

CONNECTION OF NEUROPEPTIDE Y-LIKE NEURONS IN THE NUCLEUS OF SOLITARY TRACT AND THE MOTOR NEURONS OF PHARYNGEAL MUSCLE IN THE RAT

BAO Xin Min and SHU Si Yun

(Department of Neurobiology, Zhu-Jiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282)

ABSTRACT

Connection of the neuropeptide Y-like neurons of the nucleus of the solitary tract and the pharyngeal motor neurons in the rat was investigated using PRV and NPY double immunohistochemical fluorescence method. After PRV injection into the pharyngeal muscles, numerous PRV and NPY double labeling cells were observed in the interstitial subnucleus and intermediate subnucleus of the nucleus of solitary tract in the rat. This study offers the first evidence of connection of the NPY neurons and the pharyngeal motor neurons in the rat. It is suggested that NPY may play an important role in the regulation of the motor activity of pharyngeal muscle in the rat.

Key words: Pharynx Nucleus of solitary tract Neuropeptide Y Pseudorabies virus

实验技术

巨噬细胞细胞内吞过程中膜受体流动性的测量——两种标记受体方法的比较

雷国华* 朴英杰* 吴建春** 鲍永耀*

(*中心实验室 **南方医院儿科 第一军医大学 广州 510515)

细胞膜表面受体的移动和聚集,对于细胞内吞作用和细胞内信号的产生、传导有重要意义^[1,2]。内吞作用和细胞内信号产生和传导主要由以下因素决定:第一,配体与细胞膜上相应受体的亲和力;第二,细胞膜上受体的数量;第三,配体-受体复合体在细胞膜上的聚集程度。这些因素与膜上受体的流动性有密切关系^[3,4]。

利用 FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)技术测量膜受体的流动性,通常采用的是荧光分子直接标记配体(如 ConA-FITC),通过配体与细胞膜表面受体结合来标记受体。这种标记方法适合于测量无内吞效应的细胞或受体的流动性^[5,6],但不适合测量细胞内吞过程中膜受体的流动性。本文用 ABC(Avidin Biotin Complex)法^[7,8]标记巨噬细胞膜受体,通过 FRAP 技术,首次实现了细胞

内吞过程中膜受体流动性的测量。

实验选择巨噬细胞²和伴刀豆凝集素 A(Concanavalin A, Con A),比较了用 Con A-Biotin + Avidin-FITC(ABC法)和 Con A-FITC(直接法)标记的巨噬细胞膜表面 Con A受体荧光强度,及静息状态和 ConA 刺激后巨噬细胞膜上 ConA 受体的扩散系数 D(Diffusion Coefficient)和荧光恢复率 R(Recovery)中的差异,并探讨了这两种标记细胞膜受体的方法对测量结果的影响。实验结果表明,ABC 标记方法具有测量灵敏度高、误差小的优点,可以较好地解决直接标记方法在测量细胞内吞过程中受体流动性测量的所遇到的问题。

材料和方 法

一、实验仪器和材料

激光扫描共聚焦显微镜(ACAS 570),改良的

35 mm Petri 细胞培养皿,美国 Meridian Instrument 产品。ConA、Con A-FITC、Con A-Biotin、Avidin-FITC、Hepes 购自 Sigma; RPMI-1640 粉, GIBCO 产品; 特级小牛血清购自杭川四季青生物制品公司; 18—20 g 昆明种雄性小鼠, 华南地区实验动物中心繁殖饲养。PBS 液中含有 1 mmol/L 的 CaCl_2 。

二、细胞培养

小鼠断头放血致死, 躯体用 75% 酒精浸泡 10 s, 剖腹注入 3 ml 含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 轻揉腹部, 吸取含巨噬细胞的腹腔洗液, 4000 rpm 离心 5 min, 去除上清液, 加入含 10% 小牛血清的 1640 培养液 2 ml, 配制成 10^6 cells/ml 的细胞悬液, 细胞悬液滴入培养皿, 37°C 5% CO_2 温育 2—3 h 后, 用 1640 培养液洗两次, 除去未贴壁的细胞, 在含 10% 牛血清的 1640 培养液温育 48 h。

三、ConA 受体荧光标记

ABC 法: 培养皿中巨噬细胞经过不同处理后(见结果中说明), 冷 PBS 洗三遍, 在含 Con A-Biotin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PBS 中 4°C 湿盒静置 30 min, 冷 PBS 洗三遍; 然后在含 Avidin-FITC (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PBS 液中 4°C 湿盒静置 30 min, 冷 PBS 洗三遍后测量。非特异性标记实验: 静息状态的巨噬细胞在含 Avidin-FITC (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PBS 中低温湿盒静置 30 min, 冷 PBS 洗三遍后测量。

直接法: 培养皿中巨噬细胞经过不同处理后(见结果中说明), 用冷 PBS 洗三遍, 在含 Con A-FITC (终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PBS 中 4°C 湿盒静置 30 min, 冷 PBS 洗三遍后测量。

四、受体流动性测量及数据处理

用倒置相差显微镜(Olympus IMT-2, ACAS 570 上配置的显微镜)观察并确定所要测量的培养皿中的细胞, 然后用 ACAS 570 上的 FRAP 程序确定线扫描(line scanning)的起始点、终点和光漂白点。仪器参数如下: 激发波长 488 nm (Ar^+ 激光器), 接收波长 530 nm(带宽 30 nm), 针孔(Pinhole)直径 800 μm , 线扫描步长 0.3 μm , 线扫描激光功率 4 mW; 荧光漂白的激光功率 32 mW, 漂白时间 0.9 s。在扫描开始阶段(0—200 s)每隔 10 s 进行一次线扫描; 此后(200—600 s)每隔 20 s 进行一次线扫描, 总扫描时间 600 s。所有测量均在低温下($8 \pm 4^\circ\text{C}$)空气中进行。

ACAS 570 测量膜上受体流动性 首先是根据细胞的形状确定线扫描位置、长度和光漂白点位置, 然后记录扫描线上的光漂白点的荧光强度 随时间的变化。由于培养的巨噬细胞呈扁平状, 线扫描可选取横过细胞的任意位置。根据记录的漂白前和漂白后各个时刻漂白点上的荧光强度, 利用文献^[9]推导出的公式, 计算机自动给出荧光强度与时间的曲线图, 并判断测量的数据是否满足公式要求, 随后给出受体的扩散系数 D、荧光恢复率 R。

结 果

一、不同方法标记的巨噬细胞膜上 Con A 受体荧光强度比较

图 1 显示不同标记方法巨噬细胞 Con A 受体的荧光图象。Con A-Biotin 刺激 15 min 后 ABC 标记的细胞荧光强度最高(图 1 C);

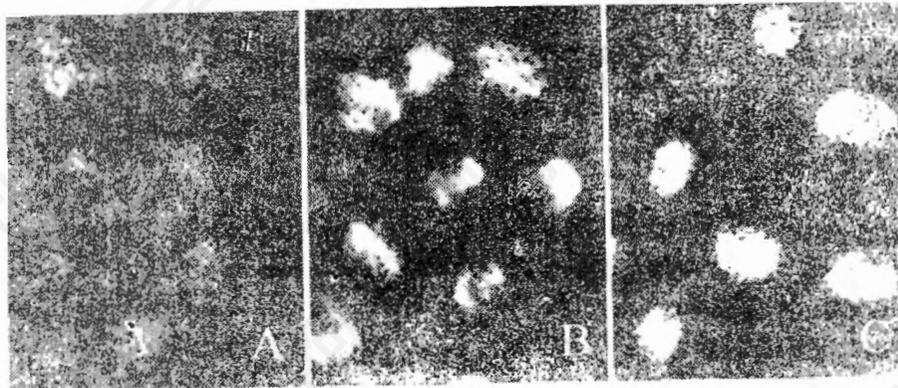


图 1 不同标记方法巨噬细胞 ConA 受体的荧光图象 $\times 40$

A: ConA 刺激 15 min 后, Con A-FITC 标记。

B: 直接用 Con A-FITC 刺激 15 min。

C: Con A-Biotin 刺激 15 min 后, Avidin-FITC 标记。

表1 不同标记方法巨噬细胞 ConA 受体的荧光强度

组别	标记方法*	荧光强度**(相对值)	
		静息状态($\bar{x} \pm SD$)	刺激15 min($\bar{x} \pm SD$)
1	ConA + Con A-FITC	-	345 ± 197
2	Con A-FITC	746 ± 177	914 ± 245
3	Con A-Biotin + Avidin-FITC	2313 ± 221	2015 ± 286

*ConA、ConA-FITC、Con A-Biotin、Avidin-FITC 的浓度均为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

** 分别为同一培养皿中 20 个细胞的测量结果。

表2 不同标记方法测量的 Con A 受体的荧光恢复率 D 和扩散系数 R

组别	标记方法*	R(% \pm SD)**		D($\bar{x} \pm$ SD)**(单位: $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$)	
		静息状态	刺激15 min	静息状态	刺激15 min
1	ConA + ConA-FITC	-	50.6 ± 18.5	-	8.67 ± 2.04
2	Con A-FITC	68.3 ± 17.5	43.5 ± 20.1	6.24 ± 1.76	2.13 ± 1.88
3	Con A-Biotin + Avidin-FITC	64.9 ± 13.5	54.6 ± 17.8	5.96 ± 1.53	2.87 ± 1.63

* ConA、ConA-FITC、ConA-Biotin、Avidin-FITC 的浓度均为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

** 分别为同一皿中 5 个细胞的测量结果。

其次是用 Con A-FITC 刺激 15 min 后, 直接法标记的细胞(图 1 B); 最低的是用 Con A 刺激 15 min 后, 直接法标记的细胞(图 1 A)。表 1 为用不同标记方法, 同一培养皿中的 20 个细胞的平均荧光强度及标准差结果。在静息状态下细胞表面的受体数目基本相同, 但表中第 2 组细胞的荧光强度明显低于第 1 组, 这是因为 Con A-FITC 的荧光发光效率低于 ABC 法标记的受体; 比较第 2 组, 刺激后的荧光强度较静息状态的荧光强度高, 显示刺激后有更多的受体与 ConA-FITC 结合; 而第 3 组细胞, 刺激后的荧光强度较静息状态低, 反映刺激后细胞膜上受体减少。

非特异性标记实验结果: 用 Avidin-FITC 标记的静息状态巨噬细胞平均荧光强度为 205, 远低于 ABC 法标记的细胞的荧光强度 2313(表 1 中第 3 组)。因此, 在受体流动性测量中忽略了非特异性标记的影响。

二、不同的标记方法测量的巨噬细胞膜 ConA 受体流动性的比较

表 2 是不同标记方法巨噬细胞膜上 ConA 受体流动性测量结果。在静息状态, 用 Con A-FITC 的细胞(第 2 组)较 ABC 法的标记的

细胞(第 3 组)受体扩散系数稍高, 但刺激 15 min 后, 第 2 组细胞的受体扩散系数却较第 3 组低。

三、巨噬细胞内吞过程中 ConA 受体流动性的变化

实验选取同一小鼠腹腔的巨噬细胞在不同皿中培养, 每一皿中测量 5 个细胞。表 3 为细胞分别在含 Con A-Biotin(10 $\mu\text{g/ml}$) 的 PBS 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育 5、15、30、40 min 后, 用 ABC 法标记, 测量所得的内吞过程中 Con A 受体荧光恢复率和扩散系数的变化。Con A-Biotin 加入细胞外液 5 min 后, 受体扩散系数从静息状态的 5.96 迅速下降到 3.74, 以后随着刺激时间的增加, 受体扩散系数呈缓慢下降趋势。

讨 论

以往研究细胞膜上受体的流动性, 多选择无内吞作用的细胞及受体, 如成纤维细胞、上皮细胞、红细胞, IgG 受体、EGF 受体, 主要测量不同状态下膜受体的流动性^[5,6]。巨噬细胞内吞过程中植物凝集素受体流动性的变化研究尚未见报道。由于植物凝集素可使巨噬细胞

表3 ABC标记法测量的巨噬细胞内吞过程中膜上ConA受体的荧光恢复率和扩散系数

组别*	R(%±SD)**	D(\bar{x} ±SD)** (单位: $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$)
静息状态	64.9±13.5	5.96±1.58
5 min	60.3±14.9	3.74±1.78
15 min	54.6±17.8	2.87±1.89
30 min	53.2±20.2	2.85±1.81
45 min	49.3±21.2	2.72±1.93

* Con A-Biotin、Avidin-FITC 的浓度均为 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

** 分别为同一皿中5个细胞的测量结果。

产生内吞作用,通常用荧光直接标记植物凝集素的方法(如Con A-FITC),在测量细胞内吞过程中植物凝集素受体的流动性中存在很大的误差。以巨噬细胞的Con A受体为例,巨噬细胞膜受体与Con A结合后,一部分受体由于内吞作用进入细胞内,一部分已与Con A结合的受体仍在细胞膜上,此时再用Con A-FITC标记细胞,仅能标记那些未与Con A结合的细胞膜上的受体(原来就存在于细胞膜,也可能来源于膜内受体循环)。因此,用这种标记方法的受体,并不是巨噬细胞膜上所有的Con A受体,实验结果显示荧光强度很低(图1A及表1第1组数据)。另一方面,在用Con A-FITC直接刺激巨噬细胞一段时间后,一部分Con A-FITC将通过受体介导内吞入巨噬细胞内部,FRAP技术中实际检测的荧光由膜上的受体荧光和细胞内荧光组成变化组成,由于细胞内部的Con A-FITC被漂白后,荧光不能再恢复,因此,这种情况下根据检测的荧光强度变化计算得出的膜受体荧光恢复率和扩散系数则偏低(表2中第2组数据)。因此,直接标记方法应用于细胞内吞过程中膜受体流动性测量存在着方法学上的缺陷。而用Con A-Biotin-Avidin-FITC标记细胞可以避免直接标记法的问题。Con A-Biotin刺激一段时间后,巨噬细胞膜上已与Con A-Biotin结合受体,可用Avidin-FITC标记;而未结合的受体,可在低温下再与Con A-Biotin结合,然后用

Avidin-FITC标记。因此,这种标记方法可使巨噬细胞膜上所有Con A受体标记上荧光,而细胞内部的Con A-Biotin不会与Avidin-FITC结合。

FRAP技术测量膜受体的流动性要求被标记的受体的荧光强度足够强,否则,测量结果因光漂白作用而有较大的误差。从Con A的分子结构来看,一个Con A分子通常只能与4-6个FITC结合;而一个Con A分子能与4-8个Biotin结合,一个Avidin可与2-4个FITC结合,假定一个Biotin和一个Avidin结合,则一个Con A分子上最终可能连接着大约18个FITC分子^[3,8]。因此,Con A-Biotin + Avidin + FITC标记的受体荧光强度是Con A-FITC标记的荧光强度三倍左右(表1第2组、第3组数据)。这使得ABC法标记的受体可以用较低强度的激发功率,获得较高的荧光强度,从而降低荧光测量过程中光漂白的影响,提高了测量的灵敏度,从表2可以看出,ABC的测量结果较直接法测量结果的标准差小。

ABC法标记的细胞,不仅可以得到受体的流动性的参量,而且可以同时测量出细胞膜上的受体数量。因为ABC法能够标记细胞膜上所有的同一类型的受体,这为研究内吞过程中细胞膜上受体的数量与受体流动性的关系提供了条件。

利用和ABC法标记受体和共聚焦显微镜,还可以有选择的测量细胞膜不同部位上受体的流动性。共聚焦显微镜可以通过改变针孔直径和聚焦位置,获得细胞膜上某一部位的受体荧光图象。例如,在本文图1C中,在巨噬细胞膜上有一些区域荧光强度较高,显示受体密度较高,因此,在这些区域内有可能会形成内吞小凹。ACAS 570用于光漂白的激光束直径为 $1.3\ \mu\text{m}$,远小于一般的细胞尺寸,因此,可以用共聚焦图象确定细胞膜上光漂白的区域,研究膜上不同区域受体的流动性差异。

ABC法标记受体可能存在着非特异性标

记的问题^[3,10]。Avidin的等电点在pH 10左右,与细胞缓冲液的pH值相差较大,因此,在缓冲液中Avidin-FITC带有一定量的电荷;而一些种类细胞膜表面在缓冲液中也带有电荷,这可能导致Avidin-FITC与这些细胞膜上带相反电荷的蛋白结合,引起非特异性荧光标记。这个问题可以用StreptAvidin-FITC或NeutraLite™Avidin-FITC(Molecular Probes, Inc产品)替代Avidin-FITC解决。它们在细胞缓冲液的pH范围内基本不带电荷^[11]。

用ABC法标记巨噬细胞的测量结果显示ConA刺激后膜受体的扩散系数和荧光恢复率与静息状态相比呈下降趋势,这可能与ConA刺激使巨噬细胞胞浆迅速酸化(5→7 min,我们测量的结果,数据未显示),降低了细胞内微丝、微管的活性^[12];也可能是由于受体介导内吞作用,使细胞膜表面受体聚焦在小的区域,限制了受体移动。

从其他研究者的实验结果^[5,6]及我们的测量结果,可以看出FRAP方法测量的膜受体的流动性均存在较大的误差,这可能是由于细胞膜上受体不均匀分布引起的。因为即使是经相同处理的细胞,由于所选择的光漂白点不同,受体的扩散速率可能也不同,从而带来较大的统计误差。从本文表3所列数据来看,随着刺激时间的增加,膜表面受体聚集程度也增加,使测量结果的标准差呈上升趋势。另一方面,由于细胞膜上受体的移动并非完全是随机扩散,因此,用基于随机扩散模型推导出的公式来计算受体流动性^[9],可能引起测量结果的系统误差。在这方面目前仍有学者不断提出新的改进模型^[9]。

摘 要

本文首次实现了细胞内吞过程中膜受体流动性的测量。实验选择巨噬细胞膜和伴刀豆凝集素A(ConA),分别用Con A-Biotin + Avidin-FITC(ABC法)和Con A-FITC(直接法)两种方法标记巨噬细胞膜Con A受体,比较了

这两种方法标记的巨噬细胞Con A受体的荧光强度;利用FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)技术,分别用两种标记方法测量了巨噬细胞Con A受体的流动性。结果显示Con A-Biotin + Avidin-FITC标记的巨噬细胞受体的平均荧光强度比用Con A-FITC标记的平均荧光强度高大约3倍;直接标记法应用于细胞内吞过程中受体流动性的测量在方法学上存在着很大的缺陷,ABC标记法适合于测量细胞内吞过程中膜表面受体的流动性的变化,且灵敏度高、误差小;ABC方法标记受体的测量结果显示,Con A刺激后巨噬细胞膜表面Con A受体的扩散系数和荧光恢复率与静息状态相比呈下降趋势。

关键词: 巨噬细胞 内吞 伴刀豆凝集素A 受体 流动性

参 考 文 献

- [1] Ralph M. S., et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 96: 1—27.
- [2] Mellman I., et al., 1986, *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 663—701.
- [3] Jacobson K., et al., 1987, *Ann. Rev. Physiol.*, 49: 162—175.
- [4] Keizer J., et al., 1985, *Biophys. J.*, 47: 79—88.
- [5] Lustyik G., et al., 1987, *Biochim. et Biophys. Acta*, 896: 57—63.
- [6] Schlessinger J., 1983, *Biopolymers*, 22: 247—353.
- [7] Wilchek M., et al., 1988, *Anal. Biochem.*, 171: 1—32.
- [8] Bauman J. GJ., et al., 1985, *Exp. Hematol.*, 13: 760—767.
- [9] Yguerabide J., et al., 1982, *Biophys. J.*, 39: 69—75.
- [10] Wilchek M., et al., 1990, *Methods in Enzymology*, Vol 184. Academic Press, London.
- [11] Haugland R. P. 1992, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 5th Edition Molecular Probes, Inc. USA.
- [12] Pokorna E., et al., 1994, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 28(1): 25—33.

MEASURING MACROPHAGE MEMBRANE RECEPTOR MOBILITY DURING RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS—COMPARING TWO METHODS OF LABELING RECEPTORS

LEI Guo Hua* PIAO Ying Jie* WU Jian Chun** BAO Yong Yao*

(*Central Laboratory, **Department of Pediatrics of Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou, 510515)

ABSTRACT

In this paper, we carried out the measurement of receptor mobility during endocytosis for the first time. We chose cultured macrophage and Concanavalin A (Con A) as experimental objects. Two methods of labeling Con A receptors were used, one labeled the receptors with Con A-Biotin+Avidin-FITC (ABC method), another labeled the receptors with Con A-FITC (Direct method). The comparisons with two labeling methods of Con A receptors fluorescence intensity were done, and the results showed the fluorescence intensity of ABC method was three times as high as that of Direct method. Applying FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) technique, the mobility of Con A receptors labeling with two methods was compared during macrophage endocytosis also. These results showed that Direct method was not suitable in measuring receptors' mobility during receptor-mediated endocytosis, however, ABC method was suitable, it had high sensitivity and small errors. The results with ABC method showed that the diffusion coefficient of Con A receptors on macrophages membrane after stimulated by Con A for different period time displayed the tendency of descend comparing with in resting state.

Key words: Macrophage Endocytosis Concanavalin A Receptor Mobility

一种用 FRAP 测定细胞间隙连接介导通讯的方法

莫永炎 罗深秋 鲍永耀* 张薇* 黄辉* 侯云霞

(第一军医大学细胞生物学与医学遗传学教研室 广州 510515)

(*第一军医大学中心实验室 广州 510515)

间隙连接(Gap junction, GJ)是目前被认为能进行细胞间物质和信息直接交流的细胞间连接形式,也是目前被发现细胞间存在的唯一通道,它参与的这种物质和信息交流被称为由间隙连接介导的细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)。GJIC在胚胎发育、细胞分化、多细胞同步化活动等方面具有至关重要的作用^[1],在这些功能研究中,

对 GJIC 测定是不可缺少的。传统的测定方法很多,如:划痕标记荧光染料示踪法^[2]、显微注射法^[3]、电生理法^[4]、同位素标记法^[5,6]等。这些方法中前三者可造成细胞膜不同程度损伤,后者有操作复杂等不足之处^[7]。

由于大型精密仪器——粘附式细胞仪(Adherent Cell Analysis and Sorting Laser Interactive Cytometer, ACAS)系列的研制成