技术与方法

基于TAXIScan细胞动态可视化系统分析中性粒 细胞迁移以及瞬时钙离子流的变化

陈 婷 梁昊岳 耿广峰 于文颖 杨晚竹 程雪莲 白 杨 付伟超 任怡然 许元富* (中国医学科学院,北京协和医学院血液病医院(血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,天津 300020)

摘要 采用新型TAXIScan细胞动态可视化系统观察和分析中性粒细胞在趋化因子甲酰甲硫氨酰--亮氨酰-苯丙氨酰(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)诱导下的迁移以及在此过程中胞质内游离钙离子浓度的变化规律。该文将小鼠骨髓中性粒细胞经Fluo-3/AM标记后用流式细胞术检测不同浓度fMLP刺激下瞬时钙离子流的变化。采用TAXIScan系统观测fMLP趋化下细胞的运动及运动过程中胞质内钙离子浓度的变化。流式细胞术结果显示,细胞在0.5、1、5 µmol/L fMLP诱导下形成的瞬时钙离子流峰值最高; TAXIScan结果显示, fMLP作用下细胞瞬时钙离子流季星于极性化出现, 且在细胞迁移过程中伴随着钙离子浓度的振荡波动, 其中1 µmol/L fMLP作用下细胞运动速度最快、路程最远。TAXIScan系统可准确、定量地分析中性粒细胞定向迁移过程及单细胞钙离子荧光的变化, 为探究中性粒细胞极性与钙离子间的关系提供新方法及参考依据。

关键词 细胞迁移;瞬时Ca²⁺流;中性粒细胞

Analysis of Calcium Transients During Neutrophil Migration by New Dynamic Visualization System TAXIScan

Chen Ting, Liang Haoyue, Geng Guangfeng, Yu Wenying, Yang Wanzhu, Cheng Xuelian, Bai Yang, Fu Weichao, Ren Yiran, Xu Yuanfu*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract To observe and analyze the cytosolic free calcium changes in neutrophils during fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)-induced cell migration, neutrophils were isolated from bone marrow by centrifugation on discontinuous percoll gradient, and then were stained with Fluo-3/AM. Cytosolic free calcium changes in neutrophils stimulated with different concentrations of fMLP ($0.02\sim100 \mu mol/L$) were detected by flow cytometry. fMLP-induced polarity and cytosolic free calciumions changes in neutrophils during migration were

收稿日期: 2016-01-14 接受日期: 2016-03-02

国家自然科学基金(批准号: 31271484、31471116)和天津自然基金重点基金(批准号: 12JCZDJC24600)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 022-23909415, E-mail: xu9669@hotmail.com

Received: January 14, 2016 Accepted: March 2, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271484, 31471116) and Natural Science Foundation of Tianjin (Grant No.12JCZDJC24600)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-22-23909415, E-mail: xu9669@hotmail.com

网络出版时间: 2016-04-22 16:59:28 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160422.1659.004.html

recorded by TAXIScan, and relevant parameters were analyzed by Diva and Volocity softwares. Flow cytometry results showed that maximum peaks of the transient calcium ions were achieved by stimulation of neutrophils with fMLP at concentrations of 0.5, 1 and 5 μ mol/L. TAXIScan results showed that fMLP (0.1~10 μ mol/L)-induced intracellular calcium transients of neutrophils were observed preferentially, which was followed by polarization and directional migration. And neutrophils migrated with a fastest velocity when stimulated with fMLP (1 μ mol/L). These results suggested that fMLP concentration-dependent changes of [Ca²⁺]_i (cytosolic free Ca²⁺ concentration) could be accurately detected by combined with flow cytometry, and TAXIScan dynamic visualization system. This study also provided a new real-time observation method for analyzing the relationship between polarity and calcium ions in neutrophils in the future.

Keywords cell migration; calcium transients; neutrophil

随着单细胞研究技术的不断发展,人们对单 细胞细胞迁移能力的分析提出了更高的要求。而 TAXIScan细胞动态分析系统无疑为此类研究提供 了新的技术支持。相比于传统的Transwell实验和细 胞划痕实验,TAXIScan提供了一种更加直观动态的 观测方式。它采用微孔径硅芯片,可自动形成严格 的趋化剂浓度梯度,细胞在水平通道中感应趋化浓 度而形成定向运动,该过程可被TAXIScan动态光学 成像系统实时捕捉^[1]。

嗜中性粒细胞是血液循环中含量最为丰富的一 类白细胞,是机体天然免疫系统抵御病原微生物的最 前沿细胞。当机体发生感染或炎症时,中性粒细胞会 第一时间外渗出血管壁并迁移至炎症部位,通过吞噬 作用和释放超氧化物、蛋白酶等来杀死细菌和微生 物[24]。这一迁移过程是通过中性粒细胞极性化和趋 化运动完成的^[5]。在中性粒细胞极性化过程中, 胞内 蛋白和脂质发生不对称重新分布, 胞内聚合肌动蛋白 在细胞膜前端聚集驱动胞膜的前突,并形成片足⁶;同 时细胞则在肌球蛋白的作用下驱动胞体的回缩,并形 成尾足。片足和尾足两者结合,构成了中性粒细胞定 向迁移的运动基础。而钙离子作为生物体内重要 的信号分子,其在白细胞迁移过程中也发挥着关键作 用。在免疫或炎症过程中,中性粒细胞表面G蛋白偶 联受体及下游信号通路被一些细胞因子、炎症介质 等激活,磷脂酶C依赖的内质网钙库释放钙离子,胞质 游离钙离子瞬时升高,进而激活其下游信使参与调节 细胞极化等活动^[8]。然而关于钙离子在单细胞定向迁 移运动中是如何变化的,目前仍然不十分清楚。

本研究将结合新型TAXIScan细胞动态成像技 术和流式细胞术,分析中性粒细胞中游离钙离子 瞬态变化与胞外甲酰甲硫氨酰--亮氨酰--苯丙氨酰 (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)浓 度之间的关系,并实时观察在不同浓度fMLP作用下 中性粒细胞定向迁移过程中胞质中游离钙离子浓度 (cytosolic free Ca²⁺ concentration, [Ca²⁺]_i)的瞬态变化, 并探讨细胞极性与[Ca²⁺]_i间的关系。

1 材料与方法

1.1 小鼠来源及主要实验试剂

雄性C57小鼠, 8~10周龄, 购于中国协和医学 院实验动物中心。Percoll分离液购自美国GE公司, Fluo-3/AM购自美国Invitrogen公司, histopaque-1119 分离液、甲酰甲硫氨酰--亮氨酰--苯丙氨酰均购自美 国Sigma公司。

1.2 小鼠骨髓中性粒细胞的分离纯化

颈椎脱臼法处死小鼠,分别剥离出胫骨、股骨、 髂骨,用HBSS-EDTA-BSA溶液反复冲取骨髓细胞 得到细胞悬液。利用Percoll分离液密度梯度离心及 histopaque-1119分离液离心后收集得到中性粒细胞, 1640(含10% FCS)培养基重悬,37 ℃孵育1 h,备用。

1.3 中性粒细胞Ca²⁺荧光探针标记

将孵育后的中性粒细胞离心、计数,取1×10⁷ 个细胞,加入终浓度5 µmol/L Fluo-3/AM,37 ℃避 光孵育45 min,而后经PBS漂洗3次后用PBS重悬。 Fluo-3/AM进入细胞内,AM体被内酯酶水解,Fluo-3 与胞质内游离Ca²⁺结合发出荧光,进而通过荧光强 度反映胞质内游离Ca²⁺水平。

1.4 流式检测

本实验所用流式细胞分析仪为BD LSRFortesssa细胞分析仪(BD公司,美国)。将Ca²⁺荧光探针 标记后的中性粒细胞单细胞悬液上机检测,激发波 长为488 nm,检测发射波长为530/30 nm, FITC电压 保持在300 V。首先记录基准荧光强度1 min,而后 迅速分别加入fMLP,使其终浓度分别为0、0.02、0.1、 0.5、1、5、10、100 µmol/L,继续记录7 min。动态 检测中性粒细胞胞质内游离钙离子瞬时变化。实验 数据采用BD FACSDiva软件测量细胞加入趋化剂后 每10 s的平均荧光强度值,然后用各平均荧光强度值 除以基准荧光值,从而得到不同浓度fMLP作用下细 胞的标准Ca²⁺荧光曲线。

1.5 TaxiScan动态观测

本实验采用TAXIScan细胞动态可视化仪(ECI 公司,日本)动态观测细胞运动情况。首先,超声 清洗、组装TAXIScan holder parts及芯片,在holder base里加入培养基1640(含10% FCS); 然后, 设置软 件拍摄程序,选择明场和FITC通道,每5 s拍摄一次, 持续拍摄10 min。在芯片的一端加入细胞浓度为 2×10⁶/mL细胞悬液1 μL, 在另一端用注射器轻轻抽 吸液体, 使细胞整齐排列在起点线上, 20倍镜下先 拍摄1 min, 而后在芯片另一端加入1 µL终浓度分 别为0.1、1和10 μmol/L的fMLP, 继续拍摄影像约 9 min。利用Volocity软件对所得细胞运动影像手动 追踪中性粒细胞的运动轨迹,进而得到细胞运动方 向、速度、荧光强度等参数并进行分析。同时运用 Volocity自动计算拍摄视频中每一帧图片中细胞的 整体平均荧光强度以及单个细胞的总荧光强度。实 验中所采用的芯片宽度为130 µm, 细胞迁移通道宽 为4 µm。

1.6 数据分析

实验数据通过BD LSRFortesssa细胞分析仪和TAXIScan细胞动态可视化仪获得,并通过BD FACSDiva软件、Volocity软件、ImageJ和Origin 8.5等进行分析。数据结果通过单因素方差分析及独立样本t检验统计,并以mean±SEM表示。

2 结果

2.1 流式细胞术检测不同浓度fMLP对中性粒细 胞胞内[Ca²⁺];的影响

采用流式细胞术观察在不同fMLP浓度条件下 中性粒细胞胞浆内游离钙离子瞬时浓度水平(图1A 和图1B)。各组先记录1 min基准荧光,而后在实验 组迅速加入fMLP,对照组加入相同体积PBS,继续记 录7 min。利用Diva软件,记录细胞每10 s的平均荧 光强度值,用各平均荧光强度值除以基准荧光值得 到变化曲线(图1C)。从图中可看出不同浓度fMLP 刺激后, FITC通道记录到的平均荧光强度均迅速达 到最高, 而后缓慢下降恢复到初始水平, 基本符合瞬 时[Ca²⁺];变化的五个时相, 包括静息期、快速上升期 (10 s)、快速下降期(150 s)、慢速下降期(250 s)和终 末期。从图中发现, 0.02 µmol/L所对应的曲线上升 时间较其他组相对迟缓, 其他各组快速上升期的斜 率是相近的。而所有组的下降趋势是基本一致的。 当fMLP浓度在0.02~0.5 µmol/L时, Ca²⁺荧光峰值随 fMLP浓度升高而增强, fMLP浓度在0.5~1 µmol/L间 Ca²⁺荧光峰值进入平台期, 当fMLP浓度达到1 µmol/L 或更高时, Ca²⁺荧光峰值反而与fMLP浓度呈反比(图 1D)。

2.2 中性粒细胞趋化轨迹分析

利用TAXIScan细胞动态可视化仪动态拍摄在 趋化剂fMLP作用下中性粒细胞的定向运动。从影 像中可以发现(图2),加入fMLP前,大部分细胞呈圆 形,处于非极性化状态;加入fMLP后,起点线上的 中性粒细胞很快感受到趋化剂所形成的浓度梯度, [Ca²⁺];快速上升,此时细胞仅出现局部胞膜的褶皱, 尚无片足的伸出。之后细胞逐渐转换为极性化状态, 并伸出伪足逆浓度梯度运动。利用Volocity软件手动 追踪细胞运动轨迹(*n*=22~30),并将细胞的起始点统 一设为坐标原点(图3A~图3D)。与对照组相比,实验 组均表现,显著的定向运动,而0.1 μmol/L fMLP作用 下发生定向运动的细胞明显少于1 μmol/L和10 μmol/L fMLP组。

进而,我们对细胞运动的路程、速度、方向进 行分析^[9]。统计发现,相比于对照组(60.690±10.160), fMLP刺激下细胞的平均运动路程(0.1 μmol/L组: 93.790±11.600, *P*<0.05; 1 μmol/L组: 148.260±1.700, *P*<0.001; 10 μmol/L组: 142.870±2.550, *P*<0.001)均显 著增加(图4A)。1 μmol/L和10 μmol/L fMLP诱导下 细胞的绝对运动速度显著高于对照组(1 μmol/L组: 0.280±0.008, *P*<0.001; 10 μmol/L组: 0.210±0.004, *P*<0.001),其中,1 μmol/L fMLP作用最强,而低浓 度fMLP作用下细胞的绝对运动速度与对照组无 显著性差异(对照组: 0.030±0.060; 0.1 μmol/L组: 0.050±0.006),如图4B所示。从图4C中可发现,对照 组和0.1 μmol/L fMLP组中性粒细胞运动的方向均 匀分布在0°~180°之间,而高浓度组细胞运动方向均 集中在0°~30°之间,且运动速度显著大于对照组和

(B) (A) 250-104 SSC-A (×1 000) 200-FITC-A 150-100-50 102 70 30 40 Time (×1 000) 0 150 200 FSC-A (×1 000) 250 10 20 50 10050 (C) (D) 7.5 - Control - 0.02 μmol/L Normalized fluorescence Normalized fluorescence 6 0.1 μmol/L 0.5 μmol/L 6.0 5 1 umol/L 5 μmol/L 10 μmol/L 100 μmol/L 4.5 4 3 3.0 2 1 1 fMLP 0 Ò 100 200 300 400 500 1000.020.1 0 5 Time (s) Concentrations of fMLP (µmol/L)

A: FSC/SSC流式图中圈出中性粒细胞群; B: FITC/时间流式图中中性粒细胞在1 μmol/L fMLP或PBS刺激前后荧光信号随时间的变化(箭头所指 为加入fMLP/PBS的时间点); C: 8种浓度fMLP作用前后中性粒细胞标准化荧光信号随时间的变化; D: [Ca²⁺],荧光峰值随fMLP浓度变化的变化, 数据以平均值±标准差表示。

A: neutrophil population was gated by FSC and SSC; B: fluorescence changes of neutrophils stimulated with 1 μ mol/L fMLP in FITC/time scatter plot (arrow represented time point with fMLP or PBS added); C: normalized fluorescences of neutrophils before and after application of fMLP with eight concentrations were plotted against time; D: normalizedpeak fluorescences of $[Ca^{2+}]_i$ were plotted against concentrations of fMLP. Data were presented as mean±SEM.





A: 1 μmol/L fMLP作用下不同时间点(第0、2、4和8 min)中性粒细胞迁移的TAXIScan明场成像; B: 1 μmol/L fMLP作用下不同时间点(第0、2、 4和8 min)中性粒细胞迁移的TAXIScan荧光成像。

A: TAXIScan bright field imaging for showing neutrophils migration at different time-points (0, 2, 4 and 8 min) after application of fMLP (1 μ mol/L); B: TAXIScan immunofluorescence imaging for showing neutrophils migration at different time-points (0, 2, 4 and 8 min) after application of fMLP (1 μ mol/L).

图2 fMLP诱导的中性粒细胞迁移的TAXIScan成像

Fig.2 fMLP-induced TAXIScanimaging of neutrophils migration



A~D: 手动追踪不同浓度fMLP作用下中性粒细胞的迁移轨迹,并将细胞的起始点合并于一点(对照组: *n*=30; 0.1 μmol/L组: *n*=30; 0.1 μmol/L组: *n*=26; 10 μmol/L组: *n*=22)。

A~D: neutrophils in in different groups were manual traced from the captured movies and realigned that all cells started from the same original point (Control group: *n*=30; 0.1 µmol/L group: *n*=26; 10 µmol/L group: *n*=22). **图3** 中性粒细胞迁移轨迹示意图



A: 不同浓度fMLP(0、0.1、1和10 μmol/L)作用下中性粒细胞平均迁移路程的比较(*n*=30); B: 不同浓度fMLP(0、0.1、1和10 μmol/L)作用下中性 粒细胞平均迁移速度的比较(*n*=30); C: 不同浓度fMLP(0、0.1、1和10 μmol/L)作用下中性粒细胞的速度随角度变化(*n*=26),角度为0°表示竖直 向上,角度为180°表示竖直向下; D: 不同浓度fMLP(0、0.1、1和10 μmol/L)作用下中性粒细胞标准化Ca²⁺荧光强度随时间变化(*n*=22),数据以平 均值±标准差表示,**P*<0.05,****P*<0.001,与对照组比较。NS表示无显著性差异,^{###}*P*<0.001。

A: comparision of mean migration lengths of neutrophils with application of fMLP (0, 0.1, 1 and 10 μ mol/L) (*n*=30); B: comparision of mean migration velocities of neutrophils with application of fMLP (0, 0.1, 1 and 10 μ mol/L)(*n*=30); C: mean velocities of neutrophils in control and 0, 0.1, 1 and 10 μ mol/L fMLP groups were plotted against angles (angle 0° means upward and 180° means downward) (*n*=26); D: normalized fluorescences of Ca²⁺ before and after application of PBS and fMLP (0, 0.1, 1 and 10 μ mol/L) were plotted against time, respectively (*n*=22). Data was presented as mean±SEM., **P*<0.05, ****P*<0.001 *vs* control group. NS means no significant difference, ^{###}*P*<0.001.

图4 中性粒细胞迁移轨迹分析

Fig.4 Cell tracks analysis of migrating neutrophils



A: fMLP(1 μmol/L)作用前后单个中性粒细胞在不同时间点的明场荧光合并成像动态变化; B: 不同浓度fMLP(0.1~10 μmol/L)作用下中性粒细胞 标准化Ca²⁺荧光峰值的比较(*n*=3); C: fMLP(1 μmol/L)作用前后单个中性粒细胞(红色箭头所指)随时间的荧光成像动态变化。数据以平均值±标 准差表示, **P*<0.05, 与0.1 μmol/L组比较。*NS*表示无显著性差异。

A: dynamic changes of merged imaging of brightfield and fluorescence channels of single neutrophilat different time-points with application of fMLP (1 μ mol/L); B: comparison of normalized fluorescence peaks of Ca²⁺with application of MLP (0.1~10 μ mol/L) (*n*=3); C: dynamic changes of immunofluorescence imaging of single neutrophil (red arrows) at different time-points before and after application of 1 μ mol/L fMLP. Data was presented as mean±SEM, **P*<0.05 *vs* 0.1 μ mol/L group. *NS* means no significant difference.

图5 单个中性粒细胞Ca²⁺荧光分析 Fig.5 Ca²⁺ fluorescence analysis of single neutrophil

低浓度组,1 μmol/L组中85%细胞的运动速度大于 10 μmol/L组。

2.3 中性粒细胞极化过程中[Ca²⁺];的变化

利用Volocity软件自动捕获视频中所有中性粒 细胞的平均荧光强度值得到图4D,时间间隔为30 s, 从图中可发现在中性粒细胞迁移过程中实验组细胞 整体荧光强度呈先增强后减弱的趋势,而0.1 μmol/L fMLP作用下荧光信号增强不显著,10 μmol/L fMLP 组与1 μmol/L fMLP组Ca²⁺荧光峰值相近,但晚于 1 μmol/L组出现。进而我们观察了不同浓度fMLP 作用下单个细胞极性化过程中Ca²⁺荧光的变化(图 5A),趋化剂刺激下细胞胞体Ca²⁺荧光随之减弱,此现 象在1 μmol/L和10 μmol/L fMLP作用下尤为明显,图 5A清晰地显示出细胞极化周期中Ca²⁺的分布情况。 统计结果显示,1 μmol/L和10 μmol/L fMLP组Ca²⁺荧 光峰值显著高于0.1 μmol/L fMLP组(P<0.05, n=3), 而1 μmol/L和10 μmol/L fMLP组(P<5B)。 值得注意的是,有些细胞在fMLP(1 μmol/L)刺激后, 细胞尾部迅速形成荧光亮斑,并一直伴随在运动过 程中,直到310 s后逐渐消失(图5C)。

在此基础上我们也分析了1 µmol/L fMLP诱导下



fMLP(1 µmol/L)作用前后单个中性粒细胞[Ca²⁺];总荧光(黑线)和伪足 长度(灰线)随时间变化。

Sum fluorescence of $[Ca^{2+}]_i$ (black line) and pseudopod length (gray line) of single neutrophil was plotted against time.

图6 单个中性粒细胞极性化分析 Fig.6 Polarity analysis of single neutrophil 单个细胞在迁移过程中伪足长度与Ca²⁺荧光的变化 (图6),利用Volocity软件测量中性粒细胞极化前及极 性化过程中细胞纵轴长度随时间的变化,时间间隔 为5 s。极化状态下纵轴长度为(13.57±0.20) μm,而静 息态下细胞在原来方向上的直径为(8.1±0.2) μm,且 细胞第一次伸长相出现在瞬时钙流之后,细胞内Ca²⁺ 荧光总强度在逐渐减弱的过程中呈振荡波动,直至 细胞停止运动。

3 讨论

中性粒细胞能产生趋化运动是其在机体中发 挥天然免疫功能的重要前提之一,在关于中性粒细 胞极性化的研究中已发现这一过程中存在胞内游离 钙离子浓度的变化。应用TAXIScan动态可视化系 统观察fMLP诱导下中性粒细胞极性化的形成,综合 了传统方法如Transwell、共聚焦显微镜等的优点, 既可以形成良好的定向迁移条件,又具有高分辨率、 高灵敏度特点,实现活细胞高速动态拍摄。而运用 流式细胞术不仅操作简便、灵敏度高,并且可在短 时间内获得大样本数据,结果更为准确可靠^[10]。本 研究将TAXIScan系统和流式细胞术相结合,分别 从群体和单细胞水平来表征中性粒细胞迁移过程 [Ca²⁺]_i的变化,并结合图像处理分析软件对细胞运 动影像进行数据分析,提供了更为严谨可靠的量化 依据。

利用TAXIScan细胞动态可视化系统我们不但 可以描绘中性粒细胞在定向迁移过程中的运动轨 迹,量化分析方向、运动速度、路程等动力学特征, 而且应用系统明场、荧光多通道拍摄融合功能可从 单细胞水平更细微地观察细胞运动过程中钙离子荧 光的分布及变化。实验结果显示,中性粒细胞在中 浓度fMLP(1 µmol/L)作用下,细胞运动速度最快,运 动距离最远,而高浓度fMLP的趋化作用反而降低。 这一结果也支持了经典的"第一信号"假说和"信号--噪声"假说理论[11]。不同浓度fMLP作用下Ca²⁺荧光 值均呈先升高后降低趋势,而无论群体还是单细胞 水平Ca²⁺荧光的瞬时升高均要早于细胞形态的改变 以及变形运动,这提示我们中性粒细胞内质网钙库 释放的Ca²⁺参与了fMLP诱导的细胞极性化的启动机 制。瞬时钙离子流减弱过程中Ca²⁺浓度振荡波动的 微小变化也能被此系统捕捉到。值得注意的是,一 些细胞在fMLP刺激下细胞尾端形成荧光亮斑,并一 直伴随在细胞运动过程中。有文献指出, [Ca²⁺]参与调 节肌球蛋白形成回缩力的过程^[7]。由此可见, [Ca²⁺],可 能不仅调控中性粒细胞极性的启动,而且参与了后 续的极性化运动。G蛋白偶联受体在激活并动员胞 内Ca²⁺活动中起关键作用,而G蛋白Ras超家族成员 Rho GTP酶亚家族在调节中性粒细胞极性过程也发 挥着重要作用,包括调控肌动蛋白聚合,肌球蛋白骨 架的形成及尾足回缩等。而有文献指出Rho家族的 异常调节与各种疾病如中性粒细胞功能异常、白血 病、贫血等密切相关^[12],那么[Ca²⁺];是否与疾病的发 生机制相关以及如何影响下游信号通路将在以后的 实验中探讨。此外,外源性钙离子也可通过钙池操 纵钙离子通道或TRPC通道进入胞质内传递信息并 调控一系列生命活动,如中性粒细胞的吞噬、脱粒 和NADPH氧化酶激活过程^[13],因此我们也可在未来 的研究中利用TAXIScan技术更加直观深入地探讨 中性粒细胞外源性Ca²⁺的相关调控功能。

从流式细胞术结果分析中我们发现,在低浓度 范围(0.02~1 μmol/L)内胞质中[Ca²⁺]_i对fMLP具有浓 度依赖性,而过高的趋化剂浓度反而使钙离子峰值 显著下降。有文献指出蛋白激酶C的激活会抑制钙 离子的释放^[14-15],高浓度fMLP可能激活了蛋白激酶 C,进而抑制了内质网Ca²⁺的释放。

本研究主要探究正常状态下中性粒细胞的趋 化迁移过程,这为未来更直观深入地研究幼稚粒细 胞或疾病微环境下中性粒细胞的迁移过程及机制 提供了参考,也为探究疾病模型中各种血细胞的运 动功能及机制建立了新的技术方法。此外,实验中 我们将拍摄间隔设置为5 s以便捕获细胞运动的更 多细节,但频繁的荧光成像会大大增加光毒性,若 使用数值孔径更高的物镜这种光毒性会被再次放 大。但相信随着活细胞染料的改进及显微成像技 术的发展,关于细胞运动的相关机制将会被更为直 观清晰地呈现。

参考文献 (References)

- Yamauchi A, Degawa-Yamauchi M, Kuribayashi F, Kanegasaki S, Tsuchiya T. Systematic single cell analysis of migration and morphological changes of human neutrophils over stimulus concentration gradients. J Immunol Methods 2014; 404: 59-70.
- 2 Chodniewicz D, Zhelev DV. Chemoattractant receptor-stimulated F-actin polymerization in the human neutrophil is signaled by 2 distinct pathways. Blood 2003; 101(3): 1181-4.
- 3 Zhelev DV, Alteraifi AM, Chodniewicz D. Controlled pseudopod

extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants. Biophys J 2004; 87(1): 688-95.

- 4 Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. Nat Immunol 2014; 15(7): 602-11.
- 5 Eddy RJ, Pierini LM, Maxfield FR. Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration. Mol Biol Cell 2002; 13(12): 4470-83.
- 6 Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell 1996; 84(3): 371-9.
- Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: Importance of localized pathways. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35(12): 1619-38.
- 8 Dixit N, Simon SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: Temporal and spatial cues for leukocyte arrest. Front Immunol 2012; 3: 188.
- 9 杨晚竹, 高亚男, 梁昊岳, 程雪莲, 于文颖, 陈 婷, 等. 显微成 像分析技术在中性粒细胞运动及吞噬功能方面的应用. 中 国实验血液学杂志(Yang Wanzhu, Gao Yanan, Liang Haoyue, Cheng Xuelian, Yu Wenying, Chen Ting, *et al.* Applications of microscopic imaging and analysis technology in studies of neutrophil movement and phagocytosis. Journal of Experimental Hematology) 2015; 37(3): 832-7.
- 10 Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López

A, Sánchez-Tusie AA, Sánchez-Guevara Y, *et al.* Measuring intracellular Ca²⁺changes in human sperm using four techniques: Conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. J Vis Exp 2013; 75: e50344.

- 11 McKay DA, Kusel JR, Wilkinson PC. Studies of chemotactic factor-induced polarity in human neutrophils. Lipid mobility, receptor distribution and the time-sequence of polarization. J Cell Sci 1991; 100(Pt 3): 473-9.
- 12 Mulloy JC, Cancelas JA, Filippi MD, Kalfa TA, Guo F, Zheng Y. Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies. Blood 2010; 115(5): 936-47.
- 13 Zhang H, Clemens RA, Liu F, Hu Y, Baba Y, Theodore P, et al. STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. Blood 2014; 123(14): 2238-49.
- 14 Chen LW, Jan CR. Mechanisms and modulation of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced Ca²⁺ mobilization in human neutrophils. Int Immunopharmacol 2001; 1(7): 1341-9.
- 15 Tsukii K, Nakahata N, Tsurufuji S, Ohizumi Y. Ca²⁺-independent synergistic augmentation of O²⁻ production by FMLP and PMA in HL-60 cells. Can J Physiol Pharmacol 1998; 76(10/11): 1024-32.