

教学研究

巨噬细胞: 一种理想的细胞骨架观察教学材料

薛雅蓉* 庄重 侯冬霞 汪水娟

(南京大学生命科学院, 南京 210023)

摘要 细胞骨架是细胞的重要结构之一,也是《细胞生物学实验》教学的重要内容。然而,在目前的教学实践中,缺乏较为理想的细胞骨架观察材料。基于对巨噬细胞易黏附、便于操作特性的了解,该研究以小鼠腹腔巨噬细胞为材料,进行了细胞骨架显示的实验探索。结果表明,无论用曲通X-100处理细胞后再用考马斯亮蓝染色还是先对细胞进行固定、透膜后再用免疫荧光法染色,均可观察到清晰的细胞骨架结构。说明巨噬细胞是一种理想的细胞骨架观察教学材料。

关键词 巨噬细胞; 细胞骨架; 细胞生物学实验; 教学材料

Macrophage: An Ideal Teaching Material for Cytoskeleton Observation

XUE Yarong*, ZHUANG Zhong, HOU Dongxia, WANG Shuijuan

(School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract Cytoskeleton is one of the important structure of cells, also is the important content of the course of *Cell Biology Experiment*. However, there is a lack of ideal cell materials for cytoskeleton observation in the current teaching practice. According to our understanding of the characteristics of easy adhesion and operation of macrophages, we used mouse abdominal macrophages as materials to observe cytoskeleton for experimental exploration. The results showed that clear cytoskeleton structure could be observed whether the cells were treated with Triton X-100 and then stained with coomassie brilliant blue or the cells were fixed, permeabilized, and stained with immunofluorescence. It shows that macrophage is an ideal teaching material for cytoskeleton observation.

Keywords macrophage; cytoskeleton; cell biology experiments; teaching materials

细胞骨架(cytoskeleton)是细胞的重要结构之一,指真核细胞中的蛋白纤维网架体系,包括微管(microtubule, MT)、微丝(microfilament, MF)和中间纤维(intermediated filament, IF)。其在细胞形态维持、细胞运动、物质运输等一系列方面均有重要作用^[1],所以,对于细胞骨架的研究是近代细胞生物学最活跃的领域之一,也是细胞生物学实验教学的重要内容。

教材及文献报道的细胞骨架教学中应用的细胞材料主要为培养的动物贴壁细胞,如肺癌细胞系A549^[2]、中国仓鼠卵巢(Chinese hamsters Ovary, CHO)细胞^[3]、HeLa细胞^[4]等;其次是植物组织^[5-6]。培养的动物贴壁细胞紧紧贴附于载玻片或盖玻片表面,便于细胞骨架的染色和洗涤等操作。但这类细胞准备工作要求条件高,并且繁琐、费时,很难一次

收稿日期: 2019-05-10 接受日期: 2019-07-05

国家重点研发计划(批准号: 2017YFD0800705)和南京大学2019年在线开放课程(慕课)立项建设项目——“细胞生物学实验”(批准号: 14010050T)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15050561305, E-mail: xueyr@nju.edu.cn

Received: May 10, 2019 Accepted: July 5, 2019

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFD0800705) and Nanjing University Teaching Reform Project for Mooc of Cell Biology Experiment (Grant No.14010050T)

*Corresponding author. Tel: +86-15050561305, E-mail: xueyr@nju.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-30 12:11:16 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1133.020.html>

性准备大量细胞材料用于教学。植物组织呈游离状态,操作时易丢失,并且容易受损。尤其是考马斯亮蓝染色法显示骨架的实验,因需要先用去垢剂曲通X-100处理细胞使膜脂和非骨架蛋白溶解,导致骨架结构极不稳定、骨架蛋白大量断裂。因此,有必要寻找更为理想的细胞骨架显示实验材料。

小鼠腹腔巨噬细胞取材容易,并且具有快速黏附于载玻片表面而具有类似于贴壁培养细胞的特点。国内外针对其骨架的研究报道很多^[7-8],但尚未见到将其用于细胞骨架教学的报道。我们以小鼠腹腔巨噬细胞为材料,进行了考马斯亮蓝染色法和荧光染色法检测细胞骨架的实验,获得了比较理想的结果。下文介绍相关实验材料、方法和结果,以供教学和巨噬细胞骨架研究参考。

1 材料和方法

1.1 供试小鼠

为6~8周龄的健康小白鼠。

1.2 4%淀粉肉汤配制

用于实验前注射于小鼠腹腔募集和活化巨噬细胞。配制方法^[9]为:0.3 g牛肉膏、1.0 g蛋白胨、0.5 g氯化钠、4.0 g可溶性淀粉、100 mL蒸馏水。高压蒸汽灭菌20 min,保存于4℃冰箱。

1.3 考马斯亮蓝染色法试剂准备

(1)M-缓冲液:60 mmol/L咪唑、50 mmol/L KCl、0.5 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、0.1 mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA)、1 mmol/L巯基乙醇,pH7.2^[9]。

(2)pH6.8的6 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS):15.3 mL 0.2 mol/L的NaH₂PO₄、14.7 mL 0.2 mol/L的Na₂HPO₄、8.6 g NaCl,加水溶解并定容至1 000 mL。

(3)1.0%曲通X-100溶液:用M-缓冲液配制。

(4)3.0%戊二醛溶液:用M-缓冲液配制。

(5)0.2%考马斯亮蓝R250染液。

1.4 荧光染色法试剂准备

(1)细胞骨架缓冲液(CB)^[10]:1.95 g吗啉乙磺酸(MES)、8.76 g NaCl、10 mL 0.5 mol/L EGTA、5 mL 1.0 mol/L MgCl₂、0.9 g葡萄糖。用1.0 mol/L的NaOH调pH至6.1,定容到1 000 mL。

(2)0.01 mol/L pH7.4的PBS溶液^[1,5]。

(3)4%多聚甲醛溶液:北京索莱宝生物科技有限公司产品,用于细胞固定。

(4)含0.1%曲通X-100的CB:用于细胞透膜。

(5)异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠 α -微管蛋白抗体:美国Sigma公司产品。

(6)罗丹明标记的鬼笔环肽:美国Sigma公司产品。

(7)抗体和鬼笔环肽稀释液:含1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS溶液。

说明:FITC标记的抗鼠 α -微管蛋白抗体和罗丹明标记的鬼笔环肽根据需要购买,可以只买其中之一或两种都买。

1.5 巨噬细胞的募集与活化

实验前2天,向每只小鼠腹腔无菌注射1 mL 4%淀粉肉汤,使更多巨噬细胞募集到小鼠腹腔并被激活。

1.6 腹腔巨噬细胞的收集

经南京大学实验动物福利伦理审查委员会审查批准,采用颈椎脱臼法或戊巴比妥钠过量麻醉法处死小鼠,向腹腔注射1 mL生理盐水,静置3~5 min后抽取腹腔液^[9],放入试管内。

1.7 巨噬细胞标本片的制备

将一张载玻片放进铺有数层湿滤纸的直径为9 cm的平皿(自制湿盒)内;给载玻片中央位置滴加1~2滴小鼠腹腔液;将平皿放进冰箱冷藏室30 min,使巨噬细胞黏附;用0.01 mol/L pH7.4的PBS溶液冲洗除去其他非黏附细胞。

1.8 荧光染色法显示细胞骨架

(1)细胞的固定与透膜处理。载玻片置自制湿盒内,向细胞标本加4%多聚甲醛溶液覆盖细胞,室温静置20 min固定细胞;用CB浸洗2次,每次5 min;再用0.1%曲通X-100透膜处理细胞10 min;用CB浸洗2次,每次5 min。

(2)细胞骨架的荧光显示。按说明书稀释FITC标记的抗鼠 α -微管蛋白抗体溶液或/和罗丹明标记的鬼笔环肽溶液,分别或先后加在细胞标本片上,使其完全覆盖细胞样品,用于分别或同时显示微管和肌动蛋白微丝。加抗体反应时间45~60 min,加鬼笔环肽反应时间30 min。因鬼笔环肽和肌动蛋白的亲合力比抗体和微管蛋白更高,同时显示时最好先加抗体。为减少荧光淬灭,应避光进行。可用锡箔纸包裹直径为9 cm的平皿(湿盒),置实验台上或37℃恒温箱里。每种溶液反应结束后,都要用PBS冲洗除去反应液,再浸泡洗涤2次,每次5 min。最后用滤纸吸干载玻片背面液体,给细胞样品处加1滴PBS并加盖玻片后用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察、

拍照。如暂时不观察, 标本需避光保存于4 °C冰箱。

1.9 考马斯亮蓝染色法显示细胞骨架

(1)细胞裂解及非骨架蛋白的去除: 载玻片置直径为9 cm的平皿中, 加1%曲通X-100溶液覆盖细胞样品, 室温静置10 min或20 min; 用M-缓冲液浸泡洗涤3次, 每次5 min。

(2)固定: 加3%戊二醛溶液固定20 min; 用PBS浸泡洗涤3次, 每次2 min。

(3)染色: 加0.2%考马斯亮蓝R250染液染色10 min; 蒸馏水冲洗去除浮液。

(4)显微观察: 普通光学显微镜观察骨架分布。

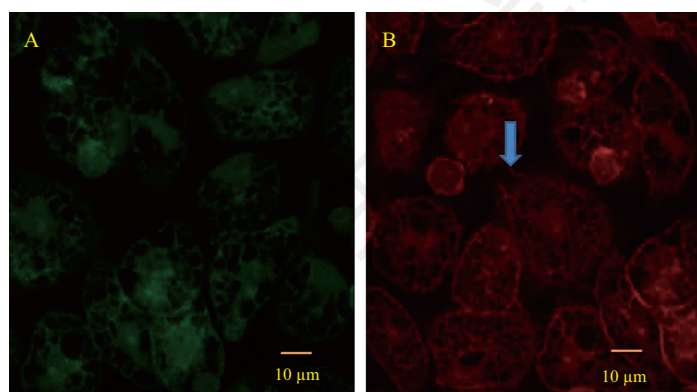
2 实验结果

按照上述方法, 得到了荧光染色的巨噬细胞骨架的共聚焦显微镜观察结果(图1)和考马亮蓝染色

法显示的巨噬细胞骨架(图2)。其中, 用FITC标记的抗鼠 α -微管蛋白抗体显示的巨噬细胞微管呈绿色(图1A); 用罗丹明标记的鬼笔环肽显示的微丝呈红色(图1B)。可以看出, 巨噬细胞的微管和微丝均在细胞周边和细胞内有分布; 在细胞内呈分散状分布, 以微丝更为丰富。从周边微丝可以看出, 细胞形态基本维持了圆形, 有的细胞表面有明显突起, 微丝也延伸至突起处(箭头所示)。

曲通X-100处理细胞时间对考马斯亮蓝染色法显示巨噬细胞骨架的影响见图2。处理10 min, 细胞形态维持较好、核尚未被破坏, 但骨架结构不很清晰(图2A); 处理20 min, 核被破坏而不可见, 骨架结构更为清晰, 但细胞也严重变形(图2B)。

上述结果说明: (1)相比于先进行细胞裂解, 对细胞先进行固定, 再进行透膜和用荧光标记物反应,

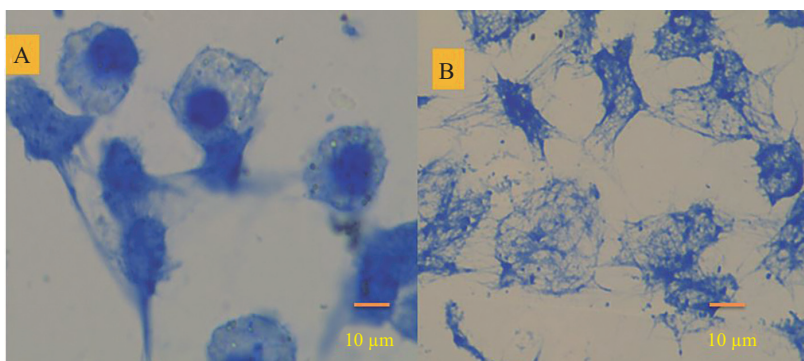


A: 用FITC标记的抗鼠 α -微管蛋白抗体显示的巨噬细胞微管, 呈绿色; B: 用罗丹明标记的鬼笔环肽显示的微丝, 呈红色。

A: macrophage microtubules shown here in green with FITC-labeled anti- α tubuloprotein antibody; B: microfilaments shown here in red with rhodamine-labeled phalloidin.

图1 荧光染色的巨噬细胞骨架共聚焦显微镜观察结果

Fig.1 Result of confocal microscopic observation of macrophage cytoskeleton stained by fluorescence



A: 曲通X-100处理细胞10 min; B: 曲通X-100处理细胞20 min。

A: the cells were treated with Triton X-100 for 10 min; B: the cells were treated with Triton X-100 for 20 min.

图2 考马斯亮蓝染色法显示的巨噬细胞骨架

Fig.2 Macrophage cytoskeleton displayed by coomassie brilliant blue staining

更有利于维持细胞形态和骨架的天然结构; (2)控制去垢剂曲通X-100的作用时间, 能够得到不同的骨架显示结果。如要维持更完整的细胞形态, 可适当缩短曲通X-100的处理时间。

3 讨论

巨噬细胞是一种重要的固有免疫细胞, 其广泛分布于人和动物体内^[11-12]。自然状态下, 腹腔中存在一定数量的巨噬细胞, 并且由于其更易获取, 腹腔液就成为小鼠、大鼠等实验动物巨噬细胞的最主要来源。如预先向腹腔注射淀粉肉汤, 还可募集并激活更多的巨噬细胞。实验时, 可先给腹腔注入生理盐水等液体进行灌洗, 然后吸取灌洗液, 其中含有腹腔巨噬细胞。这种方法较之培养贴壁细胞, 非常方便、省时, 并且, 一只小鼠的腹腔灌洗液可以制备多个细胞标本片, 用作多个学生的实验材料。如方法得当, 向腹腔注入1 mL液体, 可以抽到不少于0.8 mL腹腔液, 制备8~16张巨噬细胞标本片。

要想获取更多腹腔液并减少巨噬细胞损失, 需注意下面几个环节。(1)向腹腔注射生理盐水时避免注入皮下和内脏, 并减少从针眼流出。方法是: 用左手拇指和食指夹住并提起小鼠腹中部的皮肤和腹膜, 右手持注射器, 将针头由提起处下方空隙处扎进腹腔, 缓缓推出其中液体; 稍作停留, 使液体分散于腹腔后拔出针头; 轻揉腹部数次, 使液体与腹腔脏器充分接触; 静置3~5 min, 使更多巨噬细胞进入灌洗液。(2)抽取腹腔液时要避免腹腔液流失或肠系膜等柔软组织堵塞针头。方法是: 先沿腹中线剪开整个腹部皮肤(不要剪开腹膜), 再用双手将皮肤慢慢向身体两侧尽可能撕开, 暴露腹膜; 用左手拇指和食指夹住小鼠一侧皮肤, 左手中指从靠近背部处由外向内推压小鼠, 使腹膜下出现一个无脏器的空隙; 将注射器针头插入空隙处抽取腹腔液。一侧抽干净后再用同样方法换到另一侧抽取。(3)减少巨噬细胞因黏附于试管壁而损失。巨噬细胞易黏附于玻璃和塑料试管, 抽取的腹腔液应及时制备细胞标本片。

对比荧光染色法和考马氏亮蓝染色法, 荧光染色法因细胞先固定后透膜, 细胞及骨架结构维持较好, 并且可以选择性染微管或微丝; 但因需要用到荧光染料及相关观察设备, 成本及设备要求较高。后一方法实验要求条件较低, 多数学校可以满足, 成本也较低; 缺点是考马氏亮蓝对蛋白染色无选择性, 需要

先用去垢剂曲通X-100溶解膜结构及大部分非骨架蛋白, 导致细胞骨架蛋白缺乏支撑, 容易变形、破坏, 显示效果不及荧光染色法, 也无法区分骨架成分。具体教学中可根据实验目的和条件选择不同的方法。

综上所述, 以巨噬细胞为材料进行骨架显示, 具有材料易得、操作方便、结果可观察性强等优点, 说明巨噬细胞不失为一种理想的细胞骨架显示教学用细胞材料。

参考文献 (References)

- 1 Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010; 463(7280): 485-92.
- 2 吴佼, 李勇, 南刚, 边惠洁, 陈志南. 荧光显微成像在医学细胞生物学实验教学中的应用探索. 现代生物医学进展(Wu Jiao, Li Yong, Nan Gang, Bian Huijie, Chen Zhinan. Application of fluorescence micro-imaging system in experimental teaching of medical cell biology. *Progress in Modern Biomedicine*) 2017; 17(12): 2364-7.
- 3 王宏刚, 陈成彬, 王春国, 陈力, 宋文芹, 白艳玲, 等. 细胞骨架观察实验的改进. 实验技术与管理(Wang Honggang, Chen Chengbin, Wang Chunguo, Chen Li, Song Wenqin, Bai Yanling, et al. Improvement of observation of cytoskeleton experiment. *Experimental Technology and Management*) 2014; 31(9): 47-50.
- 4 丁明孝, 苏都莫日根, 王喜忠, 邹东方. 细胞生物学实验指南, 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2013.
- 5 赵紫平. “植物细胞骨架的显示和观察”的简化方法. 生物学教学(Zhao Ziping. A simplified method for the display and observation of plant cytoskeleton. *Biology Teaching*) 2017; 42(10): 65-6.
- 6 谢冰亮, 王语涵, 张琳, 王可玥, 卢存福. 用于本科教学的间接免疫荧光法观察玉簪保卫细胞微管骨架. 中国细胞生物学学报(Xie Bingliang, Wang Yuhan, Zhang Lin, Wang Keyue, Lu Cunfu. Observation on guard cell microtubules from *Hosta plantaginea* by immunofluorescence method for undergraduate teaching. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(5): 629632.
- 7 胡淑婷, 夏强, 曾晓丽, 包海荣, 刘晓菊. 磷脂酰肌醇3-激酶 δ -Ras同源基因家族成员A通路在慢性阻塞性肺疾病小鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能障碍中的作用. 中华结核和呼吸杂志(Hu Shuting, Xia Qiang, Zeng Xiaoli, Bao Hairong, Liu Xiaojie. Effects of PI3K δ -RhoA pathway on phagocytosis defect of alveolar macrophages in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*) 2017; 40(7): 520-6.
- 8 St-Pierre J, Moreau F, Cornick S, Quach J, Begum S, Aracely Fernandez L, et al. The macrophage cytoskeleton acts as a contact sensor upon interaction with *Entamoeba histolytica* to trigger IL-1 β secretion. *PLoS Pathogens* 2017; 13(8): e1006592.
- 9 薛雅蓉, 张晶, 华子春主编. 细胞生物学层次化实验指导(配套数字化资源), 第1版. 北京: 科学出版社, 2018.
- 10 Celis JE. 细胞生物学实验手册(导读版), 第3版, 第1卷. 北京: 科学出版社, 2008.
- 11 金伯泉. 医学免疫学. 第6版, 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- 12 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 7th edition, Saunders press (US), 2012.