

Macrophage Phagocytosis Abilities Measured with Flow Cytometry Method

Yan Zhang^{1,2,3}, Zhengguo Zhang^{2,3}, Xi Chen^{2,3}, Limei Han^{1*}, Guangwei Liu^{2,3*}

¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang

²Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai

³Biotherapy Research Center, Fudan University, Shanghai

Email: *limeihan@hotmail.com, *liugw@fudan.edu.cn

Received: Nov. 5th, 2013; revised: Nov. 19th, 2013; accepted: Dec. 4th, 2013

Copyright © 2014 Yan Zhang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Yan Zhang et al. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: Macrophage is an important component of innate immunity, which plays a great role in anti-infection immunity. The accurate evaluation of non-opsonic phagocytosis of macrophages is often used as an important indicator of the non-specific immune responses when bacterial infection occurs. In the present study, the non-opsonic phagocytosis of macrophages in resident or inflammatory infiltrating condition was quantitatively detected by using flow cytometry method combined with bacterial counts. This method will contribute to the quantitative evaluation for the ability of macrophage phagocytosis and the accurate response to macrophage immunity in a variety of physiological and pathological conditions.

Keywords: Flow Cytometry; Macrophages; Non-Opsonic Phagocytosis

流式细胞仪方法定量评价巨噬细胞非调理素吞噬能力

张 妍^{1,2,3}, 张正国^{2,3}, 陈 茜^{2,3}, 汉丽梅^{1*}, 刘光伟^{2,3*}

¹沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳

²复旦大学基础医学院免疫学系, 上海

³复旦大学生物治疗研究中心, 上海

Email: *limeihan@hotmail.com, *liugw@fudan.edu.cn

收稿日期: 2013 年 11 月 5 日; 修回日期: 2013 年 11 月 19 日; 录用日期: 2013 年 12 月 4 日

摘 要: 巨噬细胞是重要的天然免疫细胞, 在抗细菌感染等免疫应答中发挥重要调控作用。当细菌等病原微生物感染机体时, 准确的定量评价巨噬细胞的非调理素吞噬能力, 常常被作为评价机体非特异免疫应答能力的重要指标。本文采用流式细胞仪结合细菌计数的方法, 定量的检测了定居巨噬细胞和炎症浸润的巨噬细胞对细菌的非调理素吞噬能力变化。该研究方法将有助于定量评价在免疫应答中巨噬细胞的吞噬能力变化, 以更准确反映在各种生理或病理条件下巨噬细胞的免疫应答状态。

关键词: 流式细胞仪; 巨噬细胞; 非调理素吞噬

1. 引言

巨噬细胞是重要的天然免疫细胞, 在抗细菌感染

*汉丽梅和刘光伟同为通讯作者。

等免疫应答中发挥重要调控作用^[1]。当细菌等病原微生物感染机体时, 巨噬细胞常常是首先发挥免疫应答反应的细胞。在局部炎症因子刺激下, 局部定居的巨

噬细胞和炎症浸润的巨噬细胞迅速集聚到炎症局部,通过有效的吞噬反应,进行抗原处理、消化并最终提呈抗原给适应性免疫细胞,同时也伴随大量的细胞因子分泌^[2-4]。在这一巨噬细胞炎症反应过程中,对巨噬细胞吞噬能力的评价常常可以直接反映机体早期的免疫应答状态。因此,如何有效和准确的评价巨噬细胞的非调理素吞噬能力,就成为巨噬细胞免疫能力检测的重要指标。

本文采用流式细胞仪结合细菌计数的方法,定量地检测定居巨噬细胞(peritoneal macrophages; PEMs)和炎症浸润巨噬细胞(thioglycollate-induced macrophages; TEMs)对细菌的非调理素吞噬能力变化。该研究将有助于定量评价免疫应答中巨噬细胞吞噬能力,以更准确反映在各种生理或病理条件下巨噬细胞的免疫应答状态。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

C57BL/6 小鼠,体质量(20 ± 2)g,雌雄兼用,购自复旦大学实验动物中心。

2.2. 小鼠腹腔巨噬细胞悬液的制备

采用 5 mL 注射器和冷 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)反复灌洗小鼠腹腔,将灌洗液收集于 50 mL 离心管中,离心(1500 r/min, 5 min)。弃上清液,再用冷 PBS 液洗两次。混匀后用台盼蓝(北京中杉生物技术公司)染色和计数,并调整活细胞数至 1×10^6 个/mL。将 1 mL 腹腔悬液加入预先用 2% 明胶(eBioscience)处理的 24 孔板(Costar)中,于 5% CO₂ 细胞培养箱中 37°C 培养 30 min 后,将其上清液轻轻吸弃。收取贴壁纯化的巨噬细胞,并调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL 备用。台盼蓝染色观察细胞活性(活细胞率 > 95%)和小鼠巨噬细胞标志 F4/80 抗体(BD Bioscience)染色及流式细胞仪鉴定巨噬细胞纯度(阳性率 > 95%)。

2.3. 硫胶质诱导的化学性腹膜炎

采用 1 mL 无菌的 3% 硫胶质(Thioglycollate; TG)腹腔注射入小鼠诱导化学性腹膜炎,3 天后,常规腹腔灌洗,获得巨噬细胞,混匀后用台盼蓝染色(活性率 > 95%)和计数。小鼠巨噬细胞标志 F4/80 抗体染色进行

流式细胞仪鉴定巨噬细胞纯度(阳性率 > 95%)。调整活细胞数至 1×10^6 个/mL,备用。

2.4. RAW264.7 培养

RAW264.7 巨噬细胞系进行常规培养在预先用 2% 明胶(eBioscience)处理的 24 孔板(Costar)中。实验前,收取贴壁的 RAW264.7 巨噬细胞,离心收集在 15 mL 离心管中。采用台盼蓝染色和计数,调整活细胞数至 1×10^6 个/mL,备用。

2.5. 大肠杆菌标记

将带有绿色荧光蛋白(GFP)标签的质粒(pGFPuv)转入大肠杆菌,氨苄抗性筛选得到绿色标记的细菌(DH5 α -pGFPuv),细菌培养平板上保存。实验前,从培养平板上挑取一个单菌落接种于 5 mL LB(Luria-Bertani)液体培养基(胰蛋白胨 10 g/L; 酵母提取物 5 g/L 和氯化钠 10 g/L)的试管中,37°C 振荡培养 3~4 小时。采用分光光度计测定细菌 OD 值,调整细菌浓度为 10^9 CFU/mL,备用。

2.6. 流式细胞仪检测巨噬细胞吞噬百分率

将巨噬细胞和细菌按照一定比例混合培养,观察巨噬细胞对细菌的吞噬效应。为检测其吞噬效应,将培养板中待检孔上清液收集,离心并进行菌落培养和计数。同时,用冷 PBS 收取巨噬细胞,加入抗-鼠 Fc γ R 抗体 CD16/32(2.4 G2; BD Bioscience)以阻断非特异染色后,在流式测定管中加入 1×10^6 个细胞与藻红蛋白荧光素(PE)-抗-鼠 F4/80 单克隆抗体(BD Bioscience),4°C 孵育 30 min。冷 PBS 洗 2 次,上机检测。在流式细胞仪(BD Biosciences)的散点图上根据前向角(forward scatter, FS)与侧向散射角(side scatter, SS)两个参数圈定巨噬细胞群并排除细胞碎片,FL1 通道检测绿色荧光 GFP,FL2 通道检测红色荧光。应用红色荧光和绿色荧光双阳性细胞占总巨噬细胞(红荧光单阳性 + 红荧光和绿荧光双阳性)的百分数来计算其吞噬百分率。其中巨噬细胞未吞噬 *E. coli* 组作为对照实验组,而吞噬 *E. coli* 组作为实验组。

2.7. 统计学分析

实验数据均用均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 11.0 统计软件包进行检验分析。学生的非配对 *t* 检验

用来比较两组之间差异。而对于具有一个重复测量值的单因素实验,采用单因素方差分析方法。 P 值小于0.05被认为具有统计学显著性差异。

3. 结果

3.1. 巨噬细胞对细菌吞噬的时程变化

将 RAW264.7 巨噬细胞与标记了 GFP 的 *E. coli* 共同孵育不同时间后,应用 PE-F4/80 抗体标记巨噬细胞。用流式细胞仪定量检测 RAW264.7 巨噬细胞吞噬 GFP-*E. coli* 的情况。对照组检测巨噬细胞未吞噬 GFP-*E. coli* 情况(图 1(a)-(b))。如图 1 所示, RAW264.7 部分巨噬细胞吞噬 GFP-*E. coli*, 在 30 min 时阳性吞噬百分率明显增加,而后下降,但仍可以通过流式细胞仪检测到,证明巨噬细胞对 *E. coli* 具有明显吞噬效应。

3.2. 巨噬细胞对细菌吞噬的量效变化

将 RAW264.7 巨噬细胞与不同剂量的 GFP 标记 *E. coli* 共同孵育 30 min 后,应用 PE-F4/80 抗体标记巨噬细胞。用流式细胞仪定量检测 RAW264.7 巨噬细胞吞噬 GFP-*E. coli* 的情况。如图 1(c)所示,流式细胞检测显示 RAW264.7 巨噬细胞可以明显吞噬 *E. coli*,而且与 5×10^8 CFU 细菌共孵育后,巨噬细胞吞噬细菌的阳性百分率明显增加,且高于 1×10^8 CFU 组的阳性百分率,具有明显的剂量依赖性变化效应。

3.3. 定居与浸润的巨噬细胞对细菌吞噬的效应

进一步,分离小鼠腹腔定居的巨噬细胞和 3% 硫胶质诱导的化学性腹膜炎腹腔炎症浸润的巨噬细胞,并观察定居巨噬细胞与炎症浸润巨噬细胞对 *E. coli* 吞噬的变化规律。 5×10^8 CFU 的 *E. coli* 与巨噬细胞共孵育 30 min 后,取培养上清菌液进行菌培养,其菌落生长情况和细菌数被显示(图 2(a)),吞噬后定居巨噬细

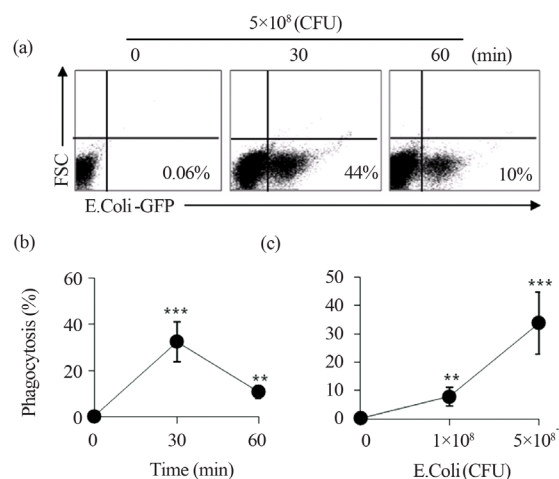


Figure 1. Time-courses and dose-effects of macrophage phagocytosis on *E. coli*. (a) Phagocytosis of RAW264.7 on *E. coli* measured by flow cytometry; (b) Time-course effects of macrophage phagocytosis on *E. coli*; (c) Dose-effects of macrophage phagocytosis on *E. coli*

图 1. 巨噬细胞对细菌 *E. coli* 吞噬的时程和量效变化 (a) 流式细胞仪检测 RAW264.7 对 *E. coli* 的吞噬; (b) RAW264.7 对 *E. coli* 吞噬效应时程变化规律; (c) RAW264.7 对 *E. coli* 吞噬效应的量效变化规律

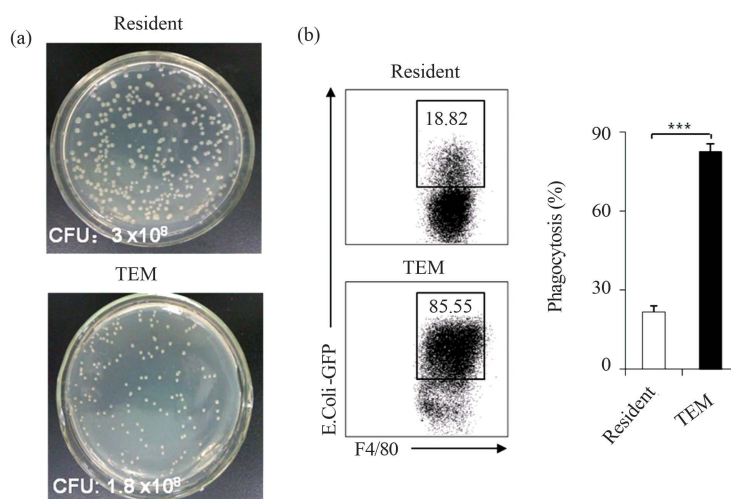


Figure 2. Phagocytosis effects of peritoneal resident macrophages (PEMs; resident) and thioglycollate-induced macrophages (TEM) on *E. coli*. (a) Following the phagocytosis of macrophages to *E. coli* in the culture plate, the supernatants were harvested and bacterial results were counted;

(b) And, the phagocytosis of PEMs and TEMs on *E. coli* was detected by flow cytometry and results were summarized

图 2. 腹腔定居巨噬细胞和硫胶质诱导的腹腔炎症浸润巨噬细胞对细菌 (*E. coli*) 的吞噬效应 (a) 在培养板中观察巨噬细胞对细菌的吞噬效应,吞噬完成后,培养上清中未被吞噬的细菌涂板进行细菌计数; (b) 流式细胞仪定量检测 PEMs 和 TEMs 对细菌的吞噬情况

胞吞噬组存活细菌数明显多于炎性巨噬细胞吞噬组,提示炎性巨噬细胞比定居巨噬细胞可能有更高的吞噬效应。

结果一致,在细菌与巨噬细胞共孵育后,采用流式细胞仪定量检测巨噬细胞吞噬 *E. coli* 的情况。结果显示,吞噬细菌的定居巨噬细胞百分率明显低于吞噬细菌的炎性浸润巨噬细胞百分率(图 2(b))。这表明,炎性巨噬细胞确实比定居巨噬细胞具有更高的吞噬效应。综合上述结果提示,炎性巨噬细胞在炎症部位集聚,对最终解决炎症可能起到至关重要的作用。同时,也表明采用流式细胞仪方法可以更精确定量巨噬细胞的吞噬能力,从而定量反映其抗细菌感染能力。

4. 讨论

单核巨噬细胞系统是机体的主要防御系统之一,具有非调理素依赖的和抗体及补体等调理素依赖的吞噬细菌或异物的吞噬清除功能^[4-6]。*E. coli* 常被作为经典的吞噬功能检测物,并通过检查巨噬细胞对 *E. coli* 的吞噬能力和速率来检测该系统的功能^[7,8]。应用预先荧光标记的 *E. coli* 或其他细菌结合流式细胞仪方法可以检测巨噬细胞吞噬能力强弱和比较巨噬细胞不同亚群的吞噬效应,以评价机体单核巨噬细胞系统的功能^[9]。同时结合未被吞噬的细菌计数等方法,可以间接反映巨噬细胞对细菌吞噬能力变化。传统的巨噬细胞吞噬能力评价是采用 Gimesa 染色,光镜下观察巨噬细胞吞噬细菌的情况,并在镜下计数获得巨噬细胞对细菌的吞噬指数^[8]。流式细胞仪检测和传统方法相比其优点是可以定量检测巨噬细胞吞噬率,较之传统 Gimesa 染色检测吞噬指数等方法更敏感。由于流式细胞仪属于高精度仪器,价格昂贵,可能在一定程度上限制了该方法的广泛应用,但是对于基础科学研究和重要病理过程巨噬细胞功能评价将大有帮助。

将多染色流式细胞仪技术进一步应用于此项检测,可以同时检测巨噬细胞多个亚群吞噬能力的测定与功能比较,其优越性将进一步提高。

项目基金

国家自然科学基金项目(No. 31171407; 81273201)、上海市科委基础研究重点项目(No.12JC1400900)和上海市教委重点项目(No.14ZZ009)。

参考文献 (References)

- [1] Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., et al. (2012) A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, **37**, 302-313.
- [2] Potian, J., Rafi, W., Bhatt, K., McBride, A., Gause, W. and Salgame, P. (2012) Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, **208**, 1863-1874.
- [3] Cramer, R., Rivera, A and Hohl, T. (2011) Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: What have we learned? *Current Opinion in Infectious Diseases*, **24**, 315-322.
- [4] Kim, B., Shenoy, A., Kumar, P., Das, R, Tiwari, S. and Macmicking, J. (2012) A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science*, **332**, 717-721.
- [5] Jantsch, J., Chikkaballi, D. and Hensel, M. (2011) Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. *Immunological Reviews*, **240**, 185-195.
- [6] Akira, S., Misawa, T., Satoh, T. and Saitoh, T. (2013) Macrophages control innate inflammation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **15**, 10-18.
- [7] Liu, G., Ma, H., Jiang, L., Peng, J. and Zhao, Y. (2007) The immunity of splenic and peritoneal F4/80(+) resident macrophages in mouse mixed allogeneic chimeras. *Journal of molecular medicine*, **85**, 1125-1135.
- [8] Dai, W., Kohler, G. and Brombacher, F. (1997) Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. *The Journal of Immunology*, **158**, 2259-2267.
- [9] Bourgeois, C., Majer, O., Frohner, I., Lesiak-Markowicz, I., Hildering, K., Glaser, W., et al. (2010) Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling. *The Journal of Immunology*, **186**, 3104-3112.