

[文章编号] 1000-2200(2004)05-0388-03

·基础医学·

# 流式细胞术检测小鼠中性粒细胞吞噬功能的方法学探讨

赵修春<sup>1</sup>, 姚春艳<sup>2</sup>, 李柏青<sup>2</sup>, 徐凤珍<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的: 建立用流式细胞术检测小鼠中性粒细胞(PMN)吞噬功能的方法。方法: 用不同缓冲液制备荧光素(FITC)标记葡萄球菌或大肠埃希菌, 流式细胞术检测细菌 FITC 标记率。小鼠全血与 FITC 标记细菌 37℃ 共育 10~20 min, 溶解红细胞后用流式细胞术检测小鼠 PMN 荧光强度的变化, 计算 PMN 吞噬率。结果: 用 PBS(pH 7.2) 标记金黄色葡萄球菌效果好, 用碳酸盐缓冲液(pH 9) 标记大肠埃希菌效果好。小鼠 PMN 对金黄色葡萄球菌的吞噬率低, 对大肠埃希菌的吞噬率高。结论: 用流式细胞术检测小鼠 PMN 吞噬 FITC 标记大肠埃希菌是测定小鼠 PMN 吞噬功能的简便、快速和重复性好的方法。

**[关键词]** 细胞学技术; 流式细胞术; 嗜中性粒细胞; 吞噬作用; 小鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 446.113 [文献标识码] A

## A methodology for detection of phagocytosis of murine neutrophils by flow cytometry

ZHAO Xiu-chun, YAO Chun-yan, LI Bai-qing, XU Feng-zhen

(Department of Respiratory Disease, Affiliated Hospital Bengbu Medical College, Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish the method for detection of phagocytosis of murine neutrophils by flow cytometry. **Methods:** *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) in different buffers. The efficient rate of labeling was assessed by flow cytometry. Whole blood taken from mice were incubated with FITC labeled bacteria at 37℃ for 10—20 min, followed by lysing red blood cells. The fluorescent intensity of neutrophils was measured as phagocytotic rate by flow cytometry. **Results:** The good labeling of *S. aureus* and *E. coli* were obtained in PBS (pH 7.2) and carbonate buffer (pH 9), respectively. The percentage of phagocytosis of *E. coli* was higher than that of *S. aureus* by murine neutrophils. **Conclusions:** Detection of phagocytosis of FITC labeled *E. coli* by flow cytometry is simple, rapid and reproducible method for measuring phagocytotic activity of murine neutrophils.

**[Key words]** cytological technics; flow cytometry; neutrophils; phagocytosis; mice

嗜中性粒细胞或多形核细胞 (polymorphonuclear cells, PMN) 是机体天然免疫的主要免疫细胞。测定 PMN 对细菌的吞噬率是反映 PMN 功能的常用方法之一, 通常采用对吞噬细菌的 PMN 染色后在显微镜下观察的方法。也有研究者用流式细胞仪检测 PMN 的吞噬功能<sup>[1,2]</sup>。近年来国外已有商品化的试剂盒可供应用, 但价格昂贵。我们在检测小鼠 PMN 吞噬细菌的实验中发现, 小鼠 PMN 在其外周血白细胞中所占比例仅为 10%~25%, 且其形态较小, 染色后在显微镜下观察的方法检测其对细菌的吞噬率较为困难。本文建立用流式细胞术检测小鼠 PMN 的吞噬功能, 以求找到一种简便、客观和重复性好的方法。

## 1 材料与方法

1.1 试剂、细菌、动物及仪器 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和二甲基亚枫 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Merck 公司; 金黄色葡萄球菌 (金葡菌) 由本院微生物学教研室保存提供; 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  由本院免疫学教研室保存提供; 昆明种小白鼠由本院实验动物中心提供; 流式细胞仪 (FACS Calibur) 为美国 BD 公司产品。

1.2 荧光素标记细菌的制备 取对数生长期的金葡菌或大肠埃希菌, PBS 洗涤 2 次。用 PBS (pH 7.2) 或碳酸盐缓冲液 (pH 9~9.5) 配成浓度为 0.5  $\times 10^9$ /ml 的悬液, 加入二甲基亚枫配成的 FITC 溶液 (10 mg/ml), 使 FITC 在菌液中的终浓度为 5  $\mu$ g/ml。然后置 37℃ 1~1.5 h, 取出离心, 弃上清, PBS 洗涤 2 次; 1% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 2 次, 配成浓度为 1  $\times 10^9$ /ml 悬液, 避光保存于 4℃ 备用。

1.3 细菌标记率检测 用流式细胞仪检测细菌的 FITC 标记率时, 先在二维点阵图 (Dot plot) 上设定

[收稿日期] 2004-06-30

[作者单位] 1. 蚌埠医学院附属医院呼吸内科 (现工作单位: 广东省广州市卫生学校, 510000), 安徽蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院免疫学教研室, 安徽蚌埠 233003

[作者简介] 赵修春 (1971—), 女, 安徽涡阳县人, 硕士。

FSC 为 E01 和 Log, 设 SSC 为 Log, 然后在 FSC/SSC 二维点阵图上检测细菌, 选取细菌区域为 R<sub>1</sub>, 然后在 SSC(Log) 和 FL1(FITC) 二维点阵图上以细菌区域(R<sub>1</sub>)设门, 检测 FITC 荧光强度, 以确定细菌标记率。

1.4 小鼠 PMN 吞噬 FITC 标记细菌的检测 取小鼠抗凝全血 100 μl, 加入 1.5 ml Eppendorf 离心管, 置冰上 10 min, 然后加入 1×10<sup>9</sup>/ml FITC 标记的菌液 10~20 μl, 混匀, 置 37℃ 水浴, 10~15 min 后迅速取出放入冰中 10 min。把样本移入流式测定用试管, 加冰冷的 PBS 洗涤一次, 弃上清, 加入氯化铵溶血剂 2 ml, 室温下放置 10 min, 离心, 弃上清。冰冷的 PBS 再洗涤一次, 弃上清, 1%PFA 固定 30 min 后用流式细胞仪检测。同时作 0℃ 15 min 对照、单独全血对照。用流式细胞仪检测 PMN 吞噬率时, 先在 FSC 和 SSC 二维点阵图选取 PMN 区域, 然后再以 SSC 和 FL1(FITC) 二维点阵图检测 FITC 阳性的 PMN 作吞噬细菌的 PMN, 一般每个样本均测定 10 000 个细胞数, 并照以下公式计算 PMN 吞噬率:

$$\text{PMN 实际吞噬率} = 37^\circ\text{C 吞噬率} - 0^\circ\text{C 吞噬率}$$

## 2 结果

2.1 标记条件对不同细菌标记率的影响 用 FITC 标记金葡菌和大肠埃希菌时, 发现缓冲液的 pH 值对标记率有不同的影响。用 FITC 标记金葡菌时, 在 PBS(pH 7.2) 中 1 h 即可使标记率达 90% 以上; 用同样 PBS(pH 7.2) 标记大肠埃希菌 1 h 标记率仅为 22% 左右, 时间延长到 3 h 标记率也仅为 42%。而改用碱性碳酸盐缓冲液(pH 9~9.5) 作大肠埃希菌标记缓冲液时, 作用 1 h、2 h 和 3 h 标记率分别为 89%、90% 和 93% (见图 1、2)。

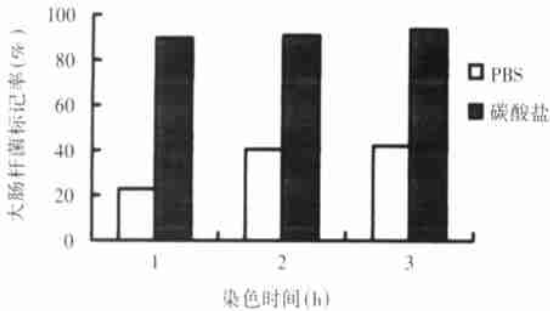


图 1 PBS 及碳酸盐缓冲液对 FITC 标记大肠埃希菌的不同作用

2.2 小鼠 PMN 对荧光素标记不同细菌的吞噬率

实验中发现小鼠 PMN 对 FITC 标记的金葡菌的吞噬率较低, 37℃ 20 min 为 40%; 而对 FITC 标记的大肠埃希菌的吞噬率较高, 37℃ 20 min 为 80.17%。

2.3 小鼠 PMN 吞噬 FITC 标记大肠埃希菌的动力学 小鼠 PMN 与 FITC 标记大肠埃希菌在 37℃ 作用不同时间后, PMN 的吞噬率在 0、5、10、15、20、30 min 时分别为 3.65%、48.85%、82.22%、87.87%、90.87%、88.23%; 在 15 min 左右即达到平台, 20 min 至 30 min 时渐下降。小鼠 PMN 吞噬 FITC 标记大肠埃希菌的流式分析见图 3。

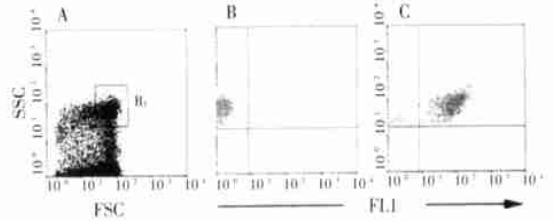


图 2 FITC 标记大肠埃希菌前后荧光强度变化 [A 为确定细菌的流式分析图, R<sub>1</sub> 为选定的大肠埃希菌区域; B 为未标记大肠埃希菌; C 为用 FITC 标记大肠埃希菌 3h 后 FITC 阳性大肠埃希菌比率 (39%)]

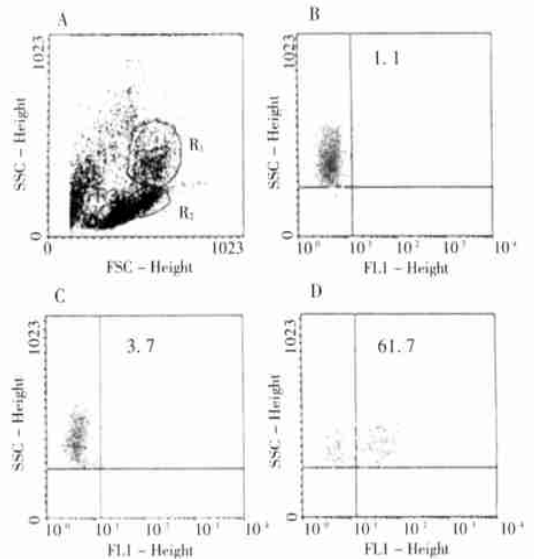


图 3 小鼠 PMN 吞噬 FITC 标记大肠埃希菌的流式分析图 (A 为小鼠外周血溶血后白细胞流式分析图, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 分别是 PMN、单核细胞; B 为未加标记细菌的小鼠 PMN; C 为加标记细菌后置 0℃ 15min 时 PMN; D 为加标记细菌置 37℃ 作用 15min 时的 PMN)

## 3 讨论

检测 PMN 功能最常用的方法之一就是检测其对细菌的吞噬率, 传统方法是取外周血与细菌混合作用后涂片染色, 在显微镜下观察 PMN 对细菌的吞噬率。该方法一般要寻找 200 个以上 PMN 中吞噬细菌 PMN 数量, 操作较烦琐, 且有主观因素影响等缺点; 检测小鼠 PMN 吞噬活性时, 由于小鼠 PMN 在其外周血白细胞中的比例仅为 10%~25%, 且形态较小, 显微镜下观察其对细菌的吞噬率更为困难。因此, 已有研究者报道用流式细胞术测定 PMN 对荧光素标记细菌的吞噬功能<sup>[1, 2]</sup>, 但实际

应用的报道不多。

近年来,陈卫国等<sup>[3]</sup>用绿色荧光蛋白基因转染方法标记大肠埃希菌,用于观察 PMN 吞噬细菌动力学,但该方法仍须在荧光镜下观察,尤其在观察 PMN 的吞噬率时仍需人工计数,受主观判断的影响。Gaforio 等<sup>[4]</sup>用 SYTOX Green 染料标记大肠埃希菌,用流式细胞仪检测 PMN 的吞噬功能。但该荧光染料价格较高,而本实验方法选用的 FITC 是更常用和价格低的荧光染料,而检测效果非常理想。实验中发现小鼠 PMN 对大肠埃希菌的吞噬是一个非常迅速的过程,5 min 时吞噬率即达到 45%,10 min 即接近 80%,20 min 即达到平台。陈卫国等<sup>[3]</sup>用绿色荧光蛋白标记大肠埃希菌观察 PMN 吞噬的全过程,发现 PMN 吞噬的整个过程需要约 11 min,故实验中检测 PMN 吞噬功能时间以 10 min 左右为佳。在实验过程中体会到,PMN 与标记细菌作用时的温度对吞噬率的影响也很大,因此必须严格控制作用时的温度,在终止吞噬作用时必须立即把样本置入冰中,洗涤时用冰冷 PBS,若不严格控制温度,细胞在温度升高时恢复吞噬功能,影响实验结果的准确性。另外,还须注意到,本方法也受小鼠血液样本和血细胞质量的影响,有时发现在流式图上血液细胞群分界不清楚,很可能与血液体外放置时间过长、导致 PMN 开始凋亡或自溶有关,这种情况将严重影响检测效果,导致检测结果不准确。实验中曾参照文献<sup>[1]</sup>应用苔盼蓝作淬灭剂,以期把粘在细胞表面的荧光素标记细菌的荧光淬灭,但对比实验发现加入和不加苔盼蓝在 0℃ 15 min 的实验结果没

有明显差别,故本实验未用苔盼蓝作淬灭剂。

流式细胞术检测 PMN 吞噬功能与用一般显微镜下观察小鼠 PMN 吞噬细菌的方法相比有明显的优点,除了可避免因小鼠 PMN 形态小、比例低、镜下不易观察、易受血涂片质量、染色状况、观察者经验及主观因素较大等不利因素的影响外,该方法检测的 PMN 实际数量一般在数千个以上,测量快速,客观性强,正如 White-Owen 所说<sup>[2]</sup>,该方法无须分离 PMN,简便、经济、重复性好。

本实验结果也充分证明流式细胞术检测 PMN 吞噬 FITC 标记大肠埃希菌确实是一种简便、快速和重复性好的方法。我们已经将该方法用于检测 IL-10 在体外对小鼠 PMN 吞噬功能的影响,将另文报道。相信本方法也可用于检测不同生物制剂或其它药物对 PMN 吞噬功能的影响。

(致谢:感谢病原生物学教研室管俊昌老师提供金黄色葡萄球菌)

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Sahlin S, Hed J, Rundquist I. Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay[ J ]. *J Immunol Methods*, 1983, 60(1-2): 115~124.

[ 2 ] White-Owen C, Alexander JW, Sramkoski RM, et al. Rapid whole blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis[ J ]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(8): 2 071~2 076.

[ 3 ] 陈卫国,洪志刚,何冬红,等.用基因标记技术实时观察中性粒细胞吞噬病原体[ J ]. *中华检验医学杂志*, 2000 23(3): 141~143.

[ 4 ] Gaforio JJ, Sernak MJ, Ortega E, et al. Use of SYTOX Green dye in the flow cytometric analysis of bacterial phagocytosis[ J ]. *Cytometry*, 2002, 48(2): 93~96.

副肿瘤性神经系统综合征的临床分型、相关肿瘤及免疫学研究 (正文见 377 页)

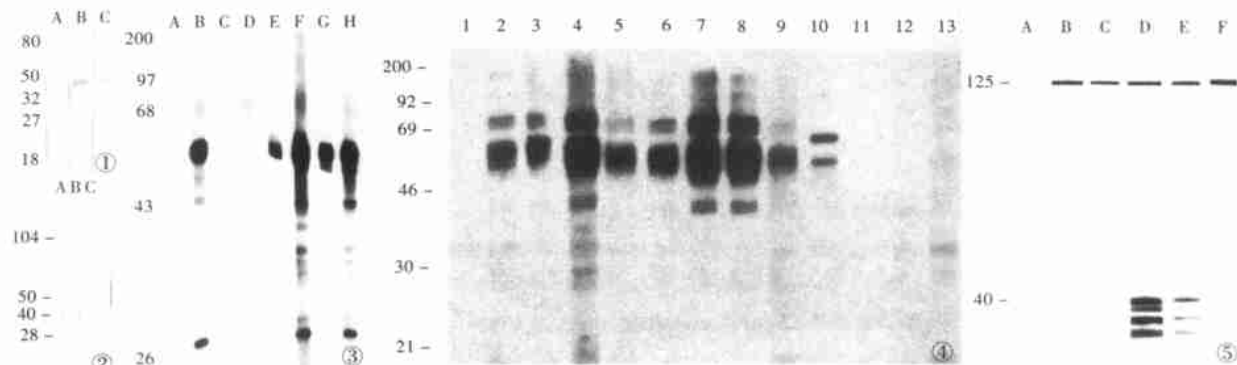


图 1 抗-Hu 抗体主要识别神经细胞核中提取物 35 000~40 000 的多条蛋白抗原带(A:阴性对照,B:阳性对照,C:抗-Hu 抗体阳性患者) 图 2 利用基因工程已经克隆 HuD 纯化蛋白,抗-Hu 抗体与之形成单一的 40 000 条带(A、B、C 均为抗-Hu 抗体阳性患者) 图 3 抗-Yo 抗体识别小脑浦肯野细胞提取物中分子量为 34 000 和 62 000 两条蛋白抗原带(A:阴性对照,B:阳性对照,C、D:抗-Yo 抗体阴性患者,E、G:抗-Yo 抗体阳性患者的脑脊液,F、H:抗-Yo 抗体阳性患者血清) 图 4 抗-Ri 抗体识别 CNS 神经细胞核中 55 000 和 80 000 两条蛋白抗原带(1:阴性对照,2:阳性对照,3~10:阳性患者,11~13:阴性患者) 图 5 抗-Amphiphysin 抗体主要识别 CNS 神经元突触囊泡中 125 000 的蛋白抗原带[A:阴性对照,B:阳性对照,C、D、E、F:阳性患者,其中 D、E 患者血清中均含有抗-Hu 抗体(阳性)]