

流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬 荧光素标记结核分枝杆菌的方法学探讨

金齐力, 姜丽娜, 姚春艳, 闵宏林, 李柏青

[摘要] 目的: 建立流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬荧光素标记结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 的方法。方法: 用不同浓度荧光素 (FITC) 标记 Mtb, 流式细胞术检测 FITC 对 Mtb 的标记率。健康人外周全血与 FITC 标记 Mtb (FITC-Mtb) 于 37 °C 共孵育 10 ~ 120 min, 溶解红细胞, 洗涤后加台盼蓝淬灭未吞噬的 FITC-Mtb 的荧光, 流式细胞术检测 FITC 阳性单核细胞的数值, 计算单核细胞对 Mtb 的吞噬率。FITC-Mtb 与佛波醇酯 (PMA) 激活分化的 THP-1 细胞以 10 : 1 的比例共孵育 1 ~ 6 h, 或以 1 : 1 ~ 100 : 1 的比例孵育 1 h 和 2 h, 用同样的方法检测吞噬率。结果: FITC (50 μg/ml) 与 Mtb 作用 2 h 的标记率达 92%。人单核细胞对 FITC-Mtb 的吞噬率从 10 min 的 34.68% 增加至 120 min 的 79.90%。THP-1 细胞对 FITC-Mtb 的吞噬率从 1 h 的 30% 增加至 6 h 的 81%。FITC-Mtb 与 THP-1 细胞以 100 : 1 比例孵育 1 h, 吞噬率达平台 (81%); 以 50 : 1 的比例孵育 2 h, 吞噬率达平台 (82%)。未加台盼蓝淬灭时, 单核细胞在 10 min 和 120 min 对 FITC-Mtb 的吞噬率与加台盼蓝淬灭相比, 分别增加 29% 和 6%; 而未加台盼蓝淬灭时, THP-1 细胞在 1 h 和 6 h 对 FITC-Mtb 的吞噬率与加台盼蓝淬灭相比分别增加 1% 和 7%。结论: 流式细胞术检测人单核巨噬细胞吞噬 FITC 标记 Mtb 是测定单核巨噬细胞对 Mtb 吞噬活性的简便、快速和重复性好的方法。

[关键词] 结核杆菌; 流式细胞术; 单核巨噬细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 378.9; R 446.113 **[文献标识码]** A

A method for detection of monocyte/macrophage phagocytosis of fluorescent labeled *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry

JIN Qi-li, JIANG Li-na, YAO Chun-yan, MIN Hong-lin, LI Bai-qing

(Department of Immunology, Bengbu Medical College; Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for detection of monocyte/macrophage phagocytosis of fluorescent labeled *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) by flow cytometry. **Methods:** Mtb was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) at different concentrations. The efficient labeled rate was detected by flow cytometry. Whole blood taken from healthy subjects were incubated with FITC labeled Mtb at 37 °C from 10 min to 120 min, followed by lysing red blood cells, washings, and then quenched the fluorescein of Mtb that not phagocytosed with trypan blue. The amount of monocytes with positive FITC were measured as phagocytosis rate by flow cytometry. FITC labeled Mtb and phorbol myristate-differentiated THP-1 cells as macrophages were incubated from 1 h to 6 h with the ratio of 10 : 1, or incubated for 1 h and 2 h at the ratios from 1 : 1 to 100 : 1, and the phagocytosis rates were detected by flow cytometry as same method above. **Results:** The efficient labeled rate for Mtb was 92% when incubated with FITC at the concentration of 50 μg/ml. The percentages of monocyte phagocytosis of Mtb were increased from 34.68% to 79.90% in coculture time from 10 min to 120 min. The percentages of THP-1 macrophage phagocytosis of Mtb were increased from 30% to 81% for 1 h and 6 h of coculture. The THP-1 cell phagocytosis of Mtb were reached platform when FITC labeled Mtb incubated with THP-1 cells with at the ratio of 100 : 1 for 1 h (81%), or at the ratio of 50 : 1 for 2 h (82%). After quenched with trypan blue, the percentages of monocyte phagocytosis of Mtb decreased by 29% in 10 min and by 6% in 120 min, whereas the percentages of THP-1 cell phagocytosis of Mtb decreased by 1% in 1 h and 7% in 6 h. **Conclusions:** The application of flow cytometry to measure monocyte/macrophage phagocytosis of FITC labeled Mtb is simple, rapid, and reproducible method.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; flow cytometry; mononuclear macrophage

[收稿日期] 2007-12-14

[基金项目] 安徽省教育厅省高校重点实验室重点科研项目 (2004Sys008); 安徽省教育厅自然科学基金资助项目 (2006kj122zc)

[作者单位] 蚌埠医学院 免疫学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 金齐力 (1979 -), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 李柏青, 研究生导师, 博士, 教授, E-mail: baiqingli@bbmc.edu.cn.

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 感染引起的, 是目前世界上死亡率最高的慢性传染病。Mtb 主要侵入单核巨噬细胞, 可被杀伤分解, 或受抑制, 也可增殖或长期存留在细胞内。测定单核巨噬细胞对 Mtb 的吞噬率是研究 Mtb 感染单核巨噬细胞模型建立与否的常用方法之一, 通常采用对吞噬 Mtb 的单核巨噬细胞行抗酸染色后在显微镜下观察的方法。近年来也有研究者用

流式细胞术检测单核巨噬细胞的吞噬功能^[1,2],但尚未见用流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬 Mtb 的报道。本文用流式细胞术检测单核巨噬细胞对荧光标记的 Mtb 的吞噬作用,以期建立一种简便、快捷、准确和重复性好的方法。

1 材料与方 法

1.1 试剂、细菌、细胞和仪器 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Merck 公司;新生牛血清 (NBS) 购于杭州四季青生物公司; Mtb H37Ra (批号:9302025), 购于中国药品生物制品检定所北京菌种保藏中心;人单核细胞系 THP-1 细胞购自美国 American Type Culture Collection 公司,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基传代培养。流式细胞仪 FACS Calibur 为美国 Becton Dickinson 公司产品;超声细胞粉碎机 JY-II 型为宁波新芝生物科技公司产品。

1.2 Mtb 菌悬液的制备^[3,4] 在本实验室将 Mtb H37Ra 培养于苏通液体培养基中,当达到对数生长期时(约 1 个月),取出经 56 °C 1 h 灭活后用含 0.05% Tween-80 的无菌 PBS 洗 3 次,反复振荡后静置 15 min,待成团的 Mtb 下沉后,取上部悬液进行超声,使其分散为单个菌。抗酸染色后显微镜下观察,为单个菌悬液,用 RPMI-1640 调细菌浓度为 3×10^8 /ml,待用。

1.3 FITC 标记 Mtb 参考 Ezekowitz 等^[5] 标记细菌的方法标记 Mtb,用 DMSO 配制 FITC 溶液 (10 mg/ml),加入 Mtb 悬液中,使 FITC 终浓度分别为 20 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml。然后置 37 °C 2 h,取出离心后弃上清,用含 0.05% Tween-80 的无菌 PBS 洗 3 次;最后用 RPMI-1640 配成浓度为 3×10^8 /ml 的细菌悬液,避光保存于 4 °C 备用。

1.4 Mtb 标记率检测 参照文献^[6] 中的检测细菌标记率的方法,用流式细胞仪检测 Mtb 标记率,检测时先在二维点阵图上设定 FSC 为 E01 和 Log,设 SSC 为 Log,然后在 FSC/SSC 二维点阵图上检测 Mtb,选取 Mtb 区域为 R1,然后在 SSC (Log) 和 FL1 (FITC) 二维点阵图上以 Mtb 区设门,检测 FITC 阳性 Mtb 的比例,以确定 Mtb 的 FITC 标记率。

1.5 外周血单核细胞吞噬 FITC-Mtb 的检测 取健康成人抗凝血每管 50 μ l,加入流式管中,设阴性对照管和实验管,实验管分台盼蓝淬灭管和未淬灭管。阴性对照管加入未标记 Mtb 悬液,实验管加入 FITC-Mtb 悬液,分别为每管 10 μ l,充分混匀后于

37 °C 孵育 10 min、30 min、60 min、120 min 后迅速取出,加入 1 ml 冰冷的 PBS 洗 2 次,弃上清液,加入预热的氯化铵溶血剂 3 ml,37 °C 水浴 15 min,离心,弃上清,冰冷的 PBS 再洗 2 次,加入 0.125% 的台盼蓝 (pH 4.4) 30 μ l,作用 3 min,以淬灭单核细胞外黏附的 Mtb,流式细胞仪进行检测。同时作 0 °C 对照、单独全血对照。用流式细胞仪检测单核细胞吞噬率时,先在 FSC 和 SSC 二维点阵图选取单核细胞区域,然后再以 SSC 和 FL1 (FITC) 二维点阵图检测 FITC 阳性的单核细胞作吞噬 Mtb 的单核细胞,单核细胞检测 2 000 个靶细胞, FITC 阳性单核细胞比例即为单核细胞吞噬率。

1.6 THP-1 细胞吞噬 FITC-Mtb 的检测 复苏 THP-1 细胞,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,收获指数生长期细胞,以 10^5 浓度接种于 6 孔细胞培养板,每孔 2 ml 细胞悬液,加入 PMA,作用浓度为 40 ng/ml,24 h 后细胞发生巨噬样变化(贴壁生长,形态不规则,有伪足伸出),用预温的培养液轻轻吹去未贴壁及贴壁不紧的细胞,弃上清液,加入含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养液轻轻悬起细胞,计数后调细胞浓度为 3×10^6 /ml。取 100 μ l 细胞加入流式管中, Mtb 与细胞以 10:1 的比例加入,充分混匀后置 37 °C、5% CO₂ 孵箱孵育 1 h、2 h、4 h、6 h 后迅速取出,冰冷的 PBS 洗 3 次,上机前加入 0.125% 的台盼蓝 (pH 4.4) 50 μ l,作用 2 min。同时 Mtb 与巨噬细胞以 1:1、5:1、10:1、20:1、50:1、100:1 的比例孵育 1 h 和 2 h,检测细胞吞噬率,实验重复 3 次。

1.7 统计学方法 采用方差分析、*q* 检验、*t* 检验及直线相关分析。

2 结果

2.1 不同浓度 FITC 对 Mtb 标记率的影响 用 FITC 标记 Mtb 时,发现 FITC 的浓度对标记率有一定程度的影响 ($P < 0.01$)。当 FITC 浓度较低时, Mtb 的标记率不高,且标记率不稳定,有一定的波动。FITC 浓度达 50 μ g/ml 时,标记率达 90% 以上。故本试验用 FITC 浓度为 50 μ g/ml 来标记 Mtb (见表 1)。

表 1 不同浓度 FITC 标记 Mtb 的标记率比较 ($n_1 = 5; \bar{x} \pm s$)

FITC 浓度 (μ g/ml)	标记率 (%)	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
20	83.07 \pm 7.35			
50	92.46 \pm 2.97 **	9.55	<0.01	22.113
100	95.53 \pm 1.87 **			

q 检验:与 20 μ g/ml 组比较 ** $P < 0.01$

2.2 单核细胞和 THP-1 细胞吞噬 FITC 标记 Mtb 不同时间与吞噬率的关系 人外周血单核细胞对 Mtb 的吞噬率随孵育时间的的延长而升高。从 10 min 的吞噬率 34.68% 增加到 120 min 则为 79.90%。PMA 分化的 THP-1 细胞对 Mtb 的吞噬率在 一定比例的条件 下随孵育时间的的延长而升高。Mtb 与 PMA 分化的 THP-1 细胞以 10:1 共孵育时,吞噬率从 1 h 的 30% 增加到 6 h 的 81%。单核细胞和 THP-1 细胞吞噬 FITC 标记 Mtb 的流式分析结果见图 1。

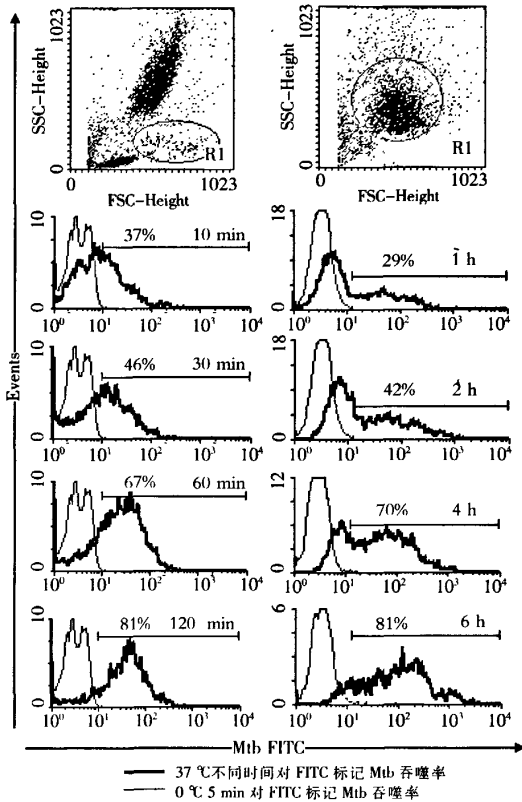


图 1 单核细胞和 THP-1 细胞吞噬 FITC 标记 Mtb 的流式分析图

2.3 台盼蓝淬灭对检测单核细胞和 THP-1 细胞吞噬 Mtb 的影响 外周血单核细胞与 Mtb 共孵育 10 min、30 min、60 min、120 min,未加台盼蓝组单核细胞吞噬 Mtb 的吞噬率分别为 64.26%、71.79%、80.86%、86.08%,加台盼蓝淬灭后的吞噬率分别为 34.68%、43.61%、62.91%、79.90%,与加台盼蓝组差异均有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 2)。Mtb 与 PMA 分化的 THP-1 细胞以 10:1 共孵育 1 h、2 h、4 h、6 h 时的吞噬率分别为 29.81%、40.51%、71.88%、80.90%,未加台盼蓝淬灭时 THP-1 细胞吞噬 Mtb 的吞噬率分别为 31.24%、42.39%、79.76%、88.03%。作用时间少于 2 h 时,

加台盼蓝组与不加台盼蓝组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),2 h 后两组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 3)。

表 2 台盼蓝 (荧光淬灭剂) 对单核细胞吞噬 Mtb 结果的影响 ($n_i = 8; \bar{x} \pm s$)

时间 (min)	未加台盼蓝 吞噬率 (%)	加台盼蓝 吞噬率 (%)	t	P
10	64.26 ± 9.96	34.68 ± 8.93	6.25	<0.01
30	71.79 ± 8.73	43.61 ± 7.38	6.97	<0.01
60	80.86 ± 7.93	62.91 ± 5.32	5.32	<0.01
120	86.08 ± 5.54	79.90 ± 4.63	2.42	<0.05
F	11.12	71.03	—	—
P	<0.01	<0.01	—	—
MS _{组内}	67.248	45.987	—	—

表 3 台盼蓝对 PMA 分化的 THP-1 细胞吞噬 Mtb 结果的影响 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

时间 (h)	未加台盼蓝 吞噬率 (%)	加台盼蓝 吞噬率 (%)	t	P
1	31.24 ± 1.62	29.81 ± 2.79	0.77	>0.05
2	42.37 ± 3.80	40.51 ± 1.63	0.78	>0.05
4	79.76 ± 3.04	71.88 ± 0.46	4.44	<0.05
6	88.03 ± 2.46	80.90 ± 1.47	4.31	<0.05
F	286.00	561.23	—	—
P	<0.01	<0.01	—	—
MS _{组内}	8.089	3.203	—	—

2.4 PMA 分化的 THP-1 细胞与 Mtb 以不同的比例混合时的吞噬率 THP-1 细胞对 Mtb 的吞噬率与时间和两者的混合比例有关,其吞噬率随时间和两者作用比例的的增加而增加。两者以相同比例共孵育时,THP-1 细胞在 2 h 的吞噬率明显高于 1 h 的吞噬率 ($P < 0.01$)。两者在同一时间以不同比例共孵育时,吞噬率随比例的增加而增加 ($P < 0.01$) (见表 4)。

表 4 Mtb 与 THP-1 细胞以不同比例孵育 1 h 和 2 h 的吞噬率 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

比例	吞噬率 (%)		t	P
	1 h	2 h		
1:1	6.51 ± 0.87	12.83 ± 0.89	8.80	<0.01
1:5	18.17 ± 1.91**	34.12 ± 3.31**	7.23	<0.01
1:10	30.15 ± 2.85**	40.81 ± 1.31**	5.89	<0.01
1:20	37.41 ± 3.29**	71.24 ± 1.75**	15.72	<0.01
1:50	60.71 ± 5.53**	85.20 ± 2.59**	6.95	<0.01
1:100	85.14 ± 1.89**	89.85 ± 3.22**	2.19	>0.05
F	260.92	514.58	—	—
P	<0.01	<0.01	—	—
MS _{组内}	9.584	5.601	—	—

q 检验:与 1:1 比较 ** $P < 0.01$

3 讨论

传统检测单核巨噬细胞吞噬 Mtb 吞噬率方法效率低、准确性差,本方法检测灵敏、准确、快速、高效。采用流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬率的方法可以满足实验的要求,并减少了实验过程中人为主观因素的影响。

本研究在参考文献的基础上经过多次实验,建立了流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬 FITC-Mtb 的实验方法。本实验选用 FITC 标记 Mtb,而 FITC 是一种常用且价格低廉的荧光染料。实验中发现 FITC 的浓度对 Mtb 的标记率有一定的影响,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 是标记 Mtb 较理想的标记浓度。在检测单核细胞吞噬 Mtb 的实验中我们发现人单核细胞对 Mtb 的吞噬是一个迅速的过程,10 min 的吞噬率即可达 35%,10 ~ 120 min,单核细胞对 Mtb 的吞噬率随时间的增加而增加。THP-1 细胞对 Mtb 的吞噬率与孵育时间和两者作用比例有关,当 Mtb 与 THP-1 细胞以 10:1 的比例孵育时,6 h 左右 THP-1 细胞对 Mtb 的吞噬率达到平台。在同一时间用不同比例的 Mtb 感染 THP-1 细胞时,其吞噬率随比例的增加而增加。两者共同孵育 1 h,比例达 100:1 时,THP-1 细胞对 Mtb 的吞噬率达到平台;两者共同孵育 2 h,比例达 50:1 时,THP-1 细胞对 Mtb 的吞噬率达到平台。

实验中我们参照文献^[7]应用台盼蓝作淬灭剂,以期把黏附在单核巨噬细胞表面的荧光素标记 Mtb 的荧光淬灭,加台盼蓝组和不加台盼蓝组的实验结果有统计学意义,人外周血单核细胞与 Mtb 共同孵育时,单核细胞吞噬 Mtb 的同时,有一部分 Mtb 会黏附在单核细胞的表面,其发出的荧光对检测结果造成影响,使检测的吞噬率比实际的吞噬率要高。而且在孵育时间较短时影响更加明显,可能是随着孵

育时间的增加有部分黏附的结核分枝杆菌被单核细胞吞噬的原因。加台盼蓝对 THP-1 细胞“吞噬 Mtb”结果亦有一定的影响,特别是 Mtb 与 THP-1 细胞孵育时间较长和两者作用比例较大时,台盼蓝淬灭对结果的影响更明显。Mtb 与 THP-1 细胞孵育时间达 2 h 或混合比例达 20:1 时,检测前一定要用台盼蓝作表面荧光淬灭。

综上所述,流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬 FITC-Mtb 是一种简便、快速和重复性好的方法。用于检测 Mtb 感染单核巨噬细胞模型是否建立及检测单核巨噬细胞对 Mtb 的吞噬功能都有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Drevets DA, Elliott AM. Fluorescence labeling of bacteria for studies of intracellular pathogenesis [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 187(1):69-79.
- [2] Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, et al. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals [J]. *Toxicology*, 2000, 142(2):145-156.
- [3] Zhang J, Jiang R, Takayama H, et al. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages [J]. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(9):845-852.
- [4] Day RB, Wang Y, Knox KS, et al. Alveolar macrophages from HIV-infected subjects are resistant to *Mycobacterium tuberculosis* in vitro [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30(3):403-410.
- [5] Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor [J]. *Nature*, 1991, 351(6322):155-158.
- [6] 赵修春,姚春艳,李柏青,等.流式细胞术检测小鼠中性粒细胞吞噬功能的方法学探讨[J].蚌埠医学院学报,2004,29(5):388-390.
- [7] 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.

文后参考文献英文文献作者的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献比例很高,但有不少作者将文后英文参考文献的作者著录错,以至用数据库检索核对文献时出现作者错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:先写名,后写姓,名可以有 1 个、2 个或 3 个,姓只有 1 个。因此,在英文原始文献中作者姓名是:名、名、姓。而文后参考文献作者的著录格式是:先写姓,后写名,姓不可以简写,名缩写(用第一个字母大写,不用缩写点)。如:英文原始文献中作者为 Natalie D Weder,文后参考文献著录时为 Weder ND。