

中性粒细胞极化过程中定向和侧足形成的方法学模式***

陈海洋¹, 蔡春青¹, 谢翠华², 罗琼¹, 孟晓静¹

Methodological study on directional sensing and lateral pseudopodia formation during neutrophil polarity

Chen Hai-yang¹, Cai Chun-qing¹, Xie Cui-hua², Luo Qiong¹, Meng Xiao-jing¹

Abstract

BACKGROUND: Neutrophil chemotaxis is an important response in the host defense and initiated by neutrophil polarization. A key event of neutrophil polarity is the ability of directional sensing and lateral pseudopodium formation. However, there are few reports regarding the correlative investigation of the neutrophil polarization.

OBJECTIVE: To compare the three experimental modes of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLp)-stimulated neutrophil polarity to provide some methodological considerations.

METHODS: ①Isolation of neutrophil by density gradient centrifugation; ②The neutrophil were stimulated by uniform concentration of fMLP, steep gradient concentration of fMLP and gentle gradient concentration of fMLP; ③The change and direction of neutrophil polarization were observed by inverted microscope; ④F-actin and cell nucleus were observed by confocal microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: ①The direction of neutrophil treated by uniform concentration of fMLP was random. ②41% of neutrophil migrated electrode-oriented when stimulated by steep gradient concentration of fMLP and 68% of neutrophil move toward the fMLP side upon stimulated by gentle gradient concentration of fMLP. ③ χ^2 test has been shown that there are significant difference in the polarized direction among neutrophils treated by three experimental modes. ④Neutrophil lateral pseudopodia formed in all of three experimental modes, especially in the group of uniform concentration. It is better to use zigmund chamber to study on the mechanism of neutrophils directional sensing, which could be interfered by the formation of neutrophil lateral pseudopodia.

¹Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; ²Department of Endocrinology and Metabolism, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Chen Hai-yang★, Master, Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
ocean198511@sina.com

Cai Chun-qing, Doctor, Associate professor, Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
h_zcn@126.com

Chen Hai-yang and Cai Chun-qing contributed equally to this paper.

Correspondence to: Meng Xiao-jing, Doctor, Professor, Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
zhumeng@fimmu.com

Chen HY, Cai CQ, Xie CH, Luo Q, Meng XJ. Methodological study on directional sensing and lateral pseudopodia formation during neutrophil polarity. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(6): 1061-1064.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 中性粒细胞极化是其趋化和产生防御功能的基础, 而极化过程中定向能力和侧足形成是重要的环节, 目前相关研究的报道还很少。

目的: 观察均匀浓度、陡峭浓度梯度、平缓浓度梯度 3 种实验模式下细胞极化过程中片足的方向和侧足的形成情况, 试图找出研究中性粒细胞极化的方法学模式。

方法: ①采用密度梯度离心法, 成功急性分离人中性粒细胞。②均匀浓度、陡峭浓度梯度和平缓浓度梯度甲酰甲硫氨酰-亮氨酸-苯丙氨酸对细胞进行趋化刺激。③倒置显微镜下观察细胞极化变化情况, 判断细胞移动方向。④对细胞进行荧光双标, 激光共聚焦显微镜下观察 F-actin 聚合情况。

结果与结论: ①均匀浓度下, 中性粒细胞极化方向和移动轨迹随机分布。②陡峭梯度浓度下, 41%的细胞呈现电极向心性分布。③平缓梯度下, 68%的细胞表现为沿着甲酰甲硫氨酰-亮氨酸-苯丙氨酸浓度的分布, χ^2 检验提示平缓浓度梯度实验模式存在较好的定向性。④三者均有明显的侧足形成, 以均匀浓度为高, 这与定向性呈现为相反的结果。结果显示平缓浓度梯度实验模式在研究细胞定向机制方面相对较好, 另一方面对细胞定向的干扰可能来源于细胞侧足的形成。

关键词: 嗜中性粒细胞; 极化; 侧足; N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酸-苯丙氨酸; F-actin

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.06.024

陈海洋, 蔡春青, 谢翠华, 罗琼, 孟晓静. 中性粒细胞极化过程中定向和侧足形成的方法学模式[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6):1061-1064. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

中性粒细胞在宿主抵抗细菌和真菌感染中起着重要的作用, 他们的主要功能是在机体发生炎症时, 外渗出血管壁并迁移到炎症位置, 通过吞噬作用和释放超氧化物和/或蛋白分解酶来杀死细菌和入侵的微生物。这种外渗和迁移的机制是通过细胞的极化和趋化性来实现的^[1-2]。趋化性是细胞朝向化学吸引剂的定向

移动, 在此过程中, 中性粒细胞在趋化因子作用下, 细胞形状和胞内多种蛋白质和脂质出现不对称重新分布, 细胞结构出现重构, 细胞表现为极性的变化^[3]。

中性粒细胞极性的形成过程包括前端片足和后侧尾足的形成, 片足的形成对细胞的趋化定向移动具有重要的意义, 另一方面, 多片足的形成可能影响细胞的定向移动, 形成的多片足又成为侧足。本文观察了均匀趋化物浓度、较陡的浓度和较缓的浓度梯度3种实验模式下细

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30971193*, 30800438*, 81071611*

Received: 2010-11-15
Accepted: 2010-12-30

¹ 南方医科大学公共卫生与热带医学学院职业卫生与职业医学系, 广东省广州市 510515; ² 南方医院内分泌代谢科, 广东省广州市 510515

陈海洋★, 男, 1984年生, 广东省高州市人, 汉族, 2011年南方医科大学毕业, 硕士, 主要从事细胞移动方面的研究。ocean198511@sina.com

并列第一作者: 蔡春青, 男, 1969年生, 河南省焦作市人, 汉族, 2004年解放军第一军医大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事细胞电生理方面的研究。h_zcn@126.com

通讯作者: 孟晓静, 博士, 教授, 南方医科大学公共卫生与热带医学学院职业卫生与职业医学系, 广东省广州市 510515 zhumeng@fimmu.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)06-01061-04

收稿日期: 2010-11-15
修回日期: 2010-12-30
(20101115012/M·Z)

胞极性过程中片足的方向和侧足的形成情况, 试图找出研究中性粒细胞极性的方法学模式。

1 材料和方法

设计: 体外细胞形态学对比观察。

时间及地点: 实验于2010-02/09在南方医科大学公共卫生与热带医学院职业卫生与职业医学系实验室完成。

材料:

血样: 南方医科大学健康志愿者提供外周静脉血, 年龄18~23岁, 性别不限。

主要试剂和仪器:

主要试剂和仪器	来源
EDTA-Na ₂ 、甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)	美国 Sigma 公司
罗丹明标记鬼笔环肽 (Rhodamine-Phalloidin)	美国 Invitrogen 公司
Zigmond 小室	美国 Neuro Probe 公司
Percoll 分离液(硅石胶态悬浮液)	瑞典 Amersham Pharmacia 公司
淋巴细胞分离液、40 g/L 多聚甲醛溶液	北京鼎国公司
Triton-X-100	广州威佳公司
FV1000 confocal 激光共聚焦显微镜、倒置显微镜	日本 Olympus 公司
微操纵器、PC-10 微电极拉制仪	日本 Narishige 公司
冷冻离心机	美国 Beckman 公司

实验方法:

人中性粒细胞的急性分离和趋化刺激: 取外周静脉血5 mL, EDTA-Na₂抗凝, 用PBS等倍稀释, 按10:3的比例加入淋巴细胞分离液, 2 000 r/min离心20 min, 吸取白膜层, 再加入等体积的红细胞裂解液混匀, 静置20 min后2 000 r/min离心20 min沉淀细胞。将粗提纯的中性粒细胞悬液小心置于Percoll分离液上, 以75%和60%Percoll液密度梯度离心收集中性粒细胞, 1 250 r/min离心15 min, 取75%和60% Percoll液界面之间的中性粒细胞, PBS缓冲液洗涤, 去除残余Percoll胶粒待用^[4]。文献中选用最多的趋化剂是fMLP, 本文也采用100 nmol/L fMLP对细胞进行趋化刺激^[5]。

均匀浓度fMLP诱导产生的中性粒细胞极性观察: 均匀浓度对细胞的刺激主要依据文献的报道^[6], 概括来说, 将中性粒细胞置于塑料培养皿中, 加入PBS液体, 放入4 °C环境10 min中静置, 以减少细胞自发性极化率, 然后通过40倍

物镜记录细胞2 min, 在相同的记录视野, 加入fMLP并调整至要求的终浓度, 然后再记录10 min。

梯度浓度fMLP诱导产生的中性粒细胞极性观察: 根据文献报道, 采用梯度浓度对细胞极性刺激主要包括陡峭浓度梯度和平缓浓度梯度, 陡峭浓度的形成采用电极法^[7], 简而言之, 显微镜下依靠微操纵器将尖端直径为2~4 μm的玻璃微电极逐渐接近中性粒细胞, 玻璃微电极内充灌有100 nmol/L fMLP, fMLP会通过扩散作用在细胞和微电极尖端之间形成一个较陡峭的梯度浓度。

平缓浓度梯度刺激采用Zigmond法^[8], 将4 °C处理10 min的中性粒细胞滴定到玻片上, 将玻片按照说明书要求放置于Zigmond小室。小室的一个沟槽中加入无血清的RPMI 1640培养基, 另一个沟槽中加入含有100 nmol/L趋化剂fMLP的无血清RPMI 1640培养液, 这两种溶液通过Zigmond小室的桥在其表面形成一个平缓的浓度梯度。

fMLP诱导中性粒细胞极性的判断: 文献上判断细胞是否出现极性变化主要根据DIC显微镜下的细胞形状来判定^[9], 典型的极性细胞通常在前边包含一个较宽的片足, 另一边呈现为圆形和狭窄的尾部, 根据±45°可以确定片足形成的方向, 这是研究细胞定向极化的重要依据。

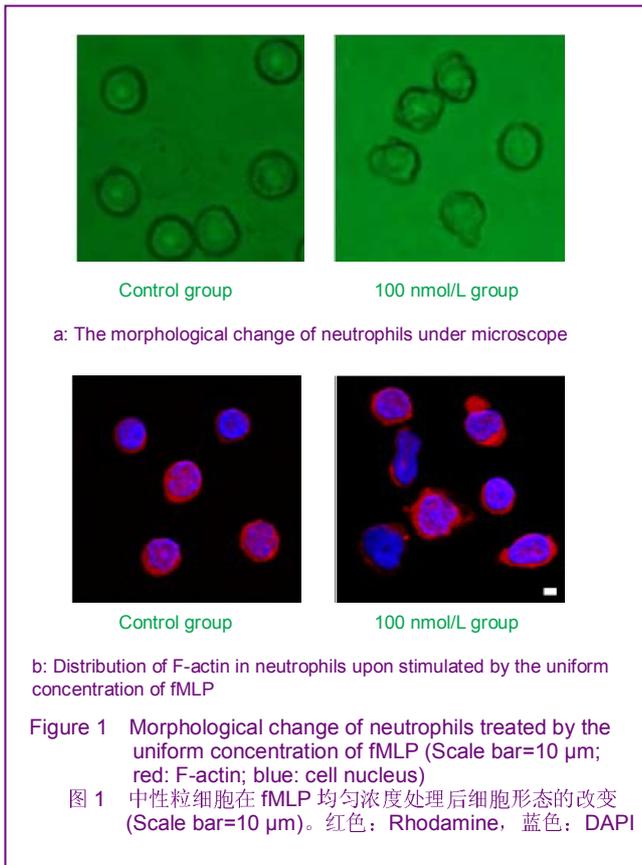
F-actin的荧光标记: 参照F-actin荧光染色试剂盒说明, 悬浮的中性粒细胞在包含有Ca²⁺, Mg²⁺的HBSS液中孵育10 min, 然后加入终浓度为100 nmol/L的fMLP进行刺激, 分别对处理后的细胞进行40 g/L的多聚甲醛固定、0.2% Triton X-100穿透、罗丹明标记的鬼笔环肽避光染色, 最后DAPI复染细胞核, 在激光共聚焦显微镜下观察。采集罗丹明-环鬼笔环肽使用的激发波和发射波长为543 nm/560 nm。

统计学分析: 所有实验数据均由通讯作者及第一作者用SPSS 13.0统计软件包处理, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 fMLP诱导中性粒细胞极性化形状的变化是F-actin聚合的结果 中性粒细胞加入100 nmol/L fMLP后, 细胞出现明显的非对称性的极性化改变(图1a), 在共聚焦下观察均匀浓度fMLP刺激后F-actin聚合的变化, 发现F-actin聚合长度和中性粒细胞片足形成呈现为

一致表现(图1b)。



2.2 三种实验模式下细胞的极化方向 见图2。

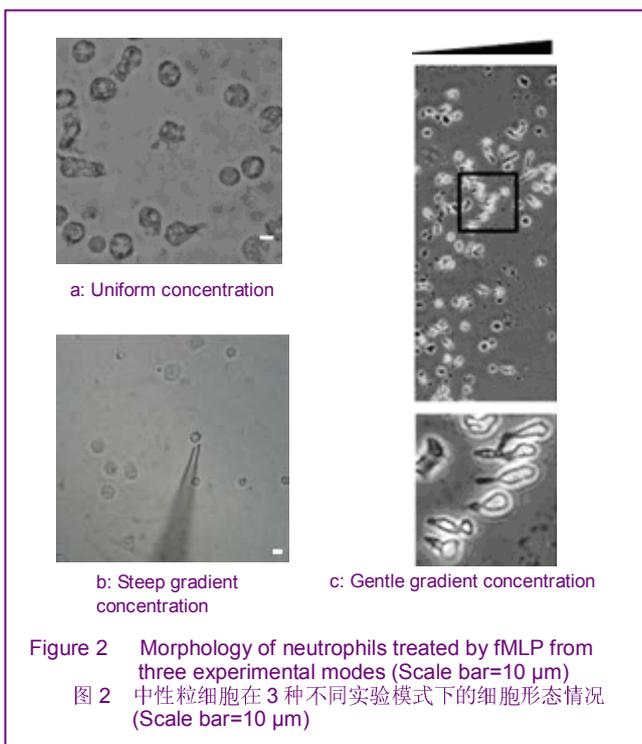
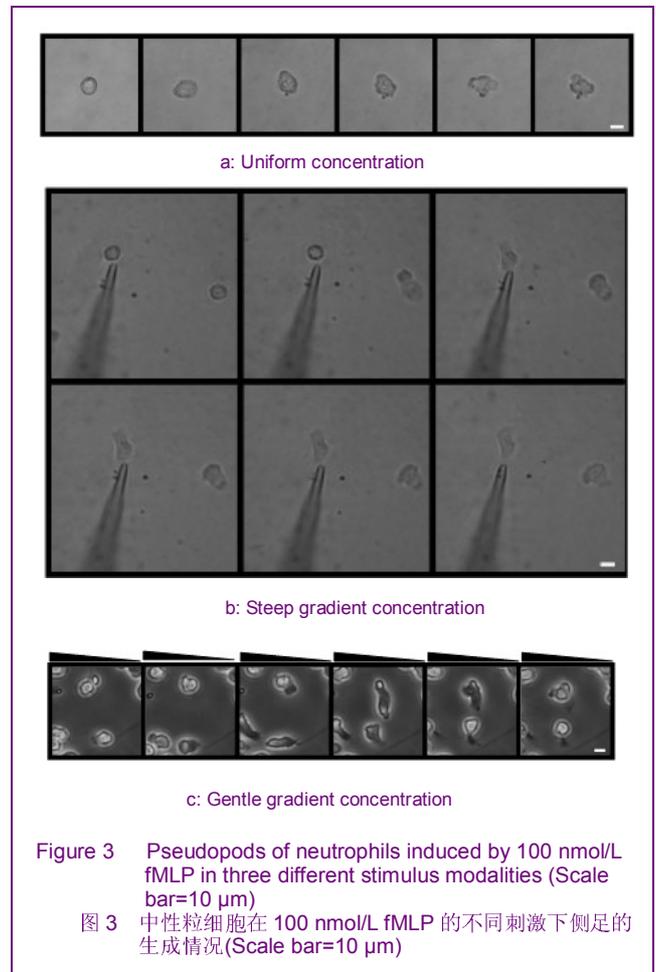


图2a显示的是均匀浓度fMLP刺激下的中性粒细胞形态,可以看出,均匀浓度下,细胞产生极性的方向是随机的,加入fMLP 1 min后,以细胞 $\pm 45^\circ$ 为一个方向,对3次不同的实验细胞朝向进行计数,则上下左右比率

分别为23%(n=29)、27%(n=33)、24%(n=41)和26%(n=36), χ^2 检验显示4个方向不存在明显的统计学差异($P > 0.05$),这表明均匀浓度下fMLP能够诱导细胞产生极性,但细胞极性不存在明显的定向,细胞的移动轨迹呈现为随机的表现。图2b和2c显示的是梯度浓度fMLP刺激形成的中性粒细胞形态,图2b显示的是电极法形成的实验结果,分别计数3次独立的实验,每次计数细胞不低于100个,可以看出1 min后(41 \pm 7)%的细胞片足朝向电极,同时细胞的移动轨迹多呈现为向心性;图2c显示的是Zigmond实验结果,在此实验模式下,fMLP刺激1 min后,对3次独立实验极性计数,计数细胞不低于100个,(68 \pm 5)%的细胞表现为朝向加有fMLP的一侧,与电极法进行比较, χ^2 检验显示二者差异有显著性意义($P < 0.05$),表明Zigmond模式下细胞方向性要高于电极法,同时在这一模式下细胞的移动多朝向fMLP一侧。

2.3 三种经典方法下中性粒细胞侧足的生成 见图3。



细胞极化过程中通常伴随有多片足的出现,对超过一个片足的细胞将多出的片足命名为侧足。图3a中是采用100 nmol/L浓度的fMLP对同一个细胞在不同时间内的极化方向的观察,可以看到有侧足出现的细胞表现为多个极化方向,实验可以观察到侧足有时能够改变细胞的极化方向,在这个过程中细胞表现为纵轴沿不

同方向的同时振荡。同样在梯度浓度实验下也可以观察到细胞的多个极性化方向和细胞侧足的形成(图3b、3c), 对3次独立实验下存在侧足的细胞进行计数(计数细胞不少于100个), 均匀浓度、电极法和Zigmond的侧足形成细胞分别为(51±8.2)%; (37±6.6)%和(24±4.3)%, χ^2 检验显示二者差异有显著性意义($P < 0.05$)。而且均匀浓度下可以见到6%的细胞有超过两个片足形成的细胞, 电极法和Zigmond下难以看到这种类型细胞的存在。

3 讨论

中性粒细胞极性的实验很难在体内完成, 文献中选用的多为体外实验, 通常包括3种实验模式。均匀浓度就是在细胞的周围形成的趋化物浓度是相同的, 而梯度浓度就是在细胞的前后极形成的趋化物fMLP浓度是不同的, 电极法形成的浓度梯度表现为离电极的距离越近, 这种浓度越高, 浓度梯度表现为向心性的特征, 但限于电极法本身的局限, 细胞极性形成时前后极浓度差较大, 所以这种实验通常又成为陡峭浓度梯度实验; 相对而言, Zigmond实验是采用趋化物沿着盖玻片缓慢扩散而形成的梯度浓度来刺激细胞形成极性的, 文献报道此实验模式下前后极fMLP浓度梯度相对较小^[10], 中性粒细胞可以感知前后极相差2%的趋化物, 因此这种实验模式较接近于机体, 又被称为平缓浓度梯度。

本文结果提示Zigmond具有较好的方向性, 电极法次之, 以均匀浓度相对较差。但实际应用中这3种实验模式又受制于多种因素的影响, 均匀浓度因其设备简单、实验室容易操作而在极性研究中包括形态学观察、共聚焦实验和分子生物学实验是普遍采取的研究方式, 图1a在研究F-actin的聚合时即采用这种实验模式。另一方面, 体内生理病理过程更多表现为趋化物的梯度浓度趋化方式, 因此采用梯度浓度进行研究比较符合病理生理过程, 但梯度浓度的建立需要设备复杂, 同时又很难在分子生物学实验中得到应用, 因此主要应用在形态学观察的研究过程中, 本文结果提示Zigmond是较好的选择, 但Zigmond法本身涉及专利, 产品昂贵, 同时操作相对复杂。

侧足的形成与细胞的定向性在本研究中呈现为相反的结果, 无论是均匀浓度还是梯度浓度, 细胞即使出现了片足, 在此过程中, 仍然有可能在其他方向出现侧足, 但以均匀浓度明显为高。关于中性粒细胞在何处形成片足的机制, 主要有两种解释^[11], 一种是“第一信号假说”, 这个学说认为, 细胞极性化方向首先在接触刺激的方向出现; 另一种是“信-噪假说”^[12], 其核心内容是细胞能够感受到配体-受体结合的波动并作出反应。显然均匀浓度下细胞更多地感受到趋化物浓度在不同方向的振荡, 这有利于侧足的形成, 而梯度浓度下这

种振荡相对较弱, 梯度浓度更由于细胞形成沿着趋化物浓度梯度的极性化方向, 但电极法由于梯度呈现为向心性, 对于一个细胞在细胞多点形成的浓度差异表现为环形, 显然Zigmond在前后极的浓度差异是最明显的。

4 参考文献

- [1] Eddy RJ, Pierini LM, Maxfield FR. Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4470-4483.
- [2] Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(12):1619-1638.
- [3] Weiner OD. Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(2):196-202.
- [4] Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*. 2008;(17). pii: 745.
- [5] Nick JA, Avdi NJ, Young SK, et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest*. 1997;99(5):975-986.
- [6] Servant G, Weiner OD, Herzmark P, et al. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*. 2000;287(5455):1037-1040.
- [7] Zhang H, Sun C, Glogauer M, et al. Human neutrophils coordinate chemotaxis by differential activation of Rac1 and Rac2. *J Immunol*. 2009;183(4):2718-2728.
- [8] Alstergren P, Zhu B, Glogauer M, et al. Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell surface expression of CD44. *Cell Immunol*. 2004;231(1-2):146-157.
- [9] Wong K, Pertz O, Hahn K, et al. Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3639-3644.
- [10] Meili R, Firtel RA. Two poles and a compass. *Cell*. 2003;114(2):153-156.
- [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):473-479.
- [12] Tranquillo RT. Chemotactic movement of single cells. *ASGMB Bull*. 1991;4(2):75-85.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金(30971193, 30800438 和 81071611)。

作者贡献: 实验设计为孟晓静、蔡春青, 实验实施为陈海洋、罗琼, 实验评估为孟晓静、蔡春青, 数据统计为陈海洋、罗琼, 资料收集为谢翠华、罗琼。陈海洋、孟晓静成文, 蔡春青审校, 孟晓静对文章负责。陈海洋与蔡春青对实验的贡献相同, 故并列为第一作者。

致谢: 衷心感谢邹飞院长对于实验设计及实验条件的大力支持, 感谢武清宜、邹文英同学在实验中的技术指导, 感谢南方医科大学公共卫生与热带医学院职业卫生与职业医学系实验室及全体师生对于本实验的支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 血液提供者完全知情同意将自己的血样用于中性粒细胞研究, 并签署相应的知情同意书。

本文创新性: 国内对中性粒细胞极性化的研究均采用一种实验模式, 尚未有对 3 种实验模式进行系统比较, 文章结果显示平缓浓度梯度实验模式存在较好的定向性, 适于定向机制方面的研究。另外基于侧足在 3 种实验模式中均出现, 以均匀浓度为高, 预示着均匀浓度刺激的中性粒细胞侧足的形成干扰其定向能力。