

### ■ 概述

吞噬作用是细胞在受体介导下从周围环境摄取大于 0.5um 的固体颗粒形成吞噬小体（膜形成的空泡）的过程。吞噬小体从质膜脱离成熟后，与溶酶体融合形成吞噬溶酶体，将吞噬的颗粒降解<sup>[1]</sup>。吞噬作用是机体抵御微生物病原、清除自身衰老或凋亡细胞的主要机制。执行吞噬功能的细胞主要是多种吞噬细胞，其中巨噬细胞和中性粒细胞是最重要的专职吞噬细胞。中性粒细胞占血液循环中白细胞的 60 ~ 70%，具有很强的趋化作用和吞噬功能。在病原体局部引发感染时，中性粒细胞快速发挥吞噬杀伤和清除作用<sup>[2]</sup>。本文使用 ACEA NovoCyte 流式细胞仪检测中性粒细胞吞噬功能，体现了流式细胞术检测细胞吞噬功能的快速、定量和高通量等优点。

### ■ NovoCyte 流式细胞仪检测中性粒细胞细胞吞噬功能

吞噬过程需要一系列受体参与识别病原体，有些受体直接识别病原体特有的分子，有些通过调理素（例如 IgG）介导。体外研究细胞吞噬过程常使用培养的细菌、酵母聚糖、真菌、乳胶 / 聚苯乙烯微球（Latex/ polystyrene beads）等作为吞噬颗粒，使用 IgG 作为调理素，模拟体内吞噬过程<sup>[3]</sup>。IgG Fab 段与吞噬颗粒结合，Fc 段与中性粒细胞、巨噬细胞表面的 Fc 受体结合，从而介导中性粒细胞识别抗原，诱导吞噬作用<sup>[4]</sup>。本文用 IgG（Sigma，I-4506）调理后的 2 um 黄色荧光（FITC）乳胶微球（Sigma，L4530）作为目标物，检测中性粒细胞对荧光微球的吞噬作用。基于发生吞噬的中性粒细胞呈现与微球相同的荧光，流式检测结果显示只有 5% 的中性粒细胞对未调理的荧光微球产生吞噬作用（图 1A），而对于 IgG 调理后的微球 45% 的中性粒细胞发生吞噬，并且表现吞噬一个或多个荧光微球的作用（图 1B）。

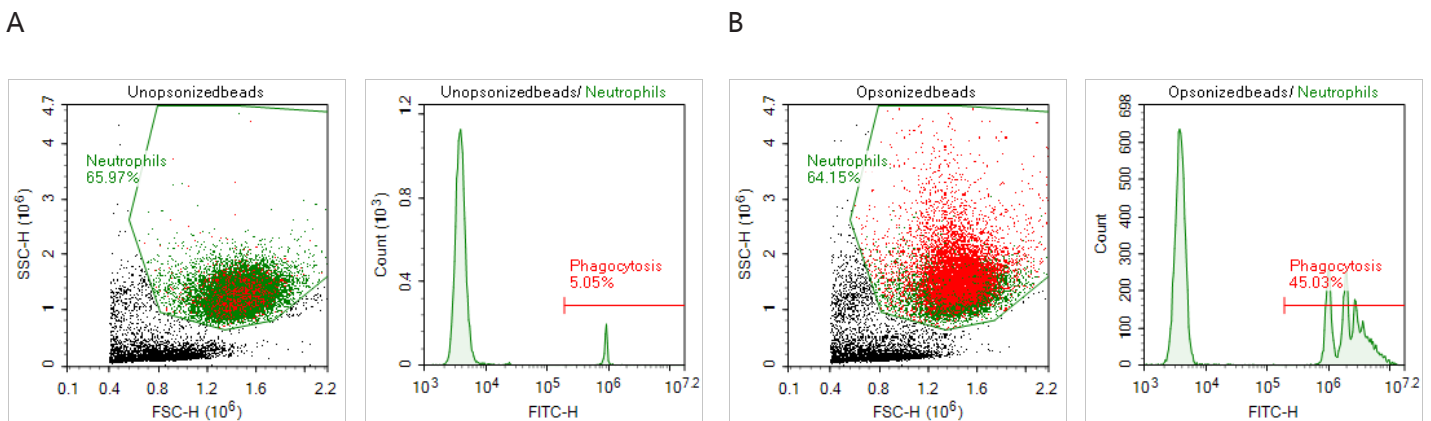


图 1. NovoCyte 流式细胞仪检测中性粒细胞吞噬荧光微球。氯化铵裂解液裂解人外周血后获得白细胞，Novocyte 体积法对白细胞中的中性粒细胞计数，以中性粒细胞：微球 1：10 的比例混合白细胞及微球，37 度 CO<sub>2</sub> 培养箱振荡孵育 40 分钟，之后用预冷的含 0.02% EDTA 的 D-PBS 终止吞噬，加入苝酚蓝淬灭未吞噬微球的荧光，Novocyte 检测<sup>[3]</sup>。绿色：未发生吞噬的中性粒细胞，红色：发生吞噬的中性粒细胞。A. 中性粒细胞与未经 IgG 调理的荧光微球混合，显示较低的吞噬比例。B. 中性粒细胞与经 IgG 调理的荧光微球混合，45% 的中性粒细胞发挥吞噬作用。中性粒细胞吞噬荧光微球的数量可以在荧光强度上得以区分。

### ■ NovoCyte 流式细胞仪检测中性粒细胞细胞吞噬功能

当病原体侵入人体，人体的先天免疫系统快速应答，清除入侵物。通过对中性粒细胞吞噬荧光微球的时间进程检测，可以看到 30 分钟内为细胞吞噬的快速动力学过程，之后随着孵育时间的延长，发生吞噬的中性粒细胞比例逐渐上升（图 2）。

## —中性粒细胞吞噬功能检测

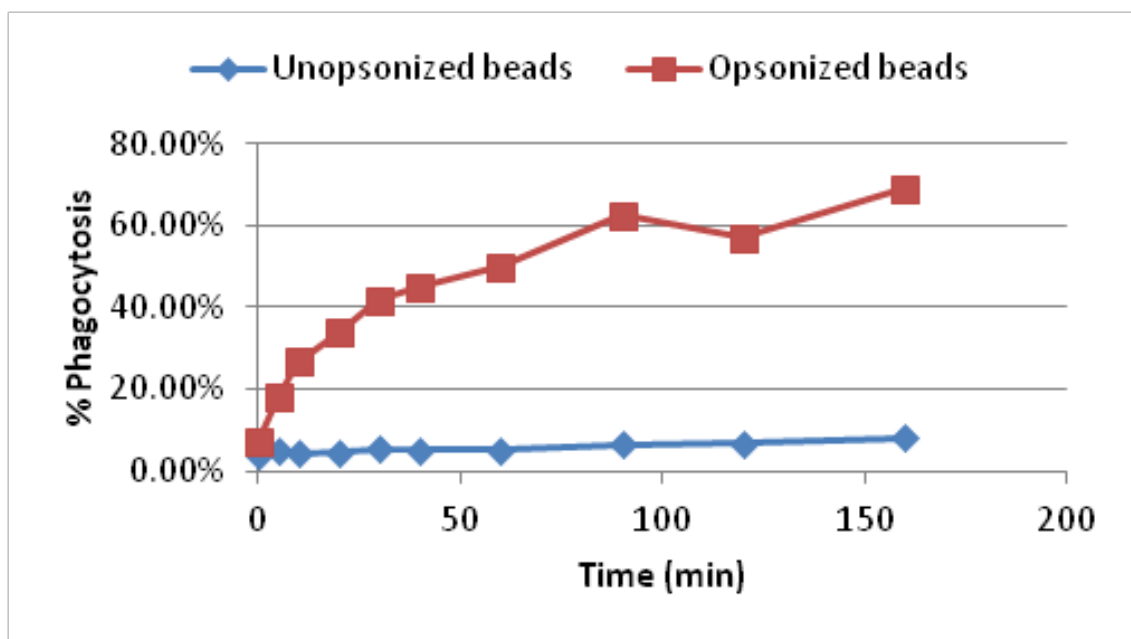
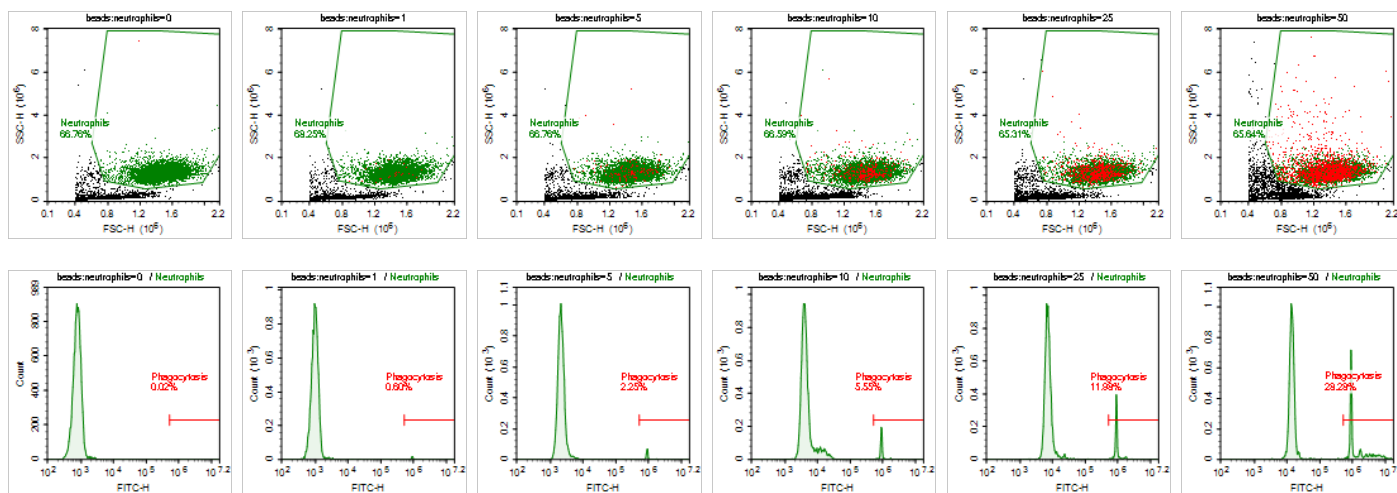


图 2. 微球 / 中性粒细胞数量比为 10 时，中性粒细胞吞噬作用的时间进程检测。30 分钟内发生吞噬的细胞比例快速上升，加长孵育时间可增加发生吞噬的细胞比例，90 分钟时达到 60% 的吞噬比例。

### ■ 细胞吞噬与感染程度

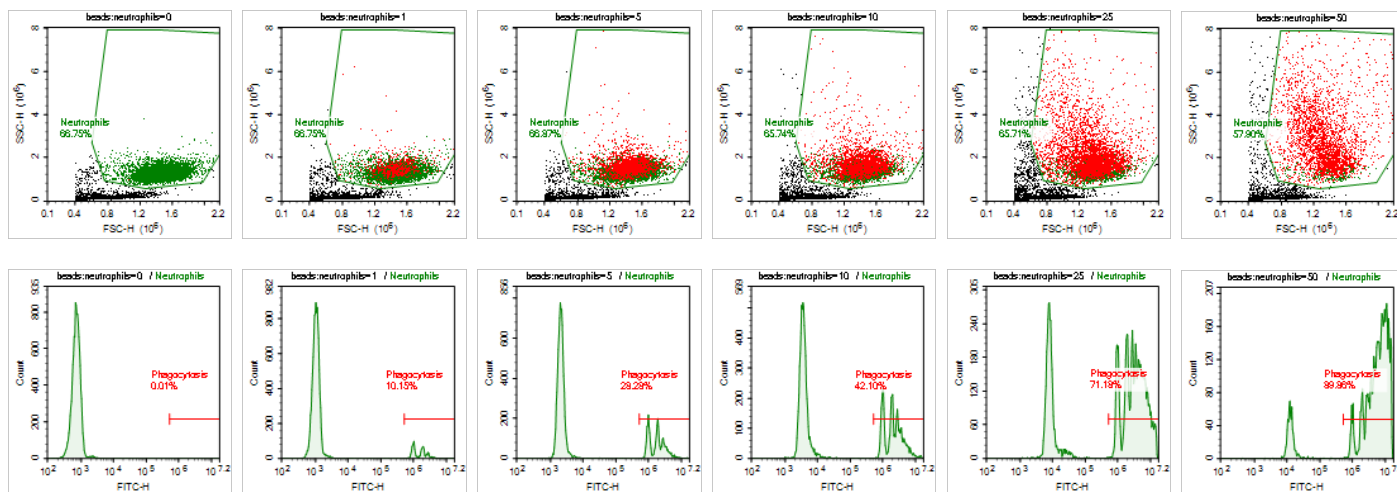
吞噬功能是抗体防御感染的第一道防线。病原菌的大量入侵或有害物质的局部富集可激活具有吞噬活性的细胞，诱发机体的自发免疫过程。调理后的微球做为异原物质，在比例逐渐升高的情况下，诱导更多的中性粒细胞发挥吞噬功能（图 3）。

A



## —中性粒细胞吞噬功能检测

B



C

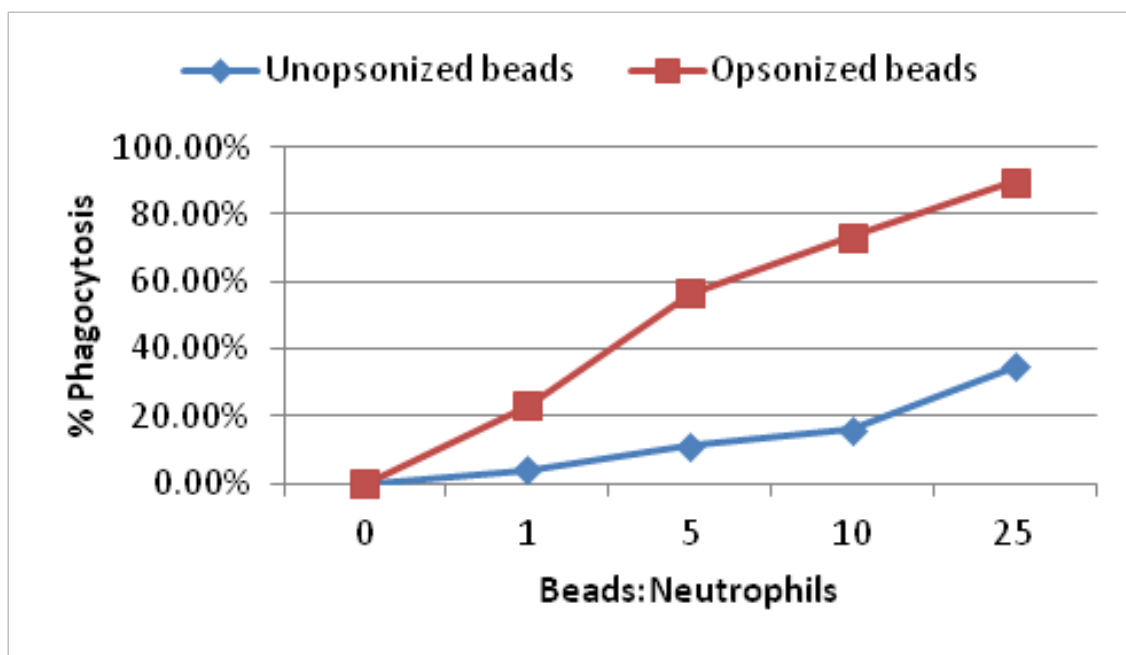


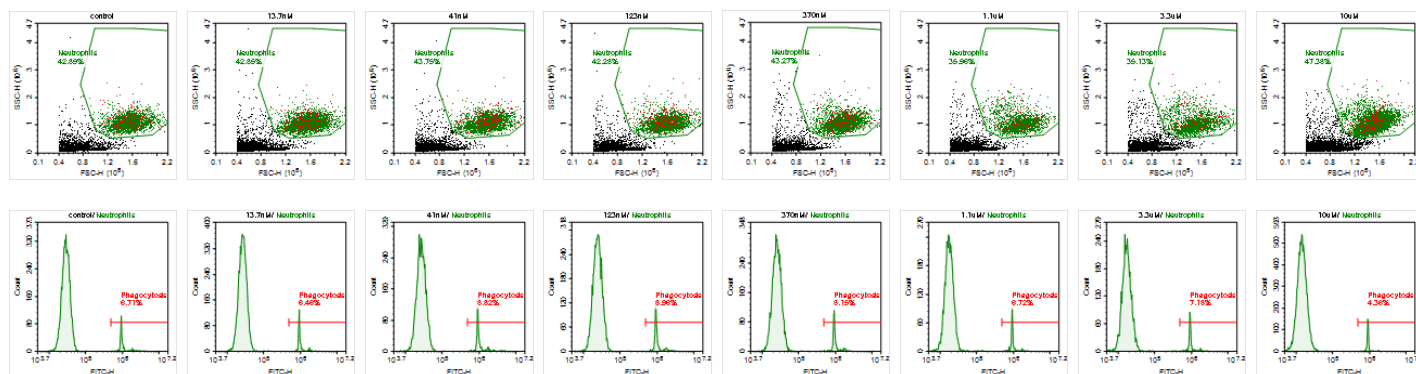
图 3. 发生吞噬的中性粒细胞随调理微球的比例增高而增多。A. 不同微球 / 中性粒细胞数量比时，中性粒细胞吞噬未经 IgG 调理的荧光微球。B. 不同微球 / 中性粒细胞数量比时，中性粒细胞吞噬经过 IgG 调理的荧光微球。C. 微球 / 中性粒细胞数量比越高，发生吞噬的中性粒细胞比例越高。经 IgG 调理的微球数量为中性粒细胞的 50 倍时，发生吞噬的中性粒细胞比例达到 90%。

### ■ 细胞松弛素 D 抑制中性粒细胞细胞吞噬

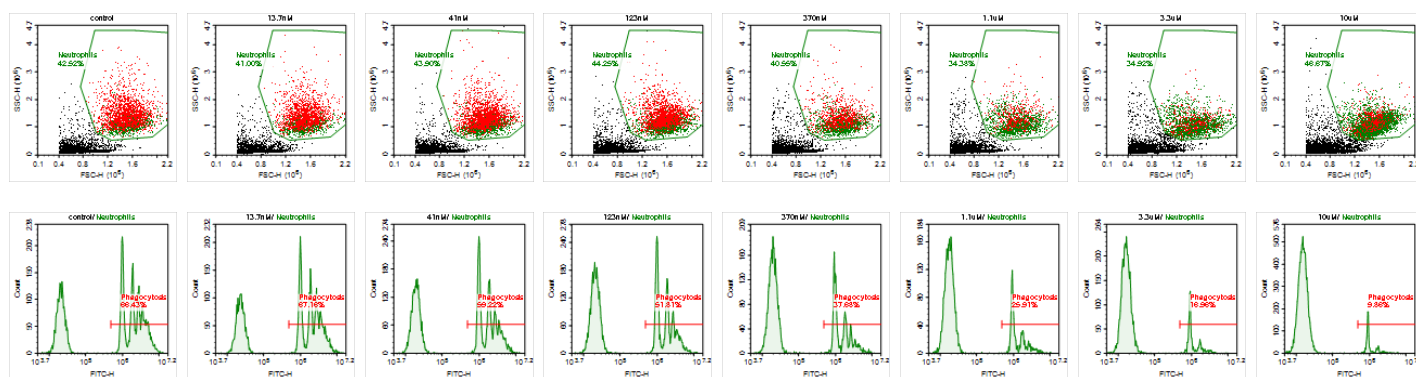
细胞吞噬过程依赖吞噬小体的形成，吞噬小体形成过程是信号传导和肌动蛋白重组的综合过程 [5]。细胞松弛素 D 是一种肌动蛋白聚合的抑制剂，可抑制吞噬小体的形成，从而抑制细胞吞噬作用 [6]。以流式细胞术为检测方法，中性粒细胞为目标细胞，可以快速并且定量地检测细胞松弛素 D 对吞噬过程的抑制作用及抑制活性 ( $IC_{50}=0.439 \text{ uM}$ ) (图 4)。以此为例，流式检测也可用于对多种已知及未知化合物的检测，并实现高通量。

## —中性粒细胞吞噬功能检测

A



B



C

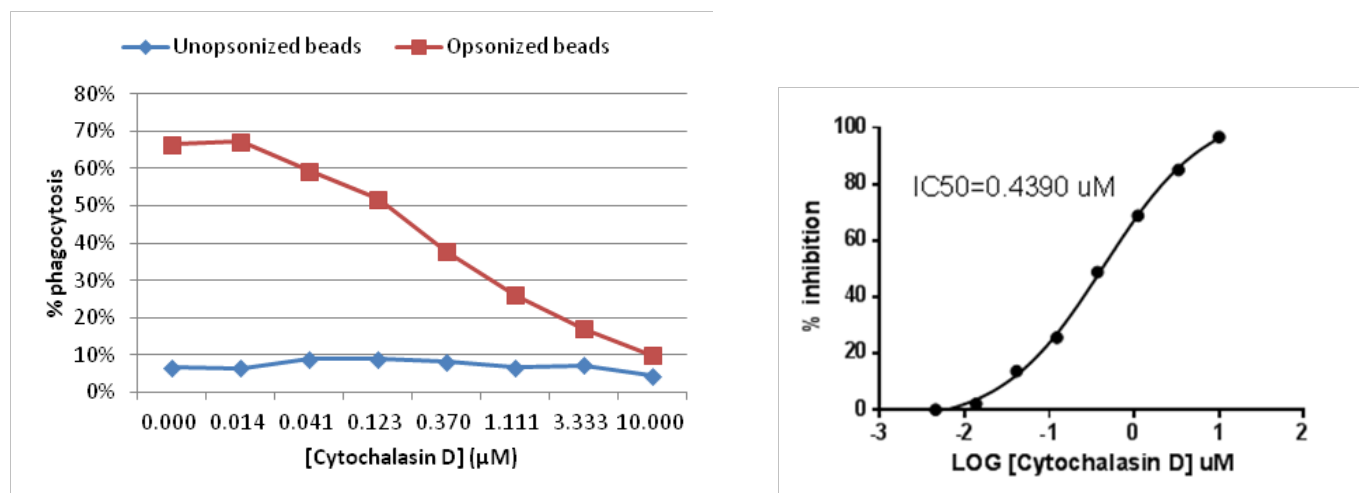


图 4. 细胞松弛素 D 对细胞吞噬的抑制作用。新鲜分离的白细胞与浓度梯度细胞松弛素 D 预孵育 30 分钟，同时对微球做调理，然后进行细胞吞噬实验。A. 不同浓度细胞松弛素 D 处理后，中性粒细胞吞噬未经 IgG 调理的荧光微球。B. 不同浓度细胞松弛素 D 处理后，中性粒细胞吞噬经 IgG 调理的荧光微球。C. 细胞松弛素 D 对细胞吞噬的抑制作用呈现浓度依赖性，IC<sub>50</sub> 为 0.439 μM。

### 参考文献

- 1、 Botelho RJ, Grinstein S. Phagocytosis. *Curr Biol*. 2011 Jul 26;21(14):R533-8.
- 2、 《医学免疫学》. 北京大学医学出版社 . P68.
- 3、 Lehmann AK, Sornes S, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):229-42.
- 4、 Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:61-98.
- 5、 Botelho RJ, Grinstein S. Phagocytosis. *Curr Biol*. 2011 Jul 26;21(14):R533-8.
- 6、 Arora PD, Manolson MF, Downey GP, Sodek J, McCulloch CA. A novel model system for characterization of phagosomal maturation, acidification, and intracellular collagen degradation in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000 Nov 10;275(45):35432-41.

