

利用活细胞工作站构建 巨噬细胞吞噬子宫内膜癌细胞的体外模型

檀学文,陈维乐,陈义昭,方亦龙,蒋海峰,许振,涂佳杰,魏伟

摘要 目的 利用活细胞工作站观察巨噬细胞吞噬子宫内膜癌细胞的过程及流式细胞术检测巨噬细胞吞噬肿瘤细胞对 T 细胞的活化。方法 将 Ishikawa 细胞与 THP-1 诱导的巨噬细胞分别用 CFSE 荧光探针和 CD11b 标记,混合接种于成像皿,实时记录 120 min 内巨噬细胞对 Ishikawa 细胞的吞噬,流式细胞术检测巨噬细胞与 Ishikawa 细胞共培养后对 T 细胞活化的影响。结果 共培养的 2 种细胞相互接触后 Ishikawa 细胞的绿色荧光被巨噬细胞摄取,且巨噬细胞能连续吞噬多个 Ishikawa 细胞。吞噬了 Ishikawa 细胞的巨噬细胞能诱导细胞毒性 T 细胞分化。结论 成功利用活细胞工作站构建巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的体外模型,为检测巨噬细胞及 T 细胞对肿瘤细胞双重杀伤作用提供可行的实验方法。**关键词** 活细胞工作站;巨噬细胞;Ishikawa 细胞;吞噬;细胞毒性 T 细胞

中图分类号 R 730.3;R 730.51;R 737.33;R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1465-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.023

巨噬细胞是固有免疫系统中的重要细胞,与肿瘤发病密切相关^[1-2]。活细胞工作站及其自带的培养系统,能模拟活细胞的生活环境,是一种体外研究细胞行为的重要方法^[3-5]。目前流式细胞术被广泛

用于检测最终的细胞吞噬比例,但不能体现动态吞噬过程^[6]。巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的过程是肿瘤微环境中一种复杂的相互作用^[7],利用活细胞工作站直接记录巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的动态过程有助于进一步研究这一复杂过程,并且能够继续探讨巨噬细胞吞噬肿瘤细胞后对 CD8⁺ IFN γ ⁺ 细胞毒性 T 细胞激活的影响。该研究利用活细胞工作站,建立了巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的体外模型,这为深入研究巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的动态过程提供了一种可靠的实验方法,同时研究巨噬细胞吞噬肿瘤细胞后增强 T 细胞的抗原提呈作用,证实其能活化细胞毒性 T 细胞对肿瘤的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人源单核细胞系 THP-1 和人源子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 购自武汉普诺赛公司。

1.2 试剂与仪器 DMEM 无酚红高糖培养基、RPMI 1640 培养基、MEM 培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、胎牛血清购自以色列 BI 公司;胰蛋白酶、青-链霉素溶液购自上海碧云天生物技术有限公司;非必需氨基酸购自美国 Gibco 公司;荧光染料 CFSE 购自上海贝博生物科技有限公司;Brilliant Violet 421 anti-human CD11b、Brilliant Violet 421 anti-human CD8、PE/Cy7 anti-human IFN γ 、PE anti-human CD3 购自美国 Biolegend 公司;ProLongTM Live Antifade Reagent 购自美国 ThermoFisher 公司;人源淋巴细胞分离液购自北京达科为生物技术有限公司;玻璃底成像皿购自北京兰杰

2021-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31900616)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,安徽医科大学类风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:檀学文,男,硕士研究生;

涂佳杰,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwwei@ahmu.edu.cn

and invasion of cells in si-Cat S group were reduced ($P < 0.001$). Results of Western blot showed that compared with si-NC group, the expression of Bcl-2 in si-Cat S group was downregulated, while the expression of Bax and Caspase-3 were upregulated ($P < 0.001$). Meanwhile, compared with si-NC group, the expression of LRP5, β -catenin, C-myc and Cyclin D1 in si-Cat S group was downregulated ($P < 0.001$). **Conclusion** Cat S siRNA knock-down can inhibit the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells and induce apoptosis by regulating Wnt/ β -catenin pathway, indicating that Cat S may be one of the potential targets for the treatment of osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; cathepsin S; small interfering RNA; proliferation; Wnt/ β -catenin

柯科技有限公司;徕卡活细胞工作站 DMi8 购自德国 Leica 公司;SIGMA 3-30 K 低温高速离心机购自上海纳腾仪器有限公司;流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 细胞培养 THP-1 细胞培养于 RPMI 1640 培养基中,另补加 10% 胎牛血清和 1% 的青-链霉素, Ishikawa 细胞培养于 MEM 培养基中,另补加 5% 胎牛血清、1% 的青-链霉素和 1% 非必需氨基酸置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养。当细胞密度长至 80% 左右时开始后续实验。

1.4 活细胞工作站细胞样本制备 以 5×10^5 个/ml 的密度将 THP-1 细胞接种于 12 孔板中,每孔 1 ml 完全培养基和 100 ng/ml 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA),处理 48 h 后换成普通完全培养基继续培养 24 h。THP-1 预处理 72 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化制备成细胞悬液,再用 PBS 洗涤细胞 2 次后加入 100 μ l PBS 重悬,在 4 ℃ 条件下用抗人 CD11b 孵育巨噬细胞 30 min, PBS 洗涤后用 500 μ l 不含酚红 DMEM 完全培养基重悬。将细胞密度 1.5×10^5 个/ml Ishikawa 细胞从培养瓶中消化并用含 CFSE 荧光探针的染色工作液重悬,在 37 ℃ 培养箱孵育 20 min 后离心收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次后用 500 μ l 不含酚红 DMEM 完全培养基重悬备用。将上述处理的 CD11b 标记 THP-1 细胞与 CFSE 标记 Ishikawa 细胞在 37 ℃、5% CO₂ 湿润环境按约 3 : 1 的比例混合接种在玻璃底成像皿中。

1.5 成像观察 预先开启活细胞工作站自带微型培养箱保持 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养环境,设置活细胞工作站成像系统拍摄参数:激发光强度为 3,绿色荧光曝光时间为 100 ms,蓝色荧光曝光时间为 30 ms, FIM 为 50%, IL-FId 为 6。将接种 2 种细胞的玻璃底成像皿放置 37 ℃、5% CO₂ 的微型培养箱中,在活细胞工作站成像系统下,每 5 min 拍摄一张照片,拍摄 120 min,挑选巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞的代表图。

1.6 流式细胞术检测 CD8⁺ IFN γ ⁺ T 细胞 THP-1 诱导的巨噬细胞与 Ishikawa 细胞混合共培养 24 h 后,加入人外周血 PBMC 继续共培养 24 h,流式细胞术检测 CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ T 细胞数量。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.2.1 软件进行统计分析和作图,结果以均数 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SEM) 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1 诱导的巨噬细胞和 Ishikawa 细胞的荧光标记 THP-1 给予 PMA 诱导的巨噬细胞和 Ishikawa 细胞分别用 Brilliant Violet 421-CD11b 和 CFSE 荧光探针进行标记,其中蓝色荧光标记的是 THP-1 诱导的巨噬细胞,绿色荧光标记的是 Ishikawa 细胞。见图 1。

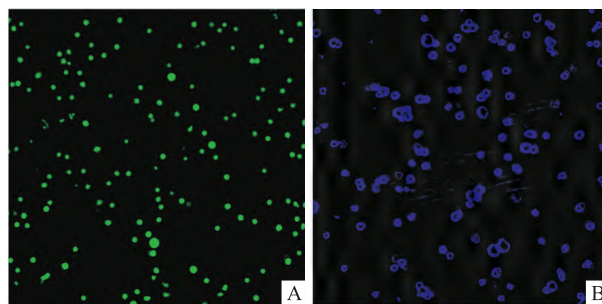


图 1 THP-1 诱导的巨噬细胞和 Ishikawa 细胞的荧光标记图

A: Ishikawa 细胞的绿色荧光标记 $\times 50$; B: THP-1 诱导的巨噬细胞的蓝色荧光标记 $\times 50$

2.2 活细胞工作站记录 THP-1 诱导的巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞的过程 活细胞工作站实时拍照记录巨噬细胞对 Ishikawa 细胞的逐步吞噬情况,在 120 min 内每隔 5 min 拍摄一张照片,记录巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞的过程并整理出每隔 15 min 的全视野细胞吞噬图像 (图 2A)。在整个视野中均可以观察到 THP-1 诱导的巨噬细胞围绕 Ishikawa 细胞不停运动,并随着共培养时间的增加,巨噬细胞逐渐吞噬 Ishikawa 细胞。活细胞工作站拍摄的照片记录着整个拍摄视野中的不同位置,每个位置上均匀分布着巨噬细胞和 Ishikawa 细胞,巨噬细胞识别周围的 Ishikawa 细胞,不断摄取 Ishikawa 细胞的绿色荧光, Ishikawa 细胞的绿色荧光逐渐到被巨噬细胞的蓝色荧光包裹,形成蓝色荧光环绕绿色荧光的类似同心圆结构。在图 2B、C 中,可以清楚呈现出巨噬细胞对 Ishikawa 细胞的吞噬现象。在共培养的不同时间点,可见到巨噬细胞开始吞噬 Ishikawa 细胞。图 2B 中,巨噬细胞对 Ishikawa 细胞的吞噬作用发生在共培养 40 min,巨噬细胞开始逐步摄取 Ishikawa 细胞的绿色荧光。图 2C 展现了巨噬细胞在 80 min 时开始吞噬 Ishikawa 细胞。随着吞噬作用的不断进行, Ishikawa 细胞的绿色荧光逐渐减弱,与 0 min 比较, 120 min 后绿色荧光减弱,差异有统计学意义 ($t = 5.692, P < 0.05$),结果见图 2D。

2.3 巨噬细胞对多个 Ishikawa 细胞的吞噬情况

在巨噬细胞和 Ishikawa 细胞同培养 0 min 时,活细胞工作站记录 Ishikawa 细胞和巨噬细胞呈现独立分布。与 Ishikawa 细胞比较,巨噬细胞的比例更高,巨噬细胞均匀分布在 Ishikawa 细胞周围。巨噬细胞吞噬单个 Ishikawa 细胞后,迁移到另一个 Ishikawa 细胞旁,不断摄取其绿色荧光直至绿色荧光被巨噬细胞的蓝色荧光完全包裹。在 40 min 时,吞噬了 Ishikawa 细胞的巨噬细胞开始包围摄取另一个 Ishikawa 细胞的绿色荧光,并在 80 min 时完全包裹 Ishikawa 细胞,表明随着共培养时间的延长,单个巨噬细胞能够吞噬多个 Ishikawa 细胞。见图 3。

2.4 流式细胞术检测巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞后对 T 细胞的影响

为了观察巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞后对 T 细胞的作用,利用流式细胞术检测 T 细胞比例。与未吞噬 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组比较,吞噬了 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组中 $CD3^+ CD8^+ IFN\gamma^+$ T 细胞数量显著增加,差异有统计学意义($t = 9.876, P < 0.05$),表明巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞后促进 $CD3^+$ T 细胞转变为 $CD8^+ IFN\gamma^+$ 细胞毒性 T 细胞,

增强 T 细胞对 Ishikawa 细胞的杀伤作用。见图 4。

3 讨论

巨噬细胞是人体免疫系统的重要细胞,能够摄取并且清除肿瘤细胞^[8-9],同时 T 细胞能够识别巨噬细胞提呈的肿瘤抗原信息,杀伤肿瘤细胞^[10]。本研究选择 THP-1 诱导的巨噬细胞和子宫内膜癌 Ishikawa 细胞进行共培养,运用活细胞工作站构建了体外巨噬细胞对 Ishikawa 细胞的吞噬模型,为研究巨噬细胞对肿瘤细胞的动态吞噬过程提供一种新的方法。同时观察巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞的后续过程,实验结果证实 $CD8^+ IFN\gamma^+$ 细胞毒性 T 细胞被进一步活化。

长时间观察巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的复杂动态过程,这是既往使用的流式细胞术和普通荧光显微镜无法实现的,但是活细胞工作站能够实现。从实验结果可以看出,使用活细胞工作站观察巨噬细胞吞噬肿瘤细胞有几个比较重要的条件:① 活细胞工作站必须配有微型培养箱,保证细胞在成像观察过程中保持正常的健康状态;② 用 100 ng/ml PMA 将 THP-1 诱导成具有强大吞噬能力的巨噬细胞;③ 对

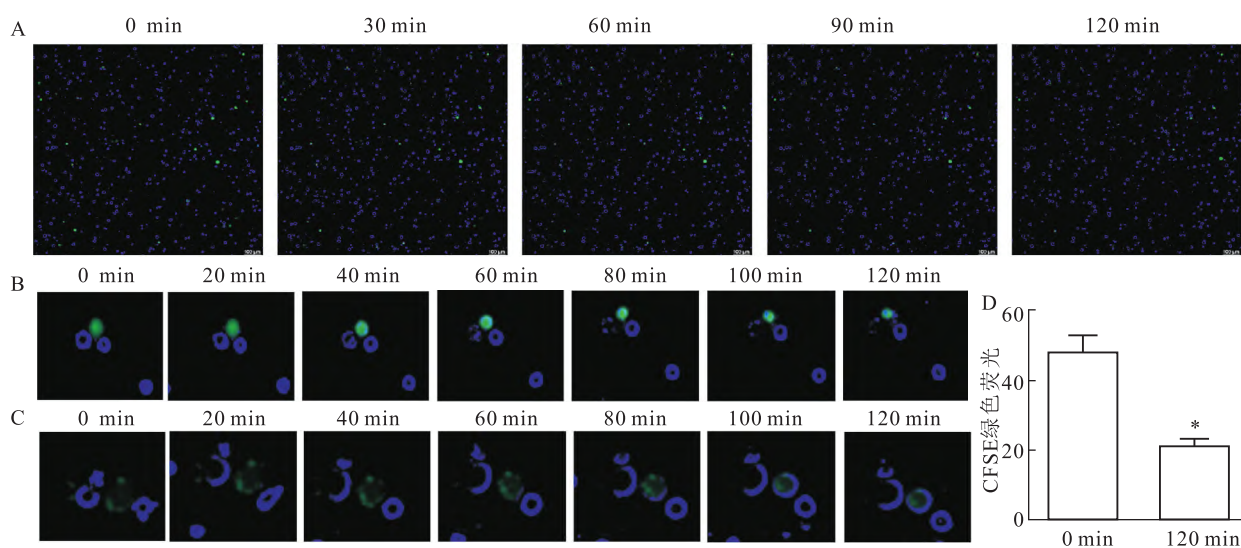


图2 THP-1 诱导的巨噬细胞吞噬人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞示意图

A:THP-1 诱导的巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞的全视野代表图 $\times 100$;B、C:单个巨噬细胞吞噬单个 Ishikawa 细胞的代表图 $\times 25$;D:CFSE 荧光改变;与 0 min 比较: * $P < 0.05$

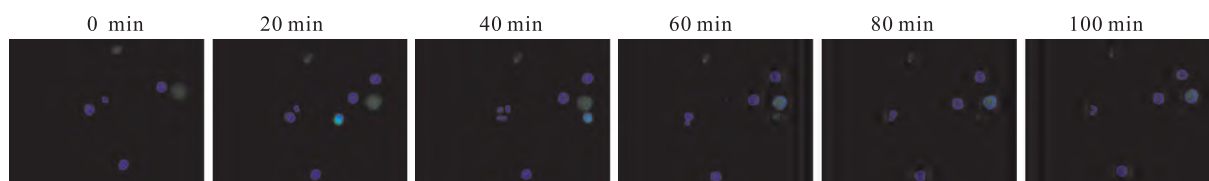


图3 巨噬细胞吞噬多个 Ishikawa 细胞的示意图 $\times 25$

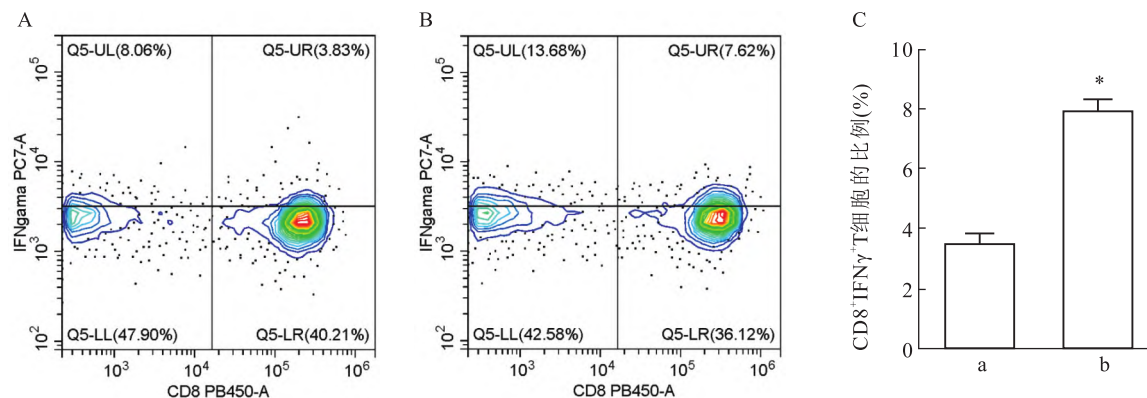


图4 流式细胞术检测巨噬细胞吞噬 Ishikawa 细胞后对 T 细胞的影响

A: 未吞噬 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组 $CD8^+ IFN\gamma^+$ T 细胞的比例; B: 吞噬 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组 $CD8^+ IFN\gamma^+$ T 细胞的比例; C: 两组 $CD8^+ IFN\gamma^+$ T 细胞的比例统计图; a: 未吞噬 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组; b: 吞噬 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组; 与未吞噬 Ishikawa 细胞的巨噬细胞与 PBMC 共培养组比较: * $P < 0.05$

巨噬细胞和肿瘤细胞进行不同的荧光标记,以便在动态过程中区分两种不同的细胞,本研究使用 Brilliant Violet 421-CD11b 和 CFSE 荧光探针,分别标记 THP-1 诱导的巨噬细胞和 Ishikawa 细胞,其中 CD11b 标记巨噬细胞膜表面,在吞噬过程中能够明显观察到 Ishikawa 细胞的绿色荧光被摄取到巨噬细胞胞质内。

观察时间过长可能因为光漂白导致荧光逐渐淬灭,影响成像质量,这是活细胞成像重要的局限性。在本研究中为了减少荧光淬灭,将成像系统的参数进行调整,降低激发光强度,调整 FIM 为 50%,并使用活细胞抗荧光淬灭剂,结果在成像过程中减少了荧光淬灭。

综上所述,活细胞工作站能够实时记录巨噬细胞吞噬肿瘤细胞,长时间动态观察细胞吞噬过程,弥补经典流式细胞术和荧光显微镜的不足,为巨噬细胞与肿瘤细胞相互作用研究提供了一种可行的实验方法。在此基础上,通过流式证明了巨噬细胞吞噬肿瘤细胞后能够增加 $CD8^+ IFN\gamma^+$ 细胞毒性 T 细胞的比例,发挥 T 细胞的抗肿瘤作用。本研究中所演示的肿瘤细胞-巨噬细胞-T 细胞 3 种细胞的相互作用模型为体外水平研究肿瘤免疫治疗作用及相关潜在靶点开发提供了一个的理想平台。

参考文献

[1] Qin H, Holdbrooks A T, Liu Y, et al. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation [J]. J Immunol,

2012, 189 (7): 3439-48.

- [2] Barkal A A, Brewer R E, Markovic M, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy [J]. Nature, 2019, 572 (7769): 392-6.
- [3] Wang R, Dang Y, Zheng R, et al. Live cell imaging of *in vitro* human trophoblast syncytialization [J]. Biol Reprod, 2014, 90 (6): 117.
- [4] Sakaue-Sawano A, Hiroshi K, Toshifumi M, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression [J]. Cell, 2008, 132 (3): 478-87.
- [5] Lekshmi A, Varadarajan S N, Lupitha S S, et al. A quantitative real-time approach for discriminating apoptosis and necrosis [J]. Cell Death Discov, 2017, 3 (1): 16101.
- [6] 方亦龙, 韩大飞, 檀学文, 等. 成像流式细胞术在检测巨噬细胞吞噬肿瘤细胞中的应用 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56 (10): 1670-4.
- [7] Gordon S R, Maute R L, Dulken B W, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity [J]. Nature, 2017, 545 (7655): 495-9.
- [8] Ramesh A, Kumar S, Nandi D, et al. CSF1R-and SHP2-inhibitor-loaded nanoparticles enhance cytotoxic activity and phagocytosis in tumor-associated macrophages [J]. Adv Mater, 2019, 31 (51): e1904364.
- [9] De Nardo D G, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19 (6): 369-82.
- [10] Chen C, Shen Y, Qu Q X, et al. Induced expression of B7-H3 on the lung cancer cells and macrophages suppresses T-cell mediating anti-tumor immune response [J]. Exp Cell Res, 2013, 319 (1): 96-102.

网络出版时间:2022-8-17 9:30 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0930.032.html

基于 16S rDNA 测序技术分析利福平致大鼠肝损伤中肠道菌群变化特征

杨璐铭¹, 郝金奇^{1,2}, 王 林¹, 裴盛斐¹, 郭 玉¹, 唐琴艳³, 李 玥¹, 高学磊¹, 李玉红^{1,4}, 郝明媛⁵, 冯福民^{1,3}

摘要 目的 采用 16S rDNA 测序技术分析利福平(RFP)致大鼠抗结核药物性肝损伤(ADLI)中肠道菌群的变化。方法 将 24 只雄性 SD 大鼠随机均分为对照组(D0 组)、RFP 灌胃 10 d 组(R10 组)、RFP 灌胃 28 d 组(R28 组)。用随机数字表法每组选取 4 只大鼠的粪便标本进行 16S rDNA 测序。

2021-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760609)

作者单位:华北理工大学¹ 公共卫生学院、³ 生命科学学院,唐山 063200

² 内蒙古科技大学包头医学院,包头 014040

⁴ 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心,北京 102206

⁵ 呼伦贝尔市传染病医院检验科,呼伦贝尔 162650

作者简介:杨璐铭,女,硕士研究生;

冯福民,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:fm_feng@sina.com

结果 与 D0 组比较,R10 组和 R28 组 α 多样性和 β 多样性均发生改变($P < 0.05$),门水平上拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰度增加,厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度减少($P < 0.05$);属水平上 *Unclassified_f_Prevotellaceae*、特氏菌属(*Blautia*)、*Prevotellaceae_NK3B31_group*、*Erysipelotrichaceae_uCG-003*、*Fournierella* 丰度增加,乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*Romboutsia*、*Ruminococcaceae_uCG-014* 丰度减少($P < 0.05$)。**结论** RFP 致大鼠 ADLI 过程中,肠道菌群数量减少,结构和组成均发生改变,有益菌减少,致病菌增多,但其菌群多样性未见改变。

关键词 抗结核药物性肝损伤;利福平;16S rDNA;肠道菌群;高通量测序

中图分类号 R 183.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)09-1469-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.024

利福平(rifampicin, RFP)是 WHO 推荐使用的

In vitro phagocytosis model of endometrial cancer cells by macrophages via live cell application

Tan Xuewen, Chen Weile, Chen Yizhao, Fang Yilong, Jiang Haifeng, Xu Zhen, Tu Jiajie, Wei Wei
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective The live cell application was used to observe the process of phagocytosis of endometrial cancer cells by macrophages, and flow cytometry was used to detect the effects of macrophages engulfing tumor cells on activation of cytotoxic T cell. **Methods** Ishikawa cells and THP1-induced macrophages were labeled with CFSE fluorescent probe and CD11b respectively, and then mixed and seeded on a glass imaging dish. The live cell application was performed to record the phagocytosis of Ishikawa cells by macrophages within 120 minutes. Flow cytometry was used to detect the effect of macrophages engulfing tumor cells on activation of cytotoxic T cell. **Results** The green fluorescence of Ishikawa cells was taken up by macrophages after the co-cultured two types of cells were in contact with each other, and macrophages were able to engulf multiple Ishikawa cells continuously. Macrophages that engulfed Ishikawa cells could induce activation of cytotoxic T cell. **Conclusion** The live cell application was successfully conducted to construct an *in vitro* model of phagocytosis of tumor cells by macrophages, which provided a feasible experimental method for detecting the dual killing process of macrophages and T cells on tumor cells.

Key words live cell application; macrophages; Ishikawa cells; phagocytosis; cytotoxic T cells