

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.004.html>

流式细胞术分选小鼠肺泡巨噬细胞及鉴定

韩鑫涛^{1,2,3} 赵殿元^{2,3} 唐 丽^{1,2,3}

摘要 目的 建立一种基于流式细胞术分离小鼠肺泡巨噬细胞(AM)的方法。方法 小鼠肺脏在体外经胶原酶 IV 消化后获得单细胞悬液,再经 CD11b 和 CD11c 抗体标记,利用流式细胞仪分选获得 CD11b^{low}CD11c⁺ AM,并经台盼蓝染色计数细胞活力,以及通过 Real-time PCR 和吞噬功能进行鉴定。结果 流式细胞术分选小鼠肺脏单细胞悬液,获得 CD11b^{low}CD11c⁺ 细胞,纯度为(93±2)% ,细胞活力为(80±5)% ; Real-time PCR 结果显示过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 在该群细胞高表达($P < 0.001$) ;细胞吞噬功能实验结果显示该群细胞具有较好的吞噬活性,吞噬率约为 10%。结论 建立了一种基于流式细胞术分选获得 AM 的方法,该方法获得的细胞纯度高,细胞活性好,可用于功能性实验。

关键词 肺泡巨噬细胞; 流式细胞术; Real-time PCR; 吞噬

功能

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1596-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.004

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)是肺脏定居的巨噬细胞,正常情况下,占肺泡内细胞总数的 90%~95%^[1]。在胚胎发育期,单核细胞进入胚胎肺,分化为 AM,并通过不断增殖完成自我更新^[2-3]。不同于腹腔、肝脏、脑、心脏等组织定居的巨噬细胞,AM 特异表达过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 转录因子,在 AM 的分化和组织特异性形成中发挥重要作用^[4]。作为诱导型表达的基因,PPAR γ 受肺泡上皮细胞产生并进入肺泡微环境的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子调控^[5-6],而且 PPAR γ 表达异常通常与某些疾病有关,如肺泡蛋白沉着症患者中 PPAR γ 的表达丢失^[7]。此外,AM 处于一种独特微环境,在肺泡内直接与外部环境接触,因而具备高吞噬活性,从而能迅速清除来自于呼吸道的颗粒抗原和“短命”上皮细胞,在肺脏免疫稳态

2017-07-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:31570901、81500428)

作者单位: ¹ 安徽医科大学,合肥 230032

² 军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850

³ 蛋白质组学国家重点实验室,北京 102206

作者简介: 韩鑫涛,男,硕士研究生;

唐 丽,女,研究员,博士生导师,责任作者, E-mail: tan-gli731@163.com

DNA was extracted from HepG2 cells, then 937, 667, 553 and 399 bp fragments before the translation start site of SAMHD1 gene were amplified by PCR from genomic DNA. Four fragments were inserted into the pMD19-T vector. After enzyme digestion and electrophoresis, DNA bands were separated and ligated into pGL3-Basic vector. The pGL3 plasmids containing four fragments were further identified by double enzyme digestion and DNA sequencing. The luciferase expression vector containing four fragments was co-transfected with pRL-TK into HepG2 cells and the promoter activities of four fragments were analyzed by luciferase assay. The transcription initiation site of SAMHD1 in HepG2 cells was identified by 5'RACE. **Results** Electrophoretic results showed that genomic DNA had been successfully extracted from HepG cells. The results of electrophoresis after PCR amplification showed that 937, 667, 553 and 399 bp fragments had been amplified. The results of electrophoresis showed that four fragments were successfully inserted into pMD19-T vector. Double enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that luciferase expression vectors pGL3-937, pGL3-667, pGL3-553 and pGL3-399 were successfully constructed. Luciferase activity analysis showed that the SAMHD1 core promoter region was located in the 0 ~ -399 region (the first base before ATG was set as -1). 5'RACE results showed that the transcription initiation site of SAMHD1 in HepG2 cells was located at -101. **Conclusion** The core promoter of SAMHD1 is located at -101 ~ -399 region, which lays a foundation for further study of SAMHD1 transcriptional regulation in hepatocytes.

Key words SAMHD1; the core promoter; transcription initiation site; transcriptional regulation

的维持中发挥重要作用^[8-9]。随着环境的恶化以及肺癌发病率的升高,AM在肺脏炎症及疾病中的作用已成为当前的研究热点。该文采用流式细胞术分选小鼠CD11b^{low}CD11c⁺的AM,并对细胞纯度、PPAR γ 转录因子及细胞吞噬活性进行检测,为进一步体外功能性试验的研究提供细胞纯度高、细胞活性好的AM。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级C57BL/6小鼠,6~8周龄,体质量20~22 g,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,并饲养于无菌的独立通气笼中。动物实验室内相对湿度40%~70%,温度约为25℃,每日光照12 h,自由摄食饮水。

1.2 主要试剂 胶原酶IV(美国Sigma Aldrich公司);RPMI-1640(美国Hyclone公司);DNase I(瑞士Roche公司);CD11b-APC或CD11b PE-Cy7抗体、CD11c-PE抗体、CFSE-FITC荧光染料(美国eBioscience公司);Carboxyl Fluorescent Sky Blue Particles(美国Spherotech公司);RNA小提试剂盒(德国Qiagen公司);cDNA反转录试剂盒(日本Takara公司);SYBR green(日本东洋纺公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 小鼠肺脏单细胞悬液的制备 戊巴比妥钠腹腔麻醉,75%乙醇浸泡,置于超净台,固定在解剖盘中;剪开颈部皮肤,打开胸腔,用1 ml无菌注射器吸取1 ml PBS注入心脏,重复3次,冲洗干净肺循环中的血液,小心去除胸腺及胸部淋巴结,摘全肺于4℃含5%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640培养基中;眼科剪刀剪碎,转移至15 ml离心管,1 500 r/min离心5 min,弃上清液,加入10 ml消化液(0.5 mg/ml胶原酶IV,0.02 mg/ml DNase I),置于37℃水浴锅中孵育30 min,每5 min摇晃1次;吹散组织,另加5 ml消化液,延长消化15 min;将细胞混合物连续通过注射器,打散组织块,过70 μ m细胞筛网,得到单细胞悬液;1 500 r/min离心5 min,加无Ca²⁺、Mg²⁺、含10 mmol/L乙二胺四乙酸的PBS重悬,室温摇5 min;1 500 r/min离心5 min,弃上清液,加5 ml红细胞裂解液冰上裂解10 min,加5 ml含10% FBS的RPMI-1640终止裂解,4℃、1 200 r/min离心10 min,收集细胞。

1.4 流式抗体标记及流式细胞仪分选 文献^[3,10]中通常将CD11b^{low}CD11c⁺细胞群定义为AM,所以本实验中选用CD11b和CD11c抗体标记肺脏单细

胞悬液。细胞计数后用流式缓冲液(RPMI-1640 + 1% FBS)重悬,一般 1×10^7 个细胞用300 μ l缓冲液重悬;加入3 μ l FC封闭抗体,室温孵育15 min;将细胞悬液分为两管,1号管为阴性对照,2号管加入3 μ l CD11b-APC(或CD11b PE-Cy7)抗体和3 μ l CD11c-PE抗体作为实验组,避光、4℃标记20 min,然后用流式缓冲液洗2遍,再用2.5 ml流式缓冲液重悬并移入流式管中,进行流式细胞分选。本实验使用的流式细胞仪为BD FACSAria III,调试参数后,设定分选条件进行分选。

1.5 细胞计数及细胞活力检测 流式细胞分选后,将收集的细胞悬液在4℃条件下1 500 r/min离心5 min,弃上清液,并用适量含10% FBS的RPMI-1640重悬。取细胞悬液100 μ l于新的1.5 ml离心管中,并加入等量的0.4%台盼蓝染液,混匀,然后取10 μ l加入细胞计数板,用细胞计数仪(美国Biorad公司)计数并读取细胞活力。细胞活力 = 活细胞数/总细胞数。

1.6 Real-time PCR检测PPAR γ 在AM的表达 收集分选后的AM及诱导获得的骨髓衍生巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM),按照RNA小提试剂盒说明书提取总RNA,然后按照cDNA反转录试剂盒说明书反转录合成cDNA后,进行Real-time PCR检测。20 μ l反应体系:SYBR green (2 \times) 10 μ l,PCR上下游混合引物1 μ l,引物序列如下:Gapdh上游引物:5'-AGGTCGGTGTGAACG-GATTG-3',Gapdh下游引物:5'-TGTAGACCATG-TAGTTGAGGTCA-3';PPAR γ 上游引物:5'-GCTG-GCCTCCCTGATGAATAA-3',PPAR γ 下游引物:5'-TCCCTGGTCATGAATCCTTGG-3',cDNA模板1 μ l,蒸馏水8 μ l。以GAPDH为内参基因,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算目的基因的相对表达水平。

1.7 小鼠AM吞噬功能的检测 取小鼠胸腺研磨,并用45 μ m筛网过滤,1 500 r/min离心5 min,弃上清液,用RPMI-1640培养基重悬,调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml,然后加入羧基荧光素双乙酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE),使其终浓度为5 μ mol/L,混匀后避光孵育10 min,然后用4~5倍RPMI-1640培养基中和,冰上放置5 min,1 500 r/min离心5 min,弃上清液,适量RPMI-1640培养基重悬,65℃加热5 min,冷却至室温获得CFSE标记的胸腺死亡细胞。

将分选后的AM按 1×10^5 个/ml铺于24孔板中,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养24 h后,

用预热的 RPMI-1640 培养基洗掉未贴壁的细胞, 然后加入荧光标记的吞噬靶标, 例如依据细胞数量按 1:10 的比例加入 CFSE 标记的胸腺死亡细胞或依据培养基体积按 20:1 的比例加入带 APC 荧光的微球。于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 60 min; RPMI-1640 培养基洗 3 次, 彻底去除未被吞噬的细胞或微球; 胰酶消化获得单细胞悬液, 流式细胞仪检测 AM 的吞噬率。

1.8 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行统计分析, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪分选 AM 的圈门策略 胶原酶消化的肺脏单细胞悬液抗体标记后流式上样。如图 1 所示, 首先通过 FSC/SSC 散点图排除细胞碎片, 圈出细胞(一级门), 并在 SSC-W/SSC-H 和 FSC-W/FSC-H 散点图中去除粘连细胞(分别是二级门和三级门), 圈出单细胞。最后在 CD11b/CD11c 散点图中选定 CD11b^{low}CD11c⁺ 细胞群为 AM(四级门), 并进行分选。如图 1 所示, CD11b^{low}CD11c⁺ AM 比例约为 7%。

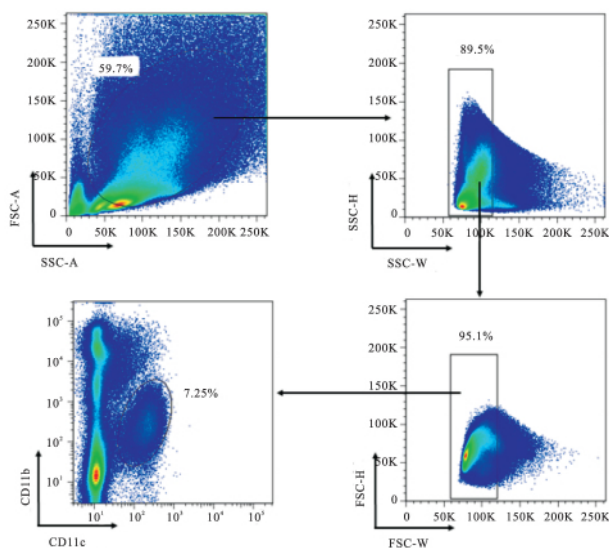


图 1 流式细胞仪分选 AM 圈门策略

2.2 流式细胞仪分选 AM 的纯度、细胞数量和活性检测 将按图 1 分选的细胞进行纯度回测, 其纯度为 $(93 \pm 2)\%$, 纯度很高, 其中一次的回测结果见图 2A。每只小鼠可获得 $(1.9 \pm 0.19) \times 10^5$ 个 AM 细胞。对分选后的细胞进行台盼蓝染色(图 2B), 其

活细胞数占总细胞数的 $(80 \pm 5)\%$, 说明活性较好。

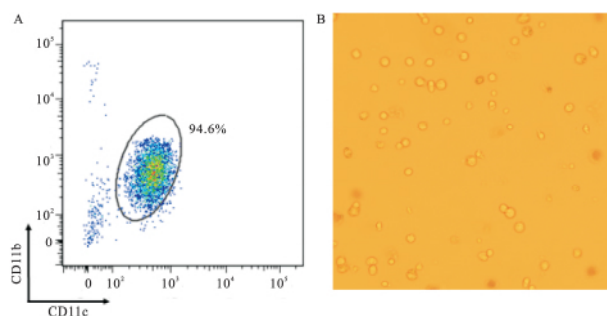


图 2 流式细胞术分选后小鼠 AM 纯度及活性鉴定

A: 流式细胞术分选后小鼠 AM 纯度鉴定; B: 流式细胞术分选后小鼠 AM 台盼蓝染色图 $\times 400$

2.3 Real-time PCR 检测 PPAR γ 在 AM 中的表达结果 与 BMDM 相比, AM 特异表达转录因子 PPAR γ 。本研究提取体外诱导的 BMDM 和流式分选的 AM 的 RNA, 并合成 cDNA, 应用 Real-time PCR 的方法, 以 GAPDH 基因为内参, 检测 PPAR γ mRNA 在 AM 和 BMDM 的表达。如图 3 所示, PPAR γ mRNA 在 AM 的表达明显高于 BMDM ($t = 39.02$, $P < 0.001$)。

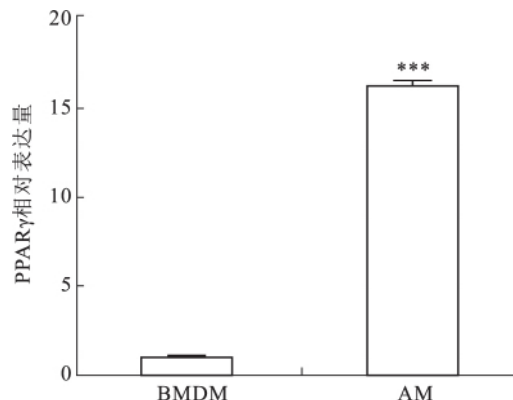


图 3 PPAR γ mRNA 在分选的 AM 中高表达
与 BMDM 比较: *** $P < 0.001$

2.4 小鼠 AM 吞噬功能的检测结果 本实验中, 分别以死亡的胸腺细胞和带 APC 荧光的微球作为 AM 的吞噬靶标进行吞噬功能的检测。其中, 细胞凋亡实验结果显示, 经 65 °C 加热处理 5 min 后约有 85% 的胸腺细胞死亡(图 4A、B), 可用于吞噬活性的检测。

AM 细胞培养 24 h 后, 添加带荧光标记的吞噬靶标, 进行吞噬功能检测。在以死亡的胸腺细胞作为 AMs 吞噬靶标的实验中, 本研究将 AMs 分为两

组,一组按 1:10 的比例加入 CFSE 标记的胸腺死亡细胞作为实验组,另一组不做处理作为阴性对照,并进行流式细胞分析。如图 5A 和 5B 所示,实验组中约有 10% 的细胞为 CFSE 阳性,而阴性对照组中几乎不含 CFSE 阳性细胞;在以微球作为 AM 吞噬靶标的实验中,添加微球的实验组中约有 13% 的细胞为 APC 阳性,而在未加微球的阴性对照组中几乎不含 APC 阳性的细胞(图 5C、D)。这说明流式分选的 AM 具有较高的吞噬活性。

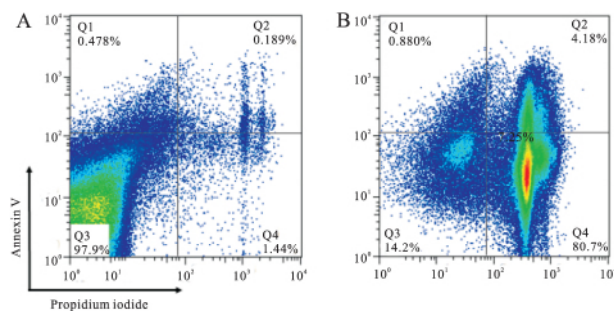


图 4 流式细胞术检测胸腺细胞死亡情况

A: 未加热处理的胸腺细胞; B: 65 °C 加热 5 min 处死的胸腺细胞

3 讨论

肺脏中有两群主要的巨噬细胞: AM 和肺间质巨噬细胞,其中数量最多、研究最透彻的是 AM^[11]。肺脏中的这两群细胞不但在表型上有明显的差异,而且功能也明显不同。例如,AM 能够吞噬外源颗粒物,以及分解代谢肺泡表面的表面活性物质;而肺间质巨噬细胞则在组织重塑和稳态平衡以及抗原提呈中具有重要作用^[12]。本研究通过肺脏巨噬细胞表面标志物的不同,并利用流式细胞术分选获得 CD11b^{low}CD11c⁺ 的 AM。该方法每只小鼠可分离获得 $(1.9 \pm 0.19) \times 10^5$ 个 AM,并具有较高的细胞活力。

巨噬细胞具有异质性和可塑性的特点。组织定居的巨噬细胞能够对组织微环境信号响应,表达一些组织特异的基因^[4,10]。如肝脏定居的巨噬细胞特异表达 Clec4f,腹腔定居的巨噬细胞特异表达 GATA6,脾脏定居的巨噬细胞特异表达 SPIC^[10,13-14]。这些巨噬细胞组织特异基因的表达不仅在巨噬细胞的功能和表型调控中发挥重要作用,而且也作为鉴定组织定居巨噬细胞提供了重要的标志物。本实验选取 AM 特异表达的 PPAR γ 作为 AM 的重要标志物对流式分选获得的细胞进行鉴定,并且结果表明 PPAR γ mRNA 在流式分选获得的

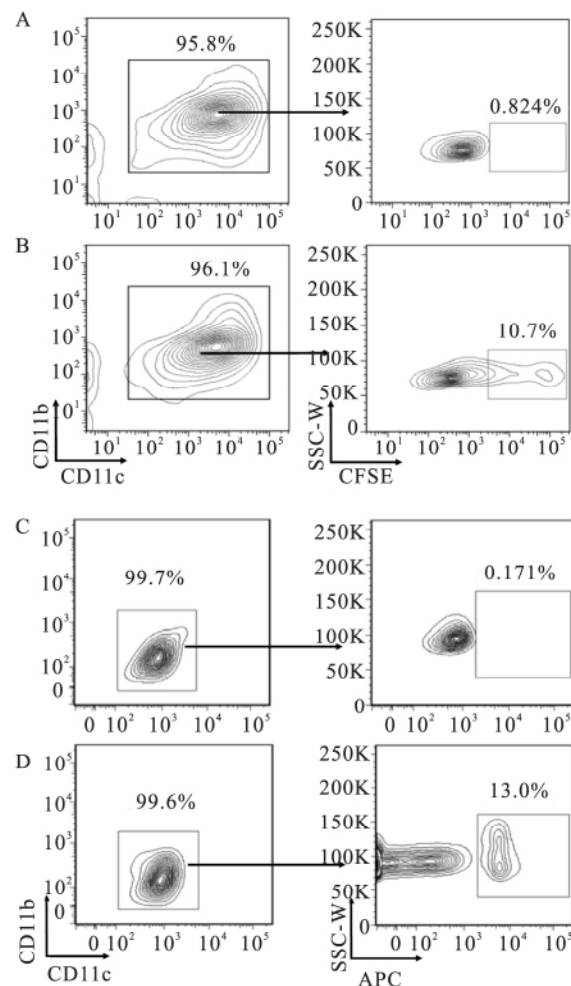


图 5 流式细胞术检测 AM 吞噬功能

A: 未加 CFSE 标记凋亡细胞的阴性对照组; B: 添加 CFSE 标记凋亡细胞的实验组; C: 未加带荧光 (APC) 的微球作为阴性对照组; D: 添加带荧光 (APC) 的微球作为实验组

CD11b^{low}CD11c⁺ 细胞群中显著高表达。

虽然不同组织定居的巨噬细胞具有适应组织微环境的特异功能和表型,但是作为单核吞噬细胞,所有组织定居的巨噬细胞都具备吞噬功能。在机体中,巨噬细胞不仅能够吞噬清除细胞碎片、凋亡细胞或大分子物质,也能够吞噬消化入侵的病原体,在机体急性炎症和慢性炎症中发挥重要作用。因此,吞噬功能是巨噬细胞功能鉴定的经典指标。本实验中,流式分选的 AM 能够吞噬死亡的胸腺细胞和微球,具备较强的吞噬功能。

综上所述,通过本实验,建立了一种基于流式细胞术分选获得 AM 的方法,并通过对组织特异基因的表达及吞噬功能的检测将其进一步鉴定为 AM,为进一步研究 AM 的功能打下基础。

参考文献

- [1] Morales-Nebreda L, Misharin A V, Perlman H, et al. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease [J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(137): 505 – 9.
- [2] Todd E M, Zhou J Y, Szasz T P, et al. Alveolar macrophage development in mice requires L-plastin for cellular localization in alveoli [J]. *Blood*, 2016, 128(24): 2785 – 96.
- [3] Hussell T, Bell T J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(2): 81 – 93.
- [4] Amit I, Winter D R, Jung S. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(1): 18 – 25.
- [5] Schneider C, Nobs S P, Kurrer M, et al. Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1026 – 37.
- [6] Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(1): 9 – 17.
- [7] Nakamura A, Ebina-Shibuya R, Itoh-Nakadai A, et al. Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(11): 2191 – 204.
- [8] Divangahi M, King I L, Pernet E. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(5): 307 – 14.
- [9] 李若曦, 刘姜瑾, 熊珊珊, 等. 卷烟烟气暴露对小鼠肺巨噬细胞吞噬功能和调节性 T 细胞的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(9): 1014 – 8.
- [10] Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages [J]. *Cell*, 2014, 157(4): 832 – 44.
- [11] Mathie S A, Dixon K L, Walker S A, et al. Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge [J]. *Allergy*, 2015, 70(1): 80 – 9.
- [12] Tan S Y, Krasnow M A. Developmental origin of lung macrophage diversity [J]. *Development*, 2016, 143(8): 1318 – 27.
- [13] Scott C L, Zheng F, De Baetselier P, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10321.
- [14] Haldar M, Kohyama M, So A Y, et al. Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages [J]. *Cell*, 2014, 156(6): 1223 – 34.

Isolation of mouse alveolar macrophages by flow cytometry and identification

Han Xintao^{1 2 3}, Zhao Dianyan^{2 3}, Tang Li^{1 2 3}

(¹Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850;

³State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206)

Abstract Objective To establish a method for isolating alveolar macrophage (AM) of mouse based on flow cytometry. **Methods** The lungs were digested by collagen IV *in vitro* to prepare single-cell suspension that was stained by CD11b and CD11c antibody. CD11b^{low}CD11c⁺ cell population were AM and isolated by flow cytometry. After that, the cell viability was measured via the Typan blue staining, and the identification of AM was through flow cytometry and real-time PCR. **Results** CD11b^{low}CD11c⁺ cell population was isolated by flow cytometry, the purity was (93 ± 2) % and the cell viability was (80 ± 5) %. The real-time PCR results showed that peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mRNA was highly expressed in AM isolated by flow cytometry ($P < 0.001$). In addition, the functional assay showed that the isolated AM possess high phagocytic activity. Thus, the results described above demonstrate that the isolated cells were AM. **Conclusion** A method for obtaining AM based on flow cytometry was established. The method has high cell purity and good cell activity which can be used for functional experiments.

Key words alveolar macrophage; flow cytometry; real-time PCR; phagocytosis