

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.009

细胞计数板在荧光显微镜观察 B 细胞吞噬现象的应用探讨 *

吴梦丽 周林甫 石晓丹 刘学武 史 明 冯国栋 赵 钢^Δ

(第四军医大学西京医院神经内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:基于细胞计数板建立一种简单、快速使用免疫荧光显微镜观察 B 淋巴细胞吞噬卡介苗(BCG)现象的新方法,对即将进行流式细胞检测的样品进行质控,提高流式细胞术检测吞噬率的稳定性,同时为流式细胞仪检测吞噬率提供镜下依据。**方法:**B 细胞与 FITC 标记的 BCG 共培养 24 h 后,PE anti-human CD19 抗体直接标记细胞膜,应用细胞计数板在荧光显微镜下观察 B 细胞吞噬现象,流式细胞仪检测吞噬率。**结果:**应用细胞计数板在荧光镜下可观察到 B 细胞与 BCG 的荧光标记及 B 细胞与 BCG 共标记现象,证实 B 细胞可吞噬 BCG,流式细胞仪检测结果显示吞噬率为 13.9 %。**结论:**应用细胞计数板在荧光镜下可观察 B 细胞吞噬现象,且操作简便快速,能对流式细胞检测的样品进行质控,并提供镜下依据。

关键词:细胞计数板;荧光显微镜;B 细胞;卡介苗

中图分类号:R-33;R446 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)11-2037-04

The Explore of Phagocytosis of B Lymphocytes using Cell Counting Chamber under Immunofluorescence Microscopy*

WU Meng-li, ZHOU Lin-fu, SHI Xiao-dan, LIU Xue-wu, SHI Ming, FENG Guo-dong, ZHAO Gang^Δ

(Department of Neurology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To establish a simple and quick method to explore phagocytosis of B lymphocytes under immunofluorescence microscopy based on cell counting chamber. By monitoring the sample quality before flow cytometry(FCM), the method could improve the stability of phagocytic rate detected by FCM. It could also offer image proof under fluorescence microscopy at the same time. **Methods:** After Raji B lymphocytes and FITC-stained BCG were incubated together for 24 hrs, B lymphocytes were labeled by PE anti-human CD19 antibody. Then we applied cell counting chamber to observe phagocytosis of B lymphocytes and flow cytometry to test phagocytic rate. **Results:** B lymphocytes and BCG could be single labeled respectively and double labeled, which was observed under fluorescence microscope based on cell counting chamber. The phagocytic rate tested by flow cytometry was 13.9 %. **Conclusions:** Observing phagocytosis of B lymphocytes using cell counting chamber under fluorescence microscopy might be a simple and quick method. It can be applied in monitoring the sample quality before flow cytometry, it could also offer proof under fluorescence microscopy.

Key words: Cell counting chamber; Immunofluorescence microscopy; B lymphocyte; BCG

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2037-04

前言

结核病是一种严重危害人类健康的全球性感染性疾病,结核分枝杆菌是结核病的病原体^[1,2]。但目前为止我们对机体参与结核分枝杆菌感染的免疫应答仍知之甚少。虽然 CD4⁺ Th1 细胞和 CD8⁺ 毒性 T 淋巴细胞对控制人类结核病发挥了重要作用, B 细胞抗结核过程中的体液免疫应答所扮演的角色仍然不可忽视^[3]。传统观念认为吞噬细胞包括中性粒细胞和单核吞噬细胞系统,而淋巴细胞没有吞噬功能。近年研究表明真骨鱼类和小鼠 B 细胞有吞噬和杀菌功能^[4-7]。我们前期研究发现在结核性脑膜炎患者脑脊液 B 细胞内有结核分枝杆菌存在^[8], Raji B 细胞和健康人外周血 B 细胞可以主动吞噬结核分枝杆菌^[9,10]。

通常我们采用流式细胞仪来检测细胞吞噬率,准确、方便、快捷的特点使其成为研究者的常用方法^[11,12]。虽然目前流式细胞检测技术已日趋成熟^[13-15],但是在实验过程中我们发现细胞吞噬率的检测结果并不稳定,因此如何在流式检测前监控待检样品的质量,使实验稳定进行成为研究者关心的问题。

细胞计数板是用来计数细胞的一种常用生物学工具,最初设计用来计数血细胞,也可用来计算一些细菌、真菌、酵母等微生物的数量。加盖盖玻片后,计数区的高度为 0.1 mm,由于虹吸作用,待检细胞悬液进入到盖玻片和计数板凹槽形成的狭窄空间。基于这个原理,我们可将荧光标记的细胞悬液移入凹槽进行观察,旨在探讨细胞计数板在荧光显微镜观察 B 细胞吞噬现象的应用价值。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81371334)

作者简介:吴梦丽(1991-),女,硕士研究生,专业:神经病学,主要研究方向:颅内感染性疾病,

E-mail: 499973205@qq.com, 电话: 15619250501

Δ 通讯作者:赵钢(1960-),男,博士生导师,教授,主任医师,主要研究方向:脑血管病与颅内感染性疾病, E-mail: zhaogang@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-07-16 接受日期:2016-08-12)

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用 BCG 为临床皮内注射用卡介苗冻干粉, 保存条件为 2~8℃。Raji B 细胞系用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基(Corning), 37℃, 含 5% CO₂ 的孵箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 FITC 标记 BCG 将 10 mg FITC(Sigma 公司)溶于盛有 1ml DMSO 溶液的 1.5 mL EP 管中, 制备成荧光染料储液, 锡箔纸包裹后置于 4℃ 冰箱避光保存。

BCG 溶于无菌 PBS 中, 2000 rpm 低速离心除去大的菌块, 留滤液 10000 rpm 离心弃上清, 沉淀用 100 μL Na₂CO₃ 重悬, 加 25 μL FITC 荧光染料, 4℃ 冰箱标记过夜后, PBS 洗涤 3 次, 每次均 10000 rpm 离心去上清, 适量 PBS 缓冲液重悬, 调整菌液浓度至 10⁸ 个/mL(用麦氏比浊法), 锡箔纸包裹后置于 4℃ 冰箱避光保存待用。

1.2.2 荧光显微镜下观察 FITC 标记的 BCG 将 FITC 标记好的菌悬液取 10 μL 移入细胞计数板, 在荧光显微镜的明场和蓝色激发光下分别观察结核分枝杆菌, 并采集图像。

1.2.3 流式细胞仪检测 BCG 的荧光标记率 取 500 μL FITC 标记过的 BCG 悬液于 1.5 mL EP 管中, 用流式细胞检测仪检测 BCG 的荧光标记率。

1.2.4 Raji B 细胞与 FITC 标记的 BCG 共培养 将 Raji B 细胞 1500 rpm 离心后弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640

重悬细胞, 调整细胞浓度至 5×10⁵/mL, 接种至 24 孔板中, 每孔 1 mL, 加 50 μL FITC 标记的 BCG, 置于 37℃, 含 5% CO₂ 的孵箱孵育 24 h。

1.2.5 anti-human CD19 标记 Raji B 细胞 将共培养 24 h 的 Raji B 淋巴细胞 1500 rpm 离心去上清, 洗 3 次, 用 100 μL pbs 缓冲液重悬, 加 20 μL anti-human CD19(BD 公司), 4℃ 避光标记 20 min, pbs 洗涤两次洗去未结合的抗体, 调整细胞浓度至 5×10⁵/mL。

1.2.6 荧光显微镜观察吞噬结果 预先将细胞计数板清洗干净, 将盖玻片加盖在中央的计数室上, 将细胞悬液用移液枪吹打均匀, 枪头吸取 10 μL, 置于盖玻片的边缘, 缓慢打出液体, 使细胞悬液缓缓吸入, 将计数板置于荧光显微镜下观察。首先在明场下寻找合适的细胞视野, 调整好视野后, 采集图像; 用绿色激发光观察 PE-anti human CD19 膜抗原标记的 Raji B 淋巴细胞, 并采集图像; 用蓝色激发光观察 FITC 标记的结核分枝杆菌, 采集图像。

1.2.7 流式细胞术检测细胞吞噬率 将经过 PBS 洗涤的细胞用 500 μL pbs 重悬, 用流式细胞仪检测细胞吞噬率。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 FITC 标记的 BCG

利用显微镜在明场下观察 FITC 标记的 BCG 呈细长略弯曲的杆状(见图 1A); 在荧光显微镜蓝色激发光下观察 BCG 被 FITC 标记为绿色(见图 1B); 合并图像后可见 BCG 被 FITC 标记(见图 1C)。

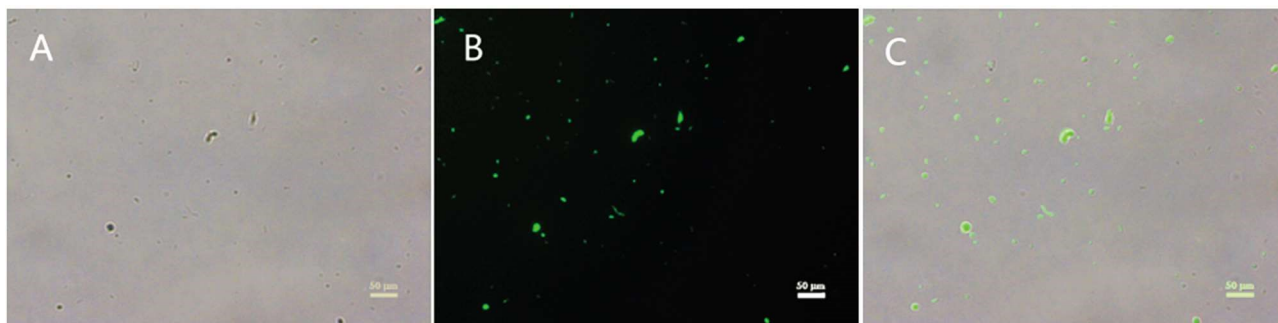


图 1 计数板下用荧光显微镜观察 FITC 标记的 BCG

Fig. 1 FITC-stained BCG observed by fluorescence microscopy based on cell counting chamber

注: A: 明场观察到的 BCG; B: 蓝色激发光观察到的 BCG; C: A 和 B 图像合并。

Note: A: BCG in bright field; B: BCG in blue luminescence; C: Merged image of A and B.

2.2 流式细胞仪检测 BCG 的荧光标记率

将 FITC 标记好的 BCG 用流式细胞术检测标记率, 结果显示为 99.6%(见图 2), 进一步证实结核分枝杆菌绝大部分被标记, 可以用于下一步实验研究。

2.3 荧光显微镜下观察共标记现象

图示分别为明场下的 Raji B 细胞(见图 3 A)、绿色激发光下 PE anti-human CD19 抗体标记的 Raji B 细胞(见图 3 B)、蓝色激发光下 FITC 标记的 BCG(见图 3 C), 合并后 B 细胞和 BCG 的共标记现象(见图 3 D), 箭头所示为共标记的细胞。

2.4 流式细胞术检测细胞吞噬率

流式检测结果显示: 细胞的均一性好(见图 4A); 吞噬 BCG

的 Raji B 细胞占 13.9%(见图 4 B2 和图 4 C), 未吞噬 BCG 的 Raji B 细胞占 85.1%(见图 4 B4)。

3 讨论

在检测细胞吞噬率时, 细菌的荧光标记率至关重要。如果细菌大部分不能被标记, 则检测的细胞吞噬率不可靠; 如果细菌的标记率不稳定, 将导致吞噬率的不稳定性。由此可见, 在细菌被标记后, 检测菌的标记率必不可少。最常见的检测标记率的方法是流式细胞仪检测^[16-18], 这里我们介绍了一种在免疫荧光显微镜下用计数板观察菌的标记的一种辅助方法。

利用细胞计数板在免疫荧光显微镜不同激发光下观察

FITC 标记 BCG 的荧光标记情况、PE-anti human CD19 的淋巴细胞膜标记情况以及 PE 和 FITC 的共标记情况可以为流式细胞术的检测提供一种镜下可见的证据,对实验样品进行质控,为下一步流式检测做准备;还可以在短时间内采集图像,免去传统免疫荧光染色的步骤。若做流式细胞术之前观察镜下菌的荧光标记率很低,则直接用来做吞噬实验会使检测到的吞噬率低于实际,需要重新制备菌液;共培养后,若荧光显微镜下观察

游离的被荧光标记的 BCG 未被洗掉,则在细胞之外会有较多游离的 FITC 标记的 BCG,导致细菌粘附细胞的比例增大,或者细菌并未粘附于细胞,但在流式检测由于通过激光束时被标记的细菌与未吞噬的细胞处于同一平面时,被计算机误认为细胞已经吞噬了 BCG,这会显著增大流式检测时细胞吞噬的假阳性^[19]。

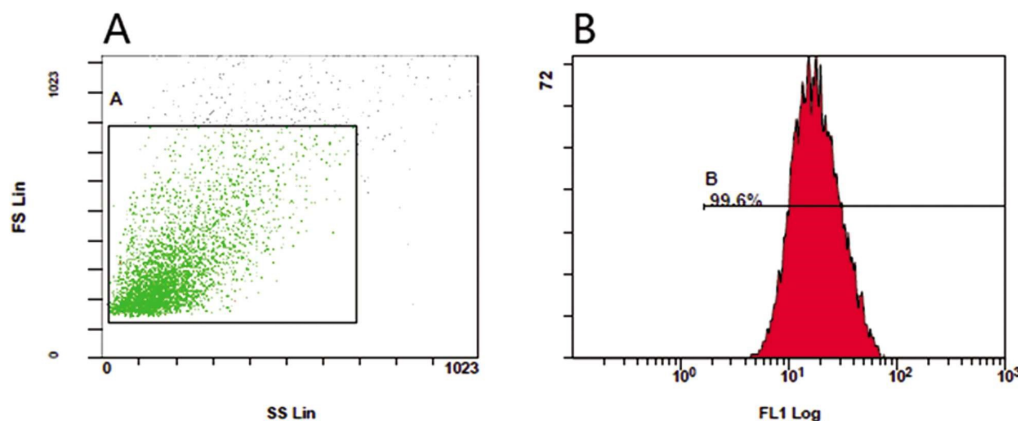


图 2 流式细胞仪检测 FITC 标记的 BCG 的荧光标记率

Fig. 2 Labelling rate of FITC-stained BCG detected by flow cytometry

注:A:BCG 的前向散射(FS)和侧向散射(SS);B:卡介苗的荧光标记率。

Note: A: FSS and SS of BCG; B: Labelling rate of BCG.

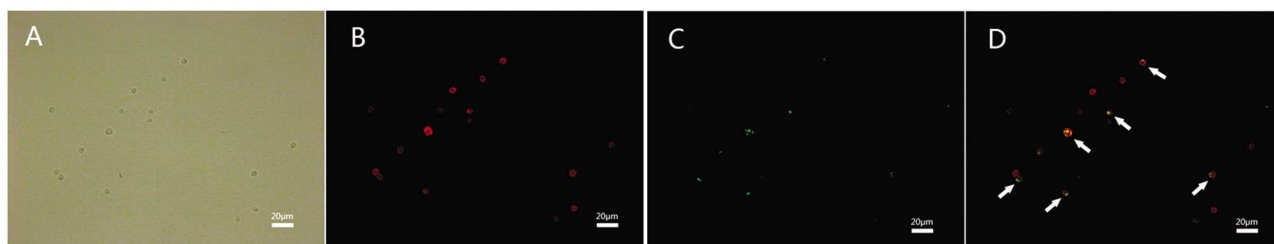


图 3 计数板下用荧光显微镜观察 B 细胞与 BCG 共标记现象

Fig. 3 Double labeled B lymphocytes and BCG could be observed under fluorescence microscope based on cell counting chamber

注:箭头所示为共标记的细胞。

Note: Cells pointed by arrows are double labelled.

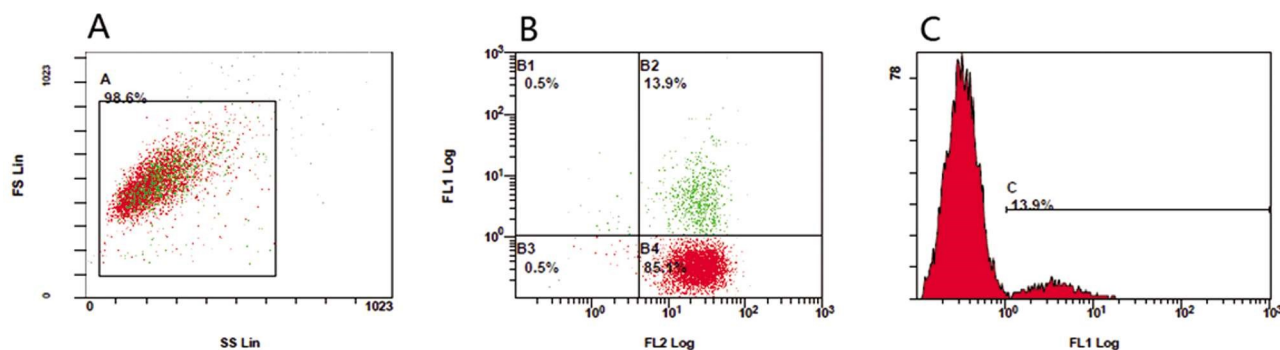


图 4 流式细胞术检测细胞吞噬率

Fig.4 Phagocytic rate detected by flow cytometry

注:A: Raji B 细胞的 FS 和 SS。B: 二维点图。通道 FL1 检测 FITC-BCG 荧光强度,FL2 检测 PE-CD19 荧光强度;C: 一维单参数直方图。

Note: A: FS and SS of Raji B cells; B: 2D scatterplot. FL1 and FL2 detected fluorescence intensity of FITC-BCG and PE-CD19 respectively;

C: One-dimensional histogram.

在计数板下用免疫荧光显微镜观察标记现象拥有许多优点:①极大地节约了时间。整个操作及采集图像过程不会超过

一小时,而常规细胞免疫荧光技术需要两天,由于淋巴细胞是悬浮细胞,不容易贴附于载玻片上,还需要赖氨酸包被,爬片过

夜,延长了实验时间;④ 方法简便易行。传统细胞免疫荧光染色步骤繁琐,一抗及二抗的比例需要摸索,否则会出现透光现象以及非特异染色;⑤ 所需要的细胞用量极少。仅需要 10 μ L,这对于来源珍贵的细胞非常适用,比如人外周血来源的淋巴细胞等,同时也适用于细胞量较少的情况;⑥ 对细胞形态影响小。相对于甩片法将细胞直接贴附在载玻片上,此法对细胞形态影响更小;⑦ 细胞分布均匀^[20]。由于利用了计数板这个特殊的工具,细胞可以相对均匀地分散在计数室中,只要将细胞吹打均匀,不会出现细胞成团出现现象;同时,利用计数板特别的凹槽设计,可以避免液面高度过高而出现细胞上下多层现象,也限制了液体的流动;⑧ 可作为流式细胞检测的镜下依据。在做流式检测的同时采集图像,一举两得。

虽然此方法拥有传统免疫荧光染色不具备的优点,但也有不足之处:① 不能保存。由于观察的是悬液中的细胞,且是在计数板下观察,所以相对传统方法,不能保存。② 观察时间短。由于液体易蒸发的特点,需要研究者在将细胞悬液吸进计数板后一个小时内进行观察,并采集图像,这个缺点可以通过再次吸取悬液观察来弥补。

我们探讨该方法的目的并不是用来替代传统的细胞免疫荧光染色方法,而是作为传统细胞免疫荧光方法的一种补充,使实验者根据自己的实验需求合理选择。同时此方法可以在流式细胞仪检测前对待检样品进行质控,提供镜下依据,在实验过程中,集流式检测与免疫荧光检测于一体。

参考文献(References)

- [1] Dirlikov E, Raviglione M, Scano F. Global Tuberculosis Control: Toward the 2015 Targets and Beyond [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2015, 163(1): 52-58
- [2] Couvin D, Rastogi N. Tuberculosis-A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage [J]. *Tuberculosis*, 2015, 95 (2): S177-S189
- [3] Du Plessis W J, Walzl G, Loxton A G. B cells as multi-functional players during *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease [J]. *Tuberculosis*, 2015, 97: 118-125
- [4] Li J, Barreda D R, Zhang Y, et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities [J]. *Nature Immunology*, 2006, 7(10): 1116-1124
- [5] Nakashima M, Kinoshita M, Nakashima H, et al. Pivotal Advance: Characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011, 91(4): 537-546
- [6] Parra D, Rieger A M, Li J, et al. Pivotal Advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4⁺T cells [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012, 91(4): 525-536
- [7] Oriol S J. Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2012, 12(3): 200-212
- [8] Chen P, Shi M, Feng G D, et al. A Highly Efficient Ziehl-Neelsen Stain: Identifying De Novo Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and Improving Detection of Extracellular *M. tuberculosis* in Cerebrospinal Fluid [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(4): 1166-1170
- [9] Zhang M, Zhu Q, Shi M, et al. Active phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by T lymphocytes (Jurkat cells)[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 66(2): 429-438
- [10] Zhu Q, Zhang M, Shi M, et al. Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Immunobiology*, 2016, 221 (4): 558-567
- [11] 赵修春, 姚春燕, 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
- [12] Zhao Xiu-chun, Yao Chun-yan, Li Bai-qing, et al. A methodology for detection of phagocytosis of murine neutrophils by flow cytometry [J]. *BengbuMed Coll*, 2004, 29(5): 388-390
- [13] 金齐力, 姜丽娜, 姚春艳, 等. 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 [J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(5): 505-508
- [14] Jin Qi-li, Jiang Li-na, Yao Chun-yan, et al. A method for detection of monocyte/macrophage phagocytosis of fluorescent labeled *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry[J]. *BengbuMed Coll*, 2008, 33 (5): 505-508
- [15] Van Nevel S, Koetzsch S, Weilenmann H, et al. Routine bacterial analysis with automated flow cytometry [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 94(2): 73-76
- [16] De Roy K, Clement L, Thas O, et al. Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting[J]. *Water research*, 2012, 46(3): 917-919
- [17] Hammes F, Broger T, Weilenmann H, et al. Development and Laboratory-Scale Testing of a Fully Automated Online Flow Cytometer for Drinking Water Analysis[J]. *Cytometry Part A*, 2012, 81(6): 508-516
- [18] Vromman F O, Re M L, Perrinet S P, et al. Quantitative Monitoring of the *Chlamydia trachomatis* Developmental Cycle Using GFP-Expressing Bacteria, Microscopy and Flow Cytometry [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(6): 1-9
- [19] Raymond Y, Champagne C P. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate[J]. *Food Microbiology*, 2015, 46: 176-183
- [20] Prest E I, Hammes F, Tzsch S K, et al. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method[J]. *Water research*, 2013, 47(19): 7131-7142
- [21] Lehmann A K, Sørnes S, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243 (1-2): 229-242
- [22] Strober W. Monitoring cell growth [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2001, appendix 3:A.3A.1-A.3A.2