

小胶质细胞吞噬 A β (微球颗粒) 能力评估

The Cytophagy of A β Microsphere Particles by Microglia

王瑛*

免疫化学研究所, 上海科技大学, 上海

*通讯作者邮箱: wangying1@shanghaitech.edu.cn

引用格式: 王瑛. (2021). 小胶质细胞吞噬 A β (微球颗粒) 能力评估. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010868. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010868.

How to cite: Wang, Y. (2021). The Cytophagy of A β Microsphere Particles by Microglia. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010868. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010868. (in Chinese)

摘要: 近年来的研究发现, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 病人脑内弥散的老年斑周围小胶质细胞的聚集和活化是机体对于不利因素的自我防御反应。小胶质细胞是中枢神经系统内调节先天免疫和适应性免疫反应的免疫活性细胞 (Kofler and Wiley, 2011), 能对中枢神经系统损伤做出级联反应 (Gehrmann *et al.*, 1995), 当遭遇各种损伤或免疫刺激如缺血缺氧、感染、创伤、退行性病变时, 小胶质细胞迅速激活, 其形态

由分枝状变为阿米巴样, 杆状或丛状分支 (Garden and Moller, 2006)。

AD 的神经病理学特征之一是淀粉样 β (A β) 肽的积累, A β 具有神经毒性, 可溶性的 A β 寡聚体诱导产生神经元细胞毒性、炎症反应、氧化应激以及 NO 生成等。均伴有小胶质细胞的激活 (Li *et al.*, 2011)。活化的小胶质细胞能主动聚集在沉积的 β -淀粉样蛋白 (amyloid-beta peptide, A β) 周围发挥清除吞噬的功能。

本研究拟观察不同浓度的 A β 处理条件下 BV2 (小鼠小胶质细胞系) 对 A β 吞噬作用的变化, 主要通过分析进入 BV2 细胞质中 A β 的颗粒的个数来达到评估 BV2 吞噬能力的目的, 为 AD 的治疗提供新的可行性方案并为完善 AD 的发病机制提供有效证据。 **关键词:** 小胶质细胞, A β , 吞噬

材料与试剂

1. 各种规格的细胞培养板均购自美国 Corning 公司

2. BV2 来源于中科院生化细胞所细胞库
3. Anti- β -Amyloid (mouse monoclonal, 6E10), 803016, BioLegend (用来标记 A β)
4. Anti Iba1 (rabbit), 019-19741, WAKO (用来标记 Iba1)
5. Donkey anti-rabbit 488, A21206, Invitrogen (对应一抗 Anti- β -Amyloid)
6. Donkey anti-mouse 594, A21203, Invitrogen (对应一抗 Anti Iba1)
7. Donkey Serum, 017-000-121, Jackson Lab
8. 胎牛血清, VS500T, Ausbian 购自上海天蔚钧生物科技有限公司
9. A β 冻干粉购自吉尔生化上海有限公司
10. F12 培养基 (无酚红) 购自美国 Gibco 公司
11. DMSO, D2650, Sigma
12. 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI), E607303, 上海生工生物有限公司
13. 4%多聚甲醛固定液 PFA, E672002, 上海生工生物有限公司
14. DPBS, 02-023-1ACS, BI
15. 含 EDTA 的胰酶, 25300062, Gibco
16. TritonX-100, A600198, BBI

仪器设备

1. 细胞培养箱 (Eppendorf, C170i)
2. 离心机 (Eppendorf, 5810R)
3. 全自动细胞计数仪 (Countstar, Countstar FL)
4. 超声破碎仪 (Covaris, S220)
5. 高通量活细胞分析仪 (Thermo Fisher Cellomics VTI700)

实验步骤

1. 细胞铺板
 - 1.1 待 BV2 汇合度达到 80%后, 将 BV2 细胞用 DPBS (02-023-1ACS, BI) 洗一遍, 加入含 0.05% EDTA 的胰酶并放入细胞培养箱中消化 3 min。
 - 1.2 消化完成后, 加入含有 FBS 的培养基终止消化。用移液管将细胞吸入离心管中, 置于离心机 500 \times g, 5 min。

- 1.3 弃去上清，用新鲜培养基重悬细胞并进行计数。
- 1.4 将细胞按照 5000 个/孔接种于 96 孔板中。
2. A β 处理
 - 2.1 细胞培养 24 h 后加入不同浓度 A β 孵育。
 - 2.2 用细胞培养基将 100 μ M 的 A β 存储液稀释分别得到 2 μ M 和 6 μ M A β 工作液。
 - 2.3 96 孔细胞培养板的培养基体积为 100 μ l，将 37 °C 预热的 A β 工作液 100 μ l 加入培养板中，保留孔板中原有的培养基，添加一倍培养基以免对细胞产生影响，最终 A β 工作浓度分别是 1 μ M 和 3 μ M。
 - 2.4 将 96 孔板继续置于细胞培养箱中孵育 6 h，孵育时间根据实验条件进行摸索。
3. 细胞固定、通透封闭及染色
 - 3.1 去除 96 孔板的培养基，每孔加入 100 μ l 洗涤液 (PBS) 后放到摇床中，洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 min。
 - 3.2 每孔加入 100 μ l 的固定液 (4%多聚甲醛)，室温固定 15 min。
 - 3.3 去除固定液，每孔加入 100 μ l 洗涤液 (PBS) 后放到摇床中，洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 min。
 - 3.4 去除洗涤液，每孔加入 100 μ l 通透液 (0.3% TritonX-100)，室温孵育 10-15 min。
 - 3.5 去除通透液，每孔加入 100 μ l 封闭液，室温封闭 30 min。
 - 3.6 去除封闭液，首先使用抗体稀释液将 6E10 及 Iba1 抗体 (一抗) 按照 1:200 稀释后加入孔中，每孔 50 μ l，4 °C 避光孵育过夜。
 - 3.7 去除一抗，每孔加入 100 μ l 洗涤液 (PBS) 后放入摇床中，洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 min。
 - 3.8 去除洗涤液，使用抗体稀释液将荧光二抗按照 1:500 稀释后加入孔中，每孔 50 μ l，室温避光孵育 2 h。
 - 3.9 去除二抗，每孔加入 100 μ l 洗涤液 (PBS) 洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 min。
 - 3.10 用 1x PBS 将 DAPI 1:1000 稀释，去除洗涤液，每孔加入 50 μ l DAPI，室温避光孵育 10 min。
 - 3.11 去除 DAPI，每孔加入 100 μ l 洗涤液 (PBS) 洗涤细胞 3 次，每次洗涤 3-5 min。
 - 3.12 每孔加入 100 μ l DPBS 放置 4 °C 储存。
4. 高内涵成像

将 96 孔板底用擦镜纸拭后，置于高内涵细胞成像分析仪进行荧光成像及分析。利用 10x 物镜，添加红色、绿色成像通道，选择空白孔、阳性对照孔调整曝光时间、激发光强度进行实验拍摄。

结果与分析

1. 结果 (图 1)

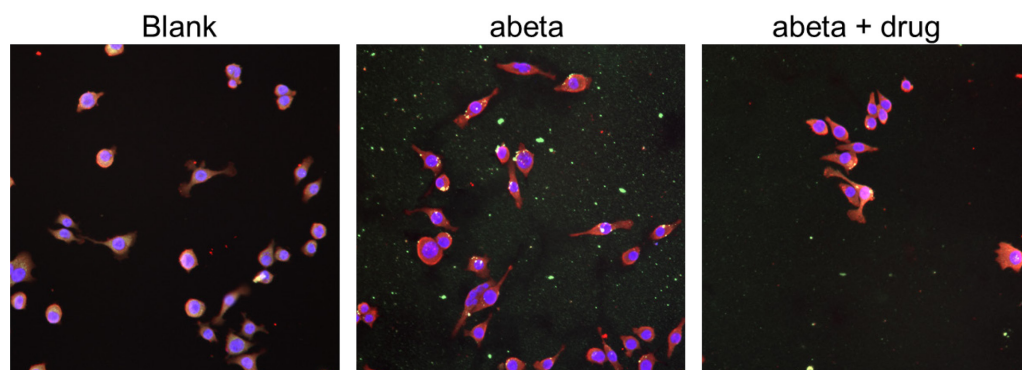


图 1. A β 处理的 BV2 细胞 (红色: Iba1; 绿色: 6E10)

2. 分析

2.1 打开 Cellomics 软件，选择软件中自带的 Autophagy 进行简单修改，调整本次分析方法。通常情况下，选择细胞核所在的通道为第一分析对象，但因为细胞核这个通道并不能很好地圈出整个细胞的轮廓，故本方法选择了 Iba1 染色通道为第一分析对象，这样可以更好地圈出细胞的轮廓 (图 2)。

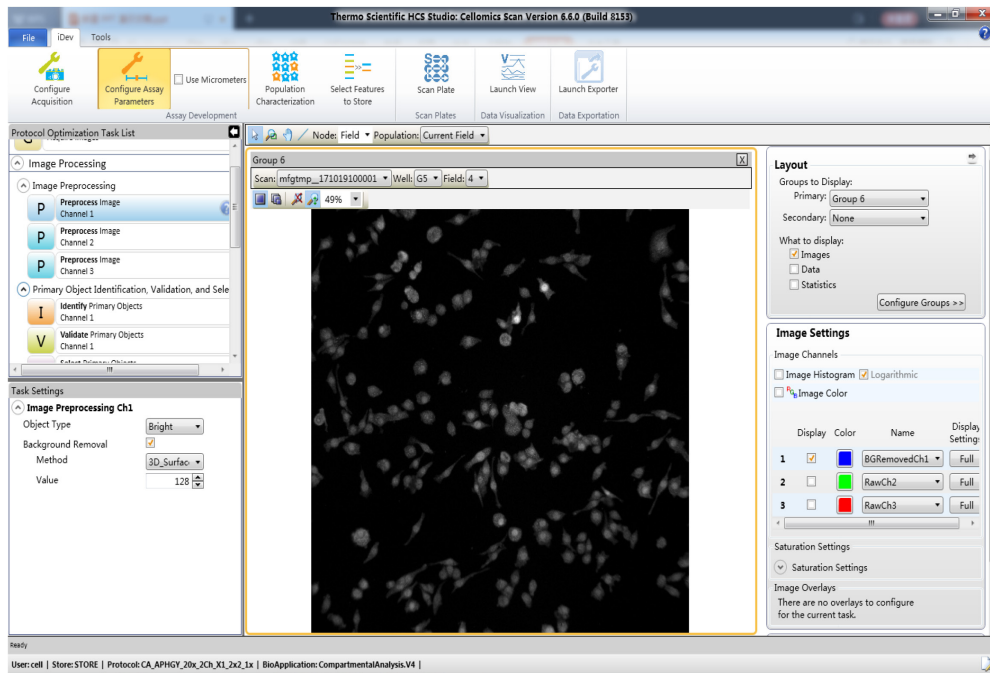


图 2. Iba1 确定细胞轮廓

2.2 确定 A β 染色通道 (图 3)

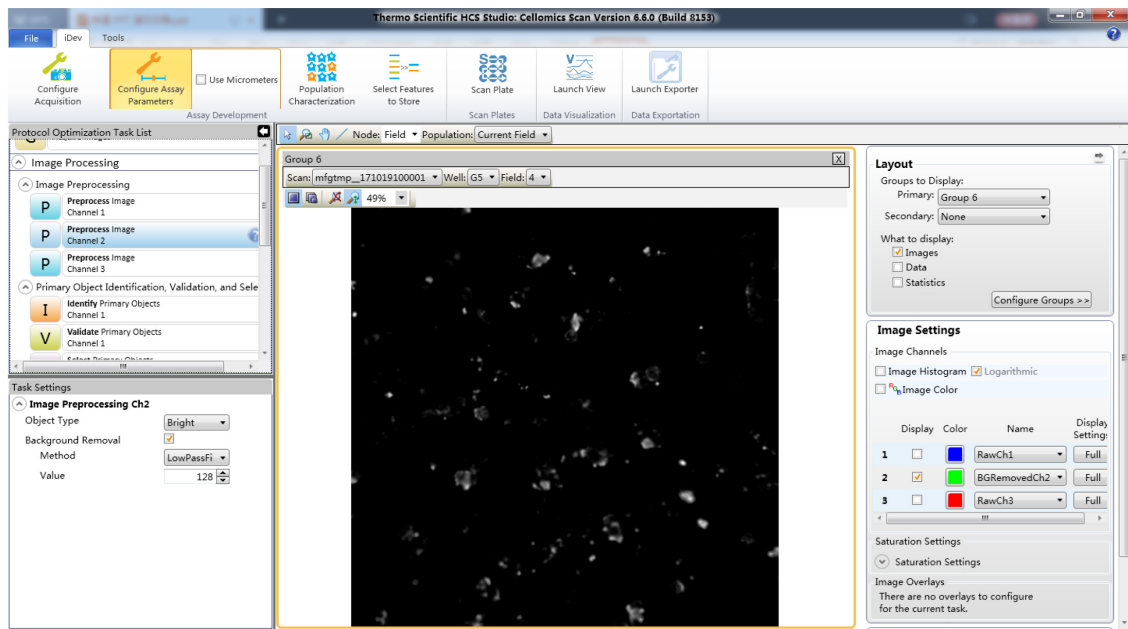


图 3. A β 染色

2.3 确定第三个分析通道为细胞核染色通道 (图 4)

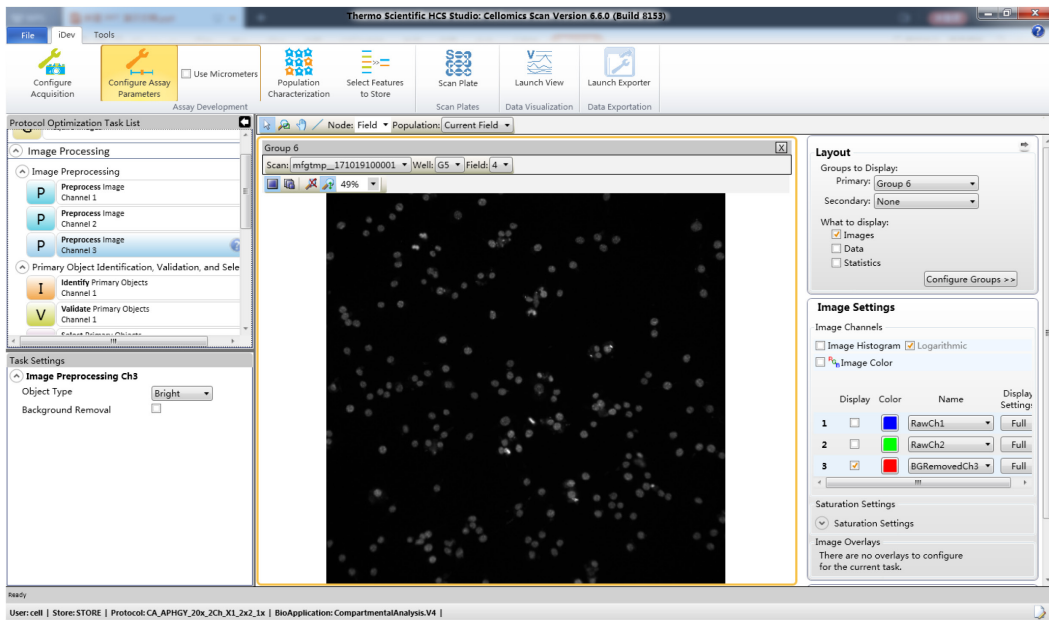


图 4. 细胞核染色通道

2.4 确定以细胞质为分析范围，调整 smoothing 和 thresholding，其中 smoothing 数值的大小会影响圈出来的细胞质的边界的圆滑程度，thresholding 就是通过固定的荧光强度来确定细胞质的边界 (图 5)，调整上述两个参数以确保每个细胞质被合适的圈出来即可。

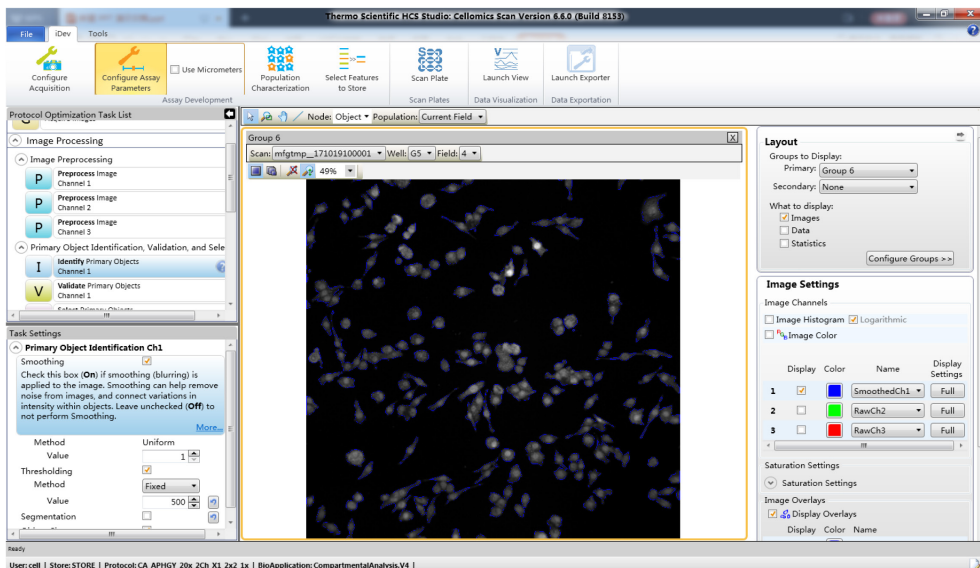


图 5. 确定细胞质做为分析 Aβ 被吞噬进入细胞的范围

2.5 选择被吞噬进入细胞质内的 Aβ (图 6)

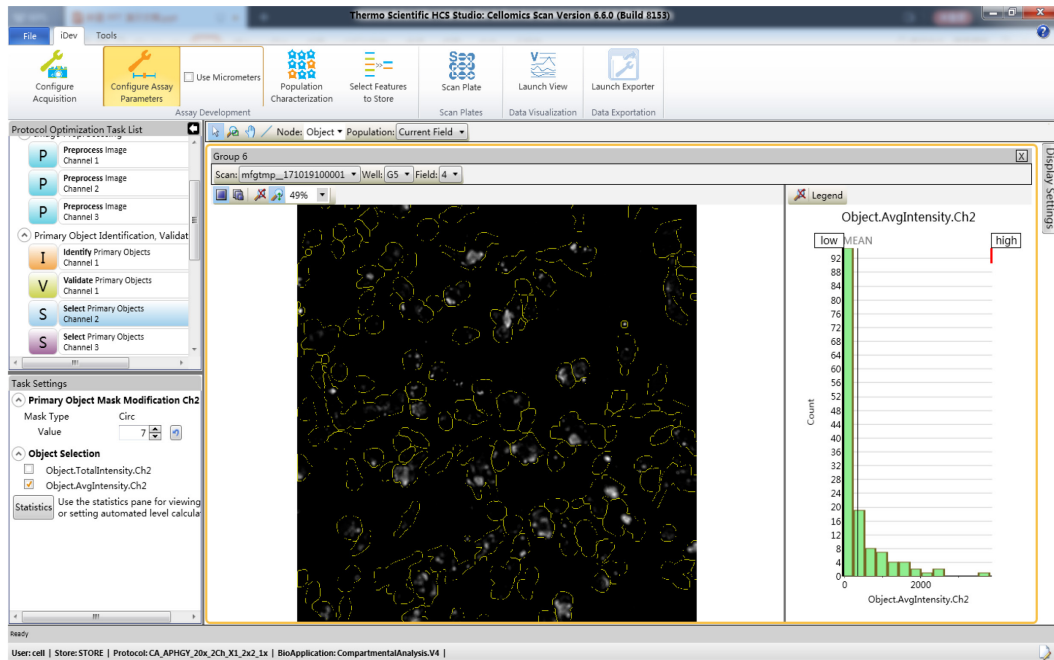


图 6. 确定被吞噬进入细胞质内的 A β

2.6 确定分析范围内的 A β 聚集情况，通过统计可发出荧光的点状物体的数量和大小评估最终实验结果；这个方法是在 autophagy 的 protocol 的基础上修改的，已经通过 Iba1 准确地圈出了整个细胞质的边界，故不需要再通过 ring 和 circle 设置范围确定被吞噬进入细胞质的 A β (图 7)。

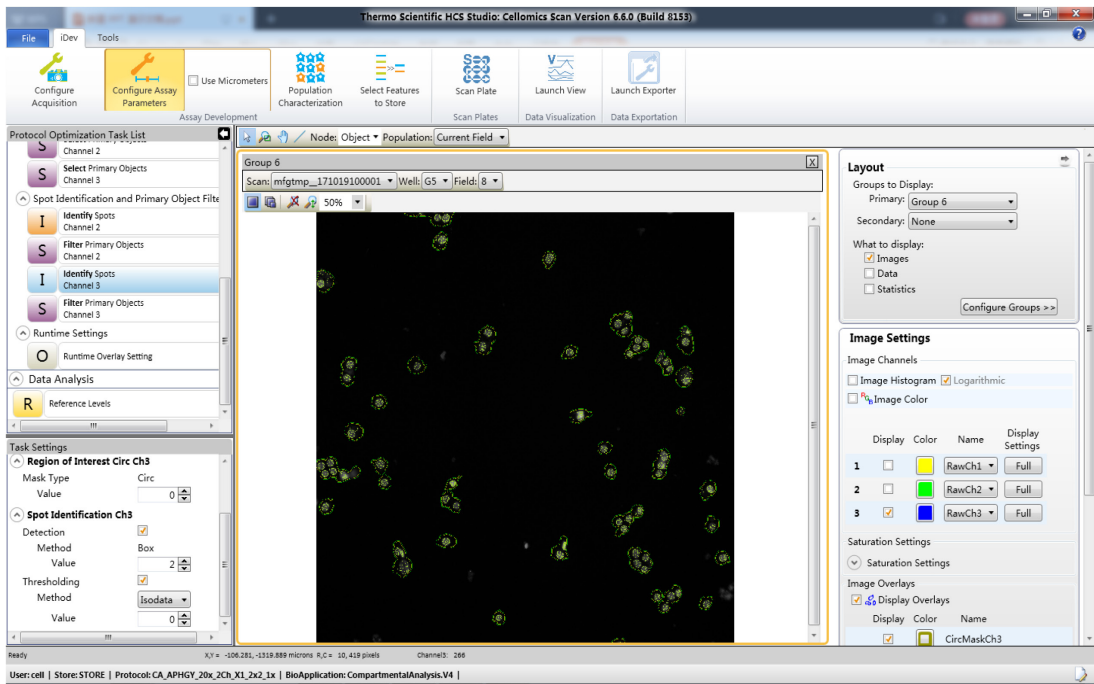


图 7. 被圈出的 Aβ 聚集物

2.7 再次确定已经选定的红色的点可以表达被吞噬进入细胞的 Aβ 聚集物 (图 8)

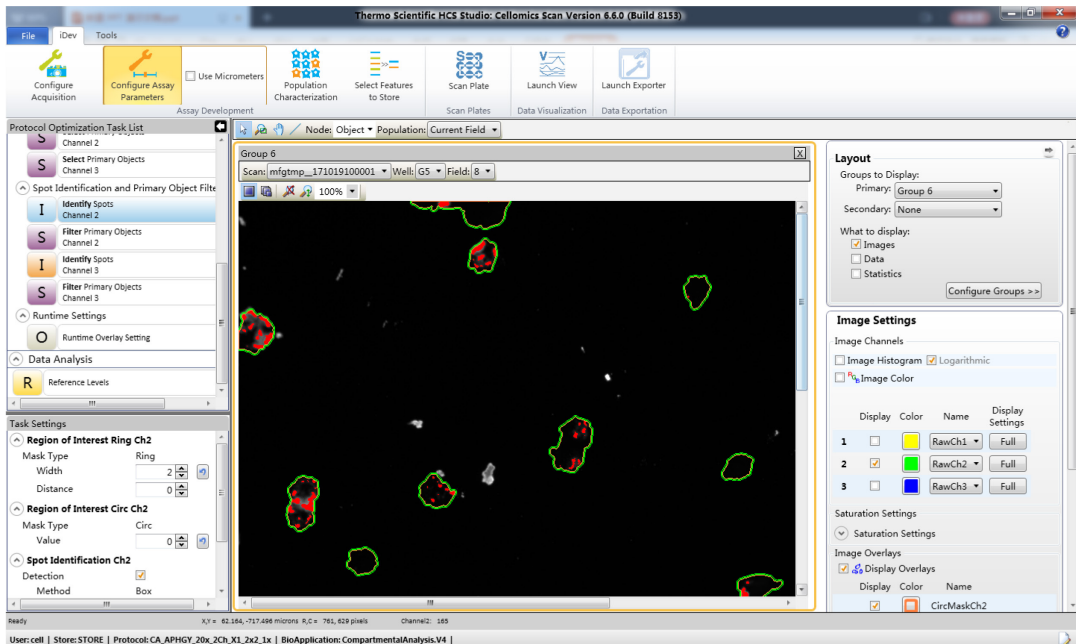


图 8. 分析参数的确定

2.8 Select features to store 选择平均每个细胞内的点的个数来进行最终分析 (图 9)

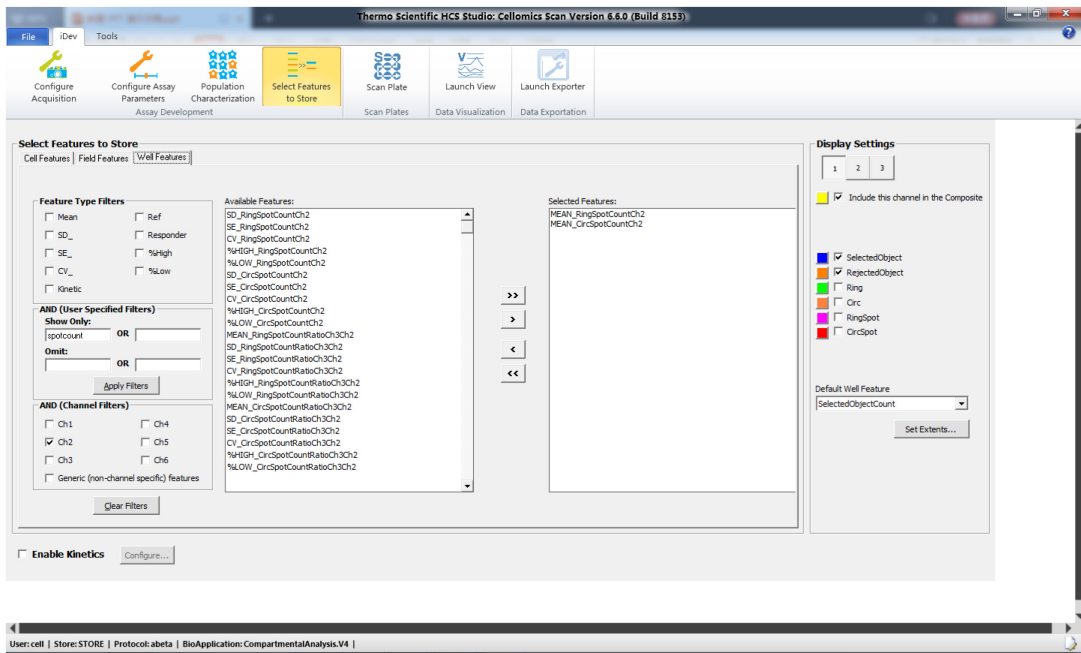


图 9. 分析参数的确定

2.9 Scan plate 开始分析

2.10 由于这次分析的平均每个细胞内的点的个数是以 Iba1 所标记的细胞质为分析范围的，而在这种情况下 Iba1 圈出的范围有的并不能很好的区分开，因此还需要重新以 DAPI 的通道计数出细胞的个数 (表 1)。

表 1. 高内涵统计数据分析

	DAPI个数	细胞质个数	spot平均个数	每个细胞中的Aβ的个数
Aβ treatment 0uM	452	883	0	0
	449	999	0	0
	402	866	0	0
Aβ treatment 1uM	510	650	2.16	2.752941
	564	914	2.03	3.289752
	615	787	2.25	2.879268
Aβ treatment 3uM	312	1000	1.87	5.99359
	341	940	2.26	6.229912
	415	987	2.25	5.351205

解析: 表格里面的 DAPI 个数是以细胞核为分析通道进行统计出来的分析通道的个数，可以准确地反应出细胞个数；而细胞质个数是以 Iba1 为分析通道统计出来的分析对象的个数，可能会因为荧光强度的强弱将一个细胞划分成两个，或者

将两个细胞统计为一个，所以不能非常准确地反映出细胞个数，因此需要利用两组数据重新计算才能导出准确的被细胞吞噬进入细胞质的 A β 聚集物的个数。Spot 的平均个数是以所有的 A β 聚集物的个数为分子，细胞质个数为分母得到的。每个细胞中的 A β 的个数是以所有的 A β 聚集物的个数为分子，DAPI 标记的细胞核个数为分母得到的。我们最终是希望得到每个细胞吞噬 A β 的平均个数，因此需要重新进行计算。公式如下：

$$\text{每个细胞中的 A}\beta \text{ 的个数} = (\text{Spot 平均个数} \times \text{细胞质个数}) / \text{DAPI 个数}$$

溶液配方

1. 抗体稀释液

1% Donkey Serum 于含有 0.1% Triton X-100 溶于 PBS 中，现用现配

2. 封闭缓冲液

10% Donkey Serum 于含有 0.1% Triton X-100 溶于 PBS 中，现用现配

3. A β 储存液

1 mg A β 溶于 200 μ l HFIP, 20 μ l/管分装，得到 0.1 mg/管，氮气挥干后，-80 °C 保存，使用前 DMSO 重悬成 5 mM (加入 4.4 μ l) 超声 10 min。加入无酚红的 DMEM/F12 制成 100 μ M A β 悬液 (加入 217 μ l)，4 °C 静置 24 h 后方可使用。

4. BV2 细胞培养基成分

10%FBS + DMEM/F12 + 1%双抗，4 °C 保存

致谢

感谢国家蛋白质中心复合激光显微镜系统提供高内涵细胞分析仪的设备及技术人员的辅助。该项目受国家重点研发计划 2018YFA0107903 和 2017YFA0104102，国家自然科学基金 81701054 的支持资助。

参考文献

1. Garden, G. A. and Moller, T. (2006). [Microglia biology in health and disease](#). *J Neuroimmune Pharmacol* 1(2): 127-137.
2. Gehrman, J., Matsumoto, Y. and Kreutzberg, G. W. (1995). [Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain](#). *Brain Res Brain Res Rev* 20(3): 269-287.

3. Kofler, J. and Wiley, C. A. (2011). [Microglia: key innate immune cells of the brain](#). *Toxicol Pathol* 39(1): 103-114.
4. Li, F., Zhu, S., Wu, C., Yan, C., Liu, Y. and Shugan, L. (2011). [Neuroinflammation and cell therapy for Parkinson's disease](#). *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 1407-1420.