高内涵活细胞成像研究多糖对巨噬细胞形态的影响

High Content Live Imaging to Investigate Macrophage Differentiation

郭浩翔, 夏亚男, 喻欢, 祖鹤, 张乐帅*

苏州大学放射医学与防护学院, 放射医学与辐射防护国家重点实验室, 江苏高校放射医学协同创新中心, 苏州市, 江苏省

*通讯作者邮箱: zhangls@suda.edu.cn

引用格式: 郭浩翔, 夏亚男, 喻欢, 祖鹤, 张乐帅. (2021). 高内涵活细胞成像研究多糖对巨噬细胞形态的影响. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010836. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010836.

How to cite: Guo, H. X., Xia, Y. N., Yu, H., Zu, H. and Zhang, L. S. (2021). High Content Live Imaging to Investigate Macrophage Differentiation. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010836. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010836. (in Chinese)

摘要: 本实验采用高内涵成像与分析系统观察了各类中药多糖, 包括黄芪多糖 (Astragalus polysaccharide, APSII)、灵芝多糖 (Ganoderma lucidum polysaccharide, GLPII) 及麦冬多糖 (Ophiopogon polysaccharide, OGPII) 对 Raw264.7 细胞分化与成熟的影响。与对照组相比, APSII 和 GLPII 能够显著改变细胞形态, 刺激细胞变大并且细胞表面形成树枝状突触; 相比之下, OGPII 对细胞形态的改变并没有明显的影响。根据高内涵成像获得的图片, 结合 Matlab 编程获得每个细胞的周长与面积, 以分析定量细胞的不规则度。

关键词: 中药多糖, 巨噬细胞, 高内涵成像, 细胞不规则度

材料与试剂

1. 96 孔板
2. 小鼠巨噬细胞 Raw 264.7 细胞株 (中科院上海生化所)
3. APSII, GLPII, OGPII 粗提物 (西安源森生物科技有限公司)
4. 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) (Sigma, catalog number: SMB00610)
5. DMEM 高糖细胞培养基 (Gibco, catalog number: 11965092)
6. 胎牛血清 (Gibco, catalog number: 16140071)

7. 青霉素-链霉素溶液 (碧云天生物技术, catalog number: ST488)
8. DMEM 高糖培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 高内涵系统 (Molecular Devices, ImageXpress Micro XLS)
2. 二氧化碳细胞培养箱 (Forma™ Series 2 CO₂ Incubator, Thermal Scientific)

实验步骤

1. 收集对数期生长的 Raw264.7 细胞, 按 5×10^3 /孔的细胞数接种于 96 孔板, 铺板完成后, 置于细胞培养箱中培养, 期间观察细胞生长状态。
2. 过夜培养细胞贴壁之后, 吸去上层培养基, 分别加入空白培养基和含有 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 APSII、GLPII、OGPII 以及 100 ng/mL 的 LPS 的 100 μL /孔的培养基。
3. 立即将 96 孔板放入高内涵系统中, 设置拍摄参数 (注 1: 具体操作方法如下): 20x 的物镜, 每个孔选 7 个位置拍照, 每次拍照间隔 20 min, 连续拍照 36 h。
4. 根据高内涵成像与分析得到每个细胞的面积及周长, 在 Matlab 编程分析的基础上, 定义 D 为 $D = 1 - (4\pi \times \text{面积}) / (\text{周长}^2)$ 。当细胞越接近标准圆形, D 接近 0, 反之 D 增大。

注 1: 高内涵系统成像具体操作方法: 进入 HCS 系统后, 点击 按钮, 将处理好的待测 96 孔板放置在高内涵仪器载物台上。点击 “Screening”, 选择 “Plate Acquisition Setup”, 进行参数设置。打开参数设置界面, 修改 “Names and Description” 对任务名称进行编辑; “Objective and Camera” 选择 20 $\times$ 物镜, “Plate name” 格式选择 “96 well zls”, 单击选择 6 $\times$ 10 的拍摄区域 (绿色), 右击将镜头转至拍摄孔 (黑色), 每孔随机选择 7 个位置进行拍摄, 拍摄时间点 (number of timepoints) 选择 “1”, 波长选择 “2”, Autofocus 设置保持不变。点击 “Test settings” 观察拍摄的图片是否清晰, 若图片不清晰, 则可点击 “Calculate Offset” 按钮, 连续拍摄 24 张图片, 再手动调焦至图片清晰为止, 下面其他参数设置保持不变。全部参数设置完毕后, 点击 “Summary”, 选中 “Acquire Plate” 进行全板拍摄 (一般 10 min 左右)。

结果与分析

中药多糖的粗提物首先经过超纯水溶解离心后经无水乙醇纯化，使用 DEAE-32 纤维素离子交换层析，浓缩透析除盐后，真空冷冻干燥得到多糖的干燥样品，最后通过凝胶过滤，旋蒸浓缩，透析除盐并真空冷冻干燥，得到多糖的精细组分 (Lv *et al.*, 1998)。其中，采用高效渗透凝胶色谱法测定到 GLPII 多糖分子量为 15.1 KDa，还原水解法分析单糖组分得到 GLPII 主要含有阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖，其摩尔比为 18.6:38.81:25.63。

使用 DEAE-32 纤维素离子交换层析及凝胶过滤层析的方法对多糖粗提物进行精提。具体方法如下：

DEAE-32 cellulose 的预处理如下：取 50g DEAE-32 cellulose 填料，经双蒸水溶胀后静置 1 h；去上层漂浮颗粒后煮沸 2 h 后抽滤除水；填料于 0.5 M NaOH 溶液，用蒸馏水洗至中性，抽干；再于 0.5 M HCl 中充分搅拌浸泡 2 h，用蒸馏水洗至中性，填料重悬待装柱。装柱完成后，用双蒸水以 1 mL/min 的流速平衡过夜。

取粗多糖充分溶解于双蒸水中，12,000 rpm 离心 10 min，取上清上样于 DEAE-32 cellulose 离子交换层析柱。首先用双蒸水洗脱中性组分，再用 NaCl 溶液分别洗脱酸性组分并收集。待收集完成后，做出洗脱曲线取各个洗脱峰，浓缩透析除盐后，真空冷冻干燥。

凝胶过滤层析填料的预处理：选择 Sephacryl S-300 HR 作为凝胶过滤介质，取填料反复洗涤，适量双蒸水重悬后装柱，装柱完成后平衡层析柱。

分别取经离子交换层析的不同组分的多糖样品，溶解于 0.2 M 的 NaCl 溶液中，12,000 rpm 离心 10 min，取上清上样于凝胶柱 (2.6×100 cm)，以 0.2 M 的 NaCl 溶液进行洗脱，苯酚-硫酸法跟踪检测多糖含量变化，分别收集适当的洗脱峰，悬蒸浓缩后透析除盐，真空冷冻干燥，得到多糖的精细组份。

图 1. 高内涵细胞成像获得中药多糖对 **Raw264.7** 巨噬细胞形态变化的影响。图片分别为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 APSII、GLPII 和 OGPII 以及 100 ng/mL 的 LPS 孵育 24 h 后细胞的形态变化。比例尺为 100 μm 。

与对照组相比，APSII 组和 GLPII 组能够显著改变 Raw264.7 细胞形态，刺激细胞变大并且使得细胞表面形成树枝状突出，这与典型的树突状细胞形态很相似，说明上述两种中药多糖具有诱导巨噬细胞分化成熟的能力。而相比之下，OGPII 对 Raw264.7 细胞形态的改变并没有明显的影响 (图 1)，说明 APSII 和 GLPII 在刺激细胞形态变化的效果显著高于 OGPII。

此外，采用了高内涵活细胞成像技术来研究 GLPII 对 Raw264.7 细胞分化的影响。应用高内涵活细胞成像系统，细胞连续培养 36 h，期间每隔 20 min 成像一次，记录细胞形态变化。图 2 提供了细胞在不同时间点的形态变化，可清楚地看到细胞从 0 h 到 36 h 的生长分化情况：细胞逐渐变大并且有树突伸展。

图 2. 高内涵活细胞成像研究多糖对 **Raw264.7** 细胞分化的影响。由 40 µg/mL 的 GLPII 诱导的细胞分化成熟过程，图中所示分别为在 0、6、12、18、24、36 h 时细胞的形态。

为了定量表示细胞分化过程形态变化，我们定义了“细胞不规则”这一概念，取绝对圆形的细胞为“0” (**Raw264.7** 细胞在未加任何处理的条件下是一种圆形的细胞)，随着细胞的分化，细胞形态不规则度数值也在上升，取 100 ng/mL 的 LPS 刺激细胞 48 h 之后引起的形态变化定义为“1”。各类中药多糖引起细胞分化的不规则度变化如图 3 所示，对照组在 36 h 内细胞形态并没有明显变化，不规则度数值在 0.06-0.3 之间波动，24 h 之后该数值还有一定程度的下降，猜测可能是由于细胞增殖出现接触抑制，使细胞形态变得更圆。

图 3. 根据高内涵成像与 Matlab 分析得到每个细胞的面积及周长，从而获得不同多糖随时间变化对 Raw264.7 细胞不规则度的影响。关于“细胞不规则度”的定义：完全圆形的细胞的不规则度为“0”，而将 100 ng/mL 的 LPS 在 48 h 时引起的细胞形态的改变定义为“1”。

各实验组都能够显著提高细胞不规则度，其中，GLPII 在引起细胞分化方面的效果最为明显，APSI 和 OGPI 的效果要弱一些。纵向比较这三组多糖，细胞不规则度在 10 h 内上升较快，而在 30 h 之后逐渐达到最高值。此外，这三种多糖均能够导致巨噬细胞分化成类似树突状细胞形态的细胞，而这种诱导细胞形态变化的能力在最初的 12 h 内基本相似，在此之后 GLPI 的效果要高于 APSI 和 OGPI，甚至高于作为阳性对照的 LPS 组。

图 4. 不同浓度 GLP II 引起 Raw264.7 细胞分化成熟的程度。图示利用了 1.25-40 µg/mL 的 GLP II 给药达到 36 h。在给药的最初 10 h 内，形态变化与浓度的依赖并不强；给药 10 h 后由浓度不同造成的细胞分化差异逐渐显现出来。

另外单独分析了 GLP II 组，发现 GLP II 引起 Raw264.7 细胞分化与多糖呈浓度依赖性关系 (图 4)，在最初 10 h 内，形态变化与浓度的依赖并不强；之后，由浓度不同造成的细胞分化差异逐渐显现出来，在细胞不规则度到达峰值的 30 h 之后，浓度差异最为明显。此外，GLP II 的浓度在低至 1.25 g/mL 也足以引起细胞形态变化。

溶液配方

1. DMEM 高糖培养基

配制含 10%胎牛血清、2%青霉素链霉素的 DMEM 高糖培养基用于培养 Raw264.7 巨噬细胞，于 4 °C 保存。

致谢

本文感谢国家自然科学基金面上项目 (项目编号 31971319, 31771104) 的支持, 并致谢江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD) 提供的资助。

本高内涵应用摘自于上海中医药大学的吕小成硕士论文《黄芪、灵芝和麦冬多糖对巨噬细胞树突状细胞的免疫刺激作用分析》及发表的参考文献 1。

参考文献

1. Lv, X., Chen, D., Yang, L., Zhu, N., Li, J., Zhao, J., Hu, Z., Wang, F. J., Zhang, L. W. (1998). [Comparative studies on the immunoregulatory effects of three polysaccharides using high content imaging system.](#) *Int J Biol Macromol* 86: 28-42.