

# 活细胞囊泡快速标记方法的建立和应用

戎叶<sup>1</sup>, 肖桂凤<sup>2</sup>, 娄绘芳<sup>2</sup>, 吴航军<sup>2,\*</sup>

(1.杭州师范大学 基础医学院, 浙江 杭州 311121; 2.浙江大学医学院, 中国浙江 杭州 310058)

**摘要:** 为了研究细胞内囊泡的快速动态变化, 本文借鉴了诱导神经元轴突诱导转向的方法, 通过脉冲压力从微电极释放诱导因子, 在细胞周围形成稳定的浓度梯度, 诱导细胞产生胞饮泡, 并通过局部染料释放进行快速标记和洗脱。同时利用活细胞成像技术, 对胞饮泡标记过程以及标记后胞饮泡动态变化进行实时标记。该方法大大缩短了标记和洗脱的时间, 从而实现了细胞囊泡的快速标记和同步观察记录, 可用于胞饮泡、溶酶体等细胞囊泡的动态标记, 是研究细胞囊泡动态变化的一种实用且高效的手段。

**关键词:** 囊泡标记; 胞饮泡; 溶酶体; 活细胞成像

**中图分类号:** Q31; Q-331; Q-337 **文献标识码:** A

## Establishment and Application of a Fast Vesicle Labeling System for Live Cell

RONG Ye<sup>1</sup>, XIAO Gui-feng<sup>2</sup>, LOU Hui-fang<sup>2</sup>, WU Hang-jun<sup>2,\*</sup>

(1. Hangzhou Normal University School of Basic Medical Sciences, Hangzhou 311121, China; 2. Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** To study trafficking of vesicles in live cell, an efficient and convenient assay was established according to the axon turning assay. By injecting indicator or fluorescent dyes through a micropipette with air pressure into cell cultures to create a stable gradient around the micropipette tip, vesicles were indicated and labeled. With live cell imaging, the whole process was recorded. Without wash out of fluorescent dyes and transferring, this assay is an effective, fast labeling system, and can also be combined with imaging system.

**Key words:** vesicle labeling; macropinosome; lysosome; live cell imaging

细胞囊泡形态和动态变化的研究, 如胞饮泡 (macropinosome)、吞饮泡 (phagosome)、溶酶体 (lysosome) 等<sup>[1-3]</sup>, 首先需要囊泡进行荧光标记。目前, 常用的标记办法是, 用一定浓度的荧光染料进行细胞外孵育, 待标记后将胞外的染料进行洗脱, 然后到显微镜下进行动态观察记录, 从标记、到洗脱、再到转移到显微镜下观察记录, 这个过程通常需要10-30

分钟的时间<sup>[4]</sup>。然而，很多类型的囊泡动态变化过程非常短暂，在洗脱和转移的过程中就已经发生了巨大的变化，而这个时间段内的变化过程是无法被观察和记录的。因此，缩短囊泡标记、洗脱以及实验各阶段的衔接时间，成为研究囊泡快速动态变化过程的关键因素。

小胶质细胞（microglia）被认为是中枢神经系统（central nervous system, CNS）中主要的免疫细胞，它们均匀地分布在中枢神经系统的各个区域，在中枢神经系统中占10%-15%。小胶质细胞是CNS的重要组成部分，在免疫应激、神经发育、神经突触修剪及突触可塑性等方面都有着重要的作用<sup>[5, 6]</sup>。静息状态下小胶质细胞的突起呈高度分枝状（ramified）<sup>[7]</sup>，然而，小胶质细胞的突起并不是完全静止，它们高度活跃，不断地巡视周围的微环境<sup>[8, 9]</sup>，并以固定的频率与周围的星形胶质细胞和神经元接触，一旦脑组织受到外伤、缺血、感染等病理侵害时都会引起小胶质细胞的活化<sup>[6]</sup>，它们的突起或胞体会向损伤部位迁移，分泌相应的细胞因子和营养因子，并清除坏死组织，从而维护正常的脑功能。迁移是小胶质细胞行使其功能的重要过程，损伤组织引起小胶质细胞聚集的现象可以通过外加ATP来模拟<sup>[9]</sup>。小胶质细胞的溶酶体中富含ATP，在不同的生理病理刺激下，小胶质细胞的溶酶体可以通过钙依赖的胞吐作用释放ATP。ATP可以诱导小胶质细胞释放内源性的ATP，这些释放的ATP对小胶质细胞远距离的趋向性迁移有着重要的作用<sup>[10]</sup>。小胶质细胞受ATP诱导迁移的过程中还伴随着胞饮泡的内吞及成熟<sup>[4, 11]</sup>。溶酶体和胞饮泡在小胶质细胞迁移过程中的形成和成熟过程非常短暂，因此，搭建一套快速标记和动态记录方法体系对研究小胶质细胞的功能非常有必要。

本研究在现有标记方法的基础上进行了改造，搭建了一套气压作用于微型电极释放微量染料的装置，并利用染料在液体中快速扩散的现象，节省了洗脱和转移的时间，建立了一种能快速有效标记、并能实时观察记录囊泡动态过程的方法。该方法可以很好的应用于胞饮泡胞饮泡、溶酶体等细胞囊泡的动态研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**实验动物：**新生 Sprague-Dawley（SD）大鼠（P0-2），所有涉及动物的实验都需要遵从浙江中医药大学和浙江大学实验动物管理相关制度。

**细胞培养相关试剂：**基本培养液（MEM, Life Technologies 公司, 美国），胎牛血清（FBS, Life Technologies 公司, 美国），非 CO<sub>2</sub> 体系依赖培养液（L15, Life Technologies 公司, 美国），或细胞外液（Extracellular solution, ECS），解剖液 HBSS（Life Technologies 公司, 美国），胰酶 0.25% (wt/vol) Trypsin-EDTA（Life Technologies 公司, 美国），多聚赖氨酸（PDL, Sigma-Aldrich 公司, 美国）。

### 1.2 溶液的配制

**细胞培养液：**MEM 加 10% (vol/vol) FBS，保存在 4 °C，使用前在 37 °C 水浴预热。