

· 基础论著 ·

建立体外诱导和检测中性粒细胞胞外诱捕网的方法

朱鏐雯 张玥 李国力 梁顺涛 郝禹 李蕊 曾辉

【摘要】目的 建立体外诱导和检测中性粒细胞胞外诱捕网的方法,旨在研究中性粒细胞胞外诱捕网(NET)产生和调节的机制。**方法** 分离正常人外周血中性粒细胞,通过内毒素(LPS)和白细胞介素-8(IL-8)体外诱导NET产生。采用免疫荧光染色和激光共聚焦显微成像定性评价NET生成;采用PicoGreen[®]染料定量检测细胞上清游离DNA,反映NET生成量。**结果** LPS体外刺激中性粒细胞3 h后,与对照组相比,产生大量胞外网状结构(NET),该结构包含DNA、组蛋白和髓过氧化物酶(MPO)成分;同时细胞上清中游离DNA(NET)含量显著升高($P < 0.01$)。采用IL-8体外刺激中性粒细胞3 h,与上述结果相似($P < 0.05$)。**结论** 建立了体外诱导和定性、定量检测NET的方法,二者结合能更好地评价NET的产生。

【关键词】 中性粒细胞胞外诱捕网; 免疫荧光染色; 游离DNA

Establishment of the methods of inducing and detecting neutrophil extracellular trap in vitro Zhu Liuluan, Zhang Yue, Li Guoli, Liang Shuntao, Hao Yu, Li Rui, Zeng Hui. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zeng Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To study the mechanisms of production and regulation of neutrophil extracellular trap (NET) by establishing a method to induce and evaluate NET. **Methods** Neutrophils were isolated from healthy human peripheral blood, and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) or interleukin-8 (IL-8) to induce NET production. Immunofluorescence staining and laser confocal microscopy imaging were adopted to evaluate NET generation. For quantitative detection, PicoGreen[®] dye was used to determine the cell free DNA in the supernatant. **Results** Compare with the untreated control, a large amount of extracellular reticular structure was generated from neutrophils stimulated by LPS for 3 h. The NET structure was composed of DNA, histone and myeloperoxidase (MPO). Meanwhile, the content of cell free DNA in the supernatant (NET) was significantly increased ($P < 0.05$). The similar results were observed by IL-8 stimulation instead of LPS ($P < 0.01$). **Conclusions** A set of methods that could be used to induce and determine NET generation, the combination of the qualitative and quantitative methods could produce a better evaluation of NET.

【Key words】 Neutrophil extracellular trap (NET); Immunofluorescence staining; Cell free DNA

中性粒细胞是天然免疫系统中重要的效应细胞。中性粒细胞具有独特的分叶型核结构,通常呈3~5个叶,因此,也称多形核嗜中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)。生理情况下,中性粒细胞占人外周血白细胞的50%~70%。感染发生时,其最先被募集到感染部位,发挥清除病原微生物的作用^[1-3]。近年研究表明,

除了吞噬之外,其还能通过释放中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)的方式黏附并清除病原微生物,并能有效限制病原体向其他组织部位播散^[4]。NET主要由组蛋白、DNA和弹性蛋白酶、组织蛋白酶G和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等酶类组成^[4-5]。近来研究表明,NET还与感染性疾病、哮喘、血栓及自身免疫性疾病等多种疾病的发生密切相关^[6-7],其产生机制及下游信号通路正成为目前研究的热点。本研究从NET的组成成分入手,建立并优化了体外诱导和定性、定量检测NET的方法,为NET产生和调节的机制研究提供解决办法。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.03.028

基金项目:北京市教委科技计划及人文计划项目(No. KM20150025026)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所;新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者:曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

材料和方法

一、主要材料与试剂

人外周血中性粒细胞分离液Polymorphprep™购自Axis-shield公司; 抗-组蛋白H3瓜氨酸化(H3Cit) (ab5103)、抗-MPO (ab25989)、Alex Fluor® 488标记山羊抗兔抗体(ab150077)、Alex Fluor® 647标记山羊抗小鼠抗体(ab150114)均购自Abcam公司; Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits购自Life Technology公司; 封片剂(H-1000)购自Vector labs公司。人外周血标本取自首都医科大学附属北京地坛医院健康体检志愿者, 无外伤、感染, HBV表面抗原阴性, 肝肾功能正常, 均获得知情同意。

二、方法

1. 分离人外周血中性粒细胞: 采用Polymorphprep™分层液密度梯度离心法分离中性粒细胞。将5 ml EDTA抗凝血加入5 ml PBS稀释, 离心管中加入10 ml分离液, 然后将稀释的抗凝血缓慢加入到分离液上层。水平离心机。吸取下层中性粒细胞至一新管, 加入等体积0.5 × Hepes缓冲液(0.85% NaCl, 10 mmol/L Hepes-NaOH, pH 7.4), 1 200 r/min离心10 min (离心半径 $r = 22$ cm), 重复1次。最后用含5% FBS的RPMI-1640培养基重悬细胞后计数。

2. 体外诱导中性粒细胞形成NET: 细胞按 4×10^5 个/孔接种至24孔板中, 每孔0.5 ml, CO₂培养箱中培养1 h静置处理细胞。随后分别采用100 ng/ml脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或100 ng/ml白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)处理细胞, 对照组给予等体积PBS。3 h后收集细胞上清, 用于检测游离DNA。

24孔板中预先置入多聚赖氨酸处理的无菌玻片, 按 4×10^5 个/孔接种细胞, 按上述操作给予LPS、IL-8或PMA刺激。3 h后小心吸净细胞上清, 加入0.5 ml 4%多聚甲醛, 4 °C固定过夜, 用于细胞免疫荧光染色。

3. NET的免疫荧光染色: ①细胞透膜: 从24孔板中取出细胞爬片, 依次用PBS洗3次, 每次5 min; 用含0.5% Triton X-100的PBS透化1 min; 再用PBS洗3次, 每次1 min。②封闭: 用PBS配制含5% FBS的封闭缓冲液, 小心加入玻片上, 在37 °C湿盒中孵育30 min。③一抗孵育: 用封闭缓冲液稀释一抗混合物, 抗-H3Cit为1 : 400, 抗-MPO为

1 : 400, 在37 °C湿盒中孵育1 h。④清洗: 随后用PBS洗3次, 5 min/次。⑤二抗孵育: 用封闭缓冲液稀释二抗混合物, 抗-H3Cit为1 : 1000, 抗-MPO为1 : 1000, 在37 °C湿盒中孵育1 h。⑥DAPI染色: 经PBS洗3次后, 用DAPI以1 : 2000避光染色5~10 min, 再用PBS洗2次。⑦封片及观察: 封片剂封片, 激光共聚焦显微镜成像或4 °C避光保存。

4. 检测细胞上清游离DNA: 采用Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits试剂盒检测细胞上清中游离DNA含量。参考试剂盒说明书稀释标准品储液和样品, 按50 μl/孔加入到96孔板中, 每孔加入50 μl稀释的PicoGreen®, 标准品终浓度依次为1 000 ng/ml、100 ng/ml、25 ng/ml、10 ng/ml、2.5 ng/ml、1 ng/ml、250 pg/ml和0 ng/ml。室温避光2~5 min。用荧光读数仪检测信号强度, 激发光480 nm, 发射光520 nm。为防止荧光淬灭尽快上机。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析。不同条件下NET含量采用配对样本 t 检验的方法进行统计学分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为准, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

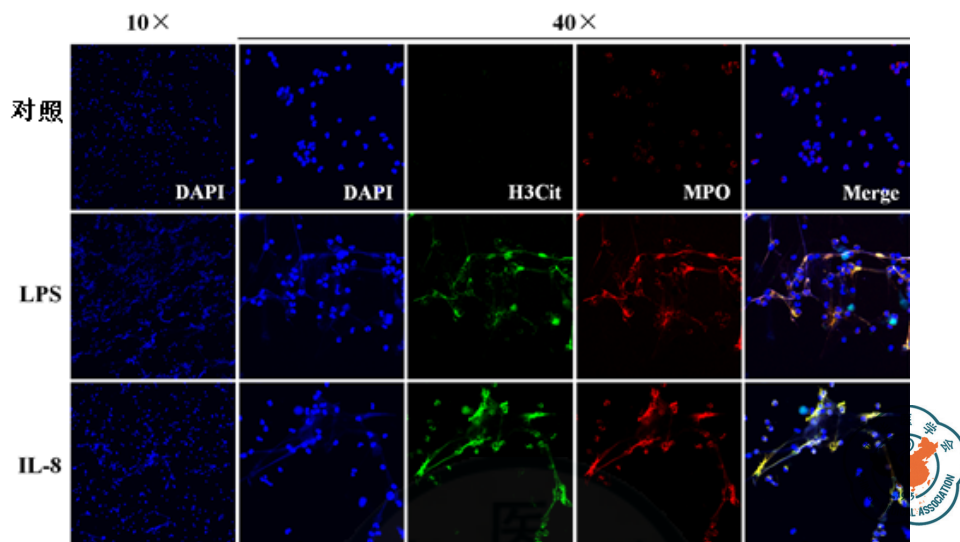
结 果

一、免疫荧光染色鉴定NET

激光共聚焦显微镜成像结果如图1所示, 中性粒细胞受LPS刺激3 h后, 产生大量细胞外网状结构, 该结构由DNA、瓜氨酸化组蛋白H3及MPO组成, 从显微结构和组成成分上可鉴定为NET; 同样, 经中性粒细胞趋化因子IL-8刺激3 h后, 也可产生上述NET结构。以上结果提示两种方法都能有效诱导中性粒细胞在体外形成NET。

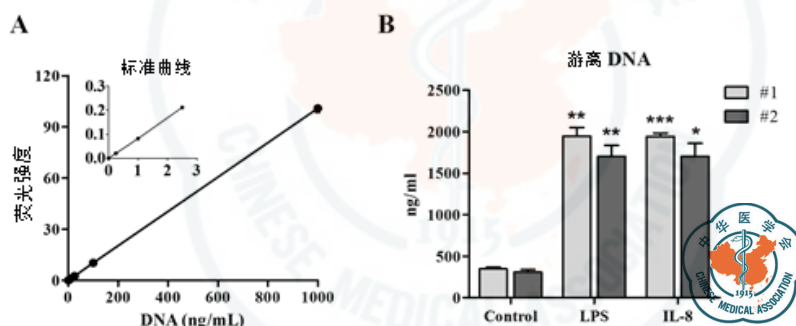
二、游离DNA检测法定量分析NET含量

用PicoGreen®荧光分光光度法测定标准品和细胞上清中游离DNA含量, 扣除背景后, 绘制标准曲线(图2A)。标准曲线呈良好的直线关系, $R^2 = 0.9998$ 。其中小图为将标准曲线DNA含量250 pg/ml~2.5 ng/ml部分放大, 仍呈良好的直线关系。可见, 该方法可在250 pg/ml~1 000 ng/ml浓度范围内准确反映样本游离DNA含量。如图2B所示, 中性粒细胞经LPS或IL-8刺激后, 上清中游离DNA含量显著增高($P < 0.05$)。该结果与免疫荧光染色结果一致, 共同证明中性粒细胞经LPS或IL-8刺激可形成NET。



注：外周血中性粒细胞经 100 ng/ml LPS 或 100 ng/ml IL-8 刺激 3 h 后，固定，进行免疫荧光染色，H3Cit（绿色）、MPO（红色），DNA 经 DAPI 染色（蓝色）。激光共聚焦显微成像，高倍镜下（目镜 40×）清晰可见细胞外纤维网状结构

图 1 免疫荧光染色鉴定 NET 形态



注：A 图：标准曲线。其中小图表示 DNA 含量 250 pg/ml ~ 2.5 ng/ml 部分放大。B 图：体外培养志愿者 #1 和 #2 外周血中性粒细胞，经 100 ng/ml LPS 或 100 ng/ml IL-8 刺激 3 h 后收集上清。LPS 或 IL-8 刺激后，上清中游离 DNA (NET) 含量显著高于对照组。样本 #1 经 LPS 刺激后与对照组相比，差异有统计学意义 (** $P = 0.0045$)；经 IL-8 刺激后与对照组相比，差异有统计学意义 (** $P = 0.0008$)。样本 #2 经 LPS 刺激后与对照组相比，差异有统计学意义 (** $P = 0.0095$)；经 IL-8 刺激后与对照组相比，差异有统计学意义 (* $P = 0.0126$)

图 2 PicoGreen® 染料法检测细胞上清中游离 DNA (NET) 含量

讨 论

中性粒细胞可以受多种因素刺激形成 NET，包括细菌、病毒、细菌脂多糖 (LPS)、粒细胞趋化因子 (IL-8)、抗菌素佛波酯 (PMA) 等^[4, 8-9]。本实验选取 LPS 和 IL-8 刺激中性粒细胞，模拟体内病原和感染部位对粒细胞的诱导因素，刺激 3 h 后成功检测到大量 NET 产生，该方法用于体外诱导 NET 形成，具有简单、方便、重复性好的优点。LPS 刺激中性粒细胞 30 min 内即能产生 NET，在 3~4 h 达到高峰。本实验选取 3 h 作为检测时间点，充分保证 NET 产量，也是大多数报道常用的检测时间点。

本研究采用定性、定量结合的方法评价 NET 产生，保证了实验的可行性和结果的准确性。采用免

疫荧光方法对 NET 结构的不同成分分别染色，再利用激光共聚焦显微镜成像方法共定位 DNA、瓜氨酸化组蛋白 H3 和 MPO 共 3 种成分，在融合照片中，实现准确定位 NET 结构。此外，肽基精氨酸脱亚胺酶 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) 修饰组蛋白精氨酸残基转变为瓜氨酸，即组蛋白瓜氨酸化，是中性粒细胞染色质形成 NET 的先决条件^[10]。因此，本研究采用抗-瓜氨酸化组蛋白 H3 (H3Cit) 代替抗-H3，使检测结果更准确。NET 诱导的细胞死亡是不同于凋亡和坏死的另一种死亡方式，采用 DNA、瓜氨酸化组蛋白 H3 和 MPO 三者共定位成像的方法，可以直接观察到，NET 是以 DNA 为骨架的长纤维网状结构，不同于凋亡时的染色质 DNA 片段化和坏死的核 DNA 固缩、断裂、溶解。因此，显微

结构和成分组成是评价NET的重要标准。

在NET发现之前,检测循环游离DNA早已应用于临床,作为诊断濒危细胞或组织的工具,用于肿瘤、子痫前期、心肌梗死、中风、创伤和自身免疫性疾病等^[11-14]。然而现在认识到,游离DNA作为NET的主要成分,由中性粒细胞主动释放并发挥作用^[15-16]。因此,应该重新评价游离DNA的临床应用价值。在定量检测细胞上清NET时,本研究采用游离DNA水平评价NET含量。该方法依赖于PicoGreen[®]染料的荧光分光光度法。PicoGreen[®]染料能特异结合dsDNA,有效避免ssDNA和RNA的干扰,并且检测灵敏度显著高于Hoechst-33258、YO-PRO[®]-1和YOYO[®]-1等核酸染料,检测DNA浓度范围可低至250 pg/ml,提示本法具有较好的精确性和可靠性。与既往检测游离DNA的方法相比,本实验采用细胞上清直接测定法,既能避免提取DNA时造成的损失和误差,又缩短了实验周期。由于细胞培养上清中核酸成分相对简单,因此,评价组织提取液等成分复杂的样本时,可能仍需要初步提取DNA后再用本法测定。

尽管已经明确NET参与多种疾病的发生发展,但是,诱导和调控NET产生的具体机制尚不明确,NET作为一种新发现的重要免疫途径,其如何捕获杀灭病原体及NET形成后下游信号通路也有待进一步研究。本研究成功建立了体外诱导和定性、定量检测NET的方法,为NET相关机制研究奠定了基础。

参考文献

- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils[J]. *Annu Rev Pathol*,2014,9:181-218.
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work[J]. *Nat Immunol*,2014,15(7):602-611.
- Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes[J]. *Immunity*,2010,33(5):657-670.
- Brinkmann V, Laube B, Abu AU, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*,2004,303(5663):1532-1535.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps[J]. *J Cell Biol*,2007,176(2):231-241.
- Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis[J]. *Curr Opin Infect Dis*,2012,25(3):321-327.
- Dörner T. SLE in 2011: Deciphering the role of NETs and networks in SLE[J]. *Nat Rev Rheumatol*,2012,8(2):68-70.
- Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity[J]. *J Immunol*,2012,189(6):2689-2695.
- Narasaraju T, Yang E, Samy RP, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis[J]. *Am J Pathol*,2011,179(1):199-210.
- Li P, Li M, Lindberg MR, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps[J]. *J Exp Med*,2010,207(9):1853-1862.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2013,10(8):472-484.
- Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases[J]. *FEBS Lett*,2007,581(5):795-799.
- Lo YM, Rainer TH, Chan LY, et al. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients[J]. *Clin Chem*,2000,46(3):319-323.
- Rainer TH, Wong LK, Lam W, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke[J]. *Clin Chem*,2003,49(4):562-569.
- Logters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis[J]. *J Orthop Res*,2009,27(11):1401-1407.
- Forsblom E, Aittoniemi J, Ruotsalainen E, et al. High cell-free DNA predicts fatal outcome among *Staphylococcus aureus* bacteraemia patients with intensive care unit treatment[J]. *PLoS One*,2014,9(2):e87741.

(收稿日期: 2014-07-28)

(本文编辑: 孙荣华)

朱鏐雯, 张玥, 李国力, 等. 建立体外诱导和检测中性粒细胞胞外诱捕网的方法[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(3): 404-408.