



高内涵分析系统联合激光扫描共聚焦显微镜观察细胞间隧道纳米管*

潘鹏宇¹⁾ 赵秋宇^{1,2)} 王 英²⁾ 王建波²⁾ 李 想³⁾ 刘春英¹⁾ 王 淳^{1)**}

¹⁾ 辽宁中医药大学中西医结合学院, 沈阳 110847; ²⁾ 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847;

³⁾ 珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司, 上海 201203)

摘要 目的 隧道纳米管(tunneling nanotubes, TNTs)是存在于细胞间的膜管样结构,具有直接且远距离的生物信息交换功能。TNTs因结构易破坏、存在时间短以及形成后不稳定,故观察其动态形成与功能存在一定难度。而本研究采用高内涵分析系统(HCA)联合激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)尝试观察TNTs形成的动态过程及其对囊泡物质的转运功能。**方法** 荧光探针标记人肺腺癌A549及顺铂耐药A549/DDP细胞,分别利用HCA观察TNTs形成过程、LSCM观察TNTs三维结构、HCA联合LSCM分析TNTs囊泡物质转运功能。**结果** 同种肿瘤细胞(A549或A549/DDP)间、不同亚型肿瘤细胞(A549与A549/DDP)间均可形成TNTs结构;与A549细胞相比,A549/DDP细胞间TNTs结构长且粗、形成指数高(A549和A549/DDP细胞TNTs长度、直径和形成指数分别为14.71 μm 、2.27 μm 、4和25.44 μm 、2.59 μm 、11);肿瘤细胞间通过细胞接触-膜融合-细胞反向易位-胞膜融合区拉长变细,以及细胞膜凸起-膜凸起丝状伪足样拉长-膜凸起与其他细胞膜/膜凸起融合两种方式形成TNTs;TNTs囊泡转运功能具有双向性,囊泡转运速率及数量因转运阶段和供体细胞不同而存在差异,A549/DDP细胞向A549细胞进行囊泡转运过程中表现为囊泡转运速率初始快、末期慢,A549作为供体细胞向受体A549/DDP细胞转运的囊泡数量和比例高于A549/DDP作为供体细胞的反向转运。**结论** HCA联合LSCM可有效观察、分析TNTs动态形成过程及囊泡物质转运功能。

关键词 高内涵分析, 激光扫描共聚焦显微镜, 隧道纳米管, 细胞间交流, 细胞间转运, 肿瘤

中图分类号 Q2, R3

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0453

隧道纳米管(tunneling nanotubes, TNTs)是存在于细胞间的细长膜管状结构,又称膜纳米管,主要由肌动蛋白、微丝和微管组成,直径大多在50 nm至几微米,长度约几十到数百微米^[1-2]。TNTs作为一种新的细胞间相互作用方式,可将不同细胞的质膜和胞质连接在一起,实现不同细胞成分的远距离直接转运,完成生物信息交换^[3]。TNTs可转运物质多样,包括如 Ca^{2+} 、线粒体、高尔基囊泡、溶酶体、病毒、外泌体、蛋白质、microRNA和siRNA等^[4-8]。TNTs直接且精准的转运功能使其在信号转导、免疫应答、凋亡、纳米与微米颗粒转运、胚胎形成与发育、细胞分化、代谢重编程、病原体传播、神经退行性病变、肿瘤发生与发展等生理、病理过程中发挥重要作用^[9-10]。对于肿瘤细胞而言,TNTs可提高其增殖和侵袭、迁移能力,促进肿瘤细胞存活,并可通过线粒体的转

运增加肿瘤细胞的氧化磷酸化和ATP生成以应对不利的环境压力^[11]。此外,对于肿瘤血管生成、放化疗耐药,TNTs也发挥了重要作用^[12]。其中,在肺腺癌的以往研究发现,利用转盘共聚焦显微镜可探明TNTs内转运物质包括囊泡、蛋白质和线粒体,可测量TNTs长度及直径(长度:大于70 μm ;直径:400~1 500 nm),该结果与本研究相一致^[13-14]。

目前,可以利用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)测量TNTs长度、观察TNTs表面结构,也可以利用透射电子显微镜(transmission electron

* 国家自然科学基金(82174254, 81973735)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13842019144, E-mail: 1205055348@qq.com

收稿日期: 2022-09-20, 接受日期: 2022-11-10

microscope, TEM) 观察 TNTs 内物质转运种类, 利用光电融合成像技术 (correlative light and electron microscopy, CLEM) 可更精细地观察 TNTs 内运输物质如囊泡等的超微结构以及 TNTs 的超微结构与转运特点^[15-17]。本研究利用高内涵分析系统 (high content analysis system, HCA) 结合 LSCM 观察 TNTs 形态学特征, 捕获 TNTs 动态形成过程, 观察经由 TNTs 的细胞间物质转运动态过程, 并探究 TNTs 转运物质在数量和分布上的特点。LSCM 是传统经典的高分辨率显微成像方法, 其采用激光光源, 结合单孔共聚焦成像方式, 配合高数值孔径 (NA) 物镜成像可达到光学显微镜分辨率的极限, 即 200 nm 左右。但 LSCM 也有不适用的情况, 如普通的 LSCM 由于成像时间长、光毒性和光漂白作用强, 应用于活细胞动态成像效果不佳^[18-19]。HCA 是新兴的显微成像和分析技术, 它结合了高通量筛选技术的效率和细胞影像学技术的成像与分析能力, 能从复杂生物系统中快速收集丰富的定量数据^[20]。HCA 往往使用转盘共聚焦光路结合水浸式物镜系统以实现高分辨率成像, 具有成像速度快 (成像时间以毫秒为单位) 并保证成像质量和细胞活性特点, 利用高 NA 物镜成像也可达到光学显微镜分辨率的极限。同时, HCA 搭载的环境控制系统更利于活细胞动态拍摄和追踪^[21-22]。因此, 本研究选用 HCA 结合 LSCM 实现 TNTs 的形态、形成机制和功能的观察。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人肺腺癌 A549 细胞、顺铂耐药 A549/DDP 细胞购自中国医学院肿瘤研究中心; 顺铂 (cisplatin, Cis-DDP) (货号: PHR1624), 德国 Sigma 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号: FB25015), 美国 Clark 公司; McCoy's 5A 培养液 (批号: WG210224C), 北京中生奥邦生物科技有限公司; DMEM/F12 培养液 (批号: 20210301), 赛文创新 (北京) 生物科技有限公司; 0.25% 胰蛋白酶 (批号: 25200-056), 美国 Gibco 公司; 青霉素和链霉素 (批号: SV30010), 美国 Hyclone 公司; 小麦胚芽凝集素和 Alexa Fluor 488 偶联物 (wheat germ agglutinin Alexa Fluor 488 conjugate, WGA-488) (批号: 2260867), 美国 Invitrogen 公司; Vybrant DiD 细胞标记溶液 (Vybrant DiD cell-labeling solution, DiD) (批号: 2246612), 美国

Invitrogen 公司; Hoechst 33342 染色液 (批号: 20210507), 中国北京索莱宝科技有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

A549、A549/DDP 细胞于 37°C、湿度 95%、CO₂ 浓度 5% 条件下, 分别在含 10% FBS 和 100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 或 McCoy's 5A 培养液中进行培养。A549/DDP 细胞于 1 μmol/L 顺铂环境下持续培养以保持其耐药性, 并于实验前 2 周更换为无顺铂的完全培养液用于后续实验^[23]。

1.2.2 荧光染色、分组及药物干预

收集 A549 或 A549/DDP 细胞, 调节细胞密度至 1.0×10^6 /ml。A549 细胞以 WGA-488 偶联物 + Hoechst 33342 荧光染料染色 (终浓度分别为 8 mg/L、10 mg/L, 37°C 共孵育 15 min); A549/DDP 细胞以 DiD + Hoechst 33342 荧光染料染色 (终浓度分别为 5 μmol/L、10 mg/L, 37°C 共孵育 15 min); 并互换荧光染料对 A549 与 A549/DDP 细胞进行染色。染色后的细胞经不含钙离子、镁离子、酚红的 PBS 洗涤, 按下列方式接种于 24 孔 TCT 细胞培养板 (Beaver 公司) 或 15 mm 共聚焦皿 (NEST 公司) 中: a. A549 细胞单独培养, 2.0×10^5 /孔; b. A549/DDP 细胞单独培养, 2.0×10^5 /孔; c. A549 与 A549/DDP 细胞按 1:1 混合培养, 细胞密度 2.0×10^5 /孔。继续孵育 4 h 待细胞贴壁后活细胞上机观察; 固定细胞拍摄在染色后培养 48 h 结束时进行, 采用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 经 D-PBS 洗涤并加入抗荧光衰减封片剂上机。

1.3 高内涵分析系统实验参数设置

1.3.1 仪器型号

高内涵分析系统: PerkinElmer High Content Analysis System Operetta CLS。

1.3.2 系统参数设置

明场拍摄仪器设置如下。物镜: 20×Air. NA 0.4; 自动对焦: Two Peak (Default); 拍摄模式: Non-Confocal, Binning: 2; 通道: Brightfield、Digital Phase Contrasts; 单孔视野数量: 246 Field; 拍摄首层: -9.0 μm; 拍摄层数: 3; 层数间隔: 1.5 μm; 单次拍摄循环时间: 30 min; 拍摄总时长 48 h。

荧光拍摄仪器设置如下。物镜: 20×Air. NA 0.4; 自动对焦: One Peak (Default); 拍摄模式: Confocal, Binning: 2; 通道: Brightfield、DiD

(Ex644/Em665)、Alexa Fluor 488、Hoechst 33342; 单孔视野数量: 58 Field; 拍摄首层: $-7.0\ \mu\text{m}$; 拍摄层数: 3; 层数间隔: $1.5\ \mu\text{m}$; 单次拍摄循环时间: 7~8 min; 拍摄总时长 48 h。

1.4 激光扫描共聚焦显微镜实验参数设置

1.4.1 仪器型号

激光扫描共聚焦显微镜: OLYMPUS FV10i。

1.4.2 参数设置

拍摄设置如下。物镜: $60\times$ NA1.35 油浸物镜; 通道选择: Hoechst 33342、Alexa Fluor 488、DID、Phase contrast; Acquire Map Image 成像通道: Alexa Fluor 488、DID; 各通道光敏感度依次: 49.6%、49.6%、41.6%、36.6%; 各通道激光强度依次: 68.3%、51.1%、27.9%、默认; 扫描像素: $1\ 024\times 1\ 024$; 扫描层数: 15~20 层; 层间间隔 $1\ \mu\text{m}$; 单通道扫描时间: 约 00:00:26.0; 总扫描时间: 约 00:26:40.4。

1.5 TNTs 三维重构

应用 IMARIS 9 软件对激光扫描共聚焦显微镜成像图片进行细胞表面三维重构, 并对细胞核荧光信号进行透明化处理。利用 Sport 工具标记供体细胞经 TNTs 转运的荧光信号, 观察被转运囊泡在受体细胞内的分布情况。

1.6 TNTs 统计分析

TNTs 形成指数即每 100 个细胞的 TNTs 数^[17], TNTs 直径、长度和形成指数统计应用高内涵软件 Harmony 4.1 采集 5 个随机时间点视野进行记录。整理数据, 采用 GraphPad Prism 9 软件对其处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验 (数据符合正态分布且方差齐)。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCA 观察 TNTs 形成过程

应用高内涵分析系统拍摄到 A549/DDP 细胞间由细胞接触-膜融合-细胞反向易位-胞膜融合区拉长变细机制形成 TNTs 的全过程 (即接触分离机制形成 TNTs) (图 1)。同时, 应用高内涵分析系统分别在 5 个随机时间点采集图像, 观察同种肿瘤细胞间 TNTs 形成情况。结果显示: 单独培养的 A549 细胞, 当细胞密度较高、距离较近时可观察到 TNTs 形成, TNTs 平均长度为 $14.71\ \mu\text{m}$, 平均直径为 $2.27\ \mu\text{m}$, TNTs 形成指数为 4; 与 A549 细胞相比, 单独培养的 A549/DDP 细胞, 在细胞密度较低、距

离较远时即可观察到 TNTs 形成, 且形成 TNTs 更多, TNTs 形成指数为 11 ($P < 0.001$), TNTs 结构更粗、长, 平均长度为 $25.44\ \mu\text{m}$, 平均直径为 $2.59\ \mu\text{m}$ (图 2)。

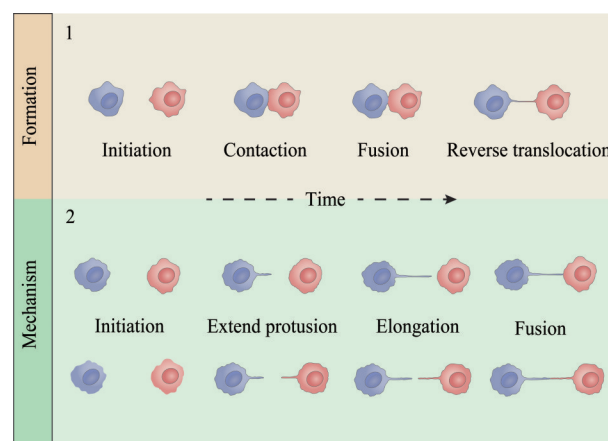


Fig. 1 Pattern diagram of formation mechanism of tunneling nanotubes

Two modes of TNTs formation: the fusion of the cell membranes of the contacting cells, followed by the translocation of the cells in the opposite direction, allows the formation of TNTs; the cells emit filopodia-like membrane projections, followed by membrane fusion allows the formation of TNTs.

0~8 min 时, 标记了红色荧光的两个 A549/DDP 细胞彼此接近; 16 min 时, 两细胞胞膜接触; 16~72 min 时, 两细胞胞膜接触面积进一步增加; 72~136 min 时, 两细胞逐渐分离, 并在 144 min 时形成 TNT 结构; 144~224 min 时, TNT 不断拉长变细, 直至 232 min 时消失。TNT 全程存在 80 min (图 3, 图 S1)。图 3a 说明了 TNTs 接触分离的形成机制; 图 3b, c 说明了胞膜接触面积增大之后再分离才能形成 TNTs, 我们在其他视野观察中发现有细胞短暂、小面积的接触并不会形成 TNTs; 图 3d 展示了 TNTs 形成并消失后细胞的状态。图 S1 是从各个时间点或时间段的细胞接触, 胞膜接触面积增加、减少, TNTs 存在时间, 以及 TNTs 消失是突然远距离中断等完整地呈现了 TNTs 形成全过程, 可以使后续的研究者整体上把控 TNTs 形成阶段并在早期区分是否有 TNTs 形成趋向。

2.2 LSCM 观察 TNTs 三维结构及 TNTs 囊泡物质运输

进一步利用 LSCM 观察不同亚型肿瘤细胞间形成的 TNTs 结构。图 4a 所示为 A549/DDP 细胞 (绿色荧光) 伸向 A549 细胞 (红色荧光) 的 TNTs 结构。为了排除不同荧光探针标记原理所产生的差异

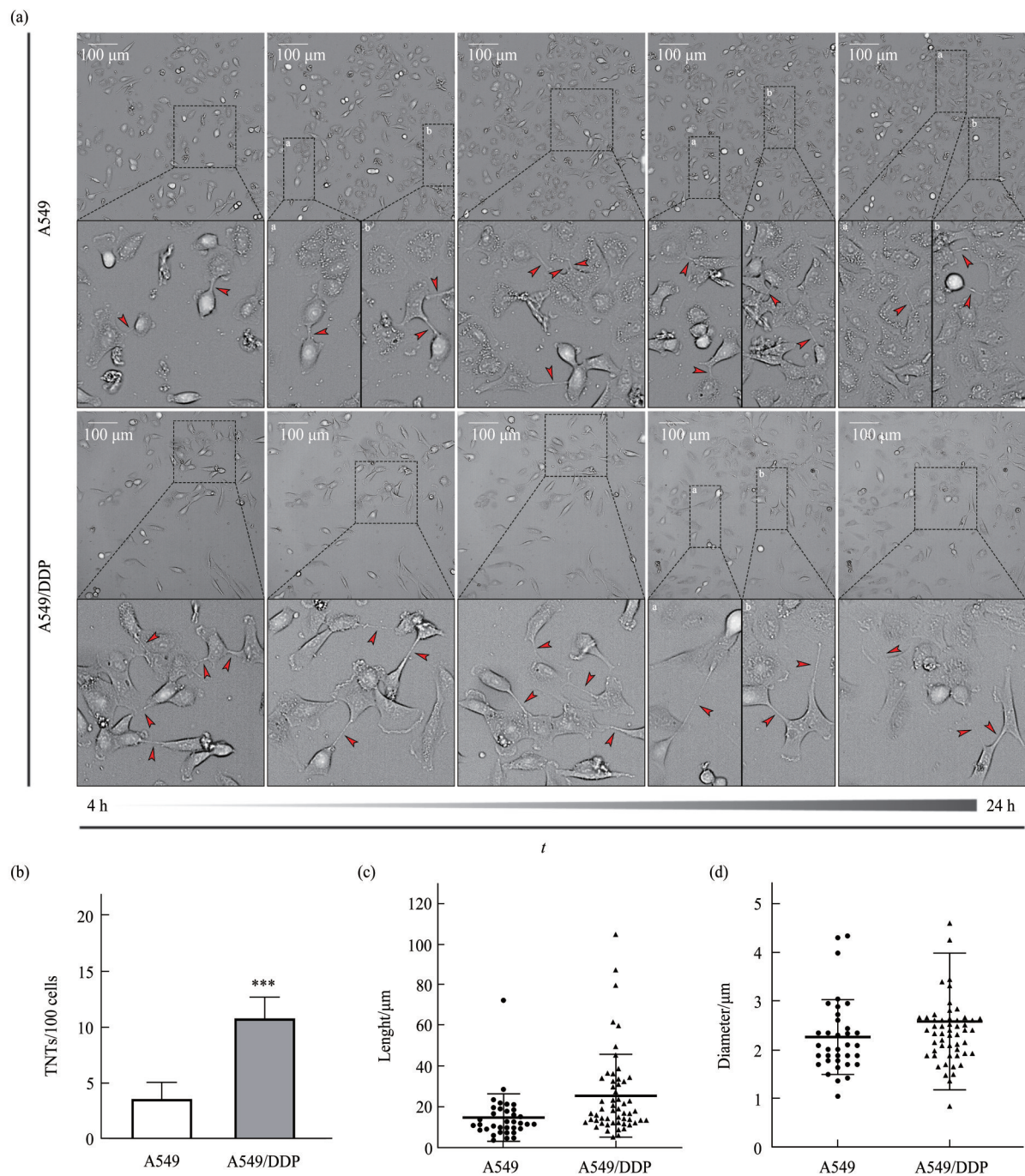


Fig. 2 Observation of intercellular TNTs by high content analysis system

(a) Brightfield high content imaging of tunneling nanotubes (red arrow: TNTs). (b) Comparison of TNTs index between A549 and A549/DDP cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$); (c, d) Comparison of the length and diameter of TNTs formed by A549 and A549/DDP cells. *** $P<0.001$ vs A549 group, $n=5$.

互换荧光标记物, 图4b所示为A549细胞(绿色荧光)伸向A549/DDP细胞(红色荧光)的TNTs结构。由此可见, 不同亚型的肿瘤细胞间可以形成TNTs。此外, 还观察到了由A549细胞(红色荧光)发出的丝状伪足样膜凸起正伸向A549/DDP细胞(绿色荧光), 以细胞膜凸起-膜凸起丝状伪足样拉长-膜凸起与其他细胞膜融合机制形成TNTs(即

以丝状伪足样膜凸起伸出后融合的方式形成TNT)(图4c, 图1)。

进一步利用IMARIS软件对TNTs结构进行三维观察, 图4所示yz视野下可观察到悬浮于基质的典型TNTs结构特征, 且通过xy与yz视野还可清晰地观察到TNT中运送的囊泡物质(图4a, b)。

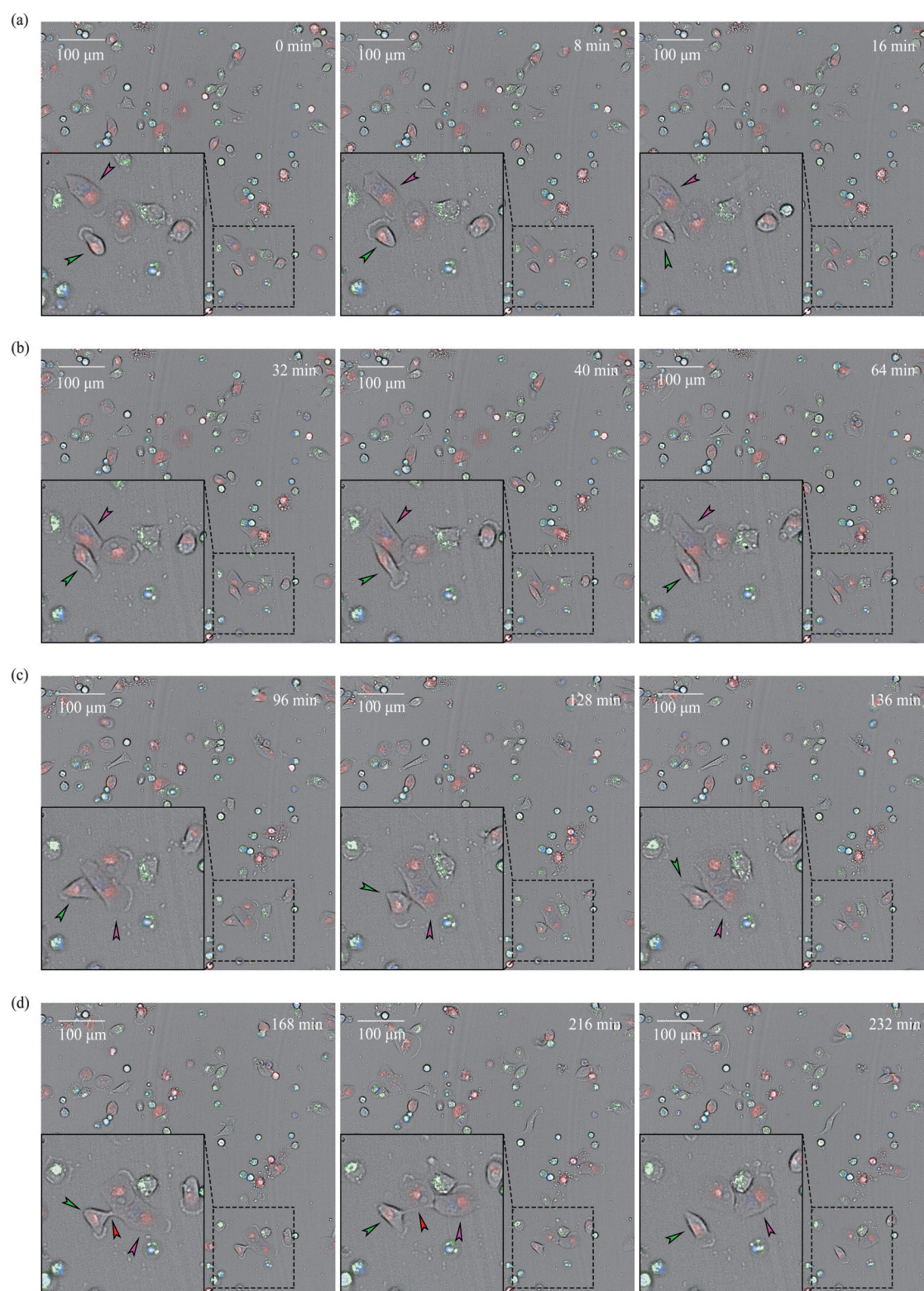


Fig. 3 Observation on the dynamic formation of TNTs by high content analysis system

The formation process of TNTs was observed. A549/DDP cells are labeled with red fluorescent dye DID, and A549 cells are labeled with green fluorescent dye WGA-488 conjugate, and the nucleus of both kinds of cells are labeled with Hoechst 33342. Green and pink arrows trace two different A549/DDP cells, respectively. The red arrow indicates the TNT structure. (a) A549/DDP cells were close to each other. (b) The contact area of A549/DDP cells increased gradually. (c) With the reverse translocation of A549/DDP cells, the contact area of the two cells decreased gradually. (d) TNT were formed with reverse translocation of A549/DDP cells and finally disappeared.

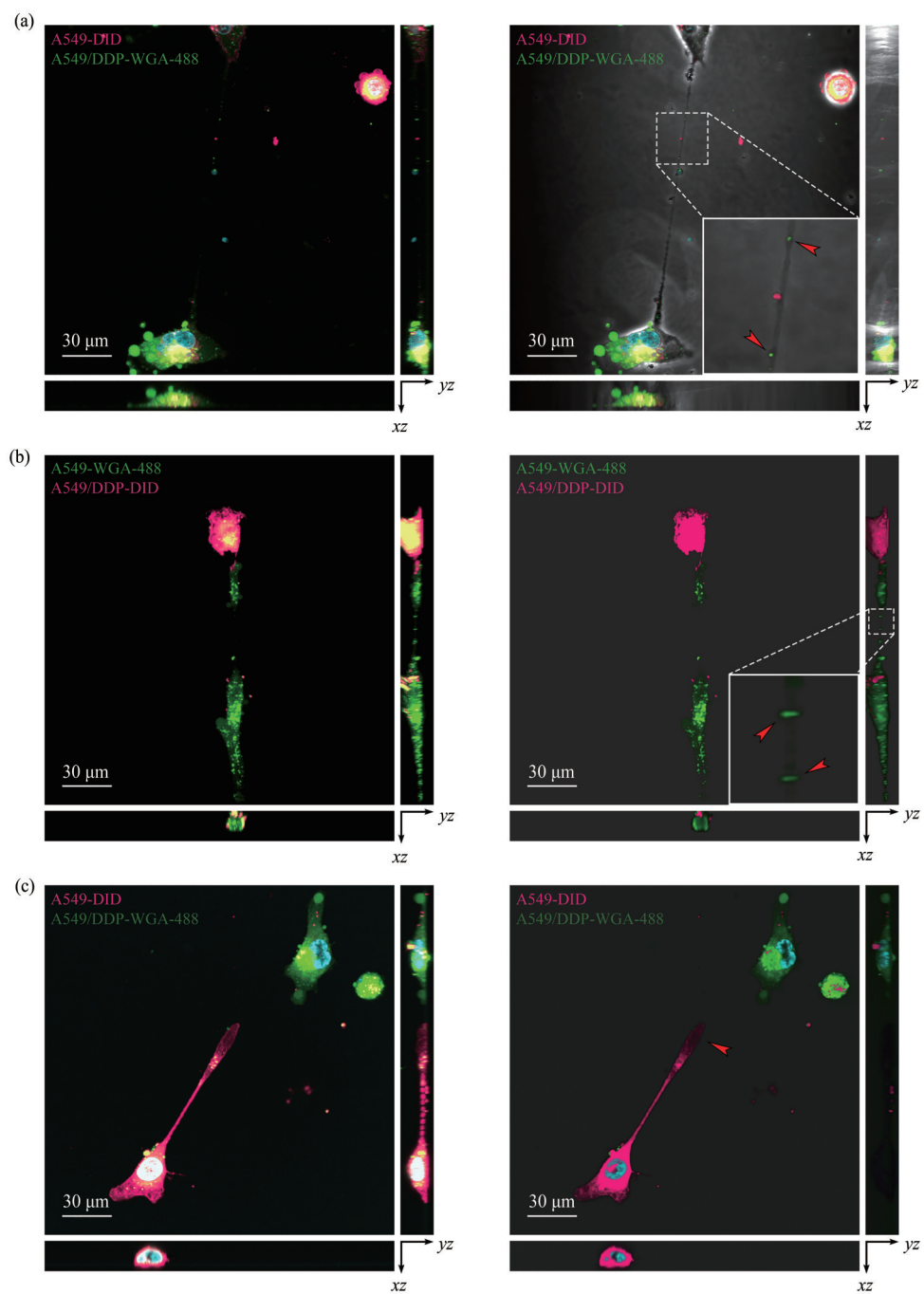


Fig. 4 Structural Characteristics of TNTs Observed by LSCM

(a) An A549/DDP cell (green fluorescence) TNT extended to an A549 cell (red fluorescence) and the vesicles (red arrow) were transported in the TNT. (b) An A549 cell (green fluorescence) TNT extended to an A549/DDP cell (red fluorescence) and vesicles (red arrow) were transported in the TNT (red arrow). (c) The thin tubular structure formed by the bulge of A549 cell membrane (red fluorescence) is extending to A549/DDP cell (green fluorescence), forming a close-ended TNT (red arrow).

2.3 HCA联合LSCM分析TNTs囊泡转运功能

利用高内涵分析系统进行延时拍摄，不仅可以

观察 TNTs 的形成，还可观察 TNTs 内囊泡物质的动态转运。图 5 中观察到由 A549/DDP 细胞（红色荧

光)发出TNT伸向A549细胞(绿色荧光),此时A549/DDP、A549细胞可分别被称为供体细胞和受体细胞。7'32"~22'36",可观察到来源于供体A549/DDP细胞的红色囊泡在TNT内快速转运至受体A549细胞,30'8"~45'12",囊泡在TNT内转运速率大幅下降,这表明A549/DDP作为供体细胞向受体A549细胞转运囊泡物质的速率随转运过程由快至慢。由此可见,通过HCA延时拍摄成像可进一步在动态观察中明确TNTs物质转运功能在物质运送方向、运输速率方面的特性。

利用LSCM拍摄图像进行三维重建,可观察到TNTs的双向物质转运功能。例如,对图6a(即图4b)中层扫的细胞图像进行三维重建:a.首先,开放Hoechst 33342通道并重构细胞表面,可见蓝色荧光标记的细胞核及由胞膜包裹的细胞轮廓(图6b),此时可清晰观察到连接两细胞间(A549及A549/DDP)悬浮于基质的TNT结构;b.开放Hoechst 33342及WGA-488通道,可见供体A549细胞(WGA-488偶联物标记,绿色荧光)内的物质(绿色荧光)通过TNT进入受体A549/DDP细胞中(图6c);c.开放Hoechst 33342及DID通道,可见供体A549/DDP细胞(DID标记,红色荧光)内的物质(红色荧光)通过TNT进入受体A549细胞中(图6d);d.开放所有通道(即Hoechst 33342、WGA-488及DID通道),则全面观察到TNT形成后细胞间双向的物质运输情况(图6e)。

利用IMARIS软件进一步量化TNTs囊泡转运功能,比较LSCM图像中TNT直径与不同点状荧光信号斑直径大小,根据两者比值选择合适直径荧光信号斑作为实际可被转运的囊泡。本次研究对图6进行分析,选择荧光信号直径为2.0 μm ,并用软件Quality功能过滤杂信号,最终将两种荧光信号量化成数目不等的球体(红色球体代表DID荧光标记的囊泡、绿色球体代表WGA-488荧光标记的囊泡)(图7a~d)。量化结果显示,a.供体A549细胞向受体A549/DDP细胞的物质运输:图7a, c显示,源于供体A549细胞的绿色小球体共109个,其中在TNT

管内15个,占总绿色球体的14%,转运进受体A549/DDP细胞内38个,占总绿色球体的35%,剩余在供体A549细胞中56个,占总绿色球体的51%。通过上述三维建模分析,可知供体A549细胞内约49%(即35%+14%)的物质已转运/正转运至受体A549/DDP细胞中(图7e, f, c)。b.供体A549/DDP细胞向受体A549细胞的物质运输:图7b, d显示,源于供体A549/DDP细胞的红色小球体共82个,其中在TNT管内4个,占总红色球体的5%,转运进受体A549细胞内17个,占总红色球体的21%,剩余在供体A549/DDP细胞内61个,占总红色球体的74%。通过上述三维建模分析,可知供体A549/DDP细胞内约26%(即21%+5%)的物质已转运/正转运至受体A549细胞中(图7e, f, d)。综合上述三维建模分析可知,在A549与A549/DDP细胞的双向转运中,以供体A549细胞向受体A549/DDP细胞的转运方向为优势转运方向,相比于A549/DDP细胞,A549细胞在囊泡物质转运的数量和比例上更高。

此外,对LSCM成像进行三维重建进行后续处理,还可观察转运物质在受体细胞内的分布情况。在图8a的三维图像基础上对细胞核进行透明处理(图8b),并沿TNT长轴与两细胞核中心相交做斜切面分为上、下两个空间,观察转运物质在两受体细胞内的分布情况:a.受体A549/DDP细胞中,由A549细胞转运来的物质(绿色球体)主要分布在细胞膜膜下、细胞质以及核膜周围(图8c, d);b.受体A549细胞中,由A549/DDP细胞转运来的物质(红色球体)仅分布于细胞膜膜下(图8e, f)。

综上,HCA可观察到TNTs动态的形成机制和物质转运,LSCM成像进行三维重建与建模分析,可获知物质在TNTs内双向转运的特点,可量化转运物质的数量与比例,并可观察被转运物质在受体细胞内的分布情况。因此,HCA联合LSCM可以更好地进行TNTs观察与分析。

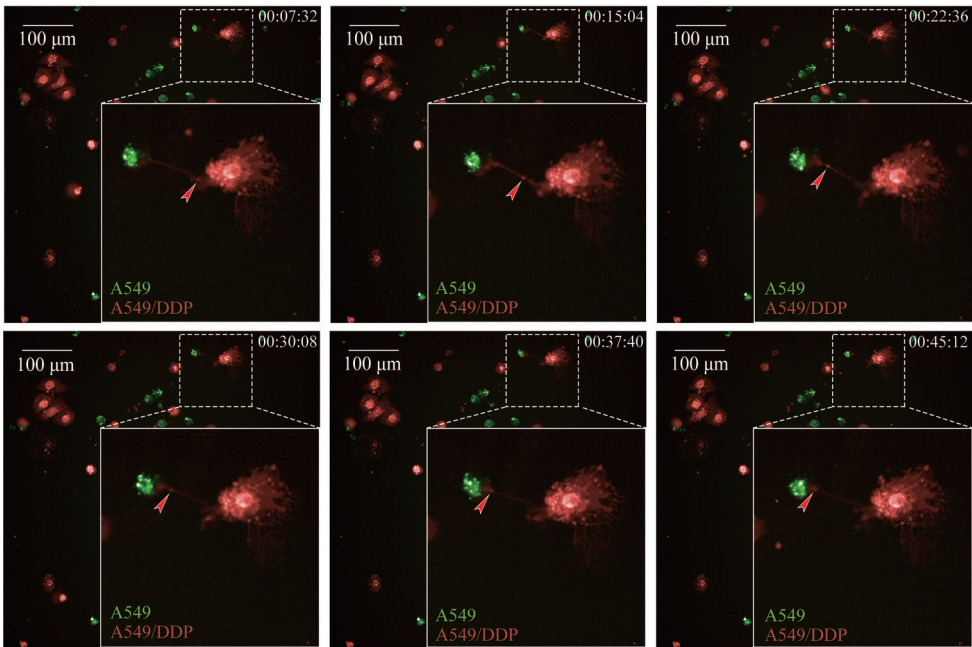


Fig. 5 The material transport through tunnel nanotubes observed by high content imaging system
A vesicle (red) derived from a donor A549/DDP cell (red fluorescence) is transported into an A549 cell (green fluorescence) *via* TNT. Red arrows indicate a transported vesicle within the TNTs.

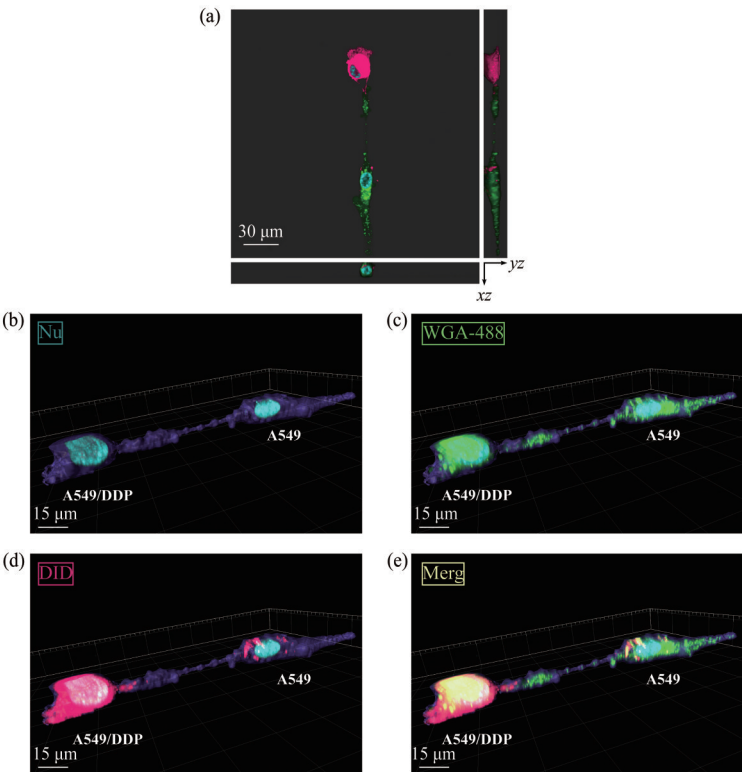


Fig. 6 Observation on the bidirectional material transport Function of TNTs by LSCM imaging 3D reconstruction
(a) Original images taken by LSCM (an A549 cell labeled with green fluorescence, an A549/DDP cell labeled with red fluorescence); (b) 3D reconstruction and display of Hoechst 33342 channels; (c) 3D reconstruction and display of WGA-488+Hoechst 33342 channels; (d) 3D reconstruction and display of DID+Hoechst 33342 channels; (e) 3D reconstruction and multi-channel (Hoechst 33342+WGA-488+DID channel) stacking.

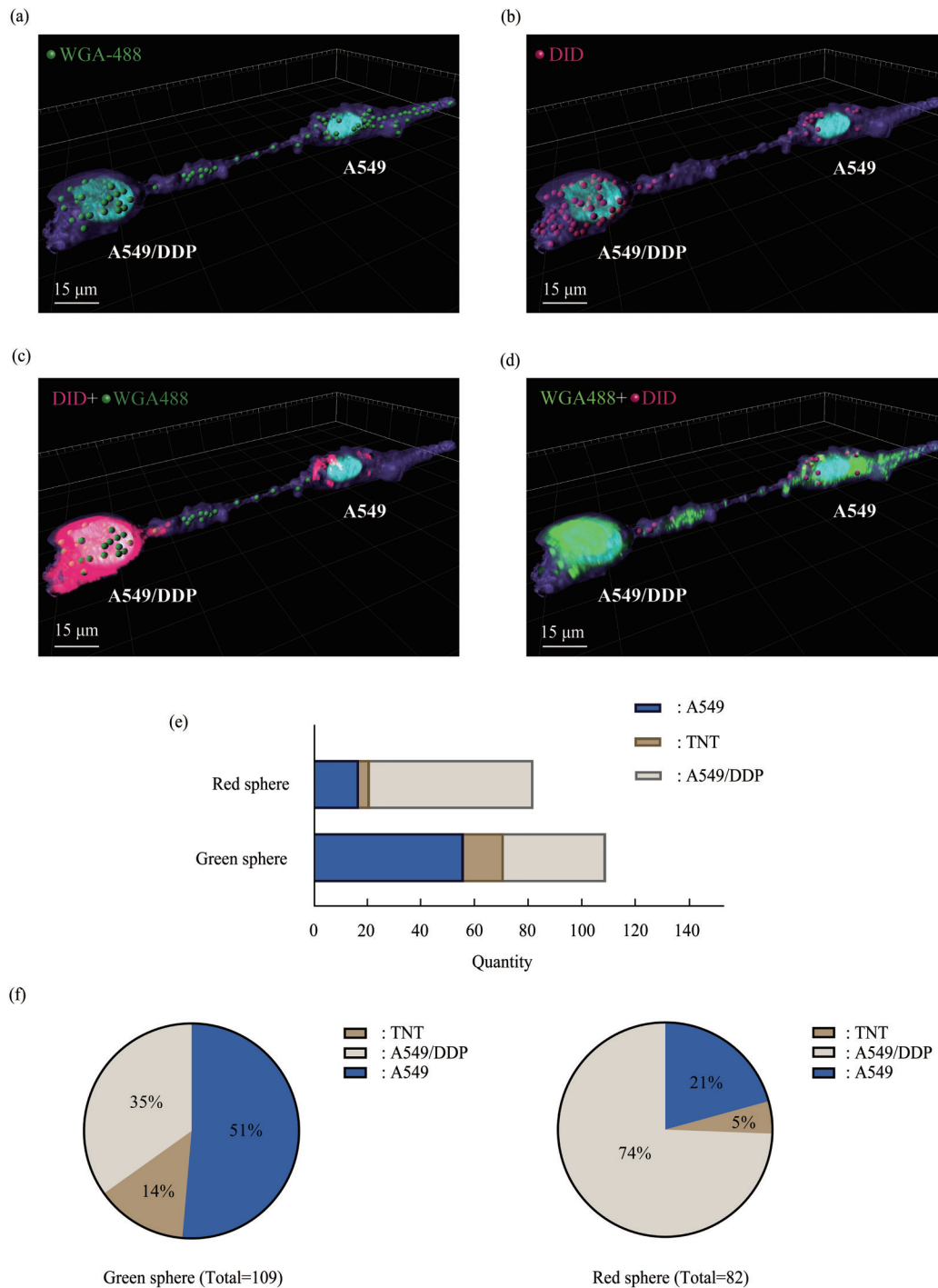


Fig. 7 TNTs material transportation analyzed by LSCM imaging 3D reconstruction

(a, c) 3D reconstruction combined with IMARIS software modeling quantified the transfer material from a donor A549 cell to a recipient A549/DDP cell; (b, d) 3D reconstruction combined with IMARIS software modeling quantified the transport material from a donor A549/DDP cell to a recipient A549 cell; (e, f) 3D reconstruction combined with IMARIS software modeling quantified the distribution and ratio of substances in donor cells, TNT and recipient cells.

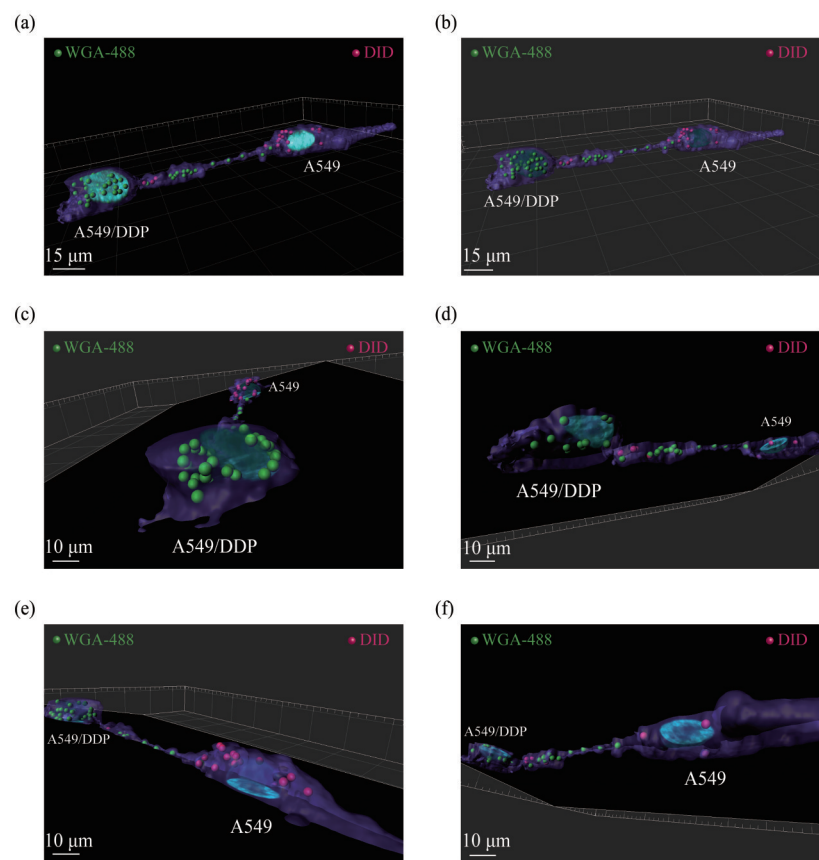


Fig. 8 Observation of transported vesicles distribution in recipient cells by LSCM imaging 3D reconstruction
(a) 3D reconstruction+IMARIS software modeling quantification; (b) figure 8a was treated with nuclear transparency; (c, d) a cleft receptor A549/DDP cell was observed from the upper and lower perspectives; (e, f) a cleft receptor A549 cell was observed from the upper and lower perspectives.

3 讨 论

TNTs是近几年发现的一种远距离连接细胞的膜管样结构,其由脂双层包裹并以F肌动蛋白(F-actin)单独构成或与微管共同组成基本骨架,使被连接的同种或异种细胞间产生远距离的直接细胞通讯。在形态上,TNTs的直径从几十纳米到几微米,长度可跨越几个细胞达到100微米以上。由于目前尚没有明确的TNTs形成分子标志,因此悬浮于基质是TNTs区别于其他不同细胞膜样凸起结构(如丝状伪足等)的显著特征^[24]。TNTs形成机制有2种:a.相互靠近的两个细胞,细胞膜彼此接触,胞膜发生融合,随后两细胞反向易位分离,膜融合区域拉长、变细,最终形成TNTs;b.由一个细胞单独伸出或两细胞共同伸出丝状伪足样膜凸起,当接触到对方细胞膜或丝状伪足样膜凸起后发生膜融合,形成TNTs^[25]。本研究中,利用HCA清晰地捕捉到两个同种细胞(A549/DDP细胞)通

过第一种方式,即接触分离机制形成TNTs的完整过程(图3,图S1),利用LSCM观察到第二种以丝状伪足样膜凸起发出再融合机制形成的TNTs,构成不同亚型肿瘤细胞间的TNT形成机制,这表明肿瘤细胞间有着两种不同的TNTs形成方式(图1)。

作为一种新的细胞间通讯方式,不仅要观察TNTs的形态学特征,还要分析TNTs的功能。TNTs长度、直径以及形成指数均可作为分析TNTs物质传递功能的评价基础,如直径大、延伸长的TNTs有利于细胞间较大物质(线粒体、高尔基体囊泡等)的远距离转运^[15, 26]。本研究利用HCA测量了肿瘤细胞间形成的TNTs长度、直径及形成指数,结果发现,与亲本人肺腺癌A549细胞形成的TNTs(平均长度14.71 μm、平均直径2.27 μm、TNTs指数4)相比,顺铂耐药的A549/DDP细胞间形成的TNTs(平均长度25.44 μm、平均直径2.59 μm、TNTs指数11)更长、更粗,且更广泛。

该结果表明,耐药的肿瘤细胞可能具备更强的TNTs相关细胞间物质转运能力或细胞通讯功能。

在细胞培养过程中,如何确定细胞间形成的丝状/管状结构是TNTs?目前认为观察到细胞间形成悬浮于基质的膜管结构是确定TNTs形成的显著特征^[1]。2004年Rustom等^[27]首先利用TEM结合SEM观察到了TNTs结构,这种观察方法虽清晰地获得了TNTs三维图像,但无法区分细胞间TNTs的发出者。随后很多学者采用CLEM观察TNTs,但由于CLEM技术繁杂,存在耗时的操作步骤与交联固定剂的使用等不利因素,加之TNTs本身具有形成的随机性、形态的多变性以及结构易破坏性等特点,因此该方法对TNTs结构保存和动态观察不利^[28]。此外,多色受激辐射损耗超分辨显微技术(stimulated emission depletion nanoscopy, STED Nanoscopy)也应用于TNTs的研究,但其过强的激发光会造成细胞标记荧光基团快速漂白,亦不利于TNTs的长时间动态成像观察^[14, 29]。本文尝试利用质膜探针染料标记细胞,采用HCA联合LSCM进行观察、拍摄,并应用IMARIS软件建模分析,观察同种或不同亚型肿瘤间TNTs形成及物质转运情况。首先,使用不同的膜结合荧光染料(DID、WGA-488)有助于判断细胞间TNTs结构的发出者,以及观察囊泡物质在TNTs中的转运及在受体细胞中的定位。其次,HCA具有通量高、成像迅速、延时拍摄时间长、光毒性低、可层扫并随机调整拍摄视野、拍摄后批量化分析的优点^[30-31]。因此,利用该系统测量TNTs直径、长度,并对TNTs指数进行统计,观察到了活细胞TNTs形成机制(即接触分离机制形成TNTs)及其内部物质实时转运的动态过程。但HCA高分辨率成像时需要配备相对昂贵的水镜成像系统,且因其通量高会造成孔板不必要的浪费,因此尝试将HCA(用于活细胞成像)与LSCM(固定细胞成像)结合使用实现优势互补,以更有效、快速、经济的方式进一步观察TNTs转运过程并分析转运功能。应用IMARIS软件对LSCM采集的图像进行三维重建和建模分析,探明了TNTs的另一种形成机制(即以丝状伪足样膜凸起伸出后再融合形成TNT的机制),确定了经TNTs的转运优势方向、转运效率及转运物质在受体细胞内的空间分布情况。

4 结 论

综上所述,利用HCA联合LSCM可有效观察TNTs结构、形成机制、内部物质(如囊泡)转运特点及物质被转运后在受体细胞内的分布特点。同时HCA联合LSCM观察TNTs结构与功能还具有经济、便利的优势,有利于在细胞形态学实验中推广使用。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>或<http://www.cnki.net>):

PIBB_20220453_Figure S1.pdf

数据可用性声明 本论文的关联数据(DOI: 10.57760/sciencedb.06337/CSTR: 31253.11.sciencedb.06337)可在Science Data Bank数据库(<https://www.scidb.cn/>)中访问获取。其中*.ims文件的打开软件为Imaris, *.pzfx文件的打开软件为Graphpad Prism。

参 考 文 献

- [1] Dagar S, Pathak D, Oza H V, *et al.* Tunneling nanotubes and related structures: molecular mechanisms of formation and function. *Biochem J*, 2021, **478**(22): 3977-3998
- [2] Austefjord M W, Gerdes H H, Wang X. Tunneling nanotubes: diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol*, 2014, **7**(1): e27934
- [3] Tiwari V, Koganti R, Russell G, *et al.* Role of tunneling nanotubes in viral infection, neurodegenerative disease, and cancer. *Front Immunol*, 2021, **12**: 680891
- [4] Jiang D, Chen F X, Zhou H, *et al.* Bioenergetic crosstalk between mesenchymal stem cells and various ocular cells through the intercellular trafficking of mitochondria. *Theranostics*, 2020, **10**(16): 7260-7272
- [5] Eugenin E, Camporesi E, Peracchia C. Direct cell-cell communication *via* membrane pores, gap junction channels, and tunneling nanotubes: medical relevance of mitochondrial exchange. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(11): 6133
- [6] Lagalwar S. Mechanisms of tunneling nanotube-based propagation of neurodegenerative disease proteins. *Front Mol Neurosci*, 2022, **15**: 957067
- [7] Driscoll J, Gondaliya P, Patel T. Tunneling nanotube-mediated communication: a mechanism of intercellular nucleic acid transfer. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(10): 5487
- [8] Pepe A, Pietropaoli S, Vos M, *et al.* Tunneling nanotubes provide a route for SARS-CoV-2 spreading. *Sci Adv*, 2022, **8**(29): 171
- [9] Ariazi J, Benowitz A, De Biasi V, *et al.* Tunneling nanotubes and gap junctions-their role in long-range intercellular communication

- during development, health, and disease conditions. *Front Mol Neurosci*, 2017, **10**: 333
- [10] Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol*, 2015, **94**(10): 429-443
- [11] Roehlecke C, Schmidt M. Tunneling nanotubes and tumor microtubes in cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(4): 857
- [12] Kato K, Nguyen K T, Decker C W, *et al.* Tunneling nanotube formation promotes survival against 5-fluorouracil in MCF-7 breast cancer cells. *FEBS Open Bio*, 2022, **12**(1): 203-210
- [13] Wang Z G, Liu S L, Tian Z Q, *et al.* Myosin-driven intercellular transportation of wheat germ agglutinin mediated by membrane nanotubes between human lung cancer cells. *ACS Nano*, 2012, **6**(11): 10033-10041
- [14] Dubois F, Benard M, Jean-Jacques B, *et al.* Investigating tunneling nanotubes in cancer cells: guidelines for Structural and functional studies through cell imaging. *Biomed Res Int*, 2020, **2020**: 2701345
- [15] Jiang D, Chen F X, Zhou H, *et al.* Bioenergetic crosstalk between mesenchymal stem cells and various ocular cells through the intercellular trafficking of mitochondria. *Theranostics*, 2020, **10**(16): 7260-7272
- [16] D'Aloia A, Arrigoni E, Costa B, *et al.* RalGPS2 interacts with Akt and PDK1 promoting tunneling nanotubes formation in bladder cancer and kidney cells microenvironment. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(24): 6330
- [17] Kolba M D, Dudka W, Zareba-Kozioł M, *et al.* Tunneling nanotube-mediated intercellular vesicle and protein transfer in the stroma-provided imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(11): 817
- [18] Neu T R, Lawrence J R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol*, 2015, **23**(4): 233-242
- [19] Cardellini J, Balestri A, Montis C, *et al.* Advanced static and dynamic fluorescence microscopy techniques to investigate drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(6): 861
- [20] Mattiazzi U M, Styles E B, Verster A J, *et al.* High-content screening for quantitative cell biology. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(8): 598-611
- [21] Boutros M, Heigwer F, Laufer C. Microscopy-based high-content screening. *Cell*, 2015, **163**(6): 1314-1325
- [22] Hor J L, Germain R N. Intravital and high-content multiplex imaging of the immune system. *Trends Cell Biol*, 2022, **32**(5): 406-420
- [23] Fang Y, Zhang C, Wu T, *et al.* Transcriptome sequencing reveals key pathways and genes associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma A549 cells. *PLoS One*, 2017, **12**(1): 170609
- [24] Ljubojevic N, Henderson J M, Zurzolo C. The ways of actin: why tunneling nanotubes are unique cell protrusions. *Trends Cell Biol*, 2021, **31**(2): 130-142
- [25] Zurzolo C. Tunneling nanotubes: reshaping connectivity. *Curr Opin Cell Biol*, 2021, **71**: 139-147
- [26] Ottonelli I, Caraffi R, Tosi G, *et al.* Tunneling nanotubes: a new target for nanomedicine?. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(4): 2237
- [27] Rustom A, Saffrich R, Markovic I, *et al.* Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 2004, **303**(5660): 1007-1010
- [28] Sartori-Rupp A, Cordero C D, Pepe A, *et al.* Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of TNTs in neuronal cells. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 342
- [29] Benard M, Schapman D, Lebon A, *et al.* Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TnTs) using gCW STED and gconfocal approaches. *Biol Cell*, 2015, **107**(11): 419-425
- [30] Li M, Liu Y, Zhang W, *et al.* Tadalafil reverses the effect of three-dimensional cell culture system on stem cell features in A549 and SK-MES-1. *DNACell Biol*, 2021, **40**(7): 869-880
- [31] 叶庆元, 李子涵, 王娅铮, 等. 间充质干细胞来源凋亡囊泡缓解牙龈卟啉单胞菌脂多糖诱导下巨噬细胞促炎状态的研究. *中华口腔医学杂志*, 2021, **56**(8): 791-798
- Ye Q Y, Li Z H, Wang Y Z, *et al.* *Chinese Journal of Stomatology*, 2021, **56**(8): 791-798

Observation of Intercellular Tunnel Nanotubes by High Content Analysis System Combined With Laser Scanning Confocal Microscope*

PAN Peng-Yu¹⁾, ZHAO Qiu-Yu^{1,2)}, WANG Ying²⁾, WANG Jian-Bo²⁾, LI Xiang³⁾,
LIU Chun-Ying¹⁾, WANG Chun¹⁾**

¹⁾College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

²⁾Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

³⁾PerkinElmer, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective Tunneling nanotubes are membrane-tubule-like structures that exist between cells and have a direct long-distance biological information exchange function. Because the structure of TNTs is easily destroyed, exists for a short period of time and is unstable after formation, it is difficult to observe its dynamic formation and function. This study used the high content analysis system (HCA) combined with laser scanning confocal microscopy (LSCM) to try to observe the dynamic process of TNTs formation and its function of vesicular material transport. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 and cisplatin-resistant A549/DDP cells were labeled using fluorescent probes. Subsequently, HCA was used to observe the formation process of TNTs, LSCM to observe the three-dimensional structure of TNTs, and HCA combined with LSCM to analyze the vesicular material transport function of TNTs, respectively. **Results** TNTs structures can be formed between tumor cells of the same types (A549 or A549/DDP) or between different subtypes of tumor cells (A549 and A549/DDP). TNTs formed between A549/DDP cells were longer, thicker and had a higher formation index compared to A549 cells (the length, diameter and formation index of TNTs for A549 and A549/DDP were 14.71 μm , 2.27 μm , 4 and 25.44 μm , 2.59 μm , 11, respectively). TNTs are formed in two steps: first, two cell cytoplasmic membranes first come into contact with each other and then fuse, and as the two cells translocate in opposite directions, the fused regions of the membranes are continuously elongated and narrowed, resulting in the formation of TNTs; second, two cells extend filopodia-like membrane projections and fuse when they come into contact with each other's membrane projections, resulting in the formation of TNTs or one cell extends filopodia-like membrane projections and fuses after contacting the other cell membrane, thus forming TNTs. The transport of vesicles by TNTs is bidirectional. During transport, the rate and amounts of vesicles being transported vary depending on the stage of transport and the donor cell. The vesicular translocation from A549/DDP cells to A549 cells showed a fast initial rate and a slow terminal rate. A549 cells, as donor cells, transit vesicles to recipient A549/DDP cells in a higher number and proportion than A549/DDP as donor cells in the opposite direction. **Conclusion** The dynamic formation process and vesicular substance transport function of TNTs could be observed and analyzed by HCA combined with LSCM effectively.

Key words high content analysis, confocal laser scanning microscope, tunneling nanotubes, intercellular communication, intercellular transfer, neoplasm

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0453

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82174254, 81973735).

** Corresponding author.

Tel: 86-13842019144, E-mail: 1205055348@qq.com

Received: September 20, 2022 Accepted: November 10, 2022