

实验方法

细胞大型内吞囊泡快速标记方法的改进和应用

戎叶¹, 杜仲燕¹, 肖桂凤², 娄绘芳², 吴航军^{2,*}

¹浙江中医药大学中医药科学院, 杭州 311402; ²浙江大学医学院, 杭州 310058

摘要: 为了研究细胞内大型内吞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记录。该方法大大缩短了标记和洗脱的时间, 从而实现了对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和观察, 是研究细胞大型内吞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

Improvement and application of a fast labeling system for bulk internalized vesicles

RONG Ye¹, DU Zhong-Yan¹, XIAO Gui-Feng², LOU Hui-Fang², WU Hang-Jun^{2,*}

¹Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China; ²Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China

Abstract: To study trafficking of bulk internalized vesicles such as macropinosome and lysosome in live cells, 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 for bulk internalized vesicles, 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) 等大型内吞囊泡^[1-3], 首先需要对囊泡进行荧光标记。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, 待标记上后将胞外的染料进行洗脱, 然后在显微镜下进行动态观察记录, 从标记到洗脱、再到转移至显微镜下观察记录, 这个过程通常需要 10~30 min 的时间^[4]。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 CNS 的各个区域, 在 CNS 中占 10%~15%。

Received 2017-12-15 Accepted 2018-03-05

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. LQ17C050001), the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. 2015QNA7028), the Experimental Technology Research Program of Zhejiang University (No. SYB201510) and the Research Foundation of Zhejiang Chinese Medical University, China (No. 2018ZY36).

*Corresponding author. Tel: +86-571-88981963; E-mail: wuhangjun@zju.edu.cn

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看重要的作用^[5, 6]。静息状态下小胶质细胞的突起呈高度分枝状 (ramified)^[7]，然而，小胶质细胞的突起并不是完全静止的，它们高度活跃，不断地巡视周围的微环境^[8, 9]，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，小胶质细胞会发生活化^[6]，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^[9]。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^[10]。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^[4, 11]。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，建立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。该方法可以很好地应用于胞饮泡、溶酶体等大型内吞囊泡的动态研究。

1 材料

1.1 材料准备 实验动物：新生 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (出生后 0~2 天)，所有涉及动物的实验都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 CO₂ 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%

FBS，保存在 4 °C，使用前在 37 °C 水浴预热。ATP (Sigma 公司, 美国)：用 HBSS 溶解配制成 10 mmol/L 的储液 (其中 ATP 需用 NaOH 调 pH 值到 7.3)，分装后保存于 -80 °C 备用。50 × PDL：用灭菌的双蒸水溶解配制成 5 mg/mL 的储液，分装后保存在 -20 °C。ECS：140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L MgCl₂，用 NaOH 调 pH 值到 7.3，保存在 4 °C，使用前按比例加入 10 mmol/L D- 葡萄糖并水浴预热到 37 °C。

1.3 仪器设备 细胞培养相关耗材：培养皿 (Corning 公司, 美国)，75-cm² 培养瓶 (Corning 公司, 美国)，离心管 (1.5 mL, Axygen 公司, 美国；15 mL 和 50 mL, Corning 公司, 美国)，枪头 (Axygen 公司, 美国)。细胞培养相关仪器设备：移液器 (Eppendorf 公司, 德国)，解剖器械 (苏州六六视觉科技股份有限公司)，解剖显微镜 (Olympus 公司, 日本)，超净台 (苏州净化设备有限公司)，CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Scientific 公司, 美国)，离心机 (Eppendorf 公司, 德国)，水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司)。细胞囊泡标记相关耗材及设备：毛细玻璃管 (外径：1.0 mm, 内径：0.5 mm, 有芯, Sutter Instrument 公司, 美国)，电极拉制仪 (Sutter Instrument 公司, 美国)，显微控制仪 (NARISHIGE 公司, 日本)，压力给药系统 (Parker 公司, 美国)，电刺激器 (Nihon Kohden 公司, 日本)，显微操作控制器 (Siskiyou 公司, 美国)，倒置显微成像系统 (Olympus, 日本)，显微镜专用 CO₂ 活细胞培养系统 (Tokai Hit 公司, 日本)。图像处理软件：Image Pro Plus 6.0 软件 (Media Cybernetics 公司, 加拿大)，ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>, 美国)，Imaris 软件 (Bitplane 公司, 瑞士)。

1.4 细胞培养及纯化 小胶质细胞培养方法参考 Nakajima 等^[12] 的方法，并略作修改，具体描述见参考文献^[10]。前期准备和培养过程大概需要一周的时间，通过这种方法可以获得高纯度的小胶质细胞，通过免疫染色的方法验证，其纯度高于 95%。取新生 SD 大鼠 (出生后 0~2 天) 大脑皮层^[13]。用镊子将皮层剪成小块，经消化、重悬后，接种于 MEM (含 10% FBS) 培养液中。培养 6~8 d 后小胶质细胞成熟，此时，在相差显微镜下观察，星形胶质细胞铺满瓶底，呈平滑丝状，上层可见圆形饱满、明亮、贴壁性弱的细胞，部分已经悬浮在培养液中，这些细

胞大部分被鉴定为小胶质细胞；轻轻地摇动培养瓶使细胞脱落，收集上清，经离心、重悬后，种子于 $8\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ 盖玻片上备用，每玻片约 $50\text{ }\mu\text{L}$ 悬液，细胞密度约为 4×10^4 个细胞/ cm^2 。

1.5 统计学处理 本文中的数值均以 mean \pm SD 的形式给出，并根据不同实验要求对数据进行成对或组间 *t* 检验，*P* < 0.05 时认为存在统计学差异。

2 方法和结果

2.1 大型内吞囊泡标记方法的改进和优化

为了标记和研究细胞大型内吞囊泡的动态变化，我们借鉴了诱导神经元轴突转向的方法^[14, 15]，以体外原代培养的小胶质细胞为载体，通过 ATP 诱导小胶质细胞产生溶酶体、胞饮泡，利用荧光成像技术对标记过程及囊泡动态变化进行观察记录。基本实验步骤如下。

(1) 用电极拉制仪按四步法将毛细玻璃管制备成微电极(图 1A)，37 °C 预热 L15 或 ECS。

(2) 打开显微镜专用的 CO₂ 活细胞培养系统，调节主板温度 45 °C，镜头加热器温度 37 °C，约 30 min 可以使体系温度达到稳定状态(考虑到该实验无法使用上盖加热，故适当调高主板温度到 45 °C

来确保细胞的温度大于 30 °C)。

(3) 仪器准备：首先，将气瓶(压缩空气或氮气)连接到压力给药系统(Picospritzer III)上，调节输出气压为 3 psi；其次，设置电刺激器的参数(DURATION : 20 ms, INTERVAL : 500 ms, 对应给药参数为 2 Hz, 20 ms 给药时程)，并将其“OUTPUT”信号输出连接到 Picospritzer III 的 EXTERNAL INPUT BNC 接口；然后，将 Picospritzer III 的电极连接杆固定到显微操纵器(Micromanipulator)上(图 1B)。

(4) 在微电极内灌入 ATP (1 mmol/L)，约 2/3 长度即可，注意消除气泡。同时在另一根微电极中灌入标记荧光染料(如溶酶体活细胞标记物 Lyso Tracker Red, 50 nmol/L，胞饮泡标记荧光染料 Dextran, 1 μg/μL)。

(5) 将纯化得到的小胶质细胞转移到含有 1.5 mL L15 或 ECS 的 chamber 上，液体表面覆盖甲基硅油，以维持实验过程中温度和渗透压的稳定。

(6) 用显微操纵器将微电极移到细胞层上面，电极尖端位于视野的中间。

(7) 选用 60 倍水镜(Olympus, UPLSAPO 60×W NA: 1.2)，对明场和相应荧光通道进行同步成像，

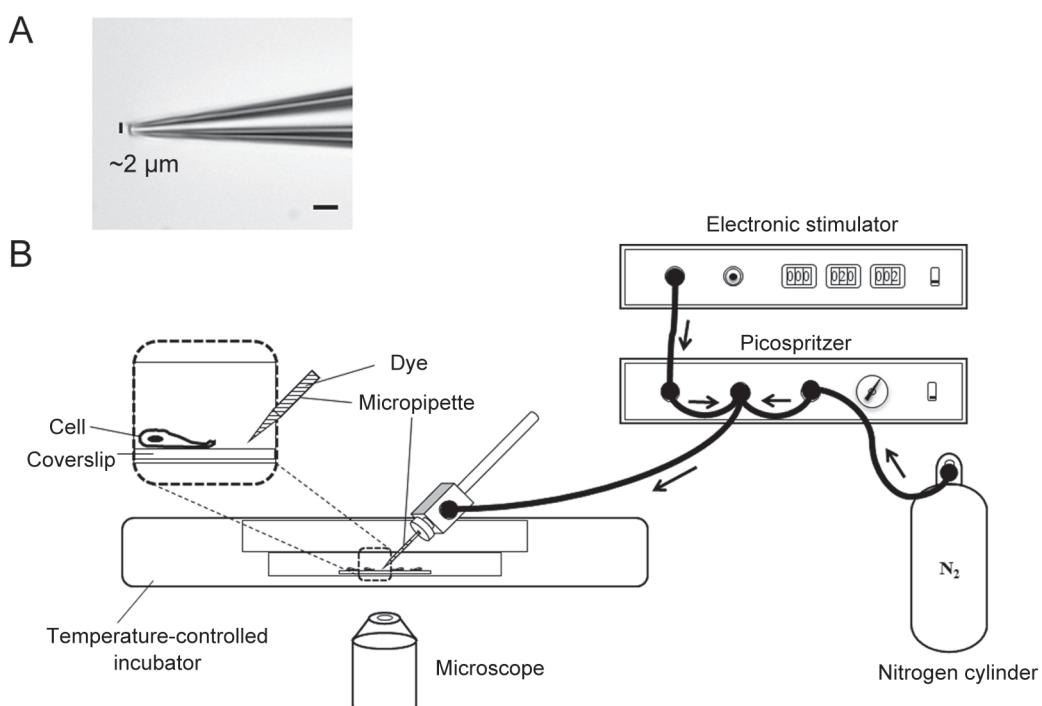


图 1. 囊泡标记装置示意图

Fig. 1. Equipment setup for the bulk internalized vesicle labeling assay using a confocal imaging system. Image in A shows the tip of a micropipette. Scale bar, 5 μm B: Schematic diagram of the vesicle labeling assay system.

图像尺寸 1024×1024 pixels, 采图间隔 20 s, 总时间 50 min。打开刺激器开关, 释放标记荧光染料, 待染料浓度稳定后, 释放 ATP 诱导细胞, 观察并记录小胶质细胞囊泡产生及动态变化过程。

(8) 获取图像后, 用 ImageJ 和 Imaris 等软件对小胶质细胞胞饮泡的动态变化过程进行追踪和分析。

通过以上方法进行囊泡标记, 不仅大大缩短了标记后洗脱的时间, 可以将成像之前的准备时间缩短 30 min 左右, 而且在标记的全过程中都可以通过显微镜来观察和记录细胞及细胞器的动态变化。

2.2 诱导及标记体系稳定性检测

微电极释放 ATP 或囊泡标记染料后, 在很短的

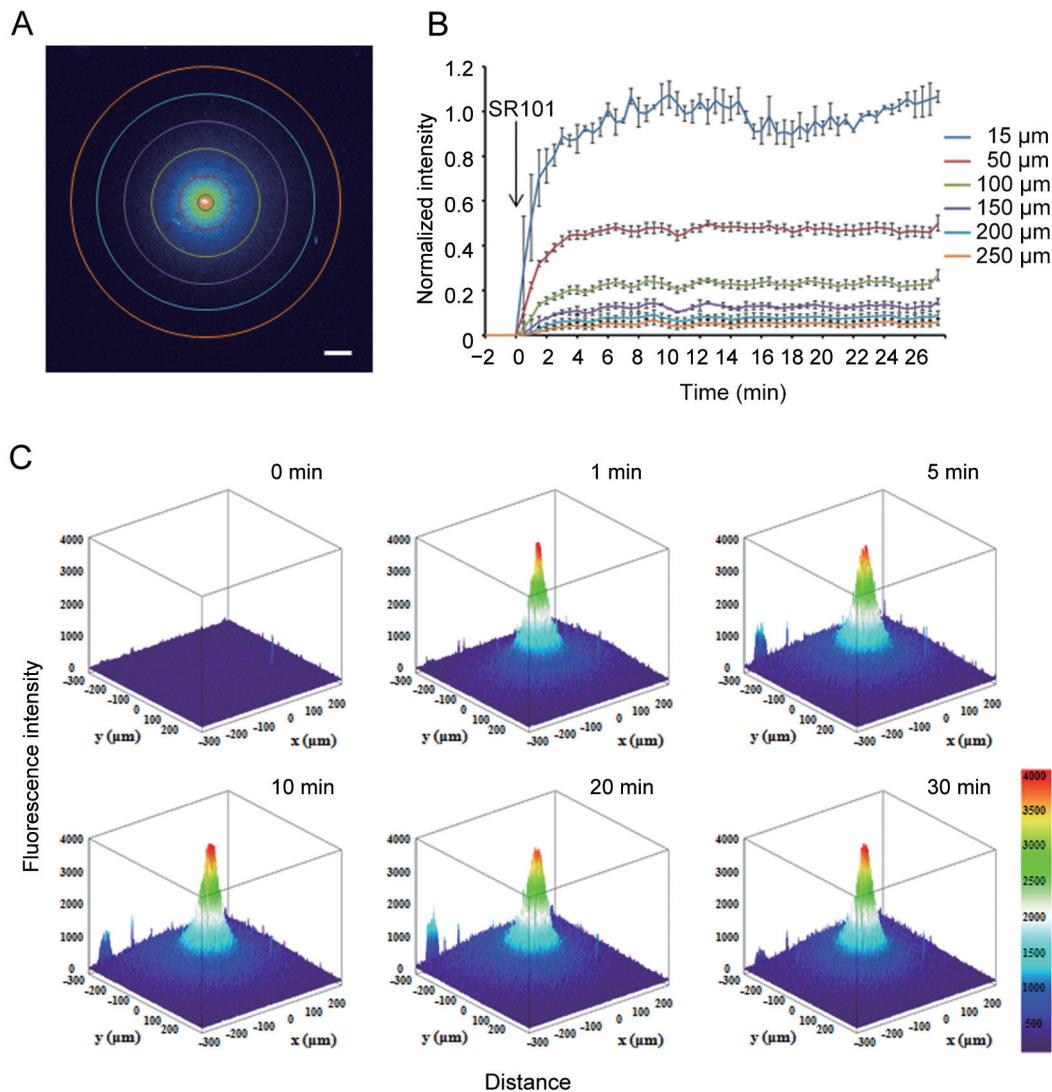


图 2. 通过微电极释放的染料Sulforhodamine 101扩散特性

Fig. 2. Diffusion profile of Sulforhodamine 101 (SR101) when ejected from the tip of a micropipette. A: Schematic of fluorescence detection position. Circles in different colors denote different distances from the tip of the micropipette. Scale bar, 50 μm . B: Quantitative analysis of SR101 fluorescence intensities. Fluorescence intensities at three different points on each circle were collected and used for data analysis. Data were normalized to the average fluorescence intensity measured at the position 15 μm from the source 10 min after SR101 ejection. The arrow marks the time point when the pulsatile application of SR101 was started. Error bars indicate SEM. C: The diffusion profile of SR101 around ~ 300 μm from the micropipette tip at different time points is illustrated in a three dimensional surface plot, which was generated using ImageJ with the Interactive 3D Surface Plot plugin. X axis and Y axis indicate distance from the tip of micropipette. Note that the diffusion profile of SR101 becomes relatively stable within 5 min after its application and keeps for more than 30 min.

时间内就可以形成稳定的梯度浓度。我们选用一个分子量与 ATP 相近的荧光染料 (Sulforhodamine 101, SR101) 来模拟 ATP 扩散的过程及浓度梯度的变化 (图 2)。用图像处理软件 ImageJ 将 SR101 在不同时间的浓度分布状况以三维曲面图形形式展现出来, 从图 2 中结果可见, SR101 在 5 min 内就可以形成稳定的浓度梯度, 并且该状态可维持超过 30 min (可达 2 h), 距离电极尖端 100 μm 的位置, SR101 的浓度降低了约 200 倍。

2.3 小胶质细胞迁移过程中胞饮泡的标记及追踪

应用本研究中建立的囊泡标记及实时成像方法, 我们研究了小胶质细胞迁移过程中胞饮泡及溶酶体的标记及动态变化过程。胞饮泡可以用其特异性的荧光染料 Dextran 标记。将 Alexa Fluor 488 Dextran (3 000 MW, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 绿色, AF3K) 和 Texas Red Dextran (70 000 MW, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 红色, TR70K) 的混合物灌入玻璃微电极, 同时用 ATP 诱导小胶质细

胞迁移, 可以观察到细胞内形成一些巨大的囊泡, 这些囊泡大小不一, 在相差显微镜下呈现清晰明亮的形态 (图 3A), 并可以被胞饮泡的特异性标记物 Dextran 染色 (图 3B), 我们在另一部分的工作中^[4], 证明了通过 ATP 诱导小胶质细胞产生的囊泡, 能被 Dextran 染料标记, 但不能被胞吞囊泡标记物 latex beads 标记^[16, 17]。因此, 可以判断这些明亮的巨大囊泡为胞饮泡, 这提示在 ATP 诱导的小胶质细胞迁移过程中细胞内会发生胞饮作用并形成大量的胞饮泡。

胞饮泡进入小胶质细胞后会有不同的动态变化, 并逐步变小。在胞饮泡中可以分离出小的囊泡 (图 3C), 新形成的胞饮泡有时会与原有的胞饮泡相互作用, 交换内容物 (图 3C), 经过这些动态变化后, 几乎所有胞饮泡都会变小并最终消失 (图 3C), 利用图像分析软件 Imaris, 我们对胞饮泡的横截面积进行了统计分析, 发现胞饮泡形成后约 10

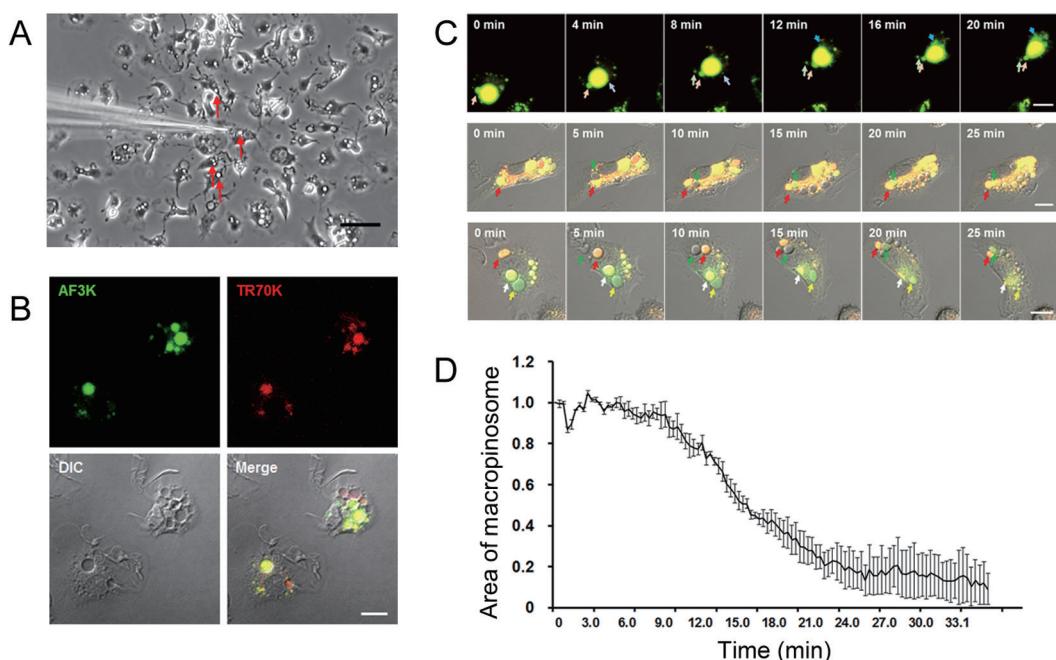


图 3. 小胶质细胞迁移过程中的胞饮泡

Fig. 3. ATP-induced macropinosome during microglial migration. A: Representative phase contrast image of microglia during ATP-induced microglial migration. Note that there were some refringent vesicles in microglia, and red arrows indicate some of the representative ones. Scale bar, 50 μm . B: Vesicles formation during ATP-induced microglial migration can be labeled by macropinosome markers, e.g. Dextran. Example images showing ATP-induced macropinocytosis labeled by Alexa Fluor 488 Dextran (3 000 MW, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; green, AF3K) and Texas Red Dextran (70 000 MW, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; red, TR70K). Scale bar, 10 μm . C: Time series showing different patterns of macropinosomes trafficking. Arrows in top panels indicate small vesicles fission from a macropinosome. Red and green arrows in middle and bottom panels indicate interaction of two macropinosomes after their formation. White and yellow arrows in bottom panels indicate maturation of macropinosomes. Scale bar, 10 μm . D: Quantification of macropinosomes area after entering into microglia.

min 开始快速变小, 这个过程持续约 15 min, 最后逐渐消失 (图 3D)。

此外, 我们用溶酶体特异性的荧光标记物 Lysotracker Red 标记溶酶体, 然后在 ATP 的作用下同步记录 50 min 内溶酶体的动态变化, 经图像软件 Imaris 处理后, 我们可以重现单个溶酶体的运动轨迹^[18]。

除了胞饮泡的标记物 Dextran、溶酶体的特异性荧光标记物 Lysotracker Red, 其他荧光染料如 CellMask (图 4)、MitoTracker 和 ER-Tracker (分别

标记细胞膜、线粒体和内质网)等都可以用来标记相应的细胞器, 从而追踪该细胞器在细胞迁移过程中的动态变化。此外, 结合钙成像技术, 我们还可以动态监测细胞迁移过程中的钙信号变化^[10]。

3 讨论

通过活细胞成像技术记录细胞内囊泡等动态变化程度是研究细胞内部结构的特性和功能的最直接和有效的方式。实施活细胞成像之前, 需要对研究的囊泡或细胞器进行特异性的活细胞标记, 常规方法通过细胞孵育染料的方式进行标记, 标记一段时间后需将染料进行洗脱, 再转移到显微镜下观察、成像, 从标记、洗脱到成像, 需要经过较长的时间^[1–4], 且这一阶段无法被观察和记录, 无法真实反映细胞内的快速动态变化, 从而限制了对囊泡动态变化的研究。因此缩短标记、洗脱及转移到显微镜下的时间将成为追踪囊泡动态变化过程的关键因素。本研究借鉴诱导神经元轴突诱导转向的方法^[14, 15], 建立了一套快速标记实时成像的实验体系。通过玻璃微电极释放微量荧光染料, 在局部快速形成稳定的标记物和诱导物的稳定浓度梯度, 从而实现标记。由于通过玻璃微电极释放的量非常少, 停止释放后, 荧光染料和诱导物被快速 (约 1 min) 稀释, 从而无需经历 10~30 min 的洗脱步骤, 整个过程都在荧光显微镜下进行, 可以通过显微镜实时记录整个标记过程及标记后囊泡的动态变化。除了溶酶体和胞饮泡等囊泡, 该系统也可以广泛应用于细胞内多种细胞器的动态研究, 为细胞生物学研究提供了一套实用而高效的实验体系。当然, 本方法也存在一定的局限性, 如染料的浓度会随着与电极尖端的距离增大而降低, 会导致部分细胞染料标记浓度的不一致, 因此, 在应用此方法时应特别注意。在对溶酶体、胞饮泡、胞吞泡进行动态研究时, 应尽量选取距离电极较近且距离一致的细胞进行分析。在后续的研究中我们将进一步探索本方法的应用, 并对其做进一步的改进。

参考文献

- Yoshida S, Pacitto R, Yao Y, Inoki K, Swanson JA. Growth factor signaling to mTORC1 by amino acid-laden macropinosomes. *J Cell Biol* 2015; 211(1): 159–172.
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 1996; 135(5):

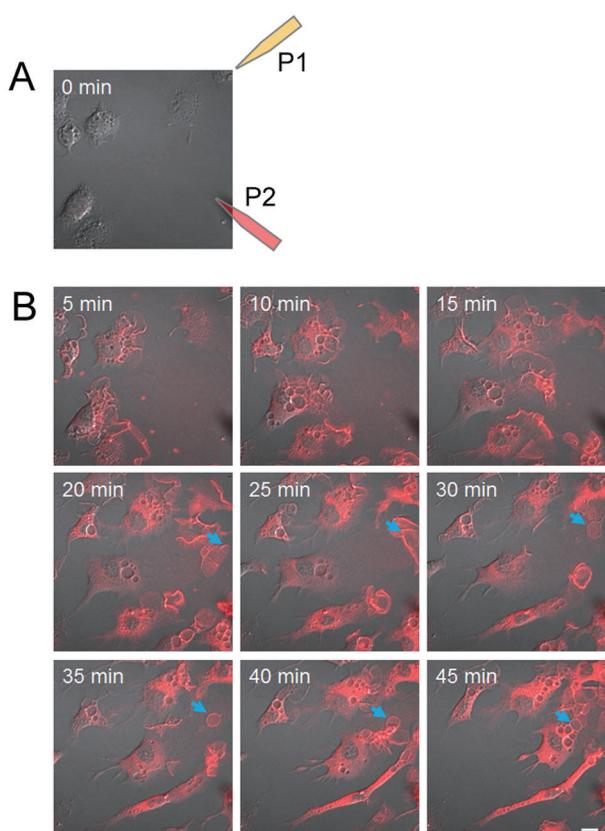


图 4. 小胶质细胞迁移过程中细胞膜的标记

Fig. 4. Labeling of cell membrane during microglial migration. Representative time-lapse images of microglia before (A, 0 min) and after (B) exposure to an ATP gradient created by pulsatile application of 1 mmol/L ATP in the micropipette (positioned at the right top of the images, P1 at different time points as indicated). Cells were labeled with 5 μg/μL CellMask (during the first 10 min) applied through a micropipette positioned at the right bottom of the images (P2). The blue arrow indicates the formation of a typical macropinosome during microglial migration induced by ATP. Cell ruffle closes to form a circular vesicle at leading edge of microglia and then moves towards the nucleus. Scale bar, 10 μm.

- 1249–1260.
- 3 Zhang ZJ, Chen G, Zhou W, Song AH, Xu T, Luo QM, Wang W, Gu XS, Duan SM. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 2007; 9(8): 945–953.
 - 4 Li HQ, Chen C, Dou Y, Wu HJ, Liu YJ, Lou HF, Zhang JM, Li XM, Wang H, Duan S. P2Y4 receptor-mediated pinocytosis contributes to amyloid beta-induced self-uptake by microglia. *Mol Cell Biol* 2013; 33(21): 4282–4293.
 - 5 Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2011; 14(10): 1227–1235.
 - 6 Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Neuron* 2013; 77(1): 10–18.
 - 7 Milner R, Campbell IL. The extracellular matrix and cytokines regulate microglial integrin expression and activation. *J Immunol* 2003; 170(7): 3850–3858.
 - 8 Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005; 308(5726): 1314–1318.
 - 9 Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 2005; 8(6): 752–758.
 - 10 Dou Y, Wu HJ, Li HQ, Qin S, Wang YE, Li J, Lou HF, Chen Z, Li XM, Luo QM, Duan SM. Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res* 2012; 22(6): 1022–1033.
 - 11 Chen C, Li HQ, Liu YJ, Guo ZF, Wu HJ, Li X, Lou HF, Zhu L, Wang D, Li XM, Yu L, Cao X, Lu L, Gao Z, Duan SM. A novel size-based sorting mechanism of pinocytic luminal cargoes in microglia. *J Neurosci* 2015; 35(6): 2674–2688.
 - 12 Nakajima K, Shimojo M, Hamanoue M, Ishiura S, Sugita H, Kohsaka S. Identification of elastase as a secretory protease from cultured rat microglia. *J Neurochem* 1992; 58(4): 1401–1408.
 - 13 Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR. Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* 2007; 2(5): 1044–1051.
 - 14 Guan CB, Xu HT, Jin M, Yuan XB, Poo MM. Long-range Ca²⁺ signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by Slit-2. *Cell* 2007; 129(2): 385–395.
 - 15 Peng H, Kang N, Xu J, Stanton PK, Kang J. Two distinct modes of exocytotic fusion pore expansion in large astrocytic vesicles. *J Biol Chem* 2013; 288(23): 16872–16881.
 - 16 Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(8): 639–649.
 - 17 Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 857–902.
 - 18 Wu HJ, Liu YJ, Li HQ, Chen C, Dou Y, Lou HF, Ho MS, Li XM, Gao Z, Duan S. Analysis of microglial migration by a micropipette assay. *Nat Protoc* 2014; 9(2): 491–500.