

运用活细胞成像和细胞阻抗技术实时监测细胞凋亡

作者

Jing Zhang, Nancy Li,
Yama Abassi 和
Brandon J. Lamarche
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣地亚哥

Grace Yang, Jiaming Zhang
和 Peifang Ye
安捷伦生物（杭州）有限公司
中国杭州

前言

细胞凋亡（也称为细胞程序性死亡）在胚胎发育和伤口愈合等多种生物过程中发挥着重要作用，它在进化上高度保守，能使多细胞生物在不引发炎症反应的情况下消灭细胞。虽然这种细胞清除机制的缺陷可能会引发癌症^[1]，但过度活跃的细胞凋亡与红斑狼疮^[2]和帕金森^[3]等疾病密切相关。细胞凋亡一旦被内在或外在刺激触发，就会引起一系列生化和形态学改变，包括细胞骨架降解和染色质裂解到蛋白质交联和磷脂易位^[4]。这些现象的最终结果是细胞分裂成凋亡小体，并迅速被巨噬细胞吞噬^[5]。

虽然可以使用多种基于生物标志物的检测方法追踪细胞凋亡，但这些方法通常需要多个手动操作步骤，并且只能获得终点检测结果。而使用 Agilent xCELLigence RTCA eSight 系统，我们只需一个细胞接种步骤和一个药物添加步骤，便可连续多天持续监测药物介导的细胞凋亡。eSight 微孔板底部嵌有阻抗生物传感器，可以直接客观的评估细胞数量、细胞大小、细胞粘附能力、细胞屏障功能等，从而可以对细胞凋亡过程早期（细胞皱缩）至晚期（碎裂）的细胞行为进行高灵敏度的定量追踪和分析。同时，eSight 可在明视场和三个荧光通道（红、绿、蓝）中采集活细胞图像，提供凋亡过程的正交读数结果。通过结合实时阻抗监测（简单、分析灵敏度高且客观）和活细胞成像（读数的特异性）的优点，eSight 在不增加工作量的情况下为凋亡分析提供了更丰富的信息。重要的是，表明 eSight 可以同时为凋亡研究提供初步结果和进行确认性分析。

检测原理

eSight 系统的核心是一个专用微电子检测微孔板。所有 96 个孔的玻璃底面都嵌入了微金电极生物传感器阵列，可以连续、非侵入性地监测细胞阻抗。如图 1 下方所示，细胞与这些生物传感器的粘附阻碍了微电流的流动，可提供细胞数量、细胞大小、细胞-基底粘附强度和细胞-细胞相互作用强度（即屏障功能）的高灵敏度读数。以用户定义的时间分辨率记录细胞阻抗信号（如每分钟、每小时一次），并使用无单位参数细胞指数 (Cell Index) 进行记录。如果出现细胞凋亡相关的生化和细胞变化（细胞皱缩、脱落），则可以轻松检测到阻抗信号下降。eSight 可以利用位于每个孔中生物传感器阵列中央的观察窗口，通过明视场和三个荧光通道（红、绿、蓝）进行活细胞成像来追踪细胞健康状况和行为（图 1）。安捷伦提供的 eSight 配套试剂包括用于构建稳定表达核定位荧光蛋白（红色、绿色、蓝色）的细胞系的慢病毒，以及用于可视化活细胞和死亡细胞的染料（红色、绿色）。在细胞凋亡研究方面，安捷伦还开发了膜联蛋白 V 试剂（偶联红色或绿色染料），用于易位的磷脂酰丝氨酸的可视化，并开发了观察 caspase 3 激活的试剂。后者包括典型

的 caspase 3 识别基序 — DEVD 四肽，它与一个绿色荧光基团相连接。尽管这种可渗透细胞膜的底物本质上并无荧光，且

不与 DNA 结合，但 DEVD 肽的裂解会释放出荧光团，荧光团随后可与 DNA 结合并发出荧光。

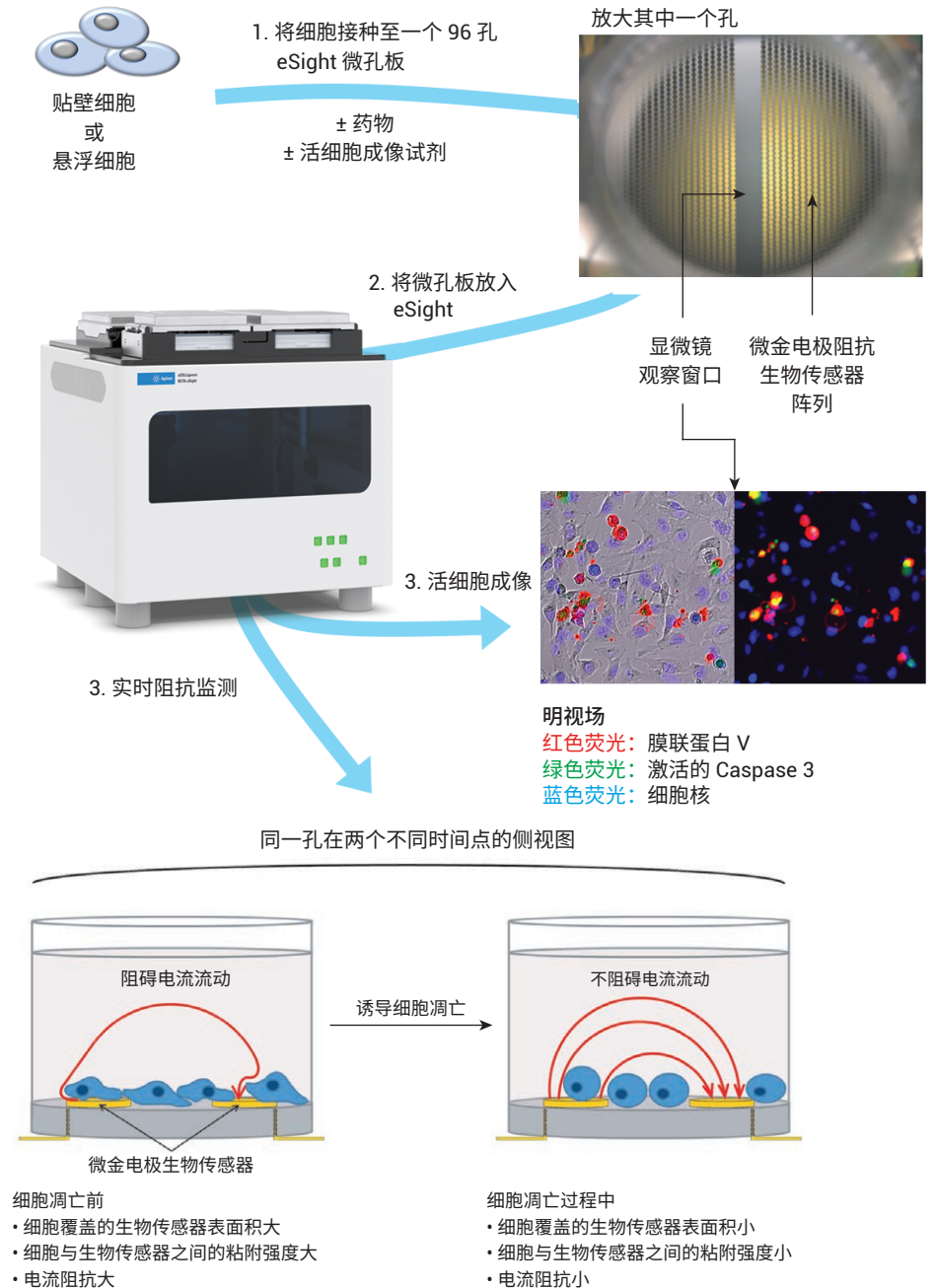


图 1. Agilent eSight 工作流程

材料与方法

用含有 10% 热灭活 FBS (康宁, 货号 35016CV) 的 F-12K 培养基 (ATCC; 货号 30-2004) 在 37 °C/5% CO₂ 条件下进行细胞培养和检测。每 15 分钟测量一次阻抗, 每小时采集一次图像。对每个孔, 分别采集四个通道的图像 (明场、红色、绿色和蓝色)。曝光时间如下: 红色 (300 ms), 绿色 (300 ms), 蓝色 (80 ms)。使用 Agilent eLenti Blue (货号 8711012) 转导 A549 细胞 (ATCC, 货号 CCL-185), 感染复数为 1, 获得稳定表达核定位蓝色荧光蛋白 (BFP) 的 A549-Blue 细胞系。感染后第 2 天至第 11 天, 向生长培养基中加入 1 µg/mL 嘌呤霉素, 以筛选转导子。为了实时观察激活的 caspase 3, 向生长培养基中添加 Agilent eCaspase 3 NucView 488 (货号 8711005), 浓度为 5 µmol/L。为了实时观察易位的磷脂酰丝氨酸, 向生长培养基中添加 Agilent eAnnexin V Red (货号 8711007), 浓度为 0.25 µg/mL。还使用了 Agilent E-Plate VIEW 微孔板 (货号 00300601030)。分别将 MG132 (Tocris; 货号: 1748/5) 和十字孢碱 (Calbiochem; 货号: 569396) 原液溶解于 DMSO 溶液中。

结果

利用实时阻抗与活细胞成像多重分析追踪细胞死亡过程

将 A549-Blue 细胞 (如上所述) 接种到 E-Plate VIEW 中, 接种密度为 10000 个细胞/孔。经过第一天的增殖, 细胞在生物传感器阵列表面的覆盖度不断增大, 导

致阻抗信号稳步上升 (图 2A 和图 2B)。如果不加以干预, 细胞将继续增殖至融合, 完全覆盖生物传感器阵列表面, 并产生稳定的阻抗信号。在第 25 小时添加蛋白酶体抑制剂 MG132 或泛激酶抑制剂十字孢碱, 阻抗信号随时间和剂量显著下降。

每种化合物的药物诱导反应的动力学, 以及阻抗曲线的整体形状截然不同。这与近 10 年中大量文献报道的一致, 这些文献表明阻抗响应对于每种类型的作用机制来说都是不同的^[6-8]。虽然 MG132 和十字孢碱都能诱导细胞凋亡, 但它们在细胞凋亡的过程中会引起不同的细胞行为, 将活细胞成像与实时阻抗测量相结合时能够清楚观察到这一现象。

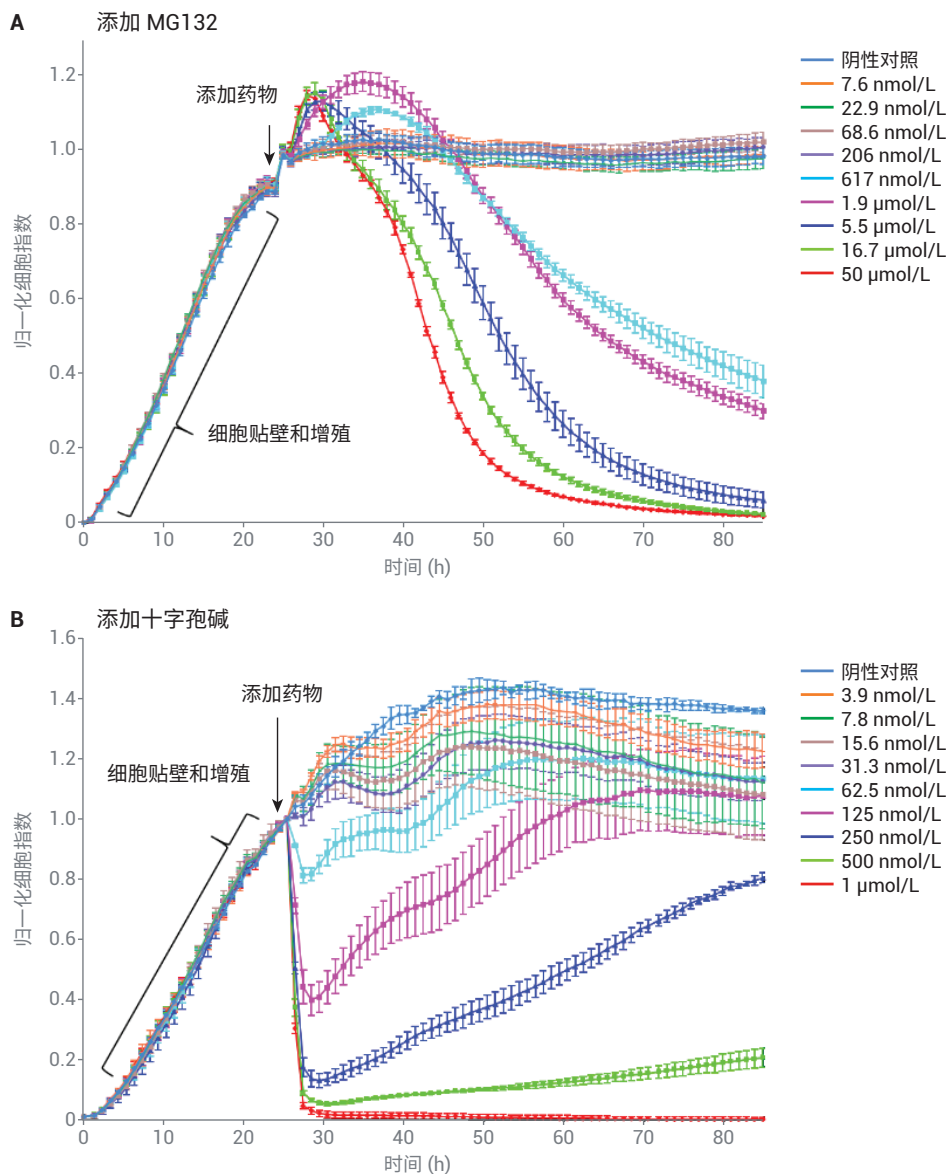


图 2. 利用细胞阻抗实时追踪药物诱导的细胞凋亡。向 A549-Blue 细胞中滴加 MG132 (A) 或十字孢碱 (B)。阴性对照为 DMSO。误差线表示样品三次重复分析的标准偏差。虽然每 15 分钟测量一次阻抗, 但为了防止相邻时间点的误差线重叠, 这里的数据点仅为每小时的数据

虽然 A549-Blue 细胞在第 26 小时已经覆盖了孔底部的大部分,但在没有药物干扰的情况下,它们将继续增殖 50 小时,使细胞以更高的密度聚集在一起(图 3A)。与此相对应的是,阻抗信号在大约 30 小时后开始趋于平稳,而蓝色细胞核总数持续增加,直到约 80 小时(图 3A)。当用四个最高浓度的 MG132 (1.9、5.5、

16.7 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 A549-Blue 细胞时,蓝色细胞核总数随时间减少,与阻抗下降具有良好的相关性(图 3B;只展示了 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的数据)。相比之下,用四个最高浓度的十字孢碱 (0.125、0.250、0.500 和 1 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞,在最初几分钟阻抗信号急剧下降,但在随后的 60 小时蓝色细胞核的数量变化不

大(图 3C;只展示了 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的数据)。这与它使细胞失水的特性相一致^[9],在添加十字孢碱一小时后,A549-Blue 细胞严重皱缩,以至于几乎无法观察到它们的细胞质,只剩下蓝色细胞核。尽管随着时间的推移,这些细胞核缩小并开始聚集在一起,但它们基本上保持完整,这就解释了为什么蓝色细胞核的数量在图 3C 中

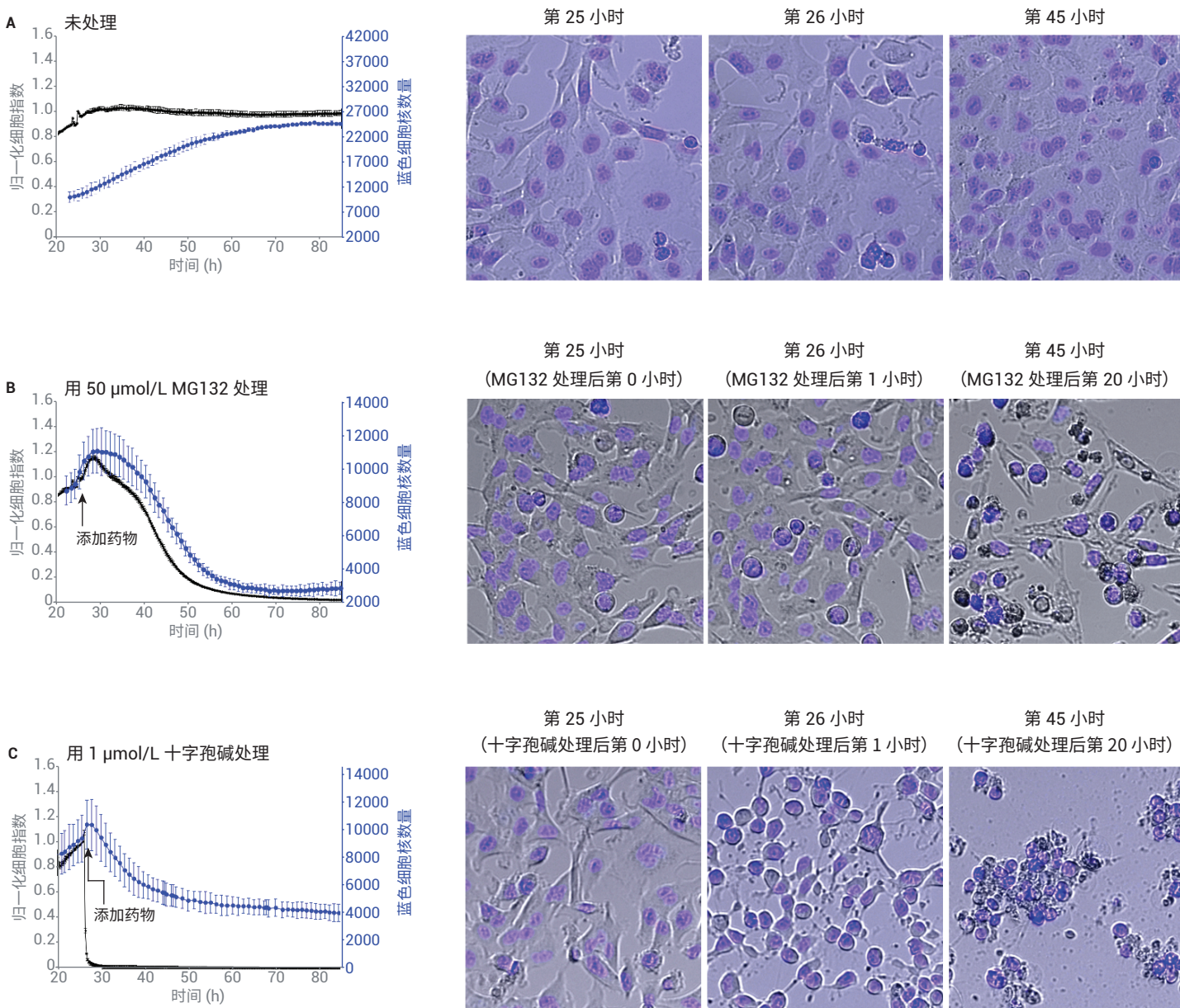


图 3. 通过阻抗实时检测到的现象与活细胞成像显示的特定细胞行为的相关性。用 DMSO (未处理; A)、50 $\mu\text{mol/L}$ MG132 (B) 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 十字孢碱 (C) 处理 A549-Blue 细胞后,追踪阻抗信号和蓝色细胞核数量。展示了药物处理前和处理后第 1 小时和第 20 小时的代表性图像。误差线表示样品三次重复分析的标准偏差

保持相对稳定。与单独使用这两种技术相比，如上所述将阻抗与成像相结合可以清楚地为药物介导的 A549 细胞死亡提供更完整和详细的信息。除了简单的细胞计数外，我们接下来探讨了与凋亡通路有关的生化现象的动力学。

同时从 5 个不同的角度追踪 MG132 介导的细胞凋亡过程

除了阻抗和蓝色细胞核计数外，追踪 MG132 诱导的细胞凋亡的方法还包括细胞汇合率、caspase 3 激活（导致细胞发出绿色荧光）和磷脂酰丝氨酸易位（导致细胞发出红色荧光）。如图 4 所示，药物诱导的阻抗下降与这些凋亡特异性标记物的时间积累密切相关。图上的白色粗体箭头显示在第 20 小时和第 40 小时出现了大的细胞膜泡，其外层含有磷脂酰丝氨酸。

接下来，使用每个基于图像的读数绘制出 A549-Blue 细胞对 MG132 的连续响应曲线。蓝色细胞核计数（图 5A）显示了对药物浓度的依赖性，这与图 2A 中所示的阻抗响应相关性很好。尽管存在大量凋亡反应，但在整个分析过程中，细胞汇合率从未低于 50%（图 5B）。因为这与在体内环境中凋亡细胞及其碎片通过吞噬作用被清除不同，在体外培养中，大量凋亡细胞继续占据着微孔底部（图 3B）。高浓度 MG132 导致阻抗信号降至零（图 2A），

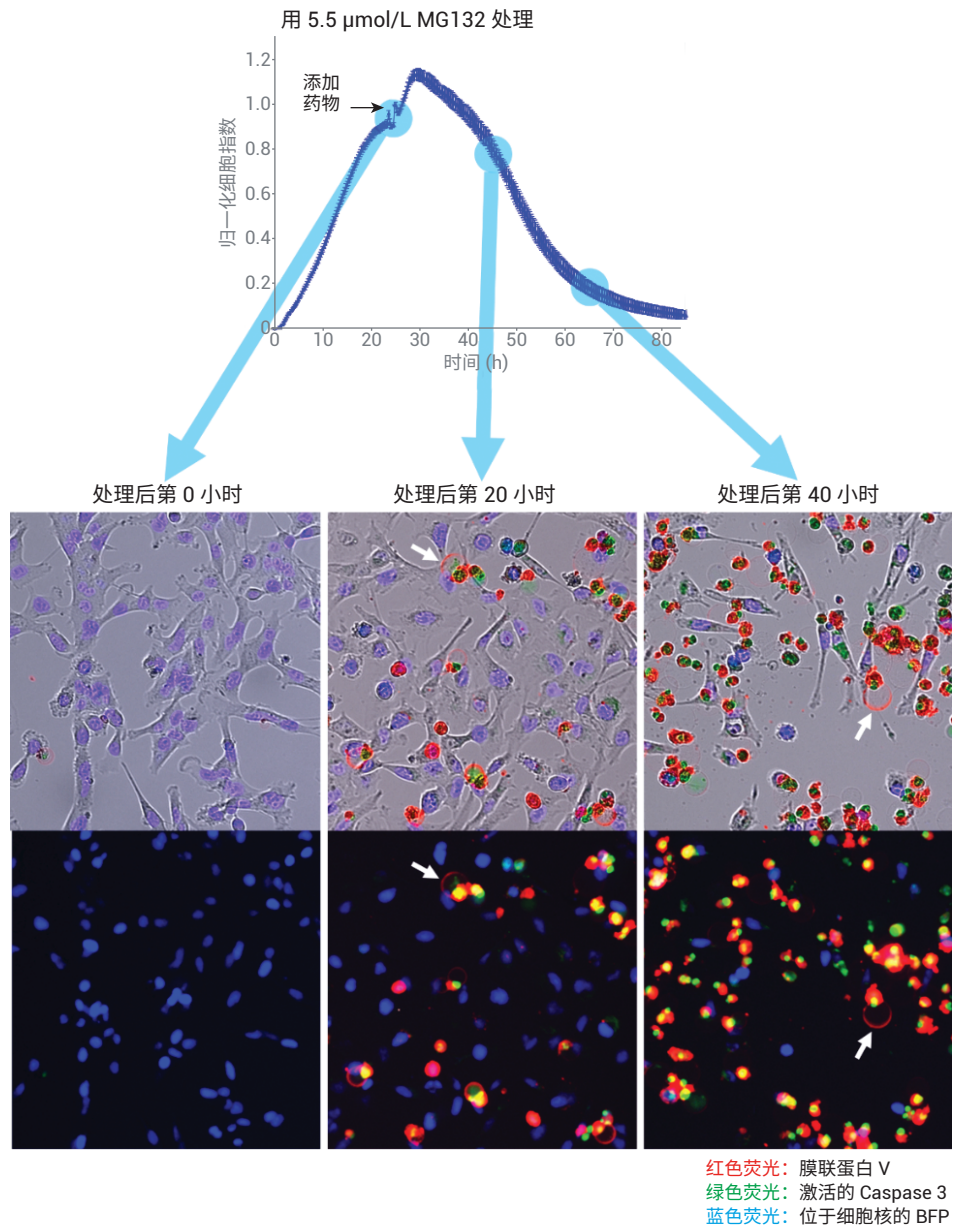


图 4. 用活细胞图像证实阻抗响应。图像展示了用 5.5 $\mu\text{mol/L}$ MG132 处理 A549-Blue 细胞第 20 小时和第 40 小时的凋亡情况。白色箭头指示出现了大的细胞膜泡，其外层含有磷脂酰丝氨酸

而细胞汇合率从未降至 50% 以下，说明残余细胞不再附着在孔板底部。caspase 3 信号 (图 5C) 和膜联蛋白 V 信号 (图 5D) 随着时间的推移而增加，显示出对 MG132 具有明显的浓度依赖性。将接种的细胞数量、生长速度以及显示凋亡标记物的细胞百分比 (图 4) 考虑在内，图 5 中的

输出数据与预期一致。为了比较不同凋亡现象的相对速率和相对丰度，将阻抗响应与三种不同的基于图像的读数共同绘图 (图 6)。如预期一样，蓝色细胞核数量开始减少的时间 (加入 MG132 后约 10 小时) 与能够检出 caspase 3 激活和磷脂酰丝氨酸易位的时间相同。在加入药

物后的前 20 个小时，显示 caspase 3 和磷脂酰丝氨酸信号的细胞数量几乎相同，但在随后的 40 个小时，caspase 3 激活的细胞数量超出磷脂酰丝氨酸易位的细胞数量约 20%。

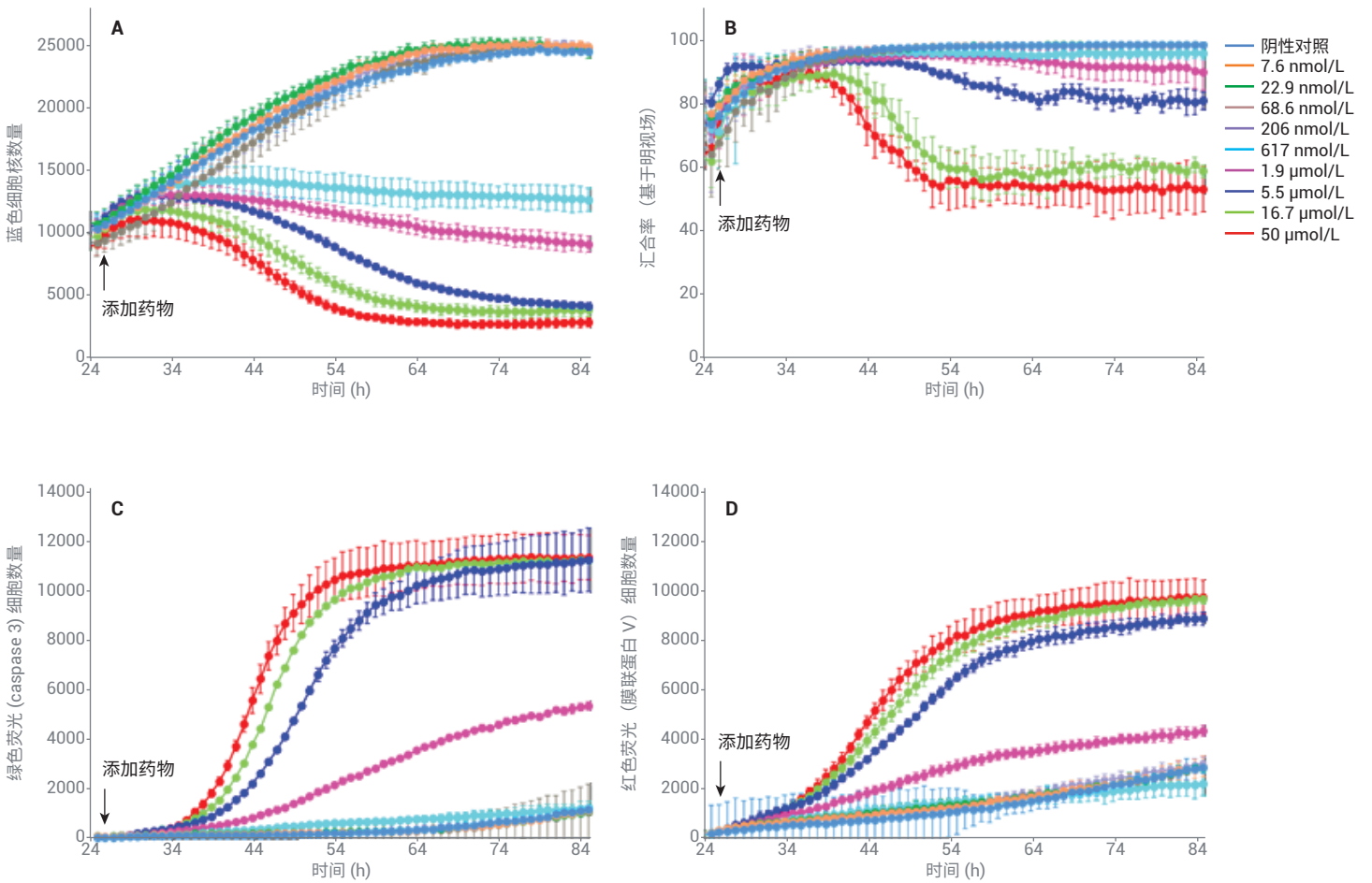


图 5. 利用蓝色细胞核数量 (A)、汇合率 (B)、绿色荧光 (caspase 3 激活) 细胞数 (C) 和红色荧光 (结合了膜联蛋白 V) 细胞数 (D) 对 MG132 诱导的 A549-Blue 细胞凋亡进行基于图像的追踪。误差线表示样品三次重复分析的标准偏差

定量分析药效

利用前几节给出的阻抗和基于图像的读数，计算了 MG132 的 EC50。绘制 MG132 浓度相对于曲线下的面积（从药物添加时间到药物添加后 60 小时）的函数曲线，得到如图 7 所示的剂量响应曲线。四种不同读数的拟合质量都非常好，R² 值为 0.96–0.98。计算得到的 EC50 值为 0.86–3.0 μmol/L，与文献中报道的值一致^[10]。

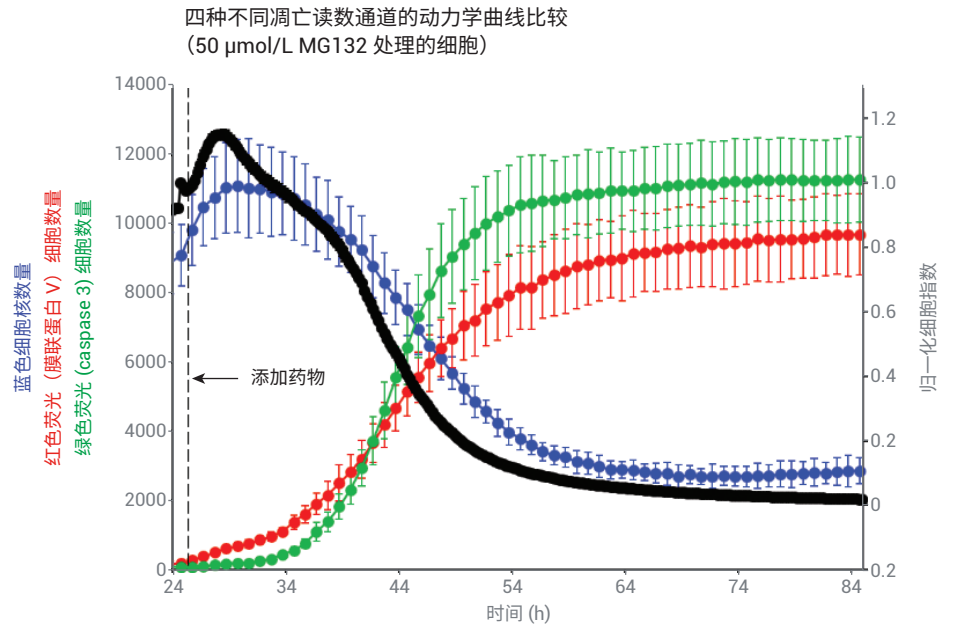


图 6. 比较不同凋亡现象的相对速率和相对丰度。误差线表示样品三次重复分析的标准偏差

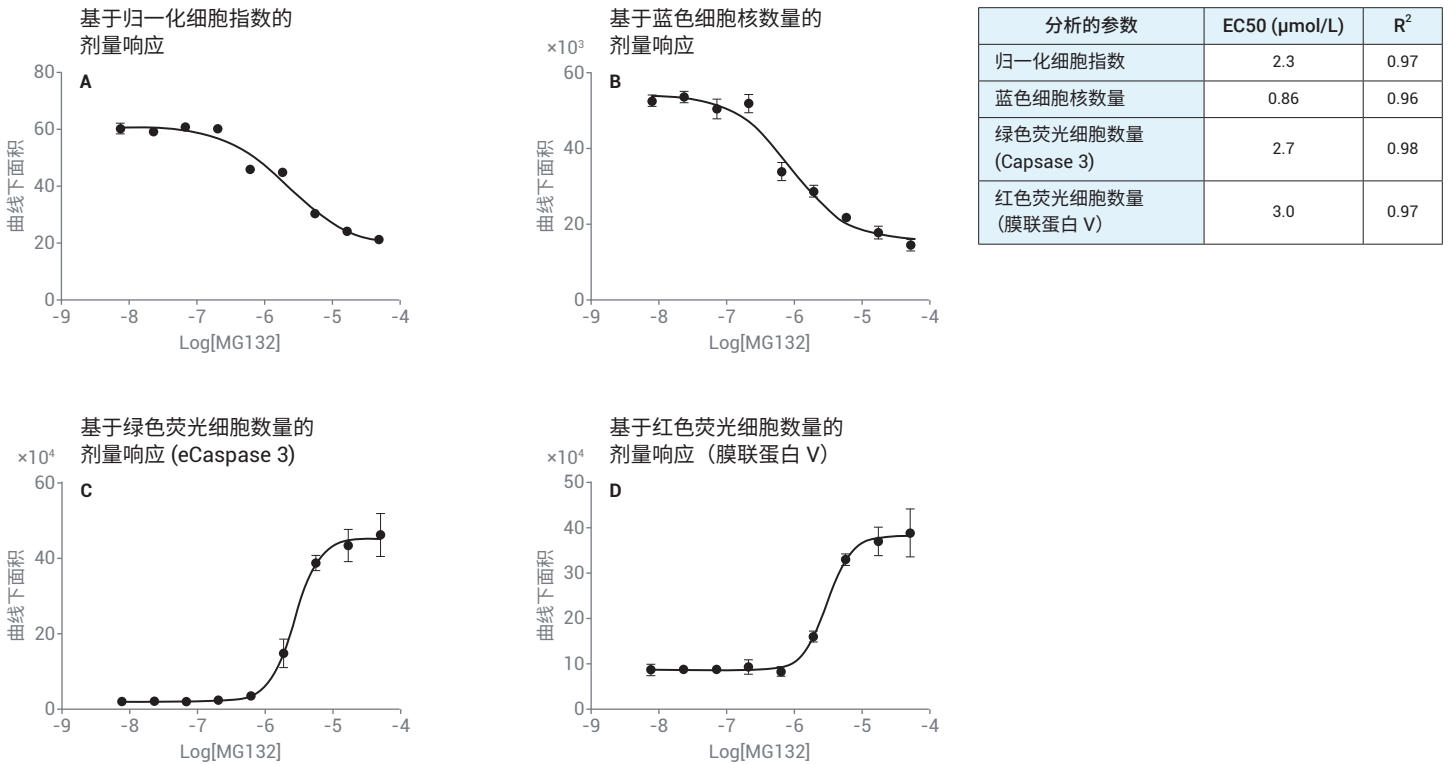


图 7. 使用剂量响应曲线计算 EC50。使用实时阻抗数据 (图 2A) 和活细胞成像数据 (图 5A、5C 和 5D) 计算曲线下面积，并相对于 MG132 浓度绘图。数据拟合成一个四参数 Logistic 方程来确定 EC50

结论

多重分析的优势在于它能为正在研究的问题提供更全面的信息。多重分析提供的丰富信息不仅意味着报告更多参数，更重要的是可以从多种不同/独特的视角提供信息。xCELLigence RTCA eSight 系统能够从实时细胞阻抗和活细胞成像两种完全不同的角度，同时监测同一微孔中的细胞健康状况和行为。它是有史以来第一个将这些功能相结合的仪器。这种双重读数的优势在图 2 和图 3 中展现得尤为突出。虽然通过阻抗分析能够检测到 A549-Blue 细胞中十字孢碱介导的快速细胞效应，但仅使用阻抗数据无法解释引起这种变化的细胞现象。而通过活细胞成像显示出的广泛细胞质皱缩，立即从机制上解释了为何会出现大幅且快速的阻抗响应。阻抗数据也提供了仅靠成像无法获得的信息。在用 MG132 处理的一个例子中，阻抗信号降至零（图 2A），而细胞融合度保持在 > 50%（图 5B），表明仍存在于孔中的细胞已完全脱离。这种定量评估细胞-基底粘附强度的性能是阻抗分析所特有的。

基于阻抗 (2.3 $\mu\text{mol/L}$) 和成像 (0.86–3.0 $\mu\text{mol/L}$) 计算得出的 EC50 值几乎相同。这两种数据集之间的一致性是由于这两种检测都是对完全相同的细胞群（即存在于同一孔中的细胞）进行的。在物理原理上完全不同的检测技术得到的数据如此相似，提高了所得出结论的可信度，表明 eSight 可以为细胞凋亡分析提供初步结果和进行确认性分析。虽然人们普遍认为解决研究问题的最佳方案是分开使用独立的技术，但这往往是不可取的，因为它可能会大大增加所需的工作量或所需样品量。eSight 分析则不同，它对每个孔都进行双重读数，无需额外的样品处理步骤或增加样品量。

除了具有两种独立的检测技术之外，还要重点注意的是阻抗读数的客观性，它直接进行报告，不需要用户进行任何处理或输入。相反，对于 eSight 以及所有其他基于成像的仪器，原始图像文件通过用户指定的算法被转换成输出数据（例如蓝色细胞核的数量），其中必须定义细胞的预期大小范围、偏心度和亮度。虽然这种方法存在的潜在问题（如用户间的差异）可以通过适当的培训和使用相同的分析参数尽量避免，但是将阻抗作为一个客观的对照参数有助于提高分析结果的可靠性。

eSight 可用于开展多种毒性试验，并且在生长培养基中加入 Agilent eCaspase 3 和 eAnnexin V 试剂可进一步提供凋亡通路特异的数据。使用细胞核表达 BFP 的细胞能够计算细胞总数，但这不是必需的，因为可以单独使用 eCaspase 3 和 eAnnexin V。

eSight 分析的连续性有两个主要优势。与只提供细胞过程快照的终点分析法不同，eSight 的实时追踪检测可确保不会遗漏重要的细胞现象。其次，eSight 分析的连续性大大减少了运行分析所需的手动操作时间。一旦接种了细胞，并添加了凋亡效应药物，就不需要进一步的干预。

综上所述，Agilent xCELLigence RTCA eSight 凋亡分析将实时阻抗监测的简便性、分析灵敏度和客观性与活细胞成像的高特异性读数相结合，能够连续追踪细胞死亡过程，并提供无与伦比的丰富信息。

参考文献

1. Yang, L. *et al.* Predominant Suppression of Apoptosome by Inhibitor of Apoptosis Protein in Non-Small Cell Lung Cancer H460 Cells: Therapeutic Effect of a Novel Polyarginine-Conjugated Smac Peptide. *Cancer Res.* **2003**, 63(4), 831–7
2. Colonna, L.; Lood, C.; Elkon, K. B. Beyond Apoptosis in Lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2014**, 26(5), 459–66
3. Venderova, K.; Park, D. S. Programmed Cell Death in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, 2(8)
4. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 2007, 35(4), 495-516
5. Nagata, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, 36, 489-517
6. Abassi, Y. A. *et al.* Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. *Chem. Biol.* **2009**, 16(7), 712–23
7. Fu, H. *et al.* Kinetic Cellular Phenotypic Profiling: Prediction, Identification, and Analysis of Bioactive Natural Products. *Anal. Chem.* **2011**, 83(17), 6518–26
8. Xing, J. Z. *et al.* Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18(2), 154–61
9. Model, M. A. *et al.* Staurosporine-Induced Apoptotic Water Loss is Cell- and Attachment-Specific. *Apoptosis* **2018**, 23(7-8), 449–455
10. Han, Y. H. *et al.* The Effect of MG132, a Proteasome Inhibitor on HeLa Cells in Relation to Cell Growth, Reactive Oxygen Species and GSH. *Oncol. Rep.* **2009**, 22(1), 215–21

了解更多安捷伦生物最新资讯
请关注公众号



www.agilent.com/chem/esight

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019年8月15日，中国出版
5994-1212ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：400-600-1063

联系我们：

bio.marketing@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

