

使用安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒实时检测和调节人 T 细胞活化

作者

Yoonseok Kam, Lisa P. Winer,
George W. Rogers,
James Hynes
安捷伦科技有限公司

摘要

安捷伦 Seahorse XF 技术能够提供细胞能量代谢的实时信息，可用于研究 T 细胞活化和功能。现在，安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定进一步扩展了该技术，提供了一种快速、标准化的方法来测量人 T 细胞中与活化相关的早期代谢反应，从而为活化的早期动态及其广泛的代谢基础提供重要见解。XF Hu T 细胞活化测定工作流程包括可溶性 CD3/CD28 活化剂、预包被多聚-D-赖氨酸 (PDL) 的 XF 细胞培养微孔板和直观且基于云的数据分析工具安捷伦 Seahorse Analytics。XF T 细胞活化测定为研究 T 细胞活化和相关的代谢重编程提供了便捷、一致的解决方案。其支持两种实验设计：标准实验用于检测 T 细胞活化；调节实验用于研究测试化合物在初始或预活化的 T 细胞中对细胞活化的急性调节效应。本应用简报概述了上述不同的实验设计，并举例说明了如何在 T 细胞免疫学和代谢中应用这些方法，这些应用与免疫细胞疗法和药物研发息息相关。

前言

安捷伦 Seahorse XF 技术是一种免标记的集成平台，无缝结合了 XF 分析仪、探针板、分析试剂盒和直观的软件，能够提供细胞代谢功能的实时动力学数据。基于此平台，安捷伦提供多种 XF 分析试剂盒，能够提供从细胞功能的广泛评估到代谢特征的具体细节的全方位信息。其中，XF 分析通过测量细胞外酸化率 (ECAR) 并计算与乳酸生成率相关的质子流出速率 (PER)，方便地评估活细胞的糖酵解活性^[1,2]。

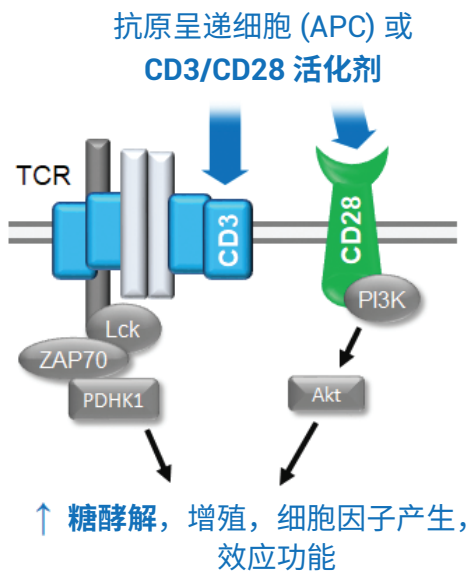


图 1. APC 或 CD3/CD28 活化剂诱导 T 细胞糖酵解增加。T 细胞经 APC 或 CD3/CD28 活化剂活化后，来自 T 细胞受体 (TCR) 和 CD28 配体的信号通过信号通路（包括各种激酶）传递，导致糖酵解迅速增加以及随后的增殖、细胞因子生成和相关的效应作用，并出现长时间的代谢变化

这种实时测量糖酵解变化的功能对于研究 T 细胞活化尤为有用，其中早期糖酵解活性快速增加是一种公认的特征性活化过程，对于后续的 T 细胞增殖和分化至关重要。通过原位加入可溶性 T 细胞活化剂共刺激 CD3 和 CD28 配体（常用于体外 T 细胞活化），可以实时检测糖酵解速率的快速增加（图 1）^[3-6]。这种易于使用的简化分析方法能够实时监测和调节 T 细胞活化，为不同 T 细胞亚型的活化反应或对特定药物或基因干预的功能反应提供了早期窗口，此类反应通常无法通过检测基因表达、细胞增殖和细胞因子生成的正交方法进行检测。

XF Hu T 细胞活化测定试剂盒通过简单可靠的工作流程测量人 T 细胞活化。对于实时 XF T 细胞活化测定，有多种模拟 APC 的活化剂可供选择，包括 anti-CD3 和/或 anti-CD28 抗体^[3-5] 以及与相关抗体偶联的磁珠^[6]。XF Hu T 细胞活化测定试剂盒采用可溶性 ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂 (STEMCELL Technologies)。该活化剂是一种人 CD3/CD28 T 细胞配体活化剂的四聚体复合物，在减少准备时间和改进加药性能方面均比基于磁珠的方法有明显优势，从而提高了 XF 平台上 T 细胞活化测定的便捷性、可靠性和一致性。XF Hu T 细胞活化测定试剂盒还结合了另外两个分析组件，可以提供更高的分析性能和便捷性。其中，PDL 包被的即用型 XF 细胞培养微孔板可以减少实验准备时间，并确保不同板和微孔具有一致的 PDL 包被性能。Seahorse Analytics 是一款基于云的多功能 XF 数据分析工具，可提供方便、灵活的数据转换，有助于分析并解析 T 细胞活化测定数据。本应用简报以初始和预活化的人 T 细胞为例，概述了将 XF Hu T 细胞活化测定试剂盒、XF PDL 细胞培养微孔板和 Seahorse Analytics 结合使用的实验方法设计、性能和应用。

实验部分

材料

材料	供应商
原代 CD4+ 和 CD8+ T 细胞, PBMC	STEMCELL Technologies 或 Hemacare
ImmunoCult-XF T 细胞扩增培养基	STEMCELL Technologies
白细胞介素-2 (IL-2)	
安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化试剂盒 (包含 ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂和 2-DG)	安捷伦科技公司
XFe96 PDL 细胞培养微孔板	
XFe96 探针板	
XF 校准液	
XF RPMI 培养基, pH 7.4	
XF 葡萄糖	
XF 丙酮酸钠	
XF 谷氨酰胺	
Seahorse XFe96 分析仪	
人 IL-2 DuoSet ELISA (DY202)	
达沙替尼	Millipore Sigma
Lck 抑制剂	
96 孔细胞培养板 (用于 ELISA)	Corning
酶标仪	Tecan Group Ltd

细胞

在初始 T 细胞活化实验中, 根据制造商的说明将分离自人 PBMC 的冻存初始 CD4+ 或 CD8+ T 细胞 (购自 STEMCELL Technologies) 复苏, 并在 ImmunoCult-XF T 细胞扩增培养基中培养。在再活化测定中, 使用 Dynabeads 或 ImmunoCult 人 CD3/CD28 T 细胞活化剂在 6 孔板上活化 ImmunoCult-XF T 细胞扩增培养基中的部分初始 T 细胞。活化后第 4 天开始, 向扩增培养基中补充 300 U/mL IL-2, 连续培养活化细胞 20 天。

ELISA

为测量生成的 IL-2, 在常规 96 孔微孔板中准备初始 T 细胞平行组, 用于 ELISA 测定。简而言之, 将初始 T 细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度悬浮于不含补充剂的 ImmunoCult-XF T 细胞扩增培养基中。在 CD3/CD28 活化剂滴定中 (图 5), 将活化剂体积调整为每 200 μ L 含 2.5、5、10 和 20 μ L 活化剂, 与相应的 XF T 细胞活化测定中每孔的活化剂浓度相对应。在进行药物调节时 (图 8D), 将细胞用达沙替尼预处理 30 分钟, 然后添加 10 μ L CD3/CD28 活化剂。活化后, 将细胞培养 72 小时, 然后收集培养基。将微孔板离心 (200 \times g, 1 分钟), 收集每个孔中的培养基样品。根据制造商的说明, 使用人 IL-2 DuoSet ELISA (DY202, R&D Systems) 检测 IL-2 水平, 并测量 450、540 和 570 nm 下的吸光度 (Spark, Tecan)。

细胞成像

细胞接种后立即使用安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统采集明视场图像^[7]。

XF T 细胞活化测定

所有 XF T 细胞活化测定均按照《XF T 细胞活化测定用户指南》^[6] 进行，包括准备探针板、准备 PDL 包被的微孔板、细胞接种和化合物稀释。分析测定的整个流程如图 2 所示。

南》^[6] 进行，包括准备探针板、准备 PDL 包被的微孔板、细胞接种和化合物稀释。分析测定的整个流程如图 2 所示。

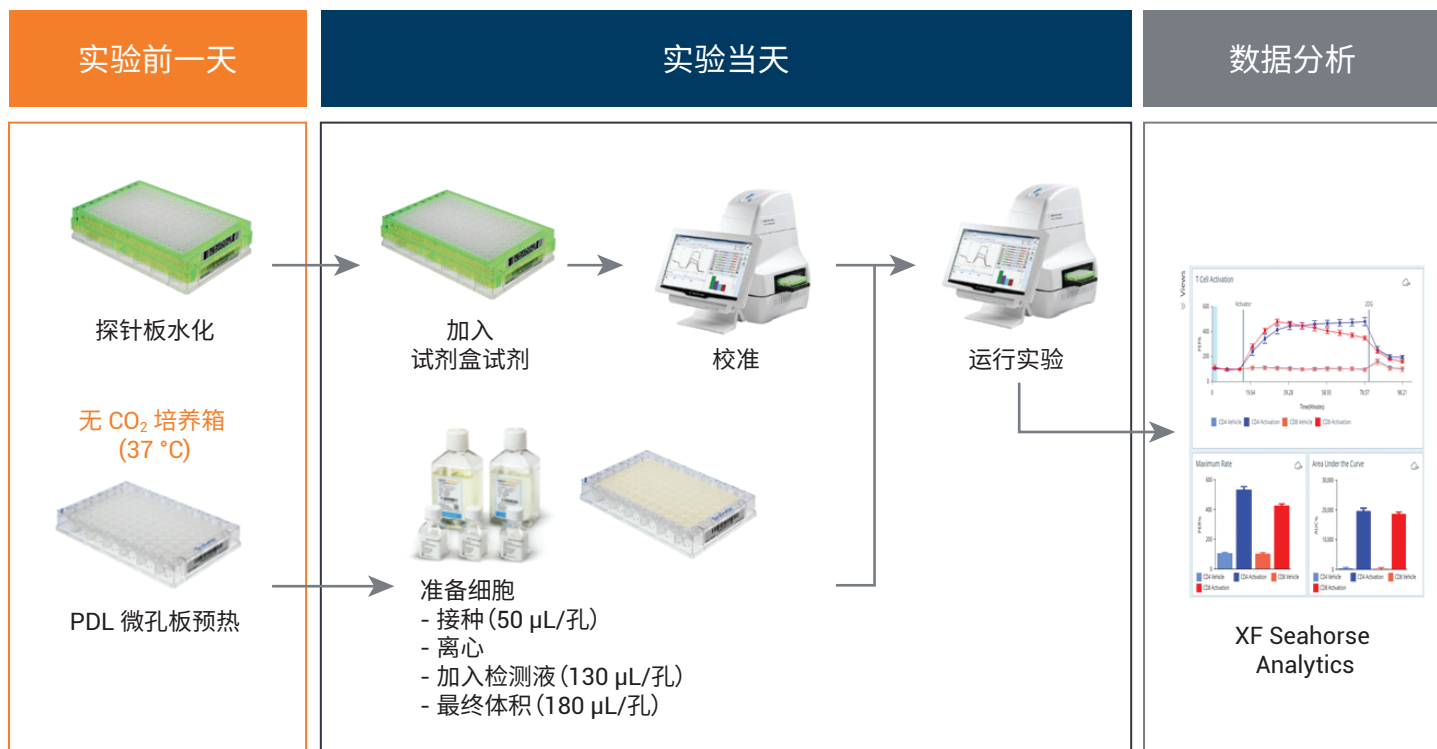


图 2. T 细胞活化测定工作流程概览

XF T 细胞活化测定策略和设计

图 3 展示了 XF Hu T 细胞活化测定的具体设计和相关数据输出。首先确定基础 ECAR，然后加入 CD3/CD28 活化剂。监测一段时间（通常是 60 分钟内 10 个测量循环）内 T 细胞活化导致的 ECAR 增加，然后加入 2-DG 抑制与活化相关的糖酵解增加。然后，通过 Wave 或 Seahorse Analytics 将得到的 ECAR 数据自动转换为质子流出速率 (PER, pmol/min) (图 3)。

XF T 细胞活化测定支持两种实验设计：标准实验用于检测 T 细胞活化 (图 3A)，调节实验用于研究测试化合物对 T 细胞活化的急性调节效应 (图 3B)。标准实验包括两次加药：加入 CD3/CD28 活化剂，然后加入 2-DG，可用于比较来自不同供体或施加干预措施（如基因和/或药物干预）后 T 细胞的活化潜力。调节实验在加入 CD3/CD28 活化剂之前先加入一种或多种测试化合物，以研究其对 T 细胞活化潜力的急性调节效应。

使用 XF Seahorse Analytics 分析 XF T 细胞活化测定数据

XF Seahorse Analytics 是一个基于网络的软件平台，为 XF T 细胞活化测定提供了简便易用的数据分析工具。Seahorse Analytics 中的 T Cell Activation Assay View (T 细胞活化测定视图) 提供了经计算得到的活化期间的一份汇总表和三份视图，包括：动力学曲线 (PER vs. 时间)、最大 PER 的柱状图 (pmol/min 或 %) 和曲线下面积的柱状图 (AUC, pmol 或 %)。动力学曲线用于 T 细胞活化动态的实时评估，并提供 T 细胞应答的全面概览。使用最小二乘最佳拟合计算出的最大速率可用于比较不同组/样品之间的活化程度 (图 4A)。AUC 提供有关 T 细胞活化潜力的累积信息 (图 4B)。为满足更多分析或作图需求，可使用 Seahorse Analytics 的数据导出功能将输出数据导出为 Microsoft Excel 或 GraphPad Prism 文件格式。

通常情况下，建议在评估数据时首先分析绝对速率数据 (PER, pmol/min)，以最大程度减少可能出现的关键信息丢失。然而，使用 Seahorse Analytics 中的 *Baseline* (基线) 功能可转换动力学曲线和最大速率数据^[9]。这种转换通常根据即将加入活化剂前测得的速率，将绝对 XF 速率数据转换为相对 (%) 比例，从而能够对一系列实验进行相对比较，最大程度减少由于细胞接种的微小差异而引起的孔间差异。尽管这种方法较为实用，但是不能取代对绝对速率的解析，因为转换时可能会丢失重要信息，此外还应考虑进行实验室间的数据比较，因此建议报告绝对值。

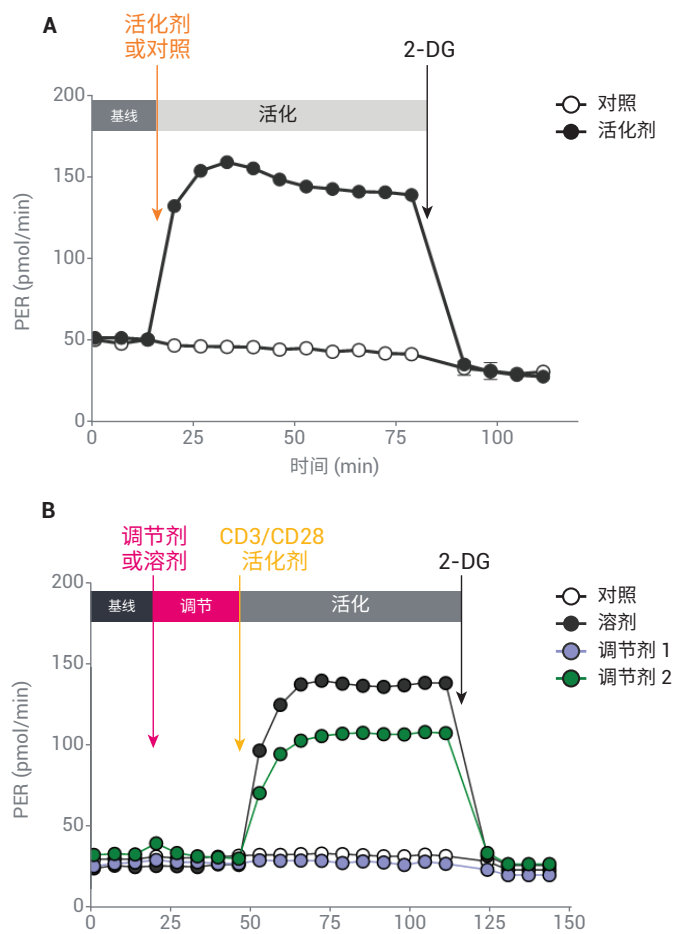


图 3. 在标准实验设计 (A) 和调节实验设计 (B) 中，安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定测量加入 CD3/CD28 活化剂后 T 细胞的糖酵解反应。糖酵解速率可以通过绝对 PER 值 (pmol/min) 或相对于基线的增加值 PER (%) 进行分析

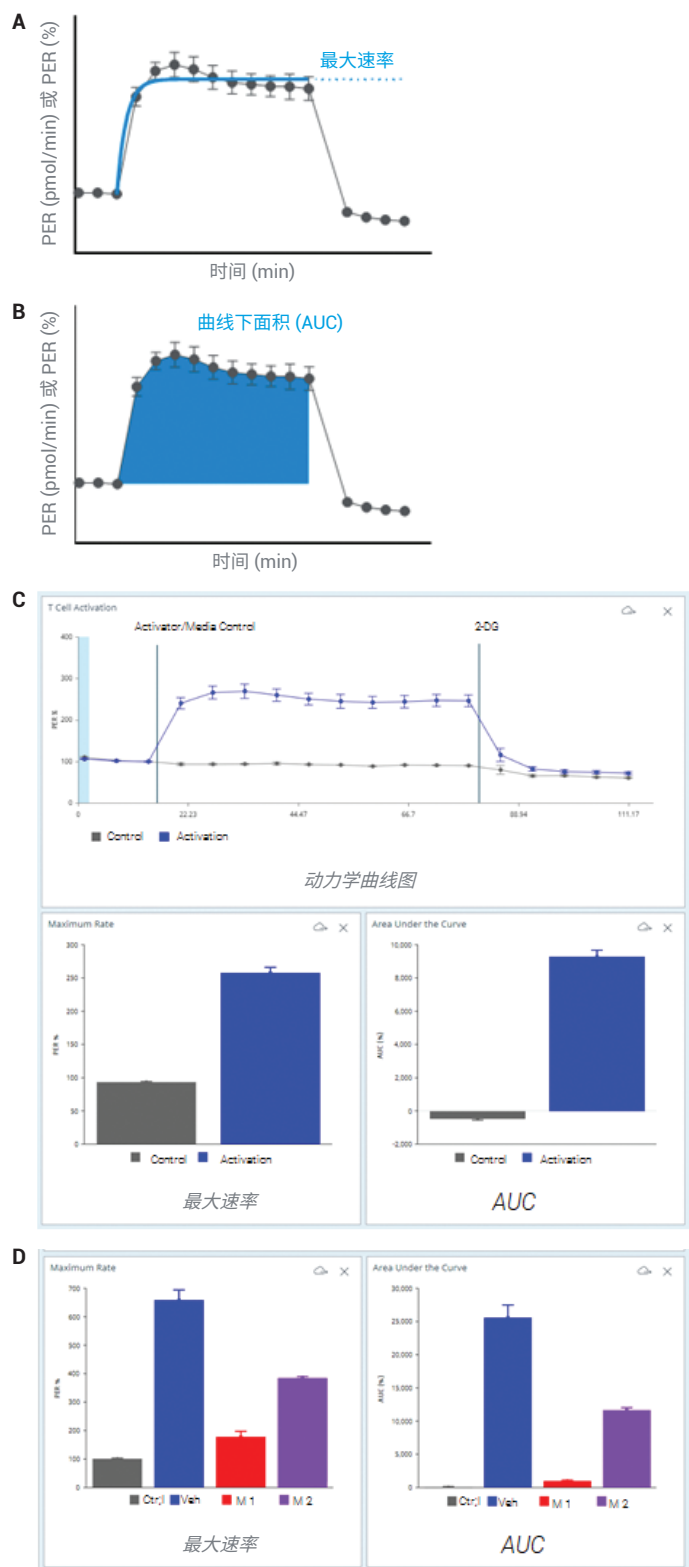


图 4. 使用 XF Seahorse Analytics 分析安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定数据。(A) 和 (B) 分别为最大速率和 AUC 计算方法的示意图。(C) 和 (D) 分别为标准实验和调节实验的动力学曲线以及最大速率和 AUC 的柱状图

结果与讨论

活化剂的评估与优化

为初步展示原理并确定最佳测定条件，使用初始 CD4⁺ T 细胞对 ImmunoCult CD3/CD28 活化剂的体积进行评估，评估范围为 2.5–20 μL /孔（总加入量为 20 μL /孔）。图 5A 中的动力学数据表明，糖酵解反应随活化剂剂量的增加而增加。数据还表明，活化剂为 10 μL /孔时就足以实现最大程度的持续活化。

采用正交 ELISA 测定相同活化剂浓度下平行对照组细胞生成的 IL-2，从而确认 T 细胞活化（图 5D）。得到的 ELISA 数据显示，在活化剂剂量为 5–20 μL /孔范围内，受刺激的细胞在 72 小时内累积的 IL-2 差异很小。相比之下，活化后立即采集的 XF 数据显示出与活化剂剂量相关的活化模式，如动力学 PER 曲线（图 5A）、最大速率和 AUC 值（分别为图 5B 和图 5C）所示。因此，XF 实时分析可以提供一种独特的方法来测量和描述免疫调节和功效，这是使用其他终点分析方法（如 ELISA）无法实现的。

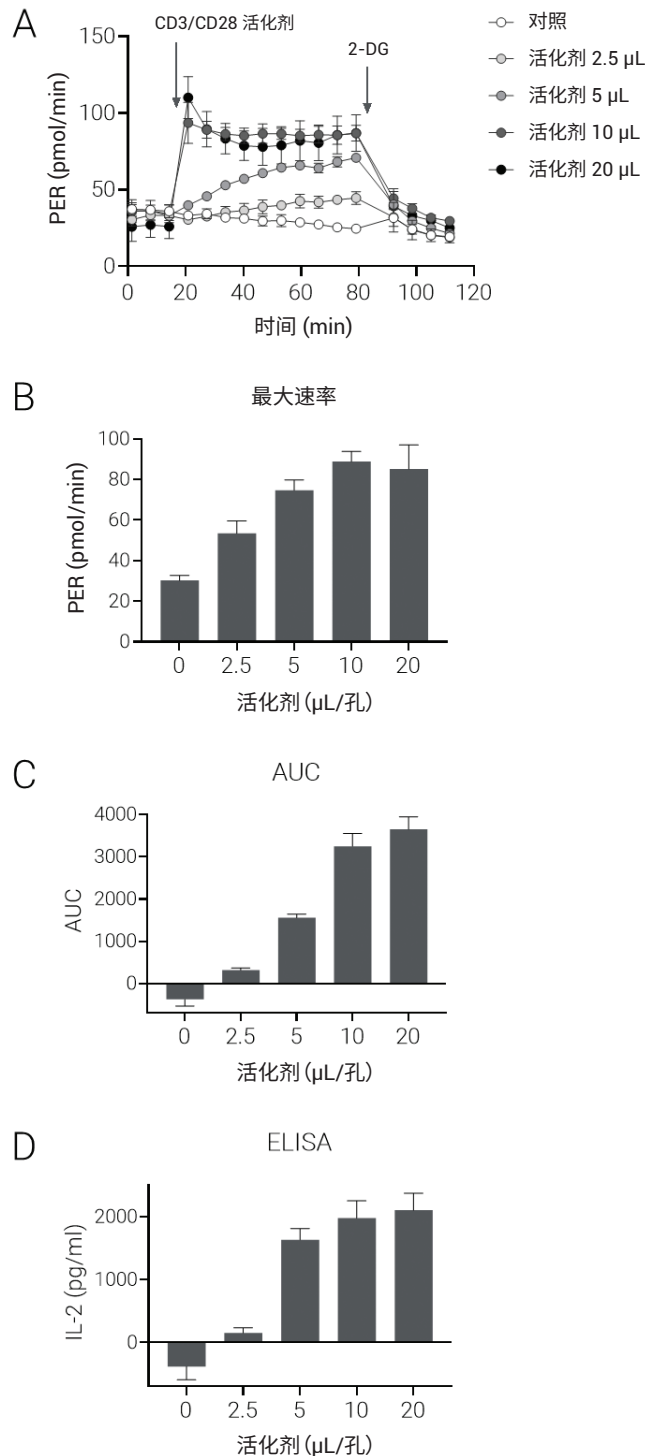


图 5. 不同剂量的 CD3/CD28 活化剂下初始 CD4⁺ T 细胞的活化情况。所有组加入的活化剂总体积均为 20 μL /孔，对于体积小于 20 μL 的组，在加至加药孔之前，用 XF 检测液稀释活化剂。(A) 动力学图，展示了加入不同剂量的活化剂后 PER 的实时变化。(B) 和 (C) 分别为不同活化剂量下的最大 PER 和 AUC 值。(D) 以不同活化剂量活化细胞 72 小时后，通过 ELISA 测量收集的培养基中生成的 IL-2

应用：评估 T 细胞活化潜力

T 细胞活化以及随后的增殖和分化功能受代谢调节，并且可通过药物进行调节。XF Hu T 细胞活化测定可用于比较来自不同受试者或施加干预措施（如基因操作和/或慢性化合物暴露）的 T 细胞之间的活化潜力和其他活化特性。图 6 展示了一个简单的例子，比较了 CD4+ 和 CD8+ T 细胞之间的活化情况。每种细胞类型均来自不同且不相关的受试者，使用绝对 PER (pmol/min) 和相对 (%) 值比较了 T 细胞活化动力学、最大速率和 AUC 值。加入 CD3/CD28 活化剂后，CD4+ 和 CD8+ 细胞的 PER 升高，随后加入 2-DG 后 PER 降低。

绝对 PER 的分析结果表明，与 CD8+ 细胞相比，CD4+ 细胞具有更高的基础速率和更高的活化诱导最大速率（图 6A 和图 6B）。但是，使用 XF Seahorse 成像和归一化系统得到的相对图像（图 6C）表明，绝对 PER 的这些差异很大程度上是由于每个孔的细胞数差异造成的。当绝对 PER 值转换为相对 (%) 比例后，最大速率之间不存在差异，这一结果进一步证实了上述结论，表明 CD4+ 和 CD8+ 细胞具有相似的活化潜力，并强调了基线归一化的实用性。此外，绝对速率和 % 数据展示了不同的动力学行为，CD4+ 细胞在测量期间保持较高的糖酵解活性，而 CD8+ 细胞的 PER 在活化后 20-30 分钟略有减弱。

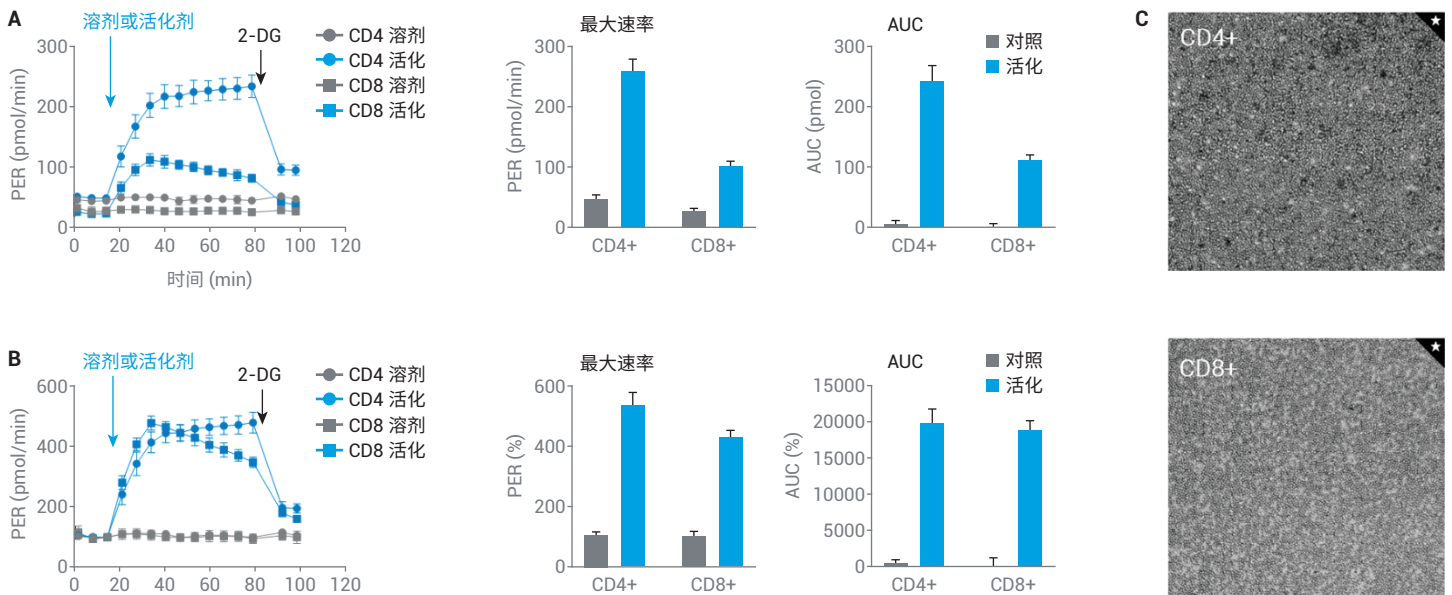


图 6. 经过和未经过基线归一化的 XF T 细胞活化测定数据。通过标准实验方案活化初始 CD4+ 和 CD8+ T 细胞，并将数据绘制为绝对 PER (pmol/min) (A) 和相对 PER (相对于最后一次基础速率测量结果的变化百分比) (B)。使用安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统的明视场成像功能比较细胞接种情况 (C)

应用：测量 T 细胞调节剂影响

XF Hu T 细胞活化测定还可通过标准实验或调节实验设计来研究药剂对 T 细胞活化的急性效应。众所周知，Lck 是 T 细胞受体复合物中的一种酪氨酸激酶。它将早期活化信号从受体传递至下游系统（图 1）。达沙替尼是一种 Bcr-Abl 激酶抑制剂，最初用作抗癌药物。据最近报道，达沙替尼可抑制 Lck，是潜在的 CAR-T 细胞活化调节剂^[10]。为举例说明 XF Hu T 细胞活化测定在评估细胞活化的药物调节方面的实用性，考察了达沙替尼和 Lck 抑制剂对原代 T 细胞活化的影响。为了确定有效

的药物浓度，在 T 细胞活化测定之前，用不同量的化合物对预先活化的 CD4+ T 细胞预处理 30 分钟。图 7 表明，达沙替尼和 Lck 抑制剂对 T 细胞活化的抑制作用均呈剂量依赖性。使用 Seahorse Analytics 可以方便地将动力学数据转换为最大速率和 AUC 值，并能导出到 Microsoft Excel 或 GraphPad Prizm 进行更多分析。图 7 展示了通过 GraphPad Prizm 软件，使用从 Seahorse Analytics 导出的最大速率和 AUC 值生成的随剂量变化的曲线以及 IC_{50} 值。

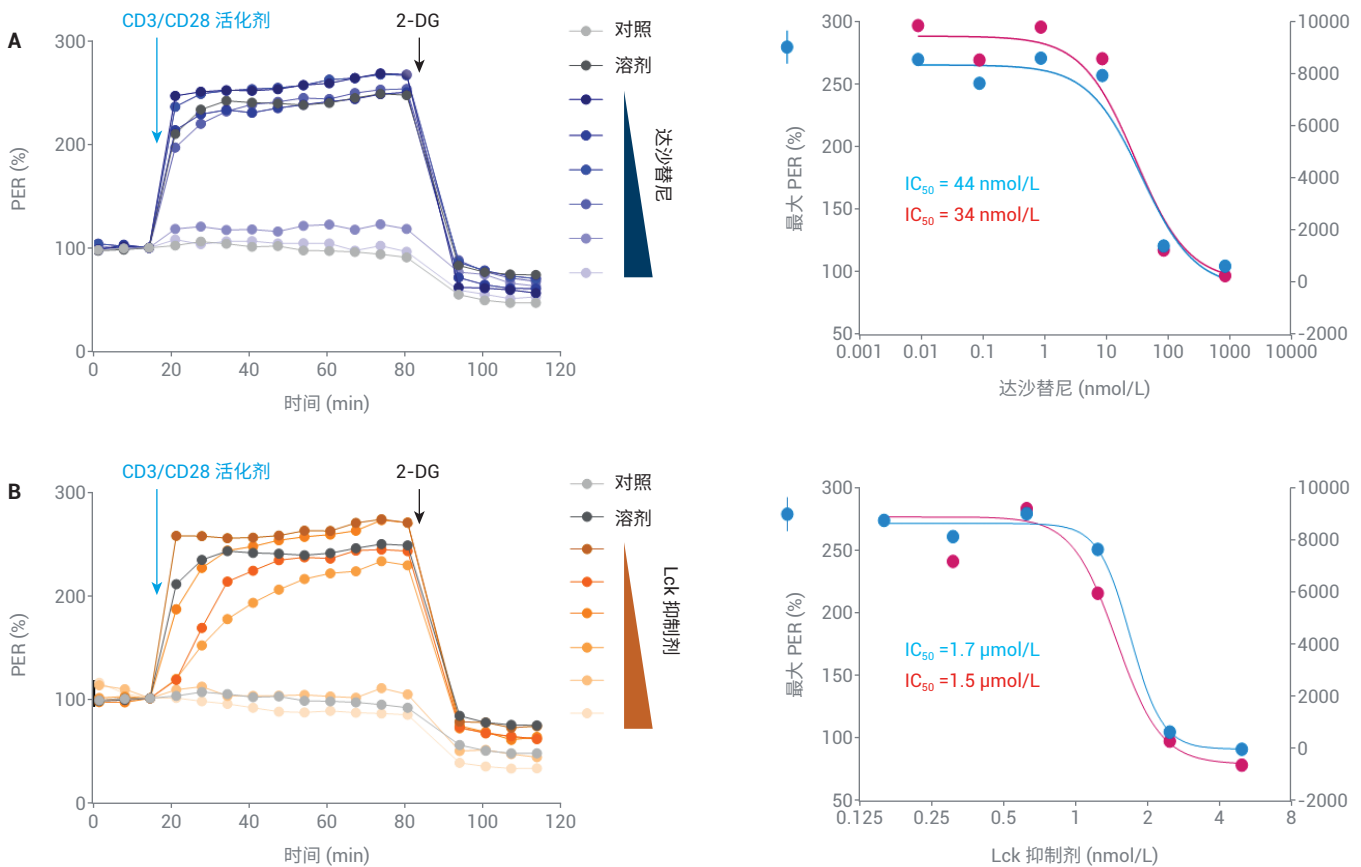


图 7. 表征 T 细胞活化抑制剂。在活化测定之前，用不同浓度的达沙替尼 (A) 或 Lck 抑制剂 (B) 将预先活化的 CD4+ T 细胞预处理 30 分钟。使用安捷伦 Seahorse Analytics 计算最大 PER (%) 和 AUC (%) (左图)，并相对于药物浓度作图。使用 GraphPad Prism 软件绘制剂量曲线并得到 IC_{50} 值 (右图)

在加入活化剂前，通过原位加入测试化合物还可对药物调节作用进行急性评估。图 8 展示了达沙替尼对初始 T 细胞活化的急性效应。加入两种不同浓度的达沙替尼（最终孔浓度分别为 50 和 100 nmol/L），并在 5 个测量循环（约 30 分钟）内监测其对 PER 的影响。随后加入 CD3/CD28 活化剂开始活化。50 nmol/L 的达沙替尼对与 T 细胞活化相关的 PER 增加产生了一定程度的抑制，而 100 nmol/L 的达沙替尼则完全抑制了与 T 细胞活化相关的 PER 增加。这一结果与图 7 中的 IC₅₀ 值一致。图 8B 和图 8C 中的转换数据以 %PER 和 %AUC 的形式显示了四种测试条件下的最大活化潜力。还通过测量生成的 IL-2 考察了达沙替尼对 T 细胞活化的影响。结果与 XF Hu T 细胞活化测定数据相符合，IL-2 水平在达沙替尼存在的情况下显著降低（图 8D）。

结论

本研究介绍了 XF Hu T 细胞活化测定的实验设计和概念验证，通过实时监测 PER 的增加情况，为可视化研究 T 细胞活化提供了一种快速方法。通过此测定可对 T 细胞活化进行早期检测并比较活化动力学，还可用于研究药物或基因干预措施的调节作用。XF Hu T 细胞活化测定试剂盒采用可溶性 CD3/CD28 活化剂最大程度提升分析性能，并且与预包装的 PDL XF 细胞培养微孔板一起使用时，可提供便捷的标准化工作流程。此外，Seahorse Analytics 还提供了简化且易于使用的分析工具，可自动提供用于数据解析的关键分析参数。这一站式实时 T 细胞活化分析解决方案有助于研究慢性和/或急性免疫调节剂，在针对各种疾病（包括癌症、免疫功能障碍和各种代谢疾病）开发细胞和分子免疫疗法时可以发挥重要作用。

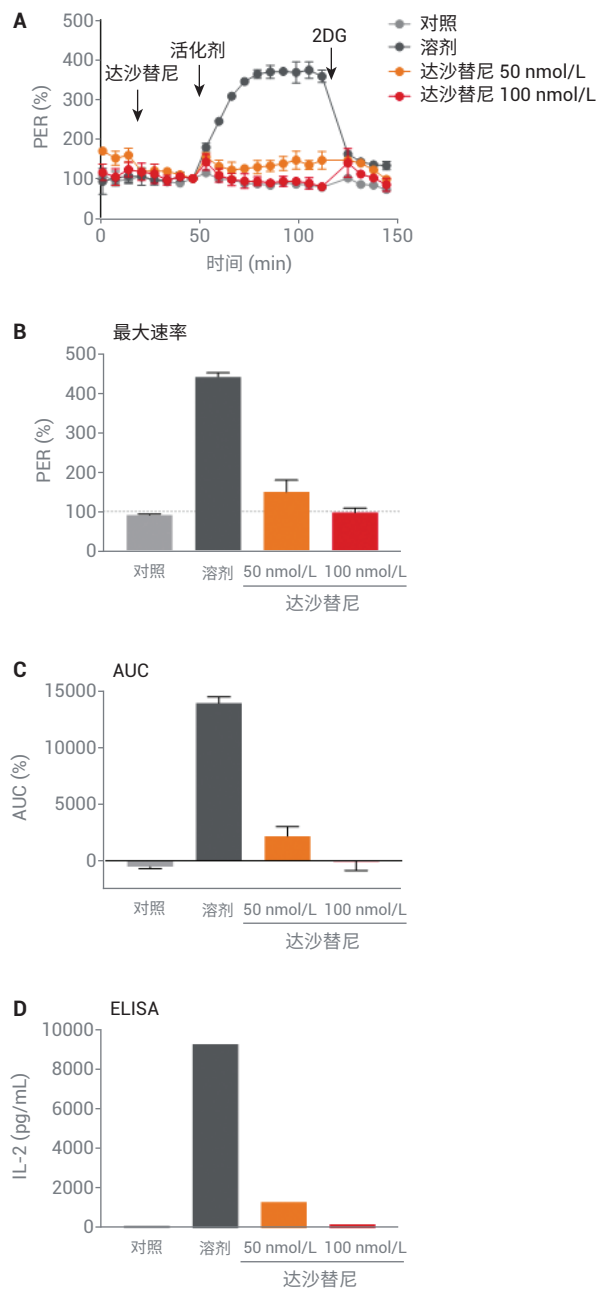


图 8. 使用调节实验方案评估达沙替尼对 CD4⁺ T 细胞活化的急性效应。在加入活化剂之前，加入两种不同浓度（50 和 100 nmol/L）的达沙替尼。(A) PER (%) 实时变化的动力学图；(B) 最大 PER (%)；(C) AUC (%) 值；(D) 细胞活化 72 小时后，通过 ELISA 测量收集的培养基中生成的 IL-2

参考文献

1. Romero, N. *et al.* Quantifying Cellular Glycolytic Rate Using CO₂-Corrected Extracellular Acidification (使用 CO₂ 校正的细胞外酸化定量分析细胞糖酵解速率), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-7894EN
2. Agilent Seahorse XF/XFp Glycolytic Rate Assay Kit User Guides (安捷伦 Seahorse XF/XFp 糖酵解速率测定试剂盒用户指南), *安捷伦科技公司*, 出版号 103344-400 和 103346-400
3. Gubser, P. M. *et al.* Rapid Effector Function of Memory CD8+ T Cells Requires an Immediate-Early Glycolytic Switch. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1064–1072
4. Menk, A. V. *et al.* Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 1509–1521
5. Jones, N. *et al.* Akt and STAT5 Mediate Naive Human CD4+ T-Cell Early Metabolic Response to TCR Stimulation. *Nature Comm.* **2019**, *10*, 152–160
6. Buck, M. D. *et al.* Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate Through Metabolic Programming. *Cell* **2016**, *166*, 63-76
7. Kam, Y. *et al.* Data Quality Management Using Brightfield Images with the Seahorse XF Imaging and Normalization System (使用明视场图像与 Seahorse XF 成像和归一化系统进行数据质量管理), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-9385EN
8. Agilent Seahorse XF Hu T Cell Activation Assay Kit User Guide (安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒用户指南), *安捷伦科技公司*, 出版号 5994-1811EN
9. Kam, Y. *et al.* Methods and Strategies for Normalizing XF Metabolic Data to Cellular Parameters (归一化 XF 代谢数据至细胞参数的方法和策略), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-8980EN
10. Mestermann, K. *et al.* The Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib Acts as a Pharmacologic on/off Switch for CAR T Cells. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaau5907

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DE.2682175926

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, 2020
2020年6月16日, 中国出版
5994-1983ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



Trusted Answers