

## APPLICATION NOTE

# 如何准确评价 HTRF 细胞因子检测与其细胞活性变化的关系

Fabienne Charrier-Savournin, PhD, Fanny Pleniére, Stephanie Douzon | Cisbio Bioassays  
Caroline Cardonnel, PhD, Laurence Monnet | Field Applications Scientists | Molecular Devices

## 简介

已知促炎和抗炎细胞因子在自身免疫、炎症调节和传染病中发挥着重要的作用。同时在代谢紊乱、肿瘤学也起着重要作用，尤其是抗肿瘤免疫应答。Cisbio 公司提供各种细胞因子和趋化因子定量的均相时间分辨荧光 (HTRF) 检测试剂盒。HTRF 技术非常适合监测细胞因子和趋化因子在细胞实验中的释放，特别是像外周血单个核细胞 (PBMC) 这样的物理模型。通常，细胞因子释放的调节依赖于使用药物化合物来诱导或抑制它们的分泌。为了进一步了解这些药物的作用机制，需要我们仔细分析它们的作用，特别是对细胞活力的影响。本应用介绍了如何使用 SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机和 SpectraMax Minimax 300 细胞成像仪如何对细胞因子分泌和细胞活性进行分析。该方法可以逐孔/逐细胞进行 HTRF 和细胞活性检测，并通过细胞形态来确定其质量。本文将介绍 (i) 如何经过处理的 PBMC 中诱导细胞因子分泌，(ii) 如何通过 HTRF 方法检测细胞因子，(iii) 如何用 Molecular Devices 公司的 EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒评估 PBMC 活性，(iv) 如何将细胞因子浓度转化成 PBMC 活性。

## 材料和方法

解冻冻存人类 PBMC，并将其以 50,000 和 100,000 细胞/孔接种于底透黑色的 96 孔板中，每孔接种 200  $\mu$ l RPMI + 10% 胎牛血清 (FCS)。在细胞处理前，用 MiniMax 细胞成像仪透射光检测 PBMC 接种量。

## 细胞处理

为了调节 IL6, IL8, TNF $\alpha$  和 IL1 $\beta$  分泌，PBMC 处理 16 小时，地塞米松浓度递增，一个已知的糖皮质激素会抑制促炎细胞因子分泌，再加入 0.2  $\mu$ g/mL LPS 诱导细胞因子分泌。为了调节 IL2 和 IFN $\gamma$  分泌，PBMC 处理 16 小时，地塞米松浓度递增，再加入 0.5 ng/mL PMA 和 1  $\mu$ g/mL 离子霉素。

## HTRF 细胞因子分析

过夜培养后，每孔上清 16  $\mu$ l 转移至小体积 384 孔板 (Greiner #784075) 进行 HTRF 细胞因子分析。每个样品用 1:10/1:20 比例稀释，这样每个分析都在其线性范围内。细胞因子浓度根据对应的标准曲线计算，RPMI + 10% FCS 稀释成标准品 (HTRF 细胞因子试剂盒: 62HIFNGPEG, 62HIL02PEG, 62HIL1BPEG, 62HIL06PEG, 62HIL08PEG, 62HTNFAPEG) 采用 SoftMax Pro 软件中预设的模板在 SpectraMax i3x 微孔板读板机上进行 HTRF 细胞因子分析。

## 优势

- 利用灵敏的 HTRF 技术评估细胞因子分泌
- 无需染色，即可在 MiniMax 细胞成像仪上监控细胞接种
- 为了保证检测效果，采用 EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒检测细胞活力

### EarlyTox 细胞完整性检测分析

采用 EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒对细胞上清进行细胞活性的评估。EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒 (Molecular Devices, P/N:R8213) 有 2 个 DNA 结合染料：活细胞红色染料 (标记所有细胞的细胞核) 和死细胞绿色染料 (只标记死细胞)。细胞活性用两种颜色的荧光染料在 MiniMax 细胞成像仪上成像 (绿色：460 nm 激发/541 nm 发射，红色：625 nm 激发/713 nm 发射)，用 SoftMax Pro 软件进行分析。

### 数据分析

#### SoftMax Pro 软件进行数据采集和分析

- HTRF 比值和数据处理都可以直接调用软件中根据 Cisbio 试剂盒预设的程序自动处理。(http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/htrf-ratio-and-data-reduction)
- 平均值和标准偏差 (SD) 会在图中显示
- 归一化过程：归一化【细胞因子】pg/mL = 【细胞因子】pg/mL ÷ 活细胞数量

### 结果

#### 细胞处理前 PBMC 的接种控制

细胞处理之前，人类 PBMC 的接种过程通过透射光成像监控和确认。这些细胞的直径小于 6 μm，用透射光计数单个细胞是非常困难的。因此，我们采用用户自定义的分析方法，通过计算图片上覆盖面积的百分比来计算细胞密度。这种方法计算出 19.7% 覆盖面积代表 50,000 PBMC/孔，35.9% 覆盖面积代表 100,000 PBMC/孔，计算比率为 1.82 (数据未显示)。结果证明，这种新的自定义数据分析方法成功识别了细胞数量，并使每孔的面积覆盖率达到到了精确的百分比。

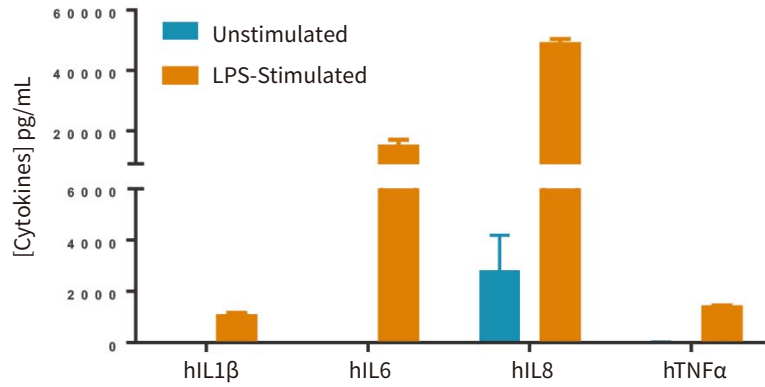
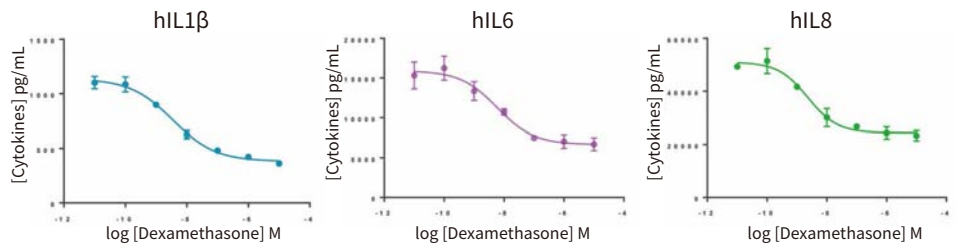


图 1 LPS 刺激下的细胞因子分泌，在 SpectraMax i3x 微孔板读板机上进行 HTRF 分析



	IL1β	IL6	IL8	TNFα	IL2	IFNγ
S/B	3.0	2.4	2.1	2.4	1.5	2.0
IC <sub>50</sub> dexa (M)	3.491E-09	5.824E-09	2.304E-09	6.048E-09	1.456E-08	3.282E-08

图 2 地塞米松对细胞因子分泌的影响。TNFα, IL2 和 IFNγ 的剂量效应曲线没有显示

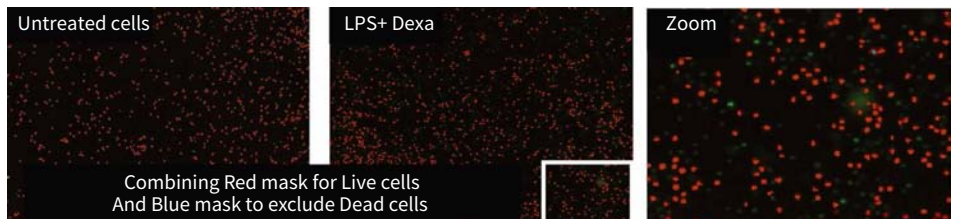


图 3 LPS + 地塞米松处理 PBMC。利用 SoftMax Pro 软件中的分类特性，识别活细胞 (红色)，但没有识别死细胞 (蓝色)

### 地塞米松处理后 LPS 或 PMA/离子霉素诱导细胞因子释放的调节

如预期, LPS 显著诱导 IL1 $\beta$ , IL6, IL8 和 TNF $\alpha$  的分泌 (图 1), IL2 和 IFN $\gamma$  在 5 ng/mL PMA + 1  $\mu$ g/mL 离子霉素共同处理下释放量最大。

有趣的是, 在 2  $\mu$ g/mL 离子霉素存在的情况下, IL2 和 IFN $\gamma$  的分泌会显著下降 (数据未显示)。

无论是 LPS 还是 PMA/离子霉素处理, 地塞米松都会显著降低细胞因子的释放 (图 2)。

### EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒监测 LPS, 地塞米松和 PMA/离子霉素处理对细胞活性的影响

EarlyTox 数据是通过红色标记计算细胞数量 (大小和荧光强度阈值) 和鉴定活/死细胞数量来分析的。使用 SoftMax Pro 软件中的分类功能, 细胞核只标记了红色的为活细胞, 细胞核标记红色和绿色的为死细胞。鉴定结果可以在软件中看到, 细胞分别标记成了红色 (活细胞) 和蓝色 (死细胞) (图 3 和 4)。

为了进一步了解 PMA/离子霉素对细胞活性和形态的影响, 分别用 PMA 和离子霉素加大剂量处理 PBMC。处理方法如上 (成像图片未显示)。如图 5 所示, 加大两种化合物浓度细胞死亡会显著增加, 表明这两种药物诱导细胞毒性。而且, 数据显示 PMA 的细胞毒性几乎是离子霉素的 2 倍 (50 ng/mL PMA 导致 15% 死细胞, 而 2  $\mu$ g/mL 离子霉素导致 7% 死细胞)。

图 4, PMA + 离子霉素处理 PBMC。用 SoftMax Pro 软件中的分类功能, 可将细胞鉴定为活细胞 (红色标记) 或死细胞 (蓝色标记) 簇。

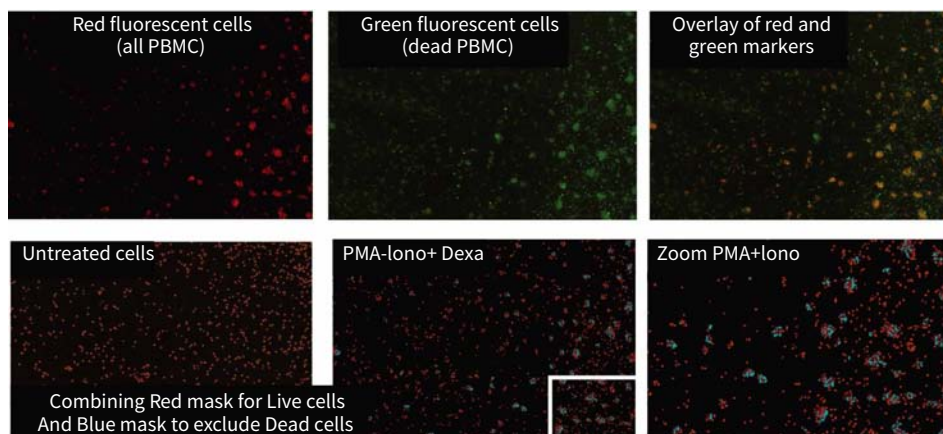


图 4 PMA + 离子霉素处理 PBMC。用 SoftMax Pro 软件中的分类功能, 可将细胞鉴定为活细胞 (红色标记) 或死细胞 (蓝色标记) 簇

	50,000 cells/well		100,000 cells/well	
	Number of living cells/well	% dead PBMC	Number of living cells/well	% dead PBMC
Control	12,133	0	29,658	0
LPS	15,210	0	30,600	0
PMA (5 ng/mL) / ionomycin (1 $\mu$ g/mL)	16,794	10	24,376	13

表 1 用 EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒检测 LPS 或 PMA/离子霉素对 PBMC 细胞活性的影响 (死细胞百分比)

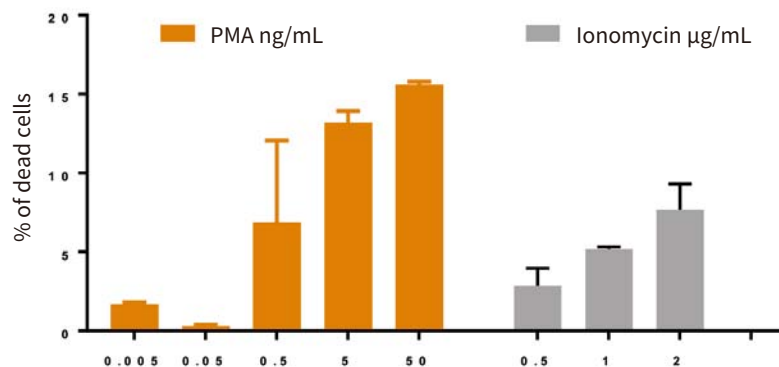


图 5 加大 PMA 和离子毒性浓度对细胞毒素的影响

整合 PBMC 活性与细胞因子分泌数据是对生物反应进行准确分析的最后阶段。采用 EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒检测，数据归一化通过 HTRF 技术测定细胞因子浓度除以活细胞数。

在图 6 中，细胞因子浓度用活细胞数表示，药理窗口和 IC<sub>50</sub> 如表 2 所示。如预期，由于地塞米松没有明显的细胞毒性，因此归一化前后的药理结果是相似的。

然而，归一化 PMA/离子毒素处理的 IL2 或 IFN $\gamma$  分泌对细胞活性值的影响显示了对 PMA 浓度的依赖 (图 7)，这点以前未检测到。这表明细胞因子分析 (或其他生物标志物) 与活细胞数量的归一化可以揭示相关的生物学响应。

## 结论

本研究明确了 PMA 和离子毒素对细胞毒性的影响，相反地塞米松没有显著的细胞毒性。用 EarlyTox 细胞完整性检测试剂盒进行细胞活性检测结果显示，PMA 或离子毒素具有明显的浓度反应效应。

用 Cisbio 生物分析方法评估细胞因子分泌和悬浮细胞如 PBMC 中药物对细胞毒性影响的分析方法简单易用且灵敏度高。结合使用 EarlyTox 细胞活性检测试剂盒在 Spectra-Max i3x 和 MiniMax 细胞成像仪能够进行 HTRF 细胞因子的定量和细胞活性评估。

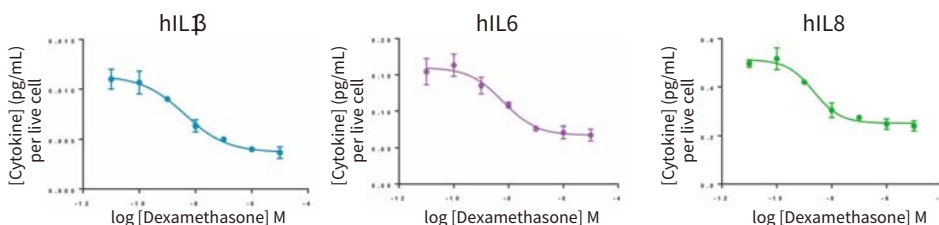


图 6 地塞米松对归一化细胞因子分泌的影响。TNF $\alpha$ , IL2 和 IFN $\gamma$  的剂量反应曲线未显示

	LPS stimulated PBMC (100% viability)				PMA/Iono stimulated PBMC (85% viability)	
	IL1 $\beta$	IL6	IL8	TNF $\alpha$	IL2	IFN $\gamma$
S/B	3.1	2.4	2.1	2.3	1.4	1.7
IC <sub>50</sub> dexa (M)	3.9 E-09	6.0 E-09	2.2 E-09	5.4 E-09	2.8 E-08	2.6 E-08

表 2 PBMC 刺激后的药理窗口 (信号/背景) 和 IC<sub>50</sub> 值

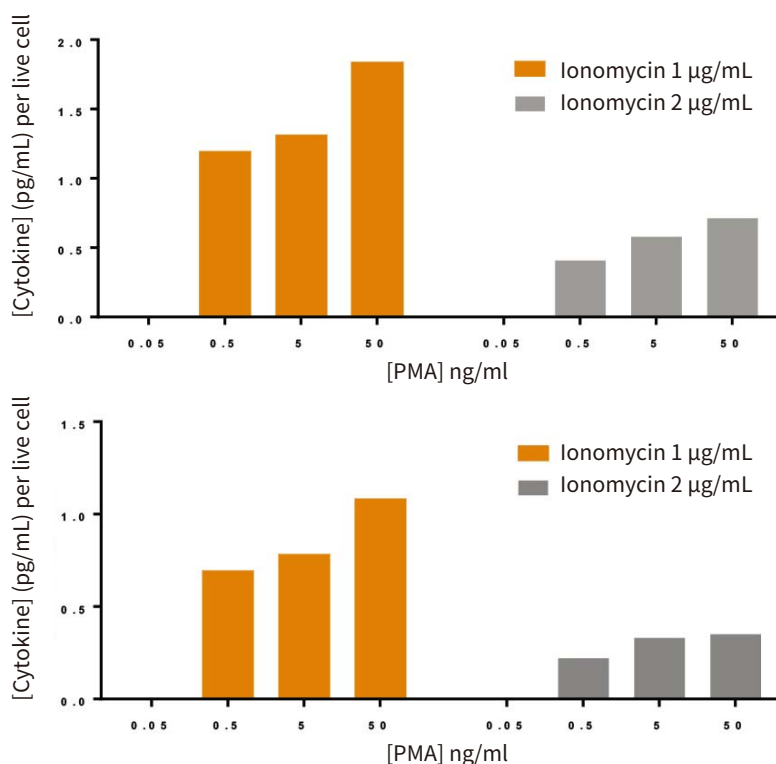


图 7 不同浓度 PMA/离子毒素对归一化细胞因子分析的影响。上图 hIL2 分泌归一化为活细胞数量，下图 hIFN $\gamma$  分泌归一化为活细胞数量



更多精彩内容  
尽在官方微信

## 美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586  
上海 电话: 86-21-3372 1088  
北京 电话: 86-10-6410 8669  
成都 电话: 86-28-6558 8820  
台北 电话: 886-2-2656 7585  
香港

www.MolecularDevices.com.cn  
Email: info.china@moldev.com  
传真: 86-21-3372 1066  
传真: 86-10-6410 8601  
传真: 86-28-6558 8831  
传真: 886-2-2894 8267  
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335  
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124  
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016  
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼  
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

