

## 应用实例

# 使用多能诱导干细胞(iPSC)来源的肝细胞球进行高内涵 3D毒性分析

### 背景介绍

在发育生物学和组织生物学中，3D细胞球建模方式能够加快转化研究进程，因此越来越受到人们的重视<sup>1-3</sup>。如何对3D样本进行更高通量的定量分析成为了热门研究课题。

在本实例中，MD公司建立并优化了一种分析方法，能够对人类多能诱导干细胞来源的3D肝细胞球进行共聚焦成像和毒性评估（图1）。

### 肝细胞球的形成

本实例使用的细胞为：

- 人类多能诱导干细胞<sup>4</sup>来源的肝细胞 iCell Hepatocytes 2.0 (Cellular Dynamics International)；
- HepG2细胞 (ATCC)。

#### 操作流程

- 1、按照标准操作流程将冻存细胞复苏；
- 2、iCell Hepatocytes 2.0 铺板进行2D培养；
- 3、贴壁细胞用Accutase酶消化后与Geltrex 基质(ThermoFisher Scientific)混合，细胞混合液以1000 cells/well的密度种植在低吸附成球孔板中(InSphero or Corning)；
- 4、将孔板以300 g转速离心2分钟使细胞沉淀并去掉基质中的气泡，然后将孔板放入细胞培养箱，在37°C, 5% CO<sub>2</sub>条件下进行培养。培养HepG2 细胞无需加入基质；
- 5、培养24-48小时后细胞球形成。

### 使用免洗染色法进行肝毒性评价

- 1、用肝毒性测试化合物处理细胞球72小时
- 2、用溶解于无菌PBS中的三种荧光染料对细胞球进行染色。三种染料的浓度分别为：

- 2  $\mu$ M calcein AM,
- 3  $\mu$ M EthD-1,
- 10  $\mu$ M Hoechst 33342 (Life Technologies).

此外，为了评价化合物对凋亡信号的激活和对线粒体形态的影响，所用的染料浓度分别为：

- 7.5  $\mu$ M CellEvent Caspase 3/7
- 200 nM MitoTracker Orange (Life Technologies)

### 特点

- 使用人类多能诱导干细胞来源的肝细胞形成肝细胞球
- 对体外筛选的3D模型进行肝毒性评价
- 3D图像分析过程中对目标样品进行识别和分割，以达到最佳分割效果

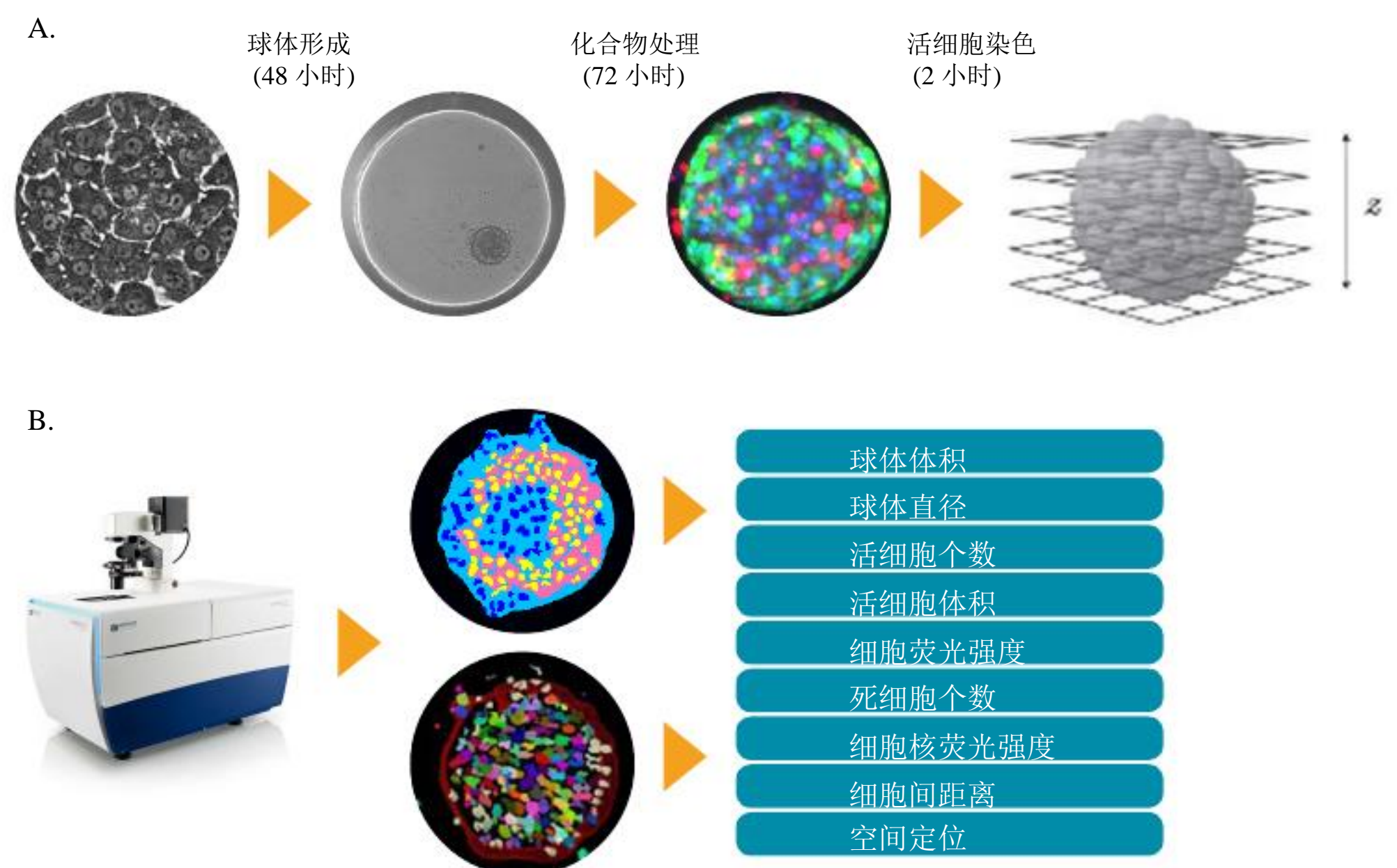


图 1. 利用人类多能诱导干细胞来源的微组织3D肝脏球进行肝毒性分析

(A) 在3D培养之前 iCell肝细胞需要先在2D模式下培养7天，当细胞球形成后，用化合物处理肝脏微组织72小时，然后染色2小时并采集图像。使用ImageXpress Micro 共聚焦成像系统 (ImageXpress Micro Confocal system) 对样品进行Z轴层扫

(B) 利用Z轴层扫得到的图片设置2D和3D图像分割参数，并利用该参数对3D样品核心表型特征进行量化分析

将染料加入细胞球培养体系中孵育2小时，然后采集图像。染料无需洗脱，加样过程小心谨慎，避免损伤细胞球而造成细胞球解体或偏离原位。典型的细胞球染色结果如图2所示。

## 高通量3D图像的采集和分析过程

采用ImageXpress® Micro 共聚焦高内涵成像系统(Molecular Devices)采集图片，具体设置如下：

- 物镜种类--10倍镜和20倍镜
- 层扫间距--5-10  $\mu\text{m}$
- 层扫范围--100-120  $\mu\text{m}$
- 层扫起始位置--多孔板孔底

所有的结果中都包含有2D maximum投射图像，分析过程中可以对这些图像进行保存和调用。

## 识别并分析3D样品

使用MetaXpress® 高内涵图像采集分析软件对3D图像进行分析。CME用户模块编辑器中新增了3D分析模块(图3)，该模块能够对3D结构的体积、荧光强度、距离等参数进行量化并对图像进行批量分析。其中“Find Spherical Objects”功能可以对目标结构的形态学参数（最小和最大宽度，最小和最大Z轴层数）和目标结构与背景之间荧光强度的差值进行自定义设置，对不同大小的目标结构（小到细胞器，大到多细胞团）进行定义。

比如将形态参数设定为：

- 细胞核宽度范围--5-15  $\mu\text{m}$
- 细胞核层数--1-2层
- 细胞核与背景的荧光强度差--200 荧光单位
- 肝细胞球宽度范围--100-300  $\mu\text{m}$
- 肝细胞球层数--5-7层
- 肝细胞球与背景的荧光强度差--400 荧光单位

分析结果包括每个目标结构的球体体积、直径（或平均体积、平均直径），以及特定荧光通道中球体的总荧光强度和平均荧光强度等参数。

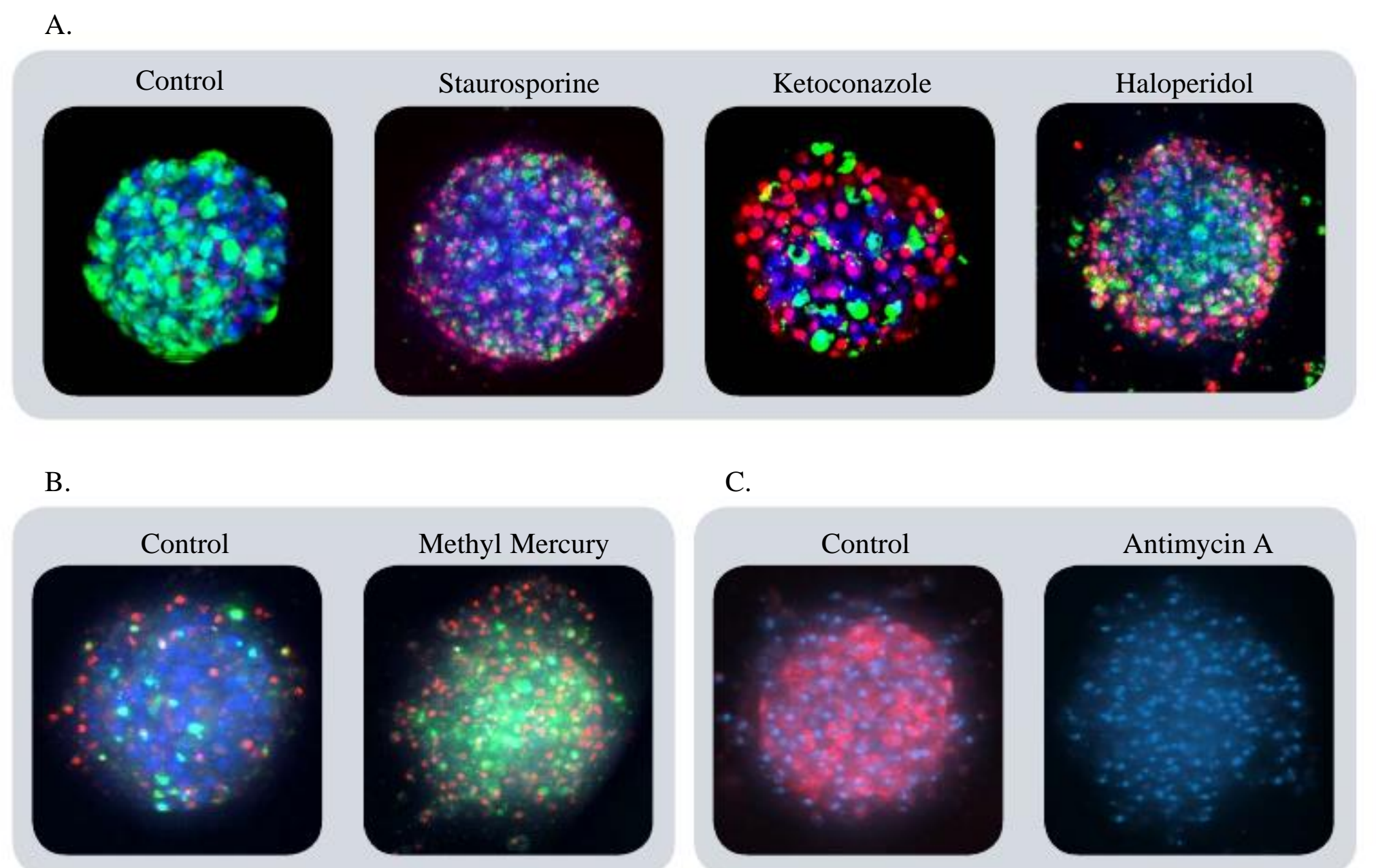


图 2. 不同标记物对细胞球的染色结果

(A) 分别用 1  $\mu\text{M}$  staurosporine（十字孢碱），30  $\mu\text{M}$  ketoconazole（酮康唑）或 30  $\mu\text{M}$  haloperidol（氟哌啶醇）处理细胞球72小时，然后用 calcein AM (绿色)，Hoechst (蓝色)，EthD-1 (红色) 荧光染料对细胞球进行染色并成像。

(B) 用CellEvent Caspase 3/7(绿色)，EthD-1 (红色)，Hoechst (蓝色)荧光染料对细胞球进行染色，在图中可以清晰地看到细胞凋亡现象。与对照组相比，经过1  $\mu\text{M}$  methyl mercury (甲基汞)处理24小时的细胞球中凋亡细胞（绿色）的数量大大增加。

(C) 用3  $\mu\text{M}$  antimycin A (抗霉素A) 处理细胞球，然后用 MitoTracker Orange (红色)，Hoechst (蓝色)荧光染料对细胞球进行染色并成像。抗霉素A破坏了线粒体膜的完整性，因此实验组中没有出现线粒体的染色结果。

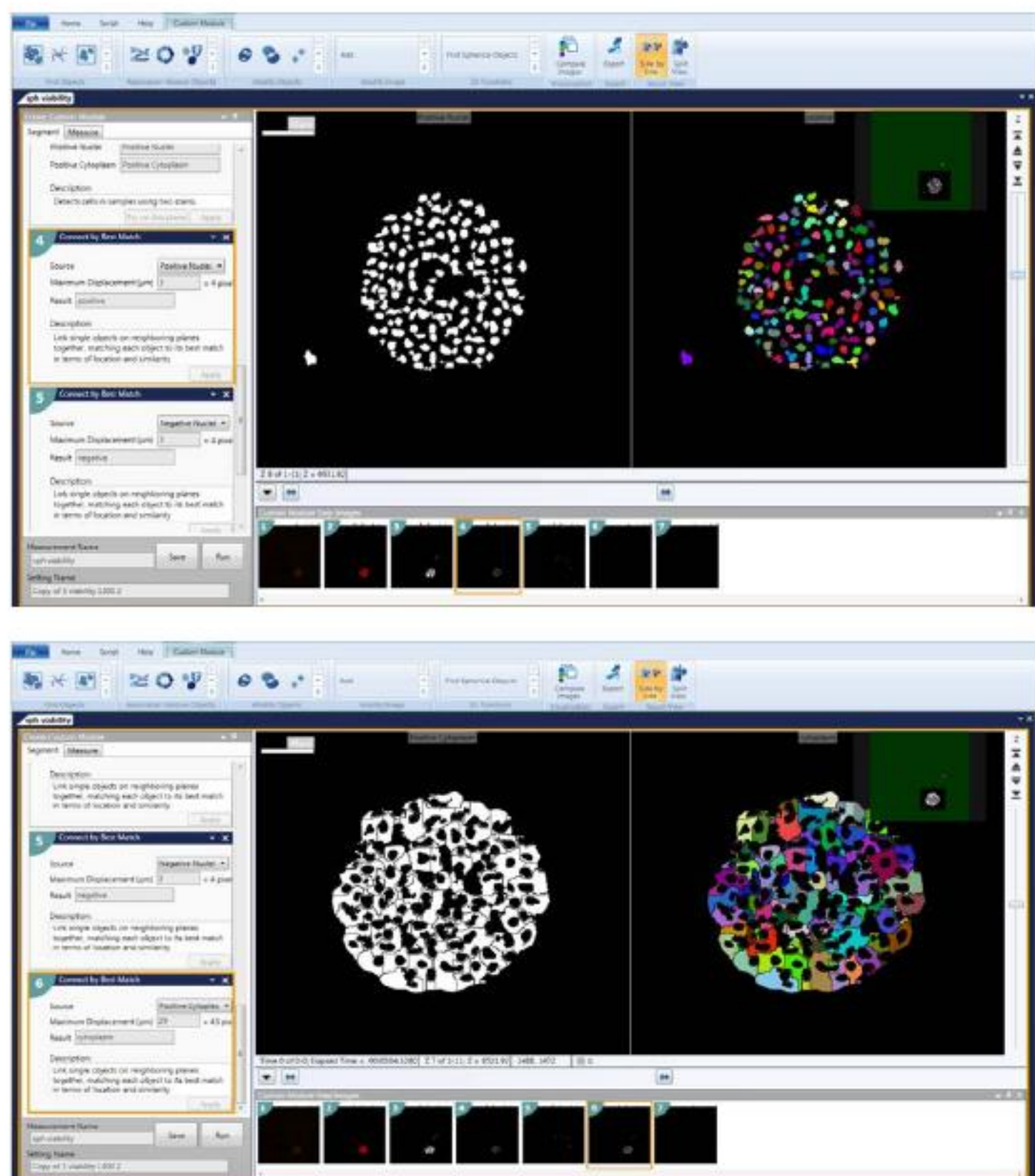


图 3.利用CME用户模块编辑器对细胞球进行识别

设置好参数后，即可对细胞球进行分析，分析内容包括细胞计数、单细胞表型分析、细胞核分析、特定标记物下细胞质的阳性阴性分析等

“Find Spherical Objects”功能还可用于识别单个细胞和细胞核或利用适当的特征将不同的单细胞区别开来。此外，3D分析模块可以按照用户自定义选项“Connect by Best Match”, “Connect by Touching”, 和 “Do Not Connect Objects”将不同层面的目标结构连接起来。

首先对Z轴层扫中的每层图片按照2D图片进行分割、分析并得到细胞核个数，细胞死/活和细胞分类等参数的测量值；其次利用用户定义的目标结构的最大范围将其连接起来。如：

- 细胞核最大范围 3-6  $\mu\text{m}$
- 细胞质最大范围 20-30  $\mu\text{m}$

最终，在3D结构中将细胞核或单细胞分割出来。整个过程中目标结构不会丢失也不会被重复计数。所有的细胞（如：calcein AM 阳性/阴性细胞；Ethidium homodimer 阳性/阴性细胞）都会被识别、被计数。

为了直观表现目标结构的整体/平均荧光强度、体积、直径、间距以及目标结构在三维空间中的定位等参数，可用不同颜色标记单个细胞。利用细胞球标记范围

（spheroid masking）对更小的结构进行计数，这些结构可能在标记范围（mask）之中或在标记范围（mask）之外。如：对每孔只含有一个细胞球的样品进行分析时，利用单细胞标记（single-cell masking）可以对所有细胞进行计数并将位于细胞球中和细胞球外的细胞区别开来。当细胞球不完整时，这种图形处理方式就显得十分重要。对每孔含有多个细胞球的样品（细胞球与基质共培养）进行分析时，这种图形处理方式可以定义每个细胞球的容量并得出均值。

图 4A 显示了不同层面的2D图像中 calcein AM 阳性细胞的细胞分类结果。利用“Connect by Best Match”功能可以将细胞在3D空间中连接起来。相同的方法可以分析 ethidium homodimer 阳性/阴性细胞(细胞死/活分析)也可以分析线粒体、荧光强度、细胞凋亡还可以分析特定染料和标记物。

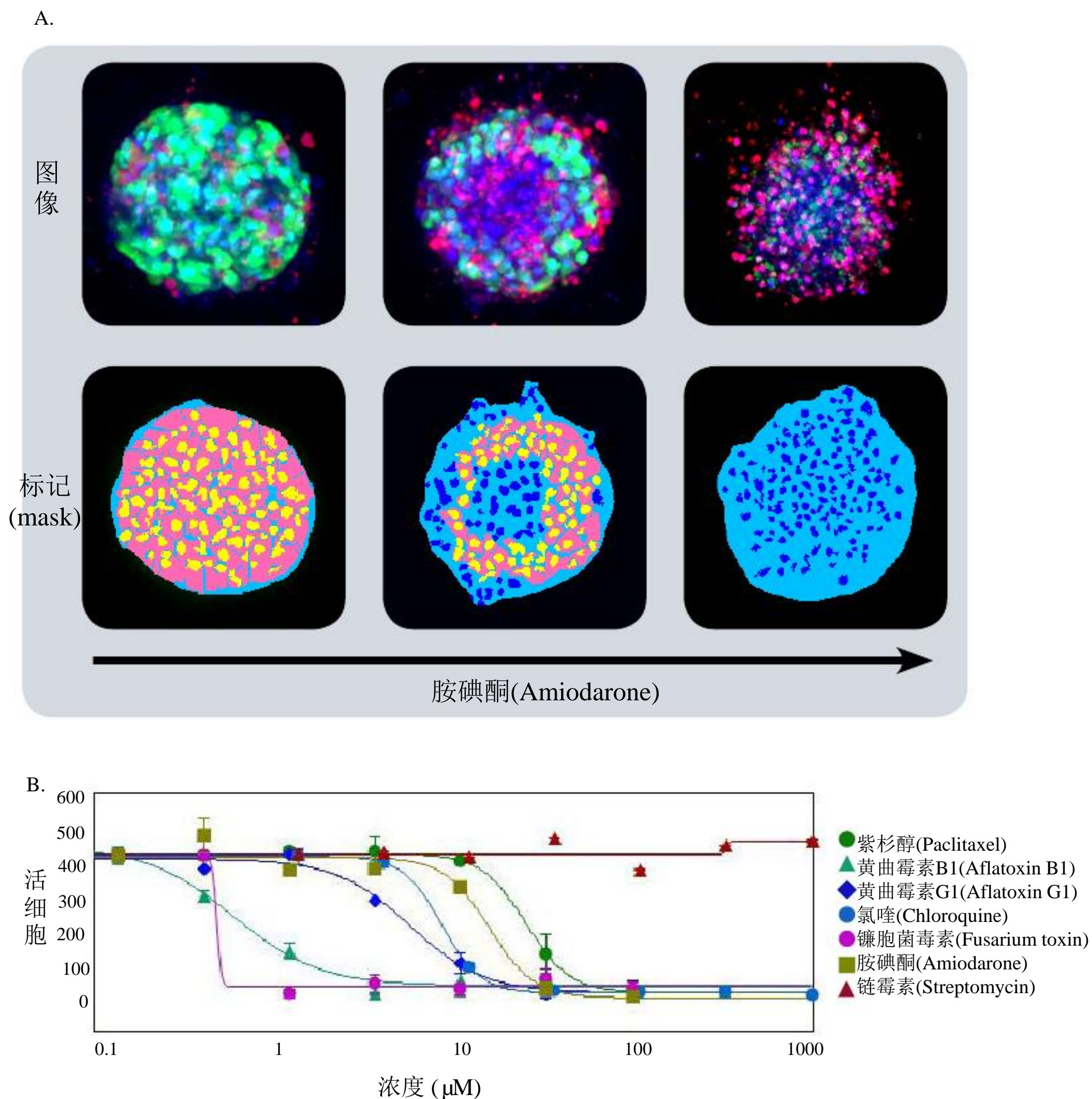


图 4. 化合物处理后细胞球表型的变化

(A)用一定浓度梯度的肝毒素化合物胺碘酮(amiodarone)处理多能诱导干细胞来源的肝细胞球，然后用 calcein AM (绿色), Hoechst (蓝色), EthD-1 (红色)荧光染料对细胞球进行染色。图像分析后的mask结果如图所示。

(B) 各个化合物的剂量效应曲线

