

# 使用 xCELLigence RTCA eSight 实现巨噬细胞吞噬作用的实时可视化和定量分析

## 作者

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

Nancy Li,  
Geetha Subramanian,  
Xiaobo Wang, 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

## 前言

吞噬作用是一种特定的内吞作用类型，可将大型 ( $\geq 0.5 \mu\text{m}$ ) 固体颗粒摄入名为吞噬体的质膜囊泡中。吞噬的颗粒可能包括大分子聚集体、其他细胞颗粒物、凋亡细胞，甚至整个微生物<sup>[1]</sup>。因此，吞噬作用是免疫系统清除病原体以及每天在组织稳态期间周转的数十亿个细胞的关键机制<sup>[2]</sup>。尽管内皮细胞和成纤维细胞等其他类型的细胞可以特异性吞噬凋亡小体，但巨噬细胞是具有广泛特异性的主要功能性吞噬细胞之一。

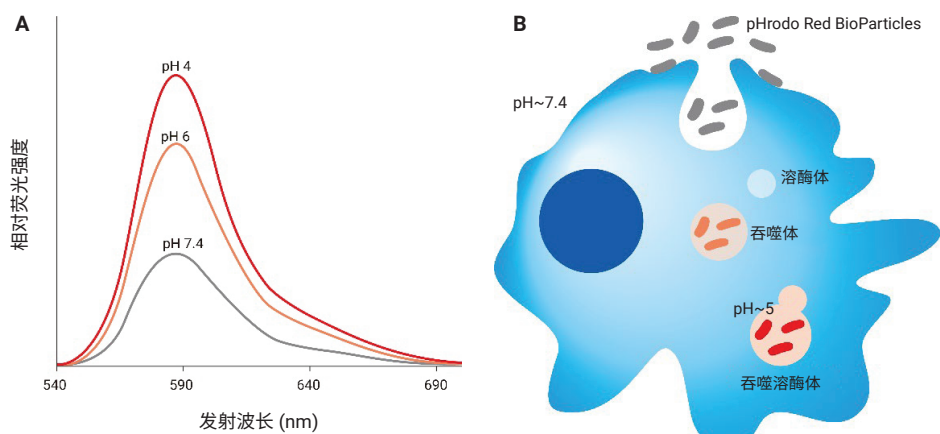
当吞噬细胞表面的调理性受体或模式识别受体与目标颗粒或细胞上的特定配体结合时，会触发吞噬作用。这种结合可激活吞噬细胞信号转导通路，驱动肌动蛋白细胞骨架重塑，最终形成伪足和吞噬体。随后吞噬体-溶酶体融合使囊泡酸化，使其内容物被降解和回收<sup>[3]</sup>。

考虑到吞噬作用的生理学意义及其在治疗干预方面的潜力，通过一种实时体外检测动态追踪整个过程并用于筛选通路调节剂将大有裨益。本应用简报使用由巨噬细胞和偶联 pH 敏感的荧光染料的大肠杆菌细胞 (pHrodo™ Red 大肠杆菌 BioParticles) 组成的模型系统，展示了 Agilent xCELLigence RTCA eSight 实时成像平台在监测吞噬作用方面的实用性。

## 检测原理

eSight 仪器可以使用细胞阻抗和活细胞成像同时研究细胞健康和行为。当使用包含微金电极生物传感器阵列（集成于所有 96 个孔底部）的专用 eSight 微孔板时，实时阻抗测量可以追踪细胞数量、细胞大小、细胞-基底粘附强度和细胞-细胞相互作用（即屏障功能）的变化。位于微金电极生物传感器之间的显微镜观察窗口使 eSight 能够同时采集包括明场以及红色、绿色和蓝色荧光在内的活细胞图像。这种从两个正交的角度对相同的细胞群进行实时监测分析的能力，使得可以通过一次简单的实验提供初步结果和确证结果。此外，拥有两种独特的结果读数通常可以更细致地了解正在发生的生物学过程。

当实验只需基于图像进行分析时，可以在标准微孔板中运行 eSight 检测。本研究使用此方法追踪巨噬细胞的吞噬作用。在本实验中，我们将 RAW 264.7 巨噬细胞与大肠杆菌细胞（结合对 pH 敏感红色荧光染料）进行共孵育。这些 pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles 在标准组织培养基的中性 pH 值下保持无色，在被吞噬以及暴露于吞噬溶酶体的酸性管腔后会显示红色荧光<sup>[4]</sup>（图 1）。通过无干扰和实时检测红色荧光的出现可以定量分析吞噬作用的程度和速率，从而为探索受体-配体相互作用和通路调节剂等创造了机会。

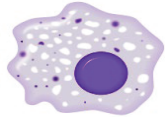


**图 1.** 使用 pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles 定量分析吞噬作用。(A) 随着 pH 从 7.4 变为 4.0，pHrodo Red 染料的荧光强度显著增强。(B) pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles 在细胞外环境的中性 pH 值下为无色，但一旦暴露于吞噬溶酶体的酸性环境就会显示红色荧光

## 材料与方法

在 37 °C/5% CO<sub>2</sub> 下，将小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞置于添加了 10% FBS (Gibco, 部件号 10099-141) 和 1% Pen/Strep (HyClone, 部件号 SV30010) 的 DMEM 培养基 (HyClone, 部件号 SH30024.01) 中进行维持培养和检测。将 RAW 264.7 细胞以指定的密度接种到 TC 处理的微孔板 (Corning, 部件号 3599) 中，并放置过夜，使其贴壁。第二天，以指定的密度添加溶解于安捷伦 XF DMEM 培养基 pH 7.4 (部件号 103575-100) 中的 pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles (赛默飞世尔科技, 部件号 P35361)。使用 eSight 对吞

噬作用进行 12 小时的实时监测（工作流程总结见图 2）。在每个孔中，每个通道（明场和红色荧光）分别采集四个视野图像，并且每 10 分钟采集一次图像。红色通道的曝光时间为 300 ms，而明场的曝光时间由 eSight 软件自动优化。在吞噬作用抑制实验中，将溶解于 DMSO 中并用生长培养基稀释的细胞松弛素 D (Life Technologies, 部件号 PHZ1063) 添加到包含 RAW 264.7 细胞的孔中。孵育 2 小时后，移除含有或不含细胞松弛素 D 的培养基，然后加入如前所述的 pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles。



RAW 264.7  
巨噬细胞

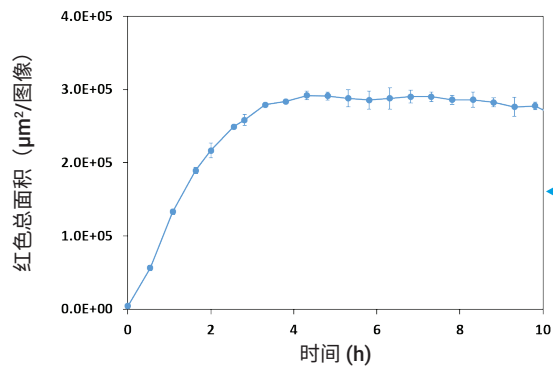
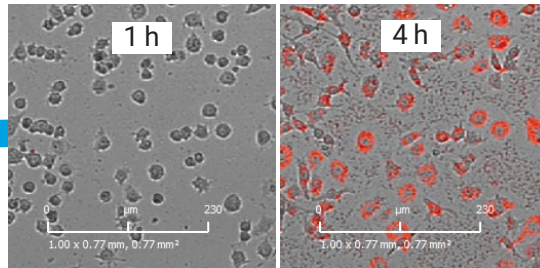
1. 将细胞接种至 96 孔微孔板中



2. 过夜孵育后，添加 BioParticles  
并将孔板放入 eSight



3. 活细胞成像



4. 数据绘图 + 分析

图 2. 用于动态监测吞噬作用的 eSight 工作流程

## 结果与讨论

### 实时观察细胞吞噬作用

将小鼠白血病 RAW 264.7 巨噬细胞以 10000 个细胞/孔的密度接种到 96 孔微孔板中。孵育过夜后，轻轻移除细胞培养基，加入含有 6.25  $\mu\text{g}$  pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles 的中性培养基。然后将孔板放入 eSight，以监测吞噬作用的进展。

加入 BioParticles 两小时后，在 RAW 264.7 细胞的细胞质内可检测到红色荧

光信号(图 3，下图)。含有大肠杆菌 BioParticles 但不含巨噬细胞的对照孔未显示红色信号。这与 BioParticles 发出荧光需要吞噬溶酶体的酸性环境这一事实相符(图 3，上图)。

### 实时定量细胞吞噬作用

继续使用 10000 个巨噬细胞/孔和 6.25  $\mu\text{g}$  BioParticles，比较在 0、1 和 4 小时所采集的图像，结果表明，吞噬作用的进展非常明显(图 4A)。绘制孔底的总红色表面积与时间的关系图(图 4B)，作为这

一过程的一种定量方法。该信号(取决于是否存在巨噬细胞)在大约前 4 小时内稳步增强，然后进入平台期。针对这一平台期有几种不同的解释。(1) 到 4 小时的时间点时，巨噬细胞已经吞噬了孔底的所有 BioParticles。(2) 在 4 小时的时间点，BioParticles 仍然存在，但巨噬细胞已停止摄入它们。(3) 在 4 小时的时间点，BioParticles 仍然存在，巨噬细胞继续摄入它们，但不再转化为红色表面积的扩大。(换言之，到 4 小时时，摄入的 BioParticles 量多到足以使 BioParticles

每孔 6.25  $\mu\text{g}$  pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles

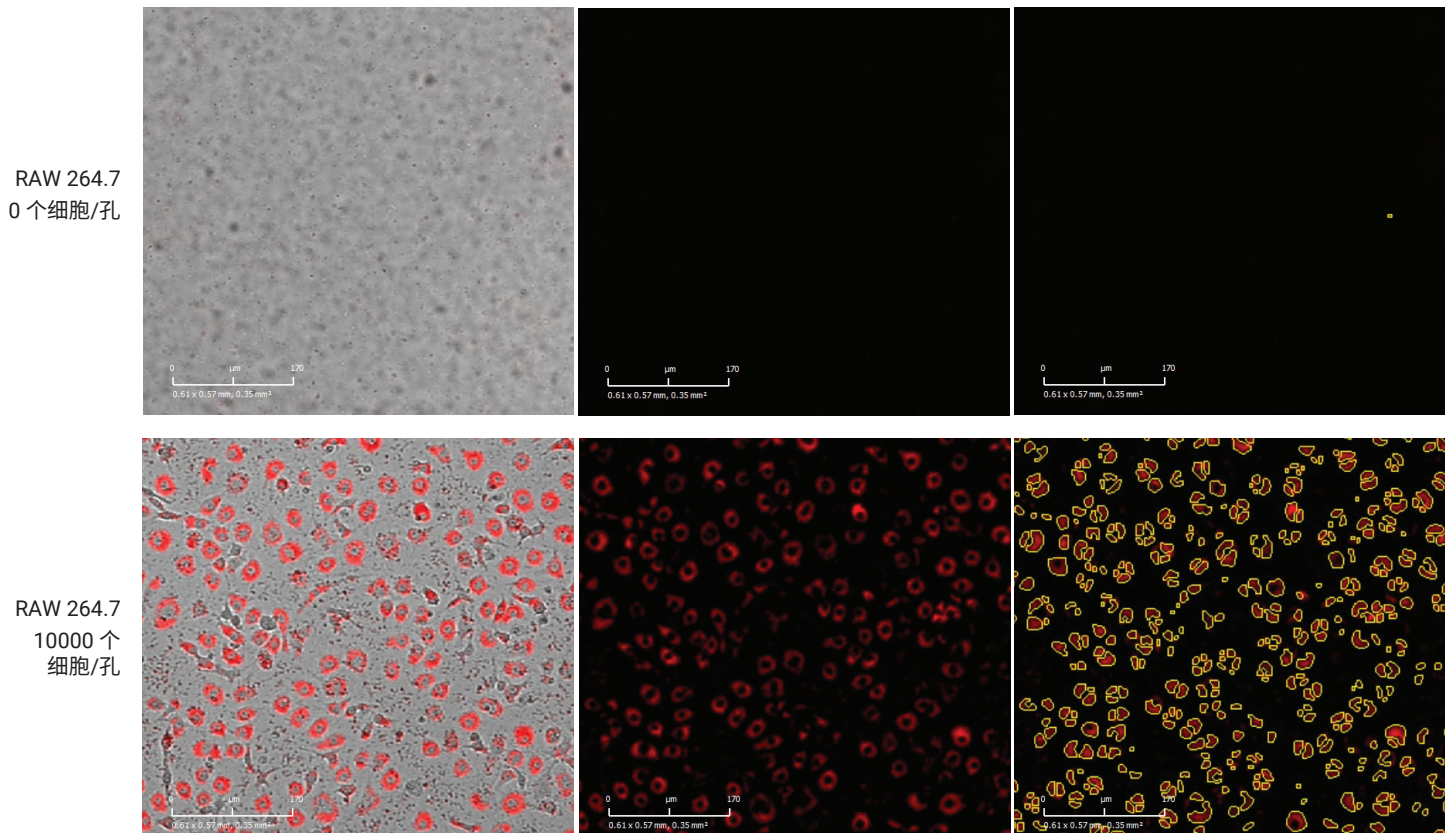
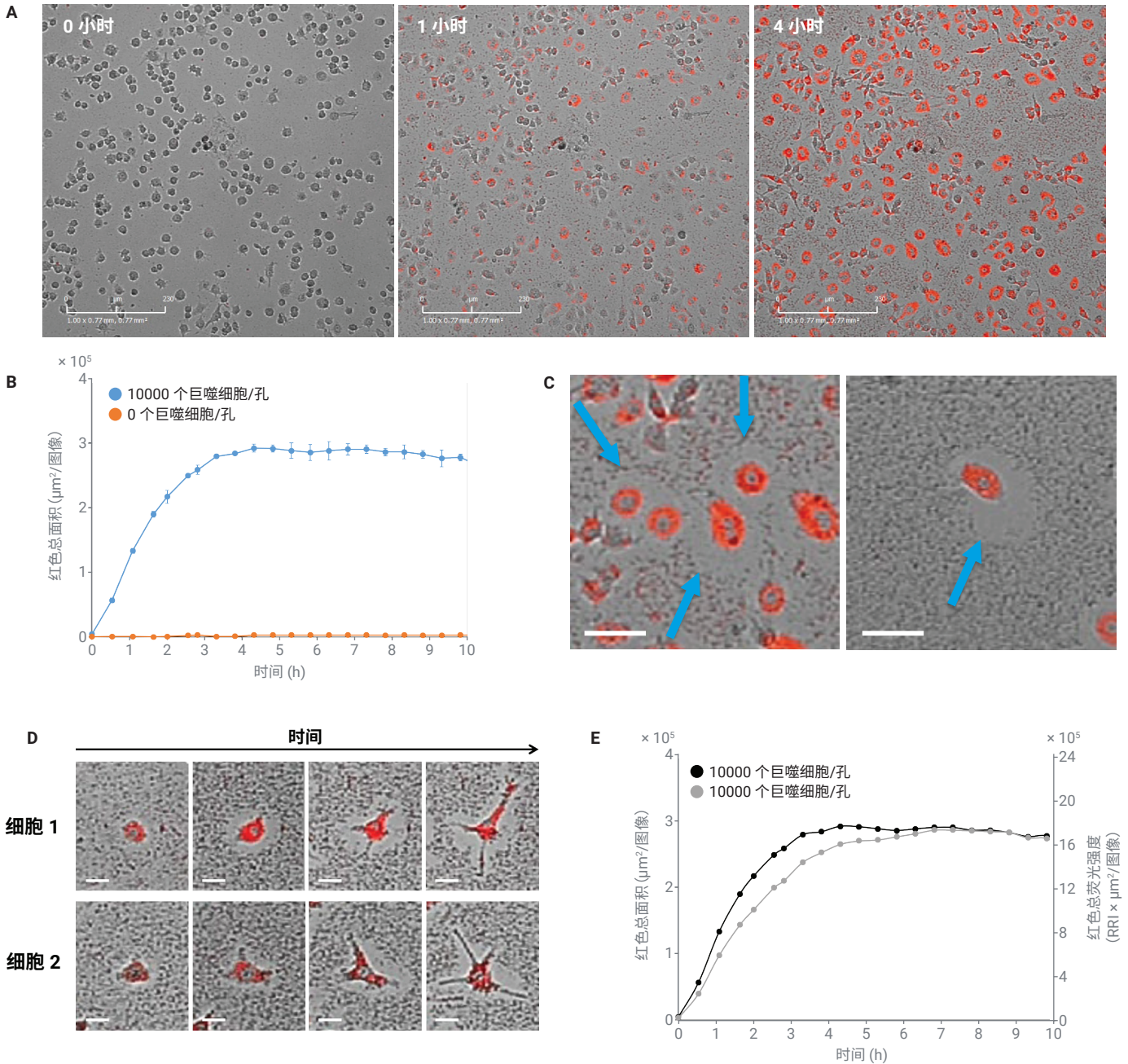


图 3. 将 6.25  $\mu\text{g}$  pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles 添加到不含 RAW 264.7 巨噬细胞的孔(上图)或包含 10000 个 RAW 264.7 巨噬细胞的孔(下图)中两小时后的吞噬作用成像结果。左图: 明场和红色荧光的叠加; 中图: 仅红色荧光; 右图: 红色荧光及其相应的分割 Mask (黄色轮廓)。比例尺 = 170  $\mu\text{m}$

RAW 264.7 (10000 个细胞/孔) + BioParticles (6.25  $\mu\text{g}/\text{孔}$ )



**图 4.** 吞噬作用动力学。RAW 264.7 巨噬细胞 (10000 个/孔) 暴露于 pHrodo Red 大肠杆菌 BioParticles (6.25  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ) 中。(A) 显示前四个小时内吞噬作用进展的图像。比例尺 = 230  $\mu\text{m}$ 。(B) 使用红色总面积定量分析吞噬作用的进展。正如预期的那样, 在没有巨噬细胞的情况下, eSight 软件检测不到任何红色荧光信号。(C) 左图: 在 4 小时的时间点, 大多数巨噬细胞周围存在明显的不含 BioParticles 的光晕。蓝色箭头指示其中三个光晕。右图: 当使用较低的巨噬细胞密度和较高的 BioParticles 浓度时, 光晕更加明显。比例尺 = 50  $\mu\text{m}$ 。(D) 单个巨噬细胞摄入其附近的 BioParticles 以产生光晕的延时图像。比例尺 = 25  $\mu\text{m}$ 。(E) 使用红色面积和红色强度监测的吞噬作用动力学的比较

或其消化产物占据巨噬细胞内部的最大可占用空间)。为了区分这三种可能性,在更高的放大倍数下查看图像。图 4C 中的左图表明,在 4 小时的时间点,孔底仍然存在游离的 BioParticles,使巨噬细胞之间的空间呈现点状。然而,在巨噬细胞附近存在“光晕”,其中含有极少或不含 BioParticles。这些光晕在不同的检测条件下都可以观察到,但在较低的巨噬细胞接种密度和高 BioParticles 浓度下更为突出(图 4C 的右图)。这些光晕的存在表明,红色面积信号的平台期可能仅仅是巨噬细胞吞噬了其附近 BioParticles 的结

果。由于 RAW 264.7 细胞仅表现出适度的运动性,因此它们的形态变化及其伸出的伪足使它们能够清除周围约 25  $\mu\text{m}$  较宽空间内的 BioParticles(图 4D)。

除了红色面积的数据统计外,还绘制了红光的总荧光强度\*与时间的关系图。虽然这两种分析方法得到的曲线形状相似(图 4E),但它们的动力学表现却略有不同,在红色面积图达到平台期后红色荧光强度图继续上升了 3 小时。

\* 总荧光强度是从孔底发出的所有红光的总和。因此,它反映了通过内吞途径吞噬和处理到暴露于酸性 pH 值的 BioParticles 的数量

### 吞噬作用的浓度依赖性

正如预期的那样,当以固定的巨噬细胞接种密度(10000 个细胞/孔)开展研究时,pHrodo Red 信号随着每孔添加的 BioParticles 总量成比例变化(图 5A)。当绘制总红色面积与时间的关系图时,吞噬作用的速率和总程度变化都取决于 BioParticles 数量(图 5B)。当绘制这些曲线下面积与 BioParticles 数量的关系图时,在采集范围内明显呈线性(图 5C)。

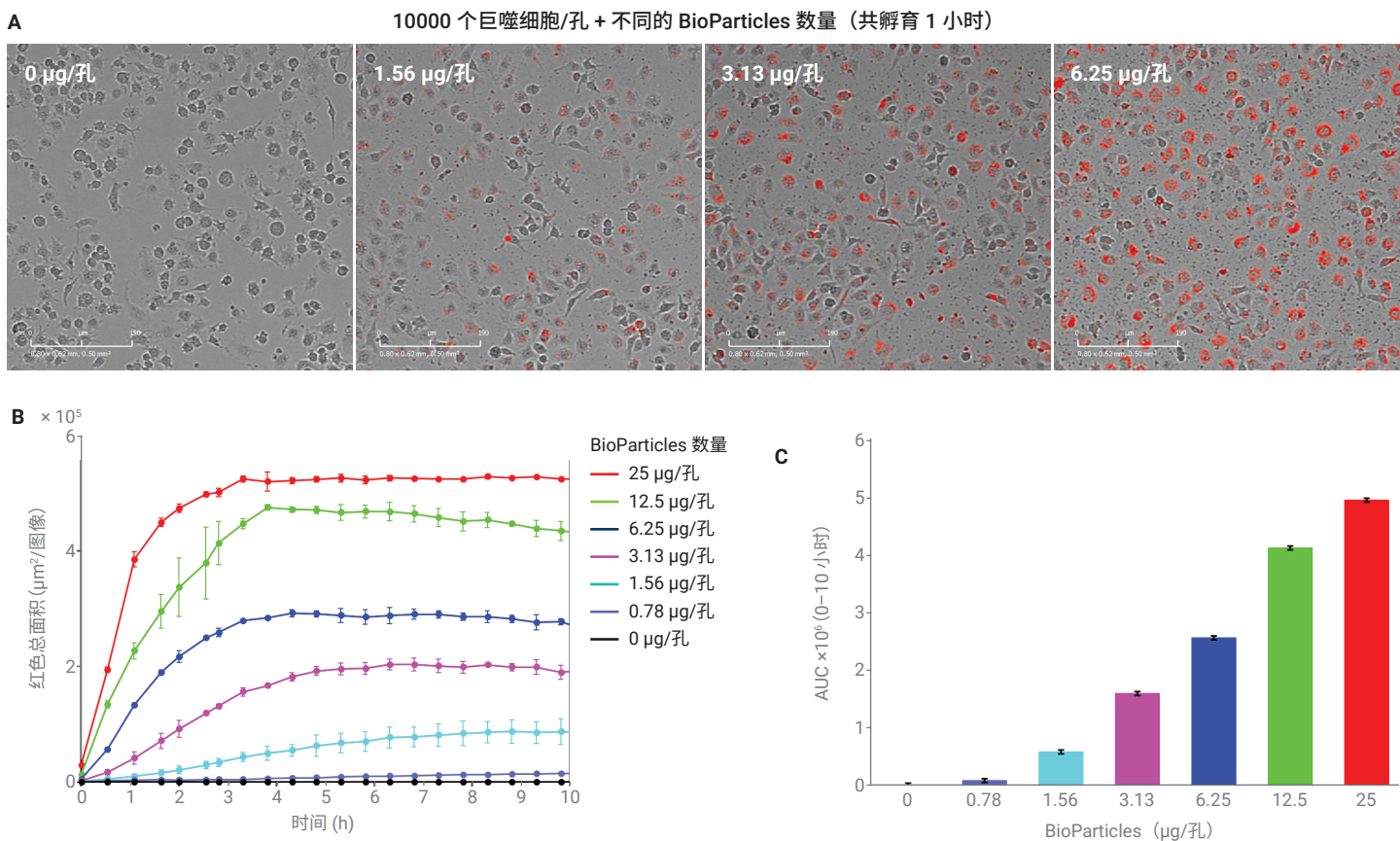


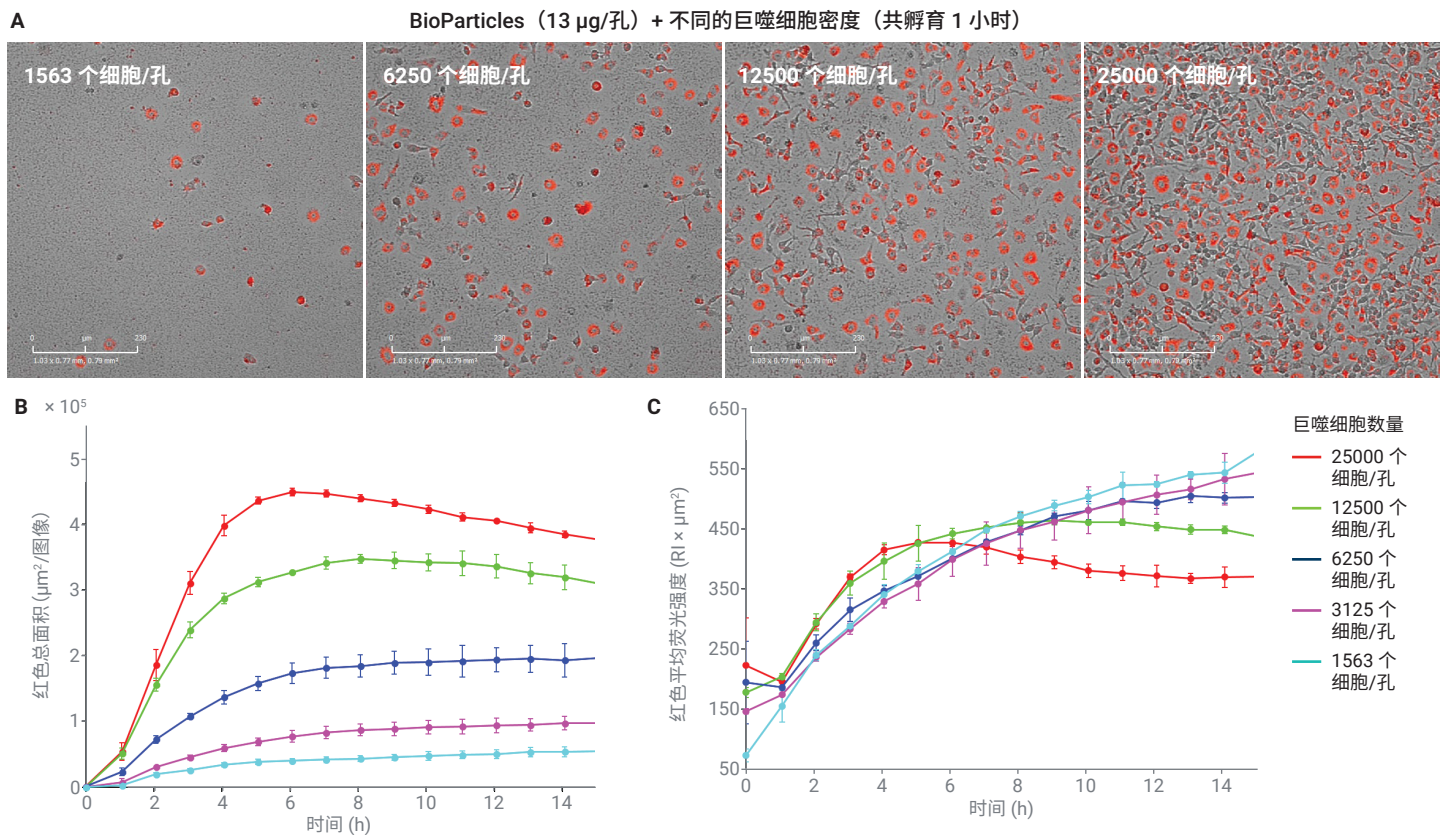
图 5. 吞噬活性对 BioParticles 数量的依赖性。(A) 与不同数量的 BioParticles 共孵育一小时后巨噬细胞 (10000 个细胞/孔) 的图像。比例尺 = 190  $\mu\text{m}$ 。(B) 七种不同 BioParticles 数量下总红色荧光面积的实时变化。(C) 图 B 数据的曲线下面积 (AUC) 分析

同样，当 BioParticles 的数量保持恒定 (13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 时，pHrodo Red 信号与巨噬细胞接种密度成正比 (图 6A)。当绘制总红色面积与时间的关系图时，增加巨噬细胞的数量会使吞噬作用的速率和总程度均增大 (图 6B)。我们还使用红色平均荧光强度分析了本试验中吞噬作用的进展 (图 6C)。该参数报告了整个细胞群中

单个巨噬细胞的平均亮度，因此表明了每个细胞通过吞噬溶酶体摄入和处理的 BioParticles 数量。图 6C 表明，当巨噬细胞密度为 1563–6250 个细胞/孔时，细胞在前 15 小时内稳步摄入 BioParticles。相比之下，当巨噬细胞密度为 12500 或 25000 个细胞/孔时，巨噬细胞的亮度在第 4–8 小时为平台期。到 15 小时的时间点

时，这些高接种密度的巨噬细胞中每个细胞的亮度较低，这与巨噬细胞:BioParticles 高比例下每个巨噬细胞吞噬的颗粒应该较少相符合。

对于该数据集，同时分析红色总面积 (图 6B) 和红色平均荧光强度 (图 6C) 可以提供比单独使用任何一种分析方法都更详细的信息。



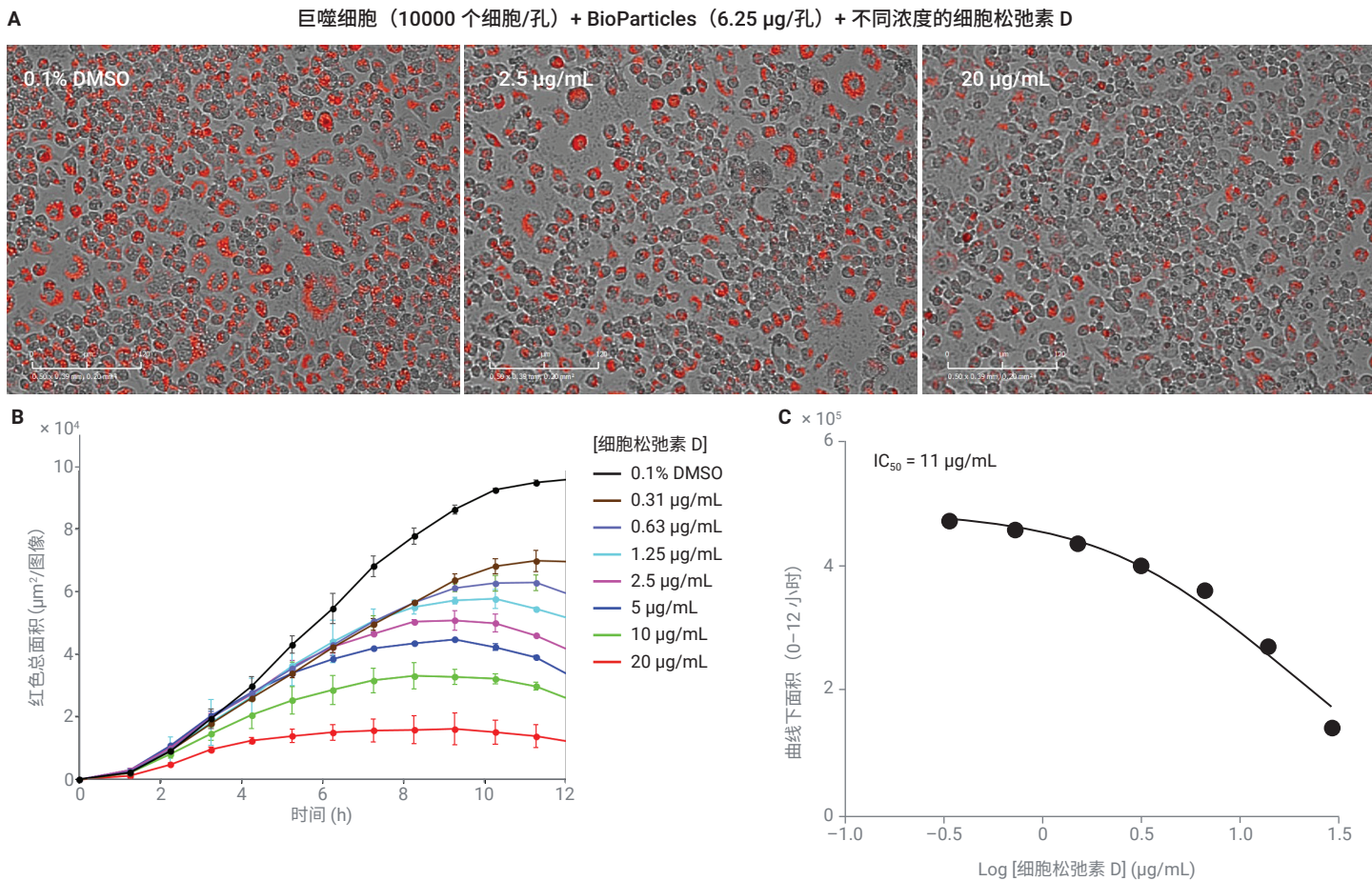
**图 6.** 吞噬活性对巨噬细胞数量的依赖性。(A) 与 13  $\mu\text{g}/\text{孔}$  的 BioParticles 共孵育一小时后不同接种密度的巨噬细胞的图像。比例尺 = 230  $\mu\text{m}$ 。(B) 五种不同巨噬细胞接种密度下总红色荧光面积的实时变化。(C) 五种不同巨噬细胞接种密度下红色平均荧光强度的实时变化

## 细胞松弛素 D 抑制吞噬作用

为了评估 eSight 筛选和表征调节吞噬作用的化合物的能力，我们分析了细胞松弛素 D 的影响。细胞松弛素 D 是肌动蛋白聚合的强效抑制剂，因此将其作为吞噬作用的通用抑制剂。在细胞生长培养基

中加入不同浓度的细胞松弛素 D 将 RAW 264.7 细胞处理 2 小时，然后在清洗后与悬浮于中性培养基中的 BioParticles (6.25  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ) 进行共孵育。然后将孔板放入 eSight，以监测吞噬作用的进展。与 DMSO 对照相比，细胞松弛素 D 抑制了

吞噬作用，并表现出剂量依赖性（图 7A 和 7B）。绘制实时曲线下面积与药物浓度的关系图，获得剂量-响应曲线， $\text{IC}_{50}$  为 11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （图 7C）。由于细胞松弛素 D 的溶解性较差，因此不可能出现有助于填充曲线下渐近线的较高药物浓度。



**图 7.** 细胞松弛素 D 抑制 RAW 264.7 巨噬细胞对 BioParticles 的吞噬作用。(A) BioParticles (6.25  $\mu\text{g}$ ) 与用不同浓度的细胞松弛素 D 预处理的巨噬细胞 (10000 个细胞/孔) 共孵育 2 小时后的图像。比例尺 = 120  $\mu\text{m}$ 。(B) 总红色荧光面积的实时变化，证明了细胞松弛素 D 的剂量依赖性影响。(C) 剂量-响应曲线。绘制图 B 的曲线下面积与细胞松弛素 D 浓度的关系图。 $\text{IC}_{50} = 11.00 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $n = 3$ )

## 结论

考虑到吞噬作用在微生物防御、伤口愈合、发育和组织稳态中发挥的关键作用，开发了大量检测方法来研究体外吞噬作用也就不足为奇。主要的传统检测方法包括显微镜、流式细胞术或分光光度法/荧光光度法。在这些检测方法中，吞噬细胞通常与经标记的组成型荧光颗粒（葡聚糖、酵母聚糖、大肠杆菌）孵育一定的时间，然后进行终点分析。通过显微镜定量分析吞噬作用通常需要进行细胞固定，然后手动计算每个细胞内的颗粒数量，这项工作十分繁琐，不适合高通量研究。通过荧光光度法定量分析吞噬作用需要在分析之前将未摄入的颗粒淬灭或去除。对这些检测方法进行改进，将颗粒与酶相连，在固定和透化细胞后，就可以通过比色底物进行检测，但这仍然需要大量的手动操作时间。基于流式细胞术的检测方法也是如此，在分析之前必须从孔底收集吞噬细胞。与上述所有传统方法相比，本文介绍的 eSight 检测仅需将吞噬细胞与底物混合，然后便无需执行任何手动处理步骤。这种 eSight 吞噬作用检测方法的另一个显著特征是其连续性。实时追踪吞噬作用可以将分析集中于合适的时间区域。例如，图 5B 中的数据表明，对细胞吞噬

速率的分析应仅限于前 1–2 小时。这之后，暴露于 12.5  $\mu\text{g}$  或 25  $\mu\text{g}$  BioParticles 的细胞不再表现吞噬作用。这与传统的终点方法形成了鲜明的对比，后者仅提供吞噬过程的快照，缺乏背景信息。

eSight 安装于标准组织培养箱中，这意味着吞噬作用检测可以在稳定的生理相关条件下进行，而无需在培养箱、工作台和分析仪器之间来回移动样品。eSight 能够在三个专用 96 孔电子板（也可提供阻抗信息）和两个标准 96 孔微孔板中同时独立地进行检测，因此适用于高通量吞噬作用研究。

eSight 采集图像后，可以使用其直观的软件快速提取有意义且实用的定量信息。使用不同的结果输出分析相同的数据集，例如图 6B 和 6C 中使用的表面积和平均亮度参数，通常可以更全面、更细致地了解细胞的行为方式。除了此处分析的两个参数外，eSight 软件还可提供 10 多种可用于研究吞噬作用的其他类型的输出结果。

本文所述的 eSight 吞噬作用检测涉及的工作流程比传统方法更简单，并且可以在无干扰的条件下实时追踪细胞吞噬作用。检测形式灵活、易于优化，并且适用于药物研发工作以及基础研究/机制研究。

## 参考文献

1. Stillwell, W. An Introduction to Biological Membranes Composition, Structure and Function Book, 2nd Edition; **2016**
2. Chow, A.; Brown, B. D.; Merad, M. Studying the Mononuclear Phagocyte System in the Molecular Age. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*(11), 788–798
3. Platt, N.; Fineran, P. Lysosomes and Lysosomal Diseases. *Methods in Cell Biology* **2015**, *126*, 1–376
4. pHrodo Red and Green BioParticles Conjugate for Phagocytosis. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P35361?SID=srch-srp-P35361#/P35361?SID=srch-srp-P35361>

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44230.6165162037

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，2021  
2021年4月16日，中国出版  
5994-3019ZH-CN

