

Akura™ 96 和 384 球体微孔板中的 3D 微组织 细胞活力检测

孔位置和生物学重复数量的影响

Promega Corporation and InSphero Inc.



试剂盒：

CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (目录号 G9681)

所需材料：

- Akura™ 96 球体微孔板 (InSphero , 目录号 CS-09-004-03)
- Akura™ 384 球体微孔板 (InSphero , 目录号 CS-09-003-02)

摘要

本文描述了在 96 孔和 384 孔 Akura™ 微孔板中应用 CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 检测 3D InSight™ 肝脏微组织 (InSphero) 活力的方法和准确度。

简介

生物学通常由细胞内大量生化反应的复杂序列定义，也可由细胞与邻近细胞的相互作用定义。在高级生物体中，细胞间相互作用对于实现协调一致的组织或器官特异性功能至关重要。这种重要的细胞间相互作用只能通过三维细胞培养模型在体外重现，最好是无支架系统。当以合适的形式培养时，如悬滴法或微重力旋转容器系统，大多数原代细胞和癌细胞自动聚集成球体。

因为球体培养现在采用标准化的微量滴定板格式，并且可以通过机器人系统处理，所以球体培养在生物制药研究中迅速普及。尽管与 2D 培养相比，球体培养的生物学更复杂，但经某些修饰后仍可进行生化检测。

细胞活力是体外细胞筛选中检测毒性或细胞增殖的关键生物标志物。ATP 是细胞活力和代谢的综合指标，在筛选中应用广泛。CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 采用“添加 - 混合 - 测量”的方便格式，是评估球体培养物活力的理想工具。该试剂盒由能够从整个细胞团中释放 ATP 的强效裂解组分组成。底物混合物含有萤光素酶，在 Mg^{2+} 和 ATP 存在下，能将萤光素转化为氧化萤光素，并同时以发光信号释放能量。发光强度与所含 ATP 量成正比，而 ATP 量与细胞活力和代谢活性成正比。

随着 3D 球体在毒理学发现筛选中的接受度越来越高，亟需可与机器人处理兼容的高通量板格式。先前的研究表明，CellTiter-Glo® 3D Assay 在 3D 细胞培养中的肝毒性预测能力高于 96 孔板中的 2D 细胞培养。本应用说明比较了含 3D InSight™ 肝脏微组织（InSphero）的 Akura™ 96 孔与 384 孔板中不同肝脏安全性化合物（安全或有药物性肝损伤；DILI）的 ATP 测量值也评估了其他参数，包括两种孔板处理组位置随机化的影响、Z'因子计算以及 4 个与 8 个生物学重复的 IC₅₀ 值是否一致。

Z'（Z-prime）统计值是被广泛用作评估检测质量的指标，表示阳性和阴性对照分布的分离程度。Z'因子描述阳性和阴性对照的分离程度，并提示假阳性或假阴性的可能性。0.5 和 1 之间表明检测方法非常适合筛选应用，0 和 0.5 之间为可能适合，小于 0 表明检测方法不太适合在高通量背景下使用。

方法

微组织形成和药物处理

在 InSphero Akura™ PLUS 悬滴培养板中，原代人肝细胞与原代人 Kupffer 细胞和内皮细胞共聚集，形成 3D InSight™ 肝脏微组织。聚集后，将微组织转移（“滴”）至 Akura™ 96 孔或 384 孔微孔板中。将肝脏微组织与已知的安全（阴性对照）或 DILI 化合物（氯丙嗪、酮康唑、曲格列酮、罗格列酮、托卡朋或恩他卡朋）共同孵育 14 天，并在第 5 天和第 9 天完全更换培养基。各化合物的最高试验浓度为 100μM，然后以半对数稀释法稀释，得到总共 7 个试验浓度（表 1）。在 96 孔板中，每个处理组有 4 个生物学重复（DMSO 溶剂对照有 8 个重复）。在 384 孔板中，每个处理组有 8 个生物学重复（DMSO 溶剂对照有 32 个重复）。

表 1.DILI 化合物浓度。本实验选择的化合物有已知有毒的代表性药物（氯丙嗪、酮康唑、曲格列酮、罗格列酮、托卡朋）和已知无毒的代表性药物（恩他卡朋），其中部分药物具有结构相关性（托卡朋和恩他卡朋）。根据先前研究和 C_{max} 选择浓度。选择半对数稀释所得的 7 个点的浓度曲线。

化合物	储备液 (mM)	最大值 (μM)	稀释法
氯丙嗪	25	100	半对数
酮康唑	40	100	半对数
曲格列酮	30	100	半对数
罗格列酮	30	100	半对数
托卡朋	40	100	半对数
恩他卡朋	50	100	半对数

用 100μM 氯丙嗪处理额外的 8 个微组织孔板，用于计算 Z' 因子。为确定微孔板的微孔位置是否会影响终点测量，使用 Tecan D300e 数字分配器将药物随机分配至微孔板（图 1）。

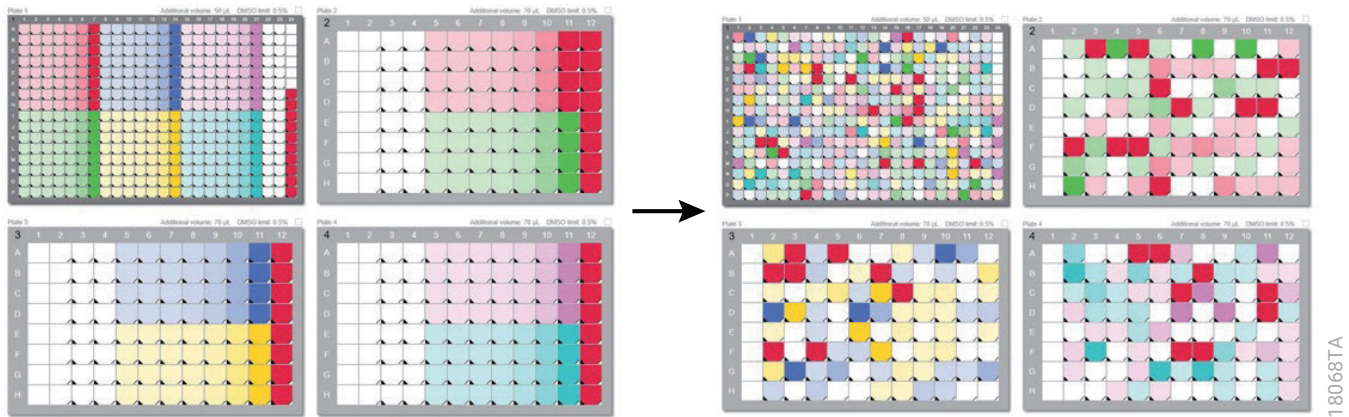


图 1. 孔板布局的随机化。图示描述将不同处理组随机分配至 384 孔和 96 孔板。培养基对照（白色）、DMSO 溶剂对照（红色）、氯丙嗪（粉色）、酮康唑（绿色）、曲格列酮（蓝色）、罗格列酮（黄色）、托卡朋（淡紫色）和恩他卡朋（蓝绿色）。

药物依赖性细胞毒性评估

共培养 14 天后，目视评估，并根据技术手册 #TM412 使用 CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 测量微组织的 ATP。使用 TECAN Infinite® 200 Pro 微孔板读数仪测量发光值。灵敏度设定为 1000ms。

为确定板内 CellTiter-Glo® 3D 测量的精密度，测定了两种板形式的 Z' 因子（图 2 和图 3）。计算 96 孔板和 384 孔板中的 6 种测试化合物的 IC₅₀ 值（图 4）。最后，为确定 384 孔板中是否可以使用较小的生物学重复而不牺牲准确度，进行额外实验，比较了每个处理组 8 个重复和 4 个重复的结果（比较了 DMSO 溶剂对照组 32 个重复和 8 个重复的结果；图 5）。

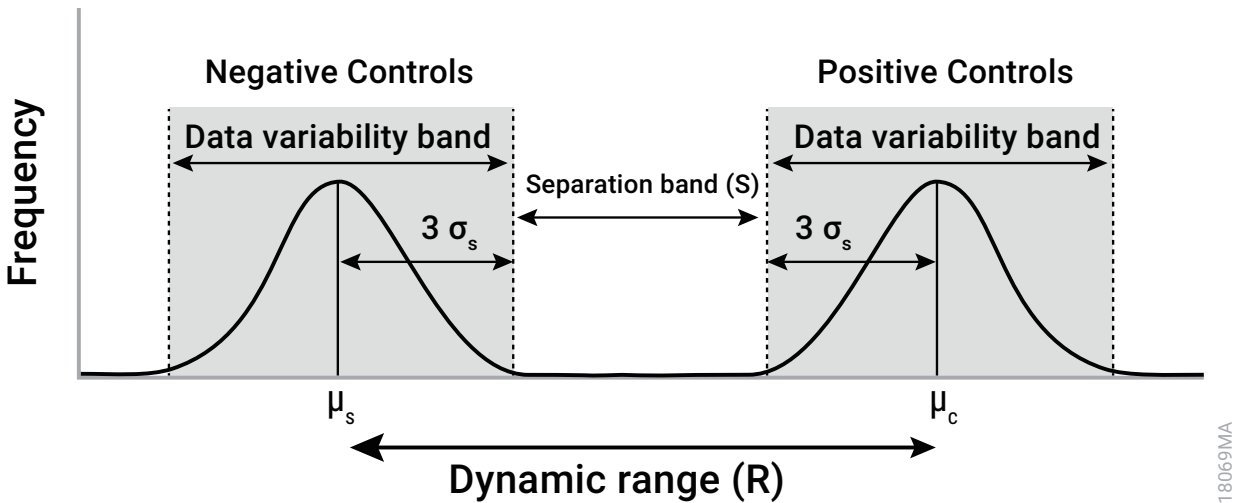


图 2. 描述 Z-prime 的计算。该图（改编自 Zhang et al.2）表明分离程度。水平轴显示测定值。垂直轴显示每个值的出现频率。该图显示阴性和阳性对照的数据。Z' 因子 = S/R。

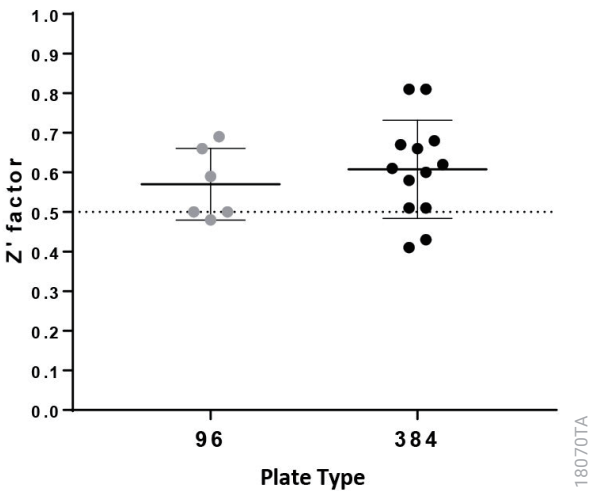
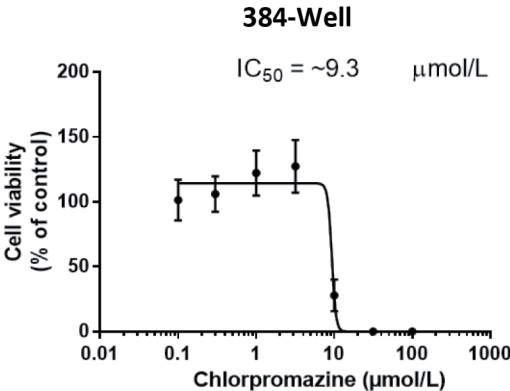
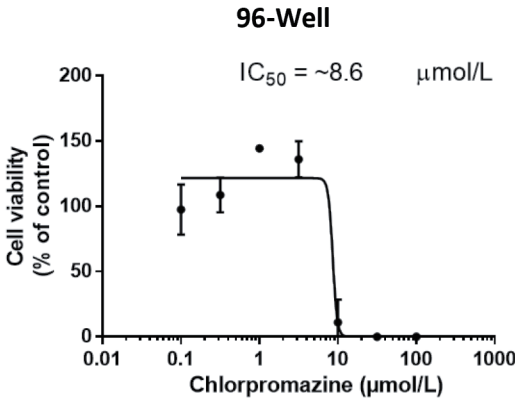
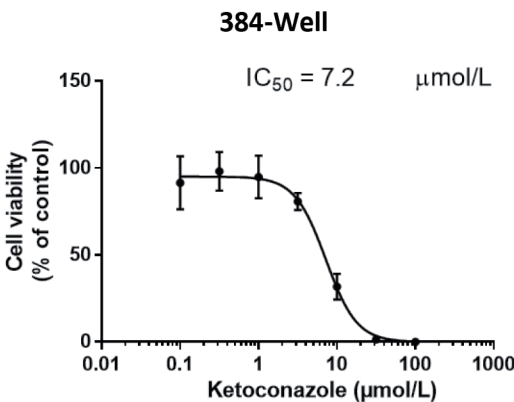
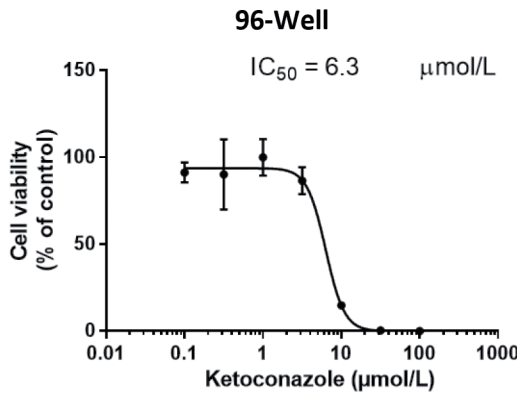


图 3. 96 孔和 384 孔孔板的 Z' 因子分布。为检测板内 CellTiter-Glo® 3D 测量的精密度，测定了两种板形式的 Z' 因子。

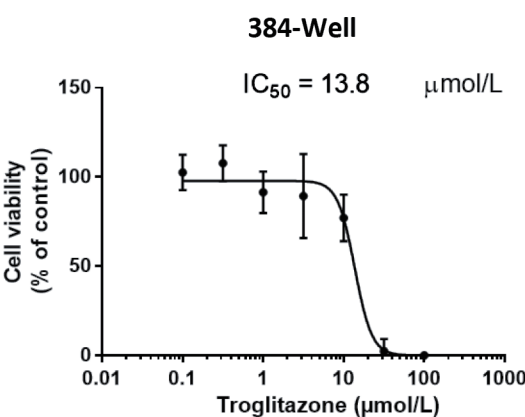
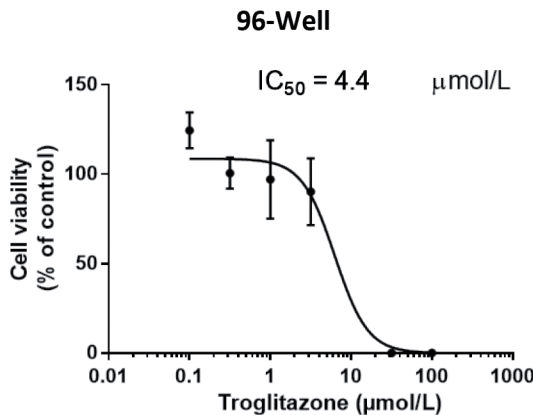
A 氯丙嗪



B 酮康唑

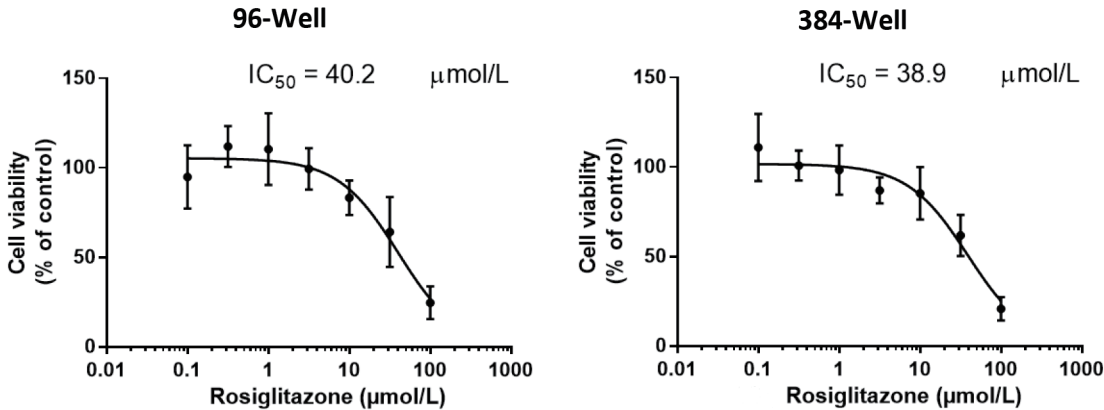


C 曲格列酮

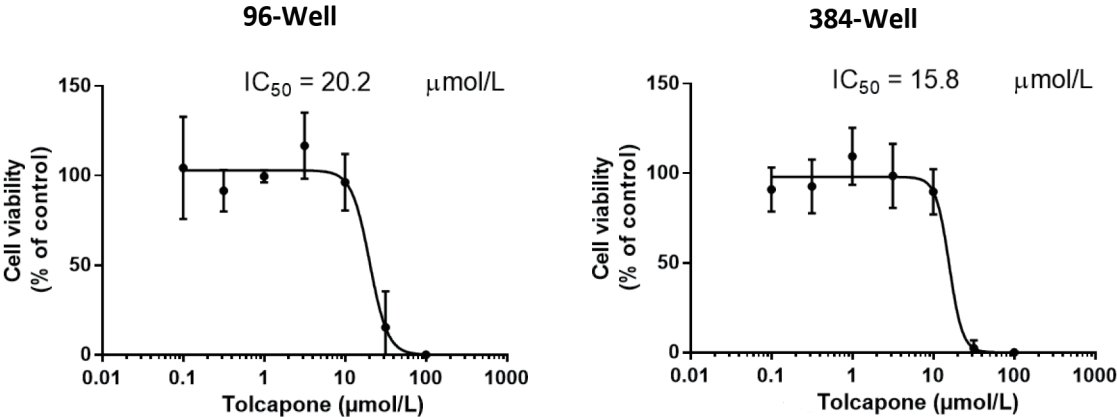


18071 TA-a

D. 罗格列酮



E 托卡朋



F 恩他卡朋

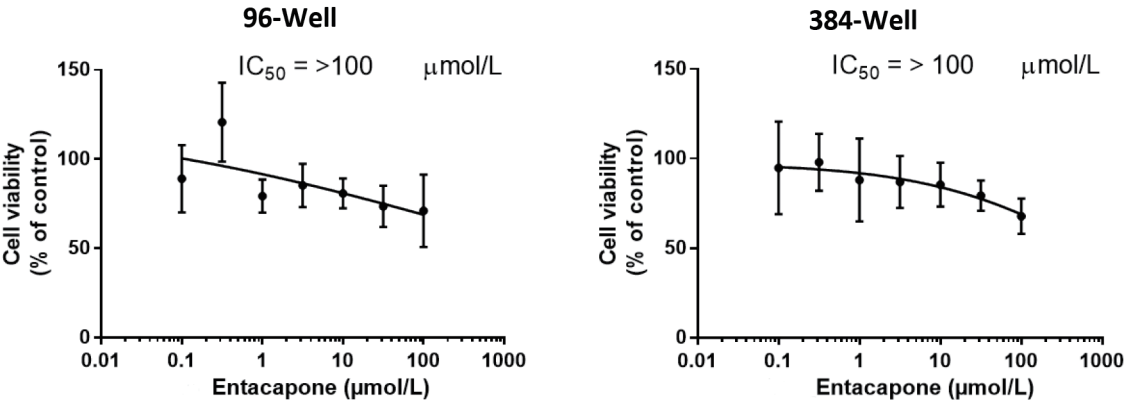
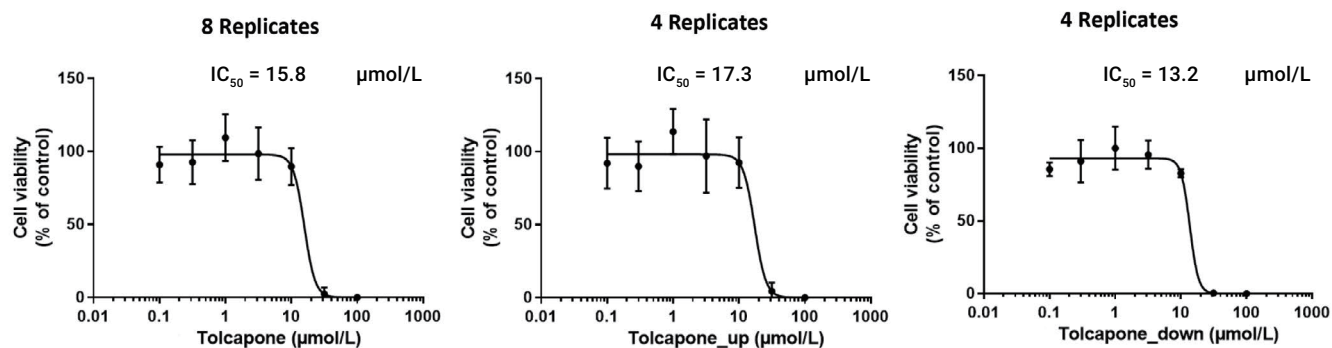


图 4. 药物处理后的 96 孔和 384 孔 Akura™ 孔板的 IC_{50} 值的比较。使用氯丙嗪 (A 组)、酮康唑 (B 组)、曲格列酮 (C 组)、罗格列酮 (D 组)、托卡朋 (E 组) 或恩他卡朋 (F 组) 处理肝脏微组织。计算 96 孔和 384 孔板内所有化合物的 IC_{50} 检测值。

18071 TA-b

A 托卡朋



B 恩他卡朋

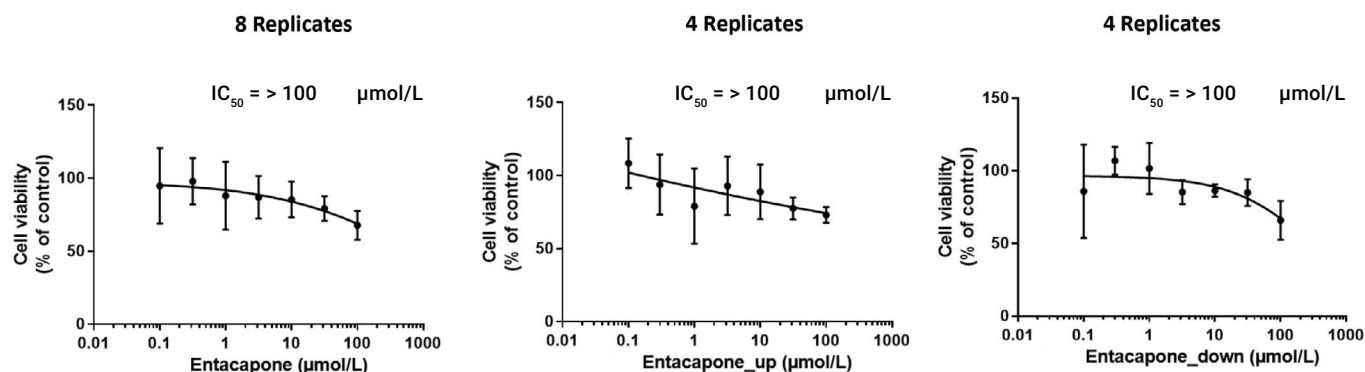


图 5. 生物学重复数量对 IC_{50} 计算的影响。为了确定生物学重复的数量从 8 减半至 4 是否产生相似的 IC_{50} 计算值，在 384 孔板的不同区域用托卡朋（图 A）或结构相关的恩他卡朋（图 B）处理 3D InSight™ 肝脏微组织。

结果

检测细胞 ATP 含量是评估细胞活力的重要研究方法。由于 CellTiter-Glo® 3D 细胞活力检测法的高灵敏度，该方法非常适合分析含单个微组织 / 孔的检测板，每个数据点的细胞总数可低至几百个。与基于四唑盐还原的其他细胞活力检测法相反，CellTiter-Glo® 3D 细胞活力检测法快速裂解细胞释放 ATP，而 ATP 可用于快速生物发光反应，因此该方法可在相对较短的孵育时间内对微组织进行 ATP 测定。如图 3 所示，Z 因子值非常一致，两种板形式的平均值均约为 0.6。为解释 Z' 因子，应用以下指导原则 2：

- Z' 因子为 1 是理想数值。检测所得 Z' 因子不得为 1.00000。当 Z' 因子的动态范围巨大且标准差微小时，Z' 因子接近 1.00000。在这种情况下，分离程度几乎与动态范围相同。Z 因子不得大于 1.0。
- Z' 因子在 0.5 和 1.0 之间表示检测方法非常适合。
- Z' 因子在 0 和 0.5 之间表示检测方法可能适合。
- Z' 因子小于 0 意味着阳性和阴性对照的信号可能重叠，该检测不是很适合进行高通量筛选。

无论孔板之间的随机化情况如何，两种孔板之间所有试验化合物的剂量响应曲线和 IC₅₀ 值均非常相似（图 4）。此外，每个处理组仅使用 4 个生物学重复不影响 IC₅₀ 值（图 5），这使得 DILI 的筛选能力翻倍。

结论

CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 非常适合在先进的 3D 体外细胞培养系统中常规检测活力和细胞毒性，例如无支架的 3D InSight™ 微组织（InSphero）。将生物学相关的细胞培养模型与用户友好且灵敏的检测系统相结合，将产生快速、经济有效和预测性的研究成果。

参考文献

1. Proctor, W.R. *et al.* (2017) Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch Toxicol.* **91(8)**, 2849–63.
2. Zhang, J.H. *et al.* (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen.* **4(2)**, 67–73.

CellTiter-Glo is a registered trademark of Promega Corporation.

InSight is a registered trademark of TECAN Group Ltd. Akura and 3D InSight are trademarks of InSphero, Inc.

