

技术与方法

分选方式对细胞能量代谢的影响研究

邢月婷¹ 李艳伟² 黄莹莹² 王佳佳² 郭春² 沈鑫² 周南² 沈红英² 宋兴辉^{1*}(浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006; ²浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

摘要 Seahorse XF(extracellular flux)是从能量的角度检测代谢及调控的方法, 因其实时检测的优点, 具有非常好的应用前景, 但该技术要求目的细胞纯度高、活性好, 因此需要对原代细胞的分选条件进行优化。该文通过免疫磁珠分选技术和流式细胞分选技术对小鼠脾脏CD4⁺ T细胞进行研究, 结果发现两种分选方式纯化的CD4⁺ T细胞在活性氧水平上无明显差异, 相较于磁珠分选, 流式分选纯化的CD4⁺ T细胞线粒体膜电位、ATP合成相关的氧耗值和线粒体储备呼吸能力均呈现下降趋势, 说明磁珠分选相较于流式分选对CD4⁺ T细胞能量代谢的损伤更小。为了进一步了解流式分选的影响, 该文对分选条件进行了研究。通过Moflo Astrios^{EQ}分选仪中不加电分选模式(SD), 加电分选模式不同偏振电压(700 V、2 400 V、5 000 V)以及同一偏振电压下不同液滴加电(35%、70%)对HEK 293T和Jurkat进行分选, 结果发现SD组相较于加电分选模式对细胞代谢干扰较小, 加电分选模式中5 000 V实验组对细胞代谢有显著影响。同一偏振电压条件下, 不同液滴加电实验组均未对细胞产生显著干扰。综上, 磁珠法更适用于小鼠原代CD4⁺ T细胞能量代谢实验前分选预处理。流式法用于能量代谢实验预处理时建议优先选择不加电分选模式, 选择加电分选模式时建议使用小于2 400 V的偏振电压。该实验结果为能量代谢检测实验提供了分选方式和分选条件的数据参考。

关键词 磁珠分选; 流式分选; 活性氧; 线粒体膜电位; 能量代谢

Study on the Effect of Different Sorting Methods on Cell Energy Metabolism

XING Yueting¹, LI Yanwei², HUANG Yingying², WANG Jiajia², GUO Chun², SHEN Xin²,ZHOU Nan², SHEN Hongying², SONG Xinghui^{1*}(¹Women's Hospital School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;²Core Facilities, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Seahorse extracellular flux technology is used to detect metabolism and its regulation from an energy perspective. It has good application prospects due to its advantages such as fewer cells and real-time detection. Optimizing sorting parameters is essential to ensure the isolation of high-purity and high-activity cells. Taking CD4⁺ T primary cells from mouse spleen as an example, it was shown that there were no significant differences in reactive oxygen species between MACS (magnetic activated cell sorting) and FACS (fluorescence-activated cell sorting). However, all parameters including mitochondrial membrane potential, ATP production and spare respira-

收稿日期: 2024-01-23

接受日期: 2024-04-15

浙江省教育厅一般科研项目(批准号: Y202249909)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-82295076, E-mail: songxh@zju.edu.cn

Received: January 23, 2024

Accepted: April 15, 2024

This work was supported by the General Scientific Research Projects of Zhejiang Provincial Department of Education (Grant No. Y202249909)

*Corresponding author. Tel: +86-571-82295076, E-mail: songxh@zju.edu.cn

tory capacity of CD4⁺ T cells from FACS showed the down-warded trend when compared with CD4⁺ T cells from MACS. This indicated that MACS caused less damage to CD4⁺ T cells in terms of cell energy metabolism compared with FACS. To investigate the impact of FACS, this study delved into sorting parameters. HEK 293T cells and Jurkat cells underwent sorting using both straight down sorting, varying voltages (700 V, 2 400 V, 5 000 V) and stream deflections (35%, 70%) in the Moflo Astrios^{EQ} sorter. The findings revealed that straight down sorting had a lesser impact on cell metabolism compared to sorting at different voltages. At 5 000 V, the cell metabolism exhibited a significant difference compared to both the 700 V and 2 400 V groups. Different stream deflections had no significant interference to the cells under the same plate voltages. Thus, MACS is suitable for conducting energy metabolism experiments with mouse primary CD4⁺ T cells, while straight down sorting is preferable for FACS experiments focusing on energy metabolism. If sorting by charge mode is necessary, it is advisable to use a voltage value lower than 2 400 V. The results of this experiment provide a data set as a reference of sorting conditions in energy metabolism experiment.

Keywords magnetic activated cell sorting; fluorescence-activated cell sorting; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential; energy metabolism

免疫磁珠分选技术^[1]和流式细胞分选技术^[2]是常见的分选技术, 通过细胞标志物进行分选^[3-4]。免疫磁珠分选技术(下称磁珠法)通过偶联磁珠的特定抗体, 与细胞抗原特异性结合, 在磁场作用下分选出目的细胞^[1]。磁珠法操作方便、对仪器设备要求低、分选纯度较高, 但价格昂贵^[5], 不能重复使用。流式细胞分选技术(下称流式法)通过对荧光素的检测, 可以快速对细胞或颗粒进行多参数分析^[6], 根据单个或多个参数分选出目的细胞或颗粒。目前传统流式分选仪通常是电荷式分选型, 即经加电装置后, 包裹目的细胞或颗粒的液滴会承载不同电荷, 在电极板电场中进行偏转, 使得目的细胞或颗粒进入不同收集管中^[7]。流式法具有细胞纯度高、可同时满足多参数分选的优点, 但对仪器设备要求高、调试流程复杂。

细胞能量代谢对于维持其生理功能非常重要, 能量代谢的变化可能会导致细胞生理功能的异常^[8-10]。为了适应外界环境, 细胞会对代谢网络进行调控。线粒体通过氧化磷酸化产生 ATP^[11], 会造成活性氧的产生和分解, 线粒体也可以控制内源性细胞凋亡的发生^[12]。通过测量完整细胞的耗氧量, 可以评估线粒体的生物能量学^[11]。在引入荧光技术前, 最经典的方法是通过 Clark 氧电极检测线粒体耗氧情况^[13], 但该方法通量较低^[14-15]。Seahorse XF(extracellular flux)技术依托能量代谢检测系统, 同时检测氧消耗速率(oxygen consumption rate, OCR)和胞外酸化速率(extracellular acidification rate, ECAR), 可以实时对单层活细胞进行能量代谢检测^[14], 极大降低了对

目的细胞数量的要求^[15], 为稀有细胞检测提供了可能性。XF技术可以应用于细胞、模式生物等, 对细胞活性要求非常高。原来源的细胞种类繁多, 通常需要通过分选步骤纯化目的细胞群, 因此分选方式和分选条件的筛选非常重要^[16]。ZHAN等^[17]采用流式法纯化原发免疫性血小板减少症患者的 T 细胞亚群, 检测其代谢特征; 马冀等^[18]通过磁珠法富集恶性疟原虫, 并建立了能量代谢检测新方法。分选技术应用广泛, 但分选方式对细胞能量代谢的影响研究鲜有报道。

本文以磁珠法和流式法分别纯化小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞, 比较两种分选方式对细胞能量代谢的影响, 确定更适用于代谢研究的分选方式, 并且以贴壁细胞 HEK 293T 细胞株和悬浮细胞 Jurkat 细胞株为例, 对流式法不同偏振电压和同一偏振电压下不同液滴加电进行实验, 以期获得适用于代谢检测的流式分选参数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HEK 293T 细胞系、Jurkat 细胞系来源于浙江大学基础医学院。

1.1.2 实验动物 C57BL/6 品系小鼠均为 6~8 周龄, 饲养于浙江大学医学院实验动物中心 SPF 无菌级环境中。本研究经浙江大学实验动物福利伦理审查委员会批准(批准号: ZJU20240081)。

1.1.3 试剂 PBS 缓冲液(E607008-0500)、RPMI-

1640培养液(E600028-0500)、DMEM(高糖)培养液(E600003-0500)、特级胎牛血清(E600001-0100)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;胰酶细胞消化液(C0203)、青霉素-链霉素溶液(C0222)、多聚赖氨酸溶液(C0312)、ATP检测试剂盒(S0026)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;BCA蛋白定量检测试剂盒(20201ES76)、活性氧检测试剂盒(50101ES01)、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(40706ES60)、RIPA裂解液(20101ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;红细胞裂解液(R1010)购自北京索莱宝科技有限公司;抗小鼠IMag™ CD4磁珠[GK1.5](551539)购自上海优宁维生物科技股份有限公司;抗小鼠CD4流式单抗[GK1.5](110670001)购自浙江正熙生物医药有限公司;线粒体压力检测试剂盒(103015-100)、XF分析检测液(103576-100)、XF校准液(100840-000)、XF葡萄糖溶液(103577-100)、XF丙酮酸溶液(103578-100)、XF谷氨酰胺溶液(103579-100)、XFe96探针板和细胞培养板(103792-100)购自杭州柏思迈尔生物技术有限公司;流式分选仪质控微球(B53230)购自贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司。

1.1.4 仪器 磁力分选架(BD Cell Separation Magnet)、流式分选仪(Beckman Moflo Astrios^{EQ})、流式分析仪(Agilent ACEA Novocyte™或Beckman Cytoflex)、全波长扫描式多功能读数仪(Thermo Varioskan Flash)、细胞能量代谢分析仪(Agilent Seahorse XFe96)来源于浙江大学医学院公共技术平台。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾脏单细胞制备 取6~8周的小鼠,解剖取得脾脏组织,置于装有预冷PBS缓冲液的培养皿中;利用注射器中的活塞装置和200目过滤器将其研磨成细胞悬液,过滤至50 mL离心管中;离心(400 ×g、5 min),弃上清液,在细胞团块中加入5 mL红细胞裂解液,冰上裂解15 min,离心(400 ×g、10 min)沉淀细胞团块,PBS缓冲液重悬细胞,进行后续实验。

1.2.2 细胞培养及消化 HEK 293T细胞培养于10 cm培养皿中,皿中加入DMEM高糖培养液[添加10%胎牛血清(V/V)和1%青霉素-链霉素溶液],放置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中。细胞消化时,用PBS缓冲液置换完全培养液,吸弃PBS缓冲液,再用0.25%胰酶37 °C消化3 min,完全培养液终止消化,离心(300 ×g、5 min)沉淀细胞,PBS缓冲液重悬细胞,进行后续实验。Jur-

kat培养于10 cm培养皿中,皿中加入PRMI-1640培养液[添加10%胎牛血清(V/V)和1%青霉素-链霉素溶液],放置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中。细胞转移至15 mL离心管中,离心(300 ×g、5 min)沉淀细胞,PBS缓冲液重悬细胞,进行后续实验。

1.2.3 磁珠法 取1×10⁷个细胞,加入50 μL IMag™ CD4磁珠,混匀后冰上孵育30 min,用1 mL PBS缓冲液稀释,从磁力分选架上吸附8 min。弃上清液,用1 mL PBS缓冲液重悬细胞,再次在磁力架上吸附4 min,重复2次,磁力分选架上取下细胞,将其重悬在新的PBS缓冲液中,进行后续实验。

1.2.4 流式法 (1) 取1×10⁷个细胞,重悬在100 μL PBS缓冲液中,细胞悬液中加入3 μL CD4流式抗体,混匀后室温孵育30 min,离心(300 ×g、5 min),弃上清液,1 mL PBS缓冲液重悬细胞至1×10⁷个/mL浓度。(2) 分选参数设置:流式分选仪Moflo Astrios^{EQ}开机后,安装100 μm喷嘴,通过分选质控微球工作液(1滴原液+800 μL鞘液)进行光路校正和仪器质控,完成激光延迟、变异系数等检测。通过设备内置Intelisort功能完成液滴延迟检测,分选模式选用纯度(purity)模式。偏振电压实验时,手动设置偏振电压值,以不加电分选模式(SD组),加电分选模式(700 V、2 400 V、5 000 V)为实验组,加电模式实验组固定分选位置(左1)。液滴加电实验时,不固定分选位置,在700 V、2 400 V、5 000 V条件下分别以液滴加电35%和70%为实验组。

1.2.5 BCA蛋白浓度测定法 (1) 配制标准品和工作液:将2 mg/mL BSA标准品用PBS缓冲液稀释成2 000、1 400、1 200、1 000、600、400、200、40和0 μg/mL终浓度。配制BCA工作液:50体积的BCA试剂A中加入1体积的BCA试剂B,充分混匀备用。(2) 制备样本待测液:取5×10⁵个细胞,加入150 μL RIPA裂解液,充分裂解后,离心(14 000 ×g、5 min),取上清备用。(3) 微孔板检测方法:取25 μL标准品或样本加入到微孔板中,每孔加入200 μL BCA工作液,振荡30 s充分混匀。盖上微孔板,37 °C孵育30 min,冷却至室温后,用全波长扫描式多功能读数仪在562 nm波长处检测吸光度(D)值,计算蛋白浓度。

1.2.6 ATP含量检测方法 (1) 配制ATP标准品和ATP检测工作液:将ATP标准溶液用ATP检测裂解液稀释成0.1、0.3、1和3 μmol/L 4个浓度备用;将ATP检测试剂按1:9比例用ATP检测试剂稀释液配制ATP检测工

作液; (2) 取 2×10^5 个细胞, 重悬在200 μL PBS缓冲液中, 离心($300 \times g$ 、5 min), 弃上清液, 加入200 μL ATP检测裂解液, 混匀后, 离心($12\,000 \times g$ 、10 min), 取上清液, 经BCA法测定蛋白浓度, 将标准品和样本分别加入到ATP检测工作液中, 用全波长扫描式多功能读数仪在化学发光模式检测。

1.2.7 线粒体膜电位检测方法 (1) 取 5×10^5 个细胞, 重悬在500 μL 细胞培养液中。(2) 配制JC-1染色工作液: 取50 μL JC-1($200 \times$)加入8 mL超纯水, 剧烈振荡充分溶解并混匀JC-1。再加入2 mL染色缓冲液($5 \times$), 混匀即可。(3) 配制JC-1染色缓冲液($1 \times$): 1 mL JC-1染色缓冲液($5 \times$)加入4 mL超纯水, 混匀后冰上备用。(4) 细胞悬液中加入500 μL JC-1染色工作液, 颠倒混匀数次, 37°C 孵育20 min, 离心($600 \times g$ 、3 min), 弃上清液, 在细胞沉淀中加入500 μL 染色缓冲液, 清洗2次后用染色缓冲液重悬, 流式分析仪上机检测。

1.2.8 活性氧水平检测方法 (1) 探针准备: 探针装载前, 用无血清培养液按1:1 000稀释DCFH-DA, 使其终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$; (2) 取 1×10^6 个细胞, 加入1 mL稀释好的探针进行装载, 37°C 孵育30 min, 每隔5 min颠倒混匀; (3) 用无血清培养液清洗细胞2次后, 流式分仪上机检测。

1.2.9 细胞线粒体压力检测方法 (1) 实验前1天, XFe96透明辅助板中每孔加入200 μL 无菌水, 置于 37°C 无 CO_2 恒温培养箱中水化(实验当天将无菌水置换成等体积 37°C 预热的XF校准液)。用0.1 mg/mL多聚赖氨酸溶液将XFe96细胞培养板进行包被(实验当天去除多聚赖氨酸后干燥1 h备用)。(2) 实验当天, 将经过不同分选方式纯化的 CD4^+ T细胞重悬于PRMI-1640完全培养液中, 离心($300 \times g$ 、10 min), 用分析检测液置换细胞的完全培养液(分析检测液含1 mmol/L丙酮酸、2 mmol/L谷氨酰胺和10 mmol/L葡萄糖, pH7.4)。按照 5×10^5 个/孔密度, 取180 μL CD4^+ T细胞接种至预先包被的XFe96细胞培养板中, 离心($300 \times g$ 、5 min)使细胞沉降, 将细胞培养板放置于 37°C 无 CO_2 的恒温培养箱中, 1 h内上机检测。期间在探针板的加药孔中加入线粒体压力试剂盒(1.5 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素、0.25~3.0 $\mu\text{mol/L}$ 解偶联剂、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮/抗霉素A)。(3) 程序设置: 未给药时混匀3 min, 检测3 min, 重复混匀检测步骤3次; 加入寡霉素后混匀3 min, 检测3 min, 重复混匀检测步骤3次; 加入解偶联剂后混匀3 min, 检测3 min, 重复混匀检测步骤3次; 加入鱼藤

酮/抗霉素A后混匀3 min, 检测3 min, 重复混匀检测步骤3次。

(1) 实验前1天, 将经流式分选仪不同实验条件分选后的HEK 293T 细胞接种在含10% FBS的DMEM高糖培养液中, 以 2.0×10^4 个/孔密度接种于XFe96细胞培养板中培养。将XFe96透明辅助板每孔中加入200 μL 无菌水, 放置于 37°C 无 CO_2 恒温培养箱中水化(实验当天将无菌水置换成等体积 37°C 预热的校准液)。(2) 实验当天, 用分析检测液置换细胞的完全培养液(分析检测液配方同上), 将细胞置于180 μL XF分析检测液中, 细胞培养板放置于 37°C 无 CO_2 恒温培养箱中, 1 h内上机检测。期间在探针板的加药孔中加入线粒体压力试剂盒(程序设置同上)。

实验前1天准备工作同 CD4^+ T细胞。实验当天, 将经过流式分选仪不同实验条件分选后的Jurkat细胞接种在含10% FBS的PRMI-1640培养液中, 离心($300 \times g$ 、10 min), 将培养液替换成XF分析检测液(分析检测液配方同上), 按 2×10^5 个/孔密度, 取180 μL Jurkat细胞接种至预先包被的XF细胞培养板中, 离心($300 \times g$ 、5 min), 使细胞沉降, 将细胞培养板放置于 37°C 无 CO_2 恒温培养箱中, 1 h内上机检测。期间在探针板的加药孔中加入线粒体压力试剂盒(程序设置同上)。

1.2.10 流式分析检测方法 ACEA Novocyte™或Beckman Cytoflex流式分析仪开机质控后, 建立实验方案, 通过FSC-A/SSC-A双参数散点图圈定目标细胞群, 创建FSC-H/FSC-A散点图圈定单细胞群, 排除黏连细胞, 通过定体积记录数据即可计算目标细胞群数量。因绿色荧光强度与活性氧水平成正比, 因此可以根据绿色荧光信号强度, 分析出活性氧水平。JC-1在正常线粒体内会聚集在线粒体基质中形成聚合物, 聚合物呈现出红色荧光, 当膜电位下降时, JC-1只能以单体形式存在于胞质中, 单体呈现出绿色荧光。可以通过红色荧光强度/绿色荧光强度的比例衡量线粒体去极化程度, 反映线粒体膜电位的变化。

1.2.11 统计学处理 实验结果采用GraphPad Prism 9.0软件进行分析, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 为差异有统计学意义。流式数据采用Novoexpress和Flowjo V10进行分析。Seahorse数据采用Wave软件进行分析。所用图片和数据均为具有代表性的结果。

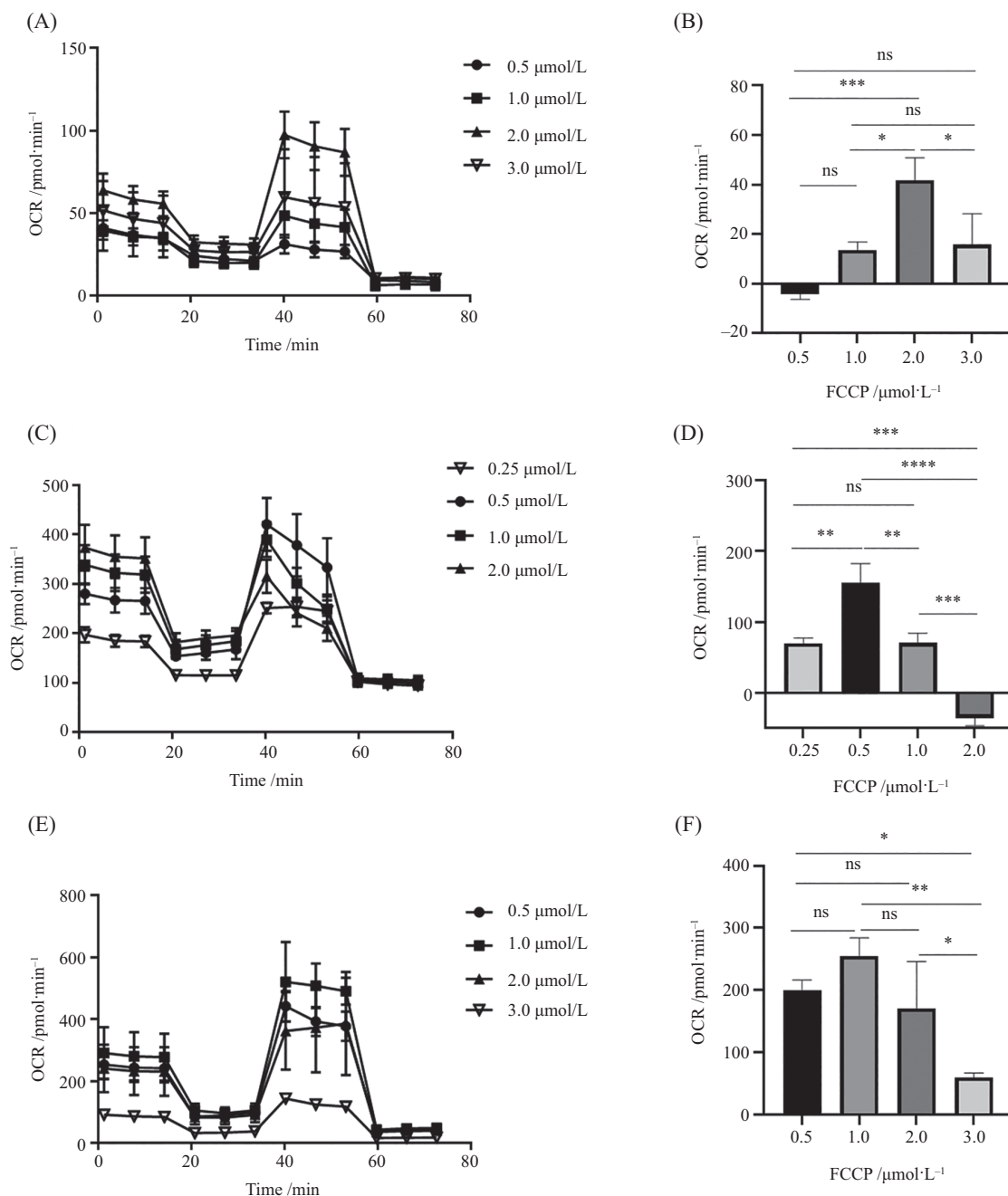
2 结果

2.1 Seahorse XF工具药浓度滴定

在寡霉素、解偶联剂以及鱼藤酮/抗霉素A的联合作用下,可以获得细胞的基础呼吸值、最大呼吸值、线粒体储备呼吸值、ATP合成相关的氧耗值等

结果,其中线粒体储备呼吸值为最大呼吸值与基础呼吸值的差值^[19]。

2.1.1 CD4⁺ T细胞最适FCCP浓度 在相同CD4⁺ T细胞数量下,对解偶联剂FCCP设置浓度梯度(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、3.0 $\mu\text{mol/L}$)。如图1A和



A、B: CD4⁺ T细胞FCCP浓度优化结果。C、D: HEK 293T细胞FCCP浓度优化结果。E、F: Jurkat细胞FCCP浓度优化结果。A、C、E为Seahorse氧耗值折线图, B、D、F为线粒体呼吸储备值的统计结果。ns: 差异不显著。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $n=3$ 。

The optimization of FCCP concentration in CD4⁺ T cells (A,B), HEK 293T cells (C,D) and Jurkat cells (E,F). Figure A, C and E mean oxygen consumption in Seahorse experiments. Figure B, D and F mean spare respiratory capacity. ns: not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $n=3$.

图1 Seahorse实验中不同FCCP浓度对HEK 293T、Jurkat和CD4⁺ T细胞的影响

Fig.1 Effect of different FCCP concentrations on HEK 293T, Jurkat and CD4⁺ T cells in Seahorse experiment

图1B)所示, FCCCP浓度在2.0 $\mu\text{mol/L}$ 检测时, 线粒体呼吸储备值最大, 相较于其他3个实验组, 存在显著差异($P<0.05$, $P<0.001$)。由此说明, CD4^+ T细胞的最适FCCCP浓度为2.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.1.2 HEK 293T细胞最适FCCCP浓度 在相同HEK 293T的细胞数量下, 解偶联剂FCCCP设置浓度梯度(0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$)。如图1C和图1D所示, FCCCP浓度在0.5 $\mu\text{mol/L}$ 检测时, 线粒体呼吸储备值最大, 相较于其他3个实验组, 存在显著差异($P<0.01$, $P<0.0001$)。由此说明, HEK 293T细胞的最适FCCCP浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.1.3 Jurkat细胞最适FCCCP浓度 在相同Jurkat细胞数量下, 对解偶联剂FCCCP设置浓度梯度(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、3.0 $\mu\text{mol/L}$)。4个实验组均可获得Jurkat细胞的线粒体最大氧耗值, 当前浓度梯度中, Jurkat细胞的最适FCCCP浓度为1.0 $\mu\text{mol/L}$ (图1E和图1F)。

2.2 分选方式对 CD4^+ T细胞能量代谢的影响

以不同稀释倍数的ATP标准品和相对化学发光值RLU(relative light unit)制作标准曲线, 两者之间呈现较好的线性相关性, 相关系数在0.99以上(图2A)。如表1所示磁珠法纯化的 CD4^+ T细胞, 其ATP含量为(0.239 ± 0.011) $\mu\text{mol/L}$, 流式法(偏振电压2 400 V)纯化的 CD4^+ T细胞, 其ATP含量为(0.204 ± 0.006) $\mu\text{mol/L}$, 由此可见流式法(偏振电压2 400 V)相较磁珠法, CD4^+ T细胞内ATP含量显著降低($P<0.05$)(图2B)。如图2C所示, 相较于磁珠法, 流式法(偏振电压2 400 V)纯化的 CD4^+ T细胞, 线粒体膜电位显著降低($P<0.001$)。 CD4^+ T细胞在两种分选方式作用下, 两者的活性氧水平无显著差异(图2D和图2E)。基于Seahorse的检测方法, 流式法(偏振电压2 400 V)纯化的 CD4^+ T细胞, 其细胞内ATP合成相关氧耗值与线粒体呼吸储备值相较于磁珠法显著降低($P<0.01$)(图2F~图2H)。

2.3 电压对细胞系能量代谢的影响

2.3.1 偏振电压对HEK 293T能量代谢的影响 如图3A和图3B所示, 加电分选模式(700 V、2 400 V、5 000 V)与不加电分选模式(SD)对比, 纯化的HEK 293T细胞活性氧水平存在显著差异($P<0.01$)。5 000 V实验组与700 V实验组相比活性氧水平显著升高, 5 000 V实验组与2 400 V实验组相比, 活性氧水平显著升高。2 400 V实验组与700 V实验组相比, 活性氧水平无明显差异。由图3C所示以及表2数据可知,

加电分选模式(700 V、2 400 V、5 000 V)相较不加电分选模式(SD)纯化的HEK 293T细胞其线粒体膜电位显著降低($P<0.001$), 但分选时不同偏振电压之间无显著区别。由图3D和图3E所示, 加电分选模式(700 V、2 400 V、5 000 V)纯化的HEK 293T细胞相较于不加电分选模式(SD)纯化的HEK 293T细胞, 其ATP合成相关氧耗值以及线粒体储备呼吸值显著降低($P<0.01$, $P<0.001$), 但分选时不同偏振电压之间对线粒体储备呼吸值无显著区别。5 000 V实验组与700 V实验组相比, ATP合成相关的氧耗值存在显著差异。

2.3.2 偏振电压对Jurkat能量代谢的影响 如图4A和图4B所示, SD实验组、700 V实验组、2 400 V实验组和5 000 V实验组分别比较, Jurkat细胞活性氧水平均存在显著差异。由图4C所示和表3数据可知, 加电分选模式(700 V、2 400 V、5 000 V)相较于不加电分选模式(SD)纯化的Jurkat细胞, 其线粒体膜电位显著降低($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.0001$)。2 400 V实验组与700 V实验组相比, 线粒体膜电位无显著变化, 5 000 V实验组与2 400 V实验组相比, 线粒体膜电位无显著变化, 但5 000 V实验组与700 V实验组相比, 其线粒体膜电位存在显著差异($P<0.05$)。由图4D和图4E所示, 2 400 V实验组与SD实验组相比, ATP合成相关氧耗值以及线粒体储备呼吸值显著降低($P<0.05$), 5 000 V实验组与SD实验组相比, ATP合成相关氧耗值以及线粒体储备呼吸值存在显著变化($P<0.05$, $P<0.01$)。

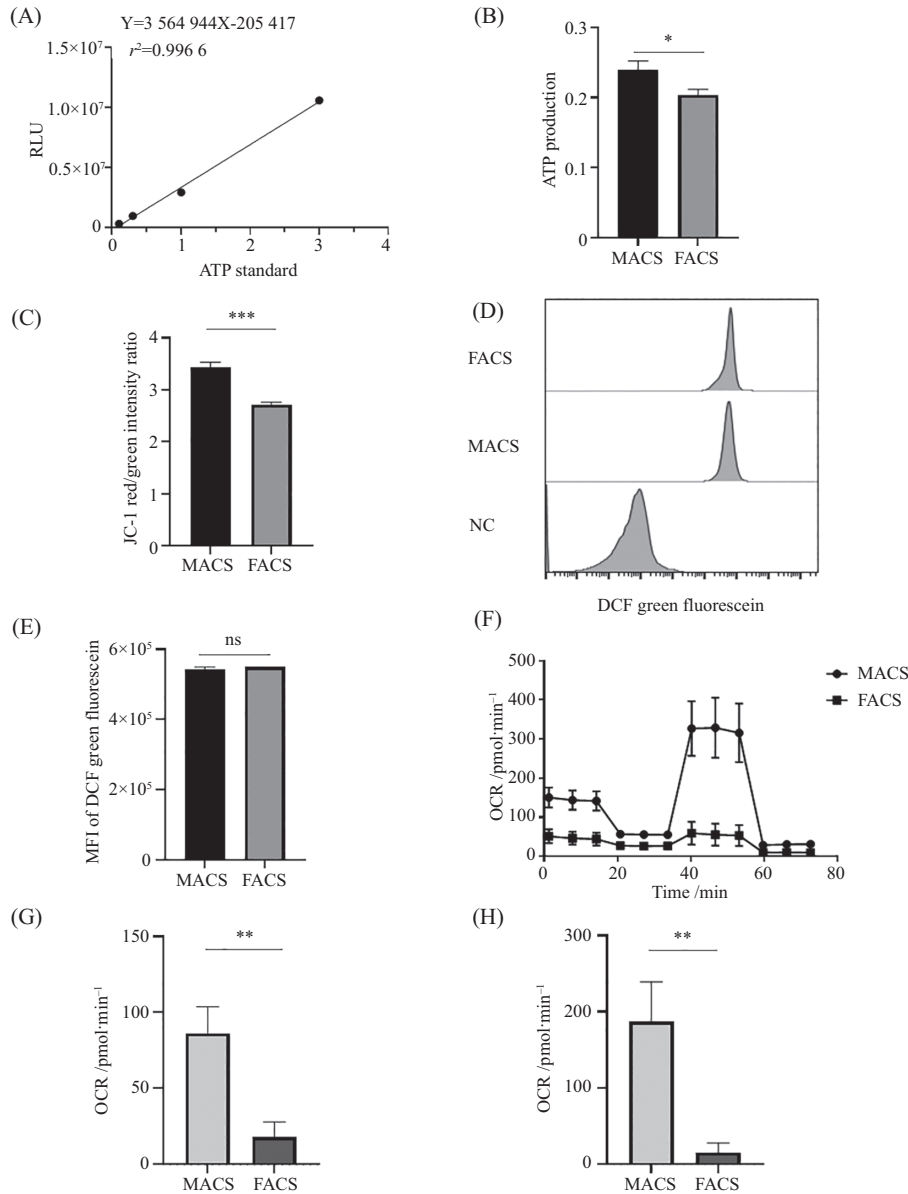
2.3.3 液滴加电对细胞系的影响 如图5A和图5C所示, 液滴加电分别为35%和70%时, HEK 293T细胞的活性氧水平和线粒体膜电位在同一组偏振电压实验组中均无显著差异。如图5B和图5D所示, 液滴加电分别为35%和70%时, Jurkat细胞的活性氧水平和线粒体膜电位在同一组偏振电压实验组中均无显著差异。

2.4 验证分选方式对 CD4^+ T细胞能量代谢影响

如图6A和图6B所示, 流式法(SD)相较磁珠法, 纯化的 CD4^+ T细胞活性氧水平无显著差异, 但线粒体膜电位显著降低($P<0.001$)。

3 讨论

XF技术是一种从能量角度检测代谢的方法, 具有实时检测的优点, 但对细胞纯度和活性的要求高。在原代细胞应用中, 由于原代细胞种类繁多, 为了纯



A: ATP标准品浓度与相对化学发光(RLU)之间的线性关系图。B: 两种分选方式对CD4⁺ T细胞ATP含量的影响。C: 用JC-1荧光探针检测两种分选方式对CD4⁺ T细胞线粒体膜电位的影响。D、E: 用DCFH-DA荧光探针检测两种分选方式对CD4⁺ T细胞活性氧水平的影响。F~H: 用Seahorse技术检测两种分选方式对CD4⁺ T细胞能量代谢水平的影响, 其中图G为ATP合成相关的氧耗值, 图H为线粒体呼吸储备值。ns: 差异不显著。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$ 。

A: linear relationship between ATP standard concentration and RLU (relative chemiluminescence). B: effect of two sorting methods on the ATP production from CD4⁺ T cells. C: effect of two sorting methods on the mitochondrial membrane potential from CD4⁺ T cells using JC-1 fluorescent probe. D,E: effect of two sorting methods on the reactive oxygen species from CD4⁺ T cells using DCFH-DA fluorescent probe. F-H: effect of two sorting methods on the the energy metabolism from CD4⁺ T cells using Seahorse. Figure G shows ATP-linked respiration and figure H shows spare respiratory capacity. ns: not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$ 。

图2 磁珠法和流式法对CD4⁺ T细胞的影响

Fig.2 Effect of MACS and FACS on CD4⁺ T cells

表1 磁珠法和流式法纯化的CD4⁺ T细胞中ATP含量

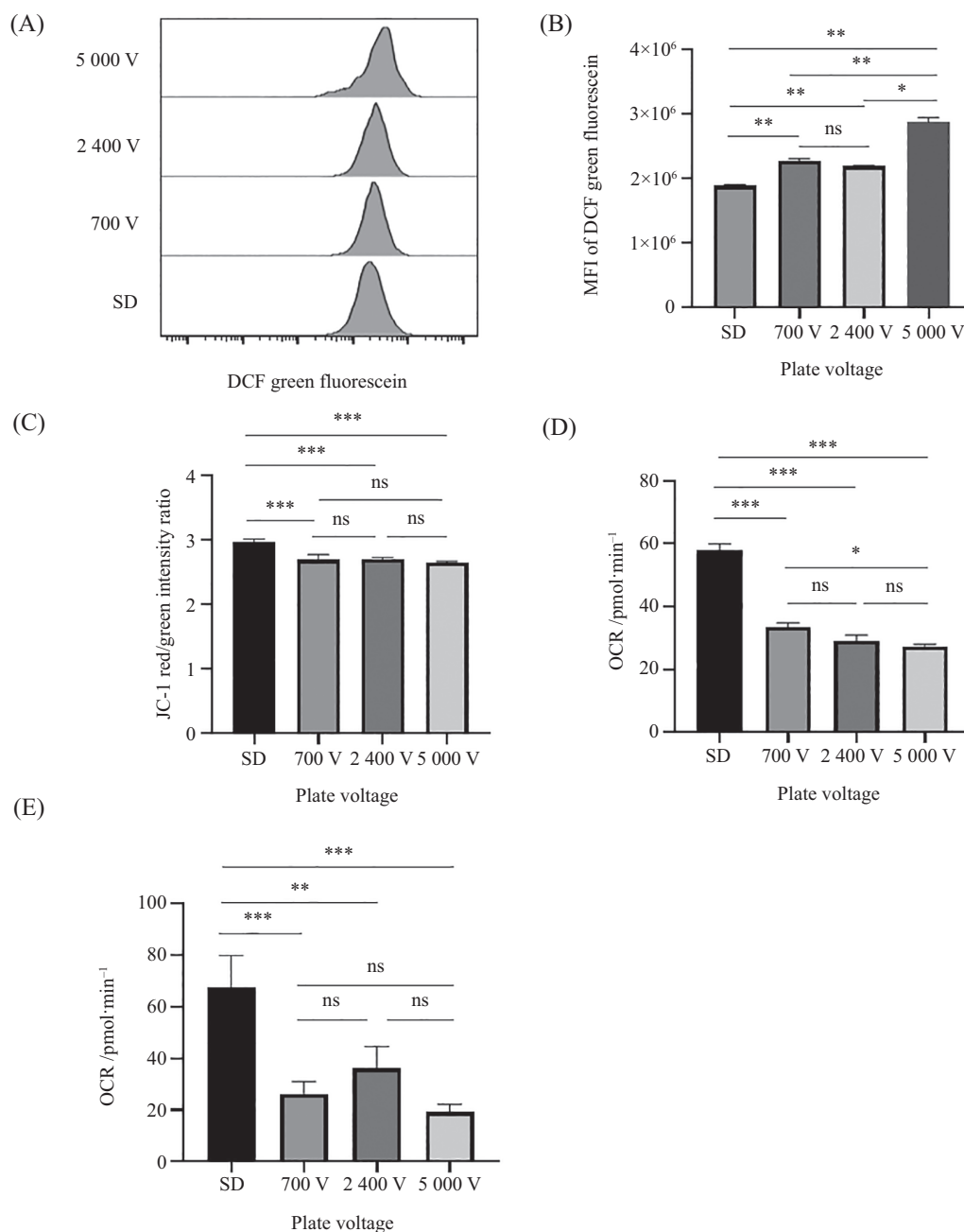
Table 1 ATP production of CD4⁺ T cells from MACS and FACS

分选方式 Sorting methods	ATP含量 ATP production
MACS	0.239±0.011 μmol/L
FACS	0.204±0.006 μmol/L

化目的细胞, 分选方式和分选条件的筛选尤为重要。本文选用的一种原代细胞和两种细胞系, 均为实验室常见细胞类型, 即HEK 293T细胞常被用做病毒包装以及转染实验^[20], Jurkat细胞常用于急性淋巴白血

病研究^[21], T细胞是免疫学研究中不可或缺的实验材料^[22]。

文中比较了磁珠法和流式法对小鼠脾脏CD4⁺ T细胞能量代谢的影响, 两种分选方式均对CD4⁺ T细



A、B: 通过DCFH-DA荧光探针检测流式法不同偏振电压对HEK 293T细胞活性氧的影响。C: 通过JC-1荧光探针检测流式法不同偏振电压对HEK 293T细胞线粒体膜电位的影响。D、E: 通过Seahorse技术检测流式法不同偏振电压对HEK 293T细胞线粒体呼吸途径中能量代谢的影响, 其中图D为ATP合成相关的氧耗值, 图E为线粒体呼吸储备值。ns: 差异不显著。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

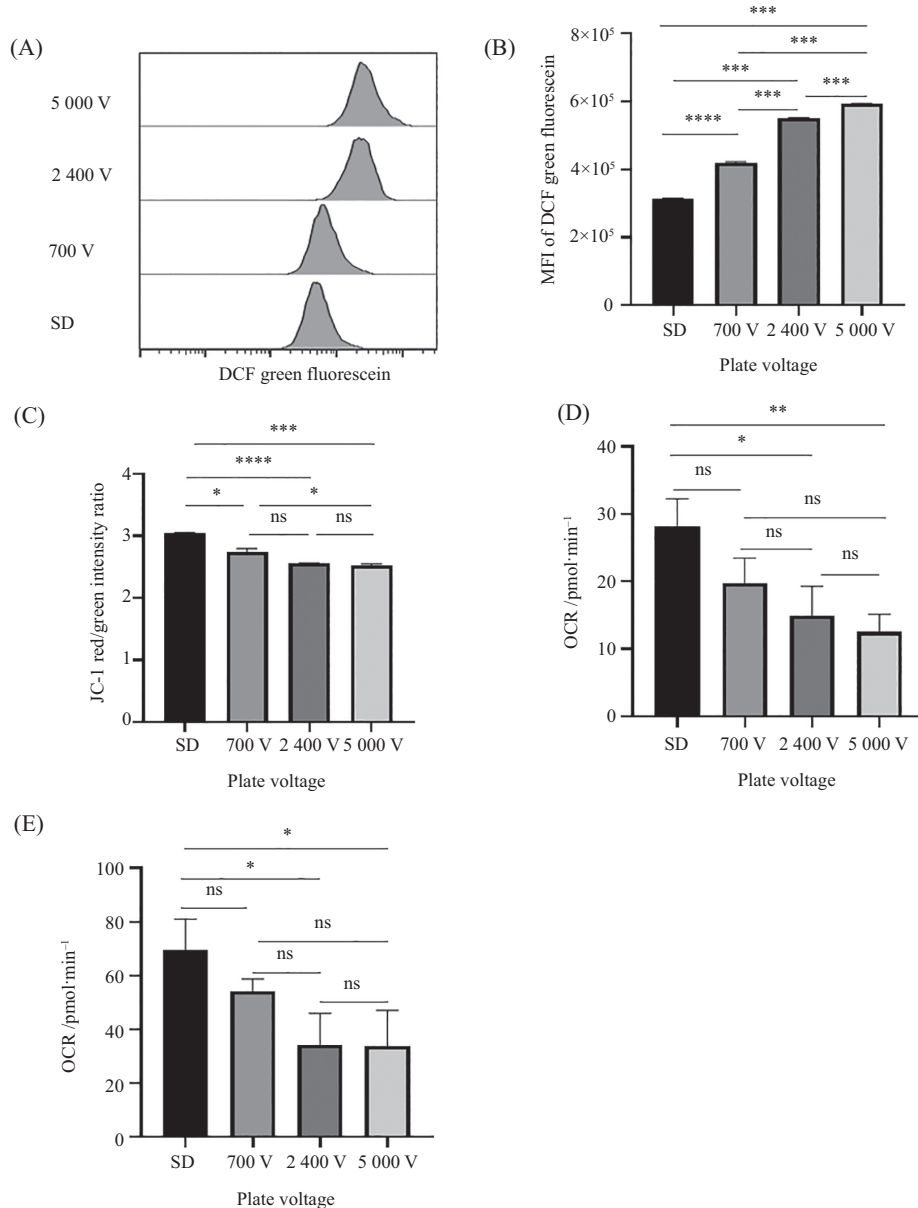
A,B: effect of different plate voltages on reactive oxygen species in HEK 293T cells using DCFH-DA fluorescent probe. C: effect of different plate voltages on mitochondrial membrane potential in HEK 293T cells using JC-1 fluorescent probe. D,E: effect of different plate voltages on energy metabolism in HEK 293T cells by Seahorse technology. Figure D shows ATP-linked respiration and figure E shows spare respiratory capacity. ns: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图3 流式法偏振电压对HEK 293T的影响
Fig.3 The influence of plate voltage on HEK 293T cells

表2 流式法偏振电压对HEK 293T细胞线粒体膜电位的影响结果

Table 2 Effect of different plate voltages on mitochondrial membrane potential in HEK 293T cells

偏振电压	红色荧光强度	绿色荧光强度	红色荧光/绿色荧光比值
Plate voltage	Red intensity	Green intensity	Red/green intensity ratio
SD	1 081 288.0±288.6	364 185.3±4 157.3	2.969±0.034
700 V	1 012 008.0±11 557.0	376 504.0±10 799.7	2.689±0.064
2 400 V	917 023.0±10 973.4	339 766.3±4 607.7	2.699±0.021
5 000 V	989 803.0±1 952.4	374 659.3±2 693.2	2.642±0.019



A, B: 通过DCFH-DA荧光探针检测流式法不同偏振电压对Jurkat细胞活性氧的影响。C: 通过JC-1荧光探针检测流式法不同偏振电压对Jurkat细胞线粒体膜电位的影响。D、E: 通过Seahorse技术检测流式法不同偏振电压对Jurkat细胞线粒体呼吸途径中能量代谢的影响, 其中图D为ATP合成相关的氧耗值, 图E为线粒体呼吸储备值。ns: 差异不显著。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $n=3$ 。

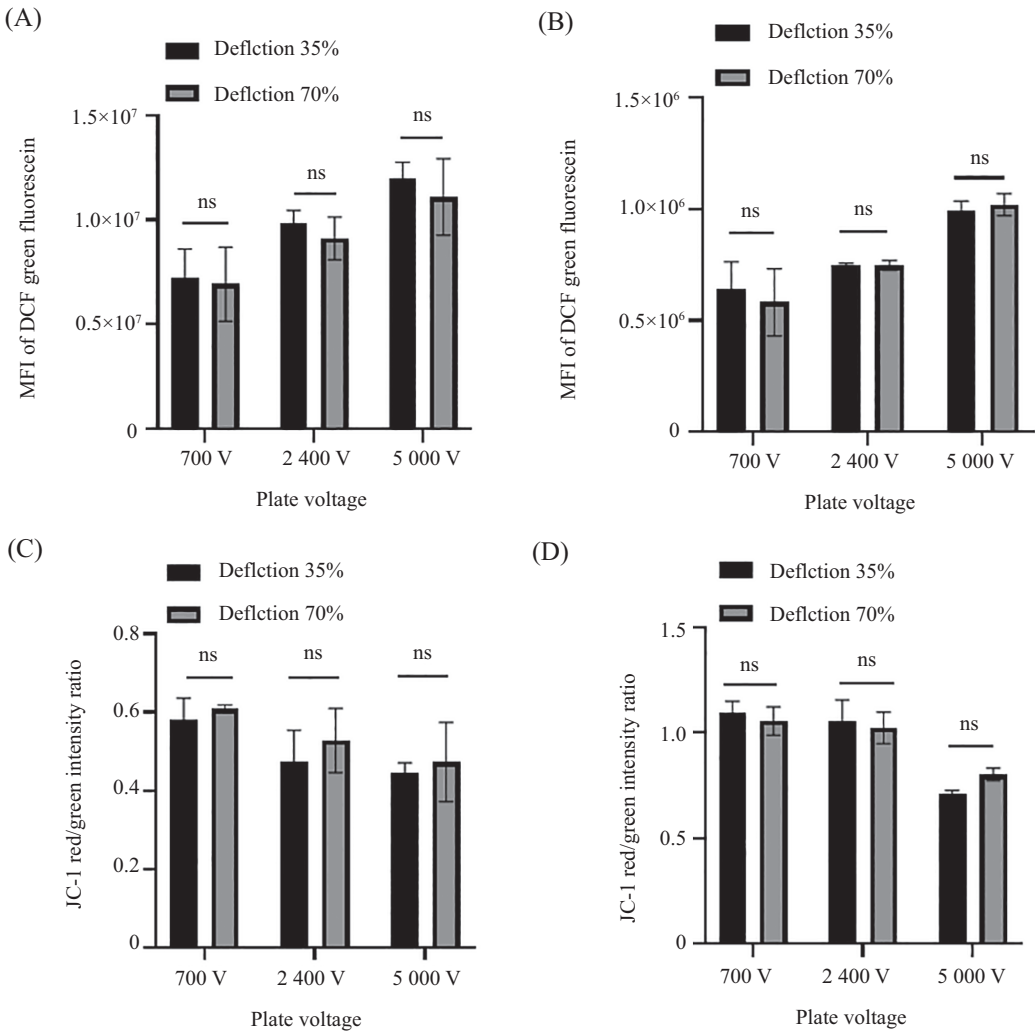
A,B: effect of different plate voltages on reactive oxygen species in Jurkat cells using DCFH-DA fluorescent probe. C: effect of different plate voltages on mitochondrial membrane potential in Jurkat cells using JC-1 fluorescent probe. D,E: effect of different plate voltages on energy metabolism in Jurkat cells by Seahorse technology. Figure D shows ATP-linked respiration and figure E shows spare respiratory capacity. ns: not significant. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $n=3$.

图4 流式法偏振电压对Jurkat细胞的影响

Fig.4 The influence of plate voltage on Jurkat cells

表3 流式法偏振电压对Jurkat细胞线粒体膜电位的影响结果

偏振电压	红色荧光强度	绿色荧光强度	红色荧光/绿色荧光比值
Plate voltage	Red intensity	Green intensity	Red/green intensity ratio
SD	438 818.0± 2 788.9	144 309.0±455.2	3.041±0.010
700 V	434 443.0±2 556.4	158 285.3±1 592.6	2.745±0.042
2 400 V	460 561.3±1 632.7	180 136.3±921.0	2.557±0.005
5 000 V	444 190.0±5 072.2	175 832.3±1 345.5	2.526±0.019

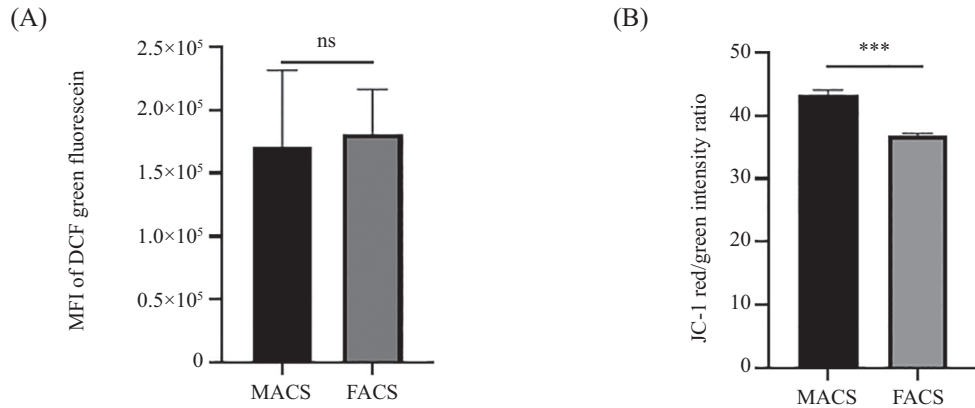


A、B: 通过DCFH-DA荧光探针检测流式法不同液滴加电对细胞系活性氧的影响。C、D: 通过JC-1荧光探针检测流式法不同液滴加电对细胞系线粒体膜电位的影响。其中图A和C是HEK 293T的实验结果, 图B和D是Jurkat的实验结果。ns: 差异不显著。n=3。
A, B: effect of different stream deflections on reactive oxygen species in HEK 293T and Jurkat cells using DCFH-DA fluorescent probe. C, D: effect of different stream deflections on mitochondrial membrane potential in HEK 293T and Jurkat cells using JC-1 fluorescent probe. Figure A and C are the results of HEK 293T, while figure B and D are the results of Jurkat. ns: not significant. n=3.

图5 流式法液滴加电对HEK 293T细胞和Jurkat细胞的影响
Fig.5 The influence of stream deflection on HEK 293T and Jurkat cells

胞的代谢特征产生干扰。尽管磁珠法和流式法在活性氧水平上无明显差异, 但流式法相较于磁珠法纯化的CD4⁺ T细胞, 其线粒体膜电位、ATP合成相关的氧耗值和线粒体储备呼吸能力均呈现下降趋势。

故从能量代谢的角度判断, 相比于流式法, 磁珠法对原代CD4⁺ T细胞的损伤更小。
流式法在多参数分选中具有不可替代的作用^[23]。为了探究流式分选对细胞能量代谢的影响, 本文进



A: 用DCFH-DA荧光探针检测两种分选方式对CD4⁺ T细胞活性氧水平的影响。B: 用JC-1荧光探针检测两种分选方式对CD4⁺ T细胞线粒体膜电位的影响。ns: 差异不显著。*** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

A: effect of two sorting methods on the mitochondrial membrane potential from CD4⁺ T cells using JC-1 fluorescent probe. B: effect of two sorting methods on the reactive oxygen species from CD4⁺ T cells using DCFH-DA fluorescent probe. ns: not significant. *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图6 磁珠法和流式法对CD4⁺ T细胞的影响

Fig.6 Effect of MACS and FACS on CD4⁺ T cells

一步对流式法偏振电压以及液滴加电进行实验。不同偏振电压实验时,与700 V、2 400 V、5 000 V实验组相比,SD组HEK 293T和Jurkat细胞的活性氧水平平均显著下降,线粒体膜电位均显著升高。ATP合成相关氧耗值和线粒体储备呼吸能力的实验结果略有不同,但两种细胞的SD组与2 400 V、5 000 V实验组分别对比,均存在显著差异。加电分选模式实验组两两对比,700 V实验组与2 400 V实验组间,仅Jurkat细胞的活性氧水平存在显著差异。2 400 V实验组与5 000 V实验组间,两种细胞的活性氧水平均显著变化。而700 V实验组与5 000 V实验组间,HEK 293T细胞的ATP合成相关氧耗值和活性氧水平存在显著差异,Jurkat细胞的线粒体膜电位和活性氧水平存在显著差异。这与唐亚丽等^[24]的研究结果一致,高强度电场作用下大肠杆菌膜损伤比例增加。不同液滴加电实验时,在相同偏振电压(700 V、2 400 V、5 000 V)条件下设置液滴加电为35%和70%,HEK 293T和Jurkat细胞的活性氧水平和线粒体膜电位在同一偏振电压实验组之间无显著变化。

综上,磁珠法更适用于小鼠脾脏原代CD4⁺ T细胞能量代谢实验前的分选预处理。基于此结论推测,磁珠法可能也适用于其他类型的原代细胞,但因本研究仅选取了一种常用的原代细胞,后续还需要对其他原代细胞做进一步验证。流式法中建议优先选择不加电分选模式,若需加电分选模式建议使用小于2 400 V的偏振电压。该实验结果为能量代谢检测实验提供了分选方式和分选条件的数据参考。分

选技术与XF技术的联合应用,为免疫代谢如自身免疫疾病的研究提供了技术参考。

参考文献 (References)

- [1] HAMSEL T T, POUND J D, PILING D, et al. Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads [J]. *J Immunol Methods*, 1989, 122(1): 97-103.
- [2] HU Y, FAN L, ZHENG J, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients utilizing multiparameter flow cytometry and assessment of the prognosis of patients in different CTCs levels [J]. *Cytometry A*, 2010, 77A(3): 213-9.
- [3] ZHU Y, KEKALO K, NDONG C, et al. Magnetic-nanoparticle-based immunoassays-on-chip: materials synthesis, surface functionalization, and cancer cell screening [J]. *Adv Funct Mater*, 2016, 26(22): 3953-72.
- [4] AGHAEPOUR N, FINAK G, FLOWCAP C, et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(5): 445.
- [5] BRANDAU S, DORHOI A. Myeloid-derived suppressor cells [M]. New York: Humana Press, 2021, 203-17.
- [6] 李艳伟, 宋兴辉, 邢月婷, 等. 实时检测收集液对分选后HEK293T细胞活性的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(LI Y W, SONG X H, XING Y T, et al. The real-time detection of the effect of collection solution on the viability of sorted HEK293T cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(10): 2009-20.
- [7] ROBINSON J P. Flow cytometry: past and future [J]. *Biotechniques*, 2022, 72(4): 159-69.
- [8] 江彬, 赵文涛, 欧阳聪, 等. 细胞代谢调控网络[J]. *厦门大学学报*(JIANG B, ZHAO W T, OUYANG C, et al. Regulation network of cellular metabolism [J]. *Journal of Xiamen University, Natural Science*), 2022, 61(3): 346-63.
- [9] HU Y, CAO K, WANG F, et al. Dual roles of hexokinase 2 in shaping microglial function by gating glycolytic flux and mitochondrial activity [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(12): 1756-74.

- [10] ZHU Y, LIU Q, LIAO M, et al. Overexpression of lncRNA EP-B41L4A-AS1 induces metabolic reprogramming in trophoblast cells and placenta tissue of miscarriage [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 518-32.
- [11] CLERC P, POLSTER B M. Investigation of mitochondrial dysfunction by sequential microplate-based respiration measurements from intact and permeabilized neurons [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34465.
- [12] BRAND M D, NICHOLLS D G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells [J]. *Biochem J*, 2011, 435(2): 297-312.
- [13] MURPHY A N, BREDESEN D E, CORTOPASSI G, et al. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9893-8.
- [14] DIVAKARUNI A S, ROGERS G W, MURPHY A N. Measuring mitochondrial function in permeabilized cells using the seahorse xf analyzer or a clark-type oxygen electrode [J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2014, doi: 10.1002/0471140856.tx2502s60.
- [15] SAFIULINA D, KAASIK A, SEPPET E, et al. Method for in situ detection of the mitochondrial function in neurons [J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 137(1): 87-95.
- [16] KRAMER P A, CHACKO B K, RAVI S, et al. Bioenergetics and the oxidative burst: protocols for the isolation and evaluation of human leukocytes and platelets [J]. *J Vis Exp*, 2014(85): 1-9.
- [17] ZHAN Y X, CAO J, JI L, et al. Impaired mitochondria of Tregs decreases OXPHOS-derived ATP in primary immune thrombocytopenia with positive plasma pathogens detected by metagenomic sequencing [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 1-14.
- [18] 马冀, 崔钊, 王华晶, 等. 不同抗疟药物对红内期恶性疟原虫3d7线粒体呼吸的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学(MA J, CUI Z, WANG H J, et al. Effects of antimalarial drugs on mitochondrial respiration in erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* 3D7 [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2020, 25(11): 1201-13.*
- [19] HILL B G, BENAVIDES G A, LANCASTER J R, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy [J]. *Biol Chem*, 2012, 393(12): 1485-512.
- [20] JANG M, PETE E S, BRUHEIM P. The impact of serum-free culture on hek293 cells: from the establishment of suspension and adherent serum-free adaptation cultures to the investigation of growth and metabolic profiles [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.964397.
- [21] 覃祥, 刘静, 陈曦, 等. 急性淋巴细胞白血病阿糖胞苷耐药细胞株的构建及机制研究[J]. *中国实验血液学杂志(QIN X, LIU J, CHEN X, et al. Establishment of cytarabine-resistant acute lymphoblastic leukemia cell lines and its resistance mechanism [J]. *J Exp Hematol*, 2021, 29(5): 1403-10.*
- [22] ZOU D, YIN Z, YI S G, et al. CD4⁺ T cell immunity is dependent on an intrinsic stem-like program [J]. *Nat Immunol*, 2024, 25(1): 66-76.
- [23] LIU Y, YANG M, TANG L, et al. TLR4 regulates ROR γ t⁺ regulatory T-cell responses and susceptibility to colon inflammation through interaction with Akkermansia muciniphila [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 98.
- [24] 唐亚丽, 卢立新, 赵伟, 等. 高强度电场对大肠杆菌细胞膜的影响及致死效应[J]. *食品与发酵工业(TANG Y L, LU L X, ZHAO W, et al. Effects of high-intensity pulsed electric field on inactivation and cell membrane of *E. coli* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(11): 30-2.*