

细胞内游离胆固醇的标记和定量

Free Cholesterol Labeling and Quantification

董云霞, 陈静, 任进*

药物安全评价研究中心, 中国科学院上海药物研究所, 浦东, 上海

*通讯作者邮箱: jren@cdser.simm.ac.cn

引用格式: 董云霞, 陈静, 任进. (2021). 细胞内游离胆固醇的标记和定量. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010832. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010832.

How to cite: Dong, Y. X., Chen, J. and Ren, J. (2021). Free Cholesterol Labeling and Quantification. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010832. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010832. (in Chinese)

摘要: 胆固醇, 又称胆甾醇, 是动物组织细胞不可缺少的重要物质(Luo et al., 2020)。胆固醇是生物膜的主要成分, 在细胞器之间快速运输且分布不均。细胞内胆固醇分布异常是许多溶酶体脂质储存障碍的标志, 因此细胞胆固醇可视化和成像, 包括质膜和细胞内部, 对于研究胆固醇的含量和分布至关重要(Wilhelm et al., 2019)。菲律宾菌素 (filipin, filimarisin) 是从菲律宾链霉菌 (*Streptomyces filipinensis*) 培养物中分离得到的混合物的统称, 其主要成分是 FilipinIII, 是一种 28 元环戊烯大环内酯类抗生素, 可以特异的与游离的胆固醇相互作用而不与酯化的胆固醇结合。FilipinIII 结合游离的胆固醇后, 激发光谱波峰约在 360 nm 处, 发射光谱波峰约在 480nm 处, 通过检测激发波长 360 nm 和发射波长 480 nm 附近的荧光信号来表征细胞内的胆固醇含量, 已被广泛应用于细胞中胆固醇的定位和定量(Maxfield and Wustner, 2012)。在进行高通量细胞内游离胆固醇的定量时, 采用 HCS NuclearMask™ Red 核染料, 它是一种可以应用于活细胞和固定细胞标记细胞核的探针, 并且可以避免甲醛固定或者表面活性剂通透时带来的影响, 在实验中可以做为内参表征细胞数。本实验中, 细胞在经过不同的处理之后, 对细胞进行

FilipinIII 和 HCS NuclearMask™ Red 染色, 通过基于图像的高内涵筛选 (high content screening, HCS) 分析评价影响细胞内游离胆固醇含量和分布的处理条件。

关键词: 胆固醇, FilipinIII 染色, HCS NuclearMask™ Red 染色, 高内涵筛选

材料与试剂

1. 96 Well Black Assay Plate, Clear Bottom with Lid, 3603 (Corning Costar, Cambridge, MA, 货号: 04119005)
2. Huh7 细胞 (ATCC, USA)
3. DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基 (HyClone, 货号: SH30243.01)
4. Filipin (Dalian Meilun Biotech, 货号: MB1848), 粉末-20 °C 避光防潮密闭干燥保存一年
5. HCS NuclearMask™ Red stain (Invitrogen, 货号: H10326), -20 °C 避光可稳定保存一年;
6. DMSO (sigma, 货号: D4540-1L)
7. U-18666A (Cayman, Item No.10009869), -20 °C 可稳定保存两年以上
8. 4%多聚甲醛固定液 (Sangon Biotech, 货号: E672002), -20 °C 保存
9. 棕榈酸钠 (Sodium palmitate) (Sigma-Aldrich, 货号: P 9767), 2-8 °C 保存
10. 牛血清白蛋白, 无脂肪酸 (BSA, Fatty Acid Free) (Yeasen Biotech, 货号: 36104ES25), 4 °C 密封可稳定保存五年以上
11. Penicillin/Streptomycin (Gibco, Germany, 货号: 15240-062)
12. Filipin 储备液 (见溶液配方)
13. Filipin 工作液 (见溶液配方)
14. HCS NuclearMask™ Red 工作液 (见溶液配方)
15. 10% BSA 溶液 (见溶液配方)
16. 10 mM PA 储备液 (见溶液配方)
17. DMEM/HIGH GLUCOSE 完全培养基 (见溶液配方)

仪器设备

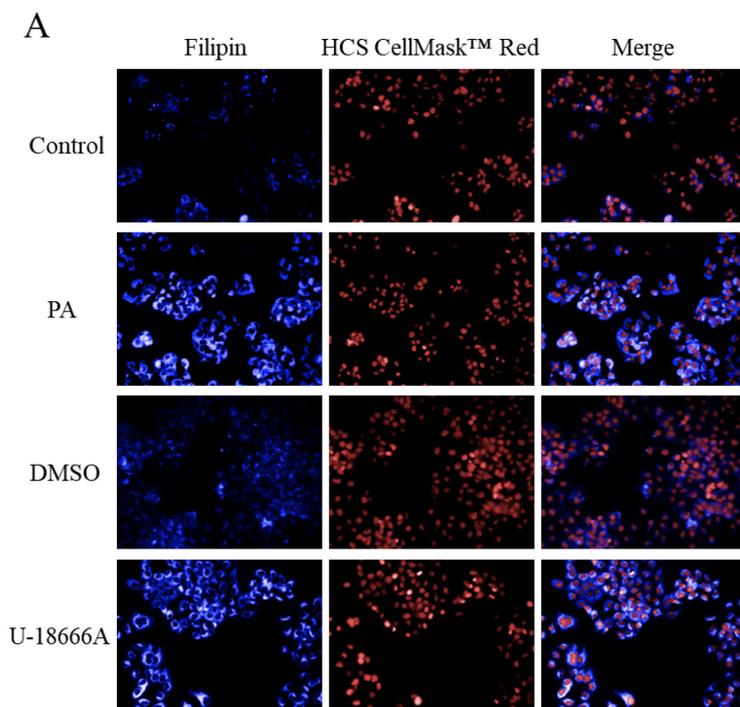
1. Operetta CLSTM 高内涵成像分析系统 (PerkinElmer)
2. 移液枪 (Eppendorf)

实验步骤

1. 细胞铺板: 采用 96 孔底透黑色细胞培养板, Huh7 细胞, 5×10^3 个/孔, 放置于 37°C 培养箱中培养。
2. 药物处理: 细胞贴壁 24 h 后, 根据实验需求对细胞进行不同的处理。本实验中通过 0.5 mM 饱和脂肪酸棕榈酸 (Palmitic acid, PA) 处理细胞 24 h, 目的是引起细胞内游离胆固醇的蓄积。同时用 DMSO 和 U-18666A (细胞内胆固醇转运抑制剂) (Koh and Cheung, 2006) 处理细胞 24 h, DMSO 作为阴性对照, U-18666A 作为阳性对照。具体处理条件如下:
 - (1) Control 组: 完全 DMEM 稀释等体积的 9% BSA 作为对照;
 - (2) PA 组: 完全 DMEM 培养基稀释 10 mM PA 储备液至终浓度为 0.5 mM PA;
 - (3) 完全 DMEM 培养基加入 0.1% DMSO;
 - (4) 完全 DMEM 培养基稀释 U-18666A 至终浓度为 1.25 μM ;取出 96 孔板, 吸去培养基, 分别加入上述配置好的培养基 (各 3 复孔), 放回 37°C 培养箱中继续培养 24 h。
3. 固定及染色:
 - (1) 除去培养基, 用 4% 多聚甲醛, 室温固定细胞 30 min;
 - (2) Filipin 染色: 去除 4% 多聚甲醛, PBS 洗三次后, 每孔加 100 μL Filipin 工作液, 避光室温孵育 30 min;
 - (3) HCS NuclearMask™ Red 染色: 去除 Filipin 工作液, 避光条件下 PBS 洗三次后, 每孔加 100 μL HCS NuclearMask™ Red 工作液, 避光室温孵育 10 min;
 - (4) 去除染色液, 避光条件下 PBS 洗三次, 最后每孔加 100 μL PBS, 进行后续的荧光拍照和分析。
4. 高内涵成像
 - (1) 打开 Operetta 主机, 采用 Harmony4.9 软件进行拍摄和统计。将 96 孔板放入仪器中, 设置图像采集条件, 包括细胞培养板的品牌规格和物镜倍数 (孔板型号为 3603 Corning, 物镜倍镜设为 $20\times$, 常用于高内涵筛选), 添加所需的荧光通道 (Filipin: 360-400 nm 激发光和 410-480 nm 发射光, HCS NuclearMask™ Red: 620-640 nm 激发光和 650-760 nm 发射光);

- (2) 分别调整两个荧光通道的参数，包括 **time** (曝光时间), **power** (光源强度) 及 **height** (聚焦高度)，确定最佳曝光时间、光源强度和聚焦高度，并保存该拍摄条件；
- (3) 选择要拍摄的孔和视野（一般选择 10 个视野），点击 **Run Experiment** 进行图像采集；
- (4) 拍摄完成后，点击 **Image Analysis** 进行图像分析，依次点击 **Find Nuclei**, **Find cytoplasm**，即为该视野的细胞数和胞质区域，然后点击 **Calculate intensity properties** 选择计算平均荧光强度，范围设为细胞质，并保存该分析方法；
- (5) 点击 **Evaluation**，使用已保存的分析方法进行多孔分析；
- (6) 接着，点击 **Data management** 导出数据；
- (7) 返回 **Image Analysis** 图像分析部分，找到每个视野的图像，点击鼠标右键，选择 **Save Image as** 保存该视野的图像（分别保存每个单荧光通道和 **Merge** 的图像）。

结果与分析



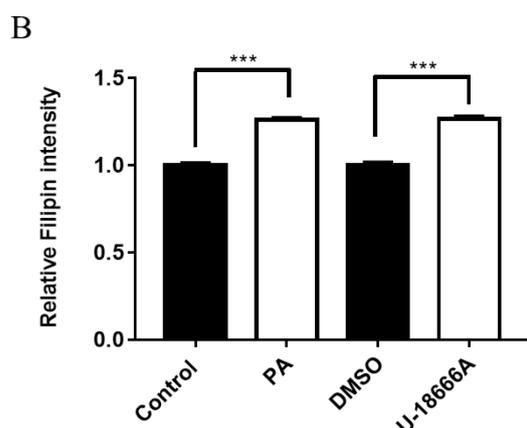


图 1. 不同条件处理 Huh7 细胞之后细胞内游离胆固醇的含量。A. PA 和 U-18666A 分别处理 24h 之后，用 Filipin 和 HCS NuclearMask™ 染色和 Operetta 高内涵荧光成像。B: 荧光统计分析结果。***P<0.001 vs control 或者 DMSO，数据用 mean ± SEM 表示。

如图 1A 所示，U-18666A 处理之后，Filipin 荧光强度增加，表明细胞内胆固醇的含量上升。同时，与 control 相比，0.5 mM PA 处理 24 h 之后 Filipin 荧光强度也显著增加，达到阳性对照的效果，表明我们选择的处理条件的确可以引起细胞内胆固醇的蓄积。Operetta 高内涵成像分析系统统计分析结果与荧光结果一致（图 1B）。

目前用于检测细胞内 FC 的方法主要包括酶促试剂盒检测和液质联用（LC-MS）。其中，试剂盒价格昂贵，检测限较高，对于细胞数较少或者细胞中 FC 轻微的变化很难准确又灵敏的被定量。而 LC-MS 的方法，对于样品的精度要求很高，样品前处理过程复杂，引入的系统误差较多，再加上整个检测时程较长，仪器昂贵。相比较而言，Filipin 染色定量的方法，操作简单，结果可视化，性价比高，更适用于高通量的筛选。

失败经验

1. Filipin 染料对光特别敏感，因此保存的时候需要避光，并且避免反复冻融，储备液需要分装冻存。同时，染色之后的细胞需要立即进行拍照分析以避免荧光的淬灭。
2. 观察分析 Filipin 荧光的最佳激发光是 340-380 nm 激发光和 385-470 nm 发射光，观察 HCS NuclearMask™ Red 荧光的最佳激发光是 622 nm 激发光和 645 nm 发射光。
3. 不同细胞的生长速率不同，铺板的时候要控制好细胞密度，避免因为细胞过密而引

起的 Operetta 高内涵成像分析系统统计分析结果不准确。

4. 因为需要根据 HCS NuclearMask™ Red 染色的结果来判定细胞的定位和数量，用以校正每个细胞的平均 Filipin 荧光强度，所以本实验中推荐使用单层贴壁细胞。
5. 不同细胞对 PA 处理的响应不同，因此更改细胞系使用该处理条件时，需要摸索合适的时间和浓度。

溶液配方

1. Filipin 储备液

5 mg 的 Filipin 粉末溶于 200 μ L DMSO，得到 25 mg/mL 的 Filipin 储备液，-80 °C 避光分装保存，避免反复冻融。

2. Filipin 工作液

PBS 稀释 Filipin 储备液至终浓度为 0.05 mg/mL，得到 Filipin 工作液，避光保存，现配现用。

3. HCS NuclearMask™ Red 工作液

取 10 μ L HCS NuclearMask™ Red 加入 10 mL 的 PBS 溶液中，得到 HCS NuclearMask™ Red 工作液，避光保存，现配现用。

4. 10% BSA 溶液

称取 1 g BSA (Fatty Acid Free) 溶解于 10 mL PBS 中，过 0.22 μ m 滤膜即可得到 10% BSA 溶液。

5. 10 mM PA 储备液

称取 27.841 mg 的棕榈酸钠 (Sodium palmitate)，加入 1 mL PBS 中，70 °C 加热溶解得到 100 mM 的原液，之后与 9 mL 10% BSA 溶液混合，55 °C 加热至溶液澄清，即可得到 10 mM PA 储备液。-20 °C 分装保存，使用时用培养基稀释至所需浓度。

6. DMEM/HIGH GLUCOSE 完全培养基

DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基 450 mL+FBS 50 mL+Penicillin/Streptomycin 5 mL。

致谢

基金项目 (Foundation)：国家科技部“重大新药创制”科技重大专项 (No

2018ZX09101001-003-007)。

参考文献

1. Koh, C. H. and Cheung, N. S. (2006). [Cellular mechanism of U18666A-mediated apoptosis in cultured murine cortical neurons: bridging Niemann-Pick disease type C and Alzheimer's disease.](#) *Cell Signal* 18(11): 1844-1853.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16797161>
2. Luo, J., Yang, H. and Song, B. L. (2020). [Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis.](#) *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(4): 225-245.
3. Maxfield, F. R. and Wustner, D. (2012). [Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes.](#) *Methods Cell Biol* 108: 367-393.
4. Wilhelm, L. P., Voilquin, L., Kobayashi, T., Tomasetto, C. and Alpy, F. (2019). [Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4.](#) *Methods Mol Biol* 1949: 137-152.