

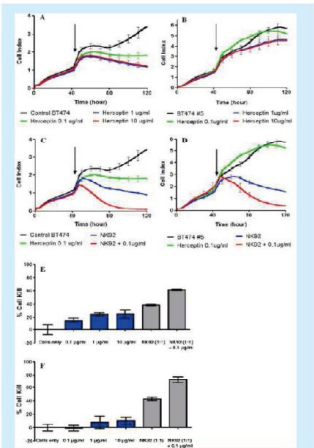
icnsensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol* 2, 363-372.

5. Hartog H, Wesseling J, Boezen HM, van der Graaf WTA (2007) The insulin-like growth fac-tor 1 receptor in cancer: Old focus, new future. *Eur J Cancer* 43, 1895-1904.

6. Stagg J and Smyth MJ (2007) NK cell-based immunotherapy. *Drug News Perspect* 20, 155-163.

客户应用实例（一）

文献：Kute TE., et al. Breast tumor cells isolated from in vitro resistance to trastuzumab remain sensitive to trastuzumab anti-tumor effects in vivo and to ADCC killing. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Nov; 8:1887

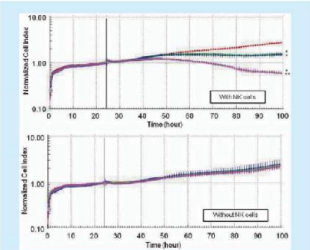


实例1. RTCA系统检测Trastuzumab对 BT-474细胞（图A）和具有trastuzumab抗性的BT-474细胞（图B）在不同条件下的杀伤作用。分别用不同浓度的Trastuzumab处理细胞(时间点如箭头所示)：10g/ml (红), 1 g/ ml (蓝), 0.1 g/ml (绿)

0g/ml(黑)。BT-474 细胞 (图 C) 和 trastuzumab 抗性的 BT-474 细胞 (图 D) 用 0.1g/ml 的 trastuzumab (红), NK-92 细胞与 BT-474 细胞按照 1:1 的比例 (绿) 分别作用, 或者 0.1 g/ml trastuzumab 以及 NK-92 细胞与 BT-474 细胞按照 1:1 同时作用细胞 (蓝)。每 30min 一次, 实时监测 Cell index 的变化, 细胞的结果如图 E 和 F 所示, 可见: NK-92 细胞的加入大大促进了 Trastuzumab 引起的细胞杀伤。

客户应用实例（二）

文献：Yamashita-Kashima Y., et al. Pertuzumab in combination with Trastuzumab shows significantly enhanced antitumor activity in HER2-positive human gastric cancer xenograft models. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17:5060-70.



实例2. RTCA系统检测Pertuzumab和trastuzumab在 ADCC 激活中的作用。细胞培养 24hr后, 用 pertuzumab (10 ng/mL), trastuzumab (2 ng/mL) 分别处理或者两者同时处理细胞。NK细胞和 NCI-N87按照 1:1的比例加入, 结果见上图。未加入NK细胞的见下图。Cell index 在前4hr内, 每5min检测一次, 之后的44hr内每15min检测一次, 然后1hr检测一次。Cell index 标准化至药物处理前的时间点。红为对照组, 绿为pertuzumab 处理组, 蓝为 trastuzumab 处理组, 品红色为两种药物同时作用组。可见: NK细胞的加入促进了 pertuzumab和trastuzumab 引起的细胞杀伤。

艾森生物简介

ACEA BIO Profile

2002年5月,艾森生物科学公司(ACEA Biosciences Inc.)创建于美国生物硅谷——加利福尼亚州的圣地亚哥市。艾森生物是一家集生产、研发、销售、技术支持等为一体的高科技公司,致力于开发具有国际先进水平的实时无标记细胞功能分析系统系列产品,以加速现代药物开发和提高基础生命科学研究水平。艾森已成功地研发出拥有自主知识产权、国际首创的微电子生物传感器芯片及实时无标记动态细胞分析技术等多项核心技术,在无标记生物检测这个新颖的生物技术领域处于全球领先地位。公司目前已经掌握了微电子生物细胞传感器芯片制备、生物信号向电子信号转化、数据采集和分析、配套分析软件设计等国际先进技术,并拥有自主知识产权,在国际生物芯片技术竞争中处于领先的地位。

实时无标记细胞功能分析仪具有实时监控、高信息量、无需标记、全自动化、高灵敏度和高准确性等优点,极大地提高了药物开发和基础生命科学研究的自动化过程及产出通量,并从根本上改进人们从事细胞分子生物学研究的手段和方式。公司用户群包括全球500强的大型制药公司及世界顶级的研究机构。同时,我们将积极进行学术推广,让客户充分了解该系统的优越性,旨在优化细胞生物研究的基础技术平台。



艾森生物包括艾森生物科学公司(ACEA Biosciences Inc.)及艾森生物(杭州)有限公司

服务热线
400 600 1063



艾森生物(杭州)有限公司

地址:浙江省杭州市西湖区西园五路2号3楼

电话:0571-2890 1211

传真:0571-2890 7820

邮箱:xe@aceabio.com.cn

网址:www.aceabio.com.cn



ACEA Biosciences Inc.

Address: 6779 Mesa Ridge Rd.#100, San Diego, CA 92121

Telephone: (858) 724-0928

Toll-free: (866) 308-2232

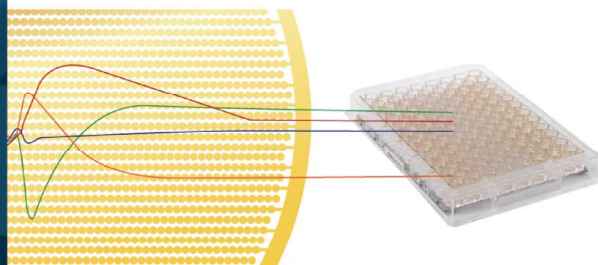
Facsimile: (858) 724-0927

Website: www.aceabio.com

Application Note NO. 1 / Nov. 2012

RTCA技术应用专辑(一)

肿瘤、免疫、药物毒性检测等





目 录

一、细胞毒性 RTCA 实时动态检测.....	1
二、生长因子介导的内皮细胞迁移 RTCA 实时动态检测.....	6
三、细胞粘附和伸展 RTCA 实时动态检测.....	11
四、肿瘤与微环境之间的相互作用 RTCA 实时动态检测.....	16
五、自然杀伤（NK）细胞介导的细胞杀伤作用 RTCA 实时动态检测.....	21
六、抗体依赖细胞介导的细胞杀伤（ADCC）作用 RTCA 实时动态检测.....	27

细胞毒性RTCA实时动态检测

前言

细胞活性及细胞死亡的检测常运用在细胞功能、细胞对药物反应以及药物毒性的研究。新的药物、化妆品、食品添加剂等在投入使用之前，都必须进行大量的细胞毒性试验。如果是抗癌药物，细胞毒性就是它们作用的关键所在，因此对于细胞毒性的研究也随研究目的的不同而不同。

细胞毒性引起的细胞死亡有程序性和非程序性之分，后者即坏死¹。药物可以针对相应的细胞死亡信号通路进行调控，从而抑制或诱导细胞的死亡。对细胞死亡信号通路的深入研究，可为药物研发提供新的靶点，反之，在抗肿瘤药物、神经保护药物等作用机制的研究过程中，密切观察其对细胞死亡通路影响，则可为细胞死亡的深入认识提供资料。

抗肿瘤药物引起细胞死亡的过程非常短暂，用传统的终点分析方法很难捕捉到。例如，细胞凋亡往往发生在很短的时间进程内，可能在几个小时内完成。这样，就需要选择最佳的时间点建立方法来检测细胞存活或死亡机理。不同化合物引起的细胞杀伤作用动力学不同，若能够持续动态监测细胞活力和毒性，就可以选择最佳的时间点并结合后续的终点检测方法来获取更多的药物作用机制的信息。

传统细胞毒性测定方法有台盼蓝染色法、克隆（集落）形成法、³H放射性同位素掺入法、MTT法以及ATP检测法等。但这些细胞学研究检测形式多是终点检测法，仅给实验提供一个最终结果，且经常需要标记，从而对细胞产生破坏。由于细胞是活体，生物细胞进程是动态的而非静态的，终点检测法大大局限了生物信息的全程动态收集。

实时阻抗细胞分析技术(RTCA, Real Time Cellular Analysis)通过电阻抗的形式，可以实现实时、无标记、持续动态检测细胞表型变化。E-Plates电极底部整

合有微金电极，细胞的有无会影响电阻抗的变化。电阻抗值以细胞指数(CI)的形式输出,可定量评估细胞生理状态包括细胞数量、存活率及细胞形态变化等。基于阻抗的动态检测细胞活力与相应的细胞计数及MTT法得到的结果一致²。基于阻抗检测得到的动力学图谱能够提供化合物引起的细胞毒性作用的瞬时效应信息，此外，在药物细胞毒性试验中，RTCA检测能够精确确定化合物介导的细胞毒作用发挥最大效应的时间点，帮助研究人员更好地控制和优化实验，有助于药物作用机理的研究及揭示。

材料与方法

细胞培养和细胞指数计算

HeLa 细胞购自 ATCC，培养于含 10%FBS、1%胰岛素和伊霉素的 DMEM 培养基中，在 5% CO₂、37°C 的培养箱中孵育。RTCA 技术持续动态监测细胞贴壁、伸展及增殖过程。使用细胞指数（Cell Index）表示细胞阻抗。每点的 CI 值定义为(Rn-Rb)/15，其中 Rn 表示孔接种有细胞时的电极阻抗值，Rb 是表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。标准化细胞指数（NCI）定义为感兴趣的时间点的细胞指数与某一特定时间点的细胞指数的比值。

化合物处理、细胞增殖及毒性试验

E-Plate 96 电极板每孔接种 2500–5000 个细胞，大约 24h 之后，用一系列稀释浓度的化合物处理细胞。RTCA 实时检测细胞状态，每隔 15–30min 检测一次。阿霉素、长春新碱、MG-132 及 5-FU 购自 Sigma。对于基于 WST-1 的细胞增殖检测，需要在固定时间点进行 WST-1（Roche）染色，步骤包括：移除 E-Plate 96 电极板孔内的旧培养基，加入 100ul 含 10%WST-1

的新鲜培养基，置于 37°C 孵育 1h，然后将含有 WST-1 的培养基从 E-Plate 中转移到一个新的 96 孔细胞培养板中，用酶标仪（DTX 890，Beckman Coulter 公司）450nm 处测量其吸光度。对于细胞凋亡检测，使用 ELISA^{PLUS} 细胞凋亡和死亡检测试剂盒（Roche），按照说明书操作。

结果与讨论

RTCA 技术能够实时、连续检测细胞的活力。图 1A 为几种抗肿瘤药物（DNA 损伤药物阿霉素 Doxorubicin 和 5-FU，蛋白酶体抑制剂 MG-132 及抗有丝分裂药物长春新碱 Vincristine）的动态细胞检测图谱。图 1B 为 WST-1 检测药物细胞毒性的结果。RTCA 的检测曲线显示，不同作用机制的化合物介导的细胞增殖抑制速率和动力学具有明显的差异（图 1A）。其中，MG-132 介导的细胞毒作用开始于加药后 4h，10h 达到最大毒性作用；与此相反，长春新碱在加药后立即引起毒性作用，15h 达到最大效应；而阿霉素和 5-FU 介导的细胞毒作用在加药很长一段时间后才观察到，起效时间分别为 12h 和 24h，药物作用 48h 后才观察到最大效应。

为评估细胞指数变化是否可用于帮助选择后续检测的最佳检测时间点，我们选择了两种具有不同细胞动力学图谱的凋亡诱导药物 MG-132 和 5-FU 进行检测³⁻⁵（图 2）。HeLa 细胞接种于 E-Plate 96 培养 24h 后，将上述两种药物 3 倍稀释后加入到细胞中。RTCA 持续检测 64h，MG-132 在加药后 10h 内出现 CI 最低值（图 2A），而 5-FU 达到最低值则至少需要 48h（图 2B）。另外，细胞作用动力学图谱显示药物作用具有浓度依赖性，高浓度药物对细胞的作用效应更明显，细胞指数下降速率较快，而低浓度药物的细胞指数下降速率较慢（图 2B）。同时，我们分别选取两个不同的时间（图 2A 2B）。用凋亡试验进行检测的结果显示，对于 MG-132，凋亡反应时间最佳剂量依赖反应时间出

现在加药后 16 hr 而在非 64 hr（图 2C）；而对于 5-FU，在 16hr，此时 CI 值刚开始出现下降趋势则无法测得凋亡效应，凋亡反应时间最佳剂量依赖反应时间出现

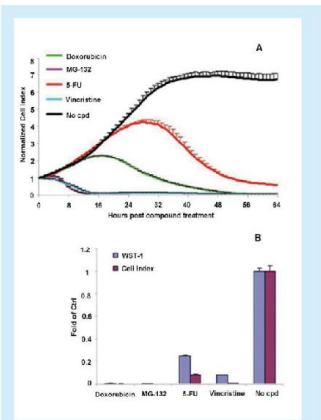
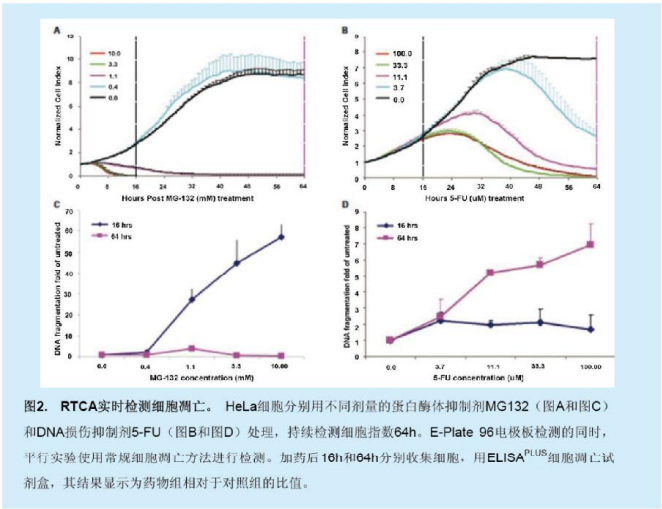


图1A. RTCA实时动态检测细胞活力。HeLa 细胞接种于E-Plate 96 电极板，培养24h之后用不同化合物处理：MG-132 (3.3 μ M)，阿霉素 (0.33 μ M)，长春新碱 (6.2 nM) 及5-FU (11.1 μ M)，未经化合物处理的细胞作为对照组。每隔15min检测一次细胞指数，持续检测64h。曲线代表所有重复样品的平均值，误差线为标准偏差。图1B. 细胞指数和WST-1分析结果对比。实验结束时（图1A所示），即加药后64h，加WST-1染色分析。细胞指数和WST-1分析结果对比，结果展示为试验组相对于对照组的倍数变化，柱状图显示所有重复样品的平均值，误差线为标准偏差。

在加药后 64hr（图 2D），这说明凋亡反应具有瞬时性，同时也说明在捕获瞬时细胞反应时挑选最佳时间点的重要性。根据上述 RTCA 获取的数据，进行凋亡检测试验时，应取 CI 值刚达到最低值时的时间点为佳，检测

时间过早或过晚都无法捕捉到凋亡效应的最佳窗口。因建立了最低细胞指数与凋亡作用之间的关系之后，我们又研究了如何根据细胞指数变化来预测细胞凋亡作用。在该研究中，我们使用了具有较快反应动力学的药

物，适合用 RTCA 技术进行检测。RTCA 技术检测细胞瞬时反应的高灵敏特性，也非常适于指示后续实验的最佳检测时间点，从而帮助研究者更深入地揭示化合物介导的细胞凋亡效应。



物 MG-132。加药后持续检测细胞指数 12h；同时设立平行试验，使用 WST-1 增殖检测试剂和 ELISA^{PLUS} 细胞凋亡试剂盒检测药物作用 1, 4, 8, 12h 的细胞凋亡现象（图 3）。当细胞指数接近最低值时可观测到最高水平的细胞凋亡效应（图 3C），重要的是，与 WST-1 分析法相比，细胞指数变化能更灵敏地预测细胞凋亡效应（图 3B）。例如，在加药后 8h，指数显示与对照组相比，试验组细胞指数发生了 >80% 的变化，而 WST-1 分析法则只显示发生了 <20% 的变化，相应的，在该时间点细胞凋亡作用非常明显，为对照组的 6 倍。因此，检测化合物引起的细胞黏附、形态等快速瞬时变化，与传统的检测线粒体功能的 WST-1 终点检测法相比，更

总结

RTCA 技术能实时、无标记、动态检测细胞活力和毒性，获取细胞活性动力学图谱。细胞活性动力学图谱有助于确定其它检测方法（如细胞死亡、细胞凋亡或其它细胞反应过程中）的最佳检测时间点。并且，RTCA 技术检测的实时性提供化合物起效的精确信息。基于阻抗的实时无标记分析系统具有下列优势：

1. 持续动态监测细胞活力，识别细胞毒性产生的起始时刻，指示最大效应发生的时间。
2. 在细胞凋亡及细胞周期等检测中帮助确定最佳的检测时间。

3. 在试验初期即可识别细胞接种数目是否合适，最大限度的减小数据分析过程中细胞接种及培养板边缘孔效应的影响。

参考文献

1. Kroemer G, et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16 (1), 3-11.
2. Xing JZ, et al. (2005). Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chem Res Toxicol* 18 (2), 154-61.
3. Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH. (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep* 22 (1), 215-21.
4. Yim EK, et al. (2004). Proteomic analysis of anti-proliferative effects by treatment of 5-fluorouracil in cervical cancer cells. *DNA Cell Biol* 23 (11), 769-76.
5. Singh S, Upadhyay AK, Ajay AK, Bhat MK. (2007). Gadd45alpha does not modulate the carboplatin or 5-fluorouracil-induced apoptosis in human papillomavirus positive cells. *J Cell Biochem* 100 (5), 1191.

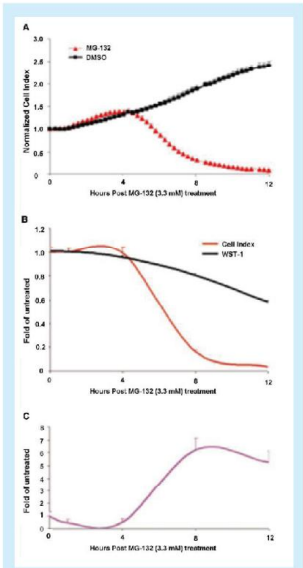
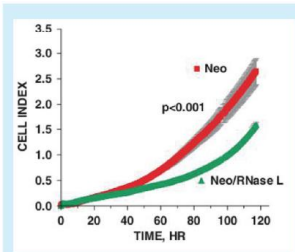


图3. RTCA检测指示最佳检测时间点。（A）HeLa细胞用 3.3 μM MG-132 处理后，细胞指数持续检测 12h；（B）RTCA 检测和传统终点 WST-1 检测的对比；（C）ELISA^{PLUS} 检测加药后 1, 4, 8, 12h 的细胞凋亡。

客户应用实例（一）

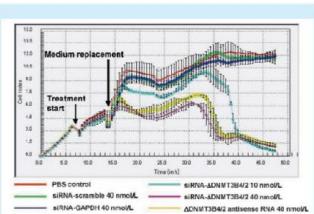
文献: W Al-Ahmadi et al., RNase L downmodulation of the RNA-binding protein, HuR, and cellular growth. *Oncogene* (2009) 28, 1782–1791.



实例1. RNase L高表达抑制细胞增殖。在低表达核糖核酸酶RNase L的Hela细胞系中稳转RNase L基因构建高表达RNase L的Neo/RNase L克隆细胞，稳转空载Neo作为对照组。将两类细胞系5x10³/孔接种至96x-Plate上，设4个副孔。RTCA实时动态监测细胞增殖情况，每隔20min检测一次，持续检测5天。结果显示，核糖核酸酶RNase L过表达抑制细胞增殖。

客户应用实例（二）

文献: Jie Wang et al., DNMT3B Variants Regulate DNA Methylation in a Promoter-Specific Manner. *Cancer Res* 2007; 67: (22). November 15, 2007.



实例2. DNA甲基转移酶DNMT3B低表达影响细胞正常有丝分裂，导致细胞死亡。RTCA实时动态监测DNA甲基转移酶ΔDNMT3B基因敲除后H1992细胞的增殖情况。H1992细胞接种于E-Plate上，待细胞稳定黏附于电极板上后，转染siRNA，8h后换成新鲜培养基。RTCA实时动态检测细胞增殖，每隔30分钟检测一次，持续检测72h。siRNA-ΔDNMT3B4/2和ΔDNMT3B4/2-antisense RNA处理10h后开始抑制细胞增殖。PBS、siRNA-scramble及siRNA-GAPDH为对照组，ΔDNMT3B4/2为DNMT3B家族中的其中一个亚型，试验组中siRNA-ΔDNMT3B4/2为部分敲除，ΔDNMT3B4/2-antisense RNA为全敲。结果显示，DNMT3B表达受抑制后影响细胞正常有丝分裂，导致细胞死亡。

生长因子介导的内皮细胞迁移RTCA实时动态检测

前言

细胞迁移 (cell migration) 指的是细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的浓度梯度后而产生的移动。细胞的定向迁移与胚胎形成、神经发育、免疫应答、器官成熟等密切相关。人类的许多重大疾病及其治疗，如肿瘤转移、神经修复、干细胞功能再生等等也与细胞运动息息相关^{1,2}。在移动过程中，细胞不断重复着向前方伸出突触，然后牵拉后方胞体的循环过程。细胞骨架和其结合蛋白、还有细胞间质是这个过程的物质基础，另外还有多种物质会对之进行精密调节^{1,2}。因此细胞迁移是目前细胞生物学研究的一个主要方向，科学家们试图通过对细胞迁移的研究，在阻止癌症转移、植皮免疫等医学应用方面取得更大成果。也因为细胞迁移独有的运动特性，成为今生物学热门研究方向。

细胞迁移研究在发育生物学、神经生物学、癌症与干细胞生物学等诸多前沿科学领域具有重大研究意义。然而长期以来细胞迁移检测是一个技术难点，目前常规可用于细胞运动性评估的主要方法有：基于显微镜的形态观察(含荧光标记)、体外组织移植、细胞集落划痕和 Boyden Chamber 法，这些方法各有千秋，但都无法实现定量检测细胞定向迁移、癌细胞侵袭性以及细胞粘附性等。

为了克服目前检测方法的局限性，ACEA Biosciences 研发了 xCELLigence RTCA DP 系统，它是一种基于 Boyden Chamber 原理的微电子细胞芯片检测技术 (RTCA, Real Time Cellular Analysis)。该技术实现了对于细胞迁移、侵袭、粘附性的定量、动态、无标记检测，同时还可同步检测包括细胞增殖、凋亡等多项细胞生理功能。

血管内皮细胞的增殖和迁移是血管生成过程中最重要的一环。肿瘤细胞缺氧或受到其它一些信号调节时会合成、分泌血管生成促进因子。血管内皮细胞的移行是一个诱导血管形成和抑制血管形成的两大类因子相互作用的复杂过程，这些促血管形成因子包括：血管内皮生长因子 (VEGF)、成纤维细胞生长因子 (bFGF)、肝细胞生长因子 (HGF) 等³。这些生长因子与其位于内皮细胞表面受体酪氨酸激酶相互作用从而激活信号通路最终导致细胞的定向迁移。

在本研究中，我们应用 xCELLigence RTCA DP 系统的细胞迁移检测板 (CIM-Plate16) 对生长因子介导的内皮细胞迁移进行实时无标记检测。细胞迁移检测板 CIM-Plate16 由上室和下室组成。上室底部具有微孔膜，其下表面整合了微电子生物传感器。下室板则作为细胞培养基的容器。当上室板中的细胞通过微孔发生迁移时就可被生物传感器检测到。通过系统测量的阻抗得到的指数，反映迁移细胞的数量。

材料和方法

细胞

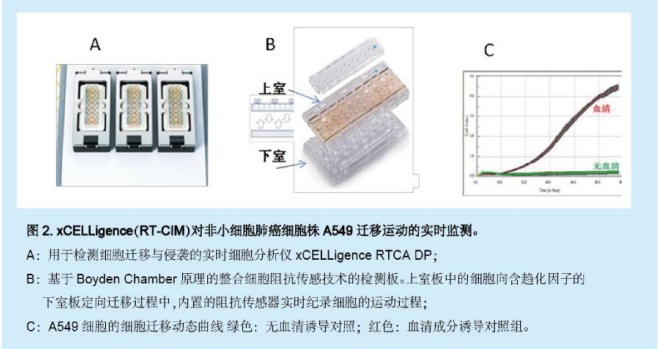
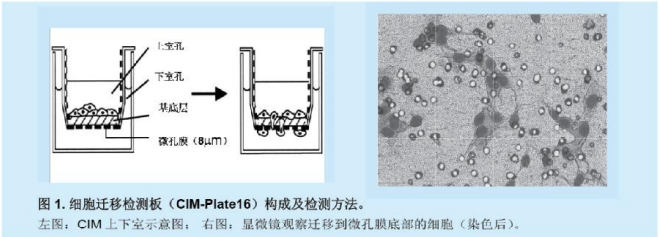
人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自 Lifeline Cell Technologies。HUVEC 细胞培养于 Vasculife VEGF 细胞培养基中。

HUVEC 细胞迁移实验

为了评估血管生成过程中不同生长因子对 HUVEC 细胞迁移作用的影响，Vasculife VEGF 培养基中含 2% 胎牛血清及 VEGF、EGF、IGF 及 bFGF 等

生长因子,将其做梯度稀释并加入到 CIM-Plate 16 的下室中(参见图 1)。为了获得最好的 HUVEC 细胞迁移结果,将 CIM-Plate16 预先用细胞外基质蛋白,如

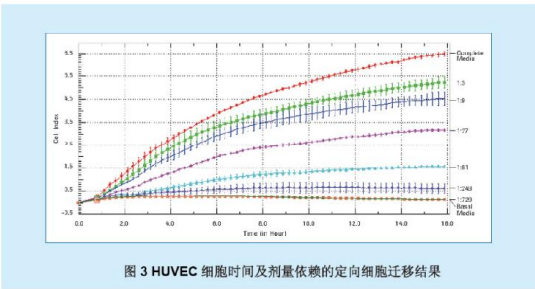
实验结果
利用 RTCA DP 系统对 HUVEC 细胞迁移进行连续的实时监测。图 3 显示 HUVEC 细胞从上室迁移到下



20 $\mu\text{g/mL}$ 纤连蛋白 (FN) 进行包被。CIM-Plate 16 组装后,向上室各孔中加入 100 μL 的细胞悬液 (30,000 个细胞)。将 CIM-Plate 16 放入 RTCA DP 分析检测仪上,并在 CO_2 培养箱中实现实时动态检测。

室的时间和剂量依赖性定向迁移结果。生长因子和血清作为趋化因子诱导 HUVEC 细胞通过 CIM-Plate16 的微孔膜定向迁移。迁移的细胞被微电子传感器芯片所检测,表现为细胞指数 (CELL INDEX, CI) 的变化 (参见图 3)。HUVEC 细胞迁移结果显示,生长因子包括 VEGF、HGF 和 bFGF 诱导 HUVEC 细胞的迁移。大量文献已证明,这些生长因子可是由肿瘤或肿瘤基质的细胞所分泌,从而诱导内皮细胞迁移和血管生成。

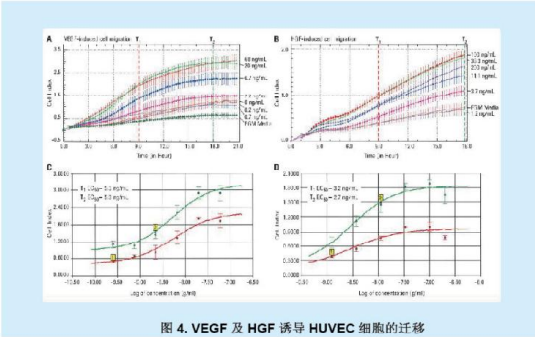
结果和讨论



CIM-Plate 16 检测不同生长因子诱导 HUVEC 细胞迁移。基础培养基 (HUVEC 完全培养基: EGM 培养基=1:125) 分别配制不同浓度梯度的 HGF 和 VEGF, 加入到下室 (参见图 1)。PET 膜用 FN 预包被。CIM-Plate 16 板装配后,分别在 VEGF 诱导迁移实验的上室板中接种 HUVEC 细胞 30,000 每孔,在 HGF

使用 RTCA 1.2 软件可计算 VEGF 和 HGF 诱导的时间依赖的 EC_{50} 值 (参见图 4C 和 4D)。

肿瘤血管生成抑制剂是以血管生成的各个环节为靶点,研制血管生成抑制剂控制肿瘤生长和转移已成为肿瘤防治的新举措,以血管生成成为靶点的单克隆抗体在结肠癌和肺癌的治疗过程中发挥了重要的作用⁴。



诱导迁移实验的上室孔中接种 HUVEC 细胞 15,000 每孔。利用 RTCA DP 系统对 HUVEC 细胞迁移进行实时监测。结果显示,VEGF 和 HGF 都可诱导 HUVEC 细胞的迁移,并呈现剂量依赖性 (参见 4A 和 4B)。

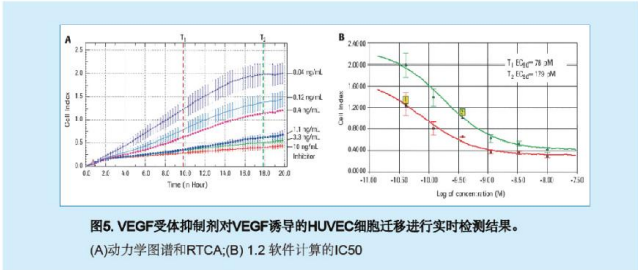
因此,血管生成因子如 VEGF 诱导的内皮细胞迁移是一个很好的体外模型,用于研究和筛选肿瘤血管生成抑制剂 (参见图 5)。为了能够定量地评估 VEGF 受体抑制剂的效应, HUVEC 细胞如以上方法接种到

CIM-Plate 16 中, 下室加入浓度梯度递增的 VEGF 受体抑制剂。如图 5A 所示, 这种抑制剂显示剂量依赖的、有效阻断 VEGF 诱导的细胞迁移作用。利用 RTCA 1.2 软件可定量获得该化合物对 HUVEC 细胞迁移抑制作用的时间依赖性 IC50 值, 如图 5B 所示, 该 VEGF 受体抑制剂 IC50 值在皮摩尔范围。

结论

本应用中的数据表明, 使用 RTCA DP 分析仪及 CIM-Plate 16 可实时动态监测生长因子介导的内皮细胞迁移。传统的细胞迁移技术如 Transwell 技术, 利用染色人工计数迁移细胞数目评估细胞的迁移, 步骤繁

琐, 重复率低, 并且无法满足动态同步监控。xCELLigence RTCA DP 系统将微电子传感技术与 Boyden Chamber 原理相结合, 将电子芯片植入上孔底部膜表面, 从而实现了动态、非标记的实时监控细胞迁移。同理, 在上孔底部膜包被不同的基底层, 可用于检测细胞侵袭。应用 CIM-Plate 16 实时动态监测生长因子介导的内皮细胞迁移, 所获得的 HUVEC 细胞迁移的连续实时数据可为我们提供进行基因表达检测及其它的细胞迁移功能分析的最佳时间点。因此, 基于微电子阻抗传感技术的 RTCA 检测具有免标记、实时、定量、自动化等诸多优势, 可作为体外检测细胞迁移和浸润的优选系统。

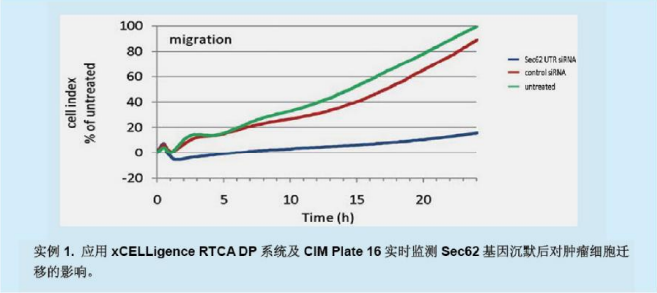


参考文献

1. Lauffenburger DA, Horwitz AF. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359-69.
2. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704-9.
3. Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. (2007).

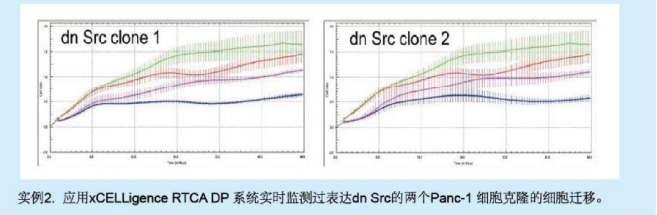
Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research* 24: 100: 782-794.
4. Folkman J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(4): 273-286.

客户应用实例(一)
文献: Greiner M, Kreutzer B, Jung V, Grobholz R. Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *Int J Cancer*. 2010 Jul 28.
分别将 control siRNA 和 Sec62 UTR siRNA 转染入 PC3 细胞, 以未转染 siRNA 的 PC3 细胞为对照, 进行细胞迁移实验。CIM Plate 上室分别接种三种细胞(无血清培养基), 下室加入完全培养基, 实时检测 24 小时。实验结果表明 Sec62 基因沉默后, 肿瘤细胞的迁移能力明显下降。



客户应用实例(二)
文献: Ungefroren H, Sebens S, Groth S. Differential roles of Src in transforming growth factor -β regulation of growth arrest, epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Int J Oncol*. 2011 Mar, 38(3):797-805.

CIM-Plate 上室预包被 Collagen I (400 µg/ml) 30 µl。细胞以接种密度为 60,000/well 接种于 CIM-Plate 上室, TGF-β1 (5 ng/ml) 加入 CIM-Plate 下室, 每 15 分钟检测一次, 持续监测 48 小时。红色曲线: 未作处理的对照组细胞; 绿色曲线: TGF-β1 处理的对照组细胞; 蓝色曲线: 未作处理的 dn Src 过表达细胞; 粉色曲线: TGF-β1 处理的 dn Src 过表达细胞。实验结果表明, dn Src 过表达抑制 TGF-β1 介导的肿瘤细胞迁移。



细胞粘附和伸展 RTCA实时动态检测

前言

人体和多细胞生物都是由细胞构成的，然而，人体并不是简单地由细胞堆积而成的，而是按特定方式有序地构建起来的。在人体组织的构建中，细胞外基质起着重要的作用。细胞外基质（ECM, extracellular matrix）是由细胞分泌的多种生物大分子组成的复杂网络结构，充填着细胞之间的大小间隙，它的主要功能是形成一种支撑性框架，使细胞有机地联系在一起，同时又为细胞提供一种有组织的外环境，使细胞能按一定方式移动和相互反应，行使各种生物学功能。在生物发育过程中，胞外基质蛋白可引导胚胎细胞到邻近区域分化最终生成不同的组织和器官。此外，胞外基质蛋白在伤口愈合、增殖、存活及分化等生物过程中也发挥着重要作用。细胞与周围基质蛋白或分子间相互作用异常会引起凋亡及肿瘤细胞转移。

各种基质蛋白成分，如纤连蛋白、胶原蛋白、层粘连蛋白及玻连蛋白等分别与特定的细胞表面受体 - 整合素(Integrins)相互作用。整合素识别并绑定于基质蛋白特定的序列，介导细胞与基质蛋白之间的粘附与相互作用。除此之外，整合素还通过与基质蛋白的相互作用启动细胞内一系列的信号级联反应，指导细胞存活、增殖、分化及迁移等生物过程。不同生物表面的细胞粘附是动态、综合的过程，需要细胞表面受体、结构和信号蛋白及细胞骨架的参与。

在研究基质蛋白与细胞表面整合素之间相互作用时，通常会在细胞板表面均匀地包被纯化的基质蛋白，细胞接种之后再行细胞生物学（细胞粘附和伸展等）研究，目前常用的研究方法包括：1）结晶紫染料对粘附细胞进行标记，在显微镜下手动计数，或将染料溶解之后用酶标仪测量其吸光度；2）荧光染料如 6-羧基双乙酸钠(CFDA)对细胞预先标记，然后用酶标仪对粘附细胞进行定量；3）荧光染料如罗丹明鬼笔环肽对粘

壁细胞的肌动蛋白细胞骨架网络进行标记、固定之后，荧光显微镜或荧光共聚焦显微镜下进行观察。这些方法都可以观察细胞粘附和伸展状态，但它们的局限性在于：首先，这些常用的方法都属于终点分析法，只提供了粘附过程中某一个点的信息；其二，这些方法都需要对细胞进行标记，成本昂贵；另外，这些方法大部分都需要对细胞进行固定和透膜作用，对细胞造成了损伤。

为应对传统方法的局限性，艾森生物研发了基于细胞水平的无标记实时（RTCA, Real Time Cellular Analysis）细胞功能分析仪 ICELLigence 及 xCELLigence，实现了对细胞功能的无标记、实时动态监测。该系统基于电子阻抗技术，在 E-plate 电极底部整合有微金电极，阻抗测量为细胞生理状态提供量化信息，与细胞数量、粘附程度、细胞活性及细胞形态有关。使用 RTCA 技术，能够实现对细胞粘附和伸展的实时连续检测，提供细胞与胞外基质蛋白相互作用的精确信息，另外，这些量化信息不仅包括粘附细胞的数量，也包括相关动力学参数如细胞粘附率等信息，而这些都是传统终点分析法无法实现的。

材料和方法

细胞

细胞均购自 ATCC，培养在 37℃，5% CO₂ 培养箱中。NIH3T3 细胞培养在含 10%FBS，1% 盘尼西林和 1% 链霉素的 DMEM 培养基中。Jurkat T 细胞和 BxPC3 细胞培养在含 10% FBS，1% 盘尼西林和 1% 链霉素的 RPMI 培养基中。

细胞粘附实验

将一定浓度的 Fibronectin 和 Poly-lysine 均匀铺在 96X E-Plates 电极板孔底部，置于 37℃ 孵育 1 小时，PBS 清洗包被的电极板，然后用 0.5% BSA-PBS 溶液包被，置于 37℃ 孵育 20 min；在加培养基和细胞之

前使用 PBS 再次清洗包被的电极板。胰酶消化细胞，均匀打散，悬浮于含 0.25% BSA 的无血清培养基中，稀释到所需浓度。向包被的电极板孔内加入 100 μL 细胞悬液，使用 RTCA 系统动态检测细胞的粘附和伸展情况。每隔 3 min 检测一次，根据实验需要持续检测 1—3 小时。RTCA 系统使用细胞指数 (Cell Index) 表示细胞阻抗。每点的 CI 值定义为 (Rn-Rb)/15，其中 Rn 表示孔接种有细胞时的电极阻抗值，Rb 是表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。

抑制剂处理

对于抑制剂检测的试验，细胞均用一定浓度的抑制剂预处理 15-30 min，然后再加入到基质包被好的电极板中。其它步骤同上。

免疫荧光及显微镜观察

细胞接种于玻片上，待贴壁后用 4% 多聚甲醛固定，

罗丹明鬼笔环肽染色，荧光显微镜观察并用 CCD 相机记录。

结果和讨论

动态检测细胞粘附和伸展

96XE-plate 电极板用 FN 或 PLL 蛋白包被，NIH3T3 细胞接种于包被好的孔内，RTCA 动态检测细胞的粘附伸展情况。同时，用 FN 或 PLL 包被玻片，接种相同数量的细胞，待细胞贴壁后罗丹明鬼笔环肽染色，免疫荧光显微镜下观察细胞状态。如图 1A 所示，用 FN 包被孔内细胞的细胞指数 (CI) 显著上升，而用 PLL 包被孔中细胞的细胞指数上升幅度较缓慢。同样的，免疫荧光显微镜下记录图谱 (图 1B) 显示 FN 包被后细胞伸展状态较明显，1 小时即达到最大值，而用 PLL 包被的细胞贴壁 2 小时后仍保持圆形，伸展状态不明显。

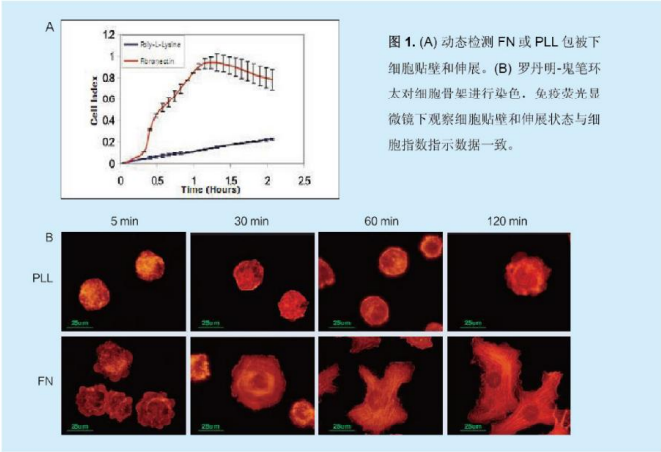


图 1. (A) 动态检测 FN 或 PLL 包被下细胞贴壁和伸展。(B) 罗丹明-鬼笔环肽对细胞骨架进行染色，免疫荧光显微镜下观察细胞贴壁和伸展状态与细胞指数指示数据一致。

为研究FN包被浓度对细胞粘附伸展的影响，E-plate用剂量梯度增加的FN包被，范围从0 $\mu\text{g/mL}$ 到20 $\mu\text{g/mL}$ ，接种NIH3T3细胞之后检测细胞粘附伸展状况。图2A显示随着FN包被浓度增加细胞指数CI相应的呈正比例提高。为确定细胞指数 CI 值的提高是否与粘附于

底面的细胞数量成正比，当细胞贴壁3 h后，胰酶消化手动计数，图2B表明在3 h后记录的细胞数量与时间点获得的CI值数据有很好的相关性。以上试验证明RTCA技术能实时、无标记、定量评估细胞粘附和伸展状态。

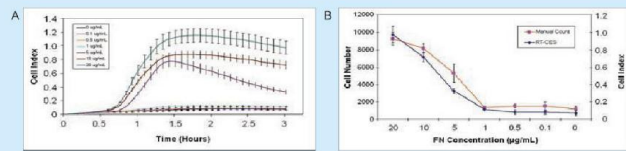


图2 (A) 定量、动态检测不同浓度 FN 包被下细胞的贴壁和伸展状况; (B) 细胞贴壁 3 小时，手动记录的细胞数量与相应的 RTCA 检测获取的细胞指数 CI 进行比较。

包含RGD的多肽抑制细胞粘附和伸展

细胞表面的整合素如 $\alpha 5 \beta 1$ 能够识别和结合FN上特定的位点，称为精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 序列¹。研究表明，含有RGD序列的多肽能竞争性的抑制细胞表面受体与FN的结合²。为评估含有RGD序列的多肽对细胞粘附到FN的抑制作用，NIH3T3细胞用剂量梯度增加的环状RGD多肽预处理，之后接种于FN包被的E-plate电极板上，随

后由RTCA技术实现对细胞粘附和伸展的动态检测。如图3A所示，环状多肽能阻断NIH3T3细胞的粘附和伸展，并呈剂量依赖性。而缺失RGD序列的对照多肽对细胞的粘附和伸展没有影响。3 h之后0.1 μM 和10 μM 浓度的环状多肽对细胞粘附和伸展的阻断率分别为20%和40% (图3B)。上述试验证明利用RTCA技术能够实时、定量的评估整合素受体功能的阻断效应。

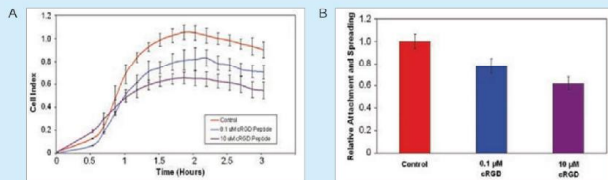


图2 (A) 定量、动态检测不同浓度 FN 包被下细胞的贴壁和伸展状况; (B) 细胞贴壁 3 小时，手动记录的细胞数量与相应的 RTCA 检测获取的细胞指数 CI 进行比较。

特异性信号蛋白抑制剂抑制细胞粘附和伸展

整合素介导的细胞粘附可引起胞内肌动蛋白骨架重排，反之亦然。也就是，肌动蛋白细胞骨架也可参与胞外整合素与胞内信号蛋白间的信号传递，介导细胞粘附和伸展¹。为确定肌动蛋白细胞骨架在细胞粘附和伸展过程中的作用，NIH3T3细胞用剂量梯度增加的肌

动蛋白抑制剂拉春库林预处理之后接种于FN包被的E-plate电极板孔内，随后由RTCA技术实现动态检测。如图4A所示，拉春库林引起抑制细胞粘附和伸展，且呈剂量依赖性。细胞贴壁2h后进行粘附伸展分析，显示拉春库林是一种有效的抑制剂 (图4B)。

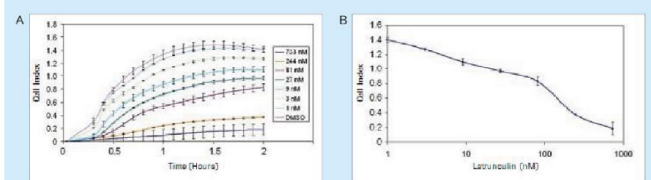


图4 动态检测拉春库林对细胞粘附和伸展的剂量依赖效应。(A) NIH3T3 细胞用剂量浓度增加的拉春库林预处理，然后接种于 FN 包被的电极板孔内; (B) 接种 2 小时后检测拉春库林抑制 NIH3T3 细胞的粘附和伸展的剂量依赖效应。

参与整合素介导的细胞粘附和伸展过程的信号蛋白家族包括非受体酪氨酸激酶Src家族¹。为验证Src家族蛋白对细胞粘附和伸展的作用，BxPC3细胞用Src激酶抑制剂PP2处理后，接种于FN包被的E-plate电极板孔内，随后由RTCA技术实现对细胞粘附和伸展的动态检测。

如图5A所示，Src抑制剂显著抑制了细胞的粘附和伸展。细胞接种2 h后，用PP2处理的细胞与DMSO处理的对照组细胞相比，其粘附和伸展程度大约下降了60% (图5B)。以上结果与前期研究中传统方法得到的数据一致³。

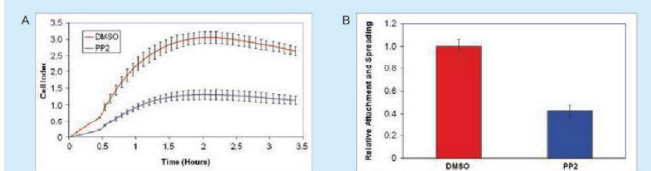


图5 (A)动态检测 Src 抑制剂 PP2 对细胞粘附和伸展的作用; (B) DMSO 和 PP2 处理细胞粘附和伸展程度比较。预处理的细胞接种于 FN 包被的细胞板上 2 小时后，检测其粘附和伸展情况。

综上所述，基于阻抗的RTCA技术可用于实时、动态定量评估细胞粘附和伸展，由于该技术无需过多的人力和高成本的标记，检测手法更加快捷、简便、经济。

另外，该技术无需标记，对细胞不具有损伤性，因此在同一试验中可同时动态检测基质蛋白对细胞粘附、伸展

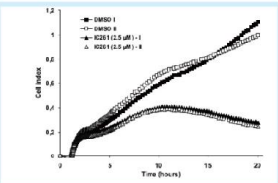
及其它生物学过程如细胞分化和增殖等的作用，这是传统分析方法无法实现的。

参考文献

1. R. O. Hynes, *Cell* 110, 673-87 (2002).
2. E. Koivunen, D. A. Gay, E. Ruoslahti, *J Biol Chem* 268, 20205-10 (1993).
3. M. S. Duxbury, H. Ito, S. W. Ashley, E. E. Whan *Biochem Biophys Res Commun* 317, 133-41 (2004).

客户应用实例（一）

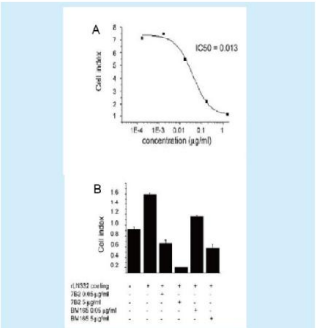
文 献：Silvie Foldynová-Trantírková *et al.*, **Breast cancer-specific mutations in CK1ε inhibit Wnt/β-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration.** *Breast Cancer Research* 2010, 12:R30.



实例 1. 酪蛋白激酶 1 (CK1) 活性抑制导致细胞粘附能力的降低。将 100ul 细胞培养基加入到 96x E-Plate 孔中，其中试验组包含酪蛋白激酶 1 (CK1) 抑制剂 IC261 (2.5 um)，对照组包含等量浓度的 DMSO，置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min。MCF7 细胞消化计数，15000/孔接种于 E-Plate 上，RTCA 实时动态监测细胞粘附，持续检测 20 小时。对照组 (DMSO) 和试验组 (2.5 um IC261) 分别设两个副孔 (I, II)。酪蛋白激酶 1 (CK1) 活性抑制后导致细胞粘附能力的降低。

客户应用实例（二）

文 献：Sirpa Salo *et al.* **Antibodies blocking adhesion and matrix binding domains of laminin-332 inhibit tumor growth and metastasis in vivo.** *Int. J. Cancer*: 125, 1814 -1825 (2009)



实例 2A. mAbs 7B2 抗体抑制 rLN-332 介导下的细胞粘附 E-Plate 用 5 ug/ml rLN-332 37°C 包被 1 小时，PBS 清洗。SCC-25 细胞用 mAb-7B2 抗体不同梯度浓度预处理，25,000/孔接种细胞于包被好的 E-Plate 上，RTCA 实时动态检测细胞粘附情况。图示为 1 小时后，不同浓度的 mAb-7B2 抗体对 rLN-332 介导下细胞粘附的抑制情况。

实例 2B. 比较 mAbs 7B2 和 BM165 两类抗体对 rLN-332 介导下的细胞粘附的抑制效率。E-Plate 用 5 ug/ml rLN-332 37°C 包被 1 小时，PBS 清洗。A431 细胞分别用不同浓度的 mAbs 7B2 和 BM165 预处理 (0.05 ug/ml, 5 ug/ml)，25,000/孔接种细胞于包被好的 E-Plate 上，RTCA 实时检测细胞粘附，图示为 1 小时后，两类抗体 mAbs 7B2 和 BM165 对 rLN-33 介导下细胞粘附呈不同程度的抑制，且具有梯度效应，mAbs 7B2 抑制效率较高。

肿瘤与微环境之间的相互作用 RTCA 实时动态检测

前言

肿瘤细胞与其周围免疫细胞、成纤维细胞、毛细血管等基质细胞及其分泌的活性物质共同组成了肿瘤的微环境。肿瘤与其微环境之间存在着复杂的相互作用，肿瘤的发生和转移与基质细胞分泌的各种活性物质有着密切的关系。肿瘤细胞可以通过自分泌和旁分泌的形式，产生大量的生长因子等物质，调节肿瘤微环境，活化肿瘤基质细胞如平滑肌细胞等¹，并诱导血管形成²。而基质细胞也可以通过代谢、分泌、免疫、结构和功能的改变来改变微环境，进而限制和影响肿瘤的发生和发展³，并且通过对肿瘤耐药性的影响而影响肿瘤的治疗。改变肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用，可以提高抗癌药物的功效。肿瘤与微环境的相互作用是近年来肿瘤细胞学研究的一个热点，不仅对肿瘤本身的发生发展和转移研究有着非常重要的意义，而且对肿瘤的治疗起着相当重要的作用。

检测肿瘤和微环境之间相互作用的传统细胞学方法是共培养的终点法，将肿瘤与基质细胞共培养一段时间后，染色后用显微镜来观察效应细胞 (effector cell) 对靶细胞 (responder cell) 的作用效果或是通过 WST 等方法检测靶细胞的生长情况。而这两种方法由于灵敏度不高，且检测的时间不易把握，因而具有一定的局限性。

艾森生物开发的细胞共培养 (CCD) 系统是以艾森的实时无标记细胞分析技术 (RTCA, Real Time Cellular Analysis) 为基础，由 E-plate 和 insert 两部分组成 (图 1B)。如图 1C 所示，贴附于 E-Plate 中的细胞，其贴壁能力及相互作用都会导致阻抗的变化；同时，阻抗的变化与贴壁细胞的数量、大小、形状变化都有关系。

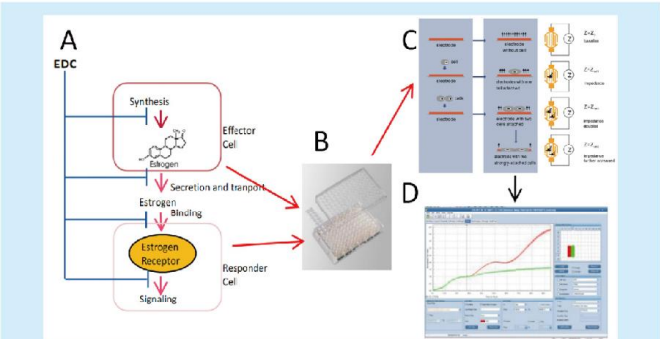


图 1. RTCA 细胞共培养系统 (CCD) 的基本工作原理。(A) 效应细胞和靶细胞之间的相互作用机理；(B,C) RTCA CCD 的基本组成及工作原理；(D) 仪器检测得到的曲线示意图。

如图2所示,在E-plate中接种应答细胞,insert中接种效应细胞,insert中的效应细胞通过分泌影响应答细胞的生长因子等物质,对E-plate中的应答细胞产生刺激(图3A),毒性(图3B)或调节(图3C)作用等。这些作用引起E-plate中应答细胞发生增殖、形态变化、死亡等现象,从而引起电阻抗变化,并通过RTCA进行实时检测(图2C),并且通过细胞指数的测定定量计算刺激的产生效果。RTCA CCD系统使动态监测肿瘤及肿瘤微环境之间的相互作用成为可能,而且,这种检测无需对应答细胞进行额外的标记。

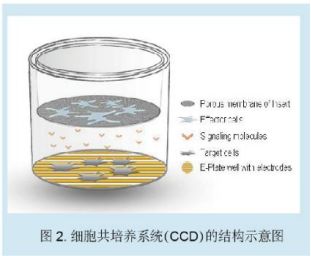


图 2. 细胞共培养系统(CCD)的结构示意图

材料和方法

细胞

实验中用到的肺成纤维细胞 MRC5 和非小细胞肺癌细胞 Hcc827 购自 ATCC。细胞放置于 5% CO₂, 37°C 的培养箱中培养, MRC5 细胞在含有 10% FBS, 1% 青霉素, 1% 链霉素的 MEM 培养基中培养, Hcc827 细胞在含有 10% FBS, 1% 青霉素, 1% 链霉素, 10mM 的 HEPES, 1mM 的丙酮酸钠的 RPMI1640 培养基中培养。

MRC5及HGF作用下的Hcc827耐药性检测

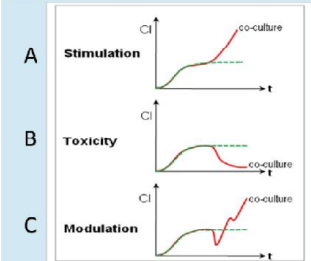


图 3. 不同作用机理的细胞共培养实验代表曲线。

(A)刺激作用, 应答细胞的生长曲线(绿色曲线), 当 insert 中的效应细胞分泌的物质对 E-plate 中的应答细胞有刺激作用时, 在 RTCA 仪器上出现曲线的明显增高(红色曲线);(B)毒性作用, 应答细胞的生长曲线(绿色曲线), 当 insert 中的效应细胞分泌的物质对 E-plate 中的应答细胞有毒性作用时, 在 RTCA 仪器上出现曲线的明显下降(红色曲线);(C)调节作用, 应答细胞的生长曲线(绿色曲线), 当 insert 中的效应细胞分泌的物质对 E-plate 中的应答细胞有调节作用时, 在 RTCA 仪器上出现特征性曲线变化(红色曲线)。

首先将 Hcc827 接种于 E-Plates 上, 每孔总体积 150 μ l。使用 RTCA 系统动态监测细胞, 细胞接种 24 小时后, 细胞形成了单一细胞层。MRC5 接种于 insert 中, 每孔总体积 60 μ l, 将 insert 放置于 receiver plate 中, 放在培养箱中培养。细胞培养过夜后, 将 insert 放入 E-plate 中, 同时选择性加入 Gefitinib 和 Crizotinib 两种药物, 共形成 8 种组合。

- a. Hcc827, 无 MRC5 细胞; b. Hcc827 + Gefitinib;
c. Hcc827 + MRC-5; d. Hcc827 + MRC-5 + Gefitinib;
e. Hcc827 + Crizotinib; f. Hcc827 + MRC-5 + Crizotinib;
g. Hcc827 + MRC-5 + Crizotinib;

h. Hcc827 + MRC-5 + Gefitinib + Crizotinib。每隔 15 分钟记录一次测定结果, 连续记录。

实验数据分析

应用 RTCA 系统自带的软件, 可对实验全过程, 即从接种到肿瘤细胞在药物作用下的细胞曲线进行显示。通过实时显示不同时间下细胞曲线, 可动态监测 C-Met 通路与肿瘤细胞耐药性的关系。RTCA 系统使用细胞指数 (Cell Index) 表示细胞阻抗。每点的 CI 值定义为 (Rn-Rb)/15, 其中 Rn 表示孔接种有细胞时的电极阻抗值, Rb 是表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。

细胞形态镜检分析

使用 Nikon 显微镜观察 MRC-5 分泌 HGF 引起的 Hcc827 的 HGF 抑制剂耐药。加入接种 MRC-5 细胞的 insert 及药物后, 继续培养至 80 小时, 取出 E-plate, 使用 diff-Quick 试剂盒染色。镜检细胞形态学并使用成像系统进行记录。

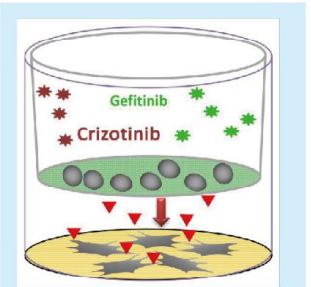


图 4. 细胞接种及药物添加示意图。

上室: 效应细胞 MRC5;
下室: 应答细胞 Hcc827。

结果与讨论

肿瘤细胞耐药性及C-Met通路

EGFR 是酪氨酸激酶家族的成员之一, EGFR 与配体结合导致重要的构象变化, 引发自身磷酸化, 转导下游信号, 调节细胞的增殖、凋亡、迁移、存活和一系列复杂的过程。EGFR 在肿瘤细胞中常处于过度激活状态, 使细胞周期失去调控, 导致肿瘤细胞无限增殖生长。EGFR-酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKI) 抑制 EGFR 的活性, TKI 中最具代表性的是 Gefitinib 和 Erlotinib。

EGFR 靶向治疗已经成功应用于临床, 并且取得了一定的疗效。但随着时间的推移, 治疗中出现了耐药现象, 其中 MET 基因扩增和 HGF 超表达是 EGFR 耐药机制之一。Engelman 等在其建立的 Gefitinib 耐药的细胞系中检测到 MET 基因的扩增, 并通过其对 MET 信号通路的阻断恢复对 Gefitinib 的敏感性。

在本应用实例中使用 CCD 系统研究 C-Met 及 HGF 介导下的肿瘤细胞 Hcc827 耐药作用。HCC827 对 EGFR 抑制剂 Gefitinib 敏感, MRC5 通过分泌 HGF, 介导 HCC827 对 Gefitinib 的耐受。使用 C-Met 抑制剂 Crizotinib 可阻断 C-Met 信号通路, 恢复 HCC827 细胞对 Gefitinib 的敏感性。

动态检测C-Met及HGF介导下的肿瘤细胞Hcc827对Gefitinib的耐受

利用 RTCA 系统的 CCD 产品检测 C-Met 及 HGF 介导下的肿瘤细胞 Hcc827 对 Gefitinib 的耐受。在 E-Plate 板的每孔中接种 Hcc827 细胞作为应答细胞, MRC-5 细胞作为效应细胞接种在 insert 中, 可分泌生长因子 HGF, 同时按实验设计加入 EGFR 抑制剂 Gefitinib 和 / 或 C-Met 抑制剂 Crizotinib, 动态监测 MRC-5 细胞介导的 Hcc827 细胞对药物的耐受过程。

如图 5B 中 NCI Curve 所示, 正常生长情况下的 Hcc827 的曲线为红色; Hcc827 细胞中加入抗肿瘤药物 Gefitinib 后 Hcc827 的生长受到明显的抑制 (绿色曲线)。如图 5C 所示, Gefitinib 处理并加入接种 MRC-5 细胞的 insert, insert 中的 MRC-5 细胞分泌的 HGF 通过 cMET 通路刺激 Hcc827 细胞的增殖, 引起了 Hcc827 细胞对药物的耐受性 (绿色曲线)。图 5D 所示, 在图 5C 实验的基础上, 加入 cMET 通路

的抑制剂 Crizotinib, 阻断了 HGF 的作用, HCC827 细胞对 Gefitinib 的敏感性重新恢复 (绿色曲线)。细胞染色图片与曲线所显示的结果一致。总之, RTCA 系统是目前唯一一种不需要对应答细胞进行标记或添加任何化学指示物就能够实时直接检测肿瘤与微环境之间相互作用的方法。该系统可以动态监测肿瘤与微环境之间相互作用的全过程, 这是基于标记的终点分析法所无法达到的。

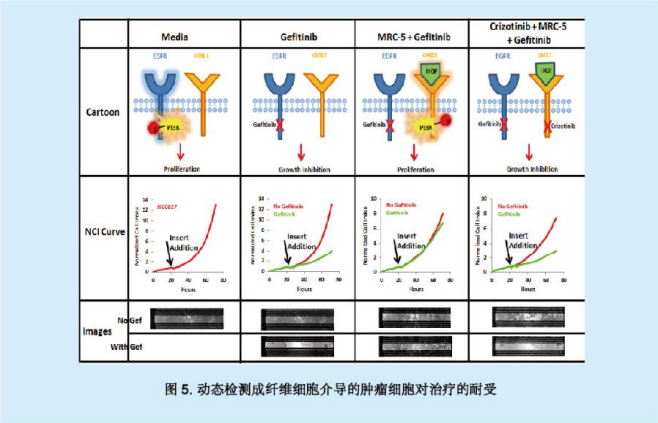


图 5. 动态检测成纤维细胞介导的肿瘤细胞对治疗的耐受

动态检测C-Met通路影响EGFR抑制剂耐药性与终点法的对比

对比 RTCA 系统检测和终点法检测的最终结果, 图 6A 显示的是 RTCA 系统动态检测法在实验结束时 (96 小时), 以细胞指数为纵坐标, 显示了各个条件下 Hcc827 细胞的生长状态。图 6B 显示的是终

点法使用 WST-1 检测 96 小时的 Hcc827 细胞的生长状态, 以 WST-1 的读数为纵坐标。两种方法得到的结果趋势基本一致, 且使用 RTCA 方法得到的结果灵敏度更高, 加入药物的反应更加敏感。

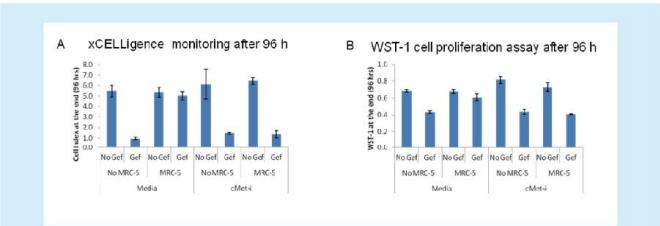


图 6. 动态检测与终点法检测成纤维细胞介导的肿瘤细胞对治疗的耐受性对比。

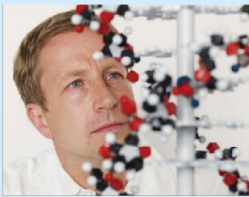
(A) 使用 RTCA 方法检测得到的细胞指数在 96 小时的数值对比;

(B) 使用终点法在 96 小时进行 WST-1 检测, 得到的 WST-1 读数的对比。

参考文献

1. Wever et al. (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *Journal of Pathology* 200:429-447
2. Bergers et al. (2003) *Nature Reviews Cancer*. 3: 401-410
3. Bhowmick et al. (2005) Tumour stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*. 15 (1):97-101
4. Abassi et al. (2005) Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J. Immunol. Methods* 292: 195-205
5. Solly et al. (2004) Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2: 363-72

E-Plate Insert Customer testimonials



Feedback from first external testing site, Roche Pharma pRED:

- "The assay performance was good and the calculated standard deviation displayed good reproducibility of results in two independent experiments. We see the major advantage in the real-time monitoring of cellular growth properties."

Feedback from second external testing site, Roche Pharma NCS:

- We have tested the new application/assay vascular leakage directly with E-Plate Inserts:
- "The assay performance is very good. To our knowledge there are no competitor assays available to compare to."

自然杀伤（NK）细胞介导的细胞杀伤作用 RTCA实时动态检测

前言

自然杀伤细胞(Nature Killer Cells, NK)是骨髓衍化的淋巴细胞，其最初通过巨大的颗粒性状被识别。NK 细胞能自发杀灭多种肿瘤细胞，同时还可保护正常的细胞，从而被认为是癌症的克星。最重要的是，不管是在胞内还是胞外，NK 细胞不需要免疫接种或提前激活，就能够自发杀伤特定的肿瘤靶细胞，而 T 细胞必须要通过抗原递呈细胞的协助才能发挥作用。许多胞内外的实验表明，除了外渗出和渗入肿瘤组织的能力外，NK 细胞还有望具有抗肿瘤的能力。研究发现缺失NK 细胞的小鼠在致癌物诱导下更容易发生癌症。另外，缺乏 NK 细胞的小鼠会持续遭受病毒感染，并很快死亡。很多疾病的发生会伴随 NK 细胞失控或出现不正常反应，包括移植排斥，糖尿病，各种自身免疫和神经性疾病,再生障碍性贫血或白血球减少症。因此，NK 细胞在决定各生理状态和疾病状态中起着举足轻重的作用。同时，监测 NK 细胞介导的细胞杀伤活性，不仅可应用于监视癌症、传染病和自身免疫性疾病的免疫活性，而且可应用于搜寻介导细胞杀伤效应的蛋白。

测量 NK 细胞介导的杀伤活性的传统标准方法是用 51Cr 或 111In 进行放射性标记分析^{1,2}。在这些分析中，靶细胞被放射性标记，然后与效应细胞混合。在给定时间内（低于四小时）检测放射性同位素的释放（与 NK 细胞介导的细胞杀伤有关）。也可以使用一些非放射性标记方法进行检测，包括流式细胞术，基于 ELISA 的颗粒酶测量，及利用显微镜进行形态学分析。

由艾森开发的实时无标记细胞分析（RTCA, Real Time Cellular Analysis）^{4,5} 技术，使动态监测 NK 细胞介导的细胞杀伤成为可能。RTCA 基于阻抗技术，贴

附于E-Plate的96孔板孔中的细胞，其贴壁能力及相互作用都会导致阻抗发生变化，同时，阻抗的变化与贴壁细胞的数量、大小，形状变化都有关系。相反，向板孔中加入悬浮细胞，因为其不与检测板电阻接触或者只是微弱接触，所以不引起电阻抗变化。因此，NK细胞介导的单层癌细胞细胞杀伤效应，可在E-Plate上进行动态的定量监测，而无需对靶细胞进行额外的标记。

材料和方法

细胞

NK 92, NIH 3T3细胞以及试验中用到的所有的癌细胞均购自ATCC，小鼠NK细胞（mNK）由Louisville 大学Hui Shao博士提供。所有的细胞均培养在5% CO₂，37° C的培养箱中，NK92和mNK细胞在含有2 mM L-谷氨酰胺，1.5g/L碳酸氢钠，0.2 mM肌醇，0.1 mM 2-巯基乙醇，0.02 mM叶酸，12.5%马血清，12.5% FBS，100-200 U/ml IL-2重组体的Alpha MEM培养基中培养。其它癌细胞培养在含有5% FBS，1% 青霉素，1%螺旋霉素(GIBCO)的RPMI培养基中。NIH 3T3细胞培养在含有10%FBS，1%青霉素，和1%螺旋霉素的DMEM培养基中。

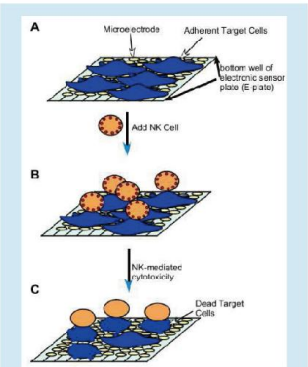
细胞形态镜检分析

使用Nikon直立显微镜观察NK细胞介导的细胞杀伤效应。加入效应细胞后，当细胞指数（Cell Index）相比对照下降到50%时，取出细胞用80%的甲醇固定5分钟，使用Giemsa染色。镜检细胞形态学并用CCD相机进行记录。

实验数据分析

应用RTCA系统自带的软件，可对实验全过程，即从接种到细胞死亡，进行显示。通过实时显示时间-E/T（效应细胞与靶细胞比值）的依赖性曲线，可动态监测NK细胞的活性。RTCA系统使用细胞指数（CI, Cell Index）表示细胞阻抗。每点的CI值定义为(Rn-Rb)/15，其中Rn表示孔接种有细胞时的电极阻抗值，Rb是表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。

为了对特定点细胞杀伤进行定量，通过与对照的参比，特定E/T比率下的细胞溶解百分比以Excel形式输出。



NK 细胞介导的细胞杀伤。A. 靶细胞接种于 96 孔 E-Plates 上，每孔 100μl 培养基。使用 RTCA 系统动态监测细胞直至对数期，此时靶细胞形成了一细胞层(24-34 小时,根据实验); B. 不同浓度的效应细胞直接加入到含有靶细胞的各孔中，效应细胞加入到不含靶细胞的孔作为对照; C. 加入效应细胞后，每隔 15 分钟记录一次测定结果，连续记录。

结果和讨论

动态检测 NK 细胞介导的细胞杀伤

利用鼠NK细胞(mNK)及靶细胞NIH 3T3细胞来监测NK细胞介导的细胞杀伤活性。在96孔E-Plates板的每孔中接种5,000个NIH3T3细胞作为靶细胞，RTCA系统每小时记录生长数据，直到34小时后细胞达到生长期。鼠NK细胞作为效应细胞，以不同的E/T比例直接加入到孔中，动态监测NK细胞介导的细胞杀伤过程。如图1A所示，与对照相比，当加入的mNK细胞E/T为15/1的时候，NIH 3T3细胞的细胞指数出现明显的下降。而在效应对照孔中加入YAC细胞（无细胞杀伤效应的T细胞），细胞指数没有出现明显的下降。这表明细胞指数的下降是由mNK特异性引起的，并且很可能是由细胞死亡造成的。mNK细胞能够引起NIH 3T3细胞的时间依赖性死亡，但YAC细胞没有该效果（图1B）。为了进一步证明细胞杀伤效应，当细胞死亡达到50%时（添加mNK细胞后8小时），对靶细胞进行镜检。如图1C所示，mNK细胞通过细胞杀伤作用很快将靶细胞有效地清理掉，而对照YAC细胞对靶细胞没有任何影响。

总之，使用RTCA系统是目前唯一一种，不需要对靶细胞进行标记或添加任何化学指示物，就能够直接检测NK细胞介导的细胞杀伤的方法。另外，该系统可以动态监测整个细胞杀伤过程，这是利用基于标记的终点分析法所不能做到的。

定量检测 NK 细胞介导的细胞杀伤

细胞指数与细胞数目有关⁵，已经被用于定量监测化学物质，如抗癌药引起的细胞毒性。为了检验mNK 细胞的活性是否也可以定量分析，用不同比例的效应/靶细胞来检测细胞杀伤。利用鼠和人的 NK 细胞 (mNK 和 NK92)作为效应细胞，NIH 3T3 细胞和 MCF7 细胞（人乳腺癌细胞）分别作为效应细胞的靶细胞。如前所述，96 孔 E-Plate 板每孔接种 5000 个靶细胞，并用阻抗系统监测细胞生长。当靶细胞达到生长期，直接加入不同浓度的 NK 细胞。监测不同 E/T 比的 NK 细胞介导的细胞杀伤。

如图2所示,向靶细胞中加入mNK或NK92细胞后,与未加效应细胞的对照相比,细胞指数降低了。细胞指数的降低是依赖于E/T比的。细胞杀伤过程中,细胞与电极相互作用的降低引起了细胞指数的降低。E/T越大,得到的细胞指数值越小。表明RTCA系统支持特异性NK细胞介导的细胞杀伤活性的定量分析。而且,通过细胞杀伤的动态监测,有助于更深入理解NK细胞介导的杀伤作用的潜在机理。例如对细胞杀伤的动态分析,表明NK92细胞比mNK细胞的杀伤能力更强,E/T为4:1或更高时,加入NK92

会有诸多因素的参与,如NK受体和配体的表达,或NK细胞介导的不同细胞杀伤机制。

无标记分析NK细胞对多种靶细胞的细胞杀伤活性

利用8种不同的人类癌细胞和NIH 3T3细胞作为靶细胞,测试mNK和NK92的细胞杀伤活性,表1和2总结了mNK和NK92介导的细胞杀伤对不同靶细胞的敏感性。NK92对癌细胞具有广谱细胞杀伤活性。加入NK92不到8小时就能够达到最大杀伤活性。图3A对比了NK92细胞对7种癌细胞的敏感性,其中四种靶细胞都出现超过90%的细胞死亡,包括H460, HepG2, Hela和MDA-MB-231细胞。相反,mNK细

是微弱的杀伤(10%)。另外,mNK介导的细胞杀伤比NK92要慢得多,加入mNK12小时后才达到最大值。

综上所述,基于阻抗的RTCA系统可以用于NK细胞介导的细胞杀伤活性的分析,且无需任何标记。

人和鼠的NK细胞被用来对9种靶细胞(包括常用的人癌细胞)进行了实验。该系统可以对NK细胞介导的细胞杀伤进行动态定量分析,无需任何外源标记和额外试剂。而且这种全新的技术提供了全自动在线细胞杀伤分析,可以用于大规模的筛选调节NK细胞介导的细胞杀伤的化合物或基因。

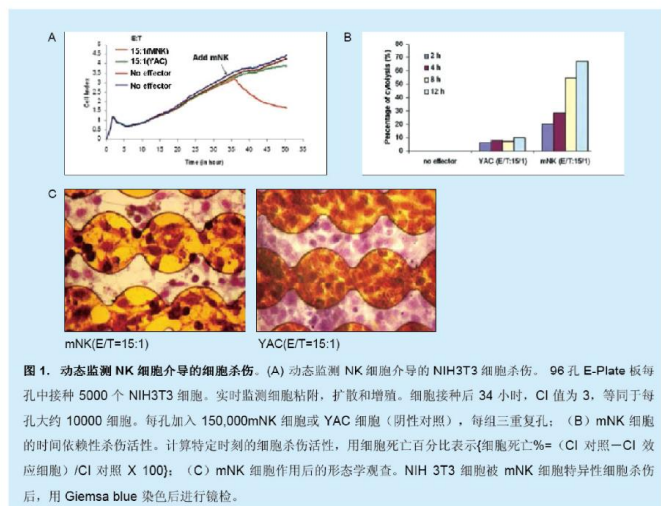


图1. 动态监测NK细胞介导的细胞杀伤。 (A) 动态监测NK细胞介导的NIH3T3细胞杀伤。96孔E-Plate板每孔中接种5000个NIH3T3细胞。实时监测细胞粘附,扩散和增殖。细胞接种后34小时,CI值为3,等同于每孔大约10000细胞。每孔加入150,000mNK细胞或YAC细胞(阴性对照),每组三重复孔;(B)mNK细胞的时间依赖性细胞杀伤活性。计算特定时刻的细胞杀伤活性,用细胞死亡百分比表示(细胞死亡%=(CI对照-CI效应细胞)/CI对照×100);(C)mNK细胞作用后的形态学观察。NIH 3T3细胞被mNK细胞特异性细胞杀伤后,用Giemsa blue染色后进行镜检。

四小时内,90%的MCF7细胞都被杀伤,而在相同的时间加入mNK细胞只引起30%细胞死亡,NK细胞介导的细胞杀伤动力学各不相同,表明效应细胞和靶细胞之间的相互作用,本质上是细胞特异性的,而且

细胞介导的细胞杀伤比NK92更具有选择性(图3B),参加测试的9种细胞中仅有4种(NIH3T3, A549, Hela, and MDA-MB-231)在加入mNK细胞后的12小时内,发生30%以上的死亡。OVCAR4, HT1080, HepG2, H460和MCF7五种细胞没有发生杀伤,或只

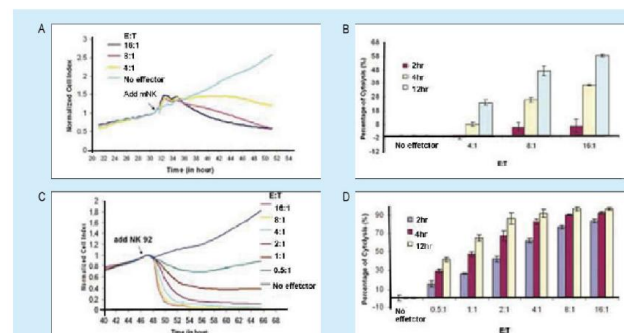


图2. 无标记定量分析mNK和NK92细胞的杀伤活性。 (A)mNK细胞杀伤活性的定量分析。NIH 3T3细胞接种到96孔E-Plate板,使用RTCA系统实时监测,直到细胞指数达到3,相当于每孔10,000个细胞。将不同浓度的mNK细胞以不同的E/T接种到靶细胞中,并动态监测细胞的杀伤活性。利用归一化的细胞指数值表示,即加入mNK细胞得到的细胞指数值与同一孔加入mNK细胞前的细胞指数值的比;(B)不同E/T比下mNK的时间依赖性细胞杀伤活性。mNK细胞介导的NIH 3T3的细胞溶解百分比的计算方法如图1。时间依赖性细胞杀伤活性如图所示;(C)对NK92细胞杀伤活性的进行定量。接种MCF7靶细胞,RTCA系统监测细胞生长,NK92细胞以不同E/T比加入靶细胞中,系统动态监测不同E/T比下的NK92细胞对MCF7的细胞杀伤活性;(D)不同E/T比下的时间依赖性NK92细胞的杀伤活性。NK92细胞对MCF7的细胞杀伤百分比的计算方法如图1。

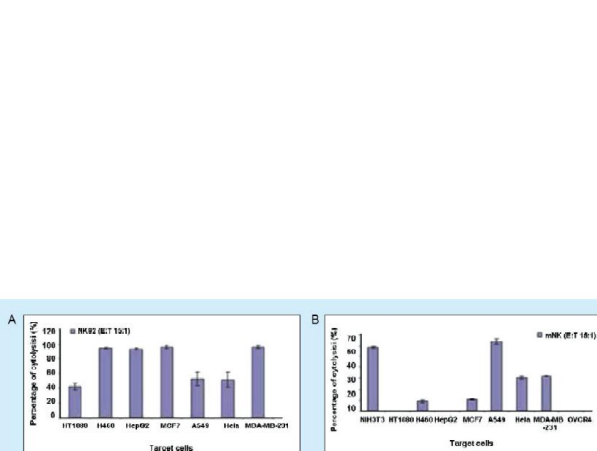


图 3. 无标记分析 NK 细胞介导的多种细胞杀伤。(A) NK92 细胞介导的 7 种细胞杀伤。细胞死伤的百分比是通过加入 NK92 细胞 8 小时后计算 CI 得到的；此刻细胞杀伤最大；(B) mNK 细胞介导 9 种不同细胞杀伤。细胞死伤的百分比通过加入 mNK 后 12 小时的 CI 计算得到的，此时细胞死伤达到最大。

Cell Name	Cell Type	Species	Maximum Cytotoxicity (%) at 12 h
NIH 3T3	Fibroblast	Murine	58.8
HT1080	Fibrosarcoma	Human	0.1
H460	Non-small cell lung cancer	Human	9.5
HepG2	Hepatoma	Human	0
MCF7	Breast cancer	Human	11.0
A549	Non-small cell lung cancer	Human	64.0
HeLa	Cervix cancer	Human	30.3
OVCAR4	Ovarian cancer	Human	0
MDA-MB-231	Breast cancer	Human	31.5

表1. mNK细胞介导的9种细胞杀伤

Cell Name	Cell Type	Species	Maximum Cytotoxicity (%) at 12 h
HT1080	Fibrosarcoma	Human	42.2
H460	Non-small cell lung cancer	Human	95.4
HepG2	Hepatoma	Human	94.1
MCF7	Breast cancer	Human	98.5
A549	Non-small cell lung cancer	Human	52.2
HeLa	Cervix cancer	Human	51.0
MDA-MB-231	Breast cancer	Human	97.0

表2. NK92细胞介导的7种细胞杀伤

参考文献

1. Brunner et al. (1968) Quantitative assay for the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Crlabelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by sioantibody and by drugs. *Immunology* 14: 181-196.

2. Geldhof et al. (1995) Expression of B7-1 by highly metastatic mouse T lymphomas induces optimal natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 55: 2730-2733.

3. De Meyer et al. (2003) Morphometric analysis of cytotoxicity in cultured cell monolayers: a simple

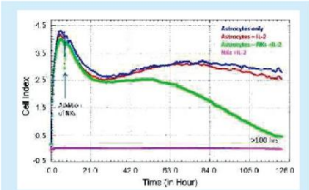
and versatile method for the evaluation of the lytic activity and the fate of LAK cells. *J. Immunol. Methods* 277: 193-211.

4. Abassi et al. (2005) Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J. Immunol. Methods* 292: 195-205.

5. Solly et al. (2004) Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cellbased assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2: 363-72.

客户应用实例 (一)

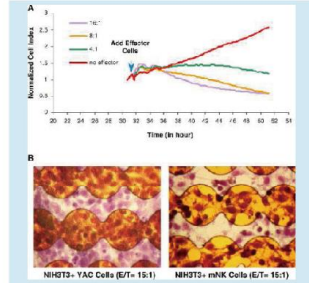
文献: Moodley K., et al. Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using RTCA technology. *J Neurosci Methods.* 2011 Sep 15; 200:173-80.



实例 1. NK 细胞介导的细胞杀伤作用过程。NT2As 为具有 NKs 抗性的细胞，但对 IL-2 激活的 NKs 细胞非常敏感。实验过程中 NT2As 细胞与 NK 细胞共培养 5min 后，再加入 IL-2 (50ng/ml) 激活 NK 细胞。蓝为 NT2As 单独的生长曲线，红为 NT2As+IL-2，绿为 NT2As+ NKs(10:1)+ IL-2，品红为 NK 细胞+ IL-2 的生长曲线。箭头所示为 NK 细胞加入时间，5min 后加入 IL-2。可见 IL-2 激活的 NK 细胞对 NT2As 细胞具有明显的杀伤作用。

客户应用实例 (二)

文献: Zhu J., et al. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic. *Cell sensor arrays. J Immunol Methods.* 2006 Feb 20; 309: 25-33.



实例 2. RTCA 系统动态监测小鼠 NK 细胞介导的细胞杀伤。(A) NIH3T3 细胞种植在 E-plate 上，小鼠 NK 细胞，YAC 细胞（对照组），按照与 NIH3T3 细胞不同的比例加入（如图所示）。箭头所示为加入效应细胞的时间点，NIH3T3 细胞的状态在 RTCA 系统上实时监测，可见效应细胞的比例越高，其引起的细胞杀伤作用越强；(B) 为 (A) 实验终点的细胞染色结果。E-plates 清洗之后用甲醛固定和 Giemsa 染料染色后拍照。

抗体依赖细胞介导的细胞杀伤（ADCC）作用 RTCA实时动态检测

前言

抗体依赖细胞介导的细胞杀伤（ADCC）作用是指表达 IgGFc 受体的 NK 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等，通过与结合在病毒感染细胞或肿瘤细胞等靶细胞表面的 IgG 抗体的 Fc 段结合，从而杀伤这些靶细胞的作用。ADCC 作用在保护机体免受致病菌的侵袭和维持免疫系统的平衡过程中发挥重要作用，也是机体抵御病毒、细菌、寄生虫和功能缺失性细胞的重要机制。近年来，随着单克隆抗体临床应用的逐渐增加，ADCC 作用也日益受到重视。ADCC 被证明是单克隆抗体临床治疗肿瘤的重要机制和手段。IgG 型抗体首先通过抗原结合部位与靶细胞结合，再由效应细胞上的 FcγR 识别其 Fc 段，介导 ADCC。有两种类型的细胞参与 ADCC 作用的过程：一种是胸腺细胞衍生而来的 T 淋巴细胞和 NK 细胞（natural killer）；另一种是骨髓衍化的淋巴细胞，如：巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞。被病毒感染的细胞会表达病原体特异性的抗原，这种抗原会被 T 淋巴细胞识别并启动其抗病毒机制抵抗病毒。NK 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞以及少部分 T 细胞通过其表面 FcγR 与特异性抗肿瘤单克隆抗体结合，借助 ADCC 效应而杀伤肿瘤，因此 ADCC 对杀伤肿瘤细胞及预防肿瘤细胞的血管转移具有重要意义。用单克隆抗体治疗时，肿瘤细胞上相应的抗原表达高，则治疗效果好；提高治疗性克隆抗体的血清水平或降低正常生理抗体血清水平可增强机体的 ADCC 抗肿瘤效应。

测量 ADCC 传统标准方法是用 51Cr 或 111In 进行放射性标记分析¹。在这些分析中，用放射性材料（如 51Cr）标记靶细胞，然后与效应细胞混合，比如 NK 细胞。NK 细胞对靶细胞的杀伤活性就通过靶细胞溶解后释放出的放射性来进行分析。也可以使用一些

非放射性标记方法进行检测，包括乳酸脱氢酶（LDH）释放量检测、流式细胞术、基于 ELISA 的颗粒酶测量，及利用显微镜进行形态学分析²。但是这些传统的标记物终点法检测，检测方法繁琐，不仅可能需要用到同位素，而且背景很高，因为标记常常会弥散在靶细胞之外。

材料和方法

由艾森开发的实时无标记细胞分析（RTCA, Real Time Cellular Analysis)^{3,4}技术，提供了一种全新的抗体依赖的细胞毒性（ADCC）非标记、体外研究方法，步骤更加简单，数据则更为可靠。研究人员将这种新技术用于在 9 种靶细胞系中动态及定量监测 ADCC 作用，其中包括在研究领域广泛应用的人肿瘤细胞系 MCF7、Hela 等。在 RTCA 检测中，靶细胞接种在 E-Plate 微孔板中，系统每 15 分钟检测细胞增殖，待靶细胞进入对数生长期，加入不同 E/T 比（效应细胞与靶细胞的比例）NK 细胞，持续、动态并定量检测抗体介导的瘤细胞杀伤活性，而无需对靶细胞进行额外的标记。

细胞

NK 92, DU145细胞以及实验中用到的所有的癌细胞均购自ATCC，NK92细胞是稳定过表达FcγRIIIb的细胞株，所有的细胞均培养在5% CO₂，37℃的培养箱中，NK92细胞在含有2 mM L-谷氨酰胺，1.5g/L碳酸氢钠，0.2 mM肌醇，0.1 mM 2-巯基乙醇，0.02 mM 叶酸，12.5% 马血清，12.5% FBS，100-200 U/ml IL-2重组体的Alpha MEM培养基中培养。其它肿瘤细胞培养在含有5% FBS，1%青霉素，1% 螺旋霉素（GIBCO）

的RPMI培养基中，DU145细胞培养在含有10%FCS，1%青霉素，和1%螺旋霉素的RPMI 1640培养基中。ADCC过程中所用的单克隆抗体针对是人源IGF-1R特异性的，可以结合在FcγRIIIb的Fc段。

实验数据分析

应用 RTCA 检测及分析软件，可对实验全过程，即从接种到细胞死亡，进行检测。通过实时显示时间-E/T（效应细胞与靶细胞比值）的依赖性曲线，可动态监测 NK 细胞的活性。RTCA 技术使用细胞指数（CI: Cell Index）表示细胞阻抗。每点的 CI 值定义为(Rn-Rb)/15，其中 Rn 表示孔接种有细胞时的电极阻抗值，Rb 是表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。

结果和讨论

动态NK细胞介导的DU145细胞的杀伤

利用 NK92 细胞及靶细胞 DU145 细胞来监测 NK 细胞介导的细胞杀伤作用。在 96 孔 E-Plates 板的每孔中接种 5,000 个 DU145 细胞作为靶细胞，RTCA 每 15min 记录一次生长数据，直到 20.5 小时后细胞达到对数生长期，去除 DU145 细胞的细胞培养基，加入不同的 E/T 比例的过表达 FcγRIII (CD16)的 NK92 细胞悬液，每 15min 检测一次，检测 67.5hr。如图 1A 所示，在加入 NK92 细胞后较短的时间内，整体的 CI 有一个较小的下降过程，这与培养基和温度的改变有关。与对照相比，当效应细胞 NK92 cells (E) 与与靶细胞 DU145 (T) 的比例从 0.47:1 到 30:1 的时候，NK92 细胞越少，靶细胞杀伤效应越低，其对应的 CI 越高。当 E:T 比值为 30:1 时，靶细胞的生长曲线基本无上升趋势，提示 DU145 细胞已经基本被 NK92 细胞介导杀伤 (图 1A, 亮绿色线)。并且，与对照组细胞相比，细胞杀伤作用发生在很短的时间内，表明 NK 细胞引起的溶细胞作用在加入 NK 细胞后迅速产生。

用不同的参数进行数据分析，无论采用标准化细胞指数分析（1A）或者用基线细胞指数（1B）分析，都可观察到，加入 NK 细胞 33h-88h 之间，除了 E:T

最低比例（0.47:1）以外，其他比例的实验组都引起梯度的 CI 值变化。

实时动态监测抗IGF-1R的抗体依赖的NK细胞介导的DU145细胞杀伤

胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor I receptor, IGF-1R)是靶向治疗的重要靶标，IGF-1R 的信号转导途径与肿瘤的发生密切相关。抑制 IGF-1R 的活性，可以有效控制肿瘤细胞的生长和转移，可增强肿瘤对化疗、放疗的敏感性⁵。抗 IGF-1R 的抗体与 IGF-1R 结合后，封闭 IGF-1R，进而阻断 IGF-1R 信号转导通路，从而抑制肿瘤的生长及侵袭。因此研究 IGF-1R 在细胞介导的肿瘤细胞杀伤过程的作用，研发针对 IGF-1R 的抗体对肿瘤的治疗和预防会起到重要的作用⁶。

IGF-1R 的单克隆抗体既可以结合 IGF-1R 受体也可与 NK92 细胞上的 FcγR 的 Fc 段结合，从而显现抗 IGF-1R 的抗体依赖的 NK 细胞介导的 DU145 细胞杀伤。实验中，96 孔 E-Plates 板的每孔中接种 5,000 个 DU145 细胞作为靶细胞，RTCA 每 15min 记录一次生长数据，直到 20.5 小时后细胞达到对数生长期。DU145 靶细胞用不同量的 IGF-1R 的抗体（终浓度为 0.1 至 100 μg/ml）预孵育 30min。未用抗体预孵育的作为对照组。随后，按照 E:T 为 3.75:1 (图 2A)加入 NK92 细胞至 DU145 细胞中，每 15min 检测一次，检测 67.5hr。未用抗体预处理的对照孔，NK92 细胞引起的 DU145 细胞杀伤的效应呈现缓慢降低的细胞指数。（红色曲线，图 2A），而用抗体预处理的 DU145 细胞的 CI 呈现明显的浓度依赖的降低（表 1）。所有抗体预处理的 DU145 细胞的 CI 均比未处理的低，说明抗体的存在增强了 NK 细胞介导的细胞杀伤 (图 2A, 表 1)。

抗IGF-1R的抗体增强NK92细胞介导的DU145细胞杀伤。DU145细胞CI的变化趋势与抗体的浓度，E:T的比例值相关。NK92细胞加入的越多，抗体的增强效应越强(表 1)。而DU145细胞只用IGF- R抗体处理，不

加入NK92细胞的情况下，其生长的CI与对照相比基本没有下降，说明抗IGF-1R的抗体对靶细胞无毒性作用。事实上，抗体的量超过6.25 μg/ml会引起DU145

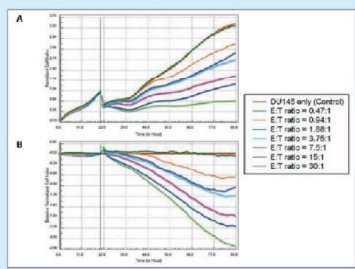


图 1. 实时无标记动态检测 NK92 细胞介导的 DU145 细胞杀伤。96 孔 E-Plate 板每孔中接种 5000 个 DU145 细胞，15min 一次实时监测细胞粘附，伸展和增殖至 20.5hr。以不同的 E/T 比例 (0.47:1 ~ 30:1, 7 倍稀释)，加入 NK92 细胞，检测至 67hr。(A) 标准化细胞指数曲线，将数据标准化至加入 NK92 细胞前的最后一个时间点，可见 E/T 比例对 DU145 细胞有浓度依赖性杀伤作用；以未做处理的对照孔 (红线) 作为基线来进行曲线分析，结果与图 A 一致。这些图形都是 RTCA 系统的自带软件生成的。

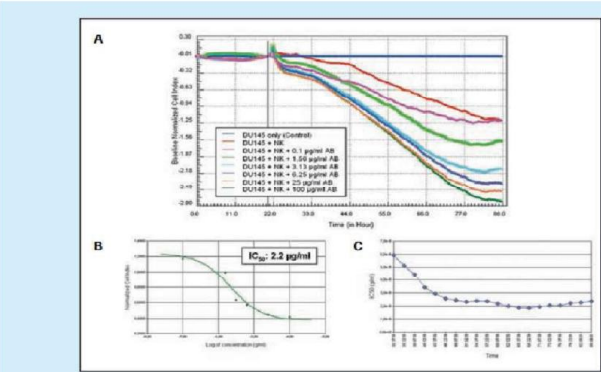


图 2. 抗 IGF-1R 的抗体对 NK 细胞介导的 DU145 细胞杀伤的影响。在 96 孔 E-Plates 板的每孔中接种 5,000 个 DU145 细胞作为靶细胞，RTCA 每 15min 记录一次生长数据至 20.5hr。DU145 靶细胞用不同量的 IGF-1R 的抗体预孵育 30min，之后 NK 细胞以 (E:T = 3.75:1) 的比例加入 DU145 细胞中，每 15min 检测一次，检测 67.5hr。(A) 基线化细胞指数曲线，以未做处理的 DU145 细胞对照孔 (红线) 作为基线来进行曲线分析；(B) 60 小时 IC50 值；(C) 是加入 NK 细胞后 9~88 小时内时间依赖的 IC50 变化。所有的图形都是 RTCA 系统的自带软件生成的。

E:T ratio	anti-IGF1R antibody (μg/ml)	Cytotoxicity (%) after 48 h
3.75:1	—	0
3.75:1	—	21
1.88:1	—	30
1.88:1	0.1	39
1.88:1	0.78	42
1.88:1	6.25	47
1.88:1	25	52
1.88:1	100	53
3.75:1	—	37
3.75:1	0.1	40
3.75:1	1.52	51
3.75:1	3.13	69
3.75:1	6.25	73
3.75:1	25	79
3.75:1	100	82
7.5:1	—	54
15:1	—	60
30:1	—	83

表 1. IGF-1R 抗体依赖的 NK 细胞介导的 DU145 细胞杀伤。48 小时细胞杀伤百分率以标准化至加入 NK92 细胞前的最后一个时间点计算。

计算抗 IGF-1R 的抗体的半有效浓度 (IC50)

为了进一步量化抗 IGF-1R 的抗体对 NK92 细胞介导的 DU145 细胞杀伤作用，由 RTCA 系统自带软件 (RTCA Software 1.1) 计算 E:T 比例为 3.75:1 时，抗体浓度依赖的作用，得到其半有效抑制浓度为 2.2 μg/ml (图 2B)。50 小时以上时间段内的时间依赖性的 IC50 是用 RTCA Software 1.1 另外一个功能计算的，数据表明 IC50 在较长一段时间内具有惊人的可重复性 (图 2C)。

结论

该研究表明了 RTCA 技术能够在无标记、无创伤性的条件下检测 NK 细胞介导的肿瘤细胞的杀伤和抗体依赖细胞介导的细胞杀伤 (ADCC) 作用。其既可以检测到加入不同量的 NK92 细胞引起的量化的效应，也可以检测到加入单抗抗体后对 NK92 细胞作用的增强。更重要的是整个细胞杀伤的过程，包括一些预知的和不可预知的细胞反应都可以被检测到，这是以前传统的终点检测法所无法达到的。

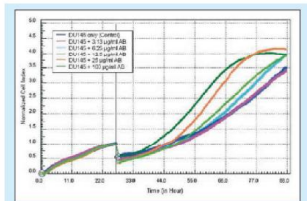


图 3. 实时无标记检测抗 IGF-1R 的抗体在不加入 NK92 细胞的情况下对 DU145 细胞的影响。在 96 孔 E-Plates 板的每孔中接种 5,000 个 DU145 细胞作为靶细胞，RTCA 系统每 15min 记录一次生长数据至 27hr 后，加入不同浓度的抗 IGF-1R 的抗体，持续检测 60 小时。标准化 CI 图由标准化至加入抗体前的最后一个时间点计算，所用软件为 RTCA 系统的自带软件 (RTCA Software 1.1)。

参考文献

1. Brunner KT, Mauel J, Cerotini JC, Chapuis B (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14, 181-196.
2. De Meyer K, De Baetselier P, Verschuere H, Geldhof AB (2003) Morphometric analysis of cytotoxicity in cultured cell monolayers: a simple and versatile method for the evaluation of the lytic activity and the fate of LAK cells. *J Immunol Methods* 277, 193-211.
3. Abassi YA, Jackson JA, Zhu J, O'Connell J, Wang X, Xu X (2004) Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* 292, 195-205.
4. Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, and Zheng W (2004) Application of real-time cell electron-