



服务热线
400 600 1063



RTCA技术应用专辑(二)

心肌细胞功能 | 信号转导 | 基因调控 | 病毒CPE | 细胞屏障
Application Notes No.2



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



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幢

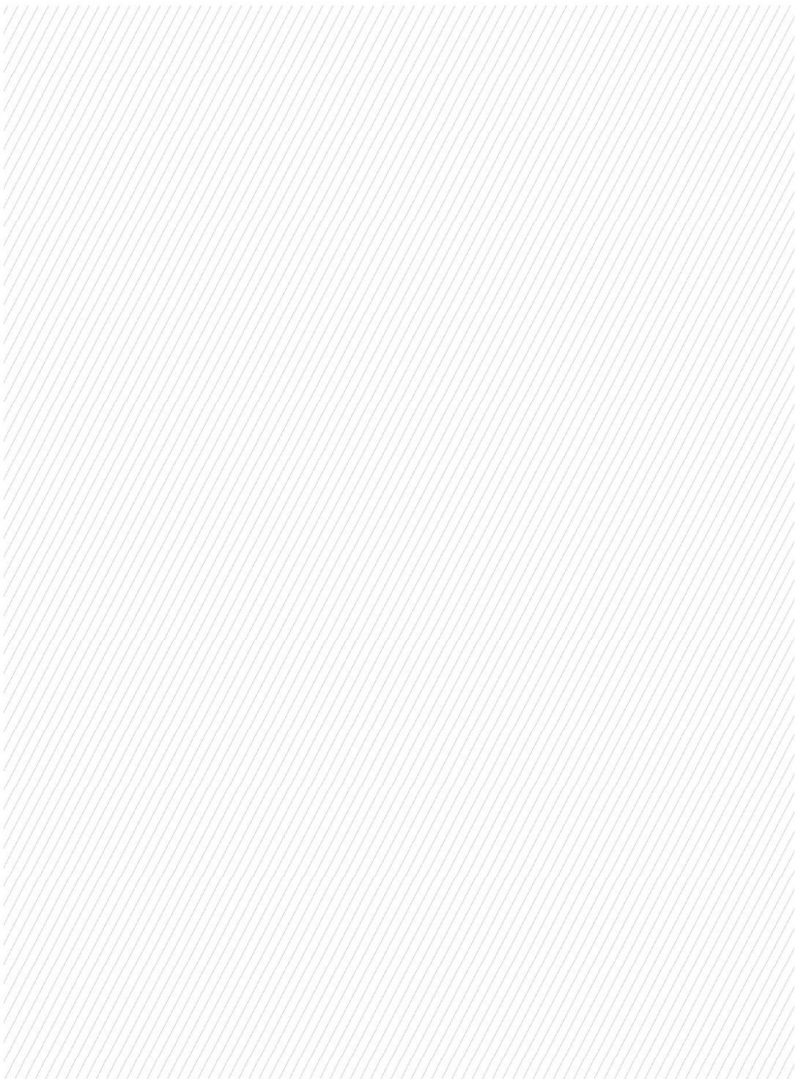
电话: 0571-2890 1211

传真: 0571-2890 7820

邮箱: xcelligence@aceabio.com.cn

网址: www.aceabio.com.cn





目 录

药物心肌毒性RTCA实时动态检测	01
内源性GPCRs功能RTCA实时动态检测	08
基因沉默调控的细胞迁移RTCA实时动态检测	16
基因功能评价RTCA实时动态检测	23
病毒Cytopathic Effect 效应RTCA实时动态检测	31
细胞屏障功能RTCA实时动态检测	37

药物心肌毒性 RTCA实时动态检测

前言

在过去的近 20 多年中,有相当数目的药物因为具有心脏毒性而被撤出市场。另外,有一些化合物也因为药物研发的后期或者临床应用阶段所发现的心脏毒性给医药产业带来巨大损失,也给人类健康造成极大危害 [1]。因此在药物研发的早期对药物的心脏毒性进行筛选和评价,对降低新药的后期研发成本,提高新药研发的成功率有着极其重要的意义。药物的心脏副作用各不相同,但总体可以分为直接作用和间接作用。大多数撤出市场的药物是因为它们干扰心脏的电活动而影响心脏功能 [2]。心脏本身自发电活动源于心肌细胞膜上的钠、钾、钙通道有规律的活动,影响了这些离子通道的功能,就会影响心脏的兴奋-收缩偶联,从而导致致命性的心率失常,也称为尖端扭转型心动过速 TdP (Torsades de Pointes)[1]。

是否还有其他的分子机制引起 TdP 目前仍在研究之中,但广为人们接受的药物导致心律失常的主要原因,是药物引起的心室复极化时程延迟(或称为 QT 间期延长) [2]。人体中心室复极化的主要电流是快速激活延迟整流钾电流 I_{Kr} ,主要由 hERG (human ether a-go-go related gene) 基因编码 [2],阻断 hERG 通道会引起心室肌动作电位时程的延长,异常的复极化过程会引起早后去极化 (EAD, early after depolarization),进而导致 TdP[2]。hERG 通道在复极化过程中重要地位和它易于被药物结合的特性使得它成为心脏药物安全性评价的重要关注点。

值得注意的是,只评价药物对 hERG 通道的作用不足以全面预测药物的心脏毒性,有些药物如 verapamil 对心肌细胞上的多种离子通道均有作用 [2]。研究药物心脏毒性的理想模型是,在体外有一个系统可以全面评价药物对心肌细胞兴奋-收缩偶联过程中所有的离子通道的作用,这对药物研发过程有着非常重要的指导作用 [3]。ACEA 自主研发的 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪将阻抗实时细胞分析技术

运用到心脏毒性检测领域,是目前市场上唯一的 96 孔通量、实时无标记、可同时进行短期及长期心率失常和心脏毒性药物筛选的仪器,为药物安全检测及优化提供了崭新的平台。分析仪的核心部件是整合在 96 孔板底部的微电极细胞传感器 (可 12.5ms 记录一次),能够记录心肌细胞的生长和跳动过程, Cardio 仪器的主要组成包括 RTCA Cardio 分析仪; RTCA Cardio 检测台和 E-Plate Cardio 96 检测板,如图 1 所示。



图 1. RTCA Cardio 是一款实时动态无标记检测心肌细胞律动和评价药物心脏毒性的仪器,主要构成有 RTCA Cardio 分析仪; RTCA Cardio 检测台 (置于 CO₂ 培养箱中); E-Plate Cardio 96 检测板。

本文主要介绍了如何利用 RTCA Cardio 检测平台,使用干细胞诱导分化的心肌细胞,实现药物的安全性检测和评价。采用 ACEA RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪,结合购自于 AxioGenesis 的小鼠源胚胎干细胞诱导的心肌细胞 (Cor.At®),用于药物临床前体外心肌安全性评价。Cor.At® 细胞纯度为 100%,有自律性和典型的心肌细胞所拥有的相关离子通道与细胞骨架等成分。数据表明 Cor.At® 细胞和 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪结合可以预测药物的心肌毒性,为心脏安全性评价提供非常便利的手段和可靠的依据。

材料和方法

细胞

Cor.At® 细胞:小鼠胚胎干细胞诱导的心肌细胞购自于 AxioGenesis AG (Cat. No. XCAC-1010E, Lonza Cologne, Germany)。细胞复苏前冻存于液氮中,复苏操作按照 AxioGenesis 提供的说明书进行, E-Plate

Cardio 96 检测板中每孔用 50 μ l 1:100 稀释的纤连蛋白液 (FN, 1114, Sigma-Aldrich, USA) 4°C 包被过夜, 移除 FN 后用 PBS 清洗后待用。细胞在 37°C 水浴复苏, 移至装有 9ml 培养基 (XCAM-250E, Lonza Cologne, Germany) 的 15ml 离心管中, 1000rpm, 离心 5min, 新鲜的培养基 (嘌呤霉素终浓度: 10 μ g/ml) 重悬细胞。台盼蓝染色后, 进行细胞计数。

RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪上实时动态检测 Cor.At® 细胞活性及功能

在 E-Plate Cardio 96 检测板中 (ACEA Biosciences) 每孔接种约 40000 ~ 60000 个活细胞, 用 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪实时检测, 细胞每天换液一次。一般情况下, 细胞培养 60~80h (取决于细胞密度) 后进行药物处理。数据由 RTCA Cardio 软件自动获取, 用户可以自己设置采样频率和窗口。通常, 药物加入前 10min, 每 1 分钟记录一次作为加药前的对照, 加入药物后的 2h 内, 1min 记录一次; 3 ~ 24h 内, 每 15min 记录一次。采样时间窗口固定为 20s。RTCA Cardio 软件同时还可以计算心肌细胞的律动参数, 如: 跳动频率、跳动幅度、标准化的跳动频率、标准化的跳动幅度、跳动一次所需要的时间和跳动的不规律性等。另外, RTCA Cardio 软件还可以进行一些统计学方面的计算如: 平均值、标准差和药物作用的半有效抑制浓度 (IC50) 等。

结果

Cor.At® 细胞的贴附、伸展和生长由 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪实时动态检测。在 E-Plate Cardio 96 检测板中接种 Cor.At® 细胞, 接种密度为 60000 个/孔, RTCA Cardio 每小时检测一次, 检测 96 小时 (图 2A)。细胞在 12、24、48、72 和 96h 的跳动曲线如图 2B 所示。细胞生长 24h 内没有明显的跳动现象, 是因为此时的细胞尚未成熟、细胞与细胞之间的

连接尚未完全建立; 48h 后细胞相互连接基本建立, 并且开始同步跳动 (图 2B), 跳动的频率为 80 次/min, 培养 1 个月以后, 细胞的跳动的频率平均为 250 次/min (数据未显示)。

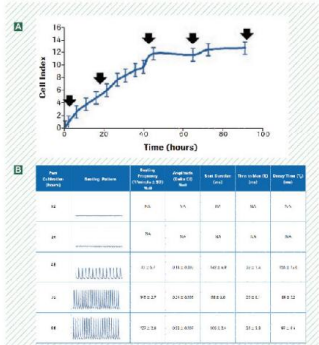


图 2. 在 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪上检测 Cor.At® 细胞的贴附、生长和跳动。(A) Cor.At® 培养在 E-Plate Cardio 96 检测板上 96 小时内的生长曲线, 培养过程中, 细胞每天更换新鲜培养基; (B) RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测 Cor.At® 细胞在指定时间点的跳动曲线, 其中跳动频率 (次/min) 和跳动幅度 (ACI) 由 Cardio 心肌细胞功能分析仪自带软件计算。数据为 8 个孔的平均值 $\pm$ 标准差; 跳动曲线时长为 5s。

RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪实施药物心脏安全性评估

RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪可以非常灵敏并定量地检测与心肌细胞兴奋 - 收缩偶联相关的离子通道和非离子通道调节剂的作用。实验中, 在 E-Plate Cardio 96 检测板中接种 Cor.At® 细胞, 培养 3 天后加入不同浓度的药物, 实时检测药物的作用。

检测电压门控 Ca²⁺ 通道调节剂的作用

Isradipine 属于二氢吡啶类化合物, 做为 L-型钙离子通道的阻断剂, 作用于心肌细胞后, 引起时间及浓度依赖的心肌细胞跳动抑制 (图 3A)。Isradipine 对 Cor.At® 细胞标准化跳动频率和幅度抑制的半有效抑制浓度分别为 19.7 nM 和 42.3 nM (药物作用后 5min 计算, 表 1 所示)。这一结果与使用体外急性分离的兔心肌细胞 [4] 以及稳定表达 Cav1.2 的 HEK293 [5] 中做出的实验结果是一致的。化合物 (S)-(-)-Bay K 8644 也属于二氢吡啶类化合物, 是一种电压门控钙离子通道的兴奋剂。(S)-(-)-Bay K 8644 会引起 Cor.At® 细胞时间和浓度依赖的跳动频率加快, 且在较高浓度时, 这种跳动促进作用可一直持续至加药后 12h (图 3B)。(S)-(-)-Bay K 8644 在 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测到的引起心肌细胞跳动频率的增加现象, 以及测定的半有效抑制浓度 (77 nM) 与之前的文献报道也非常一致 [6]。

检测电压门控 Na⁺ 通道调节剂的作用

电压门控钠通道在心肌细胞动作电位 0 期去极化过程中发挥重要作用。TTX 是一种电压门控钠通道的选择性抑制剂, 作用于 Cor.At® 细胞后, 引起药物浓度依赖的细胞跳动频率降低。在较高浓度时, 这种跳动抑制作用可一直持续到加药后 12h (图 3C)。由 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪测定结果计算的半有效抑制浓度为 0.3 μ M, 如表 1 所示。

Testosterone	Normalized Beat Rate (b/min)	Normalized Beat Amplitude (ACI)	Beat Duration (ms)	Beat Rate Irregularity (CV)
Chenodeoxycholic acid	101 $\pm$ 107.58	47.3 $\pm$ 127.58	N/A	N/A
Isradipine	772 $\pm$ 107.58	N/A	N/A	24.2 $\pm$ 107.58
Bay K 8644	28.3 $\pm$ 107.58	N/A	2.6 $\pm$ 107.58	368 $\pm$ 107.58
TTX	2.8 $\pm$ 107.58	5.8 $\pm$ 107.58	N/A	N/A
Isoproterenol	1.4 $\pm$ 107.58	N/A	7.1 $\pm$ 107.58	N/A

表 1. RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪测定心肌细胞离子通道或非离子通道调节剂的作用及作用的半有效抑制浓度。RTCA Cardio 软件计算多种参数的 IC50: 标准化跳动频率、标准化跳动幅度、单次跳动时间和跳动的不规律性。

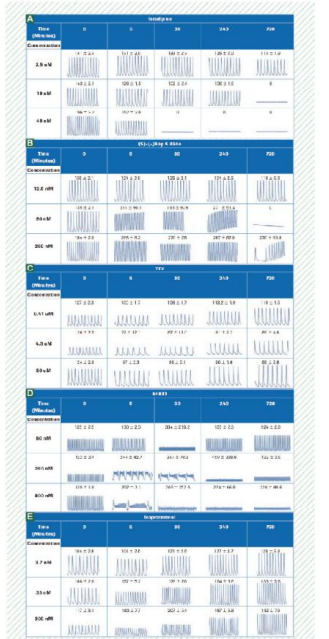


图 3. RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测心肌细胞离子通道或非离子通道调节剂的心肌细胞调节作用。在 E-Plate Cardio 96 检测板中, 接种 Cor.At® 细胞, 由 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪实时动态检测细胞的生长。3 天后, 分别加入不同浓度的化合物 (A-E)。心肌细胞跳动曲线的记录方法如实验方法中所述。各个时间点细胞跳动曲线时程除了 E4031 的结果为 14s, 其余均为 5s。(A) Isradipine, L-型钙离子通道抑制剂; (B) (S)-(-)-Bay K 8644, L-型钙离子通道激动剂; (C) TTX, 电压门控钠通道抑制剂; (D) E4031, ERG 通道抑制剂; (E) Isoproterenol, β -肾上腺素能受体激动剂。

检测电压门控K⁺通道调节剂的作用

快速激活延迟整流钾电流 (IKr) 在心肌动作电位 3 期复极化过程中发挥重要作用。如图 3D 所示, E4031 (ERG 通道抑制剂) 对 Cor.Atr[®] 细胞的作用, 破坏了心肌细胞正常的跳动节律。在浓度较高时 (200 ~ 800 nM), 引起细胞跳动时程的延长, 这种现象是典型的 hERG 通道抑制剂的作用。在药物的某些浓度作用下, 12h 之后细胞的跳动曲线出现部分恢复的现象。如表 1 所示, E4031 对细胞标准化跳动频率和跳动的规律性的半有效抑制浓度分别为 27 nM 和 57 nM, 这一结果与使用膜片钳技术检测的结果一致 [7]。

检测 Isoproterenol 的作用

β - 肾上腺素受体激活引起交感神经系统的兴奋并调节神经激素的作用, 这一过程可以调控心脏细胞的收缩和律动 [3]。本文用 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测 β - 肾上腺素受体激活后对心肌细胞跳动的影响。Isoproterenol 是一种 β - 肾上腺素受体激动剂, 引起了药物浓度及时间依赖的 Cor.Atr[®] 细胞跳动频率的增加, 和单次跳动时程的缩短 (图 3E)。

RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪在药物临床前心脏安全性评价中的应用

为了进一步验证 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪在药物临床前心脏安全性评价中的应用价值, 我们使用 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪, 检测了 4 种因诱导心肌 TdP 而撤市的药物。结果表明这 4 种药物均影响细胞的跳动频率, 并呈现药物浓度依赖性 (图 4A)。药物引起的心肌细胞抑制作用结果与 hERG 通道抑制剂 E4031 很接近, 提示这 4 种药物具有类似的作用机制, 即直接抑制 hERG 通道。

此外, 本文还检测了 Pentamidine 的作用。Pentamidine 是 hERG 蛋白转运过程的一种抑制剂, 可以引起心肌复极化时程的延长, 从而间接地影响 hERG 通道的功能。对于这类机制的药物, 膜片钳技术在短短的几分钟内很难检测到。如图 4B 所示,

RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测到 20 μ M Pentamidine 作用于 Cor.Atr[®] 细胞, 240min 内没有引起细胞跳动频率和幅度的明显变化, 但作用 900min 后, 跳动的频率明显减慢、单次跳动时程延长, 提示 Pentamidine 作用于 hERG 蛋白的转运, 影响了心肌细胞动作电位的复极化过程。这些结果再次证明了实时检测药物的作用对于预测药物短时和长时程作用具有非常重要的意义。

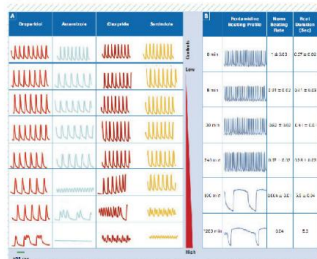


图 4. RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测药物心脏毒性。(A) RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测药物 droperidone, astemizole, cisapride 和 sertindole 对 Cor.Atr[®] 细胞的作用。图示为药物加入后 30 min (droperidone), 15 min (astemizole), 180 min (cisapride) 和 165 min (sertindole) 细胞的跳动曲线图 (时程均为 5s)。除了 cisapride 从 10 μ M, 1: 2 稀释以外, 其他 3 种药物均从 20 μ M 开始 1: 2 稀释; (B) Cor.Atr[®] 细胞在 E-Plate Cardio 96 检测板中培养 3 天后用 20 μ M 的 pentamidine 处理, 检测药物对 Cor.Atr[®] 细胞跳动的影响。

讨论

本文介绍了使用 RTCA Cardio 实时心肌细胞功能分析仪, 结合 Cor.Atr[®] 心肌细胞, 实现的药物心肌安全性检测及评估的应用。此款仪器巧妙的设计能够记录药物的短时和长时程的作用, 包括心肌细胞律动、活力以及形态学的变化。目前为止, 大多数进行药物心脏安全性评估的系统均是检测药物对 hERG 通道的影响, 不是直接检测药物对心肌细胞律动的影响, 因此无法全面评估药物对整个心脏或心肌组织的作用。

传统的方法包括浦肯野纤维法、心室楔法、Langendorff 以及活体动物遥测和动物麻醉方法 [1], 这些方法往往受制于操作者的熟练程度、技术本身的要求, 并且存在通量低和花费高等不利因素。预测临床前药物心脏安全性最好的方法通过检测药物对心肌细胞整体的影响, 包括药物对离子通道、非离子通道以及对心肌细胞律动的影响。

RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪, 以有律动活性的心肌细胞为检测对象, 能够全面、直接、定量地评价药物对心肌细胞的作用。基于 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪所获得的数据呈现与心肌细胞兴奋-收缩偶联相关的多种离子和非离子通道调节剂的作用, 包括对钙、钠、钾通道和心肌细胞收缩等多个方面, 它的高敏感性可大大提高在临床前预测药物引起心律失常的可能性。RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪的另一个强大优势是它的检测时间处理: 一个 96 孔板数据更新只需 12.5ms, 同时分析仪可以记录多天甚至多个星期的数据。RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪实时动态检测的优势还体现在: 如文中对 pentamidine 的检测上, 该药物影响的是 hERG 蛋白的转运而不是直接作用于通道蛋白本身, 因此药物的作用在 15h 后才体现出来, 传统的膜片钳方法无法实现这一检测, 而 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪对瞬时及长时程变化的实时捕捉非常便利地实现了对这类药物的检测。总之 RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪, 以它实时动态的检测方式和 96 孔的通量为药物临床前的心脏安全性评估提供了一种非常可靠的方法。

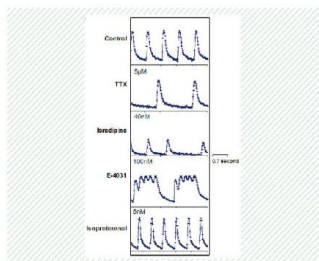
参考文献

1. Fermini B, Fossa AA. (2003). "The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development." *Nat Rev Drug Discov.* 2, 439–447.
2. Brown AM. (2005). "hERG block, QT liability and sudden cardiac death." *Novartis Found Symp.* 266, 118–131; discussion 131–115, 155–118.
3. Kettenhofen R, Bohlen H. (2008). "Preclinical assessment of cardiac toxicity." *Drug Discovery Today.* 13, 702–707.
4. Mellemkjaer S, Bang L, Nielsen-Kudsk F. (1992). "Isradipine dynamics and pharmacokinetics in the isolated rabbit heart." *Pharmacol Toxicol.* 70, 366–372.
5. Balasubramanian B, Imredy JP, Kim D, Penniman J, Lagrutta A, Salata JJ. (2009). "Optimization of Ca(v)1.2 screening with an automated planar patch clamp platform." *J Pharmacol Toxicol Methods.* 59, 62–72.
6. Zahradnikova A, Minarovic I, Zahradnik I. (2007). "Competitive and cooperative effects of Bay K8644 on the L-type calcium channel current inhibition by calcium channel antagonists." *J Pharmacol Exp Ther.* 322, 638–645.
7. Peng S, Lacerda AE, Kirsch GE, Brown AM, Bruening-Wright A. (2010). "The action potential and comparative pharmacology of stem cell-derived human cardiomyocytes." *J Pharmacol Toxicol Methods.* 61, 277–286.

客户应用实例（一）

文献

Xi B., et al. Functional cardiotoxicity profiling and screening using the xCELLigence RTCA Cardio System. J Lab Autom. 2011Dec;16:415-21.

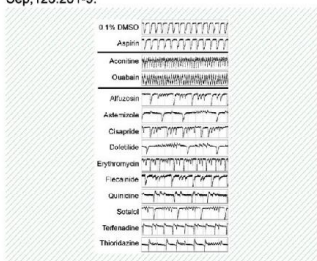


实例 1. RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测的几种化合物对 Cor-AT 细胞搏动的影响。TTX，电压门控的 Na^+ 通道抑制剂，减慢细胞跳动频率、降低跳动幅度；Isradipine，电压门控的 Ca^{2+} 通道抑制剂，降低跳动幅度；E4031，ERG 通道抑制剂，引起明显的跳动节律异常；isoproterenol β -肾上腺素能受体的激动剂，加快细胞跳动频率。不同作用机制的药物会引起特定的跳动模式。

客户应用实例（二）

文献

Guo L., et al. Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. Toxicol Sci. 2011 Sep;123:281-9.



实例 2. RTCA Cardio 心肌细胞功能分析仪检测已知的致心律失常性化合物的心脏毒性。图中所有图形时程均为 20s。0.1% DMSO 和 100uM 的阿司匹林分别作为溶解介质和阴性对照。无规律的跳动表现为一串快而小的纤颤，通常是由已知的延长心肌细胞动作电位复极化时程的药物引起如：alifuzosin(10uM)、cisapride (1uM)、dofetilide (0.01uM)、erythromycin (30IM)、flecainide (3uM)、quinidine (10uM)、sotalol (100uM)、terfenadine (1uM) 和 thioridazine (3uM)。与 TdP 无关的心率失常的药物 aconitine (0.03uM) 和 ouabain (0.03uM)，引起的是心动过速或者颤动样心律失常。

内源性GPCRs功能
RTCA实时动态检测

前言

G- 偶联蛋白受体 (GPCRs), 即 7- 跨膜蛋白, 是当今临床与科研药物的单一治疗靶点, 也是迄今为止发现的最大的靶点家族。据推测, 人类基因组中该家族的功能成员超过 300 个, 涉及到多种不同细胞与组织间的广泛信号途径。研究证实, GPCR 功能的研究, 有助于免疫学、神经病学、心脏病学与肿瘤学领域多种疾病的治疗。

通过应用新型的基于细胞水平的受体功能检测技术, 候选药物对新调节子的确认率显著提高, 而损耗率 (定义为临床前检测/临床试验失败率) 明显降低, 但基础研究获得的GPCR 功能数据很难被应用于临床疾病中。造成这种情况的原因是, 传统细胞学实验往往 (1) 使用异源细胞, 或相关性较低的细胞类型, 进行人造受体的过表达; (2) 使用外源性检测试剂, 如荧光标记试剂; (3) 使用侵入性处理手段, 像染料负载以及细胞裂解, (4) 生成的数据仅为单一时间点的数据, 而不是持续性细胞监测数据。

最新开发的 RTCA 技术检测平台, 可显著改善 GPCR 药物开发与研究应用的成功率 [1]。RTCA 实时无标记检测技术, 不需要使用外源性标记, 即可对疾病相关细胞的内源性 GPCR 功能进行实时评测, 只需将细胞接种于含有微电极的培养板上, 即可对 GPCR 激活导致的细胞骨架结构的微小变化与细胞收缩情况进行准确测定。GPCRs 通过与细胞膜鸟嘌呤核苷结合蛋白或 G 蛋白结合偶联, 可完成细胞信号传导活动。所有与 G 蛋白偶联的第二信使通路, 都被证实会激活环化 AMP/ 蛋白激酶 A、钙离子 / 磷酸酶 C、 β - 抑制蛋白 / MAPK, 以及 Rho 家族 GTP 酶, 使细胞发生形态学改变。而 RTCA 技术可通过记录细胞阻抗, 对形态学改变进行检测 [2], 从而完成对 GPCR 功能的检测。



与传统检测方法相比, 形态学阻抗测定可对多个信号途径累积效应进行捕获。内源性GPCR 功能测定的优势包括 (1) 对靶受体进行评价在其正常表达水平上; (2) 在调节因子包括激素或异源性二聚体存在情况下, 对受体之间的天然相互作用情况进行分析; (3) 允许 GPCR 与细胞内 G 蛋白的天然偶联。同时, 应用RTCA实时无标记检测技术, 可实时动态地记录实验期间的所有阻抗信息, 从而对所有GPCR 的反应进行检测, 通过单一检测即可对 GPCR 激活导致的第二信使途径进行测定, 从而有效降低试剂成本。

本研究中, 我们发现 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪是一种灵敏的、可靠的检测平台, 可用于内源性 GPCR 功能测定。研究中我们对涉及 24 个临床治疗相关受体家族的 43 个配体 (参见表 1) 进行了测定, 并生成了相关 GPCR 功能图谱。本实验涉及通用的肿瘤细胞系: HeLa、U2OS、SH-SY5Y 与 CHO-K1, 以及疾病相关的原代细胞: 人血管内皮细胞与混合肾上腺细胞。

目标家族	配体	HeLa	CHOK1	U2OS	SH-SY5Y	MREC	HUVEC
组织胺	组织胺						
乙酰胆碱	卡巴胆碱						
肾上腺素	异丙肾上腺素						
谷氨酸	L-谷氨酸						
谷氨酸	(S)-3,5-DHPG						
谷氨酸	(S)-MCPG						
谷氨酸	DCGIV						
谷氨酸	LAP4						
谷氨酸	LY342495						
多巴胺	多巴胺						
血清素	血清素						
血清素	8-OH-DPAT-HBr						
GABA	GABA						
前列腺素	PGE1						
前列腺素	PGE2						
前列腺素	Ilaprost						
胰高血糖素	胰高血糖素						
胰高血糖素	GLP-1						
胰高血糖素	Exodus-2						
CC 趋化因子	RANTES						
CC 趋化因子	MIP-3b						
CXC 趋化因子	AMD3 100						
CXC 趋化因子	SDF1a						
降钙素	降钙素						
前列腺素刺激素	a-MSH						
促凝肽	促凝肽						
胰凝乳	胰凝乳						
大麻素	花生四烯酸乙酰胺						
大麻素	ACEA						
内皮素	内皮素 1						
内皮素	[Ala1,3,11,15]-ET						
凝血酶原	LPA						
凝血酶原	S1P						
凝血酶原	SEW 2871						
催产素	催产素						
催乳素	催乳素						
生长素	生长素						
加压素	AVP						
嘌呤	ATP						
诺高雷酸	GW 9508						
诺高雷酸	月桂酸						
诺高雷酸	乙胺						
诺高雷酸	丁胺						

表 1.GPCRs 功能图谱概述

= 最大细胞指数值超出缓冲液对照的3倍标准差

= 最小细胞指数值低于缓冲液对照的3倍标准差

材料方法:

细胞系与培养条件

细胞系来自于 ATCC。按照 ATCC 的建议进行 HeLa (#CCL-2)、U2OS (#HTB-96)、SH-SY5Y (#CRL-2266)、CHO-K1 (#CCL-61)、人血管内皮细胞 (HUVEC; # PCS-100-010 批号 58570370) 与混合肾原代上皮细胞 (MREC; ATCC # PCS-400-012 lot # 58488854) 的培养, 肿瘤细胞系传代至 10 代以上, 原代细胞系传代至 4 代。

检测步骤

所有检测均在细胞培养箱 (5% CO₂, 37°C) 中进行。细胞接种密度为 1-2 x 10⁴ 细胞每孔, 接种于 96 孔 E-Plates 中, 并通过检测台进行实时检测, 直至细胞生长至接近满板。预先在另一普通 96 孔板中 2 μl/孔添加药物, 并储存于 -20°C。待细胞培养 18-24 小时后, 进行药物稀释。将药物溶解, 并添加 132 μl 检测缓冲液 (1 x HBSS, Sigma H8264, 20mM HEPES, Cellgro 25-060-Cl, 0.1% BSA, Fisher Scientific #BP1600) 对其进行稀释处理。从培养箱中移出 E-Plates 96, 使用检测缓冲液进行洗涤, 洗涤一次, 并使用 Biotek MicroFlo Select, 于每孔中添加 140 μl 检测缓冲液。将 E-Plates 96 放回至培养箱, 放置 15 min, 进行细胞平衡。然后使用 Beckman Multitek 96, 同时在各孔添加 10 μl 的药物缓冲液, 小分子药物实验最终浓度为 10 μM, 多肽为 1 μM。RTCA 细胞功能分析仪实时检测。

数据分析

使用 RTCA 软件分析数据, 首先对每孔的数据在药物添加前时间点进行标准化处理。对于各种药物, 在计算时需减去只含药物溶剂时对照细胞表现出的背景值。小分子药物相应溶剂为 DMSO, 多肽药物相应溶剂为 0.1% 的 BSA。将检测结果数据导出至 Microsoft Excel, 进行后续计算。确定每孔细胞的最大与最小细胞指数, 计算重复检测 (n=2) 的均值标准差与平均值。对于对照孔细胞来说, 对重复检测

8 个孔的均值标准差进行测定。将这些数值平均并乘以 3 以计算 “hit” 阈值。对于 Z 因子与 EC50 计算, 根据 RTCA MP 提供的动态反应曲线, 需要选择合适的时间点作为细胞系及药物综合反应的最佳时间点。

内源性GPCR检测稳定性评估

本实验检测了各种条件下 HeLa 细胞内源性 GPCRs 激活剂的反应性, 以钙离子载体 A23187 作为阳性对照。低浓度情况下, 由于 Gq- 偶联 GPCR 的激活, A23187 可模拟钙离子的活化过程, 该反应有助于细胞检测条件的探索。当细胞铺满检测板时, 用 GPCR 检测通用缓冲液更换掉生长培养基 (参见详细检测条件中的材料与方法), 分别检测几种不同细胞系对 A23187 与 1- 磷酸鞘氨醇 (SIP) 的反应, 并进行评估。SIP 是常见的 GPCR 表达家族、溶血磷脂或内皮分化基因 (EDG) 受体的内源性激活剂。用终浓度 1 μM 或与缓冲试剂 (0.1% BSA) 相同浓度的 SIP 与终浓度 100 nM 或其缓冲试剂 (DMSO) 相同浓度的 A23187 对 8 个重复孔培养的细胞进行处理。使用 RTCA 细胞功能分析仪, 对细胞反应进行实时监测, 每隔 1min 检测一次。每种细胞系中, 添加激活剂后的最初 30-40 min 期间细胞反应最大 (参见

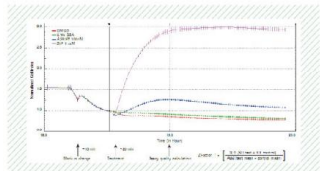


图 1.GPCR 检测可靠性评估。HeLa 细胞接种密度是 10000 细胞每孔, 接种于 E-Plates 96 上, 放置于 RTCA MP 细胞功能分析仪, 并在培养箱中过夜生长, 后去除生长培养基, 添加检测缓冲液, 持续监测 15 min 后, 添加 GPCRs 调节药物, 实时记录细胞反应情况, 持续检测 1.5h, 获得时间依赖性细胞反应曲线。8 复孔, 误差列代表均值标准差。药物添加后 30 min, 计算单一时间点 Z 因子值评估检测质量。DMSO 为 A23187 试剂对照; 0.1% BSA 用于 SIP 对照。SD = 标准差; ABS = 绝对值。

图 1。如图所示, 处理后约在 30 min 时, HeLa 细胞对 A23187 的反应最大, 对 SIP 的反应接近最大。此时, A23187 与 SIP 的 Z 因子分别是 0.83 与 0.90。在所检测的细胞类型中, 两种处理中至少一种 Z 因子值超出 0.5, 表明检测可靠性较高 (参见表 2)。相反, 两种配体混合的原代肾上皮细胞 (MREC) Z 因子接近 0.25, 表明检测可靠性不显著, 但后续 GPCR 筛查检测结果发现, 该细胞类型中其他 GPCRs 检测可靠性相对较高。

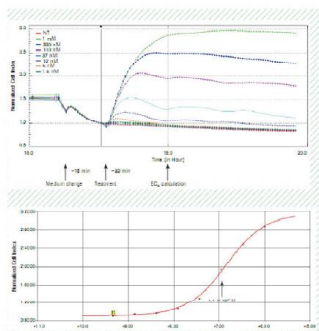


图 2.GPCR 检测灵敏度评估。如图 1 方法, 对 HeLa 细胞进行检测。每种药物以 8 个稀释浓度处理细胞。使用 RTCA 软件, 通过计算药物添加 30min 后每种药物的 EC50 值, 对检测灵敏度进行评估。

内源性GPCR检测灵敏度评估

用 A23187 与 SIP, 以及 8 点剂量反应曲线检测实验的灵敏度 (参见图 2)。通过 RTCA 软件计算产生 50% 最大反应 (EC₅₀ 值) 的激活剂浓度。每种细胞系的 EC₅₀ 值见表 2。结果表明, 除 CHO-K1 外, 所有细胞类型对 SIP 的处理均非常敏感, 产生的 EC₅₀ 值低限为 10⁻⁷ 至 10⁻⁹。

内源性GPCR功能特征图谱。

优化检测参数后, 利用 43 个临床治疗相关 GPCRs 小分子多肽调节剂, 对本研究中所用的细胞类型的功能反应进行检测 (参见表 1)。该组药物指向的 24 个受体家族, 包括 50 种潜在性反应受体, 代表所有主要的 GPCR 偶联类型 (Gs, Gi, Gq, G12/13)。四种肿瘤细胞系 HeLa, CHO-K1, U2OS 与 SH-SY5Y 对每种药物都会生成独特的时间依赖性细胞曲线 (time-dependent cellular response profile, TCRP)

细胞系	SIP	A23187	SIP	A23187
Z 因子	Z 因子	EC50	EC50	EC50
HeLa	0.90	0.82	1.4 x 10 ⁻¹¹	4.8 x 10 ⁻⁸
CHO-K1	0.56	0.75	1.0 x 10 ⁻¹⁴	6.2 x 10 ⁻¹⁴
U2OS	0.52	0.73	3.1 x 10 ⁻¹²	3.7 x 10 ⁻¹²
SH-SY5Y	0.16	0.65	9.8 x 10 ⁻¹³	2.5 x 10 ⁻¹²
MREC	0.25	0.25	1.1 x 10 ⁻¹¹	3.4 x 10 ⁻¹¹
HUVEC	0.35	0.51	1.2 x 10 ⁻¹¹	4.2 x 10 ⁻¹²

表 2. 检测开发与评价概述

(数据未显示)。我们对每孔最大与最小细胞指数值进行测定, 发现该指数值与时间点无关, 并以该数值均值与标准差作图 (参见图 3)。GPCR 功能特征图表明, 对能引发反应的配体而言, 细胞指数值的增加或降低具有显著差异。例如, HeLa 细胞显示的细胞指数正向改变程度较大, CHO-K1 细胞显示的细胞指数负向改变程度较大, 包括同样受体家族中的 GPCRs, 如 PGE₁、2 与 Iloprost 激活前列腺素受体 (参见图 3)。这些结果表明, 细胞背景差异可显著改变对同样刺激物的形态学反应, 这可能是由于 G 蛋白偶联受体的差异, 或下游信号传导途径的差异引起, 细胞指数的总体变化模式同样也可反映出不同 GPCR 配体的相对特异性。SDF1a, 即 CXCR4 内源性激活剂, 仅可于 HeLa 细胞中, 可诱导出强大的正向细胞指数反应, 而降钙素仅可诱导出 CHO-K1 细胞的强大的负向细胞指数反应。我们也对两种附加肿瘤细胞系: SH-SY5Y 神经母细胞

瘤与 U2OS 骨肉瘤细胞, 以及两种原代细胞类型: 人血管内皮细胞 (HUVEC) 与混合原代肾上皮细胞 (这里简称 MREC) 的 GPCR 配体进行了检测。

为测定细胞系的相应活性配体, 我们将 8 个对照孔的最大与最小细胞指数反应值与固有变异性进行比较。细胞指数值超出或低于对照孔细胞检测值的细胞

被视为呈活性反应。配体诱导活性反应见图 3 与 4。每种细胞相应内源性 GPCR 见表 1。本研究使用的内源性配体可激活同种受体家族的多个成员。例如, 血清素可激活所有内源性血清素受体, 包括几种亚家族。综上研究证实, RTCA 技术是一种可靠的 GPCR 家族功能检测方法。

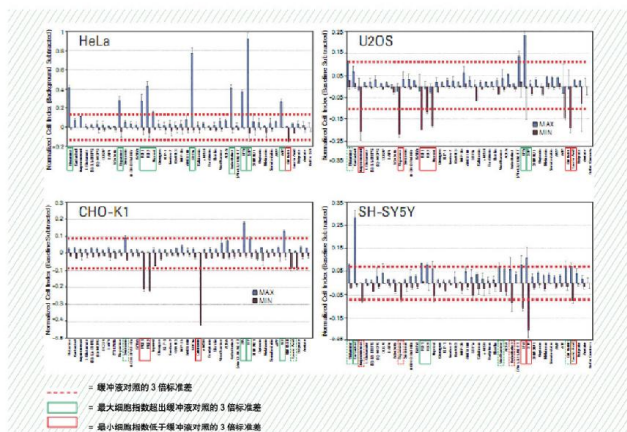


图 3. 肿瘤细胞系 GPCR 功能图谱。指定类型细胞的检测如图 1 所示, 对加入 43 个 GPCR 调节药物后的细胞反应进行评价。测定每孔最大与最小的细胞指数值 (参见材料与方法)。使用 RTCA 软件, 减去每时间点的缓冲液对照孔的平均基线细胞指数值, 对数据进行标准化处理 (参见详细文本说明), 因此对照孔细胞指数值为零。误差列代表监测时间窗内培养孔的标准差, 以反应孔的处理细胞的重复多个细胞指数值 (两个重复多个反应板, $n=2$) 均值作图。误差列代表重复多个细胞指数值的一个标准差。红色虚线代表对照孔的 3 倍标准差。明确导致细胞指数值增加 (绿色线) 或降低 (红色线) 的药物以实线框加强; 无显著统计学意义的数据 (低于 3 倍标准差 - 临界值) 以虚线框显示。

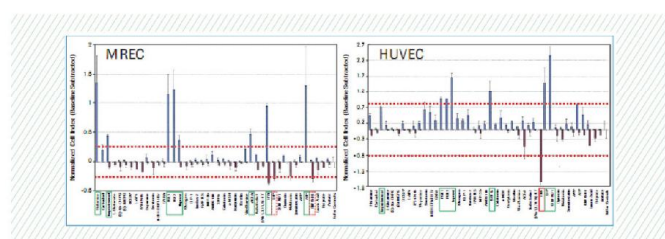


图 4. 原代细胞 GPCR 功能图谱。对指定细胞类型的原代细胞进行检测。

讨论

RTCA 实时无标记检测技术可加速药物开发进程, 并使基础研究成果更快的应用至临床中。我们的研究显示, 通过 RTCA 细胞功能分析仪可对肿瘤细胞系与原代细胞的 GPCRs 功能进行检测。目前研究显示, 在多种细胞系中, 利用 RTCA 技术检测的大多数受体 GPCR 家族可产生稳定反应。

参考文献

1. Kenakin TP. (2009) .Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 8:617-26.
2. Yu N, Atienza JM, Bernard J, Blanc S, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2006) .Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors. *Anal Chem.* 78:35-43.

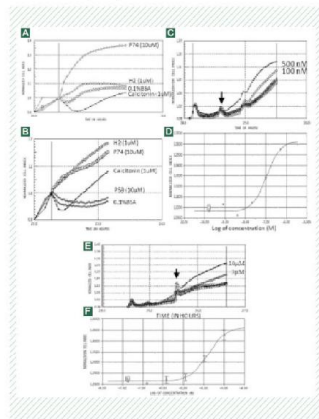
结论

1. RTCA 技术可广泛应用于内源性 GPCRs 功能检测。
2. 利用 RTCA 技术动态检测 GPCR 功能, 其灵敏性与稳定性更高。
3. RTCA 技术进行 GPCR 功能检测, 可同时适用于癌细胞系与原代培养细胞系。

客户应用实例（一）

文献

Ronen Shemesh et al., Activation of Relaxin-Related Receptors by Short, Linear Peptides Derived from a Collagen-Containing Precursor. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1160: 78–86 (2009).

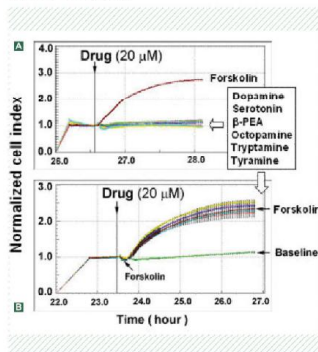


实例 1.RTCA 技术动态检测 P74 和松弛素 H2 激活 LGR 受体介导的细胞反应。(A)P74 和 H2 作用于 LGR7 - 转染的 CHO -K1 细胞反应图谱, P74 对细胞呈现较强的激活作用; (B) P74 和 H2 激活 LGR8 受体介导的 CHO -K1 细胞反应图谱, 二者均呈现较强的激活作用, 而 P59 对细胞没有作用; (C)H2 激活 LGR7 受体引起的剂量梯度依赖性细胞反应图谱; (D)根据图 C 数据绘制的剂量反应图谱; (E)P74 激活 LGR7 受体引起的剂量梯度依赖性细胞反应图谱; (F)根据图 E 数据绘制的剂量反应图谱; 黑色箭头代表加药时间点。

客户应用实例（二）

文献

Zhihua Xie et al., Cloning, Expression, and Functional Analysis of Rhesus Monkey Trace Amine-associated Receptor 6: Evidence for Lack of Monoaminergic Association. Journal of Neuroscience Research 86:3435–3446 (2008)



实例 2.RTCA 动态检测 TAAR6 受体表达细胞对化合物的反应图谱.TAAR6 稳转细胞接种于电极板上, 培养 12h, 然后加入 (20μM) 福斯克林及单胺类化合物处理; (A) 福斯克林激活 TAAR6 受体所引起的细胞效应明显高于其他单胺类化合物; (B) TAAR6 稳转细胞用单胺类化合物预先处理 10 min, 然后加入福斯克林(20 μM), 单胺类化合物没有影响福斯克林对 TAAR6 受体的激活作用。

基因沉默调控的细胞迁移 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。细胞迁移过程中, 细胞不断重复着向前方伸出突起, 然后牵拉胞体的循环过程。细胞骨架和其结合蛋白是这一过程的物质基础, 另外还有多种物质对其进行精密调节。细胞迁移不但在免疫监视和伤口愈合中起到作用, 而且是生物体生长的一个重要过程 [1]。细胞的定向迁移过程不但包括细胞极性机制、整合与转运以及胞内信号转导的相互协调合作, 而且还包括胞外信号的识别与结合 [2]。在癌症的发生发展过程中, 细胞迁移或浸润性生长的能力是导致疾病发生的重要因素之一。因此, 抑制细胞迁移成为抗炎治疗和抗癌治疗的一个关键靶点 [3]。基因沉默 (Gene Silencing) 现象广泛存在于生物界, 影响植物性状、动物胚胎发育、参与肿瘤的发生和演变。近年来通过基因沉默方法对肿瘤细胞迁移和浸润的研究备受关注, 如前列腺癌、乳腺癌的浸润、迁移 [4,5], 鼻咽癌的增殖及浸润 [6] 等。

目前迁移检测的常规方法是建立在终点与标记基础上的实验方法, 其中一种最常用的实验方法是 Boyden chamber 实验 (也被称为 trans-well 小室迁移检测实验)。Boyden chamber 实验中, 细胞接种于间隔上室中, 在化学趋化物质介导下, 细胞通过微孔滤膜浸润或迁移至间隔下室中。这种方法的缺陷在于: 必须使用化学染料对迁移的细胞 (通常是滤膜反面的细胞) 进行染色处理才能实现细胞计数, 或必须使用荧光分子对迁移细胞进行标记评估细胞的迁移能力。这两种方法耗费人力, 制约了实验通量; 同时也不能避免标记可能导致的细胞性状改变, 以及标记效率不同带来的实验差异。ACEA Biosciences 开发的 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪 (参见图 1) 是基于 Boyden Chamber 原理的细胞阻抗检测系统 (参见图 2)。RTCA DP 通过将微电子细胞传感器芯片整合到细胞浸润迁移板 (CIM-Plate 16) 的微孔膜下层, 实现实时、动态、定量的细胞迁移及

浸润动力学检测。RTCA 技术具有无需标记、实验步骤简单、结果客观和重复性好的特点, 同时还可根据实验需要, 对细胞增殖及细胞凋亡等进行同步检测。



图1. xCELLigence RTCA DP实时无标记细胞功能分析仪。
(A) xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪;
(B) 细胞浸润迁移板 (CIM-Plate16)。



图2. CIM-Plate16 检测细胞浸润、迁移原理示意图

在本研究中, 我们应用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪考察了细胞蛋白 X 对多种肿瘤细胞株迁移能力的影响, 并与目前常用的 Trans-well 细胞迁移检测方法进行了比较。研究数据表明, 蛋白 X 在各个肿瘤细胞株中都参与了迁移过程, 提示了蛋白 X 有可能成为肿瘤治疗的新靶点。这些结果为进一步在分子水平研究与细胞迁移相关的机制提供了实验依据。同时, 两种细胞迁移检测实验方法的比较结果表明, xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪可获得更直观、精确、完整的迁移动力学分析结果, 为细胞迁移的实验研究提供更多的信息。

材料方法

细胞

人前列腺癌细胞(PC3)、人膀胱癌细胞(T24)、人结肠癌细胞(HT29)、人乳腺癌细胞(MCF7)、多形性胶质母细胞瘤细胞系(TX3868)和人纤维肉瘤细胞(HT1080)培养于含 10%FBS、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中; 人肺癌细胞(H1299)培养于含 10% FBS、

1%青链霉素的RPMI1640培养基中。将细胞置于 37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下的培养箱中培养。

siRNA 干扰方法沉默基因表达

细胞分别接种于 12 孔细胞培养板 (细胞密度为 1.2×10^5 个 / 孔) 和 6 孔细胞培养板 (细胞密度为 2.4×10^5 个 / 孔) 并在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下的培养箱中培养。第 2 天待细胞达 80% 左右融合时, 以 HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) 为转染试剂, 分别转染特异沉默基因 X 的 siRNA 和 control siRNA (AllStars Negative Controls siRNA, Qiagen), 转染实验操作按照使用说明书进行。转染 24 小时后, 更换细胞培养板中的培养基并重复进行一次转染操作。

各细胞系的细胞迁移实验

我们分别利用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪和传统 Trans-well 两种方法对细胞的迁移情况进行检测和分析。对于 Trans-well 检测法, 各细胞系分别接种于 24 孔 insert 中, 并将 insert 置于含 10% FBS 的培养基中。分别在细胞迁移进行 24 小时、48 小时和 72 小时之后, 细胞依次用甲醇固定、碘化丙啶或 DAPI 进行染色并利用荧光显微镜拍照分析。作为对比, 我们应用一种新型的细胞迁移检测技术——xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪和 CIM-Plate16 检测板对细胞迁移过程进行实时动态监测。CIM-Plate 16 的上室接种以无血清培养基悬浮的细胞, 下室加入含 10% 血清的培养基作为诱导因子, 以下室加入无血清培养基作为阴性对照组。细胞迁移检测进行 18 小时。

结果和讨论

实验结果

在传统 Trans-well 方法中, 细胞分别在迁移进行 24 小时、48 小时和 72 小时后, 用甲醇固定并用碘化丙啶进行染色。预实验证实, HT1080 细胞和 H1299 细胞的最佳检测时间在 24 小时, 因此这两种细胞只进行了 24 小时的检测。实验结果显示, 通过对穿过 insert 膜底面的染色细胞的检测, HT1080、T24 和 TX3868 细胞在迁移进行 24 小时后就表现出极强的迁移能力; T24 和 TX3868 细胞在 48 小时和 72 小时后的染色细胞数目更多 (参见图 3, 细胞系 1-3); 而 PC3 细胞 24 小时后的染色细胞数量略低于以上三种细胞, 显示了中等迁移能力, PC3 细胞在 48 小时和 72 小时后染色细胞数量有所增加 (参见图 3, 细胞系 5); HT29 和 MCF7 细胞并没有表现出明显的细胞迁移能力 (参见图 3, 细胞系 6-7)。

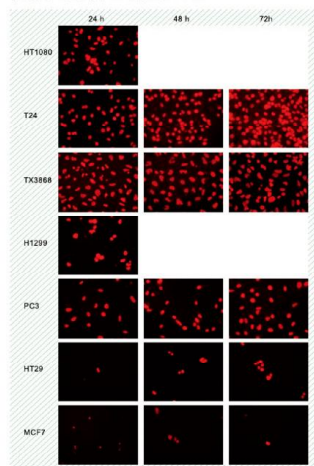


图3. 传统Trans-well检测各细胞系的细胞迁移能力

为了证实以上实验结果并获得更多的迁移动力学信息，我们利用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对以上细胞系进行细胞迁移实时动态监测。实验结果表明，TX3688、H1299 和 T24 细胞同样显示了最强的细胞迁移能力。此外，HT1080 细胞在最初的 6 小时内呈现出与 H1299 相似的迁移动力学特征，其后细胞迁移速度放缓；PC3 细胞显示了中等的迁移动力学特征；而 HT29 和 MCF7 细胞没有产生明显的细胞迁移（参见图 4）。

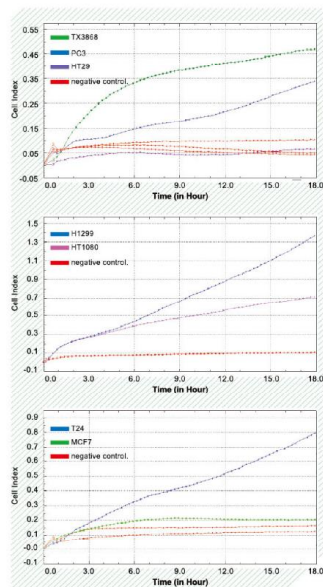


图4. xCELLigence RTCA DP实时无标记细胞功能分析仪检测各细胞系的细胞迁移能力

实时动态监测细胞迁移（实验需18小时）与终点法（实验需72小时）相比，前者可节省大量的实验时间。再者，RTCA技术方法可区分细胞迁移和之后的细胞增殖作用，而终点分析法是无法区分这两个细胞过程的，因此，细胞迁移的实时监测为我们提供了一个更为清晰准确的迁移动力学分析。

为了建立更优化的实验条件，我们根据上述两种检测方法的实验结果，选择了具有较强迁移能力的 T24 细胞系，以此来检验特异性肿瘤相关蛋白 X 在细胞迁移过程中的作用。我们利用转染特异 siRNA 的方法沉默 X 基因，之后再次用传统 Trans-well 检测和 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪检测细胞的迁移情况。在传统 Trans-well 实验中，细胞的 DAPI 染色结果表明：基因 X 被沉默后，T24 细胞的迁移能力明显下降（参见图 5A）。而通过 RTCA DP 和 RTCA 1.2 软件计算得到 T24、TX3688 和 HT1080 细胞的迁移斜率（参见图 5B），我们发现对于参与检测的所有细胞（T24、TX3688 和 HT1080），利用转染 siRNA 而使基因 X 沉默后，细胞的迁移能力都呈现出明显的下降趋势；并且这种作用在 HT1080 和 TX3688 细胞中更为明显，其原因是转染过程本身对 T24 的细胞迁移能力产生了比较明显的影响（转染 control siRNA 组的细胞迁移能力也有所下降）。综上所述，两种细胞迁移检测方法对基因 X 沉默后的细胞迁移能力的检测，获得了比较一致的结果。这就说明蛋白 X 在肿瘤细胞迁移过程中起着重要的作用，它可明显抑制肿瘤细胞的迁移能力。而且，通过 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞迁移进行实时动态监测，我们还能观察转染过程是否对细胞迁移产生影响，以及影响作用的大小。

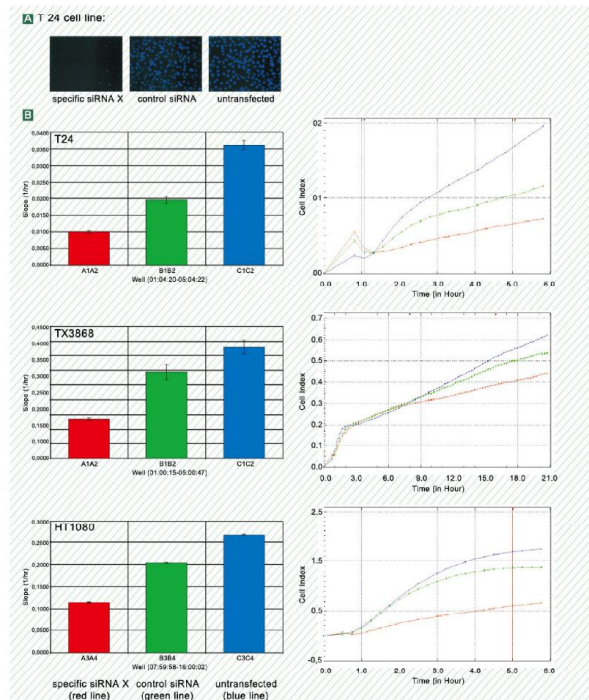


图 5 (A) Transwell 法检测基因 X 沉默后 T24 细胞的细胞迁移情况。
(B) xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪动态监测细胞迁移的动力学图谱（右图）及应用 RTCA 1.2 软件计算的迁移斜率（左图）。

结论

本应用中的数据表明，xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞迁移进行实时动态监测的方法，与终点法相比具有显著的优势。这项利用 RTCA DP 及 CIM-Plate16 的新技术具有快速准确获得实验数据及减少大量劳动的特点。系统在不进行外源性标记情况下，可实时对细胞侵袭与迁移进行定量测定。同时 RTCA 技术可进行侵袭与迁移时间点确定，有助于通过缩短实验时间而增加实验通量、最小化终点实验数量以及确定抑制剂研究的最佳时间点。而且，xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪可减少手动细胞操作步骤，从而使检测结果更加接近生理状态。此外，xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪可同时进行细胞迁移和细胞增殖检测，从而证实细胞迁移能力的下降不是由于细胞活性降低而导致的。因此，基于微电阻传感技术的 RTCA 检测具有无需标记、实时、动态、定量及自动化等诸多优势，可作为体外检测细胞迁移和浸润的优选系统。

参考文献

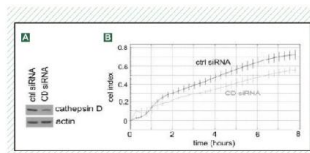
1. Weijer C.J. (2009). Collective cell migration in development. *J Cell Sci.*, 122: 3215-3223.
2. Petrie R.J., Doyle A.D., Yamada K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 538-549.
3. Mackay C.R. (2008). Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.*, 9: 988-998
4. Zetter B.R., Banyard J. The silence of the genes. *Nature*, 2002, 419(6907): 572-573.
5. Kleer C.G., Cao Q., Varambally S., et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *PNAS*, 2003, 100(20): 11606-11611.
6. LIANG B.J., LI X.P., LU J., LIN S.X., LIU X., LI G., ZHANG B., WANG L., LUO H.N., WAN R.Q., TIAN W.D. Effects of enhancer of zeste homolog (EZH2) downregulation on the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell and the possible mechanisms. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2012 Apr;47(4):298-304.

客户应用实例（一）

文献

Knopfová L., et al. c-Myb regulates matrix metalloproteinases 1/9, and cathepsin D: implications for matrix-dependent breast cancer cell invasion and metastasis. *Mol Cancer*. 2012 Mar 23; 11:15.

Control siRNA 和特异沉默 Cathepsin D (CD) 基因的 siRNA 分别转染入 MDA-MB-231MYBup 细胞(即过表达 MYB 蛋白的人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, 该文献已证实 MYB 的过表达导致 Cathepsin D 蛋白表达升高)。Western blot 分别检测两种转染后细胞的 Cathepsin D 蛋白表达情况，转染了特异沉默 CD 基因的 siRNA 细胞中 Cathepsin D 蛋白表达明显降低(参见实例 1A)。CIM-Plate 16 上室分别接种两种转染后细胞(无血清培养基)，下室加入含 10% 血清的培养基，利用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞迁移进行实时动态监测。实验结果表明：转染了 CD siRNA 的细胞与对照组相比细胞迁移能力明显下降(参见实例 1B)。Cathepsin D 蛋白表达降低导致了 MDA-MB-231MYBup 细胞迁移能力的下降。



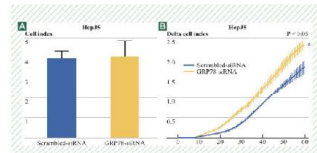
实例 1. 应用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪实时监测 Cathepsin D 基因沉默后对 MDA-MB-231MYBup 细胞迁移能力的影响。

客户应用实例（二）

文献

Wei P.L., et al. Silencing of glucose-regulated protein 78(GRP 78) enhances cell migration through the upregulation of Vimentin in hepatocellular carcinoma cells. *Ann Surg Oncol*. 2011 Sep 27.

Scrambled control siRNA 和 GRP78 siRNA 转染入 HepJ5 细胞(可过表达 GRP78 的肝癌细胞株)，western blot 证实转染 GRP78 siRNA 的细胞株中 GRP78 蛋白表达受到抑制，xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对两种细胞分别进行细胞增殖和细胞迁移检测。细胞增殖实验：应用 RTCA DP 及 E-Plate16 检测板，两种细胞以 10,000 个 / 孔接种于 E-Plate 检测板中，进行细胞增殖的实时动态检测(参见实例 2A)。细胞迁移实验：应用 RTCA DP 及 CIM-Plate16 检测板，CIM-Plate16 检测板的上室接种细胞(20,000 个 / 孔)，下室加入含 10% 血清的培养基，RTCA 1.2 软件分析的实验数据(参见实例 2B)。实验结果表明：GRP78 基因的沉默并没有影响 HepJ5 细胞的增殖能力，但却导致了细胞迁移能力的提高。



实例 2. 应用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪实时监测 GRP78 基因沉默后对肝癌细胞(HepJ5)的细胞增殖及迁移能力的影响。

基因功能评价 RTCA实时动态检测



基因功能评价

前言

人类大约有 3~4 万个基因，为了充分利用人类基因组的研究成果，并使这一成果在药物的研发过程中发挥其重要作用，可以使用 RNA 干扰 (RNAi, RNA interference) 方法，通过下调细胞内源性靶基因的 RNA 水平来研究基因的功能。由于可以方便快捷地临时关闭特定基因的表达，研究由于目标基因关闭而导致的变化，进而推测该基因的功能，RNAi 技术已经迅速成为研究基因功能的有力工具。目前 RNAi 面临的一个挑战是选择合适的方法区分是靶基因沉默的作用还是简单的外源转染引起的细胞响应，这两个方面取决于靶基因的序列、外源 RNA 浓度、细胞类型等。目前传统的终点检测法只能提供某一特定时间点的结果，不能全面地反映细胞的变化，也很难区分是 RNAi 沉默的直接结果，还是本身外源转染基因引起的细胞毒。因此，需要建立一种全面反映细胞生长、增殖和死亡的细胞生物学研究方法应用于 RNAi 介导的基因功能研究 [1]。

本文采用 RTCA 细胞功能分析仪实时动态地研究 RNAi 调节的基因功能。RTCA 细胞功能分析仪通过微电极检测电阻抗变化，实现了无需标记、实时、动态地检测细胞表型的变化。实验中细胞接种在孔底有微金电极的 E-Plates 96 中，细胞在微电极上贴壁生长，阻抗值的变化可以直接反映细胞状态、细胞数目、细胞活力、细胞形态和细胞粘附力的变化。实时动态的记录方式保证实验记录到全面的时间依赖的细胞特征性反应图谱 (TCRPs, time-dependent cell response profiles)。时间依赖的细胞特征性反应图谱可预测性地提供体外细胞反应机理以及细胞通路作用，为体外细胞研究提供更加全面的信息 [2]。并且，动态全面的信息可以区分是 RNAi 沉默的作用还是单纯转染引起的细胞毒作用。使用 RTCA 技术的检测结果表明，RTCA 细胞功能分析仪可以提供一种灵敏度高、重复性强、并且定量的 RNAi 介导的基因功能研究方法。

材料和方法

细胞

HeLa 和 A549 细胞购自于 ATCC，培养于含 10% FBS、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基、37°C、5% CO₂ 的培养箱中。

Cell Index 计算

应用 RTCA 细胞功能分析仪自带的软件，可对实验全过程，即从细胞贴壁、伸展、增殖到细胞死亡进行全面记录和显示。RTCA 细胞功能分析仪使用细胞指数 (Cell Index) 表示细胞阻抗值。每点的 CI 值定义为 $(R_n - R_b) / 15$ ，其中 R_n 表示孔接种有细胞时的电极阻抗值， R_b 是表示孔中只有培养基时的背景阻抗值。

siRNA 转染、药物处理和细胞增殖

文中除了特别注明处，沉默 KIF11 的 siRNA、Control siRNA (Ambion) 和 Mad2 siRNA (Dharmacon) 均为 10nM。1:3 稀释。转染使用脂质体，过程按照 RNAiMax (Invitrogen) 的使用说明书进行。siRNA 和脂质体混匀在 20 μ l Opti-MEM 中，并置于 96-well E-Plate 中孵育 10min，2500~5000 个细胞 / 孔加入含有 siRNA-lipid 混合液的孔中。使用化合物 paclitaxel、monastrol 和 staurosporine 进行处理时，3000 个 / 孔细胞培养 24h 后，将化合物按照指定比例稀释加入。

基因表达

本实验使用浓度为 10nM 沉默 KIF11 的 siRNA 以及对照 siRNA 转染入 HeLa 细胞。6 孔板 每孔 1.5 x 10⁵ 个细胞 / 孔；E-Plate 96 中 5000 个细胞 / 孔。实验中总 RNA 的量是在转染 24~26h 后，使用 RNA 提取试剂盒 (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) 提取。基因特异性的引物或者探针由 Universal ProbeLibrary Assay Design Center 设计，并分别购自于 IDTDNA 和 Roche。qRT-PCR 使用 LightCycler[®] 480 实时 PCR 系统。

有丝分裂指数计算

免疫荧光实验过程为：细胞接种在 16 孔室的玻璃片上 (Labtec)；100% 冰乙醇固定；PBS 洗涤后；含 0.25% Triton X-100 的 PBS 穿孔；含 1% BSA and 0.1% TX-100 的 PBS 封闭；PBS 洗后用抗 p-H3 的抗体，抗微管 FITC 抗体孵育并用 DAPI 染色。实验中所用显微镜为 Nikon E400。有丝分裂指数是通过计算 DAPI 染色的细胞中含有 p-H3 的细胞个数计算的。

RTCA细胞功能分析仪

RTCA 实时细胞功能分析仪按照其通量的不同可分为：RTCA SP、MP 和 DP。其中 RTCA SP 主要包括 4 个部分：(1) 细胞检测板 E-Plate 96；(2) 用于放置 E-Plate 96，置于细胞培养箱中的 RTCA SP 检测台；(3) 发送和接收数据的 RTCA SP 分析仪；(4) 操纵软件和实时获取数据的控制元件。而 RTCA MP 的通量较高，可以同时容纳 6 个 E-Plates 96 (总通量为 576 孔)，能满足 6 个不同的实验者同时进行相互独立的实验。



图 1. RTCA 实时细胞功能分析仪包括 3 种不同的类型。(A) RTCA SP: 电脑和分析仪 (左)、检测台 (中)、E-Plate 96 (右)。(B) RTCA MP: 电脑和分析仪 (左)、检测台 (中)、E-Plate 96 (右)。(C) RTCA DP: 可使用两种不同的检测板, 同时进行细胞增殖和细胞迁移浸润检测: 电脑 (左)、分析仪 (中)、E-Plate 16 (右上) 和 CIM-Plate 16 检测板 (右下)。

RTCA DP 是低通量检测的较好选择, 它能同时容纳 3 块 16-well E-Plate (总通量为 48 孔)。而且 RTCA DP 可以兼容细胞迁移检测板 CIM-Plate 16。完成细胞迁移和浸润实验, CIM-Plate 16 采用巧妙的上下室设计, 上室和下室之间有一层多孔的 PET (porous polyethylene terephthalate) 膜, 并在膜的下层整合有微金电极, 用于实时、动态地检测细胞迁移和浸润的过程。

结果和讨论

RTCA细胞功能分析仪实时检测siRNA介导的细胞表型变化

为了阐明 RTCA 细胞功能分析仪在 RNAi 研究基因功能中的作用, 本文针对 RNAi 介导的有丝分裂调节机制进行了研究。有丝分裂阻滞可引起细胞形态学上明显的变化 [2,3], 该变化在 RTCA 细胞功能分析仪上可获得非常典型的有丝分裂阻滞细胞特征性反应图谱。KIF11 是肌动蛋白家族的成员之一, 编码有丝分裂过程形成两极纺锤体的启动蛋白 Eg5。研究表明, Eg5 的持续高表达扰乱了纺锤体的正常组装和与其功能相关的力量平衡, 最终导致纺锤体的缺失、基因组的不稳定以及肿瘤的发生。目前认为, Eg5 主要与细胞有丝分裂过程中染色体的定位、中心体的分离以及双极纺锤体的形成和分离有关。因此, KIF11 是研究 siRNA 或者小分子抑制有丝分裂或者引起细胞凋亡过程中的重要基因 [4,5]。沉默 KIF11 的 siRNA 和 Control siRNA 分别转入培养在 E-Plates 96 的 HeLa 细胞中, 每 30min 记录一次细胞指数 (图 2A)。与对照组相比, 沉默 KIF11 的细胞生长被明显抑制, 出现有丝分裂阻滞细胞特征性反应图谱, 细胞指数的差异开始于转染后的 12h, 且在转染后 24h 后达到最大值。有趣的是, siRNA 的作用是可逆的, 转染后 48h 细胞指数逐渐恢复与对照组相同。转染后 24h 分析 p-H3 的表达证实, 细胞的有丝分裂确实被抑制 (图 2B)。

Monastrol 是 Eg5 蛋白的一种小分子抑制剂, 该药物能特异性地结合 Eg5 蛋白并抑制其功能, 诱导增殖中的肿瘤细胞停滞在有丝分裂期, 并促使细胞凋亡。用 Monastrol 处理后的细胞与沉默 KIF11 有着类似的有丝分裂阻滞细胞特征性反应图谱 (图 2C)。同样的, 在实验组和对照组的细胞指数差异最大时, 用 p-H3 染色,

可确证此时细胞的有丝分裂被抑制 (图 2D)。因此, 无论是基因沉默还是化合物作用下的细胞有丝分裂阻滞, 使用 RTCA 细胞功能分析仪检测都可获得有丝分裂阻滞细胞特征性反应图谱, 表明 RTCA 技术是一种非常有效的研究 RNAi 介导的细胞有丝分裂调节的方法。

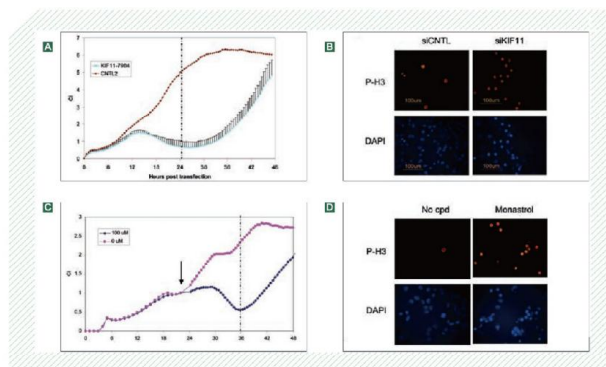


图 2. 沉默 KIF11 的 siRNA 和小分子抑制剂 monastrol 作用下的有丝分裂阻滞细胞特征性反应图谱。siRNA 的结果见 (A); monastrol 作用的结果见 (C)。时间依赖的细胞特征性反应图谱由 RTCA 细胞功能分析仪获得; 平行免疫荧光实验在 16 孔室的玻璃片上获得 (B 和 D)。p-H3 抗体 (有丝分裂阻滞指示物) 染色指示有丝分裂被阻滞的细胞, DAPI 染细胞 DNA。虚线 (A 和 C) 指示免疫荧光进行的时间; (C) 图的箭头指示为 monastrol 加入的时间。

RNAi介导的基因功能定量评估

为了更好地衡量靶基因的表达式、细胞指数的变化和有丝分裂阻滞作用之间的关系，沉默 KIF11 的 siRNA (KIF11-7904) 10 nM 开始，1: 3 稀释转染 HeLa 细胞，在 E-Plates 96 中测量细胞指数的变化。16 孔室玻璃片用以免疫荧光实验检测细胞有丝分裂指数，细胞转染 24h 后，从 E-Plates 96 中收集细胞，检测 KIF11 的 mRNA 水平或者固定后用 p-H3 抗体染色检

测有丝分裂阻滞的分裂指数。各个浓度的 siRNA 引起的细胞特征性反应图谱相似，结果显示 KIF11 沉默后细胞呈现典型的抗有丝分裂细胞特征性反应图谱且呈 siRNA 浓度依赖性，siRNA 的用量越高，细胞指数曲线的抑制作用越强 (图 3A 和 3C)，靶基因下调水平越高 (图 3B)，有丝分裂指数越高 (图 3D)。

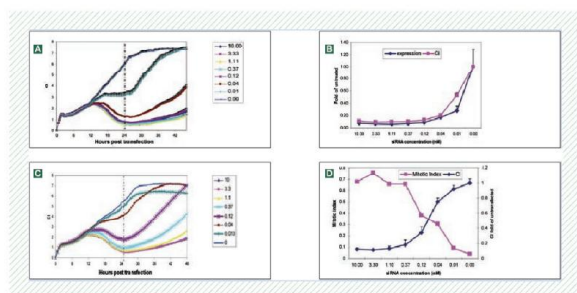


图 3. siRNA 浓度依赖基因沉默细胞特征性反应图谱和 qRT-PCR 结果。沉默 KIF11 的 siRNA (A 和 C) 均从 10nM 开始，1: 3 稀释转入 HeLa 细胞。时间依赖的细胞特征性反应图谱由 RTCA 细胞功能分析仪获得，qRT-PCR 和免疫荧光染色是平行实验的细胞在转染后 24h 收集的进行的。

RTCA 检测技术获取细胞有丝分裂阻滞特征性曲线

RTCA 细胞功能分析仪获取的有丝分裂特征性图谱是否反应了有丝分裂阻滞过程？我们在实验中结合 Mad2 靶向 siRNA 及有丝分裂阻滞化合物的作用，验证有丝分裂特征性图谱的特异性。Mad2 是在细胞有丝分裂过程中起关键作用的调控基因，Mad2 介导的信号机制调控的有丝分裂过程包括：纺锤体微管从两极出发分别和姐妹染色单体动粒相连，牵引两套姐妹染色单体分别进入子代细胞。因此，沉默 Mad2 直接抑制细胞的有丝分裂。实验中采用的三种小分子化合物分别是 Paclitaxel、Monastrol 和 Staurosporine。

Paclitaxel 是一种抗有丝分裂的化合物，主要在微管蛋白聚合和维持微管稳定中发挥作用，Monastrol 也是一种抗有丝分裂的化合物，主要作用在 Eg5 肌动蛋白马达上；而 Staurosporine 是一种常用的激酶抑制剂。我们在 HeLa 细胞转染对照组和沉默 Mad2 的 siRNA 24h 后，分别加入 paclitaxel (图 4A 和 4B)；monastrol (图 4C 和 4D) 和 staurosporine (图 4E 和 4F)，检测细胞指数直至加药后 48h。结果显示，转染细胞在加入抗有丝分裂药物之后，呈现典型的有丝

分裂抑制特征性图谱 (图 4A 和 4C)。而转染沉默 Mad2 的 siRNA 组则由于细胞的有丝分裂被抑制，细胞不再具有抗有丝分裂药物敏感性，因此细胞曲线也不再出现有丝分裂特征曲线 (图 4B 和 4D)。相反，对于非抗有丝分裂小分子 staurosporine，转染对照组和

沉默 Mad2 的 siRNA 组两者的曲线无明显差异 (图 4E 和 4F)。这表明对于研究细胞的有丝分裂过程，RTCA 技术结合 RNAi、小分子作用，可以实时检测细胞的有丝分裂抑制过程，呈现细胞有丝分裂阻滞特征性曲线。

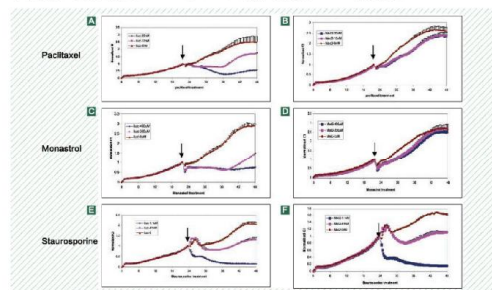


图 4. RTCA 细胞功能分析仪检测细胞有丝分裂阻滞细胞特征性反应图谱。HeLa 细胞转染对照组和沉默 Mad2 的 siRNA 后种植在 E-plates 96 中 22h 后，细胞用 paclitaxel (A 和 B)；monastrol (C 和 D) 和 staurosporine (E 和 F) 分别处理。动态的 CI 曲线由 RTCA 细胞功能分析仪获得，箭头所示为药物作用的时间点。

有丝分裂阻滞特征性图谱具有细胞广谱性

我们通过使用多个细胞株，验证了化合物及 RNAi 介导的抗有丝分裂过程在 RTCA 细胞功能分析仪上呈现的特征性曲线具有细胞广谱性。在非小细胞肺癌细胞系 A549 (图 5A 和 5B)、胰腺癌细胞系 PC3 或乳

腺癌细胞系 MCF7 (数据未显示) 中转染 KIF11 siRNA，或者加入 monastrol 后的细胞指数曲线都呈现相似的特征性抗有丝分裂作用曲线。

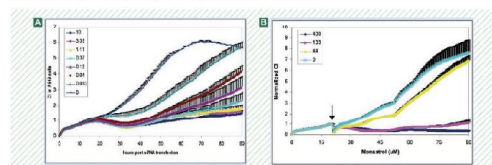


图 5. RTCA 细胞功能分析仪检测 RNAi 介导或 monastrol 处理下的 A549 细胞响应曲线。A549 细胞转染不同浓度沉默 KIF11 的 siRNA (A) 或者用不同浓度的 monastrol 处理 (B)。时间依赖的细胞特征性反应图谱由 RTCA 细胞功能分析仪获得，箭头所示为药物作用的时间点。

结论

RTCA细胞功能分析仪在研究功能性基因组中有着传统的实验方法无法取代的优势：（1）实时连续地检测细胞变化，甚至是一些细微的细胞变化，由此指示mRNA和蛋白水平变化的最佳检测时间点；（2）时间依赖的细胞特征性反应图谱为合适的细胞接种密度提供依据；（3）实验过程简单，大大减小了人为判断因素；（4）时间依赖的细胞特征性反应图谱可以预测靶基因调控的机制，为鉴定特定的通路提供机会。结合本文的实验数据，对采用RTCA细胞功能分析仪进行有关siRNA的实验我们希望给出以下建议：（1）选择转染后的发生较明显表型变化的细胞；（2）选择合适的细胞密度，因为表型的改变会因细胞密度的不同而不同，较低的细胞密度会对siRNA更敏感；（3）5~50nM的siRNA浓度转染细胞可以产生较大的细胞反应；（4）对于明显的CI变化，建议在其他细胞株中进一步验证；（5）为了更好的理解时间依赖的细胞特征性反应图谱，同时结合qRT-PCR和western blotting等方法。

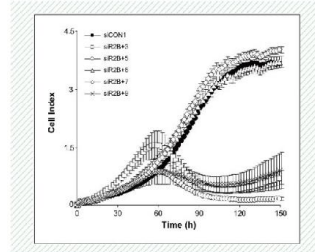
参考文献

1. Bantounas, I., Phylactou, L. A., Uney, J. B., RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* 2004, 33, 545-557.
2. Abassi, Y. A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., et al., Kinetic Cell-based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects *Chemistry and Biology* 2009, In Press.
3. Kops, G. J., Weaver, B. A., Cleveland, D. W., On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005, 5, 773-785.
4. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., Mitchison, T. J., Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol* 2000, 150, 975-988.
5. Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., et al., Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 1999, 286, 971-974.

客户应用实例（一）

文献

Heidel JD., et al. Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1; 13: 2207-15.

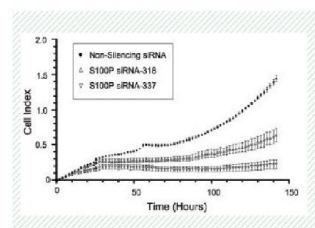


实例 1. RTCA 细胞功能分析仪实时动态检测 HT-29 细胞转染 5 种 siRNA (20nM) 后的生长情况。细胞转染 siR2B+3、siR2B+5、siR2B+6、siR2B+7、siR2B+9 和 siCON1 4 h 后种植在 E-plate 上，每 1h 检测一次细胞指数变化，可见与对照相比，siR2B+3、siR2B+5 和 siR2B+9 能够下调核糖核苷酸还原酶 M2 (RRM2) 的表达，抑制细胞增殖，而 siR2B+6 和 siR2B+7 对 RRM2 的作用不明显。数据以平均值 ± 标准差表示 (n=3)。结果在 Neuro2A, CMMT, HepG2, BW.KOSAP 和 Mca-RH7777 细胞株中也一致（数据未显示）。

客户应用实例（二）

文献

Basu GD., et al. Functional evidence implicating S100P in prostate cancer progression. *Int J Cancer.* 2008 Jul 15;123:330-9.



实例 2. RTCA 细胞功能分析仪实时检测 S100P 沉默介导的 22Rv1 细胞的增殖抑制。16000 个 / 孔转染后的 22Rv1 细胞种植在 E-plate 96 上，每小时一次，实时动态检测 siRNA 对细胞增殖的影响至 120h，可见沉默 S100P 会抑制 22Rv1 细胞增殖。

病毒Cytopathic Effect 效应 RTCA实时动态检测



病毒Cytopathic Effect

前言

病毒引起的细胞病变作用 Cytopathic Effect (CPE) 是评价病毒的感染力及致病效应的通用方法。细胞杀伤性病毒接种到正常培养的细胞中, 经过一定时间后, 在显微镜下就可以观察到细胞的变化, 包括细胞变圆、坏死、从瓶壁脱落等现象, 即细胞病变作用。目前研究病毒的最常用方法是空斑实验 [1]。在这个实验中, 使用对拟研究病毒敏感的细胞株, 对病毒感染的细胞染色 (如结晶紫) 后呈现肉眼可见的空斑, 并进行数量及大小的测定, 用以评价病毒的感染能力。空斑实验的结果是来自终点法检测, 因此无法获取病毒复制及其引起的细胞病变的完整信息。另外, 某些病毒如减毒突变株可能会在细胞内成功复制, 但由于其作用微弱, 在单层细胞上产生的空斑难以识别, 因此空斑实验无法研究此类病毒诱导的细胞 CPE 效应。空斑实验的另一缺陷是实验过程中人工操作步骤过多, 增加了操作人员感染病毒的风险。

艾森生物开发的实时无标记细胞功能分析仪 (RTCA, Real Time Cellular Analysis) 利用微电极生物传感器对细胞进行实时无标记动态监控, 检测过程对细胞没有任何损伤[2]。该系统基于阻抗的检测原理, 将微电极传感器整合于E-Plate细胞培养板底部, 接种后的细胞将贴附于检测板底部, 并进行黏附、生长及增殖, 细胞这些状态的变化引起电阻抗的变化都能被RTCA实时无标记细胞功能分析仪的微电极传感器识别。细胞杀伤性病毒接种到正常培养的细胞中, 病毒作用细胞后会在宿主细胞内大量增殖并导致细胞出现变圆、脱落、聚集甚至死亡等现象, 细胞这些状况的改变都能很清晰地被RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态地记录下来。

RTCA实时无标记细胞功能分析仪可用于检测细胞增殖、细胞黏附及细胞活性等。因此, RTCA实时无标记细胞功能分析仪的应用领域非常广泛, 涉及新药研发、毒理学、肿瘤学、医学微生物学及病毒学等。同时该方法还可应用于细胞增殖及毒性检测[2]、

细胞黏附和伸展[3]、细胞质控[4]、酪氨酸激酶受体反应[5]、肥大细胞活化[6]及G蛋白偶联受体 (GPCR) 激活[7]等实验中。

此应用案例讲述了通过RTCA实时无标记细胞功能分析仪研究病毒介导的CPE效应的实验方法。此方法克服了传统终点法的限制, 无需标记, 步骤简单, 且实时记录病毒CPE效应, 成为研究病毒CPE效应的一种简便有效的方法。

材料方法:

细胞

本实验中用到的敲除 I 型干扰素基因的非洲绿猴肾衍生细胞系 (Vero E6) 购自ATCC, 人胚胎肾细胞 (HEK 293) 购自Microbix Biosystems。实验中所用的细胞均用含有10%的小牛血清, 2mM的谷氨酸及1%青霉素/链霉素的DMEM培养基培养于5%的CO₂, 37°C培养箱中。

病毒

印第安纳血清型麻疹性口炎病毒 (VSV) 滴加入 Vero E6 及HEK 293细胞培养于5%的CO₂, 37°C培养箱中。

细胞增殖检测

本实验使用RTCA实时无标记细胞功能分析仪对细胞进行实时检测。首先在E-Plate板中加入50μl培养基测量基线CI值, 再加入100μl细胞悬液, 分别为50,000, 25,000, 12,500, 6,250, 3,125, 1,562, 781个/孔, 细胞室温放置30min后放入RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态检测细胞黏附伸展及增殖状况。

病毒CPE效应分析

细胞以 25,000 及 12,500 个 / 孔的密度接种于 E-Plate 板中。Vero E6 细胞接种 20.5h 后, 加入 10μl 培养基稀释的 VSV 病毒, 使病毒终浓度为 800,000 PFU(高 MOI)及 80,000 PFU(低 MOI), 对照组则加入 10μl 培养基。HEK 293 细胞则在 68.5h 后加入病毒处

理。加入病毒后将E-Plate放回RTCA实时无标记细胞功能分析仪，每隔15min检测一次CI值变化，总共190h。

结果与讨论

动态细胞增殖检测

本实验使用 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测细胞增殖过程，并由此确定添加病毒的最佳时间点，从结果中可以发现 Vero E6 细胞的最佳感染时期为细胞接种后 20.5h，HEK 293 则在细胞接种后 68.5h (图 1A,B)，在这个时间点接种密度为 50,000 个 / 孔的细胞处于对数生长期。选择这两个时间点可分别观察病毒对增殖平台期和对数生长期细胞的不同影响。

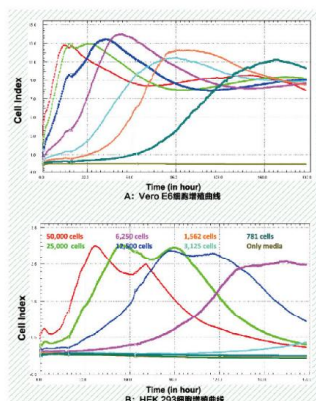


图 1. 动力学监测细胞增殖情况。细胞接种于 E-Plate96 孔板后置于 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪实时动态监测细胞增殖情况，并确定加入病毒的时间（细胞生长对数期或平台期）。RTCA 实时无标记细胞功能分析仪每 30min 检测一次 (A) Vero E6 细胞及 (B) HEK 293 细胞黏附伸展及增殖状况，不同颜色的曲线代表不同的细胞接种密度。

VSV对Vero E6细胞的CPE效应

通过 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪实时动态检测细胞状况，发现 Vero E6 细胞无论在增殖平台期还是在对数生长期用高低两个滴度的病毒处理细胞都能产生 CPE 效应。当 Vero E6 在对数生长期感染病毒，病毒的 CPE 效应与病毒接种的滴度呈明显的相关性 (图 2)。VSV 病毒以较低的滴度 (80,000 PFU) 感染细胞，在感染前期的 15h Vero E6 细胞的生长状况 (图 2A，蓝色曲线) 与对照组类似 (图 2A，绿色曲线)，但之后 VSV 病毒开始复制并诱导了细胞的死亡，表现为 CI 值下降，24h 后 CI 值下降到 50% (CI₅₀)，并持续下降，最后降为 0，细胞全部死亡。若 VSV 病毒以较高的滴度 (800,000 PFU) 感染细胞，CI 值在感染后 4h 就有所下降，在感染后 11h 下降到 CI₅₀。

VSV 病毒在 Vero E6 细胞生长平台期感染与细胞生长对数期感染的结果类似 (图 2 B)：VSV 病毒以

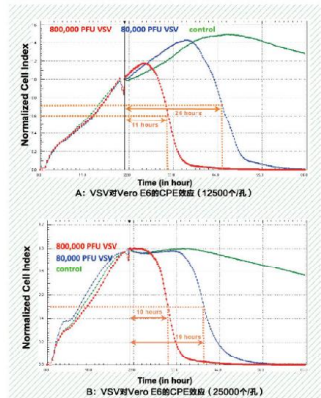


图 2. 实时监控 VSV 病毒感染后 Vero E6 细胞的生长状况。(A) 对数生长期细胞标准化 CI 值；(B) 平台期细胞标准化 CI 值。RTCA 实时无标记细胞功能分析仪每 15min 检测一次 VSV 病毒对 Vero E6 细胞黏附伸展及增殖的影响。

较高的滴度 (800,000 PFU) 感染细胞，10h 后 CI 值下降到 CI₅₀ (图 2B，红色曲线)，VSV 病毒以低滴度 (80,000 PFU) 感染细胞，19h 后 CI 值下降到 CI₅₀ (图 2B，蓝色曲线)，最后 CI 值也下降为 0，细胞尽数死亡。

VSV对HEK 293的CPE效应

根据 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测到的细胞增殖曲线，选择 HEK 293 细胞接种后 68.5 h 加入病毒 (图 3A,B)。感染 VSV 病毒后 HEK 293 细胞与 Vero E6 细胞的反应不一致。HEK 293 在细胞对数生长期对病毒的作用非常敏感：高滴度的 VSV 病毒作用细胞后细胞 CI 值下降到 CI₅₀ 只要 6h，(图 3A，红色曲线)；低滴度病毒组细胞 CI 值下降到 CI₅₀ 也只要 12h (图 3A，蓝色曲线)。然而，VSV 病毒在细胞生长的平台期感染细胞的结果却完全不同 (图 3B)。

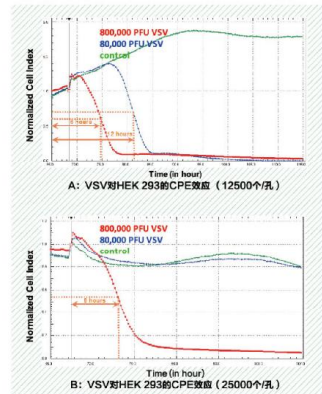


图 3. 实时监控 VSV 病毒感染 HEK 293 细胞的生长状况。(A) 对数生长期细胞标准化 CI 值；(B) 平台期细胞标准化 CI 值。RTCA 实时无标记细胞功能分析仪每 15min 检测一次 VSV 病毒对 HEK 293 细胞黏附伸展及增殖的影响。

高滴度病毒在细胞生长平台期感染细胞 CI 值变化的趋势和细胞对数生长期感染细胞的结果一致 (图 3B，红色曲线)；而低滴度病毒接种于平台期细胞时，细胞 CI 值变化趋势却与对照组相似，说明低滴度病毒对平台期 HEK 293 没有产生 CPE 效应 (图 3B，蓝色和绿色曲线)。

Vero E6 与 HEK 293 唯一的不同之处在于 HEK 293 能产生 I 型干扰素，Vero E6 敲除了 I 型干扰素基因 [8]，I 型干扰素基因可以上调抗病毒活性蛋白如 MxA 及 OAS/RNaseL 蛋白的表达，这就导致了两种细胞对 VSV 病毒的不同响应。HEK 293 细胞有完整的干扰素系统，当病毒感染时，HEK 293 细胞能产生干扰素并激活 JAK/STAT 信号通路，并引起抗病毒活性蛋白表达量增加，细胞的抗病毒能力随之增强。因此，推测本实验中干扰素系统的作用是 HEK 293 细胞对低滴度病毒 (PFU 80,000) 产生抗性的关键因素。细胞对 VSV 病毒的不同响应有助于研究细胞的抗病毒作用机制。

综上所述，与常规终点法相比，RTCA 实时无标记细胞功能分析仪可以实时动态监控病毒与宿主细胞相互作用，且无需标记，为科学研究带来了极大的便利。

参考文献

- Knipe, D. M. and Howley, P. M., Eds. (2007). Fields Virology, 5th edition. Lipincott Williams & Wilkins: 37-39.
- Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, and Zheng W (2004). Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. Assay Drug Dev Technol 2,363-372.
- Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, and Abassi Y (2005). Dynamic monitoring of cell adhesion and

细胞屏障功能 RTCA实时动态检测

前言

人体是一个高度分化的多器官生物体，与外界环境之间存在天然的屏障，如皮肤；同样，由于各器官的功能不同，对内环境的要求也不同，器官之间靠特异屏障相互隔开以形成各自所需的环境状态，并在此环境下完成各自的生理功能。其中，肠上皮屏障是人体免疫屏障系统中重要的组成部分，肠上皮屏障可防止肠内的有害物质如细菌和毒素穿过肠粘膜进入人体内其他组织、器官和血液循环 [1-2]，以维持肠道及其它器官的正常机能。

肠屏障功能降低或通透性升高会引起肠道疾病，如炎症性肠疾病（IBD）、腹腔疾病、感染性痢疾、食物过敏及细菌和病毒感染等。肠上皮细胞之间联系的紧密性是维持肠内部稳态微环境，以及抵御外部病原体、毒素及外源性化合物的必要条件。相邻细胞之间的连接通过紧密连接和黏附连接两类细胞骨架复合体来调控[3-4]，以减少细胞间隙。紧密连接由跨膜蛋白（闭合蛋白、ZO-1、钙连蛋白E-cadherin、JAM、CAR及TAMPS等）和胞内附着蛋白组成的复合物和肌球蛋白微丝紧密相连[5]。肌球蛋白和肌球蛋白微丝是主要的细胞骨架蛋白，紧密连接很大程度上会参与对骨架重排引起细胞形态变化的过程。因此，紧密连接或细胞骨架的改变或受损都会导致上皮屏障功能的紊乱，从而诱发肠道疾病。

周围环境中存在着大量诱发屏障功能障碍的因素，如促炎细胞因子、病原体、毒素、丝氨酸蛋白酶抑制剂、乙醇、醇溶蛋白、缺氧、高渗等，其中乙醇可破坏细胞间紧密连接，进而促进肠上皮细胞屏障通透性增加。因此，在研究肠上皮屏障功能时，乙醇常被用于体外破坏上皮屏障完整性的诱导因子。TER(transendothelial resistance)法是目前被广泛应用的评估上皮屏障完整性的标准检测方法，即测量跨内皮细胞层的电阻，但其局限性在于：（1）基于终点的检测手法，上皮屏障破损的动态和瞬时反应过程无法捕捉到；（2）无法实现高通量检测，信息量有限；（3）需要大量的实验条件优化，

步骤繁琐。因此，对于上皮屏障完整性的评估，需要一种能实时动态展现上皮屏障完整性损伤全过程的检测方法。

艾森生物自主研发的基于细胞水平的实时无标记（RTCA, Real Time Cellular Analysis）细胞功能分析仪可实现上皮屏障损伤过程的全程动态检测，而且无需对细胞进行标记。RTCA技术基于阻抗检测原理，在E-Plates检测板底部整合有微金电极，阻抗测量可定量评估细胞生理状态如细胞数量、存活率及细胞形态变化等。本文中，利用RTCA技术实现了乙醇刺激肠上皮细胞Caco-2单层细胞动态反应过程的实时检测，定量评估了乙醇对Caco-2细胞层完整性损伤的时间-剂量依赖性。另外，该技术还可用于高通量筛选和鉴定扰乱上皮屏障功能和内环境稳态的生化试剂。

材料和方法

细胞

Caco-2细胞购自ATCC，培养在含10%FBS，50 u/ml青霉素/链霉素的DMEM培养基中，置于37°C，5% CO₂标准培养箱中。

肠上皮单层细胞层电阻抗及通透率检测

电阻抗检测：将 Caco-2 细胞接种在直径为 12 mm，有效面积为 0.6cm²，孔径为 0.4μm 的 transwell 上，接种密度为 3x10⁵/孔。下槽培养基为 1ml，上槽培养基为 500μl，在特定的时间点利用 Millicell ERS (Millipore) 测定其跨细胞层电阻值，记录电阻值 R_t，并在接种细胞之前先测定每个孔的空白电阻值 R₀，最终按照公式计算得到每个孔的电阻值 $R = (R_t - R_0) \times \text{有效面积}$ ，其单位是Ω·cm²。

通透率检测：细胞接种于 0.4μm Trans-well（12 mm）小室中，平均接种 3x10⁵ 个细胞 / 孔，然后向上室中加入 500μl 含 0.16g/l 酚红培养基，下室加入 1ml PBS。细胞置于 37°C，5% CO₂ 标准培养箱培养 1h 后，从下室取出 100 μl 培养基，转移到新的 96 孔板中，在 550 nm 下测定其吸光度 A_i，以确定单层上皮细胞的通

透性,以 0.16 g/L 浓度的酚红的吸光度 A_0 为 100%,
通透率的计算公式: 通透率 = $(A/A_0) \times 100\%$ 。

RTCA 技术检测乙醇对肠上皮细胞屏障的破坏作用

将 50 μ l 新鲜培养基加入到 96E-Plates 检测板孔内测基线,后加入 100 μ l 细胞悬液,室温放置 30 min,将 96E-plate 板置于检测台,使用 RTCA 细胞功能分析仪实时检测,持续检测 8 天,每隔 1 天更换一次新鲜培养基。第 8 天在细胞中加入药物(如松弛素 D,阿司匹林,吡啶美辛等抑制剂)预处理 2 h,而后加入乙醇,使乙醇终浓度为 7.5%,设定每 5 min 检测一次,实时检测药物及抑制剂对乙醇诱导的屏障损伤所产生的保护作用,所测的细胞层电阻抗以细胞指数(CI)的形式表示。

透射电镜成像及荧光显微成像

透射电镜成像: Caco-2 细胞接种于 6 孔板中, 8×10^4 孔,第 8 天,2.5% 戊二醛中固定 1 h; 1% 锇酸固定 1 h; 4% 醋酸铀水溶液染色 30 min; 50%, 70%, 90% 酒精依次脱水 1 次; 100% 酒精脱水; 100% 丙酮脱水; 无水丙酮与包埋剂按 1:1 体积混合渗透样本 2 h; 纯包埋剂渗透样本 2 h; 置于烘箱内 37℃ 聚合 24 h, 5℃ 聚合 24 h, 60℃ 聚合 48 h; 修块和超薄切片(约 120 nm); 4% 醋酸铀染色 20 min; 枸橼酸铅染色 5 min; 透射电镜下观察。

荧光显微成像: 将细胞接种于盖玻片上,待细胞形成单分子层时用 2% 多聚甲醛(PFA)固定,然后用 ZO-1 (Invitrogen 公司) 抗体和 E-钙粘蛋白(Cell Signalling)抗体及鬼笔环肽(Sigma)孵育,加入二抗孵育,激光共聚焦显微镜下镜检,图像通过 LSM Image Browser 分析。

结果与讨论

RTCA 实时检测乙醇诱导的可逆的上皮屏障功能障碍

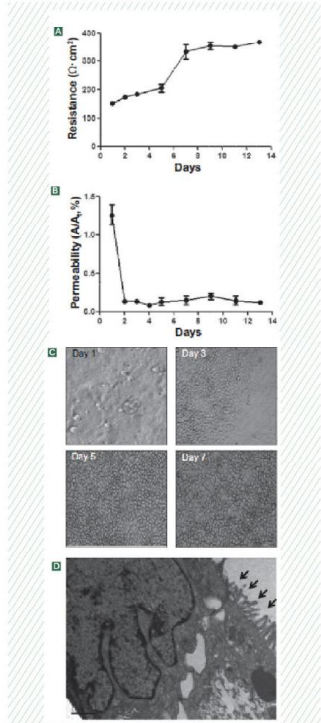


图 1 构建 Caco-2 细胞肠上皮屏障功能体外检测模型。(A) Caco-2 屏障形成过程中跨单细胞层电阻 (TER) 的变化; (B) Caco-2 屏障形成过程中酚红通透率的变化; (C) 光学显微镜下, Caco-2 在形成屏障过程中其形态的变化; (D) 透射电镜下观察形成屏障的 Caco-2 细胞的特征(箭头所指为绒毛结构)。

将肠上皮细胞 Caco-2 高密度接种于 Trans-well 上室中,增殖生长形成单细胞分子层,使用 TER 方法检测。培养 8 天后, Caco-2 单细胞层电阻抗达到稳定数值(图 1A)。通透性试验显示在第 3 天达到最低值(图 1B)。上皮屏障形态学变化观察(图 1C),细

胞接种 3 天后显微镜下观察可见明显的细胞层,连续生长 13 天后,可见 Caco-2 细胞层外有微绒毛结构生成(图 1D)。因此, Caco-2 细胞在一定条件下可培养成上皮单细胞层,作为体外检测肠道屏障功能的模型。

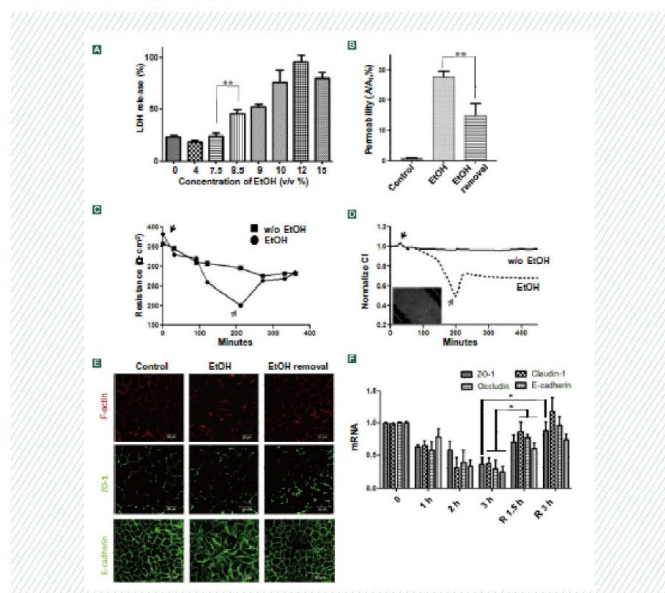


图 2 传统方法与 RTCA 技术检测上皮屏障功能比较。(A) LDH 检测不同浓度乙醇对 Caco-2 单细胞层细胞活力的影响。(B,C) 酚红通透率及 TER 法检测乙醇诱导的可逆的肠上皮屏障障碍。对对照组未处理的 Caco-2 单细胞层 EtOH: 乙醇处理 3h; EtOH removal: 乙醇处理 3h 后移除,换成新鲜培养基培养 3h。(D) RTCA 技术动态检测乙醇(7.5%)诱导的可逆的上皮屏障功能障碍。黑色箭头: 加入乙醇; 灰色箭头: 乙醇移除。(E) 三组 Caco-2 单细胞层中 ZO-1, F-actin, 及 E-cadherin 蛋白免疫荧光染色结果。(F) 乙醇处理一定时间(1-3 h)后, ZO-1, F-actin, 及 E-cadherin mRNA 表达水平。

乙醇是一种常用的破坏上皮屏障完整性的化学试剂。首先，用一系列浓度梯度的乙醇溶液处理 Caco-2 细胞，确定对细胞无毒性的乙醇浓度，然后，收集 Caco-2 细胞培养液检测 LDH 活性。结果显示低于 7.5%(v/v) 的乙醇浓度对细胞没有毒性 (图 2A)。因此，本试验选用 7.5%(v/v) 乙醇刺激 Caco-2 屏障，以观察其对屏障功能的调控作用。试验时，先用 7.5%(v/v) 乙醇处理 Caco-2 单细胞层，3 h 后移除并进行通透性检测，发现乙醇处理能够导致上皮屏障完整性降低，移除后可以恢复 (图 2B)。分别用 TER 技术和 RTCA 技术检测这种可逆的屏障破坏—恢复过程 (图 2C, 图 2D)，这两种方法所得结果一致。如图 2D 所示，RTCA 技术测得乙醇加入后可引起细胞指数降低，而 TER 法无法捕捉到这一快速变化过程 (图 2C)。另外，由于研究证实屏障功能障碍与细胞间紧密连接程度下降密切相关 [6-7]，我们检测了细胞紧密连接相关蛋白 (ZO-1, F-actin, E-cadherin, claudin-1, 和 occludin) 在乙醇诱导的上皮细胞形态变化中的分布情况。对照组 Caco-2 细胞的紧密连接蛋白 ZO-1，粘着连接蛋白 E-cadherin 和细胞骨架蛋白 F-actin 连续均一地分布在单个细胞的边缘，经过乙醇处理 3 h 后，骨架蛋白 F-actin 向胞质移动，紧密连接蛋白 ZO-1 由连续状变为断点状，部分连接破坏，粘着连接蛋白 E-cadherin 发生明显的易位现象。乙醇移除后换新鲜的培养基使 Caco-2 细胞恢复 3 h，可以看到三种蛋白都有不同程度的恢复现象 (图 2B-D)。另外，乙醇处理后，相关蛋白的 mRNA 水平也有了明显的降低 (图 2F)。综上所述，RTCA 技术可用于体外动态检测屏障功能。

RTCA技术动态检测乙醇诱导的上皮细胞屏障功能障碍的时间和剂量依赖性反应

RTCA技术最大的优势在于实时检测，因此，我们建立了乙醇作用于上皮屏障功能的时间-剂量依赖性特征反应图谱 (图3A)。低浓度乙醇 (<2%) 对细胞指数CI没有影响，乙醇含量>=10%时所引起的细胞指

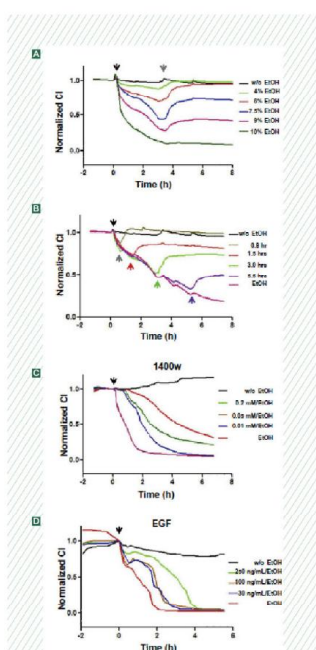


图3. 乙醇诱导的 Caco-2 单细胞层时间和剂量依赖性细胞反应特征图谱。(A) 不同浓度乙醇诱导的 Caco-2 单细胞层时间和剂量依赖性细胞反应图谱；(B) 乙醇处理时间对屏障功能可逆性的影响，黑色箭头：加入乙醇；灰色箭头及其他颜色箭头：乙醇移除；(C, D) INOS 抑制剂 1400w 及 EGF 对乙醇诱导的上皮屏障功能障碍的保护作用，均具有剂量依赖性。

数CI下降不可恢复。7.5%浓度乙醇引起的细胞指数CI下降依赖于乙醇处理的时间 (图3B)，处理时间小于 1h，Caco-2单细胞层细胞指数CI下降可以恢复，随着

乙醇处理时间的增加，破损的上皮屏障逐渐失去恢复能力。另外，乙醇通过活化一氧化氮合酶 (iNOS) 来调控Caco-2细胞上皮屏障功能。抑制iNOS活性可大大降低乙醇对于屏障功能的破坏作用。同一时间点上抑制剂处理组的CI降低的程度明显低于乙醇组，提示iNOS抑制剂 (1400w) 对保护屏障功能具有重要作用 (图3C)。研究发现，上皮生长因子EGF能够增强上

皮屏障的形成及恢复，EGF处理后可减弱乙醇诱导的上皮屏障功能的时间-剂量依赖性破坏反应，提示EGF受体信号激活是维持屏障功能的必要条件。综上所述，RTCA技术可用于动态检测乙醇诱导的上皮细胞屏障功能障碍，并通过高通量和实时检测获得时间-剂量依赖性反应曲线，该方法相比于传统的TER终点检测法，操作更为简便且可得到更多的信息量。

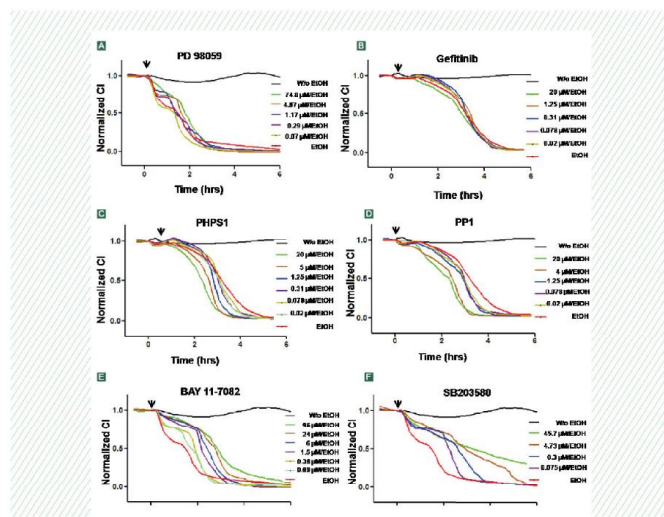


图4. RTCA 技术动态检测 MAPKK, EGFR, Shp2, Src kinase, NF-κB, 及 p38 MAPK 抑制剂对乙醇诱导的上皮屏障功能障碍的影响。抑制剂均溶于 DMSO 中，并用等浓度的 DMSO 最为对照，图中所示时间和剂量依赖性反应图谱依次为：(A) PD 98059, MAPKK 抑制剂；(B) gefitinib, EGFR 抑制剂；(C) PHPS1, 磷酸酶 Shp2 抑制剂；(D) PP1, Src 激酶抑制剂；(E) BAY 11-7082, NF-κB 抑制剂；(F) SB203580, p38 MAPK 抑制剂。黑色箭头表示乙醇加入的时间。

RTCA技术筛选影响上皮屏障功能的化学试剂

为验证 RTCA 高通量实时检测技术是否可用于筛选影响上皮屏障功能的相关化学因子。在本试验中，我们选取了 6 类小分子化合物，初步检测了其对于乙醇诱导的上皮屏障功能中的作用。首先 Caco-2 上皮屏障模型中筛选出对细胞没有毒性的剂量，然后预处理细胞 2h，再加乙醇刺激。结果显示，MAPKK 激酶抑制剂 PD98059 及 EGFR 抑制剂 Gefitinib 对乙醇诱导的屏障损伤没有影响(图 4A、图 4B)。磷酸酶 Shp2 抑制剂 PHPS1 和 Src 激酶抑制剂 PP1 能增强乙醇对屏障的损伤作用(图 4C、图 4D)。抑制剂处理组 CI 曲线与乙醇处理组相比明显前移。而 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 及 P38 MAPK 抑制剂 SB203580 可不同程度上缓解乙醇对屏障的损伤，表现在干预组的 CI 曲线比乙醇组明显后移(图 4E、图 4F)。从上述筛选结果发现，磷酸酶 Shp2 和 Src 激酶活性抑制后，较大幅度地促进了乙醇诱导的肠上皮屏障功能损伤，说明二者介导的信号传导与上皮屏障功能的维持具有直接相关性；同样，NF- κ B 和 P38MAPK 通路也直接参与了乙醇诱导的上皮屏障功能损伤。这些都可以作为未来研究治疗肠上皮功能障碍的药物靶点。上述实验充分证实了 RTCA 检测技术用于筛选、预测、鉴定与调控屏障功能相关的化学试剂的可行性。

综上所述，RTCA 技术基于实时动态监测，无需标记，高通量输出的优点，可用于建立多种因素诱导的上皮屏障损伤模型，在很大程度上优于传统的终点标记检测法(TER)。利用 RTCA 技术建立的上皮模型也可用于高通量筛选、预测、鉴定调控上皮屏障功能的相关化合物及小分子抑制剂，为发掘维持和保护屏障结构及功能的潜在药物提供了良好的平台。

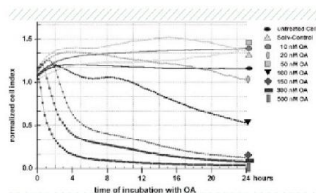
参考文献

1. D. Hollander, Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis, J. Physiol.Pharmacol. 54 (Suppl. 4) (2003) 183–190.
2. G. Roda, A. Sartini, E. Zamboni, A. Calafiore, M. Marocchi, A. Caponi, A. Belluzzi, E. Roda, Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases, World J.Gastroenterol. 16 (2010) 4264–4271.
3. L. Shen, C.R. Weber, D.R. Raleigh, D. Yu, J.R. Turner, Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo, Annu. Rev. Physiol. 73 (2011) 283–309.
4. A. Fasano, Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer, Physiol. Rev. 91(2011) 151–175.
5. L. Shen, E.D. Black, E.D. Witkowski, W.I. Lencer, V. Guerriero, E.E. Schneeberger, J.R. Turner, Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure, J. Cell Sci. 119 (2006) 2095–2106.
6. T.Y. Ma, D. Nguyen, V. Bui, H. Nguyen, N. Hoa, Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier, Am. J. Physiol. 276 (1999) G965–G974.
7. W. Zhong, Y. Zhao, C.J. McClain, Y.J. Kang, Z. Zhou, Inactivation of hepatocyte nuclear factor-4 α mediates alcohol-induced downregulation of intestinal tight junction proteins, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 299 (2010) G643–G651.

客户应用案例一

文献

Ehlers A et al., Analysis of the passage of the marine biotoxin okadaic acid through an in vitro human gut barrier. Toxicology. 2011 Jan 11;279(1-3):196-202.

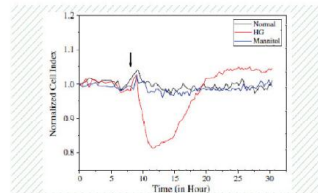


实例 1. RTCA 动态检测海洋生物毒素 okadaic acid (OA) 对 Caco-2 上皮屏障单细胞层的毒性作用。Caco-2 细胞接种于 E-Plates 检测板，分别用不同浓度的 OA 处理细胞，RTCA 实时动态检测细胞反应。结果显示，OA 对 Caco-2 上皮细胞有明显的毒性作用，浓度越高，毒性作用越强。

客户应用案例二

文献

Han-Bing Li et al., Astragaloside IV improved barrier dysfunction induced by acute high glucose in human umbilical vein endothelial cells. Life Sciences 79 (2006) 1186–1193.



实例 2. RTCA 实时动态检测葡萄糖诱导的血管内皮屏障功能障碍。E-Plates 检测板底面用人脐纤维蛋白包被，后接种 HUVEC 细胞，待细胞检测板底面增殖生长形成单细胞层后，分别加入 27.8 mM 葡萄糖和 22.2 mM 甘露醇及 5.6 mM 葡萄糖混合液刺激。结果显示葡萄糖可引起细胞指数(CI)下降，即引起血管内皮屏障功能障碍，3h 后达到最低值，10h 之后内皮屏障逐渐恢复完整。而甘露醇对内皮屏障没有影响。黑色箭头代表葡萄糖或甘露醇加入的时间点。