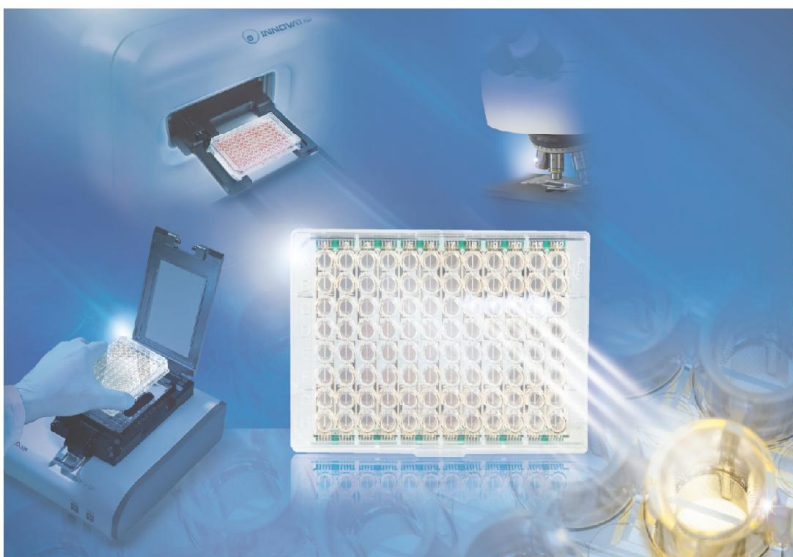
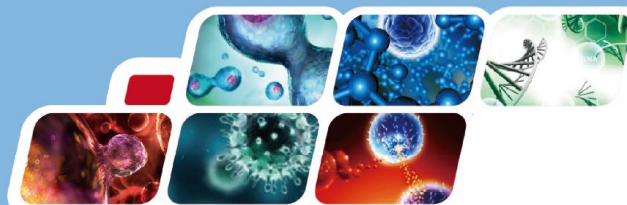




RTCA技术应用专辑(四)

肿瘤免疫、肿瘤药物、肿瘤微环境及肿瘤信号通路的研究
Application Notes No.4



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



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

服务热线
400 600 1063





目 录

RTCA实时动态检测小分子化合物抗肿瘤作用及作用机制分析	01
RTCA实时动态检测药物对肿瘤细胞迁移及侵袭的影响	07
RTCA实时动态检测肿瘤相关信号通路功能	13
RTCA实时动态检测雌激素及雌激素分泌干扰物对乳腺癌细胞生长的影响	19
RTCA实时动态监测NK细胞诱导的肿瘤细胞杀伤	24
基于RTCA的抗肿瘤药物高通量筛选	32

RTCA实时动态检测小分子化合物抗肿瘤作用及作用机制分析

前言

恶性肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病之一。在二十一世纪仍被列为对人类健康造成严重威胁疾病的首位。虽然随着现代分子生物学技术和基础医学理论的飞速发展，对许多重大疾病的发病机制有了更为深刻的理解，多数难治性疾病的防治已获得了攻克。但对恶性肿瘤的发生、发展与治疗仍有许多未阐明的环节，对许多肿瘤仍缺乏行之有效的治疗药物。因此迫切需要对肿瘤的发病机制和治疗药物进行广泛、细致和深入的研究。

肿瘤病因学的复杂性和肿瘤本身产生的耐药性，导致肿瘤药物治疗及其机制阐明的极大难度。自1943年Gilman等首先将氟芥应用于淋巴瘤治疗，揭开了现代肿瘤化疗学的序幕以来，抗恶性肿瘤药的基础和临床研究取得长足进步，化疗已从姑息性向根治性目标迈进。尽管如此，鉴于肿瘤发生发展过程的复杂性，大部分常见恶性肿瘤的治疗未能达到满意的效果。随着肿瘤生物学和肿瘤药理学的发展，为治疗恶性肿瘤的药物研发提供了不少新靶点，恶性肿瘤研究正从传统的细胞毒类药物随机设计向针对靶点的多环节作用新型化合物发展。但是，肿瘤药物的开发始终都耗费大量的时间和资源，并且无法保证巨大的投入就一定能够获得安全有效的药物。所以，我们非常迫切的需要用一种方法，在肿瘤药物开发之前就能预测到这些特定化合物所带来的靶向药效及其副作用，从而更早的对他们的结构特征进行优化和改良，使这些药物能够带来预期效果的同时尽量避免或者减少副作用。

为了解决这个难题，一些在细胞水平的多维高通量的检测方法已经开始被逐步的使用。它们包括有：Gene expression profiling, proteomic profiling, protein-fragment complementation profiling, 以及high content microscopy-based profiling等，这些方法在建立起大量信息库的同时也都能够不同程度的揭示出未知化合物以及现有药物的作用机理。但是，目标蛋白受药物或者小分子化合物的调节在一定程度上取决于多种因素，这包括：化合物的有效浓度，目标蛋白的

表达水平，以及最关键的，化合物所需要的作用时间。有些化合物的作用时间非常短暂，例如一些GPCR或者离子通道的激动剂，往往会导致即时的生化和细胞水平的改变；而其他一些化合物的作用时间则可能较之有明显的延长。正因为如此，这些现有的高通量化合物作用机制的检测方法的最大局限就在于它们大都是针对加入化合物后对其产生效应的终点监测，这样的方法无法实时动态的监测肿瘤细胞所产生的效应，从而很难捕捉到一些化合物引起的细胞效应的短暂过程，也很容易遗漏一些化合物在非检测时间点的作用信息，而这些往往可能是至关重要的[1,2]。

为了突破这个技术瓶颈的限制，实时无标记细胞分析技术（RTCA, Real Time Cellular Analysis）基于电阻抗的检测，可以实现实时、无标记、持续动态的监测小分子化合物引起的细胞效应。通过这种基于电阻抗的方法，我们发现，相似生物活性的小分子化合物会产生相似的时间依赖的细胞效应特征曲线（TCRPs, Time-dependent cell response profiles）。并且由于这种检测方法的动力学特性，短时程（short-term）或长时程（long-term）的化合物作用以及潜在的脱靶效应都可以被成功检测。很多研究都表明，通过这种基于电阻抗的实时细胞分析技术，研究者能够获得高灵敏度的量化数据以助于研究和揭示抗肿瘤化合物的作用机制，并显著降低因合成与筛选大量化合物所消耗的成本。RTCA 技术也可以帮助研究者更好的控制和优化实验，并可作为并对其他已有检测方法的重要补充。

材料方法

细胞培养和细胞指数计算

本实验所用细胞均购自 ATCC，培养于 5% CO₂，37℃的细胞培养箱内。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。

使用 RTCA 获得时间依赖的细胞效应特征曲线

为获得时间依赖的细胞效应特征曲线，在 96 孔 E-plate 中加入 90ul 的培养基，测得背景基线后再加入 100ul 的细胞悬液，E-plate 置于室温 30min 后，放置于在 CO₂ 培养箱中的检测台上，并持续获得反应细胞指数的电阻抗值。20-24 小时后，用化合物溶液处理细胞。针对短时细胞效应，细胞在化合物处理 1 小时后每 2min 检测；针对长时细胞效应，则在处理 1 小时后每 30min 检测。

试验结果

在该研究中，实验者使用了基于电阻抗的 RTCA 技术对肿瘤细胞和化合物进行了实时的检测。这种技术所使用的 E-Plate 的底部有微电极阵列，在 E-plate 中加入培养基和细胞，电阻抗值的变化与 E-plate 小孔内细胞的数量、形态、以及它们的黏附程度关系密切并呈比例（图 1A）[3]。图 1B 反应了 4 种肿瘤细胞在不同梯度的接种浓度下在 E-plate 中的生长和增殖的时间依赖的曲线。可以明显的看到，每种细胞因其自身特有的形态、黏附及生长的特性而使实时检测的结果表现出特定的动力学特征曲线。图 1C 展示了两不同作用机理的具有细胞毒作用的化合物作用于 A549 细胞时的时间剂量依赖曲线，他们分别是蛋白激酶抑制剂 staurosporine 和抗代谢药 5-fluorouracil (5-FU)。虽然两种药物都可诱导肿瘤细胞的凋亡现象，但是利用 RTCA 可以见到的它们各自具有特异性的剂量效应曲线 TCRPs。从 TCRP 可观察到，加入 staurosporine 后对 A549 较迅速出现细胞毒性作用；而 5-FU 的起效时间则较为缓慢。因此，能否通过 TCRP 来预测化合物的作用机理，相似作用机制的化合物是否会产生相似的 TCRP 就成了研究者最为感兴趣的两个问题。

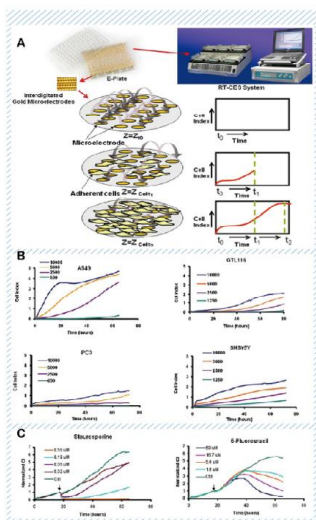


图 1. 利用 RTCA 技术实时检测黏附细胞。(A) RTCA 检测台的组成和原理；(B) 利用 RTCA 对四种不同肿瘤细胞在不同梯度的接种浓度下的实时监测；(C) 两种不同化合物的细胞毒性作用，箭头代表加入化合物的时间点。

为了验证这样的假设，研究者用 RTCA 技术对拥有 2000 个化合物的库作了筛选，这其中的 50% 为 FDA 认证药物，29% 为天然药物，18% 为具有生物活性的化合物，还有 3% 的除草剂以及农药。A549 非小细胞肺癌细胞和 PC3 前列腺癌细胞用于检测这些化合物的效应。研究者对所有化合物进行了短时程 (short-term) 和长时程 (long-term) 效应的检测。

对于短时程效应，研究者利用 RTCA，在加入化合物之后的 1 小时内每 2 分钟对化合物导致的细胞效应进行一次检测，较高的检测频率可确保可获得即时细胞效应的结果。而从加入化合物 1 小时一直到 48 小时的时间内，研究者则对这些化合物继续进行每 30 分钟一次的长时程检测。这样的长时程检测能够确保所有的化合物拥有足够的时间去作用和调控相应靶点，从而显示特征性的反应曲线 TCRPs。通过这两种互补的方法，研究者对庞大的化合物库进行了筛选。

所有通过长时程 (long-term) 细胞效应筛选出的“hits”被进行了聚类分析（图 2A）。如果 TCRPs 可反映相似的生物学活性及药物作用机制，那么在聚类分析中，具有相似作用的化合物就应该被分在一个组内。而实际的结果也证明了这个假设的正确性，基于与已知机制的化合物的对比，研究者可以明确区分出至少 5 个具有不同作用机制的化合物族群，它们有：钙离子浓度和通路调节剂，类固醇核受体调节剂，抗有丝分裂剂，DNA 损伤剂以及蛋白合成抑制剂。

而对于短时程 (short-term) 效应的化合物（图 2B），研究者把它们归为一组，并用 RTCA 检测得到了两类短时程 TCRPs 的亚型。在加药后，两类亚型结果都出现了一个非常短时的细胞指数的下降过程，而随后，其中一类出现了部分的恢复，另一类则持续保持一个非常低的细胞指数。对这两类中已知机制的化合物的分析显示，这些化合物都对 GPCR 信号通路有影响 [4]。

图 2C 表现的是核激素受体激动剂 (nuclear hormone receptor agonists)，它们的 TCRPs 表现出的特征是，在整个检测时间段内，检测组的细胞指数都高于对照组。在图 2D 中，微管聚合调节剂 (tubulin polymerization modulator) 的分组也表现了相似的 TCRPs，曲线在加药后平稳下降 14-16 小时后出现了部分的回复，并始终低于对照组。另一类化合物组则影响 DNA 的合成，解旋，复制和转录，它们的 TCRP 特征为曲线先高于对照组后再较为缓慢的下降，并位于阴性对照下方（图 2E）。

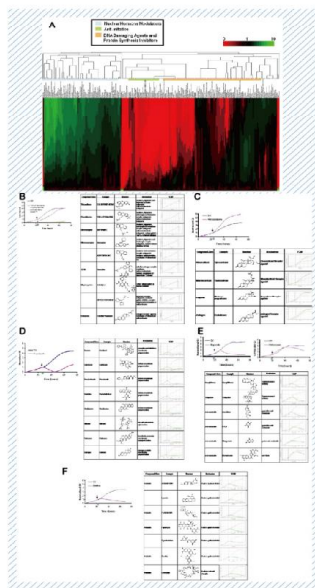


图 2. 针对不同作用机制的小分子化合物的 TCRPs 的分类分析。(A) 聚类分析长时程 (long-term) 细胞效应的化合物；(B) 典型的短时程 (short-term) A549 细胞效应化合物的 TCRPs；(C) 典型核激素受体激动剂的 TCRPs；(D) 典型微管聚合调节剂的 TCRPs；(E) 典型影响 DNA 合成类化合物的 TCRP；(F) 典型影响蛋白合成类化合物的 TCRP。

这些实验都证实了研究者先前的假设，TCRPs 能够将机制相似的小分子化合物进行分类。不过，RTCA 的方法能否起到预测的作用以及是否具有化合物药效筛选的功能还没有得到完全的验证。

因此,研究者对钙离子浓度和通路调节剂的分组进行了进一步的分析,他们发现,celecoxib的TCRP出现在这个分组中。Celecoxib是一种COX-2抑制剂,而具有相似作用机理的还有rofecoxib, valdecoxib和deracoxib(图3A),有趣的是,只有celecoxib出现在钙离子浓度和通路调节剂的分组中。因此,研究者猜测celecoxib在具有已知的COX-2抑制作用的同时,还能够使细胞内的钙离子浓度在短时间内显著增大。为了证实这个预测,研究者检测了被梯度浓度的celecoxib处理的A549细胞中的钙离子浓度,并用Thapsigargin(内质网钙离子ATP酶选择性抑制剂)作为阳性对照,结果显示,Celecoxib的确导致了非常明显的剂量依赖的钙离子浓度增大(图3B)。类似的实验也获得了非常理想的结果,在此不一一列举,这些发现都证明了RTCA技术对化合物筛选中所具有的预测价值[5]。

在药物开发中,还有一个很重要的障碍是缺少有效的对潜在靶效应的检测方法[6]。于是,研究者也希望使用RTCA技术来对化合物的TCRP进行检测从而克服这个难题。研究者利用RTCA对Eg5抑制剂monastrol的检测,同时得到了短时程和长时程的TCRPs。长时程的TCRP与抗有丝分裂剂相似,该作用机制也被研究者通过phospho-histone H3染色实验所证实(图4A);表现出的短时程TCRP却出乎意料的反映出该化合物可能调控细胞内的钙离子水平,而另一个Eg5抑制剂S-trityl-L-cysteine却只能导致有丝分裂相关的TCRP。这个发现表明,钙离子调控很可能是monastrol在抑制Eg5以外的靶效应,研究者通过对其他研究的调查证实了这样的猜测[8]。大量的实验论证都显示,RTCA技术能够检测在药物开发中原本很容易被忽视的非靶点作用,从而可以大大优化开发的过程,并得到更可靠的结果。

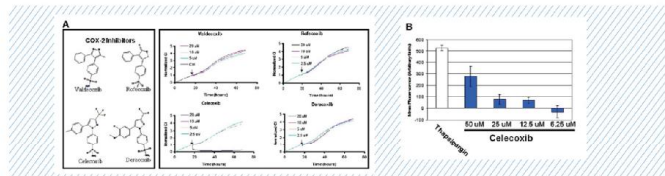


图3. TCRPs对化合物作用机制的预测 (A)不同剂量的COX-2抑制剂valdecoxib, rofecoxib, deracoxib, and celecoxib作用于A549细胞。只有celecoxib导致短时效应的TCRP,反应了celecoxib可能影响细胞内的钙离子浓度;(B)用fura-2直接检测细胞内钙离子浓度表明celecoxib能够使钙离子浓度增加。

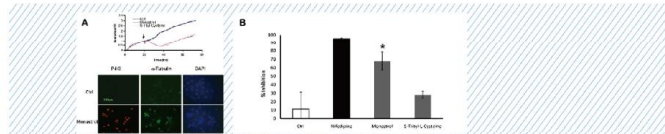


图4. 用TCRP来检测小分子化合物的靶效应 (A) Monastrol和S-trityl-L-cysteine导致的长时程的TCRP表明它们可能作用于有丝分裂,但同时Monastrol还产生了一个短时程的效应特征曲线,表明其可能对钙离子浓度的调节功能。下侧的图反映了被monastrol处理16小时后A549细胞被phospho-histone H3抗体染色;(B)用monastrol(100μM)处理后的HEK293细胞可抑制其钙离子摄取(与对照相比 $p < 0.001$),而S-trityl-L-cysteine(20μM)处理后的细胞并没有任何明显变化。

讨论与总结

鉴于肿瘤治疗的复杂性与多个环节相关,对肿瘤的治疗也具有多靶点作用的特点,如何更好地寻找对特异性靶点具有良好效果的抗肿瘤药物,是现今抗肿瘤药物研究的一个值得关注的问题。传统的抗肿瘤先导化合物的发现采用随机设计或从天然产物中提取,不仅工作量极大,且具有一定的盲目性,不利于合理高效地发现新型抗肿瘤药物。通过建立结构多样性化合物库,并对化合物库进行细胞水平的多维高通量的筛选和分析,可以显著减少寻找先导化合物的时间,明显缩短创制新药的周期。但是现有的方法大都为化合物加药后的终点检测,它们无法做到实时动态的监测肿瘤细胞对化合物所产生的效应,从而很难捕捉到一些化合物引起的细胞效应的短暂过程,也很容易遗漏一些化合物在非检测时间点的作用信息,以及它们的靶点作用。RTCA技术无疑为这样的筛选提供了一个很好的平台,它可以实现实时、无标记、持续动态的监测小分子化合物引起的细胞效应。大量的实验数据表明,相似生物活性的小分子化合物会产生相似的TCRPs,研究者也可以利用TCRPs去预测未知抗肿瘤化合物的作用机理。也因为RTCA方法的实时、动力学检测的特性,它可以检测短时程或长时程的化合物作用以及潜在的靶效应。所以,通过这种基于电阻抗的实时细胞分析技术,研究者能够获得高灵敏度且量化的数据以助于研究和揭示抗肿瘤化合物的作用机制,大大拓宽了抗肿瘤靶点探索的可能性,并显著降低了因合成与筛选大量化合物所消耗的成本。

参考文献

- Gunther, E.C., Stone, D.J., Gerwen, R.W., Bento, P., and Heyes, M.P. (2003). Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9608–9613.

- Leung, D., Hardouin, C., Boger, D.L., and Cravatt, B.F. (2003). Discovering potent and selective reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes. *Nat. Biotechnol.* 21, 687–691.
- Atienza, J.M., Yu, N., Kirstein, S.L., Xi, B., Wang, X., Xu, X., and Abassi, Y.A. (2006). Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev. Technol.* 4, 597–607.
- 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.
- Zhang, W., Couldwell, W.T., Song, H., Takano, T., Lin, J.H., and Nedergaard, M. (2000). Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 60, 5395–5400.
- Zhang, Y., and Amzel, L.M. (2002). Tuberculosis drug targets. *Curr. Drug Targets* 3, 131–154.
- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., and Mitchison, T.J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971–974.
- Kumar, B., Kaur, B., Kaur, J., Parmar, A., Anand, R.D., and Kumar, H. (2002). Thermal/microwave assisted synthesis of substituted tetrahydropyrimidines as potent calcium channel blockers. *Indian J. Chem.* 41, 1526–1530.

RTCA实时动态检测药物 对肿瘤细胞迁移及侵袭的影响

前言

细胞的迁移和侵袭不仅是细胞进行重要生理活动的基础，同时也在炎症反应和肿瘤发生发展等病理过程中发挥着关键的作用。细胞迁移和侵袭是肿瘤细胞的主要特性之一，因此这也使其成为目前细胞生物学研究的热点。近年来，越来越多的研究者们关注并寻找与细胞迁移侵袭相关的基因，从分子水平上看，这些相关基因主要包括癌基因、抑癌基因及细胞周期调控基因等。通过对相关基因表达及信号通路作用机制的研究，从而为临床治疗提供有力的理论基础。例如，Drake等[1]的研究发现某些前列腺癌细胞系的迁移能力与zeb1基因的表达有关。Tamura等[2]发现PTEN自身的磷酸酶活性可以抑制FAK介导的细胞转移及生长。在这些研究过程中，通过药物对相关基因的作用导致细胞迁移及侵袭能力的改变已成为一个有力的手段和方法。

目前对细胞迁移和侵袭研究的检测方法通常是建立在标记基础上的终点检测法，其中一种最常用的大家熟知的检测方法为 Boyden Chamber 法。Boyden Chamber 法又称 Transwell 技术，通过将细胞加入上孔室，在下孔室加入血清或其它趋化因子诱导细胞迁移到室。利用染色人工计数迁移细胞数目用于评估细胞的迁移。该方法无法满足动态同步监控，人为计数误差较大，重复率低。由于 Transwell 法无论是采用直接计数法（直接人工读取穿膜的细胞数量）还是间接计数法（MTT 或荧光试剂标记等），都不可避免的通过标记细胞从而获得实验数据。这就使该方法具有了诸如标记物对细胞损伤导致细胞性状改变以及标记效率对实验结果的真实性和重复性影响等不足。同时，该方法耗费人力和财力、消耗大量时间，也制约了实验的通量。

针对以上方法存在的缺陷和科研工作者们对细胞迁移及侵袭检测的需求，ACEA Biosciences 开发的 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪（图 1A）是基于 Boyden Chamber 原理的细胞阻抗

检测系统。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（图 1B）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、省时省力，结果客观和重复性好的特点，同时还可根据研究者的实验需要，应用配套的 E-Plate 检测板对细胞增殖、粘附及共培养等进行同步检测。



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-Plate 16)

NDRG 家族是近几年发现的一组新基因。NDRG1 和 NDRG3、NDRG4 虽然在组织分布上有明显差异，但是在氨基酸组成上却有 57% ~ 65% 的同源性。作为最早发现的 N-Myc 下游调节基因 1 (NDRG1)，早期的研究显示其与细胞的增殖能力呈负相关，在肿瘤细胞中过度表达会降低细胞的增殖速度，促进细胞的分化，并减弱癌细胞的转移能力，所以可能是潜在的抑癌基因；同时，最新的结果又表明 NDRG1 在脑瘤、乳腺癌和肾癌等多种癌组织中高表达 [3]，可被视为一种新的癌症检测标记。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缺氧自由基通过上调 N-Myc 下游调节基因 1 (NDRG1) 的表达从而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。

材料与方法

细胞

HCC1806 乳腺癌细胞系购自 ATCC。细胞培养于含 10% 胎牛血清、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，并于加药处理前 16 小时更换无血清培养基。

化合物

Diethylenetriamine nonoate (DETA/NO) 作为一种一氧化氮供体，其在水溶液中可持续稳定地提供氮氧自由基。

细胞迁移及侵袭检测

应用 CIM Plate 细胞浸润迁移检测板对细胞迁移及侵袭进行检测，将细胞用无血清培养基悬浮并以 2×10^4 孔加入 CIM Plate 检测板上室，将含 10% 血清的培养基加入 CIM Plate 检测板下室，将 CIM Plate 检测板室温静置 30 分钟后，应用 RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞的迁移进行实时监控，每 15 分钟读取一次 CI 值 (Cell Index)。

对于细胞侵袭的检测，CIM Plate 检测板上室预先用 $30 \mu\text{l}$ 以无血清培养基按照 1:40 比例稀释的 Matrigel™ 包被，CIM Plate 上室置于 37°C 培养箱中放置约 4 小时。包被好的 CIM Plate 检测板即可用于细胞侵袭的检测，实验方法同细胞迁移。

细胞增殖检测

应用 E-Plate 检测板对细胞增殖进行实时动态检测，将细胞用培养基悬浮并以 2×10^4 孔加入 E-Plate 检测板中，将 E-Plate 检测板室温静置 30 分钟后，应用 RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞的增殖进行实时监控，每 15 分钟读取一次 CI 值 (Cell Index)。

结果

已有报道证实化学的铁螯合剂能够诱导 NDRG1 表达上调[4]，并且在之前的研究中已证实氮氧自由基与铁离子螯合剂的作用类似，因此有理由推断氮氧自由基可能拥有与铁螯合剂类似的使 NDRG1 表达上调的作用。将 HCC1806 乳腺癌细胞用 DETA/NO ($500 \mu\text{M}$) 处理并在不同时间点收集细胞，qRT-PCR 对细胞的 NDRG1 mRNA 水平进行检测，Western Blot 分析

NDRG1 蛋白表达水平。实验结果表明：氮氧自由基可诱导 NDRG1 mRNA 转录及 NDRG1 蛋白的翻译。氮氧自由基作用 4-24 小时后 NDRG1 mRNA 水平和蛋白表达水平都明显升高 (图 2A, B)。为了进一步证实氮氧自由基对 NDRG1 的上调作用是否具有剂量依赖性，将梯度稀释的 DETA/NO 加入细胞培养液中，以加入分解的 DETA/NO 作为对照，并于药物作用 8 小时后收集细胞，对细胞的 NDRG1 mRNA 水平及蛋白表达水平进行检测。实验结果表明 NDRG1 的 mRNA 水平和蛋白表达水平具有明显的氮氧自由基梯度依赖性 (图 2C, D)。

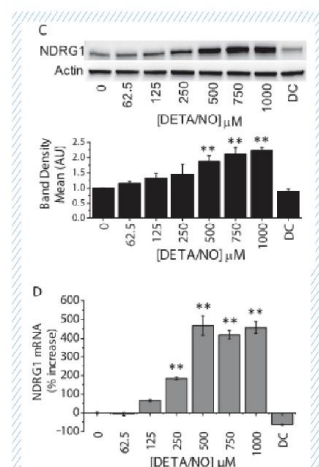
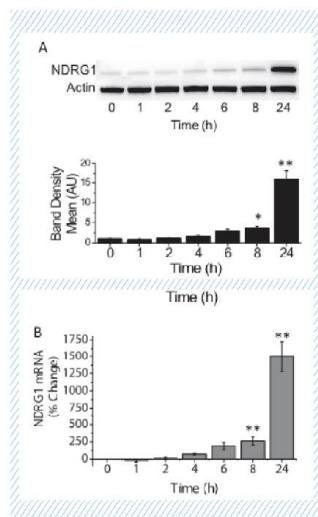


图 2 氮氧自由基可诱导 NDRG1 基因表达并呈现时间和剂量的梯度依赖性。(A) Western blot 检测 DETA/NO ($500 \mu\text{M}$) 对 HCC1806 乳腺癌细胞不同作用时间的 NDRG1 蛋白表达情况。(B) qRT-PCR 检测 DETA/NO ($500 \mu\text{M}$) 对 HCC1806 乳腺癌细胞不同作用时间的 NDRG1 mRNA 表达水平。(C) Western blot 检测梯度稀释的 DETA/NO ($0 \sim 1000 \mu\text{M}$) 作用于 HCC1806 乳腺癌细胞 8 小时后 NDRG1 蛋白表达情况。DC 为加入 $1000 \mu\text{M}$ 分解的 DETA/NO 对照组。(D) qRT-PCR 检测 DETA/NO ($0 \sim 1000 \mu\text{M}$) 作用于 HCC1806 乳腺癌细胞 8 小时后 NDRG1 mRNA 表达水平。Western blot 为 4 次相对独立的实验结果所得的统计数据，qRT-PCR 为 12 次相对独立的实验结果所得的统计数据。* 为 $p < 0.05$ ，** 为 $p < 0.01$ 。

在先前的报道中已经证实 NDRG1 的上调存在 HIF-1 α 依赖途径和非依赖途径 [5-7]。为了评估氮氧自由基对 NDRG1 的上调作用是否与 HIF-1 α 途径有关，通过基因沉默的方法分别获得沉默 NDRG1 基因的 HCC1806 细胞 (HCC1806 N) 和沉默 HIF-1 α 基因的 HCC1806 细胞 (HCC1806 H)，之后将两种细胞分

别用 DETA/NO 处理并检测 NDRG1 及 HIF-1 α 的 mRNA 水平和蛋白表达情况 (图 3A, B)。在 NDRG1 基因沉默的细胞中，HIF-1 α 蛋白在氮氧自由基的作用下大幅度上调而未能检测到 NDRG1 蛋白。相反的，在 HIF-1 α 基因沉默的细胞中，NDRG1 的 mRNA 和蛋白在氮氧自由基的作用下都明显呈上调趋势，从而预示着不存在 HIF-1 α 的情况下氮氧自由基也可导致 NDRG1 的上调。另外，我们还注意到 HIF-1 α 的 mRNA 在氮氧自由基的作用下在任何细胞组中都没有增加，而 NDRG1 的 mRNA 在 HCC1806 N 细胞中没有增加却在 HCC1806 H 细胞中有显著增加 (图 3B)。这些数据强有力地证实氮氧自由基对 HCC1806 细胞 NDRG1 基因的表达属于非 HIF-1 α 依赖途径。

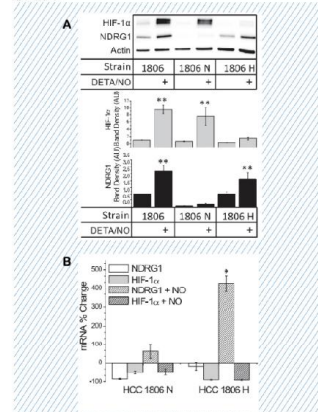


图 3 氮氧自由基对 NDRG1 基因上调的作用为非 HIF-1 α 依赖途径。(A) Western Blot 检测两种基因沉默细胞在 DETA/NO ($500 \mu\text{M}$) 作用 8 小时后的 HIF-1 α 及 NDRG1 的蛋白表达情况。(B) qRT-PCR 检测两种基因沉默细胞在 DETA/NO ($500 \mu\text{M}$) 作用 8 小时后的 HIF-1 α 及 NDRG1 的 mRNA 表达水平。* 为 $p < 0.05$ ，** 为 $p < 0.01$ 。

在肿瘤生物学中，NDRG1 通常被认为是一种转移抑制蛋白，为了评估氮氧自由基作用细胞后导致的 NDRG1 基因上调对肿瘤细胞迁移的影响，我们将以上两种基因沉默的细胞（HCC1806 N 和 HCC1806 H）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监测。实验结果表明：NDRG1 基因沉默的细胞迁移能力是野生型 HCC1806 细胞和 HIF-1 α 基因沉默细胞的 2 倍。HIF-1 α 基因沉默细胞的迁移能力比野生型 HCC1806 细胞略有升高（图 4A）。通过对以上这三种细胞迁移能力的初步了解，我们进一步考察氮氧自由基作用后对这三种细胞迁移能力的影响。实验结果表明：氮氧自由基对 HCC1806 细胞迁移能力具有极强的抑制作用（图 4B），而对 NDRG1 基因沉默细胞的迁移能力仍然具有一定的抑制作用（图 4C），但是氮氧自由基对 HIF-1 α 基因沉默细胞的迁移能力基本没有起到抑制

作用（图 4D）。图 4E 总结了与各自的非处理对照组细胞相比氮氧自由基对细胞迁移能力的抑制作用。图 4F 为与 HCC1806 细胞未加药处理组对比，氮氧自由基对细胞迁移能力的相对抑制作用结果。以上结果显示：单独的 NDRG1 基因在基础水平上表达即可抑制细胞的迁移，当 NDRG1 基因表达上调并且与 HIF-1 α 结合的情况下抑制细胞迁移的效果最为明显。除了对细胞迁移的检测，我们还利用 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪进行了氮氧自由基对细胞侵袭影响的实时检测。实验结果表明氮氧自由基可抑制肿瘤细胞的侵袭（图 4G），以上各细胞组都应用 E-Plate 检测板及 RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞增殖情况进行动态实时检测，各细胞组之间的增殖情况在 80 小时内并无明显的差别。

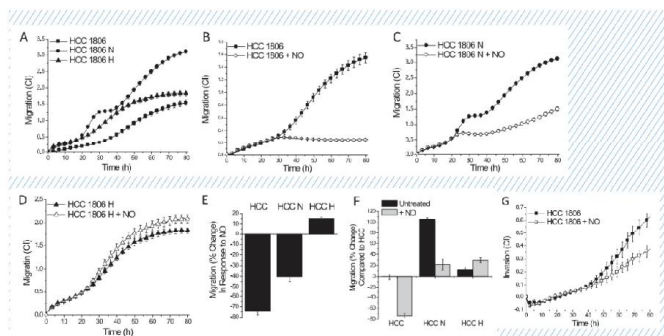


图 4. NDRG1 和 HIF-1 α 在氮氧自由基抑制细胞迁移及侵袭中的作用。应用 CIM Plate 及 xCELLigence RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪对细胞的迁移和侵袭作用进行实时监测。所有细胞的接种密度为 2×10^4 孔，DETA/NO 药物浓度为 $500 \mu\text{M}$ 。(A) HCC1806、HCC1806 N 和 HCC1806 H 未加药的细胞迁移实时动态检测结果。(B) 实时动态检测氮氧自由基对 HCC1806 细胞迁移能力的影响。(C) 实时动态检测氮氧自由基对 HCC1806 N 细胞迁移能力的影响。(D) 实时动态检测氮氧自由基对 HCC1806 H 细胞迁移能力的影响。(E) 与各自的非处理对照组细胞相比氮氧自由基对细胞迁移能力的抑制作用。(F) 与 HCC1806 细胞未加药处理组对比，氮氧自由基对细胞迁移能力的抑制作用结果。(G) 实时动态检测氮氧自由基对 HCC1806 细胞侵袭的影响。

结 论

本应用中的实验数据表明，使用 RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪及 CIM Plate 检测板可实现药物对细胞迁移及侵袭的实时动态监测。该技术在不对细胞进行外源性标记的情况下，即可快速准确获得实验数据，极大的减少了实验的劳动量，增加了实验的通量，提高了实验的可操作性和重复性。同时，应用配套的 E-Plate 检测板，RTCA DP 实时无标记细胞功能分析仪还可实现对细胞增殖、粘附及毒性等方面的实时检测，从而可进一步证实细胞迁移及侵袭能力的改变与细胞增殖、粘附等的相互关系。因此，基于微电子阻抗传感技术的 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、侵袭、增殖等的优选系统。

参考文献

- Drake JM, Srtzobehn G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD(2009) ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 20(8): 2207-2217.
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al (1998) Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280(5369):1614-1617.
- Cangul H, Salnikow K, Yee H, et al (2002) Enhanced expression of novel protein in human cancer cells: A potential aid to cancer diagnosis. *Cell Biol Toxica* 18(1): 87-96.
- Le NT, Richardson DR (2004) Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 104(9): 2967-2975.
- Melotte V, Qu X, Ongenaert M, van Crielinge W, de Bruijne AP, Baldwin HS, van Engeland M (2010) The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications.

FASEB J. 24(11): 4153-4166.

6. Ellen TP, Ke Q, Zhang P, Costa M (2008) NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis* 29(1): 2-8.

7. Kovacevic Z, Chikhani S, Lovejoy DB, Richardson DR (2011) Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Mol Pharmacol* 80(4): 598-609.

RTCA实时动态检测 肿瘤相关信号通路功能

前言

肿瘤发生与发展是一个多因素作用、多基因参与、经多个阶段才最终形成的极其复杂的生物学现象。肿瘤细胞的产生是正常细胞信号通路出现紊乱和异常导致的，单个信号蛋白基因突变或表达异常可影响一条或多条信号传导途径，而一条信号传导途径也会涉及到多个基因的突变，所以基因突变或蛋白表达异常的直接结果是细胞内信号传导途径调控失常，最终导致细胞生长、分裂、增殖及分化异常，引起癌变。多基因突变和多信号传导途径的网络交互作用是促进肿瘤发生和发展的主要分子机制。人体内存在多种信号通路与肿瘤直接相关，如受体酪氨酸激酶受体信号（RTKs）、MAPK 信号传导途径、WNT/ β -catenin 信号及 TGF β /SMAD 信号途径等。其中 RTKs 是人内体最大的一类酶联受体约占整个蛋白激酶组家族的 11%[1]。本文主要以 RTKs 为例，详细介绍了一种新型的基于肿瘤相关信号传导蛋白活性检测及相关激酶或抑制剂筛选技术的检测方法。

目前已发现 50 多种不同的 RTKs，如表皮生长因子受体 EGFR、血小板生长因子受体 PDGFR 及肝细胞生长因子受体 HGF α 等，RTKs 及其各类生长因子受体介导了多种细胞生物学过程如细胞增殖、存活、分化、代谢、运动和基因表达等。RTKs 表达或活性失常会诱导多种疾病的发生和发展，如癌症、炎症、糖尿病及心血管疾病等。RTKs 在细胞生物学过程及某些人类疾病中的重要性，使其逐渐成为临床开发治疗相关疾病药物的靶点。目前已有许多基于 RTKs 的抗体和小分子抑制剂被 FDA 批准，作为多种癌症的治疗药物。

RTKs 是一类膜受体激酶，其结构中包含一个细胞内激酶结构域，可从 ATP 分子中获得一个磷酸基团传递到酪氨酸残基上的羟基。当与配体结合后，能发生二聚体化或寡聚体化，从而导致自我磷酸化而活化，进而引起下游一系列效应蛋白磷酸化，激活多种信号通路，包括 Ras/MAPK、PI3K 及 PLC、Src、桩蛋

白（Paxillin）及 FAK 等，这类分子的磷酸化激活会引起胞内细胞骨架的变化，包括膜褶皱、片状伪足及丝状伪足的形成等 [2]。这些细胞学变化均由胞内肌动蛋白重排引起，并受小分子 GTPases Rac, Rho 及 Cdc42 蛋白调控 [3]。目前，现有的 RTKs 抑制剂筛选平台，大致可分为以下几类：

■ 抗体依赖技术，包括阿尔法筛选，TR-FRET, FP, TRF, SPA, 流式荧光检测技术（Luminex）及 ELISA 等；

■ 抗体非依赖技术包括同位素示踪法，ATP 的消耗定量法及底物大小和电荷变化检测等。

虽然这些技术具有一定的优势，但也存在许多缺陷，例如繁琐复杂的优化步骤，底物承载力的有限性，分析试剂的背景干扰及试剂成本昂贵等，所有这些因素均可影响检测信号的稳定性，及结果的有效性，检测通量方面也存在一定的局限性。

艾森生物自主研发的基于微电子传感器原理的实时无标记细胞分析技术（RTCA, Real Time Cellular Analysis），可对细胞实现实时无标记动态监测，检测过程对细胞无损伤 [4]。该技术将微金电极整合于 E-Plates 细胞培养板底面，电极覆盖率 >80%，接种后的细胞黏附于检测板底部，并进行黏附、生长及增殖，细胞这些状态改变引起电阻抗的变化都被 RTCA 细胞功能分析仪 xCELLigence 系统识别，并对细胞生物学状态变化进行量化。

xCELLigence 已成功应用于细胞增殖、毒性、黏附及 G 蛋白功能检测等研究领域，本文主要介绍了这种新型的基于阻抗检测原理的技术在 RTKs 活性分析试验中的应用。该方法克服了上文提及的传统检测手段中的缺陷，为 RTKs 抑制剂的筛选及鉴定提供了一种简便、易行的分析平台。与传统方法比较，该技术具有更好的检测特异性、可靠性及重复性，可有效的应用于 RTKs 相关激酶及抑制剂的筛选。同时，该平台也可提供单个药物的剂量效应曲线，可更好的对相关激酶或抑制剂进行定性。

材料与方法

细胞培养与试剂

COS7 细胞源自 ATCC, 培养于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中, 培养基为 10% FBS+DMEM。试验时, 细胞 1 × 10⁴/孔接种于 E-Plates 检测板, 孵育过夜, 药物处理前, 先用含 0.25% BSA 无血清 DMEM 培养基饥饿 4h。若需抑制剂处理, 则需在饥饿过程中最后 1h 加入抑制剂, 再加入生长因子或药物刺激。

RTCA动态检测RTKs

RTCA 实时动态检测 RTKs 诱导的细胞效应, 并以细胞指数 (CI) 的形式输出。

酶联免疫吸附法 (ELISA)

细胞 1 × 10⁴/孔接种于 E-Plates 检测板, 孵育过夜, 药物处理前, 先用含 0.25% BSA 无血清 DMEM 培养基饥饿 4h。若需抑制剂处理, 则需在饥饿过程中最后 1h 加入抑制剂, 然后加入生长因子或药物刺激 15min, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 裂解细胞, ELISA 试剂盒 (Bioss) 检测 EGFR 及 P-EGFR (1068) 蛋白含量, 450nm 处测量吸光度。

统计及数据分析

每个试验设 4 个复孔, 药物剂量依赖反应情况均以试验组与对照组比值表示。配体活力 EC₅₀ 及抑制剂效力 IC₅₀ 通过 XLfit 4.0 软件分析获取。

结果与讨论

表皮生长因子EGF及胰岛素Insulin细胞效应检测。

COS7 细胞 1 × 10⁴/孔接种于 E-Plates 检测板, RTCA 实时动态检测细胞增殖, 培养过夜后, 无血清培养基饥饿 4h, 加入 25ng/ml EGF 或胰岛素处理, RTCA 实时动态检测细胞反应, 每隔 1min 检测一次。两种因子均可引起细胞发生快速瞬时反应, 表现为细胞指数 (Cell Index, CI) 的迅速升高 (图 1A), 然后迅速下降, EGF 处理的细胞指数 (CI) 下降速率比胰岛素要快。这种短暂的细胞指数变化由生长因子诱导的

细胞骨架重排引起, 由此, 很好的指示了 RTK 受体激活效应。

为进一步验证 EGF 及胰岛素因子诱导的细胞反应的特异性, 试验前, 我们用 EGFR 抑制剂 (EGFRi) 4557W 药物预处理细胞 1h, 之后再分别加入 EGF 和胰岛素刺激。由于 4557W 药物是特异性抑制表皮生长因子受体 EGFR 作用, 因此, 初步预测该药物只会对 EGF 诱导的细胞反应有影响, 而对胰岛素诱导的细胞反应没有影响。结果显示, 加入 4557W 药物后, 胰岛素刺激引起的细胞指数瞬时反应状态没有改变, 但 EGF 刺激未引起细胞指数变化, 说明 EGFR 受体信号通路被 EGFRi 特异性的抑制 (图 1B)。

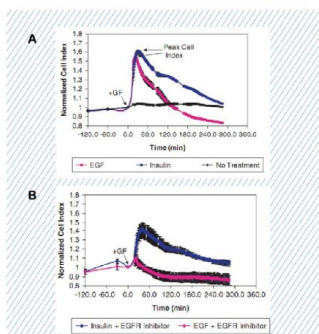


图 1. 表皮生长因子 EGF 及胰岛素刺激细胞反应特异性评估。COS7 细胞用 EGFR 特异性抑制剂处理 1h, 后加入 EGF 或胰岛素刺激。(A) 细胞经 EGF 或胰岛素刺激后, 细胞指数均呈迅速上升变化。(B) 用 10μM EGFR 抑制剂 4557W 处理细胞后, EGF 刺激引起的细胞反应消失, 而胰岛素引起的信号反应不变。

RTCA检测EGF及HGF处理COS7细胞引起特异性细胞反应

为进一步分析这种特征性细胞反应, 我们选取了一些梯度浓度的 EGF 和 HGF 因子刺激细胞, 以确定配体的 EC₅₀ (图 2A,B)。RTCA 实时动态检测不同

浓度的配体对细胞的作用情况, 每隔 1min 检测一次, 持续检测数小时。低浓度配体作用细胞引起的细胞指数 (CI) 变化幅度较小, 而高浓度配体作用引起的细胞指数 (CI) 变化幅度较大。细胞指数变化程度与配体浓度有直接相关性, 在配体浓度较高时呈饱和状态。

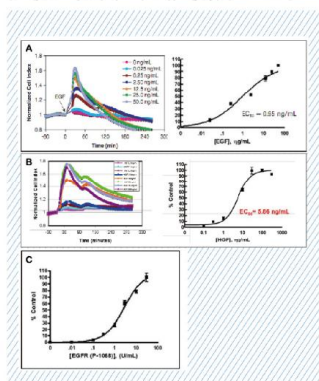


图 2. EGF、HGF 刺激 COS7 细胞引起的特异性反应。(A) RTCA 动态检测 EGF 刺激细胞引起的细胞指数变化情况。(B) 各剂量浓度配体引起的细胞最大反应性相对于配体浓度的活性-剂量依赖性曲线。(C) ELISA 试验测得 EGF 刺激细胞反应活性相对于配体浓度的活性-剂量曲线。

根据获取的细胞反应图谱, 可确定每种浓度的配体刺激细胞所引起的最大细胞指数, 同时可计算每个试验组相对于对照组的活性百分比, 并绘制相应的活性-剂量曲线, 根据该曲线计算 EGF 和 HGF 的 EC₅₀ 值分别为 0.95ng/ml, 5.9ng/ml。

这种新方法建立的同时需要考虑的一个重要因素是该方法是否与其他传统 RTK 活性检测方法获得的结果具有一致性。本试验中, 通过比较 RTCA 检测技术与经典的 RTK 活性分析方法获取的 EC₅₀ 值, 来确定 RTCA 检测方法的可行性。首先, 酶联免疫法 (ELISA) 分别检测梯度浓度 EGF、HGF 因子处理

COS7 细胞后胞内 p-EGFR 水平, 并绘制相应的配体活性-剂量依赖性曲线, 由此得出 EGF 作用于 COS7 细胞的 EC₅₀ 值为 2.6ng/ml。同时, RTCA 技术实时检测不同梯度浓度的 EGF、HGF 对 COS7 细胞的影响获得动态作用曲线, 并绘制相应的配体活性-剂量依赖性曲线, 计算得出配体 EC₅₀ 值, 并与 ELISA 试验获得的结果进行对比, 二者具有一致性, 充分证明, RTCA 检测技术可有效的用于 RTKs 活性检测, 在一定程度上可替代传统检测手段, 或作为补充。

RTCA技术筛选RTKs抑制剂条件优化

在用 RTCA 这种新型的技术筛选 EGFR 抑制剂之前, 需要对多种系统参数进行优化。首先确定合适的细胞接种数量以获取最高的细胞反应信号 (图 3A)。将一系列梯度浓度的 COS7 细胞接种于 E-Plates 检测板上测试 EGF 刺激后的细胞反应, 发现细胞指数上升的最大峰值 (CI) 随细胞数量的增加而升高, 当细胞接种密度达到一定量时, 细胞指数将不再升高, 原因是细胞数量过高的情况下, 贴附于检测板底面传感器的细胞与细胞之间的可用空间变小, 导致配体诱导的细胞形态变化不能充分被传感器捕捉到, 由此, 细胞指数不再发生显著变化。其次, 需要对配体使用浓度进行优化, 确定获得最高细胞反应信号所需最佳配体浓度。

上述优化试验完成后, 对获得的数据进行统计学分析, 主要参照 Z' 因子的分析结果 (图 3B), 评估试验的准确性和均一性。Z' 因子是一种用于检测质量评价的统计参数, 一般而言, 可以接受的 Z' 因子应大于 0.4。本试验测得 Z'=0.6, 说明试验的均一性较好。

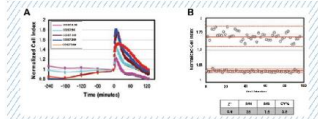


图 3. RTCA 技术筛选 RTKs 抑制剂条件优化。(A) 不同数量梯度的 COS7 细胞接种于 E-Plates, EGF 刺激细胞, RTCA 动态检测细胞反应, 每隔 1min 检测一次, 持续检测数小时。(B) EGFR 抑制剂筛选试验数据统计, Z', S/N, S/B 及 % CV 用于评估检测质量。

RTCA技术筛选RTKs抑制剂试验

为进一步验证 RTCA 技术检测 RTKs 活性的可行性，我们用 RTCA 技术应用于 EGFR 小分子抑制剂（Sigma）的筛选试验。这些小分子抑制剂化合物库储存在 96 孔板中，每种组分为单浓度，浓度从 5uM~10uM，化合物库中同时包含阴性对照和阳性对照化合物。确定每种抑制剂处理后 EGF 诱导的最大细胞指数，并计算抑制剂活性百分率（即实验组与对照组（仅加入 EGF，无抑制剂）的比值），当把活性标准设置在 60% 时，检测发现只有一种组分具有强效抑制作用，该组分为 EGFRi，4557W。利用该方法又检测了其他一些激酶抑制剂，发现 EGFRi 仍然是具有最强抑制作用的组分（图 4B）。EGFRi 梯度剂量效应图（图 4C），根据曲线计算出 EGFRi IC50 值为 160nM。

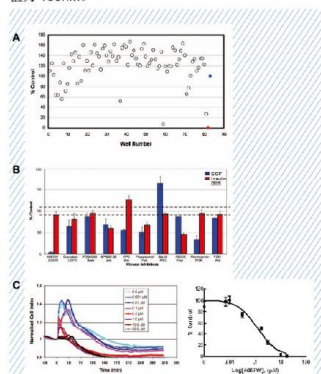


图 4. RTCA 技术筛选 RTKs 抑制剂。(A) 81 个化合物的筛选图谱，大部分化合物来源于 Sigma，单化合物稀释浓度梯度为 5uM~10uM。红色曲线代表阴性对照，蓝色曲线代表阳性对照。(B) 具有 EGFR 抑制活性的激酶类化合物筛选。(C) 两类筛选试验均确定 EGFRi，4557W 为 EGFR 信号通路的潜在抑制剂。细胞与不同浓度的抑制剂处理后，测定细胞反应信号，并绘制相应的抑制剂活性—剂量浓度曲线。

上述试验结果表明，RTCA 技术可有效的应用于化合物库或多组分抑制剂库中有效成分的筛选。

RTKs配体刺激稳定细胞株反应图谱检测

除了胰岛素和 EGF 外，其他生长因子如 HGF、FGF 及 PDGF 处理不同的肿瘤细胞株也会引起相应的细胞反应。为研究这些因子的作用，我们接种了几类不同细胞株，经上述生长因子处理后测定相应的细胞反应情况（图 5）。结果显示，细胞种类不同，对各类生长因子的反应也不同。如 A431 细胞，对 EGF 和 HGF 的反应较敏感，而其他因子作用不明显。

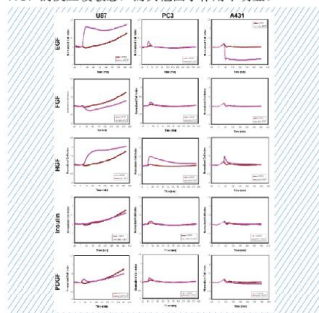


图 5. 各类 RTKs 相关配体处理不同的细胞株反应图谱比较。将细胞接种于 E-Plates，对数生长期，无血清饥饿，生长因子处理。绿色曲线代表生长因子处理细胞后反应曲线。红色曲线代表未处理细胞对照曲线。RTCA 动态检测细胞反应曲线，每隔 1min 检测一次，持续检测数小时。误差线代表标准差，每组试验设 4 个复孔。

综上所述，RTCA 技术是一项新型的、简便的适用于 RTKs 活性和功能的检测方法。该技术可对生长因子处理细胞所引起的细胞形态变化进行量化，并能模拟激酶活化引起的重要分子学事件。与传统的 RTKs 检测方法比较，该方法具有以下优点：

- 无需标记
- 实时检测
- 无损伤

该方法能够提供大量关于细胞下游信号通路激活引起的生物学状态变化信息，此外，无需昂贵的试剂（如纯化的抗体或肽段），以及免受检测试剂造成的背景干扰的优势。由于该检测技术对细胞无损伤，因此，检测板孔内的细胞在试验结束后还可用于其他试验操作。RTCA 技术也可与其他传统的基于细胞的 RTKs 检测方法配合使用。另外，该技术无需繁琐的条件优化和用户培训，常应用于小分子化合物的初筛和复筛试验。

参考文献

1. Manning G et al., (2002) *Science* 298 :1912
2. Hall, A (1998) *Science* 279 :509
3. Etienne-Manneville S and Hall A, (2002) *Nature* 420 :629
4. Solly K et al., (2004) *Assay Drug Dev Technol* 2,363-372

RTCA实时动态检测雌激素及雌激素分泌干扰物对乳腺癌细胞生长的影响

前言

肿瘤微环境是由肿瘤细胞和多种基质细胞、细胞因子、趋化因子等组成。其中基质细胞包括成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞、骨髓来源未成熟细胞等；细胞因子如TNF、VEGF、IL-1等；趋化因子如CXCL12、CCL27、CCL21等[1]。长期以来，人们研究肿瘤浸润和转移的重点在肿瘤细胞本身固有的黏附和迁移能力上。然而近些年的研究发现：肿瘤微环境中的基质细胞对肿瘤细胞的浸润和转移的形成起着非常重要的促进作用[2]。基质细胞产生的趋化因子、生长因子和基质降解酶可以促进血管生成和基底膜破坏，使肿瘤的浸润能力增强；另外，在肿瘤的转移过程中伴随着宿主骨髓来源的相关细胞向肿瘤原发部位和预转移部位的定向流动，这些细胞要么留存在原发瘤中，在肿瘤微环境中发育为相关基质细胞，促进肿瘤细胞的增殖和浸润；要么在远处预转移部位形成特殊的肿瘤预转移微环境，为肿瘤细胞的定向转移提供适宜的存活和增殖微环境。原发灶和转移灶中基质细胞的主动迁移促进了肿瘤细胞的浸润和转移能力。可见肿瘤微环境是促进肿瘤细胞浸润和转移的重要因素。肿瘤与微环境之间的相互作用也正成为近些年来肿瘤生物学研究的热点[3]。

为了能够建立更类似于体内环境的培养体系，尽可能使体外环境与体内环境相吻合，从而使细胞间能相互沟通信息，相互支撑生长增殖，20世纪80年代后期，人们在细胞培养技术的基础上发展出了细胞共培养技术。细胞共培养技术是将2种或2种以上的细胞共同培养于同一环境中的技术，由于其具有更好地反映体内环境的优点，所以这种方法被广泛应用于现代细胞研究中。传统研究肿瘤与微环境之间相互作用的细胞共培养方法，是利用transwell小室将肿瘤细胞与基质细胞共同培养一段时间后染色，显微镜观察效应细胞（Effector cell）对应答细胞（Response cell）的作用或者是通过WST方法检测应答细胞的活力，这两种方法均由于检测灵敏度不高、检测时间把握不准而具有一定的局限性。

由艾森研发的RTCA（Real Time Cellular Analysis）实时无标记细胞分析仪，基于微电子阻抗技术检测贴附于E-Plate检测板中的细胞活力，细胞的粘附能力及细胞间的相互作用。阻抗的变化与贴壁细胞的数量，大小，形状都有直接关系，而RTCA CCD细胞共培养系统由E-plate和Insert两部分构成（图1B）。在E-plate检测板中接种应答细胞，Insert中接种效应细胞，Insert中效应细胞通过分泌激素、生长因子等物质影响应答细胞的生长、增殖、形态变化或者死亡，反应在RTCA实时无标记细胞功能分析仪上的是电阻抗的变化。可见RTCA CCD细胞共培养系统使实时动态检测肿瘤及肿瘤微环境之间的相互作用成为可能，且这种检测无需对应答细胞进行额外标记。

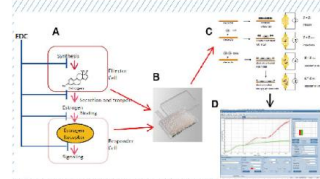


图1. RTCA实时无标记细胞功能分析仪CCD共培养系统的基本工作原理。(A)效应细胞接种于Insert中，自身能够合成和分泌激素，与接种在E-plate检测板中应答细胞表面的雌激素受体相结合，影响应答细胞的生命活动；(B,C) RTCA CCD细胞共培养系统的基本组成及工作原理；(D) RTCA实时无标记细胞功能分析仪检测得到的细胞增殖曲线图。

雌激素在乳腺癌发生发展过程的作用目前尚无定论，大量体内和体外的实验表明雌激素具有抑制乳房上皮细胞增生的能力[4]，然而流行病学研究表明雌激素水平升高与乳腺癌的发生有着密切的关系[5]。理解雌激素在乳腺癌发生发展过程中的作用，对于那些绝经后采用激素缓解身体不适，同时承担巨大患乳腺癌风险的女性有着很大的帮助[6]。本文通过RTCA实时无标记细胞功能分析仪CCD细胞共培养系统，使用T47D细胞(乳腺癌细胞系)内源性的内分泌信号通路，

研究雌激素以及雌激素分泌干扰物对 T47D 细胞生长的影响。本文还研究了雌激素受体拮抗剂 ICI-162780, 以及雌激素合成抑制剂: Ketoconazole、Anastrozole 和 Prochloraz, 在雌激素合成、分泌以及与受体结合过程中的作用。可见 RTCA CCD 细胞共培养系统可以很好的应用于研究内分泌信号通路, 包括激素的合成、分泌、与受体的相互作用等。

材料与方法

细胞

H295R 和 T47D 细胞均购自 ATCC。培养在 5% CO₂, 37° C 的培养箱中, T47D 细胞培养在含 10% FBS, 1% 青霉素 - 链霉素的 RPMI 1640 培养基中; H295R 细胞培养在含 10% Nu- 血清, 1% ITS, 1% 青霉素 - 链霉素的 DMEM/F12 中。实验前 3 天, 将 T47D 和 H295R 细胞进行细胞传代, 传代后细胞满度为 50%, 并将 T47D 和 H295R 细胞更换为实验用培养基 (无酚红 RPMI1640, 10% 木炭处理后的 FBS, 1% 青霉素 - 链霉素), 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 保证实验时细胞满度达到 80% 左右。

H295R 细胞作用下的 T47D 细胞生长检测

T47D 细胞接种于 E-plate 检测板中, 置于 RTCA 实时无标记细胞分析仪上实时监测至 24h, 同时 H295R 细胞接种于 Insert 中, 将 Insert 置于其接收板中培养, 细胞共培养时将 Insert 放入 E-plate 检测板中, 药物处理组则将药物与 Insert 同时加入 E-plate 检测板内, 持续观察 4~5 天, 检测 H295R 细胞分泌物对 T47D 细胞生长的影响。

细胞形态镜检分析

使用 Nikon 显微镜观察 H295R 细胞分泌物作用下 T47D 细胞的生长, 加入接种 H295R 细胞的 Insert 和药物后, 继续培养 4~5 天, 取出 E-plate 检测板, 使用 Diff-Quick 试剂盒染色, 显微镜观察细胞形态并使用成像系统进行记录。

实验数据分析

应用 RTCA 系统自带软件可对实验全过程, 即包括细胞接种、贴壁、伸展、生长和在 Insert 中细胞分泌物作用下生长过程的实时监测。RTCA 系统使用细胞指数 (Cell index, CI) 表示细胞阻抗。每个时间点的 CI 值定义为 (Rn-Rb)/15, 其中 Rn 表示孔接种有细胞时某个时间点的电极阻抗值, Rb 表示孔内只有培养基时的背景阻抗值。

结果和讨论

H295R 细胞分泌物对 T47D 细胞生长曲线的影响

T47D 细胞能够被不同的类固醇激素激活, 如雌激素或者孕激素, 引起细胞数目或者细胞形态的变化, 这种细胞数目或形态的改变能够被置于 E-plate 检测板底部的微电极检测到。T47D 细胞本身能够表达雌激素受体 (estrogen receptor, ER), 接种于 E-plate 检测板上作为受体细胞; H295R 细胞为人肾上腺皮质瘤细胞系, 能够产生不同的类固醇激素, 如雌激素、孕激素以及类固醇合成酶 (steroidogenic enzymes, CYPs) 接种于 Insert 中作为效应细胞 [7], H295R 和 T47D 细胞共培养时间依赖性的诱导 T47D 细胞的增殖和形态改变, 且 T47D 细胞的特异性反应图谱与与之共培养的 Insert 中 H295R 细胞的数目相关。

实验前 3 天, 将 T47D 和 H295R 细胞进行传代, 并将 T47D 和 H295R 细胞更换成实验用培养基, 即无酚红 RPMI1640, 10% 木炭处理后的 FBS, 1% 青霉素 - 链霉素, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞满度达到 80% 左右时用于实验。H295R 细胞接种于 Insert 中, 将 Insert 置于其接收板内培养, 同时 T47D 细胞接种于 E-plate 检测板中, 置于 RTCA 实时无标记细胞分析仪上实时监测其生长至 24h, 将 Insert 置于 E-plate 检测板中, 如图 2A 所示, 持续监测 4~5 天, 观察 H295R 细胞的分泌物对 T47D 细胞生长的影响。结果表明与未用 H295R 细胞共培养组相比, 与 H295R 细胞共培养促进了 T47D 细胞的生长 (图 2B), H295R 细胞的密度越高, 这种促进作用越强, 细胞共培养至 120h 后, 对 E-plate 检测板中的 T47D 细胞进行染色, 显微观察也证实 H295R 细胞密度越高, 对

T47D 细胞的生长和增殖的促进作用越强。

为了证明这一促进作用是雌激素特异性的, 实验时在共培养系统加入雌激素受体的拮抗剂 ICI-162780, 结果如图 2C 所示, 1μM 的 ICI-162780 的加入与未与 H295R 细胞共培养组接近, 对 T47D 细胞的生长和增殖无明显促进作用。可见 T47D 细胞生长和增殖作用的增强却确实是雌激素特异性引起的。

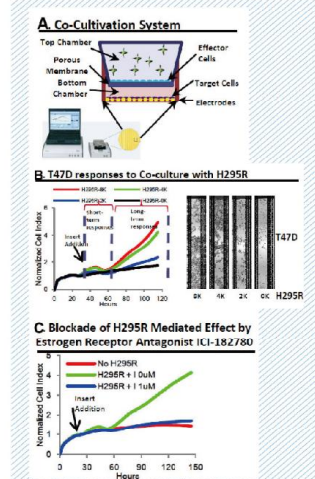
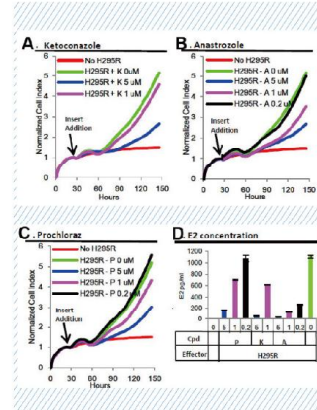


图 2. H295R 细胞分泌物对 T47D 细胞生长曲线的影响。(A) RTCA CCD 细胞共培养系统工作原理示意图: T47D 细胞作为效应细胞, 接种于下室 E-plate 检测板中, H295R 细胞作为效应细胞接种于 Insert 中, T47D 细胞响应可以通过 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪实时监测; (B) 不同密度梯度的 H295R 细胞对 T47D 细胞生长和增殖的影响, H295R 细胞密度越高对 T47D 细胞的增殖促进作用越强, 实验结束后的显微染色观察与细胞指数结果一致; (C) 雌激素受体的拮抗剂 ICI-162780 对 H295R 细胞与 T47D 细胞共培养体系的影响。可见雌激素受体的拮抗剂 ICI-162780 明显抑制了 H295R 细胞分泌的雌激素对 T47D 细胞增殖的促进作用。

雌激素合成抑制剂对 H295R 和 T47D 细胞共培养体系的影响

为了进一步验证 H295R 细胞对 T47D 细胞增殖的促进作用是雌激素特异性的, 在 Insert 中加入浓度梯度的雌激素合成抑制剂 Ketoconazole (图 3A), Anastrozole (图 3B) 和 Prochloraz (图 3C), 持续观察细胞生长 4~5 天, 结果可见, Ketoconazole, Anastrozole 和 Prochloraz 对 H295R 细胞促进 T47D 细胞增殖作用均有明显的抑制, 且这种抑制作用呈现的浓度依赖性, 即浓度越高抑制作用越强。实验结束后, 采用 Elisa 方法检测不同浓度雌激素合成抑制剂作用后, T47D 细胞培养液中的雌激素水平 (图 3D), 与标准化处理 (Normalized 至 Insert 加入前时间点) T47D 细胞生长曲线的细胞指数 (图 3E) 相比较, 结果发现雌激素水平与细胞指数的大小呈现很好的线性相关, 相关系数 R² 为 0.883 (图 3F), 即雌激素水平越高, 细胞指数越大; 反之细胞指数越小。可见 RTCA CCD 细胞共培养系统可以很好的应用在肿瘤细胞与微环境相互作用的研究中。



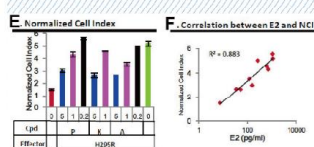


图 3. 雌激素合成抑制剂对 H295R 与 T47D 细胞共培养体系的影响。不同浓度的雌激素合成抑制剂 Ketoconazole (A), Anastrozole (B) 和 Prochloraz (C) 抑制了 H295R 细胞分泌的雌激素对 T47D 细胞增殖的增强作用。且这种抑制作用呈现浓度依赖性。实验结束时, Elisa 方法检测的雌激素的水平 (D) 与标准化后的细胞指数 (E) 呈现良好的相关性。

结论

RTCA实时无标记细胞功能分析仪CCD细胞共培养系统可以很好应用在肿瘤与肿瘤微环境的研究中。且该系统可以实现对应答细胞的响应进行实时、无标记、定量的检测。本文研究的T47D作为应答细胞与作为效应细胞的H295R共培养方法建立了研究雌激素分泌和信号通路的模型。H295R细胞分泌的雌激素促进T47D细胞的增殖,且这种促进作用与H295R细胞的数目有关,细胞密度越高,这种促进作用越强。T47D细胞对与之共培养的H295R细胞的响应能够被雌激素受体拮抗剂或雌激素合成抑制剂阻断,说明这种促进作用是雌激素特异性引起的。可见基于阻抗检测研究T47D细胞与H295R细胞共培养的模式是筛选雌激素和雌激素受体调节剂非常有力的工具。

参考文献

1. Albini A, Magnani E, Noonan DM. (2010) The tumor microenvironment: biology of a complex cellular and tissue society. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 54(3): 244-248.
2. Bergers et al. (2003). *Nature Reviews cancer*. 3:401-410.
3. Udagawa T, Wood M. (2010) Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol*, 10 (4): 369-374.
4. Dimitrakakis C, Bondy C. (2009) Androgens and the breast. *Breast Cancer Res*.11(5):212.
5. Eliassen AH, Hankinson SE. (2007) Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancer: prospective studies. In: Berstein RJ, editor. *Innovative endocrinology of cancer*. New York: Landes Bioscience. p148-65.
6. Colditz GA. (1998) Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer*. 90(11):814-23.
7. Abassi, Y.A. et al (2009). Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol* 16, 712-723.

RTCA实时动态监测NK
细胞诱导的肿瘤细胞杀伤

前言

抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC) 在免疫系统中发挥了重要作用。ADCC是指表达IgG Fc受体的NK细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等, 通过与已结合在病毒感染细胞和肿瘤细胞等靶细胞表面的IgG抗体的Fc段结合而杀伤这些靶细胞的作用。IgG抗体可介导这些细胞发挥ADCC作用, 其中NK细胞是能发挥ADCC作用的主要细胞。在抗体介导的ADCC作用的发生过程中, 抗体只能与靶细胞上的相应抗原表位特异性结合, 而NK细胞等效应细胞可杀伤任何已与抗体结合的靶细胞, 故抗体与靶细胞上的抗原结合是特异性的, NK细胞等对靶细胞的杀伤作用是非特异性的。NK细胞广泛存在于血液中, 约占血液中所有免疫细胞的15%, 血液循环中的NK细胞通常处于休眠状态, 一旦被激活, 它们会渗透到大多数脂质中攻击肿瘤细胞及病毒感染细胞等。NK细胞的ADCC作用在抗肿瘤、抗病毒感染、免疫调节有关、超敏反应和自身免疫性疾病中均发挥了重要的作用。

靶细胞受体必须与效应细胞抗体接触才能发挥ADCC作用, 细胞接触是ADCC作用的前提 [1-5]。体外研究细胞ADCC作用的方法有很多, 大部分传统方法通过检测释放到培养基中的细胞质成分间接反映细胞膜损伤 (细胞质成分已经放射物标记), 例如 ^{51}Cr 常作为标记细胞的物质 [6], 近年来许多放射性标记的特代物被用于检测ADCC效应, 例如钨螯合物和羧基酸盐等 [7,8]; 另外, 细胞中DNA完整性也可反应细胞损伤程度, JAM法使用 ^3H -TdR标记靶细胞, 效应细胞与靶细胞共培养一段时间后, 收集并裂解靶细胞, 在玻璃纤维滤膜上收集靶细胞DNA并检测其放射性, 此方法的原理是最后用于计数的DNA必须是从活细胞中收集并整合有 ^3H -TdR的完整DNA分子; 也可以通过流式细胞仪检测细胞中的caspase-3、caspase-6或annexinV染色来评价效应细胞对靶细胞的杀伤效应。

这些传统的体外研究ADCC的方法都依赖于标记物, 可能对细胞产生破坏, 且多是终点检测法, 仅提供单次实验结果, 无法实时监控效应细胞的ADCC作用。

艾森生物开发的实时无标记细胞分析仪 (RTCA, Real Time Cellular Analysis) 可实现实时无标记地研究效应细胞对靶细胞的ADCC作用, RTCA实时无标记细胞分析仪基于电子阻抗技术[9], 在E-Plate检测板底部整合微金电极, 细胞贴附于微金电极表面后会引起微金电极电阻抗发生变化。微金电极的电阻抗由细胞膜与电极接触的面积及黏附力大小而决定, 研究表明细胞贴壁、黏附、伸展、形态改变、增殖、屏障功能、死亡等都会影响金电极电阻抗 [10-13]。具有细胞杀伤作用的效应细胞受体会诱导靶细胞与金电极黏附力减弱, 细胞骨架发生变化, 细胞变圆, 脱离微金电极表面, 最终诱导细胞凋亡。这些细胞生物学现象引起微金电极表面电阻抗变化[14]。本研究的主要目的是比较RTCA技术检测ADCC和传统方法检测ADCC作用的结果。

材料方法

细胞

靶细胞: 本试验中使用的MCF-7 (ATCC HTB-22), A431 (ATCC CRL-1555™) 及 SCC-25 (ATCC CRL-1628™) 购自ATCC, 所有细胞均培养在5% CO_2 , 37°C的培养箱中, 试验中用到的胎牛血清均经过灭活处理, 细胞使用之前保证每周传代2-3次。

效应细胞: NK-92(ATCC CRL-2407™) 购自ATCC, 培养在5% CO_2 , 37°C的培养箱中, 使用含150U/ml人白介素素2的Myelocult培养基传代。人白介素素活化NK-92的方法简单介绍一下: 使用NK细胞分离试剂盒II (Miltenyi Biotec GmbH, Gergisch Glad-bach, Germany) 分离外周血单核细胞中的NK细胞。纯化后的NK细胞培养于含有10%热灭活的人AB血清, 3μg/ml植物血凝素及200U/ml人白介素素2的AIM-V培养基中, 并在前五天和丝裂霉素C处理过的人外周血单核细胞共培养 [15]。

试剂: CyQUANT 细胞增殖检测试剂盒购自Molecular Probes™ (Invitrogen); ^3H -TdR 购自Amersham Biosciences。

RTCA实时动态检测细胞黏附与细胞毒性

细胞黏附

本试验使用艾森生物RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态监测细胞状态。首先预处理E-Plate检测板: 使用人重组层粘连蛋白-5包被E-Plate检测板, 并用含0.5%胎牛血清的PBS封闭0.5h。预处理板子之后向每孔中加入相应浓度的SCC-25细胞 (12,500, 25,000, 及50,000 cells/well), RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态检测SCC-25细胞CI值变化, 1h后洗去未黏附的细胞, E-Plate孔中黏附的细胞使用CYQUANT试剂盒检测细胞活性。

细胞活性检测

采用 ^3H -TdR掺入法检测E-Plate中贴壁细胞活性, E-Plate检测板接种不同浓度MCF-7细胞 (16,000, 8,000, 4,000, 2,000, 1,000, 0 cells/well), 置于RTCA细胞功能分析仪检测台上过夜检测, 第二天培养基中添加0.5μCi/ml ^3H -TdR培养5h, 到达设定时间后用细胞培养基洗涤细胞三次以去除残留的 ^3H -TdR, 并加入NK细胞混悬液, 分别在NK细胞作用的2, 4, 6及24h洗去未贴壁靶细胞, 并检测E-Plate检测板中贴壁细胞荧光值。

JAM法检测普通96孔细胞检测板中细胞活性。靶细胞接种于普通96孔细胞培养板, 分别在NK细胞作用靶细胞2, 4, 6, 12及24h后用预热的培养基洗涤96孔板, 使用Packard Bioscience公司半自动细胞收集器收集细胞后将细胞转移入带玻璃纤维滤膜的UniFilter 96微孔板 (Millipore, Billerica, MA), 并使用TopCount NXT™微孔板闪烁和发光计数仪检测荧光值。

细胞形态观察

使用倒置荧光显微镜 (Birkerod, Denmark) 观察细胞形态。细胞用PI染色30min并使用倒置荧光显微镜观察细胞形态, 或者先去除E-Plate中的培养基,

PBS洗涤细胞3次, 加入甲醇固定10 min, 去除甲醇室温干燥E-Plate, Giemsa室温染色10 min后在显微镜下观察细胞形态。

试验结果

RTCA实时动态监测细胞黏附

SCC-25细胞 (12,500, 25,000 及50,000 cells/well) 接种于已包被层粘连蛋白-5的E-Plate检测板, 并实时动态检测细胞CI值的变化, 持续1h, 可见CI值持续上升。1h后取出E-Plate, 用37°C预热的培养基洗涤E-Plate检测板3次, 随后将检测板放回检测台检测CI值变化, 细胞洗涤前后CI值无显著差异 (数据未显示)。细胞数量通过CyQUANT法计算获得, 在此方法中细胞密度在500-50,000之间线性相关良好 (数据未显示), 因此可使用CyQUANT法获得细胞数量与CyQUANT-GR荧光值的关系拟合标准曲线, 并由此计算实验中贴壁细胞的数量。图1A表明CI值与粘附细胞数量成正比。试验还检测了以一定的细胞密度 (12,500 cells) 接种于不同浓度粘连蛋白包被的E-Plate检测板时CI曲线值的变化情况, 结果显示, 当细胞数目一定时, CyQUANT测得的细胞数量与CI值没有明显关系, 但是CI值与粘连蛋白的浓度成正比 (图1B)。

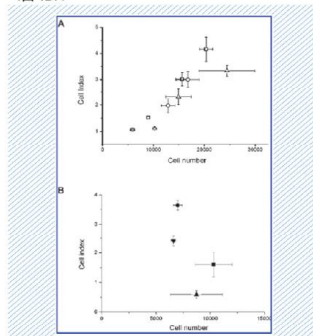


图1. RTCA实时动态检测细胞黏附, (A) 已包被层粘连蛋白-5的

E-Plate 检测板中接种不同密度的 SCC-25 细胞 (12,500、25,000 及 50,000 cells/well)，置于 RTCA 检测台，持续检测 1h，用预热的培养基洗涤细胞 3 次，更换培养基后再次检测细胞 CI 值，最后 CyQUANT 法检测细胞活性。每实验组设置 4 个复孔。结果表明细胞 CI 值大小可以反应细胞数量多少。(B) E-Plate 检测板包被不同浓度的尿黏蛋白 -5 [10 μ g/ml (■), 3 μ g/ml (▼), 1 μ g/ml (▲) 及 0.3 μ g/ml (▲)] 后接种 SCC-25 细胞 12,500 cells/well。从实验结果中可以发现，孔中接种细胞数量一致时，CI 值与包被基质的浓度成正比。

本试验还检测了 MCF-7 细胞以不同密度接种时细胞的增殖曲线。MCF-7 以不同密度接种于 E-Plate 检测板，过夜检测，获得 CI 值变化曲线 (图 2A)，最后一次检测细胞 CI 值前用预热的培养基洗涤 3 次 E-Plate 检测板。从图 2B 可见细胞接种量与细胞结合的 3 H-TdR 线性相关良好，图 2C 显示 CI 值与 3 H-TdR 测得的细胞数量成正比，且线性关系良好。

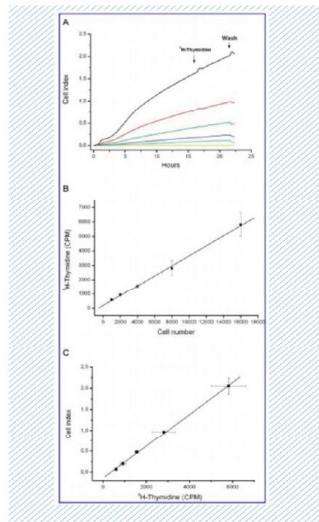


图 2. 不同接种密度 MCF-7 的细胞生长 CI 曲线及细胞中 3 H-TdR

摄入量。(A) E-Plate 检测板中接种不同密度的 MCF-7 细胞 [16,000 (—), 8,000 (—), 4,000 (—), 2,000 (—), 1,000 (—), 或 0 (—) cells/well]。RTCA 实时动态记录细胞 CI 值变化，16 h 后向培养基中加入标记物 3 H-TdR，继续培养 5 h 后弃去培养基洗涤细胞 3 次并检测细胞中的标记物放射性；(B) 细胞接种后 24 h 检测细胞接种密度与 3 H-TdR 摄入量的线性关系 ($r=0.99902$)；(C) 细胞接种后 24 h 检测细胞 CI 值与 3 H-TdR 摄入量的线性关系 ($r=0.99848$)。

RTCA实时动态检测NK细胞介导的细胞死亡

E-Plate 中接种 8,000 cells/well MCF-7 细胞，并置于 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪过夜检测细胞 CI 值，CI 曲线随细胞的贴壁及增殖而上升 (图 3A)。过夜培养后向细胞培养基中加入 3 H-TdR 预培养 5 h，随后接种 NK-92 细胞。从曲线可见 NK-92 细胞加入目的细胞时 CI 曲线有微小的上升 (这可能与操作及培养环境的细微变化有关，不影响试验结果的准确性)，随后 CI 曲线明显下降，下降程度取决于 NK-92 细胞的接种密度。需要注意的是，由于 NK-92 细胞是悬浮细胞，对 CI 值影响极小，经实验可见单独接种 NK-92 细胞不会产生 CI 值。

NK-92 细胞作用 MCF-7 2.5、4.5、6 及 24 h 后分别检测靶细胞数量。NK-92 细胞诱导的靶细胞死亡呈时间依赖性：用 3 H-TdR 法测得 NK-92 细胞作用 MCF-7 2.5 h 靶细胞数量下降不明显，作用 4.5 及 6 h 靶细胞数量显著下降；而 RTCA 细胞功能分析仪上 CI 值在 NK-92 细胞加入之后立即下降 (图 3)。本实验还使用普通 96 孔板通过 3 H-TdR 掺入法验证，结果与 E-Plate 检测板完成实验得到的结果一致 (图 3D)。

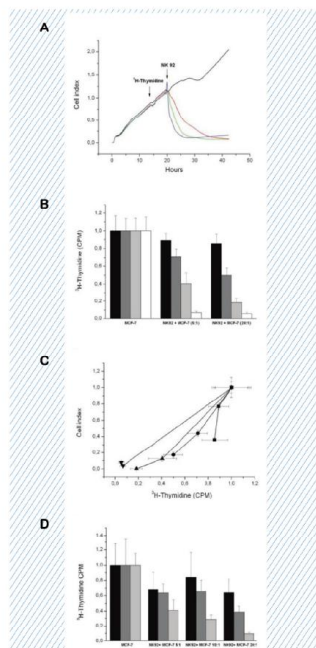


图 3. NK-92 诱导的 MCF-7 细胞死亡过程中靶细胞 CI 值与 3 H-TdR 摄入量之间的关系比较。(A) RTCA 细胞功能分析仪实时动态检测 MCF-7 细胞 CI 值变化，E-Plate 检测板中接种 8,000 cells/well MCF-7 细胞后置于检测台，RTCA 实时动态检测细胞 CI 值变化，13 h 后向细胞培养基中添加 0.5 μ Ci/ml 3 H-TdR 标记靶细胞，标记物培养 5 h 后弃去培养基，按不同比例加入适量 NK-92 细胞 [效 - 靶比分别为 0:1 (—) 2:1 (—), 5:1 (—), 或 20:1 (—)]，NK-92 细胞迅

速诱导靶细胞 CI 值下降，下降的速度与效应细胞添加量正相关。(B) MCF-7 细胞在不同密度 NK-92 细胞 (效 - 靶比为 0:1, 5:1 及 20:1) 作用的不同时间后 [2.5 h (黑色), 4.5 h (深灰色), 6.0 h (浅灰色), 23 h (白色)] 细胞内 3 H-TdR 含量。(C) NK-92 细胞作用不同时间后 [2.5 h (■), 4.5 h (●), 6.0 h (▲) 及 23 h (▼)] 靶细胞 MCF-7 细胞 CI 值与细胞内 3 H-TdR 含量间的关系。(D) 普通 96 孔细胞培养板中用 JAM 法测定细胞存活率。普通 96 孔细胞培养板中接种 8,000 cells/well MCF-7 细胞，过夜处理后向培养基中加入 3 H-TdR 标记细胞，预培养 3 h 后加入 NK-92 细胞。在 NK-92 细胞共培养一定时间后 [2 h (黑色), 4 h (深灰色) 及 6 h (浅灰色)] 弃去培养基，洗涤细胞 3 次后检测细胞存活率，细胞中放射性物质的含量取决于靶 - 效比及效应细胞作用的时间。

细胞形态分析

PI 染色的结果显示 NK-92 细胞作用 2 h 及 4 h 细胞的完整性依然很好，但在 NK-92 细胞作用 6 h 后细胞发生了明显变化，向培养基中加入 PI 染料，大量细胞被染色，但是用 PBS 洗涤可洗去大部分的染色细胞，孔内仅剩余少量贴壁细胞，从细胞固定及 Giemsa 染色的结果可以看出 NK-92 可以诱导靶细胞聚集，皱缩，作用 6 h 后细胞已大部分皱缩成团。

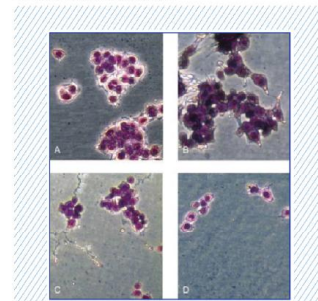


图 4. NK-92 细胞诱导的 MCF-7 细胞形态的变化。(A) 普通 96 孔细胞培养板中接种 8,000 cells/well MCF-7 细胞，细胞培养 24 h 后 Giemsa 染色并拍照；MCF-7 细胞接种 24 h 后加入 NK-92 细胞处理 (B) 2 h; (C) 4 h 及 (D) 6 h 后 Giemsa 染色并拍照。

RTCA细胞功能分析仪实时动态检测ADCC效应

人表皮生长因子受体 (EGFR) 在A431细胞系中高水平表达, 可用于检测爱必妥 (Erbix) 引起的ADCC效应。爱必妥是免疫球蛋白G1的人源化嵌合单克隆抗体, 与EGFR有高度亲和性, 可以阻断生长因子EGF与受体EGFR的结合, 这一竞争性结合的后果是使受体失活, 阻断信号传导通路, 从而抑制相关配体结合后的酪氨酸激酶活性, 并抑制通路激活诱导的A431细胞生长。当在培养基中添加爱必妥 (Erbix) 时, 可提高NK细胞产生的ADCC效应。该反应与美罗华 (MabThera) 相似, 美罗华单抗可与纵贯细胞膜的CD20抗原特异性结合。此抗原表达于95%以上的B淋

巴细胞型的非何杰氏淋巴瘤。美罗华单抗与B淋巴细胞上的CD20结合, 并引发B细胞溶解。

E-Plate检测板接种适量A431细胞, 并在RTCA细胞功能分析仪上过夜检测, 在活化的NK细胞作用A431细胞前1h E-Plate检测板中添加梯度稀释的爱必妥单抗 (图5B)。爱必妥本身并不产生毒性效应, 但是与NK细胞联合使用则可增加ADCC作用, 诱导细胞CI曲线下降。美罗华与爱必妥引起的细胞CI曲线变化的趋势相似, 但美罗华的作用明显较弱, 图5A显示了CI曲线的下降速度与这两种药物作用呈剂量依赖效应。

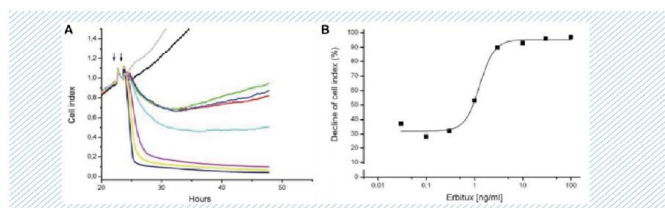


图 6. RTCA 实时动态检测 NK-92 对 A431 的细胞杀伤作用。(A) NK-92 作用 A431 诱导的细胞 CI 指数动态变化曲线。E-Plate 中接种 A431 细胞 (8,000 cells/well), 过夜培养后添加 NK-92 细胞 (160,000 cells/well 效-靶比: 20:1) 联合爱必妥或美罗华联合作用 A431 细胞。对照组 (—), 爱必妥 (1 μ g/ml) (---), NK-92 联合美罗华 (30 μ g/ml) (·····), NK-92 联合美罗华 (0.0003 μ g/ml) (—), NK-92 (—), NK-92 联合爱必妥 (0.001 μ g/ml) (—), NK-92 联合爱必妥 (0.003 μ g/ml) (—), NK-92 联合爱必妥 (0.01 μ g/ml) (—), NK-92 联合爱必妥 (0.03 μ g/ml) (—), 爱必妥单独作用不会诱导细胞 CI 值下降。NK-92 细胞单独作用或联合美罗华作用时细胞指数下降了 30%, NK-92 细胞联合爱必妥能引起细胞 CI 值急剧下降。(B) NK-92 联合爱必妥剂量依赖性细胞指数曲线, 爱必妥半数有效浓度 $EC_{50}=1.3$ ng/ml。

讨论

细胞黏附依赖于贴壁细胞与材料表面的黏附力, 本试验使用RTCA技术结合传统方法测定细胞黏附力大小。使用层粘连蛋白-5作为基质包被E-Plate检测板, 同一基质浓度下黏附的细胞数量与CI值线性相关 (图1B), 不同的浓度的基质包被时CI值与基质浓度呈正比, 该方法与传统方法检测的结果是一致的。本试验使用CyQUANT法及³H-TdR掺入法计算细胞数量, MCF-7细胞量与CI值线性相关良好, 也就是说可

以通过阻抗法实时动态持续的检测细胞数量。通过CI值反应细胞数目在其它细胞株中也是可行的, 例如人骨肉瘤细胞U2OS及人卵巢癌细胞A2780 [12]。

本试验使用MCF-7作为NK-92细胞作用的靶细胞, NK-92细胞能有效地诱导MCF-7细胞CI值下降, CI值下降速率取决于效-靶比。那么CI曲线是否能反映细胞的存活率呢? 为验证这个想法, 实验还计算了NK-92细胞作用的不同时间点靶细胞的数量, 由于

CyQUANT法检测细胞活性时被染色的NK细胞会影响靶细胞活性检测, 最终实验选择采用³H-TdR标记法计算贴壁细胞数量。结果显示在NK细胞作用的前几小时, 靶细胞CI值与活细胞数量对应关系不明显 (图3), 效-靶比为5:1和20:1培养2.5h后CI值分别下降了60%及80%, 但³H-TdR荧光值仅仅下降了10-15%。JAM法同样获得了相似的结果, JAM实验在普通96孔板中完成, 使用³H-TdR标记靶细胞, 用玻璃纤维滤膜上收集完整的DNA (图3D), 并检测所收集的DNA中放射性物质的含量[17]。A431培养基中添加EGFR特异性抗体联合使用可作为检测ADCC作用的靶细胞, 本试验使用EGFR特异性抗体爱必妥, 梯度稀释后联合NK-92细胞作用靶细胞MCF-7检测其ADCC作用, 并绘制CI剂量依赖 (dose-response) 曲线, 结果表明爱必妥和NK细胞联用能剂量依赖性增加靶细胞CI曲线下降, 爱必妥的半数起效浓度 EC_{50} 为 1.3ng/ml。这一结果与Bleeker等的实验结果一致 [18]。

从细胞形态图可以看出在NK细胞作用的前4h只有少量的细胞染上了PI, 表明细胞还未发生坏死, 而NK细胞作用6h后凋亡细胞的量明显增加 (图4), 这和Vujanovic等人的实验结果一致。实验结果表明在NK细胞诱导靶细胞活性下降之前CI值已经明显下降, 由于NK细胞诱导靶细胞死亡过程非常复杂, 目前对其作用细节并未研究透彻, 我们推测NK细胞诱导靶细胞CI值的下降是由细胞形态改变及细胞骨架完整性受损引起的, 细胞这些变化会减弱其黏附效果, 最终诱导靶细胞凋亡。

综上所述, RTCA技术无需标记, 可实现全程实时动态检测效应细胞对靶细胞的ADCC作用, 包括细胞发生的一些不可预知反应, 这是传统终点法无法做到的。

参考文献

1. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-274.
2. Yokohama WM. Natural killer cells. In: *Fundamental Immunology* (Paul WE, ed.), pp. 575-603. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.
3. Henkart PA. Cytotoxic T lymphocytes. In: *Fundamental Immunology* (Paul WE, ed.), pp. 1021-1049. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.
4. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-747.
5. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3: 361-370.
6. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. 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* 1968;14:181-196.
7. Blomberg K, Ulfstedt AC. Fluorescent europium chelates as target-cell markers in the assessment of natural killer cell cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993;160:27-34.
8. Lecœur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multi-parametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001;253:177-187.
9. Zhu J, Wang XB, Xu X, Abassi YA. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* 2006; 309:25-33.
10. Wegener J, Keese CR, Glaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res* 2000;259:158-166.

11. Abassi YA, Jackson JA, Zhu J, O' Connell J, Wang X, Xu X. Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* 2004;292:195-205.
12. Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, Zheng W. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol* 2004;2:363-372.
13. Xing JZ, Zhu LJ, Jackson JA, Gabos S, Sun XJ, Wang XB, et al.. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chem Res Toxicol* 2005;18:154-161.
14. Meredith JE, Schwartz MA. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol* 1997;7:146-150.
15. Cella M, Colonna M. Cloning human natural killer cells. In: *Natural Killer Cell Protocols*(Campbell KS, Colonna M, eds.), pp. 1-4. Humana Press. Totowa, NJ, 2000.
16. Atienza JM, Zhu J, Wang XB, Xu X, Abassi Y. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen* 2005;10:795-805.
17. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* 1991;145: 185-192.
18. Bleeker WK, van Bueren JJL, van Ojik HH, Gerritsen AF, Pluyter M, Houtkamp M, et al.. Dual mode of action of a human antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol* 2004;173:4699-4707.

基于RTCA的抗肿瘤 药物高通量筛选

前言

高通量药物筛选技术是将多种技术方法有机结合而形成的新的技术体系，它以分子水平和细胞水平的实验方法为基础，以微板形式作为实验工具载体，以自动化操作系统执行实验过程，以灵敏快速的检测仪器采集实验数据，以计算机对实验获得的数据进行分析处理。细胞水平的药物筛选模型具有材料用量少、药物作用机制比较明确和大规模筛选等优点。快速、高灵敏度的检测技术是高通量药物筛选的关键技术之一。目前，在细胞水平上对肿瘤药物高通量筛选主要是采用选取肿瘤细胞系，以培养细胞为实验模型，采用液闪计数、比色法、化学发光及荧光检测等检测技术，以细胞增殖、细胞毒作用、细胞周期调控及信号转导等为检测对象进行药物筛选。然而，由于标记物的限制以及采用终点检测的方法，大大限制药物筛选的范围和准确性。

RTCA实时无标记细胞分析技术为药物筛选研究带来基于细胞的无标记分析方法。该方法可应用于细胞增殖、细胞毒作用、细胞粘附、细胞迁移及侵袭和受体应答等各个方面，应用领域广泛，包括肿瘤、炎症、糖尿病及感染等。除了无标记应用的技术优势，RTCA另一个显著的特点是实时动态检测，该方法较传统的终点法优势明显，首次为整个反应过程的分析提供综合方法，能够使用户确定操作及处理最佳时间。细胞应答动力学定量数据能够分析细胞增殖、形态改变及凋亡等生物学特点。精确的时间依赖细胞效应图谱 (time-dependent cell response profiles, TCRP) 能够提供药物作用机理、药物细胞毒作用的脱靶效应等方面的重要信息[1]。

RTCA xCelligence HT系统将xCelligence系统的优点应用到高通量筛选领域。HT系统包括安装有HT软件的控制单元、HT分析仪及4个HT工作站。每个HT工作站可检测具备生物相容性特点的384孔检测板 (E-plate 384)，基于微电子阻抗技术检测细胞的数量、形态及粘附等变化。细胞需在药物处理的前一天接种于培养板，使细胞粘附于微电极板底，培养板置

于检测台，HT分析仪通过微电极检测细胞的变化情况。阻抗值由HT软件转换为细胞指数 (cell index, CI)，CI值反映细胞的数量、形态及细胞的粘附程度。对于快速的细胞应答如G蛋白偶联受体 (GPCR) 的活化，实时检测的时间最低间隔可设为15s。HT工作站的加热模块能够确保所有的检测在生理温度进行，从而确保在生理条件进行筛选。RTCA HT平台易于整合于自动化液体处理系统，从而建立全自动的高通量药物筛选平台 (图1)。

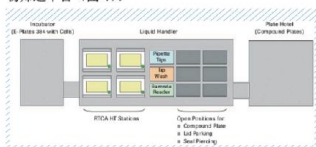


图1. RTCA整合于典型的自动化平台。HT工作站与自动化液体处理平台整合，E-plate 384自动在工作站和培养箱之间循环。

应用RTCA HT平台检测不同的细胞系会得到不同的细胞增殖图谱，可基于细胞粘附、形态及生长等表型特点进行高通量筛选；应用HT系统检测不同作用机制的细胞生长抑制剂可获得特征性细胞效应图谱，从而可在大规模筛选中预测药物的作用机制；HT系统检测的化合物药效特点与传统终点法具有良好的相关性；将某一化合物的细胞效应图谱与诱导凋亡的动力学特点相比，两种分析方法结果具有良好的一致性，可为终点法检测指示最优检测时间。综上所述，RTCA HT系统是一种可整合高通量筛选平台、易于操作的分析方法。

应用结果

借助RTCA HT系统动态检测细胞增殖

不同的细胞系具有不同的生长增殖图谱。借助HT系统检测四种不同细胞系的增殖——人宫颈癌 (Hela)、人非小细胞肺癌 (A549)、人乳腺癌 (H460) 及人纤维肉瘤 (HT1080) 细胞。接种不同密度的细胞并检测细胞80小时的增殖情况 (图2)；与细胞生长速率、形态变化及粘附力相一致，不同的细胞生长图谱不同。例如，同样以2,000/孔的密度接种，HT1080

和Hela细胞在生长30小时左右达到最大CI值，而A549和H460在80至90小时才达到最大CI值。细胞特征性的生长图谱与细胞生长速率、细胞大小及与板底电极的粘附力有关，可以用来鉴定细胞的异质性、检测细胞的污染情况以及对细胞粘附动力学、倍增时间、生长阶段等进行准确计算 [2]。上述参数在筛选细胞分化或者其他长时效应的调节因子时尤为有效，因为HT系统可用于长达数天甚至数周的分析检测。

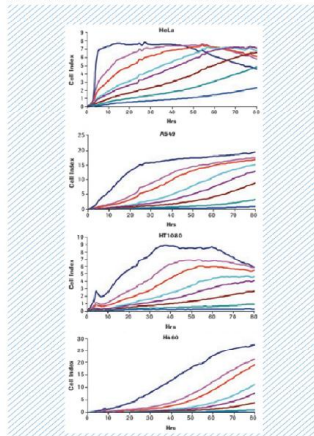


图2. RTCA HT系统检测细胞粘附和增殖图谱。细胞接种于E-plate 384，RTCA HT系统自动检测记录数据，每小时在HT工作站和培养箱之间循环一次，共进行80小时。数据代表12个重复孔的平均值。

借助RTCA HT系统动态检测细胞生长抑制剂的效应

xCelligence系统可用于细胞生长抑制剂的筛选。细胞的特征性效应图谱能预测药物的作用机理和药物的细胞毒作用 [1]。为说明RTCA HT系统在评估化合物生长抑制效果中的应用情况，应用RTCA系统检测四种不同已知作用机理的化合物对靶细胞的生长抑制效果——两种DNA损伤剂 (camptothecin 和

doxorubicin)、一种蛋白酶体抑制剂 (MG132) 和一种PI3K 激酶/mTOR 抑制剂 (PI-103)。将A549细胞接种于E-plate 384，4,000/孔，过夜培养后用相应浓度的化合物处理处于对数生长期的细胞。每小时检测CI值，共记录72小时 (图3)。所有化合物均导致CI值的下降，但是，不同作用机理的化合物引起的细胞效应图谱不同，并且均呈剂量依赖效应。DNA损伤剂处理细胞后导致短暂的CI值升高，可能与细胞形态改变有关，然后CI值呈缓慢的、剂量依赖的方式下降 (图3A,B, 左)；蛋白酶体抑制剂MG132的细胞效应图谱与DNA损伤剂类似，但起始稍快 (图3C, 左)；PI3K 激酶/mTOR 抑制剂PI-103的细胞效应图谱为在整个实验过程中CI值下降更为缓慢 (图3D, 左)。

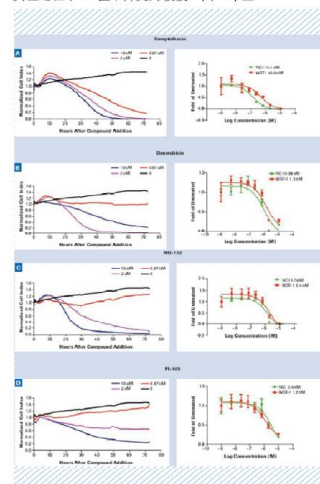


图3. RTCA HT系统检测药物的细胞毒作用。左图为RTCA HT检测结果，右图为RTCA HT和WST-1方法检测的72小时时间点的剂量效应曲线，右上角为EC₅₀值。数值为4个复孔的均值。

为验证 RTCA HT 系统检测的 CI 值是否真实体现了化合物的生长抑制效果,将 RTCA HT 系统与采用传统检测方法(基于比色的细胞增殖分析方法(WST-1))进行的平行实验比较。A549 接种于 E-plate 384,药物处理 72 小时后,加入 WST-1 孵育 1 小时,然后将裂解物转移至标准 384 板进行吸光度检测。采用 RTCA HT 和 WST-1 两种方法分析剂量效应曲线及 EC_{50} 值(图 3A-D,右),两种方法获得的 EC_{50} 拟合曲线及 EC_{50} 值相似,表明 CI 值的定量检测能够准确反映细胞存活的变化情况。

DNA 损伤剂及蛋白酶抑制剂最终均导致 A549 的凋亡,但二者动力学特点不同。为分析 CI 值的动态变化与凋亡发生的关系,用 ELISA 试剂盒检测细胞的凋亡情况。A549 细胞用 DNA 损伤剂喜树碱(camptothecin)处理,并用 RTCA HT 系统进行动态检测。同时,平行实验采用 ELISA 方法在药物处理 24、48 和 72 小时进行凋亡检测。CI 值检测及凋亡分析结果如下图所示(图 4A,B);ELISA 方法检测 24 和 48 小时药物处理显示出现明显的细胞凋亡(图 4B),分别与 CI 值的出现明显下降(约 18 小时)的时间及 CI 值达到最低值的时间(约 50 小时)结果一致。处理 72 小时,凋亡显著减少,表明大部分细胞已经死亡。

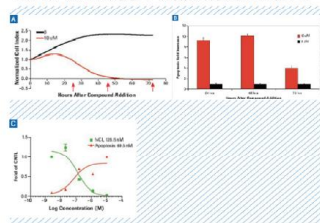


图 4. RTCA HT 和 ELISA 方法凋亡检测的比较。(A) A549 接种 E-plate 384, 6000/孔, 过夜培养, 加入喜树碱, 进行检测。红箭头表示凋亡检测的时间点。(B) 平行实验, A549 接种于 96 孔板如(A)方法处理, 按照指定时间点检测细胞凋亡。数据代表 4 个复孔。(C) 48 小时的剂量效应曲线, 分别按照(A)和(B)方法处理。右上角表明 EC_{50} 。红线表示 ELISA 方法结果, 绿线表示 RTCA HT 结果。

药物处理 48 小时, 两种方法的剂量效应曲线几乎完全重合(镜像重合);凋亡随着喜树碱浓度的增加增多, 而 CI 值则随药物浓度增加而减少(图 4C)。另外, 两种方法计算的 EC_{50} 值也相近(图 4C)。因此, 实验明确表明, RTCA HT 系统能够对凋亡进行准确的定量检测。综上所述, RTCA HT 的实时检测能够指示最佳检测时间。

讨论

RTCA HT 系统是筛选长时效细胞反应化合物的理想方法。可与自动加样系统集成最多 4 个 HT 工作站从而为培养板在培养箱与工作站之间的来回循环提供方便, 这一特点加上 HT 系统的快速检测(低至 15s)特点, 可产生高通量的筛选效果。RTCA HT 工作站装配的加热模块确保生理温度下的检测数值, 最大程度地减少读数及筛选过程中的对细胞的影响。因此, RTCA HT 系统可进行数天甚至数周的小分子化合物筛选。

实验结果表明 RTCA HT 系统可检测不同形态、粘附及生长特点的细胞的特征性效应图谱(图 2)。RTCA HT 系统可针对疾病导致的细胞凋亡、细微的形态变化及分化过程的变化等进行有效的药物筛选。对于生长抑制剂的检测, RTCA HT 系统具有高灵敏度的特点。其计算的 EC_{50} 与 WST-1 和凋亡检测等计算的 EC_{50} 高度相关。相比较于传统分析方法, xCelligence 系统的主要优势在于实时动态检测。前期工作已经证明借助 xCelligence 系统获取的时间依赖的细胞效应图谱(TCRP)可预测小分子或者 siRNA 的作用机理及其脱靶效应(1, 3)。上述四种生长抑制剂的特征性 TCRP 也验证与其相对应的三种不同的作用机理。通过与已知机理化合物的 TCRP 相比较, 可预测未知靶标新化合物的作用机理。TCRP 可看作是细胞对特定处理的固有应答的反应, 表现为细胞粘附、形态及增殖等方面, 并可作为药物的初步筛选指标。RTCA HT 系统为化合物筛选提供高通量、长时效的方法, 并可作为不同生物学功能的化合物进行基于作用机制的聚类分析。

因此, RTCA HT 系统在抗肿瘤药物高通量筛选方面, 具有显著优势:

- ◆ 能够提供基于长时效细胞应答的高通量筛选方法。
- ◆ 可检测具有不同粘附、形态及生长特点的细胞的特征细胞效应图谱。
- ◆ 可检测不同生长抑制剂的特征细胞效应图谱, 并预示其不同的作用机理。
- ◆ 可检测化合物的作用效果, 并与目前广泛应用的但更为耗时的终点法检测结果一致。

参考文献

1. Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, Feinstein SC, Wang X, Xu X. (2006). "Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects." *Chem Biol.* 16:712-23.
2. Kirstein SL, Atienza JM, Xi B, Zhu J, Yu N, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2006). "Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development." *Assay Drug Dev Technol.* 4:545-53.
3. Ke N, Xi B, Ye P, Xu W, Zheng M, Mao L, Wu MJ, Zhu J, Wu J, Zhang W, Zhang J, Irelan J, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2010). "Screening and identification of small molecule compounds perturbing mitosis using time-dependent cellular response profiles." *Anal Chem.* 82:6495-503.