

肿瘤细胞球的 3-D 成像

优点

- 利用环境控制对细胞健康动力学进行几小时甚至几天的监测
- 快速 Z 轴成像对细胞球做 3-D 重构
- 现有的培养板及简单的成像流程，研究肿瘤细胞球

很多肿瘤细胞系在适合的 3-D 培养基中都可以长成细胞球。这些细胞球被认为比长在平面上的细胞更能模拟真正的肿瘤生理过程。将细胞球培养在像 Cell-able Oncology 这样的微孔板里，就可以通过 ImageXpress® Micro 宽场高内涵系统对抗肿瘤药物进行高通量的筛选了。MetaXpress® 图像采集及分析软件能用标准应用模块分析肿瘤细胞球的活细胞/死细胞比例，评价细胞健康状态或给出增值定量数据。

Cell-able Oncology 微孔板形成细胞球

Cell-able Oncology 微孔板经过细胞外基质（ECM）包被后，肿瘤细胞可在其 100 μm 宽的 3-D 表面上生长成大小一致的细胞球，形成了可重复的，有效的药物筛选模型。由于附着在孔底表面的 ECM 上，细胞球可以做免疫荧光染色及免疫细胞化学分析。96 或 384 孔板每孔中都会长成上百个细胞球，图像捕捉系统将对这些细胞球在 Z 轴上进行快速的多层成像，并通过特殊算法把不同层的多张图像合并成一张最清晰的图片，用以分析。

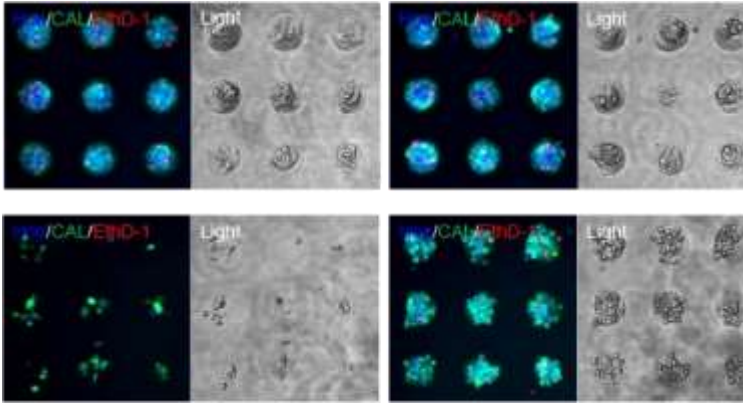
抗肿瘤药物的浓度影响细胞球大小

许多肿瘤细胞系都可以用来做抗肿瘤药物的细胞毒性评价。在此文实验中，人类前列腺癌细胞 DU145 培养在 Cell-able 肿瘤微孔板中，每孔 10,000 或 30,000 个细胞，用紫杉醇（PTX）处理三天，加药浓度从 0.1 到 1000 nM。细胞活力用 Live/Dead Cell Viability Assay 检测，细胞核以 10 μM Hoechst 33342 染色，活细胞被 2 μM Calcein AM 染色呈绿色，死细胞核被 4 μM 溴乙吡啶二聚体(EthD-1) 染色呈红色。板子在 37° 环境下孵育 30 分钟，成像前用 HBSS 清洗。在所有的实验中紫杉醇对肿瘤细胞球细胞活力的抑制作用都有浓度依赖的特点。在每孔 30,000 个细胞的孔中长出的最大的细胞球对紫杉醇有最强的耐药性（图 1）。

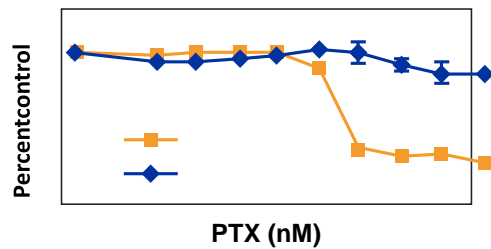
应用实时成像技术监控细胞的凋亡和坏死

我们可以利用长在 Cell-able 肿瘤微孔板上的肿瘤细胞球模型来筛选能诱导肿瘤细胞产生凋亡和坏死的抗肿瘤药物。实时监控这一过程，我们应用紫杉醇或者卡铂（carboplatin, CBDCA）处理人前列腺癌细胞 DU145，用 lapatanib 处理人肺癌细胞 PC9。用 CellEvent Caspase-3/7 绿色检测试剂（CAS）染色可以鉴别处于早期凋亡状态的细胞，溴乙吡啶二聚体（EthD-1）染色则可以鉴别坏死细胞。细胞板在 ImageXpress Micro 系统环境控制箱中培养 72 小时，并用透射光和荧光进行成像，30 分钟/次，实时图像可以用 MetaXpress 软件进行定量。如预期的一样，PTX 和 CBDCA 对 DU145 细胞及 lapatanib 对 PC9 细胞均可有效的诱导细胞凋亡及坏死（图 2）。

图 1 抗肿瘤药物浓度对肿瘤细胞球大小的影响

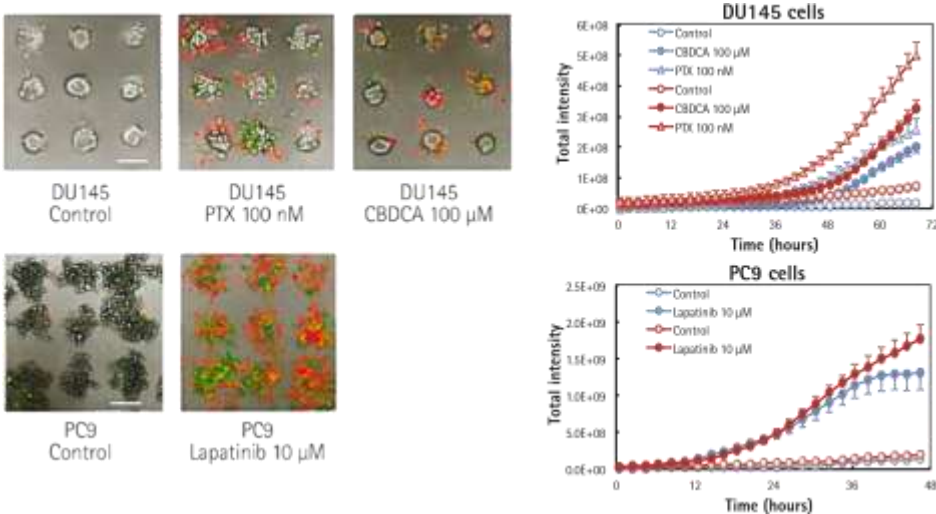


Hoe: Hoechst 33342; CAL: calcein AM; EthD-1: ethidium homodimer-1



上: 人前列腺癌细胞球 10,000 细胞/孔 (左), 30,000 细胞/孔 (右) 在 PTX 处理后细胞活力减弱。荧光 Live/Dead 细胞活力试剂染色, 所有核均染上蓝色, 活细胞为绿色, 死细胞为红色。投射光图像显示高浓度 PTX 降低细胞球的活力。
下: 折线图显示大的细胞球对 PTX 有更强的抗药性

图 2 实时监测细胞凋亡和坏死

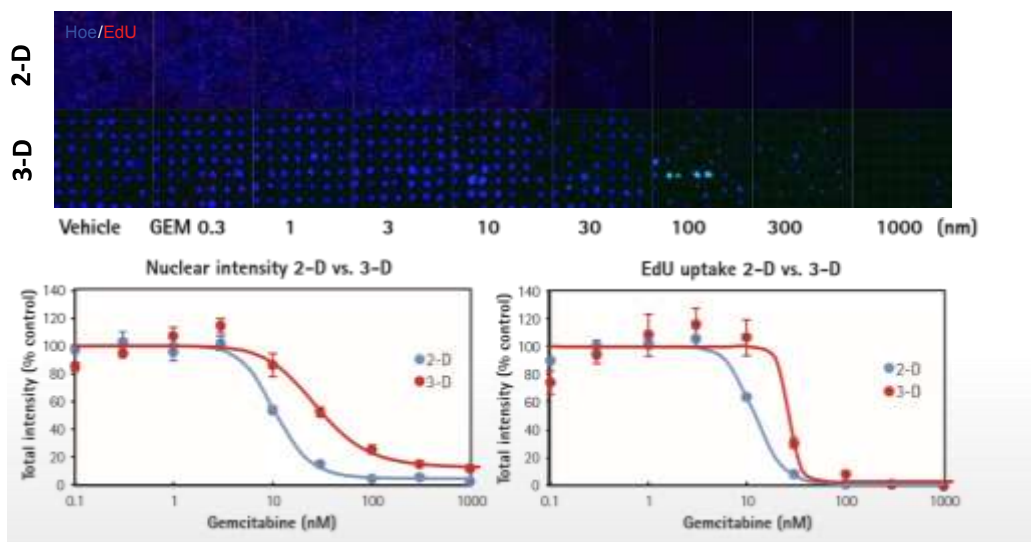


左: 实时实验的终点三色图像显示 PTX 和 CBDCA 处理的 DU145 细胞 (左上) 及 lapatinib 处理的 PC9 细胞 (左下) 的细胞凋亡和坏死情况。叠加图中, 凋亡细胞为绿色, 坏死细胞为红色。
右: 曲线图为实时图像的定量分析结果。PTX 缓慢诱导 DU145 细胞 (右上) 坏死 (红线), lapatinib 显著诱导 PC9 细胞 (右下) 坏死 (红线) 和凋亡 (蓝线)

3-D 球细胞对于化合物的抗性远高于传统平板细胞

用 2-D 方法培养与 3-D 方法培养相比在化学敏感性上存在很大差异。为了检测这种敏感性的差异，我们同时用 2-D 和 3-D 的方法培养了人前列腺癌细胞 DU-145，两天后用 0.3-1000nM 的吉西他滨 (gemcitabine) 进行处理。处理 72 小时后用 Click-iT EdU 细胞增殖试剂和 DAPI 染色做终点检测。在这两个参数中，剂量依赖的毒性效应，核染色的减少以及 EdU 摄取量降低都很明显，但是由于 3-D 细胞对化合物有抗性，所以其浓度反应有一定变化，并且 IC50 值较高 (图 3)。

图 3 比较传统 2-D 培养与 3-D 培养



上: DU145 细胞 2-D 和 3-D 培养的图像, 吉西他滨处理 72 小时后用 Click-iT EdU 细胞增殖试剂染色 (红色), 核用 Hoechst 染色 (蓝色)。细胞球用 10X PFluor 物镜成像, 每孔两个视野, Z 轴为 $8 \times 5 \mu\text{m}$ ($= 40 \mu\text{m}$)。

下: 通过核的荧光强度和 EdU 摄取量评价浓度影响。结果表明, 3-D 培养的细胞, 比起 2-D 培养的细胞, 在更高的化合物浓度产生细胞毒性, 说明 3-D 培养使细胞对吉西他滨敏感性降低。

利用 3-D 细胞球筛选药物

可以利用 Cell-able 3-D 系统培养相同大小的人肿瘤细胞球模拟体内环境, 还可以利用自动高通量技术对细胞球的药物反应进行筛选, 因此, 高内涵成像技术对于进一步发展化疗前体药物的相关预试来说是重要的里程碑。ImageXpress Micro 细胞和 MetaXpress 软件可以对微孔板里的 3-D 细胞球进行快速成像和分析, 并在此基础上检测细胞的凋亡和坏死以及抗肿瘤药物的细胞毒性, 还能比较 2-D 和 3-D 细胞的化学敏感性的差异。