

高通量筛选神经毒性

优点

- 完全自动化的图像获取与分析
- 快速得到每个细胞的多表型参数
- 实时监测活细胞的毒性，可持续几分钟至几天

神经系统对许多毒性化合物以及自然环境中生成的有害物质非常敏感。在疾病发生过程中，神经毒性可以对大脑或者外周神经系统造成短暂或持续性的损伤，例如脊髓损伤，中风，创伤性脑损伤等。同时这种神经毒性也是造成很多神经退行性疾病诸如阿尔兹海默和帕金森的主要诱因。

诱导人多功能干细胞的高通量成像技术可以用于筛查候选药物或者环境污染物的神经营养，保护功能或者神经毒性大小。本篇说明会阐述如何结合 iPSCs，分子仪器和软件自动对诱导多功能干细胞进行终点法及活细胞的神经毒性筛选。

以 iPSC 为基础的毒性筛查

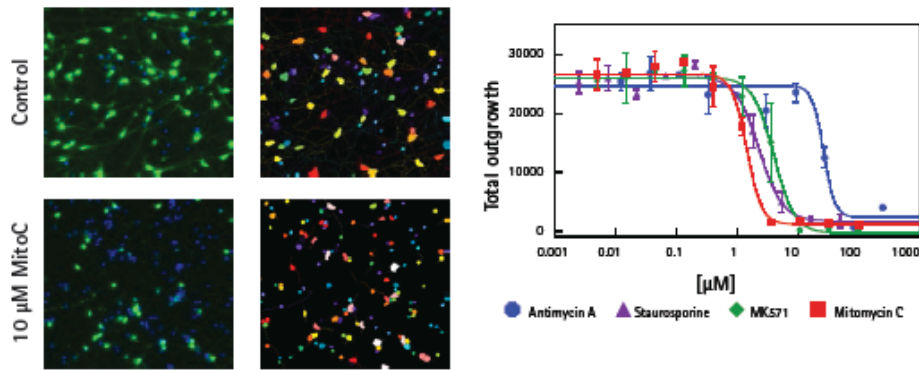
诱导多功能干细胞技术对我们研究神经元毒性是十分有用的，iPSCs 可以大批量的展示成熟神经元的功能。如果将这种独特的生物学相关的细胞类型和高通量成像分析结合在一起，我们就可以快速的筛选出在引起神经元毒性中起主导作用的化合物并大大减少临床前研究和相关动物实验的成本。此篇中用到的是 Cellular Dynamics International 公司完全分化的人神经细胞。

量化完整的神经细胞网

高通量分析是一种量化的分析方法，其可以测量神经突触长度表征被测物的阳性或阴性作用。iPSC 衍生的神经元细胞可以在 3-5 天内于 96 或者 384 孔板中形成神经网络，然后用毒性化合物刺激 48-72 小时。神经网络被 β -tubulin 标记后，可利用 ImageXpress[®] Micro 宽敞成像系统获取图像。和抗体我们可以实现神经网络的可视化。使用 MetaXpress[®] 图像处理软件中 Neurite Outgrowth 模块和 AcuityXpress[™] 高内涵数据分析软件对相关图像和实验数据进行分析。

无论是否进行了细胞核复染色，Neurite Outgrowth 模块都能找到神经细胞胞体，并根据这些荧光标记的神经细胞轴突将之标定为阳性细胞。神经网络具有几个重要的特征参数包括轴突数目，轴突长度，每个细胞或者区域的分支数。我们可以针对每个孔的相关数据和细胞表型进行计算和统计。

Neurite Outgrowth Application Module results (Figure 1)

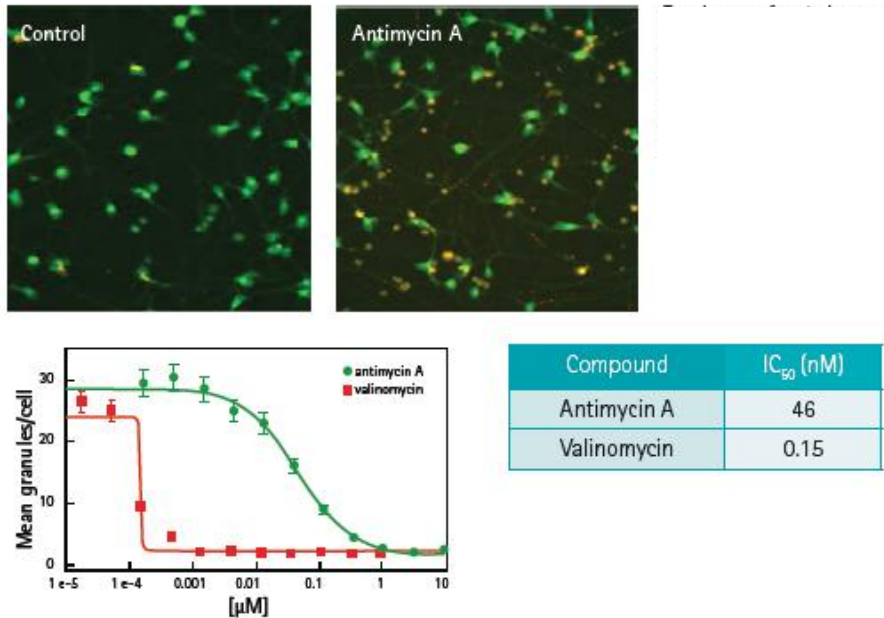


Total neurite outgrowth	
Compound	IC ₅₀ (μM)
Antimycin A	13.0
Staurosporine	0.9
MK571	4.1
Mitomycin C	0.7

上左：对照和高浓度药物的 Neurite Outgrowth 模块分析图像结果，蓝色为核，绿色为 β -tubulin III 标记的神经突触。上右：毒性化合物的总突触计量反应曲线。下：由总突触计量反应曲线计算出的 IC₅₀ 值。

检测线粒体膜电位

Neurons treated with Antimycin A (Figure 2)



上：对照和 Antimycin A 处理的神经元细胞图像，细胞被 JC-10 染色。图像所示为 20 倍镜拍摄。下：计量反应曲线绘制依据每个细胞平均线粒体/颗粒数比值。

线粒体膜的去极化过程被认为是缺氧性损伤和细胞毒性的重要早期标志，运用 JC-10 染

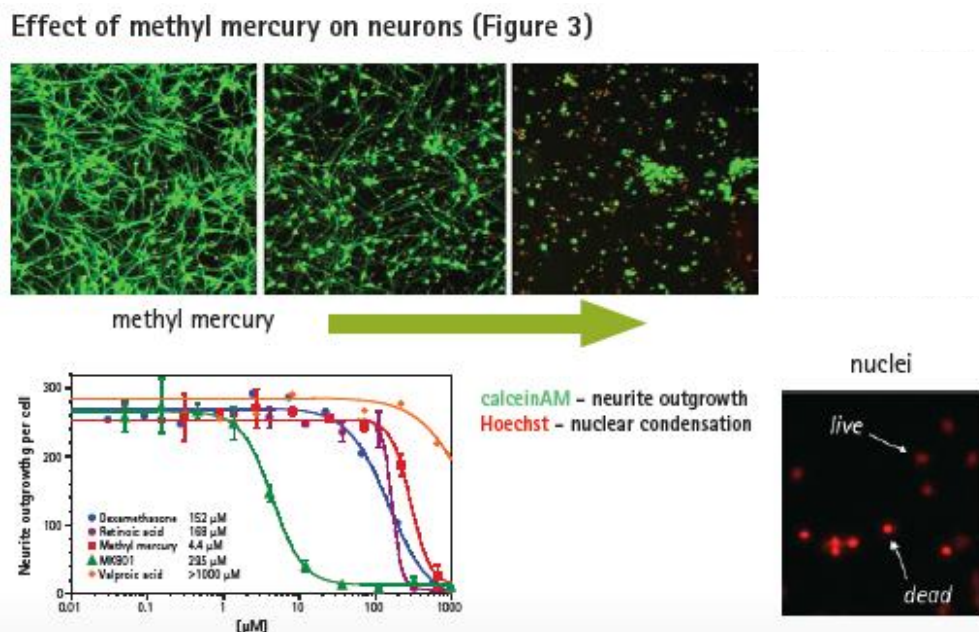
料可以对线粒体膜电位进行监测。在正常细胞中，聚集在线粒体中的 JC-10 呈橘红色，而当线粒体内膜电位降低后，JC-10 则从线粒体中以单体形式释放到细胞质中并发出绿色荧光。

用 JC-10 对神经细胞进行染色并用抗霉素或者氨基霉素处理 30min，后两者可以有效阻断细胞的氧化呼吸过程及钙离子过载。用户可以自定义 MetaXpress Software 中的 Granularity 模块来识别线粒体中 JC-10 的密度和大小。数据结果将被标准化到每个视野。

检测活细胞毒性

运用 Calcein AM 和 Hoechst 核染料我们可以对活细胞的毒性进行检验。ImageXpress Micro 系统可很好的控制培养板的温度，CO₂ 浓度以及湿度等环境因素，从而准确的检测化合物是否具有神经毒性（图 3）。通过对比体内检测出的具有神经毒性的化合物以及临床数据，我们就可以对化合物的神经毒理特性进行预测。

Calcein AM 可以同时对接活的神经细胞胞体和外放的神经纤维进行染色。利用 Neurite Outgrowth 应用模块分析神经细胞网络，Cell Scoring 应用模块区分活体和死体神经细胞。



上：图片所示为不同浓度 methyl mercury 对神经元细胞的毒性作用。Calcein AM 的存在说明活细胞代谢活动（绿色）。下左：毒性化合物的 IC₅₀ 曲线，依据测量的神经突触和细胞核大小显示的毒性所绘制。下右：Hoechst 染色的细胞核被标记为红色。

神经元毒性筛选的完美解决方案

Molecular Devices 公司的 ImageXpress Micro 系统，MetaXpress 软件和 AcuityXpress 软件完美的解决了如何筛选评估神经元毒性化合物的问题。活细胞筛选技术和成熟的表型成像分析技术相结合可以有效的鉴别神经毒性化合物，从而为早期的药物研发提供强力支持。