

使用 ImageXpressPico 个人型高内涵成像分析系统进行细胞迁移分析

R. McMillan^{1,2}, J.A. Hesley¹, J. McMillan¹, M. Thomas³

1 Molecular Devices LLC., San Jose, CA, 2 University of California Los Angeles, 3 Platypus Technologies Inc., Madison, WI

摘要

细胞迁移，即细胞的重新定位，与伤口愈合、免疫学、胚胎发育和不规则细胞事件（如癌症转移）有关。细胞迁移测定法用于测量细胞在受控环境中的运动，经常手工制备和分析。在这个项目中，我们利用了一种适应性细胞迁移实验，在微孔板的每孔中加入了一种圆形的、可溶解的生物相容性凝胶，以确定 Pico 个人型高内涵成像分析系统是否能够有效地成像和分析细胞迁移。我们研究了两种不同的癌细胞系的迁移：HT1080（来自人类纤维肉瘤细胞）和 U2 OS（来自人类骨肉瘤细胞），这两种癌细胞系被以优化的密度在包含圆形生物相容凝胶的 384 孔板中沉积，生成融合单层。在不同浓度下评价了 5 种抑制细胞迁移的化疗药物，并测量了 45 小时以上对细胞活力的影响。我们收集了一系列的延时图像，以便随着时间的推移可以测量无细胞区域的闭合情况。利用图像分析软件对细胞所覆盖的面积进行量化。比较了透射光图像和荧光图像的分析结果。结果表明秋水仙碱、松胞菌素 D 和诺科达唑在一定浓度下抑制细胞迁移。最后，这些实验表明，ImageXpressPico 个人型高内涵成像分析系统可以有效地成像和分析细胞迁移分析在透射光和荧光。

介绍

细胞迁移在胚胎发育、免疫应答、伤口愈合和癌细胞转移等许多生物学过程中是必不可少的。在先天免疫系统的激活过程中，中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等免疫细胞通过对细胞因子信号和趋化因子梯度的响应迁移到炎症部位。在大多数情况下，这是有益的，因为清除受损组

织是非常重要的，组织的再生也是非常重要的，这是由 M2 巨噬细胞的细胞因子分泌所促进的 (Shiraishi et al., 2016; Julier et al., 2017)。然而，在包括类风湿关节炎在内的许多自身免疫性疾病中，免疫细胞的迁移和积累会产生灾难性的影响 (Nevius et al., 2016)。此外，在受癌症影响的个体的肿瘤微环境中，细胞运动被上调，从而加剧了癌症的进展 (Barret et al., 2017)。因此，在研究疾病的发病机制和开发潜在的治疗方法和候选药物时，细胞迁移和这种运动的测量是一个有趣的领域。

细胞迁移试验用于测量细胞在受控环境下的运动能力。通常，“划痕”分析用于此目的。当培养细胞在微孔板中聚合后，通常用吸管尖在每孔中制造一道薄薄的划痕或伤口。随着时间的推移，细胞会迁移到受伤区域。虽然这种方法是可以承受的，但是在孔中，伤口的大小和位置往往不相同，手工制备划痕既费力又费时，而且不能采用 384 孔板模式进行筛选。为了提高通量和可重复性，Platypus 技术将这种检测方法应用于包含圆形可溶解生物相容凝胶 (384 well Oris Pro 板) 的微孔板。圆形凝胶在每个孔中间形成均匀的无细胞区，并在细胞铺板一小时后自行溶解。该方法具有细胞迁移实验的可重复性和高通量，与高内涵成像分析系统兼容。

在本次研究中，细胞迁移的纤维肉瘤和骨肉瘤细胞株被铺在 384 孔板中，成像和分析使用 ImageXpress® Pico 个人型高内涵成像分析系统和 CellReporterXpress™ 自动成像和分析软件。本研究的目的是证明可重复性的细胞迁移实验可以用通过个人型高内涵成像分析系统来完成。此外，采用松胞菌素 D、秋水仙碱、诺科达唑等化疗化合物，以合适的浓度处理细胞迁移孔。

我们假设化疗药物会抑制细胞迁移，而高内涵系统可以成功地成像和分析细胞运动。在这里，我们展示了松胞菌素 D、秋水仙碱和诺科达唑在检测浓度下显著抑制细胞迁移，并且可以使用高内涵系统进行细胞迁移成像和分析。

材料

• 检测试剂盒细胞

HT1080 纤维肉瘤细胞株
(ATCC P/N CCL-121)

U2 OS 骨肉瘤细胞系
(Millipore Sigma P/N CLL1037)

SiR - Actin 试剂盒
(Cytoskeleton Inc. P/N CY-SC001)

胞嘧啶 β-D-阿拉伯糖苷酸盐 (Ara C)
(Sigma Aldrich P/N C1768)

Oris™ Pro 细胞迁移 (Platypus
Technologies P/N PRO384CMA1)

生物相容凝胶 (384 well Oris Pro 板) 的微孔板。圆形凝胶在每个孔



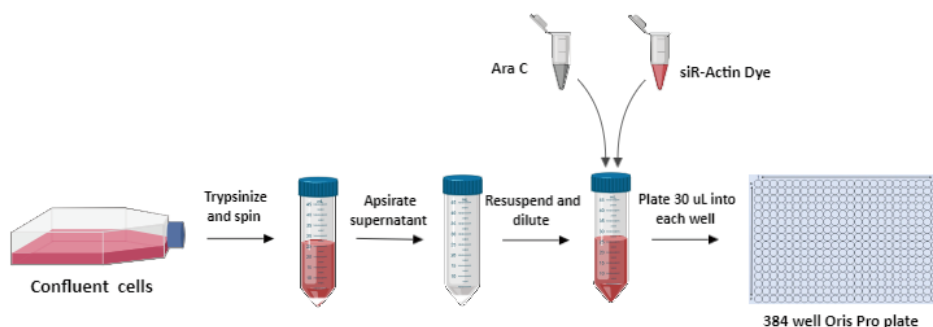
全自动成像分析

ImageXpress Pico 个人型高内涵成像分析系统，配有 CellReporterXpress 软件 (Molecular Devices, LLC)。

方法

在孔板中铺种上用荧光染料和细胞抑制剂处理过的细胞

当细胞在培养基中被稀释至各自的工作浓度后，胞嘧啶 β-D-阿拉伯糖苷酸盐 (Ara C)，一个已知的细胞分裂抑制剂，以及 SiR-Actin，一个已知的对活细胞骨架蛋白无害的荧光染料，分别按照 20 μM 和 0.1 μM 的终浓度被添加到孔板体系中。使用细胞抑制剂的目的是为了确保只检测到细胞迁移，而不是细胞增殖。细胞在经过细胞抑制剂和骨架蛋白染料处理之后，被铺种到 384 孔的 Oris Pro 细胞迁移板中，每孔 10,000 个细胞，最终体系为 30 μl。

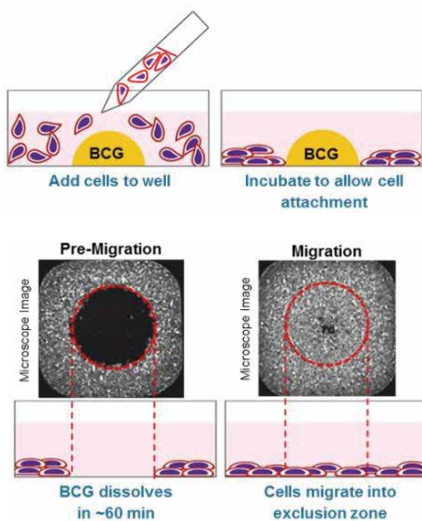


	Cont.	Isoproterenol		Colchicine		Nocodazole		Cytochalasin D		AraC	Cont.	
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
A	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	HT 1080
B	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
C	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
D	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
E	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
F	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	U2 OS
G	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
H	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
I	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	
J	0	10 uM	2.5 uM	150 nM	37 nM	1 uM	250 nM	150 nM	37.5 nM	5 uM	0	

表 1: 显示了用于测试细胞迁移抑制的化合物浓度。本次研究所选用的浓度是基于先前的实验，这些实验测量了这些化合物在不诱导细胞毒性效应的情况下抑制细胞迁移的能力。

Oris Pro 细胞迁移检测分析

Oris™ Pro Cell Migration Assay:



成像分析系统

参数	配置
成像系统	ImageXpressPico 系统
成像模式	透射光和/或 Cy 5 荧光成像
成像类型	延时成像 (非连续性间隔)
时间点 (小时, 加药处理后)	1、2、4、6、21、24、29、45
放大倍数	4x
每孔成像位点数	1
波长 / 滤光片	透射光: < 5 ms 曝光时间 Cy5/siR-Actin: 500-1000 ms
成像分析模块	Transmitted Light, Large Cells Cell Scoring - Cy5 nuclei & cytoplasm

表 2. 使用上表中所示的配置，在 45 小时内收集了一个不连续的延序列。图像分析通过计算每个处理组和对照组每孔在每个时间点的细胞覆盖面积来测量细胞迁移。所选择的分析方法之前已经针对透射光和荧光分析进行了优化。

化疗药物对铺板细胞的处理

细胞贴壁且凝胶溶解后 2 小时，30 μl 每个化合物添加到每孔 30 μl 的细胞体系中。在开始对整块微孔板进行成像之前，将细胞返回到培养箱中 1 小时。

结果

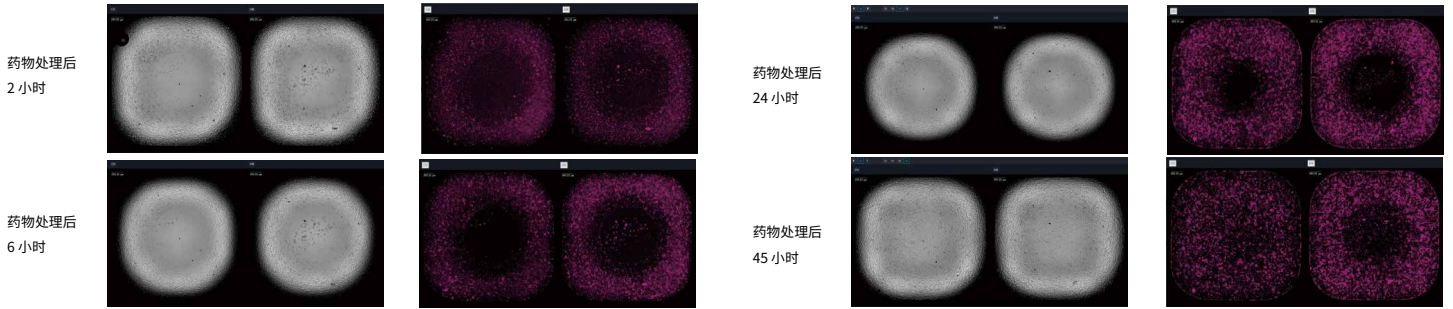


图 1. 示例，未经过处理的 HT1080 细胞对照孔透射光和 SiR-Actin 成像结果 (左)，对比 1 μM 诺考达唑处理的一个孔在 4 个不同时间点的成像结果 (右)。

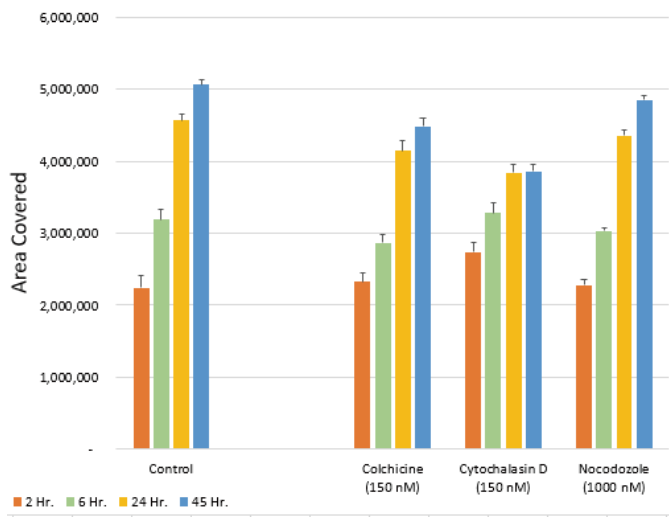


图 2. 随着时间的推移，对荧光标记细胞的分析表明，药物处理的孔显示出细胞迁移减少。

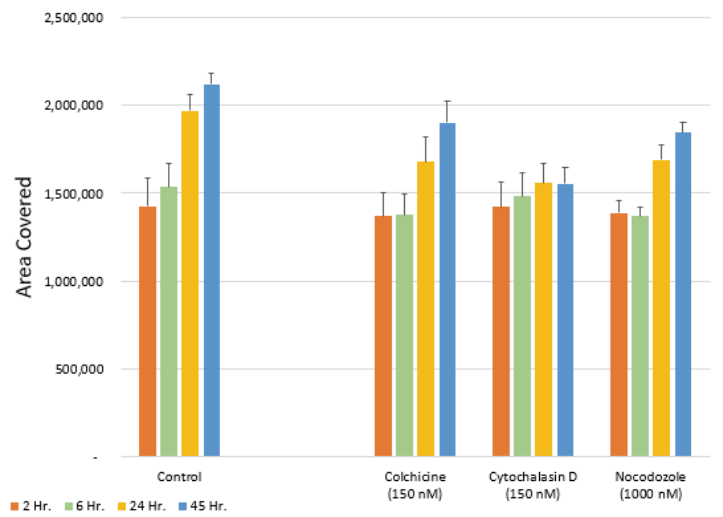


图 3. 随着时间的推移，透射光分析表明，药物处理过的井显示出细胞迁移减少。

结论:

- 在给定药物浓度下，秋水仙碱、松胞菌素 D 和诺科达唑显著降低细胞迁移
- 透射光和荧光分析之间的一致性表明，细胞迁移实验可以在无标记的细胞系中进行，也可以 SiR -Actin 荧光染料标记的细胞中进行
- 使用 OrisPro 384 孔迁移试验，可以进行细胞迁移抑制剂的中等通量筛选
- 使用 ImageXpress Pico 个人型高内涵成像分析系统和 CellReporterXpress 软件，可以方便地对时间推移分析进行成像和分析

Alpha水平=0.05				
		U2OS		HT1080
		TL	TL	Cy5
药物	浓度 (nM)	显著?	显著?	显著?
秋水仙碱	150	Yes	Yes	Yes
松胞菌素D	150	Yes	Yes	Yes
诺科达唑	1000	Yes	Yes	Yes

表 3. 双侧T检验显示上述化合物在使用 CellReporterXpress 软件中的分析方案运行的所有分析中显著影响 HT 1080 和 U2 OS 的细胞迁移。

致谢

感谢 Platypus Technologies 和 Spirochrome Inc. 在本项目上的合作以及慷慨的折扣和赠送。



参考文献:

1. Barrett CS, Millena AC, Khan SA. (2017) TGF- β Effects on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Require FosB. Prostate 77(1):72-81
2. Julier Z, Park AJ, Briguez PS, Martino MM. (2017) Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. Acta Biomater 53:13-28
3. Nevius E, Gomes AC, Pereira JP. (2016) Inflammatory Cell Migration in Rheumatoid Arthritis: A Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol 51(1):59-78
4. Shiraishi M, Shintani Y, Ishida H, Saba R, Yamaguchi A, Adachi H, Yashiro L, Suzuki K. (2016) Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. J Clin Invest 126(6):2151-66



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

