



细胞毒性分析

新的药物、化妆品、食品添加剂等在投入使用之前，都必须进行大量的细胞毒性试验。如果是抗癌药物，细胞毒性就是它们作用的关键所在；而其他药物或化妆品等，则恰恰需要证明它们是没有毒性的。因此对于细胞毒性的研究也随研究目的的不同而不同。对于抗癌药物可能旨在将细胞杀死，而要证明其他化合物没有毒性则需要更精确的研究，如监控细胞代谢水平的变化或信号通路的改变。

目前分析细胞毒性和细胞活性的方法有很多种，而且渐渐显露出这样的趋势，就是远离同位素，方法越来越简单，适用于高通量自动化分析。例如大家熟悉的 ^{51}Cr 释放实验，是分析细胞介导的细胞毒性的经典方法，但由于需要使用同位素，不安全，研究人员于是不断开发出新的替代方法。目前常用的细胞毒性方法则有台盼蓝染料排斥法、LDH 法、MTT 法、alamarBlue 等等。下面就给大家一一介绍。

有多少细胞死了

经典的评估细胞死亡的方法是定量细胞膜的损伤。常见的台盼蓝染料排斥法就是基于细胞膜通透性的改变。台盼蓝这种染料在正常情况下不能透过细胞膜，进入细胞。当细胞死亡(失去活力)时，其细胞膜因破损而被台盼蓝染料透过。通过对未着色细胞的计数，就可以估算出细胞活力。市场上的一些细胞活力分析仪如 GE 的 Cytorecon 和贝克曼库尔特的 Vi-CELL 系列，也是用这种方法来测定细胞活力。不过染色时间要控制在 1-2 分钟，不宜过长，否则活细胞会受到损伤而吸收染料，影响实验结果。这种方法简单快速，价格低廉，准确性还行，不过用于高通量分析就太累了(除非你用仪器)。类似的染料还有 PI。

另一种检测细胞膜完整性的方法就是检测从胞浆释放到培养基中的成分。大家比较熟悉的有 ^{51}Cr 释放法。不过不需要使用同位素的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性释放分析则成为它的极佳替代。LDH 在胞浆内含量丰富，正常时不能通过细胞膜，当细胞受损伤或死亡时可释放到细胞外，此时细胞培养液中 LDH 活性与细胞死亡数目成正比，用比色法测定并与靶细胞对照孔 LDH 活性比较，可计算效应细胞对靶细胞的杀伤效果。此方法不需要预先标记，操作简便快捷，自然释放率低，可用于细胞毒性 T 淋巴细胞及 NK 细胞活性测定，以及药物、化学物质或放射引起的细胞毒性。配合 96 孔板或 384 孔板，可用于高通量检测。不过应注意较高浓度血清中所含的 LDH 可能会干扰结果，应使用只含有培养基和血清而不含细胞的孔作为对照。丙酮酸盐是 LDH 反应的抑制剂，应避免细胞培养基中含有该成分。市场上畅销的产品有 Roche 的 Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH)，和 promega 的 CytoTox 96 (比色法)、CytoTox-ONE (荧光法) 等。

有多少细胞还活着

MTT 法是目前应用最广泛的细胞活性测定方法。MTT 是一种黄色水溶性四唑染料，

它可以被活细胞还原成紫色的不溶于水的甲臞 (Formazan) 产物并沉积于细胞中, 而死细胞则不能。DMSO 能溶解细胞中的 Formazan, 用酶标仪在 490nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞的数量。该方法灵敏度较高, 而且适合大规模检测, 不过也会受到很多因素的影响。如 pH 值, 在偏碱性的环境中本底偏高, 稳定性较差, 结果随放置时间延长而升高; 偏酸性溶液的实验结果比较稳定。而酚红和血清也会对实验产生影响。酚红在 pH 7.0 以上试液中呈红色, 在 570 nm 有较大光吸收值。血清蛋白在有机溶剂中容易变性形成絮状沉淀, 影响透光度。而且在实验中还要摸索最优的时间点和细胞数, 所以虽然 MTT 法看起来很简单, 注意事项还是相当多的, 菜鸟们可千万不要掉以轻心哦。

由于 MTT 还原后产生的 Formazan 不溶于水, 还要再用 DMSO 溶解, 这不仅增加了工作量, 还会对实验的准确性产生影响, 因为在吸上清时也会吸走一部分 Formazan 结晶。基于以上种种不便, 研究人员又开发了更多的四氮唑盐类: 如 XTT、WST-1、CCK-8 (WST-8) 等。它们的还原产物都是水溶性的, 使用更为方便, 省去了洗涤细胞的步骤, 也无需用到有机溶剂。而 WST-1 和 WST-8 与 MTT、XTT 相比毒性小, 灵敏度更高, 也更稳定, 不用每次都现配溶液, 当然, 价格也更贵。

上述这些方法都是对细胞毒性或活力的终端分析, 不能够连续监测。如果对实验条件已经优化好了, 那么这些方法都很有用。但是, 当优化一种抗癌新药的细胞毒性分析时, 这些方法可能就不大好使了。举个例子吧, 如果用 MTT 法分析, 发现一种抗癌药物在某个时间点如 6 小时没有作用, 那么在下一个时间点

你又要重新做一次实验。为了摸索最佳的时间点和药物浓度, 你可能要进行 N 多次实验, 工作量非常大。而现在就有了一个更好的选择 -alamarBlue。它是活细胞代谢指示剂, 易溶于水, 进入细胞后经线粒体酶促还原产生荧光及颜色变化, 可用于定量。在工作浓度时没有毒性, 不影响细胞正常代谢及基因表达, 可在无菌条件下测定后继续培养扩增细胞, 有利于对培养细胞的连续监测及深入研究。而且使用更方便, 无需预先标记靶细胞及离心、洗涤步骤, 适用于大批量样品的自动测定。不过要注意一点, 使用无酚红的培养基。

动态监测细胞毒性

如果你需要自动化的实时分析, 现在也可以做到了。Roche 与 ACEA 公司合作, 开发了 xCELLigence 系统。它利用阻抗的电子读数来非侵害性地实时量化细胞状态, 提供了一种非标记的细胞增殖和活力的实时动态监控。细胞接种在 E-Plate 微量滴定板中, 在每个孔的底部有嵌入的微电子感应器。细胞与微电极表面的相互作用产生了细胞-电极的阻抗反应, 它不仅反映了细胞活力, 还与接种的细胞数量对应。它无需标记, 不但节省时间、劳动力和资源, 还能进行更多生理相关的分析。xCELLigence 系统能提供细胞毒性的发生信息以及实时的 IC-50 值, 而不像普通的分析那样只提供单点的 IC-50 值。此外, 实时数据产生的动力学图像可以使研究人员对药物相互作用的形式和机理有一个更好的了解。另外, 由于每一种化合物或药物与靶细胞相互作用时都有其特征图像, 在确定药物与未知靶点间的作用机理时, 阻抗技术可能会有所帮助。ACEA 还利用这项技术来检测环境毒素的作用。

高内涵筛选 (HCS)

近年来,多种体外筛选模型和分析方法结合自动化技术发展起来的高通量筛选技术对创新药物的研究起到了不可替代的作用。虽然高通量药物筛选的结果较为准确,易于评价,但检测模型是建立在单个药物作用靶分子的基础之上,无法全面反映被筛样品的生物活性特征和保证细胞的完整性。在这种情况下,高内涵筛选(High Content Screening, HCS)应运而生。高内涵筛选,是指在保持药用物质细胞结构和功能完整性的前提下,同时检测被筛样品对细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号传导各个环节的影响,在单一实验中获取大量相关信息,以准确确定其生物活性和潜在毒性。在新药研究的早期阶段应用这项技术,可获得活性化合物对细胞产生的多重效应的详细数据,包括细胞毒性、代谢调节和对其他靶点的非特异性作用等,从而显著提高发现先导化合物的速率,加快新药开发速度和提高药物筛选质量。

国家新药筛选中心是国内首家启用高内涵药物筛选技术的研究单位,所用平台就是Thermo Fisher的Cellomics ArrayScan设备。赛默飞世尔为药物筛选的研究人员提供了高内涵筛选的完整解决方案。Cellomics家族包含自动成像仪器、BioApplication图像分析软件和高内涵信息学,以及试剂和服务,应用在科研和药物筛选的各个方面。

GE公司的高内涵分析系统也不容小觑,其主打机型IN Cell Analyzer 1000 获得了全球权威咨询机构Frost & Sullivan颁发的2007年细胞分析领域的技术革新奖。IN Cell Analyzer是运用了当今最先进的模块化快速自动成像技术的高内涵活细胞分析系统,其高度灵敏的成像技术使得科学家们能够轻松地研究细胞变化过程中的真实生物学进程,目前,IN Cell Investigator分析软件和IN Cell Analyzer自动化细胞成像仪器已经被广泛应用于基础研究和药物发现领域。在此基础上,GE继续在高内涵筛选的硬件平台上不断创新。例如,新推出了光学共聚焦成像辅助系统以进一步提高细胞图像质量;环境控制辅助系统用以更长时间观察活细胞。光学共聚焦成像辅助系统(optical Z-sectioning)采用了专利的硬件软件结合模式,成像时只采集聚焦平面上的光信号,排除了聚焦平面上下带来的荧光信号干扰,使得研究者可以输出媲美激光共聚焦显微镜的高质量2D和3D细胞图像。环境控制辅助系统通过特别的细胞微孔板腔体设计,能够准确地控制细胞所处环境的温度,湿度和CO₂浓度,使得连续长时间观察活细胞的动态变化成为可能,该系统支持连续观察时间长达72小时,真正做到“边培养,边观察”的水平。