

关键词：
细胞毒性、细胞凋亡、细胞坏死、细胞死亡

使用 Incucyte® 进行细胞毒性定量分析

前言

细胞毒性是一个通用术语，描述物质或环境变化对细胞健康的有害影响。细胞经毒性刺激处理后可能会损害代谢活性，抑制细胞生长，或最终通过复杂的生物学途径（如细胞坏死或细胞凋亡）导致细胞死亡。不管机制如何，细胞毒性化合物通常会损害细胞膜的完整性，细胞膜完整性一旦遭受不可逆的破坏，最终必定会造成细胞死亡。在细胞凋亡过程中，形态变化包括伪足回缩、细胞体积减少（核固缩）、核碎裂（核碎裂）以及最终丧失质膜完整性¹。细胞坏死的形态变化特征包括细胞质肿胀和质膜早期破裂²。

可以通过体外细胞毒性分析方法预测组织特异性毒性或发现癌症治疗的 leads 并对其进行分类。多路复用高通量筛选（HTS）细胞毒性分析法可测量各种不同的读数，用于评估早期药物开发中化合物的细胞毒性³。借助 Incucyte® 细胞毒性分析，可通过基于细胞的细胞毒性试验来评估早期研发阶段与医疗器械的生物相容性。此外，常用的细胞毒性分析涉及一系列终点代谢活性检测，如膜破裂后乳酸脱氢酶（LDH）和谷胱甘肽（GSH）的释放、活性氧（ROS）的产生、细胞增殖和线粒体膜电位的破坏。最后，一些细胞毒性分析涉及了膜完整性的测量，例如流式细胞术试验或荧光显微成像中碘化丙啶和其他染料的使用⁴。促成此类分析预测性质的关键因素除了化合物浓度，更重要的是化合物引发效应的时间⁵。

尽管此类多路复用分析可以同时测量体外细胞毒性的多个指标，但其通常只评估单个时间点，无法评估长期的生物学活性。为了动态测量细胞膜的完整性，开发了活细胞分析方法。然而，要灵活、准确地进行评估，需要优化技术和试剂。在本应用说明中，我们描述了 Incucyte® 细胞毒性分析的实用性，包括免洗、即混即读试剂和基于图像的可动态定量细胞毒性的集成分析工具。

检测原理

Incucyte® 细胞毒性分析将 Incucyte® Cytotox 染料与 Incucyte® 活细胞分析系统相结合，根据细胞膜完整性，实时测量细胞死亡（对药物或环境因素的反应）。Incucyte® Cytotox 染料是高灵敏性核酸染料。向正常健康的细胞中加入 Incucyte® Cytotox 染料不会干扰细胞的生长或形态，并且几乎不会产生内源荧光信号。一旦细胞变得不健康，质膜完整性降低，Incucyte® Cytotox 染料就可进入细胞内，

在与脱氧核糖核酸（DNA）结合后引起荧光信号成百上千倍地增加（图 1）。通过荧光标记的绿色、红色或近红外（NIR）细胞核来实时识别和定量死亡细胞。使用 Incucyte® 集成分析软件，可以在背景降至最低前提下，自动定量荧光对象。此外，还可以通过 Incucyte® HD 相差图像和影片提供的形态信息（例如，细胞骨架结构丧失、运动能力丧失）来验证细胞死亡。

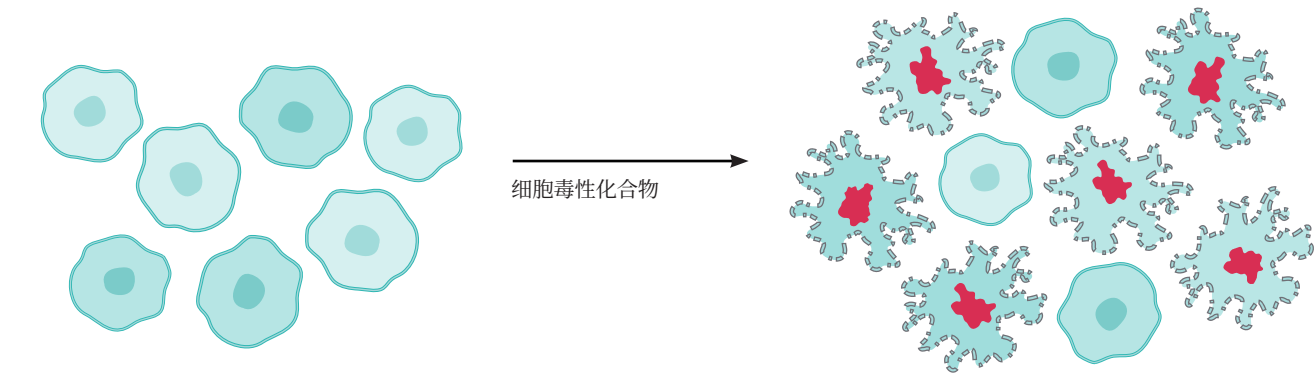


图 1
活细胞实时 Incucyte® 细胞毒性分析的原理示意图

注：细胞核被染色表明细胞膜完整性丧失，这是细胞死亡的标志。细胞不可渗透性 DNA 染料 Incucyte® Cytotox 仅当细胞经过细胞毒性化合物处理后失去膜完整性时，才对细胞核进行染色。坏死性细胞死亡的标志包括细胞质肿胀和细胞膜完整性丧失。在使用 Incucyte® Cytotox 染料的情况下，活细胞不会被染色，并且其生长不受干扰。

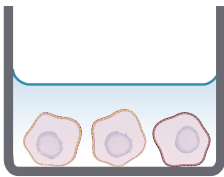
材料和方法

如图 2 所示，可以使用简单的即混即读方案以高通量方式进行 Incucyte® 细胞毒性分析。这种高灵活性分析法适用于各种细胞（包括贴壁细胞或非贴壁细胞），并且能够以非侵入方式实时定量处理引起的细胞毒作用。此外，Incucyte® Cytotox

染料可与 Incucyte® 汇合度指标、或搭配使用核标记用 Incucyte® Nuclight 试剂、Incucyte® Annexin V 染料或 Incucyte® Caspase-3/7 染料，用于同时测量细胞增殖和细胞凋亡，从而实现多重分析需求。

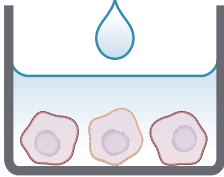
贴壁细胞快速指南

1. 细胞接种



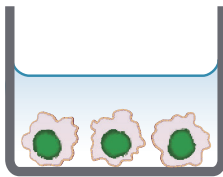
将贴壁细胞
(100 μ L/well) 接种在 96 孔板中。

2. 制备细胞毒性染料 并处理细胞



在含有 Incucyte® Cytotox 染料
的培养基中制备所需的处理液，
并添加处理液。

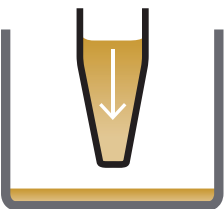
3. 活细胞成像



在 Incucyte® 活细胞分析系统中
每 2-3 小时 (20X 或 10X)
采集一次图像。

非贴壁细胞快速指南

1. 孔板包被



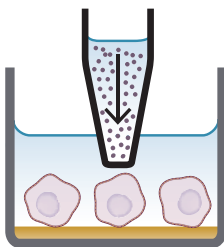
在培养板上包被 0.01%
聚 L- 鸟氨酸溶液。

2. 制备细胞毒性试剂和处理液



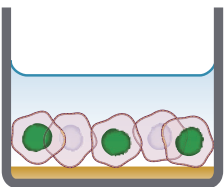
在培养基中稀释 Incucyte®
Cytotox 染料，并制备细胞
处理液。

3. 细胞接种，并添加处理液



将细胞 (100 μ L/well) 接种
到 96 孔涂层板中。立即加入
Incucyte® Cytotox 染料
 $\pm$ 处理液。

4. 活细胞成像



在 Incucyte® 活细胞分析
系统中每 2-3 小时 (20X
或 10X) 采集一次图像。

图 2
贴壁或非贴壁细胞的 Incucyte® 细胞毒性分析方案快速指南

注：这项简单方案利用 Incucyte® Cytotox 染料和 Incucyte® 活细胞分析系统，进行基于图像的细胞毒性荧光测量。

验证数据

细胞毒性定量

Incucyte® 活细胞分析系统搭配 Incucyte® Cytotox 染料有助于细胞毒性可视化和定量。基于图像的集成分析软件在整个分析过程中帮助自动分割核荧光，将荧光背景的影响降至最低。图 3 说明了如何动态定量非贴壁淋巴母细胞白血病细胞系 Jurkat 对抗癌药物喜树碱 (CMP) 的细胞毒性反应。在使用 Incucyte® Cytotox NIR 染料的情况下，用 3 μ M CMP 处理 Jurkat 细胞。所示为采集的相差和混合荧光图像 (NIR 蓝色伪彩) 和用于在处理后的定量细胞毒性的荧光圈描 (红色)。在 24 小时内观察到 Cytotox NIR 染料的核酸结合增加。此外，

图像有助于将膜完整性与细胞毒性相关的形态学变化关联起来，在 Jurkat 细胞死亡中观察到的特征性 “光晕” 效应证明了这一点。

该方法可用于以高通量方式定量研究细胞毒性。为验证这一点，我们使用了 Incucyte® 细胞毒性分析来检测 HT-1080 纤维肉瘤细胞对四种不同化合物的细胞毒性反应。细胞接种后，在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下，分别用上述化合物 (化合物以 2 被浓度梯度) 加以处理。

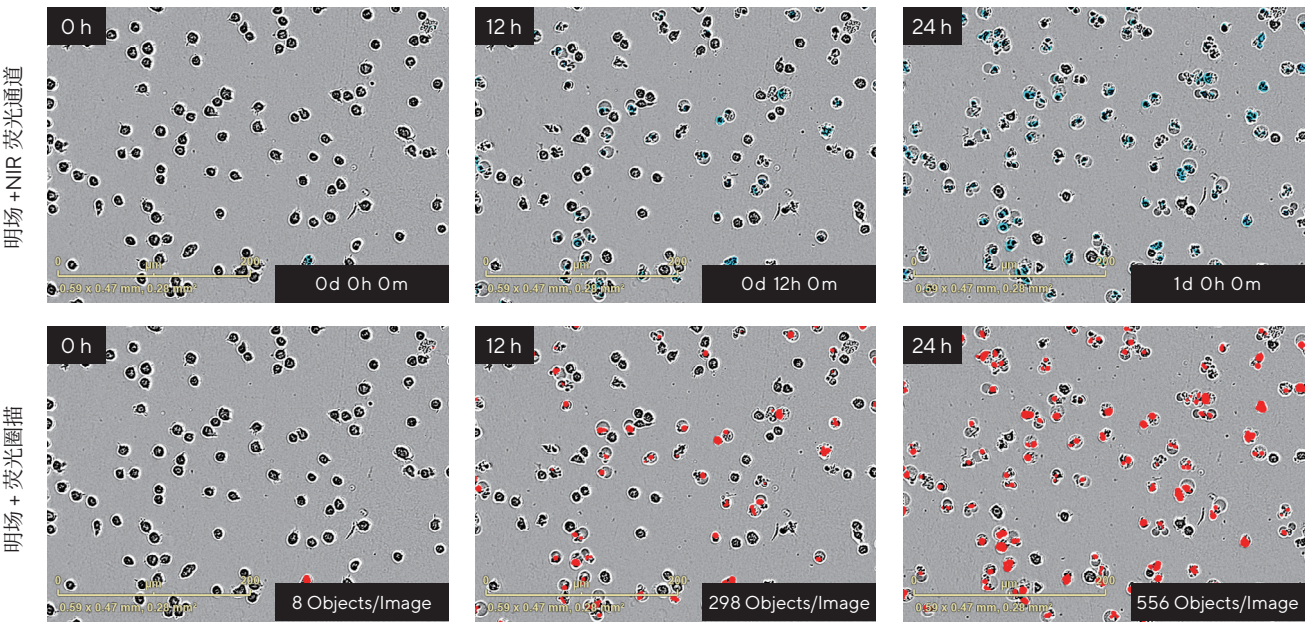


图 3
使用 Incucyte® 活细胞分析系统实时可视化和定量非贴壁 Jurkat 细胞死亡 [对抗癌药物喜树碱 (CMP) 的反应]

注：在使用 Incucyte® 细胞毒性 NIR 染料的情况下，用 3 μ M CMP 处理 Jurkat 细胞 (20,000 个细胞 / 孔)。在实验期间，每隔 2 小时以 20X 获取图像。显示了随时间推移 (0-24 小时) 获得的代表性相差明场和混合荧光图像 (NIR 蓝色伪彩；顶行) 和使用 Incucyte® 集成图像分析工具生成的圈描 (红色；底行)。观察 Incucyte® 细胞毒性 NIR 染料的核酸结合增加 [用 NIR Object Count 衡量 (0 小时：8 Objects/Image vs. 24 小时：556 Objects/Image)]。进一步，可将 Incucyte® Cytotox 染料的荧光信号与细胞死亡相关的形态变化关联起来。

并使用配套软件分析了 Incucyte® Cytotox 绿色荧光信号的存在和荧光对象的定量分析 (图 4)。整板视图显示了 72 小时内所有孔的荧光动态变化, 观察到不同的处理液有不同的特征 (图 4A)。喜树碱 (CMP) 在所有测试浓度下均表现出强细胞毒性效应, 而顺铂 (CIS)、星形孢菌素 (SSP) 和诺考达唑 (NOC) 则表现出浓度依赖性效应。顺铂是一种已确定可用于治疗各种癌症的化疗剂, 其与 DNA 交联, 激活 DNA 损伤途径, 最终导致细胞凋亡^{6, 7}。

图 4B 显示了 CIS 处理后, HT-1080 细胞动态细胞毒性反应, 定量曲线进一步表明了 48 小时的浓度依赖性效应。与顺铂处理组相比, 对照组几乎未观察到荧光增加 (在 48 小时时, 对照组仅有 3.17 ± 0.83 Objects/Image, 而 $50 \mu\text{M}$ 顺铂处理组有 214.93 ± 7.61 Objects/Image)。这些数据表明了 Incucyte® 细胞毒性分析在细胞毒性可视化和定量方面的作用, 以及活细胞分析如何适用于高通量药理学研究。

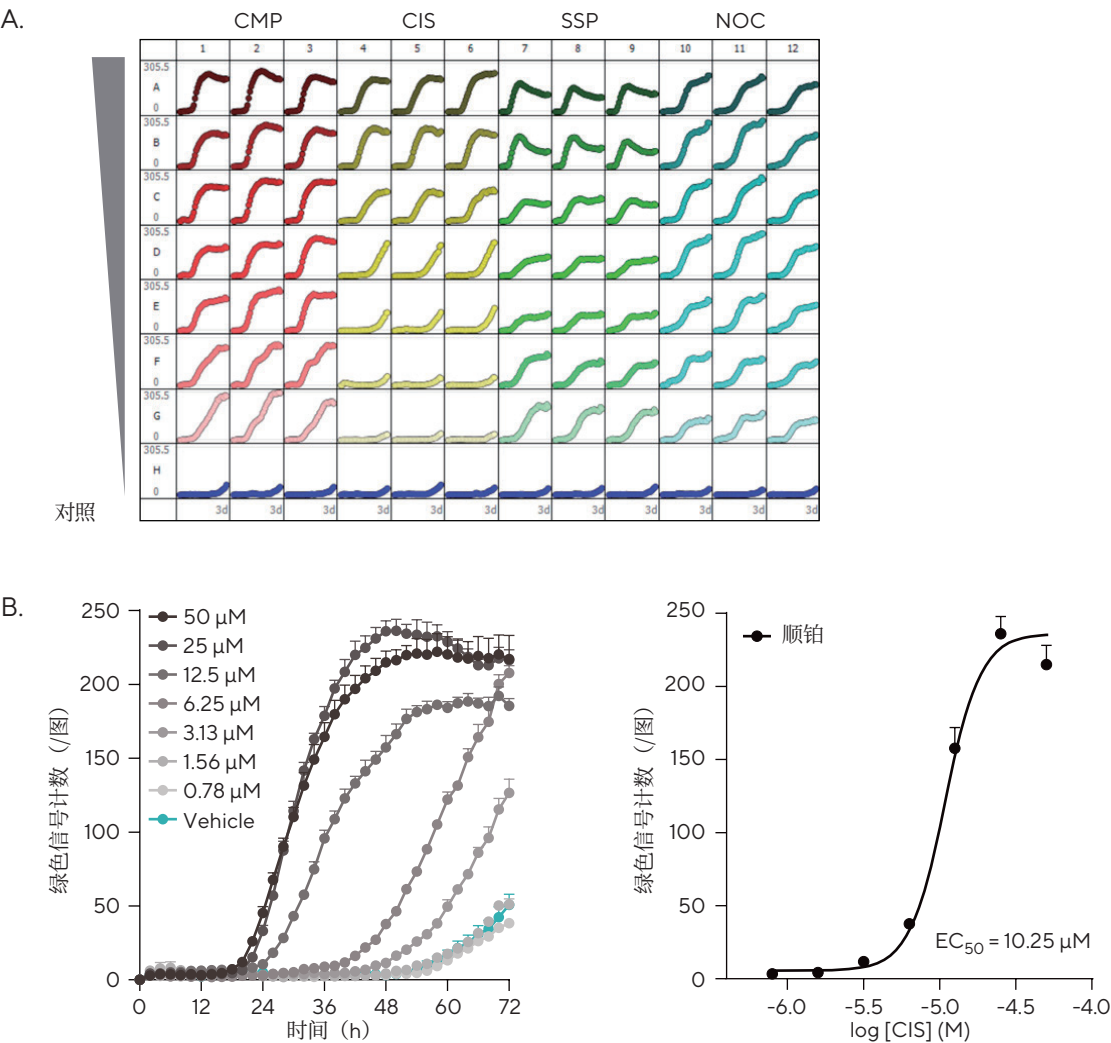


图 4
以高通量方式自动分析细胞毒性

注: 接种 HT-1080 纤维肉瘤 (2,000 个细胞 / 孔), 18 小时后, 在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下, 用四种化合物加以处理。(A) Incucyte® 细胞毒性分析允许自动对 96/384 孔板的每个孔进行成像和分析, 生成细胞毒性随时间而变化的微孔板读数。整板视图显示了处理后 72 小时内绿色荧光的动态变化及不同特征。(B) 实时和剂量反应曲线显示了顺铂处理 48h 内 (CIS; 50-0.78 μM) 对 HT-1080 细胞的浓度依赖性细胞毒性效应 (统计 Green Object Count)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=3$ 。

分析单一化合物在多种癌细胞类型中的特征

喜树碱（CMP）是一种细胞毒性化合物，通常用作研究工具，可通过抑制 DNA 酶拓扑异构酶 I（TOPO I），引发 S 期双链断裂并触发凋亡程序，最终诱导细胞死亡⁸。在一项药理学研究中，CMP 用于证明 Incucyte® 细胞毒性分析的能力，以评估三种不同癌细胞系 A549（人类肿瘤衍生肺腺癌）、SKOV3（人类肿瘤衍生卵巢癌）和 MDA-MB-231（人类肿瘤衍生乳腺纤维肉瘤）随时间推移的细胞毒性。每种细胞经过 1.25 μM CMP 或溶媒处理后，生成的相差和混荧光图像显示了 72 小时内 CMP 诱导的细胞死亡相关的形态学变化和 Cytotox 荧

光变化（图 5A）。一段时间内对细胞毒性的定量结果表明，CMP 对每种癌细胞系的作用强度不同，其中 A549 细胞显示出最强的细胞毒性反应，而在 SKOV3 和 MDA-MB-231 中仅观察到少量荧光（图 5B）。72 小时的浓度 - 反应曲线以及 EC₅₀ 值可进一步直观证明这一点（图 5C）。我们的实验结果证实了 CMP 的已知细胞毒性作用，证明癌细胞系具有不同的敏感性，为研究新型癌症疗法提供了一个强有力的活细胞分析方法。

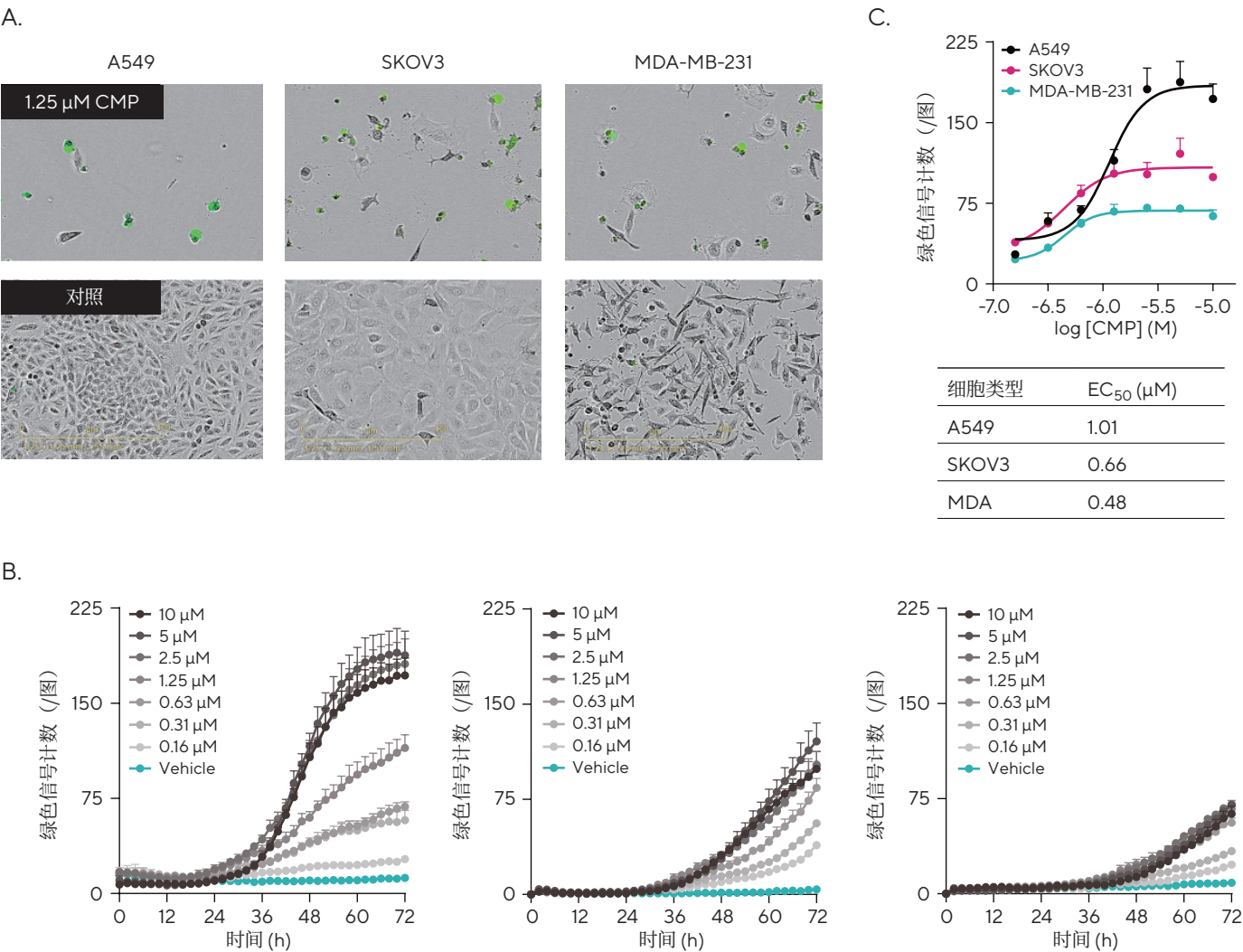


图 5
分析处理液对不同癌细胞系的作用

注：细胞接种（2,000 个细胞 / 孔），18 小时后，在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下，用一定浓度范围的喜树碱（CMP；10–0.16 μM）。（A）相差和荧光图像（72 小时；20X）比较了三种癌细胞系（A549、SKOV3 和 MDA-MB-231）的 CMP（1.25 μM）处理细胞（上图）与溶媒处理细胞（下图）的细胞毒性荧光和形态变化。（B）实时定量曲线显示了对 CMP 细胞毒性反应（用绿色对象计数衡量）的不同动态特征。（C）将数据转换成浓度 - 反应曲线（72 小时）有助于比较各个细胞系的药理学。数据表示为平均值 ± SEM，n=3。

多重分析定量细胞增殖和细胞毒性

借助 Incucyte® 活细胞分析系统，可使用 Incucyte® Cytotox 染料 + 核标记用 Incucyte® Nuclight 试剂进行多重分析，以便同时测量细胞毒性和增殖。为了说明这一点，在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下，用连续稀释浓度的 CMP 处理了 Incucyte® Nuclight 红色 HT-1080 纤维肉瘤细胞（图 6）。据随时间推移生成的代表性图像显示，CMP 处理后，红色核荧光减少，Incucyte® Cytotox 绿色荧光增加。

使用 Incucyte® 配套分析软件圈描绿色荧光信号以定量细胞死亡，圈描红色荧光核信号以监测细胞增殖。定量分析显示，CMP 诱导了细胞增殖和细胞毒性之间的浓度依赖性反比关系，得出的 IC₅₀ 和 EC₅₀ 值相似（分别为 0.11 μM 和 0.49 μM）。这些数据显示了该动态多参数方法应用于药物研发中的化合物分类的潜力。

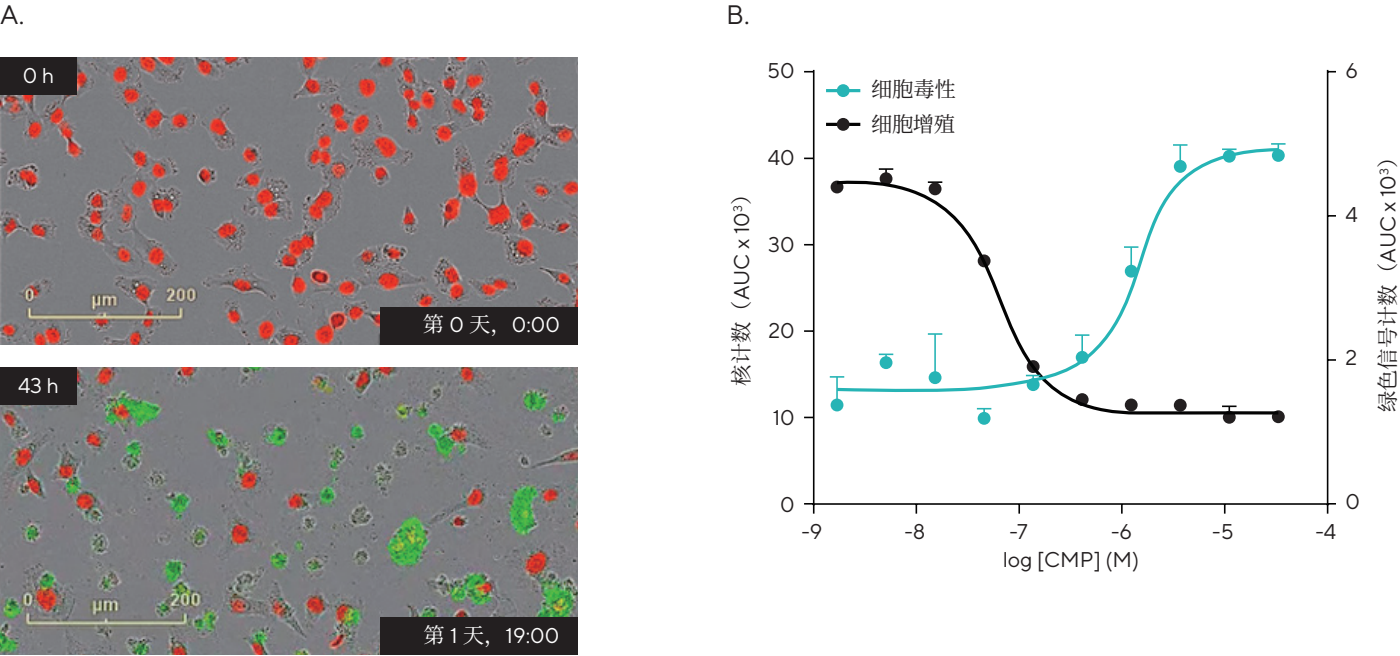


图 6
多重分析细胞毒性测定和活细胞计数用于评估化合物作用

注：在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下，采用喜树碱（CMP；33.3-0.001 μM）处理用 Incucyte® Nuclight 红色慢病毒预标记的 HT-1080 纤维肉瘤细胞（5,000 个细胞 / 孔），以检测活细胞和死细胞随时间的变化。(A) 图像显示，在加入 CMP (0.15 μM) 后 (0 小时 vs.43 小时)，Nuclight 红色信号减少，Cytotox 绿色荧光增加。(B) 曲线下面积（AUC；0-48 h）的统计分析显示，在 48 小时内，增殖（红细胞计数）呈浓度依赖性下降，细胞毒性（Cytotox 绿色对象计数）随之增加（IC₅₀=0.11 μM，EC₅₀=0.49 μM）。数据表示为平均值 ± SEM，n=3。

细胞毒性和细胞生长抑制处理作用的亚群分析

Incucyte® Cell-by-Cell 分析软件模块能够分割相差图像中的单个细胞，并可提取与分割边界内的荧光相关的每个细胞的指标。借助集成分析软件，可以基于荧光特征将细胞群体分类。为了说明这一点，我们使用无标记计数（增殖）和 Cytotox 染料荧光分类（细胞毒性）研究了两种具有不同作用机制的化合物对整个细胞群体的影响（图 7）。DNA 合成抑制剂喜树碱（CMP）是一种细胞毒性化合物，据预测，其会诱导细胞死亡。蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺（CHX）是一种抑制细胞生长的化合物，据预测，其能抑制细胞增殖而不影响细胞活性。在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下，用这两种化合物（10-0.004 μM）处理 HT-1080 纤维肉瘤细胞。借助 Cell-by-Cell 分析软件，基于绿色荧光将细胞亚群分类。

每种化合物的代表性相差和荧光图像显示如何将细胞分为活细胞或死细胞（显示死（绿色）细胞的圈描）。还显示了用于识别死亡（绿色）群体的分类图。在 Incucyte® 软件中，无标记计数和细胞毒性指数计算（用死亡细胞占细胞总数的百分比表示）揭示了两种化合物对增殖和细胞毒性的不同作用。我们发现 CMP 以浓度依赖性方式诱导 HT-1080 细胞死亡，显示了细胞毒性的作用机制。相比之下，在统计学上没有观察到 CHX 的细胞毒性诱导。但观察到明显的浓度依赖性细胞增殖抑制，表明了细胞生长抑制的作用机制。总的来说，这些数据显示了这种动态方法的潜力，可以深入了解药物诱导的治疗效果，特别是基于细胞健康亚群研究其作用机制。

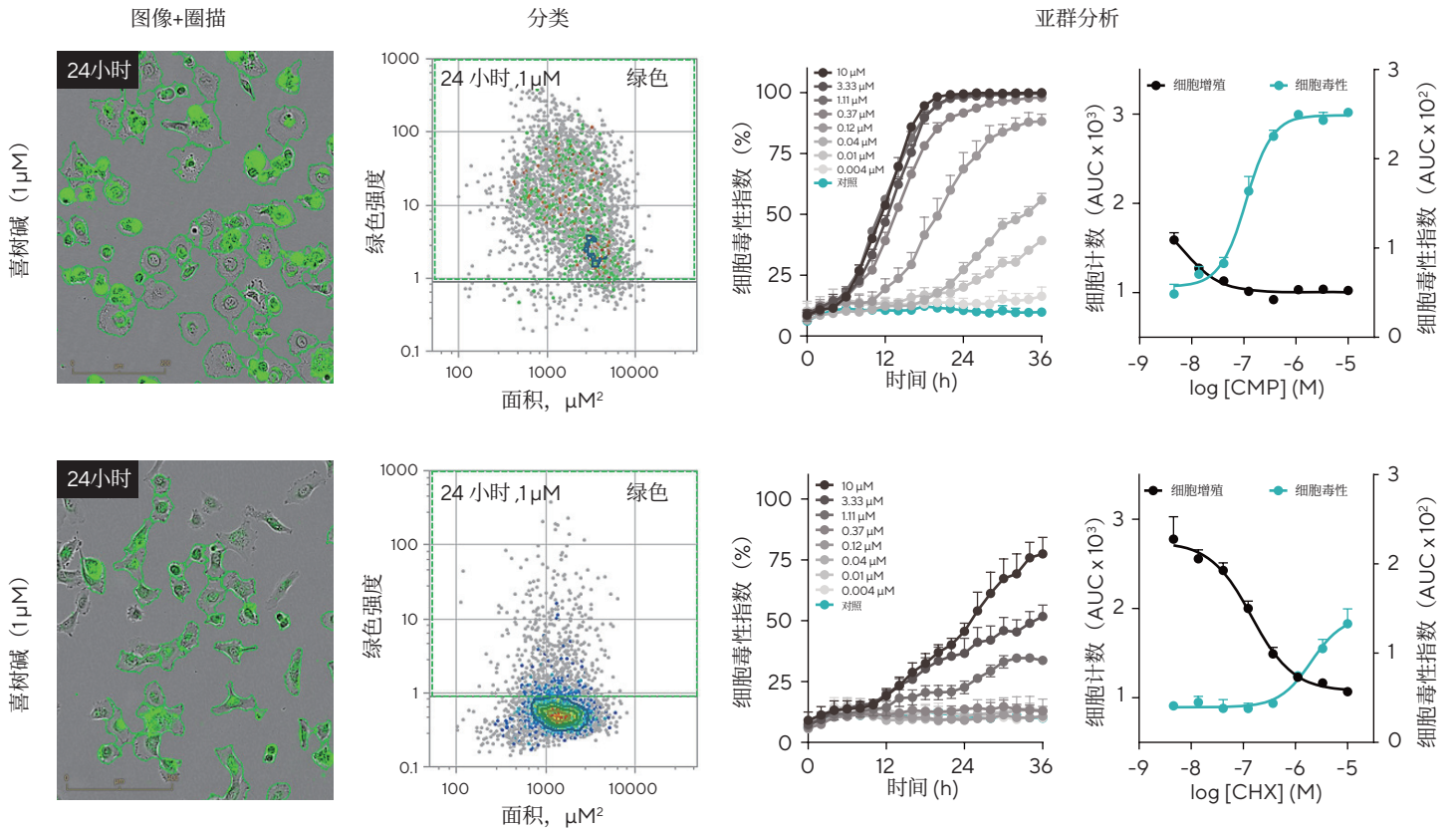


图 7
使用活细胞无标记计数和细胞毒性读数研究细胞亚群中的药物作用机制

注：在使用 Incucyte® Cytotox 绿色染料的情况下，用喜树碱（CMP；细胞毒性）或环己酰亚胺（CHX；抑制细胞生长）处理 HT-1080 纤维肉瘤细胞（5,000 个细胞 / 孔）。相差和荧光图像说明了如何利用 Cell-by-Cell 分析来检测 24 小时的活 / 死细胞（显示死细胞的圈描）。用于识别绿色（死亡）群体的分类图（第二列）、实时曲线图（第三列）和浓度 - 反应曲线（第四列）显示了细胞毒性和细胞生长抑制化合物的作用差异。数据表示为平均值 ± SEM, n=3。

总结和展望

细胞死亡是一个动态过程，在许多治疗领域，如肿瘤学，细胞毒性监测至关重要。将 Incucyte® 活细胞分析系统和 Incucyte® Cytotox 染料作为一种活细胞动态分析方法测量了细胞毒性，结果表明可定量、可重复检测细胞渗透性（细胞死亡的标志）。该方法还提供了在生理相关条件下同时定量 + 监测形态学变化的能力。Incucyte® Cytotox 染料和 Incucyte® Nuclight 试剂或稳转细胞系有助于多重测量细胞增殖和细胞毒性。

此外，Incucyte® Cell-by-Cell 分析软件能够基于荧光进行单个细胞分割和分类，计算其他参数（如细胞毒性或凋亡指数），并有助于评估药物对细胞群体的作用机制。总的来说，Incucyte® 细胞毒性分析是一种强大且灵活的工具，它适用于各种分析形式下的药理学研究（表 1），并有助于更深入地了解细胞死亡的动态模式。

	Incucyte® Cytotox 染料	Incucyte® Annexin V 染料	Incucyte® Caspase-3/7 染料
细胞活性	✓		
细胞凋亡		✓	✓
2D 单层 + 多重分析	✓	✓	✓
3D 单球	✓	✓	
3D 多球 + 多重分析	✓	✓	
荧光通道	红色、绿色、近红外	红色、绿色、橙色、近红外	红色、绿色、橙色*

*Incucyte® 代谢

表 1
用于活细胞成像和细胞健康分析的 Incucyte® 染料

注：表格总结了经验证适用于 ‘在各类分析形式下使用 Incucyte® 活细胞分析系统研究细胞健康’ 的 Incucyte® 染料。

参考文献

1. Keep, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., & Kroemer, G. (2011). Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 10 (3), 221-237.
2. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., & Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16 (1), 3-11.
3. Abraham, V. C., Towne, D. L., Waring, J. F., Warrior, U., & Burns, D. J. (2008). Application of a high-content multi-parameter cytotoxicity assay to prioritize compounds based on toxicity potential in humans. *J Biomol Screen* 13 (6), 527-537.
4. Becker, B., Clapper, J., Harkins, K. R., & Olson, J. A. (1994). *In situ* screening assay for cell viability using a dimeric cyanine nucleic acid stain. *Anal Biochem*, 221 (1), 78-84.
5. Abassi, Y. A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S. L., Gaylord, M. R., Feinstein, S. C., Wang, X., & Xu, X. (2009). Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol*, 16 (7), 712-723.
6. Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., Tsukamoto, H., Kamiya, T., Kataoka, H., Sakamuro, D., & Joh, T. (2012). Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *International Journal of Surgical Oncology*.
7. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
8. Ulukan, H. & Swaan, P. W. (2002). Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs*, 62 (14), 2039-2057.

销售与服务 联系方式

更多联系信息，请访问
www.sartorius.com.cn

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889
邮箱 leads-cn@sartorius.com

赛多利斯（上海）贸易有限公司
上海市浦东新区盛荣路 388 弄百佳通
产业园 3 号楼，7-11 层，201210
电话 +86 21 6066 6100

