

高通量共聚焦成像技术检测3D肿瘤球，助力癌症药物筛选

介绍

近年来，在体外大规模培养肿瘤细胞来模拟体内病理环境的技术已有了极大进展。如果将培养的肿瘤细胞加入圆底的微孔中，这些富集的细胞就会形成离散的球体。这些离散的球体同时包含了暴露在表面的和深埋在内部的细胞，增殖的和非增殖的细胞，外面的富氧层和内部的缺氧中心。基于上述特点，与传统的二维细胞培养方法相比，这种球体可以更好的模拟肿瘤的行为特点。而这种三维肿瘤细胞球体模型已经被成功的应用于肿瘤治疗方法的筛选中。而建立更成熟健全的球体实验目前还面临一些挑战：

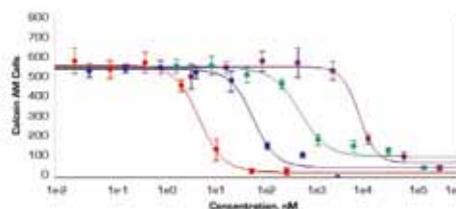
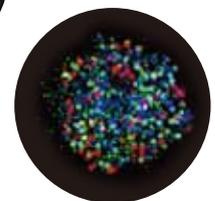
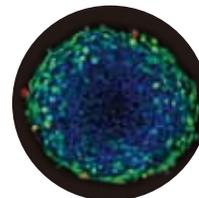
- 定位每个微孔中的球体使其在单视野中成像
- 优化染色处理过程在保证染料渗透性的同时，避免干扰球体的定位
- 获得整个3D结构的清晰图像，尽量减少成像平面外背景信号和散焦的影响
- 可以迅速的分析图像得到有意义的结果并同时绘制出图表

肿瘤球的形成及处理

我们用以下方法构建 HCT 116, DU145, HepG2 肿瘤细胞系的微球体。首先，在37度和5%CO₂条件下在培养瓶中培养肿瘤细胞，以每孔1000-1500细胞的浓度将培养的细胞种于U型孔底的96或384孔的黑色细胞板中(coming 4520 和 3830)，培养基为加入FBS的完全培养基。每孔中的单球体在24小时之内就会成形。在37度和5% CO₂培养条件下，细胞球会继续生长，2-4天后即可用于实验。如果细胞球培养时间过长，其过大的体积会影响染料的穿透性以及球体中心的成像效果。说明书中注释了如何用细胞球检验依托泊苷，紫杉醇和丝裂霉素C的抗肿瘤效果。首先，将待测化合物以10x浓度加入到含有球体的孔板中孵育1-4天，孵育时间的长短取决于实验者的想要研究的机制。短期培养适合于凋亡机制研究，而长期培养适合于多因素细胞毒性研究。如果药物处理时间超过两天，需要每两天以1x浓度更新药物。

优点:

- 20x物镜下，一个视野可拍摄整个小球
- 可直接在96或384孔板中拍摄3D小球，并获得相关生物学参数
- 利用共聚焦成像模块，可精确获得3D小球中细胞层面上的药物反应参数
- Z轴多层扫描后投射为2D图片进行保存及分析，减小储存空间



细胞球的染色及成像

示例中展示的是利用HCT116细胞小球评估球体形态变化及细胞凋亡率。在加入药物处理后，将染料混合以4-6倍浓度直接加入板孔的培养基中。染色过程中不能清洗以防影响小球状态。运用ImageXpress Micro 高内涵成像分析系统，在10x或者20x物镜下对小球进行拍摄。为了分析整个球体3D结构的细胞反应，系统会采集不同层面的图像并创建一个图像“集合包”。这个集合包中的图像可以合并或用数学算法投射到一张2D图像，这张图中的每个像素点保留了对比度最强的那一层的图像数据，最终形成3D图像的2D投射图(图2)。

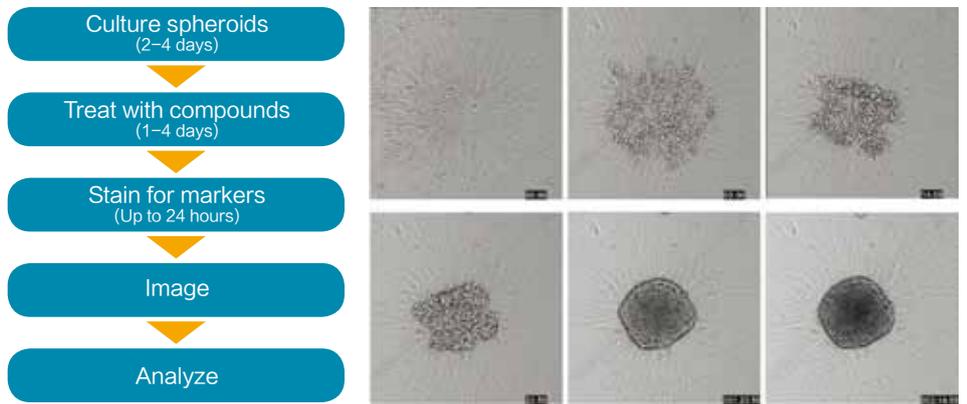


图1 高通量检测3D小球的工作流程图。96或384孔板中形成单一的肿瘤小球，经过化合物处理，小球被混合染料染色，无需清洗，小球被固定等待检测(右)。利用ImageXpress Micro 高内涵成像分析系统的长时间拍摄功能，在10x物镜下，投射光模式拍摄HCT116细胞63小时，记录细胞成球过程。

ImageXpress Micro Confocal 共聚焦模式成像使图像更锐利，分析更准确

相对于宽场成像，共聚焦可以对球体进行薄层成像，这大大降低了来自于成像平面之外的背景荧光信号的干扰。同时，共聚焦成像也可以在3D水平上更好的分辨亚细胞结构以及肿瘤细胞的聚集和堆叠。运用共聚焦成像技术还可以完成更精确细胞分割。在肿瘤小球的重复试验中，与宽场成像相比，共聚焦成像统计到的细胞核数要多20%。

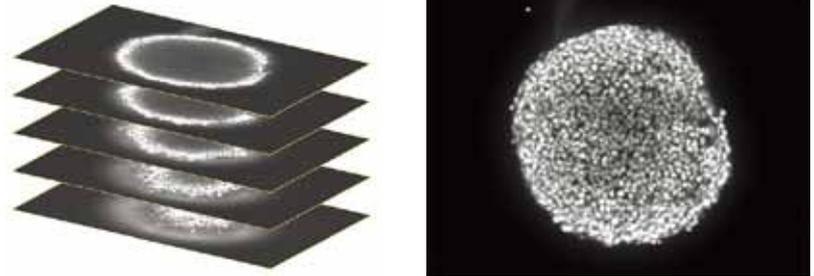


图2 Z轴上一系列的共聚焦层扫图片，拍摄了半个细胞小球厚度(左)，可以看到每一层的图片上都有对焦清晰的细胞，也有模糊的细胞。把所有的层扫图片投射到一张2D图片上，使每个细胞都是清晰的(右)。

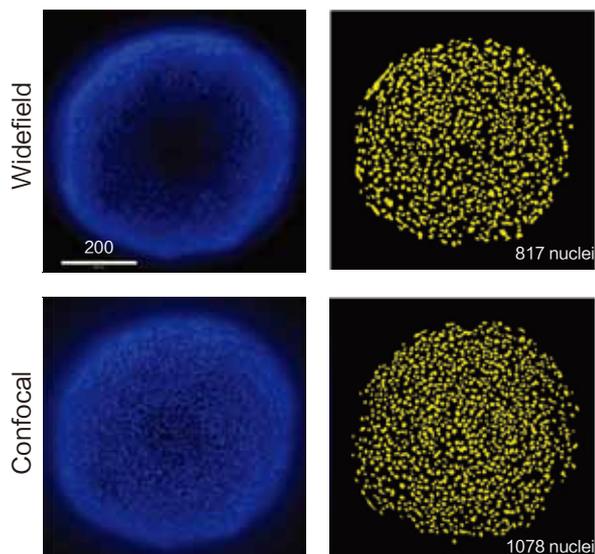


图3 (上)用宽场成像模式扫描HCT116肿瘤细胞球15层，Best focus方式投射为一张2D图像。通过软件分析数出817个细胞核，在边缘聚焦变形的核和小球内部荧光太弱的核都没有被计数到。(下)用共聚焦成像模式扫描HCT116肿瘤细胞球15层，Best focus方式投射为一张2D图像。通过软件分析数出1078个细胞核，共聚焦的图像分析出的数据更加准确。

凋亡实验筛选抗肿瘤药物

许多抗肿瘤药物是通过影响凋亡的外在通路来杀死肿瘤细胞的。为了演示凋亡实验，我们用96孔板培养了3天使HCT116细胞成球，并用4种不同的抗肿瘤药物稀释液对肿瘤球进行了处理。药物处理结束后，利用Life Technologies公司的CellEvent Caspase and MitoTracker Orange reagents检测凋亡水平。在板孔中加入了包含Hoechst核染料的4倍浓度的混合染料。染色过程中没有清洗以避免影响球体状态。

Stains for Multi-parameter Apoptosis Assay	Purpose	Final Concentration
Hoechst	Nuclear marker	16.2 μM (10 $\mu\text{g/mL}$)
CellEvent Caspase 3/7	Apoptosis marker	7.5 μM
MitoTracker Orange CMTMRos	Mitochondrial potential marker	200 nM

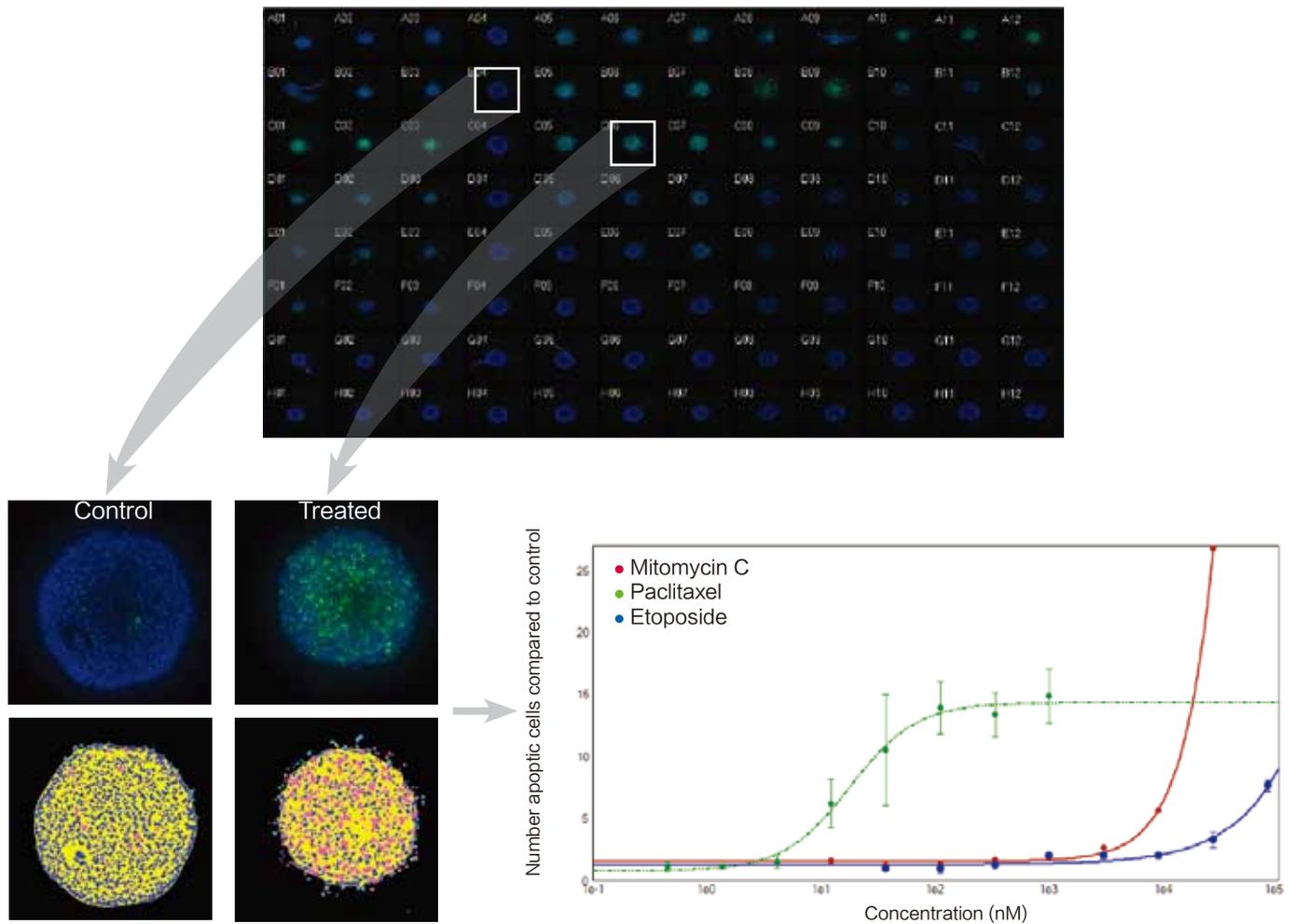


图4 (上)96孔板中培养的HCT116肿瘤小球经过化合物处理，在10x镜下拍摄，图为96孔板整板的缩略图拼图。细胞被Hoechst(蓝色)和CellEvent Caspase3/7细胞凋亡标签(绿色)染色。没有经过处理的对照组在第4列，被不同浓度紫杉醇处理的细胞球在第5-7列(3组重复)，有明显的细胞凋亡。**(左)**细胞小球在Z轴上扫描11层，2D投射图像在用户自定义模块中分析。低凋亡组和高凋亡组的原始图片和分割图片如图所示(蓝色=细胞核，粉红色=凋亡细胞)。**(右)**处理组和对照组凋亡率对比曲线图，均一化后可以看出紫杉醇与丝裂霉素C和依托泊昔相比在较低浓度就可引发凋亡。

线粒体膜电位评估

在上述的细胞凋亡筛选过程中，我们还可以在混合染料中加入MitoTracker Orange来评估线粒体膜电位。这一方法可以帮助我们研究通过影响线粒体代谢途径来抑制肿瘤生长的药物。下面阐述了我们对抗霉素A，一种线粒体膜电位强力干扰剂，的研究。在经过4个小时的处理后，基于MitoTracker Orange的荧光强度我们可以观察肿瘤微球体细胞中的线粒体状态。结果显示小球中心部位的红色荧光很弱，可能是因为MitoTracker 并没有完全的渗透到小球中心，也可能是位于中心的细胞线粒体已受到损害(图5)。

在微孔板中快速筛选3D细胞球

体外3D培养系统可以培养统一规格的人肿瘤细胞小球。而利用高通量，高内涵成像技术筛选肿瘤细胞球对药物的反应将极大地促进我们对于化疗备选药物的研究进程。ImageXpress Micro Confocal 共聚焦高内涵成像系统和MetaXpress 图像分析软件可以迅速的对微孔板中的3D小球进行成像以及分析，从而检测抗肿瘤药物诱导的凋亡及线粒体毒性。

如果想获得肿瘤细胞球筛选实验的最佳参数信息，可以查阅相关文献：Sirenko, O. et al., High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. Assay and Drug Development Technologies, 2015 In Press.

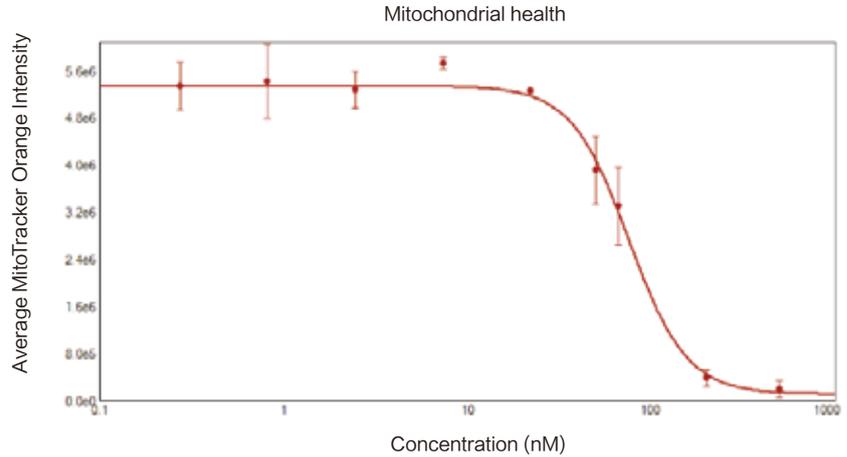
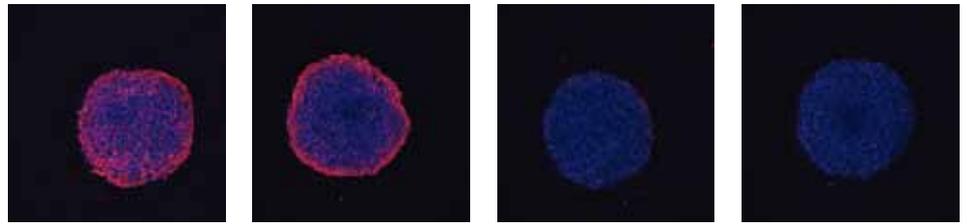


图5 抗霉素A对线粒体的毒性作用。(上)细胞小球经过一系列浓度的抗霉素A处理: (1,22, 67和200 nM)，上图为细胞小球染核(蓝色)和线粒体(橘红色)的图像叠加图。(下)药物作用下线粒体平均荧光强度的曲线图。



扫一扫关注我们
的官方微信