

## APPLICATION NOTE

# 使用 ImageXpress Pico 系统对心脏毒性化合物进行多方向自动化成像检测分析

Oksana Sirenko, PhD | Sr. Research Scientist | Molecular Devices

## 介绍

在生物研究和药物发现中，细胞检测方法的多样性和复杂性日益增加。干细胞来源的细胞和组织在药物开发和毒理学安全性评估方面，已成为传统体内外试验的一个越来越有吸引力的替代方法。在这项研究中，我们使用人类诱导多能干细胞 (iPSC) 衍生的心肌细胞来开发功能和形态学读数，以多参数检测形式测试不同化合物的效果。

我们使用 ImageXpress® Pico 个人型高内涵成像分析系统对 ipsc 衍生的心肌细胞进行了自动细胞成像和分析，以同时确定钙振荡频率、细胞存活率、细胞骨架完整性、凋亡和线粒体功能。通过钙离子振荡测定，研究了钙离子振荡对心肌细胞搏动频率的影响。对不同类型记录结果的多参数联合评估提供了对各种化合物作用机制的进一步了解。这些方法使用一组已知的心脏活性药物和选定的心脏毒性化合物进行了表征。

## 用于化合物筛选的干细胞衍生细胞模型

干细胞来源的心肌细胞，以及肝细胞和神经元，为化合物测试和毒性评估提供了非常有用的模型。心脏毒性仍然是临床试验中药物应用障碍的主要原因之一。此外，据报道很大比例的心血管疾病是由于环境暴露造成的。因此体外筛选潜在毒副作用的试验开发是一个重要的研究领域。

## 方法

### 仪器

使用 ImageXpress Pico 系统结合 CellReporterXpress™ 图像采集和分析软件进行基于细胞的检测。该成像仪器提供四个荧光通道、透射光和延时功能，能够自动监测活细胞中的复杂生物反应。

### 环境控制和延时监测

ImageXpress Pico 系统配备了一个环境控制室，可以控制和监控温度、二氧化碳和氧气含量以及湿度。该系统与延时成像相结合，是在正常或缺氧条件下进行活细胞实验的有效工具。

## 优势

- 使用活细胞自动监测复杂的生物反应
- 监测钙离子振荡、形态变化和化合物的细胞毒性作用
- 可靠地重现药物相关的心脏生理表型

## 细胞培养

人 ipsc 来源的心肌细胞和合适的培养基源自细胞动力学国际公司 (Cellular Dynamics International, Fujifilm Co.(CDI))。细胞被铺在 384 孔的黑色透明底板上, 密度为每孔 10000 个细胞, 按照 CDI 推荐的方案进行培养。化合物处理 24 h。

## 细胞染色

为了观察  $Ca^{2+}$  振荡, 细胞加载了 EarlyTox™ 心脏毒性试剂盒 (Molecular Devices)。为了评估表型变化, 使用三种染料的混合物对活细胞进行

染色: 活力染料 Calcein AM (1  $\mu$ M)、线粒体膜电位染料 MitoTracker Orange (0.2  $\mu$ M) 和核染料 Hoechst (2 $\mu$ m) (均来自 Life Technologies)。为了观察肌动蛋白细胞骨架, 我们用 4% 甲醛 (Sigma) 固定细胞, 并用 AlexaFluor 488 (AF488) 标记鬼笔环肽染色。

## 评估化合物对心肌细胞钙振荡的影响

ipsc 来源的心肌细胞是一个非常有吸引力的体外模型。它们形成一个同步跳动的单层膜, 可以使用快速、动态荧光检测细胞内钙离子振荡的变化, 可靠地重现药物相关的心脏生理学表型 (Grimm et al. 2016; Sirenko et al. 2013)。在本研究中, 我们将钙振荡法应用于将延时成像与环境控制相结合的 ImageXpress Pico 系统。

利用透射光成像可以观察到心肌细胞自发收缩和生理运动。利用环境控制, 在 ImageXpress Pico 系统上对细胞内  $Ca^{2+}$  流进行荧光成像, 每隔 0.5 秒采集一次图像。用钙染料加载细胞后, 观察到与机械收缩一致的荧光强度波动。图 1A 为钙染色心肌细胞延时采集的图像 (EarlyTox 心脏毒性试剂盒)

利用细胞计数模块对图像进行分析, 检测细胞并测量平均荧光强度和平均细胞面积。通过绘制荧光强度随时间的变化, 可以观察到钙的振荡。

为了评估心肌细胞的毒性作用, 我们对心肌细胞进行化合物处理, 通常处理 24 小时。图 1B 和图 1C 显示了添加测试化合物后产生的钙振荡痕迹的各种例子。

图 1B 显示了以剂量依赖的方式 (浓度变化半对数) 测试六种代表性化合物的实验截图。图 1C 显示了对照、阿霉素和醋酸氟卡尼条件下代表性的放大痕迹。注意阿霉素对钙流的抑制作用和氟卡尼醋酸处理后的钙流延长的效应。

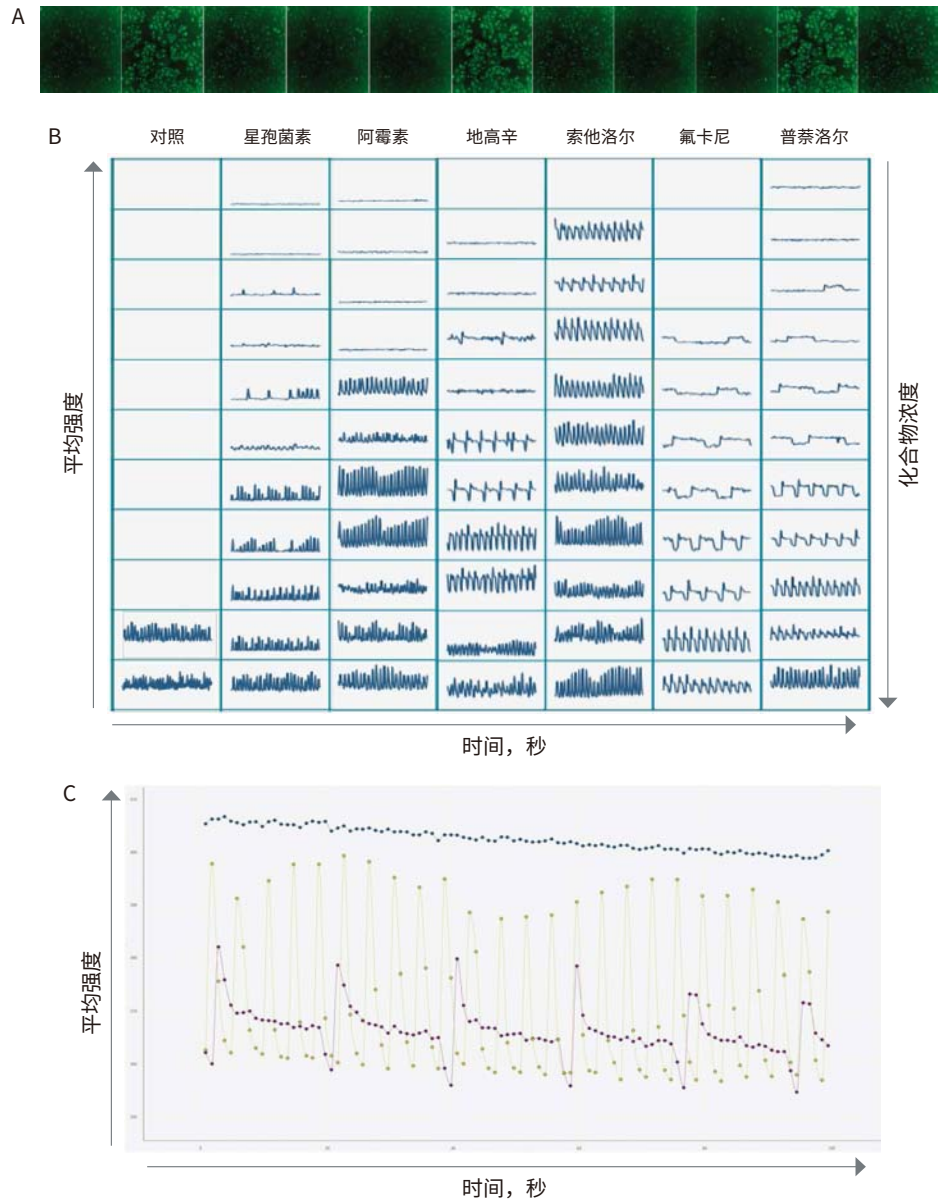


图 1 测量 iPSC 心肌细胞  $Ca^{2+}$  振荡。为了测量  $Ca^{2+}$  振荡, iPSC 使用 EarlyTox 心脏毒性试剂盒对心肌细胞进行染色, 然后使用 ImageXpress Pico 系统在 FITC 通道中随时间成像。(A) 上面板显示一系列图像, 每隔 0.5 秒采集一次。(B) 所示化合物浓度增加时钙振荡的痕迹。(C) 信号痕迹对比对照 (0.1% DMSO, 黄色)、阿霉素 (1mm, 蓝色) 或醋酸氟卡尼 (1mm, 紫色) 处理。

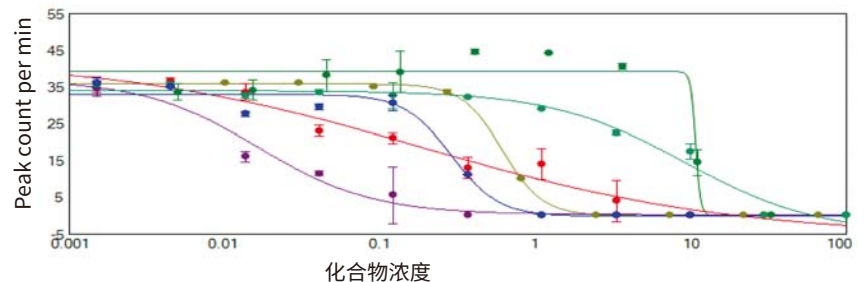


图 2 使用 4 参数曲线拟合, 根据化合物浓度绘制峰数 (手动计数)。EC 值采用 SoftMax® Pro 软件计算。西沙必利 (紫色)、氟哌啶醇 (红色)、星孢菌素 (蓝色)、伊马替尼 (黄色)、阿霉素 (深绿色)、醋酸氟卡尼 (绿色) 处理的峰值计数呈剂量依赖性下降。



通过复合处理,观察了钙振荡频率、振幅和峰形的变化。峰的数量是手工计算的。使用 SoftMax<sup>®</sup> Pro 软件评估重复时的峰值计数,并绘制浓度依赖关系图(图 2)。通过 4 参数曲线拟合计算抑制振荡频率的 EC<sub>50</sub> 值。

### 评估化合物对细胞活力和形态学的影响

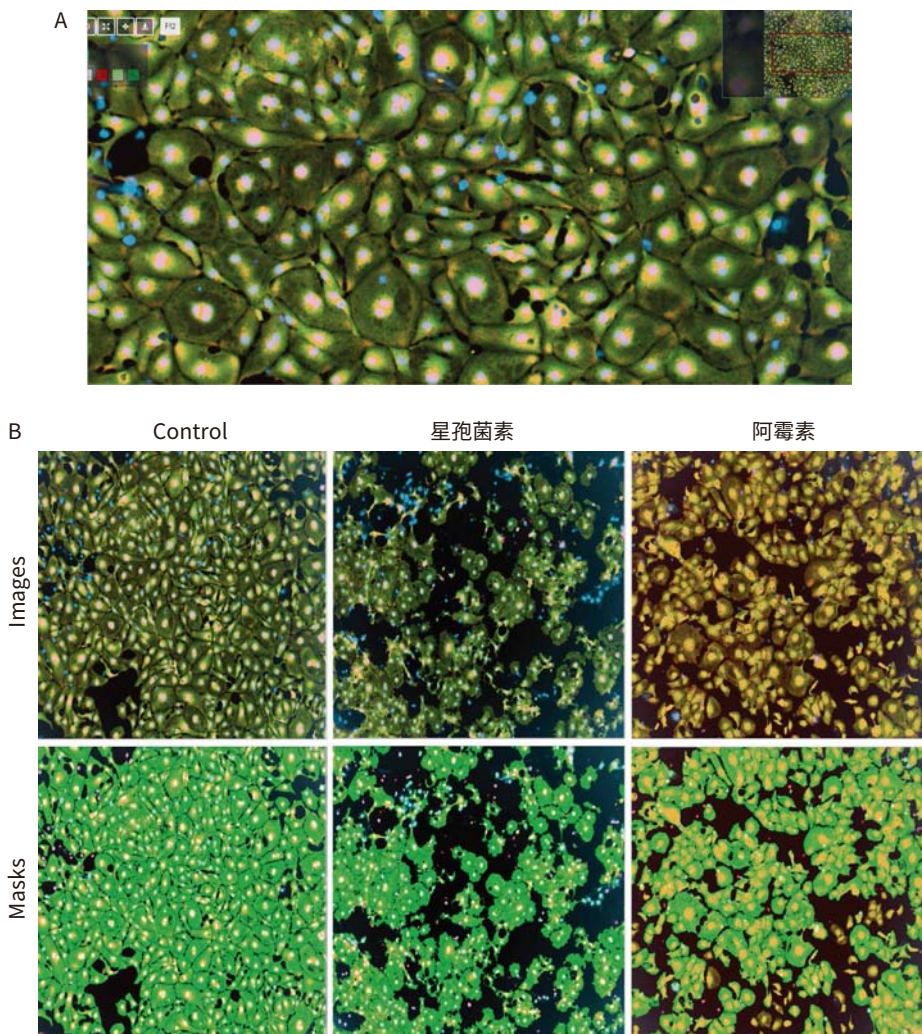
评价跳动曲线的变化对于检测功能效应是重要的,同时成像还提供了监测化合物的形态变化和细胞毒性效应的必要的补充检测。成像和分析提供重要工具描述多个方面的结果包括细胞的生存能力,细胞形状特征,细胞贴附和扩散,细胞骨架完整性和线粒体膜电位。

使用活细胞染色法,可以一步加入三种染料的混合物,无需固定细胞或重复清洗步骤。Calcein AM 被用来鉴定活的、代谢活跃的细胞,并染色整个细胞的形态学特征。使用可透的核染料 Hoechst 测量总细胞计数,评价细胞核形态。

MitoTracker 橙色是用来检测细胞完整线粒体和测量测试化合物对线粒体的影响潜力。化合物孵育 24 小时后染色。

用 10X 或 20X 物镜,三种颜色的图像:DAPI 用于 Hoechst 核染色, FITC 用于 Calcein AM, TRITC 用于 MitoTracker Orange。

具有代表性的复合图像如图 3A 所示。图像分析采用细胞分类或多波长细胞分类分析



**图 3 心脏细胞的成像分析。**(A) 心肌细胞的图像 (20 x 放大) 染色活细胞染料钙黄绿素, Mitotracker Orange 染料检测线粒体膜电位, 赫斯特核染料 (来自 Thermo Fisher Scientific, 浓度分别是 0.5  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M, 和 0.5  $\mu$ M)。(B) 多参数分析的图像和分析掩模。I-Cell 诱导的心肌细胞在 24 小时内接受了化合物的处理然后用核染色剂 (Hoechst 33342), Calcein AM 和 MitoTracker Orange CMTMRos 染色。图像和分析掩模比较了对照细胞和 0.1  $\mu$ M staurosporine 及 10  $\mu$ M 阿霉素处理的细胞。细胞用 DAPI、FITC 和 TRITC 用 10 xPlan Fluor 物镜成像。图像显示细胞核 (蓝色), Calcein AM 染色 (绿色), 线粒体 (橙色)。使用细胞分类分析模块对图像进行分析,该模块优化了 Calcein AM 阳性细胞或有丝分裂细胞橙色阳性细胞的定量。分析掩模:浅绿色阳性核, 红色阴性核, 绿色肌动蛋白细胞骨架。EC<sub>50</sub> 值如表 1 所示。

模块。分析算法首先定义细胞核，然后根据 Calcein AM 或 MitoTracker 橙色斑点的强度将细胞分为阳性或阴性。阳性细胞数量、细胞面积或染色强度的减少表明毒性作用。图 3b 显示对照和受损细胞的图像，以及 calcein AM 的分析掩模。不同检测结果的 EC<sub>50</sub> 值来自浓度依赖性结果，如表 1 所示。

表型变化的多参数分析可以检测毒性，并提供有关毒性机制的信息。值得注意的是大多数化合物显示特定心脏毒性，IC<sub>50</sub> 值浓度抑制跳动率 1/2 log 或低于减少钙黄绿素阳性细胞数量的影响细胞毒性的浓度。与此相反阿霉素的细胞毒性作用与抑制跳动速率的浓度相似。

## 结论

结果表明，多种分析方法可用于定量筛选 iPSC 心肌细胞中的化学效应，并实现快速和高性价比的多维生物图谱分析。

EC <sub>50</sub> , μM	峰值率	*活细胞数量	活细胞总面积	平均荧光强度 (Calcein AM)
西沙比利	0.017	0.22	0.13	0.15
普萘洛尔	0.038	**		
鱼藤酮	0.1	0.2	0.1	0.1
氟哌啶醇	0.19			
星孢菌素	0.39	3.1	1.2	1.5
地高辛	0.61	10	9	11.2
伊马替尼	0.62	2.1	0.83	0.81
醋酸氟卡尼	2.7			
索他洛尔	3.4			
阿霉素	16	10	12	5.8

\* 活细胞数量 (Calcein AM 染色为阳性细胞)，以及活细胞总面积，和图像检测分析得到的 Calcein AM 染色平均荧光强度。

\*\* 空白细胞显示在最高浓度测试下无效应 (50 μM)

**表 1 心脏细胞复合效应的多参数评价。**抑制钙振荡频率的 EC<sub>50</sub> 值与细胞毒性读数 EC<sub>50</sub> 值进行了比较，此 EC<sub>50</sub> 值与细胞活力、细胞扩散和钙调素 AM 信号强度有关。



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

