

APPLICATION NOTE

利用 iPSC 衍生的肝细胞进行多参数高内涵肝细胞毒性检测

引言

药物引发的肝毒性是造成肝损伤和急性肝衰竭的重要原因之一。因此如何高效的检测药物的有效性和安全性对于促进药物研发和减少药物消耗至关重要。人诱导多能干细胞(iPSC)衍生的肝细胞具有典型的成熟细胞的特征和代谢形式，这对于我们用高内涵筛选药物是非常理想的。

虽然对于如何利用高内涵进行药物筛选已经有了很多标准的程序，但是对于如何通过图像分析评估不同毒性却仍非常复杂且大多依靠经验。本文中我们阐述了如何利用 ImageXpress® Micro 系统对多参数肝毒性进行分析。每一个孔或者细胞都会产生多种化合物诱导的细胞反应，而这些反应可以用 MetaXpress® 软件的自定义模块进行分析。

优势

- 简易快速的对 96 或 384 孔板进行肝毒性筛选
- 在同一实验中得到多种肝毒性相关参数
- 利用用户自定义参数分析，量身定制，结果更准确

从标准活性检测中获得更多信息

细胞活性染料(例如 Calcein AM)可以用来检测活细胞中的化合物毒性。首先用各种化合物对肝细胞进行 72 小时处理并染色。通过 ImageXpress Micro 系统的 10 倍物镜可以得到肝细胞的图像, 然后我们用 MetaXpress 软件的 Multi-Wavelength Cell Scoring 应用模块对活细胞的整个核区域 (Hoechst 复染色) 和细胞质区域 (Calcein AM) 进行分析(图 1)。

线粒体毒性的单染分析

线粒体去极化是缺氧损伤和氧化应激的早期标志。我们可以用 JC-10 对线粒体膜电位进行检测, 在完整的线粒体中, 橙色的 J-aggregates 肉眼可见, 但是对于膜去极化来说, 这种染料可以渗入到细胞质中并发出特定的荧光波长。在用 ImageXpress Micro 系统成像前先用化合物处理肝细胞 60 分钟并用 JC-10 染色。系统的自定义模块可以对健康线粒体中保存的染料和渗透到细胞质中的染料分别定量。通过分析这两类荧光染色信号强度的比率我们可以得到比之前单一检测更可靠的数据(图 2)。

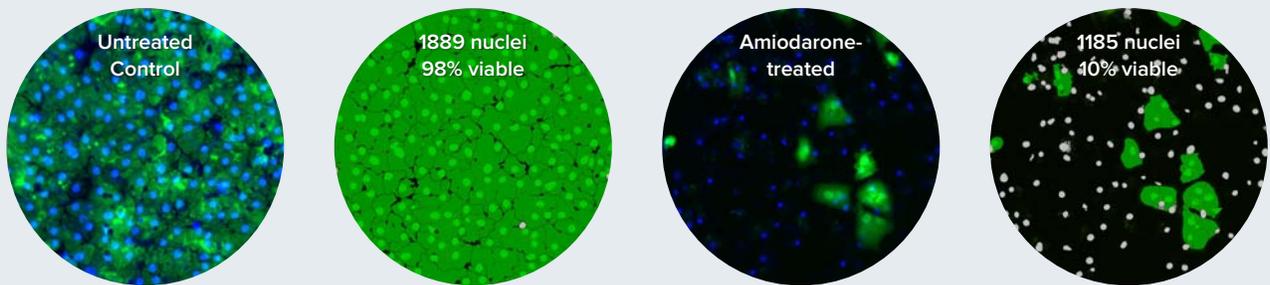


图 1. 活细胞染色比单独细胞计数提供更准确的毒性信息。Multi-Wavelength Cell Scoring 应用模块对活细胞 Calcein AM 染色进行分析。右图中绿色蒙板标记出活细胞的核, 灰色为死细胞的核。虽然阴性组和处理组的细胞核数相近, 但是从活细胞百分比可看出处理药物 Amiodarone 毒性很强。另外, 从细胞质的染色中还可分析细胞面积、荧光强度等, 研究化合物的毒理机制。

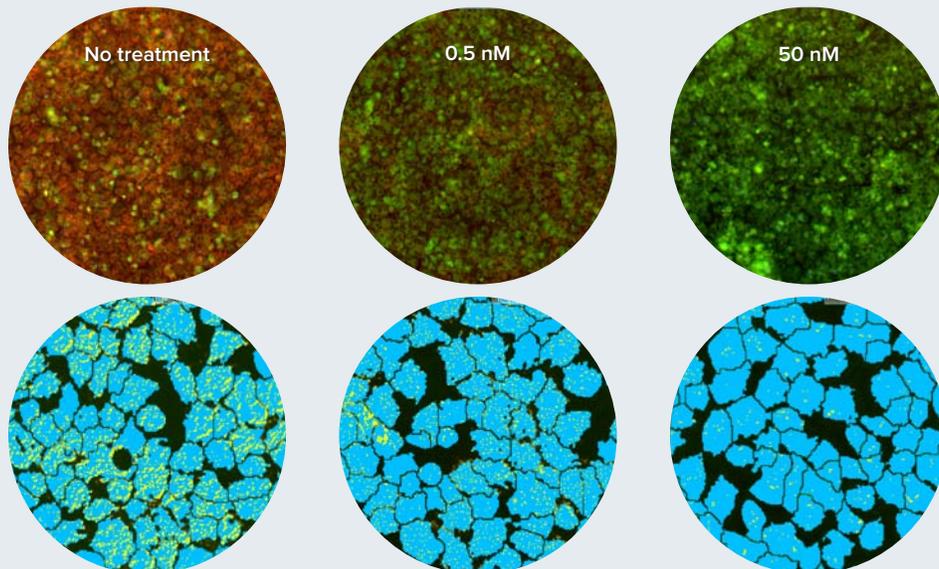


图 2. Valinomycin 改变线粒体膜电位。肝细胞加 Valinomycin 处理 60 分钟。活细胞被 JC-10 着色并用 10 倍镜拍摄。上: 绿色细胞质和红色线粒体的叠加图。下: 经用户自定义分析的结果蒙板图, 识别出来的线粒体的数量与化合物浓度相关。

磷脂质病和脂肪变性是最常见的肝细胞毒性标志

一些药物会引起磷脂质病和脂肪变性，这是由脂肪代谢紊乱引起的组织中过多的磷脂质和中性脂肪聚集造成的。我们可以用成像的方法对肝细胞中的磷脂质和中性脂肪的分布进行检测，这一检测可以精确到单细胞水平。图 3 我们列举的实验中肝细胞被种在 384 孔板中，孵育了 4 天，然后用待测化合物处理 24 小时。

从毒性分析中获得更多信息

MetaXpress 软件中的自定义模块编辑器可以让科学家们针对自己感兴趣的参数进行复杂的分析。这种自定义模块已被证明可以有有效的定量细胞大小或形状，活细胞总数以及凋亡情况(图 4)。这些模块也可以应用在图像处理上，还可以用 MetaXpress®PowerCore™ High Content Distributed Image Analysis Software 对大量样本进行高通量筛选分析。

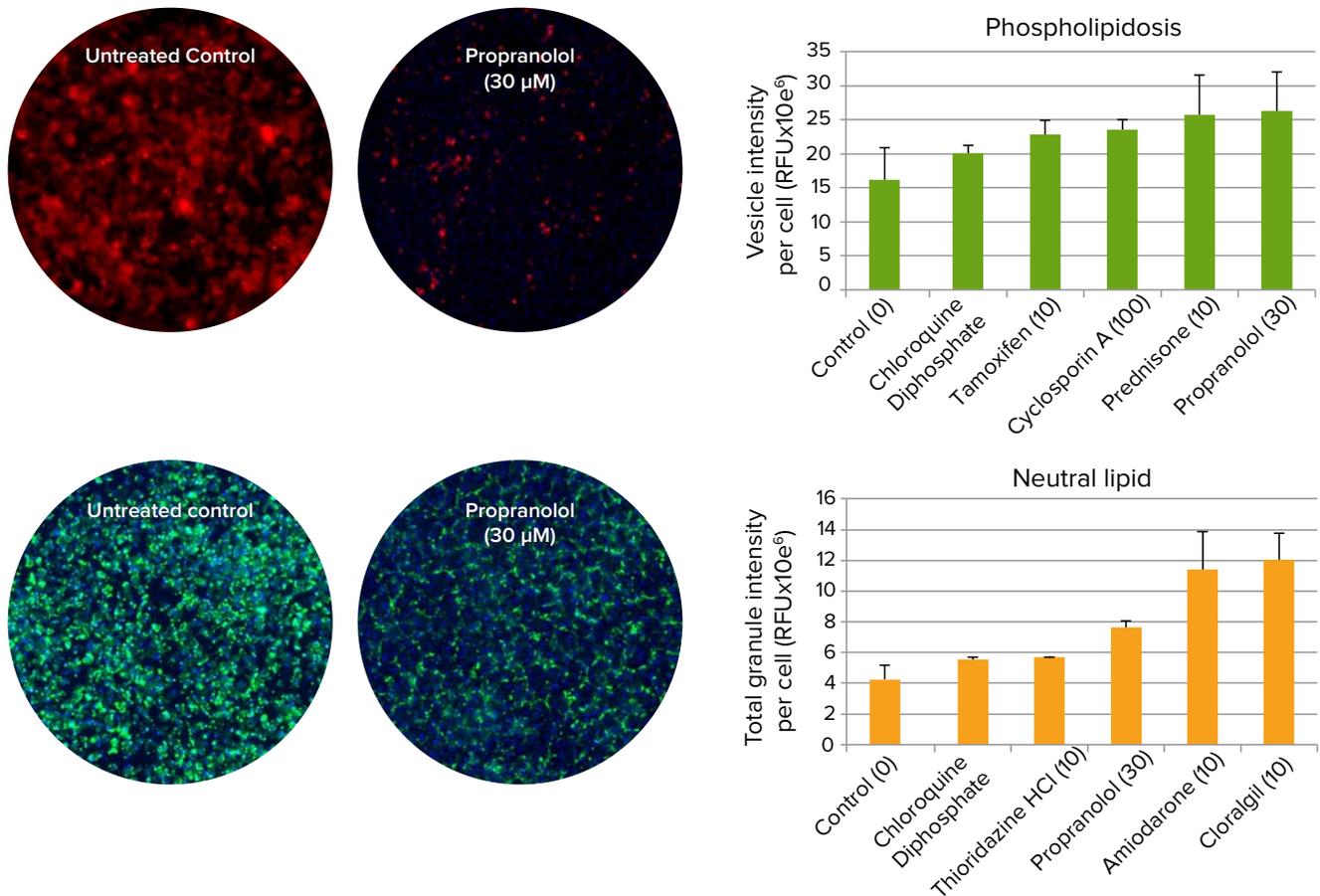


图 3. 化合物处理造成的磷脂质病和脂肪变性。肝细胞的磷脂(上)和中性脂肪(下)染色，10 倍镜获取图片。化合物处理的细胞脂质染色呈阳性(右)说明了化合物毒性的特殊机制。

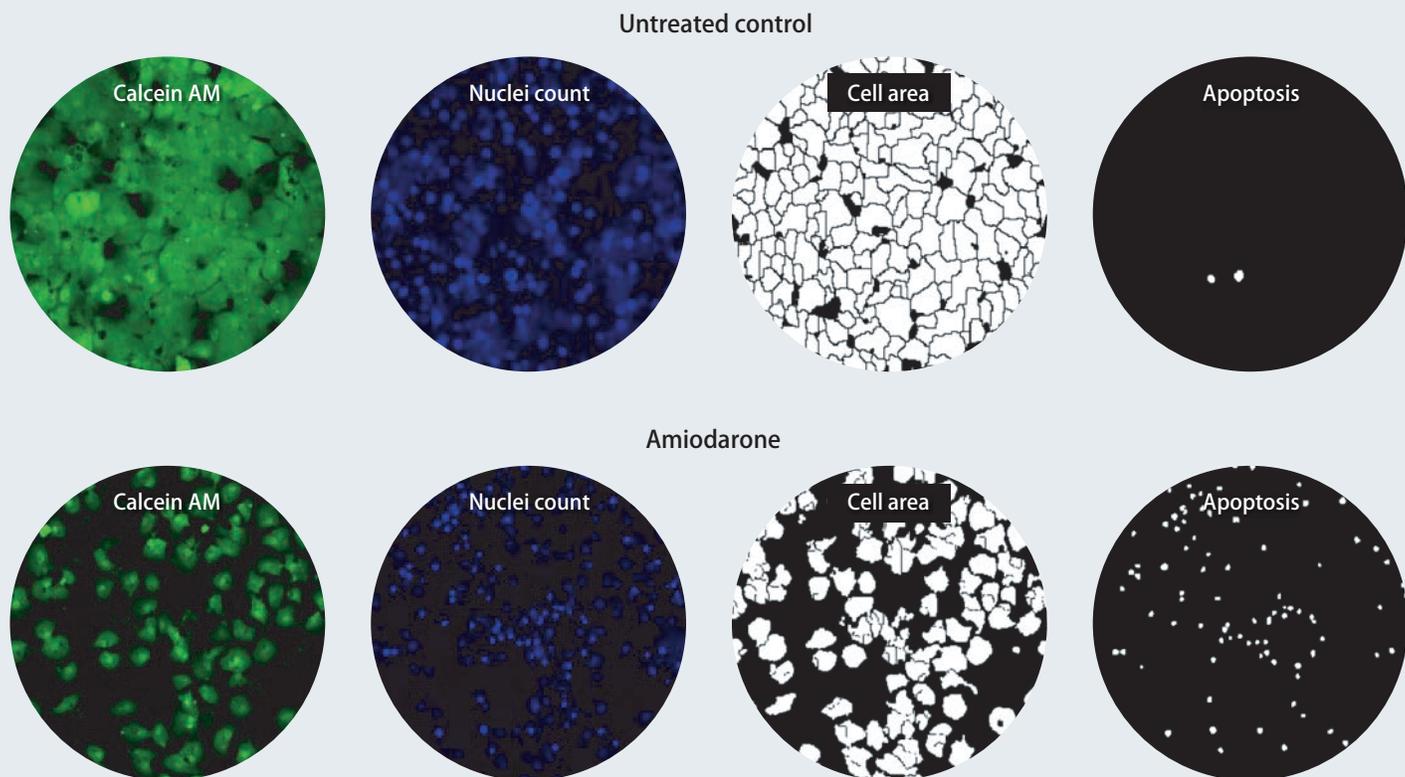


图 4. 多参数肝毒性评价。用户自定义模块例子，分析了化合物处理后细胞面积、凋亡发生率和活细胞数。

多参数肝细胞毒性筛选的完整解决方案

多参数图像分析可以显著的提高分析的灵敏性，并且为我们进一步了解化合物毒性发生机制提供更多有价值的信息。利用 MetaXpress 软件的自定义模块编辑器，科学家们可以自由的设计和调整图像分析模块并迅速的对毒性进行分析及得到相应结果。Molecular Devices 为评估肝细胞毒性提供了灵活的的高内涵筛选方案，这种方法远领先于传统的非死即活的简单检测。



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

