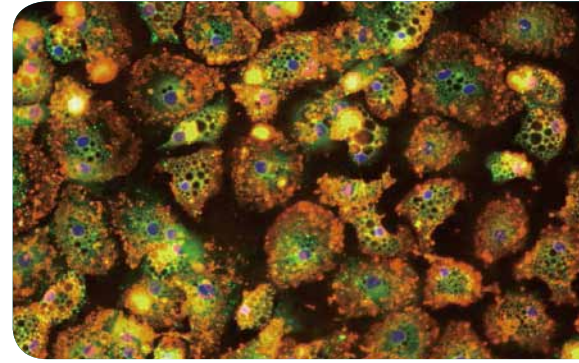


利用iPSC衍生的肝细胞 进行多参数高内涵肝细胞毒性检测



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。人诱导的多功能干细胞(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然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 XL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® 5软件的自定义模块进行分析。

活细胞染色比单独细胞计数更精确

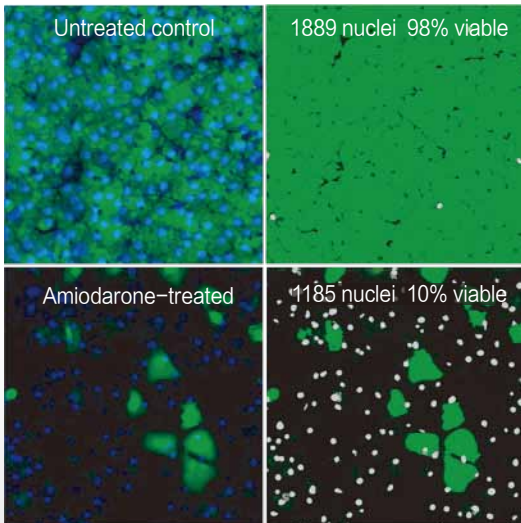


图1 Multi-Wavelength Cell Scoring应用模块对活细胞Calcein AM染色进行分析。右图中绿色蒙板标记出活细胞的核，灰色为死细胞的核。虽然阴性组合处理组的细胞核数相近，但是从活细胞百分比可看出处理药物Amiodarone毒性很强。另外，从细胞质的染色中还可分析细胞面积、荧光强度等，研究化合物的毒理机制。

从标准活性检测中获得更多信息

活性染色(例如Calcein AM)可以用来粗略的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 XL系统的10倍物镜我们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，虽然橙色的J-aggregates肉眼可见，但是对于膜去极化来说，这种染料可以进入到细胞质中并发出特定的荧光波长。在用ImageXpress Micro XL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)。

Valinomycin改变线粒体膜通透性

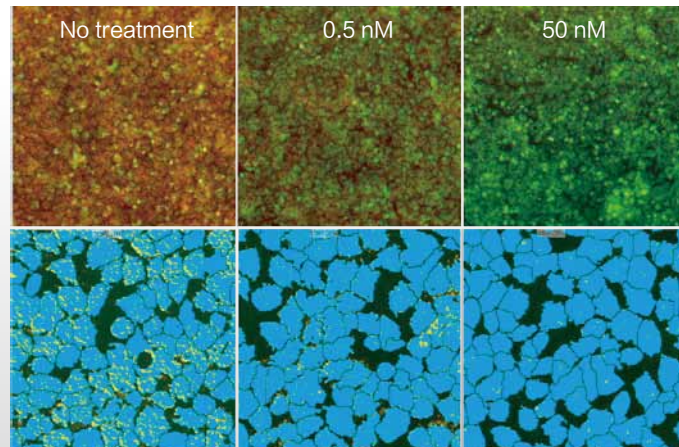


图2 肝细胞加Valinomycin处理60分钟。活细胞被JC-10着色并用10倍镜拍摄。上：绿色细胞质和红色线粒体的叠加图。下：经用户自定义分析的结果蒙板图。

优势

- 简易快速的对96或384孔板进行肝毒性筛选
- 在同一孔中得到多种肝毒性相关参数
- 利用用户自定义参数分析，结果更准确

磷脂质病和脂肪变性是最普遍的肝细胞毒性标志

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24小时后，用待测化合物处理孵育了4天。

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，形状，不同细胞的总数以及凋亡情况(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。

多参数肝细胞毒性筛选的完美解决方案

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信息。利用MetaXpress 5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非常人性化的高内涵筛选方法，这种方法大大领先于传统的非死即活的简单检测。

化合物处理造成的磷脂质病和脂肪变性

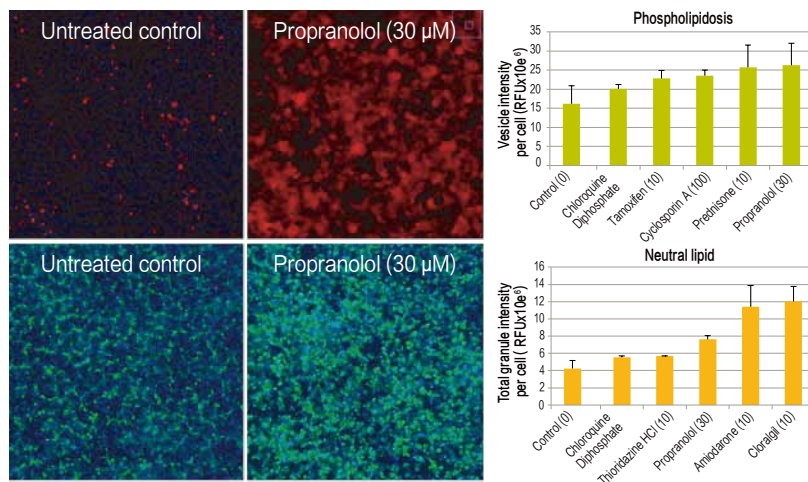


图3 肝细胞的 磷脂(上)和中性脂肪(下)染色，10倍镜获取图片。化合物处理的细胞脂质染色呈阳性(右)说明了化合物毒性的特殊机制。

多参数肝毒性评价

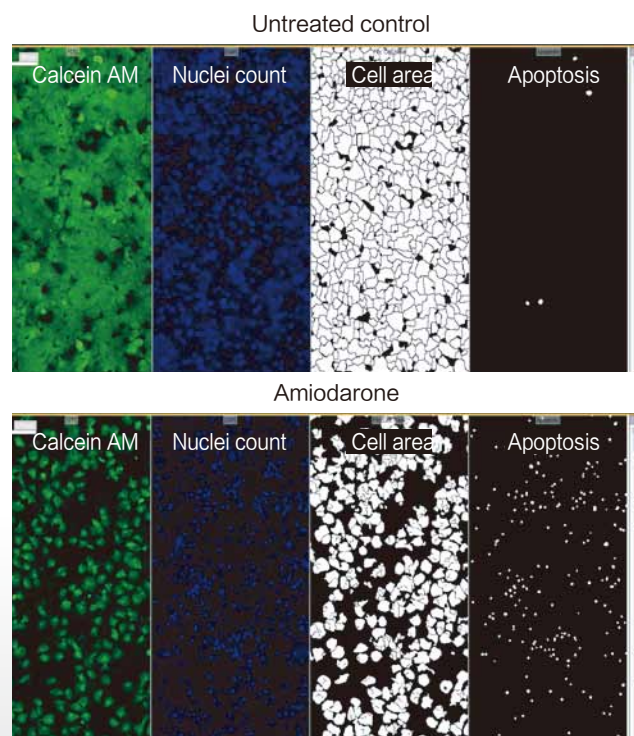


图4 用户自定义模块例子，分析了化合物处理后细胞面积、凋亡发生率和活细胞数。