

使用高内涵药物(HCA)分析提高癌症研究中伤口愈合试验的重复性；实现更高的分析精确度并减少试剂使用和处理时间

HCA主要特性

- IN Cell Analyzer 的成像速度和灵敏度能进行高内涵药物筛选 (HCS)
- 与手动设置相比，使用HCA可实现细胞培养板通量的120倍提高
- 与手动显微镜分析相比，量化结果将靶点检测的精确度至少提高了4倍
- 能够测量细胞之间的距离确保了肿瘤运动性相关基因的快速鉴定
- 明场成像减少了处理时间和试剂使用

解决方案

研究团队在96微孔板中培养了PC-3细胞并用其腺病毒shRNA敲除库将其转导。将转导细胞培养六天，使mRNA有效敲除并形成一层成片单层细胞。接着，在单层细胞上使用96针刮刀，造成0.4mm宽的一致机械刮伤（图1A）。历经数个小时，细胞被允许迁移进入这个开放空间。

随后，固定细胞并用IN Cell Analyzer 1000成像。采用透射光成像仍然开放的刮伤，使用IN Cell Developer进行细胞划分以及自定义预设分析模块量化结果。从而，这种算法保证了研究团队对抑制了细胞迁移的konck-down基因的鉴定。另外，研究团队使用此分析程序确定单层细胞中细胞之间的开放空间，可鉴定影响细胞增殖、粘附或存活力的konck-down基因（图1C）。

肿瘤微环境是癌细胞行为的一种重要中介体，所以为了最优化刮伤愈合分析，研究团队还使用此分析程序评估细胞外基质外层对迁移的影响。他们发现与未加涂层的微板相比，胶原-IV外层能增加前列腺癌细胞的移动性（图1B）。

为了给筛选提供基准并且控制微孔板之间和批次之间的差异，本研究团队挑选了一系列在每个筛选板上使用的阳性和阴性对照。选择疾病相关基因作为假定阳性对照并在各自的筛查中测试其对表型反应的影响。针对CXCR4的两个独立knock-down细胞系的研究证实前列腺癌细胞的移动性明显下降。此外，本研究团队还证实，ROCK2和PIK3CA基因的knock-down也会抑制移动性，而且该结构还直接抑制了不会影响迁移的无关基因（图1D）。

背景描述

间叶细胞能够在人体各处迁移，最终引起转移的肿瘤。癌细胞在体外也能保持其迁移能力，并且这通过体内影响肿瘤的相同信号通路调控。在三维和二维迁移中均观察到了细胞移动的基本机制，包括极化、肌动蛋白重塑、生长锥形成。一般而言，一层单层细胞中细胞闭合开放伤口的倾向可作为其迁移能力的预测。为了鉴定在癌细胞迁移中发挥作用的新的靶点，Galapagos的研究人员采用了人类PC-3前列腺癌细胞系、腺病毒shRNA敲除库以及IN Cell Analyzer，进行高通量的刮伤分析，筛查影响肿瘤细胞活力行为的成药基因。

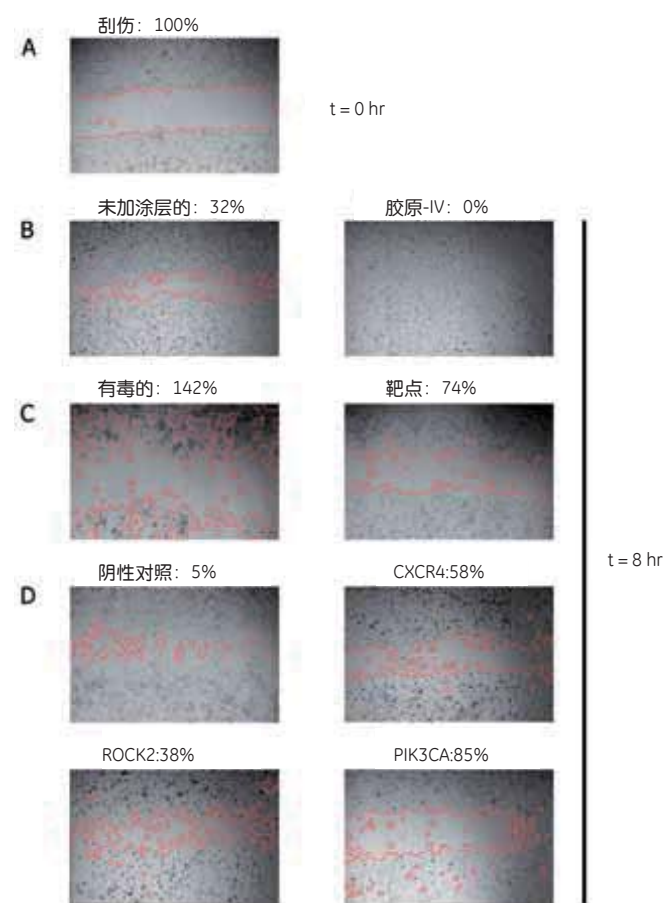


图1. 伤口愈合抑制。刮伤形成8小时后，阴性和阳性对照的典型图像。显示了开放空间的百分比。红色覆盖表示此开放空间划分。这些图像摘自以前出版的BTi, 21(2)(2009)中R.de Prii博士等人的一篇文章，已获得引用许可(1)。

“我们的新型伤口愈合分析在其他类型的设备上没有进行的可能，尤其是其成像的速度和灵敏度……IN Cell Analyzer保证了筛查的开展而不需要染色或计数筛选，因此节省了处理时间和试剂。”

Remko de Prii博士，Galapagos，AC Leiden，Netherlands(荷兰)

优点

“我们以前仅能用手动显微镜进行筛选，且一天仅能处理一个重复的96孔板样品”，Galapagos的首席科学家，Remko de Pril博士说。“HCA让我们一天能运行120个细胞培养板，因此我们的通量增加到原来的120倍。量化结果把检测靶点的精确度提高了至少3倍。总而言之，我们筛查的效率因此提高到480倍。”

此外，高内涵药物法确保了单层细胞中细胞间开放空间的测量。这使得研究人员可鉴定影响细胞增殖、粘附或存活力的knock-down靶点。根据相同的图像排除这些基因，不需要进行额外的毒性评估。

结论

癌细胞的入侵速度归因于间叶细胞战胜了肿瘤内细胞粘附的抑制效应。因此本次筛选鉴定出了新陈代谢中一组特别涉及到迁移通路的基因，并且高内涵药物筛查鉴定出了大量与肿瘤移动性有关的异常基因。鉴于腺病毒敲除库主要致力于drugable细胞，此项筛查产生的靶点能很快运用于小分子化合物生成或抗体疗法。

这项工作与Ortho Biotech Oncology R&D, Belgium（比利时）合作进行。