

3차원 세포 배양을 위한 스크리닝 도구로서의 광시야 현미경

응용 개요서



목차

서론	3
기기 구성	6
형태학 및 표현형 측면에서 3D 암 Spheroid 특성을 규명하기 위한 이미징 응용	8
3D PrimeSurface 초저 부착 마이크로플레이트를 사용한 명시야 및 형광 이미징	8
자동화 이미징 및 고성능 3D 세포 배양 기술을 활용하여 세포사멸 활동 정량화	11
3D spheroid 기반 종양 침습 어세이	15
참고 문헌	23

서론

신체에서 세포는 일반적으로 ECM 내부에 들어 있거나, 동일하거나 다른 계통의 세포와 직접적인 물리적 접촉을 이루고 있습니다.¹ 그러나 세포 생물학에서 대부분의 연구는 기존의 2차원(2D) 세포 배양 시스템에서 수행되며, 이는 세포의 자연적인 미세 환경을 그대로 재현하지 못합니다.² 조직에 존재하는 세포 기능은 2D 세포 배양에서 종종 손실되어 의약품 테스트의 예측 능력을 제한하고 세포 생물학 연구 결과에 영향을 미칩니다. 3차원(3D) 세포 배양 플랫폼은 세포 미세 환경을 더 우수하게 표현하는 세포 모델을 사용하여 연구해야 할 필요성을 충족하기 위해 생겨났습니다. 3D 환경의 세포는 단층 배양의 세포와 근본적으로 다르게 반응합니다.³ 2D와 3D 배양 모델 사이에서 관찰된 많은 차이점은 차등적인 세포-세포 및 세포-매트릭스 상호 작용으로 인해 발생합니다.² 최근에는 *생체* 내와 유사한 3D 세포 배양 기술을 개발하는 데 많은 연구가 이루어졌으며, 그 결과 3D 조직 형성을 촉진하는 다양한 제조 방법이 개발되었습니다.⁴ Spheroid 배양은 단순성, 재현성 및 생리학적 조직과의 유사성 때문에 3D 어세이 및 스크리닝에 대해 가장 우수하게 특성 규명된 모델 중 하나입니다.⁵ 3D 배양 모델 개발을 위한 최초의 시도는 hanging drop 분석법입니다. 이 분석법에서는 세포 부유물 방울이 담긴 플레이트에서 세포가 방울 바닥에 자연스럽게 모여듭니다.

또는 스피너 플라스크를 사용하면 자발적인 세포 응집이 가능합니다.⁶ 또 다른 기술인 정적 액체 오버레이 기술(LOT)은 부유 세포가 비부착성 기판에서 배양되어 세포가 표면에 부착되는 대신 응집되도록 합니다. 최근에는 저부착 등근 바닥 플레이트의 spheroid 형성이 대중화되었습니다. 이 분석법은 더 간단한 워크플로를 제공하고 고용량 이미징에 적합하기 때문입니다.⁷ 이러한 기술은 임상적으로 관련된 의약품 선택 및 복잡한 기관형 미세 조직 형성을 위한 고처리량 3D 조직 스크리닝과 같은 spheroid 배양의 새로운 응용을 발전시킵니다.

spheroid 형성을 촉진하고, 처리되지 않은 세포 내에서 최고 수준의 생존력을 유지하며, 관찰된 효과가 3D spheroid 배양의 처리에서만 발생하도록 하기 위해 중요한 단계를 거쳐야 합니다. 이러한 단계에는 실험 전반에 걸친 세포 분배, 정기적인 배지 교환 및 재투입이 포함되며, 특히 몇 주 동안 지속되는 *체외* 시험의 경우 더욱 그렇습니다. 실험 용품 부착에 의존하지 않는 세포 모델에서의 배지 교환은 단일 플레이트에서 수행하더라도 수동으로 수행하는 경우 엄두가 나지 않을 수 있습니다. 다중 채널 피펫은 매우 느린 속도로 배지를 제거 및 분주해야 하고 피펫 팁이 실제 spheroid에서 멀리 떨어져 있도록 주의해야 합니다. Agilent BioTek MultiFlo FX 멀티모드 디스펜서를 사용한 자동 분주는 수동 피펫팅보다 빠를 뿐만 아니라 부유 세포를 마이크로플레이트에 일관되고 부드럽게 분주하는 데 사용할 수 있습니다. 또한 MultiFlo FX용 Agilent BioTek 자동 배지 교환(AMX) 모듈을 사용하면 우발적인 spheroid 흡입 위험을 최소화할 수 있습니다. 사용한 배지는 자동으로 제거되고 새로운 배지로만 교체되거나 처리할 약물이 포함된 새로운 배지로 교체됩니다.

spheroid 어세이의 다양한 생물학적 판독이 설명되어 있습니다. 일반적인 분석법에는 플레이트 리더 기반 발광 또는 형광 측정과 같은 분석법을 사용하여 spheroid를 파괴하고 세포 용해물을 분석하는 것이 포함됩니다. 그러나 이미징은 spheroid의 중단이 필요하지 않고 여러 생물학적 판독이 가능하다는 점에서 플레이트 리더 기반 측정에 비해 장점이 있습니다. 따라서 고품량 이미징 분석법(high-content imaging)은 화합물 및 siRNA 라이브러리가 spheroid에 미치는 영향을 특성 규명하기 위한 유망한 기술인 것으로 입증되었습니다. 명시야 이미징은 spheroid의 형태학적 특성 분석에 사용될 수 있으며, 형광 이미징은 생존력 분석용 염료, DNA 결합용 염료, 세포사멸용 염료 또는 기타 형광 마커에 의존하는 표현형 어세이에 활용될 수 있습니다. 3D 구조를 염색하려면 2D 구조와 비교하여 프로토콜 최적화가 필요할 수 있습니다.

일반적으로 spheroid가 더 크고 단단할수록 표지 시약이 spheroid로 확산되는 데 더 오랜 시간이 걸리고 염색 과정이 완료되는 데 더 긴 배양이 필요합니다.

세포 투과성이 필요한 경우, 시약 선택과 배양 시간 길이를 고려해야 할 수도 있습니다. 이 응용 개요서에서는 spheroid와 함께 사용하도록 최적화된 3D 특정 시약을 소개합니다. spheroid 마이크로플레이트에서 배양된 세포에 1차 및 2차 접합 항체를 포함한 다양한 염색을 사용하는 데 성공했습니다. 또한, 사전 표지 또는 형광 단백질 발현 세포를 spheroid 마이크로플레이트에 시딩하기 전에 사용하여 모든 세포가 응용 분야의 필요에 따라 표지되도록 할 수 있습니다.

spheroid는 이것이 들어 있는 마이크로웰보다 훨씬 작기 때문에 신호가 웰 내 어디에서 나오는지(밀집된 영역인지 웰 내의 여러 영역인지) 이해하는 것이 중요합니다. 플레이트 리더는 각 웰에서 최대한 많은 빛을 포착하도록 설계되었으며 spheroid의 경우, 백그라운드에서 정확한 빛의 포인트가 소실됩니다. 다행스럽게도 현미경과 이미지 분석을 사용하면 시야가 대부분 spheroid로 제한되므로 웰에서 방출되는 백그라운드 방사를 피할 수 있습니다. 일반적으로 저배율 이미징은 하나의 이미지에 전체 spheroid를 포함하는 데 사용됩니다. 대물렌즈 심도가 큰 경우에도 spheroid 코어 내의 효과적인 이미징이 광산란에 의해 여전히 제한됩니다.

저배율 대물렌즈의 주된 이점은 전체 시료 폭을 포착한다는 것입니다. 이 접근법은 spheroid 직경 또는 평균 형광 강도의 변화에 관한 정보를 제공합니다. 3D 배양의 두께 때문에 구조를 관통해 이미지를 얻을 수도 있어야 합니다. 이미징 시스템은 3D 시스템의 전체 두께를 포괄하도록 초점 거리를 정의할 수 있는 z-스태킹이 가능해야 합니다. 이 기술을 사용하면 일련의 이미지가 서로 다른 초점 거리에서 캡처됩니다. 즉, 각 이미지에서 시료의 다양한 영역에 초점이 맞춰집니다. 이러한 이미지 중 시료에 초점이 완전히 맞춰진 것은 없지만 시료의 모든 부분에 초점이 맞춰진 이미지를 생성하는 데 필요한 모든 데이터가 집합적으로 포함되어 있습니다. 그런 다음 이미지의 초점이 맞는 부분을 유지하고 초점이 맞지 않는 정보를 제거하는 Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어의 수학적 알고리즘을 사용하여 z-스택의 다양한 슬라이스 이미지를 합성 이미지로 적합하게 조정할 수 있습니다. 이는 함께 결합하여 관심 구조에 대한 보다 사실적이고 선명한 3D를 이미지를 제공합니다. 3D 세포 구조의 세포 분석은 z-투영을 통해 향상시킬 수도 있습니다. 3D 시료의 서로 다른 초점 평면에 위치한 개별 세포의 명확한 z-투영 이미지를 통해 수행 중인 실험에서 보다 정확한 결론을 도출할 수 있습니다.

이 응용 개요서는 Agilent BioTek 고품량 이미징 기기와 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 수행되는 다양한 이미징 어세이를 통해 다양한 화합물 처리에 대한 반응으로 암 spheroid의 표현형 변화를 특성 규명하는 내용을 소개했습니다. 본 응용 개요서에서는 저부착 U-bottom 96- 및 384웰 플레이트, Etoplasia(마이크로웰 플레이트), 세 가지 일반적인 암세포에 대한 hanging drop 분석법과 같은 일반적인 spheroid 세포 배양 모델에 최적화된 spheroid 세포 배양 프로토콜을 제안합니다. 또한 적합한 시약과 액체 처리 시스템을 권장하여 어세이 시간을 줄이고 변동성을 최소화하는 향상된 염색 워크플로를 소개합니다. 3D 시료에서 단일 합성 이미지를 생성하는 z-투영 알고리즘을 사용하여 spheroid 이미지를 보다 원활하게 획득함으로써 다양한 spheroid 표현형을 효율적으로 비교할 수 있습니다. spheroid 형태와 표현형의 다중 파라미터 특성 규명을 제공하기 위해 Gen5에 자동 이미지 분석이 구현되었습니다. 어세이에 따라 Gen5는 형태학적 특성(예: spheroid 크기, 면적, 모양 및 부피)과 spheroid 생존력, 세포사멸, 저산소증과 같은 표현형 변화를 모니터링하기 위해 spheroid의 다양한 영역에서 나오는 신호를 측정하는 등 다양한 판독값을 보고합니다.

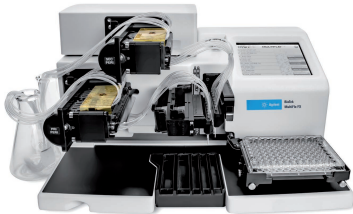
기기

Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더

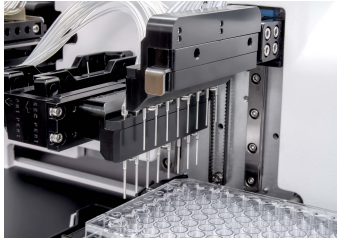


Agilent BioTek Cytation 5는 자동화된 디지털 현미경과 결합된 모듈식 멀티모드 마이크로플레이트 리더입니다. 필터 및 모노크로매터 기반 마이크로플레이트 판독이 가능하며 현미경 모듈은 형광, 명시야, 컬러 명시야 및 위상차에서 최대 60x 배율을 제공합니다. 이 기기는 단일 단계로 최대 4개 채널에서 형광 이미징을 수행할 수 있습니다. 라이브셀 어세이에 특히 중점을 둔 Cytation 5는 진탕, 65 C까지의 온도 제어, CO₂/O₂ 가스 제어 및 키네틱 분석을 위한 이중 주입기를 특징으로 하며 통합된 Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어에 의해 제어되고 이미지 캡처, 분석 및 처리도 자동화합니다. 이 기기는 배양 기간 동안 3D tumoroid 활동을 시간대 별 모니터링하는 데 사용되었습니다.

Agilent BioTek MultiFlo FX 멀티모드 디스펜서



Agilent BioTek MultiFlo FX 멀티모드 디스펜서는 여러 개의 디스펜서를 하나의 소형 장치에 결합하여 전체 기기 비용을 줄이고 처리 시간을 절약하며 프로세스를 단순화합니다. MultiFlo FX는 최대 2개의 페리 펌프(8튜브 디스펜서), 2개의 시린지 펌프 디스펜서 및 스트립 워셔를 포함할 수 있는 업그레이드 가능한 모듈식 시약 분주입입니다. 시린지 및 워셔 매니폴드는 6-384웰의 플레이트 종류에 맞게 구성할 수 있습니다. 세포 기반 어세이에 사용하기 위해 MultiFlo FX를 laminar flow 후드에 배치하여 멸균 작업을 수행할 수 있습니다. 이 응용 개요서에 자세히 설명된 어세이에서는 MultiFlo FX를 사용하여 어세이 웰에 세포와 배지 및 시약을 분주했습니다. MultiFlo FX에는 Agilent BioTek 자동 배지 교환(AMX) 모듈이 장착되어 있습니다.



Agilent BioTek 자동 배지 교환(AMX) 모듈

Spheroid 배양 배지 교환은 Agilent BioTek 자동 배지 교환(AMX) 모듈을 사용하여 수행할 수 있습니다. 이 모듈은 8개의 스테인레스 스틸 튜브 흡입 및 분주 헤드가 있는 두 개의 독립적인 전용 연동 펌프 카세트로 구성됩니다. 카세트 튜브 내 용액은 MultiFlo FX의 연동 펌프를 통해 배지 병이나 튜브로 공급됩니다. 소프트웨어를 사용하면 흡입 또는 분주 절차 중에 spheroid를 방해하지 않도록 펌프를 천천히 부드럽게 작동시킬 수 있습니다. 각 카세트는 완전한 오토클레이브가 가능하므로 멸균 처리할 수 있습니다.



Agilent BioTek BioSpa 8 자동화 인큐베이터

Agilent BioTek BioSpa 8 자동화 인큐베이터는 Agilent BioTek 리더 또는 이미저를 Agilent BioTek 워셔 및 디스펜서와 연결하여 최대 8개의 마이크로플레이트 전체 워크플로를 자동화합니다. 온도, CO₂/O₂ 및 습도 수준은 Agilent BioTek BioSpa 소프트웨어를 통해 제어 및 모니터링되어 모든 실험 단계에서 세포 배양에 이상적인 환경을 유지합니다. 테스트 플레이트는 BioSpa내부에서 7일 동안 적절한 대기 조건을 유지한 상태로 명시야 및 형광 이미징을 위해 12시간마다 자동으로 Cytation 5로 옮겨졌습니다.

형태학 및 표현형 측면에서 3D 암 Spheroid 특성을 규명하기 위한 이미징 응용

3D PrimeSurface 초저 부착 마이크로플레이트를 사용한 명시야 및 형광 이미징

어세이 소개

균일한 spheroid의 형성은 강력하고 신뢰할 수 있는 어세이의 기초이므로 매우 중요합니다. S-BIO PrimeSurface 배양 도구는 골격이 없는 자가 조립 spheroid 형성을 촉진하는 초저부착(ULA) 트레이 및 플레이트입니다. 이 플레이트는 균일한 크기의 자발적 spheroid 형성을 가능하게 하는 특수한 친수성 폴리머로 사전 코팅되어 있습니다. Prime Surface 96 및 384 ULA 플레이트는 광학 선명도가 뛰어나 명시야 및 형광 이미징에 매우 적합합니다. Agilent BioTek 세포 이미징 멀티모드 리더와 같은 이미징 기술을 사용하면 명시야 이미징을 통한 spheroid 증식뿐만 아니라 형광 프로브 및 형광 이미징을 사용한 표현형 반응도 연구할 수 있습니다. Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어에 z-스태킹 및 투영 기술을 통합하면 spheroid 세포에 초점이 맞는 이미지가 생성되어 테스트 분자 또는 조건의 효과를 정확하고 강력하며 반복적으로 측정할 수 있습니다. 이 응용 개요서에서는 명시야 및 형광 이미징을 위한 간단하고 견고한 spheroid 어세이를 개발하기 위해 PrimeSurface ULA 플레이트를 사용하는 Agilent BioTek Cytation 5 세포 이미징 멀티모드 리더로 생성된 데이터를 제시합니다.

분석법 요약

HT-1080 세포를 96웰 및 384웰 PrimeSurface U자형 바닥 마이크로플레이트에 웰당 50-10,000개 세포 범위의 다양한 농도로 시딩했습니다. 마이크로플레이트를 48시간 동안 배양하여 세포가 spheroid로 응집되도록 했습니다. spheroid 형성 후, 세포를 Camptothecin으로 처리하고 플레이트를 추가로 24시간 동안 배양하여 처리된 spheroid 세포 내에서 괴사를 유도했습니다. 다음날, 1x CellTox Green (Promega Corporation, Madison, WI) 괴사성 세포 염색용 시약이 포함된 배지로 교체하고 세포를 5시간 동안 배양하여 형광 프로브가 세포 내로 침투하도록 했습니다. spheroid 내의 세포가 z-평면 범위 내에 존재하므로 z-스택 이미지는 초점 평면 위와 아래에서 캡처되어 세포가 적절한 z-높이에서 이미지화되도록 했습니다. 3D 이미지 처리를 적용하여 z-스택에서 이미지의 z-투영을 생성했습니다. 그런 다음 명시야 채널에서 처리되지 않은 가변 크기 spheroid를 식별하기 위해 최적화된 개체 선택 기준에 따라 투영된 이미지에 세포 분석 단계를 적용했습니다. Camptothecin 처리에 의해 유도된 괴사 활성의 정도를 결정하기 위해 약물이 처리된 spheroid에 대해 추가 세포 분석 단계를 수행했습니다.

결과 요약

형성된 spheroid의 명시야 이미징

z-투영 이미지를 시각적으로 분석하면 HT-1080 세포가 96웰 U 바닥 플레이트 내에서 단단한 spheroid를 형성할 수 있음이 드러납니다. Gen5 마이크로플레이트 리더와 이미지 소프트웨어에서 사용하는 z-스태킹 및 투영 분석법은 크기에 관계없이 정확하고 초점이 맞는 spheroid와 같은 이미지를 생성한다는 것도 분명합니다. Gen5는 면적 및 직경 측정에 필요한 명시야 이미지의 기본 마스크를 정확하게 배치하여 각 spheroid를 정확하게 식별합니다(그림 1A-C). 두 측정 항목을 사용하여 부피 계산을 수행할 수 있습니다. Spheroid 부피 분석은 96웰 및 384웰 형식 모두에서 수행되었습니다. 세포 분주 밀도의 함수로서 spheroid 부피 분석의 정밀도와 직선성은 그림 1D에서 96웰 및 384웰 PrimeSurface 플레이트 모두에 대해 입증되었습니다.

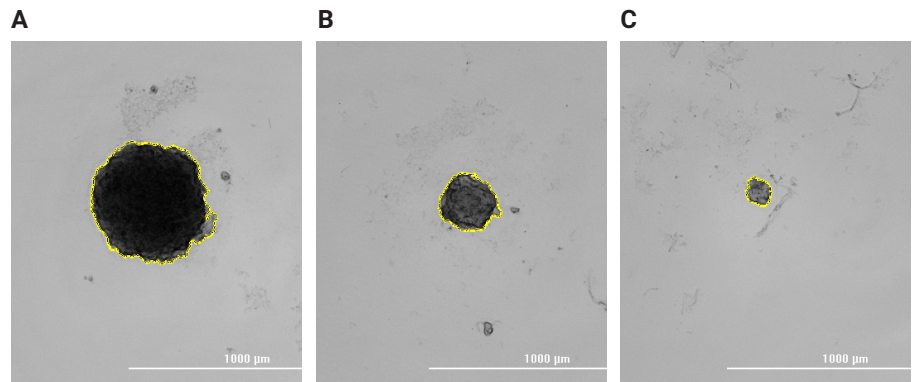
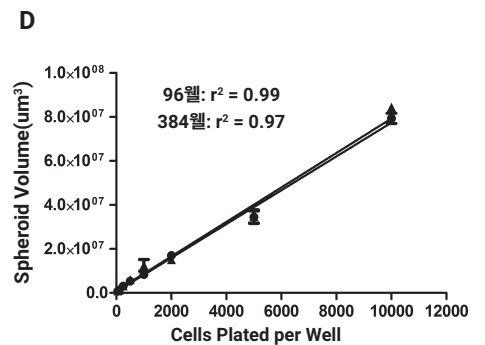


그림 1. 테스트 spheroid의 세포 분석. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어는 다음으로 형성된 spheroid 주위에 개체 마스크를 자동으로 표시합니다
(A) 10000;
(B) 1000; 및 (C) 50개 세포.
(D) Gen5 96 및 384웰의 계산된 spheroid 부피에 따른 선형 회귀성 그래프.



spheroid 내 괴사 세포 유도의 형광 이미징

이후 GFP 채널에서 캡처된 형광 이미지를 분석하여 Camptothecin으로 인한 괴사 세포 유도 수준을 확인했습니다. 명시야 채널에서 각 spheroid를 마스킹한 후 Gen5는 각 테스트 spheroid 내의 괴사 세포로만 덮인 영역을 계산합니다(그림 1A-C). 이러한 U자형 바닥 플레이트의 기하학적 구조로 인해 투명 벽의 백그라운드 자가형광이 최소화되어 영향을 받은 세포의 신호 변화를 쉽게 구별할 수 있음을 분석을 통해 확인했습니다. 괴사 세포 면적을 전체 세포 면적으로 나누어 영향을 받은 세포 비율의 적용 범위를 생성(normalization)했으며, 이는 처리된 1000개 세포 spheroid 사이의 면적 차이를 설명합니다. 그런 다음 처리에 사용된 Camptothecin의 농도를 기준으로 값을 산출했습니다(그림 2D). 명시야 이미지를 보면 플레이트 바닥에서 생성된 백그라운드 신호 (high background signal)가 상대적으로 밝고 강도가 매우 균일하다는 것이 분명합니다.

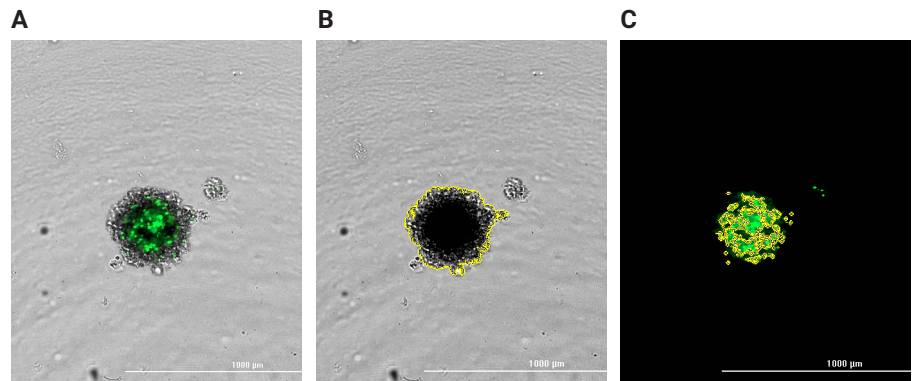
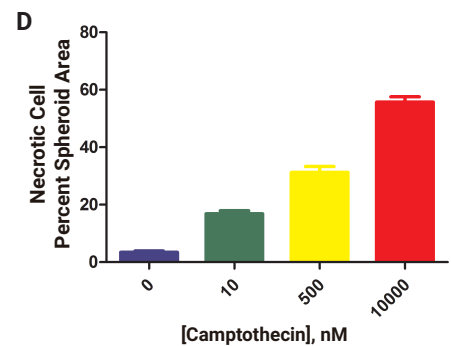


그림 2. Camptothecin에 의한 spheroid 세포 괴사의 이미징 및 분석. (A) 24시간 10,000 nM Camptothecin 처리 후 spheroid의 4x z-투영, 중첩된 명시야 및 GFP 이미지. (B) spheroid 주위에 표시된 기본 마스크 (C) 처리된 spheroid의 괴사 세포 분석. Agilent BioTek Gen5는 spheroid 내의 GFP 양성 영역(괴사 세포) 주위에 개체 마스크를 자동으로 표시합니다. (D) 가변 Camptothecin 처리 후 영향을 받은 괴사 세포로 덮인 spheroid 영역의 백분율을 나타낸 그래프입니다.



spheroid 형성 모니터링을 위해 Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Dong, G. et al. "Serum-Free Culture System for Spontaneous Human Mesenchymal Stem Cell Spheroid Formation". *Stem Cells Int.* 2019, **2019**.
2. de la Cruz Bonilla, M., Stemler, K. M., Taniguchi, C. M. & Piwnicka-Worms, H. "Stem cell enriched-epithelial spheroid cultures for rapidly assaying small intestinal radioprotectors and radiosensitizers *in vitro*". *Sci. Rep.* 8, 2–9, **2018**.

자동화 이미징 및 고성능 3D 세포 배양 기술을 활용하여 세포사멸 활동 정량화

어세이 요약 및 시약

세포사멸, 즉 프로그램화된 세포사멸은 모든 다세포 유기체의 정상적인 발달과 항상성에 필수적이며 실제로 암 퇴치를 위한 핵심 연구 도구입니다. 그러나 2D 배양 종양 세포를 사용하는 경우 암 치료제/화학물이 체내에서와 동일한 방식으로 반응하지 않을 수 있으므로 문제가 남아 있습니다. 3차원(3D) 분석법은 세포에 더 많은 생리학적 조건을 제공하며, 이는 종양 세포의 작용 기전과 의약품 저항성을 조사하는 데 유용합니다. 이 응용 자료에서는 HT-1080 섬유육종 세포 및 HCT116 대장 암종 세포에 대한 Doxorubicin HCl 및 Oridonin의 세포사멸 가능성을 밝히는 데 사용되는 새로운 3D spheroid 세포 배양 모델인 Eplasia의 유용성을 설명합니다. 마이크로웰 구조는 각 웰 중심에서 spheroid 형성을 지원하며, 광학적으로 투명한 둥근 바닥은 세포 이미징을 가능하게 하고 불투명한 구조물은 교차 간섭(cross-talk)을 방지합니다. 그런 다음 세포 이미징 멀티모드 리더를 사용하여 spheroid 성장 및 spheroid 내 유도된 세포사멸 수준을 정량화했습니다.

분석법 요약

HCT116 및 HT 1080 세포를 수집하고, 50 μ L의 부유 세포를 Eplasia 384웰 마이크로플레이트의 별도 테스트 웰에 첨가하여 마이크로 공간당 총 약 50개의 세포가 들어가도록 만들었습니다. 플레이트를 48시간 동안 배양하여 세포가 응집되도록 했습니다. Hoechst 33342 및 Kinetic Apoptosis Kit (Abcam, Cambridge, UK)에 포함된 Kinetic Apoptosis Reagent, pSIVA-IANDB를 포함하는 배지를 1:4 비율로 희석하여 0-20 μ M(2x) 범위의 Doxorubicin 및 Oridonin의 연속 농도로 만들었습니다. Phosphatidylserine은 세포막의 세포질 쪽에 위치한 구성 요소로, 세포의 외부 표면에 지속적으로 또는 일시적으로 노출되어 초기 세포사멸을 알 수 있습니다. 세포막 비침투성 형광 프로브인 pSIVA-IANDB는 phosphatidylserine에 결합하여 시간 경과에 따른 세포사멸을 모니터링할 수 있는 강력한 녹색 형광 신호를 생성합니다.

spheroid 생성 후, 각 웰에서 25 μ L의 배지를 제거하고 동일한 양의 doxorubicin 또는 oridonin 화합물을 농도별로 교체했습니다. spheroid 세포사멸 분석을 위해 플레이트를 Cytation 5에 넣고 48시간 동안 4시간마다 키네틱 이미징을 수행했습니다. 전체 웰을 시각화하기 위해 통합된 2x2 이미지 몽타주와 함께 명시야 이미징 채널을 사용하여 전체 웰을 이미지화하는 데 4x 대물렌즈가 사용되었습니다. DAPI 및 GFP 이미징 채널과 함께 동일한 대물렌즈를 사용하여 각각 모든 spheroid 및 세포사멸 spheroid를 이미지화했습니다.

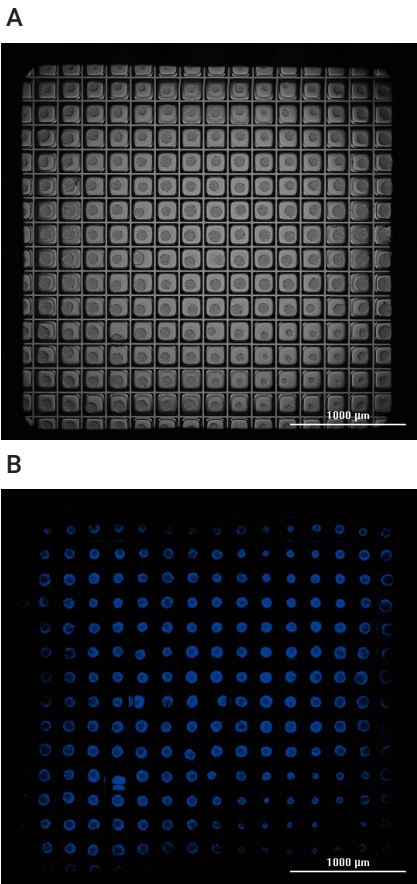


그림 3. 4x 배율의 마이크로 공간 이미징. (A) 웰 마이크로 공간에 HCT116 spheroid의 2x2 몽타주 이미지 스티칭. (B) spheroid 위치의 DAPI 채널 이미징.

결과 요약

HCT116 spheroid 증식과 마이크로 공간 내 위치는 Cytation 5 및 Gen5 마이크로플레이트 리더와 이미지 소프트웨어를 사용하여 확인했습니다. 명시야 이미징을 사용하여 웰을 덮기 위해 4개의 이미지를 2x2 구성으로 캡처했습니다. Gen5 소프트웨어로 이미지를 스티칭하여 하나의 웰에서 모든 마이크로 공간의 최종 단일 이미지를 생성했으며(그림3A), Hoechst 33342 염색을 통해 DAPI 채널을 사용하여 spheroid를 식별할 수 있었습니다(그림3B). pSIVA-IANBD, HCT116 및 HT 1080을 사용하여 spheroid 세포사멸 활동을 테스트 대상 화합물 농도 범위에 걸쳐 추적했습니다. spheroid를 400 nM doxorubicin으로 48시간 동안 처리하면 높은 세포사멸 활성이 관찰되었으며, 이는 높은 수준의 녹색 형광으로 나타납니다(그림 4B).

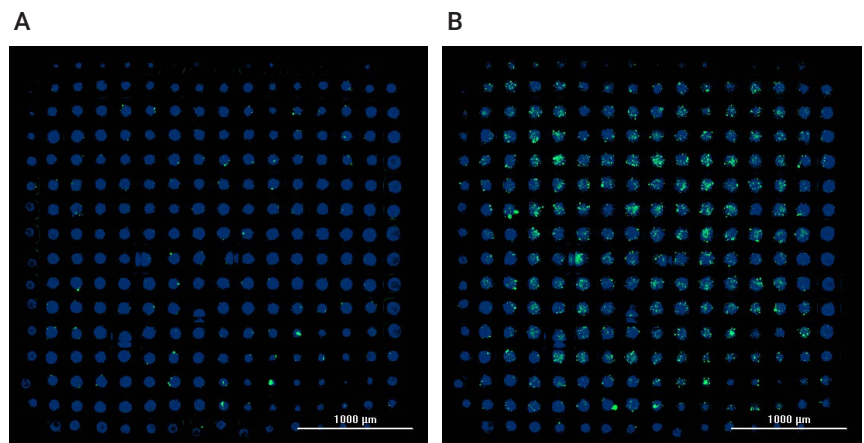


그림 4. 400nM doxorubicin으로 처리된 HT-1080 세포의 세포사멸 활성. 4x DAPI 및 GFP 채널 이미징 (A) 처리 후 24시간 및 (B) 처리 후 48시간.

Gen5의 세포 분석 기능을 사용하여 강도 임계값 및 개체 크기 범위와 같은 개체 선택 기준을 최적화함으로써 각 이미지에서 개별 spheroid를 자동으로 감지했습니다. spheroid가 아닌 개체는 표 1에 설명된 크기 및 원형도 하위 집단 기준을 사용하여 제외시켰습니다.

표 1. Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 형광 spheroid 분석 기본, 고성능 및 하위 집단 파라미터.

Spheroid 1차 세포 분석 파라미터	
채널	DAPI
임계값	자동-2
백그라운드	어두움
최소 개체 크기	25µm
최대 개체 크기	150µm
마스크의 홀 채우기	체크됨
개체 별 분할	체크됨
전체 이미지 분석	체크됨
기본 엷지 개체 포함	체크 해제됨

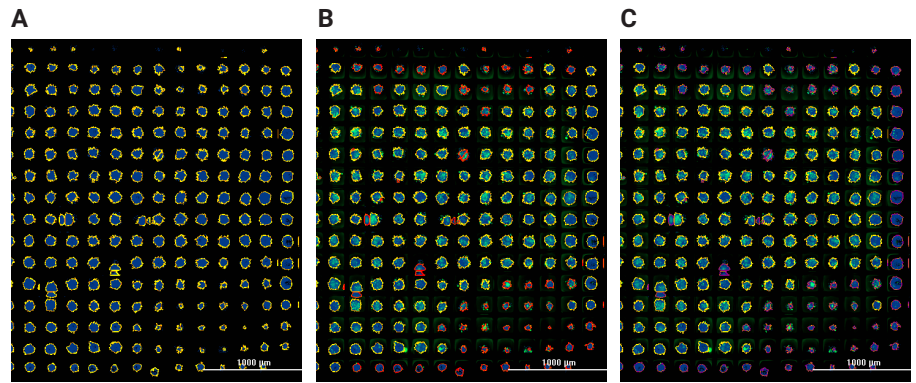
(계속)

고성능 옵션	
백그라운드 평가 커짐	최저 픽셀의 5%
이미지 스무딩 강도	0
백그라운드 평탄화 크기	1000 μ m
실제 Spheroid 하위 집단 파라미터	
크기	>85 μ m
원형도	>0.4
세포사멸 Spheroid 하위 집단 파라미터	
크기	>85 μ m
원형도	>0.4
평균 GFP	>6000

마지막으로, 평균 GFP 신호 강도에 대한 임계값을 설정하여 세포사멸 spheroid의 수를 식별하기 위해 두 번째 하위 집단 필터를 적용했습니다(그림 5A-C). 세포 분석 파라미터는 세포 유형에 따라 달라질 수 있으므로 파라미터 최적화는 정확성을 확인하기 위해 항상 여러 웰에서 수행되어야 합니다. 이 결과는 예측된 의약품 효능이 각 웰의 spheroid 수의 불일치로 인해 왜곡될 수 있음을 보여줍니다. 이러한 이상 현상을 설명하기 위해 판독값으로 웰당 세포사멸 spheroid 비율을 살펴보았습니다. 이 값은 세포사멸 spheroid 수를 웰당 확인된 실제 spheroid 총 수로 나누어 계산되었습니다. 결과로 나타나는 세포사멸 spheroid 백분율 키네틱 그래프를 사용하여 3D spheroid에 미치는 화합물 효과 간의 차이를 확인할 수 있습니다.

그림 5에서 알 수 있듯이, 화합물은 낮은 화합물 농도에서 세포사멸 spheroid 비율의 급속한 증가로 나타나는 것처럼 HT1080 spheroid에 대해 더 강한 세포사멸 효과를 나타냅니다. 그러면 세포사멸 활성은 1000nM 이상의 화합물 농도에서 감소하며, 이는 각 spheroid 내의 세포가 괴사되기 때문일 가능성이 높습니다. 세포사멸 반응을 유도하기 위해 더 높은 화합물 농도가 필요하기 때문에 HCT116 spheroid는 화합물에 대한 저항성이 더 높습니다.

결합된 결과는 세포 이미징과 Etoposide spheroid 마이크로플레이트를 사용하여 개별 세포 유형(예: 일차 세포, 줄기 세포 및 암 세포주)과 의약품 조합에서 특정 표현형 세포사멸 효과를 감지할 수 있음을 보여줍니다.



D

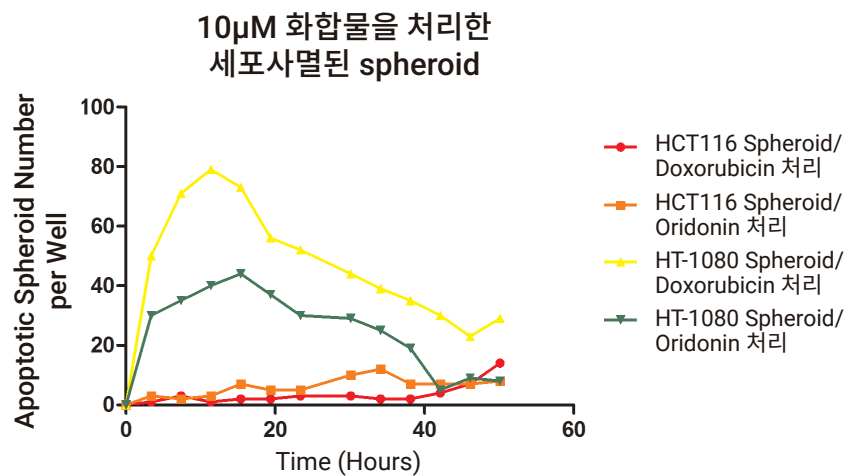


그림 5. 웰당 세포사멸 spheroid 수를 결정하기 위한 세포 분석 절차.

(A) DAPI 채널로 측정된 Hoechst 33342 신호를 사용하여 기본 및 고성능 세포 분석 기준을 충족하는 개체 주위에 자동으로 그려진 Agilent BioTek Gen5 마이크로플레이트 리더 및 이미지 소프트웨어 마스크. (B) 최소 크기 및 원형도 하위 집단 요구 사항을 충족하지 않는 제거된 아티팩트 및 spheroid를 나타내는 빨간색 개체 마스크; (C) 세포사멸 spheroid 기준을 충족하지 않는 것 외에도 초기 하위 집단을 충족하지 않음을 나타내는 보라색 개체 마스크. (D) 단일 10 μ M 농도의 doxorubicin 또는 oridonin으로 처리된 세포사멸 HCT116 또는 HT-1080 spheroid의 백분율을 보여주는 키네틱 그래프.

spheroid의 세포사멸을 측정하기 위해 Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Darrigues, E. et al. "Tracking Gold Nanorods' Interaction with Large 3D Pancreatic-Stromal Tumor Spheroids by Multimodal Imaging: Fluorescence, Photoacoustic, and Photothermal Microscopies". *Sci. Rep.* 10, 3362, **2020**.
2. Nanayakkara, A. K. et al. "Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells". *Sci. Rep.* 8, 1–18, **2018**.

3D Spheroid 기반 종양 침습 어세이

어세이 소개

종양학 의약품 발견은 수년에 걸쳐 여러 가지 과제에 직면해 왔습니다. 전이의 침습적 표현형 억제에 초점을 맞춘 새로운 치료법의 발전은 특히 암전이로 인해 사망하는 환자의 사망률이 높다는 점에서 의미 있는 개입의 가능성을 높여줍니다. 의약품 개발 과정에서 관련 감소율을 줄이기 위해, 초기 의약품 발견에 사용되는 3D *체외* 세포 모델은 복잡한 전이 과정을 최대한 유사하게 모방해야 합니다. *체내* 종양은 암과 스트로말 세포를 포함한 다양한 세포 유형의 3차원(3D) 덩어리로 존재합니다. 따라서 tumoroid를 형성하는 공동 배양된 세포 유형을 포함하는 3D spheroid 유형 세포 구조를 도입하면 마이크로플레이트에 시드된 개별 암세포를 사용하는 것보다 더 예측 가능한 모델이 얻어집니다.

세포 침습 과정을 포착하려면 장기적인 키네틱 실험을 수행해야 합니다. 따라서, spheroid의 세포 생존력이 이 장기간에 걸쳐 유지되고 추정 의약품 효과를 적절하게 평가할 수 있도록 어세이의 환경 제어가 필요합니다. 마지막으로, spheroid의 크기가 작기 때문에 종양 침습을 모니터링하는 데 적합한 유일한 판독 방법은 현미경 검사입니다. 효과적인 의약품 발견을 위해서는 현미경에 다양한 어세이 조건, 테스트 대상 화합물 및 포착된 키네틱 이미지를 처리할 수 있도록 자동화된 이미지 캡처, 처리 및 분석 기능이 갖추어져 있어야 합니다.

이 연구에서는 3D spheroid tumoroid 구조의 생성, 적합한 침습 매트릭스 생성, 자동화된 키네틱 이미지 기반 모니터링, 그리고 종양 침습의 캡처된 z-스택 이미지에 대한 세포 분석을 위한 절차를 보여줍니다.

표현형 차이와 전이 능력을 입증한 U-87 및 LN-229 다형성 교모세포종(GBM) 세포주가 이 연구에 사용되었습니다. 두 세포 유형 모두 섬유아세포와 함께 배양하여 *체내* 종양 상태를 보다 밀접하게 나타내는 3D tumoroid를 생성하고 단백질 매트릭스를 통해 침습할 수 있도록 했습니다. 종양 성장에 필요한 단백질을 안정화시키는 샤프론 단백질인 열충격 단백질 90(Hsp90)의 기능을 억제하는 것으로 알려진 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)이 잠재적인 종양 침습을 억제하기 위해 여기에서 사용되었습니다. 억제된 tumoroid 배양과 억제되지 않은 tumoroid 배양의 침습력을 특성 규명하기 위해 키네틱 캡처 이미지의 정량화가 사용되었습니다.

분석법 요약

중양 침습 어세이 준비

완전한 배지에서 각 세포 유형에 대해 2.5×10^4 cells/mL의 최종 농도로 U-87과 섬유아세포를 결합하여 혼합 세포 부유물을 만들었습니다. 100 μ L의 세포 부유물을 적절한 마이크로플레이트 웰에 분주한 후, 마이크로플레이트를 48시간 동안 배양하여 세포가 tumoroid로 응집되도록 했습니다. 동일한 농도 및 부피에서 CellTracker Deep Red 염료(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA.)로 염색된 LN-229 세포와 섬유아세포에 대해 이 과정을 반복했습니다. Tumoroid 형성이 완료되면, 70 μ L의 완전한 배지를 각 웰에서 로봇 방식으로 제거하고 tumoroid 플레이트를 냉장고의 얼음 위에 5분 동안 놓아 세포를 냉각시켰습니다. 그 후 Matrigel 매트릭스를 얼음 위에서 해동했습니다. 0.2×10^4 nM 범위의 다양한 농도의 17-AAG를 침습 배지 또는 Matrigel 매트릭스에서 제조했습니다. 그 후, 70 μ L의 Matrigel 매트릭스와 적정 화합물을 tumoroid를 포함하는 각 웰에 첨가한 다음 적정 화합물을 포함하는 100 μ L의 침습 배지로 덮었습니다. 마이크로플레이트를 300 x g에서 5분간 원심분리하고 1시간 동안 배양하여 겔 형성을 시작했습니다.

중양 침습 이미징 및 분석

겔 형성이 완료된 후 마이크로플레이트를 BioSpa 8 자동화 인큐베이터로 옮겼습니다. 여기서 7일의 배양 기간 동안 12시간마다 웰의 명시야 및 형광 이미징을 얻기 위해 마이크로플레이트가 자동으로 Cytation 5로 옮겨지도록 소프트웨어를 프로그래밍했습니다. 표 2에는 각 시료 웰의 자동 이미지 캡처를 수행하는 데 사용되는 설정이 나와 있습니다. Tumoroid 조직의 전체 면적과 깊이를 포착하기 위해 이미지 몽타주와 z-스택을 함께 사용했습니다.

표 2. 자동화된 3D tumoroid 침습 이미징 파라미터.

	이미징 파라미터
명시야 이미징 채널	완전한 3D 침습 구조
GFP 이미징 채널	GFP를 발현하는 U-87 세포
RFP 이미징 채널	RFP를 발현하는 섬유아세포
CY5 이미징 채널	CellTracker 진한 적색 염료로 염색된 LN-229 세포
대물렌즈	4x
몽타주	3행 x 2열
몽타주 오버랩	자동 스티칭
Z-스택	20조각
Z-스택 단계 크기	53.8 μ m(4x 대물렌즈의 기본값)

먼저, 개별 타일을 병합하기 위해 이미지 스티칭을 적용했습니다(표 3A).

표 3A. 이미지 스티칭 파라미터.

이미징 스티칭 파라미터	
등록 채널	명시야
융합 분석법	선형 혼합
테두리의 검은색 직사각형을 제거하기 위해 스티치 이미지 자르기	체크됨
최종 이미지 축소	체크됨 (52.62%)

20 조각 스티칭 z-스택에서 단일 이미지 투영이 생성되었습니다(표 3B).

표 3B. 이미지 Z-투영 파라미터.

이미징 Z-투영 파라미터	
채널 1	스티칭[명시야]
분석법	초점 스테킹
최대 필터 크기	11픽셀
Z-슬라이스 포함	1-20
채널 2-4	스티칭[GFP], 스티칭[RFP], 스티칭[CY5]
분석법(채널 2-4)	채널 1의 설정 사용

최종 투영에 포함하기 위해 스택의 각 이미지에서 가장 초점이 맞는 픽셀을 자동으로 선택하는 초점 스테킹 분석법이 선택되었습니다. 이를 통해 각 시점에서 각 침습 종양에 대해 가장 정확한 분석을 수행할 수 있습니다. 종양 침습을 정량화하기 위해 명시야 채널에서 1차 마스크 세포 분석 기준을 적용하여 각 최종 이미지의 전체 침습 구조 주위에 개체 마스크를 자동으로 배치했습니다(표 4A).

원래의 spheroid tumoroid 구조 내에 남아 있는 비침습성 세포 주위에 추가 마스크를 배치하기 위해 2차 마스크 세포 분석 기준도 적용되었습니다(표 4B).

표 4A. 1차 마스크 분석 파라미터.

1차 세포 분석 파라미터	
채널	ZProj[스티칭[명시야]]
임계값	25,000
백그라운드	빛
개체 별 분할	체크 해제됨
마스크의 홀 채우기	체크됨
최소 개체 크기	300 μ m
최대 개체 크기	2000 μ m
기본 엣지 개체 포함	체크됨
전체 이미지 분석	체크됨
고성능 검출 옵션	
롤링 볼 직경	2000
이미지 스무딩 강도	0
백그라운드 평가 켜짐	최저 픽셀의 5%
분석 지표	
관심 지표	개체 영역

표 4B. 2차 마스크 분석 파라미터.

2차 세포 분석 파라미터	
채널	ZProj[스티칭[명시야]]
2차 마스크 내에서 측정	1차 마스크 포함
1차 마스크 줄이기	1 μ m
임계값	12,000
스무딩	7
마스크의 홀 채우기	체크 해제됨
분석 지표	
관심 지표	개체 영역_2[ZProj[스티칭[명시야]]]

어세이 결과

7일의 배양 기간 동안 억제되지 않은 U-87/섬유아세포 tumoroid는 크기가 계속 증가했을 뿐만 아니라 단백질 매트릭스 내로 침습했습니다. Invadopodia를 포함한 전체 침습 구조가 x, y 및 z-축에서 캡처되도록 하기 위해 몽타주 형식으로 전체 z-높이 범위에 걸쳐 여러 이미지를 자동으로 얻었습니다(표 2). 명시야 이미징 외에도 몽타주 타일과 z-스택 레이어도 GFP 및 RFP 채널을 사용하여 캡처했습니다.

오버레이 이미지는 전체 구조의 침습을 추적합니다(그림 6). 공동 배양된 각 세포 유형에서 방출되는 형광 신호를 관찰하여 테스트한 두 세포 유형의 이동 형태를 비교했습니다. U-87/섬유아세포 모델의 경우, 명시야 이미지는 원래 전파되는 tumoroid에서 확장되는 광범위한 invadopodia를 보여줍니다(그림 7A). 그림 4B의 GFP 이미지에서 GFP 발현 U-87 세포가 매트릭스로의 invadopodia 침습을 따르는 것이 명백하게 드러납니다. 이는 그림 4C의 RFP 이미지와 대조되며, RFP 발현 섬유아세포가 이 실험 모델 내에서 이동 능력을 거의 또는 전혀 나타내지 않음을 확인시켜줍니다.

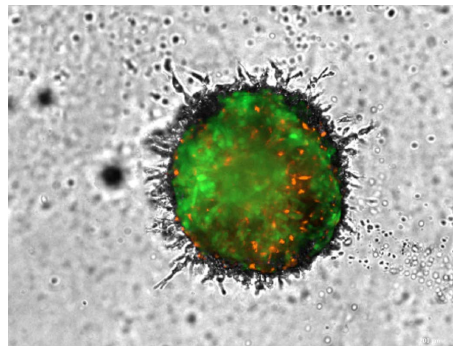


그림 6. 명시야 및 형광 오버레이 U-87/섬유아세포 공동 배양 세포 모델의 z-투영 이미지.

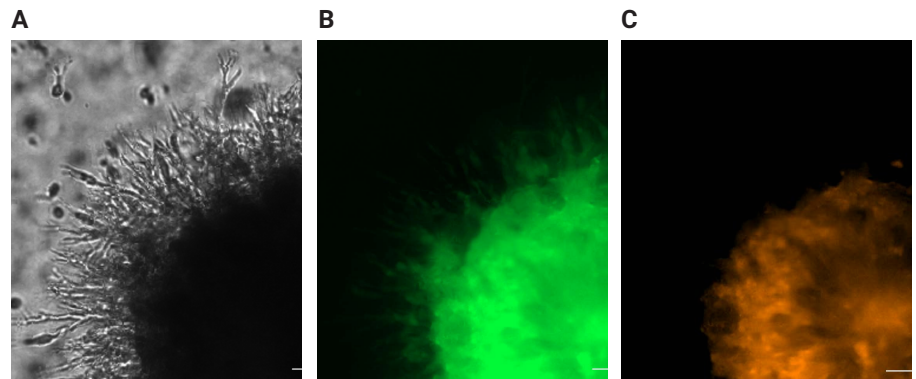


그림 7. 개별 세포 유형별 침습 확인. (A) 중첩된 GFP, RFP 및 명시야 채널을 통한 전체 tumoroid 침습. (B) GFP 발현 U-87 세포; 또는 (C) RFP 발현 섬유아세포에 의한 개별 세포 침습. 디지털 확대된 4x 이미지, 2x3 몽타주, 20-평면 z-스택.

종양 침습의 키네틱 모니터링

다양한 농도의 17-AAG로 처리한 후 U-87/섬유아세포 공동 배양된 tumoroid의 표현형 변화를 관찰하기 위해 12시간마다 이미지를 캡처하여 종양 침습을 모니터링했습니다. 처리되지 않은 종양에 대해 매우 침습적인 표현형을 관찰했는데, 이는 종양체 크기의 증가뿐만 아니라 invadopodia 형성의 극적인 증가로 나타납니다(그림 8A).

LN-229/섬유아세포 tumoroid에 대한 키네틱 이미징을 반복 수행하고 침습성 세포 모델(U-87)로서 GBM 세포 유형과 침습적 능력이 약한 세포(LN-229) 사이의 성장 및 invadopodia 생성의 차이를 비교했습니다(그림 8A). 두 가지 공동 배양된 세포 유형의 키네틱 명시야 이미지를 비교할 때 LN-229/섬유아세포 tumoroid는 spheroid 크기의 증가로 볼 수 있듯이 시간이 지남에 따라 전파되지만(그림 9) 동일한 배양 기간 동안 U-87/섬유아세포 tumoroid에 의해 명확하게 나타내어지는 침습적 특성을 나타내지 않는 것이 분명합니다(그림 8B).

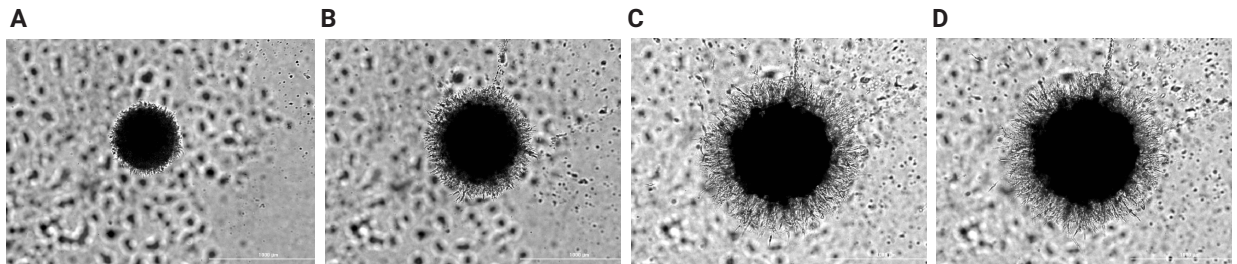


그림 8. 시간 경과에 따른 tumoroid 침습 가능성 분석, 4x 명시야 이미지, 2x3 몽타주, 20-평면 z-스택. a) U-87/섬유아세포 및 b) LN-229/섬유아세포 세포 혼합물에 대한 (A) 0시간; (B) 48시간; (C) 120시간; (D) 168시간.

전체 3D 구조의 변화는 중첩된 명시야 및 형광 이미지(그림 9A)를 사용하여 관찰되었으며, 개별 LN-229 또는 섬유아세포 침습은 각각 개별 CY5 또는 RFP 채널로 캡처된 신호로 모니터링되었습니다(그림 9B 및 C).

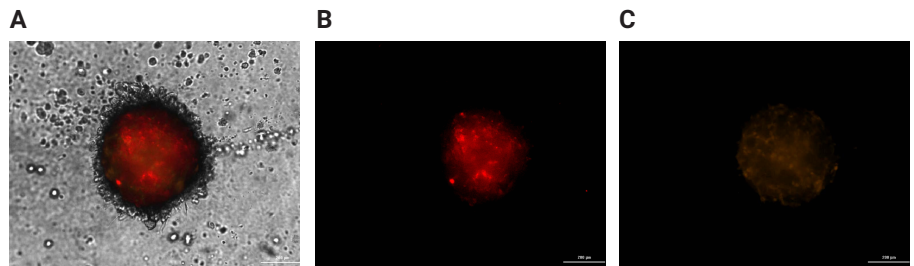


그림 9. LN-229/섬유아세포 공동 배양 세포 모델의 이미징. (A) 중첩된 CY5, RFP 및 명시야 채널을 통한 전체 tumoroid 침습. (B) CellTracker Deep Red로 염색된 LN-229 세포; 또는 (C) RFP 발현 섬유아세포에 의한 개별 세포 침습. 디지털 확대된 4x 이미지, 2x3 몽타주, 20-평면 z-스택.

Gen5를 이용한 tumoroid 침습의 자동 세포 분석

스티칭된 z-투영 명시야 이미지를 사용하여 침습 정도를 정량화했습니다. 표 4A에 나열된 BF 이미지와 개체 선택 기준을 사용하여 침습된 3D 종양 구조 주위에 상세한 개체 마스크를 배치했습니다(그림 10). 그런 다음 시간 경과에 따라 캡처된 각 이미지에 대해 전체 tumoroid로 덮인 영역을 계산했습니다. 그런 다음 후속 시점의 값을 특정 tumoroid에 대해 시간 0에서 계산된 면적 값으로 나누어 결과를 정규화하고 세포 분주 및 응집 후 tumoroid 크기의 가변성을 설명했습니다. 그런 다음 시간(x축)에 따라 면적 비율(y축)의 그래프를 나타냈습니다(그림 11). 그림 11에 표시된 결과로부터, U-87/섬유아세포 및 LN-229/섬유아세포 tumoroid는 모두 7일의 배양 기간 동안 방해받지 않았을 때 Matrigel 매트릭스 내에서 전파된다는 것이 분명합니다. 또한, 화합물 17-AAG는 예상대로 용량 의존적 방식으로 tumoroid 성장을 제한하거나 심지어 완전히 중단시킬 수 있음을 알 수 있습니다. 또한 전체 면적 비율 그래프에서 분명한 것은 LN-229 세포가 섬유아세포와 공동 배양된 것과 비교하여 U-87/섬유아세포 tumoroid에 의해 나타나는 완전한 3D 구조에 대한 성장 속도가 증가했다는 것입니다. 전체 tumoroid에 의해 덮이는 영역의 증가는 LN-229 세포(비율: 2.4)로 배양된 tumoroid와 비교하여 U-87 세포(비율: 4.4)로 배양된 tumoroid의 경우 시간 경과에 따라 약 2배입니다.

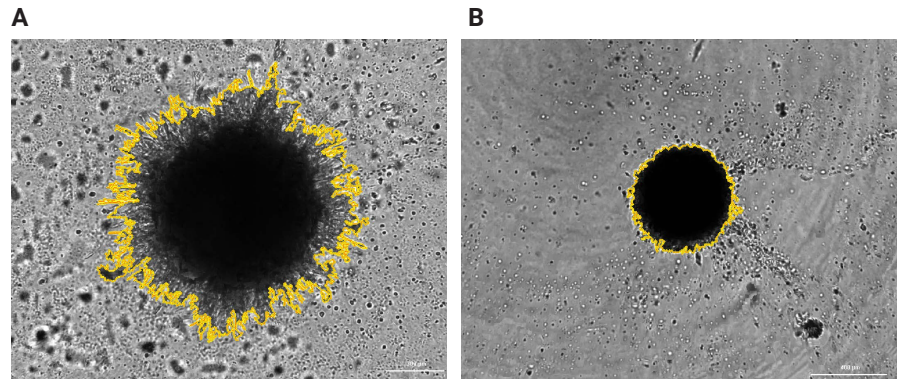


그림 10. 침습 tumoroid 개체 마스크. U-87/섬유아세포 tumoroid의 4x 확대된 명시야 이미지, 2x3 몽타주, 20-평면 z-스택. (A) 0μM 17-AAG 처리; 및 (B) 10μM 17-AAG 처리. 세포와 invadopodia 주위의 기본 마스크.

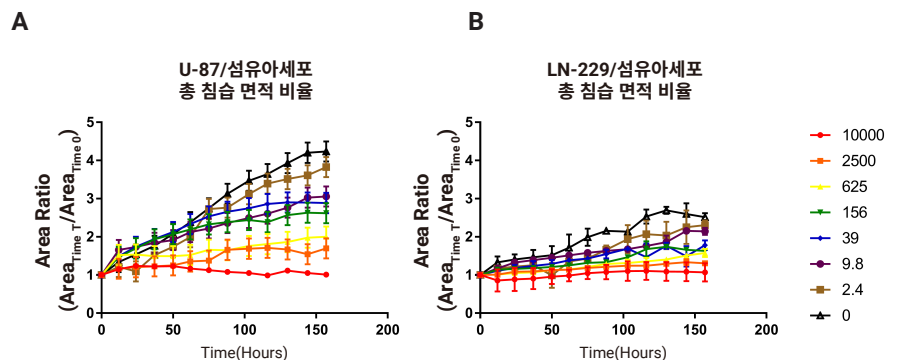


그림 11. 키네틱 총 tumoroid 면적 비율. 10,000 - 0nM 범위의 17-AAG 농도로 0-7일 처리 후 (A) U-87/섬유아세포 tumoroid, 또는 (B) LN-229/섬유아세포 tumoroid에 대해 플롯한 면적 비율.

Tumoroid 침습에 대한 Gen5 Image Prime 기반 세포 분석

Agilent BioTek Gen5 Image Prime에서 사용할 수 있는 1차 및 2차 세포 분석 기능과 표 4B에 나열된 기준을 사용하여 두 번째 세포 분석도 수행하여 tumoroid 내에서 비침습 세포로만 덮인 영역을 측정했습니다. 대조 및 처리 웰 모두에 대해 3D 체외 모델의 전이성 능력을 결정하려면 원래 tumoroid 내의 세포로 덮인 영역과 invadopodia로 덮인 영역을 구별할 수 있는 것이 중요합니다. 더 조밀하게 밀집된 비침습적 전파 세포는 명시야 이미지(그림 12A)에서 invadopodia에 비해 더 어둡게 나타나므로 원래 마스크 내 신호의 이러한 추가 변화를 통해 2차 마스크를 배치하여 각 tumoroid의 침습 영역을 제외하고 전체 3D 구조의 두 부분으로 덮인 영역을 분리할 수 있습니다(그림 12). U-87/섬유아세포 tumoroid에 대한 invadopodia로 덮인 영역은 7일의 배양 기간 동안 극적으로 증가합니다. 이에 비해 LN-229/섬유아세포 tumoroid는 같은 시간에 걸쳐 invadopodia의 증가가 거의 나타나지 않았습니다(그림 12C). 따라서 이 이중 분석은 tumoroid 세포가 얼마나 빠르게 전파되는지 뿐만 아니라 세포 모델의 침습적 특성도 결정할 수 있는 가능성을 가지고 있습니다.

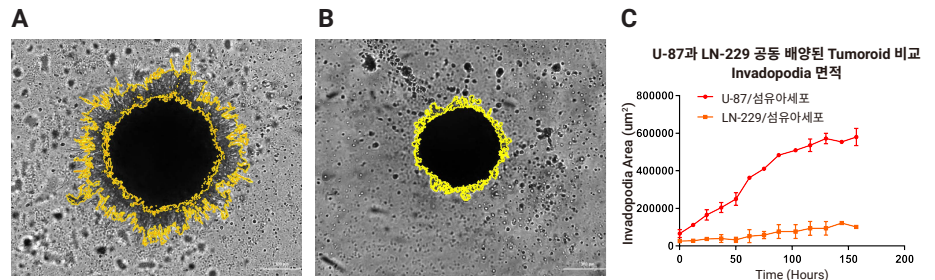


그림 12. 키네틱으로 억제되지 않은 U-87 및 LN-229 공동 배양 tumoroid 키네틱 침습성 영역. 처리되지 않은 U-87/섬유아세포 및 LN-229/섬유아세포 tumoroid에 대해 시간 경과에 따라 계산된 invadopodia 면적. Invadopodia 면적은 다음 공식으로 계산됩니다: (총 AreaTime T - 비침습성 AreaTime T).

3D 종양 괴사 모니터링을 위해 Agilent BioTek 현미경을 사용한 최근 발행물

1. Kasper, S. H. et al. "Colorectal cancer-associated anaerobic bacteria proliferate in tumor spheroids and alter the microenvironment". *Sci. Rep.* 10, 1–13, **2020**.
2. Little, A. C. et al. "IL-4/IL-13 stimulated macrophages enhance breast cancer invasion via rho-GTPase regulation of synergistic VEGF/CCL-18 signaling". *Front. Oncol.* 9, 1–13, **2019**.

참고 문헌

1. Uroz, M. et al. “Regulation of cell cycle progression by cell-cell and cell-matrix forces”. *Nat. Cell Biol.* 20, 646–654, **2018**.
2. Imamura, Y. et al. “Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer”. *Oncol. Rep.* 33, 1837–1843, **2015**.
3. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & De Boer, J. “Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues”. *Trends Biotechnol.* 31, 108–115, **2013**.
4. Huh, D., Hamilton, G. A. & Ingber, D. E. “From 3D cell culture to organs-on-chips”. *Trends Cell Biol.* 21, 745–754, **2011**.
5. Tanner, K. & Gottesman, M. M. “Beyond 3D culture models of cancer”. *Sci. Transl. Med.* 7, 1–5, **2015**.
6. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. “Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors”. *Assay Drug Dev. Technol.* 12, 207–218, **2014**.
7. Langhans, S. A. “Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning”. *Front. Pharmacol.* 9, 1–14, **2018**.
8. Kasper, S. H. et al. “Colorectal cancer-associated anaerobic bacteria proliferate in tumor spheroids and alter the microenvironment”. *Sci. Rep.* 10, 1–13, **2020**.
9. Little, A. C. et al. “IL-4/IL-13 stimulated macrophages enhance breast cancer invasion via rho-GTPase regulation of synergistic VEGF/CCL-18 signaling”. *Front. Oncol.* 9, 1–13, **2019**.

자세한 내용:

www.agilent.com/lifesciences/biotek

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요.

community.agilent.com

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.
다.RA44173.6661574074

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 2월 1일, 한국에서 발행
5994-2571KO
AG091820_03

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

