

宽场显微成像系统作为 三维细胞培养的筛选工具

应用文集



目录

前言	3
仪器	6
用于 3D 癌细胞球的形态和表型表征的 3D 成像应用	8
使用 3D PrimeSurface 超低吸附微孔板的明场和荧光成像	8
利用自动成像和先进的 3D 细胞培养技术定量细胞凋亡活性	11
基于 3D 细胞球体的肿瘤侵袭试验	15
参考文献	23

前言

在体内，细胞通常嵌在细胞外基质 (ECM) 内或与来自相同或不同谱系的细胞有直接的物理接触^[1]。但细胞生物学中的大多数研究是在传统的二维 (2D) 细胞培养系统中进行的，这些系统无法复制细胞的天然微环境^[2]。在 2D 细胞培养中，组织中存在的细胞功能通常丧失，限制了药物测试的预测能力，并影响细胞生物学研究结果。三维 (3D) 细胞培养平台结合细胞模型可以更好地模拟体内细胞微环境。3D 环境中培养的细胞与单层培养的细胞特性差异巨大^[3]。观察到的 2D 和 3D 培养模型之间的许多差异是由细胞-细胞和细胞-基质相互作用的差异造成的^[2]。最近，许多研究致力于开发出类似体内环境的 3D 细胞培养技术，通过各种方法促进 3D 组织形成^[4]。细胞球体培养由于其简单、重现性和与生理组织的相似性，是 3D 检测和筛选最成熟的模型之一^[5]。3D 培养模型开发的最早尝试是悬滴法，加入细胞悬液液滴后倒置孔板，细胞自发聚集在液滴底部。

或者，使用转瓶法实现自发的细胞聚集^[6]。另一种技术是静态液体覆盖技术 (LOT)，在非贴壁基质上培养贴壁细胞，使细胞聚集而非粘附在表面。最近，低吸附圆底孔板中的细胞球体形成得到了广泛应用，因为该方法提供了更简单的工作流程，适用于高内涵成像^[7]。这些技术为球体培养的新应用开辟了新途径，如用于筛选临床相关药物的高通量 3D 组织筛选和形成复杂的器官型微组织。

必须采取关键步骤促进球体形成，维持未处理细胞最高水平的活力，并确保观察到的效应仅源于对 3D 细胞球体培养物的处理。具体步骤包括在整个实验期间进行细胞分液、定期更换培养液和重新给药，尤其是对于持续数周的体外试验。即使在单个培养板上对不贴壁的细胞模型手动更换培养液，过程也非常棘手。必须用多通道移液器以极慢的速度去除并重新添加培养液，还需注意使移液吸头不要接触到细胞球体。使用 Agilent BioTek MultiFlo FX 多功能分液器进行自动分液比手动移液更快，还可以将细胞悬液分配到微孔板中，操作一致性高且动作轻柔。此外，使用 MultiFlo FX 的 Agilent BioTek 全自动培养液更换 (AMX) 模块可大大降低意外吸入细胞球体的风险。自动弃去用过的培养液，并替换为新鲜培养液或不同加药浓度的新鲜培养液。

之前已经介绍了细胞球体试验的不同生物学检测方法。常用的方法包括破坏细胞球体和使用分析方法分析细胞裂解物，如基于微孔板检测仪的发光或荧光测量。但与基于微孔板检测仪的测量相比，成像技术的优势在于无需破坏细胞球体，而且可以读取多个生物数据。因此，高内涵成像方法已被证明是表征化合物和 siRNA 文库对细胞球体影响的有效技术。明场成像可用于细胞球体的形态学表征，荧光成像可用于使用活性染料、DNA 结合染料、凋亡染料或其他荧光标记的表型检测。与 2D 细胞染色相比，3D 结构的染色可能需要优化方案。

一般而言，细胞球体越大、越紧密，标记试剂扩散到球形体内所需的时间就越长，完成染色过程所需的孵育时间也就越长。

如果需要细胞透化处理，可能需要考虑试剂选择和孵育时间。在本应用文集中，我们将介绍经过优化可用于细胞球体的 3D 特异性试剂。我们已经成功使用多种染料，包括一抗和偶联二抗，对细胞球体微孔板中的培养细胞进行了染色。此外，在接种于细胞球体微孔板之前，可使用预标记或荧光蛋白表达细胞，以确保所有细胞均根据应用需要进行了标记。

因为细胞球体比它所处的微孔小得多，因此了解孔内信号的来源至关重要——是源于集中的区域还是孔内的多个区域。微孔板检测仪设计为从每个孔中捕获尽可能多的光，使用细胞球体时一个点的光信号会被背景淹没。幸运的是，通过显微镜和图像分析，视野可以仅限于细胞球体范围，从而避免孔内的背景辐射。通常，使用低倍率成像技术可在一张图像中包含整个细胞球体。即使使用大景深物镜，光散射仍会限制球心内的有效成像。

低倍物镜的主要优点是可以捕捉整个样品宽度。这种方法可提供有关细胞球体直径或平均荧光强度变化的信息。3D 培养物的厚度也要求能够穿透整个结构进行成像。成像系统必须具备 Z 轴层切功能，焦距可定义为覆盖 3D 系统的整个厚度。使用该技术，可以在不同焦距下采集一系列图像；在每张图像中，对样品的不同区域实现对焦。虽然这些图像中没有一幅是整个样品完全对焦的，但它们共同包含了生成样品所有部分均对焦的图像所需的全部数据。然后可以使用 Agilent BioTek Gen5 微孔板检测仪和成像仪软件中的数学算法将 Z 轴不同切片的图像组合成复合图像，该算法保留图像的聚焦部分，剔除失焦信息。这样就能提供更清晰的图像，将其组合起来就能获得更逼真的相关结构的三维图像。通过 Z 轴叠加也可以改善 3D 细胞结构的细胞分析。利用位于三维样品不同焦平面的不同细胞的清晰 Z 轴叠加图像，可以从正在进行的实验中得出更精确的结论。

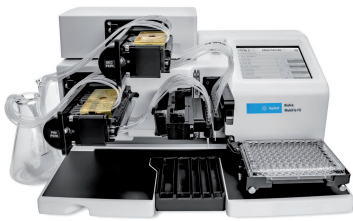
本应用文集旨在介绍使用 Agilent BioTek 高内涵成像仪器和图像分析软件进行的各种成像分析，以表征癌细胞球在不同化合物处理下的表型变化。在本应用文集中，我们提出了针对常见球体细胞培养模型的优化球体细胞培养方案，如低粘附性 U 型底 96 孔和 384 孔板、Eplasia（微孔板）以及用于三种常见癌细胞系的悬滴法。此外，我们还介绍了一种改进的染色工作流程，通过推荐合适的试剂和液体处理系统，缩短了检测时间并大大降低了变异性。我们通过使用 Z 轴叠加算法，从三维样品中创建单个复合图像，以方便采集细胞球体图像，能够有效比较不同细胞球体的表型。Gen5 实现了自动图像分析，可对细胞球体形态和表型进行多参数表征。根据检测方法的不同，Gen5 可报告一系列读数，包括形态特征（如细胞球体大小、面积、形状和体积）及球体不同区域的信号测量值，以监测表型变化，如球体活性、凋亡和缺氧。

Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统



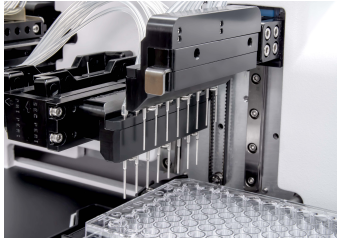
Agilent BioTek Cytation 5 是一款结合全自动显微成像系统的模块化多功能微孔板检测仪。可提供基于滤光片和光栅单色器的多功能微孔板检测，且显微成像系统模块可在荧光、明场、彩色明场和相差模式中提供高达 60 倍的放大倍率。该仪器只需一步即可在最多四个通道中进行荧光成像。Cytation 5 尤其关注活细胞检测，具有振荡、最高 65 °C 的温控、CO₂/O₂ 气体控制和用于动力学分析的双加样器功能，并由集成式 Gen5 微孔板检测与成像分析软件进行控制，以及自动图像采集、分析和处理。该仪器可用于在整个孵育期间动态监测 3D 类肿瘤活性。

Agilent BioTek MultiFlo FX 多功能分液器



Agilent BioTek MultiFlo FX 多功能分液器将多个分液器组合在一个紧凑的系统中，降低了整体仪器成本，节省了处理时间，简化了流程。MultiFlo FX 是一款可升级的模块化分液器，最多可配备两个蠕动泵（8 管分液器）、两个注射泵分液器和一个洗板机。注射器和洗板机洗头可配置为适合 6-384 孔板密度。用于基于细胞学的试验时，MultiFlo FX 可置于层流罩中进行无菌操作。在本应用文集详述的试验中，MultiFlo FX 可用于将细胞和培养液以及试剂分配到试验孔中。MultiFlo FX 配有 Agilent BioTek 全自动培养液更换 (AMX) 模块。

Agilent BioTek 全自动培养液更换 (AMX) 模块



使用 Agilent BioTek 全自动培养液更换 (AMX) 模块可完成细胞球体培养液更换，该模块由两个独特的改良蠕动泵卡盒和 8 个不锈钢管吸液和分液头组成。卡盒管线穿过 MultiFlo FX 蠕动泵送入培养液瓶或试管。利用软件可使泵缓慢而温和地运行，以免在吸液或分液过程中干扰细胞球体。每个卡盒均可完全高压灭菌，实现无菌处理。

Agilent BioTek BioSpa 8 全自动培养箱



Agilent BioTek BioSpa 8 全自动培养箱可以将 Agilent BioTek 微孔板检测仪或成像仪与 Agilent BioTek 洗板机和分液器进行整合，实现多达 8 块微孔板的全自动工作流程。通过 Agilent BioTek BioSpa 软件控制和监测温度、CO₂/O₂ 和湿度水平，在所有实验阶段为细胞培养提供理想的环境。将测试板在 BioSpa 中培养 7 天，以维持适当的环境条件，每 12 小时自动转移至 Cytation 5 进行明场和荧光成像。

用于 3D 癌细胞球的形态和表型表征的 3D 成像应用

使用 3D PrimeSurface 超低吸附微孔板的明场和荧光成像

试验简介

培养均一的细胞球体非常重要，因为它是进行稳定可靠检测的基础。S-BIO PrimeSurface 培养器皿是超低吸附 (ULA) 培养皿和培养板，可促进无支架、自组装球体的形成。培养板预包装了一种专有的亲水性聚合物，能自发形成大小一致的细胞球体。Prime Surface 96 和 384 ULA 培养板具有良好的透光性，非常适合明场和荧光成像。利用 Agilent BioTek 细胞成像多功能微孔板检测系统等成像技术，研究人员不仅可以通过明场成像研究球体增殖，还可以使用荧光探针和荧光成像研究表型事件。在 Gen5 微孔板检测与成像分析软件中结合 Z 轴层切和叠加技术，可生成球体细胞的聚焦图像，从而准确、可靠、可重复地确定测试分子或条件的影响。在本应用文集中，我们介绍了在 Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统中使用 PrimeSurface ULA 培养板生成的数据，以开发用于明场和荧光成像的简单可靠的细胞球体检测方法。

方法总结

将 HT-1080 细胞以 10000 至 50 个细胞/孔的浓度接种于 96 孔和 384 孔 PrimeSurface U 型底微孔板中。将微孔板孵育 48 小时，使细胞聚集成细胞球体。球体形成后，用喜树碱处理细胞，然后再孵育微孔板 24 小时，以诱导经处理的球体细胞坏死。第二天，用 1x CellTox Green (Promega Corporation, Madison, WI) 坏死细胞染液更换培养液，孵育细胞 5 小时，使荧光探针渗入细胞。由于细胞球体内的细胞存在于一系列 Z 平面内，因此要在焦平面的上方和下方采集 Z 轴层切图像，以确保细胞在适当的 Z 轴高度成像。应用 3D 图像处理创建 Z 轴层切图像的 Z 轴叠加。然后根据优化的对象选择标准对叠加图像进行细胞分析，识别明场通道中未处理的不同尺寸的细胞球体。对处理后的细胞球体进行额外的细胞分析，以确定喜树碱处理诱导的坏死活性。

结果汇总

已形成细胞球体的明场成像

对 Z 轴叠加图像的目视分析显示，HT-1080 细胞能够在 96 孔 U 型底微孔板内形成紧密的细胞球体。还有一点也非常明显：Gen5 微孔板检测与成像分析软件使用的 Z 轴层切和叠加方法可形成准确的聚焦球体图像，与尺寸无关。Gen5 通过在明场图像中准确添加一级 Mask 标记来准确识别每个细胞球体，这对于面积和直径的测量非常必要（图 1A-C）。使用这两个指标，可以进行体积计算。在 96 孔和 384 孔规格中进行球体体积分析。96 孔和 384 孔 PrimeSurface 培养板中球体体积分析的精度和线性与细胞接种密度的函数关系如图 1D 所示。

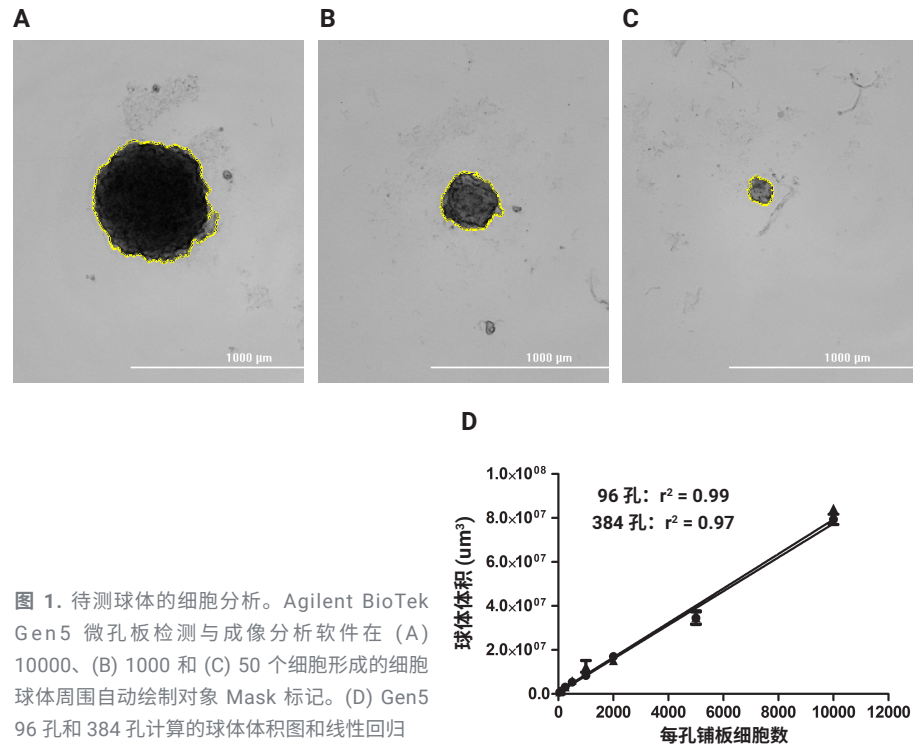
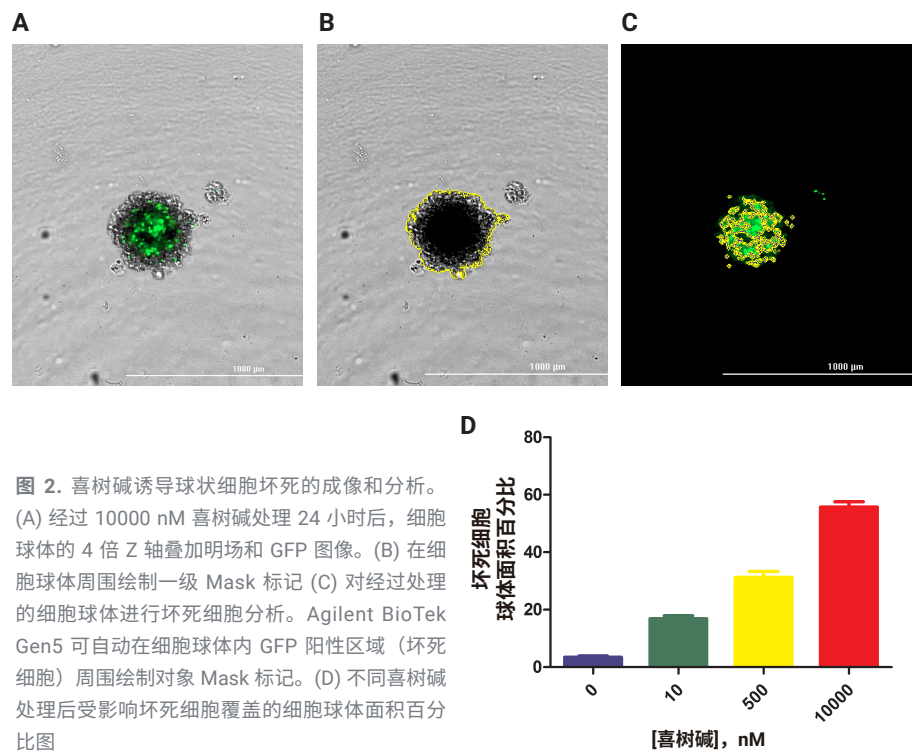


图 1. 待测球体的细胞分析。Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件在 (A) 10000、(B) 1000 和 (C) 50 个细胞形成的细胞球体周围自动绘制对象 Mask 标记。(D) Gen5 96 孔和 384 孔计算的球体体积图和线性回归

细胞球体内坏死细胞诱导的荧光成像

随后分析 GFP 通道中采集的荧光图像，以确定喜树碱诱导的坏死细胞程度。Mask 标记明场通道中的每个球体后，Gen5 计算每个测试球体内坏死细胞完全覆盖的面积（图 1A-C）。我们在分析中证实，由于这些 U 型底微孔板的几何形状，来自透明壁的背景自发荧光被减至最低，从而使受影响细胞的信号变化可以轻松区分。将坏死细胞面积除以细胞总面积，得到归一化的受影响细胞百分比覆盖面积，这解释了经处理的 1000 个细胞球体之间的面积差异。然后根据处理所用喜树碱的浓度绘制该值（图 2D）。从明场图像可以明显看出，培养板底部产生的背景信号相对较亮，且强度非常均匀。



使用 Agilent BioTek 显微镜监测细胞球体形成的最新出版物

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. & Piwnica-Worms, H. "Stem cell enriched-epithelial spheroid cultures for rapidly assaying small intestinal radioprotectors and radiosensitizers in vitro". *Sci.Rep.* 8, 2-9, **2018**

利用自动成像和先进的 3D 细胞培养技术定量细胞凋亡活性

试验总结与试剂

细胞凋亡（或称程序性细胞死亡）对所有多细胞生物的正常发育和平衡至关重要，事实上，它也是抗击癌症的重要研究工具。然而，使用 2D 培养的肿瘤细胞仍然存在挑战，因为它们对癌症疗法/化合物的反应可能与在体内不同。三维 (3D) 方法为细胞提供了更多的生理条件，有利于研究肿瘤细胞的机理过程和耐药性。本应用介绍了新型 3D 细胞球体细胞培养模型 Elplasia 的用途，该模型用于阐明盐酸阿霉素和冬凌草甲素对 HT-1080 纤维肉瘤细胞和 HCT116 大肠癌细胞的凋亡潜能。微孔的几何形状有助于在每个孔的中心形成球体，而光学透明的圆底可进行细胞成像，不透明的板体可防止信号交叉干扰。然后使用细胞成像多功能微孔板检测系统对细胞球体内的细胞球体生长和诱导的细胞凋亡水平进行定量。

方法总结

收获 HCT116 和 HT 1080 细胞，取 50 μL 细胞悬液加至 Elplasia 384 孔微孔板的各试验孔中，每个微孔共加入约 50 个细胞。微孔板孵育 48 小时，使细胞聚集。在含有 Hoechst 33342 和动力学细胞凋亡试剂盒 (Abcam, Cambridge, UK) 中的动力学细胞凋亡试剂 pSIVA-IANDB 的培养基中，使用 1:4 的稀释度对阿霉素和冬凌草甲素进行系列滴定，滴定范围为 20–0 μM (2 倍)。磷脂酰丝氨酸是一种面向胞质的细胞膜成分，其在细胞外表面持续或短暂暴露，是早期凋亡的指标。细胞膜非渗透性荧光探针 pSIVA-IANDB 能与磷脂酰丝氨酸结合，产生强烈的绿色荧光信号，从而实现了对细胞凋亡的长期监测。

形成细胞球体后，从每个孔中吸出 25 μL 培养基，更换为等量的阿霉素或冬凌草甲素化合物滴定液。将培养板置于 Cytation 5 中，在 48 小时内每四小时进行一次动力学成像，进行细胞球体凋亡分析。使用 4 倍物镜通过明场成像通道对整个孔进行成像，并结合 2 \times 2 图像蒙太奇来观察整个孔。使用相同的物镜以及 DAPI 和 GFP 成像通道，分别对所有细胞球体和凋亡球体进行成像。

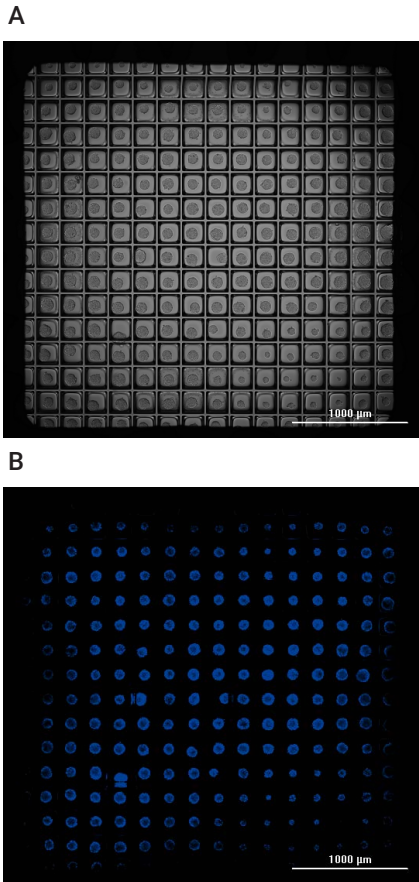


图 3.4 倍放大倍率下的微空间成像。(A) 在微孔微空间中 HCT116 细胞球体的拼接 2 \times 2 蒙太奇图像。(B) 细胞球体位置的 DAPI 通道成像

结果汇总

使用 Cytation 5 和 Gen5 微孔板检测与成像分析软件确认 HCT116 细胞球体增殖和在微空间内的位置。使用明场成像，以 2×2 配置采集四张图像，以覆盖微孔。采用 Gen5 软件将图像拼接在一起，最后生成一张孔内所有微空间的单一图像（图 3A），同时使用 Hoechst 33342 染色，利用 DAPI 通道识别细胞球体（图 3B）。使用 pSIVA-1ANBD、HCT116 和 HT 1080，在测试的化合物浓度范围内追踪细胞球体凋亡活性。用 400 nM 阿霉素处理球体 48 小时后，观察到高凋亡活性，表现为高水平的绿色荧光（图 4B）。

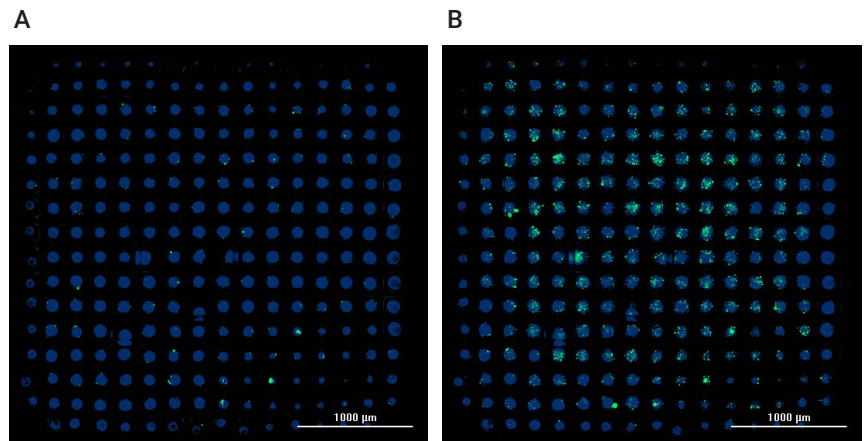


图 4. 400 nM 阿霉素处理的 HT-1080 细胞的凋亡活性。(A) 处理后 24 小时和 (B) 处理后 48 小时的 4 倍 DAPI 和 GFP 通道成像

利用 Gen5 中的细胞分析特征，通过优化强度阈值和对象大小范围等对象选择标准，在每幅图像中自动检测单个细胞球体。使用表 1 中列出的尺寸和圆度亚群标准排除非球体对象。

表 1. Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件荧光球体分析初级、高级和亚群参数

细胞球体初级细胞分析参数	
通道	DAPI
阈值	自动-2
背景	黑
最小对象尺寸	25 μm
最大对象尺寸	150 μm
填充 Mask 标记中的孔	已选中
拆分接触对象	已选中
分析整个图像	已选中
包括主边缘对象	未选中

(续)

高级选项	
评估背景	最低像素的 5%
图像平滑强度	0
背景淡化尺寸	1000 μm
真实球体亚群参数	
尺寸	> 85 μm
圆度	> 0.4
凋亡球体亚群参数	
尺寸	> 85 μm
圆度	> 0.4
平均 GFP	> 6000

最后，通过设置平均 GFP 信号强度阈值，应用第二个亚群过滤器识别凋亡球体的数量（图 5A-C）。值得注意的是，细胞分析参数可能因细胞类型而异，因此应始终在多个孔上进行参数优化，以确认准确度。我们的结果表明，预测的药物疗效可能会因每个孔中细胞球体计数的不一致而出现偏差。为了考虑这种异常情况，我们报告了每孔凋亡球体百分比作为读数。该值是用凋亡球体数量除以每孔识别的实际球体总数计算得出的。由此得出的凋亡球体百分比动力学图可用于确定化合物对 3D 细胞球体影响的差异。

如图 5 所示，化合物对 HT1080 细胞球体具有更强的凋亡作用，表现为在低化合物浓度下凋亡球体百分比迅速升高。当化合物浓度高于 1000 nM 时，细胞凋亡活性降低，这很可能是由于每个细胞球体内的细胞均出现坏死。HCT116 细胞球体对化合物的耐药性更强，因为需要更高的化合物浓度才能引起凋亡反应。

综合结果表明，利用细胞成像和 Elplasia 球体微孔板，能够从不同细胞类型（例如原代细胞、干细胞和癌细胞系）和药物组合中检测到特异性表型凋亡效应。

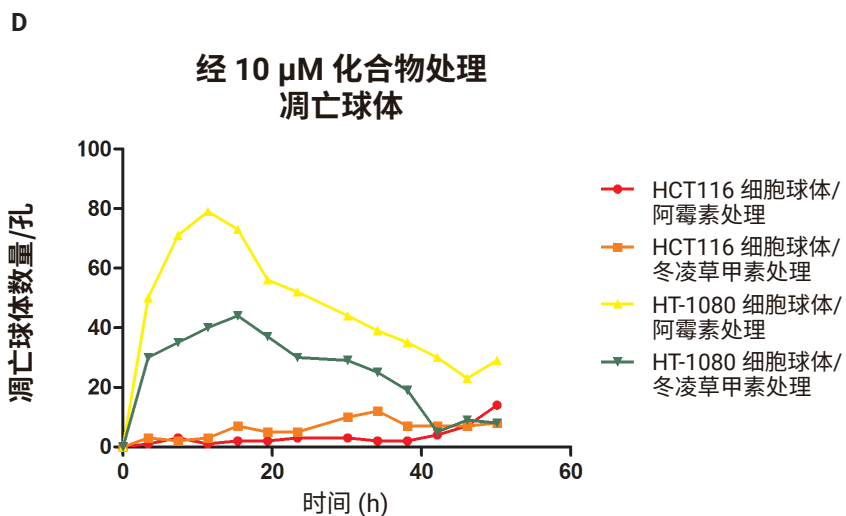
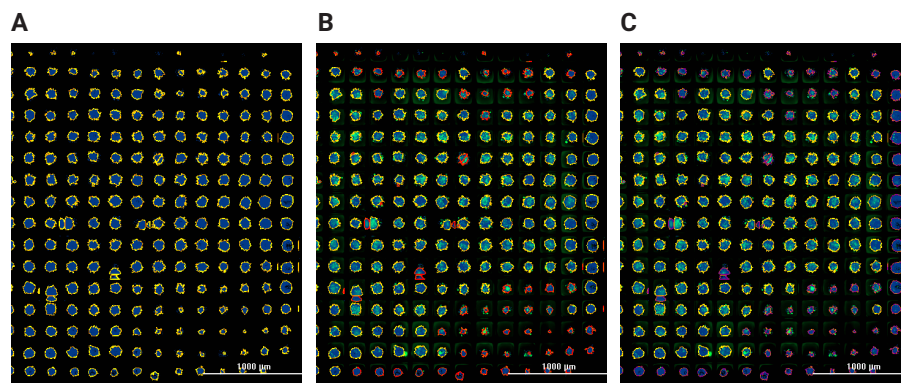


图 5. 细胞分析程序测定每孔凋亡球体数量。(A) Agilent BioTek Gen5 微孔板检测与成像分析软件利用 DAPI 通道采集的 Hoechst 33342 信号, 在符合初级和高级细胞分析标准的对象周围自动绘制 Mask 标记; (B) 红色对象 Mask 表示消除的伪影和不符合最小尺寸和圆度亚群要求的细胞球体; (C) 紫色对象 Mask 表示除不符合凋亡球体标准外, 还不符合初始亚群标准的对象。(D) 动力学图显示经单次 10 μM 浓度的阿霉素或冬凌草甲素处理的 HCT116 或 HT-1080 细胞球体的凋亡百分比

使用 Agilent BioTek 显微镜检测球体凋亡的最新出版物

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**.

基于 3D 细胞球体的肿瘤侵袭试验

试验简介

多年来，肿瘤药物研发一直面临着多重挑战。针对抑制癌症转移侵袭表型的新方法的进展提供了更大的干预潜力，尤其是因为许多患者因癌症转移而死亡。为了降低药物开发过程中的失败率，早期药物发现中使用的 3D 体外细胞模型应尽可能模拟复杂的转移过程。体内肿瘤是由多种细胞类型（包括癌细胞和基质细胞）组成的三维 (3D) 细胞团块。因此，整合 3D 细胞球体细胞结构（包括共培养的细胞类型，形成类肿瘤）可提供比在微孔板中接种的单独癌细胞更具预测性的模型。

要捕获细胞侵袭过程，需要进行长期的动力学实验。因此，需要对试验进行环境控制，在较长时间内维持球体细胞的活性，这样才能正确评估药物的作用。最后，由于细胞球体体积较小，显微镜检查是监测肿瘤侵袭的唯一合适方法。为了有效地进行药物发现，显微镜必须具备自动图像采集、处理和分析功能，以便能够应对多种检测条件、化合物测试和动态图像拍摄。

这项工作将展示生成 3D 细胞球体肿瘤结构、创建合适的侵袭矩阵、基于动力学图像的自动监测以及对采集的肿瘤侵袭 Z 轴层切图像进行细胞分析的程序。

本研究使用了 U-87 和 LN-229 多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 细胞系，因为它们具有表型差异和转移能力。将两种细胞类型与成纤维细胞共培养，以形成更接近体内肿瘤条件的 3D 类肿瘤，并可通过蛋白质基质进行侵袭。17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素 (17-AAG) 可抑制热休克蛋白 90 (Hsp90) 的功能 (Hsp90 是一种伴侣蛋白，可稳定肿瘤生长所需的蛋白质)，在此用于抑制潜在的肿瘤侵袭。利用动态采集图像的定量分析来表征受抑制和未受抑制的类肿瘤培养物的侵袭潜力。

方法总结

肿瘤侵袭试验准备

将 U-87 和成纤维细胞以各 2.5×10^4 个细胞/mL 的最终浓度在完全培养基中混合，制备混合细胞悬液。在适当的微孔板孔中加入 100 μ L 细胞悬液，孵育 48 小时，使细胞聚集成类肿瘤。在用 CellTracker Deep Red 染料 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 染色的 LN-229 细胞以及相同浓度和体积的成纤维细胞中重复上述过程。形成类肿瘤后，系统自动从每个孔中吸弃 70 μ L 完全培养基，并将含有类肿瘤的培养板置于冰上，在冰箱中放置 5 分钟，以冷却细胞。然后在冰上解冻 Matrigel 基质。在侵袭培养液或 Matrigel 基质中制备不同浓度的 17-AAG ($0-2 \times 10^4$ nM)。然后，在每个含有类肿瘤的孔中加入 70 μ L Matrigel 基质和滴定化合物，再加入 100 μ L 含有滴定化合物的侵袭培养液。微孔板在 $300 \times g$ 下离心 5 分钟后孵育 1 小时，开始形成凝胶。

肿瘤侵袭成像和分析

形成凝胶后，将微孔板转移至 BioSpa 8 全自动培养箱中，对软件进行编程，使微孔板自动转移到 Cytation 5 中，在 7 天培养期内每隔 12 小时对各孔进行明场和荧光成像。表 2 列出了对每个样品孔进行自动图像采集的设置。我们将图像蒙太奇与 Z 轴层切相结合，采集类肿瘤组织完整区域和深度的图像。

表 2. 全自动 3D 类肿瘤侵袭成像参数

成像参数	
明场成像通道	完整的 3D 侵袭结构
GFP 成像通道	表达 GFP 的 U-87 细胞
RFP 成像通道	表达 RFP 的成纤维细胞
CY5 成像通道	CellTracker Deep Red 染料染色的 LN-229 细胞
物镜	4 倍
蒙太奇	3 行 \times 2 列
蒙太奇重叠	自动拼接
Z 轴层切	20 层
Z 轴层切步长	53.8 μ m (4 倍物镜的默认值)

首先，我们应用图像拼接技术将单个图块合并在一起（表 3A）。

表 3A. 图像拼接参数

图像拼接参数	
注册通道	明场
融合方法	线性混合
裁剪拼接图像以去除边框上的黑色矩形	已选中
缩小最终图像的尺寸	已选中 (52.62%)

从 20 层拼接的 Z 轴层切创建单个图像叠加（表 3B）。

表 3B. 图像 Z 轴叠加参数

图像 Z 轴叠加参数	
通道 1	拼接[明场]
方法	焦点层切
最大过滤器尺寸	11 px
包括 Z 轴切片	1-20
通道 2-4	拼接[GFP]、拼接[RFP]、拼接[CY5]
方法（通道 2-4）	使用通道 1 的设置

选择焦点层切方法，从叠层的每张图像中自动选择最清晰的像素，以纳入最终叠加图中。这样就能在每个时间点对每个侵袭类肿瘤进行更精确的分析。为量化肿瘤侵袭，在明场通道中应用一级 Mask 细胞分析标准，在每张最终图像的完整侵袭结构周围自动添加对象 Mask 标记（表 4A）。

此外还应用二级 Mask 细胞分析标准，在原始类肿瘤结构中残留的非侵袭细胞周围添加另一个 Mask 标记（表 4B）。

表 4A. 一级 Mask 分析参数

初级细胞分析参数	
通道	Z 轴叠加[拼接[明场]]
阈值	25000
背景	光源
拆分接触对象	未选中
填充 Mask 标记中的孔	已选中
最小对象尺寸	300 μm
最大对象尺寸	2000 μm
包括主边缘对象	已选中
分析整个图像	已选中
先进的检测选项	
滚球直径	2000
图像平滑强度	0
评估背景	最低像素的 5%
分析指标	
关注指标	目标区域

表 4B. 二级 Mask 分析参数

二级细胞分析参数	
通道	Z 轴叠加[拼接[明场]]
在二级 Mask 内测量	包括一级 Mask
减少一级 Mask	1 μm
阈值	12000
平滑	7
填充 Mask 标记中的孔	未选中
分析指标	
关注指标	对象区域_2[Z 轴叠加[拼接[明场]]]

试验结果

在七天的培养期内，未受抑制的 U-87/成纤维细胞类肿瘤继续增大，并侵入蛋白基质。为确保在 x、y 和 z 轴上采集包括伪足在内的整个侵袭结构，以蒙太奇格式在一定的 z 轴高度范围内自动拍摄多幅图像（表 2）。除明场成像外，还使用 GFP 和 RFP 通道捕捉蒙太奇方块和 Z 轴层切。

叠加图像可追踪整个结构的侵袭情况（图 6）。通过观察每种共培养细胞类型发出的荧光信号，我们比较了两种测试细胞类型的迁移行为。在 U-87/成纤维细胞模型中，明场图像显示了从原始的扩增类肿瘤中延伸出来的大量伪足（图 7A）。从图 4B 中的 GFP 图像可以看出，表达 GFP 的 U-87 细胞跟随伪足侵入基质。这与图 4C 中的 RFP 图像形成鲜明对比，证实在此实验模型中，表达 RFP 的成纤维细胞几乎没有迁移能力。

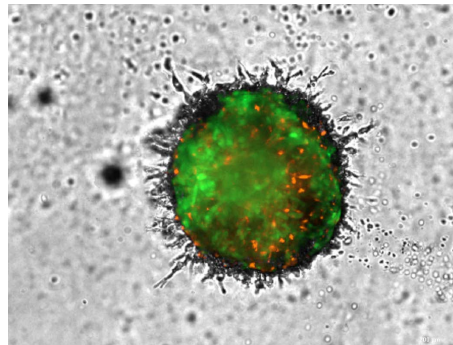


图 6. U-87/成纤维细胞共培养细胞模型的明场和荧光 Z 轴叠加图像

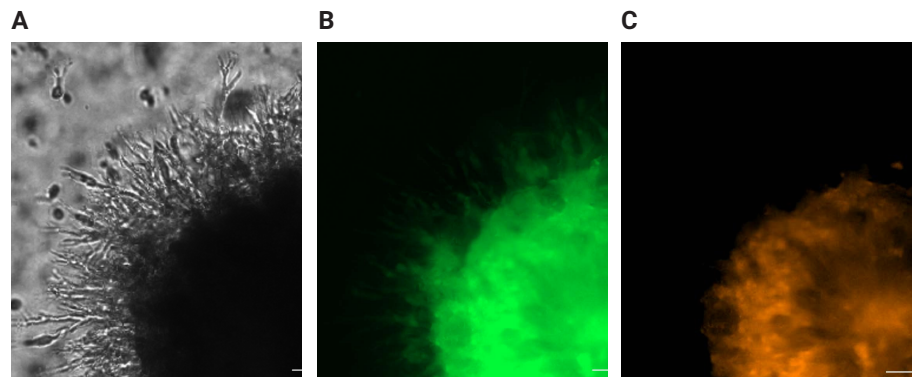


图 7. 确认单个细胞类型的侵袭。(A) 通过重叠的 GFP、RFP 和明场通道观察整个类肿瘤侵袭。(B) 表达 GFP 的 U-87 细胞；或 (C) 表达 RFP 的成纤维细胞单独的细胞侵袭。数字缩放 4 倍图像，2 × 3 蒙太奇，20 平面 Z 轴层切

肿瘤侵袭的动力学监测

在使用不同浓度的 17-AAG 处理 U-87/成纤维细胞共培养类肿瘤后，每隔 12 小时采集一次图像，观察其表型变化，从而监测肿瘤的侵袭。我们观察到未经处理的肿瘤具有高度侵袭性表型，表现为瘤体体积增大，以及伪足形成急剧增加（图 8A）。我们重复了 LN-229/成纤维细胞瘤体的动力学成像，并比较了作为侵袭性细胞模型的 GBM 细胞类型 (U-87) 和侵袭能力较弱的细胞类型 (LN-229) 在生长和伪足形成方面的差异（图 8A）。比较两种共培养细胞类型的动力学明场图像，可以明显看出 LN-229/成纤维细胞瘤随着时间的推移而增殖，这一点可以从细胞球体大小的增加看出（图 9），但在相同的培养期内，U-87/成纤维细胞瘤并没有表现出明显的侵袭特性（图 8B）。

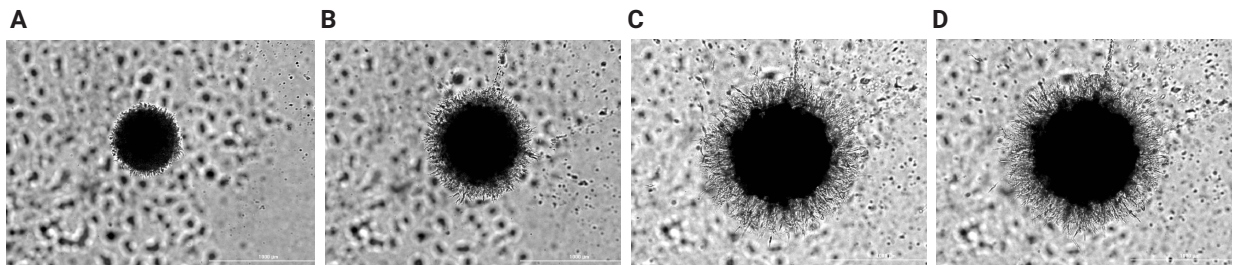


图 8. 随时间变化的类肿瘤侵袭潜能分析，4 倍明场图像， 2×3 蒙太奇，20 平面 Z 轴层切。(A) 0 小时；(B) 48 小时；(C) 120 小时；(D) 168 小时，分别为 a) U-87/成纤维细胞和 b) LN-229/成纤维细胞混合物

使用叠加的明场和荧光图像观察完整 3D 结构的变化（图 9A），同时分别通过单个 CY5 或 RFP 通道采集的信号监测单独的 LN-229 或成纤维细胞侵袭（图 9B 和图 C）。

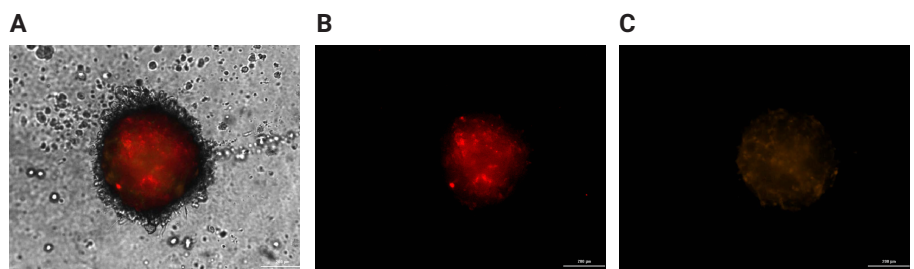


图 9. LN-229/成纤维细胞共培养细胞模型成像。(A) 通过重叠的 CY5、RFP 和明场通道观察整个类肿瘤侵袭。(B) CellTracker Deep Red 染色的 LN-229 细胞；或 (C) 表达 RFP 的成纤维细胞单独的细胞侵袭。数字缩放 4 倍图像， 2×3 蒙太奇，20 平面 Z 轴层切

利用 Gen5 对类肿瘤侵袭进行自动细胞分析

利用拼接的 Z 轴叠加明场图像对侵袭范围进行定量。我们使用表 4A 中列出的 BF 图像和对象选择标准，在侵袭的 3D 肿瘤结构周围添加详细的对象 Mask 标记 (图 10)。然后计算每个采集图像的整个类肿瘤覆盖面积随时间的变化。然后将后续时间点的值除以特定类肿瘤在时间 0 计算的面积值，使结果归一化，并考虑细胞分散和聚集后类肿瘤大小的变化。然后绘制面积比 (y 轴) 与时间 (x 轴) 的关系图 (图 11)。从图 11 中的结果可以明显看出，U-87/成纤维细胞和 LN-229/成纤维细胞类肿瘤能够在 7 天培养期内不受阻碍地在 Matrigel 基质中增殖。我们还可以看到，17-AAG 化合物能够以剂量依赖的方式限制甚至完全阻止类肿瘤的生长，与预期结果一样。从总面积比图中还可以清楚地看出，与 LN-229 细胞和成纤维细胞共培养类肿瘤相比，U-87/成纤维细胞类肿瘤的完整 3D 结构的生长速度更快。与使用 LN-229 细胞培养的类肿瘤 (比例 2.4) 相比，使用 U-87 细胞培养的类肿瘤 (比例 4.4) 的覆盖面积随着时间的推移增加了约 2 倍。

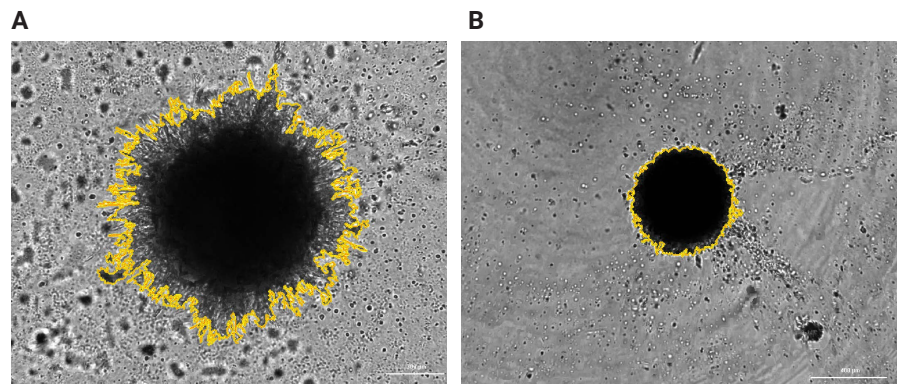


图 10. 侵袭性类肿瘤对象 Mask。U-87/成纤维细胞肿瘤的放大 4 倍明场图像，2 × 3 蒙太奇，20 平面 Z 轴层切。(A) 0 μM 17-AAG 处理；和 (B) 10 μM 17-AAG 处理。细胞和伪足周围的一级 Mask 标记

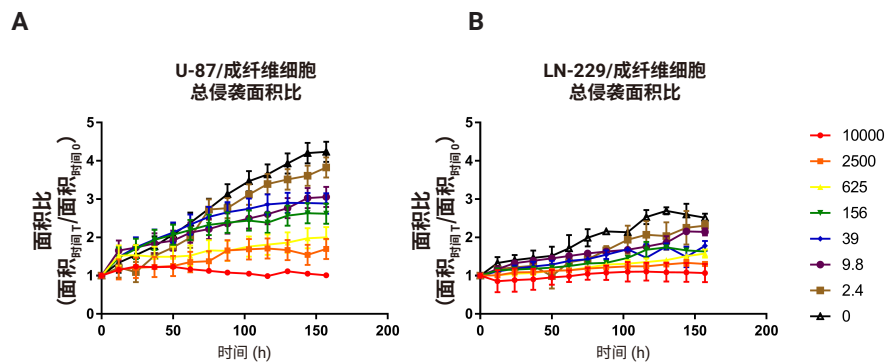


图 11. 动态总类肿瘤面积比。用浓度为 10000–0 nM 的 17-AAG 处理 0–7 天后，(A) U-87/成纤维细胞类肿瘤或 (B) LN-229/成纤维细胞类肿瘤的面积比图

基于 Gen5 Image Prime 的类肿瘤侵袭细胞分析

此外，还使用 Agilent BioTek Gen5 Image Prime 的一级和二级细胞分析功能以及表 4B 中列出的标准，进行了第二次细胞分析，以测量类肿瘤内非侵袭细胞完全覆盖的面积。必须能够区分原始类肿瘤内细胞覆盖的区域和伪足覆盖的区域，以确定 3D 体外模型（对照孔和处理孔）的转移能力。由于在明场图像中，非侵袭性的增殖细胞较伪足更暗（图 12A），原始 Mask 标记内信号的这种额外变化允许添加二级 Mask 标记以排除每个类肿瘤的侵袭区域，并将整个 3D 结构的两部分所覆盖的区域分开（图 12）。U-87/成纤维细胞类肿瘤的伪足覆盖面积在七天培养期内急剧增加。相比之下，LN-229/成纤维细胞类肿瘤在相同时间内伪足几乎没有增加（图 12C）。因此，利用这种双重分析不仅能够确定类肿瘤细胞的增殖速度，而且能确定细胞模型的侵袭性。

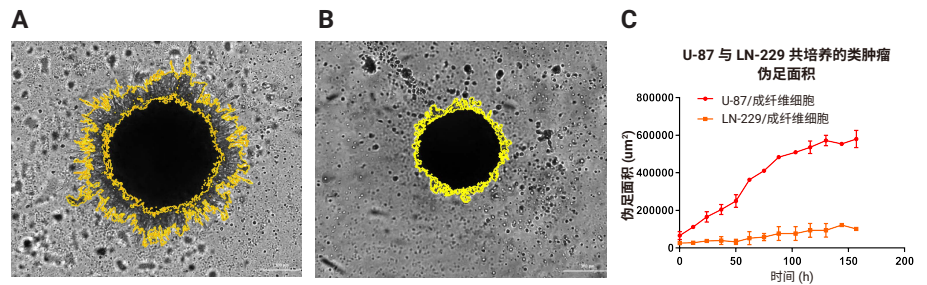


图 12. 未受抑制的 U-87 和 LN-229 共培养类肿瘤的动力学伪足面积。计算未经处理的 U-87/成纤维细胞和 LN-229/成纤维细胞类肿瘤随时间变化的伪足面积。根据以下公式计算伪足面积：（总面积时间 T - 非侵袭面积时间 T）

使用 Agilent BioTek 显微镜监测 3D 肿瘤坏死的最新出版物

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**

参考文献

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**

了解更多信息：

www.agilent.com/lifesciences/biotek

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，请访问：

community.agilent.com

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。
RA44173.6661574074

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021年2月1日，中国出版
5994-2571ZH-CN
AG091820_03

