

使用 Agilent xCELLigence RTCA eSight 系统实时监测药物介导的 3D 肿瘤细胞球体皱缩

作者

Peifang Ye, Grace Yang 和
Yunfei Pu
安捷伦生物（杭州）有限公司
中国杭州

Ryan Raver,
Yama Abassi, Nancy Li 和
Brandon J. Lamarche
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣地亚哥

前言

由于动物模型价格昂贵、费时且通量低，通常将它们用于药物研发管线后期的疗效验证。而研发管线的前期通常采用生化分析，它的成本更低、通量更高，但存在一个问题是需要将蛋白靶点从它赖以进化以产生功能的复杂细胞环境中分离出来进行单独分析。细胞实验作为体内分析和生化分析中的一个折中办法，不仅能够在蛋白靶点的内源性细胞环境中进行评估，同时成本相对较低且可实现高通量。然而，细胞实验过去一直在 2D 单层细胞上进行，目前研究人员越来越担心这种形式得出的结果无法反应临床疗效^[1]。

在生物组织中，细胞与其他细胞和细胞外基质在各方面存在广泛的接触。与此形成鲜明对比的是，在组织培养的 2D 细胞单层中，细胞的一面与其生长的刚性玻璃或塑料表面形成广泛的相互作用，与之相对的一面暴露于液体培养基中，而与相邻的细胞仅在横向发生相互作用（在培养容器底部平面）。在这种高度人工化的结构中，细胞往往无法重现其体内表型的关键方面，包括形态、极性和药物代谢^[2]。2D 模型也不能模拟细胞在体内经历的浓度梯度（氧气、营养等）。考虑到这一点，研究人员开展了大量工作来开发更具生理相关性的 3D 细胞试验。其中，应用范围最广的应该是细胞球体。通过在更有利于细胞间粘附的条件下培养细胞（相较于细胞-塑料和细胞-玻璃粘附），使细胞形成聚集体（细胞球体），体现实体瘤的生理特征，如细胞外基质沉积^[3]、深度依赖性缺氧^[4]、中心性坏死^[5] 和抗药物渗透^[6]。

无论是在细胞球体生长阶段的早期，还是在已经生长到相当大的尺寸后，都可以在不同药物的作用之下评估其是持续生长、停滞亦或是皱缩。虽然可以使用传统显微镜评估药物疗效，但其操作繁琐、通量低，并且提供的数据的时间分辨率非常有限。本应用是一项重大改进，说明了如何使用 Agilent xCELLigence RTCA eSight 仪器，通过明场和红色、绿色和蓝色荧光的组合，对 3D 肿瘤细胞球体的生长/皱缩进行实时、直观的监测。

这种实验方法的实时性不仅简化了工作流程，也使我们能够将分析重点放在最佳时间窗口上，而不仅仅是随意猜测的一个时间点。Agilent eSight 软件工具套装可以根据不同的细胞球体指标（如面积、直径和亮度）计算药效 (IC_{50})。

实验原理

eSight 是目前世界上唯一一款同时结合细胞阻抗和活细胞成像实时监测细胞健康和行为的仪器。集成到 eSight 专用电子板 (Agilent E-Plate) 底部的微金电极生物传感器会持续监测细胞数量、大小、粘附强度和细胞间粘附 (即屏障功能) 的变化。在位于微金电极生物传感器之间的 E-Plate 的每个孔中，eSight 可通过显微镜观察窗口从相同细胞群中捕获明场和荧光 (红、绿、蓝) 图像。这种串联方法可获得更多的实验信息，在不增加工作量的情况下使数据量至少翻倍。

虽然阻抗法的应用已有 20 多年的历史，并已用于研究不同实验环境下的数百种细胞系 (包括细胞球体)，但由于两个特定原因，这种方法对球体细胞而言并不理想。首先，球体不能直接在 eSight 的 E-Plate 内形成；它们首先必须在其他不同类型的板中形成，然后再转移到 E-Plate 板的孔中，因此，这种方法不适用于高通量。其次，尽管细胞球体的体积较大，但与其 E-Plate 微金电极生物传感器发生相互作用的表面积较小，从而产生的阻抗信号也相对较小。出于这些原因，本研究使用 eSight 技术时仅借助成像手

段来监测细胞球体。然而，为了比较药物在 2D 和 3D 环境中的疗效，我们在分析 2D 单层时使用了阻抗法。

虽然已经开发了多种技术来形成细胞球体，但圆底超低附着 (ULA) 板可能最适合基于图像的高通量分析，因此被用于本研究中所述的 eSight 实验 (图 1)。将细胞接种到圆底 ULA 板中后，通过瞬时离心有助于将细胞集中在孔中心。虽然仅通过 eSight 的明场图像即可监测细胞球体的聚集/生长/皱缩，但在许多情况下，引入不同的荧光探针是有优势的。

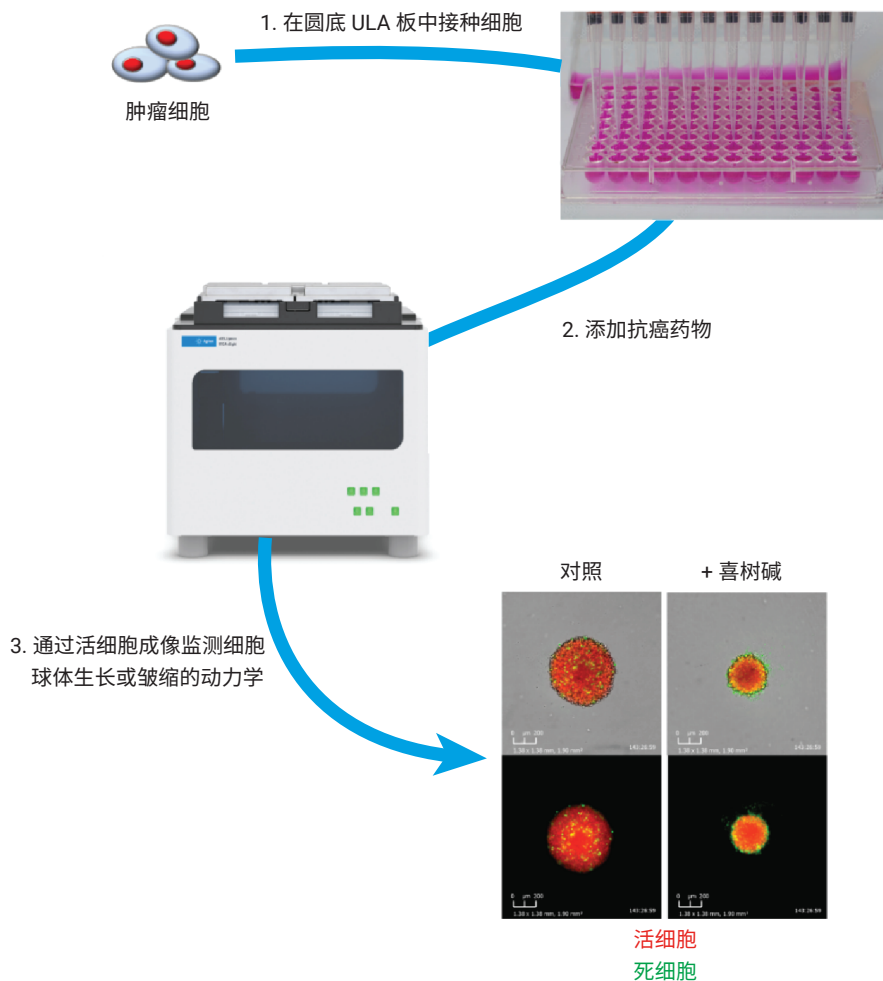


图 1. 用于 3D 细胞球体实验的 Agilent eSight 工作流程。详见文字说明

可以使用安捷伦慢病毒试剂 (eLenti) 或活细胞染料 (eLive) 标记细胞核。使用 Agilent eTox 染料检测死亡细胞, 或使用 Agilent eCaspase 和 eAnnexin 试剂特异性监测细胞凋亡, 可实现多重检测。eSight 软件可以使用表面积、直径、亮度等参数轻松量化细胞球体生长/皱缩过程。

材料与方 法

在 37 °C/5% CO₂ 条件下进行细胞维持培养和检测。细胞系及其生长培养基如表 1 所示。FBS 购自 Gibco (部件号 10099-141), Pen/Strep 购自 Hyclone (部件号 SV30010)。

使用 Agilent eLenti Red (部件号 8711011) 转导亲代细胞, 获得表达核定位红色荧光蛋白 (RFP) 的 HT-1080 Red 细胞。转导 72 小时后, 将细胞转移到含有 2 µg/mL 嘌呤霉素的完全生长培养基中再培养 14 天, 以选择转导子。

对于 3D 细胞球体实验, 将 150 µL 细胞悬液 (在完全生长培养基中) 接种到圆底超低吸附 (ULA) 板 (康宁, 部件号 7007) 的每个孔中。随后将细胞板在 125 xg 下离心 10 分钟, 使细胞聚集在孔中心。细胞

表 1. 本研究中所使用的细胞系和生长培养基

细胞系	基础培养基	培养基补充剂
HT-1080, MCF7	EMEM (ATCC, 部件号 30-2003)	10% FBS + 1% pen/strep
MDA-MB-231, T47D, BxPC3	RPMI 1640 (Gibco, 部件号 11875-093)	10% FBS + 1% pen/strep
HeLa, U87	MEM 培养基 (Gibco, 部件号 11095-080)	10% FBS + 1% pen/strep
A549	Ham's F-12 (Gibco, 部件号 11765-054)	10% FBS + 1% pen/strep

接种密度因细胞类型而异; 结果与讨论部分提供了详细信息。然后将板放入 eSight 板架 4 或 5 (仅采集图像; 在这两个板架中不检测阻抗), 并连续监测 3D 细胞球体的生长情况。使用 10 倍物镜, 每 4 小时从每个孔中采集一张照片。需要注意的是, 如果细胞球体长得太大, 超出了该视野, 则可以使用 eSight 的 2x2 拼接功能来捕获更大的区域。当仪器自动调整明场设置时, 将红色和绿色通道中的曝光手动设置为 15–40 ms (取决于细胞系的亮度)。细胞接种 3 天后, 将细胞板从 eSight 中取出, 加入 50 µL 含有抗癌化合物和 Agilent eTox Green (部件号 8711008) 的培养基。轻轻的将药物和 eTox Green 在一步中同时加入, 可以大大地减少对孔底的细胞球体的位置/方向的干扰。然后再连续监测 10 天细胞球体的生长或皱缩情况。

使用先前所述的完全生长培养基, 在安捷伦电子 E-Plate VIEW 微孔板 (部件号 00300601030) 中进行 2D 细胞单层分析。每孔添加 50 µL 培养基后, 检测背景阻抗。然后将 100 µL 细胞悬液接种到每个孔中 (接种密度 = 2500 个细胞/孔)。将细胞在室温下静置 30 分钟后, 将 E-Plate 装入 eSight 的板架 1、2 或 3 中 (这些板架采集阻抗和成像数据)。每 15 分钟测量一次阻抗, 每 2 小时使用 10 倍物镜采集图像 (4 种视野/孔)。当仪器自动调整明场设置时, 将红色和绿色通道中的曝光手动设置为 60–90 ms。在对细胞粘附和增殖监测约 24 小时后, 取出 E-Plate, 并向每个孔中加入 50 µL 含有抗癌化合物和 eTox Green 的培养基。然后再连续监测 3 天细胞毒性。

结果与讨论

细胞球体的形成和生长

为了研究细胞球体大小的变化和细胞接种密度的关系，将一系列稀释的 HT-1080 Red 细胞接种到圆底 ULA 孔中。通过简单的目视检查发现，细胞接种后 3 天，细胞球体大小以预期的方式逐步增加，从每孔 313 个细胞增加到 10000 个细胞（图 2A）。持续到第 9 天，这些细胞球体的直径普遍约为 750 μm 。在图 2B 中，这种达到普遍尺寸后的稳定现象尤为明显，该图中绘制了细胞球体直径随时间变化的曲线。在这些图中，我们注意到在细胞接种后的大约前 10 小时内细胞球体尺寸迅速减小。覆盖这一短时间窗口的图像表明，这反映了最初发散的细胞逐渐聚集成密集的细胞簇（图 2C）。在这个较大的转变过程中，eSight 的细胞球体特异性分割 Mask（黄色轮廓）从识别单个细胞相应地转变为识别整个细胞球体。图 2D 中的表格显示了直径变化百分比以及生长速率，这是跟踪细胞球体生长的另一种形式。这些数据强调了一个事实——即接种大量细胞可立即生成一个大球体，但这反过来又限制了其在较长时间窗口内的生长能力。细胞球体大小与其生长速率之间的这种反比关系是多种因素导致的，其中包括营养物质和氧气向细胞球体核心扩散不充分。在设计实验时，应牢记这些细微之处：应根据试图解决的具体问题来确定检测过程中的细胞球体大小和生长状态。

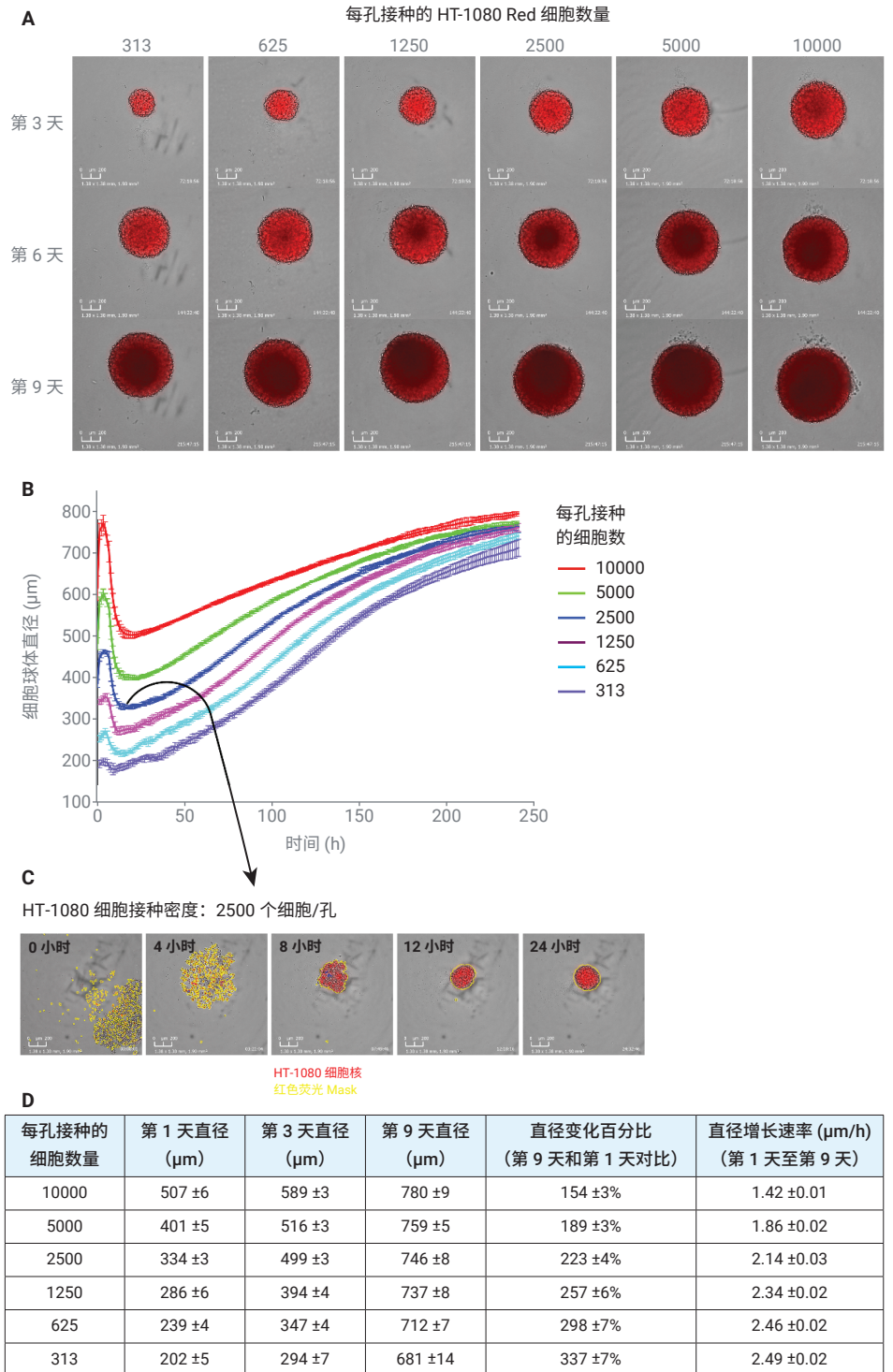


图 2. 细胞球体尺寸和生长速率随细胞接种密度的变化。(A) 按指定密度接种 HT-1080 Red 细胞。虽然 eSight 每 4 小时采集一次图像，但此处仅显示细胞接种后第 3、6 和 9 天采集的代表性图像。比例尺 = 200 μm 。(B) 细胞球体直径随时间发生的变化，其中直径由 eSight 软件根据红色表面积和公式自动计算：
$$\text{直径} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{面积}}{\pi}}$$
(C) 单孔接种 2500 个细胞后不同时间点的图像，突出显示了细胞的快速聚集/成簇，从而形成了图 B 中 0 到 10 小时时间窗口中观察到的曲线形状。(D) 另一种使用直径变化百分比和直径增长速率跟踪细胞球体状态的方法

当然，细胞球体的特性取决于组成球体的细胞系。图 3 显示了每孔接种 2500 个细胞 72 小时后的细胞球体。HeLa、HT-1080 和 U87 细胞产生高度规则的球体，而 T47D 和 MCF-7 细胞球体则多为椭圆形，BxPC3、MDA-MB-231 和 A549 细胞球体呈现高度的表面不规则性。需要注意的是，在所考察的尺寸范围内，每个细胞系产生的球体都具有不同密度/不透明度。尽管存在广泛的物理特性，eSight 软件仍然能准确地划定每个球体的边界（图 3 中的青色分割 Mask）。重要的是，在单独使用明场（图 3）以及使用荧光成像（图 2C）时都是如此。

抗癌化合物介导的细胞球体皱缩

为了评估 eSight 表征抗癌化合物对细胞球体的作用功效的能力，将 HT-1080 Red 细胞以每孔 2500 个细胞的密度接种到圆底 ULA 板中。接种 72 小时后，加入不同浓度的喜树碱和 Agilent eTox Green 染料，后者可将死细胞染为荧光绿色*。在加入药物后 10 天内采集图像。以图 4A 中第 0 天的明场图像作为对照，很明显，暴露于阴性对照 (DMSO) 的细胞球体会随着时间逐渐变大。相比之下，12.4 nmol/L 喜树碱能够抑制细胞球体生长，而 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱已引起细胞球体皱缩。值得注意的是，在某些条件下，仅使用明场图像可能很难准确量化细胞死亡的程度。例如，在第 6 天，用 12.4 nmol/L 喜树碱处理的细胞球体由致

密不透明的核心组成，核心周围有一层更透明的物质（仅在这张照片中，其外部边界由青色分割 Mask 指示）。仅通过明场图像无法清楚地看出该外围物质是由活细胞还是死细胞、凋亡小体、细胞碎片等组成。当仅使用红色荧光对同一细胞球体成像时（图 4B），只有致密核保留 RFP 信号，而外围物质为无色。图 4C 突出显示了这一点，该图中明场图像（由单个星号表示）与红色荧光图像（由双星号表示）进行了叠加。细胞球体外围红色荧光消失与细胞凋亡 RFP 降解一致，表明该区域不含活细胞。上述数据的一个重要意义在于，源自核 RFP 表达的红色荧光图像可以准确地评估球体内的活细胞，而明场图像有可能高估活细胞的数量。通过仔细调整明场分割 Mask，可以大大降低这一风险。

* 对于健康细胞，eTox Green 无法穿透细胞膜。随着细胞凋亡，细胞质膜被破坏，eTox Green 可以接触并结合 dsDNA，因此，荧光显著增加

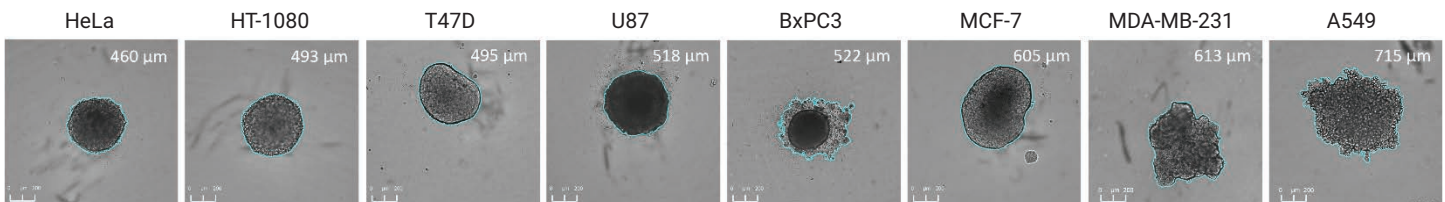


图 3. 每种细胞系的细胞球体尺寸、形状和密度/不透明度。每孔接种 2500 个细胞，72 h 后采集图像。青色线是 Agilent eSight 的分割 Mask，用于划分每个细胞球体的边界。球体直径如白色文本所示。比例尺 = 200 μm

在图 4D 中，绿色荧光信号突出显示了细胞球体中含有死细胞的区域。为了在整个球体内找到这些死细胞区域，图 4E 将它们与细胞核 RFP 表达产生的红色荧光信号叠加在了一起。对绿色死细胞图像的目视观察揭示了两种对立过程共存的事实。在没有药物的情况下，绿色死细胞信号的面积和强度随时间而增加（图 4D）。相反，在 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱存在的情况

下，由于细胞溶解（可能是继发性坏死造成的），绿色死细胞信号的面积和强度随时间不断降低。在这种情况下，荧光信号会根据药物浓度向相反方向变化，因此，认真进行数据分析尤其重要（见下文）。另一个重要的发现同样与第 6 天 12.4 nmol/L 的喜树碱样品有关。图 4F 中，当明场图像与 eTox Green 图像叠加时，明场分割 Mask 明显包含仅有少量绿

色死细胞的外围区域。综上，通过将明场图像与红色和绿色荧光图像相结合可知，在某些条件下，细胞球体的外围区域可能包含以下物质：i) 不包含活细胞的物质（RFP 信号消失），ii) 仅包含少量死细胞的物质（基于 eTox Green 的少量染色，这是一种传统的碳菁死细胞染料）。在确定如何更好地进行数据分析时，应该考虑这些异常染色区域。

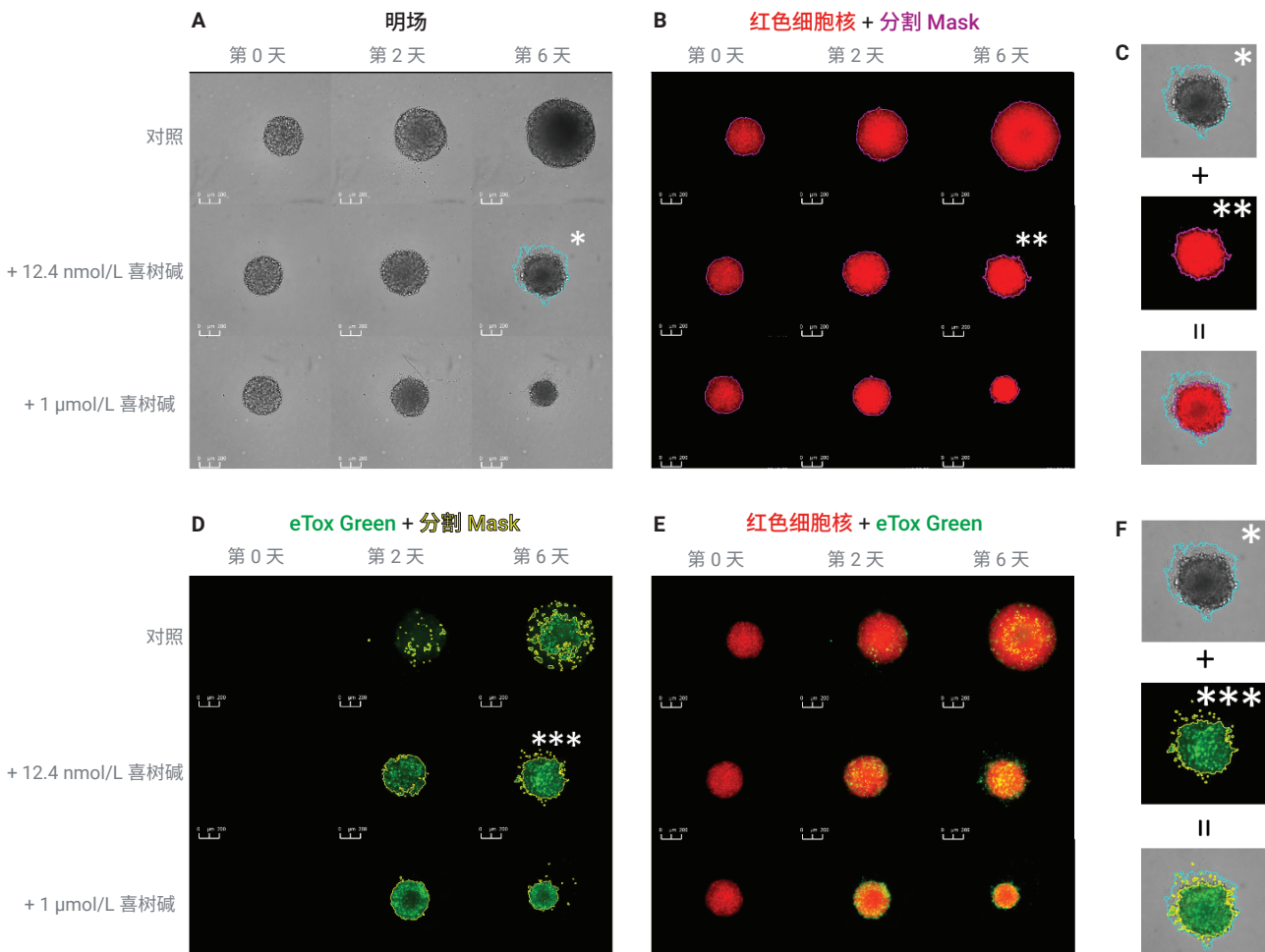


图 4. 显示喜树碱介导的 HT-1080 Red 细胞球体皱缩的时间和剂量依赖性的选定图像。(A) 仅明场。仅其中一张图像显示青色的明场分割 Mask（用星号标记）。(B) 红色荧光（源自核定位 RFP）+ 相应的分割 Mask（粉红色）。双星号突出显示了图 A 中标有单个星号的同一细胞球体。(C) 来自图 A 的明场图像（用单个星号标记）与来自图 B 的红色荧光图像（用双星号标记）叠加。青色和粉红色轮廓分别标出了基于明场和红色荧光的细胞球体边界。(D) 绿色荧光死细胞标记物 (eTox Green) 及其相应的分割 Mask（黄色）。(E) 核 RFP 衍生的红色荧光与绿色 eTox 死细胞标记物叠加。(F) 来自图 A 的明场图像（用单个星号标记）与来自图 D 的绿色荧光死细胞图像（用三个星号标记）叠加。青色和黄色轮廓分别标出了基于明场和绿色荧光的细胞球体边界。所有比例尺 = 200 μm

与上述明场问题一致的是，当试图使用细胞球体明场面积来量化喜树碱的疗效时，得到的数据质量较差（未显示）。相反，绘制 HT-1080 Red 细胞球体的红色区域面积（图 5A）或红色荧光强度（图 5B）可以清楚地显示喜树碱的剂量依赖性杀伤作用。绘制曲线下的面积与喜树碱浓度之间的关系，可得到图 5C 中的剂量-响应曲线。重要的是，通过分析细胞球体

红色区域面积和细胞球体红色荧光强度得到的 IC_{50} 值非常相似（图 5C 中插入的表格）。

绘制绿色死细胞染料的强度随时间的变化曲线揭示了该读数结果的复杂性（图 5D）。即使将分析集中在前 50 个小时（此时信号对药物浓度的依赖性似乎更明显），也没有获得合理的 IC_{50} 值（未显示）。这表明，虽然 eTox Green

这样的死细胞染料有助于确定细胞球体内死细胞的位置/分布，但它们在量化药物疗效方面可能不太有用。

比较 2D 和 3D 模型中的药物疗效

相较于 2D 细胞单层，细胞球体的一个重要属性是能更准确地模拟实体瘤的耐药性/敏感性。这要归因于多种因素，包括 2D 与 3D 微环境中细胞的差异基因表达谱和生长速率、药物难以渗透到细胞

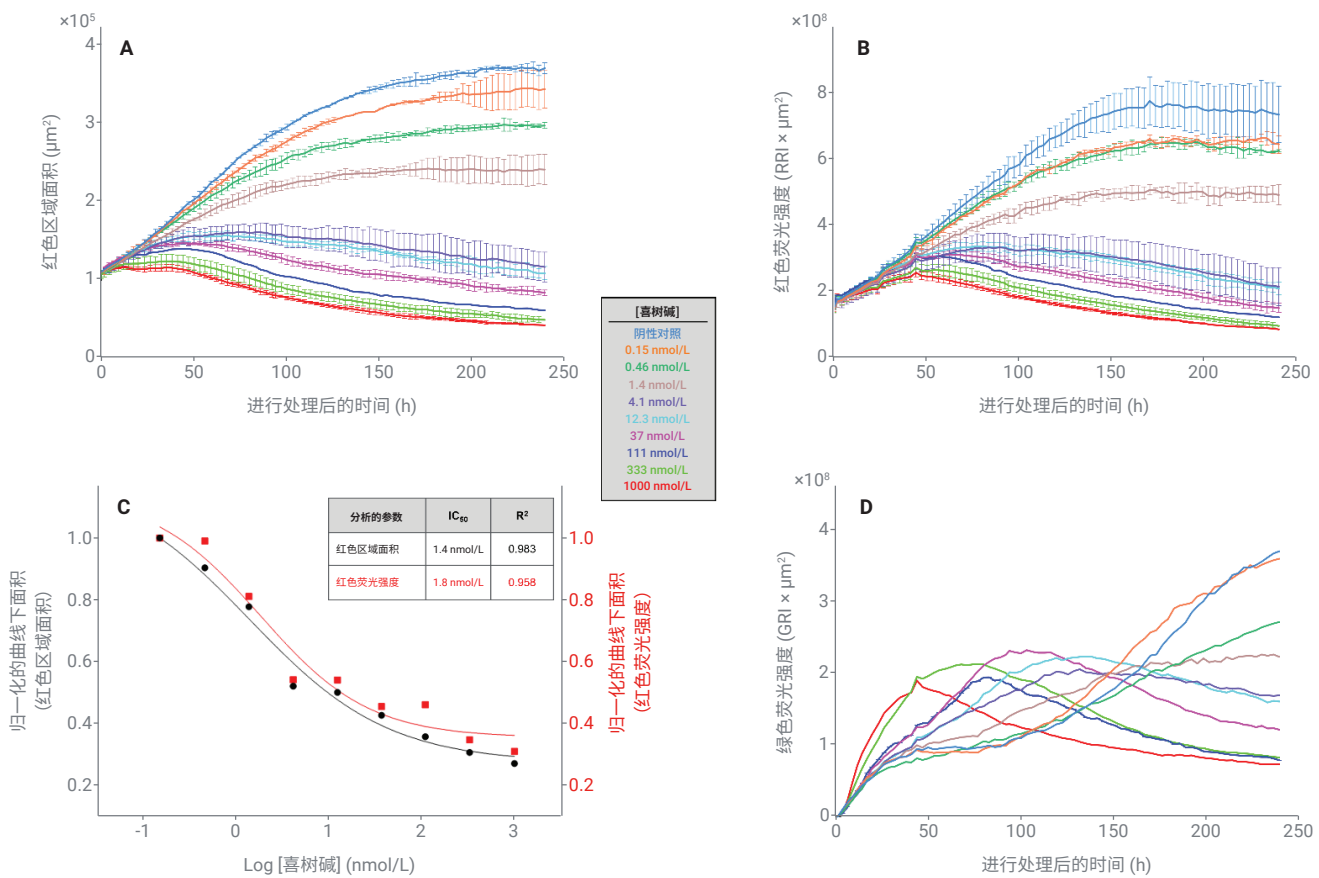


图 5. 表征喜树碱介导的 HT-1080 Red 细胞皱缩。(A) 细胞球体红色区域面积随时间的变化。(B) 细胞球体红色荧光强度随时间的变化。(C) 通过绘制图 A 和图 B 的曲线下面积 (AUC) 随喜树碱浓度的变化而得到的剂量响应曲线。为了使用相似的 Y 轴标度绘制两个数据集，使用以下公式对 AUC 值进行归一化：
 标准化 AUC = (AUC_{目标浓度}/AUC_{最低浓度})。(D) 绿色荧光强度（反映细胞死亡）与时间的关系。移除了标准偏差误差线，以便更容易地观察数据曲线的趋势

球体内部等。为了探索 HT-1080 Red 细胞的敏感性如何随检测形式的变化而变化，将这些细胞接种到电子 E-Plate（形成 2D 细胞单层）或圆底 ULA 板（形成细胞球体）中。接种 24 小时后，将不同浓度的喜树碱加入到 2D 细胞单层中，随后通过计算随时间变化的红色细胞数量来监测细胞毒性。在接种后第 3、5 或 7 天，向细胞球体中加入同样的药物，并使用红色总面积来监测细胞毒性。图 6A 和 6B 清楚地表明，相对于 2D 细胞单层，细胞球体对喜树碱的耐受性更强。重要的是，这些细胞球体的药物敏感性高度依赖于添加药物的时间。其他文献也曾提到过这种现象，当试图尽可能提高细胞球体实验的重现性时，应牢记这一点。

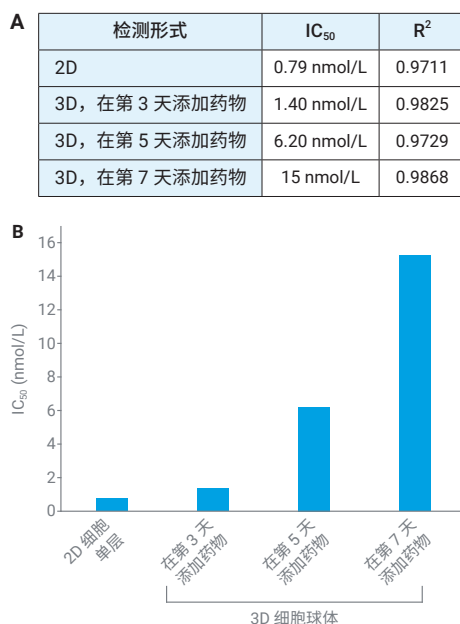


图 6. 评估喜树碱在不同检测形式下的疗效。表格 (A) 和图形 (B) 显示了 IC₅₀ 值。详见文字说明

用于高通量筛选的定量分析可靠性

理想的药物筛选实验能够轻松且高置信度地区分“命中”和“未命中”。当命中与未命中的信号之间存在较大差异且标准差很小时，就可以实现这一点。量化筛选实验的质量/有效性/可靠性（即统计效应量）的一种方法是使用 Z'-因子，其中：

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

μ 和 σ 表示阳性对照 (p) 和阴性对照 (n) 的均值和标准差。使用文献 7 中定义的标准，Z'-因子得分小于 0 表明阴性对照和阳性对照之间有太多重叠，导致实验方法无法发挥作用。当得分为 0-0.5 时，表明该实验方法有一定的实用价值，而得分为 0.5-1 时，则表明该实验方法是一种出色的筛选工具。

为了确定 eSight 3D 细胞球体实验的 Z'-因子，我们在圆底 ULA 板上培养 HT-1080 Red 细胞球体，如上所述。接种细胞 3 天后，用 0.1% DMSO 处理 48 个孔，作为阴性对照；用 1 μ mol/L 喜树碱处理其他 48 个孔，作为阳性对照。加入药物后的 3 天内，使用明场或红色荧光图像确定细胞球体的直径。

图 7A 仅呈现了每种条件下的 12 个孔，显示了阴性对照不断生长、阳性对照发生皱缩以及每种条件下细胞球体尺寸的高度一致性。虽然 Z'-因子通常是针对单个时间点计算的，但 eSight 检测的连续性使得在整个时间过程中评估 Z'-因子成为可能。从图 7B 可以看出，刚加入药物后，Z'-因子虽然很低，但却在稳步增

加。在加入药物后约 25 小时，Z'-因子超过了 0.5，并最终在 100 小时左右达到最大值 — 约 0.8。此处观察到的停滞期符合预期；只需 25 个小时，喜树碱的毒性就会表现为细胞球体大小的实质性变化。对 Z'-因子的评估表明，eSight 3D 细胞球体实验可以作为一种可靠的筛选工具，同时它也有助于确定进行分析的最佳时间窗

口。最后，基于明场直径和基于红色荧光直径计算的 Z'-因子几乎相同（图 7B）。这与图 4 和图 5 中观察到的情况形成了鲜明的对比，图 4 和图 5 中荧光图像产生的数据质量要优于明场图像。而这似乎是药物浓度导致的结果，下面的结论部分将展开进一步的讨论。

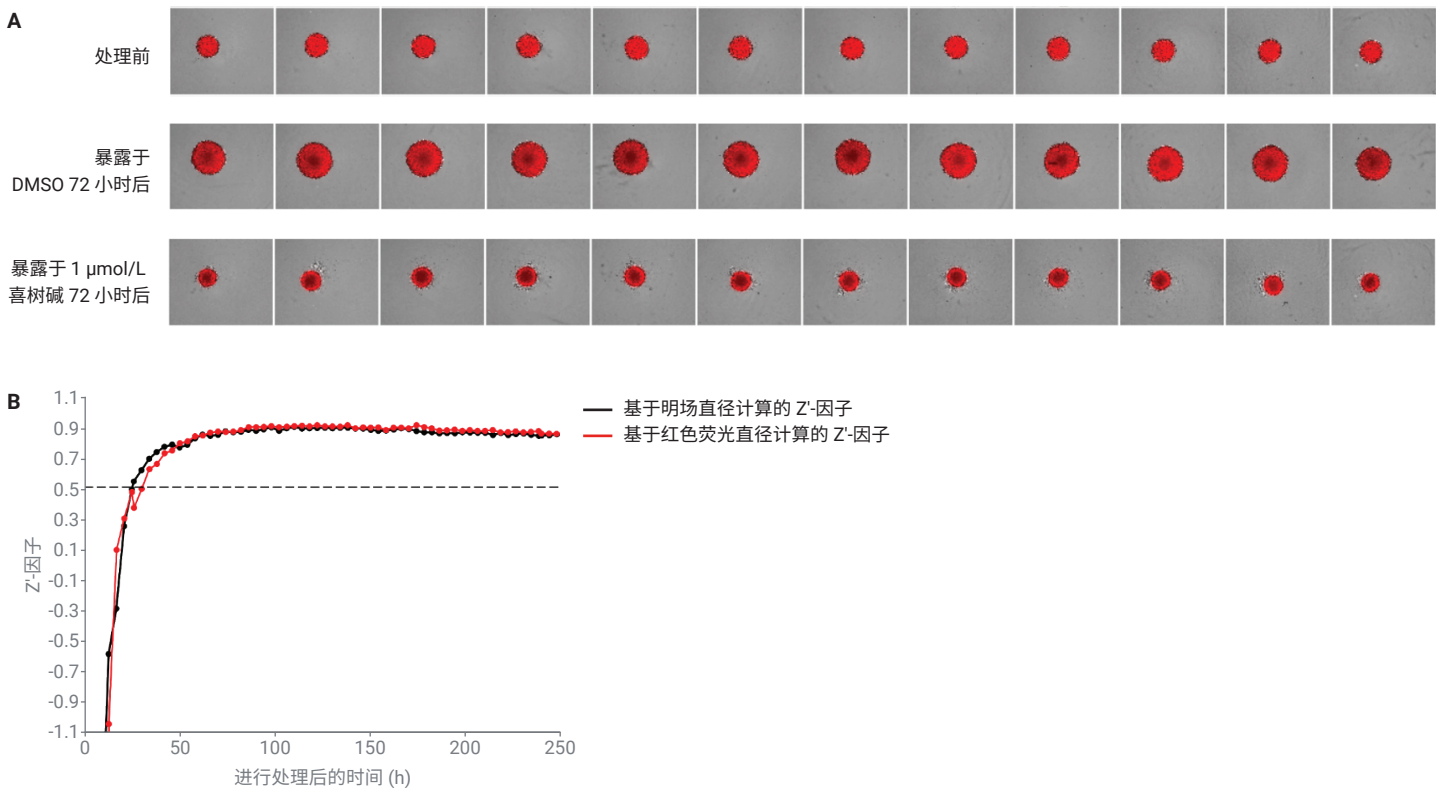


图 7. 使用 Z'-因子评估 eSight 3D 细胞球体实验作为抗癌药物筛选工具的有效性。(A) 即将进行处理前和暴露于 DMSO 阴性对照或 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱 3 天后的 HT-1080 Red 细胞球体图像。尽管在每种条件下考察了许多孔，但此处每种条件下只显示一行 12 个孔。(B) Z'-因子随时间发生的变化。根据明场图像或红色荧光图像，使用细胞球体直径计算 Z'-因子。数值 0.5 处的水平虚线表示分界值；如果高于该分界值，则认为该实验方法是可用于识别具有所需特性的药物的高效方法

结论

本应用简报中所述的 eSight 3D 细胞球体实验可以轻松生成细胞球体，并在数天的检测窗口期内进行连续分析。除接种细胞外，唯一需要的手动操作步骤是添加药物。为了初步识别命中的药物并随后量化这些命中药物的疗效，eSight 的软件会分析各种细胞球体生长/皱缩指标。由于每种细胞类型在以 3D 细胞球体生长时都表现出独特的行为，所以，应视具体情况对 eSight 的一系列分析工具进行测试，并仔细斟酌。

对于此处使用的 HT-1080 Red 细胞，高浓度的喜树碱会导致细胞球体尺寸缩小，但同时仍保持紧密明确的周界。这似乎是由于外围细胞发生了有效裂解。在这种情况下，明场和荧光图像可同样有效地分析细胞球体大小（图 4 和图 7）。相比之下，中等浓度的喜树碱会使细胞球体周界不清晰，单独使用明场进行分析会比较困难。请注意，这些球体周界

不清晰可能是由于仍然附着在球体外围的死亡细胞，以及从球体上脱落并沉降到孔底的细胞/碎片所致。目前尚未探究这种外围物质中异常染色模式的原因。与单独使用明场相比，使用内源性表达的荧光蛋白似乎是一种更可靠的跟踪细胞球体活力的方法。在慢病毒衍生的稳定细胞系不适用的情况下，只需在球体生长培养基中加入 Agilent eLive Red/Green 染料即可标记细胞核。

最后，在 3D 实验中使用强度测量是值得探讨的。当在 3D 细胞球体模式下运行时，eSight 会在多个焦平面中采集图像，然后将其叠加，生成单张输出图像。整个细胞球体的“荧光强度”可以通过将所有焦平面的总荧光强度相加来计算。这种方法并没有完全考虑到整个细胞球体发射的光。然而，由于在板的所有孔中使用完全相同的操作，因此，这是在板孔之间进行相对比较并跟踪随时间发生的变化的一种有效的方法。

参考文献

1. Horvath, P. et al. Screening Out Irrelevant Cell-Based Models of Disease. *Review Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, 15(11), 751–769
2. Kapałczyńska, M. et al. 2D and 3D Cell Cultures - a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Arch. Med. Sci.* **2018**, 14(4), 910-919
3. Glimelius, B. et al. Extracellular Matrices In Multicellular Spheroids of Human Glioma Origin: Increased Incorporation of Proteoglycans and Fibronectin as Compared to Monolayer Cultures. *APMIS* **1988**, 96(5), 433–44
4. Riffle, S. et al. Modeling Tumor Cell Adaptations to Hypoxia in Multicellular Tumor Spheroids. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, 36, 102
5. Groebe, K. et al. On the Relation Between Size of Necrosis and Diameter of Tumor Spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, 34(2), 395-401
6. Millard, M. et al. Drug Delivery to Solid Tumors: the Predictive Value of the Multicellular Tumor Spheroid Model for Nanomedicine Screening. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, 12, 7993–8007
7. Ji-Hu, Z. et al. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4(2), 67-73

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

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

www.agilent.com/chem/esight

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44610.7046064815

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，2022
2022 年 3 月 24 日，中国出版
5994-4680ZHCN