

# 使用基于阻抗的实时无标记细胞分析方法评估水样的细胞毒性

Agilent xCELLigence 实时细胞分析仪 (RTCA)  
多板位 (MP) 系统用于该测试

## 作者

Dorothy Yu Huang 和  
David W. Kinniburgh  
阿尔伯达毒理学中心,  
卡尔加里大学,  
阿尔伯达, 加拿大  
Stephan Baumann  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

接触危险化学品所引起的慢性不良反应不易被察觉, 但慢性不良反应已被职业健康研究所认可。越来越多的证据表明, 长期接触危险化学品, 即使是非常低的浓度也可能引起不良反应甚至慢性疾病<sup>[1]</sup>。这一认识有助于推动环境管理者和公共卫生决策者对水毒性筛查的关注。

传统上, 毒性分析依赖于动物试验<sup>[2]</sup>。本应用简报介绍了一种由阿尔伯达毒理学中心开发的, 用于水源监测的无标记实时细胞分析方法。这种体外细胞毒性分析使用基于阻抗的 Agilent xCELLigence 实时细胞分析仪 (RTCA)。该方法可以无创地连续监测水样中存在的累积毒性物质对细胞生长的干扰。分析中通过水毒性指数 (WTI)、生物效应百分比 (PoE) 和细胞生长抑制 (AUC) 来确定趋势和环境热点。这种无创性分析系统可用于许多贴壁细胞的分析, 并可潜在地应用于广泛的体外分析。

## 前言

水源监测是一项重要的环境公共卫生服务。水样的毒性筛查对环境管理者和公共卫生决策者具有重要意义。

目前已有多项细胞分析技术应用于毒性筛查。例如，爱尔兰环保局 (EPA) 与 Luxcel Biosciences 公司（现已加入安捷伦）合作，已共同证实了化学暴露对线粒体的影响<sup>[3]</sup>。同样，美国环保局也验证了用于化学物质风险评估的非靶向分析方法<sup>[4]</sup>。因此，本研究的重点是使用 Agilent xCELLigence 实时细胞分析仪 (RTCA) 多板位 (MP) 仪器来检测水样的细胞毒性。

一些高通量技术，如效应导向分析 (EDA)，加强了我们对暴露相关样品中化学物质的生物活性以及它们对环境影响的理解。环境毒理学检测越来越多地使用 EDA 作为多个/所有生物体测试的补充。与传统检测方法相比，EDA 等高通量方法能够节省时间和成本，有利于风险评估和常规监测。此外，EDA 还有可能洞察毒性的潜在机制。本应用简报将展示 EDA 如何帮助您鉴定在环境和生物样品中发现的人为化合物，并对它们进行优先级排序。

### 工作流程概述

完整的 EDA 工作流程<sup>[5]</sup> 步骤包括：

1. 评估水、空气或土壤样品中细胞毒性物质的生物活性
2. 将有细胞毒性的样品，通过质谱法进行分析
3. 从复杂的 GC/MS 和 LC/MS 数据中提取高质量特征，作为化学分析的一部分
4. 化学计量学可应用于非靶向数据。这些工具支持用户从统计学角度识别可能的匹配结果
5. 您可以评估可能的匹配结果，查看它们是否会影响已知的不良结局路径
6. 如果匹配结果没有已知生物活性，可以重新进入生物分析步骤，评估单个化合物的细胞毒性，帮助确定因果关系

本应用简报涵盖了工作流程的前两个步骤，而将工作置于整个 EDA 过程的背景中非常重要，如图 1 所示。

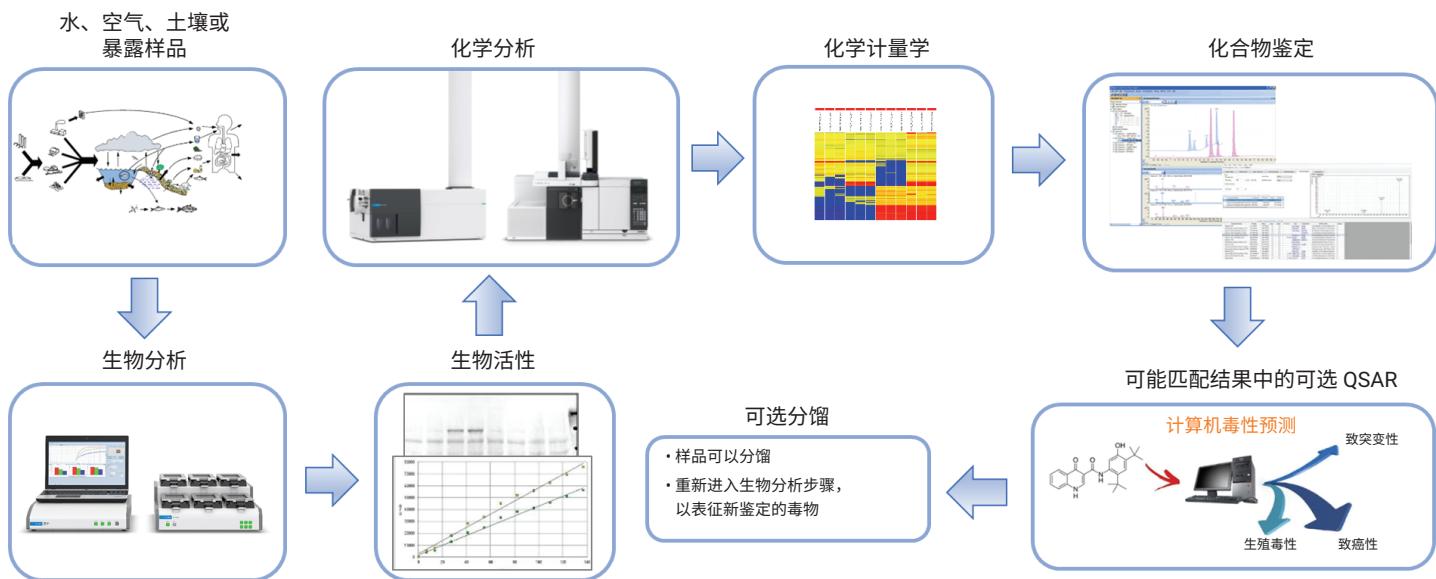


图 1. 通用 EDA 工作流程。可以在 EPA 的 DSSTox 数据库中搜索可能的匹配结果，该数据库有 87.5 万个条目。可以分离这些可能的匹配结果并评估其生物活性

## 实验部分

### 仪器

本研究采用 Agilent xCELLigence RTCA MP 仪器。

### 样品与样品前处理

在 2012 年至 2014 年的开放水域季节，我们共采集了 436 份河水样本，用于评估水的细胞毒性。

- 水样取自流经阿尔伯塔省北部的河流
- 分析中使用 HepG2 (人肝癌) 细胞
- 在对原始水样进行 80%、60%、40%、30%、20% 和 10% 的稀释下，分别检测细胞毒性反应
- 在 96 个小时的暴露期内，仪器会自动记录每小时的读数
- 这种方法的优点是可以提供数据丰富的时间-浓度-响应曲线<sup>[6]</sup>

选择砷 III 和痕量元素混合物作为细胞毒性实验的阳性对照。阴性对照仅包含靶细胞和培养基。

实验室条件下制备的细胞培养物不含细菌、霉菌、酵母、病毒、原生动物和支原体等生物污染物。这些生物污染物可以达到较高密度，从而改变培养物的生长和特性，并可能导致细胞分析结果不准确以及错误。因此，无菌细胞培养至关重要。在目前的分析条件下，并未发现细菌或支原体污染<sup>[7]</sup>。

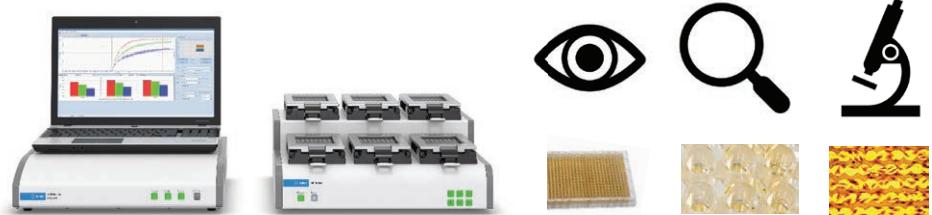


图 2. xCELLigence RTCA MP 系统，对孔板和孔进行了放大，详细展示了电极

### 结果与讨论

RTCA 系统能够无创地连续监测水样中的联合毒性作用对 HepG2 细胞造成的生长干扰。分析中建立了 WTI、PoE 和细胞响应曲线下面积 (AUCRP) 三个危害参数，来评价水源和其他水域的细胞毒性。

阴性对照组（图 3 中的红色曲线）遵循典型的细胞生长曲线，因为它们只暴露于

培养基和稀释溶剂中。阴性对照曲线展示了四个不同阶段：迟滞期、对数期、稳定期、衰亡期<sup>[8]</sup>。由于细胞表现出的自然周期，以及在衰亡期缺乏营养补充，因此活细胞数下降。如果将衰亡期纳入分析范围，结果会缺乏可信度，因为死亡原因存在不确定性。因此，我们使用曲线的对数期部分来计算 AUCRP。

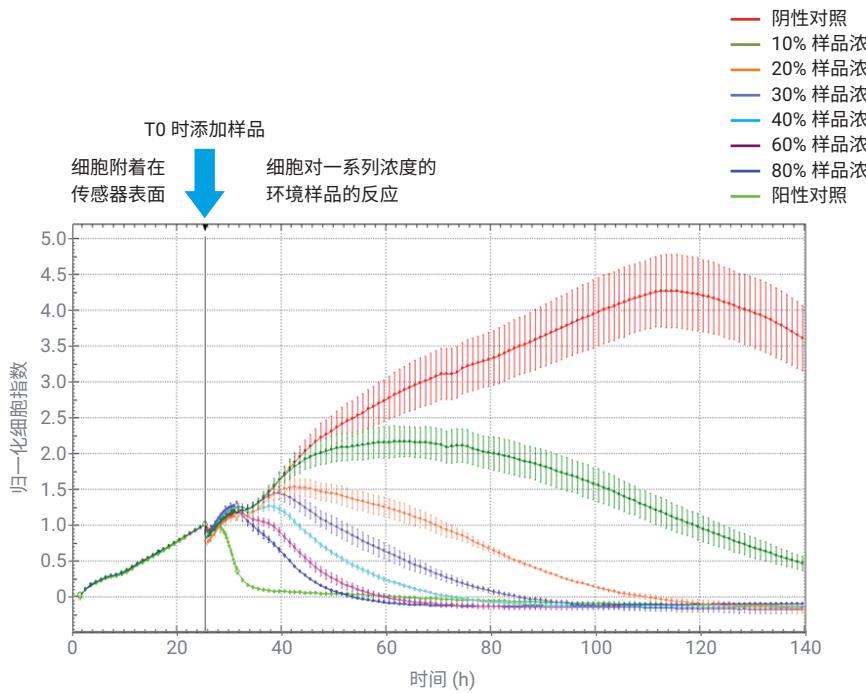


图 3. Agilent xCELLigence RTCA 的时间和剂量-依赖细胞毒性响应曲线。监测  $T_0$  顶点 (114 分钟时) 这个时间段的生物效应

PoE 值可直接衡量水样在给定浓度下的生物活性。它反映了在限定时间范围内的累积生物效应。

为了更好地理解与暴露相关的效应，我们引入了基于 PoE 的浓度-响应曲线，其中  $x$  表示浓度， $p1$ 、 $p2$  和  $p3$  是与水样浓度无关的参数， $\text{PoE}(x)$  表示用水样浓度  $x$  处理细胞时的 PoE 值<sup>[6]</sup>。

$$\text{PoE}(x) = p1 \times x^{p2} + p3$$

图 4A 显示了未经处理的阴性对照结果，图 4B 显示了具有强生物活性的样品 11 的 PoE 曲线。这些数据也可以显示为热图或剂量反应曲线，如图 5 所示。在这种情况下，相对良性的样品，例如样品 4，在高浓度下也几乎没有表现出细胞毒性，而样品 11 的 PoE 从低稀释度就开始显示出细胞毒性。

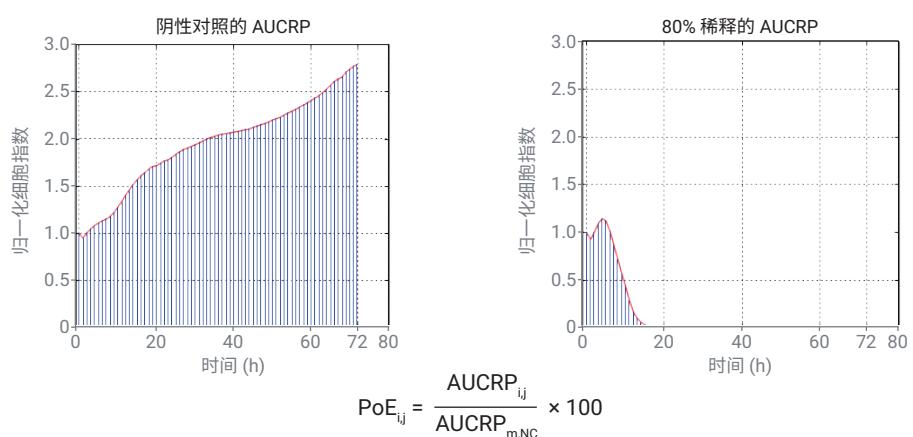


图 4. AUCRP 是细胞生长抑制的一种衡量方法，其中  $\text{PoE}_{ij}$  是第  $i$  个含第  $j$  个浓度的水样的活性指数。  $\text{AUCRP}_{m,NC}$  是第  $m$  个 E-Plate 内阴性对照的 AUCRP

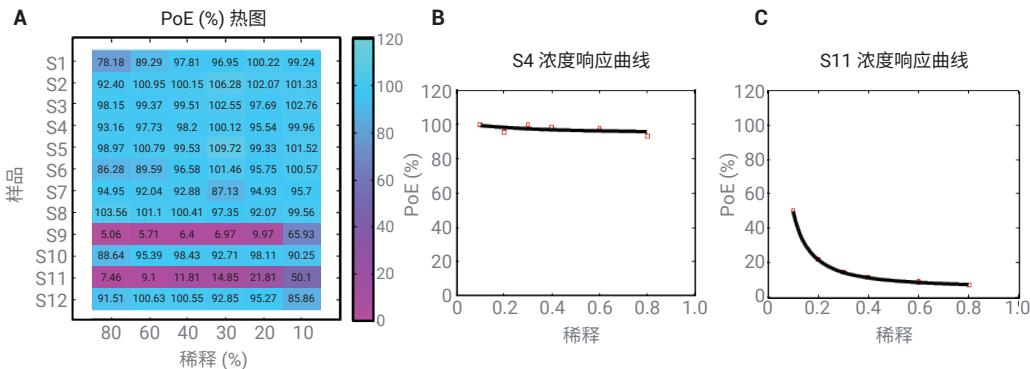


图 5. (A) 6 种稀释度下 12 个水样的活性指数 PoE 直方图。(B) 细胞毒性很低的水样的 PoE 剂量反应。(C) 细胞毒性很高的水样的 PoE 剂量反应

由于 PoE 与特定的暴露时间明确相关，并且一些水样的毒性不足以引起 20% 或 50% 的生长抑制（如图 6 所示），因此分析中引入了一个单一指标来表示相对细胞毒性。为获得综合毒性指数，我们将稀释倍数作为权重，结合所有稀释度下的累积响应，计算出加权 WTI<sup>[9]</sup>。

在计算 WTI 之前，必须计算每个细胞响应的平均值和标准偏差，然后计算各  $\Gamma_{ij}$  值，如图 7 所示。然后使用稀释倍数作为权重将这些值合并为累积响应。

如表 1 所示，三年期间，阿尔伯塔省北部河水的 WTI 范围为 0.19 至 13.72。总体而言，57% 的样品 WTI 值大于临界值（即 1），表明存在潜在毒性。按年统计，96% 的采样点在 2012 年里至少有一个样品具有细胞毒性，在 2013 年（图 8）该值为 93%，2014 年为 90%。年与年之间 WTI 的最小值是相似的（约为 0.20），这表明有一个潜在的基线值。最大毒性出现在 2012 年，并在 2013 年和 2014 年有所下降。基于 WTI、PoE 和 AUC 值，我们确定了可能的细胞毒性热点。

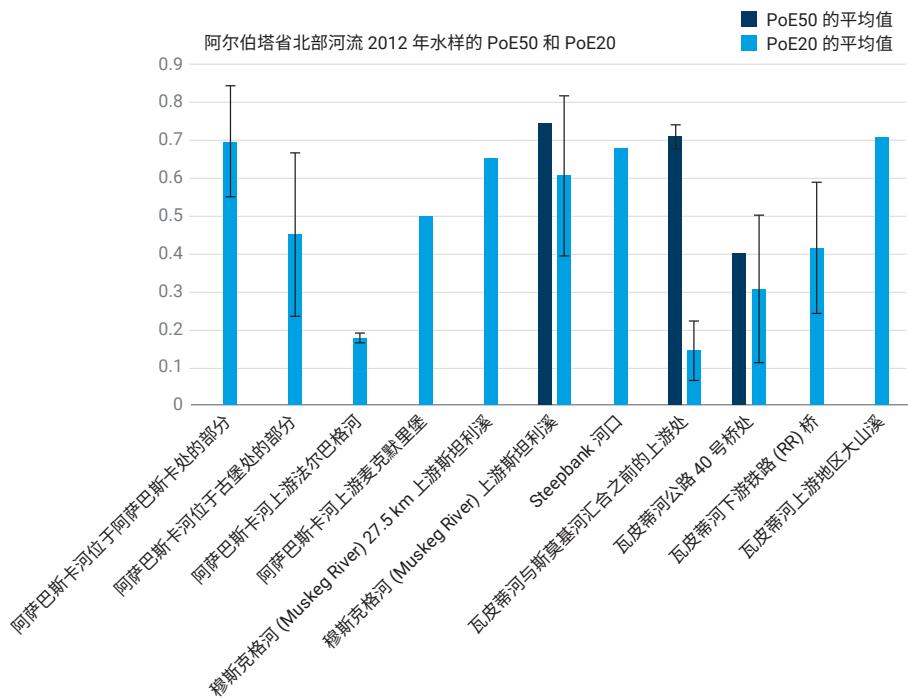


图 6. 从浓度响应曲线中插入了引起 20% 和 50% 生长抑制的浓度（PoE20 和 PoE50）。在 2012 年，几乎所有的采样点都至少有一个样品具有细胞毒性

$$\Gamma_{ij} = \frac{\text{Area}_{ij}}{\sum_{k=1}^K \sigma_{ik}}, \quad i = 1, 2, \dots, 12, j = 1, 2, \dots, 6$$

$$\tilde{\Gamma}_i = \frac{[\Gamma_{i,1}, \Gamma_{i,2}, \dots, \Gamma_{i,6}] [0.8, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1]^T}{0.8 + 0.6 + 0.4 + 0.3 + 0.2 + 0.1}, \quad i = 1, 2, \dots, 12$$

图 7.  $\Gamma$  是 WTI， $\sigma$  是阴性对照的标准偏差， $i$  是水样的数量， $j$  对应于各样品的浓度。将 WTI 值大于 1 设置为有意义的生物响应的临界值

表 1. 阿尔伯塔省北部河流水样的 WTI

年份	采样点	样品	水毒性指数								
			最大值	最小值	中位值	平均值	几何平均值	< 1	1 < 5	5 < 10	10 < 15
2012	25	110	13.72	0.19	1.21	1.59	1.16	44	64		2
SD								0.22	0.78		2.04
2013	29	263	9.84	0.23	1.19	1.68	1.24	115	139	9	
SD								0.21	0.9	1.59	
2014	21	62	5.56	0.26	1.35	1.63	1.25	26	35	1	
SD								0.22	0.99		

## 结论

以往的研究表明，使用 Agilent xCELLigence RTCA MP 系统获得的终点结果与传统的 Microtox 测试和细胞响应一致<sup>[6]</sup>。本实验证明了该系统可以作为一种高通量筛查工具来监测环境水样的细胞毒性。此项研究的结果表明：

- 水毒性指数是一个有用的指标，它将所有稀释的累积响应合并为一个值
- 阿尔伯塔省北部河流的基线水毒性指数值约为 0.2
- 水的毒性因地理和时间而异，在 2013 年 5 月和 6 月达到峰值
- 瓦皮蒂河 (Wapiti River) 被确定为未来深入研究的潜在热点

然而，我们仍然需要通过有害结局路径方法来全面表征毒性最强的水样，从而对引起细胞毒性的毒物进行分类。

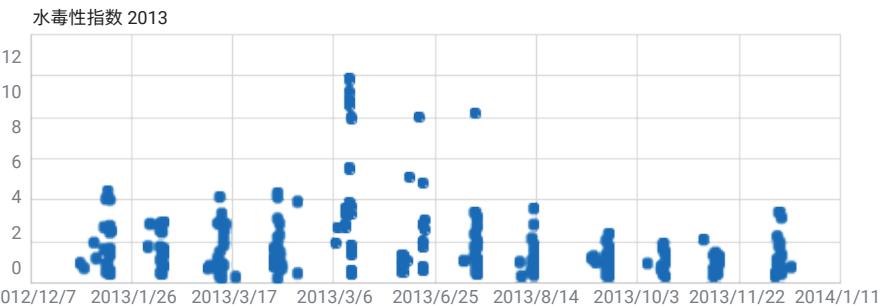


图 8. 2013 年，阿尔伯塔省北部河流水毒性的时间分布

## 参考文献

1. Stiborová, M. et al. Balkan Endemic Nephropathy: an Update on its Aetiology. *Archives of Toxicology*. **2016**, 90(11), 2595–2615
2. White, K. B.; Liber, K. Chronic Toxicity of Surface Water from a Canadian Oil Sands End Pit Lake to the Freshwater Invertebrates Chironomus dilutus and Ceriodaphnia dubia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2020**, 78, 439–450
3. Papkovsky, D. B. et al. Development of a Novel Environmental Monitoring System based on Optical Oxygen Sensing and Respirometry, (AT-04-01-01) EPA IE, **2009**
4. Sobus, J. R. et al. Integrating Tools for Non-Targeted Analysis Research and Chemical Safety Evaluations at the US EPA. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2018**, 28, 411–426
5. Burgess, R. M. et al. Effects-Directed Analysis (EDA) and Toxicity Identification Evaluation (TIE): Complementary but Different Approaches for Diagnosing Causes of Environmental Toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, 32, 1935–1945
6. Pan T. et al. High-throughput Screening Assay for the Environmental Water Samples Using Cellular Response Profiles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, 114, 134–142
7. Alberta Health, Water Toxicity Testing Technical Report, Edmonton, Alberta, Canada, **2012**
8. Davis, J. Animal Cell Culture: Essential Methods, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 2011
9. IFAC Proceedings Volumes **2013**, 46(31), 309–314

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44432.6084375

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。