

## 基于荧光图像的抗肿瘤细胞迁移药物筛选方法

聂晓静<sup>1</sup>, 赵筱萍<sup>2</sup>, 王毅<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** 本文建立了一种基于荧光图像的抗肿瘤细胞迁移药物筛选方法。应用 Hoechst 33342 荧光染料染色和 96 孔 Transwell 板, 通过细胞荧光图像采集与分析平台对正常组和加药组细胞荧光图像进行定量分析, 建立了一种快速筛选抗肿瘤细胞迁移药物的新方法。对本方法的稳定性、精密度、荧光染色时间和迁移时间进行了考察和优化, 并对抗肿瘤药紫杉醇的肿瘤细胞迁移抑制作用进行了定量分析, 计算得到紫杉醇抗肿瘤细胞迁移的  $IC_{50}$  为  $0.717 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。采用该方法对中药泽泻 24 个组分进行筛选, 发现 1 个活性组分。结果表明, 该方法快速、准确、重现性好, 能够用于抗肿瘤细胞迁移药物的快速筛选。

**关键词:** 肿瘤细胞迁移; 荧光成像; 高通量筛选; 泽泻

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 07-0793-05

## Development of fluorescence imaging based assay for screening compounds with anti-migration activity

NIE Xiao-jing<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-ping<sup>2</sup>, WANG Yi<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;  
2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**Abstract:** In the present study, A fluorescent imaging-based high-throughput screening method was developed for identifying anti-migratory compounds with 96-well Transwell plates. The correlation, precision and stability of this method were examined and the incubation time of dye Hoechst 33342 in addition to migration time was optimized. In addition, The inhibitory activity of anti-cancer drug paclitaxel on tumor cell migration was assayed and an  $IC_{50}$  value of  $0.717 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  was obtained. Using this method, 24 components from *Rhizoma Alismatis* were screened and one component with anti-migration activity was found. These results show that the new proposed method with good precision, stability and linear range has the potential to assay the inhibitory activity of anticancer compounds.

**Key words:** tumor cell-migration; fluorescence imaging; high-throughput screening; *Rhizoma Alismatis*

侵袭和转移是肿瘤最基本的生物学特征, 也是引起肿瘤患者死亡的主要原因, 因肿瘤死亡的患者中约有 90% 是肿瘤转移引起的<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞的定向迁移是肿瘤转移过程中的关键步骤<sup>[2]</sup>。因此, 寻找有效的抗肿瘤细胞迁移活性物质是抗肿瘤新药发现的重

要研究方向之一。

目前, 体外测定药物抗肿瘤细胞迁移活性应用较广泛的方法有两种: 一种是划痕法 (wound healing)<sup>[3]</sup>; 另一种是 Boyden Chamber 或 Transwell 小室法<sup>[4]</sup>。划痕法因其无法模拟肿瘤细胞在体内穿越周围组织, 目前应用较少; Boyden Chamber 或 Transwell 小室法不易受实验条件的限制因而应用更广泛<sup>[5, 6]</sup>。基于荧光染色技术的检测分析方法常用于药物高通量、高内涵筛选的研究<sup>[7]</sup>, 以及药物细胞毒测定<sup>[8]</sup>和药物相互

收稿日期: 2011-01-23.

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2008C23065); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-012).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-571-88208426, E-mail: mysyky@zju.edu.cn

作用研究<sup>[9]</sup>等。本研究将荧光成像技术与 Transwell 小室迁移相结合,建立了一种抗肿瘤细胞迁移药物的快速筛选方法,为抗肿瘤药物发现开辟了新的思路。

## 材料与amp;方法

**实验试剂及药品** EAhy926 细胞株购自中国科学院上海细胞库。DMEM 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司。胰蛋白酶购自 Sigma 公司。96 孔细胞培养板购自 Corning 公司。96 孔 Transwell 板购自 Millipore 公司。其他常用试剂为进口分装分析纯。荧光染料 Hoechst 33342 购于碧云天生物技术研究所,用 DMSO 配成  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的储备液,保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

紫杉醇标准品购自中国药品生物制品检定所。泽泻组分来自本实验室数字化中药组分库。

**实验仪器** 细胞荧光图像收集与分析平台,由浙江大学药物信息学研究所开发,包括 Leica DMI 6000 B (德国莱卡公司) 倒置显微镜,内置物镜以及荧光滤光片,高精度可控电动平台,电荷耦合器 (CCD) 和荧光图像拼接及识别软件,其基本原理参见文献<sup>[10]</sup>。

### 实验条件的选择

**最佳染料浓度选择** 将肿瘤细胞按细胞数  $10\ 000/\text{孔}$  接种于 96 孔板,常规培养 24 h 使其贴壁。分别用浓度为 0、5、10、15 及  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=3$ ) 的 Hoechst 33342 溶液替换培养液对细胞进行荧光标记,  $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 。  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 然后用 PBS 洗 2 遍, 吸净残余液体后立即在显微镜下拍摄荧光图像, 并统计各孔荧光强度。

**孵育时间对迁移细胞数的影响** 将肿瘤细胞按细胞数  $10\ 000/\text{孔}$  接种于 96 孔板, 常规培养 24 h 使其贴壁。分别用质量浓度为 0、5、10、15 及  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=3$ ) 的 Hoechst 33342 溶液替换培养液对细胞进行荧光标记,  $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 。  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 然后用 PBS 洗 2 遍, 吸净残余液体后立即在显微镜下扫描, 并统计各孔荧光强度。

**Hoechst 染色定量分析药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用** 取对数生长期的肿瘤细胞,  $0.25\%$  胰酶消化, 离心收集细胞, 悬浮于无血清培养基 (细胞数  $400\ 000/\text{mL}$ ), 接种于 96 孔 Transwell 板的上室,  $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ , 下室加入含  $10\%$  FBS 的培养基  $150\ \mu\text{L}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  常规培养 16 h。待筛选组分及阳性对照药物在种板同时按实验设计终浓度加入上室内, 同时以  $0.1\%$  DMSO 作为对照。迁移完成后, 用  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hoechst

33342 溶液替换培养液对细胞进行荧光标记,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。小心擦除膜上层未迁移的细胞, 上、下室均用 PBS 洗 2 遍, 吸净残余液体后立即在显微镜下扫描, 并统计各孔荧光强度。根据荧光强度计算药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用, 计算公式: 药物对肿瘤细胞的迁移抑制率 (%) =  $(1 - F_m / F_c) \times 100\%$ , 其中  $F_m$  为加药组的荧光强度,  $F_c$  为对照组的荧光强度。

### Hoechst 染色定量药物对肿瘤细胞迁移抑制作用的方法学研究

**线性范围** 将肿瘤细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞数分别为每孔  $40\ 000$ 、 $30\ 000$ 、 $20\ 000$ 、 $10\ 000$ 、 $5\ 000$ 、 $3\ 000$  及  $1\ 000$  个 ( $n=3$ )。常规培养 24 h 后, 测定各孔荧光强度。

**稳定性及重现性** 肿瘤细胞种板 ( $10\ 000/\text{孔}$ ,  $n=60$ ), 常规培养 24 h。对整板 (60 孔) 进行荧光染色和连续扫描, 测定各孔荧光强度。日间精密度测定方法与稳定性操作相同 ( $n=20$ ), 连续测定 3 天。

**定量限及检测限** 将肿瘤细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞数分别为每孔  $100\ 000$ 、 $10\ 000$ 、 $1\ 000$ 、 $100$  及  $10$  ( $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $n=3$ ), 常规培养 24 h, 以无细胞的培养基作为阴性对照。测定各孔荧光强度。

**紫杉醇抑制肿瘤细胞迁移活性的评价** 将含不同浓度紫杉醇的细胞悬液 (无血清) 接种于 96 孔 Transwell 板上室 (细胞数  $20\ 000/\text{孔}$ ,  $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $n=3$ )。紫杉醇浓度分别为 1、0.5、0.25、0.125 及  $0.062\ 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。下室加入完全培养基  $150\ \mu\text{L}$ 。常规培养 16 h, 迁移结束后, 按“Hoechst 染色定量分析药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用”中的方法染色、清洗、扫描。以紫杉醇浓度对抑制率作线性回归, 得直线方程, 从中求出抑制半数肿瘤细胞迁移的化合物浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

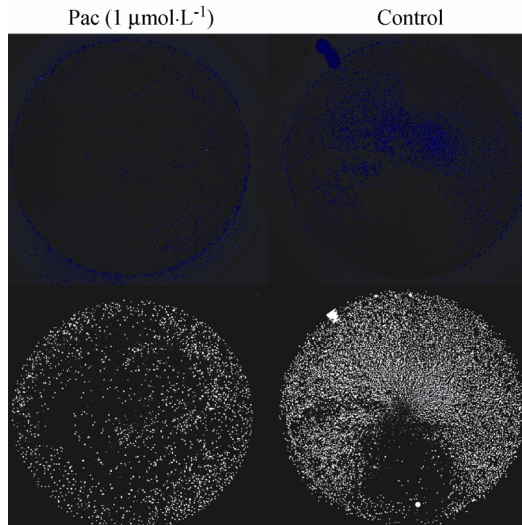
**泽泻组分抗肿瘤细胞迁移活性的筛选** 将含泽泻不同组分的细胞悬液 (无血清) 接种于 96 孔 Transwell 板上室 (细胞数  $20\ 000/\text{孔}$ ,  $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $n=3$ )。泽泻组分的质量浓度均为  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。下室加入完全培养基  $150\ \mu\text{L}$ 。常规培养 16 h, 取出后按“Hoechst 染色定量分析药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用”中的方法染色、清洗、扫描, 并根据荧光强度计算各组分对肿瘤细胞迁移的抑制率。

## 结果

### 1 荧光图片的获取与分析

本研究提出的筛选方法是利用 Hoechst 33342 荧光探针标记肿瘤细胞, 擦除膜上层未迁移的肿瘤

细胞后在荧光倒置显微镜下进行全孔扫描。获得的荧光图片经过软件拼接、识别后转化为荧光强度指标, 从而根据荧光强度计算药物对肿瘤细胞迁移的抑制率 (图 1)。



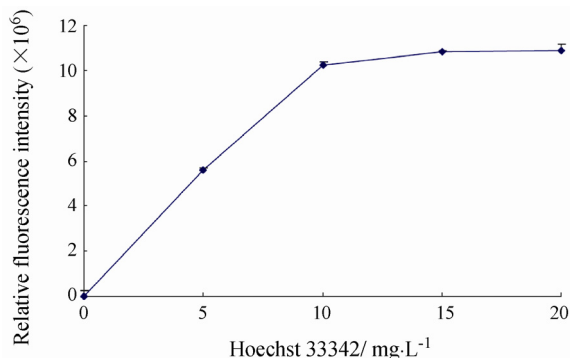
**Figure 1** Fluorescence image and binary image of paclitaxel (Pac,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and control

## 2 实验条件的选择

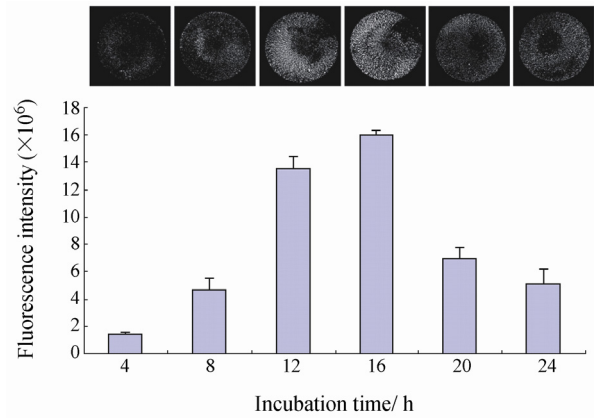
实验结果表明, 当接种肿瘤细胞数为 10 000/孔时, 荧光强度随着染料 Hoechst 33342 浓度的增加而增强, 但当染料浓度达到  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以后出现平台期 (图 2), 因此筛选中选择  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为使用浓度。此外, 预实验表明, 迁移时间对迁移细胞数的影响较大, 因此考察了连续 6 个迁移时间点的迁移细胞数。实验结果 (图 3) 表明, 迁移时间为 16 h 时, 迁移细胞数达到最大值。据以上实验结果, 最终确定荧光探针 Hoechst 33342 的使用浓度为  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、迁移时间为 16 h。

## 3 方法学研究

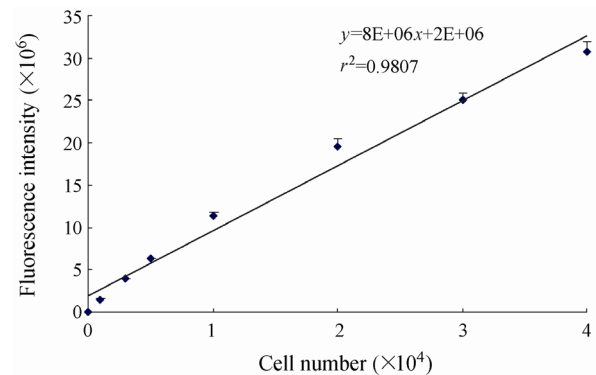
由图 4 可以看出, 接种肿瘤细胞数在  $0\sim 4\times 10^4$ /孔时, 荧光强度与每孔接种细胞数呈线性相关, 相关



**Figure 2** Correlation between fluorescence intensity and the concentration of Hoechst 33342



**Figure 3** Fluorescence intensity and binary image on various incubation time



**Figure 4** Hoechst 33342 fluorescence correlate linearly with cell number

系数  $r^2 = 0.9807$ 。

以阴性对照孔 (无细胞培养基) 的荧光强度为噪音信号, 计算各细胞浓度下响应信号与噪音信号的信噪比。如图 5 所示, 接种细胞数为 10/孔时, S/N 为  $3.73 \pm 0.48$ ; 接种细胞数为 100/孔时, S/N 为  $25.65 \pm 2.24$ 。结果表明, 当细胞数在 100/孔以上时, 应用本方法可以对细胞数进行准确定量。本实验通过对板内精密度和日间精密度的测定, 考察方法的稳定性和重现性。应用细胞荧光图像收集与分析平台, 连续扫描整板 60 孔 (去除边孔) 所得荧光强度的 RSD 为 10.96%, 连续 3 天的日间精密度为 10.66%。

## 4 紫杉醇抗肿瘤细胞迁移活性测定

应用上述方法, 研究临床常用的抗肿瘤药物紫杉醇的抗肿瘤细胞迁移活性。实验结果 (图 6) 表明, 紫杉醇对 EAhy926 肿瘤细胞的迁移有抑制作用, 且抑制作用随着药物浓度的增加而增强,  $\text{IC}_{50}$  为  $0.717 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时考察了紫杉醇对 EAhy926 肿瘤细胞的细胞毒作用 (数据未在文章中列出), 计算其  $\text{IC}_{50}$  为  $3.777 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 显著高于抑制肿瘤细胞迁移的  $\text{IC}_{50}$  值, 提示其抗肿瘤细胞迁移作用不是通过细胞毒作

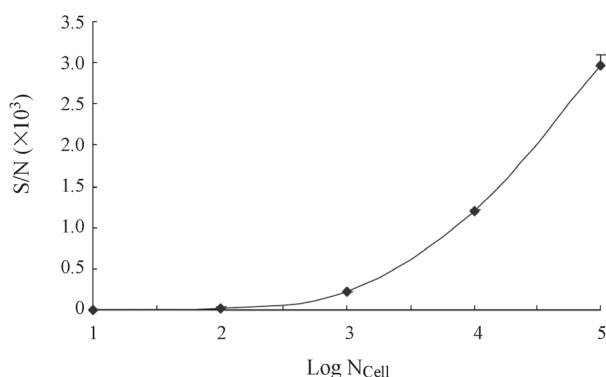


Figure 5 S/N variations with the increase of cell number (N<sub>cell</sub>)

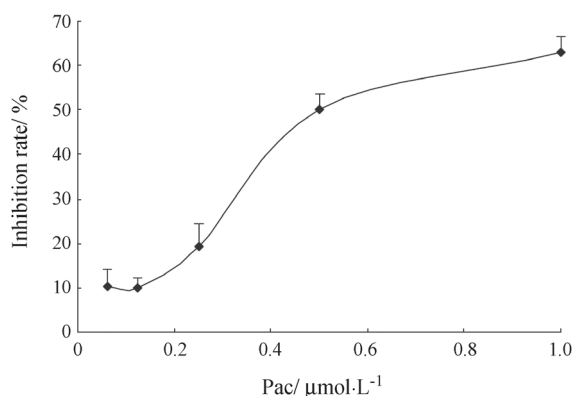


Figure 6 Dose-dependent curve of paclitaxel (Pac) on anti-migration activity

Table 1 Inhibitory activities of components from Rhizoma Alismatis on cancer cell migration

Component number	Anti-migration rate /%
A05	26.59 ± 5.24
A06	17.08 ± 5.99
A07	14.40 ± 10.27
A08	16.77 ± 4.68
A09	31.43 ± 4.97
B02	-8.44 ± 8.26
B04	-15.00 ± 9.96
B05	-16.07 ± 6.71
B06	-11.72 ± 6.76
B07	-4.38 ± 6.23
B08	-7.34 ± 9.51
B09	13.07 ± 10.64
B10	17.23 ± 7.76
B11	29.97 ± 11.25
B12	29.01 ± 3.96
C06	21.99 ± 3.53
C08	27.27 ± 4.66
C09	20.45 ± 4.98
C10	17.87 ± 5.72
C11	13.13 ± 1.39
C12	52.80 ± 6.98
C13	1.99 ± 5.02
C14	28.25 ± 3.59
C15	37.86 ± 8.40

用起效的。

### 5 中药泽泻抗肿瘤细胞迁移活性组分的筛选

泽泻组分抗肿瘤细胞迁移活性评价结果如表 1 所示, 在筛选的 24 个泽泻组分中, 对 EAhy926 肿瘤细胞的迁移抑制作用最强的是组分 C12。当组分 C12 的质量浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 其对肿瘤细胞迁移的抑制率达 52.80%。

### 讨论

体外肿瘤细胞迁移、侵袭实验是一种用于抗肿瘤转移药物研究的重要实验方法。目前广泛应用的两种方法为划痕法和 Boyden<sup>[11]</sup> 或 Transwell 小室法。对于后者, 在整个实验中, 最关键的步骤是定量穿过微孔膜黏附在膜下表面的细胞数。常用的定量迁移细胞数的方法是在迁移结束后, 用棉签将小室微孔膜上表面未迁移的细胞擦去, 甲醇固定, 结晶紫染色后, 于显微镜下手动计数膜下表面中 5~9 个随机视野的细胞数<sup>[5]</sup>, 或是将结晶紫用一定量的溶剂溶出后在适当波长下测定其 OD 值来间接定量迁移细胞数。这种方法存在易受主观因素影响、通量低、药物和试剂消耗量大的缺点。一些学者对该方法进行了改进, 如采用荧光不能透过的微孔膜代替常用的聚碳酸酯膜, 以荧光标记细胞, 迁移结束后无需固定、染色和擦除操作, 直接利用酶标仪从底部读取荧光, 从而定量迁移的细胞数<sup>[12]</sup>。但这种方法需要特殊的 Transwell 迁移小室, 价格昂贵, 且迁移结果不可视。

本研究在 Transwell (96 孔) 小室迁移的基础上, 利用荧光染料标记迁移细胞, 以荧光强度为指标定量分析全孔的迁移细胞数, 与传统的依赖于人工的显微计数法相比, 显著提高了筛选效率、缩短了筛选时间、增加了计数的准确性。当药物对 Hoechst 33342 染色无影响时, 肿瘤细胞迁移率与细胞数存在较好的相关性。方法学研究也表明, 本方法具有良好的线性关系、精密度和重现性, 适用于对 Hoechst 33342 染色没有影响的抗迁移药物抑制率的评价。为了检验本方法在筛选抗肿瘤细胞迁移药物中的应用, 实验中考察了对肿瘤细胞迁移具有确定抑制作用的紫杉醇<sup>[10]</sup>对肿瘤细胞迁移的影响, 从而验证了新方法能用于评估药物对肿瘤细胞迁移的抑制作用并且能够定量迁移抑制率。将新方法应用于泽泻组分抗肿瘤细胞迁移活性的筛选, 从中发现了 1 个具有较强的抗肿瘤迁移活性的组分。本文所建立的方法为抗肿瘤转移药物的筛选与发现提供了新思路。

## References

- [1] Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, et al. Tumor-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters [J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5: 254–258.
- [2] Mao JW, Xu B, Wang WZ, et al. Establishment of quantitative measurement assay of tumor cells migration *in vitro* [J]. *China Prac Med (中国实用医药)*, 2009, 4: 15–17.
- [3] Valster A, Tran NL, Nakada M, et al. Cell migration and invasion assays [J]. *Methods*, 2005, 37: 208–215.
- [4] Chen HW, Lee JY, Huang JY, et al. Curcumin inhibits lung cancer cell invasion and metastasis through the tumor suppressor HLJ1 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 7428–7438.
- [5] Li ZP, Jiao XM, Wang CG, et al. Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27KIP1 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 9986–9994.
- [6] Saito K, Oku T, Ata N, et al. A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20: 345–348.
- [7] Zhang TT, Du GH. Identification of ligands for human LOX-1 through fluorescence polarization-based high throughput screening [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 289–293.
- [8] Frgala T, Kalous O, Proffitt RT, et al. A fluorescence microplate cytotoxicity assay with a 4-log dynamic range that identifies synergistic drug combinations [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 886–897.
- [9] Mahringer A, Delzer J, Fricker G. A fluorescence-based *in vitro* assay for drug interactions with breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 72: 605–613.
- [10] Jin YC, Zhao XP, Zhang Y, et al. A three-stage-integrative approach for the identification of potential hepatotoxic compounds from botanical products [J]. *Int J Toxicol*, 2011, Doi: 10.1177/1091581811401046.
- [11] Brooks SA, Schumacher U. *Metastasis Research Protocols: Vol II [M]*. Totowa: Humana Press, 2001: 47–54.
- [12] Yamakawa S, Furuyama Y, Oku N. Development of a simple cell invasion assay system [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23: 1264–1266.

---

## 祝贺《药学报》英文刊正式出版

《药学报》英文刊 *Acta Pharmaceutica Sinica B (APSB)* 在广大读者、作者的关心与支持下, 经过几届编委会和全体编辑人员的共同努力终于于 2011 年 6 月出版了。这为期刊真正走向国际奠定了良好的基础。

*Acta Pharmaceutica Sinica B* 是由中国医学科学院药物研究所、中国药学会和荷兰 Elsevier 出版公司合作出版, 是《药学报》中文刊的国际化延伸。其报道内容与风格与《药学报》保持一致, 药理学家蒋建东教授为期刊主编。目前, 期刊编委会已按照国际期刊的标准组织完成, Elsevier 出版公司提供的更符合国际期刊投稿流程的投审稿系统 (<http://ees.elsevier.com/apsb>) 将于 7 月 22 日启用。本刊的出版周期为双月刊。发表论文将从 2011 年 7 月开始在 Elsevier 期刊数据库 ScienceDirect 平台以 OA 方式刊出 (第 1 期内容可以在 <http://ees.elsevier.com/apsb> 上免费阅读下载), 便于广大读者免费阅读和下载。

目前作者投稿暂时通过药学报网站 [www.yxxb.com.cn](http://www.yxxb.com.cn), 投稿方式和论文格式参见 <http://ees.elsevier.com/apsb>, 不收取审稿费、版面费。

欢迎国内外药学工作者积极投稿。

《药学报》编辑部