

# 高内涵分析仪活细胞检测功能深入开发——自噬相关研究

阎慧, 杨杏芝, 李红梅, 孔清华

(中国科学院 昆明植物研究所 天然药物活性筛选中心, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 高内涵即丰富的信息, 其内容包括: 亚细胞结构变化、细胞形态特征及数量变化、单个细胞图像采集及识别、细胞群体统计分析结果、荧光信号的时间空间分布变化等。同时高内涵平台还配备了活细胞模块, 实现长时间细胞培养及监测, 是近几年生命科学领域快速发展平台, 被广泛用于生物医药研究。通过对高内涵分析仪活细胞检测功能深入开发, 为自噬相关研究, 提供了有力支撑。

**关键词:** 高内涵分析仪; 自噬; 溶酶体

## In-depth development of living cell detection function of high content analysis- autophagy related research

Yan Hui, Yang Xingzhi, Li Hongmei, Kong Qinghua

(Service Center for Bioactivity Screening, State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, China 650201)

**Abstract:** High content means rich information, which includes: subcellular structure changes, cell morphological characteristics, cell quantity changes, individual cell image acquisition and identification, cell population statistical analysis results, and changes in the spatial distribution of fluorescence signals in time. Meanwhile, the high-content platform is also equipped with a living cell module to realize long-time cell culture and monitoring, which is a fast-developing platform in the life science field in recent years and widely used in biomedical research. In-depth development of the living cell detection function of the High Content Analysis provides powerful support for autophagy-related research.

**Keywords:** High content analysis; Autophagy; Lysosomes

高内涵分析仪 (high content analysis, HCA) 是一套自动化分析方法, 利用整合的显微镜、图像处理技术及可视化工具从细胞或细胞群中提取数据, 获得定量分析结果。高内涵筛

选（high content screening, HCS）一般应用于高通量的样品荧光成像，提供定量分析结果，例如细胞、单个细胞中靶标的空间分布以及细胞器形态。此外，HCS 能够结合单个细胞的多重检测结果，同时分析单次实验中的多个细胞亚群。

目前，国外许多制药企业对高内涵筛选表现出浓厚的兴趣，全球有数百家新药研究机构启动了这一领域的研究项目。国外业界人士认为，高内涵筛选不仅能阐明被筛样品与药靶的相互作用关系，而且可同时了解细胞的其他生物学改变，进而研究其对相关代谢途径的影响，并通过观察细胞形态来预测化合物的毒性。在这样的要求和技术的发展下，要怎样进行高内涵细胞水平的筛选成了关键性的问题。

中国科学院昆明植物研究所活性筛选中心在 2017 年对高内涵分析仪进行软件及计算机系统升级和光源升级后，提高了成像灵敏度和实验速度，并大大提高分析处理数据的效率！

光源升级和软件及计算机系统升级大大提升了高内涵分析仪的筛选效率。新的细胞毒活性筛选模型的建立，可以从机制上说明样品对细胞生长的影响机制，可以直接反映细胞数目、线粒体聚集、核形态学变化等多个方面的信息。对于进一步进行药物研发，特别是筛选抗肿瘤药物，有良好的指导意义。

高内涵分析仪一般由白色连续光源、多通道滤光片（适于常用的荧光染料）、显微镜模块和高速高分辨率的 CCD 照相机进行图像的获取，同时还可以配备细胞培养和自动加样模块进行长时间全自动的实验分析。基于激光的硬件聚焦系统使得自动对焦在 200ms 之内，再结合软件聚焦，完善了对拍摄对象的快速定位和图像获取。除了图像获取部分外，图像采集、图像分析和数据储存也是高内涵药物筛选设备的主要组成部分。一个完整的高内涵筛选技术系统应该包括具有一定开放性的数据存储库，对不同来源的实验数据进行统一的管理，同时允许研究人员调取信息、分析研究。

升级高内涵分析仪的光源和软件及计算机系统，并采用三重荧光标记法建立一种高内涵细胞增殖筛选模型，可用来筛选抗肿瘤药物。

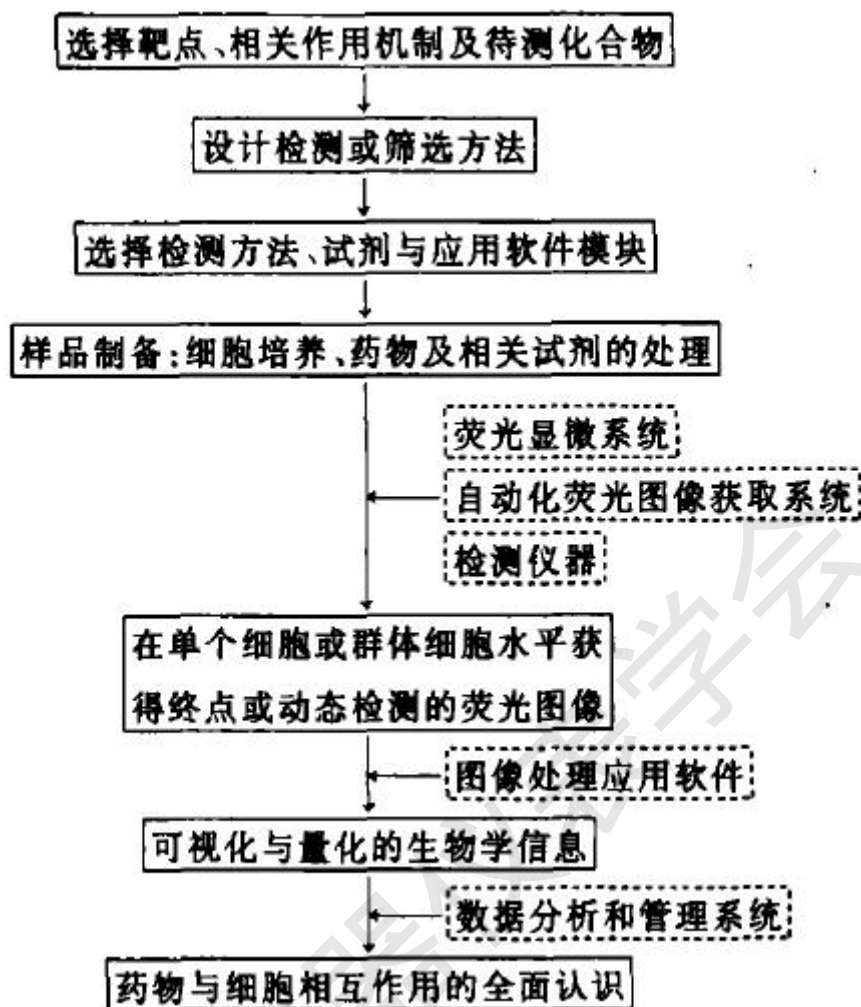


图1 技术路线及设计图

高内涵分析仪已经从功能鉴定逐渐拓展到靶点发现、靶点验证、活性初筛、代谢及毒理等研究领域，显示了巨大的发展潜力，细分下来可以检测上百种细胞参数指标，其应用几乎涵盖细胞分析的所有方面。软件更是在数据分析和结果判定方面举足轻重，在药物筛选中起到越来越大的作用。细胞水平高内涵药物筛选和药物毒性筛选越来越成为新药创制过程中不可或缺的技术选择。正因如此，如何处理庞大的数据，并利用升级后的软件进行数据分析，及时快速准确地完成实验数据处理，得到需要的实验结果是当前面临的一个技术难点。

对仪器硬件和软件工作原理的全面掌握，对于如何利用仪器进行高效检测 and 数据分析有极大帮助。因此，解决思路可以从深入了解掌握仪器设计原理及工作原理入手，在充分掌握仪器结构和工作原理的基础上，对软件的分析功能进行全面学习，这种系统的对仪器的了解，对于后期进行仪器功能的深入开发，大有帮助。

对高内涵分析仪的硬件构成、工作原理、软件分析等各项进行深入研究，以期在一次实验中掌握得到更多细胞增殖数据，通过对数据进行分析处理，实现高通量筛选检测活细胞

多种参数的目的。通过这一方法的建立，对今后进行活细胞其他参数，比如细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导各个环节，均可实现一次检测，多种参数的获得，有助于活性筛选中心根据药物研发热点，建立新型筛选模型，推动整个西南地区活性筛选的步伐，并为西南地区发现更多天然活性化合物贡献力量。

通过对高内涵分析仪活细胞检测功能深入开发，清晰记录肿瘤细胞自噬的关键过程<sup>[1]</sup>，为自噬相关研究，提供了有力支撑。

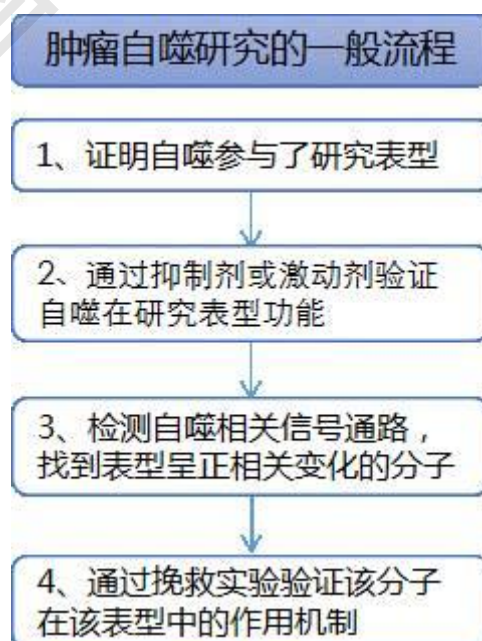
自噬 (autophagy) 是由 Ashford 和 Porter 在 1962 年发现细胞内有“自己吃自己”的现象后提出的，是指从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体 (autophagosome)，并与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解其所包裹的内容物，以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。

自噬有如下功能：

(1) 饥饿应答时的作用,在不同的器官如肝脏或在培养细胞中,氨基酸的匮乏会诱导细胞产生自体吞噬,由自体吞噬分解大分子,产生在分解代谢和合成代谢过程中所必须的中间代谢物。

(2) 在细胞正常活动中的作用,如在动物的变态发育、老化和分化过程中,自体吞噬负责降解正常的蛋白以重新组建细胞。尽管通常人们认为自体吞噬不具有选择性,但是在某些病理和压力条件下,通过自体吞噬能选择性地隔离某些细胞器,如线粒体、过氧化物酶体等。

(3) 在某些组织中的特定功能,如黑质的塞梅林神经节中,多巴胺能神经元中的神经黑色素合成就需要把细胞质中的多巴胺用 AV 包被隔离起来。



通过高内涵分析仪采用 GFP-LC3\* 融合蛋白来示踪自噬形成。

GFP-LC3\*单荧光指示体系：利用了 LC3 在自噬形成时聚集的原理，即无自噬时，GFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中；自噬形成时，GFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜。在荧光显微镜下形成多个明亮的绿色荧光斑点，一个斑点相当于一个自噬体，可以通过计数来评价自噬活性的高低。当自噬溶酶体形成后，其内部的酸性环境，可使 GFP 淬灭。因此 GFP 的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度。

还通过对高内涵分析仪活细胞检测功能深入开发，记录了天然分子促进溶酶体生成的过程<sup>[2,3]</sup>。

溶酶体，1955 年由比利时学者 Cristian de Duve 等人在鼠肝细胞中发现，是分解蛋白质、核酸、多糖等生物大分子的细胞器。溶酶体具单层膜，形状多种多样，是 0.025~0.8 微米的泡状结构，内含许多水解酶，溶酶体在细胞中的功能，是分解从外界进入到细胞内的物质，也可消化细胞自身的局部细胞质或细胞器，当细胞衰老时，其溶酶体破裂，释放出水解酶，消化整个细胞而使其死亡。

溶酶体是细胞内物质降解和信号转导的重要中心之一。溶酶体降解来源于细胞内、外的各种底物，如内吞膜蛋白及小分子物质、凋亡细胞、病原菌和自噬小体等。溶酶体的功能紊乱直接导致 70 多种溶酶体贮积病，且与神经退行性疾病密切相关。但是，在正常营养供给状态下，细胞如何应对内、外界信号而促进溶酶体的生成，是一个悬而未决的重要问题。

研究以活性天然小分子为探针，从化学生物学的角度探索溶酶体发生和稳态平衡的调控机制。由于许多细胞外信号（如生长因子、激素、趋化因子、神经递质、病原侵染等）可以与细胞膜上的受体（如 RTK、GPCR 和 TLR 等）结合，产生第二信使二酰甘油（DAG）而激活 PKC。因此 PKC 介导的溶酶体生成是细胞在响应外界信号时产生溶酶体适应（lysosomal adaptation）的一种重要调控机制，提示 PKC 的激活剂可能成为治疗溶酶体贮积病及神经退行性疾病的潜在药物。

#### 参考文献：

- [1] Yu Zhang, et al. Cytotoxic Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa* as Potent Autophagy Inhibitors by the Attenuation of Lysosomal Acidification. *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 1432–1439.
- [2] Yu Zhang, et al. Melocochines A and B, Two Alkaloids from the Fruits of *Melodinus*

cochinchinensis. *Org. Lett.* 2019, 21, 9272–9275.

- [3] Ning-Dong Zhao, et al. Identification of Ingol and Rhamnofolane Diterpenoids from *Euphorbia resinifera* and Their Abilities to Induce Lysosomal Biosynthesis. *J. Nat. Prod.* 2018, 81, 1209–1218.

中国仪器仪表表学会