

应用无标记高内涵成像分析技术检测乳酸对肿瘤细胞增殖与迁移的促进作用

古美美, 胡吉贤, 张金聚, 杨琼
(华南理工大学医学院, 广东 广州 510006)

摘要 目的:探究高内涵成像分析技术在无标记检测细胞增殖与迁移中的应用效果。方法:体外培养小鼠黑色素瘤B16-F10细胞,实验组分别添加2.5、5、10、15、30 mmol/L不同浓度的乳酸,对照组加入磷酸缓冲盐溶液(PBS),使用高内涵成像分析系统每15分钟拍摄1次、连续拍摄36 h,检测不同浓度的乳酸对B16-F10细胞的增殖与迁移的影响。结果:高内涵成像分析技术检测显示,不同浓度的乳酸处理后,实验组细胞增殖速度明显快于对照组,且添加15、30 mmol/L乳酸的实验组细胞密度明显高于其他各组。使用高内涵成像分析系统软件进行细胞计数显示,处理后12 h,15、30 mmol/L乳酸添加实验组细胞数较对照组显著增加;且随着培养时间延长,15、30 mmol/L乳酸添加实验组的细胞数均显著高于对照组(均 $P<0.05$)。高内涵成像分析系统软件统计各组处理后0~6 h细胞迁移距离,显示各实验组细胞平均迁移距离均显著高于对照组(均 $P<0.05$),其中5 mmol/L乳酸添加实验组的细胞平均迁移距离最大;各实验组中出现迁移行为的细胞比例均显著高于对照组,随着乳酸浓度增加,迁移行为细胞比例出现降低的趋势。结论:成功建立了应用高内涵成像分析技术快速、无标记、可靠且准确的定量评价细胞增殖和迁移的方法,实验操作较为简单,且能获取直观的图像及多样化的数据统计结果。

关键词 高内涵成像;无标记;细胞增殖;细胞迁移

中图分类号:R446.8 文献标识码:A 文章编号:2095-9664(2024)01-0001-06

A method for label-free detection of lactic acid in facilitating tumor cell proliferation and migration by high-content screening technology

GU Meimei, HU Jixian, ZHANG Jinju, YANG Qiong

(School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

Corresponding author: YANG Qiong, Email: yangq@scut.edu.cn

Abstract Objective: To evaluate the effect of high-content screening technology in label-free detection of cell proliferation and migration. **Methods:** Mouse melanoma B16-F10 cells were cultured *in vitro*. Different concentrations of lactic acid (2.5, 5, 10, 15, 30 mmol/L) were added to the experimental group, respectively, and PBS was added to the control group. High-content screening analysis system was used to take a shot once every 15 minutes for 36 h, and the effects of different concentrations of lactic acid on the proliferation and migration of B16-F10 cells were detected. **Results:** High-content screening analysis showed that the cell proliferation rate of the experimental group was significantly faster than that of the control group after treatment with different concentrations of lactic acid, and the cell density of the experimental group with 15 and 30 mmol/L lactic acid was apparently higher than that of the other groups. The high-content screening analysis system software was used to count the cells. The results showed that the number of cells in the experimental groups with 15 and 30 mmol/L lactic acid was significantly higher than that in the control group at 12 h after treatment; and with the prolongation of culture time, the number of cells in the experimental groups with 15 and 30 mmol/L lactic acid was significantly higher than that in the control group (all $P<0.05$). Another finding about the cell migration distance at 0~6 h after treatment demonstrated that, the average migration distance of cells in

each experimental group with lactic acid treatment was significantly larger than that in the control group (all $P < 0.05$), while that in the 5 mmol/L lactic acid group was the largest. The proportion of cells with migration behavior in each experimental group was significantly higher than that in the control group. With the increase of lactic acid concentration, the proportion of cells with migration behavior decreased. **Conclusion:** A rapid, label-free, reliable and accurate method for quantitative evaluation of cell proliferation and migration using high-content screening analysis technology was successfully established. The experimental operation is relatively simple, and intuitive images and diverse statistics can be obtained.

Key words high-content screening; label-free; cell proliferation; cell migration

高内涵成像 (high-content screening, HCS) 分析技术是将荧光显微成像技术与强大的图像分析方法进行结合的一种高通量、快速的检测方法, 该技术最早被用于药物筛选^[1]。随着显微成像技术以及分析技术的不断进展, HCS 越来越多地运用于细胞学研究中, 可以在保持细胞功能及形态结构完整的情况下, 通过多通道荧光成像获得细胞的增殖、迁移、分化、凋亡、细胞代谢途径及信号转导通路、细胞器等丰富的图像定量信息^[2-3], 有助于我们了解多种类型的细胞生理及病理改变。

20 世纪 20 年代 Warburg 发现肿瘤细胞偏向于将大量的葡萄糖代谢为乳酸而产生能量, 称为“Warburg 效应”。这一现象在多种肿瘤中均得到证实, 如直肠癌、肝癌和宫颈癌等^[4-6]。研究表明, 乳酸会通过影响肿瘤细胞的信号转导通路, 促进肿瘤细胞的存活、增殖, 增强其迁移、侵袭能力^[7]。乳酸能促进人恶性胶质母细胞瘤 U87MG 细胞和人头颈部肿瘤 SQ20B 细胞的运动、迁移, 从而提高肿瘤的生长和侵袭能力^[8-9], 此外乳酸还促进了宫颈肿瘤细胞的迁移活性^[10]。

有研究表明外源性添加乳酸, 可增强肝癌和头颈癌细胞的增殖和迁移能力^[8,11]。本研究用乳酸处理 B16-F10 细胞, 采用 HCS 技术检测和分析细胞的增殖与迁移改变, 探索使用 HCS 方法无标记、直观、高效检测细胞增殖与迁移的可行性, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞 (美国 ATCC), 1640 培养基 (美国 Gibco), 胎牛血清 (上海 ExCell Bio), 0.25% 胰酶 (美国 Gibco), 青霉素-链霉素双抗溶液 (美国 HyClone), L-乳酸 (上海阿拉丁)。细胞培养箱 (美国 Thermo), 超净工作台 (苏州苏净安泰)。Operetta CLS 高内涵细胞成像分析系统购自美国

PerkinElmer 公司。

1.2 细胞培养及处理

将 B16-F10 细胞置于 1640 完全培养基中复苏及培养, 培养至 70%~80% 融合时进行传代培养。待细胞贴壁生长至 60%~80% 融合时, 将细胞消化后重悬计数, 按细胞数 3×10^3 /孔将细胞接种于 96 孔板, 每孔接种 100 μ l。置于细胞培养箱中培养 24 h 后取出细胞, PBS 洗 3 次。将细胞分为 6 组, 每组设 3 个复孔, 分别向各实验组孔板内加入含 2.5、5、10、15、30 mmol/L 不同浓度乳酸的完全培养基, 对照组加入 PBS, 置于细胞培养箱中继续培养。

1.3 高内涵细胞成像分析

将上述处理好的 96 孔板转移到高内涵仪器内, 导入提前设定好系列参数信息, 进行高内涵细胞成像分析系统拍照。物镜选择 10 倍, 每孔选择 6 个视野成像, 设置每 15 分钟拍摄 1 次, 连续拍摄 36 h。拍摄结束后, 用仪器软件分析数据, 进行细胞计数以及细胞迁移分析。

1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析。细胞增殖采用 Two-way ANOVA 方法进行统计分析, 细胞迁移数据及迁移距离均采用 One-way ANOVA 方法进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

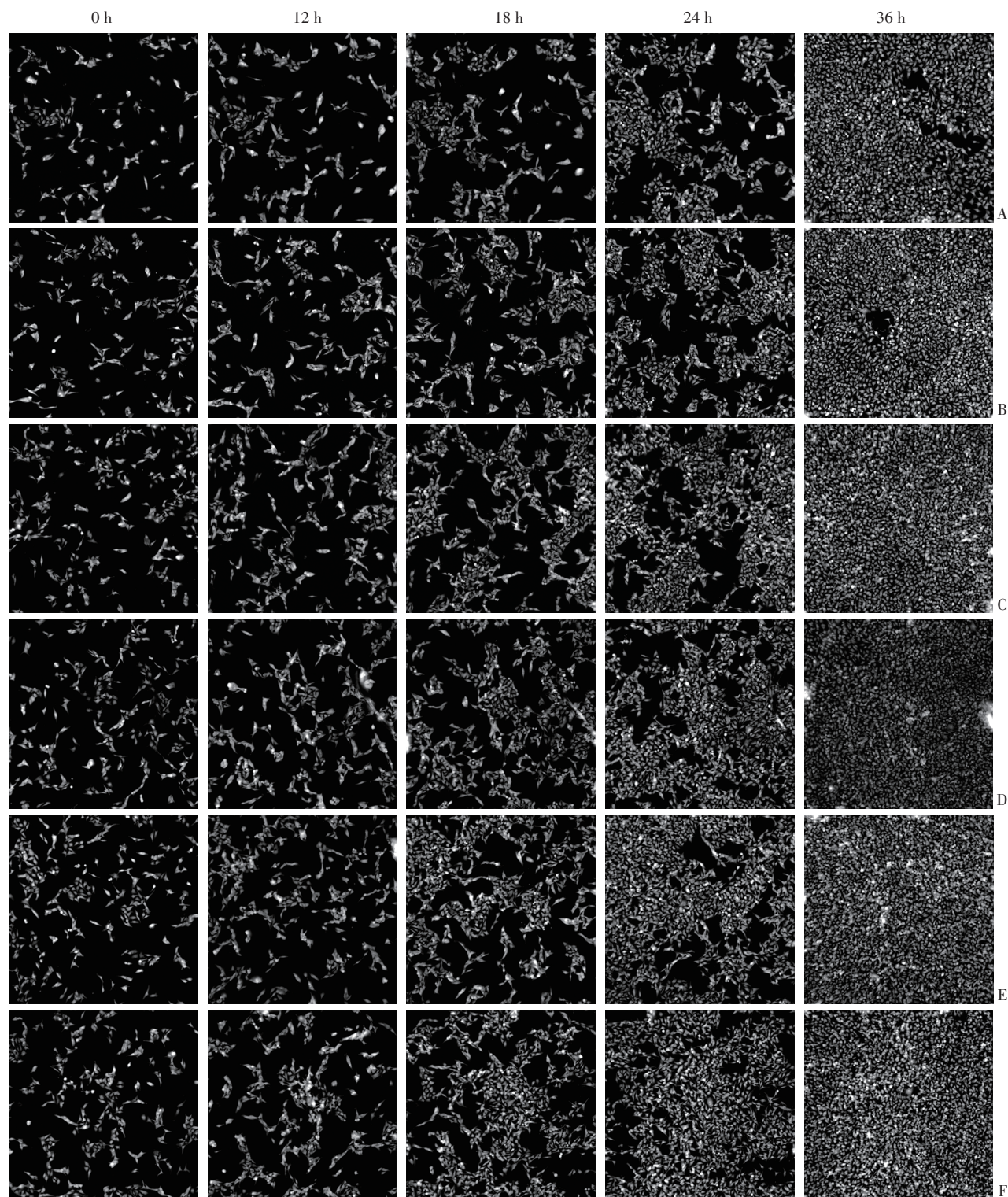
2 结果

2.1 不同浓度的乳酸对细胞增殖的影响

不同浓度的乳酸处理 B16-F10 细胞后, 细胞的增殖速度明显快于对照组, 且添加 15、30 mmol/L 乳酸的实验组细胞密度明显高于其他各组。随着乳酸浓度增加, 细胞增殖速度越快, 显示乳酸在一定程度上能够促进细胞增殖。见图 1。

2.2 B16-F10 细胞增殖计数

各实验组处理后 0、12、18、24 和 30 h, 通过高内

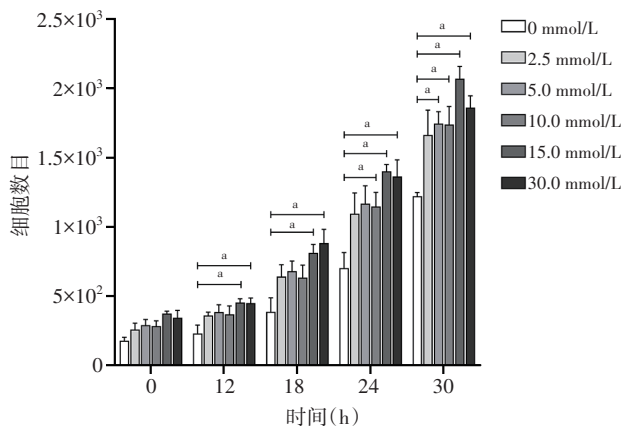


注:A为对照组(乳酸浓度0 mmol/L);B~F为实验组,乳酸浓度分别为2.5、5、10、15、30 mmol/L。

图1 不同时间、不同浓度乳酸处理对细胞增殖的影响($\times 100$)

涵成像分析软件分别进行细胞计数,结果显示处理后12 h,15、30 mmol/L乳酸添加实验组细胞数较对照组显著增加(均 $P < 0.05$);且随着培养时间延长,

15、30 mmol/L乳酸添加实验组的细胞数均高于对照组(均 $P < 0.05$),且细胞增殖与乳酸的浓度关联性较强。见图2。

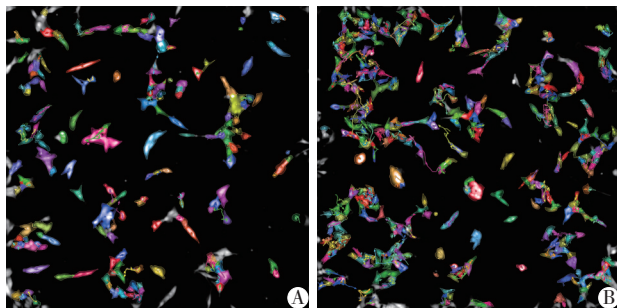


注:与对照组(乳酸浓度0 mmol/L)比较,* $P < 0.05$ 。

图2 不同浓度乳酸处理后不同时间细胞增殖检测

2.3 不同浓度的乳酸对细胞迁移的影响

通过高内涵软件追踪各组处理后0~6 h的细胞迁移轨迹,显示对照组细胞迁移的轨迹较短,而5 mmol/L 乳酸添加实验组细胞迁移的轨迹较长。见图3。



注:A为对照组(乳酸浓度0 mmol/L);B为5 mmol/L 乳酸添加实验组。使用高内涵成像分析系统软件对细胞迁移轨迹进行追踪,图中以线条及箭头还原细胞迁移轨迹。

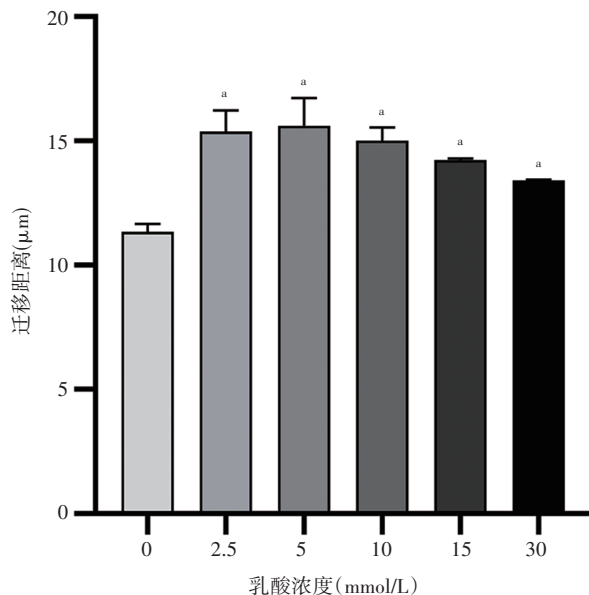
图3 乳酸对细胞迁移的影响

2.4 细胞平均迁移距离

通过高内涵软件对各组处理后0~6 h细胞平均迁移距离进行统计,各实验组的细胞平均迁移距离均显著高于对照组,其中5 mmol/L 乳酸添加实验组的细胞平均迁移距离最大;且随着乳酸添加浓度上升,细胞平均迁移距离出现先增加后逐渐降低的趋势。见图4。

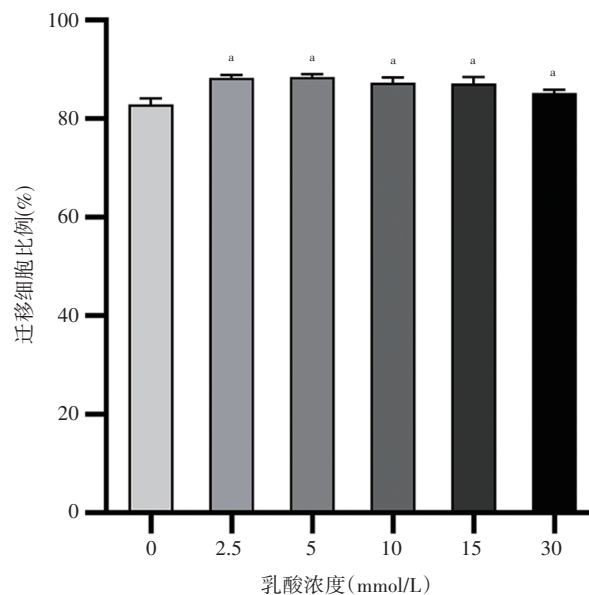
2.5 出现迁移行为的细胞比例

通过高内涵软件统计各组0~6 h有细胞行为的比例,显示各实验组中出现迁移行为的细胞比例均显著高于对照组,随着乳酸添加浓度增加,迁移行为细胞比例出现降低的趋势。见图5。



注:与对照组(乳酸浓度0 mmol/L)比较,* $P < 0.01$ 。

图4 不同浓度乳酸对细胞迁移距离的影响



注:与对照组(乳酸浓度0 mmol/L)比较,* $P < 0.05$ 。

图5 不同浓度乳酸对细胞迁移比例的影响

3 讨论

3.1 乳酸诱导肿瘤细胞增殖迁移

由于肿瘤细胞具有“Warburg 效应”的特性,肿瘤微环境表现为乳酸堆积和酸化,而大量研究表明乳酸与肿瘤细胞的增殖、迁移有着重要关系,已成为近年来肿瘤治疗的新靶点。有研究表明,乳酸可诱导黑色素瘤细胞中透明质酸合成,促进肿瘤细胞

的生长和迁移,从而获得侵略性表型^[12];乳酸通过调节肿瘤细胞内多种信号通路,如蛋白激酶B(AKT)/糖原合酶激酶3 β (GSK3 β)/ β -catenin通路^[13]、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT信号通路^[11],可明显促进肝癌细胞的增殖及转移。本研究通过体外培养小鼠黑色素瘤B16-F10细胞,添加不同浓度的乳酸来诱导B16-F10细胞的增殖与迁移,结合图像及数据统计结果,证明乳酸能促进B16-F10细胞增殖,且增殖诱导效果与乳酸浓度关联性较强;同时,检测细胞迁移的轨迹图像、迁移距离及迁移细胞比例,也证明乳酸促进B16-F10细胞的迁移能力,且乳酸添加浓度为5 mmol/L时,效果最显著。

3.2 HCS检测细胞增殖与迁移的可行性分析

传统探究细胞增殖的方式包括直接测定细胞数的方法与检测细胞活力间接反映细胞增殖情况^[14]。前者主要使用传统显微镜对细胞进行计数,当需检测的细胞孔板较多时,拍摄时间较长且误差较大;后者需使用试剂盒,价格较为昂贵,且细胞染色标记可能影响后续培养及下一步实验。以往的细胞迁移实验主要包括Transwell小室法、琼脂糖平板法这两种方法^[15]。综合来看,HCS分析技术能很好地弥补上述检测方法的不足,实现单一实验就能获得大量信息的目的。本实验显示,利用HCS可以实现高通量、快速成像以及后期系统自动对批量图像进行多样化、多参数的统计分析,同时对乳酸诱导B16-F10细胞的增殖和迁移情况进行检测分析,实验操作较为简单,且无需等待染色实验结束,培养细胞状态良好,能如常进行下一步实验,获得的实验结果包括直观的图像结果以及多样化的数据统计结果。

3.3 小结与展望

高内涵成像分析系统可以在保持细胞结构和功能完整的情况下,对细胞的增殖、迁移、凋亡、信号转导、亚细胞结构等进行实时、快速地分析检测^[16]。与传统方法相比,由于其具备便捷高速的特点,已经逐步发展为应用于药物筛选、细胞学、肿瘤学等领域的前沿技术^[17-18]。然而,HCS由于仪器购置价格昂贵,在对实验数据处理分析时,各参数选项和分析方法的种类复杂多样,暂时无统一标准,因此在使用上也有一定的局限性。

综上所述,本研究通过添加乳酸作为促进剂研究了HCS用于检测细胞增殖与迁移的效果,结果表明高内涵成像分析系统可作为一种无标记检测细胞

增殖与迁移的可靠方法,且具有操作便捷、可对实验结果和图像进行多样化、多参数统计分析等优点,在细胞增殖与迁移的检测中具有较好的实用性。

参考文献

- [1] Thomsen W, Frazer J, Unett D. Functional assays for screening GPCR targets[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(6): 655-665.
- [2] Persson M, Hornberg JJ. Advances in predictive toxicology for discovery safety through high content screening[J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(12): 1998-2007.
- [3] Gasparri F, Sola F, Bandiera T, et al. High - content analysis of kinase activity in cells[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(7): 523-536.
- [4] Prakasam G, Iqbal MA, Bamezai R, et al. Posttranslational modifications of pyruvate kinase M2: tweaks that benefit cancer[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 22.
- [5] 吴沙沙,李文燕. 辛伐他汀通过抑制 Warburg 效应改善索拉非尼耐药的肝癌细胞转移侵袭的作用机制[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(22): 2796-2801.
- [6] 刘玉琼. 青蒿素通过抑制 SIRT2 调节宫颈癌细胞 Warburg 效应[J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(9): 1111-1117, 1129.
- [7] Mashreghi M, Azarpara H, Bazaz MR, et al. Angiogenesis biomarkers and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2949-2965.
- [8] Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, et al. Lactate promotes glioma migration by TGF - β 2 - dependent regulation of matrix metalloproteinase - 2 [J]. *Neuro Oncol*, 2009, 11(4): 368-380.
- [9] Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, et al. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(2): 453-463.
- [10] Li C, Jia L, Yu Y, et al. Lactic acid induced microRNA-744 enhances motility of SiHa cervical cancer cells through targeting ARHGAP5 [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 298: 86-95.
- [11] Rudrabhatla SR, Mahaffey CL, Mummert ME. Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect[J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(6): 1378-1387.
- [12] Ye Z, Zeng Z, Shen Y, et al. ODC1 promotes proliferation and mobility via the AKT/GSK3 β / β -catenin pathway and

- modulation of acidotic microenvironment in human hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4081-4092.
- [13] 彭明兵, 郑志菊, 曾智锐, 等. 中性乳酸通过 PI3K/Akt 信号通路促进肝癌细胞增殖、迁移及侵袭[J]. *肿瘤*, 2020, 40(1): 9-19.
- [14] 石淙, 万腊根. 细胞增殖的检测方法[J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(2): 153-155, 168.
- [15] 蔡绍哲, 黎昌莉. 微流控与细胞迁移技术的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 72-75.
- [16] 赵金伴, 喻希. 化学技术的前沿——高内涵筛选技术的研究及应用[J]. *化工技术与开发*, 2008, 37(8): 19-22.
- [17] Giuliano KA, Haskins JR, Taylor DL. Advances in high content screening for drug discovery[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2003, 1(4): 565-577.
- [18] Dunlay RT, Czekalski WJ, Collins MA. Overview of informatics for high content screening[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 356: 269-280.
- (收稿日期: 2023-09-25)
(本文编辑: 孙勇)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于论文写作中的作者署名与志谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣地执行著作权法。为此将本刊对作者署名和志谢的有关要求重申如下。

1 作者署名的意义和应具备的条件

1.1 署名的意义

(1) 标明论文的责任人,文责自负。(2) 医学论文是医学科技成果的总结和记录;是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶;也是作者对医学事业做出的贡献,并以此获得社会的尊重和承认的客观指标;是应得的荣誉;也是论文版权归作者的一个声明。(3) 作者署名便于编辑、读者与作者联系,沟通信息,互相探讨,共同提高。作者姓名在文题下按序排列,排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再做更改;作者单位名称及邮政编码脚注于同页左下方。

1.2 作者应具备下列条件

(1) 参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者。(2) 起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者。(3) 能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。其他对该研究有贡献者应列入志谢部分。对文章中的各主要结论,均必须至少有1位作者负责。在每篇文章的作者中需要确定1位能对该论文全面负责的通讯作者。通讯作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第1作者为通讯作者。论文首页脚注通讯作者姓名及Email地址。作者中如有外籍作者,应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。集体署名的论文于文题下列署名单位,于文末列整理者姓名,并于论文首页脚注通讯作者姓名及Email地址。集体署名的文章必须将对该文负责的关键人物列为通讯作者。通讯作者只列1位,由投稿者决定。

2 志谢

在文后志谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予志谢。但必须征得被志谢人的书面同意。志谢应避免以下倾向:(1) 对确实给予了帮助的单位或个人,甚至用了他人的方法、思路、资料,为了抢先发表,而不公开志谢和说明。(2) 出于某种考虑,将应被志谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被志谢者的权利和义务。(3) 以名人、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在被志谢中。被志谢者包括:(1) 对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2) 协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3) 协助诊断和提出重要建议的人。(4) 给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5) 做出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,阐明其支援的性质。(6) 其他需志谢者。