C J

在线投稿: http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx

世界华人消化杂志 2017年4月8日; 25(10): 881-890 ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

DOI: 10.11569/wcjd.v25.i10.881

基础研究 BASIC RESEARCH

实时动态活细胞成像系统在单克隆筛选和克隆形成能力 检测中的应用

刘长政, 焦晓磊, 高敦芹, 邢龙彬, 刘 辉, 骆 莹, 高英堂

刘长政,高敦芹,邢龙彬,天津医科大学三中心临床学院 天津市 300170

焦晓磊,刘辉,骆莹,高英堂,卫生部人工细胞工程技术研 究中心天津市人工细胞重点实验室天津市肝胆疾病研究所 天津市第三中心医院天津市 300170

刘长政,在读硕士,主要从事肝癌原代肿瘤细胞培养及细胞异 质性方面的研究.

基金项目: 天津市卫计委重点攻关基金资助项目, Nos. 15KG113, 16KG150; 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年基金资 助项目, No. 15JCQNJC115000.

作者贡献分布:刘长政与高英堂对此文所作贡献均等;此课题 由高英堂设计;研究过程由刘长政、焦晓磊、高敦芹及邢龙 彬操作完成;研究所用试剂及分析工具由高英堂提供;数据分 析由刘长政、刘辉及骆莹完成;本论文写作由刘长政与高英 堂完成.

通讯作者: 高英堂, 研究员, 300170, 天津市河东区津塘路83 号, 卫生部人工细胞工程技术研究中心, 天津市人工细胞重点 实验室, 天津市肝胆疾病研究所, 天津市第三中心医院. gaoyt816@163.com 电话: 022-84112148

收稿日期: 2017-01-15 修回日期: 2017-02-15 接受日期: 2017-02-27 在线出版日期: 2017-04-08

Real-time live-cell analysis system for screening single tumor cell clones and analyzing their colony-forming ability

Chang-Zheng Liu, Xiao-Lei Jiao, Dun-Qin Gao, Long-Bin Xing, Hui Liu, Ying Luo, Ying-Tang Gao

Chang-Zheng Liu, Dun-Qin Gao, Long-Bin Xing, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China Xiao-Lei Jiao, Hui Liu, Ying Luo, Ying-Tang Gao, Artificial Cell Engineering Technology Research Center of Public Health Ministry; Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell; Tianjin Institute of Hepatobiliary Disease; Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China

Supported by: Key Research Project of Tianjin Healthy Bureau, Nos. 15KG113 and 16KG150; Tianjin Research Project on Basic Sciences and Frontier Technology, No. 15JCQNJC115000.

Correspondence to: Ying-Tang Gao, Researcher, Artificial Cell Engineering Technology Research Center of Public Health Ministry; Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell; Tianjin Institute of Hepatobiliary Disease; Third Central Hospital of Tianjin, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China gaoyt816@163.com

China. gaoyt816@163.com Received: 2017-01-15 Revised: 2017-02-15 Accepted: 2017-02-27

Published online: 2017-04-08

Abstract

To screen single tumor cell clones and evaluating their colony-forming ability by IncuCyte ZOOM.

METHODS

Primary tumor cells were isolated by differential digestion and differential adherence method. On the basis of limited dilution, dynamic real-time tracking technology and full aperture imaging technology were used to track single cell clones and evaluate their colony-formation ability.

RESULTS

Six lines of primary tumor cells (TJ3ZX-02

□局行業
局行
局
行
第
第
招任
大院
院
医
病
任
大院
大
大
点
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
近
大
大
近
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大
大



to 07) were isolated from 30 tumor tissues, and 89 persistently proliferative tumor cell clones were screened from five primary tumor cell lines (TJ3ZX-03 to 07), of which 67 were expanded and cryopreserved. Eighteen monoclonal cell lines were excluded due to the lack of expansion ability, and 28 polyclonal cell lines were excluded because of consisting of two or more cell types as revealed by the Sequence Diagram. The analysis of cloneforming ability of two monoclonal cell strains (TJ3ZX-06-B11, TJ3ZX-07-H11) showed that the clone-forming rates for the plate method (35.17%, 13.17%) were significantly higher than those for IncuCyte ZOOM (23.13%, 5.51%) at 14 d (P < 0.05), although there was no significant difference at 21 d (35.63% and 13.22% for IncuCyte ZOOM).

CONCLUSION

IncuCyte ZOOM is simple, accurate and time-saving for screening single clones and measuring their colony-forming ability.

© **The Author(s) 2017.** Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Primary tumor cells; Monoclonal cell; Colony forming efficiency

Liu CZ, Jiao XL, Gao DQ, Xing LB, Liu H, Luo Y, Gao YT. Real-time live-cell analysis system for screening single tumor cell clones and analyzing their colony-forming ability. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2017; 25(10): 881-890 URL: http://www.wjgnet. com/1009-3079/full/v25/i10/881.htm DOI: http:// dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i10.881

摘要

目的

利用IncuCyte ZOOM系统筛选肿瘤细胞单克 隆和克隆形成能力检测.

方法

采用差速消化与差速贴壁分离培养原代肿 瘤细胞;在有限稀释法基础上,采用IncuCyte ZOOM系统的实时动态追踪和全孔成像技 术对肿瘤细胞进行单克隆筛选及克隆形成 能力分析.

结果

从30例肿瘤组织中培养6株原代肿瘤细胞 (TJ3ZX-02至07),进一步从5株原代肿瘤细 胞(TJ3ZX-03至07)中成功筛选出89个持续 增殖的单克隆,其中67个克隆扩增培养并 冻存;并且通过时序图准确有效地排除了 18个不能持续增殖的单克隆和28个由2个 及以上细胞组成的多克隆.2例单克隆株 (TJ3ZX-06-B11, TJ3ZX-07-H11)克隆形成能 力分析表明,14 d时平皿方法的克隆形成率 (35.17%,13.17%)高于IncuCyte ZOOM 96孔 全孔成像(23.13%,5.51%),且差异有统计学 意义(P<0.05);延长至21 d时全孔成像的克隆 形成率为(35.63%,13.22%),与平皿方法比较 无统计学差异.

结论

IncuCyte ZOOM系统能够简便、准确、省时 省力地实现单克隆细胞筛选和克隆形成率 检测.

© **The Author(s) 2017.** Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 原代肿瘤细胞; 单克隆细胞; 克隆形成率

核心提要:利用IncuCyte ZOOM系统进行原代 肿瘤细胞的单克隆筛选和克隆形成力检测,该 方法使克隆筛选更加简便、准确,时序性图像 可判断细胞团来源等诸多优点,为更好的研究 肿瘤细胞异质性等生物学特性提供强有力的技 术手段.

刘长政, 焦晓磊, 高敦芹, 邢龙彬, 刘辉, 骆莹, 高英堂. 实时动态 活细胞成像系统在单克隆筛选和克隆形成能力检测中的应用. 世界华人消化杂志 2017; 25(10): 881-890 URL: http:// www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i10/881.htm DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i10.881

0 引言

肿瘤异质性是恶性肿瘤的重要特征之一,目前 多数研究者认为肿瘤异质性和肿瘤干细胞的 起源与分化密切相关^[1],其分子机制和临床应 用潜能已成为近年来研究者所关注的热点^[2-4]. 因此,获取并分析大量单个癌细胞及其衍生的 单克隆细胞群的生物学特征将是研究肿瘤异 质性亟待解决的问题.

目前,常规的细胞检测方法多为终点法,即仅仅给出最终结果,并且往往需要标记、固定或破碎细胞^[5-7];该方法明显的缺点就是无法对细胞的生长过程做出全程的动态监测和分析^[8.9].因此,越来越多具有多种功能、实时观测细胞生长状态的活细胞成像系统用于细胞学检测,其中美国Essen公司开发的第二代

长时间实时动态活细胞成像分析仪(IncuCyte ZOOM)具有高通量(可同时实时监测6块细胞 培养板/皿/瓶)、与各型号培养箱兼容可实现长 达数月的监测、4倍物镜下对6至384孔培养板 均可进行全孔成像以及强大的分析软件等优 点,可实现单克隆筛选、监测报告基因^[10]、细 胞增殖、迁移与侵袭^[11]、细胞调亡^[12]、免疫 细胞杀伤^[13]、细胞质控、细胞毒性、监测干 细胞生长及重编程、三维肿瘤球体成像等十 余种细胞检测方法^[14-16].基于该系统的优越性, 我们在有限稀释法的基础上进行了原代肿瘤 细胞的单克隆筛选和克隆形成率的检测研究.

1 材料和方法

1.1 材料 收集在天津市第三中心医院肝胆外科 治疗的肝癌患者30例, 取其癌组织培养原代肿 瘤细胞, 所有标本取材均通过天津市第三中心 医院伦理委员会审核, 家属知情同意并签字. 实验所需的仪器与试剂主要有:第二代长时间 实时动态活细胞成像分析仪(IncuCyte ZOOM) 购自美国Essen Bioscience公司;荧光倒置显微 镜(Olympus, Ix71)购自日本Olympus公司;冷 冻离心机(3-18K)购自德国Sigma公司;细胞培 养箱购自美国Thermo公司; DMEM/F12培养 液、肝裂解液、100X抗菌-抗真菌剂、Falcon 细胞筛网(40 μm)、0.25%胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)均购于美国Life公司;红细胞裂解液购 于天津市灏洋生物制品科技有限公司; 胎牛血 清购于以色列Biological Industries公司.

1.2 方法

1.2.1 **原代肿瘤细胞的分离与培养**: 生理盐水 充分清洗肿瘤组织, 将肝裂解液用注射器点状 注射、消化组织5 min, 充分剪碎并吹打, 将细 胞悬液过40 μm滤网, 1000 r/min离心5 min弃 上清; 加入5 mL溶血素37 ℃静置5 min去除红 细胞, 1000 r/min离心5 min弃上清收获细胞; 细胞接种于25 cm²培养瓶中, 加入DMEM/F-12 培养液: 含5%胎牛血清、1X抗菌-抗真菌剂, 置于37 ℃、50 mL/L CO₂培养箱中培养^[17]. 待 细胞贴壁后, 依据细胞生长状况进行半量或全 量换液.

1.2.2 差速消化与差速贴壁:根据肿瘤细胞和成 纤维细胞等基质细胞对胰蛋白酶的敏感性不 同及贴壁的速度差异,采取消化、终止、再消 化、终止,分别收集细胞离心,加DMEM/F-12 培养液重悬细胞,分别加入2个六孔板的A孔中 贴壁15-30 min,轻轻晃动培养板将上清液(含 未贴壁的悬浮细胞)轻轻吸出转入B孔,B孔悬 浮细胞贴壁15-30 min后,再重复上一步骤将未 贴壁的悬浮细胞转入C孔,根据细胞数量和贴 壁情况可重复多次,尽可能纯化癌细胞.

1.2.3 利用IncuCyte ZOOM筛选单克隆细胞: 取 对数生长期细胞消化、离心,血球计数板计 数,将细胞梯度稀释至1×10²个/10 mL,充分悬 浮,100 μL/孔(理论值1个细胞)铺于96孔板中; 将铺好细胞的96孔板置于培养箱中的IncuCyte ZOOM内,选取4×相差物镜,设置全孔拍摄,每 隔4 h循环拍摄模式,利用系统自带分析软件 (IncuCyteZOOM 2015)对只有一个细胞的孔添 加电子标记,实时追踪肿瘤克隆细胞的生长状 况,根据克隆的生长状态消化克隆并扩大培养 及冻存.

1.2.4 克隆形成能力检测:挑选2例患者的单克隆 株,取对数生长期细胞梯度稀释至1×10³个/mL. (1)IncuCyte ZOOM克隆形成能力检测:取500 μL 细胞稀释液加D-MEM/F-12培养液稀释至10 mL, 充分悬浮,每孔加100 μL(理论值5个细胞)铺于 96孔板中;再将96孔板置于IncuCyte ZOOM内, 设置方法同上,14 d后终止拍摄.分析图片,统 计克隆形成率,其中以≥50个细胞的克隆为阳 性克隆,克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数× 100%;(2)平皿克隆形成能力检测:取200 μL细 胞稀释液接种于6 cm培养皿补加DMEM/F-12 培养液至3 mL;14 d后,HE染色计算克隆数和 克隆形成率,各使用3个平皿.

统计学处理 采用SPSS20.0软件分析数据, χ²检验, *P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 **原代肿瘤细胞培养** 从每例癌组织中分 离的细胞经过2-6 mo的差速消化与差速贴 壁培养, 共培养出6株原代肿瘤细胞, 分别 命名为TJ3ZX-02至07. 细胞形态如图1所示: TJ3ZX-02、03、04为上皮样细胞, 呈现多边 形、铺路石状, 且细胞集落生长, 细胞间接 触紧密; TJ3ZX-05、06形态相似, 细胞个体 较小, 呈梭形、三角形、多角形等多种形态; TJ3ZX-07细胞形体细长, 细胞之间间隙大. 2.2 IncuCyte ZOOM单细胞克隆筛选 IncuCyte ZOOM筛选单克隆的最大优势是能够全孔、

刘长政,等.实时动态活细胞成像系统在单克隆筛选和克隆形成能力检测中的应用

□
□
○
約新選点
实验采用IncuCyte
ZOOM进行单路
成力法和方法全式
成次合用
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)
(1)



图 1 原代肿瘤细胞形态观察. A - C: TJ3ZX - 02; D - F: TJ3ZX - 03; G - I: TJ3ZX - 04; J - L: TJ3ZX - 05; M - O: TJ3ZX - 06; P - R: TJ3ZX - 07.

全程的动态实时成像观察,即用时序性图 胞.如图2所示,通过时间轴回溯追踪发现像可以非常准确地判定克隆来源于单个细 TJ3ZX-06细胞12 h能贴壁,24 h开始分裂,3 d



图 2 原代肿瘤细胞株(TJ3ZX-06)筛选单克隆的时序性图 像. 该时序性图像包含0、3、7、21 d 4个时间点, 红色电子标记A表示单克隆起点位置.



图 3 原代肿瘤细胞株(TJ3ZX-07)筛选单克隆的时序性图 像. 该时序性图像包含0、3、7、13 d 4个时间点, 红色电 子标记A表示单克隆起点位置.



图 4 时序性图像判定假单克隆来源于4个细胞.4个红色 电子标记表示4个克隆细胞起始位置.

克隆逐渐变大,7 d后能明显观察到克隆团, 细胞排列紧密、呈集落生长,21 d左右重叠 生长.TJ3ZX-07(图3)细胞形体细长,个体较 TJ3ZX-06大,运动能力强,细胞间隙大,细胞分 散,克隆团呈松散状,和TJ3ZX-06相比同等面 积下细胞数目少. 另外, 通过该系统可准确鉴 别出假单克隆, 如图4所示, 在培养13 d时貌似 是1个单克隆, 但通过时间轴回溯追踪发现实 际上是由4个细胞组成的多克隆.

在6株原代肿瘤细胞中, TJ3ZX-02由于单 个细胞难以贴壁重复3次均未获得单细胞克隆, 其余5株成功获得单细胞克隆,并通过时间轴 回溯追踪分析准确排除了由2个及以上相邻细 胞增殖形成的假单克隆.5株原代肿瘤细胞单 克隆筛选结果如表1所示,通过实时追踪发现 一部分单个细胞(89个)能形成持续增殖的克隆 团并能扩大培养,进一步通过2-3次传代排除 可能的细菌或支原体污染、挑选细胞生长状 态良好的67个单克隆株进行冻存;另一部分单 个细胞(18个)形成的克隆不能持续增殖,细胞 在增殖2-4 wk后出现停滞,细胞出现衰老或凋 亡;此外,还有28个由2个及以上细胞组成的多 克隆.

2.3 克隆形成能力分析

2.3.1 IncuCyte ZOOM克隆形成能力分析: 采集 的全孔成像图(图5, 6), 通过时间轴回溯追踪发 现: TJ3ZX-06-B11单克隆株在96孔板上总计形 成237个单克隆, 以培养14 d时计算, 其中细胞 数≥50个细胞的克隆数为111个, 即克隆形成 率为23.13%(111/96×5), 另有细胞数<50的克隆 126个; TJ3ZX-07-H11单克隆株在96孔板上总 计形成103个克隆, 其中8个为多克隆(起始细 胞2至5个, 合计26个细胞), 由于其培养2 wk时 难以准确计数予以排除, 细胞数≥50个细胞的 克隆数为25个, 即克隆形成率为5.51%[25/(96× 5-26)], 另有细胞数<50的克隆70个.

2.3.2 传统的平皿克隆形成能力分析: 克隆培 养14 d时,对TJ3ZX-06-B11和TJ3ZX-07-H11 2个单克隆株HE染色(图7),统计克隆数.对于 TJ3ZX-06-B11单克隆株,3个平皿合计细胞数 ≥50个细胞的克隆数为211个,即克隆形成率为 35.17%(211/600),另有细胞数<50的克隆38个; 对于TJ3ZX-07-H11单克隆株,3个平皿合计细 胞数≥50个细胞的克隆79个,即克隆形成率为 13.17%(79/600),另有细胞数<50的克隆14个.

2.3.3 两种方法对克隆形成能力检测的比 较: 14 d时传统方法的克隆形成率比IncuCyte ZOOM 96孔全孔成像的克隆形成率高, 且差 异有统计学意义(TJ3ZX-06-B11: χ^2 = 18.478, P = 0.000017; TJ3ZX-07-H11: $\chi^2 = 19.408$, 重要价值.

刘长政,等.实时动态活细胞成像系统在单克隆筛选和克隆形成能力检测中的应用

□名祠辭释 克隆形成率:指 细胞被制成分散 的悬液,以低密 度接种后,单个 细胞水晶、单个 新成细胞小群(克 隆)的比率.

表 1 6株原代肿瘤细胞单克隆筛选结果

细胞编号	培养时间(d)	持续增殖的克隆数	不能持续增殖的克隆数	多克隆的孔数
TJ3ZX-02	15	0	0	0
TJ3ZX-03	35	7	4	1
TJ3ZX-04	22	24	9	4
TJ3ZX-05	14	29	1	3
TJ3ZX-06	40	15	0	15
TJ3ZX - 07	38	14	4	5



图 5 IncuCyte ZOOM全孔成像图统计TJ3ZX-06-B11克隆数. A - D: 0 d时4个孔的细胞位置; E - H: 14 d时4个孔的克隆情况. 红色标签表示≥50个细胞的克隆, 绿色标签表示<50个细胞的克隆.

155

Raishider



图 6 IncuCyte ZOOM全孔成像图统计TJ3ZX-07-H11克隆数. A - D: 0 d时4个孔的细胞位置; E - H: 14 d时4个孔的克隆情况. 红色标签表示≥50个细胞的克隆, 绿色标签表示<50个细胞的克隆.

P = 0.00011). 考虑到利用IncuCyte ZOOM 96 孔全孔成像分析克隆形成能力尚处于探索阶 段,并且每个单孔中初始仅有平均5个细胞,远 少于传统方法的200个细胞在一个平皿内,由 此造成的细胞之间旁分泌作用等微环境并不 相同. 同时, IncuCyte ZOOM可以持续动态观 察细胞,因此,我们进一步分析21 d时全孔成 像的结果,发现TJ3ZX-06-B11增加了细胞数 ≥50个的克隆数60个,TJ3ZX-07-H11增加了 细胞数≥50个的克隆数35个, 重新计算二者的 克隆形成率分别为35.63%[(111+60)/96×5]、 13.22%[(25+35)/(96×5-26)], 分析二者无统计 学差异(TJ3ZX-06-B11: χ² = 0.25, *P* = 0.876; TJ3ZX-07-H11: χ² = 0.106, *P* = 0.745).

3 讨论

随着肿瘤异质性研究受到越来越多的重视,急 需一种准确的单克隆细胞筛选方法研究肿瘤异

// (

Raishida



图 7 平皿HE染色统计单克隆株克隆数. A: TJ3ZX-06-B11; B: TJ3ZX-07-H11.

质性等生物学特性.常用的单细胞克隆技术[18-20] 需要研究人员在显微镜下对96孔的每个孔及 其孔内每个区域进行仔细观察、标记含单个 细胞的孔,其缺点是耗时费力、反复从培养箱 中取出观察易污染、由于细胞形态和人为因 素等原因难以保证单克隆筛选的准确性[21-23]. 细胞成像技术的发展为单克隆的筛选提供了 新的思路^[24,25], IncuCyte ZOOM可以在有限稀释 法基础上实现自动化的单克隆筛选,通过对96 孔板设置全孔、循环拍摄的模式来筛选单克 隆细胞, 克隆筛选的整个过程除培养板补液外, 细胞无需离开培养箱,始终处于一个最适生长 环境,通过连续显微拍照,对培养克隆进行动态 监测,并可远程控制、数据读取与分析;通过 在时间轴回溯中判断细胞团是否来源于一个 细胞,并可以在图像、孔板上标记单克隆位置, 便于挑选,其优点显而易见.

利用IncuCyte ZOOM在5株原代肿瘤细胞 中成功获得89个单细胞克隆,并挑选细胞生长 状态良好的67个单克隆进行冻存,为进一步研 究单克隆细胞群的生物学特征和肿瘤细胞异 质性奠定了较好的基础.在筛选单克隆细胞时 我们发现像TJ3ZX-07运动能力强的细胞呈不 定向分散生长,与TJ3ZX-02至06细胞聚集成 团呈集落式生长的方式明显不同,像这种运动 能力强的细胞在培养过程中可能会使相邻的 克隆相互渗透生长到一起,传统的人工方法由 于是通过肉眼来观察会误认为是一个克隆团 (图4),从而使筛选结果不准确且难以发现.但 是利用IncuCyte ZOOM可以整理分析整个过 程拍摄的照片,并在每个克隆上加上电子标 签,可视化标签存在于整个拍摄过程中所设定 的任意时间点上、使监测克隆更加简便、准 确、随时记录克隆生长状况,通过时序性图像 判断细胞团是否来源于一个细胞,同时我们也 可以利用标记工具(Marker Tool)在培养器皿上 有克隆的位置做上物理标记,便于筛选结束时 能够对多克隆的孔准确的判断挑选单克隆细 胞,并对克隆进行扩大培养,提高克隆筛选结 果的准确性.

另一部分单个细胞(18个)不能持续增殖, 细胞在增殖2-4 wk后出现停滞,细胞出现衰老 或凋亡.我们推测有两种可能:(1)这些细胞可 能不是癌细胞,从瘤组织经差速消化与差速贴 壁获取的原代肿瘤细胞中依旧含有少量成纤 维细胞等间质细胞;(2)肿瘤干细胞理论能够解 释这种现象,原代肿瘤细胞中只有少部分的细 胞具有干细胞特性,即并非每个肿瘤细胞都具 有无限增殖能力,只有肿瘤干细胞能够无限制 地生长、在体外克隆形成实验中可以形成克 隆并在体内成瘤^[26-28].

克隆形成率是反映细胞群体依赖性和增 殖能力两个性状的重要指标^[29].本文首次利 用IncuCvte ZOOM全孔成像技术分析克隆形 成能力,与传统的平皿方法比较,其优点在于 自动化程度高、省时省力、实时动态追踪排 除假单克隆;但也发现一个问题,在培养条件 相同(相同材质的培养板、培养液、同一培养 箱和同一人同时操作)的情况下, 按经典平皿 克隆形成实验的要求细胞培养时间为2 wk时, IncuCvte ZOOM 96孔全孔成像的克隆形成率 明显低于传统方法,再延长培养一周时两种方 法的克隆形成率趋于一致,分析原因可能与细 胞之间旁分泌作用密切相关,由于96孔全孔成 像分析每个单孔中初始仅有平均5个细胞,而 传统方法是200个细胞同在一个平皿内,因此, 二者在旁分泌作用上可能是明显不同的.考虑 到利用克隆形成能力尚处于探索阶段,如何更 合理地利用96孔全孔成像技术分析克隆形成 率需要更多细胞系的重复实验验证.

总之,在有限稀释法基础上,我们成功地 利用IncuCyte ZOOM系统进行了原代肿瘤细 胞的单克隆筛选和克隆形成率检测,该方法能 对克隆实时监测,远程控制、使克隆筛选更加 方便、准确、省时省力,并能导出筛选克隆时 视频作为证据等诸多优点,为更好的研究肿瘤 细胞生物学特性和细胞异质性提供了强有力 的技术手段,对以个性化治疗为目标的精准医 学模式具有重要价值.

4 参考文献

- Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa JJ, Stassi G, Huntly B, Herrmann H, Soulier J, Roesch A, Schuurhuis GJ, Wöhrer S, Arock M, Zuber J, Cerny-Reiterer S, Johnsen HE, Andreeff M, Eaves C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 767-775 [PMID: 23051844 DOI: 10.1038/nrc3368]
- 2 Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 2012; 366: 883-892 [PMID: 22397650 DOI: 10.1056/NEJMoa1113205]
- Logothetis CJ. Re: intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *Eur Urol* 2013; 64: 170 [PMID: 23746321 DOI: 10.1016/j.eururo.2013.04.025]
- 4 Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013; 501: 355-364 [PMID: 24048068 DOI: 10.1038/ nature12627]
- Carroll S, Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1821-1829 [PMID: 15500410 DOI: 10.1517/14712598.4.11.182 1]
- 6 Powell KT, Weaver JC. Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population. *Biotechnology* (NY) 1990; 8: 333-337 [PMID: 1366534 DOI: 10.1038/nbt0490-333]
- 7 Alvin K, Ye J. Generation of cell lines for monoclonal antibody production. *Methods Mol Biol* 2014; 1131: 263-271 [PMID: 24515472 DOI: 10.1007/978-1-62703-992-5_17]
- 8 Manz R, Assenmacher M, Pflüger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1921-1925 [PMID: 7892200 DOI: 10.1073/ pnas.92.6.1921]
- 9 Holmes P, Al-Rubeai M. Improved cell line development by a high throughput affinity

capture surface display technique to select for high secretors. *J Immunol Methods* 1999; 230: 141-147 [PMID: 10594361 DOI: 10.1016/ S0022-1759(99)00181-7]

- 10 Dukic AR, McClymont DW, Taskén K. A Cell-Based High-Throughput Assay for Gap Junction Communication Suitable for Assessing Connexin 43-Ezrin Interaction Disruptors Using IncuCyte ZOOM. J Biomol Screen 2016 Sep 14. [Epub ahead of print] [PMID: 27628689 DOI: 10.1177/108705711666912]
 - Johnston ST, Shah ET, Chopin LK, Sean McElwain DL, Simpson MJ. Estimating cell diffusivity and cell proliferation rate by interpreting IncuCyte ZOOM[™] assay data using the Fisher-Kolmogorov model. *BMC Syst Biol* 2015; 9: 38 [PMID: 26188761 DOI: 10.1186/s12918-015-0182-y]

11

12

13

14

15

16

17

18

20

21

- Artymovich K, Appledorn DM. A multiplexed method for kinetic measurements of apoptosis and proliferation using live-content imaging. *Methods Mol Biol* 2015; 1219: 35-42 [PMID: 25308260 DOI: 10.1007/978-1-4939-1661-0_4]
- Kapellos TS, Taylor L, Lee H, Cowley SA, James WS, Iqbal AJ, Greaves DR. A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochem Pharmacol* 2016; 116: 107-119 [PMID: 27475716 DOI: 10.1016/j.bcp.2016.07.011]
- Stewart H, Bartlett C, Ross-Thriepland D, Shaw J, Griffin S, Harris M. A novel method for the measurement of hepatitis C virus infectious titres using the IncuCyte ZOOM and its application to antiviral screening. *J Virol Methods* 2015; 218: 59-65 [PMID: 25796989 DOI: 10.1016/ j.jviromet.2015.03.009]
- Widmeier E, Tan W, Airik M, Hildebrandt F.
 A small molecule screening to detect potential therapeutic targets in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 312: F157-F171 [PMID: 27760769 DOI: 10.1152/ajprenal.00386.2016]
- Zhao Z, Ma X, Hsiao TH, Lin G, Kosti A, Yu X, Suresh U, Chen Y, Tomlinson GE, Pertsemlidis A, Du L. A high-content morphological screen identifies novel microRNAs that regulate neuroblastoma cell differentiation. *Oncotarget* 2014; 5: 2499-2512 [PMID: 24811707 DOI: 10.18632/ oncotarget.1703]
- 邢龙彬, 刘长政, 焦晓磊, 刘彤, 杜智, 高英堂. 细胞 培养过程中支原体污染的防治与检测方法. 世界华 人消化杂志 2016; 24: 1557-1564
- Helgason CD, Miller CL. Basic Cell Culture Protocols. *Humana Press* 2013; 17: 371-381 [DOI: 10.1007/978-1-62703-128-8]
- 19 Puck TT, Marcus PI. Rapid Method For Viable Cell Titration And Clone Production With Hela Cells In Tissue Culture: The Use Of X-Irradiated Cells To Supply Conditioning Factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955; 41: 432-437 [PMID: 16589695 DOI: 10.1073/pnas.41.7.432]
 - 章静波. 组织和细胞培养技术. 北京: 人民卫生出版 社, 2011: 853
 - Yanıkkaya Demirel G, Budak-Alpdoğan T, Aktaş S, Bayık M. Long-term culture-initiating cells (LTC-IC) produced from CD34+ cord blood cells with limiting dilution method. *Turk J Haematol* 2010; 27: 234-241 [PMID: 27263736 DOI: 10.5152/ tjh.2010.44]

ideng∞ WCJD www.wjgnet.com

- 22 Zhu L, Gao D, Yang J, Li M. Characterization of the phenotype of high collagen-producing fibroblast clones in systemic sclerosis, using a new modified limiting-dilution method. *Clin Exp Dermatol* 2012; 37: 395-403 [PMID: 22582912 DOI: 10.1111/j.1365-2230.2011.04254.x]
- 23 徐睿瑶,蔡洁行,张玉彬.生产用重组哺乳动物细胞 株的克隆筛选方法.中国细胞生物学学报 2015; 37: 746-752
- 24 Hou JJ, Hughes BS, Smede M, Leung KM, Levine K, Rigby S, Gray PP, Munro TP. High-throughput ClonePix FL analysis of mAb-expressing clones using the UCOE expression system. *N Biotechnol* 2014; 31: 214-220 [PMID: 24518824 DOI: 10.1016/j.nbt.2014.02.002]
- 25 Choi JH, Ogunniyi AO, Du M, Du M, Kretschmann M, Eberhardt J, Love JC. Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving.

Biotechnol Prog 2010; 26: 888-895 [PMID: 20063389 DOI: 10.1002/btpr.374]

- 26 Bahnassy AA, Fawzy M, El-Wakil M, Zekri AR, Abdel-Sayed A, Sheta M. Aberrant expression of cancer stem cell markers (CD44, CD90, and CD133) contributes to disease progression and reduced survival in hepatoblastoma patients: 4-year survival data. *Transl Res* 2015; 165: 396-406 [PMID: 25168019 DOI: 10.1016/j.trsl.2014.07.009]
- 27 Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 340-356 [PMID: 22679565]
- 28 Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. J Clin Oncol 2008; 26: 2839-2845 [PMID: 18539962 DOI: 10.1200/JCO.2007.15.1829]
- 29 刘建军,段小雨.骨髓间充质干细胞对前列腺癌细胞生物学行为的影响.中国组织工程研究 2016; 20: 2046-2051

编辑:马亚娟 电编:胡珊



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2017 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

●消息●

《世界华人消化亲志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注 射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成 ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T1/2不能写成 t1/2或T₁, *V*max不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与 种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var. glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验 和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(酷 酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺 素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性 活度, Bq), $\rho(密度$, 体积质量, *g*(L), *c*(浓度, mol/L), φ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*d, *T*_{1/2}*CT*等. 基因符号通常用小写斜 体, 如*ras*, *c*-*myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.





Published by Baishideng Publishing Group Inc

8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA Fax: +1-925-223-8242 Telephone: +1-925-223-8243 E-mail: bpgoffice@wjgnet.com http://www.wjgnet.com



