DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20141115001

黄超,言野,李娜,等. 高内涵筛选技术的原理及其在生态毒理学的应用[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 2-12

Huang C, Yan Y, Li N, et al. Principles and applications of high content screening technology in ecotoxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 2-12 (in Chinese)

高内涵筛选技术的原理及其在生态毒理学的应用

黄超,言野,李娜,马梅*,王子健

中国科学院生态环境研究中心 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室,北京 100085

收稿日期:2014-11-15 录用日期:2015-1-7

摘要:大量存在于环境中的有毒污染物仍然缺乏足够的毒理学数据来对其进行有效的监管,为了满足海量化合物毒性评价的需要,基于离体生物测试的高通量毒性筛选方法在近些年得到了迅猛的发展。高内涵筛选技术是新型的高通量化合物毒性筛选方法,该方法最显著的特点是能够在保持细胞结构和功能完整的基础上同时获取多种毒性指标。因此在简介高内涵筛选技术原理的基础上,综述了其在生态毒理学领域已有的应用,并针对性地对高内涵筛选技术的发展和挑战进行了展望。

关键词: 高内涵筛选;高通量筛选;离体毒性测试;生态毒理学

文章编号: 1673-5897(2015)2-2-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Principles and Applications of High Content Screening Technology in Ecotoxicology

Huang Chao, Yan Ye, Li Na, Ma Mei*, Wang Zijian

Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 15 November 2014 accepted 7 January 2015

Abstract: As a large amount of environmental pollutants may pose hazardous effects on the environment and human beings at low concentrations, evaluating the toxic effects of these chemicals and understanding their mechanisms of action (MOA) are essential for management of chemical environmental risks. Therefore, high-throughput in vitro bioassay methods have been rapidly developed to satisfy the toxicity assessment of countless chemicals. High-content screening (HCS), as a new cell-based screening approach, allows multi-end-point determination simultaneously in intact cells. This review introduced the principles of HCS and summarized its application in ecotoxicology. Finally, the new developments and challenges of HCS are proposed.

Keywords: high-content screening; high-throughput screening; in vitro bioassay; ecotoxicology

随着现代工业进步,人类合成、使用和间接产生的化合物的数量和种类在不断增长,其中包括了化工原料、阻燃剂、农药、增塑剂、食品添加剂、药物、天

然化合物及衍生物、饮用水消毒副产物和化学合成 副产物等多个类别[1-2]。然而由于在对化合物毒性 作用方面认识的不足,绝大多数的化合物缺乏有效

基金项目:自然科学基金重点课题(No. 51290283);自然科学基金重点基金(No. 21437006)

作者简介:黄超(1989-),男,硕士生,研究方向为水生态毒理学,E-mail: hch-app@163.com;

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mamei@rcees.ac.cn

监管,部分化合物因此能够以直接或间接的方式进入环境,成为环境污染物。事实上,根据美国国家毒理规划处(NTP)生物分子筛选部负责人 Tice 等^[2]在2013 年的估计,至少有数万种存在于环境中的污染物仍然缺乏足够的毒理学数据来预测其对人类和生态系统的影响。所以在生态毒理学领域,对这些化合物展开环境危害性和毒理特性鉴定,进行风险管理显得尤为必要而迫切。为此,美国环境保护局(EPA)在2011 年已开始推进新一代的健康风险评估(NexGen)项目,NexGen 项目强调了体外高通量毒性筛选在揭示化合物毒性作用机制方面的重要性^[3],而该项目的实施对中国的毒理学发展具有借鉴意义。

模式动物的活体毒性测试由于通量低、成本高 和周期长已不能满足当前巨量化合物毒性评价的需 要,为了应对毒理学领域所面临的新挑战,2007年 加拿大国家研究委员会(NRC)的"21 世纪毒性测试: 一种远见与策略"报告[4]为毒理学领域新世纪的发 展奠定了基石。该报告不仅提出了21世纪毒性测 试应当从活体生物检测向高通量的离体检测转变, 更期望采用离体生物检测去揭示化合物毒性作用机 制,从而使在这个框架下所进行的风险科学具有充 分的科学依据。毒性作用机制的研究是以毒性途径 紊乱(perturbations of toxicity pathways)为观察指 标[4],这一特点与传统离体或活体生物检测中,以死 亡、突变、肿瘤形成等细胞或动物终点事件(apical end points)为观察指标所不同。而所谓的毒性通路 在 NRC 的报告中被定义为:正常细胞受外来化合物 干扰后所产生的,能导致损害健康效应的细胞内应 答通路[4]。为了对这一观察指标进行全面的衡量, 新的高通量生物检测方法仍然有待进一步的发展。

高内涵筛选(High Content Screening, HCS)是新型的高通量化合物毒性检测方法,能够在保持细胞结构和功能完整的基础上,运用多种荧光标记物标记细胞,自动化地对细胞内多靶点的复杂表型(phenotype)进行筛选^[5-7]。不同筛选条件下产生的表型特征既包括了完整细胞所表现的凋亡、坏死、增殖、迁移等形式,还包括了细胞内的细胞器损伤、信号转导、代谢途径以及遗传损伤等^[8]。不同于传统离体生物检测中以细胞内单靶点的作用为检测端点,HCS以高内涵(high content)的方式呈现化合物暴露下所产生的多维表型信息^[9],从而系统的对化合物的毒性作用机制展开研究^[10],更好的对化学污染物进行风险评估。

当前随着 HCS 设备及分析技术的长足的进步, HCS 技术已在毒理学、药理学和医学领域有了极大 的发展,在生态毒理学领域,HCS 的应用亦在积极 的展开。本文系统介绍了 HCS 技术原理,在此基础 上总结了 HCS 在当前生态毒理学领域的应用,并对 其发展前景和所面临的挑战进行了展望。

1 HCS 技术原理

1.1 HCS 概念

光学显微镜设备在自动化程度和图像收集速率的提高促进了 HCS 的发展,研究人员已可以利用图像分析方法在单细胞水平展开研究。因为 HCS 以完整细胞为研究对象,细胞结构和功能完整,真实反应了细胞内的毒性作用机制^[11]。细胞荧光图像是HCS 获取数据的主要手段,特异性荧光探针或荧光蛋白的采用使细胞内不同结构被多种荧光信号同时标记,从而反应细胞表型。能够被 HCS 检测得到的表型变化除包括标记点的荧光强度改变外,还有细胞或细胞内结构形态变化。图像分析技术使得表型变化的定量分析成为可能,每个细胞的荧光和形态学特征得以被聚类和分类等数据挖掘手段所整合分析,从而转换为可解释的多维细胞表型信息,这种多生物学信息呈现方式拓宽了我们对化合物毒性作用机制的理解和认识。

1.2 HCS 实验流程

HCS 的试验流程包括了细胞培养、样品制备和暴露、图像获取、图像分析和数据挖掘 5 个部分^[5],同时,基于高性能工作站和服务器建立起来的数据库系统对于 HCS 数据的存储和调用分析也至关重要^[12],以下对 HCS 过程中几个关键步骤进行相关介绍。

1.3 样品制备和暴露

常规的 HCS 过程同样依赖于实验员的操作,需要进行细胞培养、化合物暴露和细胞染色等一系列样品前处理过程,这在大规模高通量化合物的 HCS中会造成了 2 方面的影响,一方面 384、1536 等多孔板的应用增加了实验员的操作难度;另一方面,实验员在操作的过程中容易引入人为误差,整个实验的质量控制难以保证^[13]。因此在大规模高通量的HCS中,样品制备和暴露更依赖于自动化的液体处理设备,尽管当前自动化液体处理设备价格较高,但其引入使得实验的整体精度、重复性和可靠性被极大的增强,并满足了大部分液体处理的需要。目前,已有多个生物公司,如 Tecan, Perkin Elmer 等都开发了自己的液体处理设备。

1.4 图像获取

随着近几年显微镜领域的发展,HCS设备已日趋成熟,主要在检测速度、图像质量、共聚焦和厚组织扫描这4个方面有了极大的进步。高速转盘的应用使得HCS设备能够在短时间内扫描多通道的荧光信号[14],降低了检测环境对细胞的影响。新型的HCS设备已采用了基于新一代CMOS图像传感器(CIS)设计的科学级CMOS(sCMOS)。相比于传统的CCD图像传感器,sCMOS不仅能以4倍的视场范围在短时间内完成高质量的图像扫描,更能细致的展现细胞内微观结构[15]。光路系统的改进也增强了HCS设备共聚焦能力,满足了以三维细胞培养为概念的一些新的细胞及组织培养技术的发展要求。表1总结当前厂商所提供的商品化高内涵设备。

1.5 图像分析与数据挖掘

为了从 HCS 所获得图像中提取所需的生物学 信息,需要对其进行图像分析和数据挖掘[16-17]。图 像分析的主要目的是对每个细胞都进行定量化分 析,主要包括:(1)细胞及细胞内结构定位;(2)细胞 结构分割;(3) 线性结构提取(针对神经细胞的神经 突);(4)细胞追踪(针对活细胞检测);(5)特征提取共 5个部分[16]。经过图像分析,得到了与图像信息关 联的单细胞特征,包括了荧光强度、形态、表面纹理 (texture)和位置等多维数据。将多维数据正态化后 再对其进行数据挖掘,最广泛的应用是聚类和分类 算法,目的是将不同处理下所呈现不同表型特征的 细胞归入所属类型[17],例如根据 DNA 含量与细胞 形态对处于不同细胞周期下的细胞进行划分[18-19]。 图像分析和数据挖掘是 HCS 研究的热点,只有通过 该过程才能阐述图像背后的生物学问题。商品化的 HCS 分析软件的使用极大的降低了 HCS 应用的难 度,是 HCS 图像分析和数据处理过程中的主流策略, 但其使用成本较高,通用性相对较差。现也有一些较 为成熟的高内涵分析开源软件,如由美国哈佛-麻省 理工的博德研究所主导开发的 cellprofiler [20],可以通 过模块化定制来对 HCS 图像进行分析,分析得到的 数据可以进一步采用基于随机森林数的机器学习方 法来进行分选。除此之外,结合 R[21-22]和 Weka[23]等数 据分析软件,来对 HCS 图像分析经过进行数据处理、 数据挖掘和数据可视化的应用也越来越多。

1.6 生物数据库系统

Keefer 等估计,一个 HCS 平台每年数据产出量在 500 GB~6 TB 左右[10]。如此高的数据产出,不仅

要求在数据分析过程中采用并行甚至集群计算,数据的储存和调用也依赖于服务器。但是,几乎每个HCS设备提供商都以各自格式储存数据,这导致显微实验中图像格式冗余,制约了HCS数据库的管理和维护^[12]。OME以增强HCS分析软件之间的互通性为目的而开发的"Bio-format"已得到各个软硬件的广泛支持,使HCS中统一的数据管理成为可能^[24]。HCS的数据库系统除了有传统的商业数据库Oracle^[25],MDCStoreTM和 Columbus TM等,HCS 开源数据库 SIDB^[26]和 OME 的 OMERO^[27]也有了广泛的应用。

2 HCS 在生态毒理学的应用

对环境中有毒有害化合物进行毒性筛查,分析 其毒性作用机制是化学物质风险评估中必要的过 程,也正是生态毒理学领域研究的重点。而 HCS 最 大的优势是在一次实验中对观测对象,如离体培养 细胞,进行多维表型分析,因此也可以同时得到多组 反应化合物毒性的指标[9]。荧光图像中毒性指标的 提取依赖于图像分析和数据挖掘,该过程的目的是 对荧光图像中的对象进行分割和分类。所以 HCS 的毒性指标既来源于荧光标记靶点所在位置和荧光 强度,也能在细胞和亚细胞的形态结构上反应[9]。 正因如此,HCS 对于其他毒性评价方法中难表征的 毒性指标,如凋亡小体的形成,信号通路中转录因子 的核转位,细胞趋化和集落形成等也能定量化的测 定。Zock[18]已在其综述中对 HCS 所能得到的毒性 指标进行了较为完整的综述,总结在表2中。由于 HCS 中毒性指标的多产出,需要对其并行分析,这 已在生态毒理学领域展开了众多实际的应用。而在 HCS 应用较为成熟的药物筛查过程中,其在化合物 作用机制的研究也对生态毒理学领域的应用具有借 **鉴意义。**

2.1 遗传毒性

遗传毒性用于描述某化合物能够直接或间接的方式引起 DNA 或染色体损伤的性质,具有这种性质的化合物被称为遗传毒物^[29]。工业污染使众多潜在的遗传毒物进入环境介质,而遗传毒物对生物胚胎细胞和体细胞的损害可能引起多种疾病,包括了新生儿畸形和癌症生成等^[30]。因此为了对这些化合物进行监管,需要对其遗传毒性定量测定,而相比于传统遗传毒性评价方法,HCS 在具有较高的灵敏度和特异性同时,能够高通量的检测多个遗传毒性指标,因此应用广泛。

表 1 高内涵筛选平台 Table 1 High content screening (HCS) platforms

)	_				
公司	平台	成像方式	光源	共聚焦方式	图像传感器	图像通道	图像处理软件	数据库软件
Company	Platform	Optics	Light source	Confocal type	Image sensor	Image channels	Imaging software	Data management software
筹载飞 (Thermo)	ArrayScan TM XT1 High Content A- nalysis (HCA) Infinity Configuration	CF/WF	LED 固态光纖 Solid state LED	高速转盘 Disk confocal	488 万 像素 Photometrics [®] XI CCD 488 megapixelPhotometrics [®] XI	4	HCS Studio [®] Cell Analysis Software	Store TM Image and Database Management Soft- ware
	ArrayScan XTI High Content Analysis (HCA) Reader	WF	LED 固态光源 Solid state LED		488 万 傳 繁 Photometrics [®] X1 CCD 488 megapixel Photometrics [®] X1 CCD	-	HCS Studio® Cell Analysis Software	Store TM Image and Database Management Soft- ware
	CellInsight TM CX5 HCS Platform	WF	LED 固态光源 Solid state LED		488 万 像素 Photometrics [®] XI CCD 488 megapixel Photometrics [®] XI CCD	-	HCS Studio® Cell Analysis Software	Store TM Image and Database Management Soft- ware
分子仪器 (Molecular Devices)	ìmageXpress® Ultra	CF	固态激光器 Solid state laser	点扫描 Point scanning confocai	高灵敏度 PMT High sensitive PMT	4	MetaXpress®	MDCStore TM
	ImageXpress® Micro XLS	WF	固态光引擎 Solid state light en- gine		466 万像素 sCMOS 466 megapixel sC- MOS	-	MetaXpress®	MDCStore TM
通用 (GE Healthcare)	IN Cell Analyzer 2200	WF	LED 固态光源 Solid state LED		419 万像素 sCMOS 419 megapixel sC- MOS	-	IN Cell Analyzer 2000	IN Cell Miner HCM
	IN Cell Analyzer 6000	CF	固态激光器 Solid state laser	线扫描 Line scanning con- focal	550 万像素 sCMOS 550 megapixel sC- MOS	-	IN Cell Analyzer 2000	IN Cell Miner HCM
珀金埃尔默 (PerkinElmer)	Opera Phenix	CF/WF	固态激光器 Solid state laser	高速转盘 Disk confocal	550 万像素 sCMOS 550 megapixel sC- MOS	4	Acapella®	Columbus TM
	Operetta	CF/WF	氙弧灯 Xenon lamp	高速转盘 Disk confocal	140 万像素冷 CCD 140 megapixel cooled CCD	-	Harmony®	Columbus TM

Note: CF, Confocal; WF, Widefield; CCD, Charge-coupled Device; PMT, Photomultiplier; sCMOS, science Complementary Metal Oxide Semiconductor. 注:CF,共聚焦显微镜;WF,宽场显微镜;CCD,电荷耦合元件;PMT,光电倍增管;sCMOS,科学级互补金属氧化物半导体。

表 2 HCS 主要的应用领域和研究对象[28]

Table 2 Key application areas and examples of HCS^[28]

应用领域	研究对象	应用领域	研究对象	应用领域	研究对象
Feild	Object	Feild	Object	Feild	Object
			増殖		心脏衰竭
	NF-ĸB		(Proliferation)		(Cardiac failure)
	STAT		磷酸化		生物节律
	STAT		(Phosphorylation)		(Circadian rhythms)
	Wnt/fzd		吞噬作用		免疫抑制
			(Phagocytosis)		(Immunosupression)
			自噬作用		骨质疏松
	PKB		(Autophagy)		(Osteoporosis)
	NFAT		间隙连接诱导		真菌致病性
			(Gap junction induction)		(Fungal pathogensis
	P38		线粒体健康		病毒中和
细胞信号通路			(Mitochondrial health)	 机体生理学	(Virus neutralization)
Cell signaling pathways			核形态	Organism physiology	寄生物感染
	TGF-beta		(Nuclear morphology)		(Parasite infection)
	Smad2/2		凋亡		血管生成
	Smad2/3		(Apoptosis)		(Angiogenesis)
	CPCP	细胞生理学	细胞膜通透性		阿兹海默综合征
	GPCR	Cell physiology	(Membrane permeability)		(Alzheimer's disease
	糖皮质激素受体		细胞周期		帕金森综合征
	(Glucocorticoid receptor)		(Cell cycle)		(Parkinson's disease
			细胞迁移		亨廷顿综合症
	FOXO1α		(Motility/migration)		(Huntington's disease
	酵母(yeast)		细胞骨架重拍 (Cytoskeletal rearrangement)		肌萎缩性侧素硬化 (Amyotrophic lateral sclerosis)
靶点验证 Target validation	shRNA 干扰文库		神经轴突生长		微核生成
	(shRNA interference library)		(Neuite outgrowth)		(Micronucleus induction)
	siRNA 干扰文库		转化		磷脂沉积
	(s iRNA interference library)		(Transformation)		(Phospholipidosis)
	干细胞自我更新			离体毒性测试	神经毒性
	(Stem cell self-renewal)			(In Vitro Toxicology)	(Neurotoxicity)
	干细胞分化				细胞器健康
	(Stem cell differentiation)				(Organelle health)
					肝毒性
					(Hepatotoxicity)

注:NF-κB,核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子;STAT 信号转导及转录激活蛋白;Wnt/fzd,Wnt/卷曲受体;PKB,蛋白激酶 B;NFAT,激活 T 细胞核因子;p38,促分裂原活化蛋白激酶;TGF-beta,转化生长因子 β;Smad2/3,母亲 DPP 同源物 2;GPCR,G蛋白偶联受体;FOXO1α,叉头基因 O1。Note: NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; STAT, signal transducer and activator of transcription; Wnt/fzd, Wnt/frizzled; PKB, protein kinase B; NFAT, nuclear factor of activated T-cells; p38, p38 mitogen-activated protein kinases; TGF-beta, transforming growth factor beta; Smad2/3, mothers against decapentaplegic homolog 2; GPCR, G protein-coupled receptor; FOXO1α, Forkhead box O1α.

2.1.1 细胞周期阻滞

生物的生长和繁衍依赖于遗传信息在细胞中准确而稳定的复制,为了满足遗传信息在复制过程中

的高保真度,细胞进化拥有了一套高效的监控机制—DNA 损伤应答(DNA Damage Response, DDR)系统^[1]。DDR 信号通路与多个细胞内信号通路相

互关联,其中,一旦 DNA 发生了结构性损伤,DDR 信号通路被激活,可能根据不同的损伤类型和时间点首先将细胞阻滞于不同的细胞周期阶段,主要是G1、S和 G2 期^[32],并在这些阶段中尝试对 DNA 损伤进行修复,因此细胞周期阻滞与 DNA 损伤具有较强的关联性。HCS 不仅能够进行 DNA 含量分析^[18],采用数学模型来对细胞周期进行划分,还能充分利用细胞形态特征,采用机器学习的方法来判别更为细致的细胞周期状态^[33]。另外多种荧光探针也能在 HCS 被用来表征不同的细胞周期状态,例如BrdU^[34]和 Edu^[35]是 HCS 过程常用的 S 期荧光标记物^[19,33],它们分别是胸腺嘧啶核苷衍生物和类似物,能够代替胸腺嘧啶(T)渗入进 S 期细胞的 DNA 分子中,并通过荧光标记识别。

2.1.2 特定 DNA 损伤检测

DNA 损伤具有多种类别,包括了氧化性 DNA 损伤、DNA 加合物、DNA 甲基化、双链 DNA 损伤等^[29],其中 8-OHdG^[36]、DNA 甲基化结合蛋白^[37]和磷酸化组蛋白 H2AX(γH2AX)^[38]分别是氧化性 DNA 损伤、DNA 甲基化和双链 DNA 损伤特异性标志物。采用免疫荧光方法,能标记特定的 DNA 损伤标志物,并通过 HCS 高通量来对化合物 DNA 损伤类型进行判定。Barber^[39]和 Kim 等^[40]以抗体标记γH2AX,并采用 HCS 来对生成的 γH2AX foci 进行定量分析,通过该方法可以对遗传毒物的作用机制有一定了解。

2.1.3 微核试验

微核实验是在细胞核水平对遗传毒性进行评价,微核的生成存在2种机制,一种是由遗传毒物干扰细胞分裂器所引起的^[41],这使得生成的绝大部分微核中含有着丝点或着丝粒,这类遗传毒物被称为非整倍体断裂剂,能间接的造成遗传毒性。另一种微核生成是由高水平的 DNA 损伤引起的^[52],这种机制与 Cyclin B1 浓度含量有关^[42]。微核生成前,细胞核内已发生严重的基因突变和染色体损伤断裂,然而过低的 Cyclin B1 浓度使得纺锤体组装检验点(spindle assembly checkpoint, SAC)并不会被激活,因此 DNA 严重损伤的细胞被迅速退出 M 期,导致部分脱核的染色体形成微核^[42-45]。基于这一机制生成微核的遗传毒物被称为染色体断裂剂^[41],其能直接的对 DNA 造成高水平的损伤。这 2 种微核生成的机制是细胞微核实验的基础。

通过图像特征提取算法的优化, HCS 可以自动

化高通量的定位存在于细胞质中的微核,微核的生 成率是遗传毒性可靠的衡量指标。例如,Yan 等[46] 通过 HCS 对 9 种苯并噻唑类化合物进行了遗传毒 性评价,其中以 4-NQQ 和 B(α)P 为阳性对照,确保 了实验的灵敏度,同时细胞急性毒性采用细胞减少 率表示并在实验中加以控制。在此基础上对9种苯 并噻唑类暴露 MGC803 和 A549 后微核的生成率进 行衡量, HCS 的检测结果表明 2-氨基苯并噻唑 (ABT)、2-羟基苯并噻唑(OHBT)、2-氯苯并噻唑 (CBT)、2-溴苯并噻唑(BrBT)和 2-甲硫基苯并噻唑 (MTBT)的微核率能够呈现出剂量响应关系。HCS 也能根据上述2种微核生成机制,利用微核形态区 分非整倍体毒剂和染色体断裂剂。Kiyohiro 等[41]发 现通过区分微核的大小可以和 FISH 方法一样有效 的区分非整倍体毒剂和染色体断裂剂,因为非整倍 体毒剂所造成的微核相比于染色体断裂剂的尺寸更 大。Walter等[47]又通过 HCS 分析,以 MMS 和紫杉 醇为指标化合物,确定了不同机制下产生的2种微 核面积区分阀值,并采用这一阀值去测定了62种指 标化合物,该方法不仅检测过程更为简单快速,且具 有较高的灵敏度和特异性。

2.2 器官毒性评价

生物在环境中所暴露的化合物会对体内特定的 器官产生各异的毒性作用,对化合物展开特定器官 毒性评价能够发现该化合物在体内所影响的主要靶 器官,部分揭示其所具有的毒性作用机制。同时随 着毒理学研究的进步,替代动物实验的体外模型研 究是发展主流[2]。利用 HCS 能够高通量对不同器 官来源的细胞系和原代细胞进行多参数高灵敏的毒 性评价,从而使器官毒性评价的方式从活体实验向 离体实验转变。以肝毒性为例,肝是外源化合物主 要的代谢器官,外源化合物进入体内后首先被哺乳 动物肝脏中 Ⅰ 相和 Ⅱ 相代谢酶代谢,尽管对于大多 数化合物来说,代谢过程是一个解毒的过程[48],但有 些化合物在代谢后会产生毒性更强的代谢产物,例 如 B(α)P^[49]。因此在毒理学中对化合物肝毒性评价 是研究的重点,肝损伤的类型包括肝细胞的坏死、凋 亡、致癌作用和氧化应激等[48]。HepG2 是在离体细 胞实验中评价肝毒性常用的细胞系,属于人源肝癌 上皮细胞[50]。O'Brien 等[51]采用 HepG2 对 243 种来 源于药品的化合物进行 HCS,以评估该方法对肝毒 性评价的灵敏度和特异性。细胞采用4种染料分别 标记了细胞内钙离子浓度、线粒体膜电和细胞膜通 透性和 DNA 含量,结果表明,相比另外 7 种在离体实验中常用的细胞毒性评价手段,基于 HCS 肝毒性评价方法不仅具有类似的特异性,灵敏度也高达93%。通过机器学习分析 HCS 数据,Edward 等^[52] 只通过 PI 和 hoechst 对细胞染色,即根据细胞核形态和细胞膜完整性这 2 个方面的参数,采用有监督的分类方法来自动区分了健康、凋亡和坏死细胞,从而评价了金属纳米材料所能导致的肝毒性。除了HepG2 细胞,其他细胞系和原代培养细胞也广泛的应用于化合物肝毒性评价。而对于其他器官毒性的评价,如肾^[53]和心脏^[54]毒性等,HCS 也应用广泛。

2.3 神经毒性评价

神经毒性适用于描述毒性化合物对神经系统的 结构和功能造成不良影响的能力[55]。众多疾病,如 阿尔茨海默病[56],都是由于神经系统的损伤而引起 的。已有多种环境污染物被发现对神经系统会造成 损伤,尽管神经毒性也是器官毒性的一种表现,但是 其毒性指标的获取过程更为复杂,而采用离体神经 细胞结合 HCS 来评价化合物的神经毒性已是一种 有效的毒性测试手段。评价的指标包括了细胞毒 性、神经细胞间信号传递、神经纤维生长和突触形 成。Joseph 等[57] 采用来源于人神经前体细胞系 ReNcell CX 细胞结合 HCS 表明,结合神经细胞增殖 和活力指标可以用来评价化合物的神经毒性。 Nicholas 等[57]也发现 HCS 能高效的提取和分析神 经突的线性结构,化合物的神经毒性大小能以对神 经突生长抑制的能力和影响细胞活力的大小来进行 衡量。随着 HCS 图形分析技术的提高,更为细致的 神经细胞结构能够被提取和分析。Joshua 等[58]确 认了在正常培养的啮齿动物原代培养的混合皮质细 胞中,抗体标记的点状突触蛋白在树突处具有更高 的密度,表明突触主要形成于该区域。而神经毒性 化合物暴露后可以通过 HCS 来自动的判断在树突 处突触的减少量,结合神经细胞其他的形态特征,这 些参数能够有效的来判断化合物的神经毒性。

化合物在完整的生命体中的神经毒性作用也能利用 HCS 进行高通量的评价。Tara 等^[59]采用 EGFP 标记斑马鱼,评价了斑马鱼胚胎在受精后 19 h 到 29 h 内会产生自发性尾部收缩现象。这种现象被认为是斑马鱼胚胎的第一次肌动活动,潜在的发育神经毒性化合物能够显著的干扰该现象的产生。来源于EPA 的 ToxCast 一期化学品文库中的 16 种化合物在斑马鱼胚胎受精后 5 h 到 25 h 内进行静态暴露,

再用 HCS 设备在随后大约 1.4 h 的视频获取时间内对不同化合物暴露浓度下的自发性尾部收缩现象进行统计,结果表明阿维菌素(abamectin)和埃玛菌素(emamectin benzoate)的暴露下,斑马鱼胚胎虽然没有严重的畸形,但完全丧失自发性尾部收缩能力,从而通过 HCS 可以间接证明这两种化合物具有发育神经毒性。

2.4 化合物作用机制

当前,HCS 在对海量化合物作用机制(mode of action, MoA)的研究已经极大的促进了药物筛选的 发展[5],尽管药物筛查和生态毒理学这2个领域中 对化合物的毒性测试的出发点和目的性都不尽相 同,但是药筛过程中利用 HCS 展开海量化合物的 MoA 研究方法对生态毒理学中 HCS 的应用提供了 有益的参考。药物筛查的目的是在药物研发的初 期,在大型化合物文库(chemical library)中寻找针对 特定药物作用靶点(target)具有生物活性的化合物。 而对于同一靶点有效的化合物也可能会发生脱靶效 应(off-target effect),即化合物会同时对特定靶点以 外的体内生物大分子结合,这可能导致该化合物在 药物开发后期被发现具有严重的副作用而造成巨大 经济损失[60-62]。正因如此在药物筛查的过程中应尽 早发现化合物的脱靶效应,所以需要在这一过程中 对化合物的 MoA 展开研究[63]。尽管生物组学技术 的发展,如基因芯片、转录组测序等已能够有效的寻 找化合物的 MoA,但是高昂的成本使其难以在大规 模的药物筛查中展开,而利用 HCS 对产生的细胞多 维表型进行挖掘,能够了解化合物的 MoA,寻找到 目标化合物[33]。

药物筛查过程中, HCS 对 MoA 的研究主要通过 2 个方向来进行, 一是对细胞内信号转导通路中关键的蛋白进行荧光标记, 通过对该蛋白的表达和转位来直接了解暴露化合物的 MoA。例如对于核转录因子-κB(NF-κB)^[64-65], NF-κB 的核转位是调控细胞生命活动的一个重要的分子途径, 也是药物筛查中一个重要的靶点。类似的 HCS 筛查也对细胞骨架^[66-67]、蛋白酶体^[68]和细胞凋亡相关蛋白^[60]等展开。另一个方向是结合计算毒理学来对 HCS 的多维细胞表型筛选来进行化合物 MoA 的研究。Wawera等^[69]认为 HCS 中所得到的表型是一种无偏的, 多维度的"通用性语言(univeral language)",可以最大限度的反应生物活性, 有利于化合物的 MoA研究。Young等^[33]在这一个方向上展开了一些探索

性的工作,结合了 HCS 的表型分析和配体-预测模型来对化合物的作用机制进行了研究,结果揭示 HCS 所得到的细胞表型更应该去预测化合物的作用靶点,而不是去反映化合物的结构特征。得益于生物数据的积累和计算机水平的进步,在此方向上对化合物的 MoA 研究能在更大的药物筛查规模上进行,近些年来已有众多的 MoA 分析方法被建立和应用[63,69]。

2.5 RNA 干扰和 cDNA 过表达

RNA 干扰[70]和 cDNA 过表达[71]技术的应用使 我们得以以"loss of fuction"和"gain of function" 的遗传学手段来研究化合物的 MoA,在药理学领域 提出了化学遗传学(chemical genetic)的概念[72].其目 的是对化合物库中的小分子化合物进行筛查来研究 这些化合物对生物大分子和信号转导通路的影响, 也是为了发现新的药物作用靶点。HCS 能够同时 对基因表达变化和化合物处理所引起的细胞表型的 微小改变做出响应,化学遗传学中通常采用 RNA 干扰文库和化合物文库并行 HCS(parallel HCS)[66,73], 来探索两者细胞表型之间的关系。两种文库中筛选 产生的细胞表型首先被聚类,在同一个聚类类别中, 筛选出的化合物可能和这个类别下所沉默的基因导 致相同的表型,因此可以认为这些化合物能够干扰 该沉默基因原本的表达,从而找到潜在的药物靶标 和生物标记物。

在生态毒理学领域,更多的应用是通过 RNA 干扰和 cDNA 过表达技术来构建基因低表达和过表达系统,HCS 也能灵敏的检测到构建前后的表型差异。例如,尽管 HepC2 细胞被广泛的应用于肝毒性检测,但是多种 CYPs 在这种细胞模型中表达量较低^[74],不利于模拟体内肝脏的代谢功能, Tolosa 等^[75]利用 cD-NA 过表达技术在 HepC2 细胞中过表达多个 CYPs,该细胞模型与原代肝细胞中 CYPs 表达量相类似,因此显著提高了 HCS 对肝毒性检测的灵敏度。

3 展 望

当前 HCS 已发展到一个新的阶段,性能日益强大的设备拓展了 HCS 在生态毒理学的应用,但 HCS 并不仅仅依赖于设备本身,更需要利用海量数据去回答亟待解决的生物学问题,因此数据库系统和数据挖掘已成为了 HCS 应用所要着力加强的地方。

在面对从活体向离体毒性实验转换的过程中出现的新问题,一些新的生物学技术也应当在 HCS 中得到进一步的应用。例如三维细胞培养技术,因为

尽管单层细胞培养具有众多优点,但是单层细胞不能很好的模拟细胞在体内真实的生理状态,缺乏细胞间通讯机制,培养周期短且只适合单种细胞类型细胞培养^[76]。在药物毒理学领域,已有多项证据表明了这种差异性对特定器官毒性评价时会产生不利影响^[77]。例如曲伐沙星(trovafloxacin)在临床使用过程中首先被发现有很强的肝毒性^[78],而在对人源肝细胞(hepatocyte)药物筛查期间并没有明显的毒性作用^[79],最近的研究表明,可能是体内肝脏细胞与单层细胞培养模型间的差异造成的^[80]。而三维细胞培养模型间的差异造成的^[80]。而三维细胞培养模型间的差异造成的^[80]。而三维细胞培养型的济补单层细胞培养模型的不足,模拟更真实的体内细胞生长环境。得益于 HCS 设备性能的提高,利用 HCS 基于三维培养细胞对化合物进行毒性评价也展开了探索性的研究^[82]

HCS 在生态毒理学的应用仍然需要结合其他学科的发展,例如结合生物组学和计算毒理学的相关应用,来研究海量化合物的毒性作用机制。因为在当前化合物的毒性评价中,对其毒性作用机制的研究已越来越为重要,作用机制的研究能够提供从化合物暴露到毒性效应之间一系列有证据支持的、具有因果关系的关键事件(key events),从而提高评价效率,减少由毒性资料外推到人的不确定因素[483],来更好的对化合物的生产和使用展开监管。

通讯作者简介:马梅(1967-),女,博士,研究员,博士生导师, 主要从事水生态毒理学研究。

参考文献(References):

- [1] Schmidt C W. TOX 21: New dimensions of toxicity testing [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117
 (8): A348 A353
- [2] Tice R R, Austin C P, Kavlock R J, et al. Improving the human hazard characterization of chemicals: A Tox21 update [J]. Environmental Health Perspectives, 2013, 121(7): 756 - 765
- [3] Krewski D, Westphal M, Andersen M E, et al. A Framework for the next generation of risk science [J]. Environmental Health Perspectives, 2014, 122(8): 796 805
- [4] Krewski D, Acosta Jr D, Andersen M, et al. Toxicity testing in the 21st Century: A vision and a strategy [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2010, 13(2-4): 51-138
- [5] Zanella F, Lorens J B, Link W. High content screening: Seeing is believing [J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(5): 237 - 245
- [6] Taylor D, Giuliano K A. High Content Screening [M].

- Wiley Online Library, 2007: 1 39
- [7] Comley J. High content screening [J]. Drug Discovery World, 2005, 6(3): 31 - 53
- [8] Zheng W, Thorne N, Mckew J C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery [J]. Drug Discovery Today, 2013, 18(21): 1067 - 1073
- [9] Singh S, Carpenter A E, Genovesio A. Increasing the content of high - content screening: An overview [J]. Journal of Biomolecular Screening, 2014, 19(5): 640 - 650
- [10] Keefer S, Zock J. Approaching high content screening and analysis: Practical advice for users [M] // High Content Screening: Science, Techniques and Applications, 2008: 1 - 24, DOI: 10.1002/9780470229866.ch1
- [11] Starkuviene V, Pepperkok R. The potential of high content high throughput microscopy in drug discovery [J]. British Journal of Pharmacology, 2007, 152(1): 62 71
- [12] Schiffmann D A, Dikovskaya D, Appleton P L, et al. Open microscopy environment and findspots: Integrating image informatics with quantitative multidimensional image analysis [J]. BioTechniques, 2006, 41 (2): 199-208
- [13] Huang D, Ou B, Hampsch Woodill M, et al. High throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96 well format [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2002, 50(16): 4437 4444
- [14] Wang E, Babbey C, Dunn K. Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems [J]. Journal of Microscopy, 2005, 218(2): 148 - 159
- [15] Coates C. New sCMOS vs. current microscopy cameras[J]. Biophotonics International, 2011, 18(5): 24 27
- [16] Zhou X, Wong S T. A primer on image informatics of high content screening [M]// High Content Screening: Science, Techniques and Applications, 2008: 43 - 84, DOI: 10.1002/9780470229866.ch3
- [17] Zhou X, Wong S T. Informatics challenges of high throughput microscopy [J]. Signal Processing Magazine, IEEE, 2006, 23(3): 63 – 72
- [18] Lee J A, Cox K, Kriauciunas A, et al. The roles of high content cellular imaging in lead optimization [M]// High Content Screening: Science, Techniques and Applications, 2008: 249 - 268, DOI: 10.1002/9780470229866.ch11
- [19] Lyman S K, Crawley S C, Gong R, et al. High content, high - throughput analysis of cell cycle perturbations induced by the HSP90 inhibitor XL888 [J]. PloS one, 2011, 6(3): e17692
- [20] Carpenter A E, Jones T R, Lamprecht M R, et al. Cell-

- Profiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes [J]. Genome Biology, 2006, 7(10): R100
- [21] Team R C. R: A Language and Environment for Statistical Computing [M]. R Foundation for Statistical Computing, 2012: 1 3551
- [22] Liu C. OperaMate: An R package of Data Importing, Processing and Analysis for Opera High Content Screening System. R package version 0.99.6 [CP]. Bioconductor, 2015
- [23] Horvath P, Wild T, Kutay U, et al. Machine learning improves the precision and robustness of High-Content Screens using nonlinear multiparametric methods to analyze screening results [J]. Journal of Biomolecular Screening, 2011, 16(9): 1059 1067
- [24] Goldberg I. Open microscopy environment [C]// Computational Systems Bioinformatics Conference, 2005, Workshops and Poster Abstracts, IEEE
- [25] Lee S, Howell B J. High-content screening: Emerging hardware and software technologies [J]. Methods in Enzymology, 2006, 414: 468 483
- [26] Stuurman N, Swedlow J R. Software tools, data structures, and interfaces for microscope imaging [J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2012, 2012(1): 50 61
- [27] Allan C, Burel J M, Moore J, et al. OMERO: Flexible, model – driven data management for experimental biology [J]. Nature Methods, 2012, 9(3): 245 - 253
- [28] Zock J M. Applications of high content screening in life science research [J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2009, 12(9): 870 - 876
- [29] Phillips D H, Arlt V M. Genotoxicity: Damage to DNA and its consequences [J]. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, 2009, 99: 87 ~ 110
- [30] Cooke M S, Evans M D, Dizdaroglu M, et al. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease [J]. The FASEB Journal, 2003, 17(10): 1195 - 1214
- [31] Zhou B B S, Elledge S J. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective [J]. Nature, 2000, 408(6811): 433 - 439
- [32] Heijink A M, Krajewska M, Van Vugt M A. The DNA damage response during mitosis [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2013, 750(1-2): 45-55
- [33] Young D W, Bender A, Hoyt J, et al. Integrating highcontent screening and ligand-target prediction to identify mechanism of action [J]. Nature Chemical Biology, 2007, 4(1): 59 - 68
- [34] Eldridge S R, Tilbury L F, Goldsworthy T L, et al.

 Measurement of chemically induced cell proliferation in
 rodent liver and kidney: A comparison of 5 bromo -

- 2' deoxyuridine and [3H] thymidine administered by injection or osmotic pump [J]. Carcinogenesis, 1990, 11 (12): 2245 2251
- [35] Buck S B, Bradford J, Gee K R, et al. Detection of S phase cell cycle progression using 5 ethynyl 2' deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5 bromo 2' deoxyuridine antibodies [J]. Biotechniques, 2008, 44(7): 927 929
- [36] Wu L L, Chiou C C, Chang P Y, et al. Urinary 8 OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics [J]. Clinica Chimica Acta, 2004, 339(1-2): 1-9
- [37] Fuks F, Hurd P J, Wolf D, et al. The methyl CpG binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(6): 4035 - 4040
- [38] Bonner W M, Redon C E, Dickey J S, et al. γH2AX and cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 8(12): 957 – 967
- [39] Barber P, Locke R, Pierce G, et al. Gamma H2AX foci counting: Image processing and control software for high content screening [C]. Progress in Biomedical Optics and Imaging Proceedings of SPIE, 6441, 2007
- [40] Kim S, Jun D H, Kim H J, et al. Development of a high - content screening method for chemicals modulating DNA damage response [J]. Journal of Biomolecular Screening, 2011, 16(2): 259 - 265
- [41] Aardema M, Albertini S, Ami P, et al. Aneuploidy: A report of an ECETOC task force [J]. Mutation Research: Reviews in Mutation Research, 1998, 410(1): 3-79
- [42] Gascoigne K E, Taylor S S. Cancer cells display profound intra – and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs [J]. Cancer Cell, 2008, 14(2): 111 – 122
- [43] Crasta K, Ganem N J, Dagher R, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis [J]. Nature, 2012, 482(7383): 53 58
- [44] Dotiwala F, Harrison J C, Jain S, et al. Mad2 prolongs

 DNA damage checkpoint arrest caused by a double
 strand break via a centromere dependent mechanism

 [J]. Current Biology, 2010, 20(4): 328 332
- [45] Nitta M, Kobayashi O, Honda S, et al. Spindle check-point function is required for mitotic catastrophe induced by DNA damaging agents [J]. Oncogene, 2004, 23(39): 6548 6558
- [46] Yan Y, Jiang W W, Li N, et al. Application of the SOS/ umu test and high - content in vitro micronucleus test to determine genotoxicity and cytotoxicity of nine benzothiazoles [J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(12): 1400 - 1408

- [47] Westerink W, Schirris T J, Horbach G J, et al. Development and validation of a high content screening in vitro micronucleus assay in CHO k1 and HepG2 cells [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2011, 724(1-2): 7-21
- [48] Hodgson E, Levi P E. A Textbook of Modern Toxicology [M]. Wiley Online Library, 2004: 111 148
- [49] Buening M, Wislocki P, Levin W, et al. Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo [a]pyrene 7,8 diol 9,10 epoxides in newborn mice: Exceptional activity of (+) 7beta, 8alpha dihydroxy 9alpha, 10alpha epoxy 7,8,9,10 tetrahydrobenzo [a]pyrene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978, 75(11): 5358 5361
- [50] Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2003, 31(8): 1035 - 1042
- [51] O' brien P, Irwin W, Diaz D, et al. High concordance of drug - induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell - based model using high content screening [J]. Archives of Toxicology, 2006, 80(9): 580 - 604
- [52] Jan E, Byrne S J, Cuddihy M, et al. High content screening as a universal tool for fingerprinting of cytotoxicity of nanoparticles [J]. ACS Nano, 2008, 2(5): 928 -938
- [53] Ross S, Chen T, Yu V, et al. High Content Screening Analysis of the p38 pathway: Profiling of structurally related p38 α kinase inhibitors using cell - based assays [J]. Assay and Drug Development Technologies, 2006, 4(4): 397 - 409
- [54] Kim M J, Lee S C, Pal S, et al. High content screening of drug - induced cardiotoxicity using quantitative single cell imaging cytometry on microfluidic device [J]. Lab on a Chip, 2011, 11(1): 104 - 114
- [55] Blake B L. Toxicology of the nervous system [M]// A Textbook of Modern Toxicology. Third Edition. 2004: 279-297
- [56] Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease [J]. Nature Medicine, 2000, 6(8): 916 919
- [57] Breier J M, Radio N M, Mundy W R, et al. Development of a high-throughput screening assay for chemical effects on proliferation and viability of immortalized human neural progenitor cells [J]. Toxicological Sciences, 2008, 105(1): 119 133
- [58] Harrill J A, Robinette B L, Mundy W R. Use of high

- content image analysis to detect chemical-induced changes in synaptogenesis in vitro [J]. Toxicology in Vitro, 2011, 25(1): 368 387
- [59] Raftery T D, Isales G M, Yozzo K L, et al. High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(1): 804 – 810
- [60] Macdonald M L, Lamerdin J, Owens S, et al. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells [J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2(6): 329-337
- [61] Abassi Y A, Xi B, Zhang W, et al. Kinetic cell-based morphological screening: Prediction of mechanism of compound action and off-target effects [J]. Chemistry Biology, 2009, 16(7): 712-723
- [62] Bender A, Scheiber J, Glick M, et al. Cover Picture: A-nalysis of pharmacology data and the prediction of adverse drug reactions and off-target effects from chemical structure [J]. ChemMedChem, 2007, 2(6): 861 873
- [63] Ravindranath A C, Perualila-Tan N, Kasim A, et al. Connecting gene expression data from connectivity map and in silico target predictions for small molecule mechanism-of-action analysis [J]. Molecular BioSystems, 2015, 11(1): 86 - 96
- [64] 穆蕊, 李腾, 高彦飞, 等. 高内涵筛选 NF-κB 信号通路 的技术体系建立[J]. 科学技术与工程, 2011, 11 (14): 3162-3164
- [65] Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-κB "by phosphorylation of it's inhibitor IκB" [J]. Nature, 1990, 344(6267): 678 - 682
- [66] Giuliano K A, Chen Y T, Taylor D L. High-content screening with siRNA optimizes a cell biological approach to drug discovery: Defining the role of P53 activation in the cellular response to anticancer drugs [J]. Journal of Biomolecular Screening, 2004, 9(7): 557 - 568
- [67] Wang J, Zhou X, Bradley P L, et al. Cellular phenotype recognition for high-content RNA interference genome-wide screening [J]. Journal of Biomolecular Screening, 2008, 13(1): 29 - 39
- [68] Dragunow M. High-content analysis in neuroscience[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2008, 9(10): 779 788
- [69] Wawer M J, Li K, Gustafsdottir S M, et al. Toward performance-diverse small-molecule libraries for cell-based phenotypic screening using multiplexed high-dimensional profiling [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(30): 10911 - 10916
- [70] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, et al. RNAi: Doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. Cell, 2000,

- 101(1): 25 33
- [71] Papdi C, brahám E, Joseph M P, et al. Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system[J]. Plant physiology, 2008, 147(2): 528 542.
- [72] Walsh D P, Chang Y-T. Chemical genetics [J]. Chemical Reviews, 2006, 106(6): 2476 2530
- [73] Eggert U S, Kiger A A, Richter C, et al. Parallel chemical genetic and genome wide RNAi screens identify cytokinesis inhibitors and targets [J]. PLoS Biology, 2004, 2(12): e379
- [74] Westerink W, Schoonen W G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells
 [J]. Toxicology in Vitro, 2007, 21(8): 1581 1591
- [75] Tolosa L, Donato M T, Pérez Cataldo G, et al. Upgrading cytochrome P450 activity in HepG2 cells co-transfected with adenoviral vectors for drug hepatotoxicity assessment [J]. Toxicology in Vitro, 2012, 26 (8): 1272 1277
- [76] Astashkina A, Mann B, Grainger D W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high throughput drug screening and toxicity [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2012, 134(1): 82 106
- [77] Lin Z, Will Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ specific cell lines [J]. Toxicological Sciences, 2012, 126(1): 114 - 127
- [78] Bertino Jr J, Fish D. The safety profile of the fluoroquinolones [J]. Clinical Therapeutics, 2000, 22(7): 798 - 817
- [79] Liguori M J, Blomme E A, Waring J F. Trovafloxacin-in-duced gene expression changes in liver derived in vitro systems: Comparison of primary human hepatocytes to HepG2 cells [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2008, 36(2): 223 233
- [80] Shaw P J, Ganey P E, Roth R A. Tumor necrosis factorα is a proximal mediator of synergistic hepatotoxicity from trovafloxacin/lipopolysaccharide coexposure [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009, 328(1): 62 - 68
- [81] Roth A, Singer T. The application of 3D cell models to support drug safety assessment: Opportunities & challenges [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014, 69: 179-189
- [82] Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, et al. 3D high content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions [J]. Experimental Cell Research, 2014, 323(1): 131 143
- [83] 张波,杨萍,陈雯.基于毒性通路的毒理学危险度评价 方法[J].中华预防医学杂志,2010,44(7):587-590