

基于细胞模型的高通量筛选技术在药物研发中的应用进展

朱丽萍^{1,2}, 王心睿^{2,3*} (1.福建省儿童医院, 福州 350011; 2.福建医科大学附属福建省妇幼保健院医学研究中心, 福州 350001; 3.国家卫健委非人灵长类生育调节技术评价重点实验室, 福州 350013)

摘要: 发现一种具有临床疗效的新药, 通常需要对成千上万种化合物进行逐一筛选, 获得目标化合物后, 再对其进行进一步深入验证, 这个过程工作量大且周期长。高通量高内涵筛选技术的出现缩短发现目标化合物的时间, 选用适当的生物模型提高了目标化合物的验证结果的准确性。本文主要针对干细胞生物模型、CRISPR/Cas9 基因编辑细胞模型及 3D 细胞培养模型在高通量高内涵药物筛选中的应用作一综述, 同时简述了这些方法在妇科肿瘤治疗药物研发中的应用。

关键词: 高通量; 高内涵; 干细胞; CRISPR/Cas9; 3D 细胞培养

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)23-3050-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.023

引用本文: 朱丽萍, 王心睿. 基于细胞模型的高通量筛选技术在药物研发中的应用进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 3050-3056.

Advances in the Application of High-throughput Screening Techniques Based on Cell Models in Drug Development

ZHU Liping^{1,2}, WANG Xinrui^{2,3*} (1.Fujian Children's Hospital, Fuzhou 350011, China; 2.Medical Research Center, Fujian Maternity and Child Health Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 3.Key Laboratory of Technical Evaluation of Fertility Regulation for Non-human Primate, National Health and Family Planning Commission, Fuzhou, 350013, China)

ABSTRACT: The discovery of a new drug with clinical efficacy usually requires the screening of thousands of compounds one by one. When the target compound is obtained, it needs to be further verified. This process requires a lot of work and a long cycle. The emergence of high throughput and high content screening technology has shortened the time to find effective drugs, and the selection of appropriate biological models has improved the accuracy of screening results. This article mainly reviews the applications of stem cell biological models, CRISPR/Cas9 gene editing cell models, and 3D cell culture models in high throughput and high content drug screening, and briefly describes the application of these methods in the research and development of drugs for the treatment of women's malignant tumors.

KEYWORDS: high throughput screening; high content screening; stem cell; CRISPR/Cas9; 3D cell culture

高通量药物筛选技术在 20 世纪 80 年代就已应用于创新药物的研发, 它是以药物发现的基本规律为基础, 应用药理学、生物化学、分子生物学及细胞生物学、计算机科学、药物化学、组合化学等多个学科知识的一种药物筛选体系。经过三十来年的发展, 通过提高仪器制造技术、生物检测手段、计算机数据分析软件的功能等, 使高通量筛选技术朝着日筛选规模越来越大、速度越来越快的方向发展。但由于高通量筛选主要在分子水平筛选, 筛选模式单一, 具有应用局限性^[1]。因此, 以多指标多靶点为特点的高内涵药物筛选技术应运而生。

高内涵筛选技术是指在保持细胞结构和功能完整性的前提下, 同时检测被筛选样品对细胞的

多种属性及生理状态(如细胞形态、生长分化状态、迁移与凋亡、细胞代谢途径以及信号通路的各个环节)影响的高通量筛选方法^[2]。同时, 也是一种应用高分辨率的荧光数码影像系统, 可获得被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息。高内涵筛选技术在增加筛选靶标, 筛选指标的同时并不增加样品的消耗, 且一次筛选获得多样化结果, 它加快了鉴定高价值靶点的过程, 同时也降低了筛选成本。高通量筛选与高内涵筛选、自动化控制系统的结合出现, 为新药物的发现提供了更快捷有效的方法, 在制药业和学术界逐步成为药物发现和开发的基本工具^[3]。随着实验技术的不断发展, 细胞模型从原有的普通单层细胞培养模型发展出了多种细胞生物模型, 如: 诱

基金项目: 福建省妇幼保健院科技创新启动基金项目(妇幼 YCXB 18-05; 妇幼 YCXM 19-03)

作者简介: 朱丽萍, 女, 硕士, 技师 Tel: 15859137081 E-mail: 380218092@qq.com *通信作者: 王心睿, 男, 博士, 助理研究员 Tel: 18065002860 E-mail: wanxiru@sytu.edu.cn

导多能干细胞(human induced pluripotent stem cell, hiPSC)、CRISPR/Cas9 基因编辑细胞、立体3D 细胞培养模型等,为药物研究提供了更准确的生物模型。本文就从不同细胞生物模型在高通量、高内涵筛选中的应用作一综述,并简要概述这些细胞生物模型在妇女恶性肿瘤治疗药物研发中的应用。

1 干细胞生物模型

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,可分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)和成体干细胞。近年来,人们通过现有技术手段,将成年体细胞通过基因重编程获得干细胞,这类干细胞称为 hiPSC。iPSC 具有 ESCs 类似的功能,能自我更新及分化成包括三胚层在内的所有细胞类型^[4]。此外,对肿瘤组织研究的不断深入,发现肿瘤组织中存在低分化的肿瘤细胞,具有诱导肿瘤自我更新的能力,被称作肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)^[5]。

由于 iPSC 具有多种功能的干细胞特性,可为体外干细胞的研究和细胞治疗提供丰富的细胞来源,并且规避了 ESCs 的伦理学争议和移植后的免疫排斥问题,为药物研发提供良好的药物筛选和研究模型^[6]。利用 iPSC 技术获得适合药物筛选的细胞模型,结合高通量、高内涵筛选技术,可快速、高效地对大量化合物进行活性筛选和毒性评价等药物筛选活动,为经济有效地研发新药提供潜能^[7]。

开发以 hiPSC 来源的神经细胞的高通量筛选技术平台对于实现其潜在的药物发现至关重要。Sherman 等^[8]用皮质样 hiPSC 衍生的神经元细胞为研究对象,以广谱激酶抑制剂星形孢菌素为阳性对照化合物,用 384 孔板对 4 421 种化合物进行高通量筛选,分析化合物对神经元细胞不同参数的影响(如神经元核数量、神经突长度、神经末梢数目、节段、结节类型等),通过初筛和再筛确定了 50 种促生长化合物和 58 种抑制生长化合物,而后从中选出 24 种具有代表性的化合物进行作用靶标的研究,确认了神经突的激酶抑制剂、神经递质系统的调节剂、类固醇激素受体的调节剂等多种化合物。该技术平台通过数据分析对比展示了使用基于图像的自动化方法对神经突生长的 hiPSC 衍生神经元的高通量药物筛选可行性。Elcheva 团队用 hiPSC 衍生的髓样血管内皮细胞和血细胞进

行药物毒性筛选^[9]。在 NIEHS 国家毒理学化合物库选择了 22 种化学物质,进行多次高通量筛选,发现 5-氟尿嘧啶、盐酸小檗碱和苯并芘的血管内皮毒性以细胞周期调节因子的下调和造血程序向非血源性内皮细胞的转移为特征,该系统的筛选结果与药物先前的体内外作用结果一致,表明该系统可有效监控化合物对 hiPSC 衍生的髓样祖细胞的各种不利影响,并提供了一个方便的平台,可进行骨髓抑制药物谱分析以及针对髓样转录网络和内皮转化的药物机制研究。

HiPSC 的干细胞特性——可分化为目标细胞或组织的特异性,应用高内涵成像系统筛选出具有治疗意义的 hiPSC 衍生的细胞或组织,为药物筛选提供适宜的细胞模型也是药物开发的研究重点。Durens 等^[10]用 hiPSC 衍生的脑器官无血清胚状体(serum-free embryoid body, SFEB),采用高内涵成像评估 SFEB 中的神经突生长和细胞组成,实验结果获得了 SFEB 中枢兴奋性神经元数量、神经突的形态,同时了解到影响 SFEB 形成的相关因子。hiPSC 衍生的 SFEB 可成为表型药物筛选的一种细胞模型。也有研究者使用 hiPSC 衍生的心肌细胞和内皮细胞,采用高内涵平台成像分析,获知心肌细胞和内皮细胞在细胞和亚细胞水平的细胞类型特异性图谱,为候选化合物提供靶点结合位点的参考细胞模型^[11]。

CSC 的存在导致大多数肿瘤在治疗过程中出现耐药、病灶转移等情况,使得肿瘤治疗的预后差。对 CSC 表型研究发现,区别于正常组织细胞和一般肿瘤细胞的特异分子,可开发靶向肿瘤治疗新型疗法。有研究者对 CSC 进行靶向分子研究,并通过高通量表型分子筛选,发现选择性靶向人类结肠癌干细胞的新型分子,并提供了详细的实验操作方案^[12]。Wurdak 等^[13]对应用高通量筛选技术探索 CSC 表型进行了研究讨论,展现了基于 RNAi 的高通量筛选在发现不同肿瘤干细胞表型的应用,如乳腺癌干细胞可以通过上皮-间质转化的过程生成,应用高通量筛选方法鉴定能特异性杀死上皮 CSC 的化学试剂,其采用永生化的不具有致瘤能力和(或)CSC 特征的乳腺上皮细胞系,和针对细胞黏附分子 E-钙黏着蛋白 RNAi 诱导的间充质干细胞系为实验对象,使用化学试剂比较筛选大约 16 000 种化合物的文库,选择在 CSC 样细胞中选择性诱导凋亡的潜在“命中”剂用于进一步的验证

实验,筛选确定了单羧酸聚醚抗菌药物沙利霉素是一种有前途的抗 CSC 药物,可在体外和小鼠体内抑制 CSC 基因标记和乳腺肿瘤的生长^[13-14]。Yang 等^[15]用定量高通量筛选技术筛选靶向 CSC 的 ALDH1A1 的小分子抑制剂,通过筛选获得了以茶碱为活性中心的化合物,并进行进一步的分子结构研究,表明基于茶碱为核心的化合物在结构上不同于现有的 ALDH 抑制剂,其具有结构特异性,可作为活性中心,进行分子结构改造,为 ALDH1A1 抑制剂研究提供更多方案。

2 CRISPR/Cas9 基因编辑细胞生物模型

基因编辑技术是一种通过程序化的人工核酸酶对基因组 DNA 序列进行改造的遗传操作技术,是一种可用于疾病机制研究、药物研究以及疾病治疗的手段,它给生命科学研究领域带来了革命性的变化^[16]。现在普遍使用的基因编辑技术主要利用人工核酸酶进行基因切割重组,根据人工核酸酶的不同,将基因编辑技术分为以下 3 种: 锌指核酸酶技术(zinc finger nucleases, ZFN)、类转录激活因子效应的核酸酶技术(transcription activator-like effectors nucleases, TALEN)和规律成簇的间隔短回文重复相关蛋白技术 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)^[17]。ZFN 技术和 TALEN 技术分别为第一代、第二代基因编辑技术,但由于均存在一些局限性无法进行高通量的基因编辑而未被广泛运用。CRISPR 技术是第三代基因编辑技术,在张峰团队开发出 CRISPR/Cas9 基因编辑技术后,采用基因编辑技术改造后的细胞进行疾病或药物研究受到广大研究者的关注,开启了基因编辑领域的新篇章。

CRISPR 系统的高通量筛选平台包括 Cas9/sgRNA、CRISPR 干扰和 CRISPR 激活。Cas9/sgRNA 筛选平台通过设计针对目的基因的 sgRNA,与 Cas9 靶向结合导致部分序列的插入或缺失;CRISPR 干扰和 CRISPR 激活筛选平台促进通过灭活核酸酶活性后的 Cas9,在引入转录抑制剂或激活因子作用下与目的 sgRNA 相结合,从而抑制或激活目的基因表达^[18]。通过 CRISPR/Cas9 技术构建细胞株,与高通量、高内涵筛选技术结合,可进行药物靶标筛选及抗体筛选。

有研究者通过对小分子文库高通量筛选发现,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是未被认识的肿瘤免疫靶标,EGFR 抑制剂

厄洛替尼是增强肿瘤细胞 T 细胞杀伤力的最强化合物。为验证高通量筛选结果,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑构建稳定表达 Cas9 的 ID8-Cas9 细胞;并针对 EGFR 目的基因设计了 8 000 个 sgRNA,通过高通量筛选鉴定出单独靶向 EGFR 的 sgRNA,将该 sgRNA 转入 ID8-Cas9 细胞中制备单个稳定的 EGFR KO 细胞系,验证了 EGFR 敲除后肿瘤细胞对 T 细胞杀伤的敏感性增强,EGFR 是肿瘤免疫靶标^[19](图 1)。也有研究者通过 CRISPR/Cas9 的表观基因组编辑技术对表观基因组调控元件进行高通量筛选,精确干扰特定调控元件的活性,识别出已知和未知的调节元件,为各种适应症提供一类新的药物靶标^[20]。

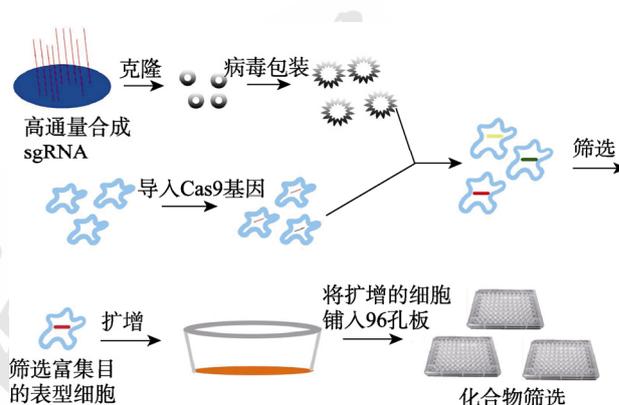


图 1 高通量筛选技术联合 CRISPR/Cas9 技术进行化合物高通量筛选流程图

Fig. 1 Flow chart of high-throughput screening combined with CRISPR/Cas9 technology for compound screening

CRISPR/Cas9 基因编辑技术进行高通量筛选特异性抗体的应用,提高抗体研发效率。哺乳动物细胞具有噬菌体或酵母菌无法取代的优势,是抗体生产最为关键的场所。然而,哺乳动物细胞基因组整合文库太小,且每个细胞有多个抗体变体,严重限制了它们的抗体筛选效率。为了解决这一限制,有团队开发了同源定向诱变(homologous directed mutagenesis, HDM),这是一种扩展 CRISPR/Cas9 介导的同源定向修复(homologous directed repair, HDR)概念的新方法。HDM 利用 Cas9 技术将具有简并密码子的寡核苷酸在哺乳动物细胞中生成定点诱变文库。将细胞通过磁性辅助细胞分选和流式细胞分选在含有定点诱变文库的细胞中高通量筛选抗体,并对潜在的候选抗体进行亲和力改造。实验中获得了具有独特 CDRH3 序列的特异性抗体,验证了该方法的

可行性^[21]。Ministro 等^[22]通过使用 CRISPR/Cas9 技术构建哺乳动物细胞内质网合成文库，开发了针对天然抗原的新型高通量抗体发现平台，这将有助于更快地发现新的生物治疗分子，从而缩短上市时间。

CRISPR/Cas9 介导的基因编辑工程通过同源重组产生内源标记的荧光蛋白，促进由内源性启动子和增强子序列控制的荧光蛋白的表达来报告细胞系的信息。此类方法已广泛用于 ESC 和体内，并为细胞途径的空间和动态控制提供重要线索。但在高内涵筛选分析方面，大多数常用细胞系应用还很少。有调查报告显示大多数已发布的高内涵筛选不是多参数的，仅部分利用了图像数据的丰富性^[23]。如有研究者通过 CRISPR/Cas9 技术对 Niemann-Pick C1(NPC1)基因进行敲除，在高内涵成像下评估 NPC1 变异亚型的细胞分布，发现 L472P 的变化会影响 NPC1 亚型的分布并损害该蛋白的胆固醇输出功能，导致机体脂肪代谢相关疾病^[24]。

CRISPR/Cas9 系统的开发为高通量鉴定基因的功能提供了不可或缺的条件。生成的 sgRNA 文库在人类细胞中进行基于汇集功能的筛选，为研究人员提供了快速识别各种生物过程的可靠方法^[25]。在高内涵筛选平台中的检测软件、数据图像分析软件的不断优化更新后，CRISPR/Cas9 基因编辑技术会在更多领域得到充分应用。

3 三维立体(three dimension, 3D)细胞生物模型

3D 细胞模型是指将具有三维结构不同材料的载体与各种不同种类的细胞在体外共培养，使细胞能够在载体的 3D 空间结构中迁移、生长，构成三维的细胞-载体复合物，形成 3D 球体模型、类器官模型等立体模型。3D 细胞模型既能保留体内细胞微环境中的物质和结构基础，又能展现细胞培养的直观性和条件可控性，在肿瘤发生、生物学过程和逆转特性等方面，3D 细胞培养模型已成为有效的研究系统^[26-27]。与 2D 细胞培养模型相比，3D 细胞培养模型具有很大的区别。其一，具有不同的发育模式，并且可以发挥功能；其二，对治疗靶点的反应不同；其三，具有不同的基因表达模式。因此，3D 细胞培养模型是在 2D 细胞模型和动物模型起桥梁作用^[28]。

近年来，已有研究者采用不同的技术进行 3D 细胞培养，并验证了培养的 3D 细胞可用于高内涵

药物筛选。微流控芯片系统具有快速检测分析、信息量大、高通量等优点，在药物筛选应用中是热门的前沿技术之一^[29]。Kim 等^[30]应用微流体技术培养 3D 细胞，将其与高内涵联用可进行药物早期毒性筛选、药敏实验、药物作用机制等应用研究。Cevenini 等^[31]将荧光素酶导入 3D 细胞而获得发光球体，并对 3D 球体发出的荧光用高内涵成像进行条件优化，开发了无损实时球体的 BL 成像测定法，用于在 3D 细胞模型上进行纵向研究，报告了微模式 96 孔板高通量 BL 3D 细胞的测定，为从药物筛选到药物递送等领域的新型 3D 分析方法的开发铺平道路。李明彦等^[32]用具有干性潜能的 HepaRG 细胞建立类器官 3D 培养模型，通过高内涵成像技术，通过对类器官球体表型、活/死细胞数量、线粒体膜电位和细胞内活性氧进行研究来评价药物肝毒性，结果提示采用 HepaRG 细胞建立的类器官体外评价模型可以准确地评价阳性对照药胺碘酮、环孢霉素及阴性对照药阿司匹林的肝毒性差异。

随着 3D 培养技术的不断发展，高通量的 3D 细胞培养技术已被研究应用，并与高内涵联用进行药物的高通量筛选。Yu 研究团队^[33]开发了一种无微通道的 3D 细胞培养系统，该系统结合了水凝胶的凝胶单元和孔板，可联用高内涵进行高通量的药物筛选，通过对人类神经祖细胞模型阿尔茨海默病的几种治疗药物的验证，评估了该方法培养的 3D 细胞在药物高通量筛选中应用的可靠性。Lee 等^[34]采用优化微柱和微孔芯片平台，联用高内涵对 3D 细胞进行小型高通量药物筛选，结果显示在 70 种药物中有 41 种药物对 3D 培养的 A549 细胞系中 p-EGFR 表现出抑制作用，其中 11 种靶向 p-EGFR，对该 11 种药物进一步绘制基于 p-EGFR 和细胞生存力的剂量反应曲线，分析得出 AEE778 药物在 3D 培养的 A549 细胞中显示较高的 p-EGFR 抑制作用和药物功效。

来源于人体细胞培养的 3D 细胞模型模拟了复杂器官在机体中的微环境，应用 3D 细胞模型进行高通量药物毒性评价，可降低药物毒性评价成本，同时提高毒性评价结果的准确性。Joshi 团队^[35]使用生物 3D 打印技术进行高通量细胞打印，进而进行高通量药物毒性筛选，及时用微柱/微孔芯片平台生成微 3D 细胞培养物，在人的微型 3D 培养物中测量模型化合物的剂量效应，结合高内涵成像

对细胞内的 DNA 损伤、线粒体膜电位变化、细胞内谷胱甘肽的消耗和细胞膜完整性等信号进行图像分析, 获得模型化合物的毒性评估结果。通过 3D 细胞的微型化易于使整个样品深度适合正常物镜的聚焦深度, 且 3D 细胞培养的小型化减少了试剂消耗, 提高了稀有材料(如患者来源细胞)的利用率, 并进一步促进了组合方法和对微环境线索的高度控制, 从而使筛选结果具有高度可重复性^[35]。该团队围绕微型 3D 细胞培养如何应用高内涵成像高通量地进行化合物毒性评估做了具体方案描述及实验验证^[36-37]。3D 生物打印高通量药物筛选流程图见图 2。

4 高通量高内涵药物筛选在妇科常见肿瘤疾病中的应用

随着时代的快速发展, 妇女群体在社会建设中的参与率不断提高, 各种压力给妇女群体在心理、生理、社会角色等各方面都产生极大影响, 这将容易引发各种健康问题, 如妇科恶性肿瘤(宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌等), 严重影响众多妇女患者的生活质量。虽然当前有先进的医疗技术, 妇科肿瘤通过外科手术、放疗、化疗等治疗手段能够使患者延长生命, 但是这些医疗手段在疾病治疗中(特别是在恶性肿瘤中)仍然很局限。运用不同的细胞生物模型进行高通量、高内涵药物筛选, 发现更具有临床应用价值的新药已迫在眉睫。

iPSC、CSC 都具有胚胎干细胞自我更新和分化的能力, 但 iPSC 表现为正常干细胞增殖的特性;

CSC 是在肿瘤组织中具有自我更新能力并且能够产生肿瘤细胞的一类细胞^[38]。针对 CSC 的药物开发有望在肿瘤治疗中提高治愈率。Ricci 等^[39]用卵巢癌干细胞(#83-SC、#110-SC)及它们衍生的分化细胞(#83-DC、#110-DC), 通过对 576 种化合物进行高通量筛选, 寻找具有靶向卵巢癌干细胞活性的化合物, 从筛选结果可知有些化合物仅对癌症干细胞具有活性, 有些化合物仅对分化细胞具有活性, 而有些化合物对癌症干细胞及其分化细胞均具有活性。Mezencev 等^[40]用卵巢癌干细胞对来源于美国国家癌症研究所化合物库中的 825 个化合物进行基于细胞毒性的高通量筛选, 筛选出具有可评估数据的化合物 739 种, 其中有 158 种化合物对卵巢癌干细胞具有明显的抑制作用。根据这些筛选结果, 可进一步实验验证获得能够改善卵巢癌患者预后的化合物。

3D 细胞体外模型模拟了体内环境状态, 使得体外药物筛选结果更趋近于体内药物作用结果。有研究者应用乳腺癌细胞 T-47D11 细胞培养成 3D 球体模型, 结合电子毛细血管传感器系统, 对癌症治疗中的细胞毒性药物进行高内涵筛选, 并成功展示了该系统最有效的高内涵筛选模块修饰和药物应用^[41]。也有研究者应用微流控细胞培养阵列芯片技术培养了乳腺癌细胞 3D 组织, 并用阿霉素、紫杉醇和顺铂对 3D 乳腺癌组织进行抗乳腺癌药物组合筛选, 结果显示这种微流控芯片能够以高度仿真的组织实现多药组合测试, 具有成为高通量药物组合筛选的有利技术平台的潜力^[42]。

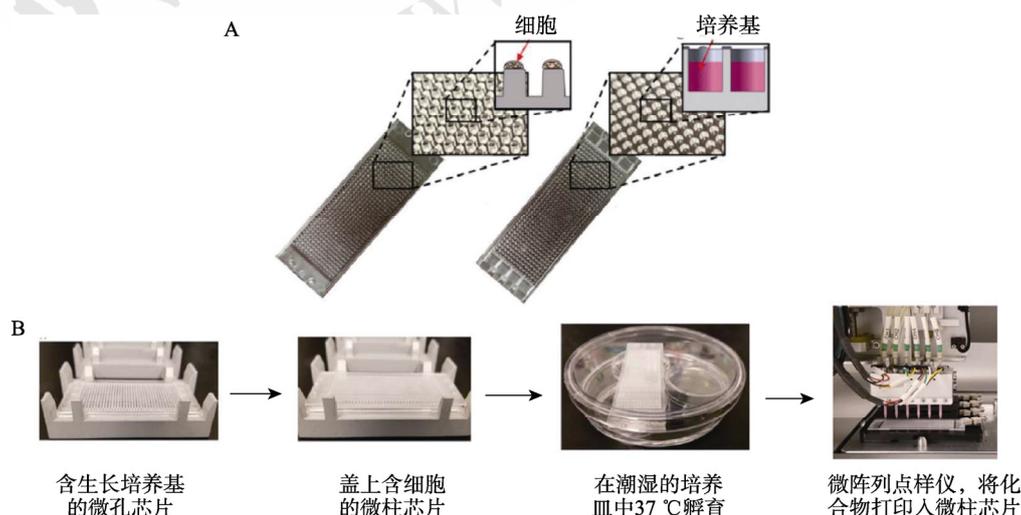


图 2 3D 生物打印高通量药物筛选流程图^[37]

A-微阵列芯片平板; B-微阵列芯片 3D 细胞培养及高通量药物筛选流程。

Fig. 2 Flow chart of 3D bio-printing high-throughput drug screening^[37]

A-microarray chip plate; B-microarray chip 3D cell culture and high-throughput drug screening process.

肿瘤微环境的改变也影响着肿瘤的转移和耐药的发生。卵巢癌的不良预后也与肿瘤的转移有关。Kenny 和 Lal-Nag 等^[43-44]用 3D 细胞培养模型对卵巢癌细胞体的肿瘤微环境进行研究,通过高通量药物筛选技术研究在不同肿瘤微环境中化合物对卵巢癌细胞增殖、迁移的影响。Klein 等^[45]探究了缺氧状态对肿瘤微环境的影响,通过体外 3D 卵巢癌细胞模型和高内涵定量成像分析相结合,筛选了缺氧肿瘤环境中化合物对卵巢癌的耐药和转移的作用。这些筛选结果表明,肿瘤微环境中的细胞环境和细胞黏附模式在肿瘤细胞耐药性中都具有重要作用,用 3D 模型系统能更真实地概括肿瘤生长和转移部位的组织组成。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在妇科肿瘤方面的高通量药物筛选报道还很少,但 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在妇科肿瘤方面的疾病机制研究已有应用,相信随着该技术应用的不深入,在妇科肿瘤药物治疗的开发领域会起到重要作用。

5 总结和展望

高通量、高内涵筛选为新药研发提供了低成本、高效率的技术平台。高内涵筛选方法的引入,从单一靶标的分子筛选发展到细胞水平的多靶标筛选,提供了更丰富的药物筛选信息,为筛选结果提高了质量保障。在筛选细胞模型中的 hiPSC、CRISPR/Cas9 基因编辑细胞模型、3D 细胞培养模型的应用,贴近了疾病发生状态、提高了疾病针对性,且模仿了机体内环境,无疑为提高药物筛选结果质量有很大帮助,同时提高药物研发企业新药的临床转化率。虽然这些生物模型仍然还有很多局限性,如 hiPSC 的来源种类少、基因编辑细胞脱靶的出现及 3D 球体模型检测深度的缺陷等影响着这些生物模型的广泛应用。但科学在不断进步,技术在不断优化,目前已有研究者应用高通量筛选技术发现 CRISPR/Cas9 的小分子抑制剂,可精确控制野生型和工程改造型细胞的 Cas9 剂量和作用时间范围,为降低脱靶效应、染色体异位和遗传毒性提供解决方案^[46]。此外,生物分子成像和信息学学会近年来对不同细胞生物模型(如 3D 细胞、干细胞、器官芯片等)在高通量、高内涵药物筛选中如何应用做了多场国际论坛讨论,可为高通量、高内涵药物筛选平台的优化提供更多的指导性意见。将来高通量、高内涵筛选获得庞大数据集应用人工智能来处理分析数据,也是筛选平台优化的一个亮点。

REFERENCES

- [1] 杜冠华. 新药发现与高通量药物筛选[J]. 医药导报, 2001, 20(6): 339-340.
- [2] ZHANG L, DU G H. High content drug screening and its application[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2005, 40(6): 486-490.
- [3] FRAIETTA I, GASPARRI F. The development of high-content screening(HCS) technology and its importance to drug discovery[J]. Expert Opin Drug Discov, 2016, 11(5): 501-514.
- [4] CHEN J Q, YANG X Y, FU B F, et al. Generation of human induced pluripotent stem cell(SKLRMi001-A) from a patient with partial androgen insensitivity syndrome(PAIS)[J]. Stem Cell Res, 2020(46): 101863. Doi: 10.1016/j.scr.2020.101730.
- [5] YE T, LI J, SUN Z, et al. Nr5a2 promotes cancer stem cell properties and tumorigenesis in nonsmall cell lung cancer by regulating Nanog[J]. Cancer Med, 2019, 8(3): 1232-1245.
- [6] LI X, ZHAO Z L, LUO X T, et al. Research progress of in the inducers stimulating in differentiation of iPS cells into male germ cells[J]. J Chin Biotechnol(中国生物工程杂志), 2019, 39(4): 94-100.
- [7] BOYD J D, HOFFMAN A F, GEBHARD D. Society of biomolecular imaging and informatics high-content screening/high-content analysis preclinical translational imaging colloquium: How emerging technologies in disease models, high-content imaging, and data analytics are changing our approach to drug discovery[J]. ASSAY Drug Dev Technol, 2019, 17(1): 3-7.
- [8] SHERMAN S P, BANG A G. High-throughput screen for compounds that modulate neurite growth of human induced pluripotent stem cell derived neurons[J]. Dis Model Mech, 2018. Doi: 10.1242/dmm.031906.
- [9] ELCHEVA I, SNEED M, FRAZEE S, et al. A novel hiPSC-derived system for hematoendothelial and myeloid blood toxicity screens identifies compounds promoting and inhibiting endothelial-to-hematopoietic transition[J]. Toxicol Vitro, 2019(61): 104622. Doi: 10.1016/j.tiv.2019.104622.
- [10] DURENS M, NESTOR J, WILLIAMS M, et al. High-throughput screening of human induced pluripotent stem cell-derived brain organoids[J]. J Neurosci Methods, 2020(335): 108627. Doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108627.
- [11] BERECZ T, HUSVÉTH-TÓTH M, MIOULANE M, et al. Generation and analysis of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and endothelial cells for high content screening purposes[J]. Methods Mol Biol, 2019. Doi: 10.1007/7651_2019_222.
- [12] BENOIT Y D. Identification of novel molecules targeting cancer stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2018(1765): 333-347.
- [13] WURDAK H. Exploring the cancer stem cell phenotype with high-throughput screening applications[J]. Futur Med Chem, 2012, 4(10): 1229-1241.
- [14] GUPTA P B, ONDER T T, JIANG G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4): 645-659.
- [15] YANG S M, YASGAR A, MILLER B, et al. Discovery of NCT-501, a potent and selective theophylline-based inhibitor of aldehyde dehydrogenase 1A1(ALDH1A1)[J]. J Med Chem, 2015, 58(15): 5967-5978.
- [16] XIE Y F, WANG Y M. Principles and applications of genome-editing technologies in cancer research[J]. Chin J Cancer Biotherapy(中国肿瘤生物治疗杂志), 2017, 24(8): 815-827.
- [17] LIU Y, XIONG Y Z, CAI Z Z, et al. Development and

- challenges of gene editing technology[J]. *Chin J Biotechnol(生物工程学报)*, 2019, 35(8): 1401-1410.
- [18] ZHANG Y, WANG K Z, GUO Z K, et al. CRISPR/Cas9 gene editing technology and its application in tumor immunotherapy [J]. *Chin Med Biotechnol(中国医药生物技术)*, 2019, 14(4): 358-360, 328.
- [19] LIZOTTE P H, HONG R L, LUSTER T A, et al. A high-throughput immune-oncology screen identifies EGFR inhibitors as potent enhancers of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte tumor cell killing[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(12): 1511-1523.
- [20] KLANN T S, BLACK J B, CHELLAPPAN M, et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 561-568.
- [21] MASON D M, WEBER C R, PAROLA C, et al. High-throughput antibody engineering in mammalian cells by CRISPR/Cas9-mediated homology-directed mutagenesis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(14): 7436-7449.
- [22] MINISTRO J H, OLIVEIRA S S, OLIVEIRA J G, et al. Synthetic antibody discovery against native antigens by CRISPR/Cas9-library generation and endoplasmic reticulum screening[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(6): 2501-2512.
- [23] BOUTROS M, HEIGWER F, LAUFER C. Microscopy-based high-content screening[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1314-1325.
- [24] VANHARANTA L, PERÄNEN J, PFISTERER S G, et al. High-content imaging and structure-based predictions reveal functional differences between Niemann-Pick C1 variants[J]. *Traffic*, 2020, 21(5): 386-397.
- [25] ZHU S Y, ZHOU Y X, WEI W S. Genome-wide CRISPR/Cas9 screening for high-throughput functional genomics in human cells[J]. *Methods Mol Biol Clifton N J*, 2017(1656): 175-181.
- [26] 马璟, 汪溪洁, 汤纳平, 等. 三维立体(3D)细胞模型在药物早期毒性筛选中的应用[C]//2017年(第七届)药物毒理学年会论文集. 太原, 2017: 30-31.
- [27] LUO J, GAO J Q. Construction of 3D multicellular tumor spheroid model and its application in drug screening and preparation evaluation[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2018, 35(4): 609-614.
- [28] DONG Y Q. Establishment of 3D cells culture model for individualized tumor therapy and study of its characteristics[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2016.
- [29] PANG L, MA L D, MENG X S, et al. Advances of microfluidic chip system in cell-based drug screening research[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2015, 32(12): 1518-1525.
- [30] KIM J A, HONG S, RHEE W J. Microfluidic three-dimensional cell culture of stem cells for high-throughput analysis[J]. *World J Stem Cells*, 2019, 11(10): 803-816.
- [31] CEVENINI L, CALABRETTA M M, LOPRESIDE A, et al. Bioluminescence imaging of spheroids for high-throughput longitudinal studies on 3D cell culture models[J]. *Photochem Photobiol*, 2017, 93(2): 531-535.
- [32] LI M Y, LI C Y, LU X H, et al. The three dimensional organoids- based high content imaging model for hepatotoxicity assessment[J]. *Acta Pharm Sin(药理学学报)*, 2017, 52(7): 1055-1062.
- [33] YU Y J, KIM Y H, NA K, et al. Hydrogel-incorporating unit in a well: 3D cell culture for high-throughput analysis[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(17): 2604-2613.
- [34] LEE S Y, DOH I, NAM D H, et al. 3D cell-based high-content screening(HCS) using a micropillar and microwell chip platform[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(14): 8354-8361.
- [35] JOSHI P, KANG S Y, DATAR A, et al. High-throughput assessment of mechanistic toxicity of chemicals in miniaturized 3D cell culture[J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2019, 79(1): e66. Doi: 10.1002/cptx.66.
- [36] JOSHI P, KANG S Y, YU K N, et al. High-content imaging of 3D-cultured neural stem cells on a 384-pillar plate for the assessment of cytotoxicity[J]. *Toxicol Vitro*, 2020(65): 104765. Doi: 10.1016/j.tiv.2020.104765.
- [37] JOSHI P, YU K N, KANG S Y, et al. 3D-cultured neural stem cell microarrays on a micropillar chip for high-throughput developmental neurotoxicology[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370(2): 680-691.
- [38] 李振华, 刘芳芳, 谷峰, 等. 诱导性多能干细胞的研究进展及其在乳腺癌治疗中的应用[J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(4): 291-293.
- [39] RICCI F, CARRASSA L, CHRISTODOULOU M S, et al. A high-throughput screening of a chemical compound library in ovarian cancer stem cells[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2018, 21(1): 50-56.
- [40] MEZENCEV R, WANG L J, MCDONALD J F. Identification of inhibitors of ovarian cancer stem-like cells by high-throughput screening[J]. *J Ovarian Res*, 2012, 5(1): 30. Doi: 10.1186/1757-2215-5-30.
- [41] BARTHOLOMÄ P, IMPIDJATI, REININGER-MACK A, et al. A more aggressive breast cancer spheroid model coupled to an electronic capillary sensor system for a high-content screening of cytotoxic agents in cancer therapy: 3-dimensional *in vitro* tumor spheroids as a screening model[J]. *J Biomol Screen*, 2005, 10(7): 705-714.
- [42] LIN J Q. Open-access microfluidic tissue array system for screening of anti-cancer drug combinations[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2017.
- [43] KENNY H A, LAL-NAG M, SHEN M, et al. Quantitative high-throughput screening using an organotypic model identifies compounds that inhibit ovarian cancer metastasis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(1): 52-62.
- [44] LAL-NAG M, MCGEE L, GUHA R, et al. A high-throughput screening model of the tumor microenvironment for ovarian cancer cell growth[J]. *SLAS DISCOVERY: Adv Sci Drug Discov*, 2017, 22(5): 494-506.
- [45] KLEIN O J, BHAYANA B, PARK Y J, et al. *In vitro* optimization of EtNBS-PDT against hypoxic tumor environments with a tiered, high-content, 3D model optical screening platform[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(11): 3171-3182.
- [46] MAJI B, GANGOPADHYAY S A, LEE M, et al. A high-throughput platform to identify small-molecule inhibitors of CRISPR-Cas9[J]. *Cell*, 2019, 177(4): 1067-1079.

收稿日期: 2020-09-30
 (本文责编: 曹粤锋)