

实时无标记细胞分析系统 (RTCA) 在药物心肌毒性检测和生物活性研究中的应用

张旭¹, 王瑞莹², 陈荣昌², 徐丽娇¹, 孙晓波², 于森¹, 孙桂波²

1 哈尔滨商业大学 药学院 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100094

张旭, 王瑞莹, 陈荣昌, 等. 实时无标记细胞分析系统 (RTCA) 在药物心肌毒性检测和生物活性研究中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2425-2434.

Zhang X, Wang RY, Chen RC, et al. Evaluation of drug myocardial toxicity and biological activity by real time xCELLigence analysis: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2425-2434.

摘 要: 实时无标记细胞分析系统 (Real time xCELLigence analysis system, RTCA) 是一种新型细胞检测技术, 能够连续监测、记录及分析细胞活动产生的各种信息, 在药物研究中的心肌毒性评估和细胞生物活性考察方面都可以发挥重要作用。文中首先对 RTCA 的原理与特点进行了介绍, 然后分别对 RTCA 在心肌毒性和细胞生物活性研究中的应用现状进行了综述, 为了解和使用 RTCA 提供了参考。RTCA 技术具有实时无标记、非侵入性、高通量、准确性高等特点, 不仅有助于药物研究和新药开发, 在其他一些领域也有着广阔良好的应用前景。

关键词: 实时无标记细胞分析系统, 药物研究, 心肌毒性, 生物活性, 细胞检测

Evaluation of drug myocardial toxicity and biological activity by real time xCELLigence analysis: a review

Xu Zhang¹, Ruiying Wang², Rongchang Chen², Lijiao Xu¹, Xiaobo Sun², Miao Yu¹, and Guibo Sun²

1 Engineering Research Center for Medicine, College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, Heilongjiang, China

2 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China

Abstract: Realtime xCELLigence analysis (RTCA) is a new cell detection technology to continuously monitor, record and

Received: September 4, 2020; **Accepted:** December 22, 2020

Supported by: Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. 2018PT35030), the Drug Innovation Major Project (No. 2018ZX09711001-009), Peking Union Medical College Graduate Student Innovation Fund (No. 2019-1007-16).

Corresponding authors: Miao Yu. Tel: +86-451-84866922; E-mail: yumiao913@163.com

Guibo Sun. Tel: +86-10-57833200; E-mail: sunguibo@126.com

中央级公益性科研院所基本科研业务费项目基金 (No. 2018PT35030), “重大新药创制”科技重大专项资金 (No. 2018ZX09711001-009), 北京协和医科大学研究生创新基金 (No. 2019-1007-16) 资助。

网络出版时间: 2021-01-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210111.1125.007.html>

analyze a variety of information generated by cell activity. In drug research, it plays an important role in assessing myocardial toxicity and cell biological activity. Here, we first introduce the underlying mechanisms and characteristics of RTCA. Then we review the applications of RTCA in the research of myocardial toxicity and cell biological activity, to provides the fundamental baseline for understanding and exploiting RTCA. With the real-time, unlabeled, non-invasive, high throughput, and high accuracy features, RTCA not only promotes drug research and development, but also has a broad and good application prospect in other fields.

Keywords: RTCA, drug research, myocardial toxicity, biological activity, cell detection

实时无标记细胞分析系统 (Real time xCELLigence analysis system, RTCA) 是反映细胞生物学状态及变化的一种新型的细胞检测技术。它基于电阻抗原理, 建立电子细胞传感器阵列, 采用微电子生物传感器技术实时、无标记、无损伤地监测细胞动态, 反馈出细胞的生存力、迁移、生长变化等信息^[1]。随着电子技术在生物领域的不断发展, RTCA 如今被世界各地的研究人员越来越广泛地应用, 在评价药物引发的心肌毒性和各类药物活性研究中也发挥着强大的作用。

1 RTCA 原理与特点

1.1 RTCA 原理

RTCA 是一种细胞生物传感器, 通过将微电极阵列 (Multi-electrode array, MEA) 技术与检测传感器系统相结合, 由生物传感器板、阻抗测定单元、阻抗转换单元、实时分析和数据处理单元

4 个主要单元组成^[2] (图 1)。

生物传感器板包含微滴定孔、金属电极和微电极传感器芯片, 后两者组成金微电极。位于生物传感器板底部的金微电极测量出的电阻抗可以对细胞的生理状态例如生长状态、形态变化、死亡数量和粘附情况等^[3], 进行无间断、无标记、实时的监测和评估。阻抗测定单元是由于施加的交流电压产生的电信号使金微电极之间产生电场, 电场与微滴定孔内溶液中的离子环境相互作用, 附着在金微电极上的细胞阻碍了环境中电子的流动^[4]。因此, 当细胞的数量、大小、形状和附着状态发生变化时, 都会导致阻抗的变化 (图 2)。阻抗转换单元主要由模数转换器 (Analog-to-digital converter, ADC) 构成, ADC 能够将模拟信号转换为数字信号, 将阻抗的变化反映为电子读数的变化, 这种读数用细胞指数 (Cell index, CI) 来表示, CI 可以表示任意单元的细胞数量、

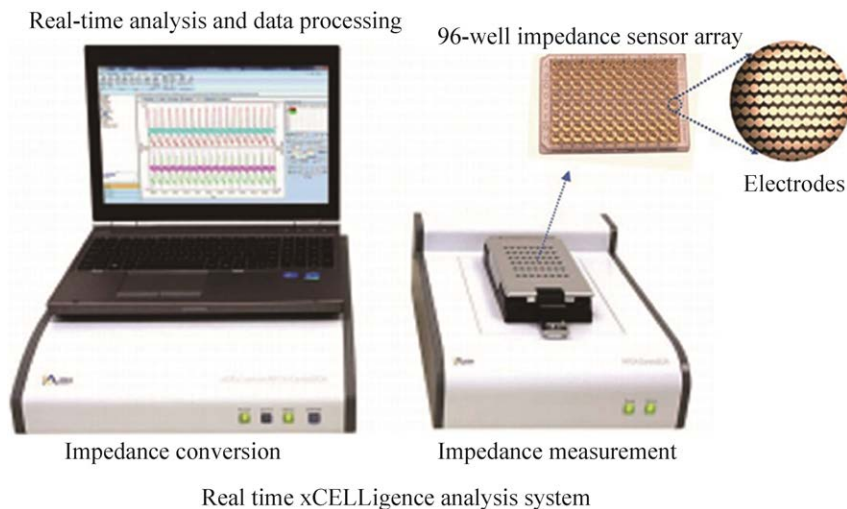


图 1 实时无标记细胞分析系统 (RTCA) 的组成

Fig. 1 Composition of real time xCELLigence analysis system.

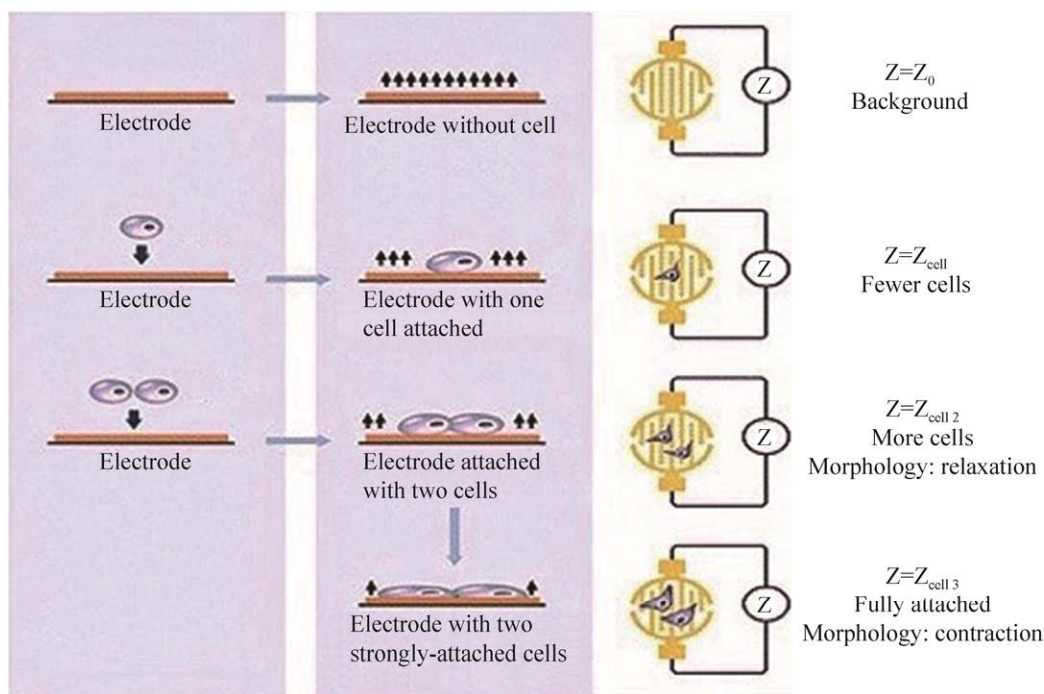


图 2 细胞阻抗检测原理

Fig. 2 Cellular impedance detection principle.

形态和粘附度^[5]。实时分析和数据处理单元即实时对细胞进行分析和处理数据, 反馈信息给研究人员。

1.2 RTCA 特点

细胞作为体外生物模型, 在生物毒性和药物临床前研究中都有着非常广泛的应用。但以往大多数的细胞分析系统都是基于细胞筛选, 使用标记跟踪来测定各种细胞的功能, 如放射性同位素标记法、酶标法、荧光标记技术等。大量实验研究证明, 传统方法在应用过程中往往具有很大的局限性, 这些方法通常需要标记适配体、酶底物或示踪分子^[6], 这可能会使实验条件复杂化, 因为细胞清洗和标记的成本很高, 且需要花费大量的时间。其他的一些传统检测法如四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法测定细胞存活率和一些细胞活力检测试剂盒均属于细胞终点法, 会对细胞造成不可逆转的损伤^[7]。但体外细胞生物传感器法则克服了上述缺点。不仅能避免标记、化合物的干扰和对细胞的破坏, 还能够在较短的时间内灵敏地反馈出药理作用^[8]。

细胞-基质电阻抗传感 (Electric cell-substrate impedance sensing, ECIS) 是最早提出的一种基于细胞的生物传感器技术^[9]。近二十年来, ECIS 已成功地应用于细胞生长、细胞增殖、细胞迁移和侵袭、细胞毒性等生物学检测。基于 ECIS 技术, RTCA 作为新型分析系统被开发出来。RTCA 具有实时、无标记、无损伤的特点, 不局限于某个时间点的测量, 而是自动地、连续地对整个实验需要的过程进行监测, 不干扰细胞正常的生长代谢^[10]。RTCA 能够高频测量细胞阻抗, 使用相应的软件可以实时记录和显示整个电极板每孔中细胞发生的搏动活动, 对采集的数据进行处理与分析, 测量出细胞的每个搏动周期, 显示并记录细胞的收缩及电位变化 (图 3) 的能力。实验中只需做好前期准备工作, 将需要监测的实验对象放入仪器, 开启软件并设置好相关参数。实验过程中人为干预较少, 具有操作简单、操作步骤少的优势。通过 RTCA 全自动地实时监测和全过程的动态观察, 在最接近生理状态条件下, 可以获得大量的实验数据信息, 这些数据具有准确性高、客观和重复性好的特点。

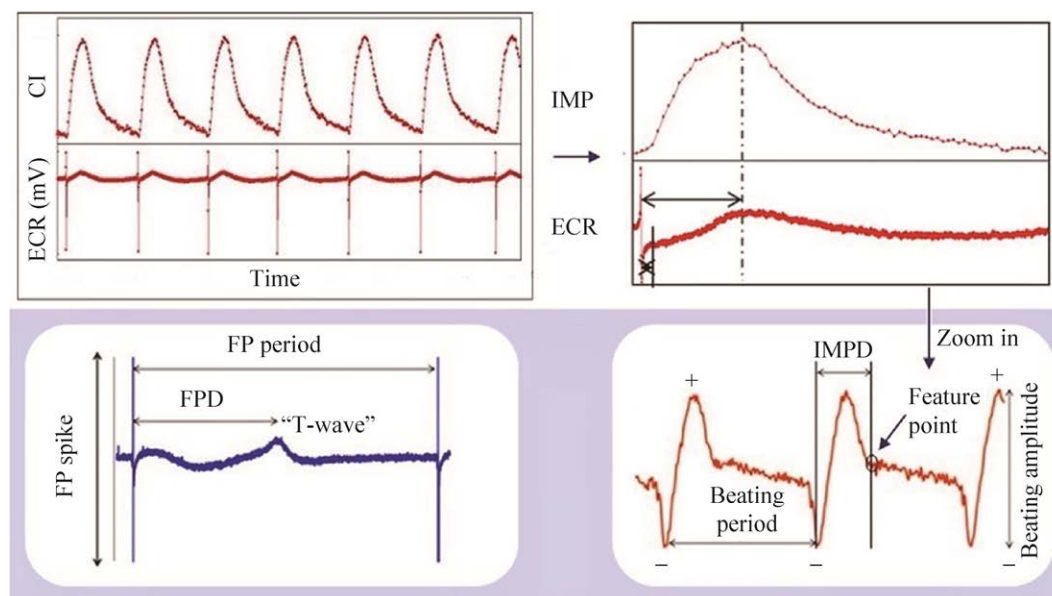


图3 RTCA记录心肌细胞律动及场电位的结果

Fig. 3 RTCA records the rhythm and field potential of myocardial cells.

RTCA 还被认为是一种高通量技术。与传统在体动物生物实验相比,体外细胞实验具有在短时间内对药物作用反应的优势。且 RTCA 能够克服体内动物实验对化合物无法大量测试及条件单一的弊端,开展对多种化合物的监测,亦可同时监测多个细胞板,可以选择细胞在不同时间点进行实验条件的改变,提供细胞随时间变化的反应,持续跟踪并捕获细胞动态行为,更易获取多种、多量的实验数据。

RTCA 与目前研究中常用的电生理技术膜片钳和多电极阵列相比,三者有着显著的区别,同样也反映出了 RTCA 存在着的一些局限性。膜片钳技术可以直接研究离子通道的分子活动,对动作电位进行详细的表征^[11]。多电极阵列技术可以记录离体组织、切片及细胞的场电位信号,施加电极刺激,反馈出电激动传导信息^[12]。RTCA 只能够基于细胞水平,记录贴壁细胞的动作电位和场电位,对细胞进行电刺激。对于悬浮细胞,需要通过一些手段,例如在微孔板底部覆盖纤维连接蛋白或明胶等用于固定细胞的特定涂层,使悬浮细胞贴壁,再进行研究,但这对于细胞的粘附

和扩散是有风险的,可能会影响到 RTCA 最终监测的结果^[13]。RTCA 不能直接观察到细胞上某一离子通道的变化,而是通过监测细胞阻抗的变化,间接地测定出细胞的电活动信息。在使用 RTCA 仪器时,必须使用其专用的微孔板,且根据不同的实验要求,需要更换相应的配件,如高通量测定分析时需更换 RTCA 高通量型号,这使得利用 RTCA 进行实验的成本很高。

2 RTCA 在药物心肌毒性检测中的应用

心肌毒性往往会引发急性心功能不全,主要表现为心律失常。从电生理学角度表述,急性心律失常是因为机械性急性心肌电生理的改变,它的作用是瞬间的,而不是由缓慢发生的收缩力机械调节或长期机械诱导的基因表达和细胞与组织重塑带来的^[14]。具体可表现为足够强的静息心肌的伸展引起膜电位的变化,就会引起去极化,则有可能触发异位兴奋,在已有病理学背景时,很有可能引发持续性快速心律失常^[15],最终结果则可能会导致心力衰竭。简而言之,在体外采用细胞模型的研究中,细胞膜上的钠、钾、钙离子定

向和选择性运动产生了膜电位,协调着心肌细胞(Cardiomyocytes, CMs)的收缩,于是心肌的机械运动产生了机械-电反馈,若有药物干扰了离子通道,就可能引发心肌毒性表现出心律失常^[16-17]。

为有效评价药物潜在的心肌毒性风险,基于人体自身机制评价心脏安全性的综合性离体致心律失常风险评估(Comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay, CiPA)方法应运而生。CiPA项目由4个部分组成:离子通道研究、*In silico*模型研究、人诱导多能干细胞来源的心肌细胞(Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)研究和心电图监测^[18]。hiPSC-CMs基于诱导性多能干细胞技术,能够作为体外细胞模型模拟体内心肌生长状态,验证离子通道、疾病模型和心律失常机制,高通量筛选化合物,可以辅助研究CiPA项目,为化合物临床前安全性评估提供相关的生理学和病理学模型,目前正广泛应用于生物医学领域,例如心脏病建模、心肌毒性筛选和损伤心肌再生方面^[19]。根据CiPA发出的倡议,利用预测性分析系统和hiPSC-CMs进行心律失常的风险评估成为了CiPA中重要的一个组成部分。在使用任何类型的分析系统时,都必须证明该系统评估不同参数时结果的一致性,RTCA的多参数分析已被证明了评估准确度与可靠性^[20]。RTCA作为实时细胞分析技术对hiPSC-CMs进行体外电生理学测试和多参数分析,衍生了专用于监测分析心肌细胞的RTCA Cadio系统^[21],在实验过程中能够灵敏和定量地实时监测存活率、心肌细胞综合电生理和阻抗振幅,检测离子通道和非离子通道调节剂对心肌细胞的影响,高速采集电信号活动,同时测量细胞兴奋收缩耦合,提供细胞收缩与舒张的相关数据如跳动强度、周期变化等,生成响应曲线,以评估药物存在下的心肌细胞是否发生心律失常事件,可以作为临床前心律失常风险评估的可靠方法,为评估药物临床安全性及心肌毒性测试提供有效数据^[22-24]。

RTCA通过实时监测细胞动态,当药物作用于hiPSC-CMs并对其产生影响时,能够在第一时间将药物与hiPSC-CMs相互作用的信息转换为可检测和量化的物理化学变量反馈给研究人员以供分析。有研究表明,应用RTCA实时监测hiPSC-CMs和大鼠新生CMs的收缩性,可以评价hiPSC-CMs和大鼠新生CMs的药物安全性^[25]。通过记录阻抗信号并转换为CI值可以表达细胞状态,根据接种密度在达到实验要求后即可加入药物治疗进行细胞活力测定,证实药物是否具有心脏毒性,并且得到与时间及剂量的关系。近年来有很多研究报道了RTCA不仅仅能够证实药物的心肌毒性,还有助于发现抑制心律失常的药物或方法。例如具有广谱抗肿瘤活性的鬼臼毒素衍生物依托泊苷(Etoposide, ETP)被认为可能是由于诱发心律失常而导致心肌毒性事件的发生^[26]。Nemade等^[27]利用RTCA Cadio分析系统实时监测hiPSC-CMs,通过记录分析CI值、搏动率、振幅等重要参数将细胞正常生长活动状态与加入ETP处理后状态产生的变化转换为数据形式表达,发现在经ETP治疗的hiPSC-CMs中,心血管疾病的生物标志物和心力衰竭的预测因子GDF15水平升高。研究结果表明单次高剂量的ETP可诱发心肌毒性,导致心律失常和细胞死亡,表现为hiPSC-CMs搏动率的不可逆增加,证实了ETP的心肌毒性。另外,根据RTCA显示数据研究发现,铁死亡抑制剂Liproxstatin-1治疗有助于hiPSC-CMs从异常中恢复,减少了药物作用过程中搏动率和搏动幅度的增加。评估临床前心脏安全药理学,有助于及时有效地在化合物早期研究开发阶段检测出潜在的心肌毒性。以hiPSC-CMs为实验模型,通过RTCA Cadio系统实时监测,Chaudhari等^[28]研究了5种化妆品中的常见化合物曲酸、三氯生、三氯卡班、碱性红51和2,7-萘二酚的心肌毒性。在同种实验条件下,曲酸、三氯生、三氯卡班和碱性红51可引起明显的心律失常,而2,7-萘二酚则使细胞活力略有下降,但

不影响搏动。这些研究提高了药物使用安全性,也防止了资源损耗。

大多数新药在研发或上市过程中被迫停止和召回的主要原因之一就是心肌毒性。研究发现,因心肌毒性引起的药物安全问题约占有所有药物停用情况的 $1/3$ ^[29]。因此,药物引发的心肌毒性成为了制药研发领域需要解决的难题,制药公司、研究机构和监管部门长久以来从未放弃寻找跨越这一挑战的方法。RTCA 技术的出现有助于克服这个难题。

3 RTCA 在细胞生物活性研究中的应用

3.1 药物细胞毒性研究

很多种类的药物在使用中都存在安全性风险,包括抗癌药、抗生素、精神类药物等。通过有效和彻底的早期临床前研究有助于更好地评估药物安全性,合适的试验方法能够在药物研发早期检测出药物安全性,降低成本,减少资源浪费^[30]。RTCA 相比其他方法更容易检测到化合物对细胞的影响,在长时间对细胞的周期性进行动态监测时,可以得到短期和长期的反应。考虑到实时数据采集、敏感性、预测性、短期及长期的周期测量,RTCA 非常适合于药物的早期临床前安全性评估。李华等^[31]利用 RTCA 探讨发现雷公藤甲素在较高浓度时有细胞毒性作用,对心肌表达相关的人类 ether-a-go-go 通道 (Human ether-a-go-go related gene, hERG) 呈剂量依赖性抑制,导致心肌细胞的搏动速率缓慢,动作电位时程 (Action potential duration, APD) 延长。许晓东等^[32]采用 RTCA 研究乌骨藤提取物对原代大鼠心肌细胞的细胞毒性作用,从乌骨藤提取物中分离出的组分 A 呈浓度依赖性影响心肌细胞的搏动幅度和频率,且致细胞停止搏动的作用迅速。但中、低浓度的组分 A 在心肌细胞停止搏动后,随着时间的延长有相应程度的恢复,高浓度则无法恢复直至搏动消失。Chiu 等^[33]实时监测人肌腱细胞的增殖状况,比较了 4 种药物细胞毒性筛选结果。对

于不同药物作用于同种细胞的研究,使用 RTCA 可以节约时间和成本,不需要大量的细胞,即可完成不同药物作用的比较,观察药物细胞毒性的差异。

药物引发的细胞毒性会导致细胞的基本结构或正常的生理活动发生改变。大量研究表明,细胞毒性与机体损伤和死亡率之间存在着正相关性^[34]。因此,研究药物的体外细胞毒性可以在一定程度上预测药物在体内可能发生的毒性反应。RTCA 在药物早期临床前研究过程中可以作为一个重要工具筛选药物细胞毒性。具有高效、高速、高通量特点的 RTCA 可以在整个实验期跟踪着细胞的生长。与基于终点的试验方法相比,使用 RTCA 更容易注意到细胞生长过程中由药物引起的随时间变化的抑制作用^[35],在药物细胞毒性研究中尤其有效。

3.2 药物影响细胞增殖和凋亡研究

生物过程的分析经常需要借助于表型分析来进行。但由于传统的终点检测技术的限制,在表型分析中获得的数据大多来源于单个终点分析^[36]。而对生物学问题至关重要的时间序列信息,就很难从终点法中解决。但 RTCA 却可以作为一种精确的基于时间分辨的方法分析生物过程。Zhang 等^[37]利用 RTCA 反映细胞增殖,证明了 RTCA 具有时间分辨分析能力,且重复性和稳定性良好。随后筛查了 20 种细胞增殖抑制剂和 25 种细胞增殖激活剂,表明 RTCA 不仅适合高通量筛选,还可以作为一种替代的表型分析技术,让人们通过电阻抗对细胞增殖进行时间分辨监测,研究细胞增殖的表型动力学。

细胞通过分裂产生新细胞的形式发生增殖活动,细胞增殖作为生物体的重要生命特征,是生长、发育、繁殖及遗传的基础。近年来,检测细胞增殖的活性广泛应用于肿瘤疾病的鉴别和诊断中,临床治疗肿瘤疾病使用的药物主要分为两种类型,一种是诱导肿瘤细胞凋亡,另一种是干扰肿瘤细胞增殖^[38]。细胞的增殖和凋亡由细胞信号

通路调节,二者失衡是肿瘤发生无限制增殖的原因。因此,评估药物对细胞增殖和凋亡的影响对研究抗癌药物有着重要意义。使用 RTCA 可以实时监测细胞的增殖率,判断药物作用下,细胞增殖或凋亡的状况。Liu 等^[39]采用 RTCA 实时监测鼻咽癌 CNE2 细胞增殖,发现不同浓度的中药单体香豆素类化合物异欧前胡素对鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖有明显的抑制作用,其作用机制可能是通过激活相关信号通路,降低增殖与抗凋亡相关蛋白的表达。乳腺癌是女性中常见的高发性癌症之一^[40],杨烨等^[41]运用 RTCA 检测并验证正交设计法筛选出的丹参、人参最佳配伍抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的作用,丹参、人参最佳配伍组对 MCF-7 的抑制增殖作用呈持续状态,而对正常乳腺细胞 MCF-10A 的抑制作用不显著,说明了丹参、人参配伍治疗 MCF-7 乳腺癌具有一定的选择性。Li 等^[42]研究来源于夹竹桃叶的欧夹竹桃苷 (Oleandrin) 抗乳腺癌作用,利用 RTCA 检测人乳腺上皮细胞 MCF10A 和 3 种人乳腺癌细胞 MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-231 的增殖情况。结果显示,欧夹竹桃苷不影响 MCF10A 的正常生长,可以抑制 MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-231 的增殖和集落形成,具有治疗乳腺癌的作用,其作用机制可能是通过激活内质网应激反应诱导线粒体介导乳腺癌细胞凋亡。

在目前的医疗条件下,手术和放射性治疗依然是治疗癌症的主要手段,因为大多数的抗癌药物缺乏选择性,对人体的正常细胞也会产生影响,具有严重的副作用,限制了临床应用的范围^[43]。利用 RTCA 研究药物对细胞增殖或凋亡的影响,有利于研究已有药物治疗癌症的功效,有助于开发出能够抑制癌细胞增殖、抑制肿瘤生长及诱导癌细胞凋亡的新药。

4 总结与展望

RTCA 作为一种新颖的体外研究方法,在技术方面具有自动、持续、高通量、高效、操作简

单的特点,在研究方面具有实时、非侵入性、无标记、高准确性、重复性好的优势。通过检测细胞与极板底部的相互作用,在近似生理状态的环境下,实时无标记地连续采集细胞的动态变化,显示与分析细胞的生长、粘附、迁移、分化、凋亡等各种信息^[44]。笔者曾使用 RTCA 监测 hiPSC-CMs,在实验过程中,使用 E-plate 48 微孔板,根据实验要求将细胞分成不同组分,例如空白组、模型组、药物组等同时进行监测,满足筛选药物浓度的需求。在导出数据过程中,可以自由选择导出的数据时间点及数据类型,例如有关细胞收缩的数据,包括振幅、搏动频率、收缩及舒张时间等,有关细胞场电位的数据,包括场电位振幅、场电位时程、收缩及衰减时间等,使得后续的结果分析更方便快捷。

就目前研究情况发现,RTCA 技术主要还是在心肌与药物研究方面应用较多,例如预测和评价药物的心肌毒性、筛选药物细胞毒性、评估药物对细胞增殖与凋亡的影响等,凭借其动态实时监测的优势,能够计算实验中任意时间点的 IC_{50} 和 EC_{50} ,这也是 RTCA 在心肌与药物研究方面应用较多的主要原因。这些研究不仅仅是响应了美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 发起的 CiPA 项目倡议,对心律失常进行风险评估,在对减少新药研发的毒性风险和降低开发成本方面也有良好的推进作用。

RTCA 的潜力是巨大的,不断推出的新型 RTCA 平台尽可能地结合着多种测量方法,为研究复杂的细胞行为和化学反应提供更全面的分析。近年来,在不同领域的各类研究中使用 RTCA 技术已越来越频繁,使用范围也愈加广泛,例如病毒研究^[45]、神经电生理研究^[46]、微生物研究^[47]、环境毒性研究^[48]等。限制 RTCA 广泛使用的成本因素,包含了金微电极的价格昂贵的一次性微孔板,也已有一些研究指出金微电极是可以多次使用的^[49],微孔板经过再生处理后重复使用不会对

实验结果产生显著影响^[50]。相信随着使用经验的增长与丰富, RTCA 作为一项更强大和先进的研究技术,能够在更多的领域得到更加广泛的应用,为各项研究带来巨大的突破。

REFERENCES

- [1] Türker ŞL, Albeniz G, Dinç B, et al. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 1866-1870.
- [2] 王淑颜, 汪溪洁, 马璟. 实时 xCELLigence 细胞分析系统在药物心脏毒性筛选中的应用. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(5): 908-912.
Wang SY, Wang XJ, Ma J. Progress in real time xCELLigence analysis system on drug cardiotoxicity screening. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2013, 27(5): 908-912 (in Chinese).
- [3] Burmakina G, Bliznetsov K, Malogolovkin A. Real-time analysis of the cytopathic effect of African swine fever virus. *J Virol Methods*, 2018, 257: 58-61.
- [4] Meindl C, Absenger M, Roblegg E, et al. Suitability of cell-based label-free detection for cytotoxicity screening of carbon nanotubes. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 564804.
- [5] Wang TX, Hu N, Cao JY, et al. A cardiomyocyte-based biosensor for antiarrhythmic drug evaluation by simultaneously monitoring cell growth and beating. *Biosensors Bioelectron*, 2013, 49: 9-13.
- [6] Yan GJ, Du Q, Wei XC, et al. Application of real-time cell electronic analysis system in modern pharmaceutical evaluation and analysis. *Molecules*, 2018, 23(12): 3280.
- [7] 周慧, 周伟强. 实时无标记细胞分析系统与传统的 MTT 法在测定乳腺癌细胞增殖中的比较. *沈阳医学院学报*, 2017, 19(3): 198-200.
Zhou H, Zhou WQ. Comparison between RTCA and MTT for detecting the proliferation of breast cancer cell. *J Shenyang Med College*, 2017, 19(3): 198-200 (in Chinese).
- [8] Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, et al. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(18): 10271-10278.
- [9] Moe B, McGuigan C, Li XF, et al. Cell-electronic sensing of cellular responses to micro-and nanoparticles for environmental applications. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons Ltd, 2014: 1-23.
- [10] Atienzar FA, Tilmant K, Gerets HH, et al. The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models. *J Biomol Screen*, 2011, 16(6): 575-587.
- [11] Mann SA, Heide J, Knott T, et al. Recording of multiple ion current components and action potentials in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes via automated patch-clamp. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2019, 100: 106599.
- [12] Wells SP, Waddell HM, Sim CB, et al. Cardiomyocyte functional screening: interrogating comparative electrophysiology of high-throughput model cell systems. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(6): C1256-C1267.
- [13] Martinez-Serra J, Gutierrez A, Muñoz-Capó S, et al. xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets and Therapy*, 2014, 7: 985-994.
- [14] Garg P, Garg V, Shrestha R, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as models for cardiac channelopathies: a primer for non-electrophysiologists. *Circ Res*, 2018, 123(2): 224-243.
- [15] Peyronnet R, Nerbonne JM, Kohl P. Cardiac mechano-gated ion channels and arrhythmias. *Circ Res*, 2016, 118(2): 311-329.
- [16] Blinova K, Dang QY, Millard D, et al. International multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment. *Cell Rep*, 2018, 24(13): 3582-3592.
- [17] Mladěnka P, Applová L, Patočka J, et al. Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. *Med Res Rev*, 2018, 38(4): 1332-1403.
- [18] 陈思蓉, 黄芝瑛, 王雪, 等. 综合性离体致心律失常

- 常风险评估研究新进展. 中南药学, 2019, 17(10): 1729-1733.
- Chen SR, Huang ZY, Wang X, et al. New progress in comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay. Central South Pharm, 2019, 17(10): 1729-1733 (in Chinese).
- [19] Parikh SS, Blackwell DJ, Gomez-Hurtado N, et al. Thyroid and glucocorticoid hormones promote functional t-tubule development in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Circ Res, 2017, 121(12): 1323-1330.
- [20] Zhang XY, Guo L, Zeng HY, et al. Multi-parametric assessment of cardiomyocyte excitation-contraction coupling using impedance and field potential recording: a tool for cardiac safety assessment. J Pharmacol Toxicol Methods, 2016, 81: 201-216.
- [21] Chaudhari U, Nemade H, Wagh V, et al. Identification of genomic biomarkers for anthracycline-induced cardiotoxicity in human iPSC-derived cardiomyocytes: an *in vitro* repeated exposure toxicity approach for safety assessment. Arch Toxicol, 2016, 90(11): 2763-2777.
- [22] Sharma A, BurrIDGE PW, McKeithan WL, et al. High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. Sci Transl Med, 2017, 9(377): eaaf2584.
- [23] El-Battrawy I, Zhao ZH, Lan H, et al. Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Europace, 2018, 20(FI1): f46-f56.
- [24] Paci M, Passini E, Severi S, et al. Phenotypic variability in LQT3 human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and their response to antiarrhythmic pharmacologic therapy: an *in silico* approach. Heart Rhythm, 2017, 14(11): 1704-1712.
- [25] Yu YY, Sun SN, Wang SH, et al. Liensinine- and neferine-induced cardiotoxicity in primary neonatal rat cardiomyocytes and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 186.
- [26] Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Orta ML, et al. Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy – a review. Curr Med Chem, 2014, 21(30): 3419-3454.
- [27] Nemade H, Chaudhari U, Acharya A, et al. Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells. Arch Toxicol, 2018, 92(4): 1507-1524.
- [28] Chaudhari U, Nemade H, Sureshkumar P, et al. Functional cardiotoxicity assessment of cosmetic compounds using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Arch Toxicol, 2018, 92(1): 371-381.
- [29] Ferri N, Siegl P, Corsini A, et al. Drug attrition during pre-clinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity. Pharmacol Ther, 2013, 138(3): 470-484.
- [30] 赵琪, 汪溪洁, 王淑颜, 等. 基于人胚胎干细胞的实时细胞系统评价心脏毒性方法的建立. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 138-143.
- Zhao Q, Wang XJ, Wang SY, et al. Establishment of the method to evaluate cardiac toxicity by real-time cell analysis system on human embryonic stem cells. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(1): 138-143 (in Chinese).
- [31] 李华, 邱云良, 李旻, 等. 雷公藤甲素对新生大鼠心肌细胞搏动的影响. 世界临床药物, 2011, 32(12): 727-730.
- Li H, Qiu YL, Li M, et al. Effect of triptolide on neonatal rat cardiac myocytes beating rates. World Clin Drugs, 2011, 32(12): 727-730 (in Chinese).
- [32] 许晓东, 李凯强, 王震, 等. 乌骨藤提取物对原代新生大鼠心肌细胞的毒性研究. 浙江医学, 2016, 38(17): 1390-1392, 1422.
- Xu XD, Li KQ, Wang Z, et al. Cytotoxic effect of Marsdeniae Tenacissimae extracts on primary cultured myocardial cells of neonatal rat. Zhejiang Med J, 2016, 38(17): 1390-1392, 1422 (in Chinese).
- [33] Chiu CH, Lei KF, Yeh WL, et al. Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening. J Orthop Surg Res, 2017, 12(1): 149.
- [34] Kustermann S, Boess F, Buness A, et al. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. Toxicol In Vitro, 2013, 27(5): 1005-1015.

- 1589-1595.
- [35] Stefanowicz-Hajduk J, Ochocka JR. Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicol Rep*, 2020, 7: 335-344.
- [36] Dawson JC, Serrels B, Byron A, et al. A synergistic anticancer FAK and HDAC inhibitor combination discovered by a novel chemical-genetic high-content phenotypic screen. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(2): 637-649.
- [37] Zhang JD, Koerner C, Bechtel S, et al. Time-resolved human kinome RNAi screen identifies a network regulating mitotic-events as early regulators of cell proliferation. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e22176.
- [38] Szyszka M, Paschke L, Tyczewska M, et al. Analysis of transcriptome, selected intracellular signaling pathways, proliferation and apoptosis of LNCaP cells exposed to high Leptin concentrations. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5412.
- [39] Liu J, He L, Hu J, et al. Isoimperatorin induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via the MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2138186.
- [40] Lin HY, Han HW, Wang YS, et al. Shikonin and 4-hydroxytamoxifen synergistically inhibit the proliferation of breast cancer cells through activating apoptosis signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. *Chin Med*, 2020, 15: 23.
- [41] 杨烨, 颜晓静, 毕蕾, 等. 正交设计优选丹参-人参活性组分抗乳腺癌有效配伍. *中国药理学通报*, 2014, 30(11): 1605-1610, 1611.
- Yang Y, Yan XJ, Bi L, et al. Optimization of effective component formula from active ingredients of *Salvia Miltiorrhiza* and *Panax Ginseng* through orthogonal design method to resist breast cancer. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, 30(11): 1605-1610, 1611 (in Chinese).
- [42] Li XX, Wang DQ, Sui CG, et al. Oleandrin induces apoptosis via activating endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109852.
- [43] Lin XK, Wang LH, Zhao LQ, et al. Curcumin micelles suppress gastric tumor cell growth by upregulating ROS generation, disrupting redox equilibrium and affecting mitochondrial bioenergetics. *Food Funct*, 2020, 11(5): 4146-4159.
- [44] Kho D, MacDonald C, Johnson R, et al. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*, 2015, 5(2): 199-222.
- [45] Marlina S, Shu MH, AbuBakar S, et al. Development of a Real-Time Cell Analysing (RTCA) method as a fast and accurate screen for the selection of chikungunya virus replication inhibitors. *Parasit Vectors*, 2015, 8: 579.
- [46] Zhang YL, Wong YS, Deng J, et al. Machine learning algorithms for mode-of-action classification in toxicity assessment. *BioData Min*, 2016, 9: 19.
- [47] Slanina H, König A, Claus H, et al. Real-time impedance analysis of host cell response to meningococcal infection. *J Microbiol Methods*, 2011, 84(1): 101-108.
- [48] Leme DM, Grummt T, Heinze R, et al. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011, 74(8): 2148-2155.
- [49] Stefanowicz-Hajduk J, Adamska A, Bartoszewski R, et al. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence real-time cell analyzer. *Biotechniques*, 2016, 61(3): 117-122.
- [50] Xu ZH, Song YY, Jiang HJ, et al. Regeneration of arrayed gold microelectrodes equipped for a real-time cell analyzer. *J Vis Exp*, 2018, (133): 56250.

(本文责编 陈宏宇)