

DOI: 10.13376/j.cblls/2014047

文章编号: 1004-0374(2014)03-0319-06

· 技术与应用 ·

毒理学研究中的体外细胞毒性评价

刘涛¹, 郭辰², 赵晓红^{2*}

(1 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; 2 北京联合大学功能食品研究院, 北京 100191)

摘要: 体外细胞毒性评价作为传统动物模型毒性评价的替代方法正在得到越来越多的研究和应用, 而其向高通量阶段的迈进则为新毒物和新药物的检测与目的物的筛选提供了更加快捷、高效的手段。将对体外细胞毒性评价常用细胞类型、体外细胞毒性评价的指标, 及其检测技术方法的研究现状、进展和存在问题进行阐述, 希望能为相关的研究提供一定的参考。

关键词: 毒理学; 体外试验; 细胞毒性评价; 高通量筛选

中图分类号: Q256; R99 **文献标志码:** A

In vitro cytotoxicity evaluation in toxicology

LIU Tao¹, GUO Chen², ZHAO Xiao-Hong^{2*}

(1 School of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China; 2 Research Institute for Science and Technology of Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: *In vitro* cytotoxicity evaluation, as an alternative of traditional toxicity evaluation using animal models, has been widely studied and applied. The development of cell-based high-throughput detecting and screening assays will provide fast and efficient means for detecting new toxic substances and drugs and screening target ingredients. The current research status, scientific progress, and existing problems of commonly used cell types, different test indexes and methods for *in vitro* cytotoxicity assessments are reviewed, which will provide some reference for related research.

Key words: toxicology; *in vitro* assay; cytotoxicity evaluation; high-throughput screening

毒性评价的传统方法主要是动物体内实验, 通过解剖检查、称量重量、计算脏器指数、血液生化学检查及病理形态学检查等来发现受试物的器官毒性, 即利用啮齿类动物和非啮齿类动物进行不同时间段的生物测定。虽然这种方法在评估化学物对人类潜在危害的实际应用中发挥了重要的作用, 但随着科学技术的发展, 其局限性也逐渐显露出来。细胞试验正是在这一基础上发展起来的。近年来, 体外细胞毒性评价由于其周期短、成本低和作用机制易于探明等优势得到快速的发展。目前在体外试验很难监控全身生理效应的前提下, 大多数试验都是测定细胞水平的效应, 即体外细胞毒性。在限定条件下, 可根据药物代谢动力学模型将体外细胞毒性检测的结果外推并应用到体内研究中^[1]。相对于复杂的体内反应, 所有体外细胞毒性试验都是简化了

的监测事件, 但由于其经济、快速、易于量化和可重复性好, 且符合替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement), 即3R的原则^[2], 它不仅提高了毒理学检测的效率, 减少了动物的使用, 而且将会使基于人类细胞或细胞系的体外毒理学检测途径的定量自动化高通量检测与筛选得到更广泛的应用^[1]。

随着社会科学技术的发展和人类需求的不断扩大, 新的药品、化学佐剂、食品添加剂、化工原料以及环境污染物等化学物不断地被发现和制造出来, 并且要求快速得到实际的检测和应用, 以满足

收稿日期: 2013-07-11; 修回日期: 2013-08-11

基金项目: 北京市教委科技发展计划重点项目(KZ2012-11417041)

*通信作者: E-mail: xiaohong@bnu.edu.cn

人类的需求^[3]。简单的检测评估与筛选手段已不能满足这一需求,这就对检测评估技术和筛选方法提出新的挑战。而融合多种新技术和新方法并应用简便快速的体外试验对大量化学物进行检测与筛选的高通量体外细胞毒性评价,恰好符合这一要求,并且近年来高通量体外细胞毒性评价的快速发展使问题正在得到逐步解决。目前,高通量细胞毒性评价已成为毒理学和药理学等领域的研究热点,并且在理论研究和实际应用中都发挥着重要的作用。因此,本文对细胞毒性评价相关方面的发展及其最新的研究现状进行介绍,希望能对相关领域的研究提供一定的参考信息。

1 体外细胞毒性评价常用细胞类型

体外细胞毒性评价所用的细胞根据受试物的不同而不同,但其基本原则是一致的,即能够尽量精确地反映毒物毒性、易于培养、连续操作性强等。在体外细胞毒性评价中,受试物多与高等生物,尤其是与人密切相关。因此,体外细胞毒性评价常用的细胞主要为直接来自人体组织的细胞,或与人类亲缘关系较近的模式生物的细胞,常用的细胞株/系类型见表1,但在环境毒物体外细胞毒性评价中,也常用到一些低等生物细胞,如酵母^[4]、单细胞藻类^[5]等。

来源于正常组织的细胞是体外细胞毒性评价中

常用的细胞类型,其功能特点和结构特性使体外细胞毒性评价更具针对性和明确性,更易于探明毒物引起细胞损伤的作用机制。Shoham等^[6]利用来自金色仓鼠胚胎的正常细胞测定刀豆蛋白A (concanavalin A, ConA) 的细胞毒性,并将其与转化后的细胞相比较,以研究ConA对体内肿瘤产生的抑制作用。利用正常细胞可检测药物对生物体特定器官的损伤作用。Jo等^[7]利用大鼠、小鼠、恒河猴和人的肝细胞评估肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 诱导正常细胞凋亡的敏感性,结果显示TRAIL可诱导人正常肝细胞的凋亡,经TRAIL处理10 h,细胞凋亡和死亡比率达到60%以上,且出现明显的细胞质收缩、caspases活化和DNA片段化等典型的凋亡特征,而其他几个物种的肝细胞却没有出现以上现象。这些结果表明,细胞对TRAIL的敏感性存在种间差异,若将TRAIL应用于人类癌症治疗,可能会出现肝毒性。来源于肿瘤组织的细胞是体外细胞毒性评价中另一种常用的细胞类型,它们可在体外培养条件下无限地增殖传代,这使其在体外细胞毒性评价中得到广泛的应用。Davoren等^[8]利用A549细胞评估单壁碳纳米管 (single walled carbon nanotubes, SWCNT) 对肺细胞的细胞毒性,从而评价其对人体的毒性,结果显示SWCNT对A549细胞的急性毒性非常低。Nakagawa等^[9]

表1 体外细胞毒性评价中常用细胞株/系类型

来源	细胞株/系	形态学	起源	种属	年龄	倍性
来源于正常组织的有限细胞系	IMR-90	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体
	MRC-9	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体
	WI-38	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体
	MRC-5	成纤维细胞	肺	人	胚胎期	二倍体
来源于正常组织的连续细胞系	MDCK	上皮样细胞	肾	家犬	成年	非整倍体
	L929	成纤维细胞	皮下/脂肪	小鼠	成年	非整倍体
	3T3-L1	成纤维细胞	胚胎	Swiss小鼠	胚胎期	非整倍体
	CHO-K1	成纤维细胞	卵巢	中国仓鼠	成年	二倍体
	COS	成纤维细胞	肾	非洲绿猴	成年	非整倍体
	Vero	上皮样细胞	肾	非洲绿猴	成年	非整倍体
	H9c2	成肌细胞	心脏	大鼠	胚胎期	二倍体
	来源于肿瘤组织的连续细胞系	A549	上皮细胞	肺	人	成年
Caco-2		上皮细胞	结肠	人	成年	非整倍体
Hela		上皮细胞	子宫颈	人	成年	非整倍体
HepG2		上皮样细胞	肝细胞瘤	人	成年	非整倍体
HL-60		悬浮细胞	髓系白血病	人	成年	非整倍体
MCF-7		上皮细胞	乳腺癌胸膜	人	成年	非整倍体

利用人乳腺癌 MCF-7 细胞检测二苯甲酮在细胞内代谢及其代谢物对细胞的影响,结果表明二苯甲酮可在细胞内代谢,并且其代谢物具有雌激素作用,可刺激 MCF-7 细胞的增殖。此外,体外细胞毒性评价中也常用到其他类型的细胞,如具有回复突变性状的中国仓鼠肺细胞株 V79 被用于检测药物遗传毒性,以评价其安全性;梨形四膜虫 (*Tetrahymena pyriformis*) 被用于环境遗传毒理学,以研究环境诱变物等^[10]。

2 体外细胞毒性评价的指标及其检测技术方法

体外细胞毒性评价指标一般是基于细胞的数量、形态、结构及生理特征来评价细胞毒性变化特征的指标,并针对不同的指标建立了不同的检测方法。

2.1 细胞水平

2.1.1 细胞生长抑制

细胞经受试物作用后,会出现因毒性作用而生长抑制或死亡,或者因激活作用而增殖速率加快的现象,这直接反映在细胞数量的变化上。检测细胞数量,计算变化比率即可得出受试物对细胞的效应。细胞数量可通过仪器检测绝对数量,计算细胞的增殖或死亡率;也可通过化学试剂检测细胞活性,计算细胞的激活或抑制率。活细胞计数仪可对受试细胞群的活细胞进行计数,但应用较多的是化学比色法,如 MTT 法^[11]及类似原理的 WST-1 法^[12]、CCK8 法^[13]、MTS 法^[14]和 XTT 法^[15]等,利用细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶将检测试剂内的唑盐还原为甲臍(formazan),甲臍的生成量与琥珀酸脱氢酶的活性呈正相关,琥珀酸脱氢酶活性又反映了细胞活性,因此,对甲臍溶液进行比色测定即可求得受试物对细胞的激活或抑制率;结晶紫染色法^[12]和中性红染色法^[12]等都是利用活细胞特定的生理条件(局部酸性)以对其特定的部位(细胞核和溶酶体)进行染色,从而达到对活细胞进行计数的目的,它们都可测得受试细胞中活细胞的相对数量;而 ATP 检测法^[11]和磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB) 检测法^[16]对细胞相对数量的测定则更加灵敏且可重复性强。在这些细胞增殖测定方法的基础上,就可以建立细胞增殖筛选模型,从而可从正或负相关性评价受试物对细胞的效应。Wodnicka 等^[17]基于对细胞整体状况变化的检测,建立了一种新型的荧光-氧生物传感器技术平台,该技术适用于许多应用领域的药物开发和检测,特别是基于细胞的检测,如

可用于检测细胞的活力、增殖和死亡,也适合于研究细胞在增殖或毒性刺激时的动力学反应。

2.1.2 细胞膜完整性

细胞经毒物作用后,膜结构会受到破坏,出现细胞膜完整性受损或渗漏现象。这一指标可通过外源物的渗入或细胞内源物的渗出来检测。台盼蓝拒染率检测^[11,18]利用台盼蓝可透过受损细胞膜而无法透过完整细胞膜的特点,对膜受损细胞进行染色,从而通过镜检计算出细胞膜受损的比率。乳酸脱氢酶漏出率检测^[19]是利用胞浆乳酸脱氢酶可通过受损细胞膜漏出的特点,通过检测细胞培养基中乳酸脱氢酶的活性来评价细胞膜受损程度。而通过特定的荧光物质与细胞膜或细胞内分子结合的荧光检测法则具有更高的敏感性和稳定性。

2.1.3 细胞代谢活性

细胞代谢活性检测可从细胞的能量代谢、氧化还原状态和生物大分子合成状态三个方面进行。细胞能量代谢最直接的体现就是 ATP 的生成与消耗速度,通过特异性试剂或专门的 ATP 检测试剂盒检测细胞内 ATP 的状态和含量,即可得知细胞的能量代谢状态^[20]。细胞氧化还原状态多以细胞内还原性物质或氧化产物的多少来衡量,如细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)含量^[21],脂质过氧化产物,如 4-羟基壬烯酸和丙二醛的生成量等。此外,细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)酶系对细胞内的脂质与甾体激素的代谢中间产物以及药物与其他毒性化学物质等非生物物质的代谢起着重要作用,是药物代谢与生物激活作用的主要酶类,约占到各种代谢反应总数的 75%,是毒理学研究中毒物毒性的生物标志物^[22]。通过乙氧基异酚噻唑酮反应、Western blotting、酶联免疫分析(ELISA)、直接免疫荧光反应、单克隆抗体技术等方法研究细胞内 CYP450,从而可对受试物在细胞内的代谢进行评价。

2.2 亚细胞水平

细胞经毒物作用受损或死亡时,其内部则表现为细胞器的损伤或病变,如能量中心——线粒体的损伤,溶酶体、内质网等细胞器的损伤。线粒体的损伤常表现为膜电位的改变,这一改变可通过 JC-1^[23]、四甲基罗丹明甲酯和罗丹明 123^[24]等荧光染料进行检测。这些荧光染料能根据线粒体膜电位的不同而发出不同的荧光,通过荧光成像技术分析,就可评估线粒体的受损程度。中性红可经胞膜内吞而进入细胞,在溶酶体的酸性环境中会出现变色反应,从而可用来检测溶酶体损伤;与其他检测方法

联合应用,可用于区分不同的细胞毒性和细胞器损伤^[25]。荧光成像技术 (fluorescence imaging technology) 在细胞和亚细胞水平的检测和筛选中应用日益广泛,它利用固定细胞或细胞器与荧光标记的抗体、配体或核酸探针的结合进行检测,或利用活细胞与荧光指示剂和生物传感器相结合的方法进行检测^[26]。该技术的出现促进了高内涵筛选 (high content screening, HCS) 的发展^[27]。然而, HCS 在诸如检测敏感性和荧光探针对细胞活性的影响等方面仍有许多有待解决的技术难题。因此,在开展 HCS 时需谨慎选择荧光探针,这也是 HCS 成功的关键。随着研究的不断深入,目前已经有多种新型荧光蛋白被用于许多受试物的 HCS 中^[28]。

2.3 离子通道水平

近年来,离子通道已经成为药物发现和筛选中备受关注的研究目标,在各种不同疾病,尤其是在中枢神经系统和心血管系统疾病的治疗中发挥着重要的作用。而且,新化学药物对心脏离子通道活性影响的评估已成为药物研发过程中重要的组成部分,以评估其对心血管系统潜在的毒副作用^[29]。近年来,由于离子通道模型的细胞毒性评价具有灵敏、简便,并可反映活细胞内离子通道活性的特点,离子通道功能性离子的通量检测 (flux assays) 作为有效的药物筛选手段正在受到越来越多的关注。在优化的通量检测中,离子通道活性的改变更容易产生可检测的放射性或非放射性离子流变化^[30]。

2.4 受体水平

随着对受体研究的深入,许多高灵敏度检测技术被应用于受体药物的筛选,这使得基于受体的药物细胞毒性评价能够高效、快速地进行,从而推动了药物筛选的发展。蛋白质家族结构信息的快速增加,大众化可访问网络信息的增长,以及如何有效应用筛选技术等都为这些新技术的发展做出了贡献。然而,更好地理解蛋白质的流动性 (mobility) 却是进一步改进检测与筛选技术的关键^[31]。Schapira 等^[32]对甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR) 拮抗剂的结构多样性的研究表明,基于受体的细胞毒性评价能用于检测和筛选不同的符合 TR 拮抗作用结构规则的化学物质,同时还表明基于受体的筛选与并行合成相耦合能显著加速先导物的优化过程。但是,基于受体的细胞毒性评价也有其自身的缺陷。与兼具结构-活性和结构-运输关系的传统筛选相比,虽然它能够合理且高效地对数千种化

合物进行筛选,但这些被筛选出的目标物与目标受体之间仅具有结构-活性的关系。若这样的药物用于治疗,由于其膜通透性较差,就会被体内的血-脑屏障阻滞于脑毛细血管内皮细胞外,从而失去意义。

2.5 基因水平

基因水平的细胞毒性评价主要是基于报告基因技术对受试物进行的检测和筛选。报告基因 (reporter gene) 筛选模型是利用转基因技术将目的基因与报告基因嵌合后导入受体细胞,然后检测受试物作用于这些细胞时基因的表达状况,以评价受试物对细胞的影响并筛选出目标物。Durocher 等^[33]通过研究 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 在 HEK293-EBNA 细胞 (即 293E) 内的表达,建立了一种对与 Gas 和 Gαq 相偶联的 GPCRs 进行报告基因检测的方法,并可适合于兴奋剂和拮抗剂的细胞毒性评价。Goetz 等^[34]利用能够表达 6×CRE (cAMP response elements) 荧光素酶的 CHO 细胞进行报告基因检测,结果显示被表达的报告基因能对细胞内 cAMP 水平的改变做出反应,进而证明该细胞系可用于药物筛选以及与 Gas 受体和 Gas 偶联的七次跨膜受体相关的药理学分析。Nagy 等^[35]利用稳定整合了 TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) 和 AhR (aryl hydrocarbon receptor) 响应的增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 报告基因的小鼠肝癌细胞系重组体 (H1G1.1c3),在由 155 种同源氨基酸和 12 090 种药物组成的化学品库中进行筛选,仅用不到 7 d 的时间就筛选出了新型 AhR 激动剂。而报告基因检测技术 (reporter gene detection technology) 是在报告基因筛选模型的基础上发展而来的,用于高通量筛选的技术平台。随着新方法的出现,报告基因技术向微型化发展,应用更加高效、简便、快捷,如荧光素酶 (luciferase) 和 β2 半乳糖苷酶报告基因系统,无需裂解分离就可直接在微孔板内进行检测。活细胞应用较多的报告基因是 GFP 基因,无需其他底物和辅因子即可自发荧光且荧光稳定,即使与其他蛋白嵌合也不影响其自身荧光特性。GFP 及其变体作为报告基因可用于细胞水平的蛋白质定位和转位、蛋白质的降解、蛋白质-蛋白质的相互作用及细胞周期的实时动态研究,并可检测目的基因表达的变化。常用的报告基因还有 β2 内酰胺酶,通过对荧光能量共振转移 (FRET) 底物 CCF4/AM 的水解,可用于定量检测,或作为核因子调节指示蛋白用于受体功能的筛选^[36]。

3 结论与展望

细胞毒性评价是从细胞类型的选择,到评价指标的确定,进而选择适合的检测方法的过程。在这一过程中,根据受试物的不同选择适合类型的细胞,如检测大气颗粒物毒性常选择肺组织相关的细胞;根据检测毒性的不同选择不同的评价指标,如检测线粒体毒性常选择亚细胞水平的指标;不同的指标又有不同的检测方法,如线粒体膜电位的改变可采用流式细胞仪检测^[37],这一过程具有周期短、成本低和作用机制易于阐明等优点。细胞培养所需器材和原料的成本与动物养殖相比较低廉,且不像动物养殖那样需要大量的人力投入,相对地易于操作和管理,节省人力物力。而且,细胞的结构和代谢途径已相对清楚,通过现有检测技术就可探知药物在细胞分子水平上的作用机制,如所参与的信号通路^[38]等。虽然它有诸多优点,但也有其不足之处。由于细胞毒性评价只是在体外单细胞水平上做出的毒性评估,而受试动物相对于单个细胞要复杂得多,其代谢、免疫等系统相互联系,即使单一毒物的测试也面临不可预测的干扰。因此,没有生物整体水平上代谢动力学的验证,就不能准确地推得体内环境下经各系统作用后的整体毒性。

高通量细胞毒性评价是在综合传统方法和新技术的基础上,实现对受试物毒性的高效快速检测以及对目标物的高通量、有目的的检测与筛选。离子通道模型、受体模型和报告基因模型等筛选模型的建立使细胞毒性评价更具针对性,从而利用不同模型的靶点检测不同种类的目标毒物。针对不同的模型又有不同的检测手段,荧光技术的应用大大提高了细胞毒性评价的效率,增加了检测和筛选的通量。虽然相对于传统方法,高通量细胞毒性评价大大提高了细胞毒性检测和目标物筛选的效率,但其在检测及筛选精度方面仍有需解决的问题,如假阴性和假阳性现象,筛选目标物活性等就是其中常遇到的,而HCS的出现使这些问题得到改善。高通量的细胞毒性评价也需适合类型的细胞,一般要求健康、稳定且丰富的细胞系,而干细胞恰恰具有这些优点,因为其可分化为任何类型的细胞且保持原有基因型,而且其来源不受限制,更重要的是干细胞可以分化形成3D球状体,从而模拟体内模型进行检测^[2,39]。若能利用人工技术设计出一种多模型和多靶点的新型细胞,那么它将能够同时对多种受试物进行更加高效快速的多靶点检测与筛选。相信随着

新的技术与方法的不断出现,体外细胞毒性评价将会更加高效、快速、成本低廉,检测与筛选的精度更高,操作也会更简便,并且会不断向着微型化、自动化、高效化、低廉化和微量方向发展。

[参 考 文 献]

- [1] Krewski D, Acosta Jr D, Andersen M, et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J Toxicol Environ Health Part B*, 2010, 13(2-4): 51-138
- [2] Andersen ME, Krewski D. The vision of toxicity testing in the 21st century: moving from discussion to action. *Toxicol Sci*, 2010, 117(1): 17-24
- [3] Vanparys P, Corvi R, Aardema MJ, et al. Application of *in vitro* cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products and cosmetics. *Mutat Res*, 2012, 744(1): 111-6
- [4] Campanella L, Favero G, Tomassetti M. Immobilised yeast cells biosensor for total toxicity testing. *Sci Total Environ*, 1995, 171(1): 227-34
- [5] Stauber JL, Franklin NM, Adams MS. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(4): 141-3
- [6] Shoham J, Inbar M, Sachs L. Differential toxicity on normal and transformed cells *in vitro* and inhibition of tumour development *in vivo* by concanavalin A. *Nature*, 1970, 227(5264): 1244-6
- [7] Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med*, 2000, 6(5): 564-7
- [8] Davoren M, Herzog E, Casey A, et al. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(3): 438-48
- [9] Nakagawa Y, Suzuki T, Tayama S. Metabolism and toxicity of benzophenone in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of its metabolites in MCF-7 cells. *Toxicology*, 2000, 156(1): 27-36
- [10] Bonnet JL, Bonnemoy F, Dusser M, et al. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ Toxicol*, 2007, 22(1): 78-91
- [11] Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10202
- [12] Semete B, Booysen L, Lemmer Y, et al. *In vivo* evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine*, 2010, 6(5): 662-71
- [13] Zhang W, Wang Z, Chen T. Curcumin induces apoptosis via caspases-independent mitochondrial pathway in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Med Oncol*, 2011, 28(1): 307-14
- [14] Zheng JT, Rix U, Zhao L, et al. Cytotoxic activities of new jadomycin derivatives. *J Antibiot Tokyo*, 2005, 58(6):

- 405-8
- [15] Kehe K, Reichl FX, Durner J, et al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials*, 2001, 22(4): 317-22
- [16] 刘宸铄, 刘芳, 杨鸣琦. SRB法检测鸡外周血T淋巴细胞增殖试验最佳条件的筛选. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2013, 41(7): 1-5
- [17] Wodnicka M, Guarino RD, Hemperly JJ, et al. Novel fluorescent technology platform for high throughput cytotoxicity and proliferation assays. *J Biomol Screen*, 2000, 5(3): 141-52
- [18] Louis KS, Siegel AC. Mammalian cell viability: methods and protocols. *Methods Mol Biol*, 2011, 740: 7-12
- [19] Wang J, Sun P, Bao Y, et al. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(1): 242-50
- [20] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharmaceut*, 2005, 288(2): 369-76
- [21] Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med*, 2001, 30(11): 1191-212
- [22] 于敏, 张双庆, 闻镍, 等. 细胞色素P450酶系体外药物代谢研究方法进展. *中国药事*, 2013, 27(1): 81-7
- [23] Pernelle K, Le Guevel R, Glaize D, et al. Automated detection of hepatotoxic compounds in human hepatocytes using HepaRG cells and image-based analysis of mitochondrial dysfunction with JC-1 dye. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254(3): 256-66
- [24] 吴永明, 夏欣一, 潘连军, 等. 罗丹明/碘化吡啶双染法检测精子线粒体膜功能的研究. *中华男科学杂志*, 2006, 12(9): 803-6
- [25] Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 2006, 160(2): 171-7
- [26] 张怡轩, 韩云波. 荧光技术在高通量药物筛选中的应用. *中国药理学杂志*, 2009, 44(11): 801-4
- [27] 李韶菁, 杜冠华. 细胞水平的高通量药物筛选技术研究进展. *中国药理学杂志*, 2008, 43(2): 84-7
- [28] Wolff M, Wiedenmann J, Nienhaus GU, et al. Novel fluorescent proteins for high-content screening. *Drug Discov Today*, 2006, 11(23-24): 1054-60
- [29] Dunlop J, Bowlby M, Peri R, et al. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(4): 358-68
- [30] Gill S, Gill R, Lee SS, et al. Flux assays in high throughput screening of ion channels in drug discovery. *Assay Drug Dev Technol*, 2003, 1(5): 709-17
- [31] Alvarez JC. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(4): 365-70
- [32] Schapira M, Raaka BM, Das S, et al. Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7354-9
- [33] Durocher Y, Perret S, Thibaudeau E, et al. A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture. *Anal Biochem*, 2000, 284(2): 316-26
- [34] Goetz AS, Andrews JL, Littleton TR, et al. Development of a facile method for high throughput screening with reporter gene assays. *J Biomol Screen*, 2000, 5(5): 377-84
- [35] Nagy SR, Liu G, Lam KS, et al. Identification of novel Ah receptor agonists using a high-throughput green fluorescent protein-based recombinant cell bioassay. *Biochemistry*, 2002, 41(3): 861-8
- [36] Kornienko O, Lacson R, Kunapuli P, et al. Miniaturization of whole live cell-based GPCR assays using microdispensing and detection systems. *J Biomol Screen*, 2004, 9(3): 186-95
- [37] Sun L, Li Y, Liu X, et al. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(8): 1619-29
- [38] Pasqualetti G, Ricciardi S, Mey V, et al. Synergistic cytotoxicity, inhibition of signal transduction pathways and pharmacogenetics of sorafenib and gemcitabine in human NSCLC cell lines. *Lung Cancer*, 2011, 74(2): 197-205
- [39] Kang KS, Trosko JE. Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. *Toxicol Sci*, 2011, 120(Suppl 1): S269-89