

细胞存活率的检测处理方式对药物效果评估的影响研究



杨璐璐^{1,2}, 龚晓云², 曾庆黎^{1,2}, 张文权^{1,2}, 申屠旭萍^{1*},
薛志超^{2*}

1. 中国计量大学, 杭州 322002

2. 中国计量科学研究院, 北京 100029

【摘要】 在使用体外培养的细胞进行药物实验时, 药物处理会造成细胞死亡, 而检测细胞存活率的方法不同, 会对实验结果造成影响。以海拉细胞作为实验对象, 用不同浓度的顺铂处理细胞, 做去除以及不去除旧培养基的处理, 比较包含或不含旧培养基中漂浮细胞情况下检测得到的细胞存活率。实验结果显示, 使用 CCK8 法检测 96 孔板、24 孔板细胞存活率, 不去除旧培养基时实验组细胞存活率高于去除旧培养基实验组细胞存活率。在顺铂浓度为 0.625 μM 时, 不去除旧培养基与去除旧培养基实验组之间的细胞存活率有显著差异。在 6 孔板和 100 mm 培养皿中, 使用细胞计数仪对用药后的细胞培养基中的漂浮细胞进行检测, 发现培养基中漂浮的细胞中存在活细胞。结果表明药物处理后的培养基中存在漂浮的活细胞, 去除旧培养基会去除这部分活细胞, 从而影响细胞药物实验结果的准确性。

【关键词】 计量学; 细胞计量; 检测方法; 细胞活率; 药物效果; 体外培养

【中图分类号】 TB99

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-9015(2024)04-0060-06

DOI: 10.12338/j.issn.2096-9015.2023.0358

【引用本文】 杨璐璐, 龚晓云, 曾庆黎, 等. 细胞存活率的检测处理方式对药物效果评估的影响研究 [J]. 计量科学与技术, 2024, 68(4): 60-65, 44.

Study on the Impact of Cell Viability Detection and Processing Methods on Drug Effect Evaluation

YANG Lulu^{1,2}, GONG Xiaoyun², ZENG Qingli^{1,2}, ZHANG Wenquan^{1,2}, SHENTU Xuping¹,
XUE Zhichao²

1. China Jiliang University, Hangzhou 322002, China

2. National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

Corresponding author: SHENTU Xuping, Email: stxp@cjlu.edu.cn; XUE Zhichao, Email: xuezc@nim.ac.cn

【Abstract】 When conducting drug experiments on cells cultured in vitro, drug treatment can cause cell death, and different methods for detecting cell survival rates can impact the experimental results. This study uses HeLa cells as the experimental object and treats the cells with different concentrations of cisplatin. The cell survival rates detected with or without floating cells in the old culture medium are compared. The experimental results indicate that when using the CCK-8 method to detect the cell survival rates in 96-well and 24-well plates, the cell survival rates of the experimental group without removing the old culture medium are higher than those of the experimental group with the old culture medium removed. At a cisplatin concentration of 0.625 μM , there is a significant difference in cell survival rates between the experimental groups with and without the removal of the old medium. In 6-well plates and 100 mm dishes, a cell counter is used to detect the floating cells in the cell culture medium after drug application, and the presence of viable cells among the floating cells in the medium is found. The results suggest that the floating viable cells in the culture medium after drug treatment can affect the accuracy of the cell drug experiment results, and removing the old culture medium will remove these viable cells.

收稿日期: 2023-12-21; 修回日期: 2023-12-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFF0705001); 国家自然科学基金项目 (21927812, 22104136)。

作者简介: 杨璐璐 (2000-), 中国计量大学在读研究生, 研究方向: 细胞计量、蛋白质组研究等, 邮箱: S22090710062@cjlu.edu.cn; 通讯作者: 申屠旭萍 (1974-), 中国计量大学教授, 研究方向: 生物防治、生物安全, 邮箱: stxp@cjlu.edu.cn; 薛志超 (1988-), 中国计量科学研究院助理研究员, 研究方向: 细胞计量、蛋白质组研究等, 邮箱: xuezc@nim.ac.cn。

【Key words】 metrology, cell cytometry, detection methods, cell viability, drug effects, in vitro culture

0 引言

癌症是一种高异质性疾病,是在世界范围内对人类健康最大的威胁之一。尽管到目前为止,癌症的治疗已经取得了显著成果,但预计到 2040 年,全球癌症病例将达到 2840 万例^[1]。患者本人承受身心折磨的同时其家庭也将承受巨大的经济压力,恶性肿瘤的治疗与攻克仍是现代社会面临的难题。然而药物研究开发是一个极其复杂、困难和耗资的过程^[2],目前的研发工作仍然面临着资金投入高、成功率和转化率极低等情况。造成实验失败的原因是多方面的,包括检测方式选择不当、数据质量欠佳、药物效果验证不准确等^[3]。体外培养的细胞系在癌症研究具有重大的意义,作为简化模型被用于分子和细胞水平的研究,是体外细胞实验不可或缺的实验工具^[4-5],细胞模型的出现和使用助力了癌症的研究及药物的研发。

细胞计量是生命科学研究的重要领域,在细胞层面和分子水平都取得了显著的研究成果^[6],为细胞领域更深层研究打下了稳固的基础。作为首个被成功从患者体内分离并在体外无限培养的癌细胞系-海拉细胞^[7],由于海拉细胞相比于其他贴壁细胞有较高的耐受性,其被广泛应用于基础性研究^[8]。顺式二氯二氨铂通常称为顺铂,它可以使 DNA 活性改变,继而诱导细胞凋亡^[9-10]。由于顺铂的这种抗癌活性,其被选择用于多种恶性肿瘤的治疗,如卵巢癌^[11-12]和乳腺癌^[13-14]。本研究选用海拉细胞作为研究对象,顺铂作为实验药物,探究细胞活率的不同检测方式对药物处理结果的影响,为选择合适的药物效果检测方式提供了数据基础。

在使用贴壁的肿瘤细胞进行细胞实验时,经过药物处理,培养基中会存在一定量的漂浮细胞,通常认为漂浮细胞为死亡细胞。然而越来越多的实验证明,经药物处理后贴壁细胞的培养基中存在一定量漂浮的活细胞^[15]。使用不同方法,纳入或不纳入这部分活细胞时,可能对实验结果存在潜在影响。外源性噻唑蓝(MTT)可以被细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原成水不溶性的蓝紫色结晶甲臜并沉积在细胞中,死细胞没有此功能^[16-17]。2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)可以被细胞线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性橙黄色甲臜产物,CCK8 法正是基于

WST-8 的性质而被用于实验中。MTT 法和 CCK8 法常被用来做细胞增殖测定^[18-19]、细胞毒性测定^[20-21]、细胞活性测定^[22-24]和药物筛选^[25]等实验,MTT 法要先加入 MTT 溶液,反应生成沉积在细胞中的不溶于水的蓝紫色甲臜后,吸掉上清并加入二甲基亚砷(DMSO)溶液溶解甲臜,用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量^[26-27]。但是上清中含有悬浮的细胞,而悬浮细胞中存在一部分漂浮但没有死亡的细胞,直接丢弃有可能会使实验结果产生误差。这些悬浮并且存活的细胞,可能是具有更强耐药性和抗凋亡能力的细胞,有部分肿瘤干细胞的潜质^[28-30]。CCK8 法有相同的问题,如果在加入 CCK8 溶液之前换新的培养基,去除的旧培养基中存在悬浮的活细胞,那么得到的检测值可能出现误差,影响实验的准确性。

1 材料与方法

1.1 设备

光学显微镜(OLYMPUS CKX53);细胞计数仪(Counter Star);酶联免疫检测仪(Thermo Fisher, Spectrophotometer)。

1.2 材料

Hela 细胞(BNCC 细胞库,编号 338703);细胞培养 96 孔板(Nest, 701001);24 孔板(Nest, 702001);6 孔板(Nest, 703001);100 mm 细胞培养皿(Nest, 704001)。

1.3 试剂

RPMI-1640 细胞培养基(gibco, 8123329);胎牛血清(四季青, 11011-8611);磷酸盐缓冲液(gibco, 8123535);EDTA-胰蛋白酶(gibco, 25200-056);顺铂(Solarbio, C8470);CCK8(WJLZ, WJ30025)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养

Hela 细胞的培养基为添加 10% 胎牛血清(四季青, 11011-8611)、1% 双抗溶液和 90% RPMI-1640 (gibco, 8123329)的完全培养基,细胞培养于含有 5% CO₂, 恒温 37 °C 的细胞培养箱中。

1.4.2 CCK8 法

CCK8 法是基于 WST-8 化学反应进行的。WST-8 可以被活细胞内线粒体脱氢酶还原生成橙黄色的产物。活细胞数量越多,生成的产物就越多,颜色也越

深。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值,通过 OD 值计算细胞活率间接评估药物效果。

1.4.3 细胞计数仪 (Count Star) 计数

细胞计数仪检测前需要对死细胞和活细胞进行染色,所用到的 AOPI 染液是由吖啶橙(AO)和碘化丙啶(PI)共同组成,其中吖啶橙(AO)是可以透过完整的细胞膜,与细胞核中的 DNA 结合发出绿色荧光的染料;碘化丙啶(PI)是只能通过不完整的细胞膜与细胞核中 DNA 结合,发出红色荧光的染料。所以在激发光的激发下,活细胞发绿色荧光而死细胞发红色荧光。细胞悬液与 AOPI 染液各取 10 μL ,把两者按 1:1 混合均匀,全部转移到 Count Star 计数板上,并选择 AOPI 计数模式,每个样品 3 个重复,每个重复随机选择三个视野拍照自动检测计数。

1.5 统计分析

1.5.1 药物抑制率、用药后细胞活率计算

采用 CCK8 法时,以 CCK8 OD 值计算药物抑制率和细胞活率,药物抑制率公式为 $(\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{实验组}}) / \text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\%$,用药后细胞活率公式为 $\text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。采用细胞计数仪计数时,以计量的细胞数量计算用药后细胞活率,公式为 $\text{实验组活细胞数量} / \text{对照组活细胞数量} \times 100\%$ 。

1.5.2 差异统计分析

实验数据采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计分析。其中两组间的实验数据对比,采用 paired t-test 进行分析;多组间实验数据对比,则采用 Two-Way ANOVA multiple comparison 进行统计分析。*号代表差异显著性,其中*表示 P 值 < 0.05 ,**表示 P 值 < 0.01 ,***表示 P 值 < 0.001 ,****表示 P 值 < 0.0001 。

2 实验结果与讨论

2.1 CCK8 孵育时间及顺铂处理时间优化

如图 1(a)所示,实验首先比较不同浓度顺铂在 CCK8 不同孵育时间情况下,顺铂反应结果差异。按每孔 3000 个细胞接种于 96 孔板中,顺铂浓度为 0 、 $1 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ 、 $0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 。当在显微镜下观察到 96 孔板中的细胞完全贴壁后,加入顺铂。当在显微镜下观察到加入 $10 \mu\text{M}$ 顺铂的细胞完全死亡后(三天),吸去 96 孔板中的旧培养基,加入新鲜培养基和 CCK8 溶液,在 37°C 细胞培养箱中

孵育。在孵育 0.5 h、1 h、2 h、4 h 后,使用酶联免疫酶标仪,检测各孵育时间点在 450 nm 处的吸光度值,得到 OD 值计算出生长抑制率(顺铂抑制率),并使用 Graphpad Prism 的 dose response inhibition 功能 $\log(\text{inhibitor})$ vs $\text{response}(\text{three parameters})$ 计算方式得到拟合顺铂抑制率曲线,并且计算出 IC_{50} 。结果为图 1(a)所示,CCK8 孵育 0.5 h,因为反应时间过短,可能 CCK8 与活性细胞反应不充分,顺铂反应曲线上各个顺铂浓度的细胞反应率有较大误差(蓝色)。随着孵育时间加长,细胞的生长抑制率与顺铂曲线拟合效果逐渐变好。孵育 2 h 和 4 h,计算出的细胞生长抑制率与顺铂抑制率曲线拟合得最好,两者没有较大差异。图 1(a)还显示,顺铂浓度在 10、1、 $0.1 \mu\text{M}$ 时,对细胞有效果,而其他低浓度的顺铂几乎没有效果。所以选用这三种顺铂浓度和 2 h 孵育时间继续探索合适的顺铂作用时间。图 1(b)为不同浓度顺铂对细胞处理 1、3、5 天的顺铂作用曲线。实验结果表明第 3 天和第 5 天的实验数据与顺铂作用曲线拟合效果最好,相比较而言第 5 天对对照组的细胞生长已经进入了平台期^[31],得到的实验数据误差较大。顺铂作用 3 天的 IC_{50} 为 $1.239 \mu\text{M}$ 。通过上述优化实验,下一步选用 2 h CCK8 孵育时间以及 3 天顺铂作用时间和 3 天的 IC_{50} ($1.239 \mu\text{M}$) 附近的顺铂浓度,进行下一步实验。

2.2 去除及不去除培养基时顺铂效果的差异

本研究比较了去除以及不去除旧培养基条件下检测到的细胞存活率。通过第一部分实验优化的结果,使用接种 3000 个细胞/孔的 96 孔板,选用 $5 \mu\text{M}$ 、 $2.5 \mu\text{M}$ 、 $1.25 \mu\text{M}$ 、 $0.625 \mu\text{M}$ 顺铂的四个浓度,顺铂作用时长为 3 天,使用 CCK8 法作为检测方法,并对两个实验组做去除旧培养基加入新鲜培养基和 CCK8(图 2 中 a)与不去除旧培养基直接加 CCK8(图 2 中 b)的处理。图 2 操作示意图中的绿色圆点代表活细胞,红色圆点代表死细胞。在细胞染色荧光图片中,绿色荧光(AO)代表活细胞,红色荧光(PI)代表死细胞。图 3(a)结果显示,在 96 孔板中,随着顺铂浓度的降低,去除旧培养基的实验组和不去除旧培养基的实验组细胞存活率都在逐渐提高,而且不去除旧培养基的实验组细胞存活率均比去除培养基的实验组细胞存活率高。顺铂浓度为 $0.625 \mu\text{M}$ 时,不去除旧培养基的实验组细胞存活率为 $(83 \pm 11.651)\%$,去除旧培养基的实验组细胞存活率为 $(67 \pm 6.624)\%$,两者差异显著。在 24 孔板中用 $5 \mu\text{M}$ 、

2.5 μM 、1.25 μM 、0.625 μM 顺铂重复这一实验，结果如图 3(b)所示，不去除旧培养基的实验组细胞存活率比去除培养基实验组细胞存活率高，两者的细胞活率都随着顺铂浓度降低而增加。顺铂浓度在

0.625 μM 时，不去除旧培养基的实验组细胞存活率为 $(94 \pm 3.687)\%$ ，而去除旧培养基后细胞存活率为 $(84 \pm 4.178)\%$ ，两者存在显著差异。

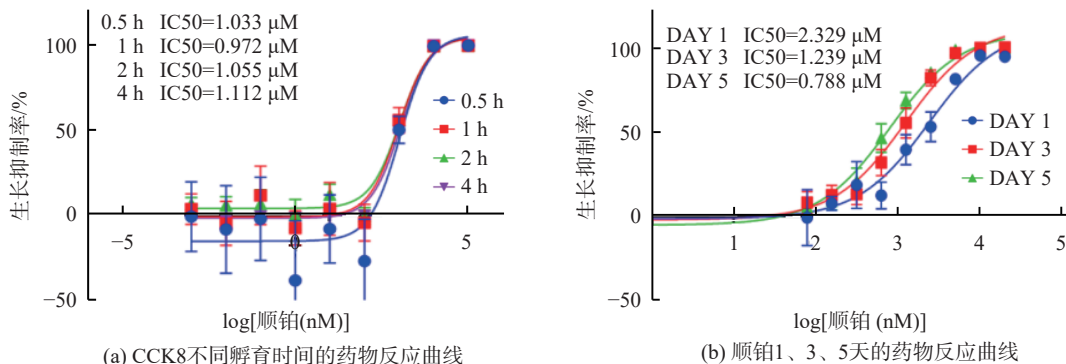


图 1 不同药物浓度和不同 CCK8 孵育时间下的药物作用

Fig.1 Drug effects under different drug concentrations and CCK-8 incubation time

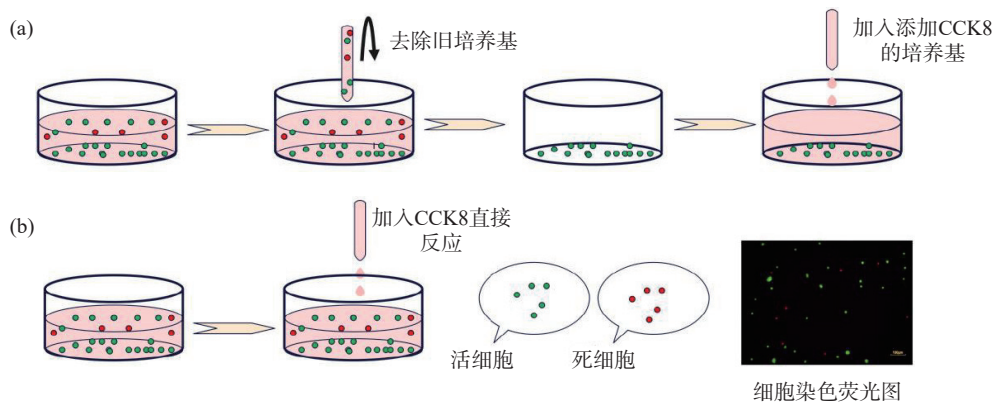


图 2 培养基不同处理方式操作示意图

Fig.2 Schematic diagram of the operation of different culture medium processing methods

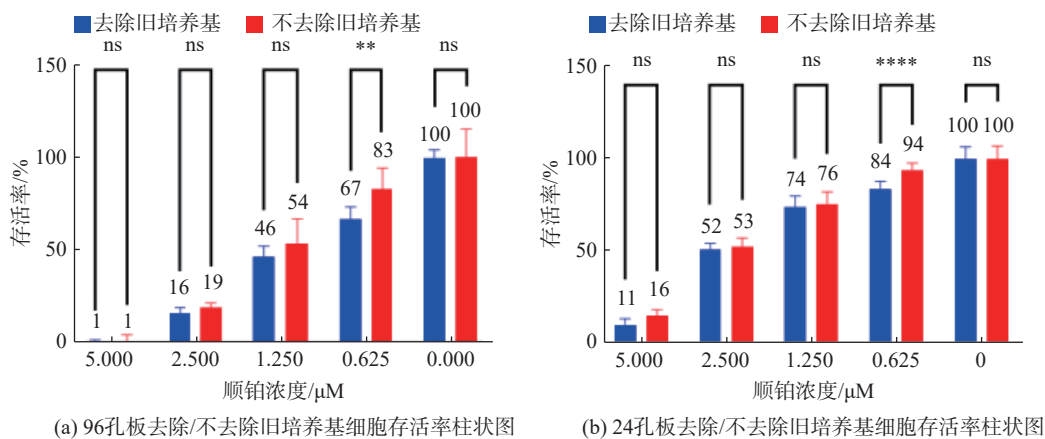


图 3 去除/不去除旧培养基检测的细胞存活率

Fig.3 Cell viability assays with or without the removal of old media

2.3 顺铂处理后培养基中存在漂浮的活细胞

在上述实验的结果中,发现去除旧培养基的实验组细胞存活率要低于不去除旧培养基实验组的细胞存活率,此结果表明加顺铂后的培养基中可能存在漂浮的活细胞,为进一步验证该发现。使用6孔板和100 mm培养皿培养细胞,取0.625 μM和1.25 μM浓度的顺铂对细胞进行处理,使用AOPI染色以及细胞计数仪来测量这两个实验组培养基中悬浮细胞中死细胞、活细胞数量及比率。结果如图4所示,在6孔板和100 mm培养皿中,经由顺铂处理后,培

养基中的悬浮细胞都存在一定的活细胞。在6孔板中,对照组活细胞、死细胞个数分别为 $(2.4 \pm 1.033) \times 10^4$ 、 $(4 \pm 0.685) \times 10^4$;使用顺铂处理后,死细胞比例个数增加,在0.625 μM和1.25 μM中死细胞个数分别为 $(5 \pm 0.398) \times 10^4$ 、 $(5.4 \pm 0.929) \times 10^4$ (图4(a))。在100 mm培养皿中对照组的活细胞和死细胞个数分别为 $(2.2 \pm 0.438) \times 10^5$ 、 $(2.4 \pm 0.469) \times 10^5$,在0.625 μM和1.25 μM中死细胞个数分别为 $(3.1 \pm 1.084) \times 10^5$ 、 $(3.8 \pm 1.089) \times 10^5$ (图4(b))。

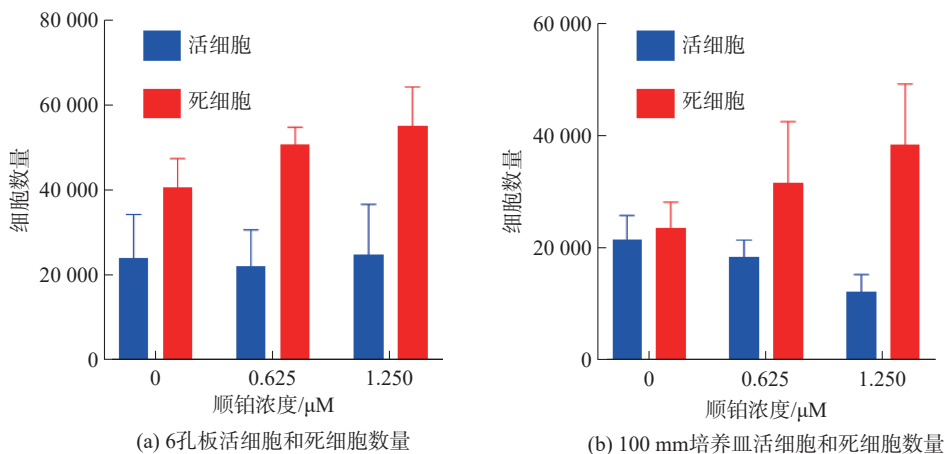


图4 加药后培养基中的细胞数量

Fig.4 Number of cells in the medium after drug application

2.4 顺铂浓度影响培养基中漂浮细胞的活细胞占比

上述统计了在6孔板和100 mm培养皿中,顺铂处理后上层培养基中死细胞和活细胞数量,随即对培养基中漂浮中的活细胞占比进行数据统计。统计结果显示如下,从图5的漂浮细胞中的活细胞占比柱状图可以看出,在6孔板和100 mm培养皿中,在没有进行顺铂处理时,培养基中的漂浮细胞有细胞处于活性状态,漂浮的活细胞在漂浮细胞中的占比分别为 $(30 \pm 7.473)\%$ 、 $(45 \pm 7.071)\%$ 。在6孔板中,顺铂浓度为0.625 μM和1.25 μM时,漂浮的活细胞在漂浮细胞的占比分别为 $(32 \pm 9.998)\%$ 、 $(37 \pm 9.860)\%$,而且1.25 μM时的漂浮活细胞的占比要高于0.625 μM时的漂浮活细胞的占比。在100 mm培养皿中,顺铂浓度为0.625 μM和1.25 μM时,漂浮的活细胞在漂浮细胞的占比分别为 $(42 \pm 11.790)\%$ 、 $(45 \pm 3.121)\%$,和6孔板一样,顺铂浓度为1.25 μM时的漂浮活细胞的占比高于顺铂浓度为0.625 μM时的漂浮活细胞占比。图5的柱状图还显示,在顺铂处理前和顺铂处理后,100 mm培养皿中漂浮的活

细胞在漂浮细胞中的占比均比6孔板中的要高。

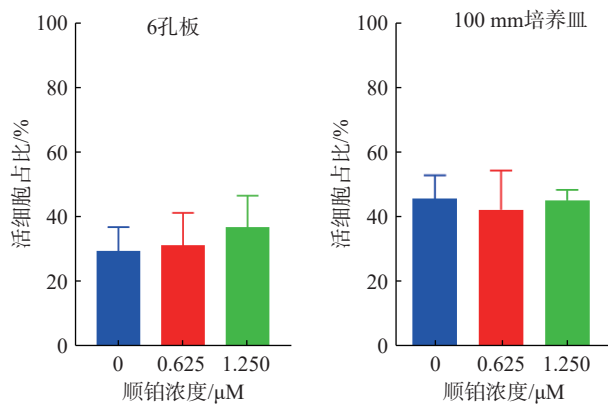


图5 漂浮细胞中的活细胞占比

Fig.5 Proportion of viable cells among floating cells

3 结论

本文研究了经药物处理的细胞检测前旧培养基的不同处理方式对药物实验结果的影响,并探究药物处理后,培养基中是否有漂浮细胞处于活性状态。在进行细胞实验尤其是药物实验时,检测细胞

活率以评估药物效果,上层培养基中的悬浮细胞也要纳入检测范围。实验结果表明,加药处理后的上层培养基中存在活细胞。在 96 孔板和 24 孔板这种较小容量的细胞培养器皿中进行药物实验,检测时纳入或者不纳入培养基中活细胞时的实验数据存在显著差异,这种差异影响检测得到的活细胞比例,继而使最终药物效果的评估结果产生较大误差,影响后续实验的进行。药物的研发复杂且耗资,因此每一步实验都要相当严谨,注意这些实验细节,有助于实验结果的准确性,促进药物研发的进程。

参考文献

- [1] Lian-Shun Feng. Development and Advances of Drugs for Cancer Theranostics – PART-IV[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2021, 18(21): 1644.
- [2] Tosca E. M, Ronchi D, Facciolo D, *et al.* Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in Anticancer Drug Development: The Contribution of 3D In Vitro Cancer Models in the Drug Efficacy Assessment[J]. *Biomedicines*, 2023, 11: 1058.
- [3] 薛志超, 赵佳威, 李永淑, 等. 细胞密度对抗癌药药效评估准确性的研究 [J]. *计量科学与技术*, 2023, 67(4): 57-62,56.
- [4] Jaroch K, Jaroch A, Bojko B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147: 297-312.
- [5] Schilling K, Harris AL, Halliday AN, *et al.* Investigations on Zinc Isotope Fractionation in Breast Cancer Tissue Using in vitro Cell Culture Uptake-Efflux Experiments[J]. *Front. Med*, 2022, 8: 746532.
- [6] Faruqui Nilofar, Kummrow Andreas, Fu Boqiang, *et al.* Cellular Metrology: Scoping for a Value Proposition in Extra- and Intracellular Measurements[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 7: 456.
- [7] Mirabelli, Coppola, Salvatore. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1098.
- [8] 薛志超, 曾嘉明, 李永淑, 等. 接种数量对细胞生长和药物作用的影响及细胞计数方法对比 [J]. *计量学报*, 2023, 3(44): 341-349.
- [9] Minerva, Amrita Bhat, Sonali Verma, *et al.* Cisplatin-based combination therapy for cancer[J]. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2023, 19(3): 530-536.
- [10] Raudenska Martin, Balvan Jan, Fojtu Michaela, *et al.* Unexpected therapeutic effects of cisplatin[J]. *Metalomics*, 2019, 11(7): 1182-1199.
- [11] Mengdi Song, Mingxiao Cui, Kehai Liu. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 232: 114205.
- [12] Chenying Jiang, Chenjun Shen, Maowei Ni, *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. *Genes & Diseases*, 2023, 1: 1.
- [13] Liang C, Zhang Hy, Wang Yq, *et al.* TMED2 Induces Cisplatin Resistance in Breast Cancer via Targeting the KEAP1-Nrf2 Pathway[J]. *CURR MED SCI*, 2023, 43: 1023-1032.
- [14] alma Y Mohamed, Hisham A Elshoky, Nayera M El-Sayed, *et al.* Ameliorative effect of zinc oxide-chitosan conjugates on the anticancer activity of cisplatin: Approach for breast cancer treatment[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 257: 128597.
- [15] A Rane, J Jarmoshti, A Siddique, *et al.* Dielectrophoretic enrichment of live chemo-resistant circulating-like pancreatic cancer cells from media of drug-treated adherent cultures of solid tumors[J]. *Lab Chip*, 2023, 6: 10.
- [16] Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review[J]. *Acta Histochemica*, 2018, 120(4): 303-311.
- [17] Ludmil Benov. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): 1.
- [18] Yanfeng Zhu, Weihui Chen, Weiqun Guan, *et al.* Study of As2O3 regulating proliferation and apoptosis of Tca8113 cells by inhibiting the expression of Id-1, Artificial Cells[J]. *Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 1932-1937.
- [19] Jun Wang, Wei Lei, Gang Li, *et al.* CD151 promotes proliferation and migration of SK-NEP-1 cells via the GSK-3 β /P21/cyclinD signaling pathway[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2019, 215(2): 329-334.
- [20] Ling Cai, Xijiang Qin, Zhihui Xu, *et al.* Comparison of Cytotoxicity Evaluation of Anticancer Drugs between Real-Time Cell Analysis and CCK-8 Method[J]. *ACS Omega*, 2019, 4: 12036-12042.
- [21] Jing-Ru Song, Na Li, Dian-Peng Li. Synthesis and anti-proliferation activity of mogrol derivatives bearing quinoline and triazole moieties[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2021, 42: 128090.
- [22] de la Fuente-Jiménez J L, Rodríguez-Rivas C I, Mitre-Aguilar I B, *et al.* A Comparative and Critical Analysis for In Vitro Cytotoxic Evaluation of Magneto-Crystalline Zinc Ferrite Nanoparticles Using MTT, Crystal Violet, LDH, and Apoptosis Assay[J]. *Mol. Sci*, 2023, 24: 12860.
- [23] Magdalena Boncler, Marek Rózsalski, Urszula Krajewska, *et al.* Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells, 2014, 69(1): 9-16.
- [24] Kumar Priti, Nagarajan Arvindhan, Uchil Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, 6: 469-472.
- [25] Yu C, Zhang X, Wang M, *et al.* Afatinib combined with anti-PD1 enhances immunotherapy of hepatocellular carcinoma via ERBB2/ STAT3/PD-L1 signaling[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1198118.

- [11] 罗敬, 张晓辉, 何煦, 等. 自准直仪光电探测器失调对测角的影响[J]. 中国光学, 2020, 13(3): 558-567.
- [12] 李小明, 朱国帅, 郭名航, 等. 基于光学自准直的旋转轴平行度测量与不确定度分析[J]. 红外与激光工程, 2023, 52(5): 304-315.
- [13] 高松涛, 武东城, 苗二龙. 大偏高度非球面检测畸变校正方法[J]. 中国光学, 2017, 10(3): 383-390.
- [14] 温彬, 李永亮, 曾佑洪, 等. 便携式红外瞄准镜瞄准基线检测系统研究[J]. 激光与红外, 2010, 40(12): 1330-1332.
- [15] 王洪君. 基于数字图像处理的透镜中心偏测量研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
- [16] 朱凡, 李颖先, 谭久彬. 高精度激光光束准直系统设计[J]. 光学精密工程, 2020, 28(4): 817-826.
- [17] 安正杰. 高精度二维自准直仪研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [18] 杜娟, 郑喆, 王世锋, 等. 激光自准直仪小型化光机结构设计[J]. 长春理工大学学报: 自然科学版, 2015, 38(6): 1-4.
- [19] 闫亚东, 何俊华, 仓玉萍, 等. 用ZEMAX模拟五棱镜误差对平行度检测的影响[J]. 应用光学, 2007, 28(5): 649-653.
- [20] 张冬. 基于PSD的光电自准直仪的研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2014.
- [21] Wang F, Zhang Z Y, Wang R Q, *et al.* Distortion measurement of optical system using phase diffractive beam splitter[J]. *Optics express*, 2019, 27(21): 29803-29816.
- [22] 雷震. 红外系统光束平行性检测方法的研究[D]. 西安: 西安工业大学, 2016.
- [23] Lu Z G, Lin S, Zheng T, *et al.* Measuring Parallelism for Two Thin Parallel Beams Based on Autocollimation Principle[J]. *Key Engineering Materials*, 2014, 613: 157-166.
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. 自准直仪: JJG 202—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [25] 赵玉平, 彭川黔, 王劫. 大口径细光束自准直测量系统的误差源分析[J]. 半导体光电, 2018, 39(3): 414-419.
- [26] 闫亚东, 董晓娜, 何俊华, 等. 单星模拟器的调校准确度分析[J]. 光子学报, 2007, 36(9): 1742-1746.
- [27] 孙一书. 光学系统畸变精密测量技术研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [28] 温中凯, 雷文平, 黄颖. 五棱镜垂直度误差对转向角的影响分析[J]. 航天返回与遥感, 2019, 40(1): 59-65.
- [29] Geckeler R D. Optimal use of pentaprisms in highly accurate deflectometric scanning[J]. *Measurement Science & Technology*, 2007, 18(1): 115-125.
- [30] 袁理, 张晓辉, 韩冰, 等. 五棱镜转动时出射光角度的变化[J]. 中国光学, 2015, 8(6): 1036-1043.
- [31] 张帅, 侯溪. K-B 镜面形高精度检测技术研究进展[J]. 中国光学, 2020, 13(4): 660-675.
- [32] 戚二辉, 罗霄, 李明, 等. 五棱镜扫描技术检测大口径平面镜的误差分析[J]. 红外与激光工程, 2015, 44(2): 639-646.
- [33] 袁理, 张晓辉. 采用五棱镜扫描法检测大口径平面镜的面形[J]. 中国光学, 2019, 12(4): 921-932.

本文编辑: 霍伟炜

(上接第 65 页)

- [26] Wang Junbin, Gao Jin, Chen Qinnan, *et al.* LncRNA LINC01116 Contributes to Cisplatin Resistance in Lung Adenocarcinoma[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13: 9333-9348.
- [27] anfang Wang, Zhenhao Zhang, Wei Wan, *et al.* FAM19A5/S1PR1 signaling pathway regulates the viability and proliferation of mantle cell lymphoma[J]. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2022, 42(3): 225-229.
- [28] Wang Ya, Zhang Xiaomei, Zhao Boyuan, *et al.* Suspension State Promotes Drug Resistance of Breast Tumor Cells by Inducing ABCG3 Overexpression[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 190: 410-422.
- [29] Mao Yuqiang, Yu Ying, Han Yun. Influence of thoracic drainage fluid on proliferation, migration, apoptosis, and drug resistance in lung cancer cell lines[J]. *Cancer Management and Research*, 2019, 11: 2253-2259.
- [30] Zhuo-Ya DAI, Shuang-Mei JIN, Hong-Qin LUO, *et al.* LncRNA HOTAIR regulates anoikis-resistance capacity and spheroid formation of ovarian cancer cells by recruiting EZH2 and influencing H3K27 methylation[J]. *Neoplasma*, 2021, 68(3): 509-518.
- [31] Grimes D R, Fletcher A G. Close Encounters of the Cell Kind: The Impact of Contact Inhibition on Tumour Growth and Cancer Models[J]. *Bulletin of Mathematical Biology*, 2020, 82(2): 20.

本文编辑: 霍伟炜