

技术与方法

基于实时无标记细胞分析系统的气道平滑肌细胞收缩舒张效应检测方法的建立

陈采陶 史阳琳 刘佳缘 杨永清 陈艳焦*

(上海中医药大学, 上海市针灸经络研究所, 上海 200030)

摘要 该研究利用实时无标记细胞分析系统(xCELLigence real-time cell analysis system, RTCA)建立气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)收缩舒张效应检测方法。筛选适宜细胞接种密度, 接种于RTCA检测板中监测细胞动态生长曲线; 利用组胺刺激细胞收缩, 并计算组胺半数抑制浓度(IC₅₀); 在适宜组胺刺激浓度的基础上, 利用特布他林模拟细胞舒张效应, 并计算半数有效浓度(EC₅₀)。结果显示, ASMCs为4 000个/孔接种密度培养于(16±4) h区间内, 符合后续实验需求; 组胺作用ASMCs 2 h后的IC₅₀为8.07 mmol/L, 故选择8 mmol/L组胺刺激ASMCs可见较为明显的收缩效应; 特布他林作用ASMCs 2 h后的EC₅₀为8.08×10⁻⁸ mol/L, 故浓度为10 μmol/L和20 μmol/L的特布他林可检测到明显舒张效应(P<0.05)。利用RTCA可以稳定、有效、可靠地检测ASMCs收缩舒张效应, 为以ASMCs为主要研究对象的呼吸系统疾病提供参考数据和准确的检测方法。

关键词 气道平滑肌; 实时无标记细胞分析系统; 收缩舒张效应; 组胺; 特布他林

Establishment of the Contraction and Relaxation Effect System Based on RTCA of Airway Smooth Muscle Cells

CHEN Caitao, SHI Yanglin, LIU Jiayuan, YANG Yongqing, CHEN Yanjiao*

(Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China)

Abstract In this study, RTCA (xCELLigence real-time cell analysis system) was used to establish a method to detect the contraction and relaxation effect of ASMCs (airway smooth muscle cells). ASMCs were inoculated into the E-plate of RTCA detection plate with different densities to monitor the dynamic growth curve, and the appropriate cell density was selected. Histamine was used to stimulate cell contraction and the IC₅₀ (median inhibition concentration) of histamine was calculated. Based on appropriate histamine stimulation concentration, terbutaline was used to simulate the relaxation effect of cells, and the EC₅₀ (median effective concentration) was calculated. The results showed that the density of ASMCs was 4 000 cells/well [the cell culture was within (16±4) h], which was in line with the requirements of subsequent experiments. The IC₅₀ of histamine on ASMCs for 2 h was 8.07 mmol/

收稿日期: 2020-03-15 接受日期: 2020-05-15

国家自然科学基金(批准号: 81973951)和上海市卫生健康委员会(批准号: 20194Y0164)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54592134, E-mail: cyjb1018@163.com

Received: March 15, 2020 Accepted: May 15, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81973951) and Shanghai Municipal Health Commission (Grant No.20194Y0164)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54592134, E-mail: cyjb1018@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5287>

L, so the contractile effect of ASMCs stimulated by histamine of 8 mmol/L was obvious. The EC_{50} of terbutaline on ASMCs 2 h was 8.08×10^{-8} mol/L. Based on the cell contraction model, significant relaxation effect of terbutaline was detected at the concentration of 10 μ mol/L and 20 μ mol/L ($P < 0.05$). ASMCs contraction and relaxation effect can be effectively detected by RTCA, providing reference data and accurate detection method for respiratory diseases with ASMCs as the main research object.

Keywords airway smooth muscle cells; xCELLigence real-time cell analysis system; contraction and relaxation effect; histamine; terbutaline

支气管哮喘在全球哮喘倡议指南(Global Initiative for Asthma, GINA)中被定义为一种气道慢性炎症性疾病,主要表现为由气道高反应引起的可逆性呼气气流受限,并引起喘息、气短、胸闷和咳嗽等症状^[1]。气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)是呼吸道的主要组成部分,其收缩和舒张是造成气道高反应加重或减轻的主要原因^[2],也是哮喘机制及相关研究的重要指标之一^[3-4]。因此,深入探讨哮喘生物学机制、哮喘药物疗效评价及新药研发的关键主要集中在有效舒张ASMCs^[5-7]。

在对哮喘患者进行直接临床研究时存在诸多限制,有关发病机制的研究、治疗方法的评价和新药研发很大程度需要在动物或细胞上进行实验。哮喘活体动物模型能模拟疾病发生发展全过程,但实验结果也受到佐剂选择^[8]、雌雄炎症反应不同^[9]等诸多因素影响。然而细胞实验操作简单、可重复性高,在一些针对性较强的实验设计中是很多实验者的选择^[10]。建立一种稳定、有效、可靠的ASMCs收缩和舒张效应检测方法,可以为哮喘发病机制和病理生理研究奠定基础。目前,针对ASMCs收缩舒张的研究方法均通过检测其形态改变来分析,如镜下观察^[11]、膜片钳检测^[12]、胶原凝胶三维立体培养法^[13]等,现有方法难以精确量化细胞收缩或舒张程度,同时无法动态监测细胞状态。

实时无标记细胞分析系统(xCELLigence real-time cell analysis system, RTCA)是一种基于电子阻抗的动态细胞监测技术。可将测定的电阻抗实时转化为细胞指数(cell index, CI),最大限度模拟细胞自然生长环境,动态、无标记、非侵入性地准确掌握细胞状态并进行分析^[14]。本研究利用RTCA技术,根据ASMCs贴壁特性,绘制细胞生长曲线,并实时监测细胞收缩和舒张,试图构建ASMCs收缩舒张效应检测方法,以期以ASMCs为主要研究对象的呼吸疾病提供参考数据和准确检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 取材于雄性SD大鼠,利用胶原酶-胰酶消化法分离纯化并培养待用,选择5~10代细胞进行实验。细胞提取及鉴定方法延续本课题组前期已发表文章^[15]。

1.1.2 主要试剂 组胺(histamine, Hist)购自上海生工生物工程股份有限公司;硫酸特布他林注射液(terbutaline, TB)购自成都华宇制药有限公司;DMEM高糖液体培养基、胎牛血清、胰酶细胞消化液购自Sigma公司;青霉素-链霉素混合液购自上海碧云天生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液购自Hyclone公司。

1.1.3 实验仪器 实验仪器包括:实时无标记细胞分析系统(xCELLigence, 美国ACEA Biosciences公司)、配套E-plate金属电极板(96孔, 美国ACEA Biosciences公司)、垂直双人单面超净工作台(SW-CJ-2FD, 上海博讯实业有限公司)、二氧化碳培养箱(CCL-170B-8, 新加坡ESCO公司)、高速低温离心机(Microfuge 22R, 美国Beckman公司)、荧光倒置显微镜(IX-81, 美国Olympus公司)、移液器(德国Eppendorf公司)、细胞计数板(上海求精实业有限公司)、培养皿(美国Corning公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠ASMCs的培养 ASMCs以 5×10^4 个/mL密度接种于培养皿,培养基为高糖DMEM,含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素混合液。培养条件为37 °C、饱和湿度、5% CO₂。每2~3日换液1次,当细胞达80%融合后进行传代待用。

1.2.2 基于RTCA筛选大鼠ASMCs接种密度 取ASMCs用3 mL胰酶在37 °C消化,加入9 mL培养液重悬,1 000 r/min离心10 min后吸尽上清,加入1 mL培养液重悬并进行细胞计数。按照5 000个/孔、4 000个/孔、3 000个/孔、2 000个/孔、1 000个/孔的细胞密度接种

(每孔培养液体积为200 μL), 每个细胞密度设3个平行复孔, 计算细胞悬液用量, 并用培养液补足体积待用。

向金属电极板每孔加入 50 μL 细胞培养液测定基线。待基线测定完毕, 将计算好的细胞悬液接种于向金属电极板中, 室温下静置30 min, 待细胞沉降至孔底后, 将向金属电极板安置于xCELLigence RTCA仪器上, 移至培养箱中培养, 设定程序连续检测细胞增殖情况。以时间为X轴, 细胞CI值为Y轴, 绘制细胞生长曲线。CI值计算公式如下:

$$CI = \max_{i=1, \dots, n} \left[\frac{R_{\text{cell}}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right]$$

其中, $R_b(f)$ 代表无细胞黏附的电阻抗; $R_{\text{cell}}(f)$ 代表有细胞黏附的电阻抗, n 代表检测电阻抗的频点数量。在相同培养条件下, 电极上的细胞数量越多, $R_{\text{cell}}(f)$ 值越大, 则CI值越大; 在细胞数量相同时, 细胞黏附电极接触面越大, 则CI值越大^[16]。CI值可实时反映细胞生长状态, 根据监测到的CI值可判定细胞是否处于对数增长期, 用于后续实验研究^[17]。

1.2.3 监测不同浓度组胺对大鼠ASMCs收缩程度的影响 设置空白对照组(PBS)和Hist实验组, Hist浓度分别设定为5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mmol/L, 每个浓度设3个平行复孔, 待细胞增长至对数增长期(CI值约为1, 细胞铺板后12~24 h内)加入Hist并检测。检测不同浓度Hist对ASMCs收缩程度的影响, 确定适宜Hist刺激浓度, 并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 监测不同浓度特布他林舒张大鼠ASMCs程度 在最适宜浓度的Hist刺激细胞收缩基础上, 设定空白对照组(PBS)和TB实验组, TB浓度分别设定为0.01、0.10、1.00、10.00、20.00 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度设3个平

行复孔, 待细胞增长至对数增长期(CI值约为1, 细胞铺板后12~24 h内)加药并检测。检测不同浓度TB舒张ASMCs程度, 并计算半数效应浓度(EC₅₀)。

1.3 统计学方法

通过xCELLigence RTCA仪器附带软件包自动计算实时动态CI值和评估的斜率。实验数据表达为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$), 组间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 两两比较采用最小显著差异性(least significant difference, LSD)测验进行分析, 以 $P < 0.05$ 判断差异显著性。

2 结果

2.1 大鼠ASMCs最适接种密度

本实验采用RTCA实时监测CI值, 并由此确定ASMCs最适接种密度和细胞增殖最佳状态。经过24 h后, RTCA监测到不同铺板密度ASMCs增殖曲线, 其CI值变化区间为0.1~1.7(图1)。ASMCs接种密度低于3 000个/孔时, 细胞未出现明显的对数生长期和平台期; 而当接种密度在4 000个/孔或5 000个/孔时, CI值在20 h内持续增长, 且呈对数生长趋势。本实验后续选择4 000个/孔细胞接种密度作为最适细胞密度, 细胞生长(16 \pm 4) h后明场下可见ASMCs形态伸展呈梭形或不规则三角形, 形成单层细胞层, 无细胞聚集叠加现象, 满足加药条件。

2.2 利用组胺进行大鼠ASMCs收缩效应检测

将ASMCs以4 000个/孔细胞接种到96孔向金属电极板中培养, 待细胞增长至对数增长期后开始加药, Hist浓度梯度为5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mmol/L, 另设置空白对照组(PBS), 加入Hist后继续培养并检

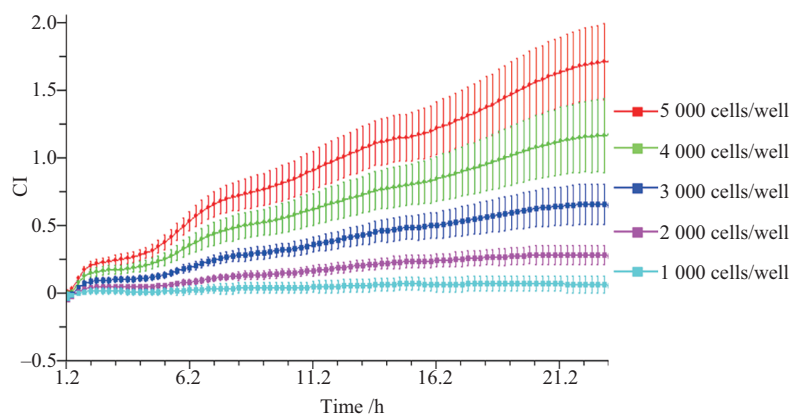
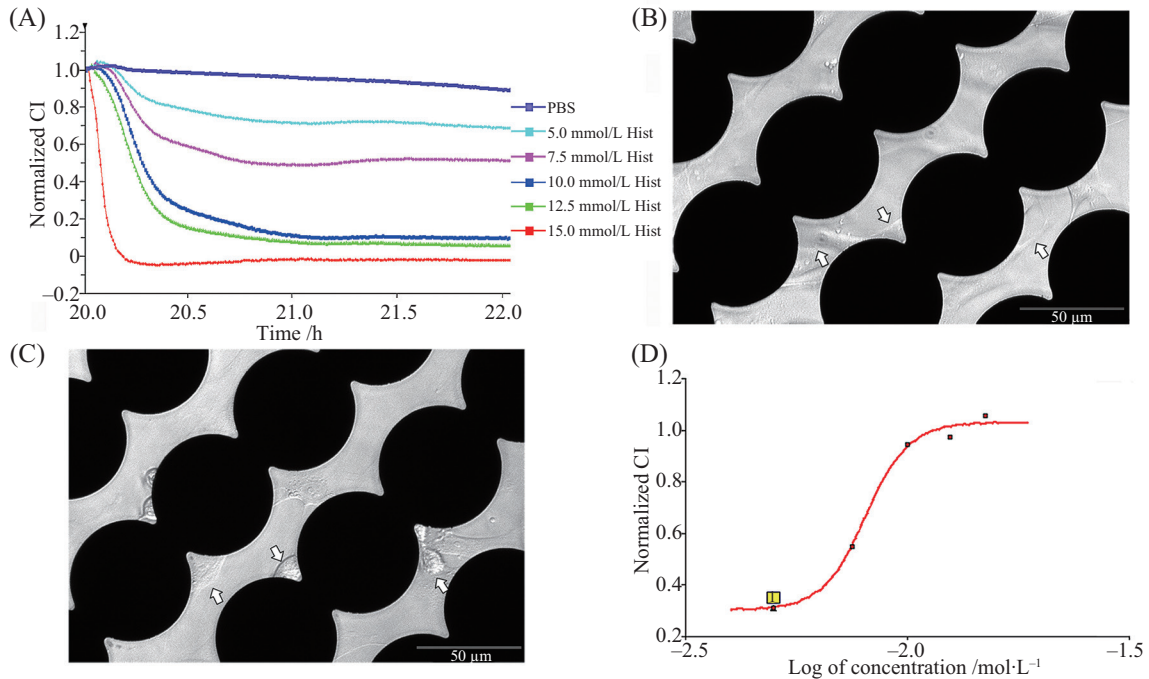


图1 实时监测不同密度大鼠ASMCs生长曲线

Fig.1 ASMCs growth curves of rats with different densities monitored by RTCA



A: 实时监测不同Hist浓度对ASMCs的CI值影响; B: ASMCs以4 000个/孔细胞密度接种生长20 h后细胞铺板状态。使用倒置显微镜采集图像, 黑色圆圈表示电极阵列的位置, 白色箭头指示细胞排列位置; C: 8 mmol/L Hist浓度刺激ASMCs收缩15 min后镜下状态; D: Hist作用ASMCs 2 h后IC₅₀。方框1为IC₅₀起始浓度, 红色小方块为不同浓度梯度下对应的归一化CI值

A: cell index of ASMCs with different concentrations of Hist monitored by RTCA; B: cell status after ASMCs inoculated with 4 000 cells/well cell density for 20 h. The image was acquired by an inverted microscope. The black circles indicated the position of the electrode array, and the white arrows indicated the position of the cells; C: cell status after ASMCs stimulated by 8 mmol/L Hist for 15 min; D: the IC₅₀ value of Hist on ASMCs (2 h). Box 1 represents the initial concentration of IC₅₀, the small red squares represent the normalized CI corresponding to different concentration gradients.

图2 Hist刺激的ASMCs收缩效应检测

Fig.2 The detection of ASMCs contraction effect induced by Hist

测CI值变化。

RTCA监测Hist不同浓度对于ASMCs的CI值呈量效关系, 随着剂量的增加, 其对ASMCs的收缩作用增强, CI值逐渐减小(图2A)。镜下观察发现, ASMCs加药前细胞呈平滑肌典型“峰-谷”状形态(图2B), 加入Hist后可见细胞逐步收缩变圆, 细胞间隙增宽, 约15 min后细胞达到收缩最大程度(图2C)。通过RTCA分析系统计算Hist作用ASMCs 2 h的IC₅₀为8.07 mmol/L(图2D)。

2.3 利用特布他林进行大鼠ASMCs舒张效应检测

在使用8 mmol/L Hist建立细胞收缩效应基础上(因Hist作用ASMCs 2 h的IC₅₀为8.07 mmol/L), 同时加入平滑肌细胞舒张阳性药物TB检测舒张效应, 浓度梯度分别为0.01、0.10、1.00、10.00、20.00 μmol/L, 另设置不加任何药物的空白对照组(PBS)。细胞至对数增长后期后开始加药, 实时检测CI值的变化。

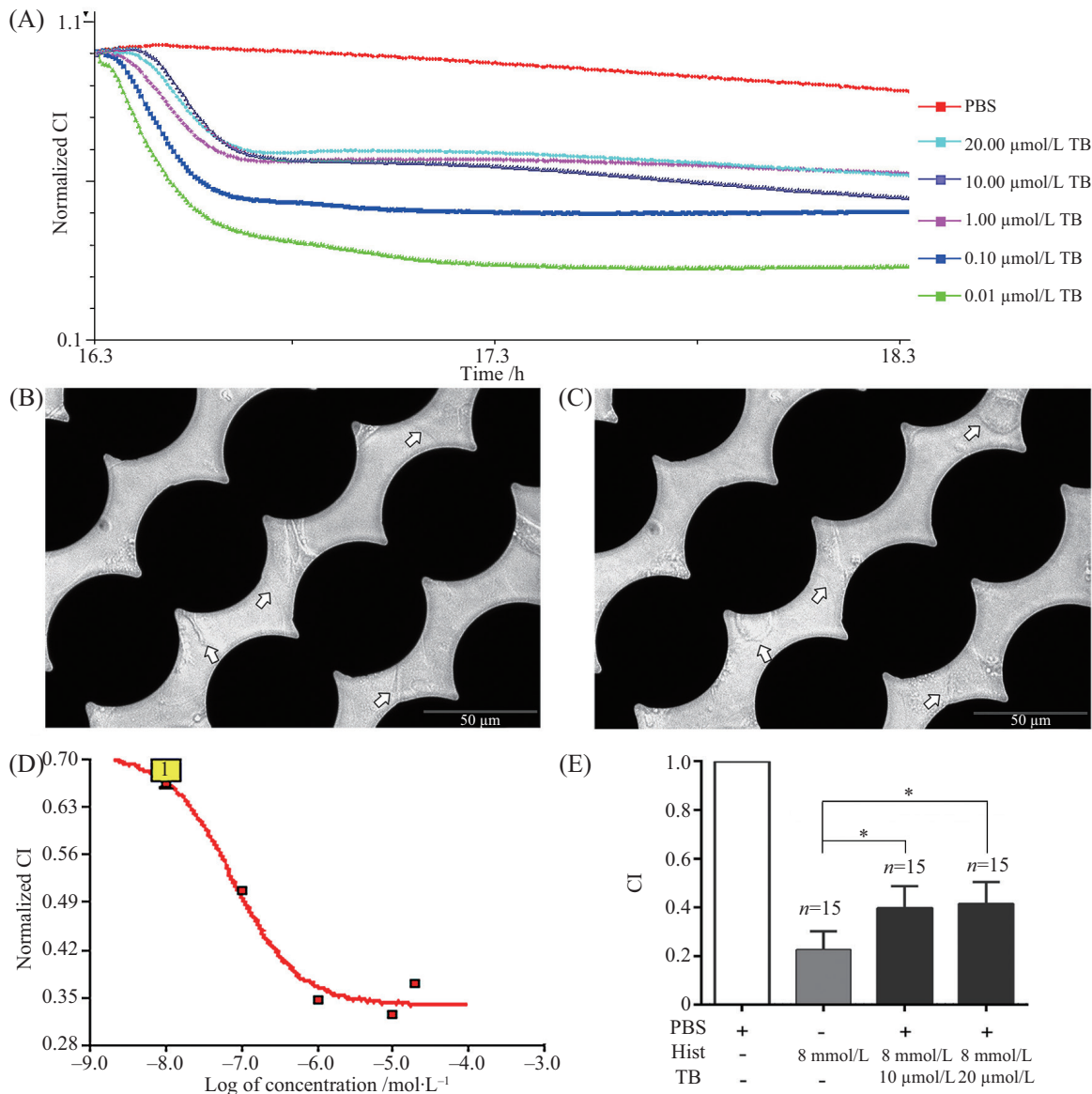
RTCA监测不同浓度TB对于ASMCs的CI值呈量效关系的影响, 随着TB剂量的增加, CI值下降程

度减少, 说明ASMCs收缩程度减少(图3A)。

镜下观察发现, 加药前细胞呈平滑肌典型形态(图3B), 加入20 μmol/L TB(8 mmol/L Hist同时加入), 可见细胞逐步收缩变圆, 约15 min后也达到收缩最大程度(图3C), 其收缩程度与8 mmol/L Hist收缩效应相比明显减少。通过RTCA分析系统计算, TB对ASMCs作用2 h的EC₅₀为8.08×10⁻⁸ mol/L, 其浓度曲线及结果如图3D所示。选择10 μmol/L和20 μmol/L两个浓度的TB进行细胞舒张实验的再次验证, 实验结果显示, TB浓度为10 μmol/L和20 μmol/L时对平滑肌细胞具有明显舒张效应($P < 0.05$, 图3E)。

3 讨论

ASMCs在细胞因子或炎症介质作用下收缩, 是造成哮喘患者气道高反应的主要原因^[5]。ASMCs收缩舒张效应的检测是评价哮喘患者病情加重或缓解的重要指标。临床应用中舒张ASMCs是减轻哮喘发作期症状的关键治疗措施, 也是目前药物研发的



A: 实时监测在收缩效应基础上不同浓度TB对ASMCI值影响; B: ASMCI以4 000个/孔细胞密度接种生长16.3 h后细胞铺板状态。使用倒置显微镜采集图像, 黑色圆圈表示电极阵列的位置, 白色箭头指示细胞排列位置; C: 收缩效应基础上20 μmol/L TB刺激ASMCI舒张15 min后细胞镜下状态; D: TB作用ASMCI 2 h后EC₅₀。方框1为EC₅₀起始浓度, 红色小方块为不同浓度梯度下对应的归一化CI值; E: 不同浓度TB对ASMCI的CI值比较, P < 0.05。

A: cell index of ASMCI with different concentrations of TB monitored by RTCA (based on contraction effect); B: cell status after ASMCI inoculated with 4 000 cells/well cell density for 16.3 h. The image was acquired by an inverted microscope. The black circles indicated the position of the electrode array, and the white arrows indicated the position of the cells; C: cell status after ASMCI were stimulated by 20 μmol/L TB for 15 min (based on contraction effect); D: the EC₅₀ value of TB on ASMCI (2 h). Box 1 represents the initial concentration of EC₅₀, the small red squares represent the normalized CI corresponding to different concentration gradients; E: cell index of ASMCI stimulated by TB at different concentrations, P < 0.05.

图3 TB舒张ASMCI效应检测

Fig.3 The detection of ASMCI relaxation effect induced by TB

重点内容。细胞实验作为基础研究的重要手段, 在哮喘生物学机制研究或药物研发中扮演了重要角色。故建立有效、准确且稳定的细胞收缩舒张效应检测方法, 可为今后哮喘发病机制、病理生理、药物筛选等研究奠定坚实的基础。为此, 本研究拟通过RTCA系统建立采集和记录ASMCI收缩和舒张效

应的实验方法。

RTCA是一种建立在电子阻抗基础上的动态细胞检测技术, 目前较多被运用于心肌细胞^[18]和肿瘤细胞^[19]的监测。实验无需对细胞进行标记, 可在最大程度接近生理状态下对细胞进行检测; RTCA仪器可即时将变化的电阻抗值转化为CI值, 避免了单个

时间点观察的缺点, 动态反应细胞增长^[20]、细胞形态变化^[21]及细胞对化合物的反应^[22]等; 同时RTCA所用向金属电极板的孔与孔之间相互独立, 可平行做多个副本, 适用于细胞接种密度的摸索和药物效应的筛选; 符合ASMCs模型的检测要求。国内鲜有采用ASMCs作为细胞实验模型报道, 团队前期曾采用RTCA系统对人和大鼠ASMCs的增殖进行了观察^[15]; 并在给与相同剂量收缩剂的条件下, 对RTCA系统与传统检测方法“胶原凝胶收缩法”进行比较研究^[23], 相较于用人工测量细胞形态学变化来分析细胞状态的传统检测方法, RTCA系统灵敏度高、组内差异小, 检测结果更为稳定。

本研究采用Hist作为ASMCs收缩效应刺激药物, Hist是肥大细胞和嗜酸性粒细胞受到抗原刺激后释放出的活性物质, 是最常见的哮喘诱发因素。Hist的释放可引起ASMCs中钙离子浓度的增加, 刺激细胞收缩效应, 因而促进气道收缩^[24]。我们对Hist造模的有效性和准确性进行了检验, 筛选了最优参数, 选择合适的刺激ASMCs收缩的Hist浓度。本实验检测到Hist对大鼠ASMCs作用2 h的IC₅₀为8.07 mmol/L, 故检测细胞收缩效应时可选择8 mmol/L Hist, 且使用5~10代细胞进行实验结果均较为稳定。

为了模拟哮喘病人实际发病后用药的缓解状态, 本实验采用TB作为阳性药物进行舒张效应检测, 在细胞收缩效应基础上模拟舒张效应。TB属于 β_2 受体激动剂, 是临床缓解轻中度哮喘急性症状的首选药物之一, 其不良反应小于同种 β_2 受体激动剂——沙丁胺醇^[25]。在本实验体系中, 可加入不同的化合物或药物, 建立影响细胞收缩或舒张效应的哮喘药理模型。结果显示, TB浓度为10 μ mol/L和20 μ mol/L时对ASMCs有显著舒张效应。在EC₅₀浓度范围内均可以选择合适的TB浓度。

本实验体系中, 有一些关键点需要注意。(1)细胞密度的选择: ASMCs的生长密度是影响本实验体系的主要参数。实验设置了5个细胞种植密度, 发现大鼠ASMCs的最佳细胞接种密度为4 000个/孔; 在采用其他种属细胞时, 需要根据细胞大小进行调整。(2)细胞状态: 实验过程中, 动作需轻柔减少细胞损伤; 实验全程操作需无菌, 避免影响细胞生长; 同时密切监测细胞增殖曲线, 达到对数增长期时方可加药, 以保证实验体系的稳定。

综上所述, 本实验利用RTCA检测Hist刺激大鼠

ASMCs收缩效应, 并用阳性药物TB进行舒张效应检测, 成功建立了ASMCs收缩舒张效应检测方法。研究显示实验结果稳定, 且第5~10代ASMCs均能获得相同的实验结果, 实验可重复性高, 能够为哮喘生物学机制研究、哮喘药物早期筛选及疗效评价提供相对准确可靠的实验体系。

参考文献 (References)

- [1] GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (Update 2019) [EB/OL]. <https://ginasthma.org/reports/2019-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>.
- [2] WEST A R, SY YONG H T, SIDDIQUI S, et al. Airway contractility and remodeling: links to asthma symptoms [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(1): 3-12.
- [3] BERGER P, TRIAN T, ROSSIGNOL R, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma [J]. *J Exp Med*, 2009, 204(13): 3173-81.
- [4] BURGESS J K, LEE J H, GE Q, et al. Dual ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways control airway smooth muscle proliferation: differences in asthma [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 216(3): 673-9.
- [5] NOBLE P B, PASCOE C D, LAN B, et al. Airway smooth muscle in asthma: linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodelling [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2014, 29(2): 96-107.
- [6] HIROTA J A, NGUYEN T T, SCHAAFSMA D, et al. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(5): 370-8.
- [7] ZUYDERDUYN S, SUKKAR M B, FUST A, et al. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells [J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(2): 265-74.
- [8] MULLANE K, WILLIAMS M. Animal models of asthma: reprise or reboot [J]? *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(1): 131-9.
- [9] HAYASHI T, ADACHI Y, HASEGAWA K, et al. Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in BALB/c mice [J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(6): 562-7.
- [10] MALM-ERJEFALT M, PERSSON C G, ERJEFALT J S. De-granulation status of airway tissue eosinophils in mouse models of allergic airway inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(3): 352-9.
- [11] CURL C L, BELLAIR C J, HARRIS T, et al. Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude microscopy and confocal microscopy [J]. *Cytom Part A*, 2005, 65A(1): 88-92.
- [12] 叶涛, 徐永健, 张珍祥, 等. 一氧化氮对被动致敏人气道平滑肌细胞钾通道的作用[J]. *中华结核和呼吸杂志*(YE T, XU Y J, ZHANG Z X, et al. Effects of nitric oxide on potassium channels in passively sensitized human airway smooth muscle cells [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*), 2006, 29(4): 278-9.
- [13] SAKOTA Y, OZAWA Y, YAMASHITA H, et al. Collagen gel contraction assay using human bronchial smooth muscle cells and its application for evaluation of inhibitory effect of formoterol [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(6): 1014-20.

- [14] ROSHAN MONIRI M, YOUNG A, REINHEIMER K, et al. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA) [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(2): 379-86.
- [15] 王文倩, 王宇, 徐玉东, 等. 利用实时细胞分析系统检测人和大鼠气道平滑肌细胞倍增时间的研究[J]. *现代检验医学杂志* (WANG W Q, WANG Y, XU Y D, et al. Research on detecting doubling time of human and rat airway smooth muscle cells with a real time cellular analyzer [J]. *J Mod Lab Med*), 2015, 30(3): 28-31.
- [16] ATIENZAR F A, TILMANT K, GERETS H H, 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]. *J Biomol Screen*, 2011, 16(6): 575-87.
- [17] MARLINA S, SHU M, 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 [J]. *Parasit Vectors*, 2015, 8: 579
- [18] 王淑颜, 汪溪洁, 靳康, 等. 运用实时细胞分析系统监测原代乳鼠心肌细胞的生长及搏动评价抗心律失常药物[J]. *中国药理学与毒理学杂志* (WANG S Y, WANG X J, JIN K, et al. A real-time cell analysis system for evaluating anti-arrhythmic drugs by monitoring the growth and beating of primary neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*), 2014, 28(6): 837-43.
- [19] 李艳伟, 宋兴辉, 王佳佳, 等. 实时无标记肿瘤细胞凋亡筛选技术体系的建立[J]. *生物技术通报* (LI Y W, SONG X H, WANG J J, et al. Establishment of the real-time and label-free screening system for tumor cell apoptosis [J]. *Biot Bull*), 2019; 35(10): 220-6.
- [20] KOWOLENKO M, KEESE C R, LAWRENCE D A, et al. Measurement of macrophage adherence and spreading with weak electric fields [J]. *J Immunol Methods*, 1990, 127(1): 71-7.
- [21] GIAEVER I, KEESE C R. A morphological biosensor for mammalian cells [J]. *Nature*, 1993, 366(6455): 591-2.
- [22] XIAO C, LUONG J H. On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(3): 1000-5.
- [23] YIN L M, HAN X J, DUAN T T, et al. Decreased S100A9 expression promoted rat airway smooth muscle cell proliferation by stimulating ROS generation and inhibiting p38 MAPK [J]. *Can Respir J*, 2016, 2016: 1-7.
- [24] HAICK J M, BRUEGGEMANN L I, CRIBBS L L, et al. PKC-dependent regulation of Kv7.5 channels by the bronchoconstrictor histamine in human airway smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(6): L822-34.
- [25] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 支气管哮喘基层诊疗指南(2018年)[J]. *中华全科医师杂志* (Chinese Medical Association, Chinese Medical Journals Publishing House, Chinese Society of General Practice, et al. Guideline for primary care of bronchial asthma (2018) [J]. *Chin J Gen Pract*), 2018, 17(10): 751-62.