

综述

高内涵分析技术在食品毒理学中的应用

强降雨薇,杨森,李雨枫

(南京市产品质量监督检验院(南京市质量发展与先进技术应用研究院),国家市场监督管理总局重点实验室
(生物毒素分析与评价),江苏南京 210019)

摘要:高内涵分析技术结合自动化显微镜和定量图像分析,以可视化的方式对体外模型进行多参数分析,具有高通量、高效、快速、多靶标的优点,现已被应用于体外毒理学研究领域。食品毒理学作为毒理学分支,在保障食品安全和人类生命健康方面起到重要作用。传统实验已难以满足当前急剧增长的食物中风险物质安全评价的需求,高内涵分析技术为其提供了精准、高效的技术手段。本文回顾了近年来高内涵分析技术在食品毒理学领域的应用,以期食品安全评估方法及技术创新提供参考。

关键词:高内涵分析;食品安全;食品毒理学;体外毒性试验

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2024)06-0751-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.06.017

Application of high-content analysis in food toxicology

QIANG Yuwei, YANG Miao, LI Yufeng

(Nanjing Institute of Product Quality Inspection (Nanjing Institute of Quality Development and Advanced Technology Application), Key Laboratory of Biotxin Analysis & Assessment for State Market Regulation, Jiangsu Nanjing 210019, China)

Abstract: High content analysis combines automated microscopy and quantitative image analysis to visualize *in vitro* models for multi-parameter analysis, which has the advantages of high efficiency, rapidity and multi-targeting, and it has been applied in the field of *in vitro* toxicology research. Food toxicology, as a branch of toxicology, plays an important role in safeguarding food safety and human health. Traditional experiments can hardly meet the current rapidly increasing demand for safety evaluation of various food-related risk substances, for which high content analysis provides an efficient technical approach. Recent applications of high content analysis in the field of food toxicology would be reviewed in this article, in order to provide reference for food safety assessment methods and technological innovation.

Key words: High content analysis; food safety; food toxicology; *in vitro* toxicity tests

近年来,随着物质生活水平的不断提高和食品行业的快速发展,新型食品层出不穷,与此同时,食品安全事件也频频发生,引起了全社会对食品安全问题的极大关注。我国《食品安全法》明确规定,对于食品、食品添加剂、食品相关产品中生物性、化学性和物理性危害因素需进行风险评估,以确保食品安全^[1-2]。传统动物实验存在耗时长、成本高、通量低及动物伦理困境等缺点,无法满足复杂样品的快速检测需求。在此背景下,欧美等国家开展了新的毒理学评价策略研究,我国近年也不断发展体外替

代法、计算生物信息学、高通量测试等技术并将其应用于食品毒理学的风险评估中,以期与国际接轨^[2]。其中,高内涵分析技术(High content analysis, HCA)作为体外高通量筛选的主要手段之一将显微镜技术与图像分析相结合,极大地推动了体外毒性测试的发展。HCA所具有的高通量、多靶标、标准化、可视化与定量化等优势能够弥补现有体外技术在通量及单靶点等方面的不足^[3]。相比于在药物开发等领域的广泛应用,HCA在食品毒理学中应用尚且较少,本文将对近年来HCA在食品毒理学方面的应用进行综述。

收稿日期:2023-06-02

基金项目:国家市场监督管理总局科技计划(2021MK135);南京市市场监督管理局科技项目(Kj2021018, Kj2022002)

作者简介:强降雨薇 女 工程师 研究方向为食品安全与检测

E-mail: qyw1007@163.com

1 高内涵分析技术

HCA是一种基于分子生物技术,利用显微成像及自动化图像分析,对细胞进行多靶点表型筛选的

技术^[3-4]。HCA 利用荧光染料的特异性和灵敏性，在维持细胞结构与功能完整的基础上，通过对细胞不同结构进行荧光染色标记，获取包括细胞数量、荧光强度、细胞形态学及纹理学、空间分布及动力学特征等细胞表型的定量成像数据，经专业的图像处理软件进行识别、统计、分析得到生物学特性数

据，从而检测待测物对于细胞形态、生长、凋亡、代谢途径等的影响^[5-8]（图 1）。与传统单靶点体外检测相比，HCA 在单次实验获得的多维细胞生理信息，为细胞的复杂机理和靶点的相互作用提供证据，为进一步机制研究提供线索。HCA 常见荧光染料见表 1。

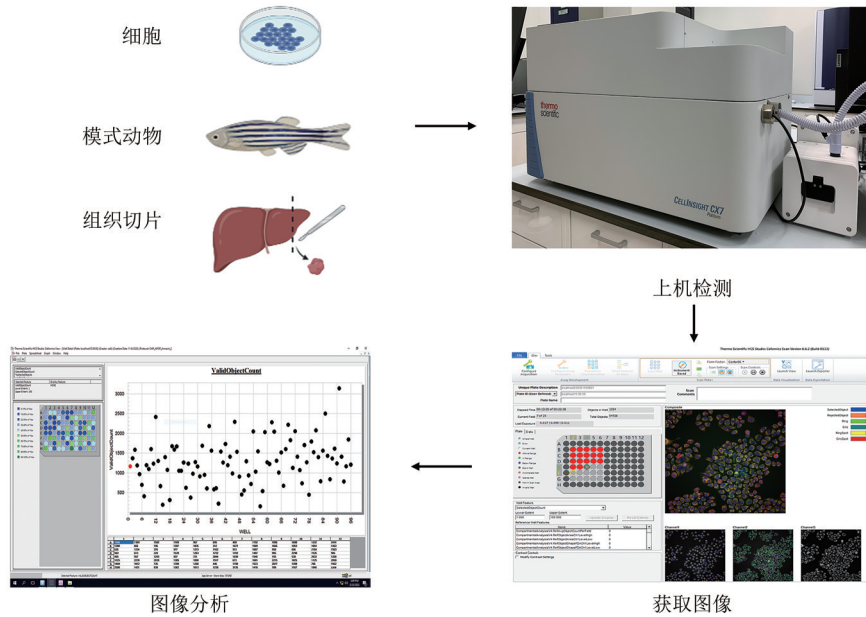


图 1 HCA 流程示意图

Figure 1 Process diagram of HCA

表 1 HCA 常见荧光染料

Table 1 Common fluorescent dyes used in HCA

染色部位	荧光染料	表征指标	参考文献
细胞核	Hoechst 33342、DAPI	细胞数量、细胞核形态、微核实验	[9-11]
	PI、TOTO-3、Image-iT DEAD Green	细胞活性	[12-14]
细胞质	CellROX、DCFH-DA	活性氧	[14-15]
	Fluo-4 AM	细胞内钙离子	[15]
细胞膜	DIR	细胞膜完整性	[15]
线粒体	MitoTracker® Orange、TMRE、MitoTracker Red CMXRos、Rhodamine 123	线粒体膜电位	[13,16-18]
	Mito SOX	线粒体超氧化物	[19]
	MitoTracker Green、MitoTracker Red、Mitotracker deep red FM	线粒体定位、线粒体质量	[15,18-19]
DNA	HCS DNA damage kit	DNA 损伤	[12]
溶酶体	LysoTracker Green	溶酶体活性	[13]

2 HCA 在食品毒理学中的应用

高内涵分析技术的高通量、低成本、高灵敏性、多靶点以及对人为偏差的消除使得其在化学品毒性评估中具有广阔的应用前景。在食品毒理学领域，高内涵已应用于食品添加剂、药食同源物质、天然毒素和食品污染物的毒性筛查和毒性作用机制分析，相关应用可见表 2。

2.1 肝毒性

肝脏在化学品的清除及生物转化中起核心作用，是最主要的毒性靶点之一^[7]。传统的肝毒性检测方法通常利用动物模型或体外细胞模型测试病理组织或单个生化指标，在花费较高时间成本和经

济成本的同时，存在较高的假阴性或假阳性率，而 HCA 能够更敏感、更准确地探测单一物质的肝毒性及混合物的联合肝毒性。

谷炎培等^[9]以细胞活性、线粒体功能及细胞膜完整性对食品添加剂山梨酸钾及赤藻糖酸钠的单一毒性和联合暴露毒性进行评价，揭示了两者的协同肝毒性作用，并发现 HCA 在细胞增殖毒性等方面较 CCK8 法更具敏感性。QU 等^[14]基于 HepG2 细胞以细胞数量、膜通透性、线粒体膜电位、活性氧生成量、胞内钙离子含量及 DNA 损伤作为表征指标评估了 5 种合成色素（柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、诱惑红）和 2 种防腐剂（焦亚硫酸钠、亚硫酸

表2 HCA在食品毒理学中的典型应用

Table 2 Typical applications of HCA in food toxicology

毒性类别	测试物种类	测试物	体外模型	评价终点
肝毒性	食品污染物	伏马菌素 B ₁ 、微囊藻素、黄曲霉毒素 B ₁ 、G ₁ 及 T ₂ 毒素、交链孢酚、白僵菌素、桔霉素、恩镰孢菌素 B、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、霉菌毒素、青霉菌、冈田酸、鳍藻毒素、鳍藻毒素-2、扇贝毒素 PTX-2、虾夷扇贝毒素、螺环内脂毒素、原多甲藻酸贝类毒素	HepG2 HepRG 3D 肝球体	细胞数量及细胞核面积 ^[9,12-14,20]
				细胞膜通透性 ^[14]
	药食同源	吴茱萸次碱、生首乌、制首乌、绒毛诃子	3D 肝球体	线粒体质量、膜电位 ^[13-14,16-17,19-20]
	天然毒素	蓖麻毒素、相思子毒素		ROS ^[14-15,17,19,21]
食品添加剂	柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红、诱惑红、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、阿斯巴甜、山梨酸钾、赤藻糖酸钠			细胞凋亡 ^[11,13-14,18,22]
肾毒性	食品污染物	桔青霉素、赭曲霉毒素 A、斑蝥素	HEK293 HK-2 SA7K PTC	DNA 损伤 ^[11-12,14]
				胞内钙离子含量 ^[14-15]
	药食同源	大黄、吴茱萸、泽泻	HEK293 HK-2 SA7K PTC	溶酶体活性 ^[13]
	天然毒素	马兜铃酸 A、斑蝥素		GSH ^[15,21]
食品添加剂	糖精、山梨醇			球形体积、形态、细胞分布 ^[21-22]
神经毒性	食品污染物	赭曲霉毒素 A、苯并芘、邻苯二甲酸二甲酯、丙烯酰胺、甲基汞	SH-SY5Y hNPCs GFP-标记 神经元	细胞存活率 ^[18,23-24]
				细胞核面积、圆度 ^[18,24]
	食品农/兽残	毒死蜱、鱼藤酮、地塞米松、七氯、毒菌酚、戊唑醇	SH-SY5Y hNPCs GFP-标记 神经元	线粒体质量、膜电位 ^[18,23-24]
	食品添加剂	糖精、山梨醇		细胞凋亡 ^[23]
遗传毒性	食品污染物	苯并芘、黄曲霉毒素 B ₁	CHO CHL U2OS BEAS-2B	DNA 损伤 ^[25]
				细胞活性 ^[26-27]
	天然毒素	秋水仙碱	CHO CHL U2OS BEAS-2B	细胞增殖毒性 ^[28]
	食品添加剂	糖精、山梨醇		细胞核大小、形状 ^[27-28]
遗传毒性	食品污染物	苯并芘、黄曲霉毒素 B ₁	CHO CHL U2OS BEAS-2B	神经突起长度 ^[29-30]
				神经元数量、活力 ^[29-30]
	天然毒素	秋水仙碱	CHO CHL U2OS BEAS-2B	线粒体完整性及膜电位 ^[27,29]
	食品添加剂	糖精、山梨醇		微核发生率 ^[10,31]
遗传毒性	食品污染物	苯并芘、黄曲霉毒素 B ₁	CHO CHL U2OS BEAS-2B	细胞存活率 ^[10,32-33]
				细胞核数量及形态 ^[31,33]
	天然毒素	秋水仙碱	CHO CHL U2OS BEAS-2B	DNA 损伤 ^[33]
	食品添加剂	糖精、山梨醇		细胞周期干扰 ^[32]

钠)的肝毒性,发现均可引起浓度依赖性细胞毒性,其中日落黄与亚硫酸钠共同暴露对肝毒性具有协同作用。基于这一评价体系,QU等^[12]发现阿斯巴甜和山梨酸钾在联合暴露时在活性氧生成、线粒体功能障碍及DNA损伤程度方面均大于单一暴露。MENEELY等^[20]聚焦细胞核及线粒体健康指标,对伏马菌素 B₁、黄曲霉毒素 B₁及微囊藻素的肝毒性进行测定,结果发现尽管除黄曲霉毒素 B₁外,另外两种单一毒素无细胞毒性效应,但是二元、三元混合物均能引起不同程度的细胞损伤。上述研究表明,HCA有利于发现混合物联合暴露的毒性,并且多维参数指标的信息有助于对化学品的毒性作用机制展开研究。

除以上常见表征指标外,FERRON等^[11]选择Caspase-3表达量以表征细胞凋亡程度,同时以 γ H2AX表达量评估DNA损伤程度,对贝类体内9种亲脂性藻毒素进行了肝毒性评价,鉴定出冈田酸、鳍藻毒素、鳍藻毒素-2及扇贝毒素PTX-2这4种高细胞毒性毒素。PAINI等^[16]利用HCA获得体外数据构建虚拟细胞模型,结合DNA加合物形成和代谢途径信息,将体内与体外暴露相联系,优化了一套雌二醇诱导的肝毒性预测动力学模型(Physiologically-based kinetic, PBK),实现了从体外数据对体内影响的推导预测。

相比传统2D细胞,3D细胞及类器官更能够模拟体内真实的生理状态,形态和结构是此类模型监测的关键指标,HCA的成像技术及自动化图像数据处理能对形态特征变化进行高通量的分析,因此,HCA在3D细胞模型及类器官的载体上具有显著优势。SIRENKO等^[22]从人诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cell, iPSC)中生成3D肝球体,用球形体积、形态、细胞分布、活力标记强度等来表征复合毒性,完成了包含常见食品污染物黄曲霉毒素 B₁、G₁及T₂毒素在内的48种化学品的系统性检验。同时比较二维和三维培养,发现3D模型更适宜联合HCA进行体外肝毒性评价^[22]。在此基础上,有团队采用低吸附法构建了3D HepaRG模型,检测线粒体健康状态以对天然毒素蓖麻毒素和相思子毒素进行肝毒性检测,结果表明3D模型在线粒体相关指标上具有更高敏感度及准确性^[19]。

2.2 肾毒性

肾脏作为代谢过程中主要的过滤器官,极易被化学品损害,各种食品污染物、天然产物和环境污染物以肾脏为毒性靶点时可能会引起急性肾功能衰竭等损伤^[34]。传统体外筛选通常选用细胞实验与相关损伤蛋白靶点共同验证,方法繁杂,准确度低,且不适用于大批量筛选。HCA极大地提高了检测效率,弥补了传统方法的不足。

郭晓等^[18]选择细胞存活率、核面积、核圆度、线粒体质量及膜电位五个指标以环境污染物马兜铃酸 A 作为阳性对照建立了一套以 HEK293 为基础的肾毒性分析体系,通过对细胞核和线粒体的形态和功能进行精确的分析,筛查了包括斑蝥素在内七种中草药的潜在肾毒性。MA 等^[24]选择相同指标以评估 18 种中草药原料的肾毒性,检测效率显著提高。另外,LI 等^[23]利用原代肾小管上皮细胞和 HK-2 细胞同样通过细胞活性及线粒体膜电位作为评价终点对包含食品污染物桔青霉素的 35 种化学品进行了肾毒性分析,结果具有更高准确性。

SU 等^[25]使用 DAPI 和罗丹明鬼笔环肽分别标记 DNA 及肌动蛋白细胞骨架,同时用全细胞染色测量细胞形态特征,最后选择 γ H2AX 和 RelA 作为 DNA 损伤反应标志物对人肾近端小管细胞进行多维度肾毒性评估,从图像中提取 129 种定量表型特征建立了肾毒性预测模型,评估并验证了桔青霉素等 44 种化学品的肾毒性。结果表明,该方法在人肾近端小管原代细胞上的毒性评估准确率约为 82%,在传代细胞上准确率为 89%,可被用来高效、准确地筛选不同化学结构物质的潜在肾毒性,提高了单体筛选效率及评价指标的全面性。

然而,体外细胞模型较难复制出肾小管的形态和功能,iPSC 诱导分化的肾细胞及生物工程手段构建的 3D 结构更具生理相关性,能够显著提高识别和表征肾毒性物质的能力^[35]。已有报告指出,利用微流控芯片构建的人肾近端小管器官芯片能够模拟肾脏近端小管的关键功能,该测试模型毒性评估结果比细胞结果更接近体内反应^[36-37],虽然尚未有研究将其实际运用于 HCA,但器官芯片的高敏感度及可重复性使其成为提高评价全面性的潜力模型。

2.3 神经毒性

神经毒性可导致大脑或周围神经系统暂时或永久性的损害,已被发现是神经退行性疾病的主要原因,如阿尔兹海默病等^[6]。对于神经发育毒性和神经毒性测试,传统方法采用形态学和神经胶质酸性蛋白染色来对神经轴突的多个参数进行分别测定^[38],HCA 有效克服了其中存在的人工误差,实现了多种参数指标的同步检测,是大量评估潜在神经毒性的一种可靠手段。

有研究通过 BrdU 标记细胞数占比以评价细胞增殖毒性,对比了三种神经元细胞系 PC12、N1E-11 和 SH-SY5Y 作为神经毒性模型的敏感性,其中 PC12 对包括赭曲霉素 A 在内的 8 种化学品的增殖抑制最为敏感^[28]。周飞和常艳^[26]通过检测细胞活力和神经突起长度,对苯并芘、毒死蜱等 13 种化学

品的神经发育毒性进行了检定,结果显示该方法具有高敏感性(87.5%)及特异性(80%)。

MELINDA 等^[27]在采用细胞数量、细胞核面积、线粒体膜电位作为一般毒性评价终点外,选择 bIII Tubulin 及 pNF-H 表征神经毒性,将神经元特异性终点如神经突数量、面积及长度、轴突损伤纳入表征指标,对含常见兽药残留地塞米松在内的 36 种化学品进行评估,将其与同样条件下 MTT、LDH 结果进行比较,结果显示 HCA 能够高效识别神经毒性,同时降低假阳性率。有团队使用钙黄绿素 AM 作为神经元特异性染料对神经元生长与分化进行定量表征,检测神经元数量、活力、线粒体完整性和膜电位等指标,建立了一套一步到位的体外神经毒性评价体系,对食品污染物甲基汞等六种化学品进行了潜在神经毒性评估^[29],与免疫染色法相比减少了检测时间,并且降低了细胞干扰。LI 等^[30]使用 GFP 直接标记神经元,通过总神经元长度、片段数量和最大神经元长度来量化评估化学品对于神经元的影响,实现了神经突生长的实时和定时成像,取消中间洗涤步骤,提高速度的同时最小化了处理差异。利用该方法,LI 等^[30]高效评估了 84 种化学品的神经毒性。HCA 显著提高了大批次神经毒性筛查的效率及准确性。

此外,3D 神经球^[39]和 3D 多巴胺能神经元模型^[40]已被开发用于评估神经突生长并用以预测神经毒性,虽然这些新模型尚未用于食品毒理学,但有望帮助提升体外神经毒性评价的全面性及敏感性。

2.4 遗传毒性

具有遗传毒性的化学品可导致 DNA 损伤并可能诱导基因突变而增加肿瘤发生的风险^[41]。体外实验如微核实验和彗星实验等在评价化学品所致 DNA 损伤方面得到了广泛应用^[42],HCA 相较于传统方法提供了一种更为高效、精准的遗传毒性评价方法。

体外微核实验是评价化学品遗传毒性的重要手段之一,通常利用影像学和数据采集技术对微核率进行统计分析。周飞等^[10]采用 HCA 建立的微核高通量体系利用微核发生率及细胞存活率作为表征指标评价了苯并芘、秋水仙碱等七种阳性物质,预测准确率为 87.5%。孙静秋等^[31]采用体外微核法和体外微核高内涵筛选法,分别检测了 5 种阳性化学品及 4 种食品原料样品的微核细胞率,阳性结果均与已知毒性完全一致。与传统方法相比,HCA 实现了微核自动识别及计数,缩短了检测时间,减少了人工干扰因素,实验结果更为精准。

GASPARRI 等^[32]选择特性的细胞标志物染色标记骨肉瘤 U2OS 细胞,以此评估细胞核形态、细胞凋亡和组蛋白 H3 磷酸化等指标来检测化学品对细胞周期的干扰作用,筛选出了细胞周期抑制剂,秋水仙碱遗传毒性得到证实。此外,GARCIA-CANTON 等^[33]通过检测细胞核形态和 DNA 损伤构建了一套基于 HCA 的 γ H2AX 检测方法,对已知遗传毒性化学品如黄曲霉素 B1、秋水仙碱和非遗传毒性化学品进行了毒性验证,结果显示出了高准确性,同时具有 86%~92% 的敏感性和 80%~88% 的特异性。

虽然食品毒理学中应用 HCA 评价遗传毒性的案例较少,但上述研究佐证了 HCA 相较于传统方法的高效性及准确性,具有良好的应用前景。

3 总结与展望

美国国家研究委员会(National Research Council, NRC)在 2007 年公布了 21 世纪毒性测试愿景与战略计划(Toxicity testing in the 21st century: A vision and strategy, TT21C)^[43],提出毒性测试应由传统的以整体动物为基础的体系转向基于细胞的体外测试体系,并强化了毒性通路在毒性测试和风险评估中的重要性。HCA 以细胞为单位通过多靶点标记获得不同毒性终点的细胞群体的多维参数信息,通过不同细胞群体的特征和靶点相互作用分析发现毒性通路,是实现 TT21C 预期目标的有效手段。

目前,HCA 在药学研究领域较成熟,对食品毒理学的应用有借鉴意义。由于食品中化学性危害物的复杂性和膳食暴露的特殊性,使得食品毒理学的研究有其自身的特点。食品中的危害物大多通过膳食暴露进入人体,危害物大多剂量低但作用时间长,且一般为联合暴露。因此食品毒理学亟须发展长期低浓度暴露和联合暴露的评估方法,但现有体外测试手段尚不完善。尽管 HCA 满足上述需求的现有成熟模型较少,但 HCA 细胞多参数测定的优势正好符合食品毒理学研究的要求。HCA 能够敏感地发现低浓度暴露时的早期效应和联合暴露时的特征性毒性表型,全面反映危害物的毒性特征及潜在机制,相信随着 HCA 的筛选方法和分析模型的不断完善,HCA 会成为食品毒理学领域里的有效检测工具。

另一方面,虽然 HCA 在体外毒性评价技术领域发展迅猛,但仍存在诸多挑战。首先,HCA 为确保荧光特异性,染色数量有限且存在荧光标记的限制;其次,现有的成熟模型有限,与体内毒性相一致的证据仍不足;最后,大型图像数据集的分析处理能力受硬件和算法限制,某些特定检测还需要较高

的生物信息学知识才能获得最佳分析。因此,HCA 在毒理学领域仍有较大发展空间。相信随着新方法、新技术的发展,HCA 将在毒性筛选和机制分析等方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 中华人民共和国全国人民代表大会. 中华人民共和国食品安全法[A]. 2009.
The National People's Congress of the People's Republic of China. Food Safety Law of the People's Republic of China [A]. 2009.
- [2] 林卫华, 吴志刚. 我国近年食品毒理学应用与研究进展[J]. 中国热带医学, 2014, 14(8): 1019-1022.
LIN W H, WU Z G. Recent progress in application and research of food toxicology in China[J]. China Tropical Medicine, 2014, 14(8): 1019-1022.
- [3] MATTIAZZI USAJ M, STYLES E B, VERSTER A J, et al. High-content screening for quantitative cell biology[J]. Trends in Cell Biology, 2016, 26(8): 598-611.
- [4] LANSING TAYLOR D. A personal perspective on high-content screening (HCS): From the beginning[J]. SLAS Discovery, 2010, 15(7): 720-725.
- [5] 王萌萌, 何玲, 胡梅, 等. 高内涵筛选技术及其在药学研究中的应用[J]. 药学进展, 2011, 35(11): 481-486.
WANG M M, HE L, HU M, et al. The development of high-content screening technique and its application in pharmaceutical research [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2011, 35(11): 481-486.
- [6] 宋佳敏, 王萌, 陈美玲. 高内涵技术在药物线粒体损伤毒性机制研究中的应用[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(20): 1861-1866.
SONG J M, WANG M, CHEN M L. Application of high content analysis in the study of toxicity mechanism of drug mitochondrial damage [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2021, 30(20): 1861-1866.
- [7] ABBOUD G, KAPLOWITZ N. Drug-induced liver injury [J]. Drug Safety, 2007, 30(4): 277-294.
- [8] 李秀英, 黄钢. 高内涵成像及其在细胞表型研究中的应用[J]. 电子显微学报, 2020, 39(4): 451-455.
LI X Y, HUANG G. High-content imaging and its application in the study of cell phenotype [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2020, 39(4): 451-455.
- [9] 谷炎培, 曲道峰, 冯立芳, 等. 山梨酸钾和 D-异抗坏血酸钠联合作用 HepG2 细胞的生物学效应分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(11): 1264-1271.
GU Y P, QU D F, FENG L F, et al. Biological effects of potassium sorbate combined with sodium D- isoascorbate on HepG2 cells[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 32(11): 1264-1271.
- [10] 周飞, 林海霞, 常艳. CHO 细胞体外微核高内涵筛选方法的建立及应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(1): 31-34.
ZHOU F, LIN H X, CHANG Y. Evaluation of micronucleus with CHO cells using highthroughput screening [J]. Carcinogenesis,

- Teratogenesis & Mutagenesis, 2011, 23(1): 31-34.
- [11] FERRON P J, HOGEVEEN K, DE SOUSA G, et al. Modulation of CYP3A4 activity alters the cytotoxicity of lipophilic phycotoxins in human hepatic HepaRG cells[J]. Toxicology in Vitro, 2016, 33: 136-146.
- [12] QU D F, JIANG M X, HUANG D P, et al. Synergistic effects of the enhancements to mitochondrial ROS, p53 activation and apoptosis generated by aspartame and potassium sorbate in HepG2 cells[J]. Molecules, 2019, 24(3): 457.
- [13] SVINGEN T, LUND HANSEN N, TAXVIG C, et al. Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform[J]. Environmental Toxicology, 2017, 32(5): 1658-1664.
- [14] QU D, GU Y, FENG L, et al. High Content Analysis technology for evaluating the joint toxicity of sunset yellow and sodium sulfite *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 135-143.
- [15] 郭丽, 路青瑜, 李娇, 等. 基于高内涵筛选技术的吴茱萸次碱肝毒性研究[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(10): 1548-1558.
- GUO L, LU Q Y, LI J, et al. Study on hepatotoxic liver of rutecarpine based on high-content screening technology [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2022, 38(10): 1548-1558.
- [16] PAINI A, SALA BENITO J V, BESSEMS J, et al. From *in vitro* to *in vivo*: Integration of the virtual cell based assay with physiologically based kinetic modelling[J]. Toxicology in Vitro, 2017, 45: 241-248.
- [17] 李丹丹, 汤响林, 龙隆, 等. 基于高内涵筛选技术研究首乌和制首乌醇提物的肝毒性机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(6): 626-635.
- LI D D, TANG X L, LONG L, et al. High-content screen assay for studying hepatotoxicity mechanisms of ethanol extract of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Polygoni Multiflori Praeparata*[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2017, 31(6): 626-635.
- [18] 郭晓, 王萌, 朱彦, 等. 基于细胞表型的高内涵多指标肾毒性检测方法的建立与应用[C]. 药物毒理学年会, 2015.
- GUO X, WNAG M, ZHU Y, et al. Establishment and application of high-content and multi-index renal toxicity detection method based on cell phenotype[C]. Annual Conference of Pharmaceutical Toxicology, 2015.
- [19] 张弛. 基于3D HepaRG细胞模型的化学性肝损伤的评价[D]. 北京: 军事科学院, 2020.
- ZHANG C. Evaluation of chemical liver injury based on 3D HepaRG cell model[D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2020.
- [20] MENEELY J P, HAJŠLOVÁ J, KRŠKA R, et al. Assessing the combined toxicity of the natural toxins, aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and microcystin-LR by high content analysis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 121: 527-540.
- [21] 王晨晓, 王志斌, 马贝贝, 等. 用高内涵分析技术初探绒毛河子肝毒性物质基础[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(5): 716-721.
- WANG C X, WANG Z B, MA B B, et al. Preliminary study of basis of hepatotoxic substance of ripe fruit of *Terminalia chebula* Retz. var. tomentella Kurtwith high content screening assay [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(5): 716-721.
- [22] SIRENKO O, HANCOCK M K, HESLEY J, et al. Phenotypic characterization of toxic compound effects on liver spheroids derived from iPSC using confocal imaging and three-dimensional image analysis[J]. Assay and Drug Development Technologies, 2016, 14(7): 381-394.
- [23] LI S Z, ZHAO J H, HUANG R L, et al. Development and application of human renal proximal tubule epithelial cells for assessment of compound toxicity[J]. Current Chemical Genomics and Translational Medicine, 2017, 11(1): 19-30.
- [24] MA Z, CAO X X, GUO X, et al. Establishment and validation of an *in vitro* screening method for traditional Chinese medicine-induced nephrotoxicity[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018: 1-15.
- [25] SU R, XIONG S J, ZINK D, et al. High-throughput imaging-based nephrotoxicity prediction for xenobiotics with diverse chemical structures[J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(11): 2793-2808.
- [26] 周飞, 常艳. 基于PC12细胞的发育神经毒性物质高通量初筛方法的建立及应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(6): 409-417.
- ZHOU F, CHANG Y. Assessment of developmental neurotoxicity with PC12 cells using high throughput screening[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2010, 22(6): 409-417.
- [27] MELINDA S, WILSON. Multiparametric High Content Analysis for assessment of neurotoxicity in differentiated neuronal cell lines and human embryonic stem cell-derived neurons[J]. Neuro Toxicology, 2014, 42: 33-48.
- [28] MUNDY W R, RADIO N M, FREUDENRICH T M. Neuronal models for evaluation of proliferation *in vitro* using high content screening[J]. Toxicology, 2010, 270(2-3): 121-130.
- [29] SIRENKO O, HESLEY J, RUSYN I, et al. High-content high-throughput assays for characterizing the viability and morphology of human iPSC-derived neuronal cultures [J]. Assay and Drug Development Technologies, 2014, 12(9-10): 536-547.
- [30] LI S, ZHANG L, HUANG R, et al. Evaluation of chemical compounds that inhibit neurite outgrowth using GFP-labeled iPSC-derived human neurons[J]. NeuroToxicology, 2021, 83: 137-145.
- [31] 孙静秋, 洪新宇, 肖萍, 等. 体外微核高内涵筛选法在食品毒理学遗传毒性评价中应用研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(2): 124-129.
- SUN J Q, HONG X Y, XIAO P, et al. Genotoxicity assessment of food ingredients using high-content screening *in vitro* micronucleus assay [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(2): 124-129.
- [32] GASPARRI F, CIAVOLELLA A, GALVANI A. Cell-cycle inhibitor profiling by high-content analysis. Advances In Experimental Medicine And Biology [M]. Boston, MA: Springer US, 2007: 137-148.
- [33] GARCIA-CANTON C, ANADON A, MEREDITH C. Assessment of the *in vitro* γ H2AX assay by High Content Screening as a novel genotoxicity test[J]. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2013, 757(2): 158-166.
- [34] LI S Z, XIA M H. Review of high-content screening applications

- in toxicology[J]. Archives of Toxicology, 2019, 93(12): 3387-3396.
- [35] SOO J Y C, JANSEN J, MASEREEUW R, et al. Advances in predictive *in vitro* models of drug-induced nephrotoxicity [J]. Nature Reviews Nephrology, 2018, 14(6): 378-393.
- [36] JANG K J, MEHR A P, HAMILTON G A, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment [J]. Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro, 2013, 5(9): 1119-1129.
- [37] DAVIES J. Engineered renal tissue as a potential platform for pharmacokinetic and nephrotoxicity testing [J]. Drug Discovery Today, 2014, 19(6): 725-729.
- [38] 刘利波, 王莉莉. 高内涵分析在新药发现毒理学中的应用进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(6): 893-896.
- LIU L B, WANG L L. Application progress of high content analysis in discovery toxicology[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2012, 26(6): 893-896.
- [39] SCHMUCK M R, TEMME T, DACH K, et al. Omnisphero: A high-content image analysis (HCA) approach for phenotypic developmental neurotoxicity (DNT) screenings of organoid neurosphere cultures *in vitro* [J]. Archives of Toxicology, 2017, 91(4): 2017-2028.
- [40] HARRIS G, ESCHMENT M, OROZCO S P, et al. Toxicity, recovery, and resilience in a 3D dopaminergic neuronal *in vitro* model exposed to rotenone[J]. Archives of Toxicology, 2018, 92(8): 2587-2606.
- [41] CICCIA A, ELLEDGE S J. The DNA damage response: Making it safe to play with knives[J]. Molecular Cell, 2010, 40(2): 179-204.
- [42] HENDRIKS G, VAN DE WATER B, SCHOONEN W, et al. Cellular-signaling pathways unveil the carcinogenic potential of chemicals [J]. Journal of Applied Toxicology, 2013, 33(6): 399-409.
- [43] KREWSKI D, ANDERSEN M E, TYSHENKO M G, et al. Toxicity testing in the 21st century: Progress in the past decade and future perspectives [J]. Archives of Toxicology, 2020, 94(1): 1-58.