论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1760-03

三维或单层培养结肠癌HT-29细胞药物敏感性及生物学特性的变化

李建军,蒋 勇,胡绍毅,何建明,边志衡,梁后杰 (第三军医大学西南医院肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 观察结肠癌HT-29细胞在三维或单层培养条件下细胞形态学、细胞周期、细胞凋亡及对化疗药物5-Fu敏感性的变化。**方法** 分别采用liquid overlay技术或常规贴壁法对HT-29细胞进行三维或单层培养,通过显微镜观察细胞形态学变化,流式细胞仪测定不同培养方式对细胞周期和凋亡率的影响,并采用radial outgrowth测定法或MTT法分别测定三维或单层培养细胞对5-Fu的敏感性。**结果** 三维培养HT-29细胞悬浮生长,形成致密的多细胞球结构,中心出现坏死区,细胞间有较多的微绒毛、紧密连接、桥粒等结构,而单层培养HT-29细胞呈单层贴壁生长,未见紧密连接、桥粒等连接结构;与单层培养细胞相比,三维培养HT-29细胞G_1期比例明显升高[(64.95±0.59)%对(36.77±0.51)%,$P<0.01$]、细胞自发性凋亡率降低[(0.99±0.12)%对(4.79±0.49)%,$P<0.01$]、对5-Fu产生明显耐药。**结论** 三维培养HT-29细胞在细胞形态学、细胞周期、细胞凋亡等方面与单层培养细胞存在明显差异,可能是导致结肠癌多细胞耐药的重要原因。

关键词: 多细胞耐药;细胞周期;凋亡;三维细胞培养;结肠癌
中图法分类号: R730.2;R735.3+5 **文献标识码:** A

HT-29 cells cultured as three-dimensional model or monolayer

LI Jian-jun, JIANG Yong, HU Shao-yi, HE Jian-ming, BIAN Zhi-heng, LIANG Hou-jie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of morphology, cell cycle, apoptosis and sensitivity to 5-Fluorouracil (5-Fu) on colon carcinoma HT-29 cells cultured as three-dimensional model or monolayer. **Methods** HT-29 cells were cultured as three-dimensional model using liquid overlay technique or as monolayer using routine method. The cellular morphology was observed by invert microscope, scanning electron microscope (SEM) or transmission electron microscope (TEM). Cell cycle and apoptotic rate were detected by flow cytometry (FCM). The sensitivity to 5-Fu on HT-29 spheroids or monolayers was determined by radial outgrowth assay or MTT assay respectively. **Results** HT-29 cells by three-dimensional culture formed many compact multicellular spheroids (MCS) and floated in the medium. MCS were constituted of hundreds of cells. The centre of HT-29 spheroids formed a necrotic core. Microvilli, tight junction and desmosome could be observed in HT-29 spheroids. When cultured as monolayer, the HT-29 cells were adherent to the bottom of flask and tight junction or desmosome could not be observed. The percentage of G_1 phase in HT-29 spheroids was higher than that of monolayer [(64.95±0.59)% *vs* (36.77±0.51)%, ($P<0.01$)] and the apoptotic rate in HT-29 spheroids was lower than that of monolayer [(0.99±0.12)% *vs* (4.79±0.49)%, ($P<0.01$)]. MCS were more resistant to 5-Fu than monolayer cells. **Conclusion** There are significant differences in morphology, cell cycle and apoptotic rate between HT-29 spheroids and monolayer, which may be the important causes of the multicellular resistance of colon carcinoma.

Key words: multicellular resistance; cell cycle; apoptosis; three-dimensional culture; colon carcinoma

既往在肿瘤体外耐药研究中通常采用单层培养模型,该模型耐药的基本单位是单个瘤细胞,明显忽略了肿瘤作为一个特殊的异质性群体其生长的微环境和瘤细胞间的相互作用。近年发现肿瘤细胞在三维培养条件下存在多细胞耐药(multicellular resistance,MCR)现象,即由于细胞-细胞、细胞-基质的相互作用导致瘤细胞对化疗药物的敏感性降低。肿瘤MCR现象更接近于体内实体瘤耐药的实际情况,因而三维培养的瘤细

基金项目: 中国临床肿瘤学科学基金资助项目(Y-2004-03),西南医院临床研究专项基金资助项目(SW2004021)
Supported by the Science Foundation of Chinese Society of Clinic Oncology (Y-2004-03) and the Clinic Research Project of Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2004021)
作者简介: 李建军(1972-),男,四川省蓬安县人,博士研究生,主治医师,主要从事肿瘤多细胞耐药及逆转耐药相关方面的研究。电话:(023)68765694
通讯作者: 梁后杰,电话:(023)68754128
收稿日期: 2005-06-13;**修回日期:** 2005-08-04

胞可作为体外耐药研究的较好模型[1]。目前肿瘤 MCR 的机制尚不清楚。本实验通过比较三维和单层培养 HT-29 细胞生物学特性的变化，寻找结肠癌 MCR 的相关线索，为研究 MCR 产生的机制提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

人结肠癌 HT-29 细胞株由本室保存，5-Fu、琼脂糖（Sigma 公司），FACSCalibur 流式细胞仪（Bio-Rad 公司）。

1.2　细胞培养

单层（2D）培养采用常规贴壁法；三维（3D）培养采用 liquid overlay 技术[2]，主要步骤如下：①以灭菌后的 2% 琼脂糖平铺于培养瓶底部使之形成凝胶层，②消化对数生长期 2D 培养细胞，制成 2×10^5/ml 的单细胞悬液，③取 6 ml 细胞悬液加入已用琼脂糖铺底的培养瓶中，置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养，④每天半量换液。

1.3　细胞形态学观察

倒置显微镜、扫描电镜（SEM）、透射电镜（TEM）观察并照相记录；3D 培养细胞采用琼脂糖固装法制作细胞石蜡切片，常规 HE 染色观察细胞形态。

1.4　细胞周期和细胞凋亡的测定

采用流式细胞仪进行检测。

1.5　药物敏感性测定及多细胞耐药指数的计算

检测培养细胞对 5-Fu 的敏感性，重复 3 次，取均值。

2D 培养细胞药敏测定采用 MTT 法[3]。3D 培养细胞药敏测定采用 radial outgrowth 测定法[2]，主要步骤如下：①接种细胞：取直径基本相同的多细胞球（MCS）接种于已用 2% 琼脂糖铺底的 96 孔培养板中，静置培养过夜，②加药：各孔中加入不同浓度 5-Fu 100 μl（终浓度 0.01、0.1、1.0、10、100、1 000 μg/ml），并设不加 5-Fu 的对照孔，3 孔平行，继续培养 24h，③转孔培养：MCS 转入未用琼脂糖铺底的 96 孔培养板中，洗涤 2 次，继续培养 72 h 使细胞从球体向外围生长，④固定、染色：小心吸弃培养液，加入 5 mg/ml 亚甲基蓝溶液 150 μl/孔固定并染色细胞，⑤测定：0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，测定细胞从球体向外围生长的距离并记录。计算抑制率和半数抑制浓度（IC_{50}）。

多细胞耐药指数（index of multicellular resistance，MCRI）的计算按照公式 MCRI = IC^{50}3D/IC_{50}2D 进行（IC_{50}3D：5-Fu 对三维培养 HT-29 细胞的 IC_{50} 值；IC_{50}2D：5-Fu 对单层培养 HT-29 细胞的 IC_{50} 值）。

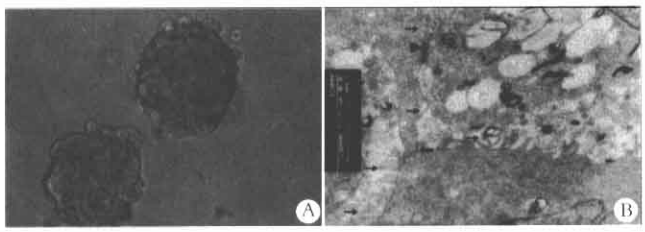
1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　三维或单层培养 HT-29 细胞的形态学特点

3D 培养 HT-29 细胞悬浮生长，细胞相互聚集并迅速增殖，形成细胞数目不等的球形多细胞聚集体，称为多细胞球（multicellular spheroids，MCS），MCS 体积逐渐增大，细胞数目逐渐增多，大多数 MCS 于培养后第 7 天直径达到 100 μm 左右（图 1A）。HE 染色可见 MCS 有明显的中心坏死区，周围由多层异型性细胞组成。SEM 观察到 MCS 呈较规则的致密的球形结构，由大量的单个细胞组成，细胞排列紧密。TEM 见 MCS 内细胞表面有大量的微绒毛，细胞之间存在紧密连接和桥粒等结构（图 1B）。

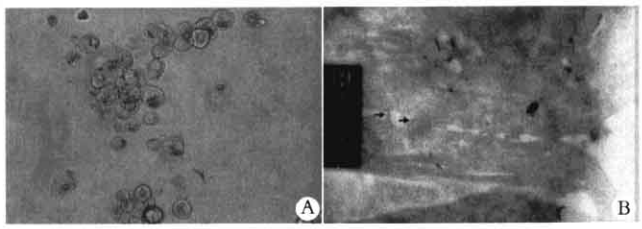


A：By invert microscope；B：By TEM；▲：Desmosome；➡：Tight junction；→：Microvilli

图 1　三维培养 HT-29 细胞（×200）

Fig 1　Morphology of HT-29 cells cultured as spheroid（×200）

2D 培养 HT-29 细胞贴壁生长，胞体较小，多为圆形，核大，胞浆相对较少，细胞密度稍高时可呈簇集状生长（图 2A）。TEM 下可见细胞表面较多的微绒毛，但细胞间无紧密连接和桥粒等结构（图 2B）。



A：By invert microscope；B：By TEM；→：Microvilli

图 2　单层培养 HT-29 细胞（×200）

Fig 2　Morphology of HT-29 cells cultured as monolayer（×200）

2.2　三维或单层培养 HT-29 细胞周期分布的变化

结果见表 1。与 2D 培养细胞相比，3D 培养 HT-29 细胞 G_1 期比例明显增高（$P<0.01$），同时 G_2 期比例显著减少（$P<0.01$），但 S 期比例无明显变化（$P>0.05$）。

表 1　3D 或 2D 培养 HT-29 细胞周期变化[$n=3$，$(\bar{x}\pm s)$ %]

Tab 1　Changes of cell cycle on HT-29 cells cultured as spheroid or monolayer[$n=3$，$(\bar{x}\pm s)$ %]

Group	G_1 phase	S phase	G_2 phase
Three-dimensional cells	64.95 ± 0.59 *	23.32 ± 0.59	11.72 ± 1.03 *
Monolayer cells	36.77 ± 0.51	22.09 ± 0.27	41.14 ± 0.24

*：$P<0.01$，*vs* monolayer cells

2.3　三维或单层培养 HT-29 细胞凋亡率的变化

2D 培养 HT-29 细胞自发性凋亡率为（4.79 ± 0.49）%，而 3D 培养 HT-29 细胞自发性凋亡率为（0.99 ± 0.12）%，较前者显著降低（$P<0.01$）。

2.4　三维或单层培养 HT-29 细胞对 5-Fu 的药物敏感性

5-Fu 对 3D 或 2D 培养 HT-29 细胞的 IC50 值分别为（18.74 ± 0.97）μg/ml 和（1.38 ± 0.09）μg/ml，MCRI 为 13.6，可见 3D 培养细胞对 5-Fu 的耐药性增加。

3 讨论

结肠癌耐药是影响化疗疗效和患者预后的重要原因，建立合适的体外耐药模型是耐药研究的关键。体内生长的实体瘤是一个三维的特殊的细胞群体，细胞异质性明显，在细胞-细胞、细胞-微环境之间存在着广泛的相互作用和相互影响，因而与单层培养瘤细胞的均一性和细胞间较弱的相互作用存在明显差异。三维培养的肿瘤细胞作为一个整体，存在明显的细胞异质性，且明显增强了细胞间的相互作用。本实验采用 liquid overlay 技术对结肠癌 HT-29 细胞进行三维培养，发现多细胞球内周围细胞增殖活跃，中心细胞坏死，而临近坏死区的细胞增殖活性减低，表明细胞异质性明显；与单层培养细胞相比，细胞间有较多的微绒毛、紧密连接和桥粒等细胞连接结构，表明细胞间的相互作用有明显增强。

已有研究表明三维培养的肿瘤细胞出现对化疗药物和放射治疗耐受[4,5]，Kobayashi 等[6]更证实三维培养肿瘤细胞株耐药特征与实体瘤相近，均表现为对多种化疗药物不敏感，而当三维培养肿瘤细胞被消化分散后，药物敏感性明显升高[7]。对单层培养细胞而言，MTT 法是测定药物敏感性较为常用和准确的方法；由于三维培养肿瘤细胞群体内存在明确的细胞异质性，既有生长活跃的细胞，也有相对静止或死亡的细胞，故不能采用 MTT 法测定三维培养肿瘤细胞的药物敏感性。radial outgrowth 测定法通过测定肿瘤多细胞球在化疗药物作用下贴附于培养孔后再经过 72 h 培养，从球体向外围生长的距离，将距离与化疗药物浓度作图即可得到一个函数，反应了药物对细胞生长的抑制作用，根据该函数可计算出药物的 IC50 值。本实验结果显示：三维培养 HT-29 细胞对 5-Fu 的多细胞耐药指数为 13.6，与单层培养细胞相比，对化疗药物 5-Fu 产生明显耐药，表明本实验所建立的结肠癌多细胞耐药模型是成功的。

三维培养 HT-29 细胞与单层培养细胞相比，细胞周期明显阻滞于 G_1 期和细胞凋亡率明显降低，可能是导致结肠癌多细胞耐药的直接原因。大量肿瘤细胞滞留于细胞周期某一时相点，除导致一些细胞周期特异性药物失效外，由于其增殖缓慢，处于相对静止状态，有利于其在细胞毒性药物中生存，极易对其他许多化疗药物产生耐受。而三维培养 HT-29 细胞自发性凋亡率较低，则有利于肿瘤细胞存活。

细胞间的相互作用可能是导致肿瘤多细胞耐药的重要原因，而细胞间的相互作用是由细胞粘附分子介导的。St Croix 等[8,9]在 EMT/6 乳腺癌多细胞耐药的系列研究中发现，耐药的产生与粘附分子 E-钙粘素（E-cadherin）促进周期素依赖蛋白激酶抑制因子 p27 表达上调有关，p27 表达上调使细胞大量滞留于 G_0/G_1 期，细胞相对静止，对化疗药物 4-氢过氧化环磷酰胺（4-HC）不敏感；利用功能阻断性抗体 SHE 78-7 阻断 E-cadherin 的作用，可下调 p27 的表达，增强肿瘤细胞对 4-HC 的敏感性；p27 表达上调主要局限于多细胞球内部相对静止、相互连接较紧密的细胞层中，而在多细胞球外部生长较活跃、但细胞结构较松散的细胞层中并不出现高表达。结果提示 E-cadherin 诱导乳腺癌多细胞耐药是通过调节细胞周期的进程来实现的。在本实验中显示结肠癌多细胞球内存在较多的细胞间连接结构，而三维培养 HT-29 细胞对 5-Fu 的敏感性明显减弱，表明三维培养结肠癌细胞多细胞耐药的产生可能与细胞间的相互作用有关。

总之，本实验在成功建立结肠癌多细胞耐药的基础上，发现三维培养结肠癌细胞生物学特性与单层培养细胞相比发生明显改变，特别是细胞间的相互作用可能是诱导结肠癌多细胞耐药的重要原因，其相关的机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Kunz-Schughart L A, Kreutz M, Kunechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology [J]. Int J Exp Path, 1998, 79(1): 1-23.

[2] Walker J, Martin C, Callaghan R. Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(4): 594-605.

[3] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 第2版. 西安：世界图书出版公司西安分公司，1996. 186-187

[4] Damiano J S, Dalton W S. Integrin-mediated drug resistance in multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2000, 38(1-2): 71-81.

[5] Damiano J S, Hazlehurst L A, Dalton W S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation[J]. Leukemia, 2001, 15(8): 1232-1239.

[6] Kobayashi H, Man S, Graham C H, *et al.* Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 3294-3298.

[7] Teicher B A, Herman T S, Holden S A, *et al.* Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only *in vivo*[J]. Science, 1990, 247(4949 Pt 1): 1457-1461.

[8] St Croix B, Sheehan C, Rak JW, *et al.* E-cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1[J]. J Cell Biol, 1998, 142(2): 557-571.

[9] Green SK, Karlsson MC, Ravetch JV, *et al.* Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 6891-6900.

（编辑 王 红）