文章编号:1000-5404(2010)16-1691-03

论著

结肠癌 HT29 多细胞球的培养及其结构与生物学特性的观察

何建明,江 恒,陈克力,黄海辉,庞学利,梁后杰 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

【摘要】 **目的** 建立结肠癌体外三维细胞培养模型 HT29 多细胞球,鉴定并检测其基本生物学特性。**方法** 琼脂糖抑制细胞贴壁、水平回旋振荡法培养 HT29 多细胞球;扫描电镜、HE 染色、免疫组化检测多细胞球的组织病理学性质;透射电镜检测细胞超微结构;Cell counting kit-8 检测药物敏感性。**结果** 成功培养由细胞相互黏附形成的多层细胞构成的结肠癌多细胞球模型;多细胞球内细胞接触广泛而紧密,可见大量细胞连接;多细胞球局部可见腺腔样结构,细胞角蛋白表达强弱与腺腔样结构有关;多细胞球药物敏感性显性降低,在 500 μg/L 奥沙利铂处理 48 h 条件下,单层细胞生存分数为(9.3±2.0)%,而多细胞球则为(42.9±4.0)%,二者相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 成功建立了结肠癌多细胞球模型,此模型是研究体内无血管的微小结肠癌及结肠癌无血管区的较理想模型。

【关键词】 结肠癌;多细胞球;细胞黏附;耐药
【中图法分类号】 R73-35;R730.23;R735.35 【文献标志码】 A

Structure and biological features of multicellular spneroids of colon cancer HT29 cells

He Jianming, Jiang Heng, Chen Keli, Huang Haihui, Pang Xueli, Liang Houjie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To establish a three-dimensional colon cancer cells culture model, multicellular spheroids for HT29 cells and detect their basic biology. **Methods** Multicellular spheroids of HT29 cells were cultured in flasks coated with 2% agarose by gently convoluting horizontally. Scanning electron microscopy, HE staining and immunohistochemistry were used to detect the histopathology of HT29 multicellular spheroids, and transmission electron microscopy was used to detect the ultrastructure. Drug sensitivities of both HT29 monolayer and HT29 multicellular spheroids were evaluated by using cell counting kit-8. **Results** HT29 multicellular spheroids consisted of layers of cells which adhered with each other closely and cell-cell junctions were found in most cells in multicellular spheroids. Lumen-like of glands were found in multicellular spheroids. Expression level of cytokeratin was related with lumen. HT29 cells acquired multicellular drug resistance when grown as multicellular spheroids. Cell survival fraction of HT29 monolayers was (9.3±2.0)% when they were treated with 500 μg/L oxaliplatin for 48 h, while that of multicellular spheroids was (42.9±4.0)% ($P<0.05$). **Conclusion** Multicellular spheroids of HT29 cells are an eligible model to mimic microtumors and avascular tumor regions *in vivo*, and helpful to research the structure formation and cell function crypt.

【**Key words**】 colon cancer; multicellular spheroids; cell adhesion; drug resistance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30171067), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5339), and the Innovation Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (2009XQN32). Corresponding author: Liang Houjie, Tel: 86-23-68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com

临床上,当恶性实体瘤发展至可探测大小时,由于癌细胞黏附的产生、能量代谢物质的改变,致使其产生独特的区域微环境,进而对肿瘤细胞的生物学特性产生显著影响[1,2]。这是体外培养的单层细胞无法模拟的。体内种植瘤能很好地模拟人体内的实体瘤,但是由于周期长、成本高、操作难度大、重复性较差,特别是由于宿主抗移植物反应、宿主状态等影响因素多的原因,其应用受到一定限制[1,2]。肿瘤细胞体外三维培养模型被认为能很好地模拟体内实体瘤的细胞黏附及区域微环境,并具有易控制、重复性好、排除了宿主影响等优点,因而被认为是研究肿瘤的较理想的模型[1,2]。本实验在抑制细胞贴壁、水平回旋振荡培养条件下建立了结肠癌细胞株 HT29 体外三维培养模型多细胞球(multicellular spheroids, MCSs),并检测了其组织病理学性质及药物敏感性。

【基金项目】 国家自然科学基金(30171067);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5339);第三军医大学青年创新人才基金(2009XQN32)
【通信作者】 梁后杰,电话:(023)68754128,E-mail:lianghoujie@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

人结肠高分化腺癌细胞株HT29，由本科保存。McCoy's 5A、新生牛血清(HyClone)，琼脂糖(Sigma-Aldrich)，Non-enzy Cell Detach Solution(Applygen Technologies)，Cell counting kit-8(Dojindo Laboratories)，兔抗人Cytokeratin抗体(迈新公司)，免疫组化试剂盒(中杉金桥公司)，AMRAY-1000B扫描电镜(Amray公司)，TECNAI10透射电镜(Philip公司)，HTS7000酶联免疫检测仪(Beckman公司)。

1.2 HT29单层细胞培养

含5%新生牛血清、100 IU/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的McCoy's 5A培养液，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度条件下常规培养。

1.3 HT29 MCSs培养

将对数生长期的HT29单层细胞消化成细胞悬液，接种至2%琼脂糖铺底以抑制细胞贴壁、含5%新生牛血清、100 IU/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的McCoy's 5A培养液浸泡过夜的培养板，37 ℃，5% CO_2饱和湿度条件下，间断水平回旋振荡培养：前24 h，每2～3小时振荡10 min，之后每4～6小时振荡10 min。

1.4 HE染色

取HT29 MCSs，4%的多聚甲醛固定，1%琼脂糖包埋，切除多余琼脂糖，将含有HT29 MCSs的琼脂糖包埋于石蜡，切片，脱蜡至水，Harris苏木精-酸化伊红染色，脱水、透明、封片。

1.5 细胞角蛋白(cytokeratin，CK)免疫组化染色

取HT29 MCSs固定、制石蜡切片、脱蜡至水，0.1% Triton X-100破膜，参照试剂盒说明书操作，DAB显色，苏木精复染，脱水、透明、封片。

1.6 扫描电镜观察

HT29 MCSs用2.5%戊二醛固定，常规制片，于扫描电镜上观察。

1.7 透射电镜观察

HT29 MCSs用2.5%戊二醛固定，1%琼脂糖包埋，制片，染色，于透射电镜上观察。

1.8 药物敏感性检测

分为HT29单层细胞组(对照组)、HT29 MCSs组(实验组)。梯度浓度(0、50、500 μg/L)加入奥沙利铂，作用48 h；HT29 MCSs组加入Non-enzy Cell Detach Solution作用10 min；2组参照说明书加入适量Cell counting kit-8，继续培养2 h；酶联免疫检测仪以630 nm为参考波长、450 nm为测定波长检测每孔光密度值；计算细胞生存分数。

生存分数 = 实验组光密度值/对照组光密度值 ×100%

1.9 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 13.0统计软件对同等药物浓度条件下2组细胞生存分数行Student's t 检验。

2 结果

2.1 HT29单层细胞生长特点

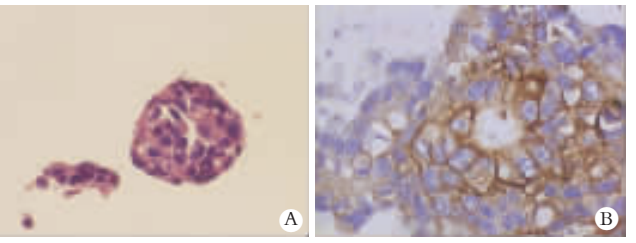
HT29在常规培养条件下呈单层细胞贴壁生长，细胞呈不规则形，核大，细胞质相对较少。

2.2 HT29 MCSs生长特点

在抑制贴壁、间断水平回旋振荡培养条件下，HT29细胞聚集成球生长。24 h即可聚集成结构松散的团状，72 h便可形成大小不一的多细胞球。HT29 MCSs生长速度与细胞数目、MCSs大小、培养时间关系密切。接种细胞多、MCSs大、培养时间长，则HT29 MCSs生长速度慢。

2.3 HT29 MCSs组织病理学结构

HE染色光镜下见生长72 h的HT29 MCSs切面呈类圆形，表明是由细胞聚集形成球形结构，细胞排列紧密(图1A)。生长1周的HT29 MCSs内，局部由细胞呈环形排列形成腺腔样结构，腺腔样结构内未见染色。CK免疫组化光镜下可见生长1周的HT29 MCSs内，局部见细胞基本呈放射状排列，形成腺腔样结构；CK表达呈阳性，靠近腺腔样结构部分表达更强(图1B)。

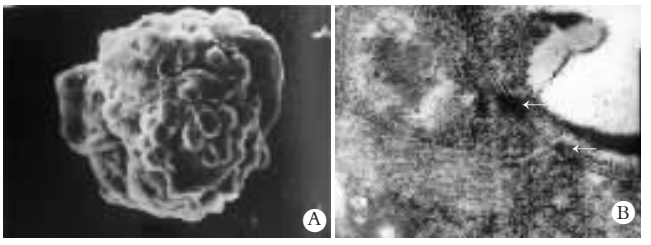


A：HE染色(×100)；B：CK免疫组化染色(SABC ×200)

图1 普通光镜下HT29 MCSs组织病理学结构观察

2.4 HT29 MCSs超微结构

扫描电镜下见HT29 MCSs由于细胞相互黏附从而聚集成团，表面由回缩成球形的细胞黏附形成凹凸不平结构(图2A)。HT29 MCSs内的细胞生长状态好，细胞器丰富；纤毛与微绒毛丰富、长而伸展。细胞-细胞接触广泛而紧密；见部分细胞与周边细胞形成细胞连接结构，其中以紧密连接多见(图2B)。



A：扫描电镜观察(×400)；B：透射电镜观察(×10 000) ↑：T29 MCSs内细胞间连接

图2 电镜下HT29 MCSs超微结构观察

2.5 HT29 MCSs药物敏感性

与HT29单层细胞相比，HT29 MCSs对奥沙利铂的药物敏感性显著降低：在给予50 μg/L奥沙利铂处理48 h条件下，HT29单层细胞的生存分数为(58.2 ± 3.3)%，HT29 MCSs则提高到(86.5 ± 4.7)%，二者差异有统计学意义($P < 0.05$)；在500 μg/L奥沙利铂处理48 h条件下，二者的生存分数分别为(9.3 ± 2.0)%、(42.9 ± 4.0)%，其差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

越来越多的研究发现，细胞间相互作用下对细胞的分化、增殖、存活、迁移等方面产生重要影响[3-5]。

而在单层培养的细胞则很难模拟体内细胞间的相互作用。因此,寻找能较好实现细胞间相互作用的模型具有重要意义。

肿瘤细胞三维培养是研究肿瘤细胞间以及肿瘤细胞与其他细胞(特别是免疫细胞,如 T 细胞等)相互作用的较理想模型[1,2]。本研究利用琼脂糖抑制细胞贴壁、水平回旋振荡培养的方法建立了结肠癌 HT29 细胞株体外三维培养模型 MCSs。HT29 MCSs 内细胞借助相互黏附形成由多层细胞组成球形结构。这一结构特点与体内无血管的微小结肠癌或结肠癌的无血管区接近,而与单层培养细胞有着显著的差异[2,6]。因此,MCSs 可以作为研究体内肿瘤的较理想模型。

MCSs 不但具有多层细胞结构,且细胞间有全方面的接触。因而,MCSs 是研究细胞间相互作用的较理想模型。如在肿瘤免疫中有着单层细胞不可取代的作用。将免疫细胞,如单核细胞及其他免疫细胞与肿瘤细胞共培养形成 MCSs,由于 MCSs 能较好地模拟实体瘤独特的区域微环境,且细胞间作用与体内相似,所以能很好地模拟体内的肿瘤免疫情况,更系统地研究体内免疫细胞与肿瘤细胞的相互作用、免疫细胞在肿瘤内部生物功能与特性的改变、免疫分子作用肿瘤细胞机制等[7]。同时,MCSs 在肿瘤细胞代谢、肿瘤血管生成、转移等方面也与单层细胞差异显著,而与体内肿瘤微小肿瘤相似,因而具有单层细胞不可替代的优势[2,8]。

我们对 MCSs 超微结构观察中发现,HT29 MCSs 内能形成与体内实体瘤相近的细胞连接,其中以紧密连接多见。细胞间连接对细胞的形态、分化、信息传递以及肿瘤的启动、演进等都起着重要作用[9]。因此,MCSs 可以为细胞间连接,特别是紧密连接对肿瘤细胞的作用研究提供一个较理想模型。

本研究还比较了结肠癌 HT29 MCSs 与单层细胞对奥沙利铂的药物敏感性,结果显示,与 HT29 单层细胞相比,HT29 MCSs 对奥沙利铂药物敏感显著下降,在 50、500 μg/L 奥沙利铂处理条件下,二者的生存分数差异皆有统计学意义($P<0.05$)。这种由于细胞聚集而导致的与单层细胞显著不同的药物现象,被称为群集耐药或多细胞耐药(multicellular drug resistance, multicellular resistance, MCR)[10,11]。在肿瘤对放疗抵抗中,也存在类似现象[12]。这种由于细胞生长方式的原因而导致的对放化疗的抵抗被称为多细胞抵抗或群集抵抗(multicellular resistance)[10,12]。肿瘤群集抵抗的原因与机制还不清楚,可能与多种因素相关,其中缺氧、抗凋亡可能起着重要作用[10,12]。

HT29 MCSs 另一组织病理学结构特点是,在 MCSs 内形成由多个细胞基本呈放射状排列组成的腺腔样结构的腺样组织,CK 表达阳性,且越接近腺腔样结构的部分,CK 表达越强。在正常的大肠内含有与结肠癌的发生、结肠功能密切相关的组织——隐窝。隐窝是由隐窝干细胞分化为杯状细胞、柱状细胞等组成腺样结构[13]。隐窝干细胞分化、隐窝结构形成机制及其分化的腺细胞的功能尚未研究清楚。而 HT29 MCSs 内形成的腺腔样结构与隐窝内的腺样结构具有相似性[13],因而,HT29 MCSs 对研究结肠隐窝结构的形成及细胞功能具有一定意义。

综上所述,结肠癌 MCSs 由多层互相黏附的细胞组成,能形成具有腺腔样结构的腺样组织,是模拟体内无血管的微结肠癌病灶及结肠癌无血管区的较理想模型,同时对研究结肠隐窝结构的形成及细胞功能也具有一定意义。

参考文献:

[1] Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, *et al*. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again[J]. J Biotechnol, 2010, [Ahead of publish].

[2] Shield K, Ackland M L, Ahmed N, *et al*. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology[J]. Gynecol Oncol, 2009, 113(1): 143-148.

[3] Hay E, Nouraud A, Marie P J. N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling[J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8284.

[4] Zigrino P, Steiger J, Fox J W, *et al*. Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration[J]. J Biol Chem, 2007, 282(42): 30785-30793.

[5] 刘晓芳, 王延洲, 徐惠成, 等. 细胞间接触诱导骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 516-519.

[6] Lawrenson K, Benjamin E, Turmaine M, *et al*. *In vitro* three-dimensional modelling of human ovarian surface epithelial cells[J]. Cell Prolif, 2009, 42(3): 385-393.

[7] Gottfried E, Kunz-Schughart L A, Andreesen R, *et al*. Brave little world: spheroids as an *in vitro* model to study tumor-immune-cell interactions[J]. Cell Cycle, 2006, 5(7): 691-695.

[8] Tzuman Y C, Sapoznik S, Granot D, *et al*. Peritoneal adhesion and angiogenesis in ovarian carcinoma are inversely regulated by hyaluronan: the role of gonadotropins[J]. Neoplasia, 2010, 12(1): 51-60.

[9] Mathias R T, White T W, Gong X. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis[J]. Physiol Rev, 2010, 90(1): 179-206.

[10] Feder-Mengus C, Ghosh S, Weber W P, *et al*. Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. Br J Cancer, 2007, 96(7): 1072-1082.

[11] Ravizza R, Molteni R, Gariboldi M B, *et al*. Effect of HIF-1 modulation on the response of two- and three-dimensional cultures of human colon cancer cells to 5-fluorouracil[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(5): 890-898.

[12] Shi D, Shi G, Huang G, *et al*. Chemosensitivity of radioresistant cells in the multicellular spheroids of A549 lung adenocarcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 72.

[13] Humphries A, Wright N A. Colonic crypt organization and tumorigenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(6): 415-424.

(收稿 2010-01-22 修回 2010-04-05)
(编辑 王小宴)