DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.018
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
704 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0704-03

肺腺癌细胞株体外三维培养模型的建立及其药物敏感性的观察

何建明,梁后杰,边志衡,胡绍毅 (第三军医大学西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨肿瘤细胞三维培养的理想方法,为模拟体内实体瘤细胞间相互作用提供良好模型。方法 在抑制细胞贴壁、间断振荡条件下,培养无载体三维细胞模型;利用微载体CutiSpher进行多细胞球(multicellular spheroids, MCS)培养;MTT法检测单层细胞(monolayer cells, MC)药物敏感性,细胞计数法检测MCS药物敏感性;利用透射电镜比较MCS与MC超微结构的差异。结果 无载体三维细胞培养在培养4 d后即可形成由多个细胞组成的细胞团。MCS在培养0.5 h后即可见细胞贴附于载体;培养5 d后,形成有多层细胞结构的细胞球。与MC相比,MCS药物敏感性显著下降;细胞器及微绒毛丰富;细胞间粘附广泛而紧密。结论 MCS细胞生长活性好,能较好地模拟体内实体瘤的细胞间相互作用,特别是细胞间粘附;细胞间粘附可能是MCS对化疗敏感性下降的重要原因。

关键词:细胞培养;肿瘤;载体;药物敏感性
中图法分类号:R-332;R734.2;R965.1 文献标识码:A

Construction of three dimensional *in vitro* culture model of pulmonary adenocarcinoma and detection of its drug resistance

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

Abstract: Objective To explore an optimal model of three dimensional *in vitro* cell culture for simulating solid tumors *in vivo*. Methods The model of three dimensional cell culture was constructed under the conditions of inhibiting the cell wall attachment and stirring the medium. Multicellular spheroids (MCS) were cultured using microcarriers (CutiSpher). Drug sensitivity of monolayer cells (MC) and MCS was tested by MTT staining and cytometry, respectively. Ultrastructures of the MC and MCS were observed by transmission electron microscopy. Results Cells in three dimensional cell culture model without microcarriers were compacted into mass at 4 d while cells in MCS were found to attach to the microcarriers at 0.5 h. MCS had more than two layers of cells growing within it at 5 d. Compared with MC, MCS was more resistant to the anticancer drug, and had more plenty of organell and microvilli with more extensive and compact cell adhesion. Conclusion MCS has strong developmental properties and can simulate the cell-cell interactions *in vivo*, especially cell adhesion, which may contribute to the drug resistance of MCS.

Key words: cell culture; neoplasm; microcarrier; drug resistance

实体瘤对放化疗的敏感性下降是影响肿瘤治疗疗效的主要原因之一。以单层细胞(monolayer cells, MC)为模型研究肿瘤对放化疗敏感性得到的结果与体内实验往往有很大差距[1,2]。究其原因可能与MC不能模拟实体瘤细胞间相互作用,特别是细胞粘附有关。用透明质酸酶作用于小鼠体内种植瘤,使细胞间粘附松散,可明显增加肿瘤细胞的药物敏感性[3]。因而,本实验旨在建立能够模拟体内实体瘤细胞间相互作用,特别是细胞间粘附的三维细胞培养模型,比较三维培养与单层培养的细胞药物敏感性及细胞间粘附的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞株:人肺腺癌单克隆细胞株A549(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室提供)。

主要试剂及仪器:RPMI1640(HyClone公司)含10%精制小牛血清(HyClone公司)、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素,CultiSpher-S(HyClone公司)。Spinner flask、低速磁力搅拌器(Bellco-glass公司),倒置相差显微镜(Olympus公司),TECNAI10透射电镜(Philip公司),AMRAY-1000B扫描电镜(AMRAY公司)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171067)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30171067)
作者简介:何建明(1976-),男,安徽省安庆市人,硕士,医师,主要从事肿瘤耐药方面的研究。电话:(023)65399027
通信作者:梁后杰,电话:(023)68754128
收稿日期:2003-06-20;修回日期:2003-09-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　无载体三维细胞培养

2%琼脂糖铺底培养瓶; 将 A549 细胞接种于培养瓶内, 间断振荡培养; 24 h 后, 将培养液加倍, 间断振荡培养。

1.3　MCS 培养

预处理载体:(参照 Rasey 等[4] 方法, 有所改变)将 CultiSpher 用 PBS 浸泡后压力蒸汽灭菌, 再用 PBS 浸泡 1 次, 接着用培养液浸泡 2 次; Spinner flask 的预处理　压力蒸汽灭菌, 2%琼脂糖铺底, 按照细胞数∶CultiSpher (mg)∶培养液(ml)的值为 3×10^6∶10∶5, 将三者放入 spinner flask 中, 间断搅拌培养; 24 h 后, 弃去大部分培养液, 加培养液至培养液(ml)∶CultiSpher(mg)为 1∶1。持续搅拌培养。

1.4　扫描电镜的观察

取培养 6 d 的 MCS, 2.5%戊二醛固定, 常规制片后, AMRAY-1000B 扫描电镜观察。

1.5　药物敏感性的比较

1.5.1　MC　细胞铺满培养瓶底的 50%左右, 加阿霉素(终浓度 0.1 μg/ml)培养 24 h, MTT 法检测其生长分数。

1.5.2　MCS　MCS 培养第 5 天, 同上药物处理, 细胞计数检测其生长分数。

1.6　透射电镜的观察

1.6.1　MC　将细胞培养至盖玻片上, 2.5%戊二醛固定, 原位包埋, 制片, TECNAI10 透射电镜观察。

1.6.2　MCS　取培养 6 d 的 MCS, 2.5%戊二醛固定, 常规制片后, TECNAI10 透射电镜观察。

1.7　统计学方法

使用 SPSS10.0 行单因素方差分析。

2　结果

2.1　无载体三维细胞培养模型生长状况

培养 24 h 后, 细胞大部分聚集成由数个细胞组成的细胞团; 细胞呈球形, 透明, 折光性好。培养 4~8 d 后, 培养液内可见大量的由多个细胞组成的细胞团; 细胞团大小不一, 所含细胞数由近百个到数十个不等; 细胞间的粘附力较弱, 轻轻吹打即分离(图 1)。

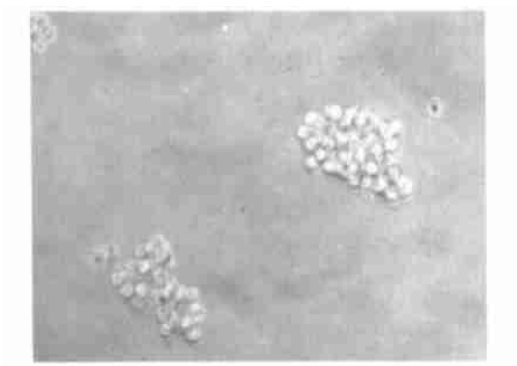


图 1　无载体三维细胞培养 5 d　(倒置显微镜× 200)

Fig 1　Three dimensional cell culture without microcarriers, 5 d (Inverted microscope× 200)

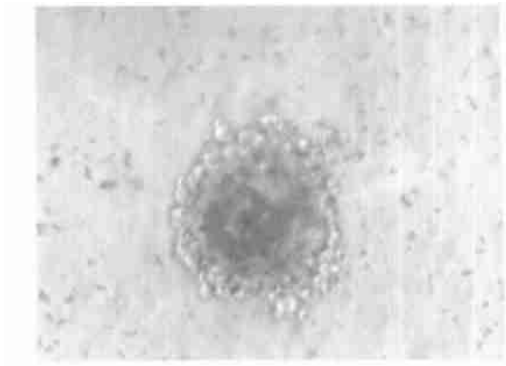


图 2　倒置显微镜下 MCS 6 d　(× 200)

Fig 2　MCS, 6 d under inverted microscope　(× 200)

2.2　MCS 的生长状况

2.2.1　倒置显微镜观察　MCS 培养 0.5 h 后, 载体上即有细胞粘附; 24 h 后, 载体上粘附生长的细胞明显增多, 载体上的细胞数量差异较大, 载体单个存在; 培养 5~9 d 后, 所有载体上皆可见大量细胞粘附生长, 形成数层, 载体间细胞层数差异不大, 部分载体借助于表面的细胞连接在一起(图 2)。

2.2.2　扫描电镜观察　MCS 培养 24 h 后, 可见载体上有少量细胞粘附生长; 培养 6 d 时, MCS 呈球形, 载体上可见大量细胞生长, 完全包裹住载体。

2.3　药物敏感性的差异

MCS 的药物敏感性比 MC 明显下降。在加阿霉素 0.1 μg/ml 培养 24 h 条件下的生长分数, MC 为(0.502±0.062), MCS 为(0.626±0.066); 二者有显著性差异($P<0.01$)。

2.4　MCS 与 MC 超微结构的差异

2.4.1　MC　大部分细胞单个存在, 与周边的细胞无明显的粘附, 偶见有细胞间粘附者, 其接触部未见细胞膜增厚或明确的细胞连接。细胞内线粒体、内质网、核糖体少。细胞表面微绒毛少, 粗而短。

2.4.2　MCS　绝大部分细胞与周边的细胞有广泛的细胞粘附, 接触部位可见细胞膜增厚。部分细胞间有镶嵌连接, 连接部胞膜增厚, 局部有点状突起, 形成数个纽扣样结构。细胞膜、核膜结构完整、清晰; 细胞器丰富, 特别是粗面内质网、线粒体、核糖体; 微绒毛丰富(图 3)。

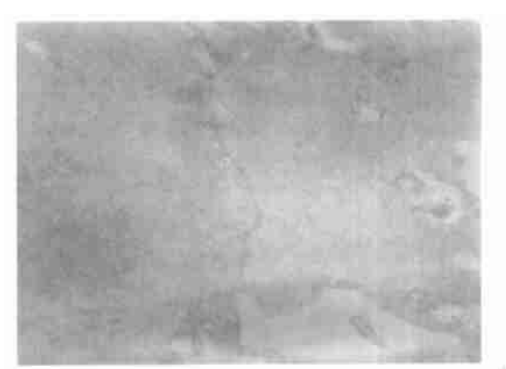


图 3　MCS镶嵌连接　(TEM× 10 000)

Fig 3　Inlay junction of MCS　(TEM× 10 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

既往对肿瘤的体外研究多采用MC为模型。在此基础上得到的结果与体内实验结果往往有很大差异，特别是在化疗及放疗方面。将从小鼠体内得到的具有多药耐药性的肿瘤细胞在体外进行单层培养，其多药耐药性消失[1]；而在三维细胞培养条件下，此细胞恢复多药耐药性[5]。同时，实验证明，在三维培养条件下，肿瘤细胞对放疗的敏感性也明显下降[6]。说明单层培养的细胞不能很好地模拟体内实体瘤，而三维细胞培养模型能较好地模拟其特性，在细胞三维培养条件下的研究能比较真实地反映肿瘤体内的情况[6,7]。其原因可能与体内实体瘤作为一个整体，因而有细胞间相互作用和独特的微环境相关。

因此，本实验建立并比较了两种三维细胞培养模型。无载体三维细胞培养条件简单，操作比较方便。利用2%琼脂糖抗细胞贴壁，使A549细胞悬浮于培养液内生长，并借助于细胞间粘附，自动聚集成由多个细胞组成的细胞团。细胞在这种条件下自动聚集成细胞团的机制还不十分清楚。有实验表明，钙粘附素与整合素在其中起着重要的作用[7,8]。我们在实验中发现，无载体三维细胞培养条件下形成的细胞团，大小差异大，所含细胞数由数十个到上百个不等，有些细胞团甚至仅由十来个细胞组成；细胞间粘附不紧密，轻轻吹打即可导致细胞团分散成数个小细胞团。

MCS的培养需要比较昂贵的仪器，培养条件要求比较高，操作也较复杂。但是，我们的结果显示，MCS优点比较多。载体对细胞的亲和性好。将细胞与载体培养0.5 h后即见细胞贴附于载体上，24 h后即可见较多的细胞贴附生长。MCS细胞生长速度快，培养6 d左右，即可见大量细胞完全包裹住载体，形成多层细胞结构的细胞球。MCS大小比较均一，细胞间的粘附紧密。与单层培养的细胞相比，内质网、核糖体、线粒体丰富；微绒毛长而多。提示细胞生长状态良好。

三维细胞培养能较好地模拟体内实体瘤细胞间相互作，而与体内实验的实体瘤相比，具有易操作、好控制、排除了宿主的影响等优点。因而，在肿瘤研究中，有广泛的应用价值。有实验证明此种培养方法培养的细胞对放疗的敏感性下降[3,6]；对化疗的敏感性与单层培养的细胞明显不同，耐药性与体内实体瘤相似[5]。同时，三维培养的细胞分泌蛋白的功能，如分泌细胞外基质成分，与单层培养的细胞明显不同，而与体内实体瘤很接近[9]。三维细胞培养还可以诱导细胞分化。Sutherland等人利用人结肠腺癌细胞株进行三维细胞培养，结果细胞呈腺样结构，并出现腺腔，与从人体取下的组织及种植至裸鼠的肿瘤非常接近[10]。

本实验中，我们比较了MC与MCS的药物敏感性及细胞间粘附的差异。结果表明，MCS的药物敏感性显著下降，二者在药物处理后的生长分数有显著性差异；MCS细胞间粘附广泛而紧密，部分有镶嵌连接。而细胞间粘附对细胞（包括肿瘤细胞）的性质起重要作用，特别是凋亡。介导细胞间粘附的细胞粘附分子具有抗凋亡作用，其中可能有NF kappa B信号转导通路的参与[11]。而诱导凋亡是化疗作用的重要机制，抑制凋亡直接影响到的化疗敏感性[12]。用透明质酸酶作用于小鼠体内种植瘤，使肿瘤细胞间连接松散，可以明显增加药物敏感性[3]。间接证明了细胞粘附是体内肿瘤耐药的重要基础。结合本实验结果，提示，MCS广泛而紧密的细胞间粘附可能是MCS药物敏感性下降的重要原因。

参考文献：

[1] 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.

[2] Ng C P, Bonavida B. A new challenge for successful immunotherapy by tumors that are resistant to apoptosis: two complementary signals to overcome cross-resistance[J]. Adv Cancer Res, 2002, 85: 145-174.

[3] Croix B S, Rak J W, Kapitain S, *et al*. Reversal by hyaluronidase of adhesion-dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells [J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(18): 1285-1296.

[4] Rasey J S, Cornwell M M, Naurer B J, *et al*. Growth and radiation response of cells groun in macroporous gelatin micro carriers (Cuttispler-C) [J]. Br J Cancer Suppl, 1996, 27: S78-81.

[5] 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.

[6] Durand R E, Olive P L. Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids[J]. Methods Cell Biol, 2001, 64: 211-233.

[7] Wehrle J P, Ng C E, McGovern K A, *et al*. Metabolism of alternative substrates and the bioenergetic status of EMT6 tumor cell spheroids[J]. NMR Biomed, 2000, 13(6): 349-360.

[8] Vizirianakis I S, Chen Y Q, Kantak S S, *et al*. Dominant-negative E-cadherin alters adhesion and reverses contact inhibition of growth in breast carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2002, 21(1): 135-144.

[9] Davies C D, Muller H, Hagen I, *et al*. Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures[J]. Anticancer Res, 1997, 17(6D): 4317-4326.

[10] Shweiki D, Neeman M, Itin A, *et al*. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(3): 768-772.

[11] Reyes Reyes M, Mora N, Zentella A, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-kappaB and MAPK activation through separate signaling pathways[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 8): 1579-1589.

[12] Kim R, Tanabe K, Uchida Y, *et al*. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2002, 50(5): 343-352.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net