

基于原代细胞培养的三维肿瘤药筛模型的初步研究

王健^{1,2,3}, 张荟蓉^{2,3,4,5}, 赵盼^{2,3,4,5}, 王光锁^{1,2,3}, 邹畅^{2,3,4,5}

1. 深圳市人民医院胸外科, 广东 深圳 518000;

2. 暨南大学第二临床医学院, 广东 深圳 518000;

3. 南方科技大学第一附属医院, 广东 深圳 518052;

4. 深圳市人民医院临床医学研究中心, 广东 深圳 518000;

5. 深圳市肿瘤精准医疗与分子诊断公共服务平台, 广东 深圳 518000

【摘要】 目的 以原代培养的肺癌肿瘤细胞为基础, 建立一种体外肿瘤药筛模型。方法 通过将分离得到的肿瘤细胞与饲养层细胞共培养, 使肿瘤细胞在体外得到初步扩增。培养得到的肿瘤细胞与海藻酸钠溶液混合后滴进氯化钙溶液中形成稳定的海藻酸钙凝胶微球(水凝胶), 凝胶微球为细胞提供一个模拟的三维生长环境, 通过传统的CCK8细胞毒性实验进行药物筛选。结果 基于原代细胞培养建立的三维模型中, 形成的海藻酸钙凝胶微球大小均一, 形态完整, 该凝胶微球可用CCK8细胞毒性实验进行药物筛选, 细胞毒性实验提示顺铂、卡铂及盐酸吉西他滨对该原代细胞的抑制率相对较高。结论 海藻酸钙凝胶微球三维体系的形成表明基于原代培养的三维肿瘤模型已初步建立, 并且该模型可用作药物筛选, 为临床用药提供一定的指导。

【关键词】 原代肺癌细胞; 共培养; 三维培养; 海藻酸钠; 氯化钙; 药物筛选模型

【中图分类号】 R73-3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2021)14-1778-04

Preliminary test of a three-dimensional tumor drug screening model based on primary cell culture. WANG Jian^{1,2,3}, ZHANG Hui-rong^{2,3,4,5}, ZHAO Pan^{2,3,4,5}, WANG Guang-suo^{1,2,3}, ZOU Chang^{2,3,4,5}. 1. Department of Thoracic Surgery, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA; 2. The Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA; 3. The First Affiliated Hospital of Southern University, Shenzhen 518052, Guangdong, CHINA; 4. Clinical Medical Research Center, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA; 5. Shenzhen Public Service Platform on Tumor Precision Medicine and Molecular Diagnosis, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA

【Abstract】 **Objective** To establish a model for tumor drug screening *in vitro* based on primary lung cancer cell culture. **Methods** By co-culturing the isolated tumor cells with feeder cells, the tumor cell were amplified *in vitro* firstly. The cultured tumor cells were mixed with sodium alginate solution and then dropped into calcium chloride solution to form stable calcium alginate gel microspheres (Hydrogels), which provided a three-dimensional growth environment for the cells and could be used for drug screening by traditional CCK8 cytotoxicity test. **Results** In the three-dimensional model based on the primary cell culture, calcium alginate gel microspheres were uniform in size and complete in shape, and these gel microspheres can be used for drug screening in CCK8 cytotoxicity test. The cytotoxicity test indicated that cisplatin, carboplatin and gemcitabine hydrochloride had a relatively high inhibited rate to the primary cells. **Conclusion** The formation of calcium alginate gel indicated a three-dimensional model based on primary cell culture was preliminarily established, which also could be used as a drug screening model to provide guidance for clinical medication.

【Key words】 Primary lung cell; Co-culture; Three-dimensional culture; Sodium alginate; Calcium chloride; Drug-screening model

研究表明, 肿瘤的发生及发展与肿瘤所处的微环境有着直接必然的联系^[1], 体外肿瘤细胞的三维培养技术, 能够更好地模拟肿瘤细胞在体内的真实状态^[2-3]。肿瘤细胞三维培养体系的建立涉及到细胞生物学和组织工程学的交叉结合, 相对于传统的平面培养, 三维培养可为肿瘤的体内实验搭建一个桥梁^[4]。在肿瘤研究的基础领域, 三维培养体系的建立对于临床前体外药物的筛选、肿瘤干细胞的维持和分化以及信号的异常传导都有着非常重要的研究意义^[5-6]。特

别是针对一些少见的恶性肿瘤, 临床前的药敏实验和药物筛选、三维培养体系的建立将会为不必要的 I、II 期临床实验提供有价值的引导, 有效减少资金和资源的浪费^[7]。因此本实验在平面培养的基础上, 尝试建立一个稳定有效的体外三维筛药模型, 并且通过试用不同化疗药物对该模型进行了初步试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 肿瘤组织标本来源于 2020 年 1

基金项目: 广东省医学科学技术研究项目基金(编号: A2020508); 广东省深圳市科创委国际合作项目(编号: GJHZ20180928171602104)

通讯作者: 邹畅, E-mail: zou.chang@szhospital.com

月至2020年7月在深圳市人民医院胸外科接受手术切除的肿瘤患者。

1.1.2 主要试剂和药物 完全培养基F培养基成分包括DMEM、F-12 nutrient mix、FBS、L-glutamine、hydrocortisone epidermal growth factor (EGF)、insulin、ROCK inhibitor (Y-27632)、青霉素/链霉素;胰酶包括0.05%的 Trypsin/EDTA、0.25%的 Trypsin/EDTA; 主要化疗药物有顺铂、卡铂、培美曲塞和盐酸吉西他滨; 其他还有海藻酸钠溶液、氯化钙。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤原代细胞培养 将胸外科手术取下的肺癌组织标本转移至组织保护液中,并放置在冰上取回至实验室。肿瘤组织块转移至6 cm的培养皿中用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗三次,洗去组织块上的血水,用已经高压灭菌消毒的手术剪刀将组织剪成1 mm³小的组织碎块,消化酶重悬转移至15 mL的离心管,固定于37℃培养箱中消化0.5~3 h。在500×g、4℃离心5 min,弃去上清。沉淀用完全培养基重悬,100 μm的滤膜过滤后300×g、4℃离心5 min。细胞沉淀用F培养基重悬后铺板在含有饲养层细胞的培养板中,于37℃、5%的CO₂培养箱中培养。

1.2.2 原代细胞免疫荧光鉴定 将10⁵的细胞接种在含有细胞爬片的24孔板中,第二天细胞贴壁后用PBS冲洗两次,洗去培养基和漂浮的死细胞后用4%的多聚甲醛室温固定30 min。PBS冲洗两次后加入0.5%的 Triton-X-100,室温使其通透15 min,再用PBS冲洗两次;用5%的BSA室温封闭30 min,一抗分别为CK7、NapsinA、TTF-1和Ki67,按照1:200的稀释比加入,4℃过夜孵育。PBS冲洗3次,每次3~5 min,二抗1:500稀释,室温孵育1 h后PBS洗3次,充分洗去抗体残留。复染细胞核DAPI,以1:1 000稀释后常温孵育10 min以后PBS漂洗3次,每次5 min。滴加抗淬灭剂,封片,荧光显微镜镜检。

1.2.3 原代肺癌细胞的三维培养及药物敏感性测试模型构建 将分离得到的原代肺癌细胞与海藻酸钠溶液均匀混合(每毫升海藻酸钠溶液中加入10⁶个细胞);利用锐孔挤压法(将混合液吸入1 mL的无菌注

射器中)控制力度均匀滴入100 mmol/L的CaCl₂溶液中,钙化30 min使之形成粒径均一的凝胶微球;生理盐水清洗两次,培养基再清洗一次,将包埋癌细胞的海藻酸钙凝胶微球转移至培养基中培养10 d,使之形成三维细胞团;转移相同个数的细胞团至96孔板中,分别加药处理48 h和72 h。

1.2.4 CCK8法检测细胞毒性 每孔加入10%的CCK8新鲜培养基,37℃培养箱中孵育2 h,酶标仪检测450 nm处的OD值。

2 结果

2.1 肿瘤组织收集及病理鉴定 收取的组织标本石蜡切片病理判定结果为浸润性肺腺癌,腺泡型(约50%)+实体型(约40%)+乳头型(约10%),免疫组化结果显示CK(+),NapsinA(+),TTF-1(+).

2.2 原代肺癌细胞平面生长情况 分离得到的肿瘤细胞与饲养层细胞共培养,培养3~7 d换液,在显微镜下可观察到明显的细胞克隆,肿瘤细胞贴壁聚集,紧密排列,成鹅卵石铺路石状,见图1A;在共培养体系中,清晰可见岛状细胞团,并被饲养层细胞紧密包裹生长,饲养层细胞呈梭形状,与上皮细胞可明显区分,见图1B。

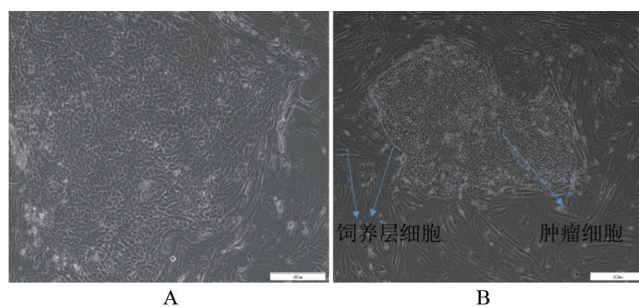


图1 原代肺癌细胞生长形态

注:A,原代细胞(×100);B,原代细胞(×40)。

2.3 免疫荧光鉴定 培养的细胞用免疫荧光法进行鉴定,如图2所示,免疫荧光结果显示CK7为强阳性,NapsinA和TTF-1均为阳性表达,Ki67细胞增殖为强阳性。免疫荧光抗体表达结果与患者肿瘤组织的病理结果一致,提示培养的原代细胞为肺腺癌肿瘤细胞。

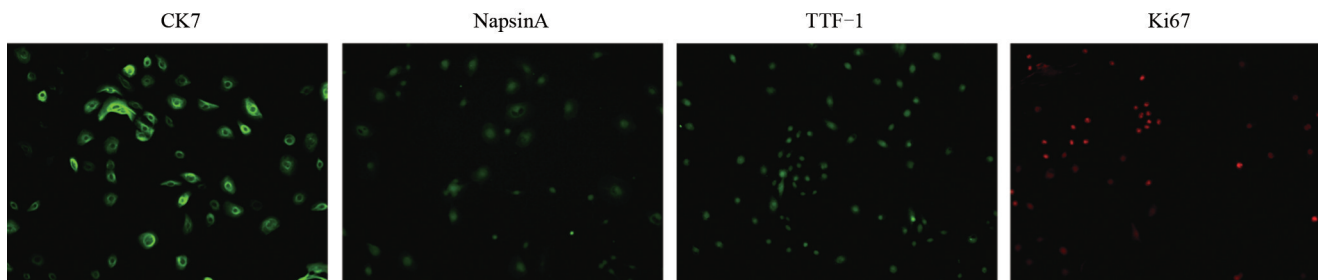


图2 原代肺癌细胞免疫荧光鉴定

2.4 原代肺癌细胞在三维培养体系中的培养 海藻酸钠溶液与细胞混合,滴进氯化钙溶液中会形成海藻酸钙凝胶微球,微球将细胞包裹形成一个三维体系,可以让细胞在立体三维空间中持续生长,图 3A 为一个海藻酸钙凝胶微球,该微球大小均一,形态完整;图 3B 是单个凝胶微球中细胞的生长状态,单个细胞在微球中会形成小的细胞团,细胞团悬浮生长,形成了一个封闭的三维环境。

2.5 原代肺癌细胞在三维培养体系中的药物敏感性检测 肺腺癌的临床化疗药物主要包括顺铂、卡铂、培美曲塞和盐酸吉西他滨等,通过 CCK8 法检测肺腺癌原代细胞在该三维体系中的抑制率,如图 4 所示,药物作用时间为 48 h 时,药物抑制率为卡铂>吉西他滨>培美曲塞;药物作用时间为 72 h 时,顺铂>卡

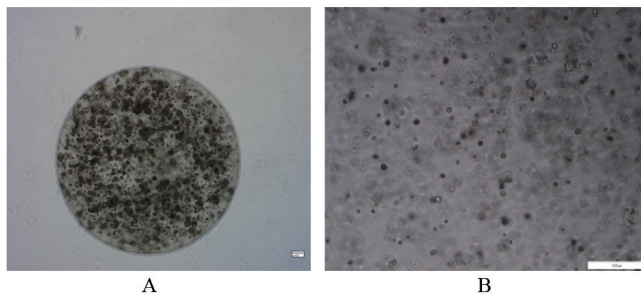


图 3 原代细胞肺癌细胞的三维培养

注:A,海藻酸钙凝胶微球($\times 40$);B,海藻酸钙凝胶微球中细胞生长形态($\times 100$)。

铂>吉西他滨>培美曲塞。此株原代细胞对培美曲塞的敏感性相对较低,对顺铂、卡铂及吉西他滨的敏感性相差不大,在临床上可选择联合用药以提高对病情的控制程度。

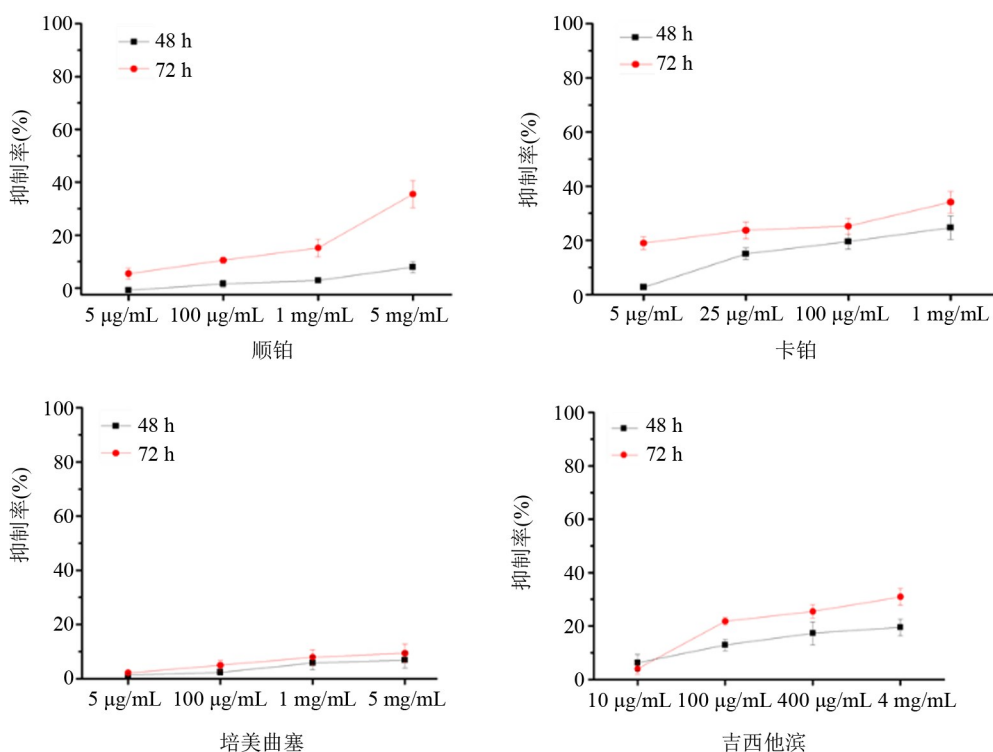


图 4 不同化疗药物对肺癌原代细胞的抑制率

3 讨论

肺癌是我国在世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[8]。临床医生对于肺癌的化疗用药多限于经验给药,这种用药模式会造成患者出现多重耐药、不良反应、效果欠佳等后果。有研究表明,有药敏实验结果指导的临床治疗效果要明显优于无药敏实验指导的治疗^[9]。因此建立一种更接近体内的成熟的体外药筛模型,是非常重要的。在体外细胞培养的研究中,研究者主要是在坚硬的塑料或玻璃表面进行 2D 培养,主要是因为 2D 培养简单、方便和有高效的细胞增殖速度^[10]。2D 培养的细胞模型会与细胞真实的生存环境和生长方式有很大的不同,与 3D 培养相比,可

以发现有明显的生物学变化,包括免疫系统激活、防御反应、细胞黏附和组织发育^[11-13]。因此,3D 系统特别是 3D 细胞培养体系在生物学上具有非常重要的意义,比如更经济高效的新药开发、癌症患者体外药敏实验及发育生物学和细胞分化机制的基础研究^[10]。

目前三维培养主要有:三维成球培养(静止性悬浮成球培养^[14]、滴滴悬挂培养^[15]、机械运动式培养^[16])凝胶包埋培养(胶原^[17]、藻酸盐^[18]、Matrigel^[19])、三维组织工程支架培养^[4,20]。水凝胶是亲水聚合物交联在一起的一种三维网络,可以吸收大量的生物液体和水而膨胀,同时可以保持自己的网络结构,就像一个活体组织一样具有高水容量、渗透力和一致性^[21]。在生物医

学领域中,水凝胶在药物输送载体、创面材料和3D打印中的巨大应用潜力和价值已得到证实^[21]。

本实验研究首先用与饲养层细胞共培养的2D培养体系在体外迅速获得大量的原代肺癌细胞,然后利用海藻酸钠水凝胶在3D培养体系方面的应用,将得到的原代肺癌细胞与海藻酸钠混合培养形成稳定的海藻酸钙凝胶微球,初步构建了一个基于原代培养的3D肿瘤药筛模型,并用此模型进行了化疗药物筛选的初步试验。实验结果显示该3D模型形成的细胞微球大小均一,形态完整,细胞生长状态良好;与其他的3D模型相比,该模型在药物筛选时可以通过准确地控制细胞球数量来统一细胞量进行药物敏感性实验,四种化疗药物处理结果提示,该细胞对顺铂、卡铂及吉西他滨的敏感性比培美曲塞的敏感性高。综上所述,该三维模型的建立,方法简单,易于操作,成功率高,可为临床上体外药物筛选提供一定的基础。

参考文献

- [1] CHIARUGI P, PAOLI P, CIRRI P. Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer [J]. *Semin Oncol*, 2014, 41(2): 267-280.
- [2] MARBRY KM, PAYNE SZ, ANESETH KS. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype [J]. *Biomaterials*, 2016, 74: 31-41.
- [3] ABBOTT A. Cell culture: biology's new dimension [J]. *Nature*, 2003, 424(6951): 870-872.
- [4] 吕东来, 陆林, 卢虎生, 等. 三维培养在肿瘤细胞生物学研究中的应用[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2017, 26(5): 497-501.
- [5] CHEN L, XIAO Z, MENG Y, et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1437-1444.
- [6] CALAR K, PLESSELOVA S, BHATTACHARYA S, et al. Human plasma-derived 3D cultures model breast cancer treatment responses and predict clinically effective drug treatment concentrations [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7): 1722.
- [7] WÄSTFELT M, FADEEL B, HENTER JI. A journey of hope: lessons learned from studies on rare diseases and orphan drugs [J]. *J Intern Med*, 2006, 260(1): 1-10.
- [8] GAO S, LI N, WANG S, et al. Lung cancer in people's republic of China [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(10): 1567-1576.
- [9] 高隆, 霍润辉. 肺癌体外药敏试验与临床疗效的相关性[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(23): 2203-2204.
- [10] ANDERSEN T, AUK-EMBLEM P, DORNISH M. 3D cell culture in alginate hydrogels [J]. *Microarrays (Basel)*, 2015, 4(2): 133-161.
- [11] WEIGELT B, LO AT, PARK CC, et al. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010, 122(1): 35-43.
- [12] KENNY PA, LEE GY, MYERS CA, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression [J]. *Mol Oncol*, 2007, 1(1): 84-96.
- [13] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [14] REYNOLDS BA, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [15] KELM JM, TIMMINS NE, BROWN CJ, et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(2): 173-180.
- [16] ZANETTA M, QUIRICI N, DEMAROSI F, et al. Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(4): 1126-1136.
- [17] FREEMAN AE, HOFFMAN RM. *In vivo*-like growth of human tumors in vitro [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(8): 2694-2698.
- [18] DVIR-GINZBERG M, GAMLIELI-BONSHTEIN I, AGBARIA R, et al. Liver tissue engineering within alginate scaffolds: effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(4): 757-766.
- [19] KLEINMAN HK, MARTIN GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2005, 15(5): 378-386.
- [20] CARLETTI E, MOTTA A, MIGLIARESI C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 695: 17-39.
- [21] ABASALIZADEH F, MOGHADDAM SV, ALIZADEH E, et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting [J]. *J Biol Eng*, 2020, 14: 8.

(收稿日期:2021-01-25)