

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.19.030

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190809.1344.062.html>(2019-08-09)

三维细胞培养的研究进展*

程 华¹, 刘素生²综述, 韩 玮³审校

(1. 河北省科学院生物研究所, 石家庄 050081; 2. 河北大学药学院, 河北保定 071002;
3. 河北省石家庄市第五医院结核门诊 050000)

[摘要] 三维细胞培养是近几年发展起来的一种新的细胞培养技术, 该技术通过模拟细胞之间及细胞外基质信号传导的微环境, 使细胞培养的状态更接近于生物体内。该技术有望成为现有的二维细胞培养和动物模型之间的桥梁, 在疾病机制研究、药物高通量筛选及疫苗生产等领域发挥巨大作用。现就三维细胞培养在技术研究方面及应用领域中的进展进行了综述。

[关键词] 二维细胞培养; 三维细胞培养; 药物评价, 临床前; 组织工程

[中图分类号] R319 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)19-3363-04

Advances in three-dimensional cell culture*

CHENG Hua¹, LIU Susheng², HAN Wei³

(1. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081, China;
2. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China;
3. Department of Tuberculosis Clinic, Shijiazhuang Fifth Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

[Abstract] The technology of three-dimensional cell culture is a new cell culture technology developed in recent years. This technique can simulate the microenvironment between cells and extracellular matrix in the body, making the state of cell culture closer to the organism. The technology is expected to become a bridge between the existing two dimensional cell culture and animal models, and plays a great role in the research of disease mechanism, high throughput drug screening and vaccine production. The progress of 3D cell culture in technology and application are reviewed.

[Key words] two-dimensional cell culture; three-dimensional cell culture; drug evaluation, preclinical; tissue engineering

细胞培养是指从生物体取出部分组织分散成单个细胞或直接从机体取出单个细胞, 在体外条件下培养, 细胞能继续存活与增殖。从 1885 年德国学者 ROUX 用生理盐水培养鸡胚组织开始算起, 细胞培养技术发展到今天已有一百三十多年的历史了。在这一百多年里细胞培养技术不断发展, 特别是 20 世纪 60 年代末期培养技术进入鼎盛阶段, 在培养器皿、培养液和培养方法等方面取得突破性进展。由于操作简单、周期短、费用低等特点, 细胞培养在基础研究和应用领域中使用越来越广泛^[1]。

经过多年的发展, 细胞培养技术已成为生命科学、疾病机制研究、药物筛选及生物制品生产等多个领域中基础且不可替代的技术手段^[2]。在肿瘤机制研究方面, 通过在体外进行肿瘤细胞培养的方式, 来揭示肿瘤发生、发展及转移过程中分子调控行为和机制^[3]。在药物筛选方面, 外源化合物可以直接作用于靶细胞, 特别是大量候选药物的初始筛选阶段, 可

以根据筛选目的设计实验条件, 短期内获得大量包括药物反应和细胞毒性在内的实验数据。同时, 标准化的细胞培养流程使得自动化设备的使用成为可能, 效率大大提高^[4-5]。在生物制品方面, 目前多种疫苗由细胞发酵生产, 特别是流感疫苗, 细胞培养已经成为其最主要的生产方式之一^[6-7]。

随着各领域研究的不断深入, 二维细胞培养技术的缺点也逐渐暴露出来。在很多情况下某些细胞在培养过程中逐渐丧失了原有的特性, 导致研究结果与体内的实际情况不符合。分析其原因, 考虑细胞在体外进行二维培养时, 无法生成细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 进而无法形成立体结构。而在活体组织中, 细胞通常在三维微环境中生长, 这个三维微环境提供了细胞生存所需的各种条件, 在物理方面起到支撑作用。在化学方面则是氧气等多种气体的传递、各种糖类营养物质的代谢及各种激素等信号分子的传导。所以空间结构和外部的微环境对于细胞

* 基金项目: 河北省科学院两院合作项目(20171410)。 作者简介: 程华(1977-), 副研究员, 硕士, 主要从事临床快速诊断技术研究。

的形状、增殖、分化和迁移等具有至关重要的作用^[8]。

因此如何填补单层细胞培养和生物活体间的鸿沟,为细胞提供与体内相似的支架系统,创造与体内相似的生长环境,促使细胞增殖、分化及呈现出类似体内的功能成为体外细胞培养技术迫切需要解决的难题和发展趋势^[9]。近几年,随着组织工程的发展,三维细胞培养应运而生。

1 三维细胞培养的出现

1972 年,ELSDALE 等^[10]发现细胞在含有细胞外基质的三维空间中生长时,表现出与在平面生长中不同的特性。这一发现引起了研究人员极大的兴趣,随之相关的研究逐渐展开^[11]。三维细胞培养是指将不同种类的细胞培养在不同三维结构的载体中,使细胞能够在载体的空间结构中增殖和分化,构成细胞-载体复合物^[12]。三维细胞培养作为体外单层细胞培养和体内天然生长环境的桥梁,具有传统单层细胞培养不可比拟的优势,既能创造体内细胞微环境的物质及结构基础,使得细胞在形态学、基因表达及其他生理过程中都更接近于体内的状况,同时又具有细胞培养的直观性及条件可控性的优势。

2 三维细胞培养的模式

实现三维细胞培养,目前有两种常用模式,第 1 个是细胞悬浮培养,第 2 个是三维支架培养。细胞悬浮培养是指在悬浮条件下细胞逐渐聚集,经过数天培养后形成一个直径数百微米的多细胞球状体。这种培养模式操作简单、费用低,已经被广泛应用于多种研究中。VINCI 等^[13]对 40 种不同的肿瘤细胞系(包括肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌等)进行了细胞悬浮培养,发现球状体的形成大致可以分为 3 种,即紧密的规则球形、紧凑的不太规则球形和松散的不规则球形。其中后两种类型可以通过往培养基中加入一定量的细胞外基质而改善球形结构。虽然细胞悬浮培养操作简单,但用途较为单一,不能用于细胞的迁移研究等。

三维支架培养则是将细胞培养在具有空间结构的支架上,该模式关键在于细胞空间支架的获得。这些支架在生物体内由细胞外基质构成,主要成分是细胞膜外蛋白和多糖类物质^[14]。其中蛋白主要是胶原蛋白和层粘连蛋白,多糖类物质则主要是糖胺聚糖,包括硫酸软骨素和硫酸乙酰肝素等。在体外构建和体内相同的三维支架非常困难,因为这涉及高分子合成、表面修饰、生物耦联、细胞生物学等多个学科和领域。经过多年的研究这一领域已经取得了一些进展,目前可用于制备三维支架的材料主要来自纯天然及人工合成。

其中纯天然的材料有胶原蛋白、水凝胶、层粘连蛋白及透明质酸等^[15-17]。这些材料是从植物、动物及人体组织中提取出来的,与生物体内的细胞外基质相似或完全相同,具有非常好的生物相容性,不容易引

起细胞的排异反应。但天然材料也有一些缺点,如提取困难、整体质量较难控制等。

人工合成的三维支架材料有聚苯乙烯、聚己内酯、聚乳酸和聚乙二醇等^[18-20]。这些合成材料具有良好的可塑性,生物化学及物理特性,以及高度的稳定性。但其生物相容性稍差,有可能引起细胞的排异反应。

3 三维与二维细胞培养的区别

由于培养条件等诸多因素的改变,同一种细胞在三维与二维细胞培养下,其形状、基因的表达及细胞侵袭等特性都有可能发生改变。LI 等^[21]用芯片比较了平滑肌细胞 9 600 个基因在三维及二维细胞培养的表达差异,发现至少有 77 个基因在三维细胞培养的表达水平比二维细胞培养高一倍以上。除了上述基因表达的差异外,在两种不同的培养模式下,细胞在形状、培养花费、细胞间相互作用及细胞耐药性方面都表现出了巨大的差异^[13-20]。

4 三维细胞培养在肿瘤研究中的应用

细胞培养技术在研究肿瘤发生、发展、转移、侵袭及坏死过程中的机制和分子调控行为具有重要的作用,随着三维细胞培养的出现,肿瘤(特别是实体瘤)相关研究进入一个更高的水平。因为在三维细胞培养过程中,细胞增殖趋于缓慢,氧气和营养物质的传递递减会形成一个中空的核心,这与体内的肿瘤组织非常相似。

目前在癌症研究中,三维细胞培养主要应用于肿瘤切片培养物、肿瘤芯片及单细胞或多细胞共培养的多细胞肿瘤球体等方面^[22]。肿瘤切片培养首先是组织标本的机械分离,即小的活检组织或切碎的患者组织标本被培养在细胞外基质中。KOERFER 等^[23]利用这一技术从胃癌患者的组织中剪下 400 μm 大小的标本块,在体外培养了 6 d。发现该培养技术能够很好地保存肿瘤细胞的组织形态完整性。在对该组织块进行 5 氟尿嘧啶和顺铂处理后,观察到肿瘤细胞的失活和细胞凋亡的增加。其认为三维细胞培养可用于检测药物的细胞毒性,也可用于研究细胞的耐药机制。

MAGUIRE 等^[24]对多个乳腺癌 MCF10 细胞株进行三维细胞培养,然后对基因组和转录组进行测序,发现在多个基因的拷贝数上,各个细胞株存在很大的差别。SIMON 等^[25]利用三维细胞培养来研究肺癌 A549 细胞的 3 个不同亚型对电离辐射的代谢反应。对培养在一种水凝胶中的细胞进行电离辐射,然后对氧气和营养物质的可用性进行分析。随着细胞与培养结构表面距离增加,缺氧诱导因子 1- α 水平增加、细胞增殖减少,细胞对电离辐射的敏感性降低。这些反应与实体瘤中观察到的癌细胞的特征非常相似。

STRATMANN 等^[26]利用三维培养模式来研究

肺癌 HCC827 细胞系对表皮生长因子受体抑制剂吉非替尼敏感性的变化情况,发现 HCC827 细胞中表皮生长因子受体的活性会被吉非替尼所抑制,从而导致细胞增殖的停滞及细胞凋亡的增加。该学者还研究了三维细胞培养下表皮生长因子受体信号网络中多个基因的变化情况,以及上皮-间质细胞转化过程中涉及的纤维蛋白、E-钙黏蛋白等的表达水平变化。找到了在三维模式下对肿瘤的增殖、凋亡和侵袭进行定量测定的一些指标,初步实现了定量测定。在肿瘤干细胞转化为肿瘤细胞的过程中,细胞微环境特别是细胞外基质被认为起了重要调节作用,为了探索这一过程,MA 等^[27]将胶质母细胞瘤 U251 细胞系培养在以聚苯乙烯作为基底,上面覆盖有多种黏连蛋白的三维空间骨架上。通过检测与干细胞特性相关的基因和蛋白的表达水平,发现由二维变为三维细胞培养后,一些干性标志物有增高的趋势,如层粘连蛋白结合整合素 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 有上调。这一系列试验结果表明,细胞微环境与肿瘤干细胞的干性关系紧密。

5 三维细胞培养在药物筛选中的应用

在候选药物的初始筛选阶段,利用体外试验来研究药物对细胞的作用是一种被广泛接受的方法。其主要目的是检测药物对靶细胞造成的损伤程度及其安全性。候选药物在靶细胞中造成的损伤程度可以指示其治疗价值,而安全性测试提供了可能的副作用和一些不可预测的结果。由于在三维细胞培养下细胞在形态学、基因表达及其他生理过程中都更接近于体内的状况,所以利用三维细胞培养进行药物的筛选其效率将大大提高。

MARINHO 等^[28]对大鼠原代肝细胞进行三维细胞培养来研究奈韦拉平及其代谢物对 PON1 酶的作用。发现在三维细胞培养下,该药物可以增强内脂酶、对氧磷脂酶及芳基脂酶的功能。LABONIA 等^[29]使用 3D 打印的微流控装置来进行三维细胞培养,用以研究伊立替康及其活性代谢物 SN-38 在实体肿瘤中渗透及代谢途径,而这一过程用二维细胞培养是无法做到的。LV 等^[30]使用三维胶原蛋白骨架来培养神经胶质瘤细胞,发现肿瘤干细胞的数量增加,同时细胞 O6 甲基鸟嘌呤脱氧核糖核酸甲基转移酶(O6-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)表达水平上升及对烷化类化疗药物的耐药性增加。其中耐药性的表现与肿瘤患者的状况十分接近,表明三维细胞培养用于抗神经胶质瘤药物的筛选时,效果更好。

BRESLIN 等^[31]研究了 BT474、HCC1954 及 EFM192A 的 3 种不同 Her-2 阳性乳腺癌细胞系在三维细胞培养条件下对来那替尼的反应、代谢及耐药性。为了提高三维细胞培养条件下的药物筛选速度,研究人员进行了一系列的改进。结果发现与二维细胞培养比较,三维细胞培养的细胞存活及转移相关蛋白如 CYP3A4

等表达均有不同的升高,考虑这些变化可能导致细胞对来那替尼的耐药性增强了。EICHLER 等^[32]发明了一种三维细胞培养与电阻检测相结合的办法,来筛选抗肿瘤药物。具体过程是先将神经母细胞瘤 SHSY5Y 细胞培养在 150~250 μm 的三维骨架中,再将细胞团转移到含有候选药物的培养基中,特定时间点取出进行多个指标的检测。该筛选方法非常高效,每天可检测 800 个细胞团。

RASHEENA 等^[33]分别用 Matrigel、Cultrex 及 Alvetex 3 种不同的三维细胞骨架进行前列腺癌 LNCaP 和 DU145 细胞系的培养,以检测两种细胞系对多烯紫杉醇和雷帕霉素的敏感性及耐药性。结果显示两种细胞在 3 个不同的三维细胞培养条件中的生长速率各不相同,耐药性也不一致。DU145 中表皮生长因子受体的表达与雷帕霉素的耐药性呈负相关,LNCaP 中则是 p53 蛋白二聚体的表达与多烯紫杉醇的耐药性呈正相关。这些结果表明,目前三维细胞培养对细胞的行为具有非常大的影响,为了保证数据的可靠性和准确性,应尽快建立统一的三维细胞培养标准。

6 结语与展望

三维细胞培养作为体外单层细胞培养与体内研究的桥梁,具有细胞培养的直观性及条件可控性的优势,同时能最大程度地模拟体内细胞微环境。这些优点使得三维细胞培养迅速被应用于生命科学、肿瘤机制研究及药物筛选,但该技术仍然有许多不足的地方,包括标准不统一、使用成本较高、细胞观察不便等。相信随着相关技术的发展,这些问题将逐步被解决,三维细胞培养将获得更为广泛的应用。

参考文献

- [1] SANYAL S. Culture and assay systems used for 3D cell culture[J]. Corning, 2014, 9: 1-18.
- [2] MASTERS J R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 315-319.
- [3] FANG Y, EGLIN R M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development [J]. SLAS Discov, 2017, 22(5): 456-472.
- [4] JAROCH K, JAROCH A, BOJKO B. Cell cultures in drug discovery and development: the need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018(147): 297-312.
- [5] TIMONEY C F, FELDER R A. A collaborative approach to creating an automated cell culture system[J]. JALA, 2002, 7(1): 55-58.
- [6] VEMULA S V, SAYEDAHMED E E, SAMBHARA S, et al. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses[J]. Expert Rev Vaccines, 2017, 16(11): 1141-1154.

- [7] HOEKSEMA F, KARPILOW J, LUITJENS A, et al. Enhancing viral vaccine production using engineered knock-out vero cell lines—a second look[J]. *Vaccine*, 2018, 36(16):2093-2103.
- [8] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1423-1437.
- [9] PAMPALONI F, REYNAUD E G, STELZER E H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10):839-845.
- [10] ELSDALE T, BARD J. Collagen substrata for studies on cell behavior[J]. *J Cell Biol*, 1972, 54(3):626-637.
- [11] VOYTIK-HARBIN S L. Three-dimensional extracellular matrix substrates for culture [J]. *Methods Cell Biol*, 2001, 63:561-581.
- [12] ALAVI A, STUPACK D G. Cell survival in a three-dimensional matrix[J]. *Methods Enzymol*, 2007, 426:85-101.
- [13] VINCI M, GOWAN S, BOXALL F, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation[J]. *BMC Biol*, 2012, 10:29-50.
- [14] MINER J H. Laminins and their roles in mammals[J]. *Microsc Res Tech*, 2008, 71(5):349-356.
- [15] SHEPHERD J N, PARKER S T, SHEPHERD R F, et al. 3D microperiodic hydrogel scaffolds for robust neuronal cultures[J]. *Adv Funct Mater*, 2011, 21(1):47-54.
- [16] WORTHINGTON P, POCAN D J, LANGHANS S A. Peptide hydrogels—versatile matrices for 3D cell culture in cancer medicine[J]. *Front Oncol*, 2015, 5:92-101.
- [17] JAMAL M, BASSIK N, CHO J H, et al. Directed growth of fibroblasts into three dimensional micropatterned geometries via self-assembling scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(7):1683-1690.
- [18] ONG S M, ZQ Z, AROOZ T, et al. Engineering a scaffold free 3D tumor model for in vitro drug penetration studies [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(6):1180-1190.
- [19] KIM J A, CHOI J H, KIM M, et al. High-throughput Generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(34):8555-8563.
- [20] CHAI Y W, LEE E H, GUBBE J D, et al. 3D cell culture in a self-assembled nanofiber environment [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9):853-873.
- [21] LI S, LAO J, CHEN B, et al. Genomic analysis of smooth muscle cells in 3-dimensional collagen matrix [J]. *FASEB J*, 2003, 17(1):97-109.
- [22] KNIGHT E, PRZYBORSKI S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro [J]. *J Anat*, 2015, 227(6):746-756.
- [23] KOERFER J, KALLENDRUSCH S, MERZ F A, et al. Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(7):1444-1453.
- [24] MAGUIRE S L, PECK B, WAI P T, et al. Three dimensional modelling identifies novel genetic dependencies associated with breast cancer progression in the isogenic MCF10 model [J]. *J Pathol*, 2016, 240:315-328.
- [25] SIMON K A, MOSADEGH B, MINN K T, et al. Metabolic response of lung cancer cells to radiation in a paper-based 3D cell culture system [J]. *Biomaterials*, 2016, 95:47-59.
- [26] STRATMANN A T, FECHER D, WANGORSCH G, et al. Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model [J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2):351-365.
- [27] MA N K, LIM J K, LEONG M F, et al. Collaboration of 3D context and extracellular matrix in the development of glioma stemness in a 3D model [J]. *Biomaterials*, 2016, 78:62-73.
- [28] MARINHO A T, DIAS C G, PINHEIRO P F, et al. Nevirapine modulation of paraoxonase-1 in the liver: an in vitro three-model approach [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 82:147-153.
- [29] LABONIA G J, LOCKWOOD S Y, HELLER A A, et al. Drug penetration and metabolism in 3-dimensional cell cultures treated in a 3D printed fluidic device: assessment of irinotecan via MALDI imaging mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2016, 6(11):1814-1821.
- [30] LV D L, YU S C, PING Y F, et al. A three dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti glioma therapeutics [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35):56904-56914.
- [31] BRESLIN S, O'DRISCOLL L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29):45745-45756.
- [32] EICHLER M, JAHNKE H G, KRINKE D, et al. A novel 96-well multielectrode array based impedimetric monitoring platform for comparative drug efficacy analysis on 2D and 3D brain tumor cultures [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 67:582-589.
- [33] RASHEENA E, ADCOCK A F, YANG L. Influence of matrices on 3d-cultured prostate cancer cells' drug response express drug-action-associated proteins [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6):e0158116.