

模拟微重力条件下 WB-F344 细胞的三维培养 Three-dimensional Spheroid Model for Cultivating WB-F344 Cells in Simulated Microgravity

曲鑫建^{1,2} 李惠侠¹ 孙世铎^{1*} 丰美福^{2*}

QU Xin-Jian^{1,2}, LI Hui-Xia¹, SUN Shi-Duo^{1*} and FENG Mei-Fu^{2*}

1 西北农林科技大学动物科技学院 杨凌 712100

2 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物国家重点工程实验室 北京 100080

1 Animal Science Department of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

2 State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要 与传统的单层平面培养相比,细胞三维培养可更好地模拟生物体内细胞的生长状态和微环境。以 Cytodex-3 微载体为支持物,利用旋转式细胞培养系统(RCCS)模拟微重力条件,悬浮培养法构建大鼠 WB-F344 细胞微重力三维培养模型。并通过细胞计数、光学显微镜、透射电镜、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和流式细胞术等方法分析了细胞增殖、显微结构、粘附分子及钙粘蛋白(E-cadherin)表达情况。结果表明,模拟微重力三维培养条件下 WB-F344 细胞增殖块,呈紧密多层排列、可见丰富的微绒毛和线粒体、胞间有桥粒和紧密连接形成,细胞粘着力加强、表现出良好的三维生长特征;与静置三维培养相比,纤粘蛋白(Fn)mRNA 表达呈上调趋势,细胞内 E-cadherin 表达量增加,这可能是微重力效应下细胞粘附力增强的部分机制。该培养体系可能有利于细胞之间、细胞与胞外基质之间相互作用及其作用机制的研究。

关键词 模拟微重力条件, WB-F344 细胞, 三维培养

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0672-05

Abstract Three-dimensional (3D) culture of cells could closely mimic the *in vivo* situation with regard to cell function and microenvironment compared with plane monolayer cultured cells. In this paper, we established 3D culture of rat WB-F344 cells with rotary cell culture system (RCCS) to simulate microgravity environment, and examined cells proliferation, morphology, microstructure, E-cadherin protein quantity and mRNA expression of adhesion molecules by count the number of cells, optical microscope, transmission electron microscope and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results demonstrated that cells were polyhedron with lots of micovilli and mitochondria, which grow well and packed together densely to form irregular aggregates. Adjacent cells were connected with desmosome and tight junction. With the regard, the aggregates behaved 3D growth characteristics. Moreover, compared with control, mRNA level of Fibronectin and E-cadherin protein were increased, the changes maybe is the part mechanism in this microgravity simulated cells culture models which strengthened cells junction. This rotating 3D model might facilitate the study of interactions of cell-cell, cell-matrix and the mechanisms.

Key words simulate microgravity, WB-F344 cells, three-dimensional culture cell

Received: March 23, 2006; Accepted: April 17, 2006.

This work was supported by the grant from the Foundation of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-SW-322).

* Corresponding author. 孙世铎: ssdsm@tom.com; 丰美福: fengmf@ioz.ac.cn

中国科学院基金项目资助 (No. KSCX2-SW-322)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

目前,肝脏疾病仍占疾病发病率与死亡率的前位,但由于可供移植的肝脏组织缺乏,使肝脏疾病的治疗无法有效开展,因而寻找新的体外培养体系,构建有功能的肝组织替代物变得尤为重要。旋转式细胞培养系统(RCM,简称RCCS)发明于Johnson航天中心,最初是为保护在宇航中进行的纤细的组织培养而设计的。然而,它的低剪切力、高物质传递效率和微重力的独特环境,使我们在普通实验室的组织培养箱内也能生长出三维细胞组织^[1]。结合近年来细胞三维培养方法的研究进展,证实三维细胞培养不仅能显著改善离体细胞的生长状况,并且使在普通培养条件下只能二维贴壁生长的细胞表现出三维空间生长,这类细胞团可进一步形成有功能的组织^[2]。这一技术的建立为临床医学等领域提供了良好的实验模型,同时可望利用离体细胞人工构建有功能的组织。

鉴于RCCS在组织工程中的应用,本实验采用RCCS,以Cytodex-3微载体为支持物对WB-F344细胞进行旋转三维培养,分析模拟微重力条件下细胞连接、细胞内部显微结构及细胞粘附分子表达情况,旨在为肝组织工程及临床应用建立理想的体外细胞模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

WB-F344细胞株由中国医学科学院药理研究所赠送,旋转式细胞培养系统(RCCS,Synthecon,Inc美国);Cytodex-3微载体购自Sigma公司,基础培养基DMEM、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(Trypsin)、碘化丙啶(PI)均为Gibco公司产品;2.5%戊二醛、Epon812包埋试剂盒(SPI-Chem USA),RNase购自Sigma,Trizol试剂盒(Cat.No.:15596)购自LIFE TECHNOLOGIES,PE标记E-cadherin单抗为Santa Cruz公司产品;PCR引物由上海博亚生物公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 WB-F344细胞培养

WB-F344细胞接种于培养瓶中,用含10%胎牛血清DMEM培养液在5%CO₂细胞培养箱内进行平面常规培养,第3天用胰蛋白酶消化收获细胞,以 1×10^6 与1mg/mL Cytodex-3微载体混合接种培养瓶,用含10%FBS的DMEM培养液灌满回转瓶,排气泡并用胶塞塞紧瓶口,密封。将细胞培养瓶固定在回转器上,置于37℃恒温孵箱内进行水平轴回转。回转器以20r/min水平轴旋转,保证细胞和微载

体呈悬浮状态。以静置三维培养作对照(Cytodex-3为支持物)。

1.3 细胞生长曲线绘制

细胞接种后1~8d,每天取细胞-微载体复合物1mL胰蛋白酶消化细胞后,计数板测定细胞数,同时台盼蓝染色观察细胞存活状况。

1.4 光镜下观察细胞形态

WB-F344细胞三维培养2d后,倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂)下观察细胞-微载体所形成的复合物,并拍照。

1.5 透射电子显微镜观察

收集培养7d的细胞,PBS洗涤细胞3次(每次5min),2.5%戊二醛室温固定1~2h,PBS洗涤3次;1%锇酸室温固定1~2h,PBS洗2次;用30%,50%,70%,80%,90%,100%乙醇系列脱水各20min,重复1次100%乙醇脱水20min;进行环氧树脂包埋、切片,透射电镜(JEM-1230,日本)观察及照相。

1.6 RT-PCR反应

收集细胞,用Trizol核酸提取试剂盒提取各组细胞中总RNA,紫外分光光度计测定RNA纯度和浓度。采用M-MLVReverse Transcriptase试剂盒进行反转录。取2 μ L总RNA逆转录合成cDNA,再取逆转录产物2 μ L进行PCR扩增。PCR反应条件:94℃预变性1min,按热循环参数94℃变性30s,退火1min,72℃延伸1min,35个循环,终末延伸10min。引物序列及长度和最佳退火温度见表1。PCR产物经1%琼脂糖(含0.5 μ g/mL EB)电泳,紫外透射仪观察拍照。

1.7 流式细胞术检测 E-cadherin 表达

收集培养7d的细胞,PBS洗2次,少量PBS重悬使细胞密度为 1×10^6 /mL,加入荧光染料标记的单抗后37℃温箱孵育20~30min,孵育完成后以冰PBS洗2次,500目筛网过滤后上机检测。

2 结果

2.1 细胞形态及显微结构变化

相差显微镜下观察,微载体Cytodex-3呈圆球状(图1A),WB-F344细胞粘附在Cytodex-3载体表面,通过细胞的连接使微载体相互接近。培养3d后进行比较,静置三维培养组微载体连接松散,表面粘着的细胞较少(图1B)。旋转三维培养组细胞粘着紧密,呈现三维立体排列方式,细胞密集,细胞之间相互连接牢固,并附着于载体表面(图1C)。

表 1 RT-PCR 引物序列及长度和最佳退火温度

Table 1 The primers' sequence, optimize Tap and length of RT-PCR

Gene name	Sequence	Optimize tap	Length
β -actin M	Sense : 5' CCCCTGGATATGCTCTTGTT 3' Anti : 5' GTGGCAGGATTATGGCTCAC 3'	56.0°C	443bp
Fn	Sense : 5' CCCGTGCTCCTTCCAT 3' Anti : 5' CCGTCCCACTGCTGATTT 3'	57.4°C	331bp
Integrin β 1	Sense : 5' GACGAAAGTGTCTAACAT 3' Anti : 5' CTGAAGGACCACCTC 3'	45.8°C	146bp
Integrin β 4	Sense : 5' CTATGAGGCTGATGGTGC 3' Anti : 5' GATGGGTAGTCTGGGTC 3'	52.2°C	114bp
Integrin α 1	Sense : 5' CGAAGTTGGCTTTATTTGTCC 3' Anti : 5' TGTGGTCTCCGAGGGTGT 3'	55.6°C	226bp
Integrin α 5	Sense : 5' CCACGGCTCCTCCATCTT 3' Anti : 5' GGTGAACCTCGGCACTGAA 3'	54.8°C	199bp

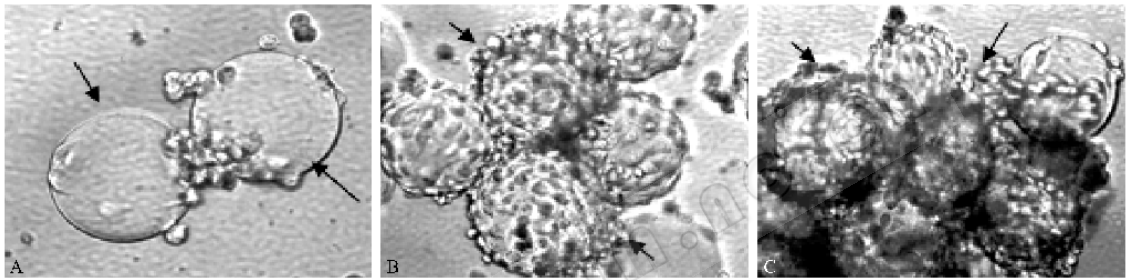


图 1 Cytodex-3 微载体支持下 WB-F344 细胞三维培养光学显微镜观察形态

Fig.1 The optical microscope figure of WB-F344 cells with Cytodex-3

A : cytodex-3 ($\times 140$); B : fixed 3D cultured cells ($\times 140$); C : rotating 3D cultured cells ($\times 140$).

透射电镜下旋转三维培养的细胞排列为数层, 其间微绒毛 (Mv) 丰富突出; 细胞呈多边形, 胞间有宽约 $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$ 间隙, 核膜完整, 细胞核 (Nu) 大且不

规则, 线粒体 (Mi) 及粗面内质网丰富, 可见细胞连接 (Tj) (图 2B, 2C)。静置三维培养细胞间有少量微绒毛 (MV) 突出于间隙 (图 2A)。

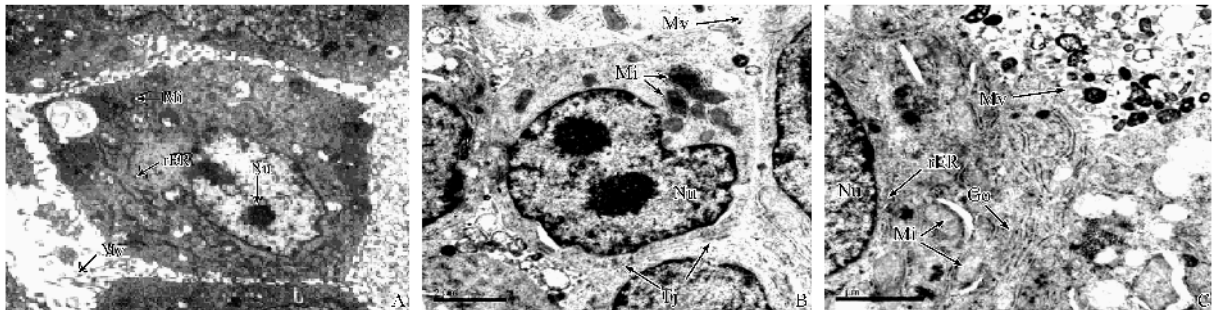


图 2 WB-F344 细胞透射电镜图

Fig.2 The transmission electron microscope figure of the WB-F344 cells

A : fixed 3D cultured cells ($\times 4500$); B, C : rotating 3D cultured cells ($\times 12000$).

2.2 细胞生长及功能检测结果

2.2.1 细胞增殖检测结果

旋转三维组生长曲线高于静置培养组, 其平台期出现时间在 $4 \sim 6\text{d}$, 滞后于静置三维组。台盼蓝染色鉴定, 两种条件下细胞存

活率均在 92% 以上, 极少数细胞发生凋亡或坏死, 说明模拟微重力条件下 WB-F344 细胞增殖快 (图 3)。

2.2.2 细胞粘附分子 mRNA 及蛋白表达检测结果:

图 4 说明, 旋转三维培养细胞各粘附分子如纤粘连蛋白(Fn)、整合素-β1(integrin-β1)、整合素-β4(integrin-β4)、整合素-α1(integrin-α1)和整合素-α5(integrin-α5)mRNA 均可表达, 与静置三维培养细胞粘附分子表达模式基本一致, 其中 Fn 的表达有上调趋势, 可能是因为模拟微重力三维条件下, 细胞呈悬浮生长, 有较多的生长空间, 从而使 Fn 的表达增加。

E-cadherin 是一类依赖钙的跨膜细胞粘附分子, 在细胞间的连接, 维持组织形态及导致组织分化等方面起重要作用。通过流式细胞术在蛋白水平上检测 E-cadherin 的表达, 结果旋转培养细胞 E-cadherin 的表达为 70.96%, 比静置三维培养细胞增加了 8.15%, 如图 5 所示。

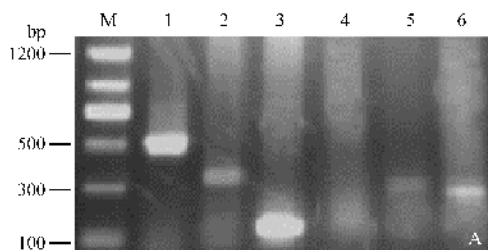


图 4 WB-F344 细胞粘附分子相关基因的 RT-PCR 分析

Fig.4 RT-PCR analysis of the relative genes of the adhesion molecules of the WB-F344 cells

M : marker ; 1 β-actin ; 2 Fn ; 3 integrin-β1 ; 4 integrin-β4 ; 5 integrin-α1 ; 6 integrin-α5

A : fixed 3D cultured cells ; B : rotating 3D cultured cells.

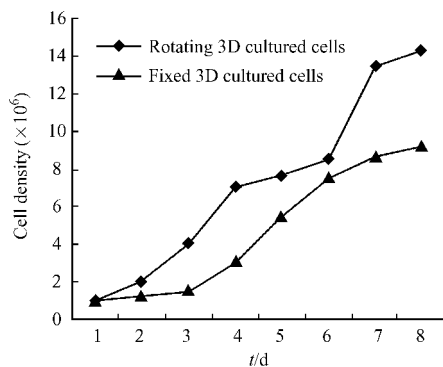


图 3 WB-F344 细胞三维培养生长曲线

Fig.3 Growth curve of 3D cultured WB-F344 cells

型细胞及组织培养装置^[5]。模拟微重力培养环境与

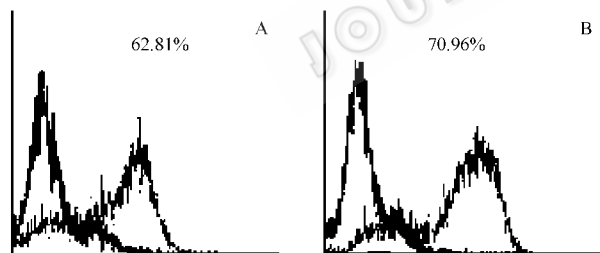
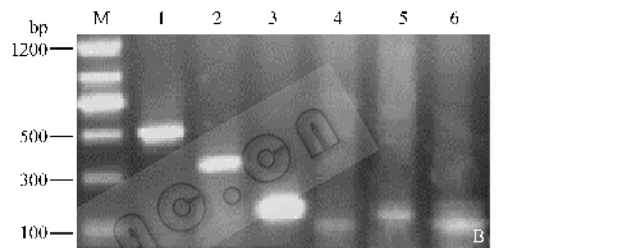


图 5 WB-F344 细胞 E-cadherin 表达量

Fig.5 The expression of E-cadherin protein in WB-F344 cells

A : fixed 3D cultured cells ; B : rotating 3D cultured cells.

3 讨论

细胞三维培养方法有多种, 如搅拌瓶培养技术、液体叠盖技术、中空纤维培养技术、放射流生物反应器技术等。虽然这些技术各有利弊, 但它们的共同原理是提供一个使细胞间粘附力大于细胞与贴附界面间粘附力的条件, 培养一段时间后细胞将形成类似体内细胞三维结构, 以便于体外研究^[3,4]。RCCS 是 1992 年美国国家航空和航天管理局(NASA)为在地面模拟微重力条件下细胞的生长而开发的一种新

其他三维培养相比可减少培养液对细胞产生的机械剪切、增加细胞营养的补充、加速代谢产物的排除, 使在悬浮的三维环境中生长和设计无应力条件下生长的细胞不再因为密度和压力而分层, 可以处于不同平面, 相互作用, 易于接触、聚集、迁移, 更易形成三维空间结构。目前已开展了多种细胞和组织微重力条件下的三维培养, 并取得了一定的研究成果。Freed 等^[6]利用 RCCS 提供的微重力条件, 将心肌细胞与生物可降解高分子支架材料(Scaffolds)共同培养, 已取得了具有功能的心肌细胞束。软骨细胞微重力三维培养也取得了重大进展, 有望用于软骨损伤的修复^[7], Yoffe 等^[8]应用 RCCS 对人肝细胞进行长期三维培养, 可形成 3cm 长的肝组织样结构并能维持基本代谢功能。Khaoustov 等^[9]在模拟微重力条件下, 以可降解生物材料作为支架对人肝细胞进行三维培养, 同样可形成肝组织样结构, 同时形成了胆管样结构和血管样结构。本实验室于 2001 年以 Cytodex-3 微载体, 进行了人肝癌细胞常规静置三维培养的研究, 发现人肝癌细胞在 Cytodex-3 的支持下呈现明显的三维生长特性^[10]。因此, 我们采用

Cytodex-3 微载体为支持物在 RCCS 中对 WB-F344 细胞进行体外三维培养, 构建微重力效应条件下细胞三维培养模型, 并检测了细胞内部的显微结构及各种粘附分子的表达, 期望为肝细胞移植及作为生物型人工肝的“种子”细胞来源及发生机制等问题提供一定的理论基础。结果显示, 模拟微重力三维培养的细胞间局部胞膜突起, 相互密切接触, 有桥粒连接形成。细胞间隙宽约 $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$, 并有丰富的微绒毛突出其中, 细胞生长状态良好。三维结构形成后 92% 以上的细胞存活, 极少数细胞发生凋亡或坏死。表明微重力环境下有利于胞外基质的积累和细胞之间发生相互作用, 克服了单层细胞培养受重力及生长空间限制, 细胞易发生接触抑制等缺点, 可以作为一种良好的细胞模型。

细胞与细胞间的粘附是由特定的细胞粘着因子粘钙素等介导的, 细胞之间的锚定连接需要粘着因子-粘钙素和整连蛋白等参与。三维生长使细胞间的接触增多, 粘附分子的表达也可能随之发生改变。因此, 在构建了微重力三维培养细胞模型后, 我们通过 RT-PCR 技术检测了细胞粘附分子纤粘连蛋白 (Fn) 整合素- $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 5$ 的 mRNA 表达情况。结果发现, 微重力三维培养细胞 7d 后各种粘附分子 mRNA 均能表达, 其中纤粘连蛋白 mRNA 水平与静置三维培养相比呈上升趋势, 蛋白水平的 E-cadherin 表达增加了 8.15%, 说明细胞与细胞间的连接增加、粘附增强。

总之, 在 RCCS 内模拟微重力条件使细胞所受剪切力极低、细胞之间三维联系的机会增加, 所培养的细胞生长状态良好, 各粘附分子表达正常。该培养模型适用于研究肝细胞间的相互作用、肝细胞移

植、生物型人工肝及其发生机制等的研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA. Culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: application of simulated microgravity. *J Tissue Cult Methods*, 1992, **14**(2): 51 - 57
- [2] Dabos KJ, Nelson LJ, Bradnock TJ *et al.* The simulated microgravity environment maintains key metabolic functions and promotes aggregation of primary porcine hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*, 2001, **1526**(2): 119 - 130
- [3] Spaulding GF, Jessup JM, Goodwin TJ. Advances in cellular construction. *J Cell Biochem*, 1993, **51**(3): 249 - 251
- [4] Hammond TG, Hammond JM. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, **281**(1): F12 - 25
- [5] Jessup JM, Goodwin TJ, Spaulding G. Prospects for use of microgravity-based bioreactors to study three-dimensional host-tumor interactions in human neoplasia. *J Cell Biochem*, 1993, **51**(3): 290 - 300
- [6] Freed LE, Langer R, Martin I *et al.* Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(25): 13885 - 13890
- [7] Song KD (宋克东), Liu TQ (刘天庆), Li XQ (李香琴) *et al.* Three-dimensional fabrication of engineered bone in rotating wall vessel bioreactor. *Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展)* 2004, **31**(11): 996 - 1005
- [8] Yoffe B, Darlington GJ, Soriano HE *et al.* Cultures of human liver cells in simulated microgravity environment. *Adv Space Res*, 1999, **24**(6): 829 - 836
- [9] Khaoustov VI, Darlington GJ, Soriano HE *et al.* Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, **35**(9): 501 - 509
- [10] Zhang JM (张建民), Wang HF (王宏芳), Feng MF (丰美福). Three-dimensional spheroid model for cultivate hepatoma carcinoma cells on Microcarriers. *Chinese Science Bulletin (科学通报)*, 2001, **46**(10): 827 - 832