

聚苯乙烯薄膜三维培养肝细胞的实验研究

杨波, 任杰, 龚翠

(上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 采用三维聚苯乙烯薄膜作为细胞培养支架,在体外进行大鼠肝细胞的三维培养,并与常规二维肝细胞培养进行比较.分析了细胞的生长状态及肝细胞功能,包括细胞存活率、白蛋白分泌功能、尿素合成功能及葡萄糖消耗功能.结果显示:三维细胞增殖活力均始终明显高于二维;在显微镜下观察,可看到三维支架表面黏附生长的肝细胞逐渐增多,有肝细胞黏附成团,且肝细胞保持着良好的形态学结构.研究表明,三维培养的肝细胞其增殖生长和代谢功能都优于同样条件下的二维培养,三维聚苯乙烯薄膜可以作为体外肝细胞培养支架,在生物人工肝培养体系中具有应用前景.

关键词: 聚苯乙烯薄膜; 三维培养; 二维培养; 肝细胞

中图分类号: Q 813

文献标志码: A

Experimental Study on Three-dimensional Cell Culture in a Polystyrene Film

YANG Bo, REN Jie, GONG Cui

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: A three-dimensional polystyrene film was used to culture cell in vitro scaffolds, and the results were compared with those of the conventional two-dimensional liver cell culture. The proliferation and metabolism functions were analyzed, including the cell survival rate, albumin secretion, urea synthesis function and glucose consumption function. The results show that the three-dimensional cell proliferation activity is significantly higher than that of the two-dimensional and the gradually increased growth of the three-dimensional scaffold surface adhesion of liver cells and the formation of liver cell adhesion can be observed by biological microscope. The studies also show that the three-dimensional liver cells proliferation and metabolism functions are superior to the two-dimensional functions in the same conditions. The three-dimensional polystyrene film can be used as scaffolds of liver cell culture in vitro, and has good application prospect in the vitro cultivation system of biological artificial liver.

Keywords: polystyrene film; three-dimensional culture; two-dimensional culture; hepatocytes

细胞在体外的生长增殖、分化和代谢功能的表达,对细胞培养而言特别重要,高密度细胞培养是体外形成组织或器官的基础.细胞在二维(2D)平面的培养模式下生长,目前大部分实验研究都基于此,尽管这种培养方式操作方便,但是与细胞在体内的生长模式相差甚远.在二维环境下培养的细胞并不总是按照实际情况生长运作,有时细胞不得不改变形态以适应二维的培养条件,最终导致细胞形成扁平的细胞形态,而这些改变影响细胞的生长分化并削弱细胞功能,因此影响最终的实验研究效果^[1-4].三维支架(Alvetex-3D)细胞培养模型作为一种新型的细胞培养模式,在体外构建与体内相近的细胞微环境,更好地模拟了细胞生长的微环境,维持细胞发育结构系统,有助于我们了解细胞体内复杂的生物现象.因此,三维细胞培养既能保留体内细胞微环境的物质基础,又能体现细胞培养的直观性及条件可控性,把这种技术通过体外培养与动物模型结合起来,能形成一种方便高效的研究体系,为研究组织的形成及药物的筛选等方面提供重要的平台,并为研究提供更准确的数据.

本研究采用聚苯乙烯薄膜作为细胞培养三维支架,通过模拟细胞在天然组织中的复杂环境和状态,可以获得更准确的细胞行为功能.相比于二维培养结果,在三维支架中细胞能保持天然的三维结构,自由地与相邻细胞联系,细胞在体外生长更接近体内环境.实验评估并比较了在传统二维培养与三维系统培养下肝细胞的生长增殖和功能代谢的情况.本实验研究肝细胞的三维培养可以为生物人工肝体外构建人工肝组织,进而为肝移植提供供体.

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肝细胞购于上海细胞生物研究所. Me_2SO (无菌,二甲基亚砷)、胎牛血清、1640 培养液、葡萄糖、试剂盒等购于上海索莱宝生物科技有限公司. 三维支架购于上海普飞生物科技有限公司.

1.2 实验仪器

实验所采用的仪器:电子天秤(Sartorius BP 211D,德国)、二氧化碳培养箱(HH.CP-01W,上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、立式压力蒸汽灭菌器(Tommy 有限公司,日本)、显微镜(ECLIPSE 55i,日本 Nikon)、酶标仪(LRM340M,北京博迈杰科技有限公司)、场发射环境扫描电子显微镜(Quanta

FEG,FEI 公司,美国).

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠肝细胞的 Alvetex-3D 培养

首先,进行 Alvetex-3D 的前处理:

a. 取出载体,打开独立包装,用镊子小心地取出细胞小室;

b. 将小室装入 6 孔培养板中,每孔大约需要 70% 的乙醇溶液 5 ml,浸泡润洗数分钟;

c. 吸出乙醇,用 1 640 培养液润洗两遍,彻底洗去乙醇,泡在培养液内,置于培养箱中备用.

然后,进行细胞的接种培养:

a. 吸去 6 孔板内的培养液,小心地将原代大鼠肝细胞以每孔约 3×10^5 个细胞的密度接种于细胞小室的圆片中央;

b. 盖上盖子,将培养板置于培养箱内孵育 60~90 min,让细胞与支架充分结合;

c. 沿着细胞小室边缘缓慢加入 6 ml 培养液(胎牛血清和 1 640 培养液的配比为 1:9),盖上盖子,将培养板置于二氧化碳培养箱(37 °C, 5% CO_2 , 100% 湿度)中;

d. 密切关注培养液的状况,液体颜色变为淡红色甚至黄色则需换液,一般培养的前 4 d 可隔天进行一次换液,继续培养则需每天观察并换液.

1.3.2 大鼠肝细胞的二维培养

由于二维培养是平面培养,细胞直接接种于 6 孔板中.在超净台上,将分离的肝细胞按每孔约 3×10^5 个细胞的密度接种于培养板孔中,加入 6 ml 培养液,置培养板于二氧化碳培养箱(37 °C, 5% CO_2 , 100% 湿度)中.培养并隔天进行换液与观察.

1.3.3 电镜的形态学观察

为了清晰反映聚苯乙烯的三维结构,需要利用电镜进行观察,具体步骤如下.

a. 取材:小心用镊子取 0.5 cm^3 左右的三维支架样本,放入样品管内.

b. 固定:样本加入浓度为 2.5% 的戊二醛,在 4 °C 冰箱内放置 2 h 以上;用 pH7.4 的磷酸缓冲液洗 3 次,每次 30 min 左右;再用 4 °C 预冷的浓度为 1% 的锇酸固定 1.5 h,然后用缓冲溶液(PBS)浸洗 2 次,每次 10 min.

c. 脱水:用配比为 1:1 的丙酮、醋酸异戊酯混合液脱水处理 10 min;再分别用 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 的酒精溶液脱水,每种浓度脱水 2 次,每次 15 min.

d. 干燥:将待测样品置于临界点干燥器内,浸

泡在液态二氧化碳中,加热至临界点温度(31.40℃,72.8个大气压)以上,使之干燥.

f. 喷金:喷镀均匀后扫描电镜下观察.

1.3.4 细胞增殖活力(MTT)值的测定

分别在培养0,2,4,6,8,10 d时对细胞的MTT值进行测定,使用MTT试剂盒在酶标仪中进行测定.

1.3.5 肝细胞的代谢功能

白蛋白、葡萄糖和尿素的代谢指标是肝细胞代谢活动的常规指标.以溴甲酚绿法、二乙酰-肼显色法、葡萄糖氧化酶法用试剂盒在酶标仪中测定白蛋白、尿素和葡萄糖的含量.

1.3.6 数据处理

最后,采用excel数据作单向方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并通过三维软件CAXA进行三维建模分析.

2 结果与分析

2.1 三维支架

聚苯乙烯三维支架载体被截成200 μm 厚的薄

片,做成了适合常规细胞培养板的形式^[5-6],如图1(a)所示.本实验使用的是适配6孔板的三维支架,电镜观察下呈疏松多孔状,成孔率在90%以上^[7-8],细胞可以黏附在空隙中进行生长分化,见图1(b).这种特殊的结构设计为体外培养细胞创造了更类似体内的微环境,并且支架的化学成分和标准细胞培养板相同,可以建立二维与三维培养模式的直接比较.

2.2 肝细胞的生长情况

扫描电镜显示肝细胞在二维和三维培养条件下有显著不同的外观.在二维培养条件下,细胞很快在表面拉伸生长,形成表面扁平的结构,如图2(a)所示.在三维聚苯乙烯支架中,细胞快速增长,并在支架孔隙中扩展,7 d后,由于三维环境可以使细胞与相邻细胞交互孵化生长,因此细胞很快相互聚集成球体,如图2(b)所示.结果表明,三维培养可以充分利用材料,使材料表面积最大化.相比二维表面细胞,在三维聚苯乙烯支架中培养的肝细胞,可以保持高水平的细胞生存能力,拥有立体的细胞形态.

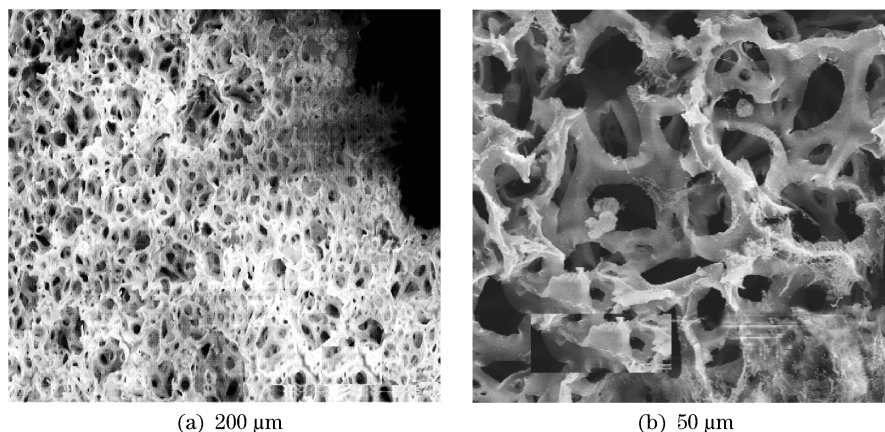


图1 扫描电镜下的 Alvetex-3D 结构

Fig.1 Structure of Alvetex-3D in scanning electron micrograph

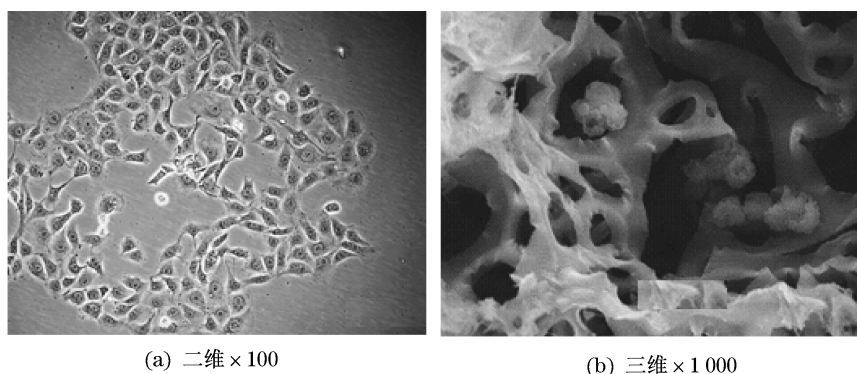


图2 肝细胞在二维平面和三维支架上的生长情况

Fig.2 Hepatocytes' growth on 2D substrates and 3D scaffolds

图 3 是肝细胞在二维表面和三维聚苯乙烯支架上的生长状态,采用三维图像重建.由文献[9]可知,细胞在二维表面生长时,为适应平面的形态,细胞需保持扁平状态,单个细胞的平均宽度是 $46.7 \mu\text{m} (\pm 9.2 \mu\text{m})$,高度是 $7.3 \mu\text{m} (\pm 4.2 \mu\text{m})$;而当细胞在聚苯乙烯支架中生长,由于支架更接近体内生长环境,细胞的平均宽度是 $14.7 \mu\text{m} (\pm 4.1 \mu\text{m})$,高度是 $23.3 \mu\text{m} (\pm 8.1 \mu\text{m})$.细胞在二维表面生长时,受到空间的限制,只能在水平区域 X, Y 轴方向尽量伸展,因此二维生长宽度是三维的近 3 倍;同时,细胞尽可能压缩竖直方向 Z 轴的生长,因此二维生长高

度仅为三维的近 1/3.在三维支架上,细胞生长更加立体,可以沿竖直方向 Z 轴生长.

2.3 三维培养的大鼠肝细胞

使用倒置相差显微镜,观察肝细胞接种入支架后的效果.显微镜可观察到支架孔隙内充满密集的细胞,因支架透光性差,在相差显微镜下不易观察到细胞.如图 4 所示,在细胞培养 2 d 和 8 d 后,对细胞进行拍照,图中用箭头指出了几处黏附生长的细胞.可观察到三维支架中的细胞多聚集生长,由于支架特殊的疏松结构,细胞生长空间大,几乎无悬浮的死细胞.

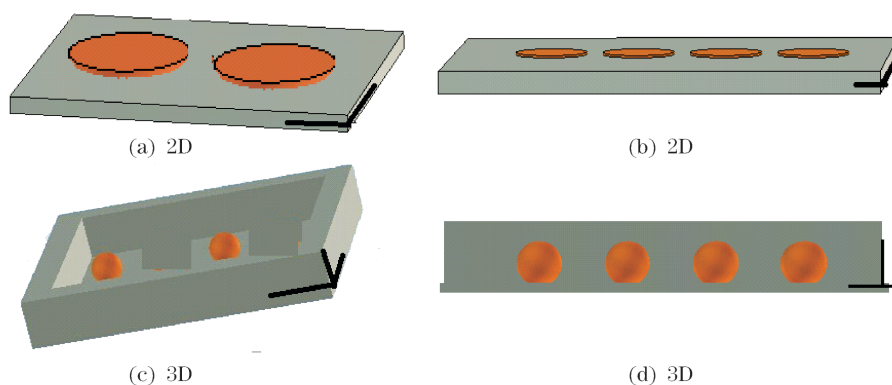


图 3 肝细胞在二维平面和三维支架上生长状态的三维构相

Fig.3 3D phase of hepatocytes' growth on 2D substrates and 3D scaffolds

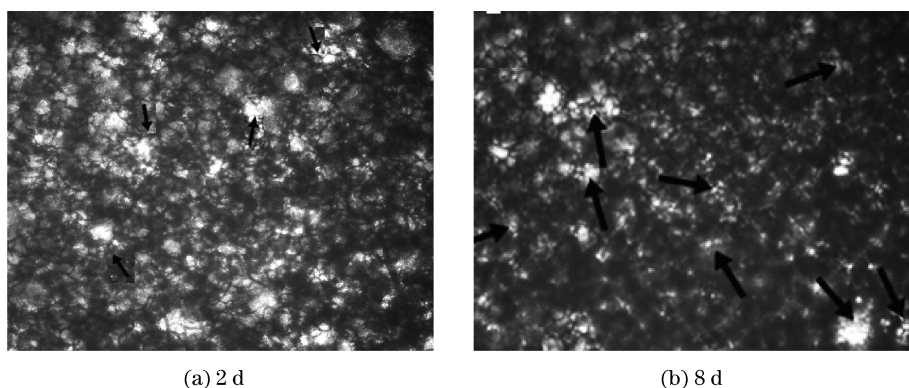


图 4 三维培养的大鼠肝细胞形态

Fig.4 Hepatocytes cultured on 3D scaffolds

2.4 细胞增殖活力 MTT 值对比

分别在培养 0, 2, 4, 6, 8, 10 d 后,对三维与二维培养的原代大鼠肝细胞进行 MTT 值测定.

由图 5 可知,二维培养条件下,细胞在前 4 d 的 MTT 值每天不断增加,4 d 后上升趋势达到最高值,而后出现下降趋势.三维培养条件下,细胞在前 6 d 的 MTT 值每天均呈上升趋势,且在培养 4 d 后增加尤为显著,从培养 6 d 后 MTT 值开始平稳.肝细胞在二维表面和三维支架中生长,从 MTT 数据显示

的结果可知,三维支架中的细胞生存能力明显强于二维平面.在二维平面上,由于细胞生长空间受到限制,一旦平面长满,细胞就无法继续生长;而在三维支架中,细胞生长不受限制,有较大的表面积供细胞增殖分化,并且可以和相邻细胞共同黏附聚集生长,因此细胞增殖生长比较快.

2.5 肝细胞的白蛋白分泌功能检测

分泌白蛋白含量是肝细胞在肝脏中的重要功能代谢指标,由于蛋白质中的氨基酸在药物联合和输

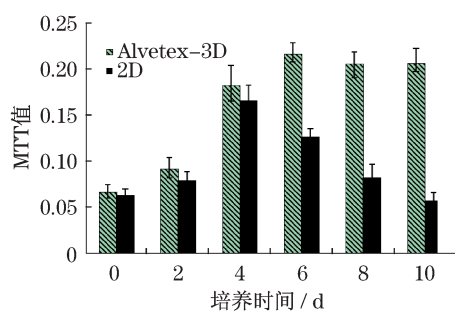


图5 三维与二维培养的大鼠肝细胞的 MTT 值比较

Fig.5 Comparison of MTT values of hepatocytes cultured on 2D and 3D structures

送、维护胶体渗透压和自由基的清除中都起到重要作用,因此,在体外培养中白蛋白分泌是常用的肝细胞功能指标^[10-12]。

图6给出了在二维平面和三维支架上白蛋白分泌随时间变化的情况。由图6可知,在前6 d,二维培养的细胞分泌白蛋白含量不断增加,在培养6 d后达到最高值,而后出现明显下降,说明肝细胞单层培养产生的细胞白蛋白分泌量较低。在三维支架培养的10 d时间内,细胞分泌白蛋白含量均呈上升趋势,与二维表面相比,细胞分泌白蛋白含量显著提升,表明3 D环境更有利于增强细胞的白蛋白功能。

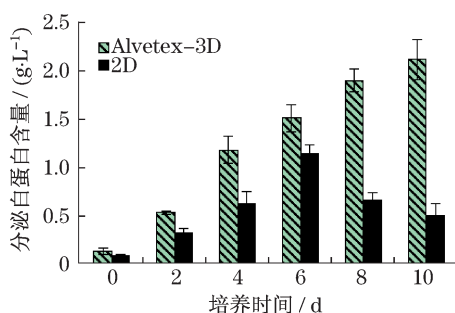


图6 三维与二维培养的大鼠肝细胞分泌白蛋白

Fig.6 Albumin concentration of hepatocytes cultured on 2D and 3D structures

2.6 细胞尿素合成功能的检测

图7给出了在二维平面和三维支架上大鼠肝细胞的合成尿素含量。在前6 d,Alvetex-3D与二维培养的细胞的合成尿素量每天均显著增加,在培养6 d后达到最高值,但每个阶段三维培养均大大高于二维培养条件下的细胞合成尿素的含量。随后,二维条件下的细胞合成尿素量呈下降趋势,而Alvetex-3D培养的细胞的合成尿素量在培养8 d后开始保持稳定。

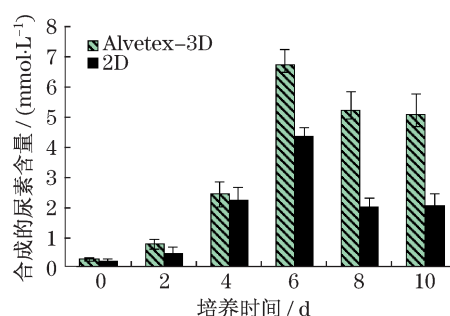


图7 三维与二维培养的大鼠肝细胞合成尿素含量比较

Fig.7 Synthesized urea contents of hepatocytes cultured on 2D and 3D structures

2.7 细胞消耗葡萄糖的检测

图8给出了在二维平面和三维支架上大鼠肝细胞的消耗葡萄糖量的对比。在前6 d,二维培养的细胞消耗葡萄糖量每天缓慢增加,6 d后达到最高值,而后开始下降;而三维支架培养的细胞在10 d内消耗葡萄糖量每天均呈上升趋势,尤其是培养8 d后,葡萄糖量显著高于二维培养组。

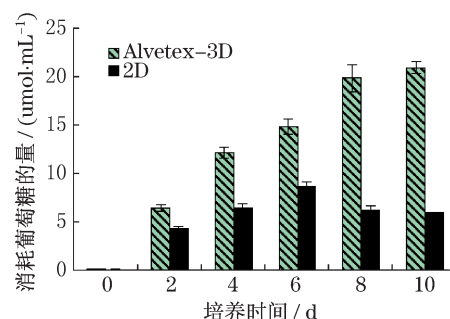


图8 三维与二维培养的大鼠肝细胞消耗葡萄糖量比较

Fig.8 Glucose concentrations of hepatocytes cultured on 2D and 3D structures

3 讨论

本文采用三维聚苯乙烯支架进行体外肝细胞的培养,并与二维平面培养相比较。环境对细胞的影响可能来自细胞的变形,也可能来自细胞所处的生化环境的改变。细胞在二维培养时,受生长条件限制,细胞的形态发生变化,而细胞的变形引起细胞膜内外离子浓度的改变,最终影响细胞营养成分和代谢产物的交换。因此,当采用三维系统培养细胞时,由于三维培养环境接近体内环境,对细胞的形态、结构、生长和代谢有什么影响,以及与二维培养有什么不同,本研究就此展开讨论。

当细胞黏附于环境表面开始生长时,具有改变

其形态以获得环境最小应变的能力. 细胞黏附于二维平面基底上时, 细胞自动形成扁平状以达到最小能量状态. 因此细胞骨架结构在某种程度上决定细胞的形态, 而其形态是控制细胞生长的重要因素, 力学刺激以特定的方式分布于胞外基质中, 只有通过结构成分骨架才能与细胞相互连接^[13]. 二维结构培养细胞尽管具有梭形形态进行扩展, 但这种培养方法由于受到细胞接触抑制的影响, 对细胞的增殖和分化有很大的影响^[14-15]. 三维结构在决定细胞内外环境变化的反应中起着重要的作用, 当细胞生长在三维基质支架中时, 细胞的生长环境接近于人体内环境, 因此细胞形态更接近于体内细胞形态, 而细胞形态和骨架结构与细胞代谢密切相关, 越接近体内环境, 细胞的生长形态越好, 细胞的各项代谢功能也越好. 本实验已经证明, 三维培养的细胞代谢功能好于二维培养的细胞.

总之, 本实验证明聚苯乙烯支架可以用于肝细胞的体外三维培养, 且该环境下细胞的代谢功能指标显著高于二维培养, 这是由于细胞的三维系统培养方式更近似于体内的培养条件. 因此, 细胞的三维培养可以为研究者提供更准确的数据, 这将有助于提高科研效率, 使细胞及组织工程的研究更具发展前景.

参考文献:

- [1] SCHMEICHEL K L, BISSELL M J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions[J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(12): 2377-2388.
- [2] BENINGO K A, DEMBO M, WANG Y L. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(52): 18024-18029.
- [3] KREWSKI D, WESTPHAL M, AL-ZOUGHLOO M, et al. New directions in toxicity testing[J]. *Annual Review of Public Health*, 2011, 32: 161-178.
- [4] CUKIERMAN E, PANKOV R, STEVENS D R, et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension[J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1708-1712.
- [5] DASH A, INMAN W, HOFFMASTER K, et al. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2009, 5(10): 1159-1174.
- [6] FERNANDES T G, KWON S J, BALE S S, et al. Three dimensional cell culture microarray for high-throughput studies of stem cell fate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(1): 106-118.
- [7] MELI L, JORDAN E T, CLARK D S, et al. Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 9087-9096.
- [8] TUNG Y C, HSIAO A Y, ALLEN S G, et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array[J]. *Analyst*, 2011, 136(3): 473-478.
- [9] ELLIOTT N T, YUAN F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100(1): 59-74.
- [10] BOKHARI M, CARNACHAN R J, CAMERON N R, et al. Novel cell culture device enabling three-dimensional cell growth and improved cell function[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 354(4): 1095-1100.
- [11] LAN S F, SAFIEJKO-MROCZKA B, STARLY B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels; a study of cell viability, morphology and drug metabolism[J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(4): 1314-1323.
- [12] KANE B J, ZINNER M J, YARMUSH M L, et al. Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary Mammalian hepatocytes[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(13): 4291-4298.
- [13] 秦廷武, 杨志明, 解慧琪, 等. 动态应变下肌腱细胞三维培养的初步研究[J]. *华西医科大学学报*, 2002, 33(1): 1-4.
- [14] SEGUROLA R J, SUMPIO B E, Mills I. Strain-induced dual alignment of L6 rat skeletal muscle cells[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1998, 34(8): 609-612.
- [15] GRYMES R A, SAWYER C. A novel culture morphology resulting from applied mechanical strain[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1997, 33(5): 392-397.

(编辑: 董 伟)