

用于抗肿瘤药物评价的三维肿瘤细胞体系的构建及性能*

王雪琴¹ 曹丽华¹ 陈正坚¹ 罗军¹
王红军^{1,2} 涂克华^{1,2} 蒋宏亮^{1,2} 王利群^{1,2**}

(¹ 浙江大学高分子科学与工程学系 ² 教育部高分子合成与功能构造重点实验室 杭州 310027)

摘要 以聚己内酯和明胶为原料,通过静电纺丝制得孔隙率高、细胞分散性好、机械性能佳的三维细胞支架;扫描电镜及共聚焦显微镜表征 U87 细胞在该三维支架内培养 14 天后的生长情况,结果表明 U87 细胞不仅能够在此支架表面黏附增殖,而且能迁移进入静电纺丝膜内部生长,形成良好的三维细胞体系. 游离阿霉素(DOX)对二维表面和三维静电纺丝膜中 U87 细胞的细胞毒性结果表明,相对于二维细胞体系而言,三维细胞体系对药物的敏感性能降低. 进一步比较了二维与三维细胞对负载于聚乙二醇-*b*-聚己内酯(PEG-*b*-PCL)胶束中 DOX 的响应,三维细胞体系的药物敏感性低于二维体系.

关键词 电纺, 三维细胞体系, 阿霉素, 胶束

检测药物释放体系对肿瘤的治疗效果可分为体内和体外两种方法. 对于药物的初期筛选,大量的研究都采用体外方法进行评价. 目前主要通过二维细胞培养板上培养单层细胞的方式进行检测. 但是事实上生物体内细胞是聚集成具有一定细胞形态和生物学性能的三维结构. 单层的细胞体系由于生长基质缺乏、迁移空间限制、可能造成细胞表型改变等原因,不能有效地模拟生物体内具有三维形态结构的细胞系^[1,2]. 因此,构建三维肿瘤组织模型用于体外评价抗肿瘤药物乃至其释药系统的药效非常重要.

目前三维肿瘤细胞模型可分为两类,一类是无支架的细胞聚集体,另一类是有支架的细胞体系^[3]. 悬滴法是制备无支架三维细胞体系的主要方法. Gunness^[4]等用该法制备了直径达 200 μm 的肝癌细胞球体. 在悬滴法基础上通过设备的改进还产生了一系列无支架三维细胞体系的制备技术^[5,6],如 Xu^[7]等运用微流控芯片培养三维细胞球体. 有支架的细胞体系是将细胞种植在具有三维孔隙结构的生物支架内,通过物理扩散或细胞自发迁移的方法得到三维细胞体系^[8]. 此法关键在于细胞支架的制备^[9].

静电纺丝所具有的独特性使其在各领域都有

广泛的应用,其中组织工程支架和药物释放领域的探索层出不穷^[10,11]. 电纺所得纤维直径介于 50 ~ 500 nm 之间,与人体内的细胞外基质(ECM)胶原纤维直径接近,其拓扑结构能很好地模拟细胞外基质. 同时电纺膜的高孔隙度和孔隙连通性,有利于细胞的铺展和转移. 可用于电纺的原料种类繁多,可选择得到既满足细胞黏附生长的生物学要求又满足基本力学性能要求的原料组合. 滕红^[12]等就曾研究过 PLLA 与 CA 材料的混纺对电纺膜性能的影响,证明 CA 的加入能提高 PLLA 的性能.

Alamei^[13]等选用明胶、聚己内酯、聚乳酸等多种原料制备了三维细胞支架并成功用于三维肿瘤细胞体系的构建. Kim^[14]等以 PHBV 和胶原为原料,利用电纺方式构建三维肿瘤细胞体系,并研究该体系对多种药物的敏感性能. 证明三维细胞体系对药物具有更高的耐药性能. Mueller^[15]通过二维和三维器官型培养仪器研究两种细胞体系对药物的敏感性,也得到了相似结论. 证明三维细胞体系能更好地模拟生物体内生长状况. Kazuaki^[16]和他的研究团队从蛋白、基因表达等方面解释了二维和三维细胞体系存在药物敏感性能差异的原因.

* 2013-10-23 收稿,2013-12-10 修稿;国家自然科学基金(基金号 21074112)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: lqwang@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2014.13374

虽然三维肿瘤细胞体系的应用已有报道,但目前研究主要集中于体外检测裸露抗肿瘤药物,缺乏对抗肿瘤药物给药系统的评价。

本研究选用 PCL 和明胶为原料,制备厚度约为 150 μm 的电纺膜。明胶具有生物识别功能,有利于细胞的攀附生长,PCL 的加入可克服明胶机械性能差的缺点。将 U87 细胞种植在电纺膜上,培养一段时间,形成具有三维形态的细胞体系。以游离 DOX 及加载 DOX 的 PEG-*b*-PCL 胶束为释药模型,比较了 U87 细胞的二维体系和三维体系对药物的敏感性。

1 实验部分

1.1 实验原料

聚乙二醇(分子量 5000)购买于 Sigma-Aldrich,使用前用甲苯共沸除水; ϵ -己内酯(ϵ -caprolactone),99%,阿拉丁试剂有限公司(上海);与辛酸亚锡(stannous octotatate),95%,阿拉丁试剂有限公司(上海);苯甲醇(benzyl alcohol),AR,国药集团化学试剂有限公司(上海),使用前用氯化钙干燥 2 个星期;明胶(gelatin,提取于猪皮, type A),90%,Sigma-Aldrich;其它试剂均来自国药集团化学试剂有限公司,未经处理,直接使用。

DMEM 高糖细胞培养液(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose)、RPMI. 1640 细胞培养液(Roswell Park Memorial Institute Medium 1640)与 0.25% 胰酶溶液购买自吉诺生物医药技术有限公司(杭州);无支原体胎牛血清、细胞膜绿色荧光探针(DIO)购买自杭州四季青生物工程材料有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)试剂购买自杭州吴天生物技术有限公司。

U87 细胞为浙江大学化学系汤谷平课题组馈赠。

1.2 实验设备

自制电纺仪的接收装置为圆柱型滚轴,转速为 20~30 r/min,单纺一种纤维时由一个喷丝头从一侧进样,混纺时由 2 个喷丝头从两侧同时进样。

扫描电镜采用日本日立 S-4800 场发射扫描电镜观测电纺丝的形态和断面结构、细胞在电纺膜表面及电纺膜内部的生长迁移状况。测试样品在真空下干燥 24 h,然后真空下镀金 40 s;纤维的

直径尺寸及其分布用图像分析软件 Images-pro Plus5 统计得到。

激光共聚焦显微镜采用 Leica TCS SP5 测定细胞在纺丝膜上的分布情况。先用二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)染色 0.5 h,再用 DIO 细胞膜绿色荧光探针(3, 3-dioctadecyloxa-carbocyanine perchlorate)染色 0.5 h,可获得细胞核和细胞质分别染色的细胞图像。

紫外可见光光度计采用北京普析通用仪器有限公司 TU-1810 紫外可见光光度计测定药物体外释放结果。

酶标仪采用 Thermo Scientific Multiskan MK3 酶标仪测定细胞生长情况。

1.3 实验步骤

1.3.1 静电纺丝膜的制备

根据文献[17]中所述方法合成 PCL。GPC 分析合成的 PCL 数均分子量 95000,分子量分散指数 1.66。核磁计算得 PCL 分子量为 1×10^5 ,两者所得数据吻合。

配制一系列 PCL 与明胶的三氟乙醇(TFE)溶液,分别进行静电纺丝预实验,确定最佳纺丝条件。PCL 纺丝条件为浓度 20%(质量百分比),电压 11~13 kV,距离 17~20 cm,进样速率 0.4 mL/h;明胶纺丝条件为浓度 10%(质量百分比),电压 9~11 kV,距离 15~17 cm,进样速率 1 mL/h。将连接两溶液的喷丝头分别置于接收滚轴的两端,混纺 8 h,获得均匀的 PCL/明胶混纺膜。通过差量称重的方法,确定静电纺丝膜中 PCL 和明胶的含量。具体操作方法为:剪取边长为 1~2 cm 的正方形电纺膜样品,浸泡在去离子水中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡箱 32 h,期间每 4 h 换水 1 次,最后取出干燥称量。

明胶含量百分比(%)=(洗涤前质量-洗涤后质量)/洗涤前质量 $\times 100\%$

将静电纺丝膜置于戊二醛蒸汽中交联 4 天,交联完毕后通过差量称重方法,测定样品交联度。

溶胶-凝胶分数(%)=(洗涤前质量-洗涤后质量)/(洗涤前质量 $\times$ 明胶含量百分比) $\times 100\%$

1.3.2 静电纺丝膜上三维细胞体系的构建

交联静电纺丝膜浸泡于甘氨酸水溶液中,以除去残留的戊二醛。将处理后的膜用打孔器冲成直径 10 mm 的圆片,浸泡在 75% 酒精水溶液中备用。将圆片铺展在 48 孔细胞培养板中,紫外灭菌

30 min,用玻璃管压住膜,防止其在培养液中漂浮.将 U87 细胞培养于含 10% 无支原体胎牛血清 DMEM 培养液中,并以 2 万/孔的密度种于纤维膜表面,通过 MTT 法测定 1、3、5、7、9、12、14 天后静电纺丝膜上细胞生长情况.培养 14 天后,取出含细胞的电纺膜,以 4% 戊二醛溶液固定,干燥后通过 SEM 和 CLSM 观察细胞在膜表面与膜内的生长形态.

1.3.3 PEG-*b*-PCL 纳米载药胶束制备

PEG-*b*-PCL 的合成是取甲苯共沸除水后的聚乙二醇 5 g 于圆底烧瓶中,加入经减压蒸馏除水的己内酯单体 3.27 mL,加入 0.0306 mol 辛酸亚锡,抽真空充氮气 3 次,在 140 ℃ 条件下反应 8 h,冷却后产物溶解在 5 mL 氯仿中,用 7~10 倍体积的无水甲醇沉降.离心干燥得 PEG-*b*-PCL.核磁及 GPC 表征.

PEG-*b*-PCL 胶束的制备是称取 PEG-*b*-PCL10 mg 溶解在 3 mL DMF 溶液中,逐滴滴加去离子水至溶液出现蓝光,搅拌过夜,将溶液置于 3500 的透析袋中,在去离子水里透析 3 天,每天换液 4 次.

PEG-*b*-PCL 载药胶束的制备是称取 3 mg DOX 固体溶解在 2 mL 二氯甲烷中,加入 0.0166 mol 的 TEA,搅拌过夜.加入 10 mL 1 mg/mL 的 PEG-*b*-PCL 胶束,搅拌 4 h,旋转蒸发除去二氯甲烷.在去离子水中透析 3 天,每天换液 4 次.用 DLS 和 TEM 表征胶束纳米粒子.

取相同剂量的空白胶束和载药胶束分别冻

干,计算胶束的载药量和载药效率.

载药量(%)=(载药胶束质量-空白胶束质量)/载药胶束质量×100%

载药效率(%)=(载药胶束质量-空白胶束质量)/投入药物质量×100%

PEG-*b*-PCL 胶束体外释药是取 4 mL 载药胶束溶液,置于 3500 的透析袋中,在 25 mL PBS 缓冲液内在 37 ℃ 恒温振荡箱内进行释药.每次取样时取出 5 mL 外液,加入 5 mL PBS 缓冲液.

1.3.4 药物抗肿瘤作用评价

将 U87 细胞以 2 万/孔的密度种植在电纺纤维膜上,培养一段时间以后(每 2 天换 1 次液),加入不同浓度的游离 DOX 或包载 DOX 的 PEG-*b*-PCL 胶束,培养 24 h 后通过 MTT 测定细胞生长情况.

2 结果与分析

2.1 静电纺丝膜的制备

通过调节纺丝距离、进样速率和纺丝电压等 3 个关键因素,可获得纤维直径分布相对较窄的电纺纤维膜,其形貌如图 1 所示.由图 1 可见,单纺时 PCL 纤维比明胶纤维粗,根据 Image Pro Plus 软件统计,PCL 单纺纤维直径在 1.25~1.84 μm 范围内,纤维平均直径约 1.43 μm,而明胶纤维直径在 0.67~0.97 μm 范围内,纤维平均直径约 0.8 μm.相同条件下混纺后 2 种纤维的直径均有所减小,分布变窄,混纺纤维直径在 0.35~0.59 μm 范围内,纤维平均直径约 0.44 μm.混纺时纤维直径变小的原因可能是由于纤维从喷丝头出来

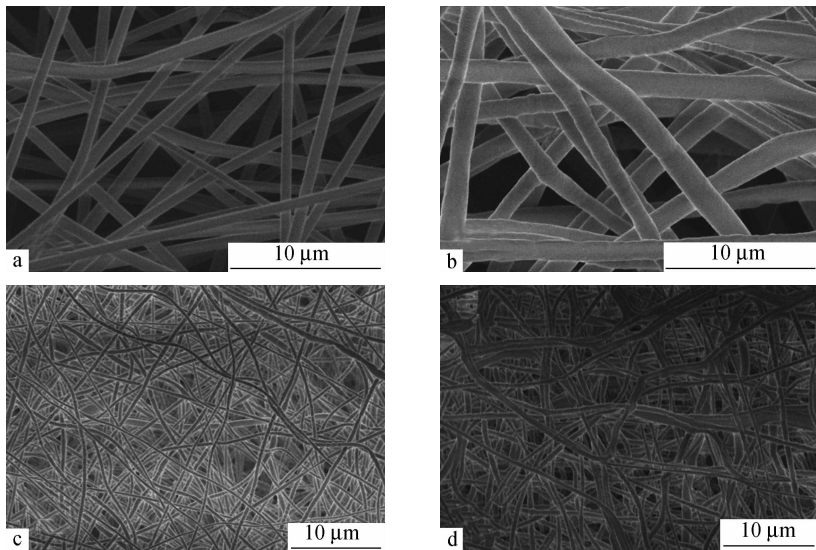


Fig. 1 SEM images of electrospinning membranes: (a) gelatin, (b) polycaprolactone, (c) gelatin/polycaprolactone and (d) gelatin/polycaprolactone crosslinked

时带有正电荷,在空中相互排斥,使纤维拉伸.当2种纤维分别从喷丝口喷出,单位空间内纤维密度增加,所带电荷的密度增加,静电排斥力增大,纤维所受拉伸力度增加,纤维变细.通过电纺条件的调节,最终获得一批 PCL 含量比例为 40% ~ 60% 的静电纺丝膜.

由于明胶具有水溶性,在使用之前需要经过戊二醛交联.交联后纤维膜形态如图 1 所示.从电镜图上看交联后的电纺膜弯曲度变大,纤维之间略有粘连,孔隙度有所减小.通过样品溶胶凝胶分数测试,在水溶液内样品损失率小于 15%.

2.2 三维细胞体系培养

戊二醛本身具有一定的细胞毒性,经戊二醛交联后的电纺膜细胞毒性很大,但用甘氨酸处理能大大降低戊二醛对细胞生长的影响.经 MTT 检测发现,U87 细胞能在甘氨酸处理过的交联纤维膜上可正常地生长繁殖(图 2).图 3(b)为细胞培养 14 天后纤维膜表面细胞生长状况,与图 3(a)未培养细胞的纤维膜表面相比,纤维膜表面已铺展致密的细胞.由于电纺纤维膜具有三维多孔结构,当纤维膜表面细胞铺满时,细胞分裂所产生的新细胞将自发地向纤维内部迁移生长,形成具有三维立体结构的细胞聚集体,此种三维结构能够更好地模拟人体内肿瘤细胞的生长状态.未培养细胞的纤维膜断面如图 3(c)所示,图 3(d)为 U87 细胞接种至纤维膜 14 天后,纤维膜的断面 SEM 照片.在照片上部红线以上区域为纤维膜上

表面,可见整个表面几乎被细胞铺满;照片红线以下部分为纤维断面,可见细胞已向纤维内部迁移,蓝色曲线标示细胞迁移的下限,在不同部位细胞铺展的深度不一样,有细胞铺展的部分占整个截面 2/3 面积.经 FDA、DIO 染色后进行 CLSM 观察,CLSM 图像进一步证实了细胞在纤维表面和内部的生长情况(图 4).其中(a-3)、(b-3)为自然光照照片,因为电纺膜不透光,在自然光照下,只能看到细胞的轮廓.(b-3)中左侧空白部分,表示截面的边界,证明(b)中细胞是在截面生长.图 4(a)显示细胞在纤维膜表面正常铺展,能表现神经细胞 U87 的细长型细胞形态.图 4(b)可以看到在截面上细胞成簇生长,长入纤维膜内部.图中细胞生长方向从右向左.

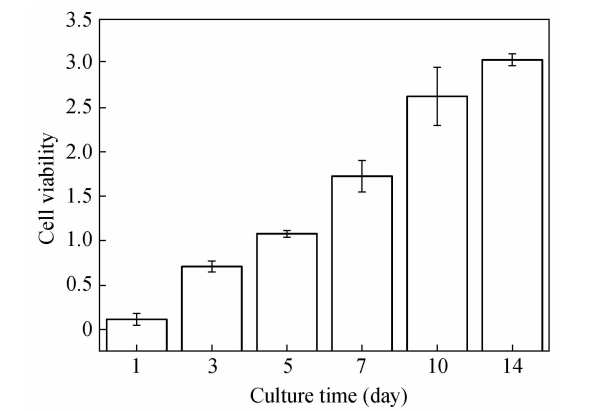


Fig. 2 MTT results of U87 cells grown on gelatin/polycaprolactone crosslinked membranes

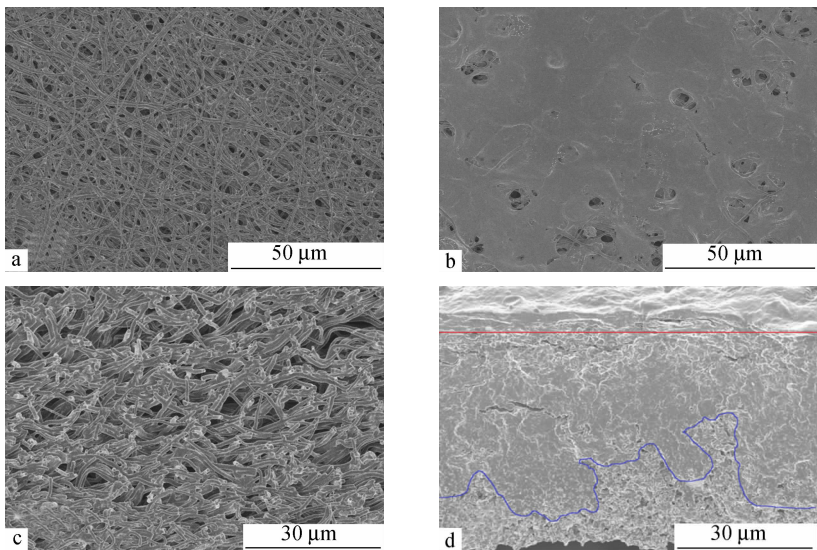


Fig. 3 SEM images of U87 grown on electrospinning membranes: (a) unseeded membranes, (b) surface of membranes after 14 days' cell culture, (c) cross section of unseeded membranes and (d) cross section of membranes after 14 days' cell culture

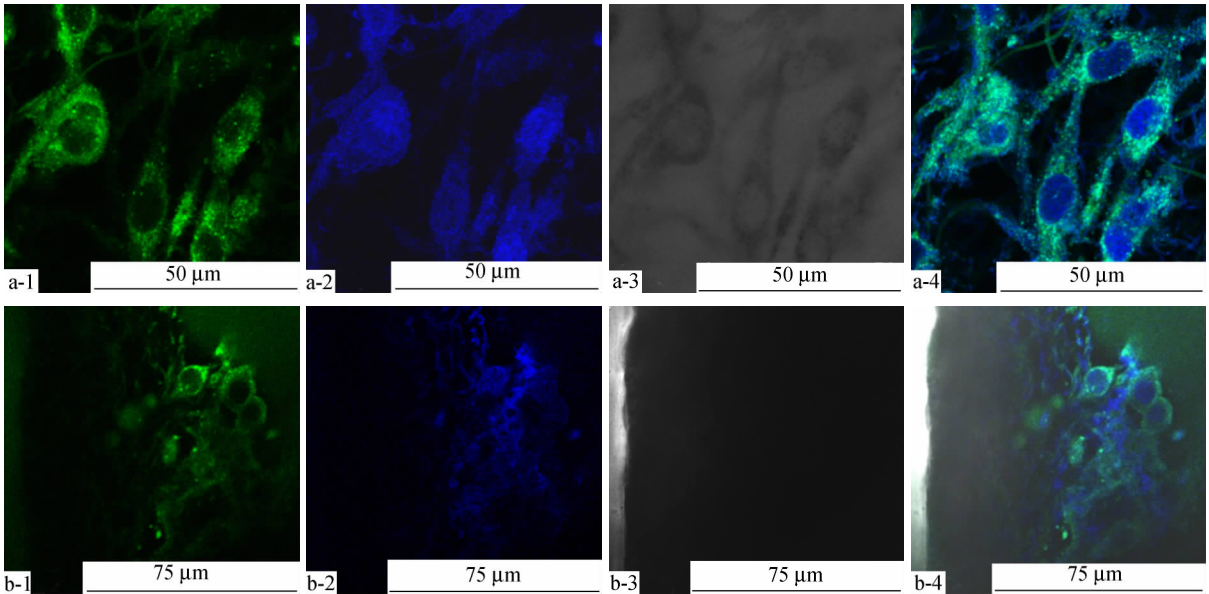


Fig. 4 CLSM images of U87 cells grown on electrospinning membranes: (a) surface of membranes after 14 days' cell culture and (b) cross section of membranes after 14 days' cell culture; (1) DIO tagged images, (2) FDA tagged images, (3) CLSM images under natural light and (4) merged images of 1,2,3

2.3 载药纳米胶束的制备

无论空白或载药胶束长期放置在 4 ℃ 环境下,无沉淀析出. 胶束载药后 DLS 粒径约为 87.1 nm,其 TEM 图如图 5 所示. PEG-*b*-PCL 胶束载药量为 20%,载药效率 83%.

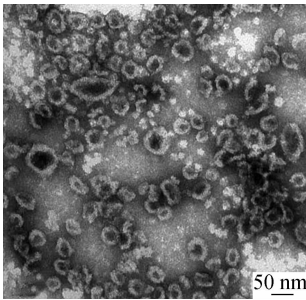


Fig. 5 TEM image of drug loaded PEG-*b*-PCL micelles

PEG-*b*-PCL 胶束的释药结果如图 6 所示. 从释药结果可以看出,在 24 h 内药物释放量接近 70%.

2.4 药物抗肿瘤作用评价

不同细胞体系对药物的敏感性能实验结果如图 7 所示. 与二维细胞体系相比,相同的药物浓度下,三维细胞体系的死亡率低于二维细胞体系. 原因可能为三维细胞体系内部的细胞与药物接触少,当外部细胞吸收药物时,内部细胞依然进行正常的分裂增长,因此,其衰亡过程将得到延长. 当药物不能持续地供给,内部细胞将继续分化增殖,使肿瘤细胞数量恢复. 这也可以解释为什么抗肿

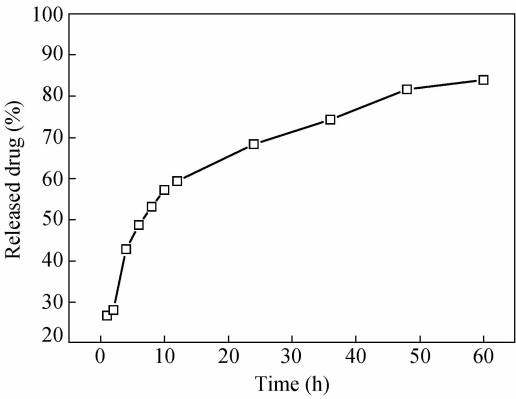


Fig. 6 DOX release profile of DOX loaded PEG-*b*-PCL micelles

瘤药物进入人体内部之后,其治疗效果并没有预期理想. 正是这种三维的细胞结构,能够让肿瘤细胞有更多的增殖分裂甚至变异的机会,给肿瘤治疗带来障碍. 通过对人体内三维细胞结构的模仿,我们能更真实地看到抗癌药物的抗肿瘤效果.

由于抗癌药物对人体本身具有相当大的副作用,很长一段时间以来,科学家们一直在致力于药物载体的研究,希望实现药物的靶向释放效果. 因此,我们也检测了 PEG-*b*-PCL 载药胶束对三维细胞体系的影响. 可以发现,胶束释药中虽然加入胶束所承载的 DOX 浓度与纯 DOX 释药时浓度相同,但不管是二维或是三维细胞体系释药,细胞存活率均升高. 造成这一结果的原因是胶束包裹的

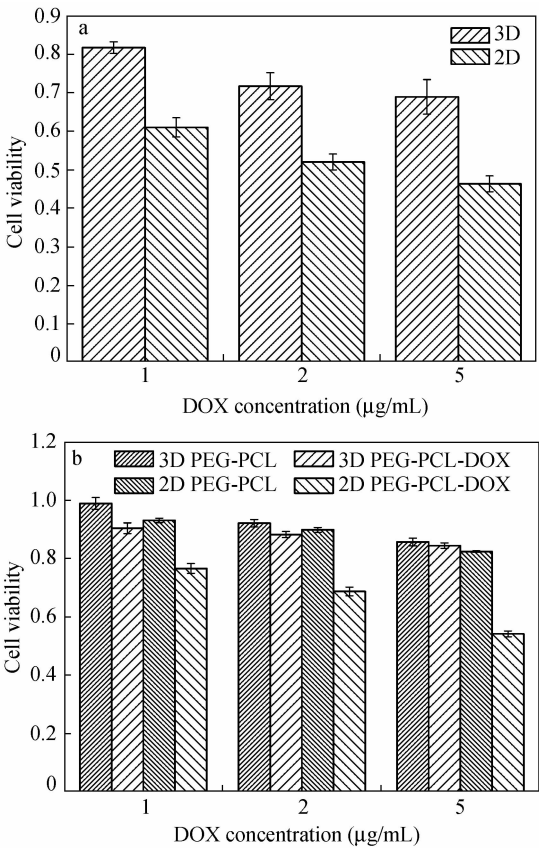


Fig. 7 Cytotoxicity of anticancer drugs to 3D cell systems :
(a) cytotoxicity of free DOX with various concentrations and
(b) cytotoxicity of PEG-*b*-PCL micelle loaded DOX with various concentrations

药物释放不完全. 随药物浓度增大, 二维细胞体系

和三维细胞体系之间的差别变大, 说明在实际肿瘤治疗中, 肿瘤治疗效果并不是与药物浓度成正比.

无论游离 DOX 还是 PEG-*b*-PCL 胶束包载的 DOX 作用于细胞体系, 二维细胞体系的耐药性均小于三维细胞体系, 这一结果与 Kim^[16] 等的研究结果相符. 造成 2 种细胞体系耐药性差异的原因可能为: (1) 由于三维细胞结构的存在, 肿瘤细胞在外层细胞死亡后, 内部细胞的正常增殖会减弱药物对整个细胞体系的影响; (2) 单层二维细胞体系内细胞的生长仅仅依赖于细胞的增殖分化. 三维结构细胞由于其与细胞外基质的相互作用, 可以促使其基因表达、蛋白表达的改变^[16]. 因此当接触药物时, 三维结构的肿瘤细胞由于其固有性能的改变, 其抗药性能也有所变化.

3 结论

以聚己内酯、明胶为原料, 利用静电纺丝的方法, 制备了具有孔隙率高、机械性能好、适宜细胞生长等特点的三维支架. 以此为基础, 构建了 U87 细胞的三维细胞体系. 将此三维细胞体系应用在抗肿瘤药物作用检测中, 发现三维细胞体系相对于二维细胞体系而言, 具有更强的耐药性能. 将三维细胞体系作为一个体外检测药物释放性能的平台, 得到的释药结论更接近于生物体内药物释放的结果. 该三维评价方法的建立, 为肿瘤药物及药物控释系统的筛选和评价提供了一个新的途径.

REFERENCES

1 Kim J B. Semin Cancer Biol, 2005, 15 (5) : 365 ~ 377
2 Kim J B, Stein R, O' Hare M J. Breast Cancer Res Tr, 2004, 85 : 281 ~ 291
3 Rimann M, Graf-Hausner U. Curr Opin Biotech, 2012, 23 (5) : 803 ~ 809
4 Gunness P, Mueller D, Shevchenko V, Heinze E, Ingelman-Sundberg M, Noor F. Toxicol Sci, 2013, 133 (1) : 67 ~ 78
5 Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, Blitterswijk C, Boer J. Trends Biotechnol, 2013, 31 (2) : 108 ~ 115
6 Greiner A M, Richter B, Bastmeyer M. Macromol Biosci, 2012, 12 (10) : 1301 ~ 1314
7 Xu Z Y, Gao Y H, Hao Y Y, Li E C, Wang Y, Zhang J N, Wang W X, Gao Z C, Wang Q. Biomaterials, 2013, 34 (16) : 4109 ~ 4117
8 Perez-Castillejos R. Mater Today, 2010, 13 : 1 ~ 2
9 Zhang H, Cheng A L. Materials Review, 2009, 23 (5) : 88 ~ 93
10 Wang H, Song H R, Cui Y, Deng Y J, Chen X S. Chinese J Polym Sci, 2011, 29 (2) : 173 ~ 179
11 Justice B A, Badr N A, Felder R A, Drug Discov Today, 2009, 14 (1-2) : 102 ~ 107
12 Hou J Z, Sun X P, Zhang W X, Li L L, Teng H. Chinese J Polym Sci, 2012, 30 (6) : 916 ~ 922
13 Alamein M A, Liu Q, Stephens S, Skabo S, Warnke F, Bourke R, Heiner P, Warnke P H. Adv Healthc Mater, 2013, 2 (5) : 702 ~ 717
14 Kim Y J, Bae H I, Kwon O K, Choi M S. Int J Biol Macromol, 2009, 45 (1) : 65 ~ 71
15 Mueller D, Kramer L, Hoffmann E, Klein S, Noor F. Toxicol In Vitro, 2014, 28 (1) : 104 ~ 112
16 Nakamura K, Mizutani R, Sanbe A, Enosawa S, Kasahara M, Nakagawa A, Ejiri Y, Murayama N, Miyamoto Y, Torii T, Kusakawa S, Yamauchi J, Fukuda M, Yamazaki H, Tanoue A. J Biosci and Bioeng, 2011, 111 (1) : 78 ~ 84
17 Chen Z J, Cao L H, Wang L Q, Zhu H Y, Jiang H L. J Appl Polym Sci, 2013, 127 (6) : 4224 ~ 4232

3D Tumor Cell System for *in Vitro* Screening of Chemotherapeutic Drugs

Xue-qin Wang¹, Li-hua Cao¹, Zheng-jian Chen¹, Jun Luo¹, Hong-jun Wang^{1,2}, Ke-hua Tu^{1,2},
Hong-liang Jiang^{1,2}, Li-qun Wang^{1,2*}

(¹ Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, ² MOE Key Laboratory of Macromolecular
Synthesis and Functionalization, Hangzhou 310027)

Abstract Compared with 2D plate, 3D tumor cell system is more like tumor tissue, for the 3D scaffold where cells grow can imitate the ECM in organisms, so that it could be used for evaluating anti-tumor efficacy of chemotherapeutic drugs with higher accuracy. There have been different ways to form a 3D scaffold, and electrospinning is the one with great potential. Although studies have shown that when exposed to drugs, greater amount of drugs are needed to kill the cells cultured on 3D scaffold, few studies have ever focused on the sensitive properties of 3D cell systems to drug delivery systems. As drug delivery system is going to be widely used in the future tumor treatment, in order to establish a drug delivery test model to predict the influence of drugs to tumor growth, a 3D cell culture scaffold composed of PCL and gelatin with high porosity, cell affinity and reasonable mechanical properties was fabricated through electrospinning method. One of the compositions PCL ensures the mechanical strength to avoid collapse and gelatin is a well known material with good biocompatibility. U87 was seeded on this scaffold, and the proliferation was monitored over 14 days with SEM and CLSM. It was found that U87 cells can not only adhere to the surface of the scaffold, but also migrate into the interior of the scaffold, forming a 3D cell system. When exposed to free DOX the electrospun scaffold was found to have lower drug sensitivity compared with the 2D cell culture plate. Further investigation of using Dox-loaded PEG-*b*-PCL micelles as the delivery system demonstrated the same result.

Keywords Electrospinning, 3D cell system, DOX, Micelle

* Corresponding author; Li-qun Wang, E-mail: lqwang@zju.edu.cn