

微囊化培养对肝细胞增殖生长和功能表达的影响***☆

黄晓波, 张英, 王为, 孙广炜, 朱静, 谢红国, 马小军

Effect of microencapsulated culture on the proliferation and functional expression of hepatocytes

Huang Xiao-bo, Zhang Ying, Wang Wei, Sun Guang-wei, Zhu Jing, Xie Hong-guo, Ma Xiao-jun

Abstract

BACKGROUND: The previous experiments have proved that, the configuration of hepatocarcinoma cells (HepG2) was changed during microencapsulated culture and the cellular skeleton was also rearranged.

OBJECTIVE: Based on the previous study, this study was aimed to further investigate the effect of microencapsulated culture on the proliferation and function expression of HepG2 cells.

METHODS: Human HepG2 cell lines were encapsulated in alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules. The configuration and microstructure of cellular spheroids, cellular proliferation and function expression were detected through microscopy and hematoxylin-eosin staining, MTT assay, Realtime RT-PCR and Elisa assay, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Microencapsulated HepG2 cells aggregated into clumps with tight junctions and proliferated in three-dimensional manner. Compared with the monolayer culture, the rate of cellular proliferation in microcapsules was reduced. However, the gene expression related with liver function and albumin secretion were increased in the microencapsulated HepG2 cells. The microenvironment provided by alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules can contribute to *in vitro* construction of HepG2 cells. The alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules can achieve *in vitro* culture of hepatocytes, it is a potential pattern of three-dimensional culture, and can be used in cancer therapy, high-flux drug screening and liver tissue engineering study.

Huang XB, Zhang Y, Wang W, Sun GW, Zhu J, Xie HG, Ma XJ. Effect of microencapsulated culture on the proliferation and functional expression of hepatocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(29):5329-5333. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期研究证实, 肝细胞在微囊化培养过程中结构形态发生变化, 细胞的骨架会发生重排。

目的: 在前期研究基础上, 进一步考察微囊化培养体系对细胞生长和功能表达的影响。

方法: 采用海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微囊化人肝癌细胞系 HepG2 细胞, 通过显微观察、苏木精-伊红染色、MTT 实验、Realtime RT-PCR 与 Elisa 实验, 检测微囊内细胞的生长形态、细胞团的形态结构、细胞的活性、以及细胞的功能表达情况。

结果与结论: HepG2 细胞在微囊内聚集成团, 以三维方式生长, 细胞间连接紧密, 与传统的平面培养相比, 微囊化细胞的生长速率减慢, 但微囊化细胞的功能基因表达水平及白蛋白的分泌量增高, 说明海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊所提供的微环境有利于肝细胞类组织的体外构建。结果也提示海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊能够实现肝细胞的体外类组织化培养, 有望成为一种更具前景的三维培养模式, 应用于癌症治疗、高通量药物筛选以及肝组织工程的研究。

关键词: 微胶囊; 三维培养; 细胞聚集体; 人肝癌细胞株; 生物材料与药物控释

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.29.003

黄晓波, 张英, 王为, 孙广炜, 朱静, 谢红国, 马小军. 微囊化培养对肝细胞增殖生长和功能表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(29):5329-5333. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

自从Holtfreter首次将胚胎干细胞进行聚集培养后, 细胞的三维类组织化培养技术便被广泛地用于生物研究的各个领域^[1-2]。与传统的单层细胞培养相比, 三维类组织化培养下的细胞无论是在形态还是功能上都更类似于体内组织^[3-4]。目前, 已有多种培养模式用以实现细胞的体外组织重建^[5-9], 其中, 微胶囊技术有其独特的优势^[10-11], 它能为细胞提供一个有利于细胞组织重建的微环境, 使细胞的形态接近于在体的组织。在以前的研究中, 作者考察了微囊化肝细胞生长过程中

的结构形态, 细胞的骨架会发生重排^[12], 在此基础上, 本文旨在以肝癌细胞系HepG2细胞为模型, 进一步考察微囊化培养体系对细胞生长和功能表达的影响, 为其用于癌症治疗、高通量药物筛选以及组织工程的研究提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 细胞对比观察实验。

时间及地点: 于2009-08/2010-01在中科院大连化学物理研究所生物技术部生物材料实验室完成。

材料: 人肝癌细胞系HepG2购自中科院上海

Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Huang Xiao-bo☆, Studying for doctorate, Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning Province, China huangxb@dicp.ac.cn

Correspondence to: Ma Xiao-jun, Investigator, Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning Province, China maxj@dicp.ac.cn

Supported by: National 973 Project by Ministry of Science and Technology, No. 2005CB522702*; the National Natural Science Foundation of China, No. 20736006*; Major Program of the National 863 Project, No. 2006AA02A140*

Received: 2010-03-18 Accepted: 2010-05-06

中国科学院大连化学物理研究所生物医用材料工程组, 辽宁省大连市 116023

黄晓波☆, 男, 1981 年生, 山西省永济市人, 汉族, 中国科学院大连化学物理研究所生物医用材料工程组在读博士, 主要从事组织工程研究。
huangxb@dicp.ac.cn

通讯作者: 马小军, 研究员, 中国科学院大连化学物理研究所生物医用材料工程组, 辽宁省大连市 116023
maxj@dicp.ac.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)29-05329-05

收稿日期: 2010-03-18
修回日期: 2010-05-06
(20100318024/GW · Y)

细胞所。

主要试剂及仪器:

主要试剂及仪器	来源
海藻酸钠、多聚赖氨酸	Sigma 公司
四甲基偶氮唑蓝、MEM 培养基	Sigma 公司
新生小牛血清	杭州四季青公司
Trizol Reagent	Invitrogen 公司
RT-PCR kit	Takara 公司
Elisa 白蛋白 kit	Bethyl 公司
Olympus CK40 型生物倒置显微镜	日本 Olympus 光学工业株式会社
MS-353 酶联免疫检测仪	Labsystems Co. Ltd, Finland
CO ₂ 恒温培养箱	Heal Force Development Co. Ltd, Hong Kong
SBA-40C 型全自动酶电极分析仪	山东省科学院生物研究所
Realtime PCR 仪	Corbett 公司, Rotor-gene 2000
高压脉冲微胶囊制备仪	本实验室研制

实验方法:

微囊化细胞制备及培养: 待平面生长的 HepG2 细胞长到对数生长期, 用 0.25% 胰酶消化, 生理盐水洗涤 3 次, 离心收集细胞, 计数, 悬浮于 15 g/L 的海藻酸钠溶液中, 利用微囊静电液滴发生器喷入 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液中, 形成海藻酸钙胶珠, 然后用 0.5 g/L 多聚赖氨酸包裹, 再与 1.5 g/L 的海藻酸钠溶液反应, 最后用 55 mmol/L 柠檬酸钠溶液处理, 获得微囊化的肝细胞。将制备好的微囊化肝细胞于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 相差显微镜观察细胞的生长状况。

苏木精-伊红染色: 体积分数 4% 甲醛溶液固定微囊化细胞后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 切片, 染色, 树胶封固后显微镜下观察细胞形态。

MTT 法检测微囊内 HepG2 细胞的生长活性: 将微囊化 HepG2 细胞接种于 24 孔板 (~200 capsules/well), 隔日取 3 个平行孔, 分别加入 100 μL MTT 溶液 (5 g/L, PBS 溶液配制) 的, 37 °C 孵育 24 h, 筛网过滤收集微胶囊, 用 1 mL DMSO 溶解蓝色结晶甲臞, 小心吸取上清液 100 μL, 酶标仪测定每孔的 A 值, 测定波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm。

Realtime RT-PCR 检测: 提取贴壁细胞和微囊化细胞的 RNA (培养了 10 d), 两步法进行反转录和实时 PCR, 反转录条件为 37 °C 15 min, 85 °C 15 s; 实时 PCR 条件为: 预变性 95 °C 30 s, PCR 反应 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 扩增

40 个循环, 所考察基因的引物设计见表 1。

表 1 肝细胞相关基因的引物设计
Table 1 The design of primers of genes related to functions of hepatocytes

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Function
ALB	F- GCC TGC TGA CTT GCC TTC ATT AG R- TCA GCA GCA GCA CGA CAG AGT A	Albumin
GSTA1	F- CAA GTG CCA ATG GTT GAG ATT GA R- CAG GTG GAC ATA CGG GCA GA	Glutathione S-transferase
GCLM	F- CAG CTG TTG ACT CAC AAT GAT CCA R- TGC GCT TGA ATG TCA GGA ATG	Ligase of glutamate and cysteine
NDUFA3	F- CAA GAA TGC CTG GGA CAA GGA R- GCC TTG TTG ATC ATG ACG GAG TA	NADH dehydrogenase
CYP1A1	F- CGG CCC CGG CTC TCT R- CGG AAG GTC TCC AGG ATG AA	Cytochrome P450 1A1
CYP2B6	F- TTA GGG AAG CGG ATT TGT CTT G R- GGA GGA TGG TGG TGA AGA AGA G	Cytochrome P450 2B6
CYP3A4	F- CAG GAG GAA ATT GAT GCA GTT TT R- GTC AAG ATA CTC CAT CTG TAG CAC AGT	Cytochrome P450 3A4
AKR1C1	F- AGA AAT GTG CGA TAT TTG ACC CTT G R- GCT GAA ATC ACC AAG CAG GAG AG	Reductase of Aldehyde and Ketone
EPHX1	F- TGA GAA CGT GGA GCC TGG TG R- AGT AGA TGG C AAA GCC CAG CA	Epoxide hydro-lase
UGT1A1	F- TGG CTG TTC C CAC TTA CTG CAC R- AGG GTC CGT CAG CAT GAC ATC	UGT transferase
COL1A1	F- TCT AGA CAT GTT CAG CTT TGT GGA C R- TCT GTA CGC AGG TGA TTG GTG	Collagen I
COL4A5	F- TGG CTG GCA ACT GTA GAT GTG TC R- CAT CGG CTA ATT CGT GTC CTC A	Collagen IV
VCAN	F- GTA TGC ACC TGT GTG CCA GGA R- GAA GGC AGA GGC ACC TGA ATG	Chondroitin sulfate
Integrin	F- TGT GTC AGA CCT GCC TTG GTG R- AGG AAC ATT CCT GTG TGC ATG TG	Integrin
E-cadherin	F- CGC CGA GAG CTA CAC GTT CA R- TGT CGA CCG GTG CAA TCT TC	E-Cadherin

白蛋白检测: 收集培养上清液, 按照白蛋白 Elisa 检测试剂盒进行操作 (Bethyl, montgomery, TX)。

主要观察指标: HepG2 细胞形态、活性、

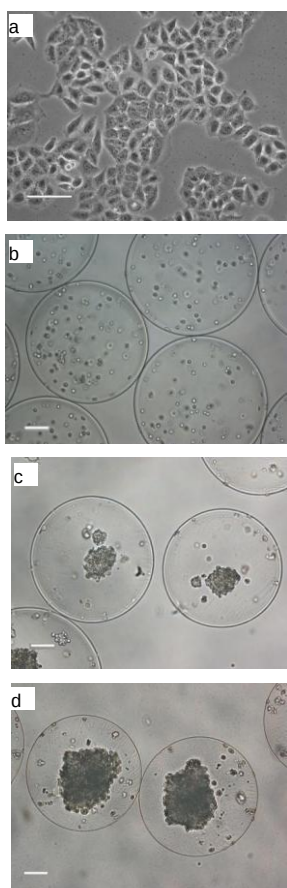
基因表达情况及白蛋白分泌水平。

设计、实施、评估者：设计为第一、二、三、四、七作者，实施为第一、五、七作者，评估为第一、六作者。

统计学分析：采用Origin 7.5软件中的One-way ANOVA分析进行处理，实验中的统计数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t -检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。统计学处理由第一、六作者完成。

2 结果

2.1 微囊化HepG2细胞培养后的形态结构 在贴壁培养中，HepG2细胞呈二维延伸生长(图1a)。而在微胶囊内，细胞聚集形成细胞团，并以三维的方式生长增殖，随着培养时间的延长，细胞团的粒径增大，培养12 d后细胞团的粒径可达到200~300 μm (图1b~d)，在随后的培养过程中，细胞团的粒径基本不再发生变化。



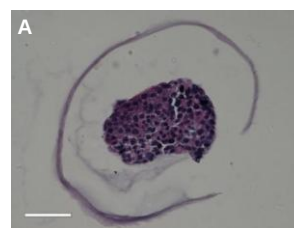
a: Monolayer culture (control group) ; b-d: Microencapsulated culture (days 1, 5, 12)

Figure 1 The configuration of HepG2 cells in different cultures (Bar=100 μm)

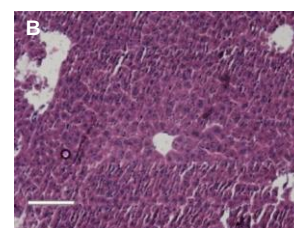
图1 HepG2细胞的生长形态特征(标尺: 100 μm)

对培养了12 d的微囊化细胞进行石蜡包埋及苏木精-伊红染色，如图2a显示，细胞在微囊内呈三维立体

生长，排列紧密，有规则，细胞间呈紧密连接，细胞核清晰蓝染，类似于在体的肝脏组织(图2b)，细胞团外围细胞几乎溶为一体。



A: Microencapsulated culture



B: The liver tissue of mouse

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of HepG2 cells (Bar=100 μm)

图2 苏木精-伊红染色观察HepG2细胞形态(标尺: 100 μm)

2.2 HepG2 细胞生长增殖情况 见图3。

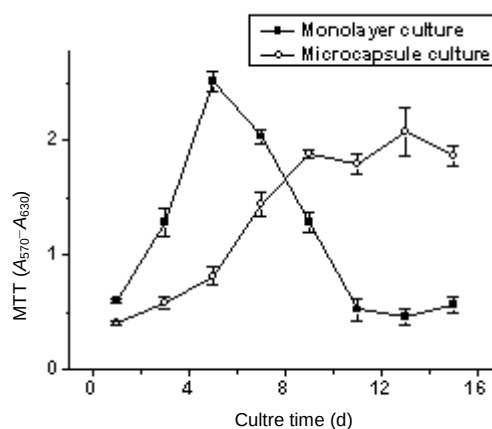


Figure 3 The effect of microencapsulated culture on the proliferation of HepG2 cells

图3 微囊化培养对HepG2细胞生长增殖的影响

平面培养的HepG2细胞生长几乎没有延滞期，细胞快速进入指数生长期，随后基本没有平台期，细胞活性快速下降，最后细胞从培养瓶中脱落、死亡。与平面培养相比，微囊化培养体系内的细胞增殖相对较慢，到第10天达到生长的平台期，随后，细胞活性基本维持在一定水平保持不变。

2.3 微囊化HepG2细胞的功能表达情况 利用Realtime RT-PCR技术，以平面培养为对照，考察了与肝细胞细胞功能相关的基因在微囊化HepG2细胞中的表达情况，与外源化合物代谢相关的基因在微囊化细胞

内的表达上调, 这些基因的表达产物主要参与肝细胞的解毒功能。如图4所示, 与单层培养相比, 参与 I 相代谢的细胞色素P450酶1A1, 2B6和3A4的的表达水平分别提高了(6.7±1.2), (20.4±1.8), (11.1±1.5)倍; 参与 II 相代谢的环氧化物水解酶EPHX1及尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 UGT1A1 的表达水平分别提高了(58.2±5.9), (9.4±1.3)倍。

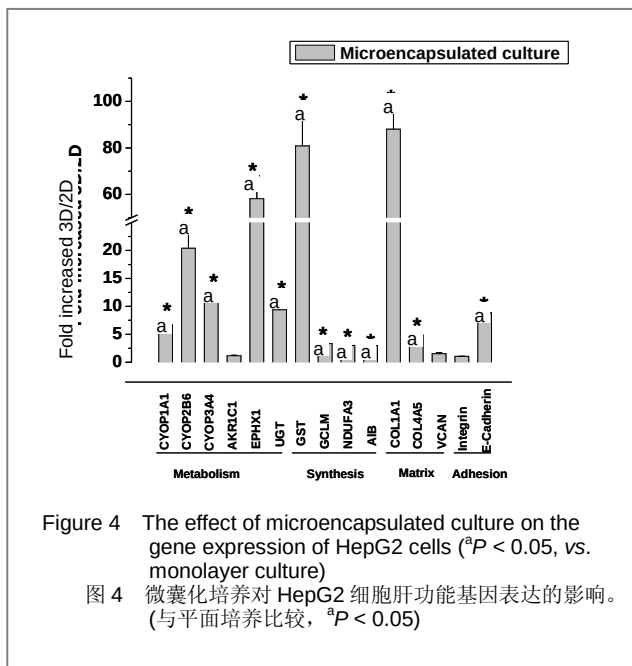


Figure 4 The effect of microencapsulated culture on the gene expression of HepG2 cells ($^aP < 0.05$, vs. monolayer culture)
图 4 微囊化培养对 HepG2 细胞肝功能基因表达的影响。(与平面培养比较, $^aP < 0.05$)

与肝细胞合成功能相关的基因在微囊化细胞内的表达呈不同程度的上调, 与合成谷胱甘肽相关的GSTA1及GCLM, 分别上调了(80.8±8.8)和(3.3±0.5)倍, 与NADH 脱氢酶相关的NDUFA3提高了(3.0±0.4)倍, 白蛋白的基因表达提高了(3.0±0.5)倍。

另外, 还考察了结构蛋白的基因在微囊化细胞内的表达情况, 与平面培养相比, 胞外基质的基因在微囊化细胞内的表达呈上调趋势, 合成 I、II 胶原及透明质酸的基因表达分别提高了(88.0±6.8), (4.8±0.8), (1.5±0.2)倍; 介导细胞-胞外基质连接的整合素蛋白在微囊化细胞内的表达几乎没有发生改变, 而介导细胞-细胞连接的E-钙连蛋白在微囊化细胞内的表达提高了(8.9±1.2)倍。

2.4 微囊化HepG2细胞的白蛋白分泌情况 以平面培养作对照, 考察了微囊化培养过程中白蛋白分泌的情况, 如图5所示, 随着培养时间的延长, 微囊化细胞分泌白蛋白的能力逐渐增强, 培养7 d以后, 白蛋白的分泌量达到最大值, 是对照组的3倍, 随后, 白蛋白的分泌水平基本维持在一定水平, 说明微囊化培养体系能够提高细胞白蛋白的分泌能力, 在培养过程中并能维持该能力。

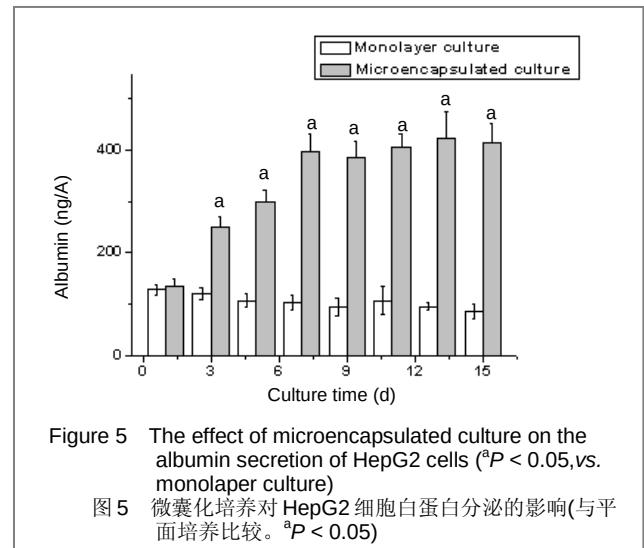


Figure 5 The effect of microencapsulated culture on the albumin secretion of HepG2 cells ($^aP < 0.05$, vs. monolayer culture)
图 5 微囊化培养对 HepG2 细胞白蛋白分泌的影响(与平面培养比较, $^aP < 0.05$)

3 讨论

自1980年, Lim和Sun^[13]将微囊化胰岛细胞用于治疗糖尿病以来, 微囊化技术逐步应用于生物医学领域。细胞在微囊内可聚集并生长形成类组织—细胞聚集体, 其特征更接近于体内细胞。本文考察了微囊化三维体系对肝细胞类组织化培养的影响, 包括细胞形态、生长和功能表达。

同其他三维培养方式一样, 在海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊内, 肝癌细胞系HepG2细胞也能够聚集成团生长, 并最终形成类似于机体组织的类组织体, 在本实验室前期的工作中也证明了该内容^[5]。在同样是三维培养体系的旋转壁式反应器中, 细胞在其中形成细胞聚集体, 但细胞的生长速率与平面培养几乎没有差异, 而在微囊化的培养过程中, 细胞的生长速率减慢, 这可能跟微囊内的基质—海藻酸钠有关, Stabler等^[12]报道了海藻酸钠对细胞生长的限制作用, 这说明, APA微胶囊在为细胞提供三维培养空间的同时, 一定程度上也限制了细胞的生长代谢, 但是, 这种限制作用也能使细胞的活性长期维持在一定水平, 从而使细胞的功能得到长期的发挥。

通过Realtime PCR和Elisa, 作者评价了有关肝功能的代谢和合成基因在微囊化细胞内的表达水平, 以及白蛋白的分泌情况, 结果显示, 相对于平面培养, 这些基因的表达水平显著提高, 该趋势与其他三维培养方式相同, 甚至在某些基因的表达上, 微囊化培养提高的更多, 这说明, 海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊作为一种三维培养体系, 能够实现细胞的类组织化培养。另外, 在海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊的三维培养体系内, I 型胶原、IV型胶原、钙粘素等结构基因表达水平也显著提高, 说明海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊所提供的微环境有利于肝细胞类组织的体

外构建, 结果也提示, 微囊化肝细胞功能的提高得益于肝细胞在微囊内的三维培养及微胶囊所提供的微环境。作为一种三维培养方式, 海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊能够提供适宜肝细胞生长的微环境, 与平面培养相比, 微囊化细胞的功能表达显著提高, 说明海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠微胶囊能够实现肝细胞的体外类组织化培养, 有望成为一种更具前景的三维培养模式, 应用于癌症治疗、高通量药物筛选以及肝组织工程的研究。

4 参考文献

[1] Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell. 2007;130: 601-610.

[2] Steinberg MS. Reconstruction of tissues by dissociated cells. Science. 1963; 141: 401-408.

[3] Hansen LK, Hsiao CC, Friend JR, et al. Enhanced morphology and function in hepatocyte spheroids: a model of tissue self-assembly. Tissue Eng. 1998;4: 65-74.

[4] Torisawa Y, Takagi A, Nashimoto Y, et al. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. Biomaterials. 2007; 28(3): 559-566.

[5] Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. Tissue Eng Part A. 2007; 15(3): 559-567.

[6] Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnol Bioeng. 2003; 83(2): 173-180.

[7] Lee J, Cuddihy MJ, Cater GM, et al. Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds. Biomaterials. 2009; 30(27): 4687-4694.

[8] Elkayam T, Amitay-shaprut S, Dvir-ginzberg M, et al. Enhancing the drug metabolism activities of C3A—A Human hepatocyte cell line—By Tissue engineering within alginate scaffolds. Tissue Eng. 2006;12(5): 1357-1368.

[9] Khalil M, Shariat-panahi A, Tootle R, et al. Human hepatocyte cell lines proliferation as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. J Hepatol. 2001; 34(1): 68-77.

[10] Zhang XL, Wang W, Li JJ, et al. Zhongliu. 2006;26(1):3-6. 张旭朗, 王为, 李锦军, 等. 微囊化肿瘤细胞生长及其基因表达的研究[J]. 肿瘤, 2006, 26(1): 3-6.

[11] Wang QY, Li SY, Xie YB, et al. Cytoskeletal reorganization and repolarization of hepatocarcinoma cells in APA microcapsule to mimic native tumor characteristics. Hepatol Res. 2006; 35(2): 96-103.

[12] Stabler C, Wilks K, Sambanis A, et al. The effects of alginate composition on encapsulated β TC3 cells. Biomaterials. 2001; 22(11): 1301-1310.

[13] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial pancreas. Science. 1980; 210(4472): 908-910.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家科技部“973”项目(2005CB522702), 国家自然科学基金重点项目(20736006), 国家 863 重大项目(2006AA02A140)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 本课题的创新之处在于通过使用 Realtime RT-PCR 技术考察了微囊化培养在基因表达水平上对肝细胞培养的影响, 通过这些信号的变化来衡量微囊化技术对肝细胞类组织化培养的影响水平, 为其用于肝组织工程提供实验依据。

课题评估的“金标准”: 检测肝细胞的功能除了白蛋白的分泌情况, 最好还应该检测其他功能指标。因为所用 HepG2 细胞源, 虽然其还保持着原代肝细胞的一些基本特征, 但是其功能丢失的较为严重, 因此, 本实验拟先以白蛋白作为指标来考察微囊化培养对细胞功能的影响。

设计或课题的偏倚与不足: 实验未能再增加一组阳性对照, 即机体肝组织的基因表达情况。

提供临床借鉴的价值: 肝细胞是一种对生长环境要求较高的细胞, 传统的体外培养中细胞的活性和功能很难得到维持, 课题的目的旨在通过体外微囊化培养来维持肝细胞的活性和功能, 通过这种方式可为肝细胞的体内移植及体外人工肝的构建提供依据, 并且, 对于药物的高通量筛选及药代动力学研究来说, 微囊化培养的研究具有广阔的前景。

外国专家修饰的医学英语句型：本刊英文部

中文含义	修前英文	修后英文
脾虚证相当于现代医学中的脾、胰、消化道和神经定位等功能的失调	Spleen deficiency in traditional Chinese medicine refers to the functional disorder of spleen, pancreas, intestines, and nervous position in modern medicine.	Spleen deficiency in traditional Chinese medicine refers to the functional disorder of spleen, pancreas, intestines, and nervous system in modern medicine.
磷酸盐缓冲盐水(PBS)	phosphate buffer solution	phosphate-buffered saline
蜷缩	scrunch	crouch
拱背	extrados	arched back