

基于量子点标记探针技术的肝癌细胞体外生长模式研究

方 敏¹, 陈梦圆², 刘璐璐², 应航洁¹, 陈 明¹

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江省放射肿瘤学重点实验室, 浙江 杭州 310022;

2. 浙江中医药大学第二临床学院, 浙江 杭州 310053)

摘 要: [目的] 建立肝癌细胞体外三维培养模型, 模拟在体肿瘤微环境, 在体外研究肝癌细胞侵袭转移的生物学行为特点。[方法] 基于 Matrigel 制作三维基质模型, 跟踪观察不同培养时间的细胞形态并三维重建, 同时利用荧光量子点标记分子探针实时监测 HCCLM9 的形态学以及动力学特征。[结果] 在该三维培养模型中, HCCLM9 细胞呈现出典型的肿瘤侵袭多步骤特征, 包括: 克服衰老, 局灶性增生活跃, 优势克隆侵袭。HCCLM9 细胞在接种后不同时间, 细胞及细胞间展现出不同形态, 呈现出血管拟态及不规则克隆, 同时伸出伪足, 促进细胞变形, 并向四周浸润生长, 证明肝癌细胞具备自身变形能力。[结论] 本研究成功建立体外人肝癌细胞培养三维模型, 表达 MT1-MMP 的伪足以及血管形成在肝癌侵袭转移过程中起关键作用。

关键词: 肝肿瘤; 量子点; 三维培养; 肿瘤侵袭

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)02-0114-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.02.B007

Study on in Vitro Growth Pattern of Hepatocellular Carcinoma Cell Line HCCLM9 Based on Three-dimensional Cell Culture and Quantum Dots Molecular Imaging

FANG Min¹, CHEN Meng-yuan², LIU Lu-lu², et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Key Laboratory of Radiation Oncology, Hangzhou 310022, China; 2. The Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: [Objective] To establish a new in vitro platform to study the invasive behaviors of HCC cells based on the three-dimensional cell culture and quantum dots molecular imaging. [Methods] By the Matrigel based three-dimensional cell culture platform, the cell morphological and cell growth characteristics were observed by inverted microscope and laser confocal microscope at regular time intervals. Cell invasion features were monitored by quantum dots based real-time molecular imaging techniques. [Results] On this three-dimensional cell culture platform, HCCLM9 cells exhibited typical multi-step invasive behaviors, including reversing cell senescence, active focal proliferation and dominant clones invasion. During the process, cells under the environment of three-dimensional cell culture showed spatio-temporal characteristics of biological behaviors. Cells fused first on the surface of matrix, then gradually infiltrated and migrated into deep matrix. The vasculogenic mimicry was clearly showed based on the quantum dots molecular imaging. In addition, cells in early stage mainly formed a mesh structure without clones or with few small clones whose edge was clear and smooth, and the cells were closely interconnected. As cellular growth continued, cell clusters gradually formed a large irregular clone with unsmooth and prominent edge, while the other remaining cells extended invadopodia. The invadopodia promoted cellular deformation and infiltrative growth by coordinating extra cellular matrix degradation with cell motility. The expressions of MT1-MMP in invadopodia were prominent based on the quantum dots immunostaining. [Conclusion] A novel three-dimensional cell culture platform has been successfully established, which in combination with quantum dots based molecular imaging, could mimic the in vivo tumor microenvironment and facilitate the study of invasive behaviors of HCC cells.

Subject words: hepatocellular carcinoma; quantum dots; three-dimensional cell culture; tumor invasion

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目(2016KYA048); 浙江省自然科学基金项目(LQ17H180003)

通讯作者: 陈 明, 副院长, 教授, 主任医师, 博士; 浙江省肿瘤医院放疗科, 浙江省杭州市拱墅区半山东路 1 号(310022); E-mail: chenming@zjcc.org.cn

收稿日期: 2017-04-15; **修回日期:** 2017-07-11

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 占全球肝癌患者的 40%以上^[1,2]。即使是小肝癌根治性切除, 术后 5 年转移复发率仍高达 43.5%^[3], 根本原因在于肝癌细胞的侵袭生物学行为。肝癌侵袭是一个多因素、多环节、多阶段、逐渐发展的过程, 涉及多分子异常及多信号通路的激活^[4]。微环境的差异一定程度上决定了肿瘤灶的发展, 因此, 研究肿瘤侵袭过程必须考虑细胞外间质 (extracellular matrix, ECM) 的作用以及细胞-间质间的相互作用^[5]。模拟肿瘤侵袭过程中肿瘤细胞所处的微环境, 并显示肿瘤细胞群体的形态变化和 ECM 重塑形成的三维形态结构显得至关重要^[6]。另外, 量子点 (quantum dots, QDs) 标记生物分子探针在细胞分子成像及定量检测分析方面有显著优势^[7,8], 尤其是在多分子成像^[9,10]和多种标志物检测方面^[9], 具有良好的应用前景。

本课题拟建立三维培养模型, 模拟在体组织形态及相关微环境, 结合荧光量子点标记分子探针技术的多分子成像优势, 建立新型肿瘤细胞培养平台, 在接近实体环境下研究肝癌细胞的侵袭行为。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂及仪器

人肝癌细胞株 HCCLM9 由本实验室提供, 用含 10% 小牛血清 (杭州四季青公司) 的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。三维培养所用 Matrigel 购自美国 BD 公司。使用日本 Olympus 公司的 BX51 荧光显微镜以及 DP-BSW 软件和激光共聚焦显微镜采集并记录图像数据。

1.2 基于 Matrigel 三维培养方法

在常规 24 孔板中置入直径 1 cm 的圆形盖玻片, 加入用 DMEM 稀释后的 Matrigel (DMEM:Matrigel 2:1) 100μl, 在 37℃培养箱中放置 30min, 待 Matrigel 凝固后, 加入 100μl 含有 HCCLM9 细胞的完全培养液 (DMEM+10%FBS+1%链霉素和青霉素), 细

胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。再加入完全培养液 1ml, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 每日更换培养液。

1.3 免疫荧光染色

细胞用 PBS 冲洗后, 4%多聚甲醛常温固定 10min, 2% BSA 封闭 30min, 加一抗 4℃过夜, PBS 冲洗后加荧光二抗 37℃孵育 2h, 冲洗后观察。本研究采用的一抗为小鼠抗人 MT1-MMP 单克隆抗体 (1:100 稀释, SANTA CRUZ 公司), 荧光二抗为 Dylight 549 山羊抗小鼠 IgG (1:200 稀释, Beyotime 公司)。

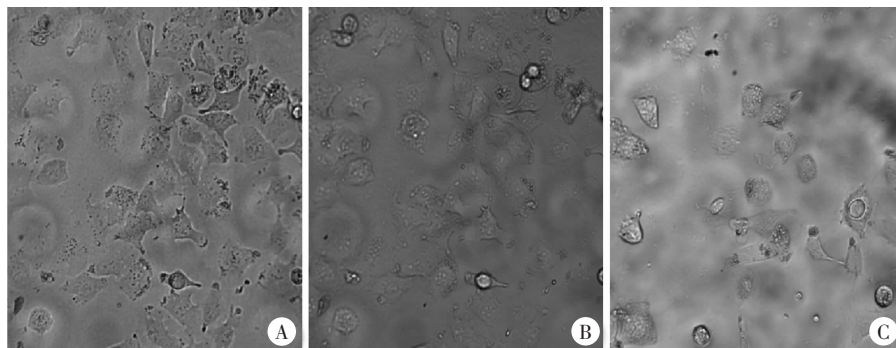
1.4 量子点荧光探针染色

细胞用 PBS 冲洗后, 4%多聚甲醛常温固定 10min, 2% BSA 封闭 30min, 加一抗 4℃过夜, PBS 冲洗后加生物素标记兔抗小鼠 IgG 37℃ 30min, PBS 冲洗后 2% BSA 封闭 30min, 加入亲和素标记的量子点 QD655 在 37℃孵育 2h, 冲洗后观察。一抗为小鼠抗人 MT1-MMP 单克隆抗体 (1:100 稀释, SANTA CRUZ 公司), 二抗为生物素标记兔抗小鼠 IgG (1:200 稀释, Beyotime 公司), 链霉素标记的量子点 QD605 (1:200 稀释, Invitrogen 公司)。

2 结果

2.1 人肝癌细胞株 HCCLM9 的三维模型构建

成功构建人肝癌细胞株 HCCLM9 的三维培养模型。激光共聚焦显微镜观察显示: 细胞先在胶面表层融合生长, 继而深层逐渐浸润迁移 (Figure 1)。证实该模型下不同胶面可观察到细胞不同的生长情况, 真正实现模拟在体肿瘤微环境。



Note: A~C: from top to bottom

Figure 1 Cellular morphology at different layers in 3D cultures under laser confocal microscope (x200)

2.2 三维模型中的细胞形态学结果

在早期细胞形成网状结构，未形成克隆或克隆形成数少，边缘清楚而光滑，并且细胞间连接紧密。随着细胞生长，逐渐形成大而不规则的克隆，边缘不整齐，其余未形成克隆的细胞，伸出伪足，促进细胞变形，向四周浸润生长，提示肝癌细胞具备自身变形能力。膜型基质金属蛋白酶(membrane-type matrix metalloproteinase-1, MT1-MMP) 可以降解 ECM 中的胶原并且突破肿瘤细胞基底膜等，是肿瘤侵袭转移的关键分子。结果显示 MT1-MMP 在肿瘤细胞的伪足部位蓄积，形成膜型突起。因此，基于量子点探针

技术检测 HCCLM9 细胞的 MT1-MMP 表达，以清晰显示三维模型下肿瘤细胞的形态学特征 (Figure 2)。

目前认为从正常细胞到转移性癌必须经过多个步骤：克服衰老，局灶性增生活跃，优势克隆侵袭，这些过程在本实验建立的三维培养中的典型表现可概括为 Figure 3 所示。

2.3 血管拟态

细胞接种后 12h，细胞均贴附在 Matrigel 上，大部分 HCCLM9 细胞为多边形，胞浆丰富，核圆形，居中。48h 后，部分肝癌细胞伸出突起，为长梭形，彼此之间呈镶嵌样生长。96h 后，肝癌细胞可明显沿着胶

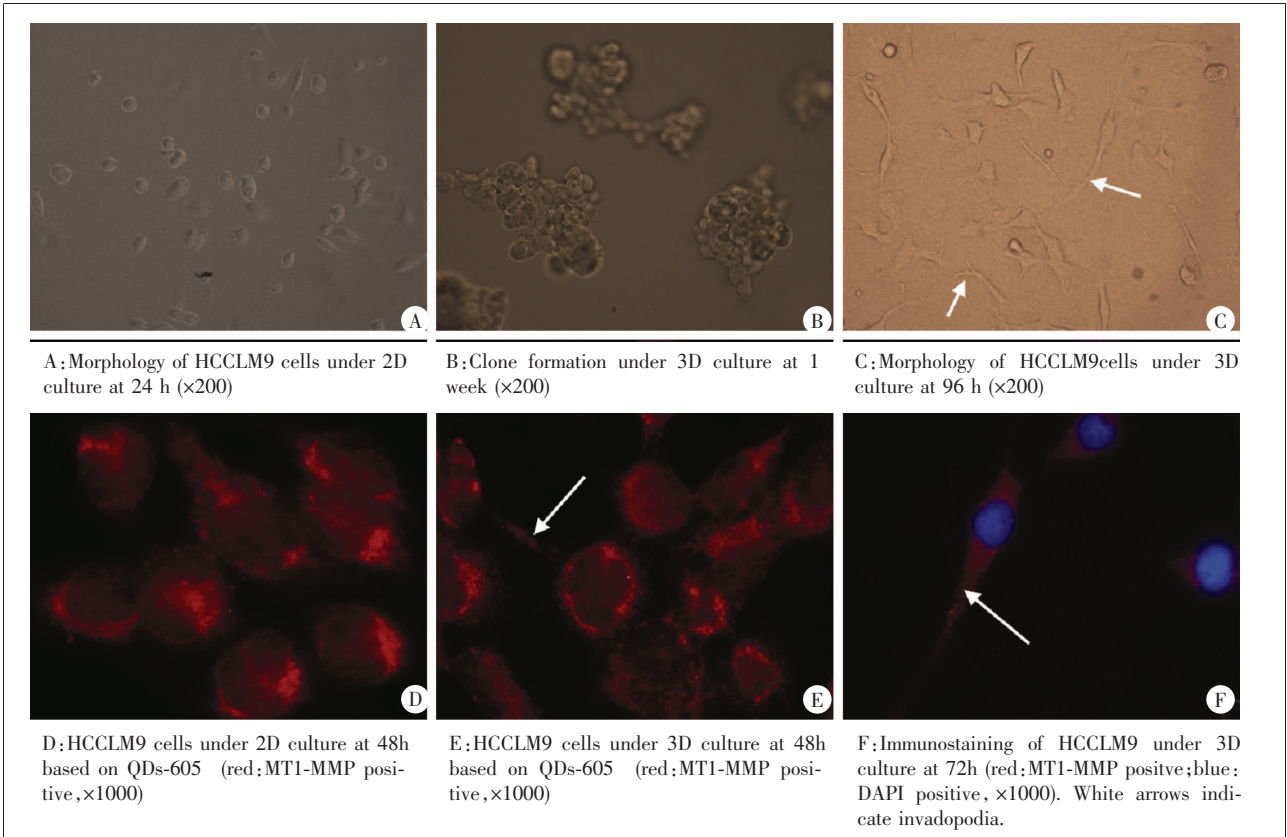


Figure 2 The morphologic characteristics of HCCLM9 cells under 2D or 3D culture

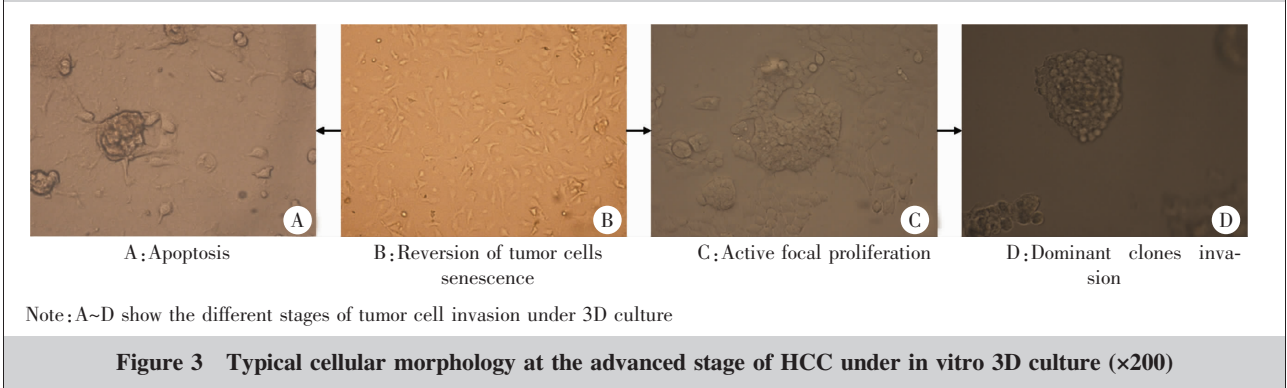
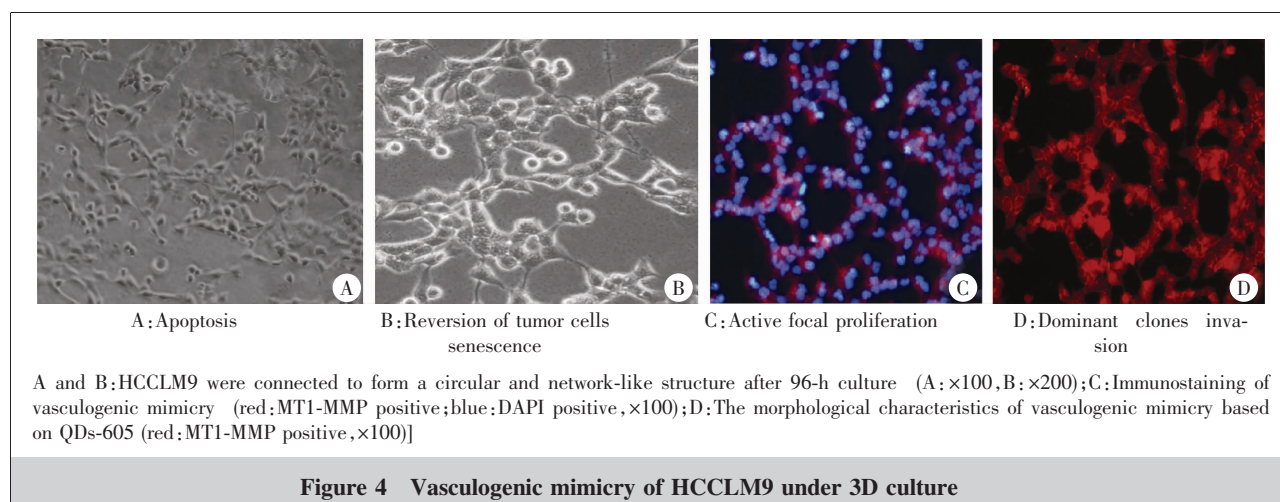


Figure 3 Typical cellular morphology at the advanced stage of HCC under in vitro 3D culture (×200)



原支架生长,伸出细长突起,彼此之间相互连接,形成腔隙、管状、环状和网络状结构,表明肝癌细胞具备形成血管拟态的形态学基础(Figure 4)。

3 讨 论

肿瘤侵袭转移是一个多阶段、多因素、多环节逐级渐进发展的过程,涉及一系列分子和信号通路的改变,最终导致肿瘤微环境的改变,促进肿瘤发生和发展^[4]。在肿瘤侵袭和转移过程中,肿瘤细胞在ECM的支架支撑下首先在原发灶增生,通过一些功能酶如MT1-MMP等,降解原发部位的支持间质以发生浸润和转移^[11]。

在传统的二维细胞培养下,肿瘤细胞无基质支持,细胞贴壁生长,失去一些原有的形态特征及生长分化能力,并不能真正反映细胞在体条件的实际生物学特征,故存在明显的局限性。与之相比,三维培养对研究肿瘤侵袭行为有明显的优势,能够保证细胞间以及细胞与间质间的相互联系,较好地模拟体内肿瘤微环境的物质和结构基础,并能展现细胞培养的直观性和条件可控性,操作方便。目前三维培养模型主要是利用与间质成分相似的生物胶构建的,例如I型胶原(鼠尾胶原)和重组基质胶(Matrigel)等^[12],能更好地模拟肿瘤侵袭转移过程中的在体肿瘤微环境,进一步更好地再现肝癌细胞的生物学行为,以更好地对肿瘤细胞和间质间的相互作用开展系统性研究。

本研究采用了以Matrigel为基质的三维培养技术,显示了二维以及三维培养下的细胞形态存在显

著差异,并且不同的基质结构最终决定了培养细胞的表型。肝癌细胞在不同阶段展现出肿瘤侵袭转移发生发展过程中的典型形态。并且,肝癌细胞可借助胶原支架生长,细胞伸出突起并在一定条件下形成伪足,彼此之间相互连接,共同构成腔隙状或环形网状结构,说明肝癌细胞具有自身变形能力,并可通过自身变形来模仿内皮细胞形成血管样通道以适应肿瘤内缺血缺氧的环境,为肿瘤的生长提供丰富的血供^[13]。

同时,基于量子点荧光探针成像技术显示肿瘤侵袭关键分子的表达情况,证实肿瘤细胞中有MT1-MMP的表达,并且与肿瘤细胞形成的突起与伸出的伪足存在高度相关,这与很多肿瘤研究一致^[14]。MMPs的表达主要受肿瘤细胞和间质的相互作用调节,能进一步诱导肿瘤细胞伪足的形成,促进肿瘤细胞变形和移动^[15,16]。该部分研究内容也显示三维基质能为研究肿瘤细胞和间质间的相互作用提供一个更好的环境,这些相互作用使肝癌细胞更具侵袭能力。相较于传统的免疫荧光成像,新型QDs成像能更清晰地显示细胞形态以及细小的伪足成像^[17]。

经典的肿瘤血管生成理论认为,实体肿瘤的生长和转移有赖于血管生成,当瘤团直径大于2mm时,需要激活血管内皮细胞构建血管而获取血供,否则肿瘤因缺血缺氧而坏死^[18]。血管生成对肿瘤发生、发展过程至关重要,是肿瘤增生、侵袭、转移复发的根本保障。肝癌是典型的多血管性肿瘤,总体预后差与其富含血管和较强的侵袭性密切相关^[19]。目前对肿瘤血管生成拟态的研究还存在争论,本研究通过肝癌细胞的三维培养证实肝癌细胞具备形成血管生

成拟态的能力,可能与肿瘤细胞的重塑性机制相关,并证实血管生成与 ECM 密切相关。这些结果表明,三维培养模型能更好地模拟肿瘤细胞在体的生物学行为特征,同时结合量子点标记分子探针成像技术的细胞三维培养模型,能较好展示肝癌细胞生长侵袭的生物学行为特征。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30.
- [2] Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990[J]. Int J Cancer, 1999, 83(1):18-29.
- [3] Tang ZY, Ye SL, Liu YK, et al. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(4):187-196.
- [4] Hoon DS, Kitago M, Kim J, et al. Molecular mechanisms of metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(2):203-220.
- [5] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024):1559-1564.
- [6] Erler JT, Weaver VM. Three-dimensional context regulation of metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26(1):35-49.
- [7] Chen C, Peng J, Sun SR, et al. Tapping the potential of quantum dots for personalized oncology: current status and future perspectives[J]. Nanomedicine(Lond) 2012, 7(3):411-428.
- [8] Wang Y, Chen L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine [J]. Nanomedicine, 2011, 7(4):385-402.
- [9] Chen C, Xia HS, Gong YP, et al. The quantitative detection of total HER2 load by quantum dots and the identification of a new subtype of breast cancer with different 5-year prognosis[J]. Biomaterials, 2010, 31(33):8818-8825.
- [10] Peng CW, Tian Q, Yang GF, et al. Quantum-dots based simultaneous detection of multiple biomarkers of tumor stromal features to predict clinical outcomes in gastric cancer [J]. Biomaterials, 2012, 33(23):5742-5752.
- [11] Turunen SP, Tatti-Bugaeva O, Lehti K. Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression [J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1864(11 Pt A):1974-1988.
- [12] Miao Z, Lu Z, Wu H, et al. Collagen, agarose, alginate and Matrigel hydrogels as cell substrates for culture of chondrocytes in vitro: A comparative study[J]. J Cell Biochem, 2017 sep 23.[Epub ahead of print]
- [13] Racordon D, Valdivia A, Mingo G, et al. Structural and functional identification of vasculogenic mimicry in vitro [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):6985.
- [14] Swayampakula M, McDonald PC, Vallejo M, et al. The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion [J]. Oncogene, 2017, 36 (45): 6244-6261.
- [15] Kraning-Rush CM, Carey SP, Califano JP, et al. The role of the cytoskeleton in cellular force generation in 2D and 3D environments[J]. Phys Biol, 2011, 8(1):015009.
- [16] Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, et al. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage[J]. Oncogene, 2009, 28(49):4326-4343.
- [17] Pohanka M. Quantum dots in the therapy: current trends and perspectives[J]. Mini Rev Med Chem, 2017, 17(8):650-656.
- [18] Ma JL, Han SX, Zhu Q, et al. Role of Twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells in vitro [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(4):686-691.
- [19] Sun T, Sun BC, Zhao XL, et al. Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: a study of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2011, 54(5):1690-1706.