

培养板悬滴法三维细胞培养模型建立及细胞活力检测方法比较

林鹤¹, 王婉秋², 焦佳媛², 杨昊坤³, 任利翔^{1*}, 邢立国^{1*}

1. 沈阳化工研究院有限公司安评中心, 辽宁 沈阳 110021

2. 沈阳化工研究院有限公司医药研究室, 辽宁 沈阳 110021

3. 沈阳化工大学, 辽宁 沈阳 110142

摘要: **目的** 采用普通 48 孔平底培养板结合悬滴培养法建立人结肠癌 HT29 细胞的三维培养模型, 并通过比较选择适合三维培养的细胞活力检测方法。**方法** 以 237.5、316.4、421.8、562.5、750.0、1 000.0/ μL 、每孔 10 μL 的接种量接种 HT29 细胞于 48 孔平底培养板底面形成液滴, 倒置培养 2 d 形成细胞球, 补充培养液后常规培养 3 d, 通过倒置显微镜测量细胞球体积; 采用酸性磷酸酶法 (APH)、MTT 法及 CCK-8 法 (直接测定及消化后测定) 测定细胞活力, 比较不同检测方法的优劣。**结果** HT29 细胞以 237.5~1 000.0/ μL 、每孔 10 μL 悬滴培养能形成较为规则的细胞球, 237.5~750.0/ μL 细胞球体积与接种量呈良好的线性关系; APH 法 A 值随细胞接种量增加而增大; MTT 及 CCK-8 未经消化直接测定组 A 值随细胞接种量增大增加缓慢, 消化后测定的 A 值-细胞接种量曲线与 APH 法相似, 但细胞球消化操作复杂, 且对细胞活力造成损伤。**结论** 采用 48 孔培养板悬滴法建立三维细胞培养模型, 并结合 APH 法进行细胞活力检测, 经济、准确、便于操作。

关键词: 悬滴三维培养法; HT29 细胞; 细胞活力检测; 酸性磷酸酶法 (APH); MTT; CCK-8

中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)08-1103-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.013

Establishment of hanging drop 3D cell culture model in cell culture plate and comparison of cell viability detection methods

LIN He¹, WANG Wan-qiu², JIAO Jia-yuan², YANG Hao-shen³, REN Li-xiang¹, XING Li-guo¹

1. Safety Evaluation Center, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd, Shenyang 110021, China

2. Pharmaceutical Research Laboratory, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd, Shenyang 110021, China

3. Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

Abstract: Objective To establish a hanging drop 3D cell culture model of human colon cancer cell (HT29) in 48-well cell culture plate, at the same time, through the comparison of several cell viability detection methods to determine the appropriate one for this cell culture way. **Methods** HT29 cells of 2 375, 3 164, 4 218, 5 625, 7 500 and 10 000/well were seeded in the bottom of the 48-well culture plate to form droplets. After 2 d of inversion culture, the cell spheroids were formed and incubated in medium for another 3 d. The volume of cell spheroids were measured, and the absorbance (A) values were detected through APH assay, MTT assay, MTT assay after digestion, CCK-8 assay and CCK-8 assay after digestion. The results were compared among different methods. **Results** After 5 d of culture, the cell spheroids were formed perfectly at the density of 2 375—10 000/well, and the volumes were in good linear with the original cell inoculation number at the density of 2 375—7 500/well. The A values of APH assay, MTT assay after digestion and CCK-8 assay after digestion increased with the increase of cell inoculation amount; But the cell ball digestion process was complex, and the cell viability was damaged. However, the A values of MTT and CCK-8 assay increased slowly. **Conclusion** The method of a hanging drop 3D cell culture model in 48-well culture plate combining with APH assay to detect cell viability is economical, accurate and easy to operate.

Key words: Hanging drop cell culture; HT29 cells; Cell viability detection; Acid phosphatase assay (APH); MTT; CCK-8

收稿日期: 2017-03-09

基金项目: 沈阳化工研究院资助项目 (2016-YTR02-12)

作者简介: 林鹤 (1989—), 男, 集安市人, 硕士, 主要从事新药活性评价研究。Tel: 024-62353466 E-mail: linhe@sinochem.com

*通信作者 任利翔, 高级工程师, 博士。E-mail: renlixiang@sinochem.com

邢立国, 教授级高工, 博士。E-mail: xingliguo@sinochem.com

肿瘤细胞三维培养是通过体外建立三维细胞网络,使细胞呈立体方式生长,细胞与细胞、细胞与基质间产生相互作用,以模拟体内肿瘤细胞生存环境及生长方式^[1]。三维培养被认为是最理想的肿瘤学体外药物测试模型,它能够再现体内实体瘤中的细胞异质性、细胞间信号传导、内部结构特征、细胞外微环境、生长动力学、基因表达及耐药性^[2-3]。因此,该技术在肿瘤生物学及药物活性筛选领域已成为研究热点。

悬滴培养法是利用含细胞液滴的表面张力形成无骨架三维细胞球,该方法简单便捷,但通常是在培养皿中形成细胞球,不便于单个细胞球的药物干预;而基于96孔板的商品化悬滴培养板价格昂贵。本研究目的是建立一种基于48孔板的、经济、操作方便的悬滴三维培养方法。

在药物活性筛选中,通过测定吸光度(A)值评价维持细胞生命的关键酶活力进而反映细胞活力,具有简单、经济、快速、无放射性污染等特点。其中,反映线粒体琥珀酸脱氢酶活力的MTT、WST-8(CCK-8)等方法广泛应用于二维培养的细胞活力检测,且在三维培养中也有应用^[3-5],但上述物质能否渗透到细胞球内部准确反映细胞球全部细胞的活力有待进一步研究。酸性磷酸酶(APH)法是针对三维培养的APH活力的检测方法^[6],通过加入表面活性剂提高底物的渗透能力。本研究旨在采用上述检测方法测定细胞活力,并进行比较,从而确定经济、准确、简便的细胞球活力检测方法。

1 材料

1.1 细胞系

人结肠癌HT29细胞购自中科院细胞库,使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,置于37℃、含5%CO₂的培养箱中培养。

1.2 主要试剂

RPMI-1640(货号10-040-CVR)、消化液(货号25-053-CI),购自美国Corning公司;胎牛血清(货号S711-001S),购自上海双洙生物科技有限公司;MTT(货号M8180),购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8检测试剂(货号B34304),购自上海毕傲图生物科技有限公司;4-硝基苯基磷酸二钠(货号71768),购自Sigma。

1.3 主要仪器

生物安全柜,购自美国热电;CO₂培养箱,购自美国纽埃尔;IX71型倒置显微镜,购自日本奥林巴斯;

Synergy HT酶标仪,购自美国伯腾;48孔培养板(货号0813A)、培养皿(货号704001),购自NEST。

2 方法

2.1 悬滴法三维细胞培养

贴壁培养的对数生长期HT29细胞,胰酶消化后离心收集细胞,制成不同浓度的细胞悬液,以密度为237.5、316.4、421.8、562.5、750.0、1000.0/μL、每孔10μL的接种量滴加到平底48孔板底面形成液滴,即每孔分别为2375、3164、4218、5625、7500、10000个细胞。倒置放入含有无菌水的带盖托盘中(由于液滴体积只有10μL,极易蒸发干涸,因此通过水盘提高局部湿度,防止液滴蒸发)培养2d后,每孔加入200μL完全培养液正置常规培养3d,进行后续相关检测^[7]。

2.2 细胞球体积

培养结束后,倒置显微镜下拍摄细胞球照片,Image J测量细胞球的长径(R_a)与短径(R_b),计算细胞球体积,并对细胞接种量作图。细胞球体积计算公式: $V=3.14 \times R_a \times R_b^2/6$ 。

2.3 APH法检测细胞活力^[6]

培养结束后,离心吸弃上清,每孔加入200μL的APH反应液(0.1mol/L醋酸钠、0.1%TritonX 100、2mg/mL 4-硝基苯基磷酸二钠),37℃孵育1.5h。反应结束后每孔加入20μL终止液(1mol/L NaOH),震荡混匀,测定405nm处吸光度(A_{405})值并对细胞接种量作图。

2.4 MTT法检测细胞活力

培养结束后,离心吸弃上清。未消化组每孔直接加入200μL含0.5mg/mL MTT的培养液;消化组每孔加入200μL胰酶消化液消化5min,加入培养液终止消化并吹散细胞球,离心吸弃上清后加入上述含MTT培养液。37℃孵育3h后,离心吸弃上清,每孔加入200μL二甲亚砜,震荡混匀后测定 A_{490} 值并对细胞接种量作图。

2.5 CCK-8法测定细胞活力

培养结束后,未消化组每孔直接加入20μL的CCK-8反应液;消化组离心吸弃上清,加入消化液消化5min,终止消化并吹散细胞球,离心吸弃上清后每孔加入200μL培养液及20μL CCK-8反应液。37℃孵育3h后,震荡混匀,测定 A_{450} 值并对细胞接种量作图。

2.6 数据处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 19.0统计学

软件进行组间 *t* 检验, 所有统计图表均由 GraphPad Prism 6 制作。

3 结果

3.1 细胞球形态及球体积

采用普通 48 孔平底培养板, 通过悬滴培养 HT29 细胞可以形成较为规则的细胞球, 在每孔 10 μL 、237.5~1 000.0/ μL 范围内, 细胞球直径分布在 300~700 μm (图 1), 操作简便、每孔含唯一细胞球利于后期检测。以细胞球体积对原始细胞接种量作图可见, 随细胞接种量的增加细胞球的体积逐渐

增大, 在每孔 10 μL 、237.5~750.0/ μL 接种量范围内呈良好的线性关系 (图 2A)。

3.2 细胞球活力检测结果

APH 检测结果显示, 随着细胞接种数量的增加, *A* 值逐渐增加, 呈现出较好的线性关系 (图 2B)。MTT 及 CCK-8 检测结果如图 2C、2D 所示, 未经消化直接测定组 *A* 值-细胞接种量曲线斜率较小, *A* 值随细胞接种数量增大而增加缓慢; 消化后测定的 *A* 值-细胞接种量曲线与图 2A、2B 相似, 与未消化组比较, 其 *A* 值在低接种数量时相当或显著减小 ($P <$

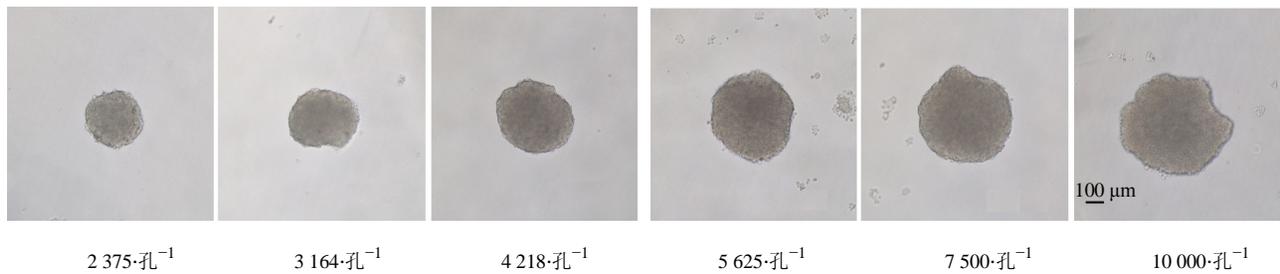
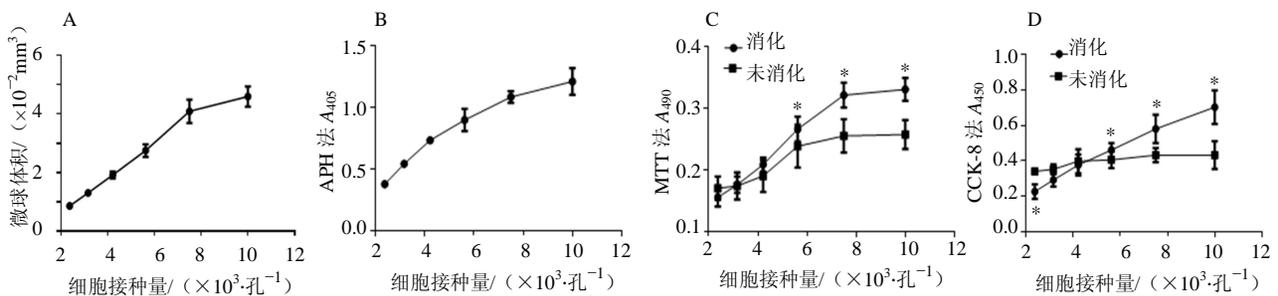


图 1 悬滴法培养 HT29 细胞球的形态学观察

Fig. 1 Morphology of HT29 cells incubated in hanging drop culture for 5 d



A-细胞球体积; B-消化及未消化 CCK-8 法; C-APH 法; D-消化及未消化 MTT 法; 与未消化组比较: * $P < 0.05$

A- cell sphere volume; B-CCK-8 method; C-APH method; D-MTT method; * $P < 0.05$ vs Non-digestion group

图 2 各检测指标-初始细胞接种数量曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Indicators detected-original cell number curve ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

0.05, 图 2D), 而在高接种数量时显著增大 ($P < 0.05$)。

3.3 检测方法比较

如表 1 所示, 利用最高细胞接种量组平均 *A* 值/最低细胞接种量组平均 *A* 值, 计算各检测方法的相对增长率, APH 法、未经消化 MTT 法、消化后 MTT 法、未经消化 CCK-8 法、消化后 CCK-8 法分别为 2.83、1.51、2.13、1.27 及 3.11 (表 1), 而最法、消化后 CCK-8 法更接近理论值。但考虑到细胞高与最低组初始细胞接种量之比为 4.21。因此, APH

表 1 各检测方法 *A* 值相对增长率 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Relative change ratio of *A* value in different detection methods ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

方法	A 值		相对增长率/%
	2 375·孔 ⁻¹	10 000·孔 ⁻¹	
APH 法	0.427±0.019	1.210±0.108	2.83
未消化 MTT 法	0.170±0.017	0.257±0.023	1.51
消化 MTT 法	0.155±0.019	0.330±0.018	2.13
未消化 CCK-8 法	0.340±0.018	0.432±0.078	1.27
消化 CCK-8 法	0.226±0.041	0.703±0.095	3.11

球消化需要较为复杂的操作,无法进行较高通量的筛选,且消化过程对细胞活力可能会造成损伤,因此 APH 法更适合进行细胞球活力检测。

4 讨论

本研究中采用 48 孔平底培养板结合悬滴培养法建立了 HT29 细胞的三维培养模型。该方法较传统培养皿悬滴培养提高了后期药物处理及指标检测的可行性;较商品化的 96 孔悬滴培养板筛选通量有所降低,但该方法无需昂贵的特殊构造的悬滴培养板以及专用的三维细胞培养液,具有操作简便、材料易得、价格低廉、适合较高通量药物筛选等优点。研究发现,细胞接种数量在 2 375~7 500/孔,悬滴倒置培养 2 d 后补充培养液继续培养 3 d,细胞球体积与接种数量间呈现较好的线性关系,而接种数量过高细胞球直径超过 700 μm 后由于营养和氧气等严重缺乏导致细胞球生长速度降低。

APH 法是基于胞质 APH 活性的定量研究方法,活细胞内的 APH 可将磷酸对硝基苯酯水解成对硝基苯酚,其在 405 nm 处有最大吸收^[6]。APH 法反应液中加入表面活性剂 TritonX 100,具有较强的裂解能力,可将细胞膜溶解,进而将细胞内的 APH 充分释放出来。Friedrich 等^[6]比较了 APH 法测定完整细胞球及经过消化处理的细胞球,其 A 值无明显差异,认为 APH 法不需要进行单细胞悬液的预处理。由于该法操作较为简便,且试剂价格较低,因此在细胞球活力检测中应用较多^[3, 6, 8]。

MTT 及 CCK-8 均可被线粒体内的脱氢酶还原,MTT 生成水不溶性蓝紫色甲臞,但可被二甲亚砜溶解;而 CCK-8 操作更为简便,其还原产物是黄色的水溶性甲臞,可直接进行吸光度测定。由于这两种方法在二维培养细胞活力检测中最为常用,许多三维培养研究也应用^[3-5],但并无相关研究证明 MTT 及 CCK-8 是否具有良好的渗透能力达到细胞球内部真实的反映所有细胞的活力。在本研究中,MTT 及 CCK-8 法消化处理后与未经消化处理测得的结果存在较大差异,证明这两种脱氢酶底物并不能完全渗透入细胞球内部,从而导致未经消化的细胞球 A 值随细胞量增加变化幅度较小,推测其仅与外层的细胞产生反应。而经过胰酶消化后,细胞球内的

细胞重新分散成单个细胞,使得细胞能与 MTT 及 CCK-8 充分反应,其 A 值-细胞接种量曲线与 APH 趋于一致。但在细胞球消化过程中可能会对细胞造成损伤,这导致本研究中最底的两个接种量消化后 MTT 及 CCK-8 的 A 值小于未经消化组。因此,在本研究所采用的细胞活力测定方法中,APH 法更加准确、简单,适合高通量细胞活力测定。

综上所述,本研究采用 48 孔培养板悬滴法建立三维细胞培养模型并结合 APH 法进行细胞活力检测,经济、准确、便于操作。

参考文献

- [1] Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, et al. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again [J]. J Biotechnol, 2010, 148(1): 3-15.
- [2] Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45745-45756.
- [3] Costa E C, Moreira A F, Melo-Diogo D D, et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(8): 1427-1441.
- [4] Wan Y H, Yeap S K, Chai L H, et al. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay [J]. Plos One, 2012, 7(9): e44640.
- [5] Kang A, Seo H I, Chung B G, et al. Concave microwell array-mediated three-dimensional tumor model for screening anticancer drug-loaded nanoparticles [J]. Nanomedicine, 2015, 11(5): 1153-1161.
- [6] Friedrich J, Eder W, Castaneda J, et al. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay [J]. J Biomol Screen, 2007, 12(7): 925-937.
- [7] Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids [J]. J Vis Exp, 2011, 51: e2720.
- [8] Yeon S E, Da Y N, Lee S H, et al. Application of concave microwells to pancreatic tumor spheroids enabling anticancer drug evaluation in a clinically relevant drug resistance model [J]. Plos One, 2013, 8(9): e73345.