

Application of Three-Dimensional Culture in the Study of Drug Resistance of Leukemia Cells

Jian Liu¹ Limei Li² Arong Jin^{2*}

1. Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, 010050, China

2. Department of Hematology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Inner Mongolia, 010017, China

Abstract

Acute leukemia (AL) is a malignant tumor of the hematological system with a high degree of heterogeneity. The resistance of leukemic cells to chemotherapeutic drugs has become a key problem restricting the treatment of leukemia. Cell culture model in vitro is an important experimental method to study the occurrence and development of acute leukemia. Compared with the traditional two-dimensional cell culture, the three-dimensional cell culture model can simulate the microenvironment of leukemia more effectively, which provides a good experimental platform for exploring the biological characteristics of leukemic cells. In recent years, more and more researchers use three-dimensional cell culture model to study cell resistance, in order to provide more effective potential therapeutic drugs. This paper summarizes the recent advances in three-dimensional culture and its application in the study of drug resistance of AL in vitro.

Keywords

acute leukemia; drug resistance of cell resistances; three-dimensional culture

三维培养在研究白血病细胞耐药性方面的应用

刘健¹ 李丽梅² 金阿荣^{2*}

1. 内蒙古医科大学, 中国·内蒙古 呼和浩特 010050

2. 内蒙古自治区人民医院血液科, 中国·内蒙古 呼和浩特 010017

摘要

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是血液系统恶性肿瘤, 具有高度的异质性。白血病细胞对化疗药物耐药成为制约白血病治疗的关键难题。体外细胞培养模型是研究急性白血病发生、发展的重要实验方法。与传统的二维细胞培养相比, 三维细胞培养模型能更有效地模拟白血病体内微环境, 为探索白血病细胞生物学特性提供了良好的实验平台。近年来, 越来越多的研究者应用三维细胞培养模型进行细胞耐药性研究, 以期提供更有效的潜在治疗药物。论文总结了近年来关于三维培养及其在 AL 耐药性的体外研究中的应用。

关键词

急性白血病; 细胞耐药性; 三维培养

1 引言

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是一组高度异质性的血液系统恶性肿瘤, 表现为血液细胞在其生长、分化和发育的某一阶段发生恶性病变。目前, 临床治疗该疾病的方法仍以化学治疗为主, 但有约 20% 的患者无法取得理想的效果, 患者的

耐药性高, 对治疗并不敏感, 甚至在化学治疗后出现复发。而制约化学治疗成功与否的关键在于患者对于药物的耐药性^[1]。

因此, 研究白血病细胞耐药机制对 AL 的治疗尤为重要。

组织培养是研究从正常发育到疾病等许多方面细胞功能的重要工具。目前, 研究急性白血病发生、发展的实验方法主要是体外细胞培养。体外细胞培养通常包括二维细胞培养和具备空间结构的三维细胞培养。在白血病细胞研究中, 传统的二维 (2D) 细胞培养方法依赖于细胞附着在组织培养皿的固体基质上或在液体培养基中悬浮生长的能力, 不能充分体现细胞复杂的体内结构和反应细胞的真实状态^[2-3], 而三维 (3D) 培养允许细胞向各个方向生长, 细胞在空间运动方面

【作者简介】刘健 (1993-), 男, 在读研究生, 内蒙古医科大学临床医学院。

李丽梅 (1981-), 女, 博士研究生, 硕士研究生导师, 内蒙古自治区人民医院血液科副主任医师。

【通讯作者】金阿荣 (1971-), 女, 硕士研究生导师, 内蒙古自治区人民医院血液科主任医师。通讯邮箱 JxP-003@163.com。

更接近于人体内骨髓造血环境,使细胞的基因表达、信号传递更具生理学相关性,与体内白血病细胞的生物学形态、增殖速率以及对化学、生物疗法的反应更为相近^[4-5]。

2 3D 培养

2.1 3D 培养的概念

哺乳动物细胞生物学的研究往往依赖于建立的体外培养模型,以使细胞在实验室中能在不同的测试条件下研究特定的生物学机制。这些模型的质量以及它们如何表示真实组织中细胞的行为,对产生的数据的价值和如何使用这些数据实际问题起着至关重要的作用。特别重要的是要认识到细胞的结构如何影响其功能,以及如何使用体外培养模型来更接近的代表真实组织的结构^[6]。传统的2D培养方法对体内分化、增殖和细胞功能至关重要的细胞外基质成分、细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用都无法准确的模拟,无法准确地体现出体内复杂的生理环境,因此成为体外研究细胞功能的一个局限。

3D培养是将细胞接种到具有三维结构的不同材料载体上,在适宜的条件下,在培养体系中培养,使细胞增殖分化,分泌特定的细胞外基质,形成三维细胞-载体复合体。它不仅为细胞提供了三维空间结构,使细胞之间形成合适的空间分布和联系,还为细胞的生长和分化提供了特定的信号,形成了与体内组织相似的细胞生长微环境^[7-9]。

2.2 2D 培养与 3D 培养比较

物理构象改变及细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间信号传递增加使3D细胞在多方面与2D细胞存在差异(见表1)。首先,2D细胞形态扁平,这种形态影响细胞核形状,进而影响基因表达和蛋白质合成。其次,2D细胞只有横向的细胞与细胞相互作用,细胞增殖速率快而分化能力降低,而3D细胞的增殖速率明显低于2D细胞。再者,由于2D细胞的接触抑制作用,细胞长到一定密度后即停止生长,3D细胞则可以进行长时间培养。

表1 2D细胞与3D细胞的比较

培养结果	2D 培养	3D 培养
细胞形态	扁平,不符合体内细胞生长状态	立体,符合体内细胞生长状态
细胞增殖	倍增时间短	倍增时间长
培养时间	由于接触抑制,长到一定密度停止生长	可进行长时间培养
细胞交流	有限的细胞-细胞交流,生理学相关性弱	合适的细胞-细胞交流,生理学相关性强

2.3 3D 培养的方法

3D培养的方法大致可以分为无支架和基于支架的培养

系统,无支架系统主要包括多细胞聚集体的形成,通常被称为球体,在这些聚集集体中,细胞形成自己的细胞外基质成分,不需要外源支架或基质的支撑,这种结构可以通过各种方式和使用替代材料来制造。由于球体中心氧气和营养物质的运输有限,球体表面有增殖细胞的区域,中心多为静止的细胞,更大的球体可能在中心包含坏死细胞,因此其应用前景较为局限。基于支架的培养系统在医学生物研究中的应用则较为广泛,根据支架的材料来源分为天然支架和合成支架。天然支架通常基于细胞外基质的各种成分,如胶原蛋白、纤维蛋白和透明质酸,也可以包括其他天然衍生材料,还包括明胶和海藻中的藻酸盐。合成支架包括有机高分子材料、无机生物材料、纳米材料和复合材料等。

目前,常用的有合成水凝胶支架、丙交酯-乙交酯共聚物支架、聚苯乙烯支架、聚乳酸支架以及聚己内酯支架等。合成材料制成的支架也有其独特的优点,如明确的化学成分和可调的机械性能,并且可以影响细胞分化和细胞黏附。总之,这些基于支架结构的三维细胞培养体系优势是除了提供细胞外基质蛋白外,还提供了糖、脂质、氨基酸、激素及其他可溶性生长因子,能更好地反映体内肿瘤微环境^[10]。

3 3D 培养在研究白血病细胞耐药性方面的应用

3D培养以其更接近生理的形态和功能,逐渐成为药物筛选、干细胞研究和组织工程领域的研究热点。在研究细胞耐药性方面,3D培养所表现出的优势越来越明显。

中国学者郭军及其研究小组用聚己内酯(PCL)作为3D培养支架,比较了急性淋巴细胞白血病(ALL)Jurkat细胞株2D培养与3D培养在细胞增殖、群体、及耐药性等方面的差异。该小组分别用Ara-C和DNR来处理Jurkat细胞并测定2D培养板系统(TCPS)、无涂层PCL支架(UPS)和涂层聚己内酯支架(CTCPS)对Jurkat细胞的药物敏感性。结果显示:TCPS作用48、144、168h后,细胞增殖分别降至 $89.58 \pm 3.26\%$ 、 $62.86 \pm 6.84\%$ 和 $53.36 \pm 3.37\%$ 。用CTCPS培养的细胞在48h、144h、168h的细胞增殖率分别为 $103.98 \pm 5.3\%$ 、 $88.69 \pm 2.19\%$ 、 $77.11 \pm 3.47\%$,UPS对药物的敏感性介于TCPS和CTCPS之间,48h、144h、168h的相对百分量分别为 $87.98 \pm 3.74\%$ 、 $73.28 \pm 5.5\%$ 、 $63.65 \pm 0.81\%$ 。与TCPS和UPS相比,在CTCPS上培养的细胞对Ara-C和DNR的耐药性均有所提高。为了进一步证实其作用机制,

郭军及其研究小组使用了酪氨酸激酶受体-盘状结构域受体(DDR1)受体酪氨酸激酶抑制剂(DDR1-IN-1)来阻断DDR1。通过阻断DDR1的功能,白血病细胞对化疗药物的敏感性增强。在分子水平上,DDR1和转录因子STAT3的表达上调与化疗耐药增加有关。在Ara-C、DNR或它们的联合作用下,DDR1特异性抑制剂DDR-IN-1抑制DDR1活性可加速细胞死亡。这些结果表明,3D培养系统可支持化疗药物对Ara-C、DNR或它们的联合耐药,耐药机制是通过DDR1/STAT3途径实现的,至少部分概括了体内条件下的耐药性。因此,3D结构在提供抗药性方面也很重要。有趣的是,DDR1在支架内诱导的细胞黏附介导的耐药性与临床相似,这表明肿瘤细胞的三维培养重现了体内的肿瘤环境^[11]。同样,Laura J. Bray小组检测了四种白血病细胞系KG1a、MOLM13、MV4-11和OCI-AML3以及急性髓系白血病患者标本的生长情况。研究发现,与2D悬浮培养相比,在3D培养中显示出对柔红霉素(DNR)和(Ara-C)更高的耐药性^[12]。

综上所述,仿生结构是药物临床试验中的一个重要参数。因为在某些情况下,细胞在2D培养中对药物敏感,但在3D培养中耐药通过与临床试验的比较,发现3D培养能更好地反映白血病细胞的耐药性。一方面,具有较长时间支持白血病细胞的仿生三维支架在药物筛选方面具有巨大的潜力;另一方面,针对药物靶点,可以设计治疗白血病的药物,3D细胞培养系统的应用使研究人员能创建更好的体外模型,从而从体外研究中获得更真实的生理结果。因此,3D培养的使用将降低治疗和制药产品的总体开发成本,并缩短上市时间。

4 结论

3D培养为研究细胞与细胞之间的相互作用提供了一个专门的平台,解决了当前培养模型的一个关键挑战。这一体外培养系统允许对患者细胞反应进行个性化分析,为细胞耐药性研究提供了新的见解。

虽然3D培养表现出比2D培养的众多优势。但是目前并没有一种特定的解决方案可以满足所有要求,研究人员必须根据自己的需要选择合适的方法。将这项技术与细胞生物学中的其他现代资源(例如,人类干细胞)结合使用,通过3D培养研究细胞耐药性的特征,并且研究如何在3D培养中逆转耐药性,为药物研发提供新的依据。这些模型的应用将有助于推进基础研究,提高化合物的预测准确性,并减少动物在生物医学科学中的使用。

参考文献

- [1] Michael J. Brisco, Pamela J. Sykes, Gaynor Dolman, et al. Early Resistance to Therapy during Induction in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. *CANCER RESEARCH*, 2000(60):521-524.
- [2] Amelian A, Wasilewska K, Megias D, et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development.[J]. *Pharmacological Reports*, 2017(05):861-870.
- [3] Lovitt C J, Shelper T B, Avery V M. Cancer Drug Discovery: Recent Innovative Approaches to Tumor Modeling[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2016(09):885-894.
- [4] Ravi M, Paramesh V, Kaviya S R, et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2015(01):16-26.
- [5] Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning[J]. *Front Pharmacol*, 2018(09):6.
- [6] Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro[J]. *Journal of Anatomy*, 2016(11):746-756.
- [7] Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro[J]. *J Anat*, 2015(06):746-756.
- [8] Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research[J]. *Cancers(Basel)*, 2019(08):1098.
- [9] Rödling L, Schwedhelm I, Kraus S, et al. 3D models of the hematopoietic stem cell niche under steady-state and active conditions[J]. *Sci Rep*, 2017(01):4625.
- [10] Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional(3D) culture systems[J]. *Semin Cancer Biol*, 2005(05):405-412.
- [11] Laura J. Bray, Marcus Binner, Yvonne Körner, et al. A three-dimensional ex vivo tri-culture model mimics cell-cell interactions between acute myeloid leukemia and the vascular niche[J]. *Sci Rep*, 2017(07):1215-1226.
- [12] Guo Jun, Zhao Chunting, Yao Ruyong, et al. 3D culture enhances chemoresistance of ALL Jurkat cell line by increasing DDR1 expression[J]. *Exp Ther Med*, 2019(03):1593-1600.