

HepG2 细胞在模拟微重力条件下的生长研究*

——体外细胞三维生长模型构建

徐大勇 汪 蕴 丰美福**

(中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 将人肝癌细胞 (HepG2) 接种于生物可降解支架聚羟基乙酸 (polyglycolic acid, PGA) 上, 采用模拟微重力方法, 在具有低剪应力和适宜气体扩散的旋转细胞培养系统 (RCCS) 中培养, 构建体外三维培养模型. 通过扫描电镜、透射电镜、RT-PCR、流式细胞术等方法观察分析. 结果表明, 细胞在此模型中生长良好, 细胞呈多面体, 含有丰富的微绒毛、线粒体以及胞间有紧密连接形成. 该系统有利于细胞形成三维结构, 更接近于体内细胞实际生长状况. 另外, 通过黏附分子表达分析, 表明该模型重现了肝癌细胞某些体内侵袭转移特征. 一些在肿瘤细胞侵袭和转移过程中具有重要作用的细胞黏附分子 (cell adhesion molecules, CAMs) 表达有了显著的变化, 其中 E-钙粘素 (E-cadherin) 表达降低, CD44、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1, CD54) 以及整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$, CD29) 表达增高. 在体外实验中, 对实验模型的适当选择是得到理想客观实验结果的必要前提, 采用模拟微重力的方法构建的体外细胞三维培养模型, 将为肿瘤生物学研究、药物敏感性试验等提供更为理想的研究模型.

关键词 HepG2, 模拟微重力, 三维培养, 旋转细胞培养系统, 聚羟基乙酸, 细胞黏附分子
学科分类号 Q81

目前体外研究或检测通常采用单层细胞培养方法, 如药物筛选或药物敏感性试验等. 但事实上在体内, 细胞与细胞、细胞与基质间的相互关系都是三维的, 因而单层培养的细胞和体内的实际状况相去甚远, 往往会带来假阳性或不切合实际的结果, 导致时间、财力和人力上很大的浪费. 近年来兴起的细胞三维培养和组织工程研究, 由于其更加接近体内的真实状况和在生物医学上广阔的应用前景而备受各国重视, 发展极其迅速. 利用组织工程策略建立的体外肿瘤细胞三维生长模型, 对于细胞生物学和抗肿瘤药物的筛选等将是一个更为理想与合理的体外研究方法^[1]. 这在基因表达^[2]、骨组织构建^[3]、干细胞生长^[4-6]以及肿瘤发生发展^[7,8]等诸多方面已经进行了研究和探讨. 例如, 以胶原作细胞生长支架的三维培养模型, 研究维甲酸调节头颈癌细胞放疗敏感性^[9]以及脑细胞三维培养在脑肿瘤的浸润、脑细胞分化多方面的应用^[10]等等.

美国航空航天局 NASA 设计的旋转细胞培养系统 (RCCS) 是一种基于模拟微重力效应的细胞培养装置, 具有独特的流体力学特征与低剪应力等优点, 有利于细胞的三维生长. 本文用人肝癌细胞系 HepG2 细胞为样品, 以可降解的聚羟基乙酸 (PGA)

为支架, 采用模拟微重力效应的培养方法, 以期建立一个更接近于体内肿瘤生长状况的体外细胞三维生长模型, 为肿瘤生物学与药物作用的体外研究提供更真实可行的实验模型和更为合理的研究方法.

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2 细胞株来源于本室, 由美国菌种保存中心 (ATCC) 建株. TaqDNA 聚合酶、逆转录试剂盒 (Promega 公司); TRIZOL™ 总 RNA 抽提试剂 (GIBCOBRL 公司); 引物合成 (上海博亚生物技术有限公司); 葡萄糖 (glucose) 检测试剂盒 (北京中生生物公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (南京建成生物公司); 甲胎蛋白 (AFP) 检测试剂盒 (北京邦定泰克生物公司); FITC 标记 CD44s 单抗 (Ancll 公司); PE 标记钙粘素 (E-cadherin) 单抗 (Santa Cruz 公司); PE 标记 CD54 单抗, FITC 标记 CD29 单抗 (整合素 $\beta 1$) 以及荧光标记同型抗体 (BD 公司); 扫

*中国科学院重要创新方向性项目 (KSCX2-SW-322).

** 通讯联系人. Tel/Fax: 010-62571017, E-mail: fengmf@ioz.ac.cn

收稿日期: 2006-06-23, 接受日期: 2006-07-31

描电镜(JEOL, JSM-5600LB, 日本), 倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂); 透射电镜 (JEM-1230, 日本), 流式细胞仪(Becton Dickinson); 聚羟基乙酸 (PGA) 支架和旋转细胞培养仪 (Synthecon Inc Houston TX 公司).

1.2 PGA 支架的准备

将 PGA 支架切割成规则的 5 mm × 4 mm × 1 mm. 在接种细胞前, 置于 70% (体积比)乙醇溶液灭菌过夜, 然后用无菌磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS) 溶液洗 3 次^[11].

1.3 细胞培养

按常规用 0.25%胰酶消化收获 HepG2 细胞, 以 1 × 10⁶/ml 的密度接种到 RCCS 的 50 ml 培养室, 同时接种灭菌 PGA 支架. 灌注含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液直到充满整个 RCCS 培养室, 确保无气泡、无渗漏. RCCS 培养系统, 置于培养箱内, 转速为 20~30 r/min 以使三维培养物处于悬浮状态. 每 24 h 更换新鲜培养液, 取样观察细胞生长状态和聚集的程度. 可采用台盼蓝染色确定细胞的存活状态. 取样及更换培养液时注意保证无菌条件^[12]. 以常规平面培养作为对照.

1.4 形态学鉴定

培养一定时间后, 用倒置相差显微镜观察细胞生长状态及聚集程度, 以及 PGA 表面的细胞层次. 在光镜下观察到多层细胞覆盖聚集的 PGA 支架时, 三维形态形成, 收获培养物, 将培养物用 10%福

尔马林固定后, 石蜡包埋, 连续切片 4 μm, 苏木精 - 伊红(H.E.)染色后镜检观察其生长情况. 做电镜观察时, 用 PBS(pH 7.4)洗涤三维培养物, 2.5%戊二醛室温固定 1~2 h. 随后用 1%锇酸室温固定 1~2 h, 经乙醇系列脱水. 最后加入乙酸异戊酯, 室温静置 2 h 再进行临界点干燥, 真空喷金, 扫描电子显微镜观察及照相. 另取三维培养样品用相同方法进行样品固定和脱水, 然后进行环氧树脂包埋及切片, 最后用透射电镜观察及照相.

1.5 细胞代谢检测

分别于培养的不同阶段, 新鲜换液培养 24 h 后取其培养上清, 4℃离心 10 min, 按检测试剂盒说明, 测定上清液中每 1×10⁶ 细胞 24 h 内的葡萄糖消耗量及乳酸脱氢酶活性.

1.6 甲胎蛋白 (AFP) 检测

采用酶联免疫反应(ELISA)检测细胞内 AFP 表达. 分别于培养的不同阶段, 新鲜换液培养 24 h 后取其培养上清, 在 10 000 r/min, 4℃条件下离心 10 min, 留取上清, 按操作说明书进行检测.

1.7 RT-PCR 分析

依据说明书操作, 抽提细胞总 RNA 并进行 CD29、纤粘连蛋白(fibronectin, FN)、层粘连蛋白(laminin, LN)、CD44、CD54、E-cadherin 基因表达分析. 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测. 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参, 所用引物序列及产物长度见表 1.

Table 1 Primers and expanding product size of RT-PCR

Primer	Sequence	Product size/bp
GAPDH	F 5' CCTTCATTGACCTCAACTACA 3' R 5' GAGATGATGACCCCTTTTGG 3'	259
CD29	F 5' TGAAGGGCGTGTGTGGTAGAC 3' R 5' GTCCCGACTTTCTACCTTGGT 3'	556
FN	F 5' AACAACTCTTCCGAACCTTAT 3' R 5' GGACTCAATCCAAATGCCTCTAC 3'	255
LN	F 5' CGATTTCCGTTGTGACGC 3' R 5' ACGGCATCACCAATCTCA 3'	309
CD44	F 5' CTCCACCTGAAGAAGATTGTACATC 3' R 5' ATTCTGTCTGTGCTGTGCGGTGAT 3'	289
CD54	F 5' CAGTG ACCATCTACAGCTTT CCGG 3' R 5' GCTGCTACCACAGTGATGATGACAA 3'	675
E-cadherin	F 5' CGACCCAACCCAAGAATCTA 3' R 5' AATGGCAGGAATTTGCAATC 3'	238

1.8 细胞黏附分子表达测定

采用流式细胞术检测. 分别收获经常规与三维培养 7 天的细胞, 经 PBS 洗 2 次后, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入荧光染料标记的单抗, 于 37°C 温箱孵育 20~30 min(或冰上 45~60 min), 再以冰 PBS 洗 2 次, 500 目筛网过滤后上机检测. 结果由 CellQuest 3.0 软件分析获得. 各实验组平行 3 次或以上重复. 背景荧光为同型荧光抗体标记的对照. 每次至少计数 5 000 细胞, 数据用 CellQuest3.0 分析.

2 结 果

2.1 形态学观察

2.1.1 倒置相差显微镜观察显示, 平面常规培养细胞呈单层铺展状态(图 1a). 在 RCCS 培养中, 细胞首先贴附到 PGA 支架上呈梭状或扁平多边形(图 1b). 随着细胞不断增殖, 密度逐步增大, 细胞变为半球形, 以单层布满整个 PGA, 多层排列的细胞首先在支架间形成, 随后覆盖整个团块(图 1c).

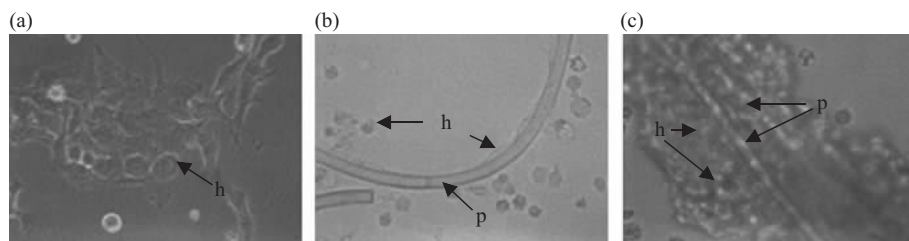


Fig. 1 The morphologic characteristic of the cultured HepG2 cells

(a) The plane cultured HepG2 cells. (200 $\times$). (b) After cultured one day in simulated microgravity, partial cells attached to PGA scaffolds. (200 $\times$). (c) After cultured three days under simulated microgravity, HepG2 cells formed obvious conglomeration. (200 $\times$). h: HepG2 cells; p: PGA scaffolds.

2.1.2 苏木精 - 伊红(H. E.)染色. 来自模拟微重力培养细胞团的石蜡切片经 H.E. 染色后, 发现细胞黏附于 PGA 支架生长, 排列紧密, 染色较深, 呈数十层(图 2).

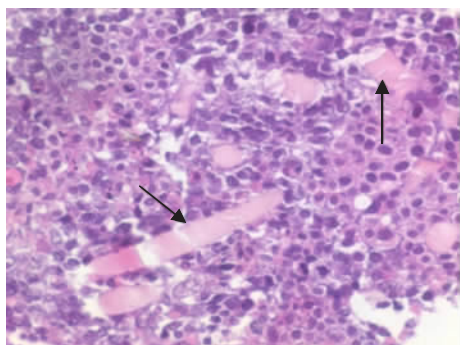


Fig. 2 The paraffin slice of HepG2 cells cultured under simulated microgravity

After the paraffin slice of cell conglomeration was dyed by H.E., the cells were observed to attach to the PGA scaffolds (arrow) and arrayed tightly with tens of layers. (200 $\times$).

2.1.3 扫描电子显微镜观察. 在 RCCS 中生长的细胞呈多面体, 大小均一, 表面有丰富的微绒毛, 细胞间彼此接触聚集, 支架被细胞覆盖形成不规则的三维立体团块(图 3a). 团块断面显示, 细胞呈多边

形, 密切接触, 多层排列覆盖或位于支架之间, 厚度从七八层到十几层细胞不等(图 3b). 团块外周细胞微绒毛丰富(图 3c).

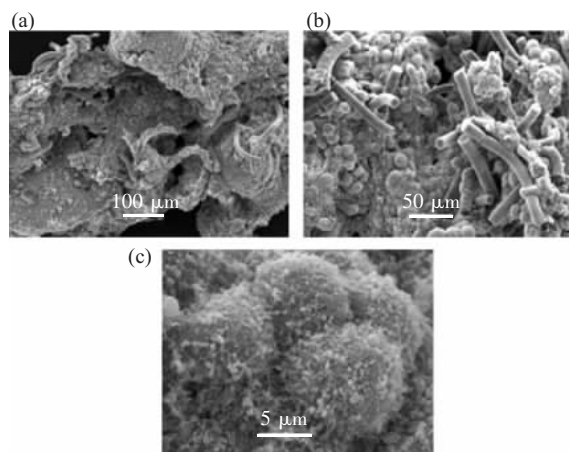


Fig. 3 The scanning electron microscope figure of HepG2 cells cultured under simulated microgravity

(a) The PGA scaffolds was covered with cells and formed the anomalous 3-dimensional conglomeration. (170 $\times$). (b) The multilayer cells covered or lay in the scaffolds. (400 $\times$). (c) The cell microvilli (Mv) were abundant beside the conglomeration (5 000 $\times$).

2.1.4 透射电子显微镜观察显示, 细胞呈多边形, 胞间有间隙, 排列为数层, 其间微绒毛(Mv)多且突

出, 线粒体(Mi)及粗面内质网(rER)丰富(图 4a), 核膜(NE)光滑完整, 细胞核(Nu)大(图 4b), 相邻细胞的胞膜局部突起密切接触, 形成桥粒(Ds)与紧密连接(Tj)(图 4c).

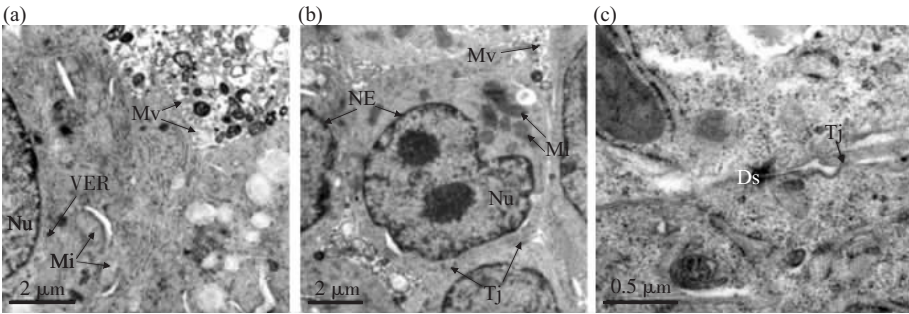


Fig. 4 The transmission electron microscope figure of HepG2 cells cultured under simulated microgravity
(a) The cells arrayed with multilayer and their microvilli (Mv) were abundant; mitochondria (Mi) and rough endoplasmic reticulum (rER) were abundant. (b) The cells took on polygon; nuclear membranes(NE) were full and slick; nucleus were large. (c) The membrane borderline regions of the cells formed desmosome (Ds) junctions and tight junctions (Tj).

2.2 细胞代谢检测

2.2.1 葡萄糖消耗和乳酸脱氢酶含量检测. 分别测定细胞经 RCCS 培养 1 天, 5 天, 10 天, 15 天后 24 h 培养上清中葡萄糖的消耗量和乳酸脱氢酶 (LDH)含量. 以常规单层平面培养为对照. 由表 2 可见, 对照组经不同天数培养后 24 h 的上清中, 其葡萄糖消耗量和 LDH 含量变化不大. 而经 RCCS

培养不同天数后 24 h 的上清中, 其葡萄糖消耗量和 LDH 含量有明显变化.它表明在三维结构形成前, 细胞对葡萄糖的消耗相对较多, 此时细胞增殖相对活跃. 在三维结构形成后(10 天, 15 天), 细胞对葡萄糖的消耗量有所下降, LDH 活性升高. 表明三维生长的细胞其代谢作用有所降低.

Table 2 Glucose consumption and lactate dehydrogenase (LDH) ability

Cell culture	Glucose consuming (mg/10 ⁶ cells)	LDH ability (U/10 ⁶ cells)
Monolayer culture for 1 day	9.32±0.04	13.78±0.13
Monolayer culture for 5 day	9.26±0.07	13.84±0.27
Monolayer culture for 10 day	9.29±0.12	13.61±0.45
Monolayer culture for 15 day	9.27±0.09	13.90±0.33
RCCS culture for 1 day	9.47±0.08	14.45±0.54
RCCS culture for 5 day	9.03±0.11	14.97±0.26
RCCS culture for 10day	8.97±0.06	15.23±0.71
RCCS culture for 15day	7.45±0.03	17.49±0.91

P<0.05.

2.2.2 甲胎蛋白(AFP)的表达检测. 分别测定细胞经 RCCS 培养 1 天, 5 天, 10 天, 15 天后新鲜换液 24h 的培养上清中 AFP 的表达量. 以常规单层平面培养为对照. 由表 3 可见, 对照组经不同天数培养后 24 h 的

上清中, 其 AFP 的表达量变化不大. 而经 RCCS 培养不同天数后 24 h 的上清中, AFP 的表达量有明显变化. 反映三维结构形成后(10 天, 15 天), 细胞 AFP 的表达明显上调 (P <0.05).

Table 3 Expression of α-fetoprotein (AFP)

Cell culture	Expression of AFP (ng/10 ⁶ cell)
Monolayer culture for 1 day	257.38±1.37
Monolayer culture for 5 day	259.42±1.02
Monolayer culture for 10 day	260.57±0.95
Monolayer culture for 15 day	263.83±0.74
RCCS culture for 1 day	261.45±2.10
RCCS culture for 5 day	281.19±1.85
RCCS culture for 10 day	305.53±1.19
RCCS culture for 15 day	313.67±1.43

P<0.05.

2.3 黏附分子表达检测

2.3.1 相关黏附分子的 RT-PCR 分析. 通过 RT-PCR 检测与肝癌生长、侵袭和转移有关的一些

黏附分子及生长因子基因表达的变化, 发现肝癌细胞 HepG2 的 E-cadherin 表达明显下调, 而 CD29、CD44、CD54 的表达明显升高(图 5). 同时发现 FN 表达上调, 而 LN 未见表达.

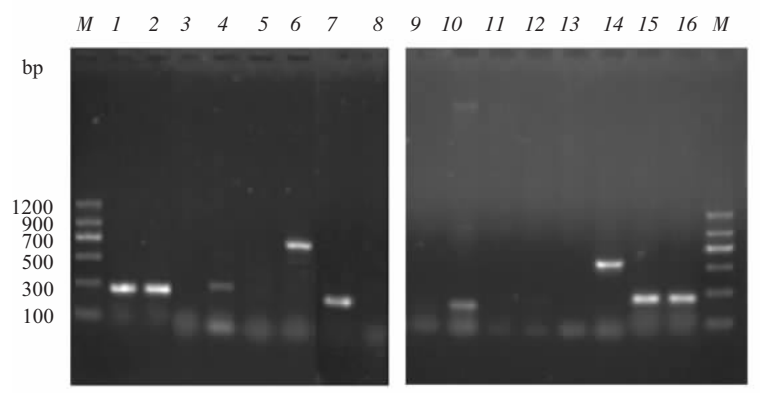


Fig. 5 The RT-PCR analysis of the relative genes of the adhesion molecules of HepG2 cells after cultured

M: Marker II; 1,3,5,7,9,11,13,15: mRNA expression which cultured in plane monolayer; 2,4,6,8,10,12,14,16: mRNA expression which cultured under simulated microgravity; 1,2,15,16: GAPDH; 3,4: CD44; 5,6: CD54; 7,8: E-cadherin; 9,10:FN; 11,12:LN; 13,14: CD29.

2.3.2 黏附分子表达的流式细胞术(flow cytometer, FCM)检测. 肝癌细胞 HepG2 流式细胞术检测结果

表明, 经 RCCS 培养后, E-cadherin 表达表现为下调, 而 CD29、CD44、CD54 的表达有不同程度的上调(图 6, 表 4). 这与 RT-PCR 的分析结果相符.

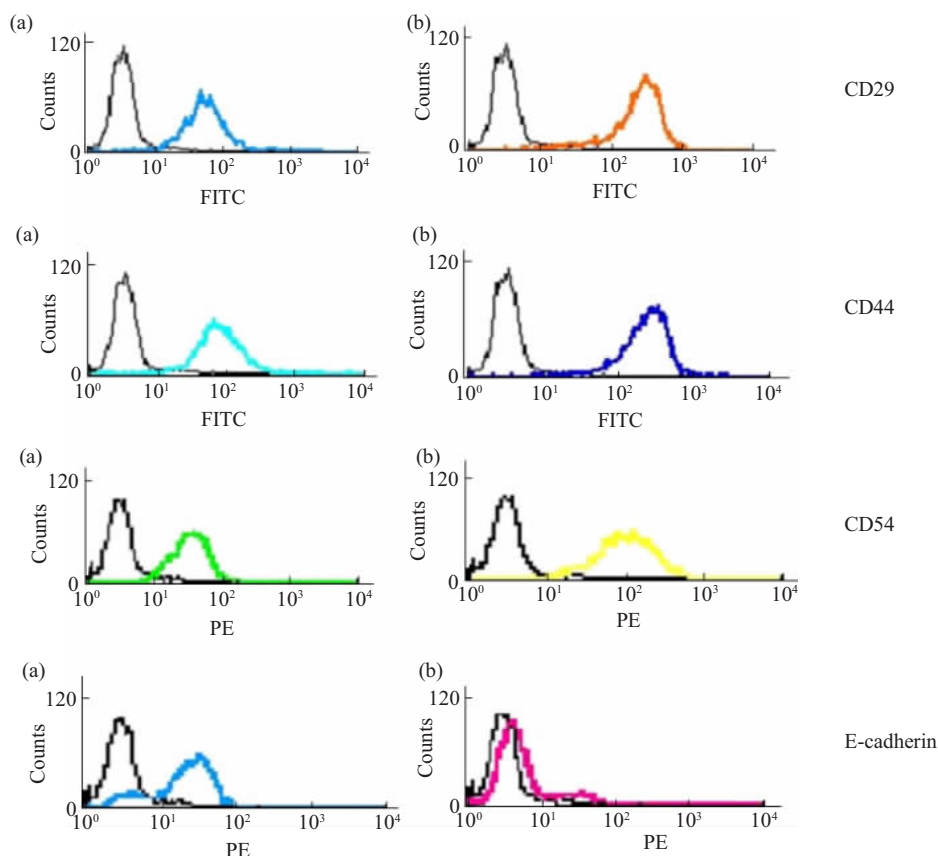


Fig. 6 The FCM analysis of the expression of the adhesion molecules

(a) HepG2 cells cultured in plane monolayer. (b) HepG2 cells cultured under simulated microgravity (RCCS culture).

Table 4 Results of the FCM analysis of the expression of the adhesion molecules

CAMs	Monolayer culture	RCCS culture
CD29	53.57%	70.96%
CD44	84.83%	94.75%
CD54	69.81%	88.81%
E-cadherin	27.53%	5.38%

3 讨 论

传统的单层平面培养仍然是目前肿瘤研究中最常用的体外培养方法,但是难以真实地反映作为一个社会群体时细胞在体内的状态,尤其在研究细胞与细胞、细胞与微环境相互作用,以及研究肿瘤细胞生长调控浸润和对临床化疗的抗性机理等方面存在明显的局限性,而三维培养模型具有更重要的研究与应用价值^[13].美国 NASA 设计的旋转细胞培养系统(RCCS)是一种新的基于模拟微重力效应的细胞悬浮培养装置,降低了剪应力,改进了传统进行细胞三维培养的方法.该培养系统,有利于实体瘤细胞自发形成具有类似于体内同源性细胞特征的多细胞聚合物^[1].PGA 是一种能够生物降解的支架材料,有助于贴壁细胞黏附生长,从而为肿瘤细胞悬浮生长提供了附着空间和支持.我们采用 PGA 为支持物,在旋转细胞培养系统中,进行人肝癌细胞 HepG2 三维培养,这种微环境有利于肝癌细胞之间发生相互作用,也有利于胞外基质的积累并与细胞发生相互作用.结果显示,这种方法获得的三维培养物细胞呈多层重叠排列,细胞间局部胞膜突起,相互密切接触,有桥粒和紧密连接形成,有丰富的线粒体和微绒毛,细胞的生长状态良好.

许多研究表明,在体内实体瘤生长中,一些关键的代谢物如氧气,葡萄糖,营养物质,激素以及生长因子呈梯度变化,引起细胞微环境的异质性以及相关表型表达的差异,影响了细胞增殖状态和活力.同时氧气和葡萄糖的变化会诱导一些特异性蛋白质的合成^[14-17].我们发现,三维结构形成后细胞仍维持葡萄糖的分解代谢,但与单层生长状态相比,葡萄糖消耗量下降.其原因可能是三维结构形成后,从表面到团块中央形成了营养物质、氧气及 pH 值的梯度分布,部分细胞由增殖状态转入静息状态,多种因素综合作用使部分位于内部的细胞对细胞外环境中糖的利用率降低.此时胞内乳酸脱氢酶(LDH)活性升高,提示细胞可能增加了糖的异生,而这一结果正与体内细胞生长状况相一致.肝

癌细胞通常分泌甲胎蛋白(AFP),我们用 ELISA 方法检测平面及三维培养细胞的上清,发现三维培养细胞的 AFP 表达上升(表 3),这表明在 RCCS 系统中生长的细胞更有利于维持其低分化的肿瘤细胞特性.

细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)在细胞间相互作用以及细胞和细胞外基质(ECM)相互作用中十分重要,伴随着许多肿瘤的侵袭和转移过程,调节了细胞内信号传导过程.因此,细胞黏附分子在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移以及多细胞抗药性等方面扮演重要角色^[18-22].然而在模拟微重力条件下,三维培养肿瘤细胞黏附分子的表达变化未见报道.本文研究了在 RCCS 中生长的细胞和常规平面生长的细胞的 4 种黏附分子(CD29, CD44, CD54 和 E-cadherin)表达的变化.这些黏附分子和肝癌细胞的侵袭转移密切相关.

CD29 为整合素(integrins)家族一员,通过识别 ECM 及细胞膜上免疫蛋白超家族黏附分子、细胞间黏附分子等介导细胞-基质及细胞间黏附反应,对细胞的生长、分化、活化、移动以及肿瘤细胞的侵袭与转移等过程具有重要的调节作用^[23,24].细胞表面的糖蛋白——纤粘连蛋白(FN)则在细胞膜受体整合素参与的细胞黏附、形态维持、细胞分化、生长及信息传递等过程中有重要作用^[25].CD44 是分布极为广泛的细胞表面糖蛋白,它能与多种配体分子结合,参与细胞与细胞、细胞与基质之间的特异性黏附.CD54 即细胞间黏附分子-1 可与整合素结合,是免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily, IgSF)的一员,可介导肿瘤细胞与不同细胞、基质的黏附.Momosaki 等证明肝癌细胞中高表达的 CD54 或许与肿瘤细胞恶性转变密切相关^[26-28].E-cadherin 是一个钙离子的细胞黏附分子,以同型黏附的方式相互作用,既可以作为受体,又可以作为配体,是细胞连接的重要分子.E-cadherin 调节细胞间的黏附在许多上皮性癌细胞的发展过程中降低^[29].Slagle 等^[30]研究表明,在肝癌中 E-cadherin 分子表达水平降低与肝癌的转移和侵袭有关.这些研究结果表明,在肿瘤细胞获得更强的侵袭和转移能力时,往往伴随着 CD29, CD44, CD54 的表达升高,而 E-cadherin 的表达降低.

我们的流式细胞术分析表明,相对于平面生长,三维生长的肝癌细胞 CD29, CD44, CD54 的表达量明显升高,而 E-cadherin 的表达量明显降低(表 4).RT-PCR 分析结果在基因水平上证实了这一

变化. 这样一个升高的 CD29、CD44、CD54 和降低的 E-cadherin 表达的特征, 与前人研究观点相符, 可能表明, 生长在 RCCS 中的肝癌细胞可以重现某些早期肝癌的特征, 即其侵袭和转移的能力. 这与甲胎蛋白的表达上调可能也密切相关, 两者相互关系还需要进一步探讨.

模拟微重力旋转培养方式简单易行, 得到的肝癌三维培养物具有多层细胞的结构特征, 细胞状态良好. 该培养模型适用于体外研究肝癌细胞相互作用、肝癌细胞生长行为的控制机理、肝癌细胞浸润和转移的分子机制. 还有一点需要提出的是, 细胞的三维生长状况和细胞黏附分子的表达与体内实体瘤和体外药物实验中的肿瘤细胞耐受性——多细胞耐受性(MCR)有关^[31], 因此, 本实验模型也可能有利于筛选抗癌药物和肿瘤细胞抗药机理的研究, 为体外药物研究提供新的方法和思路.

参 考 文 献

- Obayashi H K, Man S, Graham C H, *et al.* Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (8): 3294~3298
- Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro*: a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*, 2005, **15** (5): 405~412
- Nishikawa M, Ohgushi H, Tamai N, *et al.* The effect of simulated microgravity by three-dimensional clinostat on bone tissue engineering. *Cell Transplant*, 2005, **14** (10): 829~835
- Michelin M, Franceschini V, Sihui Chen S, *et al.* Primate embryonic stem cells create their own niche while differentiating in three-dimensional culture systems. *Cell Prolif*, 2006, **39** (3): 217~229
- Abilez O, Benharash P, Mehrotra M, *et al.* A novel culture system shows that stem cells can be grown in 3D and under physiologic pulsatile conditions for tissue engineering of vascular grafts. *J Surg Res*, 2006, **132** (2): 170~178
- Grayson WL, Ma T, Bunnell B. Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices. *Biotechnol Prog*, 2004, **20** (3): 905~912
- Moiseeva E P, Fox L H, Howells L M, *et al.* Indole-3-carbinol-induced death in cancer cells involves EGFR downregulation and is exacerbated in a 3D environment. *Apoptosis*, 2006, **11** (5): 799~812
- Wang R, Xu J, Juliette L, *et al.* Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Semin Cancer Biol*, 2005, **15** (5): 353~364
- Lorenzo R, Renzo C. Retinoic acid modulates the radiosensitivity of head-and-neck squamous carcinoma cells grown in collagen gel. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, **53** (5): 1319~1327
- Barnea A, Cho G, Lu G, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor induces functional expression and phenotypic differentiation of cultured fetal neuropeptide Y-producing neurons. *J Neurosci Res*, 1995, **42** (5): 638~647
- Levenberg S, Huang N F, Lavik E, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (22): 12741~12746OPM
- Schwarz R P, Goodwin T J, Wolf D A. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of stimulated microgravity. *J Tiss Cult Meth*, 1992, **14** (2): 51~58
- Graham C H, Kobayashi H, Stankiewicz K S, *et al.* Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents. *J Natl Cancer Inst*, 1994, **86** (13): 975~982
- Sutherland R M. Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumors. *Cancer*, 1986, **58** (8): 1668~1680
- Bauer K D, Keng P C, Sutherland R M. Isolation of quiescent cells from multicellular tumor spheroids using centrifugal elutriation. *Cancer Res*, 1982, **42** (1): 72~78
- Luk C K, Sutherland R M. Nutrient modification of proliferation and radiation response in EMT6/Rospheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1987, **13** (6): 885~895
- Tannock I F, Kopelyan I. Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line. *Cancer Res*, 1986, **46** (6): 3105~3110
- Furbert-Harris P M, Parish-Gause D, Hunter K A, *et al.* Activated eosinophils upregulate the metastasis suppressor molecule E-cadherin on prostate tumor cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2003, **49** (7): 1009~1016
- Cohen M B, Griebing T L, Ahaghotu C A, *et al.* Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Am J Clin Pathol*, 1997, **107** (1): 56~63
- Wimmenauer S, Keller H, Ruckauer K D, *et al.* Expression of CD44, ICAM-1 and N-CAM in colorectal cancer. Correlation with the tumor stage and the phenotypical characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res*, 1997, **17** (4A): 2395~2400
- Zhang Z, Vuori K, Reed J C, *et al.* The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (13): 6161~6165
- Kantak S S, Kramer R H. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, 1998, **273** (27): 16953~16961
- Torimura T, Ueno T, Kin M, *et al.* Integrin alpha 6 beta 1 plays a significant role in the attachment of hepatoma cells to laminin. *J Hepatol*, 1999, **31**: 734~740
- Paroli M, Carloni G, Franco A, *et al.* Human hepatoma cells expressing MHC antigens display accessory cell function: dependence on LFA-1/ICAM-1 interaction. *Immunol*, 1994, **82** (2): 215~221
- Masumoto A, Arao S, Otsuki M. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 1999, **29** (1): 68~74

- 26 Momosaki S, Yano H, Ogasawara S, *et al.* Expression of intercellular adhesion molecule-1 in human hepatocellular carcinoma. *Hepato*, 1995, **22** (6): 1708~1713
- 27 Hyodo I, Jinno K, Tanimizu M, *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 release from human hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 1996, **20** (4): 308~315
- 28 Soresi M, Cervello M, Lipani G, *et al.* Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepato*, 1997, **9** (8): 805~809
- 29 Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, 1999, **24** (2): 73~76
- 30 Slagle B L, Zhou Y Z, Birchmeier W, *et al.* Deletion of the E-cadherin gene in hepatitis B virus-positive Chinese hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 1993, **18** (4): 757~762
- 31 Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, **36** (2~3): 193~207

Studies on HepG2 Growth Under Simulated Microgravity: to Establish a Method for Three-dimensional Cultivation *In vitro* as an Research Model*

XU Da-Yong, Wang Yun, Feng Mei-Fu**

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Human hepatocarcinoma cells, HepG2 were cultured onto biodegradable polyglycolic acid (PGA) polymer scaffolds, which were cultured in a rotating cell culture system (RCCS) to form a three-dimensional (3D) multicellular culture *in vitro*. The RCCS can simulate microgravity effects with low shear stress and well exchanging for gas. Then the growth characteristics and some mechanism of the cells in RCCS were detected by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), RT-PCR and flow cytometry (FCM). The results indicate that the cells grew well with polyhedron morphology and lots of microvilli, mitochondria and tight junctions in this system, which means that this system is useful for cells to form 3D structure to mimic cell status *in vivo*. The expression of some cell adhesion molecules (CAMs) were changed markedly, which are closely associated with cancer invasion and metastasis. The characters of increased expression of integrin $\beta 1$ (CD29), CD44, intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and depressed expression of E-cadherin presumably show that the HepG2 cells cultured in RCCS could recur some characters of primary liver cancer *in vivo*, the capacity of invasion and metastasis. It is necessary for acquiring perfect and external results to select an appropriate research model for studying *in vitro*. This 3D culture *in vitro* under simulated microgravity can provide a useful and reasonable model for oncology, anticancer drugs research and other research.

Key words HepG2, simulated microgravity, three-dimensional culture, rotating cell culture system (RCCS), polyglycolic acid (PGA), cell adhesion molecules (CAMs)

*This work was supported by a grant from The Foundation of The Chinese Academy of Sciences(KSCX2-SW-322).

**Corresponding author . Tel/Fax: 86-10-62571017, E-mail: fengmf@ioz.ac.cn

Received: June 23, 2006 Accepted: July 31, 2006