

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	: 建立3D神經腫瘤細胞球體的形成及培養
------------	----------------------

執行計畫學生：陳葦澤
學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-029-B
研究期間：106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授：蔡蕙芳

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 107年05月30日

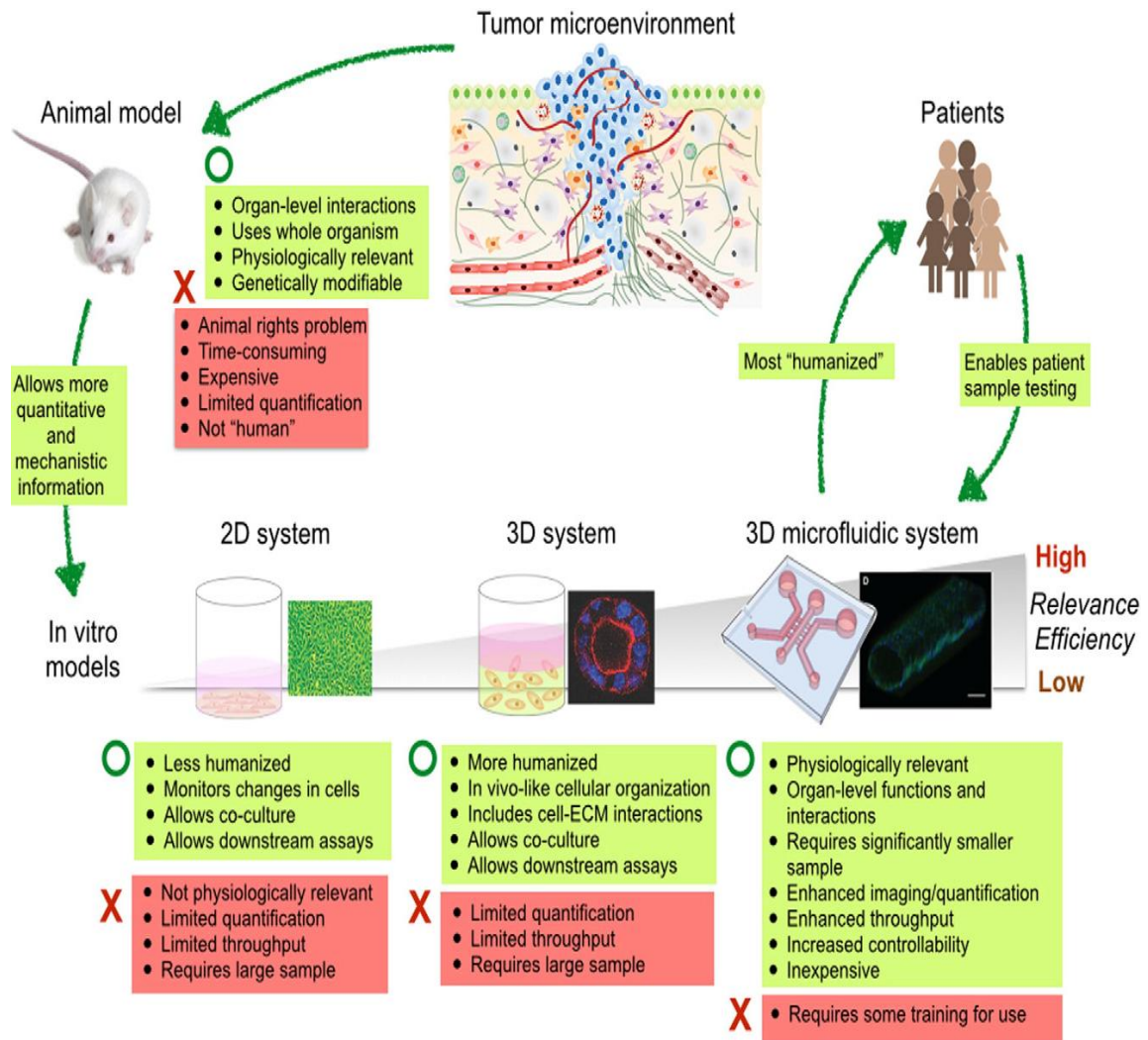
(一)摘要：

3D 細胞培養技術被認為具有腫瘤活體組織的特點，例如功能性腫瘤增長特性、延續性低氧細胞群、細胞緊密排列、異質性等優點，和 2D 細胞培養技術顯著不同。本研究計畫主要是以神經腫瘤細胞株為材料建立神經腫瘤細胞球體 (3D tumor spheroids) 的研究平台，選擇以 Matrigel 為基質與神經腫瘤細胞共同培養形成類腫瘤組織，並且可藉由添加致癌因子或藥物做為致癌機轉或治療策略之研究平台，此系統不但能應用於癌症機轉之體外研究，並可應用於癌症治療之體外模擬。本實驗建立神經腫瘤母細胞(Human neuroblastoma cell line; SK-N-SH)的三維體外模型並和二維培養下的神經腫瘤母細胞比較，在三維培養下的神經腫瘤母細胞可根據大小、透光性分為，大型密集(large dense aggregates, LDAs)、大型鬆散(large loose aggregates, LLAs) 和小型聚集(small aggregates, SAs) ，而在二維培養下的神經腫瘤母細胞則沒有此現象；結果在 Planar cell polarity (PCP) 細胞訊息傳遞路徑的標記蛋白 ROCK 和 RhoA 均在 3D 細胞培養中表現較低，可促進細胞存活及細胞遷移。未來其研究進一步利用 Matrigel 3D 腫瘤球體，了解癌細胞的轉移及侵襲並探討神經機械性質與神經腫瘤細胞癌化以及對神經腫瘤細胞惡化之關係。本計畫將生醫材料研發和癌症研究結合是一種創新的構想，同時也兼具基礎研究和應用開發的價值。

關鍵字: 3D 細胞培養技術、訊息傳遞、神經腫瘤細胞

(二)研究動機：

對於整個細胞基礎篩選測定的開發，目前大都是利用細胞附著到各種塑料基質的平坦面的 2D 細胞培養技術。然而，這些腫瘤細胞的複雜性，模擬在 2D 細胞培養塑膠基質的運用上，不能準確地表示腫瘤細胞在人體生長的微環境。為了更精確地表現疾病的狀態，開發研究 3D 腫瘤細胞培養結構模型已有許多世界各地先進的實驗室進行。現在普遍接受的是在 2D 的條件下培養細胞，與生理學並無相關，也困難表現可能在下游與體內的轉譯中。利用 3D 細胞培養模型，提供了用於生長和遷移的高表面積，其可以被調節以支持其他細胞行為，例如分化或成熟。也可以部分地概括表現組織特異性結構，與周圍的微環境，皆是腫瘤組成的重要部分元素。這些三維細胞培養模型對於研究機制路徑和腫瘤細胞耐藥性特別有利。此外，腫瘤細胞在 2D 單層培養條件下對癌症治療劑/化合物反應，表現方式並不相似由 3D 模型研究癌細胞的分子結構機制。最近的研究已經表明藥物的發現方法利用 3D 細胞培養模型更具潛力。然而，顯而易見的是，進一步的研究是需要更複雜的模型，可納入大多數腫瘤細胞和物理性能的發展。



圖一：現有的癌症腫瘤研究模型的比較。在實驗動物模型中優點能夠研究癌症在器官層級下其在動物體內和生理相關的情況利用修改特定基因來觀察癌症在此實驗動物中的反應及其表現情形；缺點則是有倫理道德上的疑慮、價格昂貴、數量限制以及非人類等.....2D 和 3D 培養都可以進行共同培養，且可以提供後續的實驗(例如西方點墨法、免疫螢光染色等實驗)，且 3D 培養接近真實人體內的情形。

(Kyung et al., Advanced Drug Delivery Reviews 79–80 (2014) 68–78.)

近幾年，新技術的快速發展和大量且多樣性的腫瘤細胞株提供給予研究者更多的研究機會，並且在某些細胞培養環境的條件下，可以分析細胞訊息傳遞路徑中這些多種生物相關模型的廣泛表徵，並且比較評估細胞以傳統的 2D 單層培養和 3D 腫瘤球體細胞培養的差異性。如果在 2D 模型細胞途徑不是代表在體內微

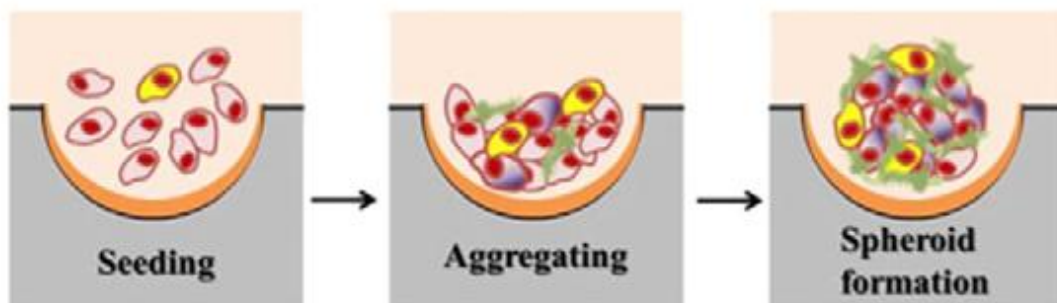
環境，則篩選出的這些模型的活性化合物可能不如預測。例如，生長在 2D 單層細胞培養，特定化合物的細胞目標可能不會在體內表現相同的數量或細胞信號可能不會反映在體內時的表現，因此對結果是有影響的。為了提供用於生長依附的空間架構，同時能夠協調生物活性因子和細胞之間的相互作用，增進細胞之間的黏附，促使細胞的基因表達、分泌，使細胞的功能活動更接近於體內，選以合適的支架材料是非常重要的，理想的支架應具有可調節的機械性能（例如，通過濃度調整），使得可以近似組織的性質。如果希望是盡可能逼真地再現 ECM，然後再定義組成應包括在特定 ECM 中普遍存在的組分（例如，透明質酸，膠原），在體內下層細胞有薄外基質稱基底膜，Matrigel. Basement Membrane Matrix 是從 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤中提取的可溶性基底膜製劑，腫瘤含有豐富的細胞外基質蛋白。其主要成分是層粘連蛋白，其次是 IV 型膠原，硫酸乙酰肝素蛋白多醣，巢蛋白。BD 基質膠基底膜基質還包含 TGF- β ，表皮生長因子，胰島素樣生長因子，成纖維細胞生長因子，組織纖溶酶原激活劑，並有在 EHS 腫瘤中自然發生的其他生長因子。Matrigel. Basement Membrane Matrix 可有效正常的吸附和分化，和轉換的錨地上皮依賴性和其它細胞類型。

除了上述所提供一個接近體內生長的微環境，細胞的遷移及侵襲也是值得我們去探討的，為了進一步確認我們對細胞遷移的觀察和基質與細胞之間的相互作用，我們可以進行細胞骨架（例如：肌動蛋白和微管）的探討及追蹤，細胞骨架一般是指細胞內細胞質中的由蛋白質構成的纖維的網絡結構。儘管其名稱所暗示的骨架是穩定的，但它是一個動態結構，其中有一部分是不斷的被破壞，更新或新建的，因此透過 3D 培養用以觀察腫瘤細胞遷移所造成細胞骨架形態上的變化，目前研究細胞骨架的主要方法是應用高壓電子顯微鏡技術或免疫螢光顯微鏡技術，本研究主要選以後者，提供一個簡易的方法來呈現預期的結果。

(三)文獻回顧與探討：

2D 培養技術使生物學家得以觀察和使用哺乳動物細胞，奠定細胞和分子生物學的基礎，2D 培養是使細胞黏附在平坦的表面如培養皿，在培養皿可塗上特定的蛋白質如膠原蛋白，研究細胞對此種蛋白的生化反應。然而 2D 培養並不能完全模擬出真正在 3D 的情況下細胞和細胞外基質 (Extracellular matrix ECM) 如何組成組織和器官(圖一)，因此進而開發出了 3D 培養(Kyung et al., 2014)。

3D 培養是指人造的環境使細胞、組織能夠在 3D 立體空間結構中遷移、生長、構成 3D 的細胞複合物，這些 3D 培養物通常生長在生物反應器中，細胞可以生長成球狀體(圖二)，或細胞集落(Kyung et al., 2014)。3D 細胞培養包括：細胞衍生的基質、生物材料為基礎的細胞培養模型、工程基質的共同培養。3D 細胞培養對於癌症的研究有著重要的影響，藉由的癌細胞和周圍微環境之間的相互作用，製造出一個適合的環境，促進腫瘤的形成(Bissell et al., 2001)。



圖二. 腫瘤球狀體的形成示意圖。將腫瘤細胞中入加工過生物反應器中，加入特定細胞外基質；細胞會漸漸形成聚集，進而形成球狀。

近期有文章探討出，目前的GBM細胞的遷移利用2D的實驗模型，以及動物模型來研究，並列出兩者的優點和缺點。並嘗試開發 3D 組織工程啟發模型及解開腫瘤細胞在微環境中的行為作用，大大凸顯實用程序。另外，使用 3D 模型彌合 2D 和動物模型之間的時間隙。(Shreyas et al., 2014) 也有許多研究利用 Matrigel

來培養細胞，讓細胞在 3D 的類組織物質中生長，更接近細胞在人體中的型態與作用。而 RhoA 蛋白在 2D 遷移系統有起作用已被證明，在其中明顯的無相關或有抑制細胞遷移的條件。然而，腫瘤細胞的侵襲和使用 3D 浸潤性生長的多個生理評估，RhoA 變得更加有影響力。當然，Rho 蛋白的侵襲作用在 3D 生長比放置在細胞外基質的張力更加複雜。更證明 3D 細胞培養比 2D 培養，更具有研究探討價值。所以，我們利用先前實驗室已經建立有的口腔鱗狀上皮細胞 (SCC-15) 3D 細胞培養技術為實驗模型，本實驗進一步想利用 SK-N-SH 神經腫瘤細胞建立起 3D 神經腫瘤細胞的培養技術，並探討神經機械性質與神經腫瘤細胞癌化以及對神經腫瘤細胞惡化之關係。

(四)研究方法及步驟

1. SK-N-SH 神經腫瘤細胞在 2D 的細胞培養

SK-N-SH 神經腫瘤細胞在 2D 的細胞培養中較其他腫瘤細胞培養困難，所以首先要學會培養 SK-N-SH 神經腫瘤細胞 2D 的細胞培養，方法如下：

人類神經腫瘤母細胞株 (human neuroblastoma cell line; SK-N-SH) 單層貼壁生長於 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) 培養液，其中含有 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 、1% 200mM L-glutamine、1% PSN (5 mg/ml Penicillin, 5 mg/ml streptomycin and 10 mg/ml Neomycin) 和 1% non-essential anamin acid (NEAA) 並置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養，約每隔三天繼代培養一次，首先移除舊培養液，用 1X PBS 潤洗兩次，勿直接沖洗到細胞，接著加入 1 ml 胰蛋白酶 (trypsin-EDTA)，加入新的培養液中止胰蛋白酶作用，1200 r.p.m. 離心 5 分鐘後加入培養液以比率 1:2 繼代培養。

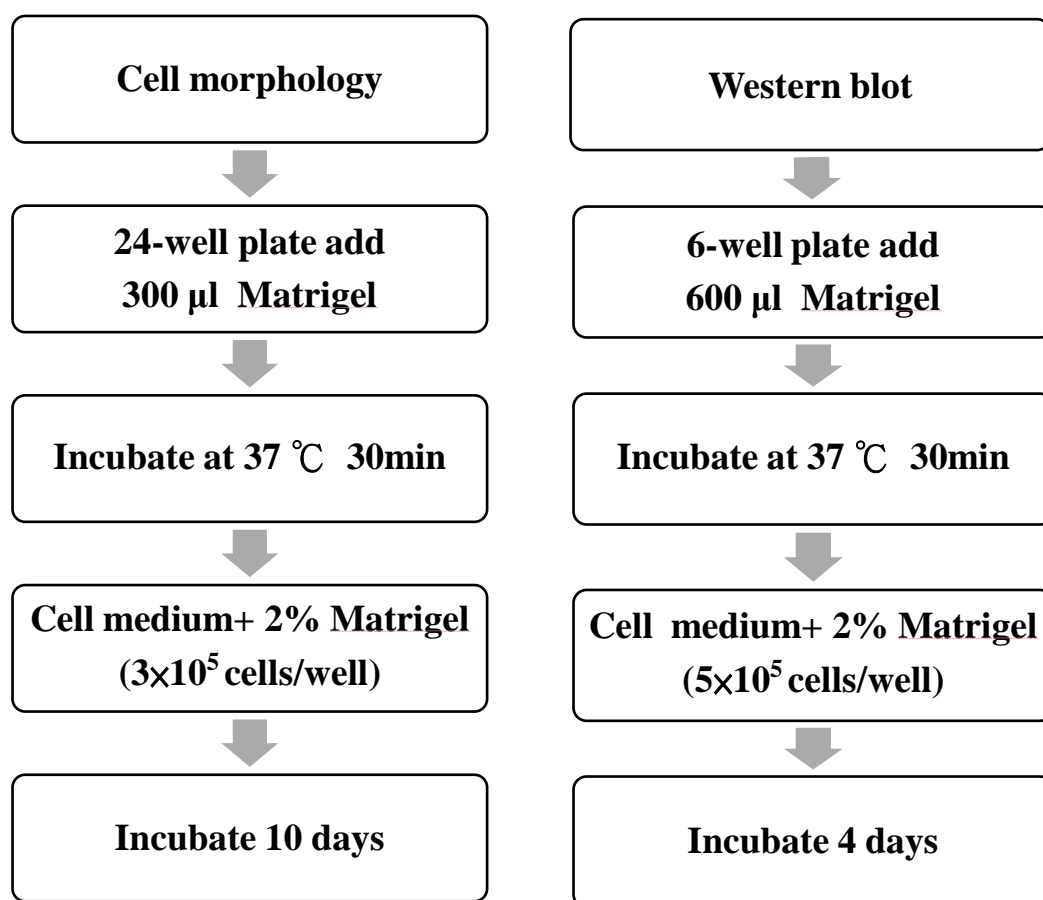
2. SK-N-SH 神經腫瘤細胞在 3D 的細胞培養

利用實驗室先前的學姊所建立的口腔鱗狀上皮細胞 (SCC-15) 3D 細胞培養技術及其他文獻中所使用過的各種 3D 培養模型(Liyuan Li, 2011)，找出適合 SK-N-SH 神經腫瘤細胞培養的系統：

Table I: 在 Matrigel 適合檢測的 3D 細胞培養技術。

	Cell line	Seed into	Matrigel	incubate	
Liyuan Li, et al. 2011	Breast cancer	96-well (1×10 ⁴ cells/well)	1. Precoated 40 µl 2. Medium+ 2% Matrigel	Up to 10days	Cell morphology
Dal Vechio AM, et al. 2011	HNSCC	75 cm ² falask	suspended in 1:3 Matrigel	72 hours	Western blot
Oliver Z, et al. 2012	A549 SCC15	24-well	Precoated	4 days	Western blot
Meng Tong, et al. 2013	HNSCC (SCC9, SCC15, CAL27)	24-well (4×10 ⁵ cells/ml)	Precoated 289 µl/well	17 hour	tube formation assay
Stephanie Hehlans, et al. 2012	HNSCC	96-well	0.5 µg/ µL	6-13 days	Western blot

本實驗室所建立的三維立體細胞培養實驗方法流程圖如下:



3. 細胞回收 (Cell recovery)

回收使用 matrigel 三維立體細胞培養細胞，準備操作西方墨點法，先用 PBS 清洗兩次，加入 1000µl 的 cell recovery solution (BD, U.S.A.) 並用細胞刮杓收集 Matrigel，待 matrigel 漿化後放入 1.5 ml 離心管，接著加入 500µl 的 cell recovery solution 清洗兩次，液體均收集至 1.5 ml 離心管，在冰上作用 60 分鐘直到 Matrigel 回溶液化，最後在 4°C 下離心 6000 r.p.m. 5 分鐘，用冷的 1X PBS 清洗兩次，加入 100 µl lysis buffer 在冰上作用 20-25 分鐘，待細胞懸浮，以上清液做蛋白質定量和進行日後的分析。

4. 蛋白純化 (Protein purification)

實驗設計為了比較平面與立體培養的蛋白表現量，準備操作西方墨點法的細胞量，先種 5×10^5 cells/well 在 6 孔盤作二維平面培養的對照組，三維立體細胞培養則是在 6 孔盤先加入 matrigel (BD, U.S.A.) 作為基底，先加入 600µl matrigel 放入 37°C 培養箱 30 分鐘，使 matrigel 成膠後，再加入包含細胞的 2% matrigel 培養液，培養觀察 4 天後，回收細胞進行蛋白質純化。取出一個 6 well plate 細胞液至離心管以冷的 1X PBS 清洗兩次，離心 5000 r.p.m. 5 分鐘，在離心沉澱的細胞團塊加入 Cell lysis buffer 包含 5% Glycerol、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、0.5% Triton X-100，另外為了偵測磷酸化蛋白，額外再添加 1mM PMSF、1 mM

Na₃VO₄、1 μg/ml aprotinin、1 μg/ml leupeptin 和 mixed proteinase inhibitor。接著使用 sonicator S-4000 (Misonix, U.S.A.) 儀器，依據以下流程破細胞，以 80 振幅震盪 3 分鐘，每震盪 30 秒，休息 15 秒，完成後將細胞碎片在 4°C 離心 12,600 r.p.m. 20 分鐘，取上清液保存在 -20°C。使用 Bio-Red Model 680 microplate reader 偵測吸光值 595nm 檢測 Bio-Red protein assay 之呈色，透過一系列標準品 BSA 畫出的標準曲線計算蛋白濃度。

5. 西方墨點法 (Western blot)

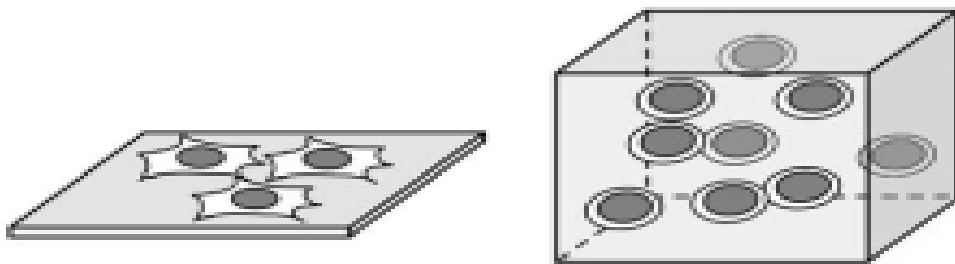
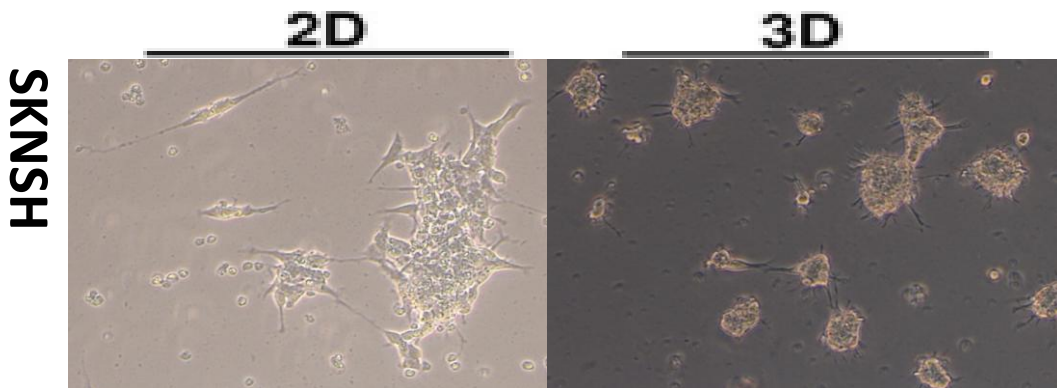
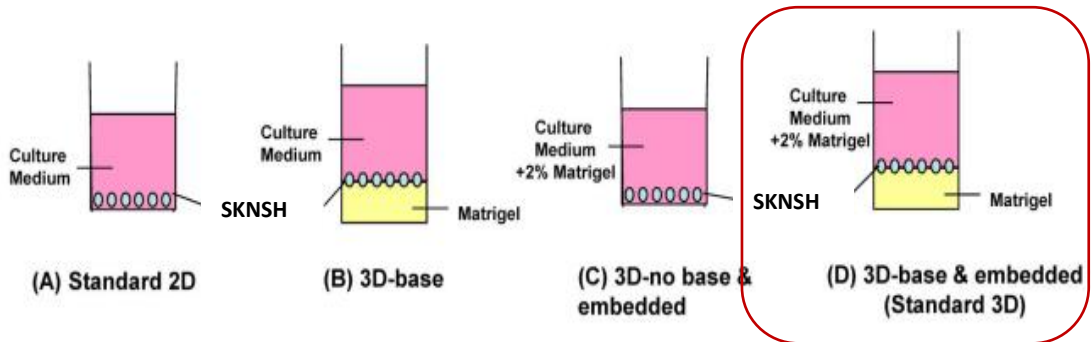
定量蛋白濃度為 50 ng，以 d₂H₂O 稀釋並加入 4X SDS-gel loading buffer (含 1 M of tris-HCl、14.4 M of β-mercaptoethanol、0.4% bromophenol blue、10% glycerol、10% SDS) 後，將待測之檢體蛋白置於 Dry Bath 6100 (Pantech, R.O.C.) 95°C 下作用 5 分鐘，再放至冰上冷卻 5 分鐘，完成後可依序加入 SDS-PAGE 膠體凹槽中 (SDS-PAGE 板膠製備配方詳見表五)，最後加入 Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo, USA) 作為分子量標示。stacking gel 將 Bio-Red Power PAC Basic 電源供應器設定在 70 伏特跑 30 分鐘，resolving gel 則設定為 90 伏特跑 90 分鐘，在 1X Running buffer (含有 25mM Tris-Base、192mM Glycine 和 0.1% SDS) 下進行膠體電泳分析。下一步進行轉漬 (transfer)，先將 0.45-μm PVDF 膜，放入甲醇 (methanol) 中，浸泡 5 分鐘去除極性，取出 SDS-PAGE 電泳分析完之膠體，與 PVDF 膜、圖畫紙、海綿放入 transfer cassette 中，加入 transfer buffer (含有 12mM Tris-Base pH8.3、96mM Glycine 和 20% methanol)，並放入冰塊，電源供應器設定在 90 伏特跑 60 分鐘。轉漬後的膜先以 Tris buffered saline (TTBS; 含有 10mM Tris-Base pH7.4、150mM NaCl 和 0.1% Tween 20) 清洗一次，再用以 TTBS 製備的 5% 脫脂牛奶在室溫放置搖擺式震盪器 (shaker) 上一小時進行 blocking 後，用 T.T.B.S 清洗 3 次，每次 5 分鐘。完成後加入以 1% 脫脂牛奶稀釋的一級抗體 (first antibody) 置於 4°C shaker 過夜 (overnight)。隔天，使用 T.T.B.S. wash 3 次，每次 5 分鐘，接著加入結合 horseradish peroxidases (HRP) 的二級抗體 (secondary antibody) 後，置於 shaker 上在室溫搖晃 60 分鐘 (抗體使用表格詳見表六)，使用 T.T.B.S. 清洗 3 次，每次 5 分鐘。最後加入化學冷光法的 HRP substrate working solution (Millipore, U.S.A.) (包含 1:1 的 luminal/enhancer solution 和 stable peroxide solution) 室溫下作用 5 分鐘。進入暗房，使用底片 BioMax scientific imaging film (Kodak, U.S.A.) 來偵測冷光，顯影定影劑為 GBX developer/replenisher 和 GBX fixer/replenisher (Kodak, U.S.A.)，先曝光 1 分鐘再依訊號強弱調整壓片時間。

6. 統計分析 (statistical analysis)

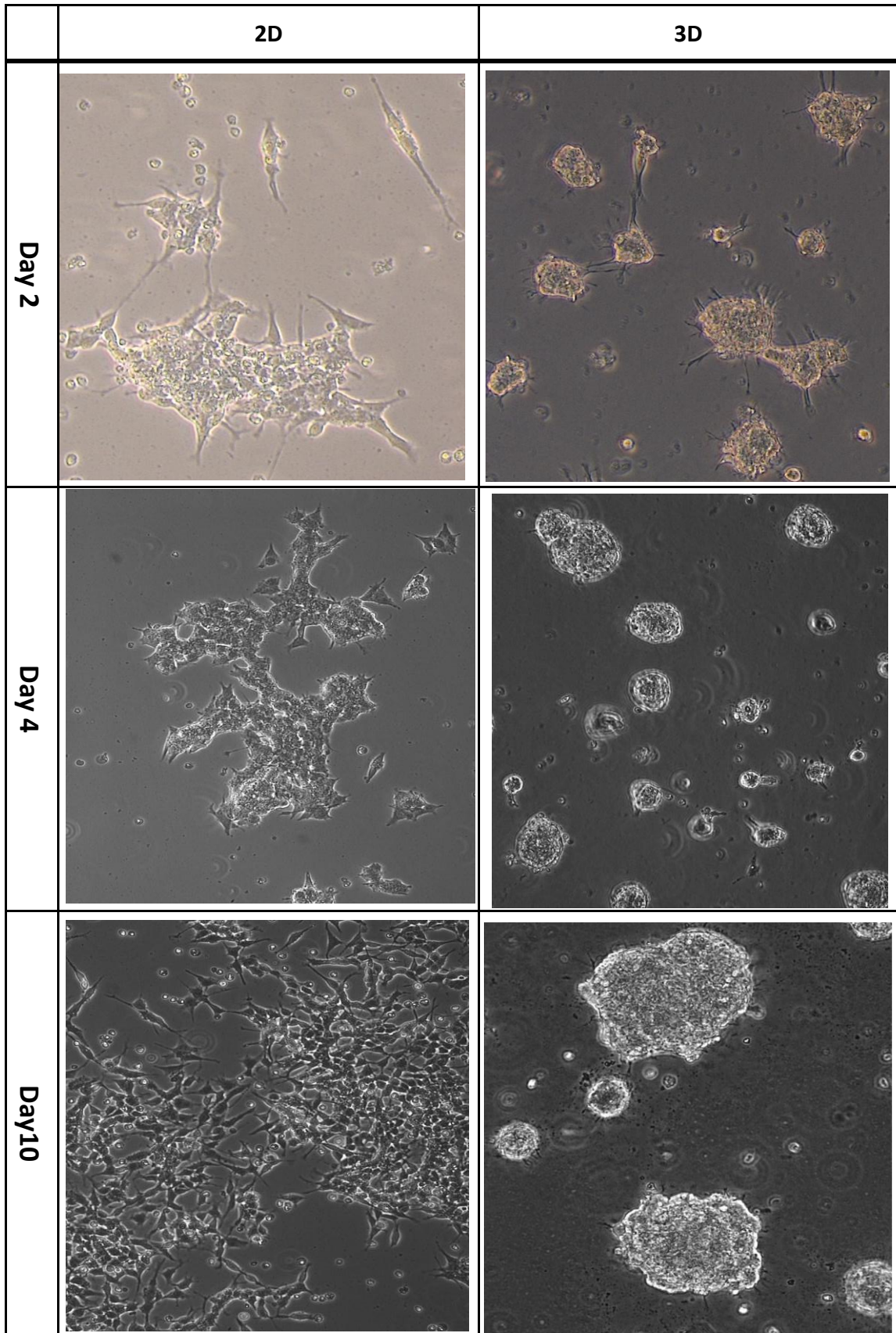
西方墨點法的結果，使用進行 Image J 軟體定量分析，以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示，使用變異數分析 (Analysis of variance; ANOVA) 比對實驗組與對照組間的差異。

(五) 結果與討論

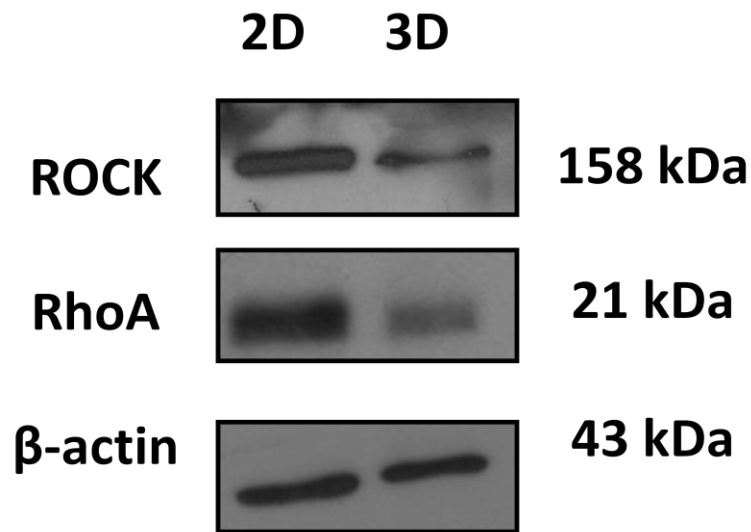
3D 細胞培養比 2D 細胞培養的平坦單層細胞提供了一個更合適的體外細胞的生長環境(下方圖示 D)，本實驗模型和建立的 SK-N-SH 3D 細胞培養物的流程。與 2D 細胞培養相比較，我們增加了利用質膠所形成的三維球體細胞培養。在此研究中，我們提供證據顯示三維的細胞培養更像體內機制。在 2D 與 3D 環境中相比，細胞有不同的形態。



圖一、建立 3D 細胞培養模型



圖二、比較 2D 與 3D 細胞培養模式在第二天、第四天以及第十天的細胞型態



圖三、利用 western blot 比較 2D 與 3D 細胞培養模式中的 ROCK 與 RhoA 蛋白表現量

由於神經母細胞瘤是一種高轉移性疾病，70%的患者在診斷時呈現轉移性擴散，透過分析 3D 腫瘤模型在不同天數細胞形態上的差異，我們可以清楚觀察到細胞隨著天數的演進，其細胞由原先的單一細胞生長，逐漸聚集成球體生長模式，神經腫瘤母細胞(Human neuroblastoma cell line; SK-N-SH)的三維體外模型並和二維培養下的神經腫瘤母細胞比較，在三維培養下的神經腫瘤母細胞可根據大小，透光性分為，大型密集(large dense aggregates, LDAs)、大型鬆散(large loose aggregates, LLAs) 和小型聚集(small aggregates, SAs) ，而在二維培養下的神經腫瘤母細胞則沒有此現象，此結果與癌症在人體內的模式相符合。值得討論的是，雖然實驗結果顯示細胞有聚集現象(migration)，但由於時間不足，我們尚未更進一步利用免疫螢光染色來觀察細胞骨架相關抗體，以證明出其移動的原因及方式。另外，我們還觀察到此 3D 培養方式能夠抑制 PCP (Planar cell polarity)細胞訊息傳遞路徑中的標記蛋白 Rho 和 ROCK，Rho 透過激活下游 ROCK 活化 PTEN 間接抑制促細胞存活蛋白 Akt，抑制神經元存活。換句話說，3D 腫瘤模型可以提供神經母細胞瘤，較好的生長環境，且可以促進腫瘤細胞轉移及擴散，更貼近人體內腫瘤實際生長的情況。然而，本實驗室還尚未證明此路徑的其他腫瘤

轉移標記蛋白，以表達腫瘤生長與此路徑的相關性。未來以期我們能透過此細胞培養模型，藉由添加致癌因子或是藥物作為致癌機轉和治療策略的研究平台，而此系統不但可用於癌症體外研究，也可應用於癌症治療的體外模擬。

(六) 參考文獻

Alfred S. Song et al., (2014) Thermally induced apoptosis, necrosis, and heat shock protein expression in 3D culture. *J Biomech Eng.* 136(7)

C. M. Fife, S M Sagnella et al., (2017) Stathmin mediates neuroblastoma metastasis in a tubulin-independent manner via RhoA/ROCK signaling and enhanced transendothelial migration. *Oncogene.* 36: 501–511

Dal Vecchio AM et al., (2011) Vimentin expression and the influence of Matrigel in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *Braz Oral Res.* 25(3): 235-240.

Kyung Eun Sung, David J. Beebe. (2014) Microfluidic 3D models of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 79-80

Liyuan Li and Yi L et al., (2011) Optimizing a 3D Culture System to Study the Interaction between Epithelial Breast Cancer and Its Surrounding Fibroblasts *J Cancer.* 2:458-266.

M.J. Bissell, D. Radisky. (2001) Putting tumours in context, *Nat. Rev. Cancer* 146 – 54

Meng Tong, Han BB, Holpuch AS et al., (2013) Inherent phenotypic plasticity facilitates progression of head and neck cancer: Endothelial characteristics enable angiogenesis and invasion; *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH.* 319 (7):1028–1042

Oliver Z, Streichert T, Hehlhans S et al., (2012) Genome-Wide Gene Expression Analysis in Cancer Cells Reveals 3D Growth to Affect ECM and Processes Associated with Cell Adhesion but Not DNA Repair. *PLoS ONE.* 7(4): e34279

Shao J, Welch WJ, Diprospero NA et al., (2008) Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol Cell Biol.* 28(17):5196-5208

Shreyas S et al., (2014) Toward 3D Biomimetic Models to Understand the Behavior of Glioblastoma Multiforme Cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 20(4):314-327.

Stephanie Hehlhans (2009) 3D cell cultures of human head and neck squamous cell carcinoma cells are radiosensitized by the focal adhesion kinase inhibitor TAE226. *Radiotherapy and Oncology.* 92(3):371-378.

Stephanie Hehlhans (2012) Targeting FAK Radiosensitizes 3-Dimensional Grown Human HNSCC Cells Through Reduced Akt1 and MEK1/2 Signaling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 83(5):e669-e676