

基于水凝胶微球建立胰腺癌原代细胞的3D培养模型

马芳芳, 秦洁洁, 任灵杰, 唐笑梅, 刘 佳, 施敏敏, 蒋玲曦

上海交通大学医学院附属瑞金医院胰腺疾病研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·利用水凝胶微球和新鲜胰腺癌组织原代细胞构建模拟肿瘤微环境的体外培养新模型。**方法**·记录水凝胶微球的形态分布情况, 倒置荧光显微镜下观察并拍照, 通过Image J软件计算微球的直径, 统计得到粒径分布图。肾上皮细胞(293T)、胰腺癌细胞(8988)、正常胰腺上皮细胞HPNE均在DMEM完全培养基中生长, 当细胞长满到80%~90%时传代。DMEM培养基和微球浸提液培养293T细胞, 通过CCK-8法检测2种培养基培养的293T细胞的增殖曲线, 探究水凝胶微球的生物相容性。在超净工作台中剪碎新鲜胰腺肿瘤组织, 用透明质酸酶和胶原蛋白酶I裂解胰腺癌肿瘤组织, 在37℃水浴锅中间隔振荡消化为单细胞。水凝胶微球与胰腺细胞在DMEM完全培养基中共培养3 d, 半数细胞用4%多聚甲醛固定, 鬼笔环肽和DAPI染色, 普通荧光显微镜下观察微球的形态和细胞分布; 剩余一半细胞用于悬浮细胞和黏附细胞计数。水凝胶微球与原代细胞在培养基中共培养7 d, 用免疫荧光法观察基于水凝胶微球建立的胰腺癌原代细胞体外培养模型中的细胞组成。用石蜡包埋胰腺癌组织, 随后进行石蜡组织切片, 苏木精-伊红染色组织切片, 用显微镜观察胰腺癌组织结构。**结果**·水凝胶微球大小均一, 微球粒径约200 μm, 293T细胞的增殖曲线表明水凝胶微球具有良好的生物相容性。水凝胶微球与胰腺细胞系共培养结果表明水凝胶微球表面具有较强的细胞亲和力, 能够为胰腺细胞提供支撑点, 使其黏附在微球表面正常生长。水凝胶微球与消化后的胰腺癌新鲜组织单细胞共培养成功建立胰腺癌体外3D培养模型。该模型具有与胰腺肿瘤组织相似的细胞组成, 包含胰腺导管上皮细胞、相似比例的肿瘤干细胞、内皮细胞、成纤维细胞等。**结论**·基于水凝胶微球建立的胰腺癌原代细胞3D培养模型具有胰腺癌肿瘤微环境的重要特征。

[关键词] 水凝胶微球; 胰腺癌; 肿瘤微环境; 3D体外培养模型

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.01.001 **[中图分类号]** R541.6 **[文献标志码]** A

Establishment of a 3D culture model *in vitro* of pancreatic cancer primary cells using hydrogel microspheres

MA Fangfang, QIN Jiejie, REN Lingjie, TANG Xiaomei, LIU Jia, SHI Minmin, JIANG Lingxi

Institute of Pancreatic Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To establish an *in vitro* culture model mimicking tumor microenvironment using hydrogel microspheres and fresh primary pancreatic cancer cells. **Methods**·The morphological distribution of the hydrogel microspheres was recorded, observed and photographed under an inverted fluorescence microscope. The diameter of the microspheres was calculated by Image J, and the particle size distribution map was obtained by statistics. Renal epithelial cells (293T), pancreatic cancer cells (8988), and normal pancreatic epithelial cells (HPNE) were grown in DMEM complete medium, and passaged when the cells were 80%–90% confluent. 293T cells were cultured in DMEM medium and microsphere extract, and the proliferation curve of 293T cells cultured in the two mediums was detected by CCK-8 method to explore the biocompatibility of hydrogel microspheres. Fresh pancreatic tumor tissue was cut in the ultra-clean workbench, and pancreatic cancer tumor tissue was lysed by hyaluronidase and collagenase I, and digested into single cell with interval shaking in a 37 °C water bath. The hydrogel microspheres and pancreatic cells were co-cultured in DMEM complete medium for 3 d, 1/2 of the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and stained with phalloidin and DAPI, and the morphology and cell distribution of the microspheres were observed under a common fluorescence microscope. The remaining 1/2 cells were used for suspension and adherent cell counting. The hydrogel microspheres and primary cells were co-cultured in the medium for 7 d, and the cell composition in the established culture model of *in vitro* pancreatic cancer primary cells based on the hydrogel microspheres was observed by immunofluorescence method. The pancreatic cancer tissue was embedded in paraffin, followed by paraffin tissue sectioning, hematoxylin and eosin staining of the tissue section, and observation of the

[基金项目] 上海市教育委员会高峰高原学科建设项目 (20200037)。

[作者简介] 马芳芳 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: mafang704@163.com。

[通信作者] 蒋玲曦, 电子信箱: jlx12120@rjh.com.cn。

[Funding Information] Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20200037).

[Corresponding Author] JIANG Lingxi, E-mail: jlx12120@rjh.com.cn.

pancreatic cancer tissue structure with a microscope. **Results**·The size of the hydrogel microspheres was uniform, and the diameter of the microspheres was about 200 μm . The proliferation curve of 293T cells showed that the hydrogel microspheres had good biocompatibility. The co-culture experiments of hydrogel microspheres and pancreatic cell lines showed that the surface of hydrogel microspheres had strong cell affinity, which could provide support points for pancreatic cells to adhere to the surface of the microspheres and to grow normally. Through co-culture of hydrogel microspheres with fresh pancreatic cancer cells, a 3D culture model of pancreatic cancer cells *in vitro* was successfully established. Composition of cell types in this model was similar to that in the corresponding primary tumor tissue, which included pancreatic ductal epithelial cells, tumor stem cells, endothelial cells, fibroblasts and other cells. **Conclusion**·The *in vitro* 3D culture model of primary pancreatic cancer cells based on hydrogel microspheres has important characteristics of pancreatic cancer tumor microenvironment.

[Key words] hydrogel microsphere; pancreatic cancer; tumor microenvironment; *in vitro* 3D culture model

胰腺癌主要起源于胰腺导管上皮细胞及腺泡细胞,恶性程度极高,起病隐匿,早期诊断困难,进展迅速,生存时间短,是预后最差的恶性肿瘤之一,被称为“癌中之王”。胰腺癌患者90%以上是胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)。PDAC的总生存率仅为8.5%,并且可选择的治疗方案很有限^[1]。吉西他滨联合白蛋白紫杉醇和FOLFIRINOX(5-氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康和奥沙利铂)是中晚期PDAC患者的2个一线治疗方案。然而,这些治疗措施为患者带来的生存获益仍十分有限,患者的总生存率仅为6~11个月^[2-3]。近年来,特异靶向关键分子途径的药物有望改善肿瘤的治疗效果^[4-5]。目前,多聚ADP核糖聚合酶(poly ADP ribose polymerase, PARP)抑制剂是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的针对胰腺癌的唯一靶向药^[6]。因此,为了进一步提高胰腺癌患者的精准化治疗水平,迫切需要开发新的胰腺肿瘤靶向药物并建立高效的体外模型进行后续药物筛选。

为揭示胰腺癌的生物学特征和开发新的靶向药物,科学家们建立了多种PDAC细胞系。这些细胞系大多具有永生能力,常用于体外鉴定靶基因功能和高通量筛选胰腺癌药物^[7]。然而,胰腺癌是一种具有高度异质微环境的肿瘤。单一细胞组成的细胞系很难反映肿瘤在微环境中的真实表型,因此,能较好维持肿瘤微环境的患者组织来源移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)模型广泛应用于肿瘤新药的临床前研究。与二维培养的癌细胞系相比,PDX模型与原代肿瘤组织具有较高的病理学相似特征^[8]。但PDX模型的构建需要较大体积的肿瘤组织且成瘤时间长,而类器官是介于肿瘤细胞系和PDX模型的优化选择。只需要较少数量的原代细胞就可以在独特

的3D培养系统中建立类器官,并且类器官的结构和功能与原始组织相似^[9-11]。与PDX模型相比,类器官模型具有明显的时间优势,可为中晚期癌症患者的新辅助化学治疗(化疗)提供指导方案,提高手术转化率。但是,由于常规类器官培养条件苛刻,并不是所有患者的肿瘤组织都可以成功建立类器官。近年来,研究者发现新型的类器官装配体材料能帮助原代肿瘤细胞在3D体外条件下存活,能更好地模拟肿瘤微环境,提高类器官的成功率^[12]。

甲基丙烯酸酯化明胶(gelatin methacrylamide, GelMA)是一种类似于细胞外基质的材料^[13],是通过用甲基丙烯酸酯酐取代明胶中的游离胺基,同时保留促进细胞附着的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)序列而产生的^[14]。GelMA具有可注射、成胶快、机械性能较好、生物相容性好、适合定制生物打印以及容易与各种细胞类型结合等优势^[15-16],交联过程中产生的自由基对细胞的损伤效应也可以通过降低紫外线光源的强度和光引发剂的用量、提高甲基丙烯酸酯基的接枝率来调节。有相关文献^[17]报道,利用微流控技术,以肉豆蔻酸异丙酯为油相、GelMA为水相在一定的速度差下形成理想直径类似油包水的单分散液体,再在强度为6.9 mW/cm²紫外线照射的作用下交联,通过冷冻干燥的手段形成多孔结构。GelMA多孔微球具有良好的生物相容性,不会对细胞的增殖和存活产生影响,也不会对T细胞的活化产生影响^[17]。前期研究^[18]显示,通过调节流速和GelMA浓度,可获得理想粒径(50~400 μm)和孔径(0~50 μm)的均匀多孔微球,且粒径为300 μm 、孔径为50 μm 的冻干微球已用于快速吸附小鼠骨髓源性间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),并使之保持了细胞体外活性和成骨潜能。本研究以前期

制备的多孔微球为基础,构建胰腺癌细胞(8988)、正常胰腺上皮细胞HPNE、胰腺癌新鲜肿瘤组织原代细胞的3D体外培养模型。本研究一方面旨在提供一种可作为胰腺癌类器官装配体的新型生物材料物质,另一方面拟证明所构建的3D体外细胞培养模型包含了胰腺癌肿瘤微环境的主要细胞成分,未来可以应用于胰腺癌的药物筛选过程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 水凝胶微球、组织、细胞 水凝胶微球来自上海交通大学医学院附属瑞金医院/上海市伤骨科研究所崔文国教授实验室制作^[18]。新鲜胰腺癌组织来源于上海交通大学医学院附属瑞金医院胰腺中心行胰腺切除术的胰腺癌患者。肾上皮细胞293T、胰腺癌细胞8988、正常胰腺上皮细胞HPNE均购自中国科学院细胞库,且经过短串联重复序列(short tandem repeat, STR)鉴定,支原体检测呈阴性,保存在添加了10%胎牛血清和抗生素的DMEM培养基中。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、OmaStem[®] Pan-cancer Advanced Medium (Human)、Matrigel 基质胶、TrypLE[™] Express Enzyme、100×青霉素-链霉素、透明质酸酶、胶原酶I、组织保护液、冷PBS(4℃)、一抗[细胞角蛋白19(cytokeratin-19, CK19)、CD31、主动脉平滑肌(smooth muscle aorta, SMA)、上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、CD133]和二抗均购自Proteitech[®], CCK-8原液(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基)、4%福尔马林、乙醇、二甲苯、固体石蜡、苏木精、0.5%盐酸乙醇、氨水、乙醇伊红染色剂型、封片剂、切片机、恒温箱、溶蜡箱、玻璃缸、载玻片、盖玻片、手术刀片、镊子、包埋盒、剪刀、镊子、EP管、15 mL离心管、50 mL离心管、100 μm滤网、水浴锅、离心机、振荡器、低黏附24孔板、超净台、细胞培养箱、高压灭菌锅、细胞计数仪、酶标仪、普通荧光显微镜、激光共聚焦显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 微球粒径分布 记录冻干微球的形态分布情况,倒置荧光显微镜下观察并拍照,通过Image J软

件计算出照片内微球的直径,统计得到粒径分布图。

1.2.2 细胞培养 取出液氮中冻存细胞,迅速置于37℃水浴锅中轻晃解冻,在超净台内转移细胞悬液至15 mL离心管,再加3 mL培养基吹打混匀,560×g离心5 min。倒掉上清液,加10 mL培养基重悬接种。前后左右轻轻摇动培养皿,使细胞均匀分布,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,细胞贴壁后换培养基。根据细胞增长速度2~3 d换一次培养基。

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖 293T细胞按2×10⁷个/mL的细胞浓度接种在96孔板内,分别用DMEM培养基和微球浸提液培养,置于37℃、5% CO₂的培养箱中,分别培养1、3、5 d。到计划时间点后,吸取上清液,PBS清洗后加入CCK-8检测液110 μL,培养箱避光孵育2 h,每孔吸取90 μL至新的96孔板中用来检测,注意不要有气泡产生,使用酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

1.2.4 基于水凝胶微球建立胰腺癌原代细胞的3D培养模型

(1) 原代细胞的分离提取 标本离体后,采用无菌操作,避开肿瘤坏死区域取肿瘤组织,大小约5 mm×5 mm,在组织保存液中4℃转运。在超净台中取出样品管,涡旋振荡15 s,静置1 min,去除保护液,加入含2%青霉素-链霉素的冷PBS 10 mL,涡旋振荡15 s,静置1 min,去除PBS,重复清洗3~5次;组织消化。去除PBS,用眼科剪剪碎组织,加入1 mL浓度为2 mg/mL的胶原酶I和20 μg/mL的透明质酸酶,置于37℃水浴锅消化,每隔10 min,振荡1次,直至组织块消化成絮状;稀释过滤细胞。将消化液移至15 mL离心管中,加入适量的DMEM培养基稀释,100 μm滤网过滤,滤液经560×g离心5 min,弃去上清液,保留沉淀,加入细胞培养基重悬计数。

(2) 水凝胶微球与胰腺细胞共培养 冻干微球紫外灭菌24 h,将200 μL含3×10⁶个细胞的培养基滴加到100 mg微球中轻微摇动混合。微球充分吸收细胞悬浮液后,加培养基重悬水凝胶微球,接种于24孔低黏附细胞培养板中,37℃、5% CO₂培养3 d。其中一半用4%多聚甲醛固定30 min,鬼笔环肽和DAPI染色,PBS洗涤,载细胞微球置于普通荧光显微镜下观察微球形态和细胞分布;另一半用100 μm滤网分离微球和悬浮细胞,收集滤液于15 mL离心管中,离心收集细胞,重悬细胞并计数。收集滤网上的水凝胶微球,加入3 mL TrypLE[™] Express Enzyme 消化

15 min, DMEM中止消化, 离心收集细胞, 重悬细胞并计数。

1.2.5 石蜡切片苏木精-伊红染色 制作石蜡切片。取新鲜胰腺癌组织块用10%福尔马林固定, 用由低浓度到高浓度乙醇作脱水剂, 逐渐脱去组织块中的水分, 再将组织块置于二甲苯中透明, 然后将已透明的组织块置于已溶化的石蜡中包埋切片, 薄片一般为5~8 μm 厚, 最后贴片烘干。接下来进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, H-E染色)。染色前, 须用二甲苯脱蜡, 再经由高浓度到低浓度乙醇, 最后入蒸馏水, 方可染色。染色时将已入蒸馏水的切片放入苏木精水溶液中染色数分钟, 然后0.5%盐酸乙醇及氨水中分色, 各数秒钟, 流水冲洗20 min后入蒸馏水片刻, 入70%和90%乙醇中脱水各10 min, 入乙醇伊红染色液染色2~3 min, 染色后的切片经无水乙醇脱水, 再经二甲苯使切片透明。已透明的切片滴上封片剂, 盖上盖玻片封固, 显微镜下观察。

1.2.6 石蜡切片免疫荧光 脱蜡至水: 组织切片室温放置10 min, 放入二甲苯30 min, 由高浓度到低浓度乙醇脱蜡5 min, 后入 ddH_2O 5 min。抗原修复: 组织切片置于柠檬酸抗原修复液中进行抗原修复, PBS清洗3次, 每次5 min。组化笔画圈, 滴加5% BSA封闭30 min。滴加一抗 (CK19、CD31、SMA、CD133、EpCAM) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS洗涤3次, 每次5 min。滴加荧光二抗 (CK19为鼠源二抗, 其余均为兔源), 室温避光孵育60 min。PBS洗涤3次, 每次5 min。滴加DAPI染液, 室温避光孵育5 min。PBS洗涤3次, 每次5 min。最后加防荧光淬灭剂, 封片镜检。利用Image J软件进行荧光图片的自动

胞计数分析。

1.2.7 胰腺癌3D培养模型免疫荧光 吸去培养基, PBS清洗1遍, 加4%多聚甲醛溶液冰上固定20 min, PBS清洗3次, 每次5 min。0.25% Triton X-100冰上通透5 min, PBS洗3次, 每次5 min。3% BSA室温封闭30 min。每孔加入100 μL 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日PBST清洗3次, 每次5 min。加100 μL 二抗避光孵育45 min, PBST清洗3次, 每次5 min。加DAPI染色室温避光孵育15 min, PBST清洗3次, 每次5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存或荧光观察。利用Image J软件进行荧光图片的自动细胞计数分析。

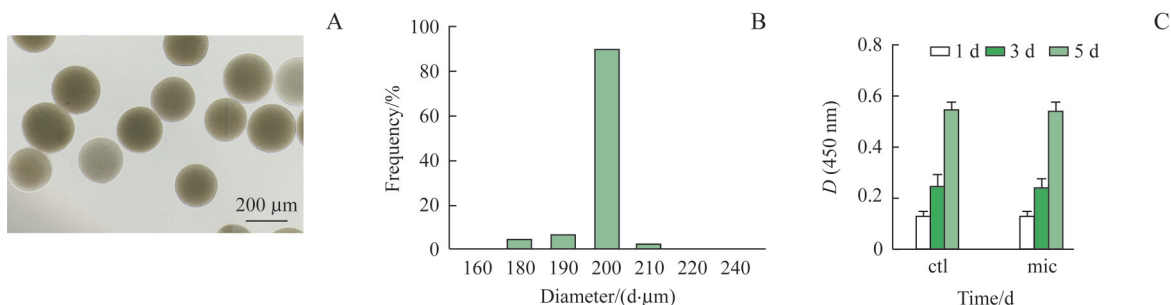
1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两独立样本 t 检验进行2组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GelMA水凝胶微球的表征

经微流控技术制备的GelMA水凝胶微球经75%乙醇和去离子水清洗后, 在倒置荧光显微镜明场下观察拍照, 结果如图1A所示, 可以观察到微球均保持高度分散且大小均一。通过Image J软件计算照片中GelMA水凝胶微球的直径并绘制柱状图 (图1B) 可见, 约97%水凝胶微球粒径为200 μm , 3%的也在200 μm 左右。为了探究GelMA多孔水凝胶微球的生物相容性, 通过CCK-8法比较2种培养基培养的293T细胞的增殖状况, 结果如图1C所示, 2种培养基培养的293T细胞增殖趋势无差别, 说明GelMA多孔水凝胶微球的生物相容性良好。



Note: A. Bright field imaging of hydrogel microspheres under a fluorescence inverted microscope ($\times 10$). The microspheres were highly dispersed and uniform in size. B. Particle size distribution of GelMA hydrogel microspheres, with an average particle size of 200 μm . C. There was no significant difference in cell proliferation between the two groups by CCK-8 assay. The ctl was 293T cells cultured in high glucose medium, and the mic group was 293T cells cultured with GelMA porous hydrogel microsphere extract.

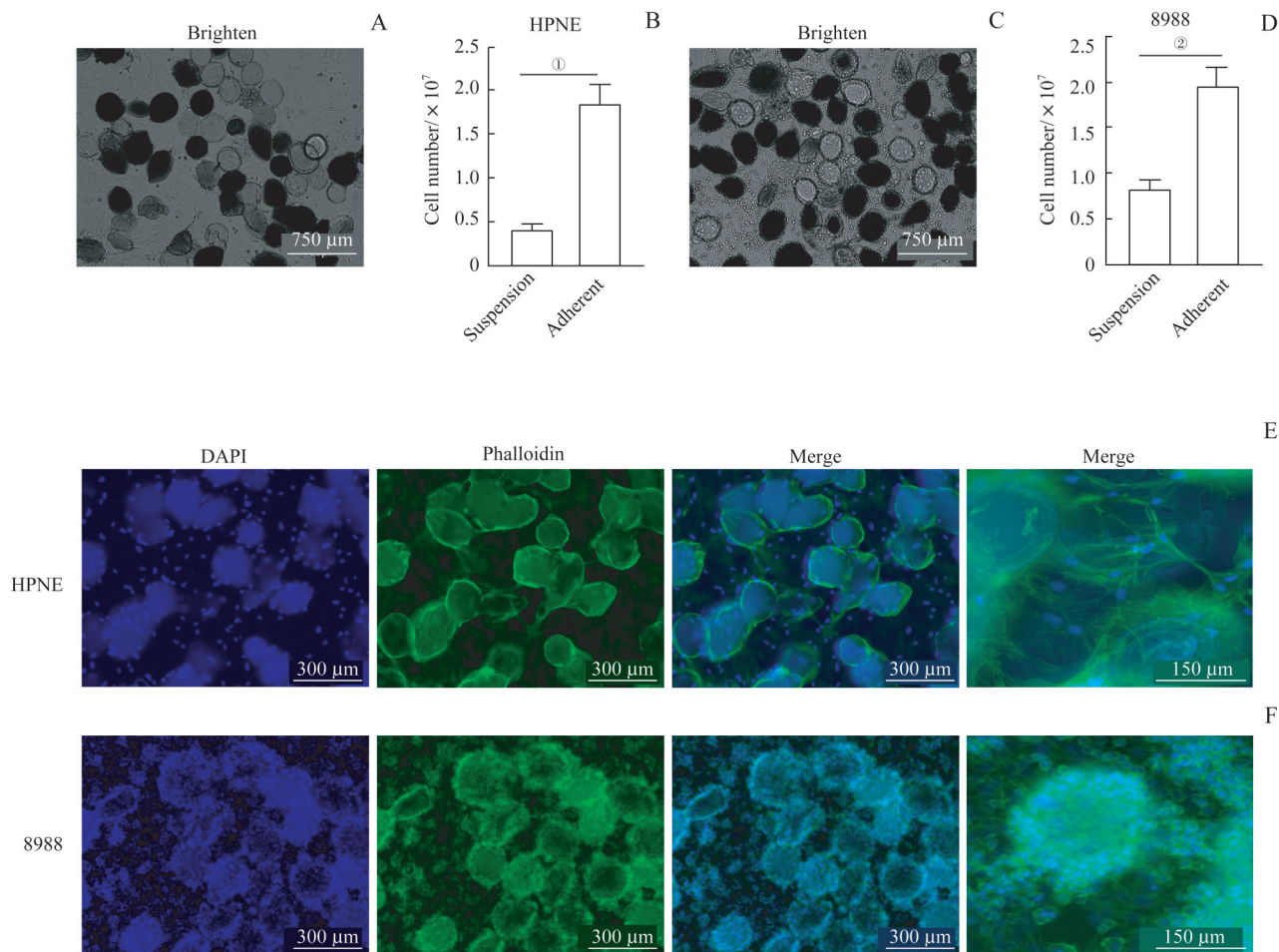
图1 GelMA水凝胶微球的表征

Fig 1 Characterization of GelMA hydrogel microspheres

2.2 正常胰腺上皮细胞和胰腺癌细胞系能够黏附在水凝胶微球表面生长

为了探究水凝胶微球能否支持胰腺细胞的生长,将胰腺癌细胞8988和正常胰腺上皮细胞HPNE分别与水凝胶微球混合培养,在第3日固定染色,发现8988和HPNE细胞均能够黏附在微球表面生长(图2A、C、E、F)。细胞计数结果显示HPNE细胞微球

表面黏附的细胞数为 1.86×10^7 ,占总细胞的81%,而悬浮细胞数为 4.21×10^6 ,占总细胞的19%(图2B);8988细胞微球表面黏附的细胞数为 1.96×10^7 ,占总细胞的71%,而悬浮细胞数为 8.32×10^6 ,占总细胞的29%(图2D)。因此,证明水凝胶微球表面具有较强的细胞亲和力,能够为胰腺细胞提供支撑点,使其黏附在微球表面正常生长。



Note: A. Bright field images of HPNE cells growing on the surface of hydrogel microspheres (×4). B. The number of HPNE cells adhered to the surface of the microspheres and the number of cells suspended in the culture flask were counted. C. Bright field images of 8988 cells growing on the surface of hydrogel microspheres (×4). D. The number of 8988 cells adhered to the surface of the microspheres and the number of cells suspended in the culture flask were counted. E. Fluorescence images of HPNE cells growing on the surface of hydrogel microspheres [DAPI (blue) staining, phalloidin (green) staining]. F. Fluorescence images of HPNE cells growing on the surface of hydrogel microspheres [DAPI (blue) staining, phalloidin (green) staining]. ^①P=0.000, ^②P=0.001.

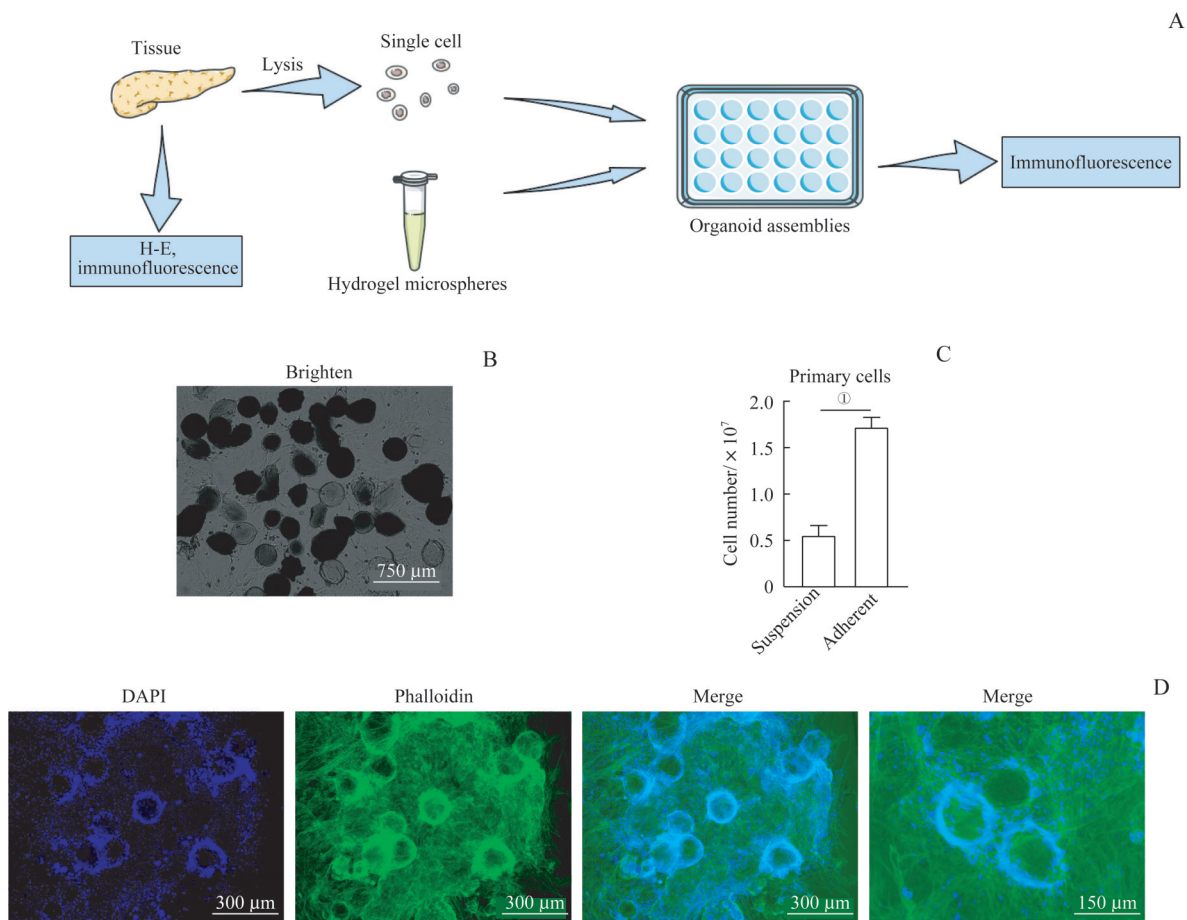
图2 正常胰腺细胞和胰腺癌细胞系均能黏附在水凝胶微球表面生长

Fig 2 Both normal pancreatic cells and pancreatic cancer cell lines can grow on the surface of hydrogel microspheres

2.3 新鲜胰腺肿瘤组织的原代细胞能黏附水凝胶微球表面生长

接下来,我们研究胰腺肿瘤来源原代细胞能否在水凝胶微球表面正常生长。本实验按照图3A所示将胰腺癌患者手术分离的肿瘤组织裂解消化成单细胞,随后将单细胞悬液与水凝胶微球混合培养。培养1周后固定染色,显微镜下观察发现新鲜肿瘤组织来源的

原代细胞也能黏附在微球表面生长,且细胞状态良好。成纤维细胞扩增长将相邻微球连接起来,形成细胞网,爬满微球表面(图3B、D)。细胞计数结果显示:微球表面黏附的细胞数为 1.73×10^7 ,占总细胞的76%,而悬浮细胞数为 5.61×10^6 ,占总细胞的24%(图3C)。这说明原代细胞也具有在水凝胶微球表面正常生长的能力。



Note: A. Schematic diagram of the 3D model of pancreatic cancer primary cells based on hydrogel microspheres. B. Bright field image of a 3D model of pancreatic cancer primary cells ($\times 4$). C. The numbers of cells adhered to the surface of the microspheres and suspended in the culture flask were counted. D. Fluorescence images of cells growing on the surface of hydrogel microspheres [DAPI (blue) staining ($\times 10$), phalloidin (green) staining ($\times 10$)]. $^{\text{①}}P=0.000$.

图3 胰腺癌组织来源细胞能在水凝胶微球表面生长

Fig 3 Pancreatic cancer tissue-derived cells can grow on the surface of hydrogel microspheres

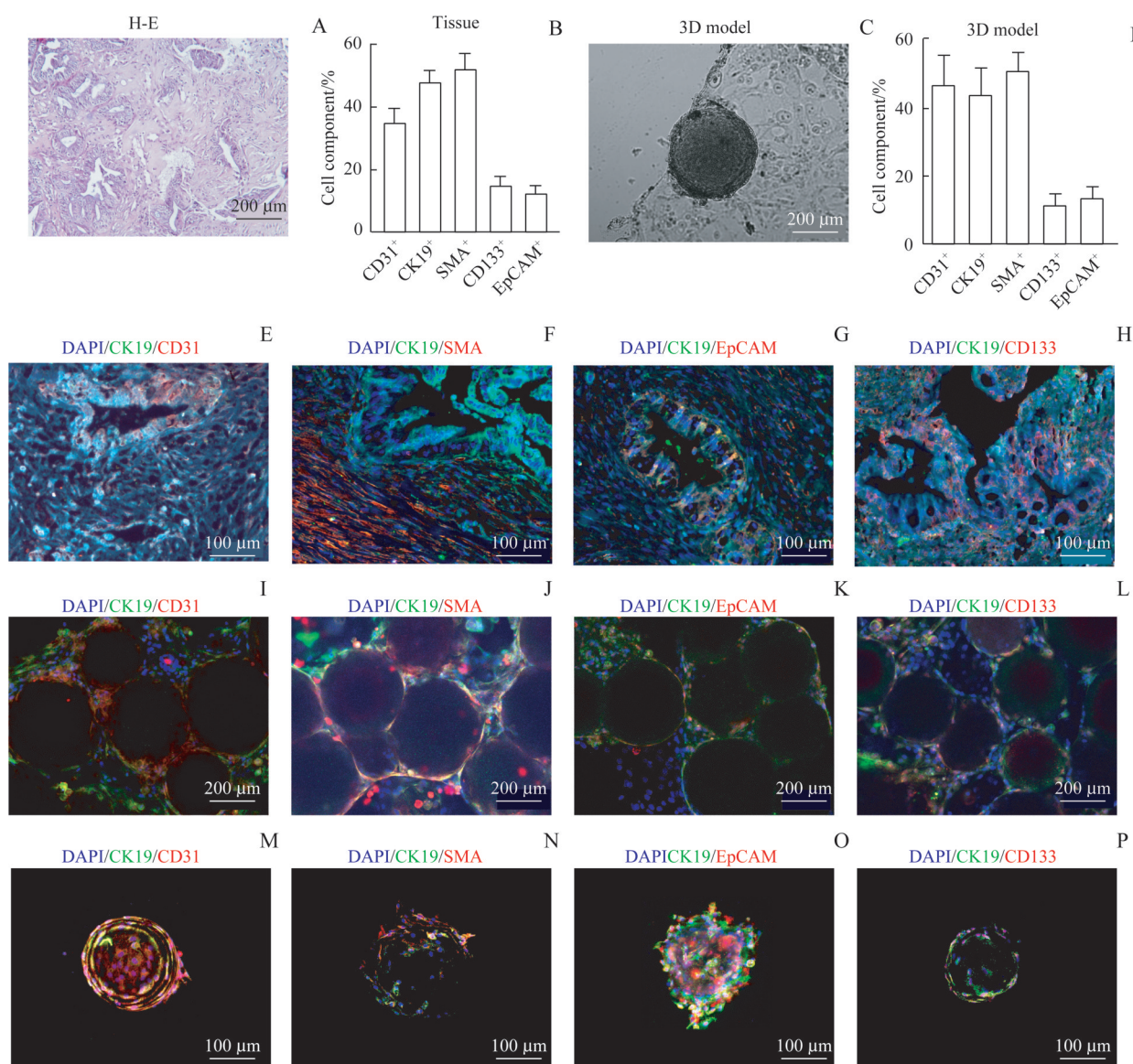
2.4 基于水凝胶微球建立的胰腺癌细胞3D培养模型包含胰腺癌肿瘤微环境的主要细胞成分

胰腺癌肿瘤微环境主要由肿瘤细胞、内皮细胞、成纤维细胞、免疫细胞等组成^[19-20]，通过分泌细胞因子和代谢产物等形式使肿瘤细胞与周围的细胞相互驯化，形成高度异质的肿瘤微环境，加速了胰腺癌的进展。本研究将胰腺癌肿瘤新鲜组织和来源于该组织的原代细胞构建的水凝胶3D培养球体固定染色。H-E染色结果显示肿瘤组织中富含基质成分（图4A），明场图片显示3D培养球体生长状况良好（图4C）。用胰腺癌肿瘤微环境主要细胞成分的代表标志物对肿瘤组织和水凝胶3D培养球体进行免疫荧光染色。CK19为PDAC的重要标志物，肿瘤组织切片染色结果显示胰腺导管周围有明显的阳性信号（图4E~H）。3D培养球体荧光成像显示CK19阳性细胞聚集生长，与肿瘤组织的免疫荧光结果相一致（图4I~L）。CD31是内皮细胞的重要标志物，组织切片染色显示CD31阳性细胞

与胰腺导管细胞镶嵌或内皮细胞在导管细胞周围附近生长（图4E）。3D培养球体染色发现内皮细胞更易黏附在水凝胶微球表面生长，内皮细胞之间黏附生长将临近的微球连接起来，形成一个整体，胰腺导管细胞与内皮细胞或依附或镶嵌生长（图4I），这种生理结构与组织极为类似。SMA是成纤维细胞的重要标志物，本研究实验结果显示PDAC周围存在大量的成纤维细胞（图4F），像一道屏障包围着肿瘤组织。3D培养球体染色发现水凝胶微球表面生长大量的成纤维细胞，梭长的胞体相互连接，将临近微球连接起来，编织成细胞网，胰腺导管细胞在细胞网中生长（图4J）。肿瘤干细胞是具有自我更新和决定肿瘤复发的重要细胞^[15]。CD133和EpCAM都是肿瘤干性相关标志物。本研究用这2种抗体对组织切片和3D培养球体分别染色，结果显示CD133⁺/CK19⁺、EpCAM⁺/CK19⁺的细胞数量较少（图4G、H），说明PDAC细胞中只有少数细胞是肿瘤干细胞。在基于水凝胶微球建立的3D培

养系统中也有类似发现(图4K、L)。肿瘤组织切片荧光统计结果显示CK19⁺细胞占比48%, CD31⁺细胞占比35%, SMA⁺细胞占比47%, CD133⁺细胞占比15%, EpCAM⁺细胞占比13%(图4B);水凝胶3D培养的荧光统计结果显示CK19⁺细胞占比44%, CD31⁺细胞占比47%, SMA⁺细胞占比51%, CD133⁺细胞占比12%, EpCAM⁺细胞占比14%(图4D)。这说明,水凝胶3D培养模型中不同细胞类型的占比与其原代肿瘤组织的细胞组成类似。单个3D培养模型的结构

图像(图4M~4P)显示:几乎所有细胞都会黏附在水凝胶微球表面生长,然而可能由于细胞和微球分布不均,导致各个微球表面黏附生长的细胞数量存在差异。如图4N所示,微球表面细胞比较少,而图4O所示微球表面长满了密密麻麻、层层叠叠的细胞。不同肿瘤组织来源的原代细胞所构建的水凝胶3D培养系统中各种细胞组分比例具有显著差异。总之,以上所有结果都说明基于水凝胶微球建立的胰腺癌3D培养模型具有胰腺癌肿瘤微环境的主要细胞组成。



Note: A. H-E staining pictures of pancreatic cancer tissue sections ($\times 5$). B. The percentage of each cell in the tissue. C. Bright field images of pancreatic cancer primary cell 3D culture model ($\times 10$). D. The percentage of each cell in the 3D culture model. E-H. Immunofluorescence staining pictures ($\times 10$) of pancreatic cancer tissue sections, stained with CD31, SMA, CD133, EpCAM (red), CK19 (green), and DAPI (blue), respectively. I-L. Immunofluorescence staining pictures ($\times 10$) of pancreatic cancer primary cell 3D culture model [confocal microscope x, y axis scan synthetic 2D image stained with CD31, SMA, CD133, EpCAM (red), CK19 (green), and DAPI (blue), respectively]. M-P. Immunofluorescence-stained 3D images ($\times 20$) of pancreatic cancer primary cell 3D culture model [confocal microscopy x, y, z axis scans of the synthesized 3D structures, stained with CD31, SMA, CD133, EpCAM (red), CK19 (green), and DAPI (blue), respectively].

图4 胰腺癌原代细胞3D培养模型包含胰腺癌肿瘤微环境的主要细胞成分

Fig 4 Pancreatic cancer primary cell 3D culture model contains major cellular components of the pancreatic cancer tumor microenvironment

3 讨论

胰腺癌是一种恶性程度很高的肿瘤,其预后差,生存期短,缺乏靶向药物。建立新鲜组织来源的胰腺癌3D体外培养模型对药物开发和筛选十分重要。类器官属于3D细胞培养物,与对应的器官拥有类似的空间组织并能够重现器官的部分功能,从而提供一个高度生理相关系统^[21]。但是,Matrigel基质胶类器官成本高,培养条件苛刻,并不是所有的患者肿瘤组织都可以成功建立类器官。近年来,有很多生物材料应用于类器官装配体研究。有研究^[12]表明水凝胶类器官装配体材料能帮助原代肿瘤细胞在3D体外条件下存活,能更好地模拟肿瘤微环境,缩短培养时间和提高类器官的成功率。

本研究基于水凝胶微球的3D结构和强吸附细胞能力,将患者来源的新鲜组织裂解成原代细胞,并与水凝胶微球在类器官专用培养基共培养,10 d后固定染色,显微观察发现原代细胞3D培养球体具有胰腺癌组织的重要特征。免疫荧光显示内皮细胞、成纤维细胞、胰腺导管上皮细胞等黏附在水凝胶表面生长,形成典型的肿瘤微环境,模拟肿瘤组织微环境的异质性。荧光统计结果显示内皮细胞、胰腺导管上皮细胞、成纤维细胞和肿瘤干细胞的细胞百分比在同一患者来源的组织和原代细胞3D培养模型中比较接近。不同肿瘤组织来源的原代细胞所构建的水凝胶3D培养模型中各种细胞组分比例具有显著差异。肿瘤干细胞是肿瘤中具有自我更新和驱动肿瘤发生的细胞^[19]。CD133和EpCAM染色结果显示肿瘤组织和3D培养模型包含少量的肿瘤干细胞,这与之前研究^[20]结果一致,表明水凝胶3D培养系统含有与原代肿瘤类似的肿瘤干细胞比例。肿瘤微环境包括周围的免疫细胞、血管、细胞外基质、成纤维细胞、淋巴细胞、骨髓源性炎症细胞和信号分子^[20,22]。恶性和非恶性细胞之间的相互作用形成肿瘤微环境,影响癌症的发生和进展^[23-24]。内皮细胞是肿瘤微环境的重要组成部分,它在肿瘤的发展和肿瘤细胞免疫逃逸中发挥关键作用。肿瘤血管通常从已存在的血管向外分支生成,或来自内皮祖细胞^[25]。通过这种方式,这些细胞为肿瘤的生长和发展提供营养支持。肿瘤微环境主要成分还包括大量的免疫抑制细胞,如粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞。但由于组织中免疫细胞的

提取难度大,我们在消化裂解组织中免疫细胞基本死亡,因此在本研究的水凝胶3D培养系统中并未检测到免疫细胞的存在。后续我们将改进裂解方案以提高免疫细胞的成活率。胰腺癌肿瘤微环境中包含大量的成纤维细胞^[26-27]。成纤维细胞为肿瘤中的内皮细胞完成血管生成过程提供支持,促进癌细胞从原发肿瘤部位迁移到血液中,从而发生全身转移。此外,成纤维细胞在胰腺癌中具有化疗抵抗作用^[28-29]。本研究建立的水凝胶3D培养模型包含大量的成纤维细胞,具有用于药物筛选的优势。

总之,本研究基于水凝胶微球建立胰腺癌原代细胞3D培养模型。本研究一方面展示了一种可作为胰腺癌类器官装配体的新型生物材料物质,另一方面证明所构建3D体外细胞培养模型包含胰腺癌肿瘤微环境的主要细胞成分,可以更好地应用于胰腺癌的药物筛选过程,为临床应用提供技术支持。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究得到上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会的批准[文件号:(2021)临伦审第(161)号]。新鲜胰腺癌组织来源于上海交通大学医学院附属瑞金医院胰腺中心行胰腺切除术的胰腺癌患者,相关患者签署了知情同意书。

The research protocol was approved by the Ethics Committee of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine [Approved Letter No. (2021) Linlun Examination No. (161)]. Fresh pancreatic cancer tissues were obtained from pancreatic cancer patients who underwent pancreatectomy in the Pancreatic Center of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. The relevant patients signed the informed consent form.

作者贡献/Authors' Contributions

蒋玲曦、马芳芳参与实验设计;秦洁洁、任灵杰参与实验的具体执行;唐笑梅、刘佳、施敏敏参与论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

The study was designed by JIANG Lingxi and MA Fangfang. The experiments were performed by QIN Jiejie and REN Lingjie. The manuscript was drafted and revised by TANG Xiaomei, LIU Jia and SHI Minmin. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2022-05-18

• Accepted: 2022-08-21

• Published online: 2022-00-00



参·考·文·献

- [1] ANSARI D, TINGSTEDT B, ANDERSSON B, et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow[J]. *Future Oncol*, 2016, 12(16): 1929-1946.
- [2] KUNZMANN V, SIVEKE J T, ALGÜL H, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine *versus* nab-paclitaxel plus gemcitabine followed by FOLFIRINOX induction chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer (NEOLAP-AIO-PAK-0113): a multicentre, randomised, phase 2 trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6(2): 128-138.
- [3] BACHET J B, HAMMEL P, DESRAMÉ J, et al. Nab-paclitaxel plus either gemcitabine or simplified leucovorin and fluorouracil as first-line therapy for metastatic pancreatic adenocarcinoma (AFUGEM GERCOR): a non-comparative, multicentre, open-label, randomised phase 2 trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2(5): 337-346.
- [4] SEINO T, KAWASAKI S, SHIMOKAWA M, et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(3): 454-467. e6.
- [5] TIRIAC H, BELLEAU P, ENGLE D D, et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(9): 1112-1129.
- [6] D'ANDREA A D. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2018, 71: 172-176.
- [7] COLEMAN O, HENRY M, O'NEILL F, et al. Proteomic analysis of cell lines and primary tumors in pancreatic cancer identifies proteins expressed only *in vitro* and only *in vivo*[J]. *Pancreas*, 2020, 49(8): 1109-1116.
- [8] BYRNE A T, ALFÉREZ D G, AMANT F, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 254-268.
- [9] BARNES R P, DE ROSA M, THOSAR S A, et al. Telomeric 8-oxoguanine drives rapid premature senescence in the absence of telomere shortening[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2022, 29(7): 639-652.
- [10] SUGA H. Making pituitary hormone-producing cells in a dish [Review][J]. *Endocr J*, 2016, 63(8): 669-680.
- [11] SCALISE M, MARINO F, SALERNO L, et al. From spheroids to organoids: the next generation of model systems of human cardiac regeneration in a dish[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13180.
- [12] WHITAKER R, HERNÁEZ-ESTRADA B, HERNÁNDEZ R M, et al. Immunomodulatory biomaterials for tissue repair[J]. *Chem Rev*, 2021, 121(18): 11305-11335.
- [13] KIM Y H, DAWSON J I, OREFFO R O C, et al. Gelatin methacryloyl hydrogels for musculoskeletal tissue regeneration[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2022, 9(7): 332.
- [14] HUCH M, GEHART H, VAN BOXTEL R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver[J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 299-312.
- [15] HERSEL U, DAHMEN C, KESSLER H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(24): 4385-4415.
- [16] ZADPOOR A A. Meta-biomaterials[J]. *Biomater Sci*, 2019, 8(1): 18-38.
- [17] 何家辰, 刘畅, 陈迟迟, 等. 制备负载细胞可注射微球及体外评价[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(28): 4483-4488.
- HE J C, LIU C, CHEN C C, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of injectable microspheres loaded with cells[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(28): 4483-4488.
- [18] WU J, LI G, YE T, et al. Stem cell-laden injectable hydrogel microspheres for cancellous bone regeneration[J]. *Chem Eng J*, 2020, 393: 124715.
- [19] FEIG C, JONES J O, KRAMAN M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(50): 20212-20217.
- [20] ZHAO X, LIU S, YILDIRIMER L, et al. Injectable stem cell-laden photocrosslinkable microspheres fabricated using microfluidics for rapid generation of osteogenic tissue constructs[J]. *Adv Funct Mater*, 2016, 26(17): 2809-2819.
- [21] KORNEEV K V, ATRETKHANY K N, DRUTSKAYA M S, et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis[J]. *Cytokine*, 2017, 89: 127-135.
- [22] SINGH R, MISHRA M K, AGGARWAL H. Inflammation, immunity, and cancer[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 6027305.
- [23] BAGHBAN R, ROSHANGAR L, JAHANBAN-ESFAHLAN R, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance[J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 59.
- [24] KIM J, BAE J S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6058147.
- [25] PETITPREZ F, MEYLAN M, DE REYNIÈS A, et al. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 784.
- [26] HANAHAN D, COUSSENS L M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 309-322.
- [27] ABADJIAN M Z, EDWARDS W B, ANDERSON C J. Imaging the tumor microenvironment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1036: 229-257.
- [28] ÖHLUND D, HANDLY-SANTANA A, BIFFI G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(3): 579-596.
- [29] VON AHRENS D, BHAGAT T D, NAGRATH D, et al. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 76.

[本文编辑] 包 玲