

综述

三维细胞培养技术的发展及其在干细胞和肿瘤细胞中的应用

赵典典 侯玲玲* 张靖思 胡红刚 晏琼

(北京交通大学理学院生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

摘要 三维细胞培养技术是在二维细胞培养和动物实验模型的基础上发展起来的简单、有效的细胞培养方式。利用三维细胞培养技术可以更好的模拟体内微环境, 为相关研究领域提供新的手段。目前, 三维细胞培养技术在组织工程、肿瘤学、再生医学和干细胞生物学等研究领域均有应用。该文就近年来三维细胞培养技术的发展及其在干细胞和肿瘤细胞中的应用进行综述。

关键词 三维细胞培养技术; 干细胞; 肿瘤细胞

The Development of Three-Dimensional Cell Culture Technology and Its Application in Stem Cells and Tumor Cells

Zhao Diandian, Hou Lingling*, Zhang Jingsi, Hu Honggang, Yan Qiong

(College of Life Science and Bioengineering, School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

Abstract Three-dimensional cell culture technique is a kind of simple and effective culture system which is developed on the basis of the two-dimensional cell culture and *in vivo* animal model. Three-dimensional cell culture can better mimic the *in vivo* cell environment and provide a new research tool for the relevant fields. At present, three-dimensional cell culture technique is used in many areas, including tissue engineering, tumor treatment, regenerative medicine and stem cell biology, etc. Here, we review recent research progress in three-dimensional cell culture technique and its application in stem cells and tumor cells.

Keywords three-dimensional cell culture technique; stem cells; tumor cells

目前, 体外细胞水平的研究很大程度上是在二维培养条件下完成的; 在体内, 主要在实验动物模型体内完成。二维细胞培养技术培养的细胞在体外环境下逐渐丧失了其体内原有的性状, 在形态、结构和功能方面都与其在体内自然生长的状态相去甚远^[1]; 而动物实验由于体内的多种不可控因素的制约以及体内和体外环境相互影响而变得复杂化, 不利于探究具体机制。鉴于两者均存在一定的局限^[2],

近年来发展了三维细胞培养技术(three-dimensional cell culture, TDCC), 这种培养方法获得的细胞在形态结构、增殖分化、基因表达及细胞的功能活动等方面均与二维培养存在显著不同^[3]。三维细胞培养既能保留天然细胞微环境的物质结构基础, 又能更好的模拟体内细胞生长的微环境^[4], 克服了之前两种方式的缺陷, 为细胞水平的研究提供了一种更简单、更安全、更可靠的方法。如何能够维持干细胞

收稿日期: 2015-04-30 接受日期: 2015-07-06

中央高校基本科研业务费(批准号: 2014JBM119、2015YJS164)和国家自然科学基金青年基金(批准号: 81201762)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-51688577-602, E-mail: llhou@bjtu.edu.cn

Received: April 30, 2015 Accepted: July 6, 2015

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.2014JBM119, 2015KJS164) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81201762)

*Corresponding author. Tel: +86-10-51688577-602, E-mail: llhou@bjtu.edu.cn

网络出版时间: 2015-07-29 11:00:43 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150729.1100.003.html>

的自我更新并使其定向分化是干细胞研究的两个基本问题。目前, 绝大多数干细胞相关研究均使用二维平面培养体系, 但干细胞在体内的生长、分化微环境应为三维体系。干细胞的分化及其发育方向与其所处微环境紧密相关, 而体外三维培养体系能够更好的模拟干细胞的体内生长环境, 并能够为组织工程研究提供更加准确可靠的实验数据。肿瘤细胞在特定时间、空间条件下能够产生与其发生和发展密切相关的特定表型、结构和生长行为。二十世纪70年代的研究表明, 肿瘤的发生与肿瘤所处的微环境密切相关^[1]。在动物体内肿瘤细胞间、肿瘤细胞与基质间通过信号传导来维持肿瘤的生长。传统二维细胞培养技术无法模拟肿瘤发生的形态学特点, 但三维细胞培养技术能够通过体外构建类似体内的细胞生长分化系统来对肿瘤细胞生长的微环境进行模拟, 从而研究肿瘤恶性表型与肿瘤细胞所处环境的关系, 进而随着技术的改进实现多种细胞共培养, 达到更好模拟体内环境的目的。本文就近年来三维细胞培养技术的发展及其在干细胞和肿瘤细胞中的应用进行综述。

1 三维细胞培养技术

1885年德国人Willhelm Roux从鸡胚中分离细胞被认为是组织细胞培养技术的萌芽^[2], 而Harrison^[3]在1907年以及Carrel^[4]在1912年开始研究的离体动物细胞培养方法标志着现代细胞培养技术的诞生。在体外细胞培养技术发明和发展的这一百多年的时间, 二维细胞培养技术已经具有培养简单、易操作、费用低等优点, 但在很多时候通过二维培养得出的实验结果并不能在动物体内得到重复。科研人员认为, 这种体外和体内实验结果差异的原因主要是由于二维培养的细胞虽能在体外增殖和分化, 但其生长发育的环境和条件与体内差异较大, 这就导致细胞的基因表达和形态特征与体内差异较大。为尽可能的模仿细胞在动物体内的生长环境并得到更加类似体内生长的细胞, 三维细胞培养技术得到了越来越多的关注。

20世纪80年代, 美国劳伦斯伯克利国家实验室的Mina Bissell和William Ole Peterson在对乳腺癌的研究中发明了三维细胞培养技术, 他们发现, 三维培养的正常的乳腺上皮细胞形成了腺泡状单层管状结构, 同时, 原癌基因激活的乳腺上皮细胞也形成了碗

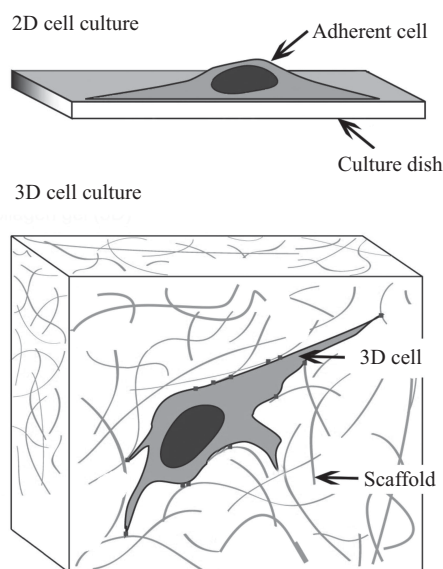


图1 3D细胞培养模式图(根据参考文献[5]修改)

Fig.1 Three-dimensional cell culture model (modified from reference [5])

状腺泡结构(图1)^[5]。三维细胞培养技术是指将动物细胞与具有三维结构的支架材料共同培养, 使细胞能够在三维立体空间生长、增殖和迁移, 构成三维的细胞-细胞或细胞-载体复合物, 从而更好地模拟细胞在体内的生长环境。在近30年的研究过程中, 三维培养技术也得到了巨大的进步, 目前三维培养技术主要分为需要支架的三维培养技术和不需要支架的三维细胞培养技术。细胞支架主要是在三维空间内构建供细胞附着和生长的类似脚手架的多孔结构, 细胞依附于支架进行三维生长和迁移, 主要的支架材料有胶原和水凝胶等, 价格较为低廉且操作简单; 而不需要支架的三维培养技术主要是通过物理方法使贴壁细胞悬浮于培养基中以达到三维培养的目的, 目前主要的技术有微载体、磁悬浮、悬滴板和磁性三维生物印刷等技术, 这类方法操作较为复杂, 前期投入较大, 目前绝大多数三维培养均借助于支架材料, 下文还会对三维支架材料进行介绍。近年, 三维细胞培养技术在肿瘤学、干细胞生物学和器官再造等领域得到了普遍的应用, 同时很多研究者也关注到, 在病毒监测、药物筛选和评估实验等方面, 利用三维培养得出的结论与动物实验更加类似, 因此研究三维细胞培养技术尤为重要。

2 三维细胞培养技术的优点

自首次建立体外细胞培养体系以来, 二维细胞培养技术有了蓬勃的发展。但是, 在一些情况下, 二

维细胞培养技术所取得的研究结果与体内的情况不吻合,在形态、结构和功能方面都与在体内自然生长的细胞相去甚远。麻省理工学院著名肿瘤学专家Weinberg等^[6]指出,应用二维培养方法研究恶性肿瘤细胞似乎有些怪异。而动物模型耗时、耗力且价格昂贵,我们通常在动物身上只观察到最终呈现的表现,却不能很好地探究其中的过程,同时动物实验涉及动物个体差异、免疫排斥等问题,不易控制,也不易得出普遍又准确的结论^[7]。三维细胞培养技术可利用模块化组织工程技术较好地模拟体内细胞生长环境,并凭借该技术得到更快的发展。

目前,已经有大量的实验证据表明,三维培养的细胞更适用于抗癌药物的筛选,更能够预测与肿瘤相关的机制。Chetty等^[8]将肝癌细胞分别在二维和三维培养条件下进行药物处理,结果发现,肝癌细胞在三维培养体系中对药物的敏感性比二维条件下低,更接近于体内肿瘤细胞对药物的敏感性。Chitcholtan等^[9]通过研究子宫内膜细胞分别在二维和三维培养条件下的生长模式、信号分子的表达及代谢情况,发现三维培养体系明显优于二维培养体系。Leslie等^[10]的研究发现,使用三维培养技术传代培养乳腺上皮细胞可以观察IL-6的分泌,并可以激活STAT3通路;同时,在异种移植物和人类肿瘤中也证明了这一现象确实存在,而在二维培养条件下,却不能得出同样的结论。Tit-Oon等^[11]的研究结果表明,生长在三维环境中的胆囊癌细胞比生长在二维环境中的细胞形态变化更加显著,而且能够增强细胞外基质的沉积,能够分泌更多的蛋白,有利于更好地研

究胆囊癌形成的机制。

综上所述,三维细胞培养更加灵活、简单、安全和可控,比二维培养有更多的优势,见表1。目前,三维细胞培养技术在细胞传代、细胞复苏、细胞冻存等方面都已经取得了很大的进展。为此,从不同的研究需求出发,建立更接近细胞生存环境的三维细胞培养模型体系以对细胞进行更好的培养,就显得格外重要了。

3 三维细胞培养技术的支架材料

由于支架材料具有价格低廉和操作简便的优势,绝大多数的科研人员都以支架材料为手段对三维培养进行研究。三维培养支架材料可分为天然细胞外基质和人造基质,是组织工程学研究中最重要内容之一。研究表明,支架材料本身的结构特性和表面活性可为细胞提供用于生长依附的空间架构,同时能够协调生物活性因子和细胞之间的相互作用,增进细胞之间的黏附,促使细胞的基因表达、分泌,使细胞的功能活动更接近于体内^[18]。理想的生物支架材料应具备以下特点:良好的组织相容性、无毒性、可降解、硬度好、多孔性、可渗性好、弹性好等。常用的三维细胞培养支架材料有天然生物材料、人工合成高分子材料等。

3.1 天然高分子材料

天然高分子材料来源于动物或人体,其网状结构、成分、生物力学环境适合细胞的增殖、黏附及新陈代谢,而且该种材料抗原性低、无毒性、可降解、能促进细胞生长和黏附,因此越来越受到研究者的

表1 三维细胞培养相比于二维细胞培养的优点
Table 1 Advantages of 3D cell culture compared to 2D cell culture

特征 Characteristic	二维细胞培养 2D cell culture	三维细胞培养 3D cell culture
Morphology	Cells in the plane growth, showing spindle or flat round shape, adherent growth, small nucleolus	Cells grow in the 3D space and present irregular polygon or sphere, layered growth, large nucleolus ^[11]
Cell junction	Most of cells grow alone, a few cells aggregate	The 3D network structure with large number of cells-matrix and cell-cell interactions. A large number of cells aggregate into clusters ^[12]
Gene expression and metabolism	Less secretory factors	Enhance the expression of key growth factors and secrete more key proteins ^[9-10,13]
Proliferation	Apoptosis begin after 5 days	Greater proliferation potential ^[14-16]
Differentiation	Weak differentiation potential	Greater differentiation potential ^[16-17]
Drug susceptibility	High susceptibility	Low susceptibility ^[8]

重视。天然高分子材料主要包括胶原、Matrigel、壳聚糖、明胶等。

3.1.1 胶原 胶原是人体中含量较高、白色透明、无分支的原纤维,在动物的皮肤、骨、软骨、牙齿、肌腱韧带和血管中有较高的表达。胶原具有良好的酶和细胞亲和性,可吸收并结合多种酶和细胞,使其固定化。同时胶原的免疫排斥反应小,力学性能高,能够促进细胞生长,具有较高的生物相容性和生物降解性。目前,胶原凭借其独特的优势以水凝胶的形式作为三维细胞培养的普遍支架材料。胶原凝胶是含水的凝胶,营养物可以自由进出凝胶网络,使分散于网络中的细胞都能得到营养,并易于添加各种生长因子,有利于细胞的黏附、增殖和分化。总之胶原是最具前景的一项生物材料,已广泛的应用于心肌、肝脏等人体组织器官的工程化组织构建。Luo等^[19]在牛肌腱复合胶原上培养人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPDLFs),结果发现,牛肌腱复合胶原明显增强HPDLFs的增殖,且HPDLFs细胞间的黏附能力有所提高,证明了牛肌腱复合胶原具有良好的生物相容性,可作为支架材料应用于牙周组织工程研究。Meng等^[20]研究表明,以胶原、明胶水凝胶为支架构建的三维培养系统能够更好地模拟肝脏组织结构,并能在更长时间内保证肝细胞进行生长、分裂、代谢等各种复杂的功能。

3.1.2 Matrigel Matrigel是从富含胞外基质蛋白的Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)小鼠肿瘤中分离出来的重组基质成分。Matrigel的主要成分是层黏连蛋白(laminin),一种可溶性的大分子糖蛋白,分布在细胞外基质中,其分子上存在某些细胞表面黏附分子的结合位点,以此促进细胞的黏附、生长与分化。Matrigel中还含有IV型胶原、硫酸乙酰肝素、蛋白多糖、内毒素、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)等多种细胞外基质、蛋白酶和生长因子成分,均能参与调节细胞的生长、分化、迁移及组织形成。因此,Matrigel比单一细胞外基质成分更能发挥生物学作用,更接近在体细胞生长的微环境,是理想的体外培养平台。近年来,Matrigel凭借其具有稳定的增殖率、高酶活性、可以通过诱导细胞表达必要的蛋白质,从而促进细胞之间更好的连接等优点,用于构建适于细胞生长的三

维立体支架。目前,Matrigel在胚胎发育、肿瘤学研究、组织损伤后修复过程中均发挥着重要的作用。Li等^[21]在Matrigel上培养人汗腺上皮细胞,结果发现,Matrigel能够促进上皮细胞分化成汗腺组织,表明Matrigel可以作为组织工程的支架材料。

3.2 人工合成高分子材料

人工合成高分子材料主要包括聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物、聚己内酯等脂肪族聚酯等。相对于天然材料,更利于进行标准化的生产,其具有良好的可塑性,可以加工成各种实验所需要的结构形状。但是人工合成高分子材料亲水性差、对细胞的黏附性较弱,易引发无菌性炎症,因此在某些方面还有待于进一步改进。

3.2.1 聚乳酸 聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)是将天然农作物所提取的淀粉原料进行发酵、人工化学合成等一系列方法得到的一种全新形态的生物降解塑料。PLA不仅具备良好的生物降解和生物相容性、可吸收性及可降解性,而且它还具有机械强度高、化学稳定性好等优点,成为了最具竞争力的生物材料,广泛应用于缝线、支架、医药和农业等领域。但是PLA疏水性较强,成骨性能不理想,降解产物偏酸性,在体内易引起无菌性炎症,从而不利于细胞的黏附和增殖,因而限制了其应用,所以PLA需要与其他材料复合后方可达到较好的效果。Man等^[22]利用聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(methoxypolyethylene glycol-poly-lactic acid, MPEG-PLA)包裹齐墩果酸(oleanolic acid, OA),以解决OA疏水性和水溶性差而不能达到抗癌药性的缺陷,结果表明,MPEG-PLA共聚物是口服抗癌药物载体的最佳选择。Llorens等^[15]制备了含有聚六亚甲基双胍(polyhexamethylenebiguanide hydrochloride, PHMB)的PLA纳米纤维,并用该材料作为生物支架材料三维培养成纤维细胞和上皮细胞,结果发现,与二维培养相比,三维培养的细胞具有更好的增殖活性和黏附能力。

3.2.2 聚己内酯 聚己内酯(polycaprolactone, PCL)是由 ϵ -己内酯开环聚合所得的线性脂肪族聚酯。自20世纪60年代以来,PCL具有良好的药物透过性、力学性能、生物相容性、低毒性、易于加工等优势,并有利于细胞的生长、繁殖,因此其研制与开发日益受到人们的重视。目前,PCL已经获得美国FDA的批准,在生物医学、组织工程支架、药

学材料等领域得到越来越广泛的应用。然而, PCL 仍存在亲水性差、熔点及分解温度低、成型工艺复杂、强度不高等缺点, 所以需要与其他材料复合使用。Roohani-Esfahani等^[12]利用PCL/碳酸钙骨(calcium phosphate cement, CPC)复合支架培养骨髓来源细胞(bone marrow-derived cells, BMDCs), 结果发现, BMDCs具有更好的增殖、黏附和成骨潜能, 从而说明了该复合支架具有良好的力学强度、生物活性和生物相容性, 能够为BMDCs的爬行长入、黏附、增殖及成骨潜能的发挥提供更好的微环境, 进而证明了该复合材料可以作为骨组织支架, 与种子细胞复合以构建组织工程化骨, 应用于骨组织缺损的修复和功能重建。综上, 表2总结了不同的材料的各自优缺点。

最新研究成果表明, 用于三维培养的支架材料

的种类越来越多, 培养方法更为标准。例如, 通过与微流控、微制造、微芯片等前沿技术融合, 已成功研制出新型三维肿瘤组织微芯片^[29]、绿色荧光蛋白三维模型^[30]、生物活性纳米纤维支架^[31]、灌注的微流体反应装置^[32]等, 为细胞研究提供新的、有效的模型体系。

4 三维细胞培养技术在细胞研究中的应用

三维细胞培养技术因其可再现组织细胞的体内生长情况, 已在再生医学^[26]、肿瘤治疗^[27]、病毒监测^[28]、药物筛选和评估^[29]等领域备受关注。近年来, 随着细胞生物学、材料学、生物化学及免疫学等诸多学科与组织工程学的结合, 促进了三维细胞培养技术的不断发展和完善, 已经应用到很多种细

表2 三维细胞培养的支架材料
Table 2 3D cell culture's scaffold

分类 Classification		优点 Advantages	缺点 Disadvantages	应用 Application
Natural material	Collagen	Low antigenicity, non-toxic, biodegradable, super-hydrophilic property, low cost, easy to absorb and combine a variety of enzymes and cells, etc	Poor mechanical properties, poor plasticity, etc	Engineered tissue constructs of heart, liver and other body tissues and organs, etc ^[19-20]
	Matrigel	Stable proliferation rate, high telomerase activation, best adhesion ability and biocompatibility, promote cell proliferation and secretion of matrix, etc	Expensive, low mechanical strength, easy to degrade	The research of embryonic development and tumor treatment, tissue injury repair, etc ^[23-24]
Macromolecule material	Polylactic acid (PLA)	High mechanical strength, better biodegradability and biocompatibility, etc	Strong hydrophobicity, not easy to osteogenesis, acidic degradation products can lead to inflammation in the body, disadvantages for cell adhesion and proliferation	Medicine, agriculture and other fields ^[22,25]
	Polycaprolatone (PCL)	High drug permeability, better mechanical properties and biocompatibility, low toxicity, easy to process, etc	Weak hydrophilic, low intensity, greatly change of pH value during the degradation process	Biomedicine, pharmaceutical materials and other fields ^[12]

表3 三维细胞培养技术在多种细胞中的应用

Table 3 The application of three-dimensional cell culture technique in variety of cells

种类 Direction	细胞 Cell	应用 Application
Stem cell	Mesenchymal stem cells	Improve nuclear cytoplasm ratio and differentiation potential, increase the expression of cells factors ^[30-31]
	Neural stem cells	Promote the differentiation capacity to astrocytes and neuronal cell, enhance nerve-related genes expression ^[32-33]
	Embryonic stem cells	Significantly increased proliferation rate and differentiation potential ^[34]
Tumor treatment	Breast cancer, hepatic carcinoma, ovarian cancer	Establish microenvironment model that is closer to <i>in vivo</i> niche, provide the conditions for drug screening and potential therapeutic methods ^[35-36]

胞的研究中(表3)。

4.1 三维细胞培养技术在干细胞中的应用

自从威斯康辛大学的Thomson等^[37]在1998年首次成功建立人胚胎干细胞系以来, 干细胞研究逐渐成为最热门的领域。干细胞是一类具有高度自我复制能力和多向分化潜能的原始未特化细胞的统称。干细胞被广泛应用在再生医学、免疫疾病和肿瘤治疗等领域。随着细胞培养技术由二维培养向三维培养的转变, 干细胞的三维培养获得了越来越多的关注。研究发现, 三维培养的干细胞呈现高核质比, 而且分化能力也显著增强, 趋化因子表达增加, 由此可知, 三维培养的干细胞优于二维培养, 三维细胞培养技术在干细胞培养方向具有更好的应用价值前景。

4.1.1 三维培养技术在间充质干细胞中的应用

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的一类具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞^[38], 在体外可以诱导分化成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等^[39]。随着对其认识及研究的日趋成熟, MSCs凭借其多系分化潜能、低免疫原性, 且易于分离、培养、扩增等特点成为一种理想的“种子细胞”, 广泛应用于再生医学、器官损伤治疗、免疫疾病治疗、肿瘤治疗等领域。近年, MSCs应用于肿瘤治疗方面的探索逐渐深入。一些研究证明, MSCs对肿瘤细胞的生长和发育具有促进作用; 但同时也有实验证明, MSCs对肿瘤细胞具有抑制作用(图2)^[40]。MSCs对肿瘤细胞的双重作用与MSC的来源、分离培养方法、体内注射方法以及所处的微环境等有关。因此, 需要利用三维细胞培养

技术更好的模拟体内的微环境来探索MSCs在肿瘤治疗上的作用和机制。

目前, 对间充质干细胞的研究多停留在二维细胞水平上, 存在较多的缺陷, 而三维细胞培养在干细胞的增殖、形态、分化能力等方面均更接近体内微环境。Becerra-Bayona等^[13]利用三维细胞培养技术探究了细胞外基质中的纤维蛋白、纤维蛋白原和层黏连蛋白对MSCs向成骨细胞分化的影响, 通过检测成骨反应的分子标志发现, 三维培养的MSCs的成骨强度和特异性有所提高, 并证明了 $\alpha 2$ 、 $\alpha 6$ 和整合素等在此过程中发挥了重要作用。Toh等^[41]证明了可调的透明质酸酯-酪胺(hyaluronic acid-tyramine, HA-Tyr)水凝胶的三维微环境能够有效的促进MSCs对软骨形成及其空间组织形成中的作用。Guo等^[42]的研究发现, 三维培养的人MSCs通过mRNA和组蛋白水平的改变, 多能性和分化能力明显增加。Yeatts等^[16]以藻酸盐珠作为支架材料, 并结合管状流体系统生物反应器三维动态培养人MSCs, 结果表明, 这种动态培养方式相比于传统的二维静态培养更能促进MSCs的增殖和分化。此外, Li等^[43]将三维培养的MSCs移植进小鼠体内后, 发现三维培养的MSCs能够显著地促进干扰素 γ 、白介素6的分泌, 减少了肿瘤坏死因子 α 的分泌, 从而减轻了肝坏死。Liu等^[44]利用水凝胶为支架材料研究骨髓来源的MSCs, 也证明了三维细胞培养技术相比于传统的二维培养在各方面均有明显优势。

4.1.2 三维培养技术在神经干细胞中的应用

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类能产生神

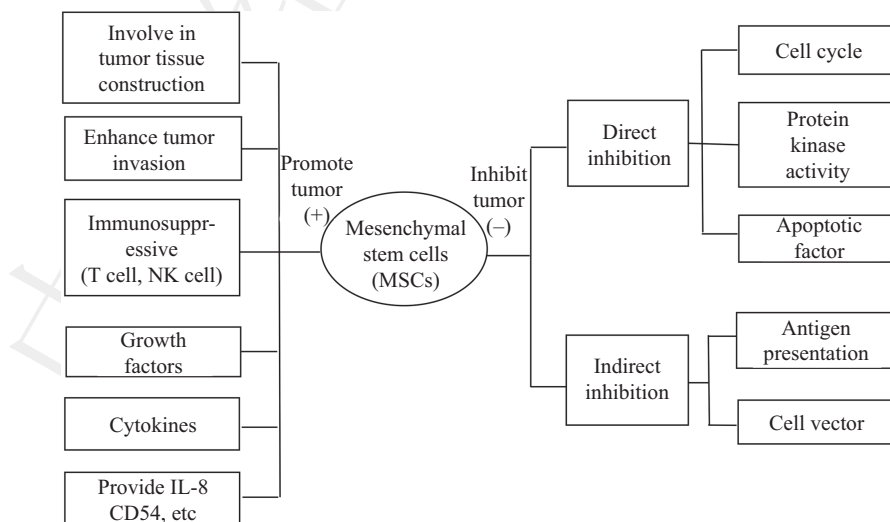


图2 间充质干细胞对肿瘤的作用

Fig.2 The role of mesenchymal stem cells to tumors

经组织或来源于神经系统的具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞,可以诱导分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。NSCs的发现使得人们对神经系统发育和神经退行性疾病的治疗成为了可能。但随着研究的深入,发现NSCs在传统的二维空间中培养,因其增殖形成神经球(neurospheres)悬浮在培养液中,由于神经球直径逐渐增长,随着时间的推移,营养物质和细胞代谢物不能很好地传递,因此常导致神经球中心细胞坏死。而三维细胞培养技术为细胞提供了生长支架,模拟了细胞在体内的培养微环境,使得细胞的形态及其它生物学性状很少受到影响,小分子物质如营养物质、激素、溶解氧及细胞的代谢产物可通过微孔结构得到交换,从而避免因增殖过快而导致的中心细胞坏死,为细胞的生长提供一个稳定、持久、健康的生长环境。Bible等^[45]利用酶法结合化学和机械的方法提取了猪的大脑和膀胱中的细胞外基质,并制备了三维支架材料用于培养NSCs,结果表明,三维培养的NSCs具有更强的迁移到脑损伤部位的能力,从而能够有效的修复大脑中受损的神经组织。Kim等^[46]利用三维培养体系培养NSCs,发现该系统可以为NSCs的生存提供更好的微环境和组织集成,从而能够让NSCs重新填充创伤性损伤的中枢神经系统中丢失或损伤的细胞和组织。Koutsopoulos等^[47]设计了多肽纳米纤维水凝胶支架来培养NSCs,结果发现,三维培养的NSCs在细胞存活和分化特性等方面明显优于二维培养的细胞,从而为神经系统组织替代和组织再生提供了更好的研究方法。Li等^[32]利用石墨烯泡沫作为三维细胞培养的支架材料培养NSCs,发现三维培养的NSCs具有更好的增殖能力、更容易向星形胶质细胞和神经元细胞分化,从而为NSCs、神经组织工程学以及神经假体的研究提供实验基础。此外, Lee等^[48]基于普通三维培养的支架材料水凝胶渗透率和硬度不好的事实,改进并建立了新型的水凝胶支架材料,并利用其培养NSCs,结果发现,这种新型水凝胶能够显著增强了NSCs的生存能力和分化能力,而且促进了三维培养体系内神经网络的形成。Smith等^[49]利用惰性三维支架材料培养NSCs,证明了三维培养的NSCs不仅在增殖和分化方面优于二维培养的体系,而且利用基因芯片检测了二维和三维培养的NSCs的基因表达情况,结果显示,与神经功能、细胞外基质和细胞骨架等相关的

基因表达都有显著的不同。三维细胞培养能够提高体外实验的生理相关性,从而减少用于医学研究的实验动物的数量,节约实验成本。因此,利用三维细胞培养技术开展NSCs培养,应用于神经退行性疾病等的治疗具有广阔前景。

4.1.3 三维培养技术在胚胎干细胞中的应用 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一种高度未分化细胞,它具有发育的全能性,能分化出成体动物的所有细胞类型。三维细胞培养技术能够对体内细胞的生存环境和功能环境进行模拟,从而为研究ESCs的结构、功能及其与亚器官、器官之间的关系提供了有效的研究方法。目前,已经有越来越多的研究者关注三维培养的ESCs。Muguruma等^[50]已成功建立了人ESCs的三维培养体系,结果发现,三维培养的ESCs中产生了来自组织的极化小脑结构,从而能够更好的研究人类ESCs源性小脑前体细胞的自组织能力。Jaramillo等^[34]利用纤维蛋白水凝胶为三维支架材料培养ESCs,结果发现,凝胶的刚度对ESCs的增殖率有很大影响,且刚度越低细胞增殖率越高。此外,Meinhardt等^[51]证明了Matrigel三维培养的ESCs在神经诱导条件下聚集,能够形成神经组织并能够自发放电,而在二维培养条件下无此特性,所以该三维培养体系是研究ESCs形态发生以及神经组织来源的有效工具。Ahadian等^[52]结合介电泳技术在水凝胶中三维培养ESCs,使其快速、大量聚集,并能产生高细胞活力和多能性的胚体。

干细胞因其具有自我复制能力、发育全能性等优势,成为了备受关注的“万能细胞”,因此干细胞的三维培养技术就尤为重要。目前,三维细胞培养技术不仅应用在上文所提到的几种干细胞方面,还应用到很多其他干细胞。Gao等^[53]利用壳聚糖/明胶为三维支架材料培养脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs),结果发现,三维培养的ADSCs具有更好的增殖活性和分化能力。Ferroni等^[54]建立的透明质酸三维细胞培养体系培养牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs),结果发现,三维培养的DPSCs能够产生功能性牙髓样组织,因此证明了三维细胞培养技术是研究牙髓组织工程学的有效方法。随着研究的不断深入,三维培养干细胞将会被更多的科研工作者研究并应用来治疗和改善人类的疾病。

4.2 三维细胞培养技术在肿瘤细胞中的应用

三维细胞培养由于其独特的优点在肿瘤细胞

中也有广泛的应用,目前三维细胞培养方法不仅可以用来研究微环境对肿瘤细胞动力学和细胞变化的影响,而且还可用于寻找癌细胞形成的相关通路以及监测癌细胞对抗癌药物的应答等。

4.2.1 三维细胞培养技术在乳腺癌细胞中的应用
乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,近年来其发病率和死亡率有上升的趋势^[55],因而受到人们的广泛关注。目前,体外乳腺癌细胞培养均为二维培养,细胞全单层贴壁生长,但二维生长的人乳腺上皮细胞缺失了对生长因子和催乳激素的响应,不能检测到如乳清蛋白和 β -酪蛋白等分化相关蛋白质,更不能形成类似于体内的腺泡结构。而三维细胞培养的乳腺上皮细胞能够形成腺泡结构,并对激素信号、生长因子等产生响应。因此,三维培养乳腺癌比二维培养和动物实验的靶向性更强、安全性更高、更经济安全。Choi等^[56]使用体外三维细胞培养和共培养脑转移模型等方法研究癌相关成纤维细胞的作用,结果表明,癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)在乳腺癌脑转移和定植中起着至关重要的作用。Chen等^[57]利用三维胶原支架材料培养乳腺癌细胞MCF-7,在体外诱导出多样化的细胞形态,同时发现三维培养的MCF-7分泌出更多的上皮-间充质转化标志分子,具有更高的成瘤性。Weigelt等^[58]利用三维细胞培养技术对乳腺上皮细胞进行培养,发现了新的乳腺癌形成相关信号通路并提出了潜在的治疗方法。Phan-Lai等^[59]利用壳聚糖-藻酸盐作为三维支架研究T细胞对乳腺癌微环境的影响,结果证明了肿瘤中高表达的趋化因子配体21[chemokine (C-C motif) ligand 21, CCL21]和干扰素 γ (interferon γ , IFN γ)使得肿瘤特异性T细胞激活并在肿瘤部位聚集。

4.2.2 三维细胞培养技术在肝癌细胞中的应用
肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在我国均排名前三位^[60]。近年来,对于肝癌治疗新方法的研究越来越多,如漫散射光谱^[61]、肝动脉灌注^[62]、组织消融^[63]以及射频治疗^[64]等。其中,三维细胞培养技术对肝癌治疗的研究也有很大的贡献。Mueller等^[36]利用三维培养体系培养终末分化肝细胞(HepaRG细胞),探究了四种药物黄曲霉毒素B1、乙胺碘呋酮、丙戊酸和氯丙嗪对HepaRG细胞的毒性作用,并将其与二维细胞培养结果进行比较。结果发现,三维细胞培养模型能够更好地模仿体内组织

环境和改善细胞功能,三维HepaRG细胞培养模型能够很好地研究药物毒性筛选,此模型有望成为临床前试验的有效方法。Gunnness等^[65]也研究了三维HepaRG细胞培养,结论和Mueller等的类似,同样说明了三维HepaRG细胞培养模型是研究肝癌治疗的一个有效的、简单的方法,对于治疗慢性药物诱导的肝毒性等具有重要意义。此外,Fang等^[66]成功构建了能模拟体内肿瘤微环境的三维细胞培养模型,并将此模型与以量子点为基础的分子成像系统相结合,从而可以更好的研究肝癌细胞的侵袭行为。Yip等^[67]也成功构建了能模拟体内肿瘤微环境的三维细胞培养模型,并利用此模型进行了抗肝癌药物检测,为改善仿生肿瘤模型的体外临床药物开发提供了实验基础。Malinen等^[68]利用不同支架材料的三维细胞培养技术成功的研究了肝脏祖细胞的组织结构、特点以及参与的代谢活动等。总之,三维细胞培养技术以其利于肝癌细胞生长、增殖、分化以及接近体内微环境等优点,使其成为治疗肝癌体外研究不可替代的一种手段。

4.2.3 三维细胞培养技术在卵巢癌细胞中的应用
卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤,其死亡率位居世界首位^[69],因此,对于卵巢癌治疗的研究具有重要意义。2014年,Sarisozen等^[70]使用经过三维细胞培养的可以耐受多种药物的卵巢癌细胞来评估联合递送紫杉醇和一种强效的NF- κ B抑制剂姜黄素的效果以及细胞毒性作用,结果显示,经过聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺为三维支架材料的三维细胞培养能够很好的促进卵巢癌细胞的生长,同时得出了紫杉醇增加了细胞毒性而姜黄素对细胞几乎没有毒性的结论,而二维培养并不能得出类似的结论。Chen等^[71]研究发现,从三维培养的人体卵巢上皮癌细胞系HO8910中分离的CD44⁺和CD117⁺细胞比肿瘤干细胞具有更多的优点,如生长速度更快、在缺氧的情况下有更强的生存力、能够形成更大的瘤体等。同时,他们的研究也表明了三维细胞培养模型能够更加精确的显示体外肿瘤干细胞的行为特点。因此,三维模型可以用来筛选抗癌药物进而治疗卵巢癌。

在肿瘤学研究中三维细胞培养技术已经被广泛使用,在肿瘤细胞的侵袭性、凋亡和转移机制等方面起到了至关重要的作用。目前,三维细胞培养技术也应用到很多其他的领域,除了本文提到的这些细胞

外, 三维细胞培养技术还应用到胰岛细胞^[72]、成骨细胞^[73]、星胶质细胞^[74]等的培养。三维细胞培养技术必将凭借其易操作、费用低、能够更好地模拟体内环境等优点应用到更多的领域, 被更多的研究者所重视。

5 三维细胞培养技术的发展前景

三维细胞培养技术对于细胞生长、分化以及细胞间相互作用机制的研究具有巨大的意义, 同时将会有更多的应用价值被发掘。在支架材料、操作方法和抗肿瘤药物筛选及组织工程应用等方面三维细胞培养基础都取得了一定的成就。但是三维细胞培养技术的发展还面临许多困难, 如细胞在三维培养体系中未达到最好的生长状态, 与体内的真实情况还有一定的差别; 支架材料的选择、辅助的培养方式等不够完善等。相信随着三维细胞培养技术与微流控、微制造、微芯片等前沿技术的融合以及相关学科的发展, 这些问题将会逐一解决。三维细胞培养技术在肿瘤学、干细胞生物学、组织形成、血管发育、器官再造等领域的应用将会取得巨大的成就, 是目前值得深入研究的课题。

参考文献 (References)

- Verloes R, Kanarek L. Tumour microenvironment studies open new perspectives for immunotherapy. *Arch Int Physiol Biochim* 1976; 84(2): 420-2.
- Heams T. Selection within organisms in the nineteenth century: Wilhelm Roux's complex legacy. *Prog Biophys Mol Biol* 2012; 110(1): 24-33.
- Ross HG. Embryonic transplantation and development of the nervous system. *Anat Rec (Hoboken)* 1908; 2(9): 385-410.
- Carrel A, Ingebrigtsen R. The production of antibody by tissues living outside of the organism. *J Exp Med* 1912; 15(3): 287-91.
- Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: How 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 13): 3015-24.
- Jacks T, Weinberg RA. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell* 2002; 111(7): 923-5.
- Bartel C, Tichy A, Schoenkypl S, Aurich C, Walter I. Effects of steroid hormones on differentiated glandular epithelial and stromal cells in a three dimensional cell culture model of the canine endometrium. *BMC Vetres* 2013; 9: 86.
- Chetty AS, Vargha V, Maity A, Moolman FS, Rossouw C, Anandjiwala R, *et al.* Development of thermoresponsive poly (propylene-g-N-isopropylacrylamide) non-woven 3D scaffold for smart cell culture using oxyfluorination-assisted graft polymerisation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2013; 419: 37-45.
- Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res* 2013; 319(1): 75-87.
- Leslie K, Gao SP, Berishaj M, Podsypanina K, Ho H, Ivashkiv L, *et al.* Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation. *Breast Cancer Res* 2010; 12(5): R80.
- Tit-Oon P, Chokchaichamnankit D, Khongmanee A, Sawangareetrakul P, Svasti J, Srisomsap C. Comparative secretome analysis of cholangiocarcinoma cell line in three-dimensional culture. *Int J Oncol* 2014; 45(5): 2108-16.
- Roohani-Esfahani SI, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites. *Biomaterial* 2010; 31(21): 5498-509.
- Becerra-Bayona S, Guiza-Arguello V, Qu X, Munoz-Pinto DJ, Hahn MS. Influence of select extracellular matrix proteins on mesenchymal stem cell osteogenic commitment in three-dimensional contexts. *Acta Biomater* 2012; 8(12): 4397-404.
- Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014: 29-41.
- Llorens E, Calderon S, Del VL, Puiggali J. Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 50: 74-84.
- Yeatts AB, Geibel EM, Fears FF, Fisher JP. Human mesenchymal stem cell position within scaffolds influences cell fate during dynamic culture. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109(9): 2381-91.
- Shin CS, Kwak B, Han B, Park K. Development of an *in vitro* 3D tumor model to study therapeutic efficiency of an anticancer drug. *Mol Pharm* 2013; 10(6): 2167-75.
- Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 334-39.
- 骆凯, 闫福华, 金岩, 刘源, 王新文. 牛肌腱复合胶原与人牙周膜成纤维细胞培养的实验研究. *中国修复重建外科杂志 (Luo Kai, Yan Fuhua, Jin Yan, Liu Yuan, Wang Xinwen. Biocompatibility study on tendon mixed extraction of bovine collagen for periodontal tissue engineering. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi)* 2005; 19(3): 234-7.
- Meng Q, Tao C, Qiu Z, Akaike T, Cui F, Wang X. A hybrid substratum for primary hepatocyte culture that enhances hepatic functionality with low serum dependency. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 2313-23.
- Li H, Chen L, Zhang M, Tang S, Fu X. Three-dimensional culture and identification of human eccrine sweat glands in matrigel basement membrane matrix. *Cell Tissue Res* 2013; 354(3): 897-902.
- Man DK, Casettari L, Cespi M, Bonacucina G, Palmieri GF, Sze SC, *et al.* Oleanolic acid-loaded PEGylated PLA and PLGA nanoparticles with enhanced cytotoxic activity against cancer cells. *Mol Pharm* 2015; 12(6): 2112-25.
- Dolega ME, Abeille F, Picollet-D'Hahan N, Gidrol X. Controlled 3D culture in Matrigel microbeads to analyze clonal acinar development. *Biomaterials* 2015; 52: 347-57.
- Li H, Chen L, Zhang M, Tang S, Fu X. Three-dimensional culture

- and identification of human eccrine sweat glands in matrigel basement membrane matrix. *Cell Tissue Res* 2013; 354(3): 897-902.
- 25 Llorens E, Calderon S, Del VL, Puiggali J. Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 50: 74-84.
 - 26 Matsusaki M, Case CP, Akashi M. Three-dimensional cell culture technique and pathophysiology. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 74: 95-103.
 - 27 Benien P, Swami A. 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Future Oncol* 2014; 10(7): 1311-27.
 - 28 Kwapiszewska K, Michalczuk A, Rybka M, Kwapiszewski R, Brzozka Z. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab Chip* 2014; 14(12): 2096-104.
 - 29 Liu X, Weaver EM, Hummon AB. Evaluation of therapeutics in three-dimensional cell culture systems by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2013; 85(13): 6295-302.
 - 30 Becerra-Bayona S, Guiza-Arguello V, Qu X, Munoz-Pinto DJ, Hahn MS. Influence of select extracellular matrix proteins on mesenchymal stem cell osteogenic commitment in three-dimensional contexts. *Acta Biomater* 2012; 8 (12): 4397-404.
 - 31 Yeatts AB, Geibel EM, Fears FF, Fisher JP. Human mesenchymal stem cell position within scaffolds influences cell fate during dynamic culture. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109(9): 2381-91.
 - 32 Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, *et al.* Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci Rep* 2013; 3: 1604.
 - 33 Li H, Wijekoon A. 3D differentiation of neural stem cells in macroporous photopolymerizable hydrogel scaffolds. *PLoS One* 2012; 7(11): e48824.
 - 34 Jaramillo M, Singh SS, Velankar S, Kumta PN, Banerjee I. Inducing endoderm differentiation by modulating mechanical properties of soft substrates. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9(1): 1-12.
 - 35 Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G, *et al.* The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* 2012; 33(5): 1437-44.
 - 36 Mueller D, Kramer L, Hoffmann E, Klein S, Noor F. 3D organotypic HepaRG cultures as *in vitro* model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 2014; 28(1): 104-12.
 - 37 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-47.
 - 38 Cortes Y, Ojeda M, Araya D, Duenas F, Fernandez MS, Peralta OA. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res* 2013; 9: 133.
 - 39 Gittel C, Brehm W, Burk J, Juelke H, Staszky C, Ribitsch I. Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: Comparison of cellular properties. *BMC Vet Res* 2013; 9: 221.
 - 40 Torsvik A, Bjerkvig R. Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. *Cancer Treat Rev* 2013; 39(2): 180-88.
 - 41 Toh WS, Lim TC, Kurisawa M, Spector M. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials* 2012; 33(15): 3835-45.
 - 42 Guo L, Zhou Y, Wang S, Wu Y. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J Cell Mol Med* 2014; 18(10): 2009-19.
 - 43 Li Y, Guo G, Li L, Chen F, Bao J, Shi YJ, *et al.* Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res* 2015; 360(2): 297-307.
 - 44 Liu ZQ, Wei Z, Zhu XL, Huang GY, Xu F, Yang JH, *et al.* Dextran-based hydrogel formed by thiol-Michael addition reaction for 3D cell encapsulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; 128C: 140-8.
 - 45 Bible E, Dell'Acqua F, Solanky B, Balducci A, Crapo PM, Badylak SF, *et al.* Non-invasive imaging of transplanted human neural stem cells and ECM scaffold remodeling in the stroke-damaged rat brain by (19) F- and diffusion-MRI. *Biomaterials* 2012; 33(10): 2858-71.
 - 46 Kim H, Cooke MJ, Shoichet MS. Creating permissive microenvironments for stem cell transplantation into the central nervous system. *Trends Biotechnol* 2012; 30(1): 55-63.
 - 47 Koutsopoulos S, Zhang S. Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, matrigel and collagen I. *Acta Biomater* 2013; 9(2): 5162-69.
 - 48 Lee MK, Rich MH, Baek K, Lee J, Kong H. Bioinspired Tuning of hydrogel permeability-rigidity dependency for 3D cell culture. *Sci Rep* 2015; 5: 8948.
 - 49 Smith I, Silveirinha V, Stein JL, de la Torre-Ubieta L, Farrimond JA, Williamson EM, *et al.* Human neural stem cell-derived cultures in three-dimensional substrates form spontaneously functional neuronal networks. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; doi: 10.1002/term.2001.
 - 50 Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep* 2015; 10(4): 537-50.
 - 51 Meinhardt A, Eberle D, Tazaki A, Ranga A, Niesche M, Wilsch-Brauninger M, *et al.* 3D reconstitution of the patterned neural tube from embryonic stem cells. *Stem Cell Rep* 2014; 3(6): 987-99.
 - 52 Ahadian S, Yamada S, Ramon-Azcon J, Ino K, Shiku H, Khademhosseini A, *et al.* Rapid and high-throughput formation of 3D embryoid bodies in hydrogels using the dielectrophoresis technique. *Lab Chip* 2014; 14(19): 3690-4.
 - 53 Gao S, Zhao P, Lin C, Sun Y, Wang Y, Zhou Z, *et al.* Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron-like cells which are compatible with photocurable three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(7/8): 1271-84.
 - 54 Ferroni L, Gardin C, Sivoletta S, Brunello G, Berengo M, Piattelli A, *et al.* A hyaluronan-based scaffold for the *in vitro* construction of dental pulp-like tissue. *Int J Mol Sci* 2015; 16(3): 4666-81.
 - 55 Zhu X, Yang J, Liu M, Wu Y, Shen Z, Li G. Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer-cell-aptamer

- sandwich architecture. *Anal Chim Acta* 2013; 764: 59-63.
- 56 Choi YP, Lee JH, Gao MQ, Kim BG, Kang S, Kim SH, *et al.*. Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional *in vitro* models. *Int J Cancer* 2014; 135(9): 2024-33.
 - 57 Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G, *et al.* The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* 2012; 33(5): 1437-44.
 - 58 Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69-70: 42-51.
 - 59 Phan-Lai V, Kievit FM, Florczyk SJ, Wang K, Disis ML, Zhang M. CCL21 and IFN γ recruit and activate tumor specific T cells in 3D scaffold model of breast cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(2): 204-10.
 - 60 Zafar H, Ali S. Boron inhibits the proliferating cell nuclear antigen index, molybdenum containing proteins and ameliorates oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Arch Biochem Biophys* 2013; 529(2): 66-74.
 - 61 Liu R, Xiong Y, Tang W, Guo Y. Near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy (NIR-SERS) studies on oxyhemoglobin (OxyHb) of liver cancer based on PVA-Ag nanofilm. *J Raman Spectrosc* 2013; 44(3): 362-9.
 - 62 Tsimberidou AM, Leick MB, Lim J, Fu S, Wheler J, Piha-Paul SA, *et al.* Dose-finding study of hepatic arterial infusion of oxaliplatin-based treatment in patients with advanced solid tumors metastatic to the liver. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(2): 389-97.
 - 63 Golberg A, Yarmush ML. Nonthermal irreversible electroporation: Fundamentals, applications, and challenges. *IEEE Trans Biomed Eng* 2013; 60(3): 707-14.
 - 64 Raoof M, Cisneros BT, Guven A, Phounsavath S, Corr SJ, Wilson LJ, *et al.* Remotely triggered cisplatin release from carbon nanocapsules by radiofrequency fields. *Biomaterials* 2013; 34(7): 1862-9.
 - 65 Gunness P, Mueller D, Shevchenko V, Heinzle E, Ingelman-Sundberg M, Noor F. 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: A tool for *in vitro* toxicity studies. *Toxicol Sci* 2013; 133(1): 67-78.
 - 66 Fang M, Peng CW, Liu SP, Yuan JP, Li Y. *In vitro* invasive pattern of hepatocellular carcinoma cell line HCCLM9 based on three-dimensional cell culture and quantum dots molecular imaging. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33(4): 520-4.
 - 67 Yip D, Cho CH. A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433(3): 327-32.
 - 68 Malinen MM, Kanninen LK, Corlu A, Isoniemi HM, Lou YR, Yliperttula ML, *et al.* Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. *Biomaterials* 2014; 35(19): 5110-21.
 - 69 Cho H, Lai TC, Kwon GS. Poly (ethylene glycol)-block-poly (epsilon-caprolactone) micelles for combination drug delivery: Evaluation of paclitaxel, cyclophosphamide and gossypol in intraperitoneal xenograft models of ovarian cancer. *J Control Release* 2013; 166(1): 1-9.
 - 70 Sarisozen C, Abouzeid AH, Torchilin VP. The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and *in vivo* tumors. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; 88(2): 539-50.
 - 71 Chen J, Wang J, Zhang Y, Chen D, Yang C, Kai C, *et al.* Observation of ovarian cancer stem cell behavior and investigation of potential mechanisms of drug resistance in three-dimensional cell culture. *J Biosci Bioeng* 2014; 118(2): 214-22.
 - 72 Sabra G, Vermette P. A 3D cell culture system: separation distance between INS-1 cell and endothelial cell monolayers co-cultured in fibrin influences INS-1 cells insulin secretion. *Biotechnol Bioeng* 2013; 110(2): 619-27.
 - 73 Tirkkonen L, Haimi S, Huttunen S, Wolff J, Pirhonen E, Sandor GK, *et al.* Osteogenic medium is superior to growth factors in differentiation of human adipose stem cells towards bone-forming cells in 3D culture. *Eur Cell Mater* 2013; 25: 144-58.
 - 74 Puschmann TB, Zanden C, De Pablo Y, Kirchhoff F, Pekna M, Liu J, *et al.* Bioactive 3D cell culture system minimizes cellular stress and maintains the *in vivo*-like morphological complexity of astroglial cells. *Glia* 2013; 61(3): 432-40.