

技术与方法

三维胶原培养模型中MRC-5细胞的生长状态及病毒感染

何兵 陈国敏* 曾毅*

(传染病预防控制国家重点实验室, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206)

摘要 该研究以鼠尾I型胶原为支架构建了人胚肺成纤维细胞MRC-5三维立体培养模型, 探索在此模型中常规培养液和PDGF(platelet-derived growth factor)培养液对MRC-5细胞生长状态的影响, 以及这两种培养液对细胞在胶原表面上生长状态的影响。应用此模型初步观察了人巨噬细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)的感染。结果显示, 常规培养液和PDGF培养液均能使细胞相互交错, 形成多层的三维立体网状结构。PDGF培养液有利于早期促进细胞呈树突状伸展, 常规培养液更有利于细胞在较长时间内维持多层立体的网状结构。常规培养液可促进细胞在胶原表面聚集, PDGF培养液则有利于细胞以单个细胞方式进行迁移。三维胶原体系内生长的MRC-5细胞感染HCMV病毒后, 也能呈现明显的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。由此提示, 鼠尾I型胶原与MRC-5细胞构成的三维培养模型, 有望进一步应用于细胞生物学、形态学以及病毒感染的研究。

关键词 人胚肺成纤维细胞; 三维细胞培养模型; 胶原; 巨噬细胞病毒

Growth and Viral Infection of MRC-5 Cells in A Three-Dimensional Collagen Culture Model

He Bing, Chen Guomin*, Zeng Yi*

(State Key Laboratory of Infection Disease Prevention and Control, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract In this study, human embryonic lung fibroblasts (MRC-5) were cultured in the three-dimensional (3D) culture model with rat tail tendon collagen type I as a scaffold. The effects of conventional culture media and PDGF (platelet-derived growth factor) media on the growth status of MRC-5 cells were investigated in a 3D culture model. And the effects of the cellular growth status on the surface of 3D collagen matrices with two different culture media were analyzed. The infection of HCMV (human cytomegalovirus) was observed in the 3D culture model. The results showed that conventional culture media and PDGF media promoted cells to overlap each other and formed a multilayer three-dimensional network structure. PDGF media promoted cells to protrude dendritic extensions at early stage. Conventional culture media helped cells to keep multilayer network structure for longer time. Furthermore, MRC-5 cells in conventional culture media were contracted into clusters, whereas cell migration in PDGF media were observed as individual cells. HCMV could induce the cytopathic effect (CPE) of MRC-5 cells

收稿日期: 2016-11-21 接受日期: 2017-01-20

国家传染病重大专项(批准号: 2014ZX10004002-004-001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-63552662, E-mail: guominch2013@163.com; E-mail: zengyicdc@163.com

Received: November 21, 2016 Accepted: January 20, 2017

This work was supported by the National Mega-Projects for Infectious Diseases (Grant No.2014ZX10004002-004-001)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-63552662, E-mail: guominch2013@163.com; E-mail: zengyicdc@163.com

网络出版时间: 2017-02-27 13:37:11 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170227.1337.002.html>

cultured in 3D collagen. It is possible that the 3D culture model of MRC-5 cells will contribute to cellular biology, cell morphology and viral infection.

Keywords human embryonic lung fibroblast; three-dimensional cell culture model; collagen; cytomegalovirus

当前研究MRC-5细胞主要是基于传统的二维细胞培养模型,细胞在平面的塑料或玻璃基质上生长。然而,在体内组织中细胞生长的微环境是三维立体的形态,具有动态性和复杂性的特点^[1]。许多研究表明,二维细胞培养不能充分反映真实组织的生理状态^[2]。三维细胞培养弥补了二维细胞培养的缺陷与不足。三维细胞培养是指将具有三维结构的不同材料作为载体与各种不同类型的细胞在体外共同培养,以模拟体内的真实环境^[3]。目前,成纤维细胞三维培养最常使用的支架是胶原。胶原是人体内含量最多、分布最广的蛋白质,其中I型胶原含量最为丰富,成纤维细胞在其生物合成以及分泌方面扮演着重要的角色。三维胶原体系培养的肺成纤维细胞能够渗透进入基质并形成纤维网状矩阵。在这种微环境下,为了达到相互平衡,细胞与胶原基质会进行重塑,来源于这种重塑基质的机械信号又会不断地反馈以调节细胞行为。这种细胞与基质间的相互作用更接近于体内组织的状态^[4]。胶原纤维具有较高的抗张力强度,特别是I型胶原,这对促进肺成纤维细胞生长,维持细胞结构的完整及生物力学特性非常重要。此外,当成纤维细胞在三维基质中培养时,没有基底端极性,这类似于体内组织的状态^[5]。三维胶原成纤维细胞培养模型有助于在更接近于真实组织环境的条件下分析细胞的形态和生理功能,这种模型已经成为研究成纤维细胞生理学、行为学和细胞与基质间相互作用的重要工具。

本研究目的是以鼠尾I型胶原为支架,构建一个模拟体内组织环境的三维胶原-MRC-5细胞培养模型,分别使用含有胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的常规培养液和含有血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的培养液培养MRC-5细胞,观察细胞在三维胶原基质内的形态和分布,进一步分析比较两种培养液对在胶原表面生长的MRC-5细胞形态变化的影响。利用构建的三维胶原-MRC-5细胞培养模型感染人巨噬细胞病毒,为进一步应用三维细胞模型探索细胞生物学、细胞形态学和病毒感

染及抗病毒药物等方面的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人胚肺成纤维细胞MRC-5购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。DMEM培养基购自Hyclone公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自浙江天杭生物科技股份有限公司。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)购自Peprotech公司。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)细胞培养级别购自MRC公司。TRYPsin 0.25% EDTA购自Invitrogen公司。2×DMEM培养液购自BI公司。鼠尾胶原蛋白I型(5 mg/mL)购自Thermo Fisher公司。4%多聚甲醛购自上海翊圣生物科技有限公司。牛血清白蛋白标准级别购自MP公司。鼠抗微管蛋白(tubulin)单克隆抗体购自天津三箭生物技术有限公司。FITC标记山羊抗小鼠IgG和FITC标记山羊抗人IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。TRITC Phalloidin罗丹明标记鬼笔环肽购自上海翊圣生物科技有限公司。DAPI购自北京索莱宝科技有限公司。人巨噬细胞病毒株(human cytomegalovirus, HCMV)、人抗巨噬细胞病毒阳性血清由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 二维细胞培养 MRC-5细胞分为两组,一组在含10% FBS的DMEM常规培养液(以下简称常规培养液)中培养;另一组在含50 ng/mL PDGF和5 mg/mL BSA的DMEM培养液(以下简称PDGF培养液)中培养。细胞置于37 °C、含5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 构建三维胶原-MRC-5细胞培养体系 将对数生长期的MRC-5细胞用0.25%胰蛋白酶消化后,使用常规培养液制备单细胞悬液。将细胞悬液、FBS、鼠尾I型胶原和2×DMEM按1:1:3:5的体积比充分混合后迅速置于冰浴中,用0.1 mol/L NaOH溶液调整pH值至7.0,细胞终浓度为1×10⁶/mL,鼠尾胶原终浓度为1.5 mg/mL。将制备好的MRC-5细胞-胶原混合液加入24孔板中,每孔加入300 μL(细胞数量为

3×10^5 /孔), 置于 37°C 培养箱孵育30 min, 待胶原形成水凝胶后, 分别加入上述两种培养液, 继续培养于 37°C 、含5% CO_2 的培养箱中。

1.2.3 细胞免疫荧光 (1)二维细胞的免疫荧光。将无菌玻片置于24孔板底部, 用0.25%胰蛋白酶消化后, 分别使用常规培养液和PDGF培养液制备细胞悬液, 调整细胞密度为 $7 \times 10^4/\text{mL}$, 往24孔板中分别滴加上述两种细胞悬液, 1 mL/孔。细胞培养24 h后弃培养液, PBS润洗; 加入4%多聚甲醛室温固定15 min, 用PBS润洗2次, 每次5 min; 加入1% BSA(标准级)处理30 min, 用PBS润洗1次; 用0.5% Triton X-100作用15 min, 用PBS润洗1次。标记微管(microtubules): 添加鼠抗微管蛋白单克隆抗体[使用含1% BSA(标准级)的PBS按1:200稀释], 37°C 孵育60 min, PBS润洗5次, 每次5 min。加入FITC标记的山羊抗小鼠IgG[使用含1% BSA(标准级)的PBS按1:100稀释], 37°C 孵育45 min, PBS润洗5次, 每次5 min。标记肌动蛋白(actin): 加入TRITC Phalloidin[使用含1% BSA(标准级)的PBS按1:100稀释], 室温避光孵育30 min, PBS润洗5次, 每次5 min。使用DAPI染色液($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)对细胞核进行复染5 min, PBS润洗5次, 每次5 min, 于倒置荧光显微镜下观察并拍照。(2)三维细胞培养免疫荧光。细胞在三维胶原培养体系内分别生长至4、8、24 h时, 弃培养液, PBS润洗细胞2次, 每次5 min; 加入4%多聚甲醛室温固定15 min, 剩余步骤按上述二维细胞免疫荧光法操作。

1.2.4 细胞培养于胶原表面 首先, 建立无细胞的胶原培养体系, 然后将细胞加入此胶原体系表面进行培养。具体方法: 将MRC-5细胞用0.25%胰蛋白酶消化后, 使用常规培养液制备单细胞悬液, 将常规培养液、FBS、鼠尾胶原和 $2 \times \text{DMEM}$ 按2:1:2:5的体积比充分混合后迅速置于冰浴中, 用0.1 mol/L NaOH溶液调整pH值至7.0, 鼠尾胶原终浓度为1 mg/mL。将制备好的胶原混合液加入24孔板中, 每孔加入300 μL , 置于 37°C 培养箱中孵育30 min, 待胶原形成水凝胶后, 分别加入两种细胞悬液, 一种是常规培养液的细胞悬液, 另一种是PDGF培养液的细胞悬液。当MRC-5细胞在常规培养液和PDGF培养液中分别生长6 h后, 弃掉原培养液, PBS清洗后, 对常规培养液中生长的MRC-5细胞分别添加1 mL常规培养液和1 mL PDGF培养液, 对PDGF培养液中生长的MRC-5细胞也分别添加1 mL常规培养液和1 mL PDGF培养液, 然后于

37°C 、含5% CO_2 的培养箱中继续培养至24 h。

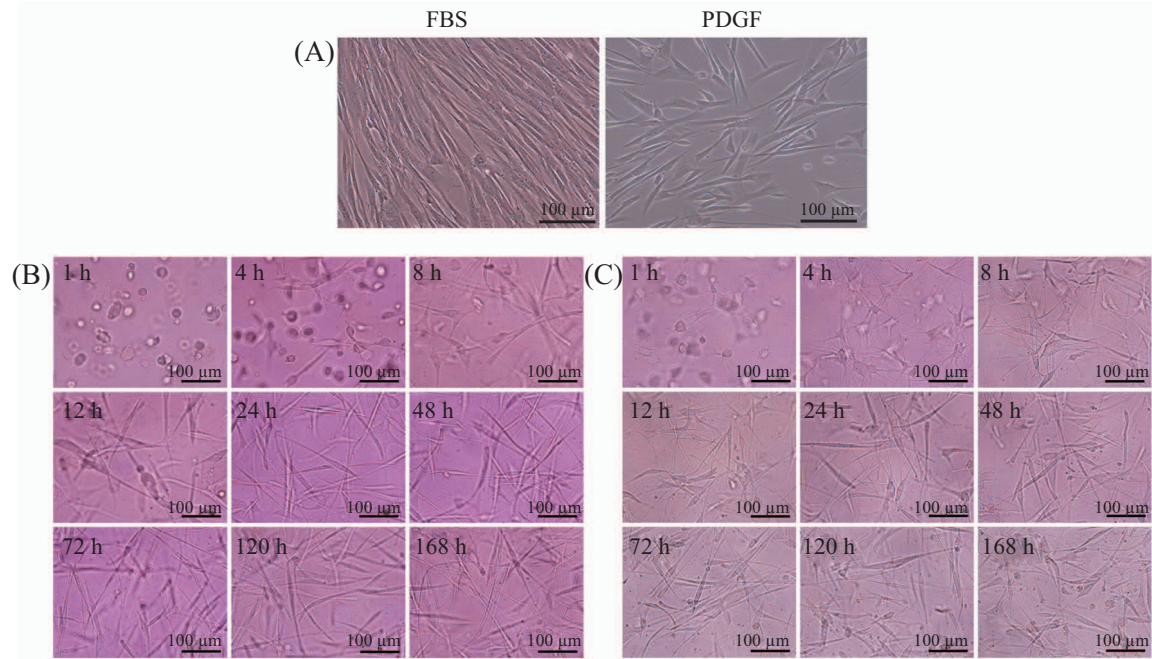
1.2.5 人巨噬细胞病毒感染MRC-5细胞 MRC-5细胞在三维胶原基质内生长24 h后, 弃掉培养液, 以MOI(multiplicity of infection)=0.1接种HCMV病毒, 设置对照组, 于 37°C 、含5% CO_2 的培养箱中孵育2 h, 每隔30 min轻轻摇晃数次, 2 h后补加含2% FBS的DMEM维持液, 分别在第4、5、6、7、8 d光镜下观察细胞病变的情况。

1.2.6 病毒感染检测 采用间接免疫荧光法检测病毒感染, HCMV病毒感染MRC-5细胞第6 d, 弃掉维持液, PBS润洗; 加入4%多聚甲醛室温固定15 min, 用PBS润洗2次, 每次5 min; 加入1% BSA(标准级)处理30 min, 用PBS润洗1次; 用0.5% Triton X-100作用15 min, 用PBS润洗1次。加入1:15稀释的人抗巨噬细胞病毒阳性血清(稀释液为含10% FBS的PBS), 37°C 湿盒中孵育1 h, PBS润洗5次, 每次5 min; 加入1:100稀释的FITC标记的羊抗人IgG(稀释液为含10% FBS、10% 伊文氏蓝的PBS), 37°C 孵育45 min, PBS润洗5次, 每次5 min, 于倒置荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 三维胶原支架内MRC-5细胞的形态和分布

在二维培养条件下, MRC-5细胞培养24 h后, 光镜下观察到常规培养液中的细胞形态呈长梭形、单层分布, PDGF培养液中的细胞以板状伪足的方式扩展延伸(图1A)。培养三维细胞的胶原溶液呈透明状, 37°C 孵育30 min后形成胶原凝胶, 并紧密贴附于24孔板底部, 有一定的抗张力性能。在倒置显微镜下观察发现, 三维胶原-MRC-5细胞培养模型构建1 h后, 在常规培养液中的细胞呈圆形, 均匀分布于胶原凝胶中, 未见伪足突起。在PDGF培养液中的少部分细胞逐渐伸展, 出现褶边及丝状伪足。培养8 h后, 可见常规培养液中的细胞已伸展延伸, 呈多突起的星形或不规则三角形, PDGF培养液中的大部分细胞已形成较长的突起, 呈树突状结构, 并且相互层叠接触。12 h时, 常规培养液中的细胞形态基本一致, 呈长梭形, 条索状或纺锤形, 伪足较长, 细胞可向各个不同的方向伸展, PDGF培养液中的细胞呈网状和树突状结构, 向四处伸展延伸。培养24 h时, 常规培养液中的细胞和PDGF培养液体系中的细胞密度均较高, 均能相互交织形成三维的网状, 可达数层分布于三维胶原中。细胞培养24 h至168 h(7 d)期间, 常



A: 二维培养条件下, MRC-5细胞在常规培养液和PDGF培养液中的分布和形态; B: 三维胶原模型中, MRC-5细胞在常规培养液中各个时间点的形态及分布; C: 3D胶原模型中, MRC-5细胞在PDGF培养液中各个时间点的形态及分布。

A: the morphology and distribution of MRC-5 cells in conventional culture media and PDGF media on 2D culture plates; B: the morphology and distribution of MRC-5 cells in conventional culture media in 3D collagen scaffolds; C: the morphology and distribution of MRC-5 cells in PDGF media in 3D collagen scaffolds.

图1 二维培养板上和三维胶原支架内MRC-5细胞的形态和分布

Fig.1 The morphology and distribution of MRC-5 cells on 2D culture plates and in 3D collagen scaffolds

规培养液中的细胞能维持明显的三维立体网状结构, PDGF培养液中的细胞也能很好地呈现三维立体结构, 但是当细胞在PDGF培养液中生长72 h(3 d)后, 细胞的三维立体形态开始逐渐减弱, 细胞也开始逐渐衰老, 细胞碎片增多(图1B和图1C)。

2.2 三维胶原支架中细胞的微管和肌动蛋白的状态

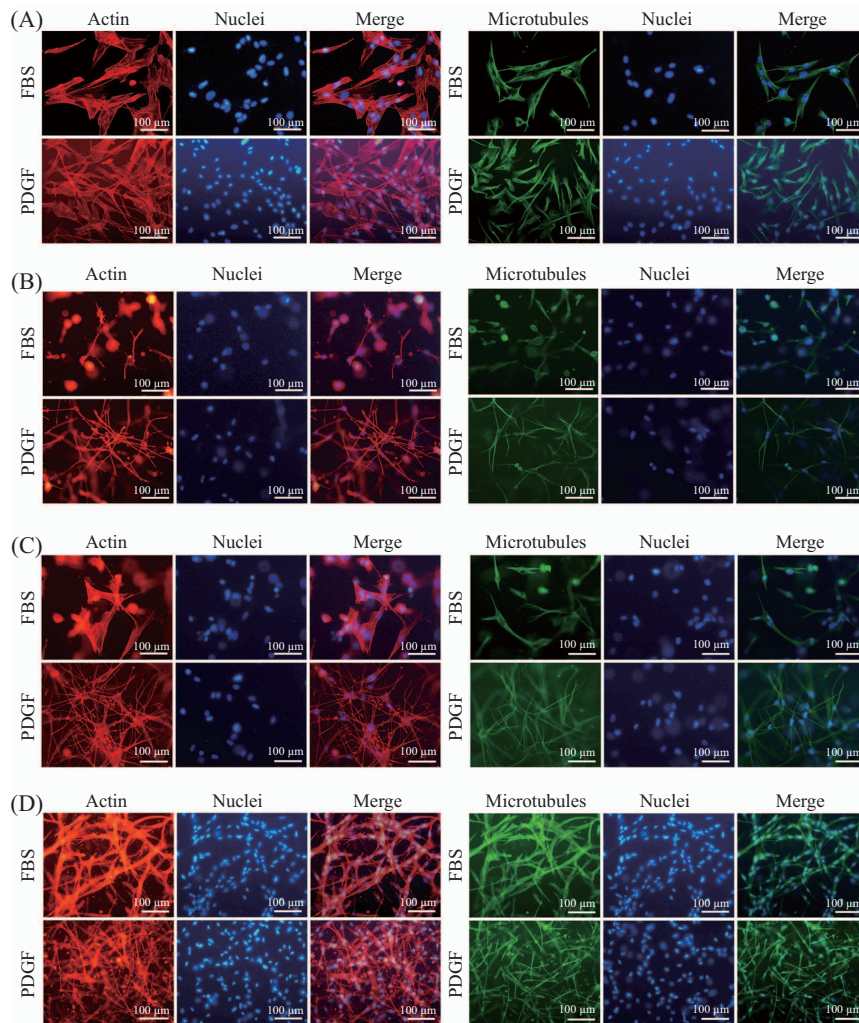
细胞骨架由微丝(microfilament)、微管(microtubules)和中间纤维(intermediate filament)所组成, 其中微丝主要由肌动蛋白(actin)构成, 因此可以通过鼠抗微管蛋白单克隆抗体标记的微管和TRITC Phalloidin标记的肌动蛋白来间接地反映细胞在三维胶原支架中的形态和分布。在二维细胞培养条件下, 24 h后在荧光显微镜下观察常规培养液中的细胞贴壁并呈单层极性生长, 形状为梭形或不规则三角形, PDGF培养液中的部分细胞则呈现树突状, 部分细胞呈长梭形(图2A)。3D胶原体系培养的细胞, 加入常规培养液4 h后, 大部分细胞呈圆形, 少部分细胞开始伸展延伸(图2B), 8 h后细胞逐渐伸展延长形成多个星状胞质突起, 细胞呈星形、不规则三角形或纺锤形, 并分布于不同的层次(图2C)。24 h后可见不同

层面的细胞已交织成三维的立体网状(图2D)。加入PDGF培养液4 h后, 细胞很快开始伸展延伸, 突起较明显, 层次立体感较强(图2B); 8 h后细胞呈现树突状结构并向四周延伸生长(图2C); 24 h后细胞密度较大, 并且相互层叠形成网状结构(图2D)。总之, 在24 h内PDGF培养液体系中的细胞伸展延伸速度快于常规培养液体系中的细胞。

2.3 胶原表面MRC-5细胞形态的变化

在参考国内外相关文献[14-15]的基础上, 结合预实验结果(实验数据未列出), 观察到细胞在终浓度为1 mg/mL的胶原表面培养时生长状态最佳。常规培养液和PDGF培养液对在3D胶原表面生长的细胞可能显示出了不同的作用。常规培养液促进细胞在胶原表面形成聚集, 且随着培养时间的延长, 聚集效应越明显(图3A); PDGF培养液则有利于细胞在胶原表面以单个细胞的方式进行伸展迁移(图3B)。

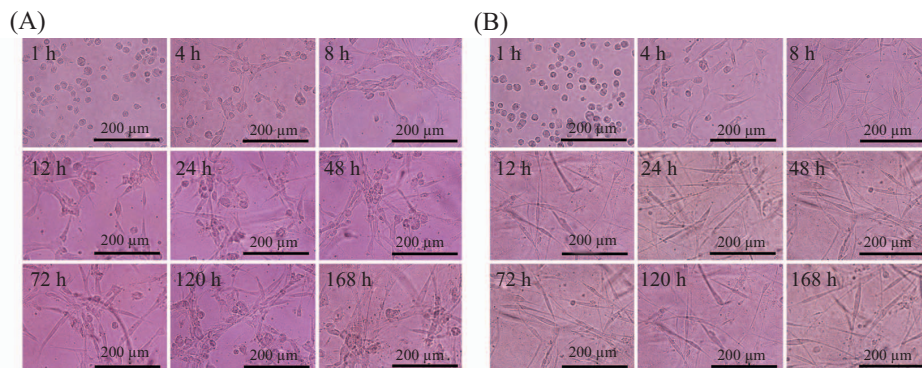
当细胞在胶原表面生长6 h时, 将原来的常规培养液更换为PDGF培养液继续培养18 h后, 细胞由聚集状态转变为单个细胞方式伸展, 而未更换常规培养液的细胞则仍呈现聚集状态(图4A)。另一方面,



A: 二维培养条件下, MRC-5细胞分别在常规培养液和PDGF培养液中生长24 h; B、C、D: 分别表示MRC-5细胞在三维胶原基质内孵育4、8、24 h。绿色为微管, 红色为肌动蛋白, 蓝色为细胞核。

A: MRC-5 cells were incubated for 24 h in conventional culture media and PDGF media on 2D culture plates, respectively; B,C,D: MRC-5 cells incubated for 4, 8, 24 h in two media mentioned above in 3D collagen scaffolds, respectively. Green represented microtubules positive, actin was shown in red while nuclei were blue.

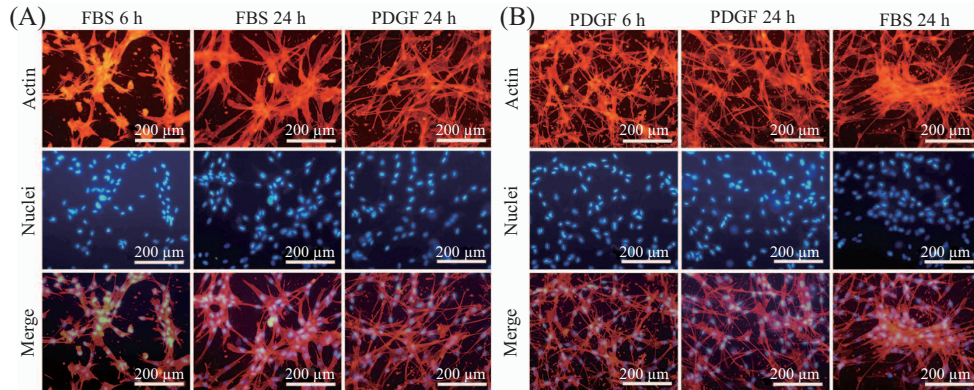
图2 在二维培养皿上和三维胶原模型中细胞微管、肌动蛋白的生长状态
Fig.2 Microtubules and actins on 2D culture plates and in 3D collagen scaffolds



A: 常规培养液促进MRC-5细胞在3D胶原表面聚集; B: PDGF培养液有利于MRC-5细胞在3D胶原表面以单个细胞方式进行迁移伸展。

A: conventional culture media promoted the contraction of MRC-5 cells into clusters on 3D collagen scaffolds; B: PDGF media promoted the MRC-5 cell migration as individual cells on 3D collagen scaffolds.

图3 常规培养液促进细胞聚集和PDGF培养液促进细胞迁移
Fig.3 Clustering in conventional culture media and cell migration in PDGF media

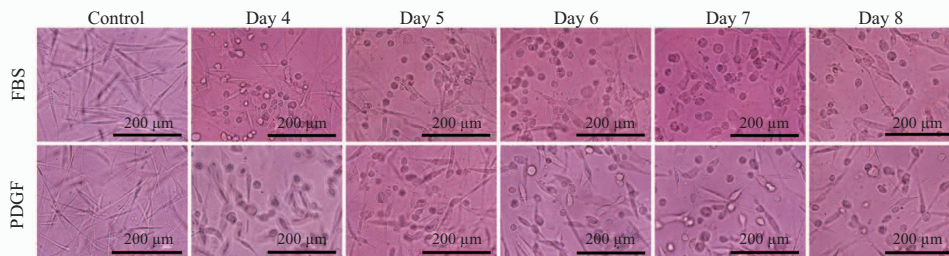


A: MRC-5细胞在1 mg/mL的三维胶原表面生长, 添加常规培养液培养6 h, 随后立刻用PBS清洗细胞, 分别加入常规培养液和PDGF培养液继续培养18 h; B: 添加PDGF培养液培养6 h, 随后立刻用PBS清洗细胞, 分别加入PDGF培养液和常规培养液继续培养18 h。细胞培养6 h和24 h时, 样本用TRITC Phalloidin标记Actin(红色), DAPI复染细胞核(蓝色), 细胞在常规培养液和PDGF培养液中的形态可发生逆转。

A: MRC-5 cells were cultured for an initial period of 6 h on 1 mg/mL collagen matrices in conventional culture media. Subsequently, the samples were rinsed with PBS and placed into conventional culture media and PDGF media as indicated for an additional 18 h. B: MRC-5 cells were cultured for an initial period of 6 h PDGF media. Subsequently, the samples were rinsed with PBS and placed into conventional culture media and PDGF media as indicated for an additional 18 h. At the end of the initial 6 h period and after 24 h, samples were fixed and stained for actin (red) and nuclei (blue). Cellular morphogenetic movement in PDGF and conventional culture media was reversible.

图4 细胞形态变化的可逆性

Fig.4 Reversibility of cellular morphogenetic movement



在HCMV感染三维胶原内的MRC-5细胞后, 第4 d至第8 d的细胞病变, 对照组为培养第5 d的MRC-5细胞。

The cytopathic effect of MRC-5 cells infected with HCMV from day 4 to day 8 in 3D collagen scaffolds, the MRC-5 cells cultured in 3D collagen on the 5th day were as control group.

图5 HCMV感染MRC-5细胞的病变情况

Fig.5 The cytopathic effect of MRC-5 cells infected with HCMV

细胞在胶原表面生长6 h时, 将原来的PDGF培养液更换为常规培养液继续培养18 h后, 以单个细胞迁移伸展的细胞转变为细胞聚集状态, 而未更换PDGF培养液的细胞仍然以单个细胞方式进行迁移伸展(图4B)。

2.4 三维胶原-MRC-5细胞培养模型应用于巨噬细胞病毒感染

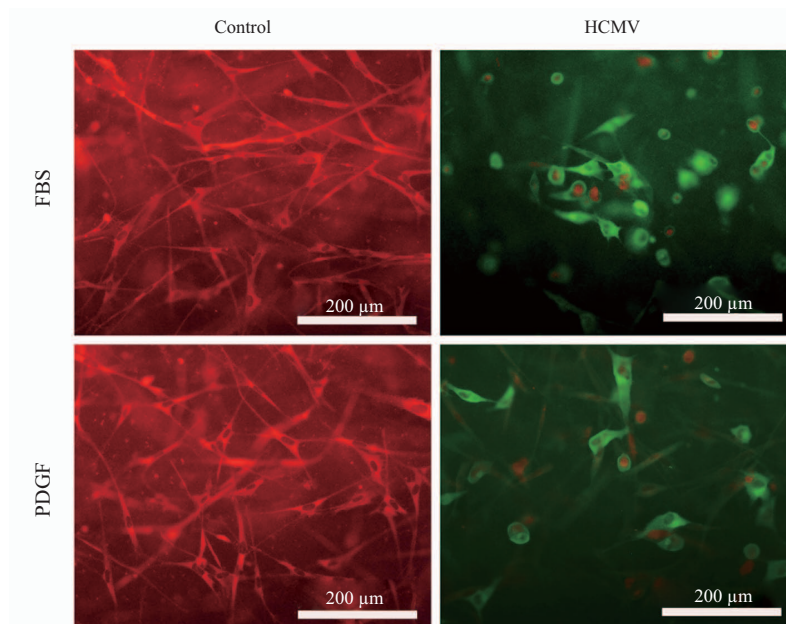
三维胶原支架内的细胞在感染HCMV病毒4 d时, 常规培养液和PDGF培养液中的细胞逐渐开始出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 病变的细胞变圆、膨胀、折光性增强, 分布在不同的层次; 第5 d, 细胞圆缩更加明显; 第6 d和第7 d, CPE达到高峰(图5)。

依据MRC-5细胞感染的程度, 选择病毒感染后

第6 d进行间接免疫荧光检测, 图6显示了在三维胶原体系内培养的MRC-5细胞感染HCMV病毒后, 病毒抗原的表达情况。

3 讨论

三维细胞培养模型为肺成纤维细胞的体外培养提供了新的机遇。目前, 国内外研究肺成纤维细胞三维培养的支架主要有聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)、静电纺丝多孔支架(electrospun porous scaffolds)、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和胶原(collagen)等^[6-7]。当前以胶原为支架构建的三维MRC-5细胞培养模型的文献报道较少, 且多为共培养三维模型^[7]。本实



三维胶原支架内的MRC-5细胞感染HCMV病毒后,第6 d病毒抗原的表达情况。对照组为培养第6 d的MRC-5细胞。

HCMV antigen expression in MRC-5 cells cultured in 3D collagen scaffolds on the 6th day. The MRC-5 cells cultured in 3D collagen on the 6th day were as control.

图6 HCMV感染的间接免疫荧光检测结果

Fig.6 Indirect immunofluorescent test of HCMV

验采用I型鼠尾胶原构建三维MRC-5细胞培养模型, I型胶原来源广泛, 易于获取, 力学性能高, 具有较高的生物降解性和生物相容性^[3]。营养物质可以自由进出三维胶原培养体系, 便于细胞进行新陈代谢, 也易于添加各种生长因子^[4]。此外, 这种三维胶原培养体系透明度高, 便于在倒置光学显微镜下实时观察细胞的生长状况。三维胶原MRC-5细胞培养模型有助于在更接近生理环境的条件下研究细胞的形态学行为。

MRC-5细胞体外培养的微环境对细胞的形态及分布有着至关重要的作用, 如细胞外基质环境的机械性能以及物理特征、细胞培养条件等^[8]。本实验比较了常规培养液和PDGF培养液对MRC-5细胞在三维胶原体系内的形态和分布。与二维条件下培养的细胞相比, 细胞在三维胶原体系内生长时, 常规培养液和PDGF培养液中的细胞都能形成良好的三维立体网状结构, 细胞可达数层或数十层。这样的网状结构类似于体内间充质细胞和结缔组织成纤维细胞的生长方式^[9]。相关研究表明, 成纤维细胞在三维胶原基质内以树突状的方式扩展形成了纤维矩阵, 使得细胞与细胞、细胞与基质间的相互作用更接近于体内的状态。这种相互作用对于细胞和组织的生理有着重要的影响, 包括细胞形态、细胞增殖

分化、细胞行为以及细胞迁移和黏附等^[10-11]。国外研究人员报道, 在二维条件下培养的成纤维细胞具有较高的张力, 细胞在二维平面生长, 并以板状伪足的单一方式进行迁移。而在三维胶原基质内培养的成纤维细胞张力低, 细胞在三维立体空间内生长, 并以多种方式进行迁移, 这接近于成纤维细胞在体内生长的状态^[10,12-13]。本研究还观察到, PDGF培养液有利于早期促进细胞扩展延伸, 常规培养液则更有利于较长时间维持细胞多层的三维立体网状结构。这对进一步优化三维胶原-MRC-5细胞培养条件具有一定的指导意义。

通过进一步分析比较常规培养液和PDGF培养液对在胶原表面生长的MRC-5细胞形态变化的影响, 我们观察到, MRC-5细胞在常规培养液条件下分泌并形成了纤连蛋白(fibronectin)基质, 这种基质可促进细胞发生聚集效应^[14]。这种聚集现象在正常的组织间质、纤维化组织和瘢痕组织以及伤口组织中都能观察到, 而且有研究表明, 成纤维细胞在三维胶原基质表面生长时能形成张力纤维, 虽然成纤维细胞在真实组织中没有张力纤维, 但在损伤修复和纤维化过程中存在张力纤维^[9]。MRC-5细胞在PDGF培养液的条件下, 细胞以单个细胞方式进行迁移生长, 说明PDGF培养液能促进细胞迁移^[15]。胶原

与组织的形成和损伤修复等生物学过程有着紧密的关系,在调控细胞的黏附、迁移、增殖和分化中起着重要作用。相关研究表明,成纤维细胞能够在损伤修复过程中产生大量炎症介质,如PDGF。成纤维细胞与胶原基质相互作用呈现的不同细胞行为取决于生长环境的因素^[16]。在不同培养液条件下细胞出现的聚集和迁移现象,类似于体内组织损伤修复的过程,这为进一步研究体内生长因子环境是怎样在生理条件下(如损伤修复、形态发生和恶性肿瘤)调节成纤维细胞的形态行为提供了新的视角。

虽然国外有很多关于三维细胞培养模型应用于人类病毒的研究报道^[17-18],但是目前尚未检索出利用三维胶原-成纤维细胞培养模型研究病毒的文献。本研究应用构建的三维胶原-MRC-5细胞培养模型进行了HCMV病毒感染,结果显示,在三维胶原基质内生长的MRC-5细胞仍能感染HCMV病毒,而且还出现了明显的细胞病变效应,说明三维胶原体系培养的MRC-5细胞没有改变其对HCMV病毒的易感性。这对进一步应用三维胶原-成纤维细胞培养模型研究病毒感染、复制、增殖以及抗病毒药物等具有参考意义。

参考文献 (References)

- 1 Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(5): 633-9.
- 2 Wang S, Wang Z, Foo SE, Tan NS, Yuan Y, Lin W, *et al.* Culturing fibroblasts in 3D human hair keratin hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7(9): 5187-98.
- 3 Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci* 2015; 16(3): 5517-27.
- 4 Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003; 13(5): 264-9.
- 5 Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007; 130(4): 601-10.
- 6 Htwe SS, Harrington H, Knox A, Rose F, Aylott J, Haycock JW, *et al.* Investigating NF-kappaB signaling in lung fibroblasts in 2D and 3D culture systems. *Respir Res* 2015; 16: 144.
- 7 Liu XQ, Kiefl R, Roskopf C, Tian F, Huber RM. Interactions among lung cancer cells, fibroblasts, and macrophages in 3D co-cultures and the impact on MMP-1 and VEGF expression. *PLoS One* 2016; 11(5): e0156268.
- 8 Rhee S, Jiang H, Ho CH, Grinnell F. Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(13): 5425-30.
- 9 Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G. Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2): 384-95.
- 10 Kim D, You E, Min NY, Lee KH, Kim HK, Rhee S. Discoidin domain receptor 2 regulates the adhesion of fibroblasts to 3D collagen matrices. *Int J Mol Med* 2013; 31(5): 1113-8.
- 11 Engler AJ, Sweeney HL, Discher DE, Schwarzbauer JE. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7(4): 335.
- 12 Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: How 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 13): 3015-24.
- 13 Friedl P, Sahai E, Weiss S, Yamada KM. New dimensions in cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(11): 743-7.
- 14 da Rocha-Azevedo B, Ho CH, Grinnell F. Fibroblast cluster formation on 3D collagen matrices requires cell contraction dependent fibronectin matrix organization. *Exp Cell Res* 2013; 319(4): 546-55.
- 15 Rhee S, Ho CH, Grinnell F. Promigratory and procontractile growth factor environments differentially regulate cell morphogenesis. *Exp Cell Res* 2010; 316(2): 232-44.
- 16 Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; 26: 335-61.
- 17 He B, Chen G, Zeng Y. Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses. *Virology* 2016; 31(5): 363-79.
- 18 Gardner JK, Herbst-Kralovetz MM. Three-dimensional rotating wallvessel-derived cell culture models for studying virus-host interactions. *Viruses* 2016; 8(11): 1-17.