

# 食管鳞状细胞癌组织体外3D培养

梁亚冰<sup>1</sup> 张满<sup>2</sup> 杜华<sup>3</sup> 杨凌<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心, 呼和浩特 010050; <sup>2</sup>内蒙古医科大学附属医院胸外科, 呼和浩特 010050; <sup>3</sup>内蒙古医科大学基础医学院病理学教研室, 呼和浩特 010050)

**摘要** 该文将新鲜的食管鳞状细胞癌组织剪成细小的碎块, 和基质胶(matrigel)混合在96孔板中进行培养。在培养2、4、6、8、10、12、14、16、18天时取出并固定、石蜡包埋、切片, 进行HE染色和Ki-67、P63、P40、细胞角蛋白5/6免疫组织化学实验。HE染色显示, 培养的肿瘤组织与原组织基本相同。随着培养时间的延长, 组织块变得小, 且肿瘤组织有萎缩和退化的现象。随体外培养时间的增加, P40和P63蛋白在肿瘤细胞中的表达变少。Ki-67蛋白在肿瘤组织中表达的强度和比率都随着培养时间的延长而减弱。综上所述, 食管鳞状细胞癌的一部分特性会随着体外培养时间的延长而发生变化, 所以体外培养天数越短越好。

**关键词** 食管鳞状细胞癌; 3D培养; Ki-67; P63; P40; 细胞角蛋白5/6

## *In Vitro* 3D Culture of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Liang Yabing<sup>1</sup>, Zhang Man<sup>2</sup>, Du Hua<sup>3</sup>, Yang Ling<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Clinical Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China;

<sup>2</sup>Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China;

<sup>3</sup>School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

**Abstract** The fresh esophageal squamous cell carcinoma tissue was minced into tiny pieces and mixed with matrigel, the mixture was cultured in the 96-well plate. The cultured mixture was taken out at the 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th, 12th, 14th, 16th, 18th day, and fixed, embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxylin and eosin, and performed immunohistochemistry with Ki-67, P63, P40 and cytoheratin5/6 antibody. HE staining showed that the cultured tumor tissue was basically the same as the original tissue. However, with the extension of culture, tissue blocks became small and tumor tissue showed atrophy and degeneration. The expression of P40 and P63 protein in tumor tissues decreased with the increase of culture time *in vitro*. The intensity and ratio of Ki-67 protein in tumor tissues decreased with the increase of culture time. In conclusion, part of the characteristics of esophageal squamous cell carcinoma changes with the extension of the culture time *in vitro*, therefore, the shorter the time tissue cultured *in vitro*.

**Keywords** esophageal squamous cell carcinoma; 3D culture; Ki-67; P63; P40; cytokeratin 5/6

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤, 目前在全球肿瘤死亡率中位于第6位。我国是食管癌的高发国

家之一。目前食管癌的治疗包括手术、术前放化疗和术后放化疗。食管癌预后差, 2012年时5年存活约

收稿日期: 2018-04-20 接受日期: 2019-01-02

内蒙古自治区第七批草原英才工程, 内蒙古自治区卫生计生委医疗卫生计生科研计划项目(批准号: 201703104)和内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 2018MS08076)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-3451716, E-mail: yanglingshmily@126.com

Received: April 20, 2018 Accepted: January 2, 2019

This work was supported by the Seventh Prairie Talents Project in Inner Mongolia Autonomous Region, Medical and Health Planning Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region Health and Family Planning Commission (Grant No.201703104) and Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.2018MS08076)

\*Corresponding author. Tel: +86-471-3451716, E-mail: yanglingshmily@126.com

网络出版时间: 2019-04-01 11:15:01

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1114.006.html>

为20.9%<sup>[1]</sup>。目前, 铂类药物联合紫杉醇广泛用于食道癌的化疗。对于一线治疗后仍需治疗的患者, 目前尚无标准的治疗方案, 近年来部分研究认为, 以伊立替康为基础联合奥沙利铂或是5-氟尿嘧啶(5-FU)的化疗方案可作为晚期食道鳞状细胞癌患者的新选择<sup>[2-3]</sup>。

伴随肿瘤化疗药物的不断出现和治疗手段的多样化, 如何选择治疗方案, 是目前面临的挑战, 但我们往往难以根据大多数患者自身特点选择相应化疗药物, 只能依据化疗评效来评估每一个方案的有效性。因此, 若能建立一个临床用药前的个体化的体外化疗药物筛选平台, 将能有效地解决这个问题, 为临床的药物选择提供参考, 从而提高化疗的有效性, 减轻患者的痛苦和负担。然而, 肿瘤组织体外培养后, 肿瘤组织性质和肿瘤细胞增殖是否会有很大的变化, 以及最佳的培养天数均需要实验进行探索。本文将使用3D培养的方法在体外培养食管鳞状细胞癌组织, 对培养的组织性质、肿瘤细胞的增殖以及最佳培养天数进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

胎牛血清、DMEM/F12培养液购自Gibco公司。基质胶(matrigel)和96孔板购自Corning公司。即用型一抗Ki-67、P63、P40、细胞角蛋白5/6和免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。蛋白质提取试剂盒购自Invent Biotechnologies公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。一抗P63、P40、细胞角蛋白5/6和二抗抗兔IgG H&L(Alexa Fluor<sup>®</sup> 790)购自Abcam公司。GAPDH购自Proteintech Group公司。

### 1.2 食管鳞状癌组织3D培养

取手术废弃的食管鳞状细胞癌组织, 冷PBS清洗1次, 用眼科剪刀将肿瘤组织剪成细小的碎块, 和基质胶(matrigel)进行混合, 整个过程在冰上进行。将组织和matrigel混合物放在96孔板中, 加入含有20%胎牛血清的DMEM/F12培养液进行培养。培养2、4、6、8、10、12、14、16、18天时取出, 然后固定、石蜡包埋和切片后进行后续实验。

### 1.3 HE染色

组织切片在二甲苯中脱蜡、梯度酒精复水, 分别在苏木精和伊红中进行染色, 再经过梯度酒精脱

水, 二甲苯透明、封片, 以备观察。

### 1.4 免疫组织化学

组织切片二甲苯脱蜡、梯度酒精复水, 3%过氧化氢封闭内源生物素, 按照抗体使用说明进行抗原修复, 即用型一抗Ki-67、P63、P40和细胞角蛋白5/6于4℃孵育过夜, PBS清洗后滴加二抗室温孵育, PBS清洗后滴加DAB显色液进行显色, 苏木精复染, 再经过梯度酒精脱水, 二甲苯透明、封片, 以备观察。染色结果由病理医师进行观察。

### 1.5 Western blot

组织培养2、6和12天后提取总蛋白, 使用BCA方法进行定量。加入5×蛋白质上样缓冲液, 煮沸10 min, 上样进行SDS-PAGE电泳和Western blot检测。采用Odyssey双色红外激光成像系统(美国LI-COR公司)对蛋白印迹条带进行定量。目标蛋白的相对表达量用目标蛋白测定值与GAPDH蛋白测定值的比值进行计算。

## 2 结果

### 2.1 3D培养食管鳞状细胞癌组织HE染色

在3D培养的食管癌组织中, HE染色显示, 培养的肿瘤组织与原组织基本相同。随着培养时间的延长, 组织块变得小, 且肿瘤组织有萎缩和退化的现象(图1)。

### 2.2 3D培养食管鳞状细胞癌组织中P63、P40和细胞角蛋白5/6的表达

从第2天到第18天, 3D培养的食管癌组织均表达P63、P40和细胞角蛋白5/6蛋白。随体外培养时间的增加, P40和P63蛋白在肿瘤细胞中的表达变少, P40蛋白在培养第18天时表达很弱, 且细胞核表达不明显。在体外培养过程中, 细胞角蛋白5/6的表达没有明显的变化(图2)。可见在体外培养的过程中, 食管鳞状细胞癌的一部分特性会随着体外培养时间的延长而发生变化。

将第2、6和12天的培养组织提取的总蛋白进行Western blot检测, 观察P63、P40、细胞角蛋白5/6在培养组织中的表达。结果显示, 随着培养时间的延长P63和P40蛋白的表达下降(图3A和图3B)。在培养第2天的组织中, P63和P40蛋白均有杂带, 但是在培养第6天和第12天的组织中相同位置却没有杂带, 我们推测, 这可能是非特异性条带, 也可能是异构体或是蛋白修饰。由于第6天和第12天P63和P40蛋白量



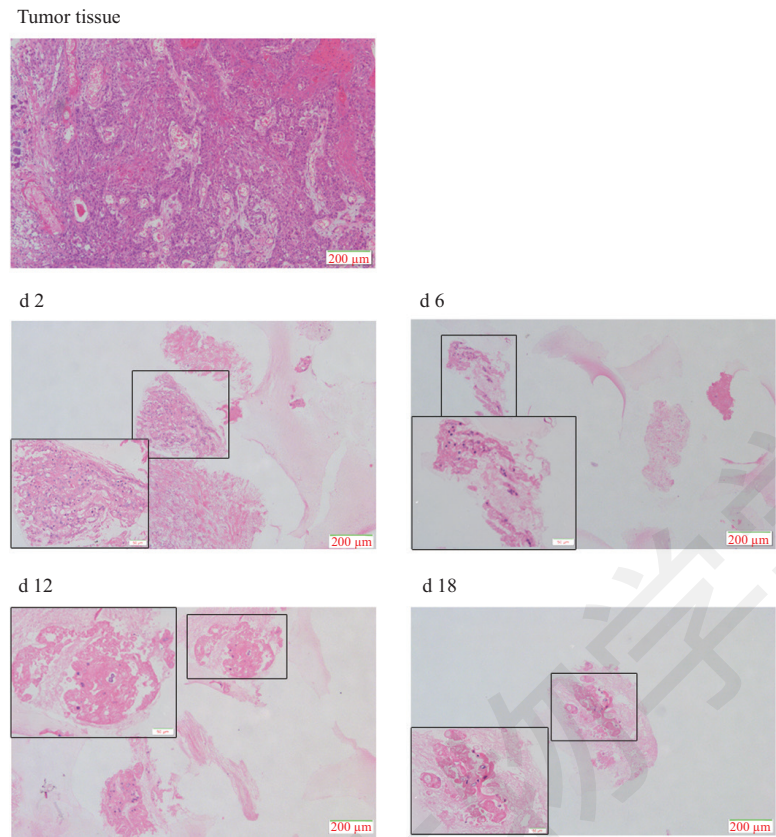


图1 肿瘤组织与体外培养第2、6、12、18天肿瘤组织的HE染色

Fig.1 HE staining of tumor tissue and ESCC tissue cultured *in vitro* for 2nd, 6th, 12th, 18th day

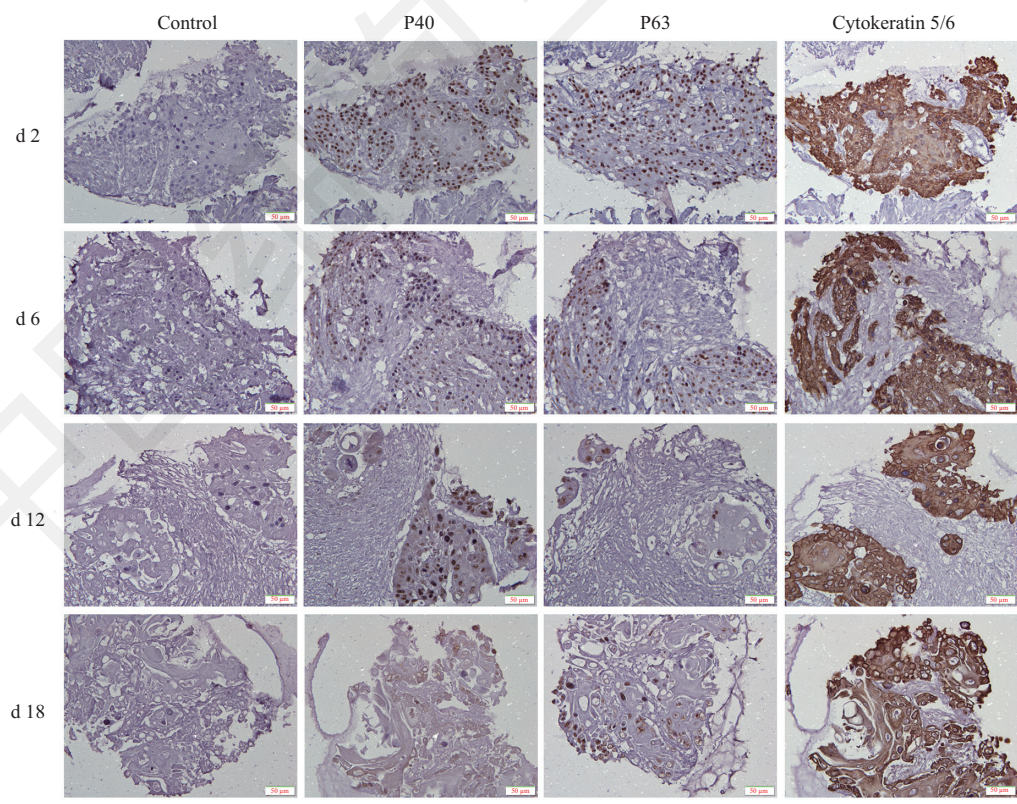
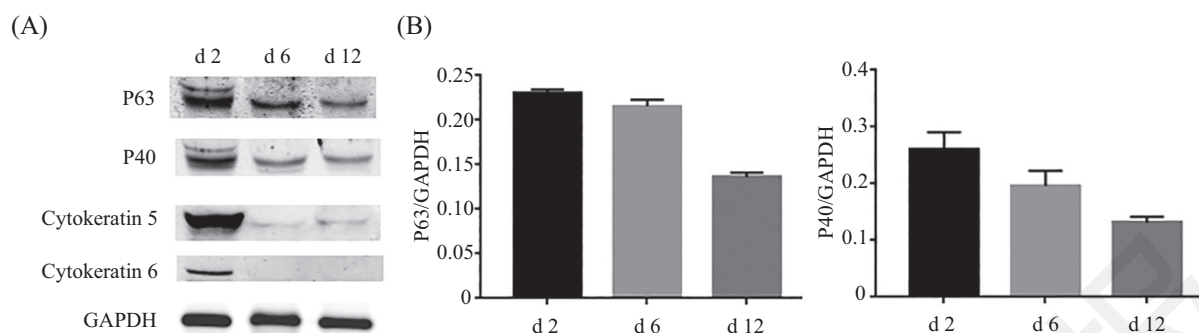


图2 体外培养第2、6、12、18天肿瘤组织的P40、P63和细胞角蛋白5/6的免疫组织化学染色

Fig.2 Immunohistochemistry staining of P40, P63 and cytokeratin 5/6 in ESCC tissue cultured *in vitro* for 2nd, 6th, 12th, 18th day



A: Western blot检测体外培养第2、6和12天肿瘤组织的P63、P40、细胞角蛋白5/6在培养组织中的表达; B: P63和P40蛋白的相对表达量。

A: Western blot results of P40, P63, cytokeratin 5/6 in ESCC tissue cultured *in vitro* for 2nd, 6th, 12th day; B: the relative expression levels of P63 and P40 were measured with GAPDH as an internal control.

图3 体外培养组织的Western blot结果  
Fig.3 The results of Western blot in cultured ESCC tissues

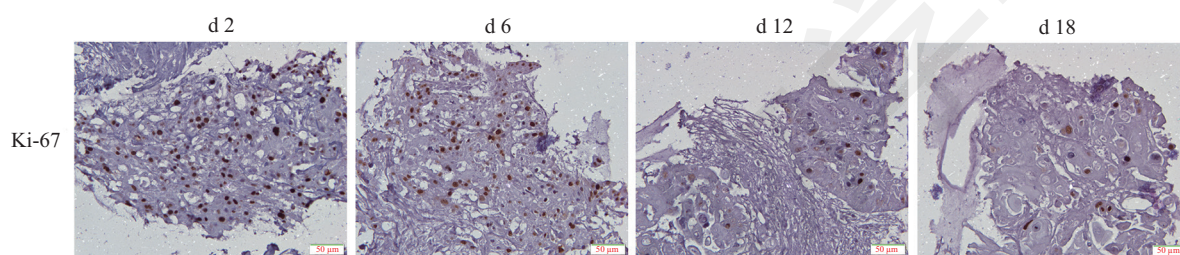


图4 体外培养第2、6、12、18天肿瘤组织的Ki-67的免疫组织化学染色  
Fig.4 Immunohistochemistry staining of Ki-67 in ESCC tissue cultured *in vitro* for 2nd, 6th, 12th, 18th day

减少, 极其少量的异构体或是修饰蛋白也检测不到了。细胞角蛋白5/6的表达在第6天和第12天时几乎检测不到(图3A), 这和免疫组化的结果不同。我们推测, 可能与检测的方法和两种实验过程中使用的抗体不同有关。

### 2.3 3D培养食管鳞状细胞癌组织中Ki-67的表达

在3D培养的食管癌组织中, 从第2天到第18天, 我们均发现, Ki-67蛋白在癌组织中有表达, 但Ki-67蛋白在肿瘤组织中表达的强度和比率都随着培养时间的延长而减弱(图4)。

## 3 讨论

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤, 根据2013年全国347个肿瘤登记处的数据进行统计, 我国2013年食管癌的发病率排名第五, 新发病例约为276 900, 死亡率排名第四, 死亡病例约为206 500<sup>[4]</sup>。农村地区食管癌的发病率与死亡率均高于城市地区, 男性食管癌的发病率与死亡率均高于女性。由于早期症状不典型, 大部分食管癌患者就诊时已属晚期, 患者无法接受手术治疗; 还有一部分患者在手术和放化

疗后出现复发及远处转移。伴随肿瘤化疗药物的不断出现和治疗手段的多样化, 如何选择治疗方案以及在耐药出现后及时调整治疗方案, 同时适时停止无效治疗以规避药物副作用, 是临床医师所面临的重要挑战。目前临床中常用的食管鳞状细胞癌化疗药物有铂类、紫杉醇、5-FU、吉西他滨和伊立替康, 由于不知道患者对何种药物敏感, 我们难以根据大多数患者自身的临床特点选择相应化疗药物, 只能依据化疗评效来评估每一个方案的有效性, 这样患者可能面临经历多个无效化疗方案的痛苦。因此, 建立一个临床用药前的体外个体化的化疗药物筛选平台是亟需解决的问题。

3D细胞组织培养是将细胞、组织培植在一定的细胞外基质中, 细胞外基质蛋白充当生长支架所创建的生长环境, 最大程度地模拟体内环境。3D细胞组织培养作为体外二维单层细胞系统的研究与组织器官及整体研究的桥梁, 显示了它既能保留体内细胞微环境的物质及结构基础, 又能展现细胞组织培养的直观性及条件可控性的优势。

3D培养技术已应用于生物学、医学研究和药



物开发等领域。人们利用3D培养技术建立了多种体外组织培养和疾病模型,包括肝、胰腺、小肠<sup>[5]</sup>、胃<sup>[6]</sup>和乳腺<sup>[7]</sup>,研究组织发育过程、疾病发生和进展过程和对药物的反应。3D培养技术在肿瘤学研究中不仅可以用于寻找癌细胞形成的相关通路<sup>[8]</sup>,而且可以用于监测癌细胞对抗癌药物的应答,致力于推进精准治疗<sup>[9-11]</sup>。在多种肿瘤包括肺癌<sup>[12]</sup>、胰腺癌<sup>[10]</sup>、前列腺癌<sup>[13]</sup>和结直肠癌<sup>[9]</sup>中人们均建立了体外3D培养模型。虽然现在体外3D培养要运用于临床检查还有很多问题,诸如还未实现自动化的高通量、费用过高等,但是,我们应该看到3D细胞组织培养技术有可能填补从癌症基因组学到患者临床前实验的空白,也可能完善了从细胞系到异种移植模型的药物研究过程,使个体化治疗方案的建立成为可能。

所以本实验采用3D培养的方法在体外培养食管鳞状细胞癌组织,对培养的组织性质、肿瘤细胞的增殖以及最佳培养天数进行研究。结果显示,体外培养的食管鳞状细胞癌组织表达鳞状细胞癌的标记蛋白,肿瘤细胞中发现Ki-67的表达,但是随着培养时间的加长,培养的肿瘤组织变小,HE染色发现有萎缩和退化的迹象,P40、P63和Ki-67的表达均随着培养时间的增加而减弱。所以,可以将体外培养的食管鳞状细胞癌组织用于化疗药物的筛选,且体外培养天数越短越好。已有的研究在体外培养结直肠癌6天时,使用多种药物处理培养物并利用CellTiter-Glo试剂检测样本的活性,以确定培养物对药物的敏感性。结果显示,培养物对药物的反应一致性很好,重复性也很高<sup>[9]</sup>。所以,本研究小组计划在后期药物筛选中采用药物处理6天,现有的预实验显示,食管鳞状细胞癌组织在体外培养6天时,使用几种化疗药物处理和对照组织中的ATP活性是有显著差异的,说明培养6天时可以区分加药的效果和对照。本实验结果和其他研究小组已有的研究结果为下一步进行体外的化疗药物筛选奠定基础。

实验结果中,免疫组织化学和Western blot两种方法中细胞角蛋白5/6的表达结果有差异,这可能是两种实验方法造成的结果的差异,或是进行这两种实验时使用的一抗不同造成了表达的差异。本研究的不足之处是,未在包埋之前将基质胶消化掉,使得培养的肿瘤组织在包埋时很分散,不能准确地判断癌组织中Ki-67表达的阳性率,虽然我们试图使用

Western blot来进一步阐明这个问题,可是多次实验后,仍没有得到Ki-67的阳性信号,这个问题需要在后续的研究中进行改善。总之,我们的实验建立了短期的体外培养食管鳞状细胞癌组织的3D模型,在后续的实验可以用来对常规化疗药物进行敏感性的检测。

## 参考文献 (References)

- 1 张思维, 郑荣寿, 左婷婷, 曾红梅, 陈万青, 赫捷. 中国食管癌死亡状况和生存分析. 中华肿瘤杂志(Zhang Siwei, Zheng Rongshou, Zuo Tingting, Zeng Hongmei, Cn Wanqing, He Jie. Mortality and survival analysis of esophageal cancer in China. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*) 2016; 38(9): 709-15.
- 2 Hawkes E, Okines AF, Papamichael D, Rao S, Ashley S, Charalambous H, *et al.* Docetaxel and irinotecan as second-line therapy for advanced oesophagogastric cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(8): 1146-51.
- 3 Schoennemann KR, Bjerregaard JK, Hansen TP, De Stricker K, Gjerstorff MF, Jensen HA, *et al.* Biweekly cetuximab and irinotecan as second-line therapy in patients with gastro-esophageal cancer previously treated with platinum. *Gastric Cancer* 2011; 14(3): 219-325.
- 4 Zheng R, Zeng H, Zhang S, Chen T, Chen W. National estimates of cancer prevalence in China, 2011. *Cancer Letters* 2016; 370: 33-8.
- 5 Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, *et al.* Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc* 2016; 11(9): 1724-43.
- 6 Pompaiah M, Bartfeld S. Gastric organoids: An emerging model system to study helicobacter pylori pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017; 400: 149-68.
- 7 Jamieson PR, Dekkers JF, Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development* 2017; 144(6): 1065-71.
- 8 Li X, Nadauld L, Ootani A, Corney DC, Pai RK, Gevaert O, *et al.* Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat Med* 2014; 20(7): 769-77.
- 9 van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, *et al.* Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015; 161(4): 933-45.
- 10 Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, *et al.* Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* 2015; 21(11): 1364-71.
- 11 Devarasetty M, Mazzocchi AR, Skardal A. Applications of bioengineered 3D tissue and tumor organoids in drug development and precision medicine: current and future. *Bio Drugs* 2018; 32(1): 53-68.
- 12 Pomeroy A. Organotypic models of lung cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018; doi: 10.1007/82\_2017\_79.
- 13 Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, *et al.* Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016; 11(2): 347-58.