

构建三阴性乳腺癌的三维体外培养模型用于抗肿瘤药物的活性评价

王杰^{1,2,3}, 李婷婷³, 李瑞红³, 陈志强³, 周元园³, 王韞芳³, 柳娟³, 张宏艳^{1,2}

摘要 目的 构建体外 3D 肿瘤微组织模型用于抗肿瘤药物的药效学评价。方法 采用液滴重叠法构建基于基质胶 (Matrigel) 的 3D 肿瘤微组织培养模型 (3D-M)。采用 Alamar blue 法检测肿瘤细胞在 2D、3D 及 3D-M 培养条件下的细胞增殖情况与对临床乳腺癌治疗常用药物的反应性; 使用流式细胞仪在 2D、3D 及 3D-M 培养条件下肿瘤细胞对表柔比星的内吞情况。结果 MDA-MB-231 细胞与 Matrigel 共培养更加容易聚集成紧密的 3D 球形。Matrigel 可以促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖。对于大多数药物的抗肿瘤活性测试发现 3D-M 模型中的肿瘤细胞相较于 2D 与 3D 培养表现出更高的药物耐受性。流式细胞仪法检测药物内吞显示 3D 培养条件下细胞内吞药物的阳性细胞率和中位荧光强度较 2D 培养低, 3D-M 相较 3D 培养条件下的阳性细胞率和中位荧光强度较低。在药物作用 30 min 时, 3D-M 的阳性细胞率和中位荧光强度较低分别为 3D 的 80% 和 25%。结论 Matrigel 与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞构建的体外 3D 肿瘤微组织培养模型, 能够建立起类肿瘤组织的结构, 药物渗透性降低, 更加真实的反映抗肿瘤药物的反应性情况, 可以作为抗肿瘤药物体外药效学评测模型。

关键词 Matrigel; 肿瘤微组织; 三维培养; 抗肿瘤药物

中图分类号 R 73-35+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0374-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.008

乳腺癌是严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤, 在发达城市地区, 其发病率逐年升高。据国家癌症中心最新统计显示, 全国每年新发乳腺癌例数超过 27 万, 死亡例数超过 7 万, 位居女性恶性肿瘤发病率之首。其中, 三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 的雌激素受体 (estrogen receptor, ER), 孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长

因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 均为阴性, 具有恶性程度高、易复发转移、生存率低的特点^[1]。三阴性乳腺癌因其特殊生物学特征, 易产生耐药导致预后较差, 因此研发能降低肿瘤耐药性和预防肿瘤转移复发的更为高效的抗肿瘤药物就变得尤为重要。

通过组织工程技术的不断发展, 组织化培养的肿瘤微组织已经被用于肿瘤生物学及分子机制研究, 相较于二维 (two dimensional, 2D) 培养, 三维 (three dimensional, 3D) 培养模型可以模拟肿瘤细胞在体生长状态, 并取得了大量的研究进展^[2-3]。3D 细胞培养支架为细胞培养提供了类似体内生长环境, 因此选择好的 3D 细胞培养支架材料也是成功进行 3D 培养的一个关键因素^[4]。基质胶 (Matrigel) 是一种孔径为 20~50 nm 的水凝胶基质, 其主要成分为细胞外基质蛋白^[5]。MDA-MB-231 是一种 ER、PR、HER-2 均为阴性的乳腺癌细胞系, 恶性程度高。该研究拟采用 Matrigel 模拟肿瘤细胞外基质微环境, 促进 MDA-MB-231 细胞形成 3D 类组织结构, 采用液滴重叠法构建体外肿瘤细胞 3D 培养体系, 对临床常用抗肿瘤药物进行药物药效学评价, 旨在构建一种能够真实模拟反映体内抗肿瘤药物敏感性的基于 Matrigel 的 3D 肿瘤微组织培养模型 (3D-M); 使用流式细胞仪在 2D、3D 及 3D-M 培养条件下肿瘤细胞对药物的内吞情况, 探索不同模型所检测的药物敏感性差异的机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与仪器 多西紫杉醇注射液 (docetaxel injection, DTX, 英国安万特医药有限公司); 盐酸表柔比星注射液 (epirubicin hydrochloride for injection, EPI, 海正辉瑞制药有限公司); 酒石酸长春瑞滨注射液 (vinorelbine bitartrate injection, NVB, 江苏豪森药业股份有限公司); 氟尿嘧啶注射液 (fluorouracil injection, 5-Fu, 天津金耀药业); 注射用环磷酰胺 (cyclophosphamide for injection, CTX, 百特国际有限公司); 顺铂注射液 (cisplatin injection, DDP,

2019-01-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31370990)

作者单位: ¹ 安徽医科大学陆军总医院临床学院, 合肥 230032

² 中国人民解放军陆军总医院肿瘤科, 北京 100700

³ 卫生勤务与血液研究所, 北京 100850

作者简介: 王杰, 男, 硕士研究生;

张宏艳, 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: roninzhy@126.com

江苏豪森药业股份有限公司);注射用盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride for injection, GEM, 江苏豪森药业股份有限公司);紫杉醇注射液(paclitaxel injection, Tax, 海口奇力制药有限公司);依托泊苷注射液(etoposide injection, VP-16, 齐鲁制药有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(以色列biological industries公司);Matrigel基质胶(美国BD公司);Alamar Blue(美国Invitrogen公司);96孔板(美国Costar公司);Attune NxT流式细胞仪、CO₂培养箱(美国Thermo Scientific公司);Vectra荧光显微镜、Ensignt微孔板检测仪(美国PerkinElmer公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清、100 μg/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM培养基中,于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养,隔天换液,待其汇合度达到90%左右,用含0.02% EDTA的0.25%的胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 3D与3D-M肿瘤微组织的构建 将Matrigel基质胶用4℃DMEM培养基稀释成10 μg/ml,低吸附的96孔U型孔板每孔50 μl包被,静置10 min左右,将50 μl MDA-MB-231细胞悬液分别以50、100、200、400、600、800、1 200、1 600、2 000个/孔加入孔板混合均匀,于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养5 d,期间镜下观察细胞形态并拍照记录3D微组织的变化。确定MDA-MB-231肿瘤微组织构建的最适细胞数,将MDA-MB-231以最适细胞数接种于无Matrigel包被的低吸附的96孔U型孔板中,并定期观察。将MDA-MB-231细胞在3D、3D-M条件下培养5 d的肿瘤微组织,收集后4%多聚甲醛固定,依次经70%酒精20 min,95%酒精20 min,100%酒精2×20 min,二甲苯2×20 min梯度脱水;石蜡包埋切片,脱蜡后经蒸馏水洗3次,Harris苏木精-酸化伊红染色,再经脱水透明后封片拍照。

1.2.3 Alamar blue法检测细胞增殖 取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种,2D培养的细胞以3×10³个/孔接种于96孔板中,3D及3D-M培养的细胞以600个/孔分别接种于无基质培养基和Matrigel(10 μg/ml)包被的低吸附的96孔板培养,在0、1、2、3、4、5 d时分别检测12个孔,每孔加入10 μl的Alamar blue试剂,混匀后置于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱2 h,Ensignt微孔板检测仪检测Ex 570 nm、Em 585 nm的荧光值,用于评测细胞活性。

1.2.4 抗肿瘤药物活性检测 取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种,2D培养的细胞以8×10³个/孔接种于96孔中,24 h过夜贴壁后加化疗药进行细胞毒性测试。3D及3D-M培养的细胞以600个/孔分别接种于无基质和10 μg/ml Matrigel包被的低吸附的96孔板培养,5 d后加化疗药进行细胞毒性测试,DTX、EPI、NVB、5-Fu、DDP、Tax、VP-16浓度分别为0.01、0.1、1、10、100 μg/ml,CTX、GEM浓度分别为0.1、1、10、100、1 000 μg/ml。2D、3D及3D-M培养的MDA-MB-231细胞在给药24 h后,每孔分别加入10 μl的Alamar blue试剂,混匀后置于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱2 h,Ensignt微孔板检测仪检测Ex 570 nm、Em 585 nm的荧光值,用于评测细胞活性。

1.2.5 流式细胞仪检测化疗药物进入肿瘤微组织的情况 将MDA-MB-231细胞在2D、3D及3D-M条件下培养5 d,弃培养基,各加入含有10 μg/ml EPI的DMEM培养基,加药作用时间为0、10、30、60 min时,弃培养基,预冷的PBS洗3遍,将2D、3D和3D-M培养的细胞消化为细胞悬液分别收集于1.5 ml离心管中,使用流式细胞仪检测MDA-MB-231细胞内吞EPI的量。

1.3 统计学处理 采用Office Excel 2016软件进行数据统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3D培养乳腺癌微组织的形态表征 镜下观察表明Matrigel可以促进MDA-MB-231细胞成球,细胞数偏低和偏高均不能和基质相契合,仅在400~800个细胞/孔时,MDA-MB-231细胞可以和Matrigel充分结合,形成致密立体结构,故确定以MDA-MB-231细胞(600/孔)与50 μl Matrigel(10 μg/ml)共培养时可以形成3D微组织,见图1。在2D单层培养条件下,镜下乳腺癌MDA-MB-231细胞贴壁生长,癌细胞大小不等成巢状汇集,癌细胞呈现多边形、梭形、椭圆形。在用低吸附U型底96孔板3D培养乳腺癌MDA-MB-231细胞时,加Matrigel共培养时可以聚集成紧密的球形,而未加Matrigel培养的微组织镜下较为松散。在3D和3D-M培养的肿瘤微组织石蜡切片HE染色时,3D培养的微组织细胞呈现类圆形,3D-M共培养的肿瘤微组织更为紧密,见图2。

2.2 MDA-MB-231 细胞在不同培养条件下增殖情况比较 将 MDA-MB-231 细胞在 2D、3D 和 3D-M 培养条件下 1~5 d 的细胞计数做增殖曲线时,可以发现 2D 培养较 3D 培养增殖快,呈指数型增长;3D 培养时生长速度较慢,加 Matrigel 时细胞增殖较不加 Matrigel 时快,表明 Matrigel 能够促进 MDA-MB-231 的细胞增殖,见图 3。

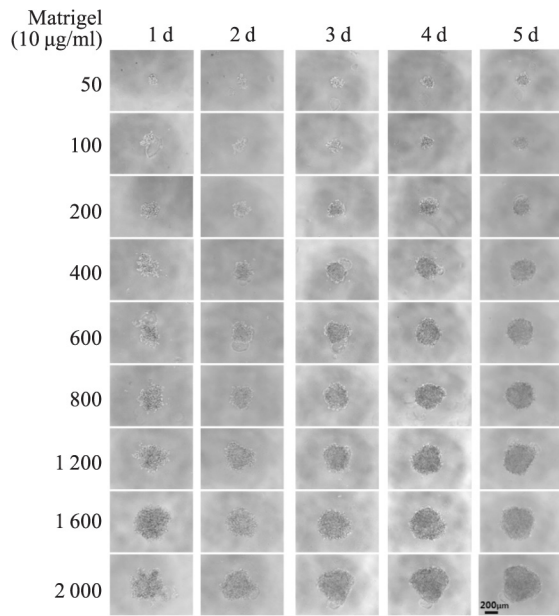


图 1 MDA-MB-231 细胞三维培养的形态表征

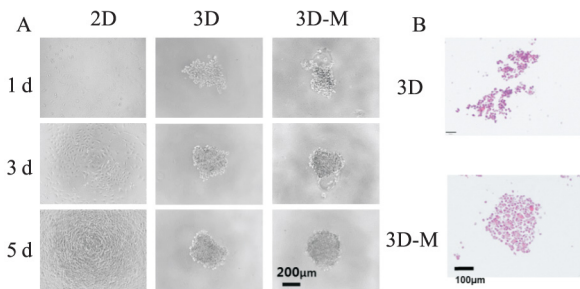


图 2 MDA-MB-231 细胞培养条件下的生长情况及染色

A: MDA-MB-231 细胞各培养条件下生长情况; B: MDA-MB-231 细胞在 3D 和 3D-M 培养后 HE 染色

2.3 使用不同培养条件下的 MDA-MB-231 细胞进行抗肿瘤药物活性检测结果 MDA-MB-231 细胞在 2D、3D 和 3D-M 培养条件下,使用临床常用一线化疗药物 DTX、EPI、NVB、5-Fu、CTX、GEM、DDP、Tax、VP-16 在多浓度条件下分别做药物敏感性实验,通过比较药物 20% 抑制浓度 (IC_{20}) 值,3D 培养条件下的 IC_{20} 值大于 2D 培养,3D-M 培养条件下的 IC_{20} 值大于 3D 培养,测试 DTX、EPI、NVB、5-Fu、

CTX、GEM、DDP、Tax、VP-16 的 IC_{20} ,3D 分别为 2D 的 11.7、2.3、46.5、12.7、769.2、8.1、1.7、11.7、0.7 倍;3D-M 分别为 3D 的 4.4、7.6、1.9、1.6、1.4、416.7、0.8、5.9 倍,可以发现 3D-M 培养条件下的细胞对化疗药物毒性反应的敏感性较差,耐受性高,反映出较强的耐药性,见表 1、图 4。

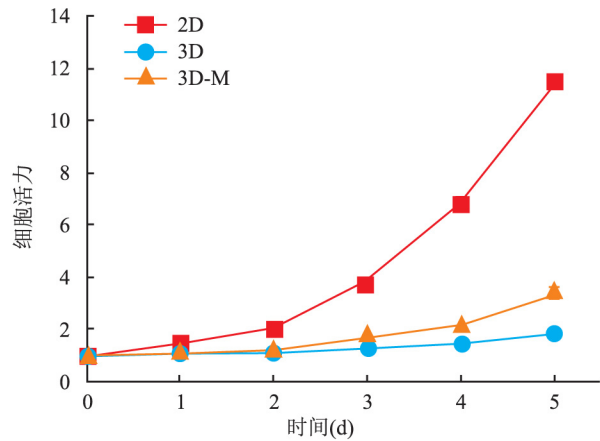


图 3 MDA-MB-231 细胞在 2D、3D 和 3D-M 培养条件下 1~5 d 时的细胞增殖曲线

表 1 MDA-MB-231 细胞体外 24 h 药物毒性测试的 IC_{20} 值 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

化疗药物 ($\mu\text{g/ml}$)	2D	3D	3D-M
DTX	1.95	22.81	> 100
EPI	0.12	0.28	2.13
NVB	1.11	51.6	> 100
5-Fu	4.98	63.49	> 100
CTX	1.3	> 1000	> 1000
DDP	1.64	13.23	18.71
GEM	1.44	2.4	> 1000
Tax	1.12	13.06	10.04
VP-16	3.54	2.52	14.8

2.4 药物在不同培养条件下的 MDA-MB-231 细胞的含量分析 EPI 是一个带自发荧光的临床一线化疗药,能够在 488 nm 的激发光下,发射红色荧光。通过观察 MDA-MB-231 细胞在不同培养条件下不同作用时间时对 EPI 的内吞,可以直观地比较 MDA-MB-231 细胞中药物含量的变化。在流式细胞仪检测 MDA-MB-231 细胞内吞 EPI 实验中,药物作用时间分别为 0、10、30、60 min,作用时间越长,内吞药物的 MDA-MB-231 细胞的阳性细胞率越高,中位荧光强度越强;3D 培养条件下细胞内吞药物的阳性细胞率和中位荧光强度较 2D 培养低,3D-M 相较 3D 培养条件下的阳性细胞率和中位荧光强度偏低,

在药物作用 10 min 时,3D-M 的阳性细胞率和中位荧光强度较低,分别为 3D 的 71% 和 54%,30 min 时 3D-M 的阳性细胞率和中位荧光强度较低,分别为 3D 的 80% 和 25%,60 min 时 3D-M 的阳性细胞率和中位荧光强度较低,分别为 3D 的 93% 和 27%,见图 5。

3 讨论

传统的细胞培养法多采用 2D 单层平面培养,实际上许多细胞从组织中分离并进行 2D 培养后,会贴壁生长逐渐失去极性,导致异常分化甚至失去分化表型^[6]。2D 培养的 MDA-MB-231 细胞生长速度较快,培养箱过夜 24 h 内便可以贴壁,生长 2~3 d 细胞汇合度便可达到 80% 以上。其无论以何种细胞密度进行无基质介导的 3D 培养,自身均难以进行微组织化培养。MDA-MB-231 细胞 600/孔和 50 μl 的 Matrigel(10 μg/ml) 在 U 型低吸附 96 孔板共培养 5 d 可以形成 3D 肿瘤微组织。3D 培养条件下,肿瘤细胞的增殖速率较 2D 减慢,细胞生长周期

延长,可以进行长时间、动态的细胞观察和检测。

2D 细胞培养是现在研究肿瘤细胞生物学的主要方法,但在 2D 培养体系下建立的 2D 细胞培养体外模型,不能很好地模拟体内肿瘤细胞与微环境之间的相互作用,研究的耐药机制也不能完全说明体内实际的耐药机制^[7]。与传统 2D 培养相比,3D 细胞培养既可模拟体内细胞生长的微环境,又有更直观性和条件可控的优势。David et al^[8] 在对 2D 和 3D 培养条件下的肺癌细胞研究时发现,肺癌细胞 2D 培养时细胞间相互作用较难实现,而 3D 培养的细胞间紧密连接,更利于传递生物信息,更接近体内细胞的分化程度、超微结构等生物特征。

以往研究表明,3D 细胞培养技术能更好的模拟在人体内细胞的生长微环境。3D 培养的体外肿瘤微组织细胞具有与体内肿瘤细胞相似的耐药性,但当肿瘤微组织被消化为单细胞后,肿瘤细胞对药物的耐受性大幅降低。Graham et al^[9] 研究证实乳腺癌细胞 EMT6 经过 3D 培养后具有耐药性,但改为 2D 培养后其药物耐受性显著降低。Matrigel 是一种

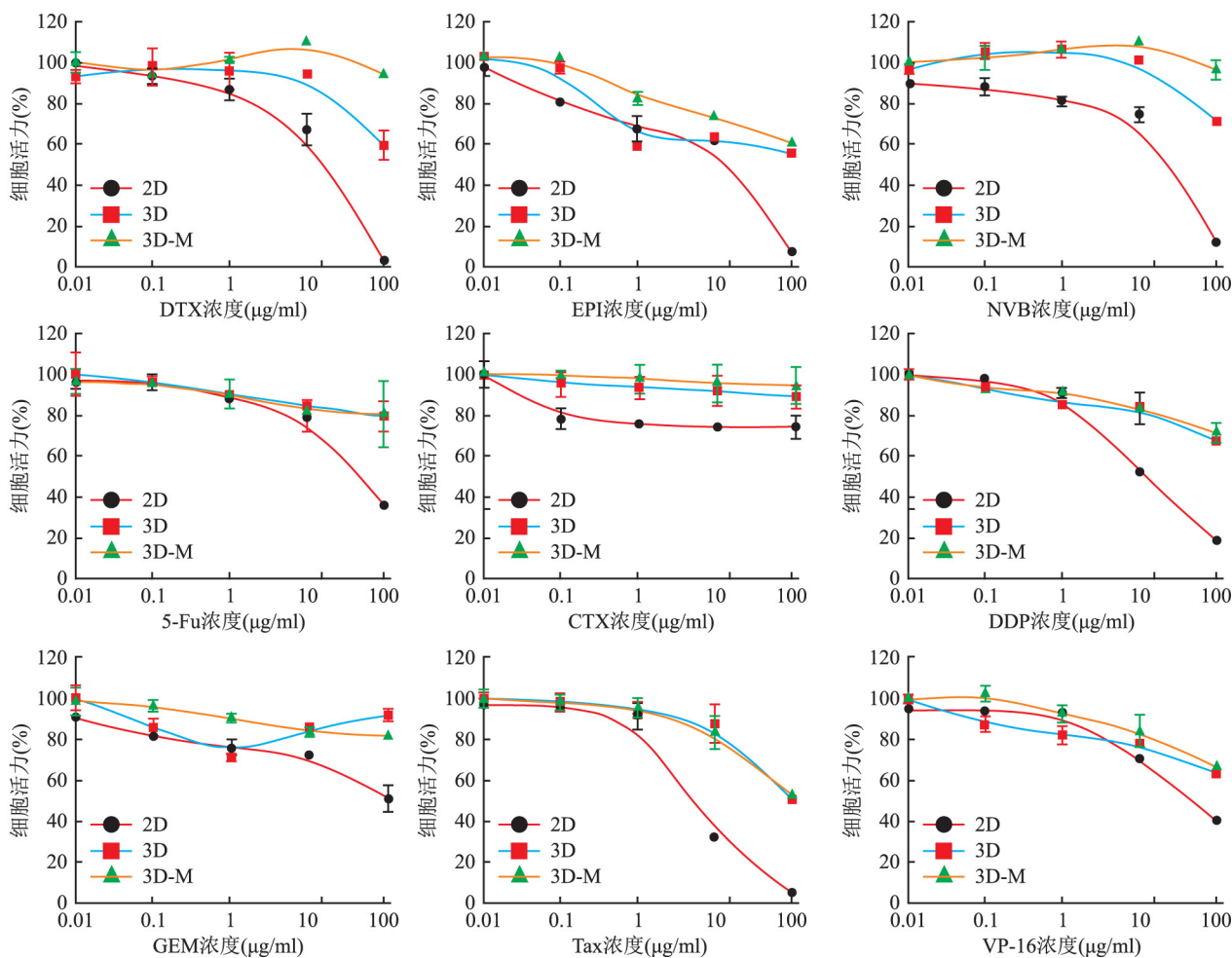


图 4 MDA-MB-231 细胞在 2D、3D 和 3D-M 培养条件下的抗肿瘤药物活性检测

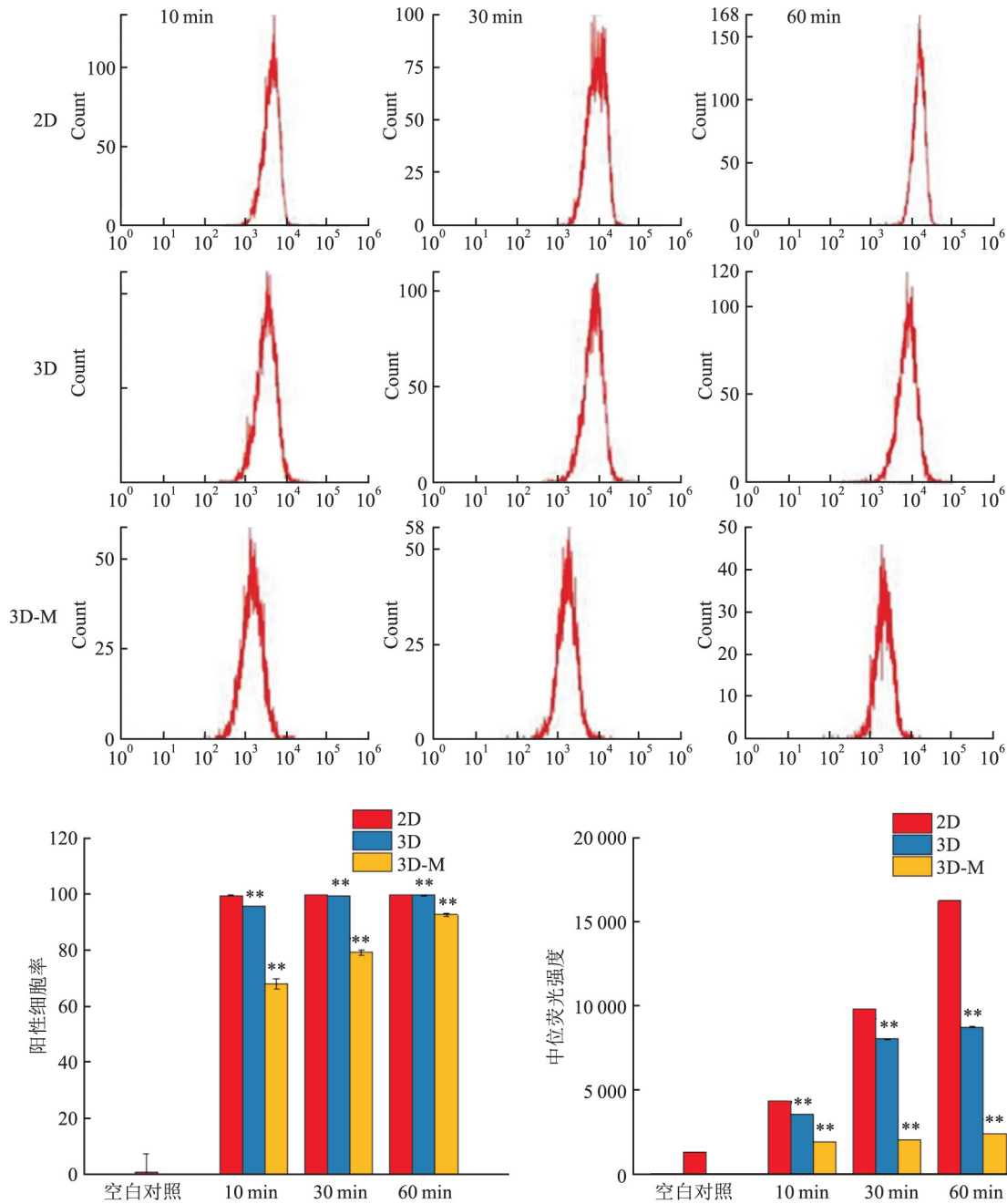


图5 流式细胞仪检测化疗药物进入不同培养条件下肿瘤微组织的情况

A: MDA-MB-231 细胞在 2D、3D 和 3D-M 培养条件下对 EPI 的内吞; B: MDA-MB-231 细胞在不同培养条件下内吞 EPI 的阳性细胞率和中位荧光强度; 与 2D 培养的细胞比较: ** P < 0.01

细胞外基质蛋白的提取物,可以为细胞提供物理支撑,还能使细胞快速黏附,并充分接触到细胞外基质,为细胞提供近似于体内的立体微环境^[10]。Matrigel 可以为 MDA-MB-231 细胞构建一个生长的微环境,并可以促进 MDA-MB-231 细胞的增殖,能够真实模拟肿瘤细胞体内的生长状态。Wang et al^[11] 在 Matrigel 中培养人乳腺上皮细胞(MCF10 A)以及成纤维细胞和脂肪细胞等乳腺间充质细胞,经过 3D

培养,促使组织形成类似体内的乳腺腺泡状结构,乳腺间充质细胞表现出与体内相似的生物学特性,如极性的维持及上皮细胞功能性分化等,说明 3D 培养比 2D 培养更能模拟体内微环境。大量研究^[12-13] 也表明,3D 培养模型优于 2D 细胞培养模型。

据文献报道,TC-71 EW 肿瘤细胞经 3D 支架培养后,对阿霉素有较强的耐药性,其 IC₅₀ 为 2.738

mmol/L, 而经 2D 贴壁单层培养的 TC-71 EW 肿瘤细胞对阿霉素的敏感性显著增高, 其 IC_{50} 为 0.012 2 mmol/L^[14]。本研究采用 Alamar blue 法进行乳腺癌细胞药物敏感性检测, 通过比较多种药物 IC_{20} 值 3D 培养条件下的 IC_{20} 值远大于 2D 培养, 3D-M 培养条件下的 IC_{20} 值远大于 3D 培养, 差异有统计学意义, 可以发现在 3D-M 培养条件下的细胞对化疗药物毒性反应的敏感性较差, 表明 3D-M 条件下培养肿瘤细胞对化疗药物有较强的耐受性。Matrigel 3D 培养时 MDA-MB-231 细胞可形成致密的立体球形结构, 在进行测试抗肿瘤药物活性时 2D 培养的细胞可以和药物充分接触, 进入细胞内的药物浓度较高, 药物更容易起效; Matrigel 3D 细胞球能够模拟实体瘤独特的 ECM 微环境, 降低药物扩散速度, 细胞间相互作用增强, 所形成的致密结构使药物不能大量进入球体内部, 导致 3D 肿瘤微组织总体内吞药物较 2D 培养少, 差异有统计学意义, 因此 3D 培养时 IC_{20} 值远大于 2D 培养, 此时肿瘤细胞产生了耐药性。蒋乔等^[15]在构建肿瘤微组织细胞球的模型时, 也发现致密结构可以降低药物扩散, 促进细胞存活产生耐药。

综上所述, 基于 Matrigel 和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共培养体外模型, 可真实模拟肿瘤细胞体内生长, 可作为抗肿瘤药物体外筛药模型, 为药物研发和临床用药提供理论指导。使用 Matrigel 3D 培养 MDA-MB-231 体外肿瘤微组织模型, 也可以为体外乳腺癌耐药性研究和信号通路机制研究提供研究模型。

(致谢: 感谢刘端祺教授在论文的撰写与修改方面提出的宝贵建议。)

参考文献

- [1] Bartsch R, Ziebmayer R, Zielinski C C, et al. Triple-negative breast cancer[J]. N Engl J Med 2010, 160(7-8): 174-81.
[2] Huttmacher D W, Horch R E, Loessner D, et al. Translating tis-

- sue engineering technology platforms into cancer research[J]. J cell mol med 2009, 13(8A): 1417-27.
[3] Benien P, Swami A. 3d tumor models: History, advances and future perspectives[J]. Future Oncology, 2014, 10(7): 1311-27.
[4] Balachander G, Balaji S, Rangarajan A, et al. Enhanced metastatic potential in a 3d tissue scaffold toward a comprehensive in vitro model for breast cancer metastasis[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(50): 27810-22.
[5] Benton G, Arnaoutova I, George J, et al. Matrigel: From discovery and ecm mimicry to assays and models for cancer research[J]. Adv Drug Deliv Rev 2014, 79-80: 3-18.
[6] Knight E, Przyborski S. Advances in 3d cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro* [J]. J Anat, 2016, 227(6): 746-56.
[7] Han X D, Lei W, Zheng J, et al. Three-dimensional scaffold materials for cell culture and their application in tumor tissue engineering [J]. CJTER, 2016, 20(42): 6371-7.
[8] David L, Dulong V, Cerf D L, et al. Hyaluronan hydrogel: An appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity [J]. Acta Biomaterialia, 2008, 4(2): 256-63.
[9] Graham C H, Kobayashi H, Stankiewicz K S, et al. Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents [J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86(13): 975-82.
[10] 姚燕丹, 黄松音, 袁广卿, 等. Matrigel 对不同 her2 表达的乳腺癌细胞原位成瘤、增殖、凋亡和转移的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(12): 2338-43.
[11] Wang X, Sun L, Maffini M V, et al. A complex 3d human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function[J]. Biomaterials, 2010, 31(14): 3920.
[12] Ghajar C M, Bissell M J. Tumor engineering: The other face of tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A 2010, 16(7): 2153-6.
[13] Santiagowalker A, Li L, Haass N K, et al. Melanocytes: From morphology to application[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2009, 22(2): 114-21.
[14] Wolun-Cholewa M, Langer K, Szymanski K, et al. An efficient 3d cell culture method on biomimetic nanostructured grids [J]. Plos One, 2013, 8(9): e72936.
[15] 蒋乔, 薛雪, 马会利, 等. 肿瘤多细胞球: 一种近似实体瘤的体外肿瘤模型[J]. 电子显微学报, 2011, 30(6): 552-6.

Construction of three-dimensional *in vitro* culture model of triple negative breast cancer for evaluation of antitumor drug activity

Wang Jie^{1,2,3}, Li Tingting³, Li Ruihong³, et al

(¹PLA Army General Hospital Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Oncology, PLA Army General Hospital, Beijing 100700; ³Institute

of Health Service and Transfusion Medicine, Beijing 100850)

Abstract Objective To construct a 3D tumor micro-tissue model *in vitro* for antitumor drug sensitivity evaluation.

新型吡咯并嘧啶衍生物 N67 对 3T3-L1 细胞的抑制作用及机制初探

易晓红¹, 李文峰², 钟占琼³, 贺玉萍², 谢璐霜¹, 陈继兰³, 李敏¹, 龚圆渊¹, 杨岚¹

摘要 目的 探讨新型吡咯类小分子化合物 N67 对小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 的作用效果和机制。方法 培养 Swiss 小鼠 3T3-L1 细胞, 设对照组, 将 N67 以不同时间的浓度作用于 3T3-L1 细胞, 采用 MTT 细胞毒性检测, 求出 IC₅₀; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blot 检测相关蛋白表达。结果 N67 对 3T3-L1 细胞的生长有显著抑制作用, 流式细胞术显示能诱导其凋亡, 且有时间和浓度依赖性。Western blot 结果证明其可能通过 ABHD6 靶点发挥作用。结论 新型小分子化合物 N67 可诱导 3T3-L1 凋亡, 作用机制可能是通过抑制 ABHD6 表达, 证明 N67 有可能作为新的 ABHD6 抑制剂。

关键词 新型小分子化合物 N67; 前脂肪细胞 3T3-L1; 凋亡; ABHD6; 抑制剂

中图分类号 R 961

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0380-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.009

2018-11-05 接收

基金项目: 四川省教育厅自然科学基金(编号: 16ZB0124); 成都中医药大学自然科学基金(编号: ZRMS201232)

作者单位: 成都中医药大学基础医学院¹ 组胚教研室、² 方剂学教研室、³ 实验科研中心 成都 611137

作者简介: 易晓红, 女, 讲师, 硕士;

杨岚, 女, 教授, 博士, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lanyang72@163.com

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指患者在无过量饮酒史的条件下, 以肝细胞内脂肪过度沉积并超过 5%~10% 的肝重量为主要特征的临床病理综合征。如不及时治疗, 可演变为脂肪性肝炎、肝硬化、肝纤维化、甚至发展成肝细胞癌^[1]。全球流行病学调查表明, 我国非酒精性脂肪肝的发病率约为 15%^[2]。而上海地区的患病率更是高达 17.29%^[3]。NAFLD 不仅给患者带来沉重的疾病痛苦和经济压力, 而且为国家带来沉重的经济负担和人才损失。目前, 尚无推荐用于 NAFLD 常规治疗的药物, 只能通过改变不良生活方式^[4] 或服用胰岛素增敏剂、减肥药、调脂药、血管紧张素受体拮抗剂、抗氧化剂等防治糖代谢紊乱, 间接改善 NAFLD 病情^[5]。因而, 针对 NAFLD 新靶点创新药物的研究具有重要意义。研究^[6-7]表明, α -水解酶域包含蛋白 6(α / β -Hydrolase domain containing 6, ABHD6)在 NAFLD 的发生发展过程中扮演着重要角色, 是脂肪代谢的关键酶之一。研究^[8-9]显示在 NAFLD 患者中, ABHD6 的表达很高, ABHD6 可以水解几个脂质底物, 在甘油磷脂代谢和脂质信号转导的过程中起到重要作用。ABHD6 抑

Methods MDA-MB-231 3D tumor micro-tissue culture model based on Matrigel (3D-M) was constructed by drop overlap method in the low-adsorption U-bottom 96-well plate. The cell proliferation of tumor cells in 2D, 3D and 3D-M culture conditions and their sensitivities to commonly used drugs in clinical breast cancer treatment were detected by alamar blue assay. The cell uptake of epirubicin was measured by flow cytometry. **Results** MDA-MB-231 cells formed more tighter 3D spheroids with the addition of Matrigel, which could promote the proliferation of MDA-MB-231 cells. Cell cytotoxicity assays showed that cancer cells in the 3D-M model showed higher drug resistance compared to 2D and 3D cultures. The evaluation of cellular uptake showed that the positive cell rate and the median fluorescence intensity of endocytosis drugs in 3D spheroids were lower than those in 2D culture. After treatment with epirubicin for 30 minute, the percentage of 3D-M positive cells and the median fluorescence intensity were lower at 3D with 80% and 25%, respectively, with the treatment of epirubicin for 30 minutes. **Conclusion** The *in vitro* 3D cancer cell culture model promoted by Matrigel with breast cancer cells could form a tumor-like micro tissue, in which the permeability of drugs could be recude compared with 2D and 3D cultures. In this case, 3D-M model could more accurately reflect the reactivity of anticancer drugs and be a potential model for the assessment of anticancer drugs effect *in vitro*.

Key words Matrigel; tumor micro-tissue; three-dimensional culture; anti-cancer drug