



3D 细胞培养在阿尔茨海默病研究中的应用

康美美, 王 蓉*

(首都医科大学宣武医院中心实验室, 北京市老年病医疗研究中心, 北京脑重大疾病研究院阿尔茨海默病研究所, 神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053)

【摘要】 2D 细胞培养的细胞在体外环境下随着增生会逐渐丧失原来的性状; 动物模型实验繁琐, 价格昂贵; 而 3D 细胞培养模型可在一定程度上弥补动物模型和 2D 细胞模型的缺陷, 越来越受到大家重视。2014 年数据报道阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 65 岁以上人群发病率在 5.14%, 我国 AD 患者 2016 年已达 800 万, 但该病的发病机制尚未明确, 对 AD 的研究一直是热点及难点。本文将简单介绍 2D 细胞培养和 3D 细胞培养, 并对 3D 细胞培养近些年在 AD 研究方面的应用作一综述。

【关键词】 2D 细胞培养; 3D 细胞培养; 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 05-0012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.05.003

Application of three-dimensional cell culture in the study of Alzheimer's disease

KANG Meimei, WANG Rong*

(Department of Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University; Beijing Geriatric Medical Research Center; Center of Alzheimer's disease, Beijing Institute for Brain Disorders; Key Laboratory for Neurodegenerative Disease of Ministry of Education, Beijing 100053, China)

【Abstract】 Cells in two-dimensional (2D) cultures gradually lose their original traits as they are passaged *in vitro*. Existing animal models are expensive and animal experiments require too much work to conduct large-scale experiments. Three-dimensional (3D) cell culture models have attracted increasing attention as they can circumvent the limitations of these previous two models. In 2014, it was reported that the incidence of Alzheimer's disease (AD) in people over 65 years old was 5.14%. In China, the number of AD patients reached 8 million in 2016, but the pathogenesis of the disease is not yet clear. Study of AD is a 'hot' yet complicated issue. This article will briefly introduce 2D and 3D cell cultures and the application of 3D cell culture to AD research in recent years.

【Key words】 2D cell culture; 3D cell culture; Alzheimer's disease

近些年来, 由于传统 2D 细胞培养和动物模型的局限性, 3D 细胞培养技术区别于二者的优势逐渐得到各国研究学者的关注。在肿瘤和药物高通量

筛选方面 3D 细胞培养模型已经取得了初步的成果。但是在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的研究当中, 此项技术的应用才刚刚开始。本

【基金项目】 国家重点研发计划资助项目 (编号: 2016YFC1306300); 北京市医院管理局临床医学发展专项经费 (扬帆计划) (编号: ZYLX201706)。

【作者简介】 康美美 (1994—), 女, 硕士, 研究方向: 阿尔茨海默病。E-mail: 13701065914@163.com

【通信作者】 王蓉 (1963—), 女, 研究员, 教授, 研究方向: 神经元退行性变的发病机理、早期诊断及防治策略。E-mail: rong_wang72@aliyun.com

文希望通过介绍 3D 细胞培养近些年在 AD 方面的应用,给 AD 研究学者一些启发。

1 细胞培养

1.1 细胞培养简介

自从 1885 年德国学者 Willhelm Roux 从鸡胚中成功分离出细胞以来,组织细胞培养技术开始萌芽^[1];Harrison^[2]和 Carrel 等^[3]分别于 1907 年和 1912 年开始研究离体细胞培养方法,现代细胞培养技术诞生。经过一百多年的发展,细胞培养技术已经广泛应用于生物医学、组织工程、再生医学和工业实践当中。

细胞培养 (cell culture) 指的是从体内组织取出细胞,并为其提供一个无菌、具有适当温度及酸碱度的环境,给予充分营养,使其生长繁殖并维持其结构和功能的一种培养技术。从体内取出的细胞进行首次培养的过程称为原代培养 (primary culture);原代培养的细胞生长到一定程度,受环境影响,需要转移到另一个新的容器,称为传代培养 (subculture)。

1.2 传统 2D 细胞培养技术的优势与劣势

2D 细胞培养模型一直是细胞水平的体外研究的主要手段。2D 细胞培养是将离体的细胞粘附在塑料培养板或玻璃板上,在添加营养物质和细胞因子的培养基中单层培养。因 2D 细胞培养技术简洁及高效的特点,得到了生物学家和临床工作者的认同。

然而,2D 培养技术按时传代的要求限制了细胞的大规模培养;且因为平板附着的原因,细胞的形态、细胞内部骨架和核形状发生改变,进而反过来影响基因和蛋白质变化^[4]。其次,2D 培养技术的单层细胞结构,使得培养物有时不能准确再现动物的生理或病理过程^[5]。

2 三维细胞培养技术

2.1 3D 细胞培养

目前,在体研究主要依赖于构建动物模型,细胞水平则主要基于二维培养条件下的实验研究。然而,经历了 100 多年的变化之后,研究人员发现在体外进行二维培养的细胞会逐渐改变甚至丧失其原有的性状和形态,结构与功能等方面也与在体环境不同^[6];动物模型则因为耗时长、操作复杂以及价格昂贵等因素限制了大规模开展实验。由于二

维细胞培养模型和动物模型应用的局限性,以及其他类似组织工程的相关学科的发展,三维细胞培养技术 (three-dimensional cell culture, TDCC) 应运而生。

三维细胞培养不同于二维单层培养的核心是细胞与培养环境间相互作用,它指将三维结构不同材料的载体与不同种类细胞在体外进行共培养,使细胞在支架上进行空间立体型生长、分化和迁移,并形成具有一定组织特异性的三维复合结构^[7]。三维细胞培养较之二维细胞培养技术可通过改善胞间交流、作用力及构建各种营养因子浓度梯度更大程度地模拟体内环境,使细胞形成类似体内的组织结构,发挥其功能。此外,三维细胞培养还具有直观可控性特点,可以将简单的体外二维细胞培养技术与组织器官及生物体联系起来,在体内体外实验之间架起一座桥梁^[8]。3D 细胞培养在肿瘤^[9]和药物筛选^[10-11]方面已取得广泛应用,在神经退行性疾病方面,3D 细胞培养模型的优势也逐渐吸引了各国研究学者的关注。

2.2 3D 细胞培养技术支架材料

按照来源不同,可以将支架材料分为天然材料、合成材料及新型复合材料三大类^[12-13]。

天然材料指自然界生长或者形成的材料,大部分为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)^[14],主要包含蛋白、多糖和蛋白聚糖等物质,在细胞骨架、细胞形态、迁移、分化、增殖等各项生理功能生命活动中扮演重要作用。常见的天然材料有:胶原 (collagen)、透明质酸 (hyaluronic, HA)、纤维蛋白 (fibrin) 等。

合成材料包括人工高分子材料和人工合成无机材料两类。前者是以石油天然气等为原材料合成的高分子聚合物材料,常见的有聚乳酸 (poly lactic acid, PLA)、聚羟基乙酸 (poly glycolic acid, PGA) 以及它们之间的各种共聚物。人工合成无机材料则是指医用碳素材料、生物玻璃、陶瓷、合金等无机材料。合成材料降解产物为水和二氧化碳,毒性作用小且机械性能可控,是良好的 3D 支架材料。

天然支架材料和合成支架材料都广泛应用于 3D 细胞培养中,但是单一材料或多或少都存在缺陷以及局限性,研究者们又开发了新型复合材料。新型复合材料是将几种不同的材料通过物理或化学方法按照不同比例合成的新材料,可以彼此互补,扬长避短,使得细胞可以在最接近生物环境中增殖

分化。常见的天然材料复合的有胶原/纤维蛋白、丝素蛋白/壳聚糖、透明质酸/丝素蛋白等,天然材料与合成材料复合的有聚己内酯/壳聚糖、聚乳酸/丝素蛋白等。

3 3D 细胞培养在阿尔茨海默病中的应用

阿尔茨海默病(AD)又称老年性痴呆,是一种常见的中枢神经系统退行性疾病。该病起病隐匿,呈渐进性发展,主要临床表现为记忆减退、认知能力下降,以及其他神经精神症状及行为障碍,最终导致生活不能自理^[15-17]。据文献报道,65 岁以上人群 AD 发病率为 5.14% 左右^[18]。我国自 20 世纪 80 年代进入“人口老龄化社会”,到 2025 年老年人口将达到 2.8 亿。2016 年文献估计,我国 AD 患者人数已达 800 万^[19],到 20 世纪中叶,AD 患者将接近 2000 万^[20]。AD 已经严重威胁人类健康,给患者、家庭以及社会都带来了沉重的负担。但是该病发病机制尚未明确,又缺乏长期有效的治疗措施,使得 AD 的研究一直是全球学者研究的热点与难点。

AD 发病机制两大假说分别为“ β -淀粉样肽(amyloid β -protein, A β) 异常沉积”、“tau 蛋白过度磷酸化”两大假说^[21-24]。前者认为,位于人体第 21 条染色体上的 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP) 基因,正常情况下, A β 生成与降解平衡。当 APP 基因突变或某些原因导致 APP 代谢异常时,它被体内的 β 和 γ 分泌酶切割, A β 生成增多,或者降解减少,造成 A β 大量沉积,形成老年斑(senile plaques, SPs)。寡聚肽的 A β 具有神经毒性,可以引发复杂的级联反应,最终导致神经元的死亡。而“tau 蛋白假说”则认为,正常情况下体内 tau 蛋白磷酸化和去磷酸化处于动态平衡,当 tau 蛋白磷酸化速度大于去磷酸化速度时,体内 tau 蛋白含量增加,进而导致疾病的发生。有文献报道,AD 发病过程中,存在 A β 在其毒性基础上演变成 tau 蛋白的过度磷酸化以及神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)的级联反应^[25]。笔者将就阿尔茨海默病在普通 2D 细胞培养模型下无法凸显,但在 3D 细胞培养模型中表现出的优势做简单介绍。

3.1 促进细胞分化

大脑的神秘之处就在于其复杂的神经网络,单一研究某种特定细胞而不考虑各种分化细胞间的相互影响是很片面的。运用 3D 细胞培养技术,形

成复杂的神经网络,可能会给阿尔茨海默病的研究带来新的机会。Puschmann 等^[26] 报告了一种新型电纺丝聚氨酯纳米纤维 3D 细胞培养模型,可以用于神经网络的体外支持,供神经元在各个方向生长,进而形成比其他培养体系更复杂的神经网络; Park 等^[27] 建立了一种基于 3D 培养的微流控芯片的体外脑模型,不但形成了更加接近在体状态的神经网络,并且与静态条件相比, A β 处理后的神经球蛋白生存能力显著下降,神经网络破坏也明显。

3.2 再现 2D 培养模型中无法出现的病理过程

AD 最显著的两大病理特征即为 A β 沉积形成的老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结,两者之间是否存在关系,这其中又涉及了哪些信号通路,一直都是研究人员关注的热点问题。Zhang 等^[28] 发现只有在 3D 培养条件下,才可以观察到神经细胞在 A β 寡聚体诱导下,磷酸化的 p21 激活激酶(pPAK)等其他相关蛋白再分配的病理变化,该过程在传统的 2D 细胞培养中是观察不到的; Choi 等^[29-33] 利用 ReNcell VM 细胞系(ReN 细胞)表达 APP、PSEN1 突变,产生 FAD ReN 细胞系,再通过 3D 细胞培养方法,得到一个可以加速神经元细胞分化并形成神经网络的细胞模型,成功再现了 A β 积聚并驱动 tau 蛋白胞外聚集的病理过程; Labour 等^[34] 开发了一个 3D 隔室细胞培养模型,当 A β 聚集体被仿生胶原基质隔开的时候,聚集体对细胞并无毒性,但是当基质孔隙被打开,聚集体与分化的大鼠嗜铬细胞瘤细胞系(PC12)细胞接触,显示细胞毒性,诱导神经退行性过程,作者也进一步指出,该模型可用于研究神经突触聚集体诱导神经元死亡或神经突营养不良的信号通路,探究 AD 发病的分子机制。

4 结论及展望

3D 细胞培养模型作为一个强有力的体外模型,自诞生之日起就不断取得了很多人欣慰的成就,尤其在肿瘤及高通量药物筛选方面。但不可否认的是,目前的 3D 细胞培养技术仍有待提高。越来越多科研人员正在将 3D 细胞培养模型运用到 AD 的研究中,并取得初步成果。如何更好地发挥这项技术的优势并应用到其他神经退行性疾病当中去,仍然需要生命科学、材料科学、组织工程学等各学科的专家协作努力。

参考文献:

[1] Heams T. Selection within organisms in the nineteenth century;

- Wilhelm Roux's complex legacy [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2012, 110(1): 24–33.
- [2] Harrison RG. Embryonic transplantation and development of the nervous system [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 1908, 2(9): 385–410.
- [3] Carrel A, Ingebrigtsen R. The production of antibodies by tissues living outside of the organism [J]. *J Exp Med*, 1912, 15(3): 287–291.
- [4] Mckee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 159: 62–77.
- [5] Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 695: 1–15.
- [6] Verloes R, Kanarek L. Tumour microenvironment studies open new perspectives for immunotherapy [J]. *Arch Int Physiol Biochim*, 1976, 84(2): 420–422.
- [7] 胡康洪, 姚颖. 三维细胞培养技术的研究与应用 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5(2): 185–188.
- [8] Yang L, Yang Y, Wang S, et al. *In vitro* mechanical loading models for periodontal ligament cells: from two-dimensional to three-dimensional models [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(3): 416–424.
- [9] 赵典典, 侯玲玲, 张婧思, 等. 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 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(8): 1140–1150.
- [10] Smalley KS, Lioni M, Noma K, et al. Three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2008, 3(1): 1–10.
- [11] Brajša K. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery [J]. *Period Biol*, 2016, 118(1): 59–65.
- [12] Astashkina A, Grainger DW. Critical analysis of 3-D organoid *in vitro* cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 69–70: 1–18.
- [13] 徐竹, 诸葛启钊, 黄李洁, 等. 干细胞 3D 支架的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(9): 112–117.
- [14] Diekjürgen D, Grainger DW. Polysaccharide matrices used in 3D *in vitro* cell culture systems [J]. *Biomaterials*, 2017, 141: 96–115.
- [15] Albert MS, Dekosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 270–279.
- [16] Boeve BF. Mild cognitive impairment associated with underlying Alzheimer's disease versus Lewy body disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, 18(Suppl 1): S41–S44.
- [17] 金贺, 王蓉. 阿尔茨海默病: 自噬与 β 淀粉样肽关系的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(8): 68–71.
- [18] Jia J, Wang F, Wei C, et al. The prevalence of dementia in urban and rural areas of China [J]. *Alzheimers & Dement*, 2013, 10(1): 1–9.
- [19] Jia J, Zuo X, Jia XF, et al. Diagnosis and treatment of dementia in neurology outpatient departments of general hospitals in China [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(4): 446–453.
- [20] 李巍巍, 张翔. 中国阿尔茨海默病诊治任重道远 [J]. *解放军医药杂志*, 2014, 26(2): 117.
- [21] Harris SA, Harris EA. Molecular mechanisms for herpes simplex virus type 1 pathogenesis in Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 48.
- [22] 张静爽, 王蓉. 阿尔茨海默病发生机制的研究进展 [J]. *首都医科大学学报*, 2014, 35(6): 721–724.
- [23] Rajmohan R, Reddy PH. Amyloid beta and phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of Alzheimer's disease neurons [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 975–999.
- [24] Iqbal K, Liu F, Gong CX, et al. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2010, 7(8): 656–664.
- [25] Hussain I, Powell DJ, Howlett DR, et al. ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the β -secretase site [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2000, 16(5): 609–619.
- [26] Puschmann TB, De PY, Zandén C, et al. A novel method for three-dimensional culture of central nervous system neurons [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(6): 485–492.
- [27] Park J, Lee BK, Jeong GS, et al. Three-dimensional brain-on-a-chip with an interstitial level of flow and its application as an *in vitro* model of Alzheimer's disease [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(1): 141–150.
- [28] Zhang D, Pekkanen-Mattila M, Shahsavani M, et al. A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of p21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1420–1428.
- [29] Choi SH, Kim YH, Quinti L, et al. 3D culture models of Alzheimer's disease: a road map to a "cure-in-a-dish" [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 75.
- [30] Choi SH, Kim YH, Hebisch M, et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 274–278.
- [31] D'Avanzo C, Aronson J, Kim YH, et al. Alzheimer's in 3D culture: challenges and perspectives [J]. *Bioessays*, 2015, 37(10): 1139–1148.
- [32] Kim YH, Choi SH, D'Avanzo C, et al. A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(7): 985–1006.
- [33] Choi SH, Kim YH, D'Avanzo C, et al. Recapitulating amyloid β and tau pathology in human neural cell culture models; clinical implications [J]. *US Neurol*, 2015, 11(2): 102–105.
- [34] Labour MN, Vigier S, Lerner D, et al. 3D compartmented model to study the neurite-related toxicity of A β aggregates included in collagen gels of adaptable porosity [J]. *Acta Biomater*, 2016, 37: 38–49.