

## 转移性人肝癌类组织体模型的建立\*

唐建华\*\* 崔杰峰\*\* 刘银坤\*\*\*

(复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032)

**摘要** 为了探讨三维培养状态下人肝癌细胞的生物学特征和转移潜能, 利用旋转壁式生物反应器(rotating wall vessel, RWV)结合生物支架材料, 将高转移性人肝癌细胞(MHCC97H)成功地构建一种新的转移性人肝癌类组织体模型, 针对肝癌细胞的临床病理特征, 一系列体外和体内实验包括组织形态、显微结构、蛋白质产生和分泌、葡萄糖代谢、组织特征基因表达、细胞的生长和凋亡, 以及在裸鼠中的成瘤性和转移性等对模型进行检测评估, 结果均显示, 该模型能较好地模拟转移性人肝癌组织的病理特征, 且优于单层培养的人肝癌细胞, 该模型可能对肝癌转移分子机制探讨、抗癌药物筛选以及肝癌动物模型建立产生积极的推动, 同时也表明肝细胞癌(HCC)细胞的立体形态结构对维持肝癌细胞生物学功能十分重要。

**关键词** 肝细胞癌, 转移, 模型, 旋转壁式生物反应器

**学科分类号** R73, Q81

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2010.00052

肝细胞癌(HCC)是第六种最常见的恶性肿瘤, 是死亡率位居第三的癌症, 每年有将近 600 000 人死于 HCC<sup>[1-2]</sup>。目前已有大量基于肝癌细胞平面培养的 HCC 研究报道<sup>[3-4]</sup>, 这些研究多采用贴壁平面培养方法, 然而平面培养的细胞存在缺乏组织样结构、细胞间相互作用、细胞与基质相互作用等一些局限性<sup>[5-6]</sup>, 还有可能丢失或者改变癌症组织状态下细胞的部分重要生物学特征<sup>[7-9]</sup>。三维培养技术能较好地克服上述平面培养中遇到的问题, 较理想地模拟肿瘤组织的结构和功能, 在体外癌症机制研究中有良好的应用。美国国家航空航天局发明的旋转壁式反应器(RWV)作为新型三维培养系统, 在维持细胞间相互作用和组织样结构形成方面具有明显优势, 在肿瘤细胞生物学研究中逐渐获得应用<sup>[10-11]</sup>, 但在三维培养状态下肝癌细胞转移分子机制研究目前尚未见报道。

高转移性人肝癌细胞 MHCC97H 是复旦大学附属中山医院肝癌研究所建立的用于 HCC 转移机制研究的细胞模型, 在过去 8 年中, 该细胞模型不仅促进了 HCC 转移关联基因和蛋白质的发现, 也为研究微环境对 HCC 侵袭的影响以及 HCC 转移的干预提供了有利的工具<sup>[3-4]</sup>。然而由于单层平面

培养细胞生物学功能的局限, 迫切需要建立三维体外类组织模型来弥补二维细胞模型的不足, 为较全面阐明 HCC 转移机制提供理想研究平台。本研究使用乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)支架和旋转壁式生物反应器(RWV), 在三维培养环境中将 MHCC97H 细胞成功地构建成一个转移性 HCC 类组织体模型, 并对三维状态下肝癌细胞的生物学功能进行探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 PLGA 支架的准备和应用

PLGA 支架(Synthecon, Houston, TX, USA) 75%乙醇过夜灭菌, PBS 洗 3 次在三维培养时放入 4 mm × 4 mm × 1 mm 的 PLGA 支架于 RWV 生物反应器。

\* 国家自然科学基金(30772062)和上海市浦江人才计划(A类, 08PJ1403000)资助项目。

\*\* 共同第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。

Tel: 021-64041990-2501, E-mail: liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

收稿日期: 2010-01-26, 接受日期: 2010-04-19

## 1.2 MHCC97H 细胞的平面培养

MHCC97H 细胞由复旦大学附属中山医院肝癌研究所建立, 使用含有 10%胎牛血清和 1%青霉素 - 链霉素(100 U/ml 和 100 U/ml, GIBCO, USA) 的 DMEM/F12(GIBCO, USA)培养基培养。

## 1.3 MHCC97H 类组织体的形成

将  $1 \times 10^7$  个 MHCC97H 细胞悬液接种于 RWV 反应器(Synthecon, Houston, TX, USA)中, 同时放入 PLGA 支架, 以 7~8 r/min 旋转 5 min, 静止 5 min, 重复 3 次, 然后以 7~8 r/min 旋转 18 h. 接下来调整速度使得细胞团能自由悬浮, 每 36 h 换液一次. 收集不同培养时段(5 天, 10 天, 15 天)的培养细胞团块, 并保存于 -80℃ 待用。

## 1.4 免疫化学染色样品以及电镜样品的制备

在 10%甲醛中固定 HCC 类组织体 10 h, 石蜡包埋并切成 5  $\mu$ m 薄片. 接下来用二甲苯脱蜡并用浓度梯度乙醇水化, 切片进行 HE 染色。

HCC 类组织体在含 2.5%戊二醛和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)中浸泡, 在磷酸缓冲液中洗涤过夜, 再用 1%锇酸固定 1 h. 样品包埋于 618# 树脂, 超薄切片(LKB-1, Leica, Sweden)切割成超薄切片. 切片用醋酸铀和枸橼酸铅染色, 透射电镜(CM-120, FEI, USA)分析超微结构。

## 1.5 HCC 类组织体形成不同时段葡萄糖、乳酸脱氢酶、白蛋白、 $\gamma$ -谷氨酸和甲胎蛋白浓度的检测

收集 HCC 类组织体形成不同时段(5 天, 10 天, 15 天)的培养上清(收集前 24 h 换液), 超滤管(3000MW, Millipore)超滤, 依次用酶比色法检测葡萄糖和乳酸脱氢酶(LDH), 溴甲酚绿染料结合法检测白蛋白(ALB), 紫外分光光度法检测  $\gamma$ -谷氨酸( $\gamma$ -GT), 双抗体酶联免疫夹心法检测甲胎蛋白(AFP)。

## 1.6 HCC 类组织体形成过程中 HCC 特异基因和转移相关基因表达检测(RT-PCR 和免疫组化)

用 Trizol (Invitrogen 公司, USA) 试剂抽提 MHCC97H 平面培养细胞和培养不同时段的类组织体细胞 RNA, 用逆转录试剂盒(Fermentas, Japan) 进行逆转录反应, 进行 AFP、ALB、ICAM1、E-Cadherin、CD29、CD44、MMP-9、MMP-2、GAPDH 的 PCR 分析. 引物序列见表 1. 所有 PCR 反应由 PCR 仪 (GeneAmp PCR System 9700 thermocycler, Applied Biosystems, Inc. Foster, CA) 完成。

Table 1 Primers of RT-PCR

AFP	F 5' ATG CGT TTC TCG TTG CTT AC 3'; R 5' CAG GGT TTA CTG GAG TCA TTT C 3';
ALB	F 5' TGA TTG CCT TTG CTC AGT ATC TT 3'; R 5' AGC AGT CAG CCA TTT CAC CAT 3';
ICAM1	F 5' CAG TGA CCA TCT ACA GCT TTC CGG 3'; R 5' GCT GCT ACC ACA GTG ATG ATG ACA A 3';
E-Cadherin	F 5' CGA CCC AAC CCA AGA ATC TA 3'; R 5' AAT GGC AGG AAT TTG CAA TC 3';
CD29	F 5' TAT CCC ATT GAC CTC TAC TAC CT 3'; R 5' CCA TCT CCA GCA AAG TGA AAC 3';
CD44	F 5' CGT GAT GGC ACC CGC TAT GT 3'; R 5' CAG GGA TTC TGT CTG TGC TGT CG 3';
MMP-9	F 5' CAC CTT CAC CCG CGT GTA C 3'; R 5' TGC TCC GCG ACA CCA AA 3';
MMP-2	F 5' GGC CCT GTC ACT CCT GAG AT 3'; R 5' GGC ATC CAG GTT ATC GGG GA 3';
GAPDH	F 5' AAT CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG 3'; R 5' GCA TTG CTG ATG ATC TTG AGG CTG 3'

切片经二甲苯脱蜡并用浓度梯度乙醇水化, 3%过氧化氢甲醇溶液浸泡, 然后浸泡于沸腾的 10 mmol/L 枸橼酸钠溶液 10 min. 5%山羊血清孵育 20 min, 用一抗单克隆抗体[鼠抗 AFP (原液, AbD Serotec, UK); 兔抗 ICAM1 (1 : 50, Epitomics, USA); 兔抗 CD29 (1 : 250, Epitomics, USA); 鼠抗 CK7 (1 : 100, DAKO, Denmark); 鼠抗 CK8 (1 : 100, DAKO, Denmark); 鼠抗 CK19 (1 : 100, DAKO, Denmark); 兔抗 MMP9 (1 : 100, CST, USA)] 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 生物素化二抗孵育 30 min, SABC 孵育 1 min, DAB 显色(Boster 公司, 中国)后, 用苏木精染色。

## 1.7 流式细胞技术分析细胞周期和细胞凋亡

用胰酶消化细胞并用 PBS 洗涤, 悬浮于柠檬酸缓冲液, 固定 30 min 后, 用胰酶消化液处理, 再用胰酶抑制剂缓冲液终止, 样品经碘化丙锭染色 15 min 后, 用 53  $\mu$ m 尼龙滤膜过滤, 进行流式细胞分析。

## 1.8 裸鼠肝脏接种类组织体观察成瘤性和转移能力

以下动物实验过程经上海医学实验动物保护协会许可. 麻醉雄性 5 周 BALB/C-nu/nu 裸鼠(上海斯莱克公司), 然后将左腹剪开, 暴露肝左叶, 用剪刀挑开肝表面一小部分, 接种旋转 15 天形成的类

组织体, 将肝放回原处, 用缝合线缝合腹腔, 接种后, 用手触摸肝脏以观察肿瘤的形成情况, 当肿瘤长到 12~15 mm 时, 处死裸鼠并进行解剖, 取出形成的肿瘤和相应的肺组织进行组化和免疫组化分析.

## 2 结 果

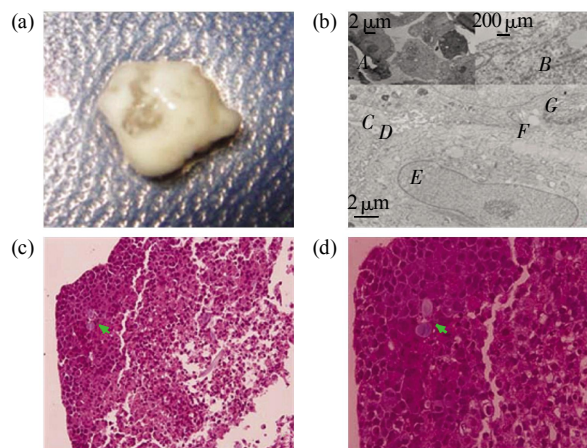
### 2.1 类组织体的形态特征

在三维培养过程中, MHCC97H 细胞首先围绕 PLGA 支架形成了较大且松散的细胞团块, 在转速为 18 r/min 的培养过程中逐渐变得紧密, 细胞团变小, 15 天旋转培养后就形成了直径约 0.8~1 cm 的表面光滑的类组织体团块(图 1a). 组化结果显示了团块外层增殖活跃的肿瘤细胞和中心较小的未增殖肿瘤细胞以及少量坏死细胞(图 1b), 这与实体瘤的临床病理形态很相似<sup>[12]</sup>. 另外还看到类似实体肿瘤细胞的核多形性、明显的核仁、增加的有丝分裂活性等特征. 电镜观察结果显示, 类组织体细胞呈数层多面体形(图 1c), 细胞表面有丰富的微绒毛结构, 在细胞交界处存在典型的组织中才存在的桥粒连接和紧密连接, 肿瘤细胞核膜正常但是细胞核比较大, 细胞质中存在丰富的线粒体和内质网, 另外一个显著的组织特征是在细胞间隙存在细胞基质. 以上特征说明类组织体呈现了在平面培养细胞中看不到的类组织性质.

### 2.2 类组织体形成的不同时间点葡萄糖、LDH、ALB、 $\gamma$ -GT 和 AFP 的水平

临床上葡萄糖、LDH、ALB、 $\gamma$ -GT 和 AFP 常用来评价肝组织功能. 与平面培养细胞相比, 类组织体形成过程中葡萄糖消耗下降, LDH 分泌增加, 显示在类组织体形成过程中葡萄糖分解增强而葡萄糖氧化受到了抑制. 类组织体形成过程中,  $\gamma$ -GT

和 AFP 的分泌也明显高于平面培养细胞. 这些结果(表 2)显示类组织体获得了 HCC 特征性酶(蛋白)产生和分泌的能力, 并且结果同 HCC 病人血清病理特征一致<sup>[13-15]</sup>.



**Fig. 1 Macroscopic and histological and ultrastructural characteristics of the tissue-like HCC spheroid on day15**

(a) Macroscopic morphology of the whole tissue-like spheroid with a diameter of 0.8~1.0 cm. (b) Ultra structure analysis of tissue-like HCC spheroid on day15 by transmission electron microscope. A: PLGA scaffold; B: Rough-surfaced endoplasmic reticulum; C: Cellular matrix; D: Microvillus; E: Nucleus; F: Desmosome junction and tight junction; G: Mitochondrion. (c) Histological analysis of tissue-like HCC spheroid dyed by HE staining (x200) exhibited a spherical geometry with a concentric arrangement of large proliferating tumor cells in the periphery and smaller non-proliferating cells in deeper regions, as well as some cells necrosis in central section. Arrow indicates PLGA scaffold. (d) Some cytological features of tumor cells such as nuclear pleomorphism, prominent nucleoli, increased mitotic activity, etc were also observed in tumor cells of this tissue-like HCC spheroid (x400). Arrow indicates PLGA scaffold.

**Table 2 Level of glucose, LDH, ALB,  $\gamma$ -GT and AFP in culture supernatant at different time points of the development of tissue-like HCC spheroid**

Culture mode	Glucose(mmol/10 <sup>7</sup> cells)	LDH(U/10 <sup>7</sup> cells)	ALB(g/10 <sup>7</sup> cells)	$\gamma$ -GT (U/10 <sup>7</sup> cells)	AFP(ng/10 <sup>7</sup> cells)
Monolayer culture	9.31 ± 0.69	437.95 ± 32.60	12.83 ± 0.95	5.70 ± 0.42	0
RCCS culture on day5	15.11 ± 0.81	1343.30 ± 179.52	14.35 ± 1.07	9.05 ± 1.34	0
RCCS culture on day10	14.83 ± 0.10	771.30 ± 47.00	15.44 ± 0.83	14.40 ± 1.27	0
RCCS culture on day15	13.24 ± 0.72	1560.85 ± 116.18	31.73 ± 2.36	28.50 ± 2.12	2.00 ± 0.15

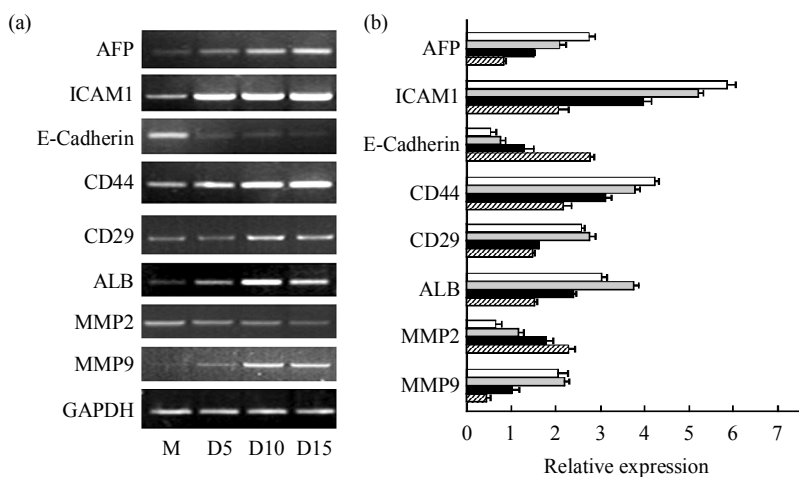
### 2.3 类组织体形成过程中 HCC 特征基因和转移相关基因的表达特征

基于 HCC 临床病理和三维组织结构特征,

分别对 15 天类组织体 HCC 特征基因(AFP, ALB)、黏附分子基因(ICAM1, CD29)以及转移相关基因(CD44, E-cadherin, MMP9, MMP2)的检测发现, 三

维培养的不同时段尤其是第 15 天, 这些基因的表达明显不同于平面培养细胞(图 2), ICAM1 和 CD29 的上调表达说明类组织体呈现了明显的细胞相互作用和连接的组织特征. 白蛋白和 AFP 的表达增加和上述培养上清中的结果一致, 说明类组织体部分具有了肝脏和肝癌组织的特征. 肝癌转移相

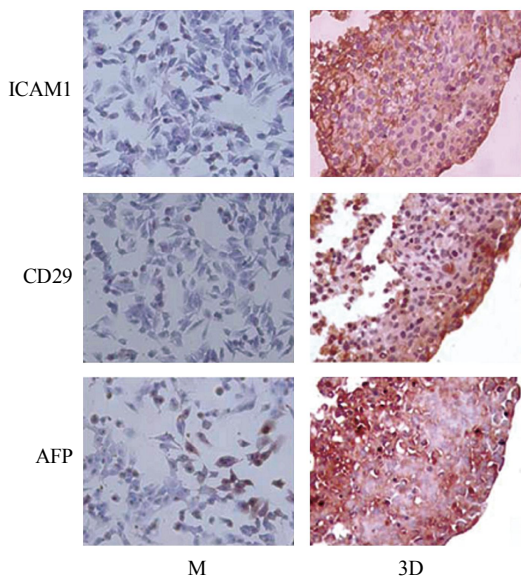
关基因 CD44, MMP9, ICAM1, CD29 表达增加和 E- 钙黏素的表达降低同临床转移性 HCC 特征相似. 这些结果显示该模型不仅是 HCC 模型也和肝癌转移相关. MMP2 的表达相对平面培养细胞明显下降, 这与一些临床肝癌研究的结果不同<sup>[6]</sup>.



**Fig. 2 Time course of the expression of HCC specific genes and metastasis associated genes during the development of tissue-like HCC spheroid model**

(a) mRNA Level of HCC specific genes and metastasis associated genes in MHCC97H and HCC spheroid on day 5, day10 and day15 (RT-PCR). M: Monolayer cells MHCC97H; D5: HCC spheroid on day5; D10: HCC spheroid on day10; D15: HCC spheroid on day15. (b) The relative mRNA expression of HCC specific genes and metastasis associated genes at different time points of 3D culture normalized by the reference gene GAPDH. □: 3D culture on day15; ▤: 3D culture on day10; ■: 3D culture on day5; ▨: Monolayer culture.

免疫组织化学方法对 ICAM1、CD29 和 AFP 在类组织体中的表达进行进一步验证(图 3), 结果



**Fig. 3 Distribution and expression of ICAM1, CD29 and AFP in monolayer cells MHCC97H and HCC spheroid on day15**

M refer to MHCC97H cells, 3D refer to HCC spheroid on day15. (x200).

显示这些蛋白质相对平面培养细胞具有强表达, 这些蛋白质表达的模式与上述基因表达的模式一致. ICAM1 和 CD29 的深染区主要位于细胞和细胞相连接的区域, AFP 的表达主要分布于细胞质和细胞外.

**2.4 平面培养 MHCC97H 细胞和类组织体细胞周期和凋亡的比较分析**

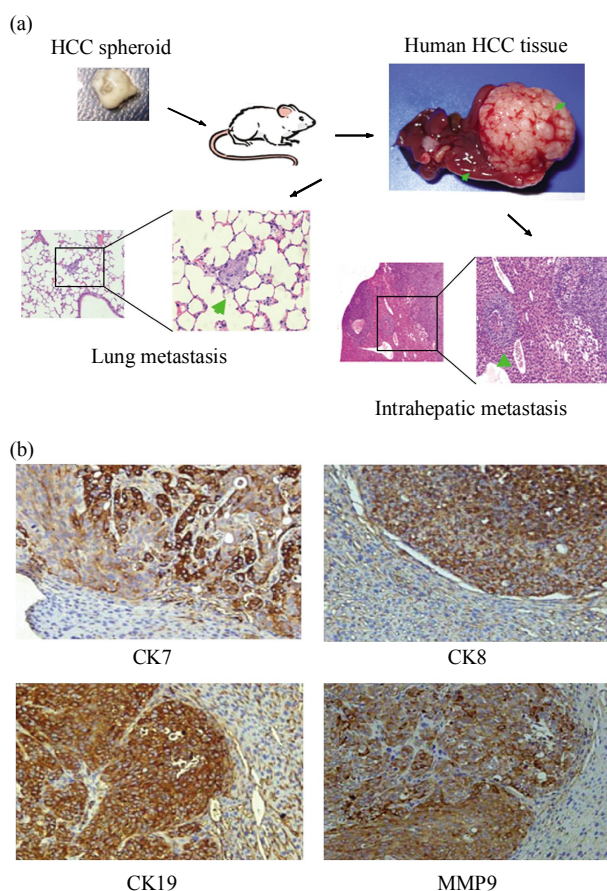
流式细胞仪分析细胞周期的结果显示, 在类组织体和平面培养细胞中, S 期、G0-G1 期和 G2-M 期细胞分别为 21.14%/25.18%、73.46%/63.04% 和 5.40%/11.77%, 细胞凋亡指数为 9.06/0.76, 类组织体中较低的 S 和 G2-M 期细胞说明其中的细胞生长和增殖不活跃.

**2.5 肝脏原位种植类组织体后成瘤性和转移能力的证实**

在肝脏原位种植类组织体 2 周后, 查体可触及到实体肿块, 当瘤块生长至直径约 12 到 15 mm 时, 猝死裸鼠, 取出肿瘤及肺组织, 肿瘤的组织结构呈现典型的 HCC 病理组织特征, 主要表现为多核性、细胞核深染、明显的核仁、细胞体积大以及

含少量间充质的网状结构(图 4), 所有待测裸鼠肝脏都形成了肿瘤, 且肿瘤具有恶性实体瘤典型病理形态特征.

HCC 转移相关蛋白 CK7, CK8, CK19 和 MMP9 在再生瘤中具有高表达, 证明再生瘤具有高转移潜能. 在主要肿瘤周边分布有次级肿瘤, 说明存在肝内播散; 在所有待测裸鼠的肺组织连续切片病理分析中, 均发现有癌细胞转移(图 4), 说明发生了肝癌肺转移. 上述结果证实类组织体具有肝内播散和远端转移的能力.



**Fig. 4 Identification of the tumorigenicity and metastasis of a tissue-like HCC spheroid in the nude mouse by intrahepatic inoculation (HE stain and immunohistochemistry)**

(a) Experimental outline of the tumorigenicity and metastasis of a tissue-like HCC spheroid in the nude mouse by intrahepatic inoculation. The secondary tumor nodules were found around primary tumor in liver (HE stain, green arrow indicates intrahepatic metastasis,  $\times 400$ ). The tumor cells of metastatic lesions in lung confirmed distant metastasis of HCC (HE stain, green arrow indicates lung metastasis,  $\times 400$ ). (b) The expression state of HCC metastasis associated proteins CK7, CK8, CK19 and MMP9 in the reascent tumor by immunohistochemistry.

### 3 讨 论

目前, 肝脏再生和肝细胞生物学研究领域只有少量的人肝细胞类组织模型报道, 第一个体外肝类组织模型由 Yoffe 等<sup>[17]</sup>使用原代肝细胞建立, 部分再现了肝组织功能. Miyazawa 等<sup>[18]</sup>发现在旋转生物反应器中培养的肝细胞能够聚集并产生一些类似肝组织的功能. 最近, 分别使用聚乙醇酸(PGA)和不使用 PGA 的两种 HCC 组织体在 RWV 生物反应器中的培养也显示了部分肝脏特有的功能<sup>[7, 19]</sup>, 但这两项研究均未对建立的 HCC 类组织体的成瘤性及转移性进行评估, 而肝癌细胞的成瘤和转移是临床上 HCC 最重要的病理特征. 本研究建立的 HCC 转移性类组织体模型, 针对临床肝癌主要病理特征, 经过较完整的系列体内和体外实验验证包括糖代谢、特征酶/特征蛋白合成及分泌、转移相关基因表达、细胞增殖和凋亡、裸鼠肝脏原位成瘤性及转移性, 能够较好地再现转移性人肝癌组织的病理特征.

已有的研究表明, 细胞形态的改变会影响其组织相关特异性基因的表达, 并进一步导致细胞分泌、黏附、运动、侵袭和转移性质的改变<sup>[20, 21]</sup>, 细胞的特定形态和细胞间结构对维持其癌细胞生物学性质和相应肿瘤组织特征均起到重要作用<sup>[7, 22]</sup>, 因此, 是否能够重现类似组织的细胞形态结构和组织特征成为组织模型建立的重要标准之一. 已有的细胞三维培养研究显示, 流体剪切力、支架材料以及细胞基质类似物等均对体外培养细胞立体结构的形成及维持起关键作用<sup>[5, 23]</sup>, 在本研究应用的 PLGA 支架和 RWV 生物反应系统具备了微重力和低流速, 及 PLGA 生物支架维持的特点, 易于再现组织样结构的生长环境. 在该培养环境中, 经过 15 天的旋转培养, 高转移人肝癌细胞 MHCC97H 被成功地构建成 HCC 类组织体.

类组织体超微形态结构观察到细胞紧密连接和胞间基质, 提示类组织体具有典型的组织样特征; 细胞黏附分子 ICAM1 和 CD29 在平面培养细胞中的表达较低且没有位置分布的特异性, 而在类组织体细胞间连接的区域深染, 说明类组织体中细胞和细胞的相互作用增强, 与组织中的情况相似. 类组织体中周边增殖旺盛的肿瘤细胞及类组织体中央区域存在少量凋亡、坏死细胞的组化结果(图 1), 说明在类组织球形体中央区域存在营养缺失和缺氧,

易导致肿瘤细胞坏死和凋亡, 这与临床实体瘤的组织结构特征十分相符。

与平面培养细胞 MHCC97H 相比, 类组织体的培养上清 ALB、AFP 和  $\gamma$ -GT 含量较高, 显示类组织体部分获得了 HCC 特征蛋白产生及分泌能力, ALB 和 AFP 基因表达的变化也证实了这一结论, 与临床 HCC 患者血清的改变相类似。

与平面培养的 MHCC97H 比较, 类组织体中肝癌转移性关联基因 CD44, MMP9, ICAM1, CD29 表达增加和 E-钙黏素表达减少, 与临床转移性 HCC 病理特征相似<sup>[24-28]</sup>, 说明该类组织体具有转移潜能。然而 MMP2 基因表达在类组织体中明显降低, 与一些临床 HCC 肿瘤研究结果相反<sup>[16]</sup>, 但是 Arai 等<sup>[29]</sup>的研究也发现, 在部分肝癌组织标本中, MMP2 的表达低于非肿瘤组织中的表达, 癌和非癌组织的表达差异区别不明显, 似乎只有 MMP9 的表达同 HCC 的侵袭和转移密切相关, 而 MMP2 在其中扮演的角色则需要进一步的研究。

类组织体原位接种裸鼠肝脏的成瘤转移实验结果表明, 形成的类组织体具有转移潜能, 能在肝内播散, 并转移到远端, 这与 HCC 转移主要发生在肝内, 远端转移主要是肺的临床特征一致。再生瘤的组织病理特征同已经报道过的裸鼠移植瘤特征相似<sup>[29]</sup>, 而肝癌转移相关基因 CK7, CK8, CK19 和 MMP9 表达呈阳性, 进一步证实了该模型是转移性肝癌模型。就目前所知, 本研究报道的转移性肝癌类组织模型, 为首次在体外构建成功的模拟转移性肝癌组织病理特征的体外类组织模型, 并具有良好的成瘤和转移特征。

综上所述, 肿瘤细胞三维形态结构对肿瘤生物学功能的维持具有重要作用, 在三维培养环境中建立的肝癌类组织体模型可较好地模拟体内肝癌实体组织的病理特征, 有望成为体外研究 HCC 分子机制的有利工具, 同时在抗癌药物筛选和动物模型建立方面具有潜在的价值。

### 参 考 文 献

- [1] Santamaría E, Muñoz J, Fernández-Irigoyen J, *et al.* Toward the discovery of new biomarkers of hepatocellular carcinoma by proteomics. *Liver Int*, 2007, **27**(2): 163-173
- [2] Aravalli R N, Steer C J, Cressman E N. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, **48**(6): 2047-2063
- [3] Cui J F, Liu Y K, Zhang L J, *et al.* Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis *in vitro*. *Proteomics*, 2006, **6**(22): 5953-5961
- [4] Tian B, Li Y, Ji X N, *et al.* Basement membrane proteins play an active role in the invasive process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, **131**(2): 80-86
- [5] Kim J B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*, 2005, **15**(5): 365-377
- [6] Wang R, Xu J, Juliette L, *et al.* Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Semin Cancer Biol*, 2005, **15**(5): 353-364
- [7] Chang T T, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A*, 2009, **15**(5): 559-567
- [8] Grun B, Benjamin E, Sinclair J, *et al.* Three-dimensional *in vitro* cell biology models of ovarian and endometrial cancer. *Cell Prolif*, 2009, **42**(2): 219-228
- [9] Pampaloni F, Reynaud E G, Stelzer E H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(10): 839-845
- [10] Unsworth B R, Lelkes P I. Growing tissues in microgravity. *Nat Med*, 1998, **4**(8): 901-907
- [11] Navran S. The application of low shear modeled microgravity to 3-D cell biology and tissue engineering. *Biotechnol Annu Rev*, 2008, **14**: 275-296
- [12] Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1987, **113**(2): 101-122
- [13] Lopez J B, Balasegaram M, Thambyrajah V, *et al.* The value of liver function tests in hepatocellular carcinoma. *Malays J Pathol*, 1996, **18**(2): 95-99
- [14] Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, *et al.* Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996, **23**(5): 1093-1097
- [15] Weber G. Enzymology of cancer cells (second of two parts). *N Engl J Med*, 1977, **296**(10): 541-551
- [16] Tang Z Y, Ye S L, Liu Y K, *et al.* A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, **130**(4): 187-196
- [17] Yoffe B, Darlington G J, Soriano H E, *et al.* Cultures of human liver cells in simulated microgravity environment. *Adv Space Res*, 1999, **24**(6): 829-836
- [18] Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, *et al.* Effect of mechanical stress imposition on co-culture of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells: possibility of stimulating production of regenerating factor. *Transplant Proc*, 2005, **37**(5): 2398-2401
- [19] 徐大勇, 汪 蕴, 丰美福. HepG2 细胞在模拟微重力条件下的生长研究——体外细胞三维生长模型构建. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(2): 146-153  
Xu D Y, Wang Y, Feng M F. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(2): 146-153
- [20] Kenny P A, Lee G Y, Myers C A, *et al.* The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*, 2007, **1**(13): 84-96

- [21] Feder-Mengus C, Ghosh S, Reschner A, *et al.* New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal?. *Trends Mol Med*, 2008, **14**(8): 333–340
- [22] Bissell M J, Radisky D C, Rizki A, *et al.* The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, 2002, **70**(9–10): 537–546
- [23] Kim J B, Stein R, O'Hare M J. Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer -a review. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, **85**(3): 281–291
- [24] Arii S, Mise M, Harada T, *et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase 9 gene in hepatocellular carcinoma with invasive potential. *Hepatology*, 1996, **24**(2): 316–322
- [25] Sun J J, Zhou X D, Liu Y K, *et al.* Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999, **125**(1): 28–34
- [26] Hirohashi K, Yamamoto T, Uenishi T, *et al.* CD44 and VEGF expression in extrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2004, **51**(58): 1121–1123
- [27] Osada T, Sakamoto M, Ino Y, *et al.* E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996, **24**(6): 1460–1467
- [28] Liu L X, Jiang H C, Liu Z H, *et al.* Integrin gene expression profiles of human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2002, **8**(4): 631–637
- [29] Sun F X, Tang Z Y, Lui K D, *et al.* Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice *via* orthotopic implantation of histologically intact tissues. *Int J Cancer*, 1996, **66**(2): 239–243

## Establishment of A HCC Tissue-like Spheroid Model\*

TANG Jian-Hua\*\*, CUI Jie-Feng\*\*, LIU Yin-Kun\*\*\*

(Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** Previously a cell line MHCC97H with high metastatic potential was established for HCC metastatic study. For further analysis of the biological character and the metastatic potential of HCC cells in 3D state, a HCC spheroid with tissue characteristics derived from MHCC97H cells formed in a RWV bioreactor system with PLGA scaffold. The spheroid was transparent and compact in macroscopical morphology, and the cells of it displayed concentric arrangement of large proliferating tumor cells in the periphery and smaller non-proliferating cells in deeper regions, as well as some cells necrosis in central section. The spheroid also had a tissue-like ultra-structure desmosome junction and tight junction complex at membrane borderline of adjacent cells. The higher contents of ALB, AFP,  $\gamma$ -GT in culture supernatant of HCC spheroid implied that the spheroid better regained the function of HCC specific proteins/enzymes synthesis and secretion. Moreover, the similar changes of ALB, AFP,  $\gamma$ -GT in culture medium were frequently found in serum contents of HCC patients in clinic. The expression patterns of adhesion molecules, HCC specific gene and metastasis associated genes in the established spheroid clearly demonstrated that the spheroid was not only a HCC model, but also a model with high metastasis potential. More significantly, the occurrence of secondary tumor nodule around primary tumor in liver and the tumor cells of metastatic lesions in lungs of the tested nude mice verified intrahepatic metastasis and distant metastasis. All the results indicated that the establishment of a HCC tissue-like spheroid model was successful and it might have applications in HCC study, anticancer drug screening and establishment of animal model.

**Key words** hepatocellular carcinoma(HCC), metastasis, model, rotating wall vessel bioreactor

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2010.00052

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30772062) and Shanghai Pujiang Program (08PJ140300).

\*\*These authors contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-21-64041990-2105, E-mail: liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn

Received: January 26, 2010 Accepted: April 8, 2010