微環境影響表觀遺傳學 - 為細胞生長分化創造不受限的3D立體空間

撰文：陳幼淇

在表觀遺傳學幹細胞生長與分化的研究佔有不可取代的角色。什麼環境會誘使細胞走向分化?又有什麼藥物可以調控細胞分化的方向?以細胞微觀探討在不改變基因的狀態下，藉著改變基因表達而使表型變換，為基礎科學以及未來的臨床研究開展出另一片天空。然而，既然細胞取自3D的生理微環境，為什麼要讓研究被侷限在2D的培養盤或培養皿上呢?

雖然多數組織和器官在體內是以3D的方式生長，但細胞研究仍然多建立於傳統2D細胞培養系統。對多數的研究者而言，細胞培養就是要使用傳統的培養角瓶或培養皿，尤其是面對貼附型的細胞，找到經過恰當的表面處理的塑膠耗材，讓細胞以最適合的形態單層平均地貼附於耗材表面是細胞培養必經的過程。儘管2D培養方便而好用，但對比組織和器官在體內是以3D的方式生長，靜態2D細胞培養環境明顯與生理狀態3D的微環境有出入。許多實驗證實，2D環境會改變細胞DNA的表現量、讓細胞分化的能力降低並喪失部分細胞在活體組織中原有的特性。生物學家逐漸開始認知到3D培養可以幫助細胞群集，增強細胞與細胞(cell-to-cell)、細胞與細胞外間質(cell-to-extracellular matrix)的相互反應，對於維持細胞分化非常重要。

這些現象考量不僅在基礎科學研究中十分重要，同時也被應用在表觀遺傳的細胞治療中，在調控MSC細胞骨原細胞(Osteogenic cells)的研究中發現，3D環境可以使細胞對調控表觀遺傳的藥物更加敏感。而正在快速成長中的組織工程未來也會需要高效率的大規模3D培養技術。因此，如何在體外仿造一個相似於生理環境的3D培養系統，以及3D培養系統對細胞生長產生的變化，成為炙手可熱的研究主題。

3D 培養的方式

目前普遍認同的3D細胞培養系統有幾種，包含人工細胞外間質、細胞骨架、特製的細胞培養表面、細胞微載體以及微重力型旋轉培養系統。

圖一. 微載體提供細胞立體貼附表面。

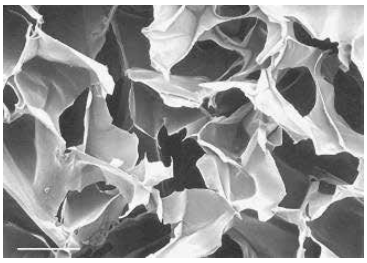
方法一: 微載體提供細胞貼附

既然細胞平貼於Flask的2D表面不可行，生物學家們就為細胞提供立體的表面供其貼附，微載體microcarrier就因應而生(圖一)。然而細胞雖然因此向立體層面生長，搭配旋轉培養瓶spinner flask後可以讓細胞懸浮生長於培養瓶中，但細胞仍舊只能以單層方式貼附在給與支撐的表面上，細胞生長仍十分受限，形態與表現仍與生理狀態有很大差異。

岑祥股份有限公司www.thco.com.tw 台北02-2785-1156 新竹03-530-7592 台中04-2471-0255 高雄07-343-1735

方法二： 將細胞包埋於人工或自然的細胞支架

為提供3D生長空間給細胞，部份廠商開始提供結構特殊的細胞培養表面材質，模仿生理內細胞生長所需的細胞骨架(scaffold)，包含多孔性細胞支架或常被使用的一種為富含營養成份的特殊聚合物Hydrogel，讓細胞不只能平貼於表面，更可以延伸到膠體中間，朝垂直方向生長(圖二、圖三)。這樣的靜態3D培養確實幫助細胞展現了活體組織的形態，並且出現細胞與細胞(cell-to-cell)、細胞與細胞外間質(cell-to-extracellular matrix)間交互作用的多形性。



圖二. 電顯下的多孔性殼聚醣細胞支架。

圖三. Hyclone Hydrogel 可以讓細胞作3D靜態生長。

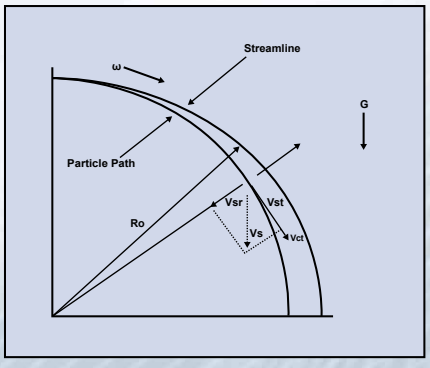
然而細胞培養在靜態的膠體上卻也發現新的問題，組織團塊形成後，藉由被動運輸傳遞的氣體和養份難以傳達到組織的中心部位，細胞便由中心開始壞死(necrosis)。雖然這種培養技術對於建立3D細胞培養的好處舉足輕重，卻仍舊無法完全仿造活體內細胞自由生長的微環境，更很難滿足大規模細胞培養的需求。

方法三：微重力旋轉培養系統

利用垂直持續旋轉的方式，給予細胞近似於活體內微環境的微重力狀態，使細胞在不受壓力的狀況下自由生長，是最接近活體微環境的3D培養系統，可以解決傳統3D培養的問題。

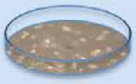
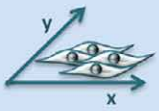
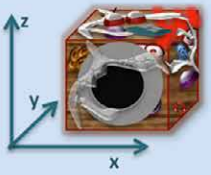
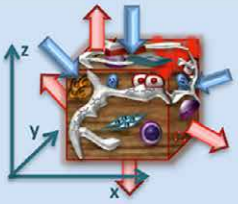
美國太空總署NASA在做太空低重力環境的細胞培養研究中發現，在微小重力的狀態下，細胞表現的形態、細胞分化與細胞間交互作用都異於一般2D培養的細胞狀態，而與活體內細胞表現狀態相似。經過多種嘗試，終於研發出特殊的旋轉培養盤，圓柱型的外型在很低的轉速下使重力、浮力、向心力和地球旋轉科氏力達成平衡，細胞維持自由落體的狀態，自由懸浮在旋轉培養盤中，成為動態的3D旋轉細胞培養系統(Rotary cell culutrue system, RCCS)(圖四、圖五)。

圖四. RCCS持續旋轉，使細胞在微重力狀態下自動聚集生成團塊。



圖五. 細胞在RCCS內被液體包圍，作用於細胞的力量達成平衡，讓細胞可以自由生長。

動態3D培養的RCCS，除了可以增進細胞群集，讓細胞表現與活體相近的細胞與細胞(cell-to-cell)、細胞與細胞外間質 (cell-to-extracellular matrix) 間交互作用之外，更可以藉由流體動力學，促進氧氣與養份在細胞團塊中的交換效率、維持細胞活性，長期培養下由細胞長成組織並且表現特定組織特性的文獻不勝枚舉，解決傳統3D培養無法放大規模的問題。

CULTURE CONDITIONS			
	CELL CULTURE	TISSUE CULTURE	
	STATIC condition	STATIC condition	DYNAMIC condition (RCCS™ bioreactor)
Hydrodynamic forces			(free-fall)
Dimensionality	 2D	 3D	 3D
Characteristics of tissue-specific micro-environment (compared to the *in vivo* situation)	**a) Absence (loss) of:** • tissue architecture/ dimensionality (3D) • complex heterotypic cell-cell/ cell-matrix interactions • stroma/parenchyma interplays **b) Air-liquid interface** **c) Low mass transfer**: passive diffusion of gas and nutrients **short-term preservation of differentiated cell functions**	**a) Preservation of the integrity of:** • tissue architecture/dimensionality (3D) • complex heterotypic cell-cell/cell-matrix interactions • stroma/parenchyma interplays **b) Air-liquid interface** **c) Low mass transfer**: passive diffusion of gas and nutrients → • decreasing gradient of oxygen and metabolites from outer to inner parts of the explant: development of central core necrosis ( ) **rapid cell suffering/death**	**a) Preservation of the integrity of:** • tissue architecture/dimensionality (3D) • complex heterotypic cell-cell/cell-matrix interactions • stroma/parenchyma interplays **b) No Air-liquid interface** **c) High mass transfer:** • hydrodynamic forces acting inside the culture vessel permit efficient gas inter-exchanges, nutrients supply(⇒) and catabolites removal (⇒) **long-term survival of tissue-specific differentiated cells**

表．2D與3D細胞培養對細胞分化的比較：RCCS動態3D培養比一般靜態培養，能有效傳遞氧氣與養份，促進細胞間交互作用

隨著培養系統的開發，3D細胞培養不再是難事，任何有能力做細胞培養的實驗都能輕鬆升級。只要將Hyclone Hydrogel加在一般培養皿上，就能簡單成為靜態3D細胞培養，可以做短期的細胞分化與細胞交互作用實驗。而使用RCCS微重力培養系統可以更有效模仿生理狀態，讓細胞在不被影響的狀況下自由生長與分化，不僅實驗數據具有高參考價值，並且可以在長期培養下生長成組織團塊，應用於組織工學等等。

Reference:

Ex-Vivo dynamic 3-D culture of human tissues in the RCCS bioreactor allows the study of multiple myeloma biology and response to therapy. Marina F, et, al. PLoS One. 2013, 8(8):e71613.8

Differentiation of human mesenchymal stem cell spheroids under microgravity conditions. Cerwinka WH,et, al. Cell Regeneration 2012, 1:2

3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. Barrila J, et, al.Nature Rev. Microbiol. 2010,8:791-801

3D culture adds an extra dimension to targeted epigenetic therapies
Ali R Ozes and Kenneth P Nephew. Cell Cycle. 2013, 12(14): 2173–2174.

岑祥股份有限公司www.thco.com.tw 台北02-2785-1156 新竹03-530-7592 台中04-2471-0255 高雄07-343-1735