

文章编号: 1000-7032(2013)10-1408-04

# 基于拉曼光谱的微重力三维培养条件下的人 HepG2 细胞的研究

王雁军<sup>1</sup>, 王桂文<sup>2</sup>, 姚辉璐<sup>2\*</sup>

(1. 中国科学院动物研究所膜工程与生物膜国家重点实验室 细胞生物学系, 北京 100101;

2. 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530003)

**摘要:** 采用一个波长为 785 nm 的半导体激光束来囚禁人的肝癌细胞并激发人的肝癌细胞的拉曼光谱, 分析模拟微重力三维培养条件下的人肝癌细胞的 DNA、蛋白和脂类的生物学物质的变化和表达情况。结果显示, 微重力三维培养条件下和平面培养下的人的肝癌细胞的拉曼光谱在 527, 1 367, 1 438, 1 659  $\text{cm}^{-1}$  处有明显的差异。

**关键词:** 人肝癌细胞; 微重力; 三维培养; 拉曼光谱

中图分类号: Q631 文献标识码: A DOI: 10.3788/fgxb20133410.1408

## Study on Liver Cancer Cells (HepG2) Under Simulated Microgravity Based on Raman Spectroscopy

WANG Yan-jun<sup>1</sup>, WANG Gui-wen<sup>2</sup>, YAO Hui-lu<sup>2\*</sup>(1. State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology,  
Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing 100101, China;

2. Laboratory for Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China)

\* Corresponding Author, E-mail: huiluy@gmail.com

**Abstract:** In our work, HepG2 was cultured onto biodegradable polyglycolic acid (PGA) polymer scaffolds, which was cultured in a rotating cell culture system (RCCS) to form a three-dimensional (3D) and human liver cancer cells cultured in common plate. We detected the spectra of HepG2 cells under two culture conditions and compared the spectra changes of the different cells under two culture conditions. The results show that Raman spectroscopy can differentiate among HepG2 cells under two culture conditions. 527  $\text{cm}^{-1}$  and 1 357  $\text{cm}^{-1}$  peaks of HepG2 cells under simulated microgravity are higher than that of HepG2 cells in common plate. 1 438  $\text{cm}^{-1}$  and 1 659  $\text{cm}^{-1}$  peaks of HepG2 cells under simulated microgravity are lower than that of HepG2 cells in common plate. It is known that 527  $\text{cm}^{-1}$  represents Fe(II), N-N-MeIm, 1 357  $\text{cm}^{-1}$  represents Guanine, porphyrins (haemoglobin), lipids, 1 438  $\text{cm}^{-1}$  represents  $\text{CH}_2$  deformation (lipids), cholesterol, and 1 659  $\text{cm}^{-1}$  represents Amide I; proteins. These biomaterials which induce these peak changes are possibly related to 3D culture.

**Key words:** liver cancer cells; simulated microgravity; three dimensional culture; Raman spectroscopy

收稿日期: 2013-07-01; 修订日期: 2013-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(60868002)资助项目

作者简介: 王雁军(1976-), 女, 辽宁丹东人, 主要从事肝脏病和激光拉曼光谱的研究。

E-mail: wangyanjun117@163.com

## 1 引 言

旋转细胞培养系统 (Rotary cell culture system, RCCS) 是美国航空航天局 (NASA) 发明的。在 RCCS 中, 细胞可以聚生、成三维生长和分化, 可进行极脆弱的细胞培养以及人和动物细胞的共同培养, 可生成理想的三维组织, 并具有亲本组织的结构和功能。在正常情况下, 细胞间是相互关联的。失去这种关联, 将会导致病变。这种关联在研究正常和病变器官的机理时非常重要。目前, 通常的培养方法都是二维的, 故原来不可能在体外研究这些机理。重力的影响将导致细胞因细胞间的关联失常而不能自然生长, 仅能得到平的、极薄的培养产物, 难以观察细胞与细胞间的关联。在 RCCS 中, 这种关联是正常的, 因为 RCCS 巧妙地让细胞维持在连续的自由落体状态, 如同在宇宙的微重力空间中宇航员所感受到的一样。在这个极佳的微环境中, 细胞能以几乎接近自然的方式进行三维生长。因此, RCCS 是目前世界上唯一能提供理想的体外生长环境的细胞培养系统<sup>[1-3]</sup>。拉曼光谱是一种简便灵敏的光谱分析新技术, 近年来在细胞的结构、功能及细胞凋亡等方面得到了迅速发展。目前, 拉曼光谱已经在农业、工业、化学和生命科学等领域得到了广泛的应用, 取得了明显的成效<sup>[4-6]</sup>。

本文以人的 HepG2 细胞为实验材料, 采用 RCCS 系统模拟微重力效应, 并以 Cytodex-3 为微载体对肝癌细胞进行培养 (以平面培养的肝癌细胞为对照), 采用激光光镊拉曼光谱检测微重力三维培养条件下人的肝癌细胞的 DNA、蛋白和脂类的生物学物质的变化和表达情况<sup>[3-6]</sup>。

## 2 实 验

### 2.1 材料来源

HepG2 购自 ATCC; 培养基 DMEM、胎牛血清 (FBS) 均为 Gibco 公司产品, 购自北京科普佳公司; 旋转式细胞培养系统 (RCCS) 购自美国 Synthecon. Inc.; Cytodex-3 微载体购自 Sigma 公司。

### 2.2 样品处理

将 PGA 支架切割成规则的  $5\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ , 在接种细胞前, 置于 70% 乙醇溶液灭菌过夜, 然后用无菌磷酸盐溶液洗 3 次。0.25% 胰酶消化细胞以  $1 \times 10^6/\text{mL}$  接种到 RCCS 的 50 mL 培

养室, 同时接种 PGA 支架, 加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 转速为 20 ~ 30 r/min, 使细胞处于悬浮状态。

### 2.3 实验装置

单细胞激光光镊拉曼光谱仪的实验装置如图 1 所示。从二极管激光器中发出一束波长为 780 nm 的激光, 二极管激光器通过恒温电路控制以避免波长漂移。激光光束经过滤波片滤掉干扰光, 然后进入倒置生物显微镜 (Nikon TE2000U), 显微镜的物镜数值孔径为 1.30, 放大倍数为 100 倍。样品槽由一个厚 3 mm、中心有直径为 8 mm 孔的玻璃板构成, 下部用一片石英片密封, 上部盖上盖玻片。血细胞样品放在石英片和盖玻片的空隙中, 样品池中的单个 HepG2 细胞可以被聚焦的激光束产生的辐射压力囚禁在焦点附近, 同时这束激光也用来激发被囚禁细胞的喇曼散射。在收集光路里, 物镜也作为收集透镜收集来自细胞的背向散射光。光谱仪 (SpectraPro2300i, Acton) 的衍射光栅的闪耀波长为 1 000 nm, 刻槽密度为 600 gr/mm。光谱仪耦合到 CCD 上, 为了获得极低的暗电流, 用液氮冷却 CCD 至  $-120\text{ }^\circ\text{C}$ , 并且通过一个摄像机来连续监视被囚禁的白细胞。喇曼光谱的收集范围是  $300 \sim 2\,100\text{ cm}^{-1}$ , 光谱分辨率为  $6\text{ cm}^{-1}$ 。

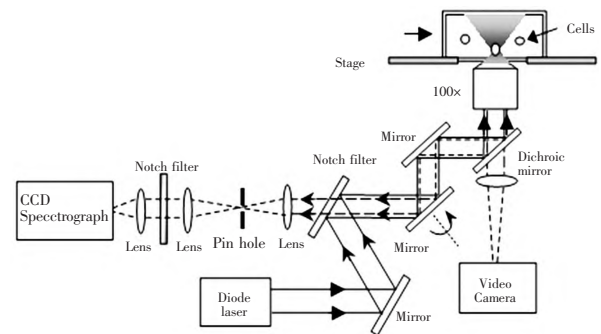


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup

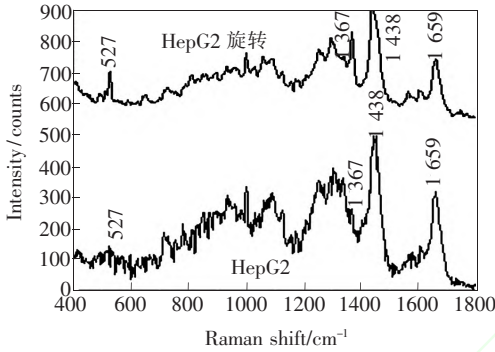
### 2.4 HepG2 细胞光谱的获取

将分离获得的微重力三维培养条件下人的肝癌细胞和平面培养的肝癌细胞悬液分别置于样品池, 光镊囚禁一个待测细胞, 在激发功率为 7 mW、激发波长为 785 nm、收集时间为 30 s 条件下采集拉曼光谱<sup>[7-8]</sup>。释放细胞, 以同样的功率和时间采集背景溶液的光谱。每组样品收集 20 个细胞, 最后通过 WinSpec32 软件分析, 取平均光谱。数据分析采用 Origin8.0 软件和 Matlab 软件

分析的方法。

### 3 结果与讨论

图 2 为微重力三维培养条件下的人肝癌细胞和平面培养的肝癌细胞的平均光谱。从图中可以看出:对于  $527\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 357\text{ cm}^{-1}$  的峰值强度而言,微重力三维培养条件下人的肝癌细胞要高于平面培养的肝癌细胞;而对于  $1\ 438\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 659\text{ cm}^{-1}$  的峰值强度而言,微重力三维培养条件下人的肝癌细胞要低于平面培养的肝癌细胞。

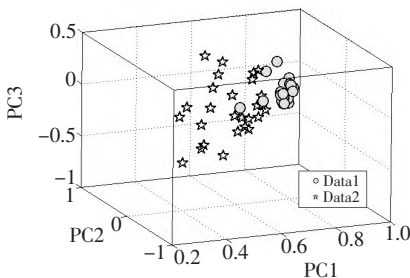


HepG2: 正常的胎肝干细胞; HepG2 旋转:  
模拟微重力条件下培养的肝癌细胞。

图 2 模拟微重力条件下培养的肝癌细胞和平面培养的肝癌细胞的平均光谱的相互比较

Fig. 2 Comparison of Raman spectra of human liver cancer cells cultured onto biodegradable polyglycolic acid (PGA) polymer scaffolds with that cultured in common plate

图 3 为采用 PCA 方法分析模拟微重力条件下培养的肝癌细胞和平面培养的肝癌细胞的数据分析结果。可以看出,微重力三维培养条件下培



Data1: 模拟微重力条件下培养的肝癌细胞;  
Data2: 平面培养的肝癌细胞。

图 3 PCA 方法分析模拟微重力条件下培养的肝癌细胞和平面培养的肝癌细胞

Fig. 3 PCA analysis of human liver cancer cells cultured onto biodegradable polyglycolic acid (PGA) polymer scaffolds and that cultured in common plate

养的人的肝癌细胞的激光光镊拉曼光谱数据明显可以和平面培养的人的肝癌细胞分开。

拉曼光谱峰代表的物质如表 1<sup>[9]</sup> 所示。拉曼光谱在  $527\text{ cm}^{-1}$  的峰代表铁和氮-甲基咪唑,  $1\ 357\text{ cm}^{-1}$  的峰代表鸟嘌呤和卟啉类化合物(血红蛋白),  $1\ 438\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 659\text{ cm}^{-1}$  的峰代表脂类、蛋白和胆固醇。微重力三维培养条件下人的肝癌细胞在  $527\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 357\text{ cm}^{-1}$  的峰值强度高于平面培养的肝癌细胞, 在  $1\ 438\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 659\text{ cm}^{-1}$  的峰值强度低于平面培养的肝癌细胞。  $527, 1\ 357, 1\ 438, 1\ 659\text{ cm}^{-1}$  处峰值强度的变化很可能与人的肝癌细胞的培养条件的改变有关。

表 1 拉曼光谱峰代表的物质

Table 1 Tentative peak assignments for Raman tissue spectra

峰值/ $\text{cm}^{-1}$	主要物质
527	Fe( II ), N - 甲基咪唑
1 078	C—C 或 C—O 伸展(脂类), C—C 或 $\text{PO}_2$ 伸展(核酸)
1 260	酰胺 III; 无序的
1 264	在平面弯曲的=C—H(脂类和蛋白)
1 240 ~ 1 265	酰胺 III (蛋白 C—N 键的伸展, 表明 a-helix 结构)
1 369	鸟嘌呤, 卟啉类化合物(血红素), 脂类
1 437	$\text{CH}_2$ 变形(脂类), 胆固醇
1 443	$\text{CH}_2$ 变形(脂类和蛋白)
1 446	$\text{CH}_2$ 蛋白的弯曲模型
1 485	核酸和嘌呤碱(鸟嘌呤和腺嘌呤)
1 520 ~ 1 538	—C=C—类胡萝卜素
1 548	色氨酸
1 573	鸟嘌呤, 腺嘌呤
1 659	氨基化合物 I; 蛋白

拉曼光谱是一种简便灵敏的光谱分析新技术,近年来在细胞的结构、功能等方面的研究取得了迅速发展,但目前尚无使用拉曼光谱检测和分析三维培养的细胞报道。目前,体外研究或检测通常采用单层细胞培养方法,如药物筛选等。事实上,在体内,细胞与细胞、细胞与基质间的相互关系都是三维的,因而单层培养的细胞和体内的实际状况相去甚远,往往会带来假阳性或不切合实际的结果。近年来,细胞三维培养和组织工程方面的研究,由于其更加接近体内的培养条件和在医学领域的光明应用前景而发展迅速。因此,本文使用拉曼光谱的方法检测和分析了微重力三

维培养条件下培养的人的肝癌细胞和平面培养条件下培养的人的肝癌细胞。通过 PCA 的方法证明两种方法培养的肝癌细胞可以使用拉曼光谱区分开来,并且监测到一些有趣的光谱峰的变化。已有研究证明:三维培养可以再造肿瘤细胞的微环境,调控癌细胞的造血信号——II-8 和血管内皮细胞因子的分泌<sup>[10]</sup>。还有研究表明:在三维培养媒介中,肝癌细胞的白蛋白的浓度高于单层培养的肝癌细胞的白蛋白的浓度<sup>[11]</sup>。Kevin E Fisher 等<sup>[12]</sup>也报道了磷脂酸参与了肿瘤的转移和侵袭过程并比较了三维培养和二维培养中磷脂酸等脂类物质的表达变化。所以,在微重力三维培养条件下培养的人肝癌细胞中铁和氮-甲基咪唑(527  $\text{cm}^{-1}$ ),鸟嘌呤、卟啉类化合物(血红蛋白)(1 357  $\text{cm}^{-1}$ )物质峰的升高,以及脂类、蛋白和胆固醇(1 438  $\text{cm}^{-1}$ 和 1 659  $\text{cm}^{-1}$ )物质峰的下降很可能是人的肝癌细胞随其模拟微重力三维培养条件而出现的变化。综上所述,LTRS 拉曼光谱可以

检测和区分模拟微重力三维培养的肝癌细胞和平面培养下的肝癌细胞,是分析肿瘤生物学与研究药物筛选的体外培养细胞的一个很好的手段。

## 4 结 论

结合拉曼光谱和光镊技术对平面培养的 HepG2 细胞和旋转培养的 HepG2 细胞的拉曼光谱进行了研究。光谱的对比分析结果表明两者之间的拉曼光谱有较明显的差异。微重力三维培养条件下人的肝癌细胞在 527  $\text{cm}^{-1}$ 和 1 357  $\text{cm}^{-1}$ 的峰值强度高于平面培养的肝癌细胞,在 1 438  $\text{cm}^{-1}$ 和 1 659  $\text{cm}^{-1}$ 的峰值强度低于平面培养的肝癌细胞。527,1 357,1 438,1 659  $\text{cm}^{-1}$ 处峰值强度的变化很可能与人的肝癌细胞的培养条件的改变有关。应用拉曼峰位移的不同特征可以了解体内新肝癌细胞的分子结构、构象和组成的变化,从分子水平探讨其内容物的改变情况及其变化机理,为疾病的机理研究和药物筛选提供一定的实验依据。

## 参 考 文 献:

- [1] Nakamura K, Kuga H, Morisaki T, *et al.* Simulated microgravity culture system for a 3-D carcinoma tissue model [J]. *Biotechniques*, 2002, 33(5):1068-1070.
- [2] Wang X, Wei G, Yu W, *et al.* Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with ES-Derived cardiomyocytes in vitro [J]. *Biotechnol. Prog.*, 2006, 22(3):811-818.
- [3] Martin A, Zhou A, Gordon R E, *et al.* Thyroid organoid formation in simulated microgravity: Influence of keratinocyte growth factor [J]. *Thyroid*, 2000, 10(6):481-487.
- [4] Draux F, Jeannesson P, Beljebbar A, *et al.* Raman spectral imaging of single living cancer cells: A preliminary study [J]. *Analyst*, 2009, 134(3):542-548.
- [5] Kang L L, Huang Y X, Luo M. Confocal Raman microscopy on single living young and old erythrocytes [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.* (光谱学与光谱分析), 2008, 28(10):2343-2347 (in Chinese).
- [6] Schrader B, Schulz H, Andreev G N, *et al.* On-destructive NIR-FT-Raman spectroscopy of plant and animal tissues, of food and works of art [J]. *Talanta*, 2000, 53(1):35-45.
- [7] Xie C A, Li Y Q. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. *Appl. Phys.*, 2003, 93(5):2982-2986.
- [8] Xie C A, Li Y Q, Tang W J. Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy [J]. *Appl. Phys.*, 2003, 94(9):6138-6142.
- [9] Potten C S, Loeffler M. Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt [J]. *Development*, 1990, 110(4):1001-1020.
- [10] Fischbach C, Kong H J, Hsiong S X, *et al.* Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106(2):399-404.
- [11] Kinasiwicz A, Kawiak J, Werynski A. 3D matrigel culture improves differentiated functions of HepG2 cells in vitro [J]. *Biocybern. Biomed. Eng.*, 2006, 26(4):47-55.
- [12] Fisher K E, Pop A, Koh W, *et al.* Tumor cell invasion of collagen matrices requires coordinate lipid agonist-induced G-protein and membrane-type matrix metalloproteinase-1-dependent [J]. *Mol. Cancer*, 2006, 5:69-72.