

冯珊珊,金毅,娄东晓,等. 3D 培养细胞球快速石蜡切片方法建立及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 57-61.
Feng SS, Jin Y, Lou DX, et al. Establishment and application of a rapid paraffin sectioning method for 3D cellular spheroids [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 57-61.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.008

3D 培养细胞球快速石蜡切片方法建立及应用

冯珊珊¹, 金毅^{2*}, 娄东晓¹, 魏孟超¹, 谢泳娇¹, 王汝仙¹, 李静^{1*}

(1.广东东阳光药业有限公司,广东 东莞 523871;2.深圳市药品检验研究院(深圳市医疗器械检测中心),
深圳 518057)

【摘要】 目的 建立一种适合于三维(3D)细胞培养模型的、简便快速的石蜡切片技术及其染色方法,为更便捷、快速地制作 3D 细胞切片并观察培养模型形态、功能,开展应用研究提供病理技术平台。**方法** 利用超低吸附培养板将 HepG2 细胞或/和 LX-2 细胞培养成 3D 细胞球,制作石蜡切片,并进行 HE 染色、免疫组化染色和免疫荧光染色检测细胞球组织形态和蛋白表达。**结果** 建立了适用于 3D 细胞培养模型的快速石蜡切片方法,制作的切片细胞球结构完整、细胞界限清楚,抗原活性良好,进行 HE 染色、免疫组化染色和免疫荧光染色能准确检测 3D 细胞球的形态结构、蛋白表达和分布。**结论** 该快速石蜡切片方法的建立,丰富了 3D 细胞培养模型研究手段,可促进其在基础研究、转化医学和药物研发中的应用。

【关键词】 3D 培养;细胞球;类器官;石蜡切片

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0057-05

Establishment and application of a rapid paraffin sectioning method for 3D cellular spheroids

FENG Shanshan¹, JIN Yi^{2*}, LOU Dongxiao¹, WEI Mengchao¹, XIE Yongjiao¹, WANG Ruxian¹, LI Jing^{1*}

(1. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd, Dongguan 523871, China.

2. Shenzhen Institute for Drug Control (Shenzhen Testing Center of Medical Devices), Shenzhen 518057)

【Abstract】 Objective To establish a simple and fast paraffin section technique and staining method suitable for use with three-dimensional (3D) cell culture models and to provide a convenient pathological technology platform for the study of the morphology, function, and application of 3D cell culture models. **Methods** HepG2 cells or/and LX-2 cells were cultured into 3D multicellular spheroids using an ultra-low attachment surface culture plate, and paraffin sections were made. Hematoxylin and eosin (HE) staining, immunohistochemical staining, and immunofluorescence staining were performed to detect the histological and morphological characteristics and protein expression of the multicellular spheroids. **Results** A rapid paraffin sectioning method suitable for 3D cell culture models was established. The prepared sectioned cell spheroids had complete structure, clear cell boundaries, and good antigen activity. The morphological structure and the expression and distribution of the proteins of 3D cell culture models could be accurately detected by HE staining, immunohistochemical staining, and immunofluorescence staining. **Conclusions** The establishment of a rapid paraffin sectioning method has enriched the research method available for 3D cell culture models and could promote their application in basic research, translational medicine, and drug development.

【Keywords】 three-dimensional cell culture; multicellular spheroids; organoid; paraffin section

[基金项目]“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201002);抗感染新药研发国家重点实验室项目(2015DQ780357);广东省重点领域研发计划新药创制专项(2019B020202001);广东省药品监督管理局实验病理学重点实验室项目(2020ZDB11)。

[作者简介]冯珊珊(1987—),女,博士,研究方向:药物毒理学。E-mail: 416725755@qq.com

[通信作者]李静(1981—),男,博士,研究方向:药理学。E-mail: lijing@hec.cn

金毅(1971—),女,博士,主任药师,研究方向:病理学。E-mail: dingxiangshu2010@163.com * 共同通信作者

在生物学、基础医学、药理学研究和新药评价中,实验动物具有非常重要的地位,但随着动物福利日益受到重视,3R 原则(reduction, replacement, refinement)的广泛接受,实验动物替代技术逐渐被学术界认可^[1]。近年来,器官芯片(organ-on-a-chip)、类器官(organoid)、细胞球(spheroid)等三维(3D)细胞模型技术的发展为实验动物替代提供了便利条件^[2-4]。我国最新发布的《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)》已明确将 3D 细胞模型纳入评估药物有效性和安全性的候选模型^[5]。研究类器官或细胞球的组织形态特征、组织病理学、基因表达的时空分布通常采用冰冻切片或石蜡切片结合组织化学染色、免疫荧光染色等。冰冻切片虽然具有制片简便快速的优点,但也具有保存时间较短,制片过程中冰晶的形成可能影响抗原定位等缺点^[6]。石蜡切片具有组织结构保存良好,贴片牢固、抗原定位准确、可长期保存等优点。但由于类器官或细胞球的培养体系复杂,体积小,组成相对单一,制作病理切片难度较大。传统细胞球或类器官石蜡切片采用琼脂、琼脂糖、蛋清等预包埋,存在制片过程复杂,耗时长,受琼脂糖浓度和熔融状态的影响还可能导致浸蜡不充分,不易切片,在加入琼脂过程中因温度原因极易凝固、脱水时易收缩、琼脂含水量高导致脱水时间过长等问题,这在一定程度上限制了石蜡切片技术在 3D 细胞模型研究中的应用^[7-10]。本研究结合 3D 细胞模型的特点,通过对经典石蜡包埋切片技术进行改良,旨在建立一种适合于 3D 细胞培养模型的、快速高效的石蜡切片技术及其染色方法,为 3D 细胞培养模型形态、功能、及应用研究提供便利的病理技术平台。

1 材料和方法

1.1 细胞系

人肝癌细胞 HepG2 细胞来自美国菌种保藏中心(货号:HB-8065);人肝星形细胞 LX-2 细胞购于美国默克公司(货号:SCC064)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,货号:SH30809.01B);胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号:10099141C);青霉素-链霉素混合液(美国 Hyclone 公司,货号:SV30010);10%中性福尔马林(北京索莱宝科技有限公司,货号:G2161);鳞片状切片石蜡

(德国 Leica 公司,货号:39601006);0.5%水溶性伊红染液、苏木素(珠海贝索生物科技有限公司,货号:BA4024、BA4041);抗荧光淬灭封片液、QuickBlock™ 免疫染色封闭液、免疫染色通透液(碧云天生物,货号:P0131、P0260、P0096);抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab207327、ab8798、ab150077、ab150120、ab6721)。超低吸附 96 孔板(美国 Corning 公司,货号:4515);全自动组织脱水机(美国 Thermo Scientific 公司,型号:Excelsior AS);石蜡包埋机(德国美康公司,型号:EC360);石蜡切片机(德国美康公司,型号:HM340E);自动染色一体机(德国 Leica 公司,型号:STS020);倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司,型号:DM i8)。

1.3 实验方法

1.3.1 3D 细胞球培养

将 HepG2 细胞或/和 LX-2 细胞以 2000~5000 个/孔的密度,不同比例接种至超低吸附 96 孔培养板中^[11],置于 CO₂ 培养箱内,5% CO₂,37℃ 静置培养 3~5 d,待细胞聚集形成质地较为紧密的,直径为 100~500 μm 细胞微球时进行收集。在细胞接种至超低吸附 96 孔培养板后,也可以 200 r/min 离心 1~2 min,能加速细胞聚集成球。

1.3.2 制作石蜡切片

收集培养的 3D 细胞球至离心管中,待细胞球沉淀或低速离心至离心管底部后,移除上清培养基,加入适量的 10%的中性福尔马林,室温固定 20~30 min。因细胞球十分微小,可在固定过程中加入几滴水溶性伊红染液对样品染色 2 min,使样品标记为红色,便于后续操作中识别样品。移除伊红染液,依次按照 75%乙醇 5 min,90%乙醇 5 min,95%乙醇 3 min,无水乙醇连续 3 次、每次 5 min 的顺序进行脱水。加入适量的二甲苯,进行透明,连续 3 次,每次 5 min。若样品较多,脱水和透明的过程也可以采用全自动组织脱水机,但因细胞球体积微小,需先将样品用滤纸包好,再放入包埋盒中,以防止丢失。将透明后的细胞球转移至装有液体石蜡的包埋底模中,置于 65℃ 恒温加热台或烘箱 10 min,取出后立即置于冷板上使含细胞球的液体石蜡快速凝固。切片厚度设置为 3 μm,将切下的一层蜡带置于冷水中,用玻片在冷水中捞起蜡带,将其置于温水中使其展平,再贴于载玻片上于显微镜下初步观察细胞球切割情况。将切好的片子置于 42℃ 烘箱中烘烤 30 min,置于 4℃ 冰箱内备用。染色前进行脱蜡复水,将切片于室温二甲苯中浸

泡 5 min, 更换二甲苯, 重复 3 次。100% 乙醇浸泡切片 3 min, 连续 2 次; 95% 乙醇浸泡切片 2 min; 70% 乙醇浸泡切片 2 min。

1.3.3 HE、免疫组化和免疫荧光染色

(1) HE 染色

将切片脱蜡、复水后进行常规 HE 染色: 去离子水冲洗 2 min, 苏木素染液浸染 5 min, 自来水冲洗 1 min, 盐酸-乙醇溶液分化 3 s, 碳酸锂稀溶液蓝化 30 s, 自来水浸泡 10 min, 伊红染液浸染 10 min, 依次经 95% 乙醇 (2 次, 每次 1 min)、无水乙醇 (3 次, 每次 1 min) 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

(2) 免疫组化染色

将切片脱蜡、复水后进行免疫组织化学染色: 抗原修复, 将装有切片的架子放入 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4) 内清洗, 微波炉加热 Tris/EDTA 抗原修复液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.05% 吐温-20, pH 9.0) 到 100℃, 将装有切片的玻片架放入煮沸的 Tris/EDTA 修复液中, 中火加热 20 min, 取出容器放置冰水中快速冷却 10 min 左右。含 0.025% Triton X-100 的 1×TBS (pH 7.6) 孵育样品 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。用封闭液 (含 10% 山羊血清、1% BSA 的 1×TBS) 在 37℃ 下封闭 1 h。灭活过氧化物

酶; 37℃ 复温 45 min; 用含 0.025% Triton X-100 的 TBS 漂洗 3 次; 将玻片在含 0.3% H₂O₂ TBS 中孵育 15 min。使用含 1% BSA 的 1×TBS 稀释一抗, 滴加 100~200 μL 至组织上, 于湿盒内 4℃ 过夜孵育。使用 1×TBS 稀释二抗, 室温下避光孵育 1 h。清洗后滴加显色剂 DAB, 反应 1 min。苏木精复染, 乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。

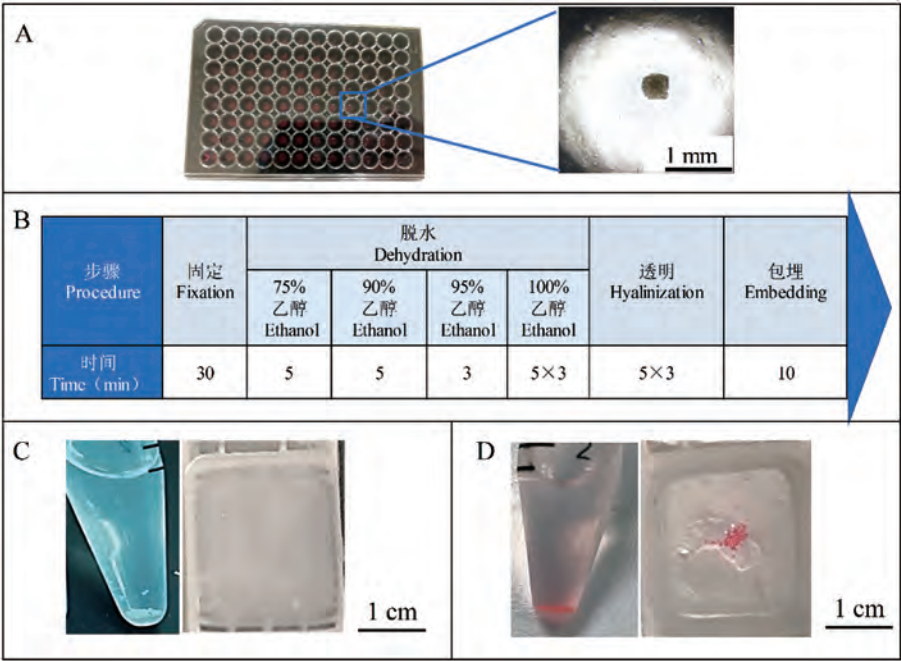
(3) 免疫荧光染色

将切片脱蜡、复水后进行抗原修复、通透和封闭, 方法同免疫组化染色。使用含 1% BSA 的 1×TBS 稀释一抗, 滴加 100~200 μL 一抗至组织, 于湿盒内 4℃ 过夜孵育。移除一抗, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 100~200 μL 1×TBS 稀释的二抗至组织, 于湿盒中室温下避光孵育 1 h。滴加 10~20 μL 含抗荧光淬灭剂的封片液 (含 DAPI), 孵育 10 min, PBS 洗去多余的封片液。在荧光显微镜下观察采集图像。

2 结果

2.1 3D 细胞球包埋流程优化

本研究中 3D 细胞球石蜡包埋的流程如图 1。在细胞聚集形成直径 100~500 μm、质地紧密的微球时收集固定。该流程从固定到完成包埋耗时仅



注: A: 细胞球培养; B: 包埋流程图; C: 细胞球固定和包埋 (未标记); D: 细胞球固定和包埋 (伊红标记)。

图 1 细胞球的培养和石蜡包埋

Note. A, Cellular spheroids culture. B, Operation flow chart of embedding. C, Fixed and paraffin-embedded spheroids (unmarked). D, Fixed and paraffin-embedded spheroids (marked with eosin).

Figure 1 Culture and embedding of cellular spheroids

80~90 min。在脱水前,先用伊红对细胞球染色标记,可明显提高细胞球的能见度,有利后续操作。

2.2 HE 染色

本方法制作的切片细胞球结构完整,细胞界限清晰,呈卵圆形,单个分布。HE 染色质核分明,细胞形态完整,细胞活力高,核心无坏死;LX-2 细胞所形成的细胞球体积较小,结构更为致密,HepG2 细胞形成的细胞球体积较大,结构相对松散(图 2)。

2.3 免疫组化染色

免疫组化标记 HepG2 细胞表达的白蛋白呈棕色弥漫状主要分布于 HepG2 和 LX-2 细胞共培养细胞球的内部,外周较少,细胞核蓝染(图 3)。

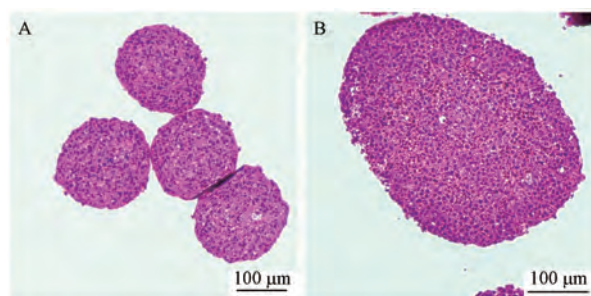
2.4 免疫荧光染色

免疫荧光分别用绿色荧光标记 HepG2 细胞表达的白蛋白,红色荧光标记 LX-2 细胞表达的波形蛋白,以及 DAPI 标记细胞核,可见在 HepG2 和 LX-2 共培

养细胞球中,白蛋白主要分布于细胞球的内部,波形蛋白主要分布于细胞球的周边,内部数量较少(图 4),该结果与免疫组化染色结果一致。这说明在 HepG2 细胞和 LX-2 细胞共培养的细胞球中,两种细胞的空间分布特点是不同的,HepG2 细胞集中于细胞球内部,LX-2 细胞主要在细胞球的周边。

3 讨论

本研究根据 3D 细胞培养模型的特点,对传统石蜡切片的制备方法进行了改进,从细胞球的收集到蜡块制备完成耗时不到 2 h,缩短了制片时间,显著提高实验效率。而以往报道的类器官石蜡切片制备方法完成同样的过程耗时约 4~30 h,且成片的组织结构松散,给组织鉴定增加了难度^[12-14]。本方法操作简便,无需离心富集,无需琼脂糖、蛋清等预包埋,固定、脱水、透明、浸蜡等步骤都根据样品特点进行了优化。



注:A:LX-2 细胞;B:HepG2 细胞。

图 2 细胞球 HE 染色

Note. A, LX-2 cells. B, HepG2 cells.

Figure 2 Hematoxylin and eosin staining of multicellular spheroids

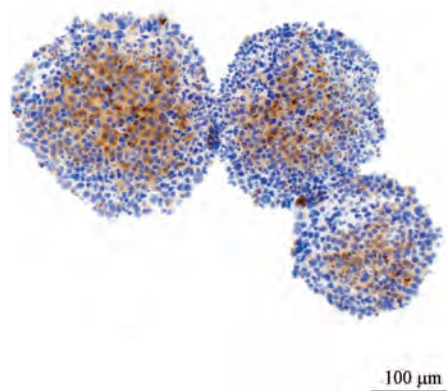
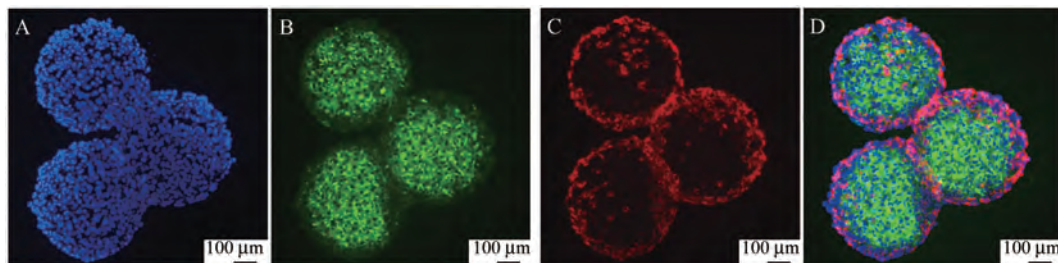


图 3 免疫组织化学染色显示白蛋白在

HepG2 和 LX-2 细胞共培养细胞球中的表达

Figure 3 Albumin was detected by immunohistochemistry in multicellular spheroids of HepG2 cells co-culturing with LX-2 cells



注:A:4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI);B:白蛋白;C:波形蛋白;D:合并。

图 4 免疫荧光显示白蛋白和波形蛋白在 HepG2 和 LX-2 细胞共培养细胞球中表达

Note. A, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). B, Albumin. C, Vimentin. D, Merged.

Figure 4 Albumin and vimentin were detected by immunofluorescence in multicellular spheroids of HepG2 cells co-culturing with LX-2 cells

本方法可操作性和实用性强,制作的切片结构完整、细胞界限清楚,制作的切片可行 HE 染色、免疫组织化学染色和免疫荧光染色,均能取得良好的效果。

本文介绍的方法较一般石蜡切片制备方法的耗时短很多,主要在于缩短了固定、脱水、浸蜡、烤片等步骤的时间,这主要源于细胞球样品体积较小,试剂渗透较快。在我们的实践中,这种快速的蜡块制备方法适用于直径 50~1000 μm 的细胞球或类器官,若样品体积更大,则应适当延长上述过程的时间。值得注意的是肿瘤球模型在直径超过 500 μm 左右时,大多数会出现中心区的细胞坏死,所以,在培养细胞球时,应根据细胞的实际生长情况控制其大小^[15]。

相较于病理切片中常见的组织,3D 细胞球或类器官体积微小、几乎无色透明且细胞成分相对简单,导致样本具有不易收集、易丢失、易损坏等特点,从而增加了样品包埋和切片的难度。本研究在样本固定后脱水前,采用了水溶性伊红进行样本标记,克服了上述操作难点。标记后的细胞球呈红色,在蜡块中清晰可见,便于后续切片和制片,并且该染色在复水过程中可被洗去,不影响对切片进行其他染色的效果。为保证样本的结构完整性,在保证固定和脱水充分的前提下,应尽量缩短这些过程的时间,且在样本处理时,动作应尽量轻柔。

细胞球和类器官作为不同的 3D 细胞模型,各有优势,细胞球的培养更为简单,成本适中,易于实现;类器官在组成和功能上与真实器官相似度更高。如 3D 肿瘤球模型,相比较 2D 平面培养的细胞,肿瘤球模型结构上非常类似体内无血管的肿瘤小结节,更适合作为肿瘤相关研究的体外模型^[16]。本文中所用的肝细胞和星形细胞混合培养的细胞球,可用于构建肝脂肪变性和肝纤维化模型,进行药物筛选^[11]。虽然细胞球和类器官在细胞来源、构建难易程度、应用上有一定的差异,但由于二者组成和体积类似,对其形态结构、组织病理的研究手段是相通的,均可借助病理技术手段对其结构和功能进行鉴定。本文所述的快速石蜡切片不仅适用于各种细胞球,也适用于体积相似的类器官模型。

该快速石蜡切片方法虽然缩短了制片时间,但仍使用了甲醛、二甲苯等试剂,对于免疫活性容易被破坏的抗原在进行免疫组化染色或免疫荧光染色前,仍需进行抗原热修复。本文介绍的适用于 3D

细胞模型的快速石蜡切片技术有助于细胞球、类器官等动物替代模型在研究中的应用,加快研究进程。

参考文献:

- [1] 宋冰, 辜吉秀, 汪永峰, 等. 实验动物替代技术研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 680-687.
- [2] Wu Q, Liu J, Wang X, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects [J]. Biomed Eng Online, 2020, 19(1): 9.
- [3] Shariati L, Esmaeili Y, Javanmar SH, et al. Organoid technology: current standing and future perspectives [J]. Stem Cells, 2021, 39(12): 1625-1649.
- [4] Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues [J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(2): 108-115.
- [5] 国家食品药品监督管理总局. 基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行) [EB/OL]. [2021-12-03], <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/41bc557bec23a6ebfb0e148cc989f041>.
- [6] 郑捷, 方庆全, 陈安敏. 病理冷冻切片组织速冻与解冻方法的优化 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2020, 29(4): 358-363.
- [7] 曾晓蓓, 张立新, 甄亚平, 等. 制备组织石蜡切片琼脂预包埋法的应用性探讨 [J]. 实验技术与管理, 2008, 25(12): 52-53, 57.
- [8] 时维平, 史海磊, 付广明, 等. 琼脂糖明胶在组织脱水前预包埋中的应用 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(3): 365-366.
- [9] 杜萍, 马国荣, 张瑜. 蛋清液细胞石蜡包埋法联合免疫组化在胸腹水诊断中的应用 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(3): 340-341.
- [10] 刘天助, 颜晓慧, 汪鑫, 等. 一种新的肿瘤干细胞球囊研究技术——蛋清包埋技术 [J]. 中华神经医学杂志, 2012, 11(12): 1200-1203.
- [11] Pingitore P, Sasidharan K, Ekstrand M, et al. Human multilineage 3d spheroids as a model of liver steatosis and fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7): 1629.
- [12] 李丽, 陈菲, 包春娟, 等. 一种肠类器官样本快速石蜡块的制作方法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(9): 1131-1133.
- [13] 陈曦, 冯雁, 刘莹照, 等. 一种卵巢癌类器官的制备方法建立及鉴定 [J]. 中国癌症防治杂志, 2021, 13(3): 248-252.
- [14] 万光升, 张新艳. 小鼠小肠类器官体外培养体系的建立与应用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(5): 513-518.
- [15] Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research [J]. Biotechnol J, 2008, 3(9-10): 1172-1184.
- [16] Santo VE, Rebelo SP, Estrada MF, et al. Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs [J]. Biotechnol J, 2017, 12(1): 10.

[收稿日期] 2021-12-13