

专题: 软物质研究进展

癌细胞体外实验模型及成型技术现状和展望*

王高¹⁾ 王晓晨²⁾ 刘婷¹⁾ 刘如川^{1)†} 刘雳宇^{1)‡}

1)(重庆大学物理学院, 重庆 401331)

2)(中国科学院物理研究所, 北京 100190)

(2016年8月8日收到; 2016年8月24日收到修改稿)

传统的癌症研究是通过观察实验小白鼠的活体组织切片了解肿瘤的形成及癌症的各阶段发展情况, 相比于活体实验, 癌细胞的体外实验因为可以灵活地操控实验变量和实时观测癌细胞生长和发育的特点从而得以快速发展. 但进一步的研究发现, 在诸如培养皿二维环境中培养的细胞的行为在很大程度上与其实际所处的三维环境中的细胞行为有着巨大的差异. 因此借助于微加工和微流体技术以及近年来蓬勃发展的生物3-D打印技术、飞秒激光直写技术和水凝胶的紫外光固化等技术, 越来越多的癌细胞体外三维实验模型得以制造并用于癌症的研究. 但同时, 现有的技术也面临着精度与速度的矛盾和模型材料的生物相容性等问题. 本文讨论了二维及三维癌细胞体外侵袭转移实验的模型及制造技术的优缺点, 简要介绍了最新的研究进展, 分析提出了未来几年三维实验模型成型技术的发展方向, 为相关研究提供新的实验思路.

关键词: 癌细胞侵袭转移实验模型, 三维结构成型技术, 癌症生物物理

PACS: 87.19.xj, 87.80.-y, 87.17.Rt

DOI: 10.7498/aps.65.188700

1 引言

过去三十年来, 癌症研究中逐步建立的癌症侵袭-转移级联反应模型描述了癌细胞从原发灶脱离后入侵细胞外基质组织的局部侵袭行为(local invasion), 然后经由内渗过程(intravasation)进入到淋巴管或血管系统并参与到机体的循环过程(circulation)从而扩散至全身, 当遇到合适的部位时再通过外渗过程(extravasation)从血管迁出并定植(colonization)于新的组织或器官. 但研究表明, 仅有近1%的癌细胞会发生上述的侵袭转移过程, 但却有90%以上的癌症致死与癌细胞在人体内的侵袭和转移相关^[1,2]. 所以, 关于癌症侵袭转移的研究吸引了大批科研工作者, 促进了该领域的研究进展.

科学家们从不同角度对癌细胞的行为进行研究并总结出癌细胞不同的特征, 其中, 从生物学角度总结出癌细胞的八大特征, 包括: 具有持续的增殖信号(sustaining proliferative signaling), 能规避生长抑制(evading growth suppressor), 会进行侵袭和转移(activating invasion and metastasis), 可以保持复制永生性(enabling replicative immortality), 能诱导血管增生(inducing angiogenesis), 可抗细胞凋亡(Resist cell death), 其能量代谢异常(deregulating cellular metabolism)并且可以逃脱免疫清除(evade immunological destruction)^[3]. 而从生物物理软物质的角度总结出癌细胞的四个特征是: 具有无限增殖能力(reproductive immortality), 具有抗失巢凋亡能力(anoikis resistance)^[4], 会进行定向迁移(directional mobility), 形变能力得到增强(increased deformability)^[5]. 不同的考

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB837200)、国家自然科学基金(批准号: 11474345)和重庆市前沿与应用基础研究计划(批准号: cstc2013jcyjA10047)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: liu@iphy.ac.cn

‡ 通信作者. E-mail: phyliurc@cqu.edu.cn

察角度催生了不同的研究思路,传统的癌症研究侧重于分析癌症内部的分子机理及其作用的信号通路,而癌症生物物理研究者倾向于研究癌细胞群体的侵袭和转移的模式与途径,并考察细胞间的协作与共进化关系,从而分析癌症的特征.

一般将癌细胞的侵袭模式分为单细胞运动、多细胞运动和整体组织动态行为三大类.其中,单细胞运动不会导致癌细胞的扩散和组织破坏,而组织整体动态行为则是与肿瘤的恶化密切相关的一种侵袭模式.癌细胞侵袭模式的多样性与多种因素相关,包括细胞间的连接、超细胞收缩性和细胞黏附性等.近年来科学家们发现,动物细胞生长的物理材料表面并不是只起到一般的机械支撑作用,细胞能够借助其附着材料表面感知周围环境的机械力学属性^[6].细胞的形态结构形成、增殖分化和迁移等都需要锚定在一定属性的表面才能正常进行,否则细胞会发生失巢凋亡现象.可见,细胞所处的环境对细胞的生长和发育及细胞行为都具有极其关键的作用,这也强调了在进行癌细胞的体外模拟实验时,实验模型尽可能高的仿真度才能保证实验结果的可靠性.

对癌细胞转移的研究发现,蛋白异常是癌细胞发生转移的主要内部原因,若细胞E-cadherin发生变化,则细胞与细胞之间的连接会松散,同时细胞与基质间的连接也会变得不稳定^[7-9].当Rho家族蛋白异常时,癌细胞的迁移能力迅速加强从而可以脱离原发灶^[10].由于癌细胞的形变能力被加强,使得其能够穿过由胶原蛋白纤维构成的微孔状细胞外基质,像金属蛋白酶的产生则会降解一部分细胞外基质,从而加剧了癌细胞向血管和淋巴管的渗透^[11,12].细胞的迁移与细胞上黏着斑的分布有关.研究表明,细胞是通过分泌可以附着在基质表面的蛋白,并通过细胞跨膜表面受体与之相结合形成黏着斑,从而锚定在基质表面上的;而细胞在附着表面的运动则是通过其前端伸出的伪足中新生的黏着斑的拉扯,及后端黏着斑的收缩共同驱动,从而产生迁移运动的.由此可见,不仅癌细胞的侵袭实验要求实验模型的高度仿真,癌细胞的转移实验也对实验模型的仿真度提出了很高的要求.

癌细胞对环境因素的敏感促使科研工作者们不断改进实验模型,同时发展新的实验手段.从小白鼠的活体实验到体外培养皿中的实验,实现了癌

细胞的灵活操纵和实时观测,但研究发现,癌细胞在培养皿等二维生长环境中的行为与实际三维环境中的癌细胞行为有较大的差异^[13-15],因此构建比较接近于细胞生长的实际环境的三维结构模型是十分必要的.

2 癌细胞的侵袭转移实验模型

本节将分别介绍传统的二维环境下癌细胞的侵袭转移实验模型以及借助微加工微流体芯片技术、生物3-D打印技术、飞秒激光三维直写技术和水凝胶的紫外光固化等技术构造的三维结构中癌细胞的侵袭转移实验模型.对比两类实验模型的优缺点,并对这些技术的使用和发展进行分析.

2.1 二维癌细胞侵袭转移实验模型的构建

研究癌细胞的行为及癌细胞侵袭转移的调控因素对于癌症的有效治疗和控制癌症的扩散具有极其重要的意义.通过实验控制癌细胞生长的环境因素,定量分析实验结果以理解癌细胞侵袭转移过程中的各种细胞行为.目前,运用较为广泛的实验模型有两类:琼脂平板(agar plate)和侵袭小室(boyden assay).

1) 琼脂平板实验是在培养皿中均匀铺上琼脂或明胶,让其形成一层凝胶,然后在凝胶层上制造一些腔体,将细胞和需要测试的趋化因子放在其中,趋化因子会经由琼脂或明胶扩散形成有一定浓度梯度的状态,细胞受不同浓度的趋化因子的吸引而逐渐扩散.在一定时间内通过统计另外一端腔体中细胞的数量便可以推测出细胞的迁移运动能力.

2) 侵袭小室是由上腔体和下腔体构成的,两腔体之间由过滤层相隔,过滤层可根据实验需要由细胞外基质成分构成.将有侵袭性的细胞放在上层腔体中而在下层腔体中注入含测试趋化因子的液体.细胞受趋化因子的吸引便会从上层腔体经由过滤层的小孔进入到下层腔体中.一定时间后统计下层腔体中的细胞数量则可量化此类细胞的侵袭扩散能力.

上述两种实验装置被广泛用于癌细胞的侵袭转移实验中,因其比较直观并且可方便地调控实验参数,受到科学家们的青睐.但其缺点也是明显的,不论是琼脂平板还是侵袭小室,癌细胞在迁移扩散过程中实际所处的环境都是二维的.侵袭小室虽然

上下腔体提供了三维环境, 但当其经过小孔时会紧贴小孔壁向下迁移, 所以依旧是一般的二维运动. 所以, 若想模拟出癌细胞在人体内所处的三维实验环境, 则需要构建新的实验装置.

Trepat 等和 Irimia 等使用微流体芯片对癌细胞的迁移进行了研究, 包括实时观测细胞间力的大

小分布^[16]和观察单个细胞在微米级管道中的动力学行为^[17], 如图 1 所示. 两实验装置可直观地表明癌细胞的一些特征, 但其仍旧是二维表面的癌细胞行为. 而 Wu 等^[18]研究发现, 在三维条件下, 持续性随机行走模型不能很好地描述方向相关性较强的细胞运动情况.

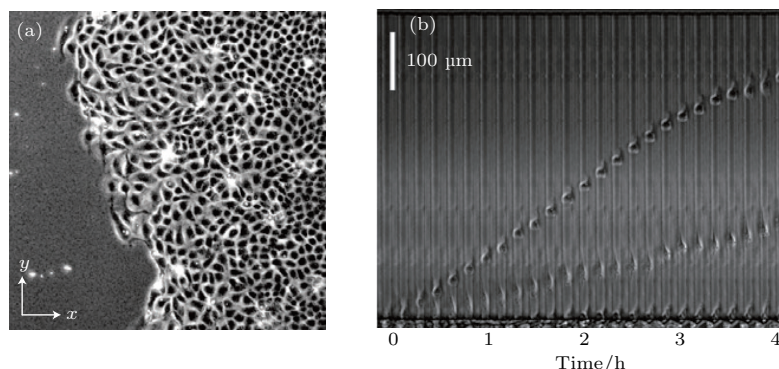


图 1 (a) 细胞在平面上繁殖, 达到饱和后向四周移动^[16]; (b) 从时间上连续观察乳腺癌细胞 MDA-MB-231 随微米级管道自下方向上方迁移^[17]

Fig. 1. (a) Cell reproduce on the plane, and spreading when reach saturation^[16]; (b) observing MDA-MB-231 breast cancer cells' moving in micron channel over time^[17].

2.2 三维癌细胞侵袭转移实验

二维癌细胞侵袭转移实验的不足使得科学家们将目光投向三维高仿真实验模型. 要同时兼顾到模型的仿真度和材料的生物相容性, 导致构建体外模拟癌细胞生存环境的三维结构变得十分困难, 需要同时结合材料、生物、物理和信息学等相关领域的先进技术^[19,20]. 最近几年, 快速发展的生物 3-D 打印技术、飞秒激光三维直写技术、水凝胶的紫外光固化技术和微加工与微流体芯片等先进技术为构建实验所需高精度三维结构带来了良好的契机.

2.2.1 生物 3-D 打印技术

相较于一般使用固体或金属为材料的普通 3-D 打印, 生物 3-D 打印在使用的材料上有很大的不同,

因为要考虑到生物兼容性问题, 所以生物 3-D 打印的材料偏向于凝胶类. 可以将细胞和凝胶通过喷头按一定的流量喷出, 一层一层累积成三维立体结构, 文献^[21, 22]借此技术发展了活组织的快速成型技术, 也有研究团队借助海藻酸钠和氯化钙的固化反应将混合细胞的海藻酸钠通过 3-D 打印技术固化成三维微孔结构, 用于研究成骨细胞和间质干细胞在该结构中的存活率^[23], 如图 2 所示. 生物 3-D 打印可以将细胞和具有生物兼容性的材料累积构造各种各样的形状用于对人体内不同的组织结构进行高度仿真, 相比二维结构中的实验具有更高的准确性. 但形成的三维结构很难用现有的设备对结构内部的细胞进行实时观察和跟踪, 这也是当前三维结构观测的主要难题.

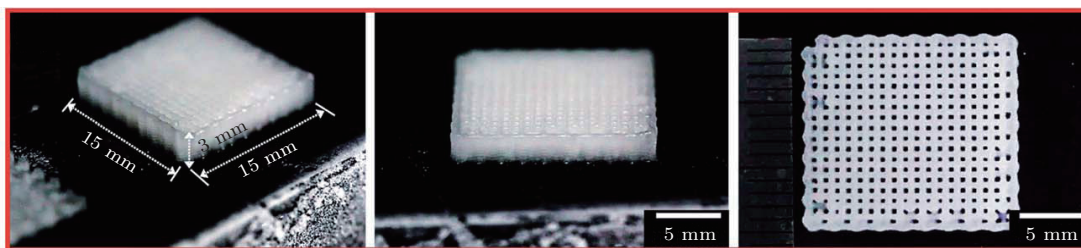


图 2 利用海藻酸钠和 CaCl_2 的固化反应由 3 D 打印技术制造的三维微孔结构^[23]

Fig. 2. Producing 3-D micro pore structure with sodium alginate and CaCl_2 reaction^[23].

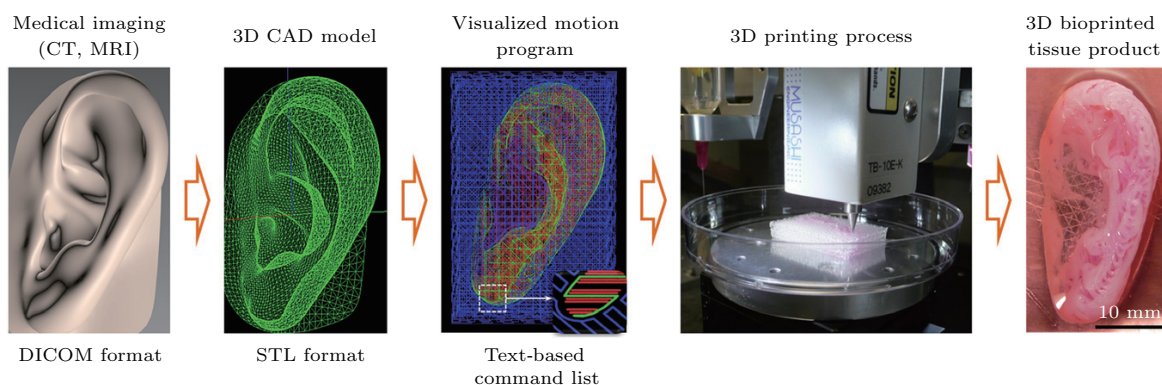


图3 模拟靶组织或靶器官的3-D模型自动化打印的CAD/CAM处理, 将医学图像数据转化为三维CAD模型, 然后编程为包含结构数据的可视化动作程序, 通过气动压力喷出材料实现3-D打印^[24]

Fig. 3. CAD/CAM process for 3-D model, which is imitating target tissue or organ, and it could be printed automatically. The model is made with medical image data, and the structure data is involved in program, which could be printed by 3-D Bioprinter^[24]

维克森林大学最新研制出的完整组织器官打印机 (ITOP), 可进行稳定的宏观组织打印, 包括颌骨和颅顶的骨头、软骨和骨骼肌等^[24]. 图3所示为人耳结构的3-D打印, 其使用水凝胶和生物降解物质作为打印材料, 可为医疗和医学研究带来极大的便利, 并对组织工程的研究产生重要影响.

2.2.2 飞秒激光三维直写技术

飞秒激光三维直写技术是利用双光子聚合化学反应, 促使光引发剂和光敏化剂吸收双光子, 使得聚合物发生单体链式聚合反应, 从而使材料发生固化. 因为该技术利用的是激光, 所以其优势在于精度特别高, 可以制造出非常精细的立体结构^[25-27]. Buckman等^[28]利用该技术制造了如图4所示的精细组织支架, 而Kim等^[29]用其制作

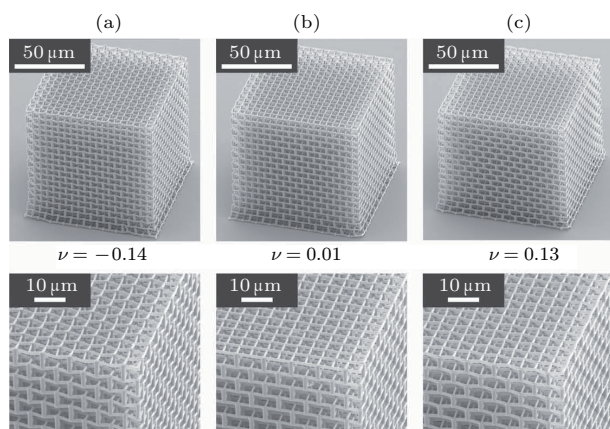


图4 利用三维激光直写技术制造的组织支架结构^[28]

Fig. 4. Organization structure made by direct femtosecond laser writing technology^[28].

微型机器人, 用于研究细胞在这些支架和微型结构上的生长及分布情况. 但考虑到加工过程是使用激光逐点固化, 所以该技术无法将细胞与材料的混合物固化, 并且加工的时间比较长.

2.2.3 水凝胶的紫外光固化技术

水凝胶的紫外光固化技术原理是利用水凝胶材料在紫外光下会发生聚合交联固化作用, 从而制造出有一定强度的三维结构^[30-32]. 相较于飞秒激光三维直写技术, 水凝胶的紫外光固化是采取投影面扫描的办法一次成型一个面, 然后逐层扫描得到立体结构, 所以成型速度大大提高.

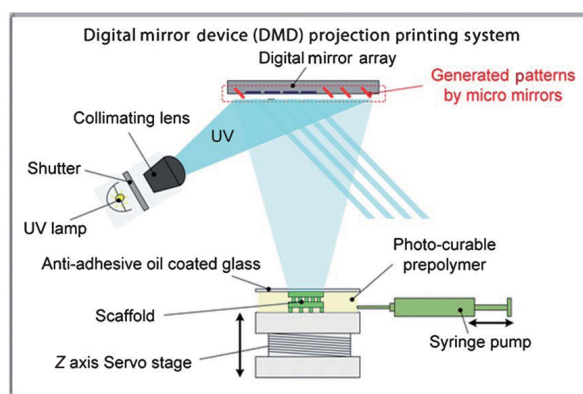


图5 紫外光固化水凝胶的结构原理图^[33]

Fig. 5. Structural schematic diagram of UV curing hydrogel technology^[33].

图5所示为Soman等^[33]制作的通过水凝胶的紫外光固化技术制造三维支架的结构原理图, 包含了紫外光源、三维平台、光学系统和注入系统等. 水凝胶的紫外光固化可以保证结构的精度, 而且成型的速度也相对较快, 所以目前该技术是非常

被看好的一种三维结构成型技术. 不过, 该技术主要应用于打印生物兼容性支架, 并将细胞种植在支架上^[33]. 而此过程无法保证在打印包含细胞结构时, 胞内结构如DNA等在紫外线的照射下不被破坏. 所以该技术若要成熟广泛地使用还要很多工作要做.

2.2.4 微加工与微流体芯片技术

通过离子刻蚀技术, 将微加工工艺硅片制造出三维高台结构的技术, 被科学家用来研究不同

细胞在高台结构上的移动特征和不同细胞群体的差异性行为, 从而分析癌细胞入侵血管的过程^[34]. 图6所示为刘雳宇研究组^[34]关于前列腺肿瘤转移性和非转移性细胞在模拟三维微结构中的侵袭实验结果. 对比两种细胞在微型高台结构上的不同表现, 特别是LNCaP细胞在二维表面并没有出现这样的接触抑制现象, 更加引起科学家们对癌细胞在二维环境条件下的实验结论的怀疑, 并进一步激励科学家们探索癌细胞在三维实验模型下的各种行为特征.

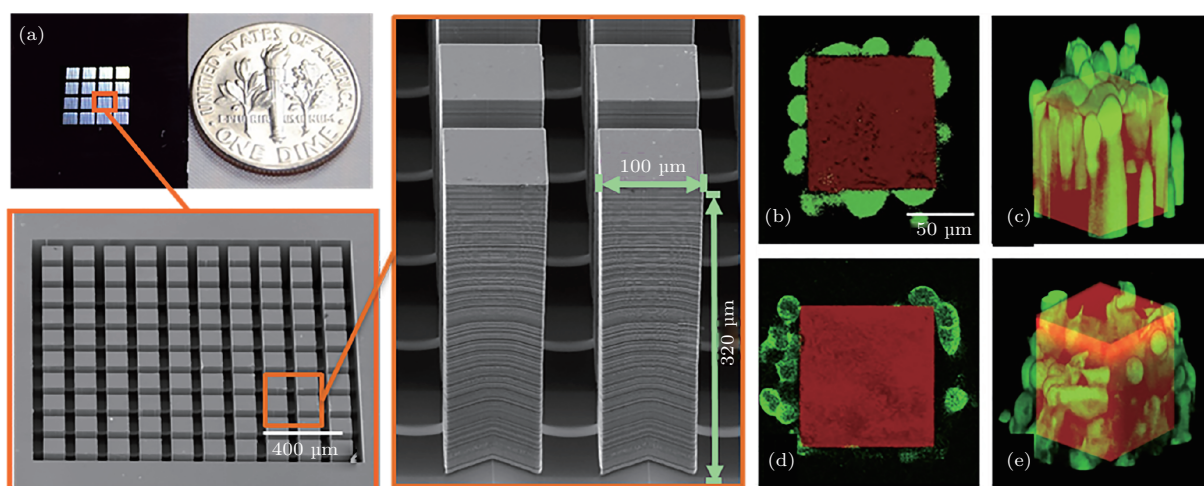


图6 绿色荧光染色的前列腺肿瘤细胞在高台垂直平面上爬行的形态 (a)为硅片上利用离子刻蚀技术造出的微型阵列结构; (b)和(c)为转移性PC-3细胞; (d)和(e)为非转移性LNCaP细胞, 可以看到非转移性癌细胞LNCaP由于空间的接触抑制机理导致三维空间的高台上表面始终不能被占据, 而转移性的PC-3细胞会占满整个高台^[34]

Fig. 6. GFP-tagged prostate tumour cells crawl on the vertical plane of hathpace: (a) Miniature array structure is produced by ion etching technology on silicon slice; (b), (c) metastatic PC-3 cells; (d), (e) non-metastatic LNCaP cells; it shows that LNCaP cells couldn't occupy the upper surface of hathpace but metastasis PC-3 cells could occupy the whole upper surface^[34].

刘雳宇组^[35]也通过微流体芯片技术研究发现胶原蛋白纤维的取向会在很大程度上促进癌细胞向血管的内渗转移进程. 图7所示为胶原纤维在癌细胞入侵细胞外基质和穿透人工基底膜时起引导作用的实验过程. 由此提出的“组织疗法”概念, 即通过改变组织内胶原纤维的取向从而将癌细胞侵袭的概率降至最低, 为癌症的治疗提供了一个全新的思路.

微加工可以在硅片这样的固体材料上制造实验需要的三维结构, 这是上述其他三种技术难以做到的, 对于模拟一些癌细胞侵袭转移的过程具有极高的重要性. 但微加工和微流体芯片对制造精度要求较高, 且结构对芯片的模具依赖性高, 在一些情形下也很难满足实验需求.

2.2.5 生物4-D打印技术

最近报道的生物4-D打印技术是将包含有局部经过结构设计的纤维素纤维的水凝胶复合物打印成三维结构, 然后将此结构置于水中, 因其各向异性的吸水膨胀行为, 一段时间后便可按设计形成稳定的复杂结构, 如图8所示. 但图8中的结构所使用的材料是N, N-二甲基丙烯酰胺, 所以该结构不具有可逆性. 若使用热敏性材料N-异丙基丙烯酰胺, 则可以通过加热和冷却, 实现结构的可逆变化^[36]. 此技术在三维结构的基础上增加了时间维度, 可以使结构随时间产生灵活的变化, 有望为相关生物组织结构领域的研究带来突破性进展, 但其制作的难度特别高, 且制作的周期较长, 很大程度上阻碍了该技术的使用.

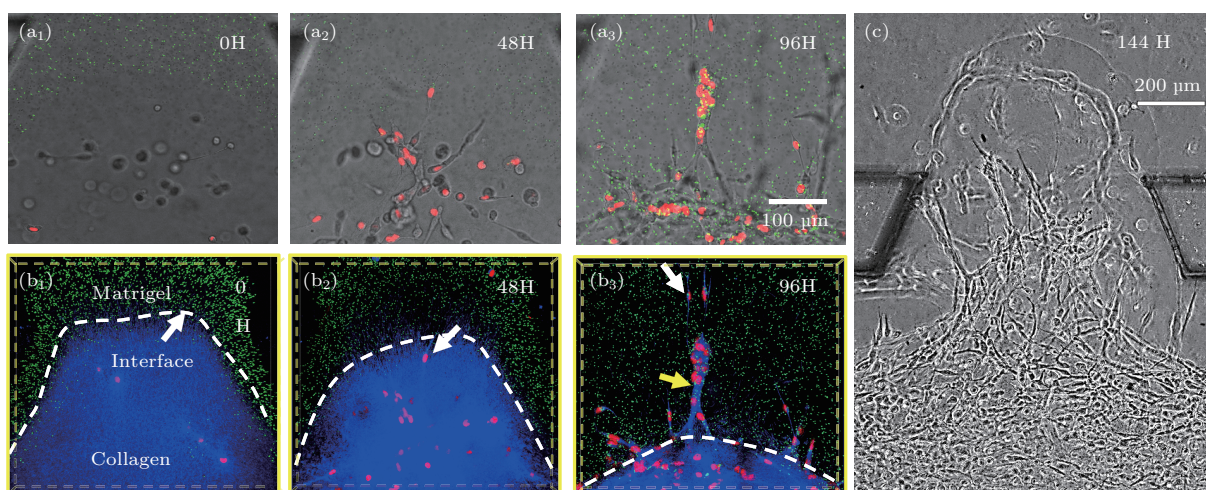


图7 MDA-MB-231 细胞向复合细胞外基质的侵袭进程被加强 (a₁)—(a₃) 是每隔 48 h 在明场光下拍摄的侵入基质的细胞; (b₁)—(b₃) 是在反射式荧光条件下拍摄的图像, 绿色为人工基底膜区域, 蓝色为胶原蛋白区域, 其中红色的是侵袭性细胞, 可以清晰地看到 96 h 时, 在同一观察视野下, 有胶原纤维的引导, 这些细胞形成团块并侵入了坚硬的基底膜, 形成了溪流型的侵入形状; (c) 显示了在 114 h 时, 细胞穿透了基底膜区域, 表明了胶原蛋白纤维对 MDA-MB-231 细胞侵袭作用具有极大的促进作用 [35]

Fig. 7. The process of MDA-MB-231 cells invading into the composite ECM is enhanced: Panels (a₁)—(a₃) show cells' condition images under the bright-field, and they are taken every 48 h; panels (b₁)—(b₃) show cells' condition images under fluorescent with combined with reflective mode, in these images, green field is Matrigel, blue field is collagen, and red spots are invading cells; these images indicate that at 96 th hour, cells have invade into rigid Matrigel along the direction of collagen; panel (c) show that at 144 th hour, cells have broken through the Matrigel; it is clear that collagen could enhance MDA-MB-231 cells' intravasation process [35].

由上述对近年来广泛使用的癌细胞侵袭转移实验模型的加工制造技术的介绍可以看出, 三维结构的制造不仅要选择适当的材料保证细胞的存活率, 还要有一定的精度和尽可能快的成型速度, 这就对现有的加工制造技术提出了更高的要求. 另外, 三维立体结构相对于普通的二维模型在癌细胞行为的实时观测上也遇到了很大的难题, 特别是当立体结构的透明度低时, 这样的观测更是难以实现.

3 癌细胞体外侵袭转移实验的困难及发展方向

癌细胞在人体内的各种行为具有很大的差异性和复杂性, 所以在体外建立各种模型模拟癌细胞的行为本身也是极其困难的, 但随着科学技术的日新月异及科学家们日复一日的努力, 现今的癌细胞体外侵袭转移实验已经取得了很多实实在在的成果, 为人类战胜癌症增添了许多新的力量. 但同时, 我们也发现目前的技术在一定程度上仍难以满足实际的实验需求, 主要体现在以下几个方面.

1) 具有生物相容性的材料在成型时很难模拟癌细胞在人体内的实际环境机械力学属性. 这会导

致细胞在模型结构中的行为与实际的行为有较大的差异.

2) 三维结构成型时, 若使用激光或紫外光, 则难以将细胞与材料混合后进行固化. 一方面, 细胞可能在固化过程中直接死亡; 另一方面, 存活下来的细胞很难保证其没有发生基因突变或者内部结构的破坏.

3) 目前的三维结构成型技术的速度不是很快, 这会导致细胞在模型的各个部位处存在的时间有很大的差异, 由此带来的实验误差是很难估量的. 同时, 速度太慢的成型技术也会极大地影响实验的效率.

4) 相比于二维模型, 三维结构在模拟癌细胞的实际行为上迈出了重要的一步, 但同时, 癌细胞在三维结构中行为的观测却成了一个很大的难题. 而且在三维结构中, 若想对细胞进行操纵, 也将是一件极其困难的事.

这些困难的出现, 在一定程度上阻碍了癌细胞体外侵袭转移实验的研究, 使得实验结果很难准确反映出癌细胞的真实特征. 不过, 这些困难更激发了科研工作者攻克癌症的坚定步伐. 同样, 这一个个难关的攻克将在未来几年里引领癌细胞的体外侵袭转移实验上的突破. 我们预计突破点可能如下:



图8 用4-D生物打印技术制作复杂花朵形态 (a), (b)简单的花朵可由 90° , 0° , -45° 和 45° 纤维构成;在花瓣变形过程中,双分子层控制每片花瓣的弯曲方向(比例尺:5 mm,插入图为2.5 mm);(c)打印的结构;(d)使结构膨胀;(e)花状结构呈现出一系列有天然兰花的形态结构;(f)经过此打印过程,此兰花结构展示了四种不同的形态:弯曲、扭曲、花冠周围的褶皱和中央区域的漏斗形状(比例尺:5 mm) [36].

Fig. 8. Complex flower morphologies generated by biomimetic 4-D printing: (a), (b) Simple flowers composed of 90° , 0° , -45° and 45° cellulose fibrils (scale bars, 5 mm; inset = 2.5 mm); (c) printed structure; (d) make the structure swollen; (e) this flower structure demonstrate a lot of morphologies that a native orchid have; (f) after the printing process, the flower structure shows four different morphologies: bending, twisting and ruing corolla surrounding the central funnel-like domain (scale bars, 5 mm) [36].

1) 将细胞包被在具有生物相容性的材料中,然后再与成型材料混合进行立体结构的制造,解决生物相容性与材料机械力学属性的矛盾;

2) 发展无害光源或能使细胞屏蔽有害光源的立体结构成型技术,保证细胞能够存活且结构不被破坏的情况下快速建立三维立体模型;

3) 进一步发展微加工与微流体芯片技术,使用高密度的微通道实现在三维空间中对细胞的操控及实验变量的精细调控;

4) 改进现有的细胞观测技术或发展新型观测技术,实现对三维立体结构中细胞行为的实时观测和测量.

可以相信,随着科学技术的快速发展及科学家们对癌症研究的深入,人类在和癌症的斗争中将有更大的把握赢得胜利.

参考文献

- [1] Sleeman J, Steeg P S 2010 *Eur. J. Cancer* **46** 1177
- [2] Steeg P S, Theodorescu D 2008 *Nat. Clin. Pract. Onco.* **5** 206
- [3] Hanahan D, Weinberg R A 2011 *Cell* **144** 646
- [4] Frisch S M, Ruoslahti E 1997 *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 701
- [5] Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T 2012 *PLoS One* **7** e46609

- [6] Discher D E, Janmey P, Wang Y L 2005 *Science* **310** 1139
- [7] Liu W F, Nelson C M, Pirone D M, Chen C S 2006 *J. Cell Biol.* **173** 431
- [8] Pishvaian M J, Feltes C M, Thompson P, Bussemakers M J, Schalken J A, Byers S W 1999 *Cancer Res.* **59** 947
- [9] Nieman M T, Prudoff R S, Johnson K R, Wheelock M J 1999 *J. Cell Biol.* **147** 631
- [10] Poincloux R, Collin O, Lizarraga F, Romao M, Debray M, Piel M, Chavrier P 2011 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** 1943
- [11] Chabottaux V, Noel A 2007 *Clin. Exp. Metastasis* **24** 647
- [12] Hegedus L, Cho H, Xie X, Eliceiri G L 2008 *J. Cell. Physiol.* **216** 480
- [13] Pampaloni F, Reynaud E G, Stelzer E H 2007 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** 839
- [14] Meyer A S, Hughes-Alford S K, Kay J E, Castillo A, Wells A, Gertler F B, Lauffenburger D A 2012 *J. Cell Biol.* **197** 721
- [15] Sung K E, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A, Beebe D J 2013 *PLoS One* **8** e76373
- [16] Trepap X, Wasserman M R, Angelini T E, Millet E, Weitz D A, Butler J P, Fredberg J J 2009 *Nat. Phys.* **5** 426
- [17] Irimia D, Toner M 2009 *Integr. Biol.* **1** 506
- [18] Wu P H, Giri A, Sun S X, Wirtz D 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** 3949
- [19] Malda J, Visser J, Melchels F P, Jungst T, Hennink W E, Dhert W J A, Groll J, Huttmacher D W 2013 *Adv. Mater.* **25** 5011
- [20] Derby B 2012 *Science* **338** 921
- [21] Zorlutuna P, Annabi N, Camci-Unal G, Nikkhah M, Cha J M, Nichol J W, Manbachi A, Bae H, Chen S, Khademhosseini A 2012 *Adv. Mater.* **24** 1782
- [22] Xu T, Zhao W, Zhu J M, Albanna M Z, Yoo J J, Atala A 2013 *Biomaterials* **34** 130
- [23] Ahn S, Lee H, Lee E J, Kim G H 2014 *J. Mater. Chem. B* **2** 2773
- [24] Kang H W, Lee S J, Ko I K, Kengla C, James J, Yoo J, Atala A 2016 *Nat. Biotechnol.* **34** 312
- [25] Gill A A, Ortega I, Kelly S, Claeysens F 2015 *Biomed. Microdevices* **17** 27
- [26] Selimis A, Mironov V, Farsari M 2015 *Microelectron. Eng.* **132** 83
- [27] Wang J, Auyeung R C, Kim H, Kim H, Charipar N A, Pique A 2010 *Adv. Mater.* **22** 4462
- [28] Buckmann T, Stenger N, Kadic M, Kaschke J, Frolich A, Kennerknecht T, Eberl C, Thiel M, Wegener M 2012 *Adv. Mater.* **24** 2710
- [29] Kim S, Qiu F, Kim S, Ghanbari A, Moon C, Zhang L, Nelson B J, Choi H 2013 *Adv. Mater.* **25** 5863
- [30] Cha C, Soman P, Zhu W, Nikkhah M, Camci-Unal G, Chen S, Khademhosseini A 2014 *Biomater. Sci.* **2** 703
- [31] Hong S, Sycks D, Chan H F, Lin S, Lopez G P, Guilak F, Leong K M, Zhao X 2015 *Adv. Mater.* **27** 4035
- [32] Soman P, Kelber J A, Lee J W, Wright T N, Vecchio K S, Klemke R L, Chen S 2012 *Biomaterials* **33** 7064
- [33] Soman P, Fozdar D Y, Lee J W, Phadke A, Varghese S, Chen S 2012 *Soft Matter* **8** 4946
- [34] Liu L, Sun B, Pedersen J N, Yong K A, Getzenberg R H, Stone H A, Austin R H 2011 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** 6853
- [35] Han W, Chen S, Yuan W, Fan Q, Tian J, Wang X, Chen L, Zhang X, Wei W, Liu R, Qu J, Jiao Y, Austin R H, Liu L 2016 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (in press)
- [36] A. Sydney Gladman, Matsumoto E A, Nuzzo R G, Mahadevan L, Lewis J A 2016 *Nature. Mater.* **15** 413

SPECIAL TOPIC — Progress in Soft Matter Research

In vitro experimental models and their molding technology of tumor cell*

Wang Gao¹⁾ Wang Xiao-Chen²⁾ Liu Ting¹⁾ Liu Ru-Chuan^{1)†} Liu Li-Yu^{1)‡}1) (*College of Physics, Chongqing University, Chongqing 401331, China*)2) (*Key Laboratory of Soft Matter, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

(Received 8 August 2016; revised manuscript received 24 August 2016)

Abstract

Traditional cancer researches focus on the analyses of the mice biopsy in order to understand the formation of cancer and the stage of cancer development. In contrast to in vivo experiments, in vitro investigation of cancer cells provides the flexible manipulation of the experimental parameters and the real time observation of the growth and reproduction of cancer cells, thus has been developing rapidly. However, further studies have demonstrated that cells' behavior in a two-dimensional (2 D) environment, e. g. petri dish, is dramatically different from that in a three-dimensional (3 D) environment. Therefore, with assistance of bio-microfluidic chips, 3 D bio-printing, direct femtosecond laser writing technology and UV curing hydrogel technology, an increasing number of 3 D models have been developed to investigate the behaviors of cancer cells in vitro. Nevertheless, the existing technology is also facing the contradiction between accuracy and speed requirements, as well as the biocompatibility and biodegradability of scaffold materials in use.

In this paper, we first summarize and compare present 2 D models, e. g. Agar Plate and Boyden Assay, and the developing 3 D models in vitro experimental approaches as mentioned above, and discuss the merits of these fabricating technologies. Then we focus on the recent progress and achievements of 3 D bio-techniques, especially the successful applications in probing the invasion behaviors of cancer cells. Though significant progress has been made from 2 D to 3 D approaches and these in vitro experimental models are becoming more flawless in simulating the in vivo environment of cells, the following challenges remain: 1) biocompatible material with the appropriate mechanic properties simulating the environment in vivo; 2) the viability of cells in the complex 3 D model with of biomaterial, especially during the laser or UV-assisted gelation of hydrogels; 3) the speed and resolution of the present 3 D fabrication technologies; 4) the in situ observation and control of cells. Nevertheless, with the development of 3 D bio-technologies, breakthroughs can be expected in solving those problems, and thus will guide the 3 D experimental models for the invasion of cancer cells in next few years. This will eventually help people in the war towards cancers, and at the same time provide new experimental approaches for other relevant researches in the interdisciplinary fields of biology, physics, chemistry, materials and engineering.

Keywords: invasion and metastasis experimental models of tumor cell, 3-D shape molding technology, cancer biophysical

PACS: 87.19.xj, 87.80.-y, 87.17.Rt

DOI: 10.7498/aps.65.188700

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2013CB837200), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 11374345), and the Fundamental and Advanced Research Program of Chongqing, China (Grant No. cstc2013jcyjA10047)

† Corresponding author. E-mail: liu@iphy.ac.cn

‡ Corresponding author. E-mail: phyliurc@cqu.edu.cn