

# 基于 3D 微肿瘤模型探讨乳腺癌微环境及耐药性

王娟如<sup>1</sup>, 宋巧稚<sup>2</sup>, 刘晓利<sup>1,3</sup>, 吴正升<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022;

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一临床医学院, 合肥 230032; <sup>3</sup> 安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032)

**摘要** 目的 利用液滴微流控技术构建 3D 微肿瘤模型来模拟肿瘤微环境。通过 3D 微肿瘤制造、表征和对化疗药物的敏感性测试, 探究其作为体外乳腺癌研究模型的可行性。方法 将人乳腺癌细胞用水凝胶壳封装在富含胶原蛋白的微胶囊核心中, 获得体外乳腺癌微肿瘤; 将乳腺癌微肿瘤通过 Transwell 系统与 3D 微胶囊化的内皮细胞进行共培养。通过显微镜直接观察微肿瘤的结构和生长特征; 采用 CCK-8 实验检测不同培养模型下细胞的增殖情况以及对阿霉素的药物敏感性; 采用流式细胞术比较增殖过程细胞凋亡的差异; 采用划痕实验和 Transwell 实验评估细胞迁移和侵袭能力的差异; 采用 Western blot 法检测细胞上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白的表达。结果 乳腺癌细胞在水凝胶核-壳微胶囊中生长良好; 细胞增殖实验结果显示, 3D 培养和 3D 共培养细胞增殖速度显著低于 2D 培养; 与 2D 培养相比, 3D 培养和 3D 共培养细胞迁移和侵袭能力增强并显示出更高的 EMT 相关蛋白表达; 与 2D 培养相比, 3D 培养和 3D 共培养细胞对化疗药物的敏感性显著降低。结论 3D 培养表现出与体内肿瘤相似的形态结构和生物学特征且对化疗药物耐药性更高。

**关键词** 3D 培养; 共培养; 核-壳微胶囊; 肿瘤微环境; 化疗耐药

**中图分类号** R 73-354

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)11-2004-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.016

乳腺癌是全球女性中最常见的癌症<sup>[1]</sup>。癌症研究中的大多数体外研究都是在 2D 模型下进行的, 随后在体内动物模型中进行验证。然而, 2D 模型无法准确模拟肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME), 动物模型存在伦理学和高成本等局限性<sup>[2]</sup>。作为肿瘤细胞生物学和组织工程之间的交叉点, 3D 体外肿瘤模型能更准确地模拟体内微环境, 它有可能缩小传统 2D 细胞培养和体内肿瘤细胞学实验之间的差距<sup>[3]</sup>。其中, 微胶囊化可以更准确地模拟细胞外基质的微环境, 液滴微流控技术也为 3D 培养的微胶囊化和小型化开辟了新的潜力, 但其低产量、低效率以及复杂的工艺导致该技术无法广泛应用<sup>[4]</sup>。该研究通过构建一种简易的 3D 微肿瘤模型, 探讨该模型是否可作为乳腺癌进展机制研究和筛选抗肿瘤药物的临床前模型。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 人乳腺癌细胞系(michigan cancer foundation-7, MCF-7)和(MD anderson-metastatic breast-231, MDA-MB-231)(中国科学技术大学朱涛教授惠赠), 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)(中国科学技术大学赵刚教授惠赠); 鼠尾胶原蛋白 I 型(货号: C8062)、胶原酶 I(货号: C8140)购自北京索莱宝科技有限公司; EGM-2 BulletKit(CC-4176)购自瑞士 LONZA 公司; 阿霉素(doxorubicin, DOX)(货号: KGA1705-10)购自江苏凯基生物技术有限公司; CCK-8 检测试剂盒(货号: KA231531)购自上海陶术生物科技有限公司; Annexin V-FITC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒(货号: BB-41012)购自上海贝博生物科技有限公司; 基质胶(货号: 356234)购自美国 Corning 公司; E-cadherin(货号: 60335-1-Ig)、N-cadherin(货号: 22018-1-AP)、Vimentin(货号: 60330-1-Ig)购自美国 Proteintech 公司; 多功能酶标仪购自美国 PE 公司; FACS-Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司; PowerPac™ Basic Power Supply 1645050 型电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司。

## 1.2 方法

2024-04-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81972472); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划资助项目(编号: 2020xkjT012)

作者简介: 王娟如, 女, 硕士研究生;

刘晓利, 女, 博士, 讲师, 通信作者, E-mail: lxl\_8512@163.com;

吴正升, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

**1.2.1 微胶囊的封装** 利用液滴微流控技术<sup>[5]</sup>自制装置用于微胶囊封装,该装置(图1)主要由3个直径不同的针头组装而成,包括内径0.16 mm、外径0.30 mm的紫色针头,内径0.60 mm、外径0.90 mm的粉色针头以及内径0.74 mm、外径1.04 mm的黑色针头,通过热熔胶按照图1进行组装,并且保证紫色针头与粉色针头横切面处于同心圆位置,最后与1.5 ml EP管组合,使用中空的泡沫将装置固定于50 ml 离心管中。取 $1 \times 10^6$ 个细胞于EP管内,以1 200 r/min速度离心5 min,弃去上清液,加入646  $\mu$ l 2%羧甲基纤维素钠溶液,混匀后置于冰上备用;然后,将300  $\mu$ l I型鼠尾胶原加到18  $\mu$ l 0.1 mol/L NaOH溶液中,立即混匀,再加入36  $\mu$ l 10 $\times$ 含酚红的PBS,混匀;最后,加入含有细胞的羧甲基纤维素钠溶液,混匀后置于冰上备用,最终I型鼠尾胶原蛋白浓度为1.5 mg/ml(样品);将2%海藻酸钠从入口1注入到装置中,样品从入口2注入到装置中,出口下方连接装有CaCl<sub>2</sub>溶液的EP管。通过改变封装系统的参数(如针头内径的大小、针管与CaCl<sub>2</sub>溶液表面的距离、水凝胶混合比和离心机转速等)可控制微胶囊的生成。

**1.2.2 细胞培养** 2D细胞培养:将MCF-7、MDA-MB-231和HUVCEs细胞分别培养于DMEM高糖完全培养基;3D细胞培养:通过核-壳微胶囊制备装置(图1)将MCF-7、MDA-MB-231和HUVCEs细胞封装入微胶囊;3D共培养:将MCF-7和MDA-MB-231微胶囊置于Transwell上室,HUVCEs微胶囊置于Transwell下室,共同培养于含内皮细胞生长因子的培养基中。

**1.2.3 细胞增殖实验** 2D培养组将对数生长期MCF-7和MDA-MB-231细胞按照500个/孔的密度

接种到96孔板中,每孔约100  $\mu$ l细胞悬液;3D培养组和3D共培养组分别将培养0、1、3、5、7 d的相应微胶囊经胶原酶I消化成单个细胞后在同一时间按照500个/孔的密度接种到96孔板中;没有加入细胞的孔作为空白对照组,设置6个重复孔,每组重复3次。在第0、1、3、5、7天同一时间,每孔加入90  $\mu$ l新鲜培养基和10  $\mu$ l CCK-8检测液,避光孵育2 h后,酶标仪检测孔板的吸光度(optical density, OD)值,检测波长为450 nm(单波长)。统一将第0天的OD值设置为1,所有数据标准化(归一化),活性指数定义为发光值与第0天发光值的归一化比值,利用GraphPad Prism软件作出生长曲线图。

**1.2.4 流式细胞术实验** 2D培养组取对数生长期MCF-7和MDA-MB-231细胞,3D培养组和3D共培养组将微胶囊消化成单个细胞(收集培养基终止消化),4 $^{\circ}$ C PBS洗2次后用Annexin结合液重悬细胞至 $1 \times 10^6$ 个/ml,加入Annexin V-FITC染液避光孵育15 min后,加7-AAD染液避光孵育5 min后在流式细胞仪中检测并分析细胞凋亡率。每组设3个复孔,重复3次。

**1.2.5 划痕实验** 使用marker笔沿直尺在6孔板背后均匀画横线,2D培养组取对数生长期MCF-7和MDA-MB-231细胞,3D培养组和3D共培养组将相应微胶囊消化成单个细胞,接种于6孔板中(细胞量以24 h后铺满为准),培养24 h后,用10  $\mu$ l枪头垂直于细胞平面沿孔板背后横线制造划痕,PBS洗2次后更换无血清培养基,在0和24 h时间点分别拍照。每组设3个复孔,重复3次。使用Image J软件计算不同时间点同一划痕的宽度,得出细胞迁移距离。

**1.2.6 Transwell 迁移与侵袭实验** 2D培养组取对

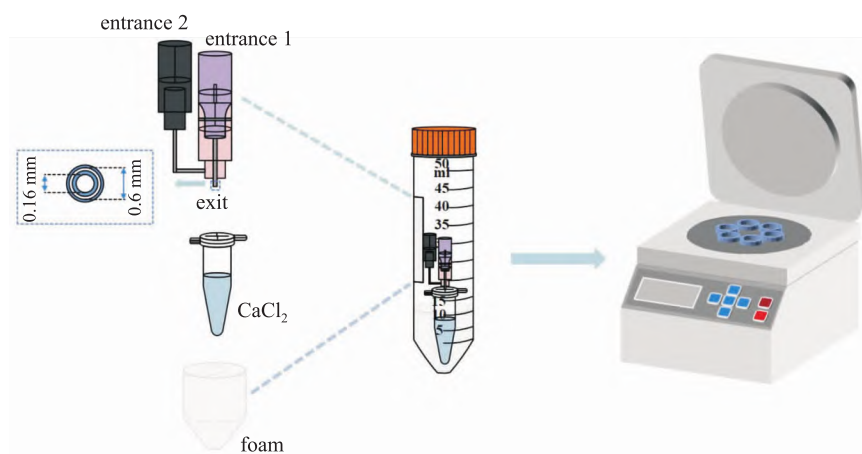


图1 核-壳微胶囊制备装置

Fig. 1 Diagram of the device for the preparation of nucleus-shell microcapsules

数生长期 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞,3D 培养组和 3D 共培养组将相应微胶囊消化成单个细胞,用无血清培养基重悬至每 200  $\mu\text{l}$  悬液含  $1 \times 10^5$  个细胞;Transwell 小室的上室加入 200  $\mu\text{l}$  细胞悬液(侵袭实验的小室提前用 70  $\mu\text{l}$  稀释的基质胶包被),下室加入 700  $\mu\text{l}$  完全培养基;每 6 h 观察 1 次,镜下观察到底部有细胞即可,取出小室,4 % 多聚甲醛固定 30 min,结晶紫染色 15 min,用纯水清洗,棉签擦拭内侧细胞;每个小室随机选取 5 个视野拍照、计数并分析数据。

**1.2.7 Western blot 实验** 2D 组细胞培养 3 d,3D 和 3D 共培养组培养 7 d 后收集细胞,提取蛋白,经电泳、转膜,封闭后,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育一抗过夜;次日,TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h 后,TBST 洗 3 次,使用 ECL 发光液显影。采用 Image J 软件对蛋白条带进行分析,测得条带的灰度值,以各组目的蛋白与内参( $\beta$ -actin)蛋白灰度值的比值来反映目的蛋白的相对表达水平,比较各组间的差异。每组实验重复 3 次。

**1.2.8 化疗药物毒性实验** 2D 培养组将对数生长期 MCF-7(5 000 个/孔)和 MDA-MB-231(3 000 个/孔)细胞接种到 96 孔板中,每孔约 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液;3D 培养组及 3D 共培养组将相应微胶囊消化成单个细胞后同 2D 组操作;培养 24 h 后,更换含不同浓度 DOX(0、5、10、20、40 和 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的培养基再培养 24 h,每个浓度设置 6 个重复孔,每组重复 3 次。每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 检测液,避光孵育 2 h 后,酶标仪检测孔板的 OD 值,检测波长为 450 nm(单波长)。统一将第 0 天的 OD 值设置为 1,所有数据标准化(归一化),利用 GraphPad Prism 软件作出生长曲线图并计算出  $\text{IC}_{50}$ ,绘制细胞生长曲线图并计算半抑制率(median inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ),半抑制率 =  $[(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,配对或非配对的两组数据采用独立样本  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 核-壳微胶囊的制备** 利用液滴微流控技术自制封装装置并通过该模型成功构建 3D 微肿瘤。图 2 显示了 3D 微肿瘤的球形和核壳形态。该微肿瘤模型通过将癌细胞封装和培养在核-壳微胶囊中

来实现,由富含 I 型胶原蛋白的核心组成,封闭在半透性海藻酸盐水凝胶壳中,形成细胞聚集体或微肿瘤,以此模拟体内肿瘤微环境。将微胶囊化的乳腺癌细胞(MCF-7 和 MDA-MB-231)和 HUVECs 细胞通过图 3 Transwell 系统分别培养于上室和下室进行共培养来构建 3D 血管化微肿瘤。

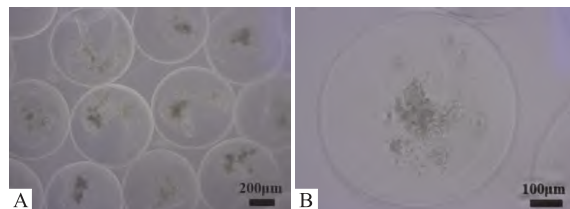


图 2 微胶囊形态和结构

Fig. 2 Morphology and structure of microcapsules

A: Encapsulated and mass-cultured core-shell microcapsules  $\times 40$ ;  
B: Morphology and structure of microcapsules  $\times 100$ .

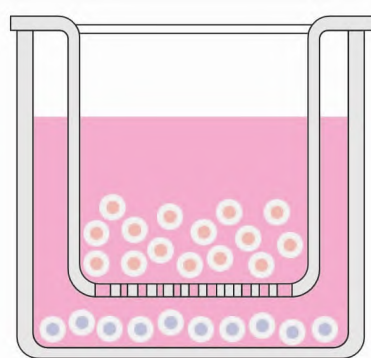


图 3 Transwell 共培养系统

Fig. 3 Schematic diagram of the Transwell co-culture system

**2.2 不同培养模型对乳腺癌细胞增殖与凋亡的影响** 图 4A 显示了 1~9 d 微胶囊中乳腺癌细胞的增殖情况。图 4B、4C 显示,培养第 3 天后,3D 培养组的细胞增殖速度低于 2D 培养组。此外,流式细胞术实验结果显示(图 5),第 3、5 天,3D 培养组的细胞凋亡率较低,与 2D 培养组相比,差异无统计学意义;当 3D 组细胞培养至第 7 天,凋亡率高于 2D 组( $P < 0.05$ )。在第 3、5 和 7 天,3D 组和 3D 共培养组细胞的凋亡率差异无统计学意义;当细胞培养至第 9 天,3D 共培养组培养的细胞凋亡高于 3D 培养组( $P < 0.05$ )。

**2.3 不同培养模型对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响** 划痕结果显示,3D 培养组划痕愈合率较 2D 培养组高,3D 共培养组划痕愈合率较 3D 培养组高。Transwell 迁移实验结果显示,3D 培养组迁移细胞数较 2D 培养组高,3D 共培养组迁移细胞数较 3D

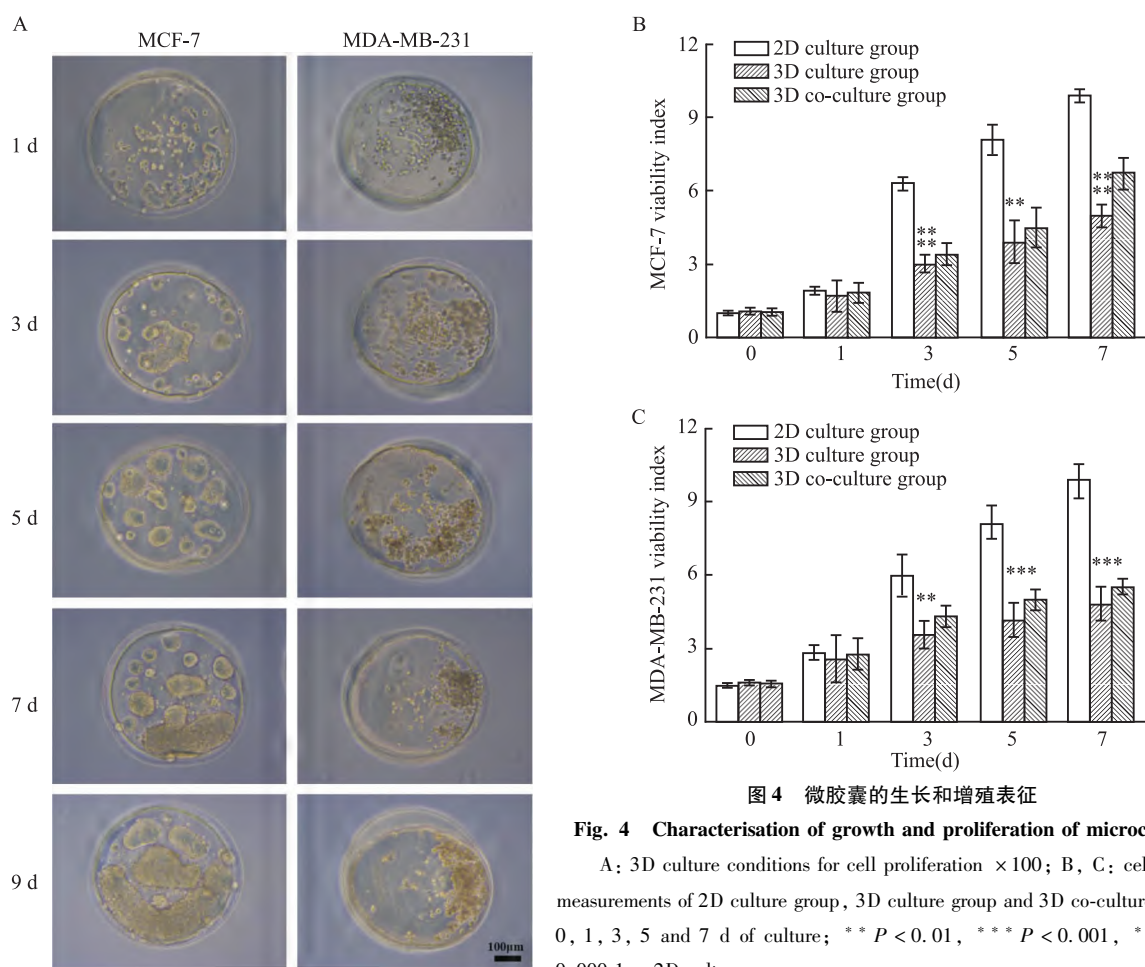


图4 微胶囊的生长和增殖表征

Fig. 4 Characterisation of growth and proliferation of microcapsules

A: 3D culture conditions for cell proliferation  $\times 100$ ; B, C: cell viability measurements of 2D culture group, 3D culture group and 3D co-culture group at 0, 1, 3, 5 and 7 d of culture; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs 2D culture group.

培养组高。Transwell 侵袭实验结果显示,3D 培养组侵袭细胞数较 2D 培养组高,3D 共培养组侵袭细胞数较 3D 培养组高。结果显示,3D 组培养细胞较 2D 培养组具有显著增强的迁移和侵袭能力,3D 共培养组细胞较 3D 培养组具有增强的迁移和侵袭能力。见图 6。

**2.4 不同培养模型对乳腺癌细胞上皮间 - 间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达的影响** 通过 Western blot 实验对上皮标志物 E-cadherin、间质标志物 N-cadherin 进行检测,结果显示,与 2D 培养组相比,3D 培养组 E-cadherin 的表达明显降低,N-cadherin 的表达升高;与 3D 培养组相比,3D 共培养组 E-cadherin 的表达降低,N-cadherin 的表达明显升高。见图 7。

**2.5 不同培养模型对乳腺癌细胞药物敏感性的影响** 如图 8 所示,MCF-7 经 DOX 处理 24 h 后,2D 培养组 ( $8.218 \pm 0.870$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的  $\text{IC}_{50}$  值较 3D 培养组 ( $22.230 \pm 0.647$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  更低,3D 培养组的  $\text{IC}_{50}$  值较 3D 共培养组 ( $58.760 \pm 0.635$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  更低;MDA-MB-231 经 DOX 处理 24 h 后,2D 培养组

( $1.820 \pm 0.540$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的  $\text{IC}_{50}$  值较 3D ( $10.260 \pm 0.665$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  培养组更低,3D 培养组的  $\text{IC}_{50}$  值较 3D 共培养组 ( $31.310 \pm 0.768$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  更低。与 2D 培养的细胞相比,3D 培养的细胞对化疗药物的敏感性更低,耐药性更高;与 3D 培养的细胞相比,3D 共培养组的细胞耐药性更高。

### 3 讨论

化疗耐药性是乳腺癌治疗的主要挑战之一<sup>[6]</sup>。而肿瘤药物临床疗效的下降归因于临床前工具的缺乏,这是准确评估药物疗效的关键瓶颈<sup>[7]</sup>。为了能够模拟肿瘤复杂的微环境并用于癌症研究,人们一直在努力寻找合适的模型。向 3D 细胞培养的转变是实验室研究的重大进步,因为它为研究细胞过程和疾病提供了更具生理相关性的模型。虽然仍有一些难点有待解决,但 3D 培养的优势超过了 2D 培养。随着技术的不断发展,3D 培养可能会成为癌症研究和其他生物医学科学领域中越来越重要的工具<sup>[8]</sup>。

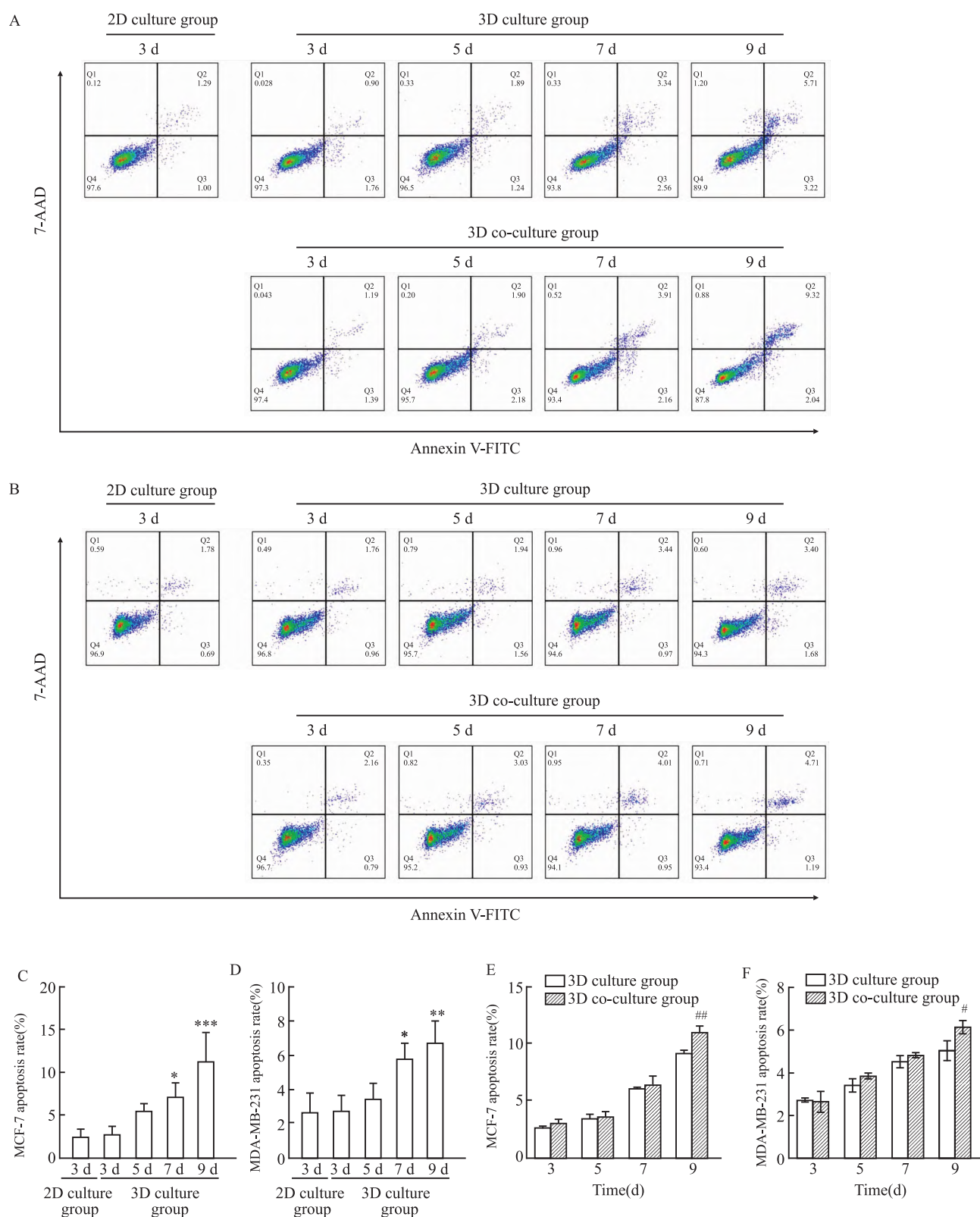


图5 不同培养模型对细胞凋亡率的影响

Fig. 5 Effect of different culture models on apoptosis rate of cells

A, B: MCF-7, MDA-MB-231 flow cytometry detection of apoptosis in 2D culture for 3 d, 3D culture with 3D co-culture for 3, 5, 7 and 9 d; C, D: analysis of apoptosis rate in MCF-7, MDA-MB-231 2D culture group and 3D culture group; E, F: analysis of apoptosis rate in MCF-7, MDA-MB-231 3D culture group and 3D co-culture groups; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs 2D culture group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs 3D culture group.

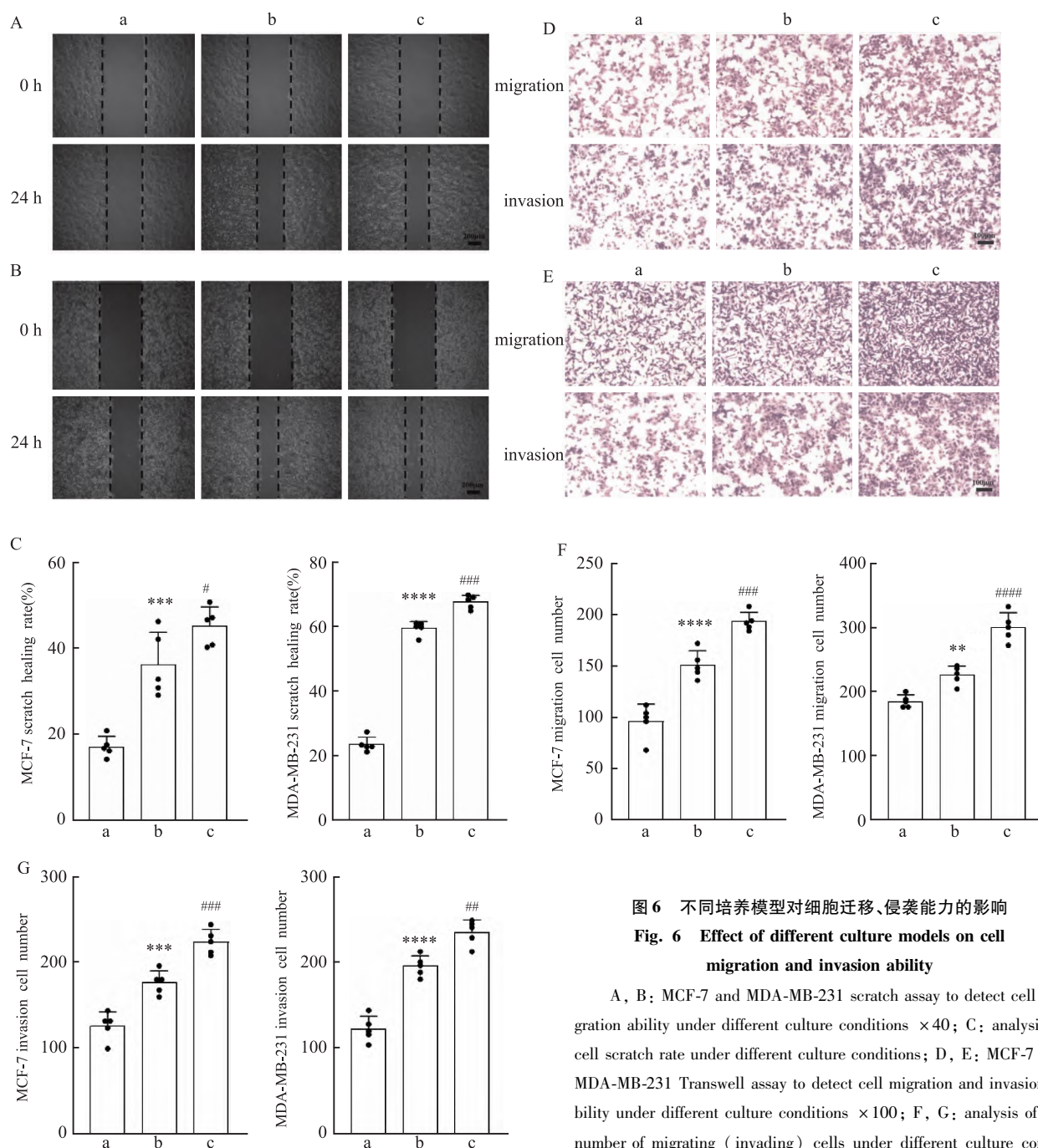


图6 不同培养模型对细胞迁移、侵袭能力的影响

Fig. 6 Effect of different culture models on cell migration and invasion ability

A, B: MCF-7 and MDA-MB-231 scratch assay to detect cell migration ability under different culture conditions  $\times 40$ ; C: analysis of cell scratch rate under different culture conditions; D, E: MCF-7 and MDA-MB-231 Transwell assay to detect cell migration and invasion ability under different culture conditions  $\times 100$ ; F, G: analysis of the number of migrating (invading) cells under different culture conditions.

a: 2D culture group; b: 3D culture group; c: 3D co-culture group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs 2D culture group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , ####  $P < 0.0001$  vs 3D culture group.

考虑到这些局限性,开发3D模型的关键就是真实再现体内TME关键特征。肿瘤微环境通常包括免疫细胞、基质细胞、细胞外基质和其他分泌分子以及脉管系统<sup>[9]</sup>,在动态调节癌症进展和影响治疗效果中起重要作用。胶原蛋白是乳腺细胞外基质中最丰富的成分,因此,它是培养乳腺癌细胞的理想生物材料<sup>[10]</sup>。乳腺肿瘤的基质微环境,即脉管系统,是肿瘤增殖、侵袭和转移的关键条件之一,在化疗耐

药机制中也占据重要地位<sup>[11-12]</sup>。因此,开发能够模拟肿瘤微环境的体外血管化培养模型,对于研究肿瘤微环境对肿瘤进展、侵袭和转移的影响以及进行化疗药物的筛选具有重要价值。

该研究验证了将海藻酸钠/羧甲基纤维素钠+胶原蛋白球状水凝胶的微胶囊作为研究癌细胞行为的体外模型的潜在可能。乳腺癌细胞经核-壳微胶囊封装后形成3D微肿瘤,细胞间的直接接触类似

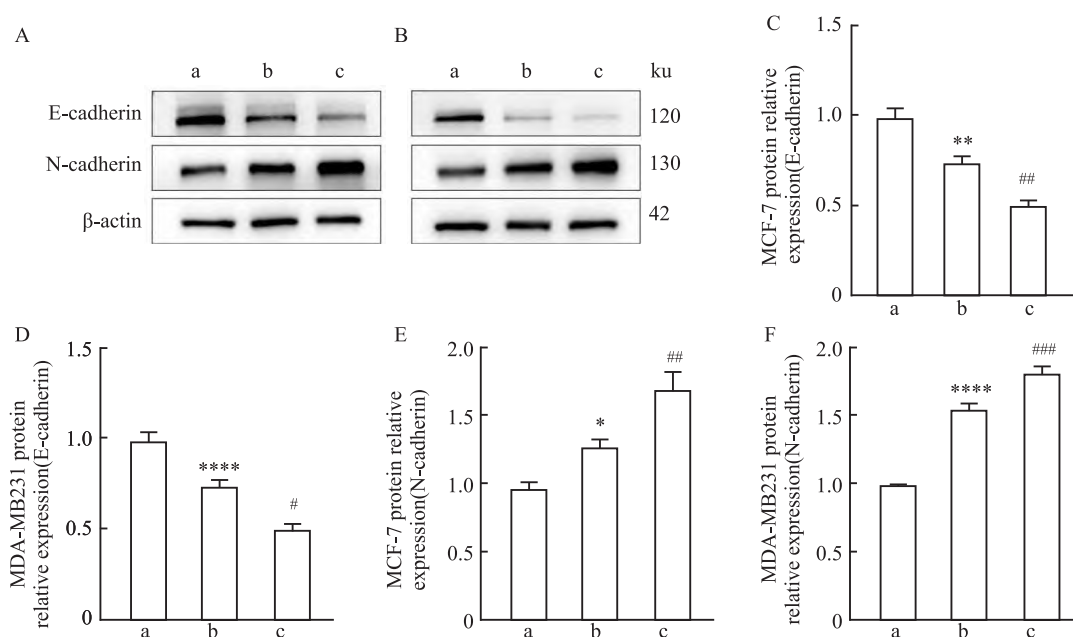


图7 不同培养模型对乳腺癌细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of different culture models on the expression of EMT-related proteins in breast cancer cells

A, B: MCF-7, MDA-MB-231 Western blot to detect the expression of EMT-related proteins in different cultured model cells; C-F: analysis of the relative expression of EMT-related proteins in different cultured model cells; a: 2D cultured group; b: 3D cultured group; c: 3D co-cultured group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$  vs 2D culture group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs 3D culture group.

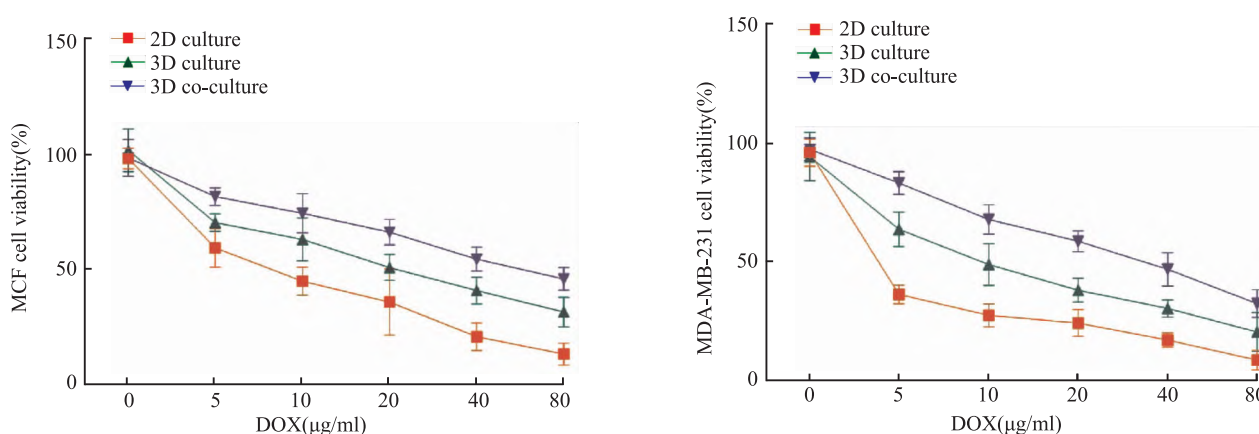


图8 经 DOX 处理后不同培养模型对细胞药物敏感性的影响

Fig. 8 Effect of different culture models on cellular drug sensitivity after DOX treatment

于体内结构,更好地展现了肿瘤增殖和形态变化。相较2D单层培养,3D培养表现出了更为缓慢的增殖和更多的凋亡,这可能是由于球状体内部缺乏营养和氧气。而球状体中的缺氧微环境是影响细胞表达并导致耐药的关键因素之一<sup>[13]</sup>。球状体中的大多数细胞都是存活的<sup>[14]</sup>,该研究的结果与之一致。划痕实验、Transwell实验结果显示,3D培养后细胞迁移、侵袭能力增强,这一结果在Western blot实验中被验证,表现为上调E-cadherin蛋白水平,抑制N-cadherin蛋白的表达。药物毒性检测实验显示

出,3D培养的细胞对化疗药物DOX的敏感性更低,耐药性更高,表明肿瘤微环境对细胞耐药有显著的影响。该研究中设计的体外3D培养模型中的MCF-7和MDA-MB-231球状体也显示出多种恶性肿瘤特征,如低氧、增殖减少、EMT增强和对毒理学反应的抵抗力增强。此外,跨膜共培养证实了细胞间的信号传递和细胞分泌物之间的相互影响,并模拟了肿瘤复杂的异质性<sup>[15]</sup>。较3D培养相比,3D共培养表现出更强的迁移、侵袭能力,更优异的EMT和更高的耐药性。

该研究设计的体外 3D 微肿瘤模型,能够表征实体瘤的相关病理特征和药物敏感性,该模型可作

为探索乳腺癌进展机制和筛选抗肿瘤药物的临床前模型,为探讨乳腺癌 EMT、化疗耐药和血管生成机制等相关研究提供了一种潜在的方案。但该研究尚存在一定的不足之处,尚未阐明 3D 培养对化疗药物耐药的机制;缺乏临床个体化,后续可提取患者原代乳腺癌细胞建立微肿瘤组织模型,用于化疗药物的筛选。

### 参考文献

- [1] Siegel R, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA A Cancer J Clin, 2023, 73: 17–48. doi:10.3322/caac.21763.
- [2] Costard L S, Hosn R R, Ramanayake H, et al. Influences of the 3D microenvironment on cancer cell behaviour and treatment responsiveness: a recent update on lung, breast and prostate cancer models[J]. Acta Biomater, 2021, 132: 360–78. doi:10.1016/j.actbio.2021.01.023.
- [3] Singh A, Poling H M, Spence J R, et al. Gastrointestinal organoids: a next-generation tool for modeling human development [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 319(3): G375–81. doi:10.1152/ajpgi.00199.2020.
- [4] Kang S M, Lee J H, Huh Y S, et al. Alginate microencapsulation for three-dimensional *in vitro* cell culture[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2021, 7(7): 2864–79. doi:10.1021/acsbomaterials.0c00457.
- [5] Mehta P, Rahman Z, Ten Dijke P, et al. Microfluidics meets 3D cancer cell migration[J]. Trends Cancer, 2022, 8(8): 683–97. doi:10.1016/j.trecan.2022.03.006.
- [6] Muley H, Fadó R, Rodríguez-Rodríguez R, et al. Drug uptake-based chemoresistance in breast cancer treatment [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 177: 113959. doi:10.1016/j.bep.2020.113959.
- [7] Letai A, Bhola P, Welm A L. Functional precision oncology: testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations[J]. Cancer Cell, 2022, 40(1): 26–35. doi:10.1016/j.ccell.2021.12.004.
- [8] Abuwatfa W H, Pitt W G, Hussein G A. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research[J]. J Biomed Sci, 2024, 31(1): 7. doi:10.1186/s12929–024–00994–y.
- [9] Bejarano L, Jordão M J C, Joyce J A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment[J]. Cancer Discov, 2021, 11(4): 933–59. doi:10.1158/2159–8290.CD–20–1808.
- [10] Redmond J, McCarthy H, Buchanan P, et al. Advances in biofabrication techniques for collagen-based 3D *in vitro* culture models for breast cancer research[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 122: 111944. doi:10.1016/j.msec.2021.111944.
- [11] Liu Z L, Chen H H, Zheng L L, et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 198. doi:10.1038/s41392–023–01460–1.
- [12] Teixeira F C, Chaves S, Torres A L, et al. Engineering a vascularized 3D hybrid system to model tumor-stroma interactions in breast cancer[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 647031. doi:10.3389/fbioe.2021.647031.
- [13] Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 157. doi:10.1186/s12943–019–1089–9.
- [14] Kaminska A, Wedzinska A, Kot M, et al. Effect of long-term 3D spheroid culture on WJ-MSC [J]. Cells, 2021, 10(4): 719. doi:10.3390/cells10040719.
- [15] Nair L, Mukherjee S, Kaur K, et al. Multi compartmental 3D breast cancer disease model-recapitulating tumor complexity in *in vitro* [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2023, 1867(6): 130361. doi:10.1016/j.bbagen.2023.130361.

## Exploring breast cancer microenvironment and chemoresistance based on 3D *in vitro* microtumour models

Wang Juanru<sup>1</sup>, Song Qiaozhi<sup>2</sup>, Liu Xiaoli<sup>1,3</sup>, Wu Zhengsheng<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>The First Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>3</sup>Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To simulate the tumor microenvironment through the 3D microtumor model which was constructed using droplet microfluidics. To explore its feasibility as a model for *in vitro* breast cancer research through 3D microtumour fabrication, characterisation and sensitivity testing to chemotherapeutic drugs. **Methods** Breast cancer cells were encapsulated with hydrogel shells in collagen-rich microencapsulated cores to obtain breast cancer microtumours *in vitro*; breast cancer microtumours were co-cultured with 3D microencapsulated endothelial cells by Transwell system. The structure and growth characteristics of the microtumours were directly observed by microscopy;

# 基于生信分析构建泌尿系肿瘤铁死亡预后模型

沈忠杰,张俊勇,葛成国

(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

**摘要** **目的** 通过生物信息学方法构建并验证泌尿系肿瘤铁死亡相关的预后模型。**方法** 分析 TCGA 中的膀胱癌 (BLCA) 和肾透明细胞癌 (KIRC) 数据集的 RNA-seq 及临床数据,建立预后模型,并使用 ICGC 和 GEO 数据进行验证。通过单变量 Cox、LASSO-Cox 和多变量 Cox 回归分析确定铁死亡相关预后基因。利用共表达和蛋白-蛋白互作网络分析基因间的关系,以及通过免疫浸润分析探讨基因与免疫微环境的关联。对 BLCA 和 KIRC 预后模型高低风险组的差异表达基因进行功能富集分析,探讨铁死亡相关基因调控这两种癌症预后的潜在机制。**结果** 在 BLCA 和 KIRC 中鉴定出与预后显著相关的铁死亡基因,包括 BLCA 的 EGR1、ZEB1、P4HB、WWTR1、JUN、CDO1、SCD、SREBF1、CAV1、GALNT14 等;KIRC 的 ASMTL-AS1、CHAC1、MT1G、RRM2、TIMP1、DPEP1、GLRX5、NDRG1 等。此外,筛选出与两种癌症预后相关的铁死亡相关 miRNA。基于这些基因和 miRNA 构建的风险模型预测了 TCGA-BLCA 和 KIRC 患者的预后,其中低危组的总生存期显著高于高危组 ( $P < 0.05$ ),模型的风险比范围为 2.54 (95% CI: 1.73 ~ 3.74) 至 4.74 (95% CI: 3.47 ~ 6.47),AUC 均在 0.60 以上。共表达分析和蛋白-蛋白互作网络显示 BLCA 中 JUN 与 EGR1 表达水平相关性高,SCD 与 SREBF1 之间也存在相关性。免疫浸润相关性分析显示 BLCA 中 EGR1、CAV1、JUN 基因表达与免疫评分呈正相关,SREBF1 与免疫评分呈负相关。**结论** 基于铁死亡相关基因的预后模型在预测 BLCA 和 KIRC 患者预后方面表现出良好的性能,可为靶向铁死亡评估 BLCA 和 KIRC 患者预后提供参考。

**关键词** 膀胱尿路上皮癌;肾透明细胞癌;铁死亡;预后模型;miRNAs;免疫浸润

**中图分类号** R 737.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)11-2012-12

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.017

2024-09-24 接收

基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTB2022NSCQ-MSX0879)

作者简介:沈忠杰,男,硕士研究生;

葛成国,男,博士,主任医师,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:geg2022@hospital.cqmu.edu.cn

泌尿系统肿瘤包括膀胱癌、肾癌等,其中膀胱癌为泌尿生殖系统中第二大常见癌症,且为全球十大最常见恶性肿瘤。随着人口老龄化,这些肿瘤的发病率逐年增加<sup>[1]</sup>。早期泌尿系统肿瘤主要通过手术切除治疗,但晚期患者由于对化疗和放疗的抗

the CCK-8 assay was used to detect the proliferation of the cells under different culture models and the drug sensitivity to doxorubicin; flow cytometry was used to compare the differences in apoptosis during the proliferation process; and the differences in the migratory and invasive abilities of the cells were assessed by scratch assay and Transwell assay; the expression of epithelial-mesenchymal transition-related proteins was detected by Western blot. **Results** Breast cancer cells grew well in hydrogel nucleus-shell microcapsules; cell proliferation assays showed that 3D culture and 3D co-culture cells proliferated at a significantly lower rate than 2D culture; 3D culture and 3D co-culture cells had enhanced migration and invasion ability and showed higher expression of EMT-related proteins compared to 2D culture; 3D culture and 3D co-culture cells were significantly less sensitive to chemotherapeutic drugs compared to 2D culture. The sensitivity of 3D and 3D co-cultured cells to chemotherapeutic drugs was significantly reduced compared to 2D culture. **Conclusion** 3D cultures show similar morphology and biology to in vivo tumours and are more resistant to chemotherapeutic agents.

**Key words** 3D culture; co-culture; core-shell microcapsules; tumor microenvironment; chemoresistance

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China(No. 81972472); Basic and Clinical Cooperative Research Promotion Program of Anhui Medical University(No. 2020xkjT012)

**Corresponding authors** Liu Xiaoli, E-mail: lxl\_8512@163.com; Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn