- 5 张娟,周月希,刁波,等. 环磷酰胺诱导家兔卵巢早衰动物模型的建立和评价[J]. 中国比较医学杂志,2018,28(1):38-43
- 6 刘小燕,祁爱蓉,罗登贵,等. 雷公藤制剂生殖毒性及联用减毒研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2018,25(4):133-135
- 7 何国珍,杨美春,谢桂珍,等. 雷公藤多苷诱导大鼠卵巢功能低下模型的实验研究[J]. 广西中医药大学学报,2017,20(4):9-11
- 8 Field S, Dasgupta T, Cummings M, et al. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation [J]. Mol Reprod Dev,2014, 81(4):284-314
- 9 Mishra B, Ripperdan R, Ortiz L, et al. Very low doses of heavy oxygen ion radiation induce premature ovarian failure [J]. Reproduction, 2017,154(2):123-133
- 10 贺宇恒,谭容容,浦丹华,等. 放疗致卵巢早衰小鼠动物模型的构建[J]. 生殖医学杂志,2017,26(12):1243-1249
- 11 孙萍,包秀芳. 不同剂量钴⁶⁰γ射线致大鼠卵巢早衰的实验研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(47):55
- 12 Kappeler C, Hoyer P. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity[J]. Sys Biol Reprod Med, 2012, 58(1): 57-62
- 13 Van Kempen T, Gorecka J, Gonzalez A, et al. Characterization of neural estrogen signaling and neurotrophic changes in the accelerated ovarian failure mouse model of menopause[J]. Endocrinology, 2014, 155(9):3610-3623
- 14 Reis F, Pestana - Oliveira N, Leite C, et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause - animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats [J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 49(11):130-140
- 15 Dinh N, Eui - Man J, Yeong - Min Y, et al. Depletion of follicles accelerated by combined exposure to phthalates and 4-vinylcyclohexene diepoxide, leading to premature ovarian failure in rats [J]. Reprod Toxicol, 2018, 80(9):60-67
- 16 王佩娟,陈思,卢燕. 基于免疫性卵巢早衰小鼠模型的建立研究卵巢早衰的免疫机制[J]. 中国临床研究,2017,30(3):298-301
- 17 申可佳,申奏秦旋,刘碧源,等. 慢性制动应激建立卵巢早衰及卵巢低反应小鼠模型的研究[J]. 中国医药导报,2017,14(17):19-22
- 18 苗明三,田硕,辛卫云,等. 围绝经期综合征动物模型制备规范(草案)[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报),2018,33(3):996-1000

(收稿日期:2018-08-28)

(修回日期:2018-09-19)

体外肿瘤模型在药敏试验及药物研发中的应用

徐怡朦 杨亚冬 杨 耿 宋勇飞 张文元

摘要 迄今为止,许多研究已经促成癌症研究方式从传统的二维(2D)培养系统向三维(3D)培养系统转变。研究人员认识到肿瘤不仅仅是肿瘤细胞增殖形成的肿块,还有处于动态变化的细胞外基质,以及基质、免疫细胞和内皮细胞相互作用所组成的高度复杂的组织。而肿瘤模型的药敏试验在指导临床用药及个体化治疗方面具有重要作用。本文综述了2D、3D肿瘤细胞培养模型的研究现状、3D生物打印肿瘤模型的进展,以及在药敏试验和抗癌药物研发中的应用和展望。

关键词 二维肿瘤模型 三维肿瘤模型 3D生物打印 药敏试验 抗癌药物研发

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.042

癌症是全球死亡的主要原因之一,尽管研发人员和制药界作出了巨大努力,但肿瘤药物开发仍然充满挑战,即使是最先进的临床前药物测试,也难以预料药物毒性作用、不良反应、药物耐受及药物相互作用。肿瘤模型的药敏试验在指导临床用药及个体化治疗方面具有重要作用。可靠的药敏试验,可帮助选择有效的化疗药物,避免药物毒性不良反应,设计合理的

治疗方案,提高治疗效果。一个理想的肿瘤模型应与其模拟的肿瘤在分子、形态、组织结构及生物学特征方面有许多共同性,即真实地仿生^[1]。细胞培养模型一直是抗癌药物研发计划的核心。为了在体外肿瘤模型中了解肿瘤微环境的详细情况,研究人员开发了大量二维(2D)和三维(3D)模型。其中3D体外模型正成为传统2D细胞培养和动物模型之间的桥梁。而3D生物打印肿瘤模型可将细胞与材料同时操作,实现多种细胞和细胞外基质材料的特定空间排布,构建比传统3D模型更为仿真的3D肿瘤模型,以发挥其在抗癌药物筛选评估中的作用。

一、二维(2D)肿瘤模型与药敏试验及药物研发

2D细胞培养是生物技术中最核心、最基础的技术

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY17H280008, LY18H180010);浙江省医药卫生科技计划项目(2015ZDA011, 2017KY299,2017KY307);浙江省中医药科技计划项目(2015ZA045, 2016ZA044,2018ZA017)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:张文元,电子邮箱:zhangwy61@163.com

术。肿瘤细胞2D培养模型由于操作简便,反应灵敏,观察分析快捷,实验周期短等诸多优点而成为目前生物学和医学研究中最常用的一种细胞培养方式。各种癌细胞系的体外2D培养被广泛用于肿瘤疾病研究,以及候选药物高通量筛选评估,是目前广泛使用的肿瘤模型。然而在从临床前模型转向人体试验后,2D培养模型预测治疗方案和策略的有效性值得商榷:①体内的肿瘤细胞团呈三维球形;②肿瘤细胞在遗传和表型上呈现多样化,2D细胞培养难以模拟如此巨大的克隆多样性(肿瘤异质性)以测试候选药物的功效和毒性不良反应;③肿瘤微环境非常复杂,而2D肿瘤模型由于缺乏有效的肿瘤微环境而不能被认为是类肿瘤组织;④2D培养的细胞缺乏3D细胞培养支架的空间深度和细胞连接性,无法支持细胞维持适当的组织功能,而实体肿瘤耐药性的产生与其三维立体的空间结构密切相关^[2,3]。因此,用2D细胞评估的药物功效、药代动力学、作用机制、毒性不良反应、遗传毒性和致癌性等并不总能准确预测人类患者的真实反应。

使用2D培养模型进行抗肿瘤药物筛选,越来越被认为是导致肿瘤耐药/肿瘤恶化及抗癌治疗失败的主要原因。因为,体内存在的实体瘤是一个3D细胞团,所有细胞均处于3D空间之中,包括增殖旺盛的细胞、静止细胞和坏死组织等,具有明显的异质性,可使肿瘤耐药物性提高^[4]。而目前使用较多的2D肿瘤细胞培养未能真实地模拟出肿瘤细胞在体内所处的状态,往往造成耐药性消失。而3D肿瘤细胞模型却易产生耐药性^[5,6]。另外,动物模型的组织微环境与人类不同,也存在无法控制的变量,这限制了在分子水平上理解疾病进展的机制的定量分析。药物测试结果提示,动物模型可能由于种间差异而不能准确预测人类患者的结果^[7]。并且在药物筛选领域的评价技术中,动物筛选模型存在种属差异和周期长,裸鼠饲养条件苛刻,价格昂贵等缺点。而且动物模型和体内研究都存在不可预测的特性和伦理认同的问题。因此,建立一个在生理上相对真实的3D模型变得十分重要。

二、三维(3D)肿瘤模型与药敏试验及药物研发

3D细胞培养是继2D细胞培养和动物模型之后的第3个模型,在创建含有活细胞的复杂支架方面显示出明显的优势,同时它也是一种低成本,高通量和高重现性的有效方法。由细胞聚集形成的多细胞肿瘤球体模型因简单易用而被认为是3D癌症模型的

“金标准”^[8]。3D体外癌症模型提供了维度和生理相关度高于常规2D模型的方法,更便于研究致瘤及耐药现象。与2D模型比较,3D模型在细胞增殖,基因表达和抗癌药物反应方面都表现出了与实体瘤更为相似的行为,更好地模拟细胞在体内的自然生长环境,人体活细胞的生物打印可在体外进行更有效真实地复制,可用于高通量药敏试验及新药开发筛选^[9,10]。研究表明,与2D癌细胞培养模型比较,3D培养癌细胞间的相互作用明显增强,具有更强的抗辐射和抗化学活性,显示了异质性的增加和对细胞凋亡抗性的提高^[11,12]。

恶性肿瘤的异质性可导致不同个体治疗效果相去甚远,其耐药性是影响化疗治疗效果和预后的重要因素,这将对常规诊断及患者管理决策造成影响,造成诊断不一致和治疗性抵抗,以及造成化疗药物的多药耐药和严重的药物毒性不良反应等缺陷,是肿瘤化疗失败的主要原因^[13,14]。因此,建立合适的体外3D耐药模型是耐药研究的关键所在,体外肿瘤药敏实验尤为重要,将为恶性肿瘤的个体化治疗提供有力的循证医学依据。从而实现“个体化”化疗以取代经验性、盲目性化疗。

与传统的二维单层比较,3D肿瘤球状体模型更忠实地再现了体内肿瘤的宏观结构,能更好地反映体内肿瘤的生长和发育情况,是一种更接近体内癌细胞病变特性的肿瘤模型,可更准确地预测药物在体内的治疗效果,对肿瘤学研究、癌症个体化治疗和抗癌药物研发等都会产生重要的促进作用^[15]。并可对抗癌药物的筛选、作用和抵抗进行分析,具有重要的临床意义^[14]。

事实上,越来越多的癌症研究正在利用3D培养模型,并且观察到许多与传统2D模型明显不同的反应。Huang等^[16]研究发现,NSC 23766在三维水凝胶中刺激了U87 GBM细胞的迁移,而在二维单层培养基中抑制了细胞的活性,表明3D水凝胶研究肿瘤细胞侵袭的优势。此外,Eguchi等^[17]研究发现,基于纳米培养板的3D环境使细胞能够形成类多能干细胞肿瘤体,并在形态和基因表达水平上更准确地模拟体内肿瘤状态。先进的体外三维培养系统克服了许多2D系统的局限性,比较真实地反映肿瘤体内的情况。因此,细胞在3D条件下更能代表其在体内条件下的响应,药物筛选更有效。体外3D肿瘤模型替代现有2D肿瘤模型用于药物筛选与药物研发是肿瘤药筛技术发展的必然趋势。

三、3D 打印肿瘤模型的发展

肿瘤组织是由微环境中生存的恶性细胞与基质组成,基质在癌症恶化中起着关键作用。因此,光有3D是不够的,还需要建立一个对细胞有触发性的微环境,用于肿瘤间质微组织的构建^[18]。3D打印技术通过将计算机辅助设计逐层沉积生物墨水(生物材料基质与细胞混合)来制造复杂3D生物结构,并将具有3D结构不同材料基质的载体与各种不同种类的细胞在体外共同培养,使细胞能够在载体的3D空间结构中迁移、生长,构成3D细胞-载体基质复合物的一种方法^[19]。

近年来,3D打印技术在组织工程等学科领域发展迅速。相比于来自2D培养、传统组织工程3D模型及实验动物肿瘤模型,3D生物打印的肿瘤模型具有如下优点:①可以在打印前设计模型的大小和形状;②可以根据打印机的喷嘴和相关匹配参数控制水凝丝的粗细;③可以将几种不同类型的细胞与材料基质同时精确地组合打印;④可以在多层次上制作双分子(不同的营养与氧气浓度)梯度。一方面,可以在生物打印的肿瘤样组织上呈现内部和外部双分子梯度;另一方面,内部和外部生物分子也可以呈现在水凝胶薄片上。因为双分子梯度在趋化性和癌症转移中发挥重要作用,在非黏附条件下细胞在水凝胶形成的球体中生长,形成营养和氧气的梯度,更能模拟人体内的营养物质浓度,以及药物筛选中药物分子的浓度梯度。生物材料是组织工程的核心部分,可以提供促进细胞黏附、增殖的分子和机械信号,并增强细胞外基质(ECM)蛋白沉积和组织形成。可通过精确设计,模拟体内肿瘤组织,用于研究肿瘤发生、发展,肿瘤异质性,肿瘤侵袭和转移,以及进行抗癌药物敏感性研究。

由于高通量筛选和细胞筛选模型与体内环境差异大,药物筛选准确率低。因此,可用细胞3D打印技术制造仿真的组织器官模型,并构建更准确的药物筛选模型。目前已经开发了皮肤复制模型来模拟黑色素瘤,以研究肿瘤细胞球状体的疾病机制和药物筛选。有研究利用永生化肝细胞与ECM衍生水凝胶构建的肝模型不仅可恢复部分肝功能,也可用于体外评估肝毒性的高通量药物筛选。3D打印细胞培养模型将有助于抗癌新药的鉴定,毒理学分析,以及精准药物的研发。

包含肿瘤微环境的多个特征并代表癌症进展的3D生物打印癌症模型正在出现,并用于肿瘤转移研

究,以及药物筛选测试研究^[20]。3D生物打印肿瘤模型在创建快速、廉价、高度仿真3D癌症组织模型方面已迈出重要一步,为研究癌症转移提供了强有力的工具。利用创新的生物学方法和技术开发更复杂的系统用来研究肿瘤微环境,对于改进药物发现实践及抗癌药物研发至关重要。

药敏试验及药物计划失败的一个主要原因是缺乏临床疗效和相关毒性不良反应问题。鉴于3D生物打印结构能产生更好的肿瘤组织模型,可以降低临床前研究和药物开发过程的成本。在临床评估的重要阶段,准确的临床前期治疗效果和毒性不良反应测定将降低新药物的失败率。在3D生物打印的人体器官上进行药物测试可以消除从临床前动物和细胞培养研究中得出不确定结论的可能性。为了准确预测候选药物在临床试验中不需要的参数,可以使用各种现有的和新兴的技术(模型),例如球状体,凝胶包埋培养,共培养系统和3D组织模型等。预计技术创新将扩大肿瘤工程的范围,允许操纵特定于肿瘤的因素,从而促进未来的癌症药物发现实践。

四、展 望

虽然传统3D肿瘤模型具有很高的应用潜力,但是它存在固有的局限性,仍然面临诸多挑战。挑战之一是满足组织工程应用要求的理想材料仍难以捉摸,是目前最大的瓶颈。另外,传统3D模型通常仅模拟单个时间节点,或者肿瘤发生、发展的某个阶段。

至今研究人员已经开发了多种方法来模拟复杂的3D癌症模型,现在正在采取同时满足肿瘤复杂性和异质性的方案,这一努力将能够使癌症模拟的领域更加准确和先进。先进的肿瘤建模有助于通过对新分子治疗药物的鉴定和(或)验证来解决肿瘤复杂性和异质性问题,增加对新致癌驱动因素和生物标志物的理解,为肿瘤模型和生物标志物开发铺平道路。除了识别和评估新的化学实体外,更多创新的肿瘤模型在预测精密药物,以及在患者个体化药物治疗功效方面得到真正体现。随着科技的发展,将来有可能将整个肿瘤生态纳入3D模型系统之中。总之,3D生物打印技术的进步将为肿瘤研究开辟新的前沿,一个渐进式临床癌症疗法时代即将到来。

参考文献

- 1 Zhang W, Li C, Baguley BC, *et al.* Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: how to reliably produce a biomimetic 3D model[J]. *Anal Biochem*, 2016, 515:47-54
- 2 Levinger I, Ventura Y, Vago R. Life is three dimensional - as in vitro cancer cultures should be[J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 121:383-414

3 Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, *et al.* Comparison of 2D - and 3D - culture models as drug - testing platforms in breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4) :1837 - 1843

4 Suresh PK. Breast cancer heterogeneity: a focus on epigenetics and in vitro 3D model systems [J]. *Cell J*, 2018, 20(3) :302 - 311

5 Yang Z, Zhuang H, Song H, *et al.* A miniature cell pattern formation of ovarian cancer cell lines on self - assembling peptide nanofiber - coated coverslip and In vitro chemosensitivity assay [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2018, 18(4) :2370 - 2378

6 Muddineti OS, Vanaparthy A, Rompicharla SVK, *et al.* Cholesterol and vitamin E - conjugated PEGylated polymeric micelles for efficient delivery and enhanced anticancer activity of curcumin: evaluation in 2D monolayers and 3D spheroids [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 9:1 - 14

7 Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre - clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(1) :150 - 161

8 Pradhan S, Clary JM, Seliktar D, *et al.* A three - dimensional spheroidal cancer model based on PEG - fibrinogen hydrogel microspheres [J]. *Biomaterials*, 2017, 115:141 - 154

9 Kessel S, Cribbes S, Bonasu S, *et al.* Real - time apoptosis and viability high - throughput screening of 3D multicellular tumor spheroids using the celigo image cytometer [J]. *SLAS Discov*, 2018, 23(2) :202 - 210

10 Kessel S, Cribbes S, Déry O, *et al.* High - throughput 3D tumor spheroid screening method for cancer drug discovery using celigo image cytometry [J]. *SLAS Technol*, 2017, 22(4) :454 - 465

11 Cannon TM, Shah AT, Skala MC. Autofluorescence imaging captures heterogeneous drug response differences between 2D and 3D breast

cancer cultures [J]. *Biomed Opt Express*, 2017, 8(3) :1911 - 1925

12 Tataru T, Mukohara T, Tanaka R, *et al.* 3D culture represents apoptosis induced by trastuzumab better than 2D monolayer culture [J]. *Anti-cancer Res*, 2018, 38(5) :2831 - 2839

13 Aleskandarany MA, Vandenberghe ME, Marchiò C, *et al.* Tumour heterogeneity of breast cancer: from morphology to personalised medicine [J]. *Pathobiology*, 2018, 85(1 - 2) :23 - 34

14 Brancato V, Gioiella F, Profeta M, *et al.* 3D tumor microtissues as an in vitro testing platform for microenvironmentally - triggered drug delivery systems [J]. *Acta Biomater*, 2017, 57:47 - 58

15 Shafiee A, Atala A. Printing technologies for medical applications [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(3) :254 - 265

16 Huang Y, Tong L, Yi L, *et al.* Three - dimensional hydrogel is suitable for targeted investigation of amoeboid migration of glioma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1) :250 - 256

17 Eguchi T, Sogawa C, Okusha Y, *et al.* Organoids with cancer stem cell - like properties secrete exosomes and HSP90 in a 3D nanoenvironment [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2) :e0191109

18 Brancato V, Garziano A, Gioiella F, *et al.* 3D is not enough: building up a cell instructive microenvironment for tumoral stroma microtissues [J]. *Acta Biomater*, 2017, 47:1 - 13

19 Dai X, Ma C, Lan Q, *et al.* 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(4) :045005

20 Charbe N, McCarron PA, Tambuwala MM. Three - dimensional bio - printing: a new frontier in oncology research [J]. *World J Clin Oncol*, 2017, 8(1) :21 - 36

(收稿日期:2018 - 07 - 24)

(修回日期:2018 - 07 - 24)

(上接第 164 页)

7 颜敏, 翟新, 刘玉兰. 重症肺炎患儿外周血辅助性 T 细胞 17 与调节性 T 细胞及其细胞因子表达的临床意义 [J]. *中华妇幼临床医学杂志: 电子版*, 2017, 13(4) :414 - 418

8 Guo J, Tao W, Tang D, *et al.* Th17/regulatory T cell imbalance in sepsis patients with multiple organ dysfunction syndrome: attenuated by high - volume hemofiltration [J]. *Int J Artif Organs*, 2017, 40(11) :607 - 614

9 Crouser ED. Role of imbalance between Th17 and regulatory T - cells in sarcoidosis [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2018, 24(5) :521 - 526

10 Basta A, Brucka A, Górski J, *et al.* The statement of Polish Society's Experts Group concerning diagnostics and methods of endometriosis treatment [J]. *Ginekol Pol*, 2012, 83(11) :871 - 876

11 Terao M, Koga K, Fujimoto A, *et al.* Factors that predict poor clinical course among patients hospitalized with pelvic inflammatory disease [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(2) :495 - 500

12 Artimani T, Karimi J, Mehdizadeh M, *et al.* Evaluation of pro - oxidant - antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(2) :148 - 152

13 Yang HL, Zhou WJ, Gu CJ, *et al.* Pleiotropic roles of melatonin in

endometriosis, recurrent spontaneous abortion, and polycystic ovary syndrome [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 80(1) :e12839

14 Munrós J, Martínez - Zamora MA, Tàssies D, *et al.* Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(2) :325 - 331

15 Parachuru VPB, Coates DE, Milne TJ, *et al.* FoxP3 + regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease [J]. *J Periodontal Res*, 2018, 53(4) :622 - 635

16 陈鹏, 刘宏潇. Th17/IL - 17 炎症轴介导强直性脊柱炎炎症的机制研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(7) :796 - 798

17 Lee MH, Tung - Chieh Chang J, Liao CT, *et al.* Interleukin 17 and peripheral IL - 17 - expressing T cells are negatively correlated with the overall survival of head and neck cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(11) :9825 - 9837

18 Koyama R, Fukuda Y, Kamada Y, *et al.* Cholesterol unbound ROR γ t protein enables a sensitive inverse agonist screening [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2018, 16(4) :194 - 204

19 Chang KK, Liu LB, Jin LP, *et al.* IL - 27 triggers IL - 10 production in Th17 cells via a c - Maf/ROR γ t/Blimp - 1 signal to promote the progression of endometriosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3) :e2666

(收稿日期:2018 - 08 - 31)

(修回日期:2018 - 10 - 03)