

本文引用: 汤晓娟, 任媛, 贺敏, 丁宁, 吕元, 李勇敏, 赵亮, 何永恒. 结直肠癌 3D 细胞肿瘤球的构建及天马颗粒抗肿瘤作用的初探[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(3): 499–508.

结直肠癌 3D 细胞肿瘤球的构建及天马颗粒抗肿瘤作用的初探

汤晓娟¹, 任媛¹, 贺敏², 丁宁³, 吕元¹, 李勇敏¹, 赵亮¹, 何永恒^{1,2*}

1.湖南省中西医结合医院(湖南省中医药研究院附属医院), 湖南 长沙 410006; 2.湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

3.湖南大学生命医学交叉研究院, 湖南 长沙 410082

〔摘要〕 **目的** 建立一种包含肠癌细胞(HCT-116)与内皮细胞(HUVEC)的 3D 细胞肿瘤球模型,并在该模型上验证天马颗粒对 3D 细胞肿瘤球生长和血管新生的影响。**方法** 不同比例 HCT-116 与 HUVEC 混合液培养于超低吸附 96 孔板,通过检测 3D 细胞肿瘤球体积、细胞数量、ATP 含量确定最佳培养比例。将 HCT-116 和 HUVEC 以 2:1 比例混合,分为空白对照组(15%空白血清)、盐酸阿霉素组(15%空白血清+100 ng/mL 盐酸阿霉素)、天马颗粒含药血清低剂量组(5%含药血清+10%空白血清)、天马颗粒含药血清中剂量组(10%含药血清+5%空白血清)、天马颗粒含药血清高剂量组(15%含药血清+0%空白血清);检测 3D 细胞肿瘤球体积、细胞数量、ATP 含量。将 2D 细胞和 3D 细胞肿瘤球分为 2D 组(15%空白血清)、3D 组(15%空白血清)、盐酸阿霉素组(15%空白血清+100 ng/mL 盐酸阿霉素)、天马颗粒含药血清低剂量组(5%含药血清+10%空白血清)、天马颗粒含药血清中剂量组(10%含药血清+5%空白血清)、天马颗粒含药血清高剂量组(15%含药血清+0%空白血清);进行 RNA 测序分析,RT-qPCR 检测丙酮酸激酶 M1(PKM1)、丙酮酸激酶 M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(Glut1)mRNA 表达,Western blot 检测 CD31、P21、P53 蛋白表达,TSA 多重免疫荧光检测 CD31、增殖细胞核抗原(PCNA)表达。**结果** 培养第 9 天,细胞比例为 2:1 时,3D 细胞肿瘤球体积最大、细胞数量最多、ATP 含量最高($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白对照组相比,各给药组 3D 细胞肿瘤球体积均缩小、细胞数量均减少、ATP 含量均降低($P<0.01$)。与盐酸阿霉素组相比,天马颗粒含药血清低剂量组 3D 细胞肿瘤球体积增大、细胞数量增加、ATP 含量升高($P<0.05$, $P<0.01$);天马颗粒含药血清中剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小($P<0.01$);天马颗粒含药血清高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小、细胞数量减少、ATP 含量降低($P<0.01$)。与天马颗粒含药血清低剂量组相比,天马颗粒含药血清中、高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积均缩小、细胞数量均减少、ATP 含量均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与天马颗粒含药血清中剂量组相比,天马颗粒含药血清高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小、细胞数量减少、ATP 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与 2D 组相比,3D 组糖酵解通路上调;与 3D 组相比,天马颗粒含药血清高剂量组糖酵解通路下调。与 2D 组相比,3D 组 PKM1、PKM2、Glut1 mRNA 表达水平及 CD31 蛋白表达水平均升高($P<0.01$),P53、P21 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与 3D 组相比,各给药组 PKM1 和 Glut1 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$),P53、P21 蛋白表达水平均升高($P<0.05$, $P<0.01$);盐酸阿霉素组、天马颗粒含药血清中、高剂量组 PKM2 mRNA 表达水平及 CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与盐酸阿霉素组相比,天马颗粒含药血清低剂量组 PKM1 和 PKM2 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$, $P<0.01$),P21 蛋白表达水平降低($P<0.05$);天马颗粒含药血清中剂量组 PKM2 mRNA 表达水平及 P21、CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$);天马颗粒含药血清高剂量组 PKM1、PKM2 和 Glut1 mRNA 表达水平及 P53、P21、CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与天马颗粒含药血清低剂量组比较,天马颗粒含药血清中剂量组 PKM1、PKM2 mRNA 表达水平及 CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$);天马颗粒含药血清高剂量组 PKM1、PKM2 和 Glut1 mRNA 表达水平及 P53、P21 和 CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与天马颗粒含药血清中剂量组比较,天马颗粒含药血清高剂量组 Glut1 mRNA 表达水平及 P53、P21 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白对照组相比,盐酸阿霉素组及天马颗粒含药血清高剂量组 PCNA、CD31 阳性细胞数量均减少($P<0.05$, $P<0.01$);与盐酸阿霉素组比较,天马颗粒含药血清高剂量组 CD31 阳性细胞数量减少($P<0.01$)。**结论** 肠癌细胞与内皮细胞比例为 2:1 时可构建较稳定的 3D 细胞肿瘤球模型,天马颗粒含药血清可抑制肿瘤球生长和血管新生。

〔关键词〕 结直肠癌;天马颗粒;3D 细胞肿瘤球;糖酵解;血管新生

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.03.009

〔收稿日期〕 2025-10-29

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82374462);湖南省自然科学基金项目(2024JJ6286);长沙市自然科学基金项目(kq2403131);湖南省卫生健康委员会科研项目(W20243256);湖南省中医药管理局科研项目(B2024031)。

〔通信作者〕 * 何永恒,男,硕士,教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:2320990685@qq.com。

Construction of 3D colorectal cancer cell tumorspheres and preliminary exploration of the anti-tumor effects of Tianma Granules

TANG Xiaojuan¹, REN Yuan¹, HE Min², DING Ning³, LYU Yuan¹, LI Yongmin¹,
ZHAO Liang¹, HE Yongheng^{1,2*}

1. Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine), Changsha, Hunan 410006, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. School of Biomedical Sciences, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China

[Abstract] **Objective** To establish a 3D cell tumorsphere model incorporating colorectal cancer cells (HCT-116) and endothelial cells (HUVEC), and validate the effects of Tianma Granules on the growth and angiogenesis of the 3D cell tumorspheres within this model. **Methods** HCT-116 and HUVEC were mixed in varying ratios and cultured in ultra-low attachment 96-well plates. The optimal culture ratio was determined by measuring the volume, cell count, and ATP content of the 3D cell tumorspheres. HCT-116 and HUVEC were mixed at a 2:1 ratio and divided into five groups: blank control group (15% blank serum), doxorubicin hydrochloride (15% blank serum + 100 ng/mL doxorubicin), and low-, medium-, and high-dose Tianma Granules-containing serum (TGCS) groups (5%, 10%, and 15% drug-containing serum respectively, supplemented with blank serum to a total of 15%). The volume, cell count, and ATP content of the 3D cell tumorspheres were then measured. Additionally, 2D cells and 3D cell tumorspheres were divided into six groups: 2D control (15% blank serum), 3D control (15% blank serum), doxorubicin group (15% blank serum + 100 ng/mL doxorubicin hydrochloride), and low-, medium-, and high-dose TGCS groups (5%, 10%, and 15% drug-containing serum respectively, supplemented with blank serum to a total of 15%). RNA sequencing analysis was performed, and RT-qPCR was used to measure the mRNA expressions of pyruvate kinase M1 (PKM1), pyruvate kinase M2 (PKM2), and glucose transporter 1 (Glut1). Western blot was conducted to check the protein expressions of CD31, P21 and P53. TSA multiple immunofluorescence was employed to examine the expressions of CD31 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Results** On the 9th day of culture, when the cell ratio was 2:1, the 3D cell tumorspheres exhibited the maximum volume, the highest cell count, and the highest ATP content ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank control group, the 3D cell tumorspheres in all drug-administered groups showed reductions in the volume, cell count, and ATP content ($P<0.05$). Compared with the doxorubicin hydrochloride group, the low-dose TGCS group showed increases in the volume, cell count, and ATP content of 3D cell tumorspheres ($P<0.05$, $P<0.01$); the medium-dose TGCS group showed reductions in the volume of 3D cell tumorspheres ($P<0.01$); the high-dose TGCS group exhibited reductions in the volume, cell count, and ATP content of the 3D cell tumorspheres ($P<0.01$). Compared with the low-dose TGCS group, the medium- and high-dose TGCS groups exhibited reductions in the volume, cell count, and ATP content of the 3D cell tumorspheres ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the medium-dose TGCS group, the high-dose TGCS group exhibited reductions in the volume, cell count, and ATP content of the 3D cell tumorspheres ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the 2D group, the glycolytic pathway was upregulated in the 3D group; conversely, compared with the 3D group, the glycolytic pathway was downregulated in the high-dose TGCS group. Compared with the 2D group, the mRNA expression levels of PKM1, PKM2 and Glut1, as well as the protein expression level of CD31, increased in the 3D group ($P<0.01$), while the protein expression levels of P53 and P21 decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the 3D group, the mRNA expression levels of PKM1 and Glut1 reduced in all drug-administered groups ($P<0.05$, $P<0.01$), while the protein expression levels of P53 and P21 increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA expression level of PKM2 and the protein expression level of CD31 decreased in the doxorubicin hydrochloride group, as well as the medium- and high-dose TGCS groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the doxorubicin hydrochloride group, the low-dose TGCS group exhibited elevated mRNA expression levels of PKM1 and PKM2 ($P<0.05$, $P<0.01$) and reduced protein expression level of P21 ($P<0.05$). The medium-dose TGCS group showed decreased mRNA expression level of PKM2 and protein expression levels of P21 and CD31 ($P<0.05$, $P<0.01$). The high-dose TGCS group demonstrated reduced mRNA expression levels of PKM1, PKM2 and Glut1, as well as protein expression levels of P53, P21 and CD31 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the low-dose TGCS group, the medium-dose group exhibited decreased mRNA expression levels of PKM1 and PKM2, as well as protein expression level of CD31 ($P<0.05$, $P<0.01$); while the high-dose group showed reduced mRNA expression levels of PKM1, PKM2 and Glut1, as well as protein expression levels of P53, P21 and CD31 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the medium-dose TGCS group,

the high-dose group exhibited reduced mRNA expression level of Glut1 and protein expression levels of P53 and P21 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank control group, both the doxorubicin hydrochloride group and the high-dose TGCS group showed a decrease in the number of PCNA- and CD31-positive cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the doxorubicin hydrochloride group, the high-dose TGCS group demonstrated a reduction in the number of CD31-positive cells ($P<0.01$). **Conclusion** A relatively stable 3D cell tumorsphere model can be established when the ratio of colorectal cancer cells to endothelial cells is 2:1. TGCS can inhibit tumorsphere growth and angiogenesis.

[**Keywords**] colorectal cancer; Tianma Granules; 3D tumorsphere; glycolysis; angiogenesis

二维(two-dimensional, 2D)培养是肿瘤细胞研究中广泛使用的基本方法。然而,近年研究表明,三维(three-dimensional, 3D)细胞培养模型比2D培养能更真实地模拟原发性肿瘤的关键特征,且操作相对简便^[1]。尽管类器官已广泛应用于肿瘤发生机制及抗肿瘤药理学研究,但其仍存在培养成本较高、适用细胞类型有限、易发生突变和表型不稳定以及长期培养稳定性较差等缺点^[2]。3D细胞肿瘤球培养具有操作简便、成本相对较低的优势,且适用于研究特定细胞类型间的相互作用。另外,由多种细胞类型组成的3D细胞肿瘤球体比由单一细胞类型构成的球体能更好地模拟肿瘤异质性的特点,是判断肿瘤进展、治疗反应、药物渗透和耐药性的重要体外模型^[3]。肿瘤细胞和内皮细胞是肿瘤微环境中的重要细胞类型,二者共同参与肿瘤血管生成过程^[4]。3D共培养可模拟肿瘤细胞与微环境(如血管内皮)的相互作用,为研究肿瘤生长和转移机制提供合适的细胞模型。本研究选用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)作为研究对象。研究表明,该细胞具有较高的可用性和稳定性,在分子生物学、细胞生物学及药理学研究中应用广泛^[5]。既往研究报道,胰腺癌细胞、肝癌细胞与HUVEC 3D共培养的比例分别为1:4^[6]和3:1^[7],但目前尚无研究报道关于肠癌细胞与HUVEC 3D共培养的比例。因此,本研究拟建立一种包含肠癌细胞和HUVEC的3D细胞肿瘤球,为后续抗肿瘤研究提供合适的体外模型。

天马颗粒是湖南省著名中医外科学专家何永恒教授创立的治疗结直肠癌的专利方,具有抗癌解毒、祛瘀止痛的功效^[8-9]。20余年临床研究证实,该方可有效预防结直肠癌的复发和转移,减轻放/化疗毒副作用,与现代医学治疗手段(手术、放/化疗、分子靶向及免疫治疗)联合可协同增效^[8,9]。团队前期实验研究发现,天马颗粒可通过调控 Friend 白血病病毒整合基因1/Kltho基因、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白等通路抑制结直肠癌细胞的生长^[10,11],初步揭示了该方抗结直肠癌的分子机制。但既往研究采用的是2D培养的肿瘤细胞模型,无法客观地评价该方的体外疗效,因此,亟须寻

找更合适的细胞模型以评价药物的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 细胞株及实验动物

人结肠癌细胞(HCT-116,货号:CL-0096)和HUVEC(货号:CP-H082)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,培养于DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清),置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,2~3 d传代1次。

SD雄性大鼠20只,体质量180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2021-0002。动物饲养于湖南省中医药研究院医学实验动物中心SPF级动物房,每笼5只,自由摄食、饮水,室温控制在(22±2)℃,相对湿度50%~60%,12 h/12 h明暗交替循环,适应性喂养1周后进行实验。本研究中涉及动物的实验均经湖南省中医药研究院动物伦理委员会批准(伦理编号:SY2024-0009)。

1.2 主要试剂

胎牛血清(长沙赛尔博克斯生物科技有限公司,批号:AUS-01S-02-S);高糖DMEM培养基、RNA提取试剂(美国赛默飞世尔科技公司,批号:11995073、15596026);PBS(浙江百迪生物科技有限公司,批号:L205-500);CCK-8检测试剂盒、cDNA合成反转录试剂盒、热启动通用型2×SYBR Green实时荧光定量PCR预混液[艾普拜生物科技(苏州)有限公司,批号:K1018、K1173、K1170];聚甲基丙烯酸羟乙酯、增强型三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒、4%多聚甲醛(上海碧云天生物技术有限公司,批号:ST1582、S0027、P0099);BCA试剂盒[赛文创新(北京)生物科技有限公司,批号:SW101-02];PVDF膜(德国默克密理博公司,批号:R8AA8000F);CD31抗体、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:11265-1-AP、10205-2-AP);DAPI(上海翌圣生物科技股份有限公司,货号:40727ES10);P53抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:AF0879);P21抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号:AB109520];GAPDH抗体(杭州华安生物技术有限公司

司,批号:ET1601-4);山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗(南京赛戈巍生物科技有限公司,货号:L3012);TSA 染料组合装试剂盒[多玛克(北京)有限公司,货号:DK750-15]。

1.3 主要仪器

CKX53 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);CellDrop 型细胞计数仪(美国 Denovix 公司);Synergy HT 型多功能微孔板扫描仪(美国 BioTek 公司);T100 型 PCR 仪(美国伯乐公司);Light Cycler480II 型荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司)。

1.4 药物

天马颗粒组方:蜈蚣、全蝎、半边莲、黄柏、醋制三棱、胆南星、海藻、黄芪、山药、大黄(专利号:ZL2017 1 0036198.2),购自湖南省中医药研究院附属医院。该颗粒由华润三九医药股份有限公司生产,经湖南省食品与药品监督管理局批准生产并质检合格(批准文号:1304002H,规格:10 g/包)。盐酸阿霉素(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:D1515)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

将 20 只 SPF 级 SD 雄性大鼠分为空白组和天马颗粒组,每组 10 只。天马颗粒灌胃剂量按体表面积换算系数^[12]折算为 70 kg 成人等效剂量,使用蒸馏水配制药液浓度为 0.175 g/mL,灌胃剂量为 10 mL/kg,2 次/d,连续给药 7 d。空白组予以蒸馏水灌胃,剂量、频次、天数相同。第 7 天灌胃 2 h 后收集腹主动脉血,室温静置 2 h,离心,收集血清,56 °C 水浴 30 min 灭活补体,除菌后分装,-80 °C 储存。

2.2 3D 细胞肿瘤球的共培养比例筛选

将 HCT-116 和 HUVEC 以 4:1、2:1、1:1、1:2、1:4 比例混合,即分为 4:1 组、2:1 组、1:1 组、1:2 组和 1:4 组,以每孔 5×10^3 个的细胞密度接种于超低吸附 96 孔板,培养 3、5、7、9 d,每 3 天换液 1 次,于倒置显微镜下拍照。

2.3 3D 细胞肿瘤球体积、细胞计数、ATP 含量测定

2.3.1 3D 细胞肿瘤球的分组及给药 将 HCT-116 和 HUVEC 以 2:1 比例混合,分为空白对照组、盐酸阿霉素组及天马颗粒含药血清低、中、高剂量组,以每孔 5×10^3 个的细胞密度接种于超低吸附 96 孔板,用于 3D 细胞肿瘤球体积计算、细胞计数及 ATP 细胞活力测定。空白对照组采用 15% 的空白血清处理,盐酸阿霉素组加入 15% 的空白血清+100 ng/mL

的盐酸阿霉素^[13],天马颗粒含药血清低、中、高剂量组分别加入 5%、10%、15% 含药血清+10%、5%、0% 空白血清(总量均为 15%),培养 9 d,每 3 d 换液 1 次,进行后续检测。

2.3.2 3D 细胞肿瘤球体积的计算 使用 ImageJ 软件处理图像,观察球体直径、纵横比和圆形成度。根据公式 $V = [(a^2) \times (b)]/2$,计算球体体积(V),其中 a 和 b 分别代表最大直径和最小直径。

2.3.3 3D 细胞肿瘤球细胞计数 为评估每个肿瘤球的细胞数量,使用移液管保持球体完整性,小心去除培养基,用 200 μ L PBS 洗涤球体。加入 50 μ L 胰蛋白酶后,样品在 37 °C 下孵育 30 min,每 5 min 吹打一次,促进球体解离成单细胞悬浮液,随后进行细胞计数。

2.3.4 3D 细胞肿瘤球 ATP 含量测定 从超低吸附 96 孔板中收集 3D 细胞肿瘤球,去除培养基,并用 PBS(200 μ L)洗涤,去除细胞外 ATP,重悬于无酚红 DMEM。随后将球体悬浮液(50 μ L)转移到不透明的 96 孔板,并加入 50 μ L 3D 细胞活力检测试剂,避光室温孵育 10 min 以诱导球体裂解。继续室温避光孵育 20 min,在酶标仪上进行检测,实验至少重复 3 次。

2.4 RNA 测序分析

取处于对数生长期的 2D 细胞和 3D 细胞肿瘤球,分为 2D 组(15% 空白血清处理),3D 组(15% 空白血清处理)和天马颗粒含药血清高剂量组(处理同 2.3.1)。各组处理结束后收集细胞,并将其送往南京奥维森基因科技有限公司进行转录组测序。在文库制备后,从原始数据中删除低质量的碱基,并使用 Hisat2 v2.0.5 软件将读数映射到参考基因组。采用 featureCounts v1.5.0-p3 软件计算每个基因的读取次数;计算外显子每千碱基百万片段数。使用 DE-Seq2 R 包(版本号 1.20.0)进行差异表达分析。

2.5 RT-qPCR 检测糖酵解相关基因 mRNA 表达

取处于对数生长期的 2D 细胞和 3D 细胞肿瘤球,分为 2D 组、3D 组、盐酸阿霉素组以及天马颗粒含药血清低、中、高剂量组,各组给药处理同 2.3.1 和 2.4。处理结束后收集细胞,吸弃培养基,每孔加入 1 mL RNA 提取试剂,反复吹打使细胞充分裂解,提取总 RNA。然后按照反转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA 并进行实时荧光定量 PCR 反应,检测糖酵解相关基因丙酮酸激酶 M1(pyruvate kinase M1, PKM1)、丙酮酸激酶 M2(pyruvate kinase M2,

PKM2)和葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, Glut1)的 mRNA 表达水平,以 GAPDH 作为内参基因。每个样品设置3 个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	反向:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	
PKM1	正向:CTATCTCTGAGGCTCTGC	102
	反向:CCATGAGGTCTGTGGAGTGA	
PKM2	正向:CGCCTGGACATTGACTCTG	122
	反向:TGTAGAACTCCTCAATAACCTTCTG	
Glut1	正向:GATCTGAGCTACGGGGTCTT	122
	反向:CGATCACCCGAAGTTCAGTAG	

2.6 Western blot 检测 CD31、P21、P53 蛋白表达

细胞分组及处理同“2.3.1 和 2.4”,各组处理结束后收集细胞,提取总蛋白,每组加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,超声 5 min 并在冰上裂解 30 min,每隔 10 min 震荡 1 次,使其充分裂解,在 4 ℃、12 000×g 的条件下离心 15 min,取蛋白上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。用 5×loading Buffer 配制蛋白上样缓冲液,样品上样并电泳分离,转膜后用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h,加入相应一抗,包括 CD31(稀释比 1:2 000)、P21(稀释比 1:2 000)、P53(稀释比 1:500),4 ℃摇床孵育过夜,TBST 清洗后加入山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗(稀释比 1:4 000)室温孵育 2 h。最后用增强型化学发光试剂显影,并用 ImageJ 软件分析,以目的蛋白灰度值/内参灰度值比值作为最终结果。

2.7 TSA 多重免疫荧光检测 CD31、PCNA 的表达

取处于对数生长期的 3D 肿瘤球进行分组处理,分为空白对照组、盐酸阿霉素组以及天马颗粒含药血清高剂量组,各组给药处理同 2.3.1。处理结束后,用 500 μL 4%多聚甲醛固定,将球体包埋在石蜡中并切片,然后进行抗原修复;加入相应一抗,包括 CD31(稀释比 1:2 000)、PCNA(稀释比 1:10 000),4 ℃孵育过夜;PBST 浸洗 5 次,每次 5 min;加入山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗(稀释比:1:4 000)室温孵育 30 min;PBST 浸洗 5 次,每次 5 min;最后用 TSA 荧光染料(稀释比 1:200)孵育 5 min,并用 DAPI 复染细胞核。在荧光显微镜下观察并拍照。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件处理实验数据。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间比较时,若符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法;若不符合正态分布或方差不齐,采用 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较采用 Dunn's 检验。两组间比较时,若符合正态分布且方差齐,配对设计采用配对 *t* 检验,成组设计采用两独立样本 *t* 检验;若不符合正态分布,配对设计采用 Wilcoxon 符号秩检验,成组设计采用 Mann-Whitney *U* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 3D 细胞肿瘤球的构建及表征

当细胞比例为 4:1、2:1 和 1:4 时,随着时间的延长,3D 细胞肿瘤球形态较好,体积逐渐增大,其中以细胞比例为 2:1 时体积最大($P<0.01$)。此外,在第 9 天时,细胞数量最多($P<0.05, P<0.01$),ATP 含量最高($P<0.05, P<0.01$)。基于此,选用 2:1 的细胞比例并在培养第 9 天时进行后续研究。详见图 1、表 2—3。

3.2 天马颗粒抑制 3D 细胞肿瘤球的生长

与空白对照组比较,盐酸阿霉素组、天马颗粒含药血清低、中、高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小、细胞数量减少、ATP 含量降低($P<0.01$)。与盐酸阿霉素组比较,天马颗粒含药血清低剂量组 3D 细胞肿瘤球体积增大、细胞数量增加、ATP 含量升高($P<0.05, P<0.01$);天马颗粒含药血清中剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小($P<0.01$);天马颗粒含药血清高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小、细胞数量减少、ATP 含量降低($P<0.01$)。与天马颗粒含药血清低剂量组比较,天马颗粒含药血清中、高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小、细胞数量减少、ATP 含量降低($P<0.05, P<0.01$);与天马颗粒含药血清中剂量组比较,天马颗粒含药血清高剂量组 3D 细胞肿瘤球体积缩小、细胞数量减少、ATP 含量降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图 2、表 4。

3.3 天马颗粒抑制 3D 细胞肿瘤球糖酵解通路

转录组学测序结果表明,与 2D 组相比,3D 组糖酵解通路上调;与 3D 组比较,天马颗粒含药血清高剂量组糖酵解通路下调。详见图 3。

RT-qPCR 结果表明,与 2D 组相比,3D 组糖酵解相关基因 PKM1、PKM2 和 Glut1 mRNA 表达水平均升高($P<0.01$)。与 3D 组相比,盐酸阿霉素组及天马颗粒含药血清低、中、高剂量组 PKM1 和 Glut1

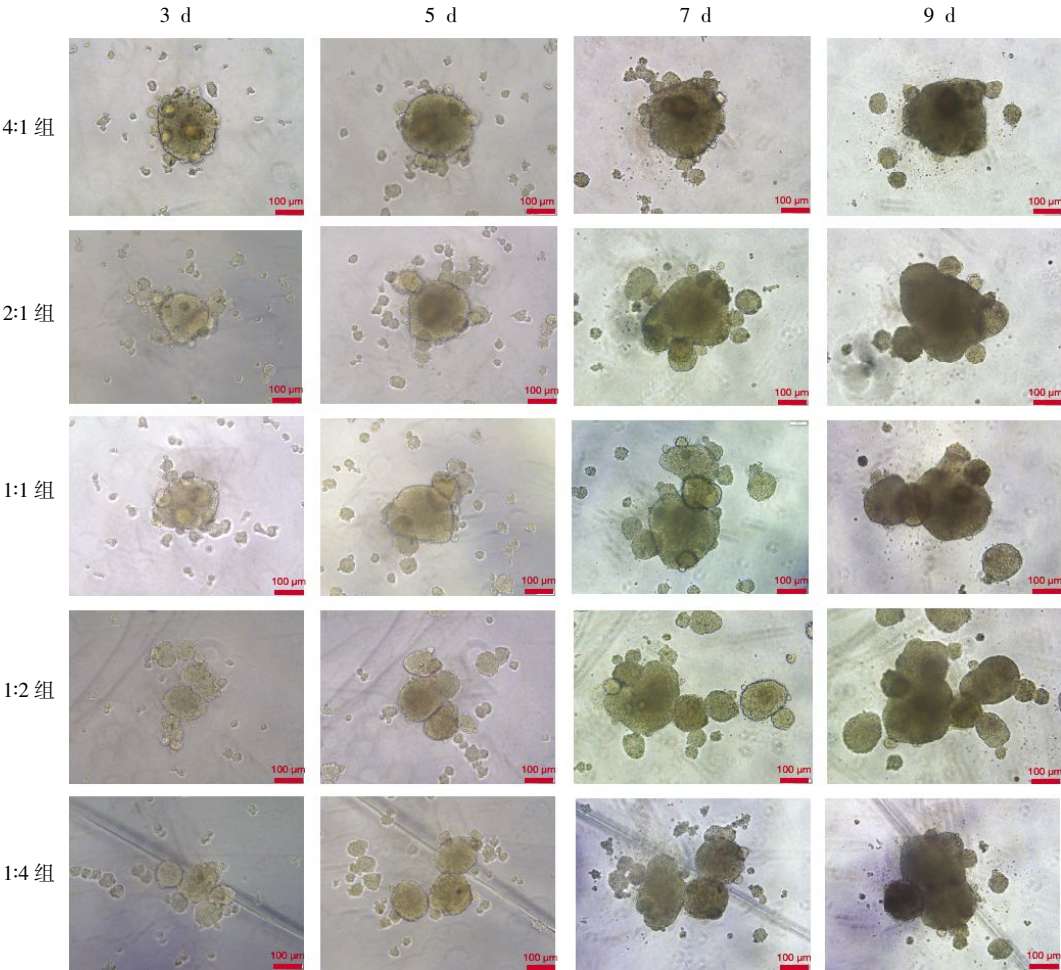


图 1 不同细胞比例的 3D 细胞肿瘤球代表图(×200)

Fig.1 Representative images of 3D cell tumorspheres with different cell ratios (×200)

表 2 不同细胞比例的 3D 细胞肿瘤球体积比较
($\bar{x}\pm s, n=5, \text{mm}^3$)

Table 2 Comparison of volume of 3D cell tumorspheres with different cell ratios ($\bar{x}\pm s, n=5, \text{mm}^3$)

组别	3 d	5 d	7 d	9 d
4:1 组	0.023±0.002 ^{##}	0.027±0.003 ^{##}	0.043±0.004 ^{##}	0.069±0.004 ^{**}
2:1 组	0.022±0.000 ^{##}	0.025±0.000 ^{##}	0.051±0.001 ^{##}	0.091±0.000
1:1 组	0.028±0.000 ^{##}	0.033±0.001 [*]	0.036±0.000 ^{##}	0.051±0.000 ^{**}
1:2 组	0.003±0.001 ^{***}	0.008±0.002 ^{***}	0.045±0.003	0.042±0.003 ^{**}
1:4 组	0.003±0.001 ^{***}	0.005±0.001 ^{***}	0.009±0.002 ^{***}	0.051±0.000 ^{**}

注:与2:1组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与9 d比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表 3 不同细胞比例的 3D 细胞肿瘤球细胞数量和 ATP 含量比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Comparison of cell number and ATP content in 3D cell tumorspheres with different cell ratios ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	细胞数量/个	ATP 含量/($\mu\text{mol/L}$)
4:1 组	21 675.0±1 312.4 [*]	2.721±0.190 [*]
2:1 组	30 950.0±714.1	3.616±0.125
1:1 组	16 825.0±1 260.6 ^{**}	2.315±0.139 ^{**}
1:2 组	15 000.0±1 407.1 ^{**}	2.417±0.316 ^{**}
1:4 组	17 425.0±1 997.3 ^{**}	2.118±0.087 ^{**}

注:与2:1组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

mRNA 表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$);盐酸阿霉素组及天马颗粒含药血清中、高剂量组 PKM2 mRNA 表达水平均降低($P<0.01$)。与盐酸阿霉素组相比,天马颗粒含药血清低剂量组 PKM1和 PKM2 mRNA 表达水平均升高($P<0.05, P<0.01$);天马颗粒含药血清中剂量组 PKM2 mRNA 表达水平降低($P<0.01$);天马颗粒含药血清高剂量组 PKM1、PKM2 和 Glut1 mRNA 表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$)。与天马颗粒含药血清低剂量组相比,天马颗粒含药血清中剂量组 PKM1 和 PKM2 mRNA 表达水平均降低($P<0.01$);天马颗粒含药血清高剂量组 PKM1、PKM2 和 Glut1 mRNA 表达水平均降低($P<0.01$)。与天马颗粒含药血清中剂量组相比,天马颗粒含药血清高剂量组 Glut1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。详见表 5。

3.4 天马颗粒调控 3D 细胞肿瘤球 P53、P21、CD31 蛋白的表达

与 2D 组相比,3D 组 P53、P21 蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$),CD31 蛋白表达水平均升高($P<0.01$)。与 3D 组相比,盐酸阿霉素组及天马颗粒

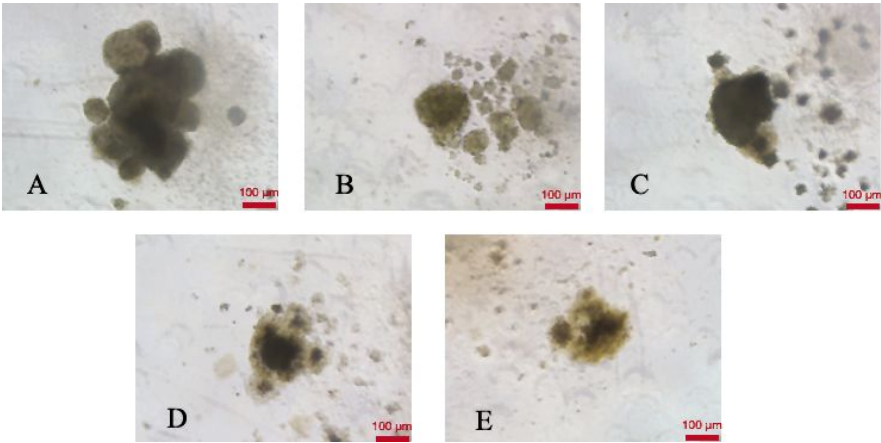


图2 各组3D细胞肿瘤球代表图(×200)

Fig.2 Representative images of 3D cell tumorspheres in groups (×200)

注:A.空白对照组;B.盐酸阿霉素组;C.天马颗粒含药血清低剂量组;D.天马颗粒含药血清中剂量组;E.天马颗粒含药血清高剂量组。

表4 各组3D细胞肿瘤球体积、细胞数量和ATP含量比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Comparison of 3D cell tumorspheres volume, cell number and ATP content in groups ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	体积/mm ³	细胞数量/个	ATP含量/(μmol/L)
空白对照组	0.088±0.003	32 050.0±1 686.2	3.875±0.152
盐酸阿霉素组	0.009±0.002**△△	7 125.0±853.9**	0.921±0.051**
天马颗粒含药血清低剂量组	0.021±0.003**##	11 500.0±1 291.0**##	1.236±0.129**#
天马颗粒含药血清中剂量组	0.002±0.001**##○○	7 750.0±645.5**○	0.853±0.132**○
天马颗粒含药血清高剂量组	0.000±0.000**##○○△△	5 050.0±420.3**##○○△△	0.441±0.134**##○○△△

注:空白对照组相比,** $P<0.01$;与盐酸阿霉素组相比,* $P<0.05$,# $P<0.01$;与天马颗粒含药血清低剂量组相比,○○ $P<0.05$,○ $P<0.01$;与天马颗粒含药血清中剂量组相比,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

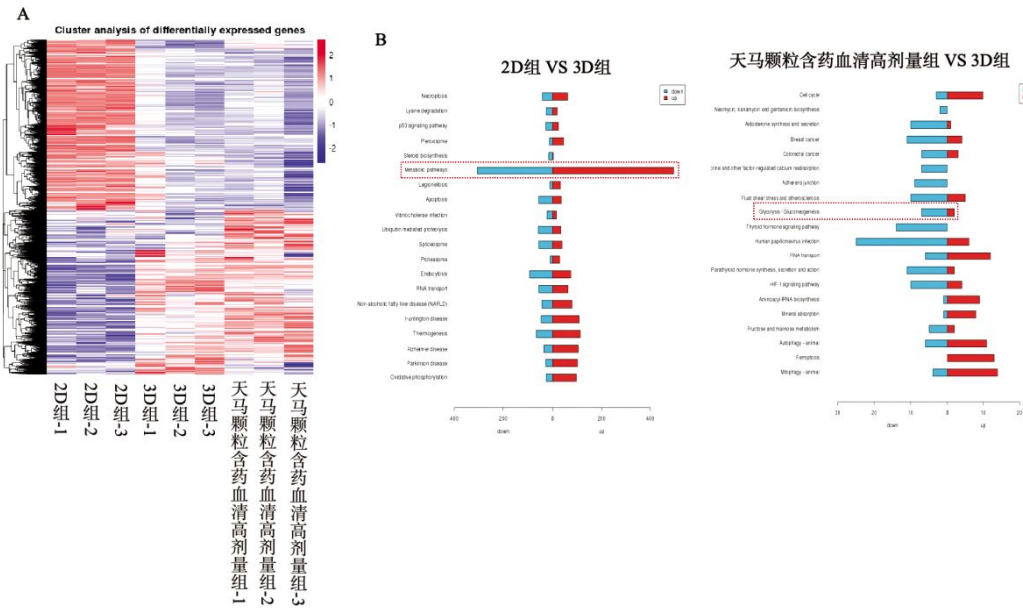


图3 各组转录组测序结果

Fig.3 Transcriptome sequencing results for each group

注:A.热图;B.通路富集图。

表 5 各组 PKM1、PKM2、Glut1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Comparison of mRNA expression levels of PKM1, PKM2 and Glut1 among groups ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	PKM1	PKM2	Glut1
2D 组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
3D 组	19.945±2.580**	37.544±12.684**	19.793±3.862**
盐酸阿霉素组	12.048±3.450**#	21.127±11.139**##	10.911±3.910***
天马颗粒含药血清低剂量组	14.167±1.623***#	37.142±9.526***##	11.161±3.905***
天马颗粒含药血清中剂量组	10.326±1.820***## [○]	7.800±3.566***## [○]	9.324±0.700***
天马颗粒含药血清高剂量组	9.590±1.900***## [○]	8.630±3.819***## [○]	7.305±2.169***## [○] ▲

注:与 2D 组相比,** $P<0.01$;与 3D 组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与盐酸阿霉素组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与天马颗粒含药血清低剂量组相比,[○] $P<0.01$;与天马颗粒含药血清中剂量组相比,▲ $P<0.05$ 。

含药血清低、中、高剂量组 P53、P21 蛋白表达水平均升高($P<0.05, P<0.01$);盐酸阿霉素组及天马颗粒含药血清中、高剂量组 CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$)。与盐酸阿霉素组相比,天马颗粒含药血清高剂量组 P53 蛋白表达水平降低($P<0.05$);天马颗粒含药血清低、中、高剂量组 P21 蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$);天马颗粒含药血清中、高剂量组 CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与天马颗粒含药血清低剂量组相比,天马颗粒含药血清高剂量组 P53、P21 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);天马颗粒含药血清中、高剂量组 CD31 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与天马颗粒含药血清中剂量组相比,天马颗粒含药血清高剂量组 P53、P21 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。详见图 4、表 6。

3.5 天马颗粒抑制 3D 细胞肿瘤球 PCNA 和 CD31 的表达

空白对照组、盐酸阿霉素组及天马颗粒含药血清高剂量组 CD31 和 PCNA 在肿瘤球周围呈高表达,中心区域表达较低;盐酸阿霉素和天马颗粒含药血清高剂量可抑制肿瘤球细胞中 PCNA 和 CD31 的表达。进一步定量分析结果显示,与空白对照组比较,盐酸阿霉素组和天马颗粒含药血清高剂量组 PCNA

和 CD31 阳性细胞数量均减少($P<0.05, P<0.01$);与盐酸阿霉素组比较,天马颗粒含药血清高剂量组 CD31 阳性细胞数量减少($P<0.01$)。详见图 5—6。

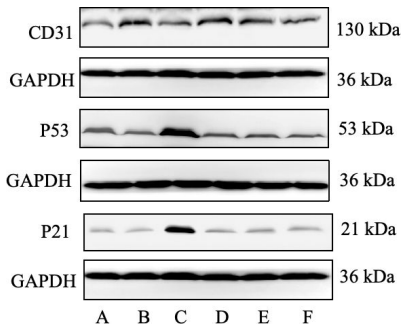


图 4 各组 P53、P21、CD31 蛋白条带图

Fig.4 Protein band diagrams of P53, P21 and CD31 in each group

注:A.2D 组;B.3D 组;C.盐酸阿霉素组;D.天马颗粒含药血清低剂量组;E.天马颗粒含药血清中剂量组;F.天马颗粒含药血清高剂量组。

4 讨论

本研究采用 1.2%(w/v)的聚甲基丙烯酸羟乙酯构建超低吸附涂层,探索 HCT-116 与 HUVEC 在 3D 共培养下的最佳成球比例。既往研究显示,不同肿瘤细胞与基质细胞或内皮细胞共培养的最佳比例各异,如胰腺癌细胞 PANC-1 与成纤维细胞MRC-5、

表 6 各组 P53、P21、CD31 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Comparison of protein expression levels of P53, P21 and CD31 among groups ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	P53	P21	CD31
2D 组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
3D 组	0.591±0.125**	0.685±0.088*	3.505±1.051**
盐酸阿霉素组	1.455±0.259##	2.654±0.634***	2.743±0.901**#
天马颗粒含药血清低剂量组	1.384±0.182##	1.426±0.183### [△]	2.892±1.144**
天马颗粒含药血清中剂量组	1.332±0.348##	1.350±0.121### [△]	1.569±0.430### [△]
天马颗粒含药血清高剂量组	0.796±0.166# [△] [○]	0.894±0.315### [△] [○]	1.348±0.453### [△]

注:与 2D 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 3D 组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。与盐酸阿霉素组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与天马颗粒含药血清低剂量组相比,* $P<0.05$;与天马颗粒含药血清中剂量组相比,[○] $P<0.05$ 。

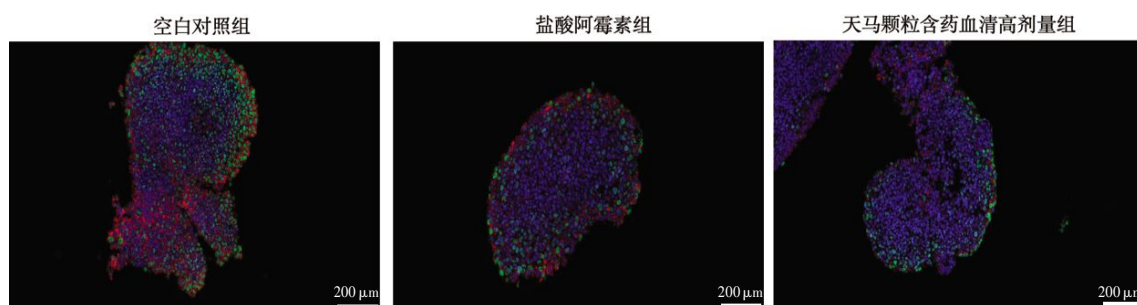


图 5 各组 PCNA、CD31 的表达(×200)

Fig.5 Expression of PCNA and CD31 in each group (×200)

注:绿色.PCNA;红色.CD31;蓝色.DAPI。

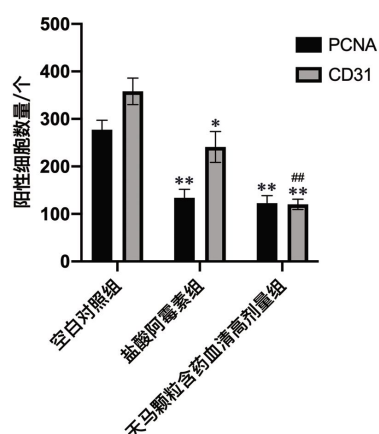


图 6 各组 PCNA、CD31 阳性细胞数量比较

Fig.6 Comparison of the number of PCNA- and CD31-positive cells among groups

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与盐酸阿霉素相组比,### $P<0.01$ 。

HUVEC 以 1:9:4 比例培养时肿瘤球体积最大^[6],而 HCT-116 与成纤维细胞 HLF 以 1:4 比例共培养时成球效果最佳^[3]。基于此,本研究设置了 HCT-116 与 HUVEC 的共培养比例分别为 4:1、2:1、1:1、1:2 和 1:4,结果显示,当比例为 2:1 时,肿瘤球体积最大、细胞数量最多、ATP 含量最高。但不同肿瘤细胞与 HUVEC 的 3D 共培养最佳比例具有细胞特异性,需根据具体实验对象确定。

在药效评价方面,本研究结果显示,盐酸阿霉素及天马颗粒含药血清低、中、高剂量均能显著抑制 3D 细胞肿瘤球生长,其中以天马颗粒高剂量组效果最佳。天马颗粒为中药复方,具有多成分、多靶点、多途径的作用特点^[4]。本团队前期通过网络药理学及液质联用分析发现,天马颗粒中含有芹菜素、槲皮素、木犀草素、表儿茶素等多种有效成分^[5]。槲皮素可通过抑制糖酵解、阻滞细胞周期发挥抗肿瘤及抗血管新生作用^[16-17];木犀草素、表儿茶素等亦具有类似活性^[18-19]。上述成分可能是天马颗粒调控 Glut1、

PKM2、P53、P21、CD31 等多个靶点、干预糖酵解、细胞周期及血管新生等多条途径的物质基础。本研究中,天马颗粒低、中、高剂量对各检测指标的影响不尽相同,可能与不同分子通路对药物浓度的敏感性差异有关:部分通路对低浓度药物敏感,而另一些通路需较高浓度方可被有效调控。

代谢重编程是肿瘤生长的重要驱动因素。3D 细胞肿瘤球内部易形成缺氧环境,诱导糖酵解增强,进而促进 3D 细胞肿瘤球生长^[20]。本研究通过转录组测序比较 2D 细胞与 3D 细胞肿瘤球的差异,发现 3D 细胞肿瘤球糖酵解通路上调,糖酵解相关基因 PKM1、PKM2 和 Glut1 表达增加,此现象可能与肿瘤球内部缺氧密切相关^[21]。而天马颗粒含药血清可有效抑制上述糖酵解相关基因的表达。既往研究亦表明,乳腺癌肿瘤球中 miRNA(如 miR-3143)可直接调控脂质及糖代谢相关基因^[22]。因此,3D 细胞肿瘤球较 2D 细胞更能模拟体内肿瘤的缺氧微环境及代谢特征,天马颗粒可能通过抑制糖酵解发挥抗肿瘤作用。

P53/P21 轴是经典的抑癌通路,在细胞周期调控及 DNA 损伤反应中发挥关键作用^[23-24]。本研究发现,与 2D 细胞相比,3D 细胞肿瘤球中 P53、P21 呈低表达,提示 3D 微环境(如细胞间接触、基质刚度)可能更接近体内肿瘤的高增殖状态,从而下调 P53、P21 的表达。免疫荧光结果显示,3D 细胞肿瘤球中增殖标志物 PCNA 高表达进一步佐证其高增殖活性,这与 BADEA 等^[25]在 MDA-MB-231 肿瘤球中的观察一致。经天马颗粒含药血清或盐酸阿霉素处理后,P53、P21 表达上调,PCNA 表达受到抑制,其中盐酸阿霉素对 P53、P21 的上调作用更为显著,天马颗粒则以低剂量效果最佳。此外,与 2D 细胞相比,3D 细胞肿瘤球中血管新生标志物 CD31 表达上调,尤其以球体边缘部分更为显著,这与球体内部营养

及氧气缺乏有关^[26]。天马颗粒含药血清与盐酸阿霉素均可不同程度抑制 CD31 表达,提示二者均具有抗血管新生作用。

本文建立了一种包含肠癌细胞和内皮细胞的 3D 细胞肿瘤球,基于该模型揭示了天马颗粒抗结直肠癌生长和血管新生的药效作用,但进一步体内实验和机制研究有待后续完善。综上,该模型为建立更完善的 3D 细胞肿瘤球提供了方法学依据,并为研究其他中药复方的体外抗肿瘤作用提供了可靠的方法。

参考文献

- [1] ROY M, ALIX C, BOUAKAZ A, et al. Tumor spheroids as model to design acoustically mediated drug therapies: A review[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 806.
- [2] MOSS S P, BAKIRCI E, FEINBERG A W. Engineering the 3D structure of organoids[J]. *Stem Cell Reports*, 2025, 20(1): 102379.
- [3] BAULETH-RAMOS T, FEIJÃO T, GONÇALVES A, et al. Colorectal cancer triple co-culture spheroid model to assess the biocompatibility and anticancer properties of polymeric nanoparticles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 323: 398–411.
- [4] XU G Z, GUAN H Y, GUO Y G, et al. USP13 suppresses colorectal cancer angiogenesis by downregulating VEGFA expression through inhibition of the PTEN-AKT pathway[J]. *Oncology Research*, 2025, 33(8): 1947–1967.
- [5] CAO Y. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in pharmacology and toxicology: A review[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2025, 45(12): 2512–2545.
- [6] LAZZARI G, NICOLAS V, MATSUSAKI M, et al. Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 78: 296–307.
- [7] HAN S, LIM J Y, CHO K, et al. Anti-cancer effects of YAP inhibitor (CA3) in combination with sorafenib against hepatocellular carcinoma (HCC) in patient-derived multicellular tumor spheroid models (MCTS)[J]. *Cancers*, 2022, 14(11): 2733.
- [8] 彭天书, 谢彪, 聂甜, 等. 天马颗粒剂在抑制结直肠癌术后肿瘤复发中的临床效果[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 191–193.
- [9] 黄国栋, 黄媛华, 黄敏, 等. 天马颗粒剂配合希罗达治疗中晚期大肠癌的临床研究[J]. *中药材*, 2009, 32(5): 831–832.
- [10] 王华帅, 谢彪, 罗敏, 等. 天马颗粒通过 FLI-1/Klotho 通路对结直肠癌 HCT116 增殖抑制的作用机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(10): 1656–1662.
- [11] 邓松华. 天马颗粒剂的拆方研究及其精减方对大肠癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的作用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [12] 王华帅, 武明胜, 李一金, 等. 天马颗粒对结直肠癌细胞中 FLI-1 启动子甲基化影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(12): 2016–2021.
- [13] LIM I K, CHOI J A, KIM E Y, et al. TIS21/BTG2 inhibits doxorubicin-induced stress fiber-vimentin networks via Nox4-ROS-ABI2-DRF-linked signal cascade[J]. *Cellular Signalling*, 2017, 30: 179–190.
- [14] 汤晓娟, 任媛, 贺敏, 等. 中医药防治结直肠癌-结直肠癌“炎-癌转化”疗效、优势评价及作用机制[J]. *中国中医药信息杂志*, 2025, 32(2): 20–24.
- [15] TANG X J, REN Y, LI Y M, et al. Targeting senescence: Tianma granule inhibits colorectal cancer progression by modulating miR-29a-5p/P53 signaling in the tumor microenvironment[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2026, 70(2): e70338.
- [16] DAS S, SAHA M, MAHATA L C, et al. Quercetin and 5-fluorouracil loaded chitosan nanoparticles trigger cell-cycle arrest and induce apoptosis in HCT116 cells via modulation of the p53/p21 axis[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(40): 36893–36905.
- [17] JIA L J, HUANG S, YIN X R, et al. Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction[J]. *Life Sciences*, 2018, 208: 123–130.
- [18] JANG C H, MOON N, OH J, et al. Luteolin shifts oxaliplatin-induced cell cycle arrest at G₀/G₁ to apoptosis in HCT116 human colorectal carcinoma cells[J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 770.
- [19] CHEN S H, NISHI M, MORINE Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate hinders metabolic coupling to suppress colorectal cancer malignancy through targeting aerobic glycolysis in cancer-associated fibroblasts[J]. *International Journal of Oncology*, 2022, 60(2): 19.
- [20] GONÇALVES I G, GARCÍA-AZNAR J M. Hybrid computational models of multicellular tumour growth considering glucose metabolism[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 1262–1271.
- [21] RIFFLE S, HEGDE R S. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36(1): 102.
- [22] MUCIÑO-OLMOS E A, VÁZQUEZ-JIMÉNEZ A, LÓPEZ-ESPARZA D E, et al. microRNAs regulate metabolic phenotypes during multicellular tumor spheroids progression[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 582396.
- [23] TRAN A P, TRALIE C J, REYES J, et al. Long-term p21 and p53 dynamics regulate the frequency of mitosis events and cell cycle arrest following radiation damage[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2023, 30(3): 660–672.
- [24] LUNDSTEN S, BERGLUND H, JHA P, et al. p53-mediated radiosensitization of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE in neuroblastoma tumor spheroids[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1695.
- [25] BADEA M A, BALAS M, HERMENEAN A, et al. Influence of matrigel on single- and multiple-spheroid cultures in breast cancer research[J]. *SLAS Discovery*, 2019, 24(5): 563–578.
- [26] SHIN S, CHOI Y, JANG W, et al. A vascularized tumors-on-a-chip model for studying tumor-angiogenesis interplay, heterogeneity and drug responses[J]. *Materials Today Bio*, 2025, 32: 101741.

(本文编辑 陈晨)