

• 论 著 •

## 卵巢癌血管生成三维模型的体外构建\*

周静雅<sup>1</sup>, 李欣<sup>2</sup>, 韩庆<sup>1△</sup>(1. 三峡大学第一临床医学院/宜昌市中心人民医院妇产科, 湖北宜昌 443003; 2. 宜昌市第二人民医院  
放化疗科/三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443003)

**[摘要]** **目的** 利用人脐静脉内皮细胞(HUVECs)及卵巢癌患者腹水中原代卵巢癌细胞构建体外卵巢癌血管生成三维模型。**方法** 2019年11月至2021年1月原代提取及培养HUVECs及卵巢癌细胞,分3组进行细胞培养。A组为无Matrigel基质胶条件下卵巢癌细胞和HUVECs间接共培养,B组为Matrigel基质胶条件下HUVECs单独培养,C组为Matrigel基质胶条件下卵巢癌细胞和HUVECs三维间接共培养。观察各组HUVECs血管生成情况。采用免疫印迹试验检测卵巢癌细胞条件培养液对HUVECs的CD105表达水平的影响,Transwell实验检测卵巢癌细胞条件培养液对HUVECs侵袭能力的影响。**结果** 成功提取原代HUVECs和卵巢癌细胞,A组HUVECs有突起或伪足,但不形成管状或网状结构;B组HUVECs排列成网状,但没有细胞的变形、伪足和融合,也不形成类毛细血管样结构;C组HUVECs形成了不连续的三维类毛细血管样结构。卵巢癌细胞条件培养液可增强HUVECs的CD105表达并增强其侵袭能力。**结论** 成功构建了体外卵巢癌血管生成三维模型,卵巢癌细胞具有促进HUVECs增殖及侵袭能力。该模型能为研究卵巢癌的血管生成提供一个更接近体内生理状态的体外模型。

**[关键词]** 卵巢肿瘤; 新生血管化; 体外研究; 三维模型; 人脐静脉内皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.08.003 中图法分类号:R737.31

文章编号:1009-5519(2023)08-1275-06 文献标识码:A

## Construction of a three-dimensional model of ovarian cancer angiogenesis in vitro\*

ZHOU Jingya<sup>1</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, HAN Qing<sup>1△</sup>(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Yichang Central People's Hospital/the First College  
of Clinical Medical Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China;2. Department of Chemoradiotherapy, the Second People's Hospital of Yichang/  
Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy,  
Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct a 3D model of ovarian cancer angiogenesis in vitro using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and protogenic ovarian cancer cells from ascites of ovarian cancer patients. **Methods** Primary HUVECs and ovarian cancer cells were extracted and cultured from November 2019 to January 2021, and cell culture was performed in three groups. In group A, ovarian cancer cells were indirectly co-cultured with HUVECs without Matrigel gel; in group B, HUVECs were separately cultured with Matrigel gel; and in group C, ovarian cancer cells and HUVECs were indirectly co-cultured with Matrigel gel. The angiogenesis of HUVECs in each group was observed. Western blotting was used to detect the effect of ovarian cancer cell conditioned medium on CD105 expression level in HUVECs, and Transwell assay was used to detect the effect of ovarian cancer cell conditioned medium on the invasion ability of HUVECs. **Results** Primary HUVECs and ovarian cancer cells were extracted successfully. HUVECs in group A had protuberance or pseudopodia, but did not form tubular or reticular structure. HUVECs in group B were arranged in a network, but there was no cell deformation, pseudopod and fusion, and no capillary-like structure. HUVECs in group C formed a discontinuous 3D capillary-like structure. Ovarian cancer cells conditioned medium enhanced CD105

\* 基金项目:湖北省科技厅科学研究计划重点项目(D20211206);湖北省宜昌市科技攻关项目(A21-2-013);三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室开放基金项目(2017KZL02)。

作者简介:周静雅(1997—),硕士研究生,住院医师,主要从事妇科肿瘤的研究。△ 通信作者,E-mail:1205472677@qq.com。

expression and invasiveness in HUVECs. **Conclusion** The 3D model of ovarian cancer angiogenesis is successfully constructed in vitro, and the ovarian cancer cells have the ability to promote the proliferation and invasion of HUVECs. This model can provide an in vitro model for studying the angiogenesis of ovarian cancer which is more similar to the physiological state in vivo.

**[Key words]** Ovarian tumor; Neovascularization; In vitro study; Three-dimensional model; Human umbilical vein endothelial cells

卵巢癌被称为“沉默的杀手”，其病死率为妇科恶性肿瘤之首。2020 年全球新增卵巢癌患者 31.4 万例，死亡病例超过 20.7 万例<sup>[1]</sup>。超过 80% 的患者被发现时已为晚期转移，难以早期诊断卵巢癌是导致其病死率居高不下的主要原因<sup>[2]</sup>。卵巢癌的播散、转移与腹水有关，有研究发现，晚期患者腹水中含有肿瘤细胞聚集的“球形体”，这种“球形体”是形成腹、盆腔继发性转移的关键因素<sup>[3]</sup>。此外，卵巢癌转移与肿瘤相关血管生成密切相关。血管生成与卵巢癌相互促进，使卵巢癌细胞的侵袭性更强。抗血管生成治疗是通过血管生成抑制剂阻断促血管生成因子，靶向抑制肿瘤血管生成的一种治疗方法<sup>[4]</sup>。因此，在体外构建血管生成模型将有利于在体外更好地实现对筛选卵巢癌抗血管生成药物和血管生成机制的研究。

目前，卵巢癌研究模型主要采用肿瘤细胞株二维/三维培养模型、异种移植模型和类器官。传统二维培养模型操作简单，但与人体内的肿瘤微环境差异较大，且由于卵巢癌的肿瘤异质性，癌细胞系无法代表人体内卵巢癌细胞表型。患者来源的异种移植模型和类器官能体现肿瘤异质性，但费用高、周期长且对实验条件及伦理要求高，且目前尚未建立标准化的类器官培养方案，类器官研究的可重复性尚有待于确定<sup>[5]</sup>。三维培养模型与人体内环境更为接近。因此，利用人来源的原代细胞研究新的可模拟肿瘤细胞生长微环境的体外肿瘤三维模型研究卵巢癌意义重大<sup>[6]</sup>。本研究通过原代提取及培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)和卵巢癌患者腹水中的原代卵巢癌细胞，利用 Matrigel 基质胶构建三维血管生成模型，在同一微环境中 HUVECs 和卵巢癌细胞相互作用下，HUVECs 表达肿瘤血管内皮的特性，形成与体内类似的卵巢癌血管生成模型，旨在为深入研究针对卵巢癌血管内皮细胞的抗肿瘤治疗研究提供更贴近真实人体内环境的模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂和材料** 杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)/F12 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司，Percoll 细胞分离液购自天津灏洋华科

生物科技公司，RIPA 蛋白裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司，CD31 抗体、Ⅷ因子抗体均购自武汉博士德公司，鼠抗人上皮细胞黏附分子(EpCAM)流式抗体、兔抗人 CD105 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司，鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司，Matrigel 基质胶、侵袭/迁移培养小室 3422(8.0  $\mu$ m)均购自美国 Corning 公司，Millicell PIHP 01250 插入式细胞培养皿(0.4  $\mu$ m)购自美国 Millipore 公司。

**1.1.2 腹水、脐带标本来源** 腹水标本来源于 2019 年 11 月至 2021 年 1 月宜昌市第二人民医院妇科进行手术并经病理检查证实的 10 例卵巢癌手术患者，脐带标本来源于宜昌市第二人民医院产科收治的 10 例无乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒感染，无妊娠期高血压症、羊水污染的足月剖宫产健康产妇。采用无菌 50 mL 离心管收集新鲜脐带及腹水，30 min 内 4  $^{\circ}$ C 快速运输至实验室用于 HUVECs 和卵巢癌细胞的原始培养。研究对象对本研究知情并同意参与，本研究经医院伦理委员会审批。

**1.1.3 细胞株与细胞培养液** 人卵巢癌细胞株 SK-OV3 和 CAOV3 购自中国科学院上海生科院细胞库。采用添加 10% 胎牛血清及 1% 青霉素和链霉素的 DMEM/F12 培养液。

### 1.2 方法

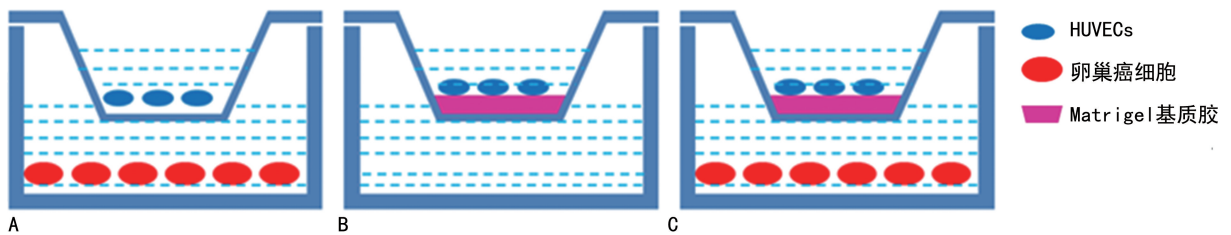
**1.2.1 HUVECs 分离培养及鉴定** 无菌条件下取脐带(20~25 cm)2 h 内进行 HUVECs 的胰酶消化法分离，采用 DMEM/F12 培养液培养。光学倒置相差显微镜下观察。选择生长状态良好的细胞进行形态学鉴定及血管内皮细胞表面 CD31、Ⅷ因子免疫荧光染色鉴定。

**1.2.2 流式分选卵巢癌腹水中原代卵巢癌细胞** 使用 Percoll 密度梯度离心技术从腹水中分离细胞<sup>[3]</sup>。通过胰蛋白酶消化法制备单细胞悬液。将细胞与 PE 标记的 EpCAM 抗体一起孵育，使用 MoFlo XDP 细胞分选仪(Beckman Coulter, Inc.)分选出 EpCAM 阳性原代卵巢癌细胞。用 DMEM/F12 培养液培养。

**1.2.3 细胞培养及分组** 分 3 组进行细胞培养，A 组为无 Matrigel 基质胶条件下卵巢癌细胞和

HUVECs 间接共培养, B 组为 Matrigel 基质胶条件下 HUVECs 单独培养, C 组为 Matrigel 基质胶条件下卵巢癌细胞和 HUVECs 三维间接共培养。具体方法: (1) 无 Matrigel 基质胶条件下原代卵巢癌细胞和 HUVECs 间接共培养。在 24 孔板中加入处于对数生长期的原代卵巢癌细胞(细胞密度  $1 \times 10^4$  个/孔, DMEM/F12 培养基 1 mL), 培养 24 h 后换液, 加入 600  $\mu\text{L}$  DMEM/F12 培养基, 在 24 孔板中插入 Millicell 共培养小室, 并在 Millicell 小室中加入处于对数生长期的 HUVECs (细胞密度  $3 \times 10^3$  个/孔, DMEM/F12 培养基 400  $\mu\text{L}$ ), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳( $\text{CO}_2$ )培养箱培养, 观察细胞生长。见图 1A。(2) Matrigel 基质胶条件下 HUVECs 单独培养。提前将 Matrigel 基质胶(常规存放于  $-80^\circ\text{C}$ )置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜使其充分溶解, 无血清培养基和 Matrigel 基质胶按 8:1 比例配制工作 Matrigel 基质胶。在 24 孔板中加入 DMEM/F12 培养基 600  $\mu\text{L}$ , 不加任何细胞,

在 24 孔板中插入铺有工作 Matrigel 基质胶(每孔 300  $\mu\text{L}$ )的 Millicell 小室, 并在小室中加入处于对数生长期的 HUVECs(细胞密度  $3 \times 10^3$  个/孔, DMEM/F12 培养基 100  $\mu\text{L}$ ), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h, 倒置显微镜下观察内皮细胞生长情况。见图 1B。(3) 三维血管生成模型(Matrigel 基质胶条件下原代卵巢癌细胞和 HUVECs 间接共培养)。在 24 孔板中加入处于对数生长期的原代卵巢癌细胞(细胞密度  $1 \times 10^4$  个/孔, DMEM/F12 培养基 1 mL), 培养 24 h 后换液, 加入 600  $\mu\text{L}$  DMEM/F12 培养液, 在 24 孔板中插入铺有工作 Matrigel 基质胶(每孔 300  $\mu\text{L}$ )的 Millicell 小室, 并在小室中加入处于对数生长期的 HUVECs(细胞密度  $3 \times 10^3$  个/孔, DMEM/F12 培养基 100  $\mu\text{L}$ ), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h, 倒置显微镜下观察内皮细胞的体外管道形成情况。见图 1C。



注: A. 卵巢癌细胞和 HUVECs 间接共培养; B. Matrigel 基质胶条件下 HUVEC 单独培养; C. Matrigel 基质胶条件下卵巢癌细胞和 HUVECs 三维间接共培养。

图 1 卵巢癌三维血管生成模型

**1.2.4 卵巢癌细胞条件培养液处理 HUVECs** 收集卵巢癌细胞(SKOV3、CAOV3、原代卵巢癌细胞)条件培养液, 即癌细胞培养至细胞密度达 70%~80% 时进行细胞换液。去除原培养液, 每个培养皿添加 5~8 mL DMEM/F12 培养液, 培养 24 h 后吸出, 离心后取上清液作为条件培养液。分别使用 SKOV3、CAOV3、原代卵巢癌细胞的培养液添加至 HUVECs 培养体系培养 72 h, 未添加卵巢癌细胞条件培养液的 DMEM/F12 培养液作为对照组。

**1.2.5 免疫印迹试验检测各组 HUVECs 的 CD105 表达水平** 收集各组 HUVECs, 使用 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞提取总蛋白, BCA 蛋白浓度检测法测定蛋白浓度。样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离, 并转移至聚偏氟乙烯膜上, 室温封闭 1 h。分别加入兔抗人 CD105 单克隆抗体(1:1 000 稀释)和鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:5 000),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 用 TBST 缓冲液漂洗, 加二抗室温孵育 2 h 后漂洗, 采用化学发光法检测蛋白强度。应用 Image-

Lab 软件测定各条带灰度值。实验重复 3 次, 取平均值。

**1.2.6 Transwell 实验检测各组 HUVECs 侵袭能力** 将各组 HUVECs 细胞胰酶消化计数后重悬于无血清 DMEM/F12 培养基中, 将 100  $\mu\text{L}$  细胞密度为每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液加入 Matrigel 基质包被的上室, 下室每孔加入含 10% 胎牛血清的培养液 600  $\mu\text{L}$ 。培养 24 h 后取出小室, 棉签擦除上室细胞后用甲醛固定, 结晶紫染色。每个小室取 5 个视野拍照计数细胞数。实验重复 3 次, 取平均值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验; 计数资料以率或构成比表示, 采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 成功分离培养 HUVECs** 分离得到的 HUVECs 呈圆形或椭圆形, 24 h 后完全贴壁, 呈漩涡状排列或鱼贯状相连。见图 2A。5~7 d 融合成片,

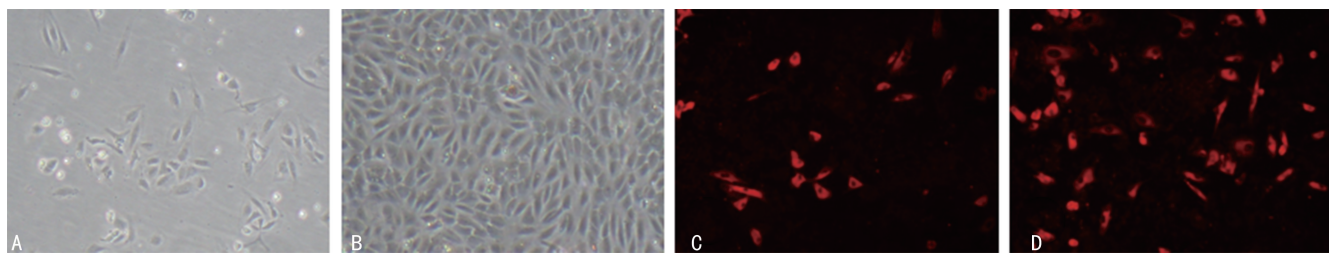


细胞呈多角形或小三角形镶嵌排列,呈典型的铺路石状。见图 2B。细胞质可见红色荧光,细胞轮廓清晰,呈阳性表达。见图 2C、D。

**2.2 成功分离培养卵巢癌患者腹水中原代卵巢癌细胞** 卵巢癌患者腹水中存在球形细胞聚集体,通过流式分选获得的原代 EPCAM 阳性卵巢癌细胞见图 3。

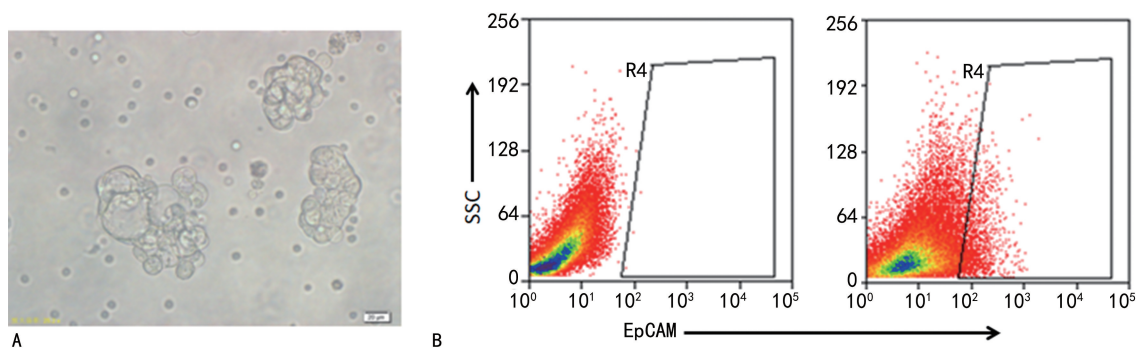
**2.3 成功构建卵巢癌血管生成三维模型** A 组 HUVECs 可见部分有突起或伪足,伪足可相互接近

并融合,但不形成管状或网状结构,接近融合时呈单层铺路卵石样排列。B 组 HUVECs 可见内皮细胞排列成网状,但没有细胞的变形、伪足和融合,也不形成类毛细血管样结构。C 组 HUVECs 可见明显的三维类毛细血管样结构形成,具有肿瘤血管的多形性、异型性,所形成的血管网络不完整、不连续,具有较大的血管通透性。见图 4。



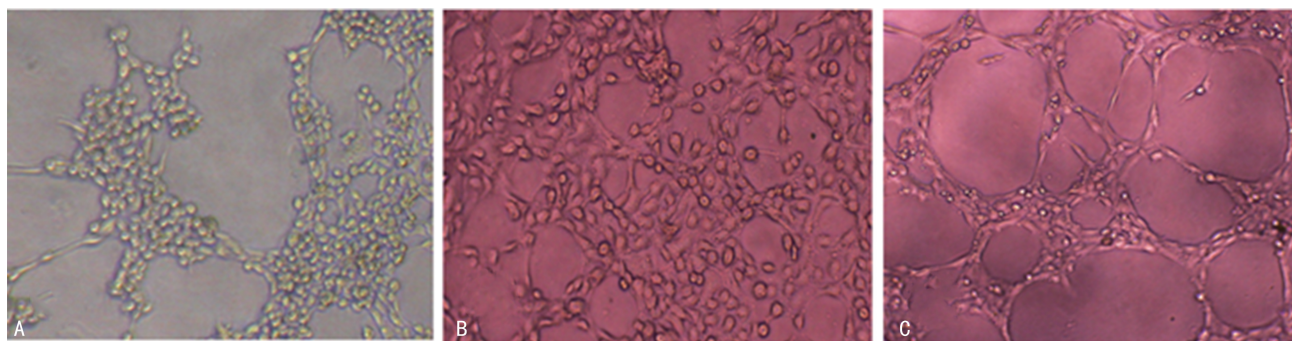
注:A. HUVECs 24 h 贴壁后(100×);B. HUVECs 5~7 d 融合呈铺路石状(100×);C. CD31(200×);D. Ⅷ因子(200×)。

图 2 HUVECs 的分离鉴定



注:A. 卵巢癌患者腹水细胞的镜下图像(100×);B. 流式分选从腹水细胞中分离的 EPCAM 及癌细胞。

图 3 卵巢癌患者腹水中原代卵巢癌细胞



注:A. 卵巢癌细胞与 HUVECs 间接共培养;B. Matrigel 基质胶条件下 HUVECs 单独培养;C. 卵巢癌细胞与 HUVECs 三维共培养,类毛细血管样结构形成。

图 4 各组 HUVECs 形态的镜下观察(100×)

**2.4 卵巢癌细胞条件培养液增强 HUVECs 增殖能力** SKOV3、CAOV3、原代卵巢癌细胞经卵巢癌细胞条件培养液处理后 CD105 表达量[分别为(1.66±0.12)、(1.94±0.16)、(1.82±0.08)]均较对照组(1.00±0.00)增加。表明卵巢癌细胞可通过分泌生物因子促进内皮细胞的增殖能力。见图 5。

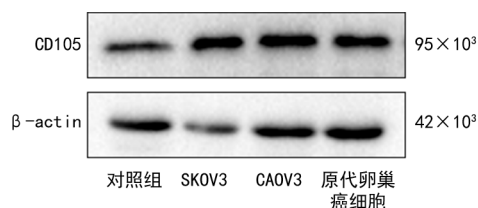
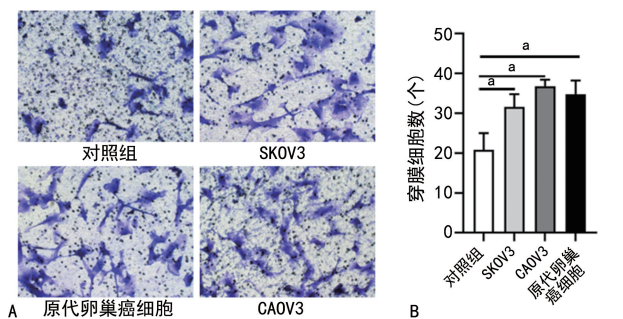


图 5 卵巢癌细胞条件培养液增强 HUVECs 增殖能力

**2.5 卵巢癌细胞条件培养液增强 HUVECs 侵袭能力** 与对照组比较, SKOV3、CAOV3、原代卵巢癌细胞经卵巢癌细胞条件培养液处理后均明显增强了 HUVECs 的侵袭能力, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。表明癌细胞可促进内皮细胞发生转化。



注: A. 各组 Transwell 侵袭实验图(结晶紫染色, 200 $\times$ ); B. 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ 。

图 6 卵巢癌细胞条件培养液增强 HUVECs 侵袭能力

### 3 讨 论

卵巢癌的病理生理学机制尚不清楚, 患者生存率并没有显著提高, 主要原因是缺乏良好的肿瘤治疗研究模型<sup>[7]</sup>。异质性被认为是卵巢癌疗效欠佳的主要原因, 卵巢癌异质性不仅表现为不同患者间的临床差异, 还表现为同一患者体内肿瘤细胞的生长、转移及对药物的敏感性、耐药性的差异。因此, 建立个体化的研究模型对不同患者制定有效的治疗策略具有重要意义<sup>[8]</sup>。患者来源的癌细胞比卵巢癌细胞系具有优势, 后者无法反映不同类型卵巢癌的分子表型及病理特征, 不能完全代表卵巢癌的异质性。有研究表明, 卵巢癌患者来源的癌细胞能反映患者体内肿瘤的异质性特征<sup>[9]</sup>。本研究利用从卵巢癌患者腹水中获取的原代卵巢癌细胞及原代 HUVECs, 成功构建了体外卵巢癌血管生成三维模型。并经体外实验证明了卵巢癌细胞可通过其分泌物增强 HUVECs 的增殖和侵袭能力, 从而发挥潜在的促进卵巢癌转移的功能。

1971 年 FOLKMAN<sup>[10]</sup> 提出了肿瘤血管生成假说, 拉开了关于肿瘤和血管生成关系的研究序幕。肿瘤的血管生成对原发肿瘤的生长及转移具有重要作用<sup>[11]</sup>。血管新生是血管内皮细胞经分裂增殖, 以出芽方式形成新的毛细血管的过程, 受到血液中的促血管因子和抑制血管因子的严格调控<sup>[12]</sup>。肿瘤细胞可分泌血管内皮生长因子 A, 与血管内皮细胞表面的血管内皮生长因子受体 2 结合, 从而启动肿瘤血管新生<sup>[13]</sup>。

血管内皮细胞是血管壁的主要组成部分, 体外获

得血管内皮细胞可用于建立血管形成的病理研究模型<sup>[14]</sup>。但由于缺乏相应的内皮细胞株<sup>[15]</sup>, 而脐带取材方便, 因此, 通过原代分离培养 HUVECs 是常用的内皮细胞研究方法。三维细胞培养技术是将细胞放在胶原凝胶中生长, 使细胞在体外能与细胞外基质相互作用, 以表达其生物学特性。主要有表面培养法、夹心培养法、混合培养法等, 采用何种方法在不同的实验中有不同的选择<sup>[16]</sup>。三维培养体系中内皮细胞的生长类似于体内血管生成。因此, 本研究选取了 HUVECs 和卵巢癌患者腹水来源的原代肿瘤细胞。将细胞在基质胶上进行三维培养模拟细胞外基质中血管的生成, 成功提取并体外培养了 HUVECs 和腹水中的原代卵巢癌细胞, 并对不同培养模式下内皮细胞的血管生成进行了观察, 结果显示, 卵巢癌患者腹水中存在球形细胞聚集体流式分选, 可获得原代卵巢癌细胞。在 Matrigel 基质胶条件下卵巢癌细胞与 HUVECs 间接共培养(三维血管生成模型), 可见 HUVECs 形成明显的三维类毛细血管样结构, 具有肿瘤血管的多形性、异型性, 所形成的血管网络不完整、不连续, 具有较大的血管通透性。

CD31 是血管内皮细胞表面标志物, 而 CD105 是细胞膜表面的跨膜糖蛋白, 其在转化生长因子- $\beta$  信号通路和血管新生中发挥着重要作用<sup>[17]</sup>。已有研究发现, 与正常内皮细胞比较, CD105 在肿瘤相关内皮细胞中高表达<sup>[18]</sup>。结直肠癌细胞的条件培养液可活化正常血管内皮细胞, 使其转变为与肿瘤来源内皮细胞具有相同基因表达的异常血管内皮细胞<sup>[13]</sup>。本研究利用卵巢癌细胞的条件培养液刺激 HUVECs 后测定内皮细胞恶性增殖标志物 CD105 的表达变化, 结果显示, SKOV3、CAOV3、原代卵巢癌细胞经卵巢癌细胞条件培养液处理后 CD105 表达量明显增加, 说明卵巢癌细胞可通过分泌物刺激血管内皮细胞, 使之发生改变, 从而促进血管新生。HUANG 等<sup>[19]</sup> 发现, 恶性胶质瘤的癌细胞可增强肿瘤相关内皮细胞迁移和侵袭能力, 从而介导异常的血管生成和耐药。据文献报道, 血管新生和血管内皮细胞的侵袭能力相关<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, 经卵巢癌细胞株及原代卵巢癌细胞条件培养液刺激的 HUVECs 侵袭能力有不同程度的增强。表明卵巢癌细胞可在体外活化内皮细胞, 促进肿瘤血管新生, 从而进一步促进卵巢癌的恶性进展。因此, 构建卵巢癌细胞及内皮细胞的三维培养模型研究卵巢癌的意义重大。

由于在本研究采用了一些特殊方法, 所以, 与同类研究比较有着明显的不同: (1) 采用的是原代卵巢癌细胞作为血管生成的诱导因子, 不需要添加额外的



血管生成刺激因子,能直接利用肿瘤细胞和内皮细胞间的相互作用和分泌的细胞因子,因而更接近生理条件下的病理性血管生成。(2)采用了 Millicell PIHP 01250 插入式细胞培养皿,其底膜是透明的,能保证在培养状态下动态观察肿瘤血管的形成,而不需要传统的染色过程,也能持续动态地观察。(3)使用 Matrigel 三维培养形成了三维的肿瘤毛细血管网络,避免了二维培养条件下形成的与体内血管生成有差异的二维血管生成模型。本研究证实了在二维共培养中内皮细胞呈铺路卵石样结构生长,不形成管道样结构,而在三维共培养系统中则可见明显的类毛细血管样的结构,模拟了体内的血管生成过程。本研究为卵巢癌的血管生成研究和干预提供了一个既简单又经济的模型,该模型可动态地重建卵巢癌细胞与血管内皮细胞的相互作用。当然该模型也存在局限性,因肿瘤微环境包括各种生长因子、肿瘤细胞及间质细胞等,而该模型没有包含更丰富的间质细胞,如成纤维细胞和免疫细胞,故尚需进一步完善。

#### 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] LHEUREUX S, GOURLEY C, VERGOTE I, et al. Epithelial ovarian cancer [J]. Lancet, 2019, 393(10177): 1240-1253.
- [3] HAN Q, HUANG B, HUANG Z, et al. Tumor cell-fibroblast heterotypic aggregates in malignant ascites of patients with ovarian cancer[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(6): 2245-2255.
- [4] MARTIN J D, DUDA D G, JAIN R K, et al. Going beyond VEGF pathway inhibition for antiangiogenic cancer therapy: Is inhibition of the PP2A/B55 $\alpha$  complex the answer? [J]. Circ Res, 2020, 127(6): 724-726.
- [5] NINA M, CHARLOTTE D, MATTEO B, et al. Developing organoids from ovarian cancer as experimental and preclinical models[J]. Stem Cell Reports, 2020, 14(4): 717-729.
- [6] YLOSTALO J H. 3D stem cell culture [J]. Cell, 2020, 9(10): 2178.
- [7] ZAREMBA A, ZIMMER L, GRIEWANK K G, et al. Immunotherapy for malignant melanoma [J]. Internist (Berl), 2020, 61(7): 669-675.
- [8] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: Past, present, and the future [J]. Cell, 2017, 168(4): 613-628.
- [9] MARU Y, TANAKA N, ITAMI M, et al. Efficient use of patient derived organoids as a pre-clinical model for gynecologic tumors [J]. Gynecol Oncol, 2019, 154(1): 189-198.
- [10] FOLKMAN J. Tumor or angiogenesis therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [11] GUZMAN G, COTLER S J, LIN A Y, et al. A pilot study of vascular genic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma [J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(12): 1776-1781.
- [12] MAMMOTO A, CONNOR K M, MAMMOTO T, et al. A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis [J]. Nature, 2009, 457(7233): 1103-1108.
- [13] VAN BEIJNUM J R, DINGS R P, VAN DER LINDEN E, et al. Gene expression of tumor angiogenesis dissected: Specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature [J]. Blood, 2006, 108(7): 2339-2348.
- [14] MENG X, LI Z M, ZHOU Y J, et al. Effect of the antioxidant alpha-lipoic acid on apoptosis in human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose [J]. Clin Exp Med, 2008, 8(1): 43-49.
- [15] SUDA K, ROTHEN-RUTISHAUSER B, GÜNTHER T M, et al. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: Endothelial versus epithelial features [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(8): 505-514.
- [16] YAMADA Y, OKANO T, ORITA K, et al. 3D-cultured small size adipose-derived stem cell spheroids promote bone regeneration in the critical-sized bone defect rat model [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 603: 57-62.
- [17] WOOD L M, PAN Z, GUIRNALDA P, et al. Targeting tumor vasculature with novel Listeria-based vaccines directed against CD105 [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(7): 931-942.

2017,45(D1):D362-D368.

- [20] GARBER M E, TROYANSKAYA O G, SC HLUENS K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(24): 13784-13789.
- [21] HOU J, JOACHIM A, BIANCA D H, et al. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10312.
- [22] SU L J, CHANG C W, WU Y C, et al. Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme[J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 140.
- [23] LANDI M T, TATIANA D, MELISSA R, et al. Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival[J]. PLoS One, 2008, 3(2): e1651.
- [24] SELAMAT S A, CHUNG B S, GIRARD L, et al. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression[J]. Genome Res, 2012, 22(7): 1197-1211.
- [25] KAYAMA H, KOHNO T, ISHII Y, et al. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas[J]. Cancer Res, 2012, 72(1): 100-111.
- [26] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [27] JONNA S, SUBRAMANIAM D S. Molecular diagnostics and targeted therapies in non-small cell lung cancer(NSCLC): An update[J]. Dis-cov Med, 2019, 27(148): 167-170.
- [28] MOK T S. Personalized medicine in lung cancer: What we need to know[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(11): 661-668.
- [29] LIU Z, GUAN C, LU C, et al. High NUSAP1 expression predicts poor prognosis in colon cancer[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(7): 968-973.
- [30] FANG L, ZHANG M, CHEN L, et al. Down-regulation of nucleolar and spindle-associated protein 1 expression suppresses cell migration, proliferation and invasion in renal cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1506-1516.
- [31] QIU J, XU L, ZENG X, et al. NUSAP1 promotes the metastasis of breast cancer cells via the AMPK/PPAR gamma signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(22): 1689.
- [32] DING X, DUAN H, LUO H. Identification of core gene expression signature and key pathways in colorectal cancer[J]. Front Genet, 2020, 11: 45.
- [33] LUO B, FENG S, LI T, et al. Transcription factor HOXB2 upregulates NUSAP1 to promote the proliferation, invasion and migration of nephroblastoma cells via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(6): 205.
- [34] QIU J, XU L, ZENG X, et al. NUSAP1 promotes the metastasis of breast cancer cells via the AMPK/PPAR $\gamma$  signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(22): 1689.
- [35] XU Z, WANG Y, XIONG J, et al. NUSAP1 knockdown inhibits cell growth and metastasis of non-small-cell lung cancer through regulating BTG2/PI3K/Akt signaling[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3886-3893.

(收稿日期:2022-05-05 修回日期:2022-12-20)

(上接第 1280 页)

- [18] BURROWS F J, DERBYSHIRE E J, TAZZARI P L, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: Implications for diagnosis and therapy[J]. Clin Cancer Res, 1995, 1(12): 1623-1634.
- [19] HUANG M, LIU T, MA P, et al. c-Met-mediated endothelial plasticity drives aberrant vascularization and chemoresistance in glioblastoma[J]. J Clin Invest, 2016, 126(5): 1801-1814.
- [20] HULTGREN N W, FANG J S, ZIEGLER M E, et al. Slug regulates the Dll4-Notch-VEGFR2 axis to control endothelial cell activation and angiogenesis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5400.

(收稿日期:2022-07-10 修回日期:2023-01-12)