

3D 生物打印前列腺癌模型用于唑来膦酸药敏试验*

王晗¹, 朱莲², 唐靓³, 杨亚冬³, 赵思雨³, 张文元³

(杭州医学院 1. 公共卫生学院; 2. 基础医学与法医学院; 3. 检验医学院、生物工程学院, 浙江 杭州 310013)

摘要: **目的** 探讨 3D 生物打印模型用于唑来膦酸对 PC-3 前列腺癌细胞药敏试验的可行性。**方法** 使用 3D 生物打印技术构建 PC-3 前列腺癌 3D 模型, 采用唑来膦酸进行药敏试验。使用钙黄绿素-AM/碘化丙啶溶液对前列腺癌模型进行 Live/Dead 染色测试支架内前列腺癌细胞存活生长情况。采用 ELISA 法测定培养上清液中人基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、人基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白分泌变化。并均与 2D 培养条件下进行比较。**结果** 通过 3D 生物打印技术构建 PC-3 前列腺癌模型, 细胞多层包埋在海藻酸钠/明胶支架内。结果表明, 随着加入唑来膦酸浓度的升高, PC-3 细胞存活率呈下降趋势。在 3D 培养条件下对 PC-3 前列腺癌细胞的整体药物敏感性显著低于 2D 培养。即与 2D 培养相比, 随着唑来膦酸浓度的升高, 3D 细胞培养的整体耐药性显著增加, 细胞培养上清液 MMP-2 和 MMP-9 蛋白分泌的下降速度明显更慢。**结论** 相比于 2D 培养, 使用 3D 生物打印技术构建的前列腺癌模型, 可能更好地模拟体内前列腺癌肿瘤微环境, 以提高临床前药物研究的预测能力, 改善药物临床转化。

关键词: 3D 生物打印; 3D 前列腺癌模型; 唑来膦酸; 药敏试验

中图分类号: R73-36+1

3D bioprinted prostate cancer model and its application in drug sensitivity test of zoledronic acid*

WANG Han¹, ZHU Lian², TANG Liang³, YANG Yadong³, ZHAO Siyu³, ZHANG Wenyuan³

(1. School of Public Health; 2. School of Basic Medicine and Forensic Medicine; 3. School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

Abstract: **[Objective]** To explore the feasibility of 3D bioprinted model for drug sensitivity test of zoledronic acid to PC-3 prostate cancer cells. **[Methods]** PC-3 prostate cancer 3D model was constructed by 3D bioprinting technology, and drug sensitivity test was performed with zoledronic acid. Then Live/Dead staining was used to test the survival and growth of prostate cancer cells in the prostate cancer model using calcein-AM/propidium iodide solution, and the protein expression of MMP-2 and MMP-9 in culture supernatant was determined by ELISA. In addition, the results were compared with those under 2D culture condition. **[Results]** PC-3 prostate cancer model was constructed by 3D bioprinting technology, and cells were embedded in sodium alginate/gelatin scaffold. The results showed that, with the increase of zoledronic acid concentration, the survival rate of PC-3 cells decreased, and the overall sensitivity of the zoledronic acid to PC-3 prostate cancer cells in 3D culture was significantly lower than that in 2D culture. That is, compared with 2D culture, overall drug resistance of 3D cell culture was significantly increased. In addition, the descent rate of MMP-2 and MMP-9 protein secretion in the supernatant of 3D cell culture was significantly slower than that in the 2D culture model. **[Conclusion]** Compared with 2D culture, the prostate cancer model constructed by 3D bioprinting technology may better simulate the microenvironment of prostate cancer tumor *in vivo*, so as to improve the predictive ability of preclinical drug research and clinical transformation.

Keywords: 3D bioprinting; 3D prostate cancer model; zoledronic acid; drug sensitive test

收稿日期: 2023-06-14

* 基金项目: 杭州医学院基本科研业务费基础科研计划 (KYYB202103); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2021KY126, 2021KY645, 2022KY137, 2022KY730); 浙江省中医药科技计划项目 (2021ZB080, 2022ZB223, 2022ZB224, 2023ZL358)

[通信作者] 张文元, E-mail: zhangwy61@163.com; Tel: 13516875682

前列腺癌是老年男性常见疾病，正严重影响着我国男性患者的健康，寻求精准的药物治疗很重要^[1]。目前，超过 90% 的潜在抗癌药物在临床试验中失败，主要原因是目前用于药物开发和个性化治疗的临床前模型不准确^[2]，使用了过于简化的体外模型，缺乏对肿瘤微环境的模拟。虽然 2D 培养系统仍然是良好的高通量基础研究的选择，但它忽视了细胞自然的 3D 微环境，难以达到高水平的生物学复杂性^[3]。因而很有可能会提供治疗效果的不准确信息，使得假阳性化合物进入临床试验。在 2D 培养条件下筛选为有效药物，而临床应用往往无效^[4]，导致高退出率，浪费时间和金钱。体内模型虽然更能反应肿瘤的发生和行为机制以及药物代谢，但是这些模型使用和维护更加昂贵，费时费力，同时涉及伦理问题。由于 2D 培养的局限性和体内模型的复杂性，刺激了体外三维肿瘤模型的开发^[5]。3D 细胞培养可克服 2D 培养的限制，提高诊疗效果^[6]，正在成为药物研究中有力的新型手段，成为介于二维培养和动物实验之间的一种折中方法^[7]，以弥合两者之间的鸿沟^[8-9]，可提高对生理或病理过程、药物发现和筛选的认识^[10]。从而提高临床前药物研究的预测能力，改善药物临床转化^[11]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 中的人基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、人基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 降解 IV 型胶原，在肿瘤细胞的侵袭与转移灶的形成中起重要作用^[12]。为了改善晚期前列腺癌和骨骼受累患者的预后，需要更好地了解这一过程是如何启动和调节的。本实验采用 ELISA 法测定细胞培养上清液中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达含量变化，可更全面地捕捉前列腺癌侵袭与转移的生物学特征及机制^[13]。

3D 生物打印技术为建立模拟异质肿瘤微环境模型提供了可能性，可以精确定位包括水凝胶、细胞和营养物质在内的生物墨水，以创建 3D 体外培养环境^[14]。临床上前列腺癌患者常采取手术治疗及放疗、化疗^[15]。唑来膦酸是临床上被广泛应用的化疗药物^[16]。本实验采用唑来膦酸作为药敏试验药物。本实验通过 3D 生物打印技术构建前列腺癌 PC-3 细胞 3D 模型，并进行唑来膦酸药敏试验，并与 2D 细胞培养进行比较，利用 ELISA 法测定培养上清液中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达含量变化。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

前列腺癌 PC-3 细胞 (赛百慷); RPMI-1640 培养基 (Gibco); 胎牛血清 (Procell); 海藻酸钠 (Sigma), 明胶 (Sigma), 钙黄绿素-AM (Solarbio), 碘化丙啶 (Solarbio)。唑来膦酸 (Macklin), 先用少量完全培养基溶解, 并用 0.22 μm 滤膜过滤后, 再用完全培养基配置为工作浓度。人基质 MMP-2、MMP-9 两种 ELISA 试剂盒 (晶美生物工程有限公司); 3D 生物打印机 (BioScaffolder2.1, 德国 GESIM 公司); 荧光倒置显微镜、多功能酶标仪 (上海普丹光学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 前列腺癌细胞于 2D 培养下药敏试验 前列腺癌 PC-3 细胞使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 每 2~3 d 换液 1 次, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。收集对数期生长的 PC-3 细胞, 制成 5×10^4 cells/mL 细胞悬液, 100 μL /孔均匀接种于 96 孔板。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后, 弃上清, 分别加入不同浓度的唑来膦酸 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$), 100 μL /孔, 每个浓度设 3 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔滴加 10 μL CCK-8 溶液, 继续培养 4 h, 酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。细胞存活率 = (加药处理 OD 值/未加药处理 OD 值) $\times$ 100%。

1.2.2 3D 生物打印构建前列腺癌模型 将 1.2 g 明胶粉末、1.6 g 海藻酸钠粉末分别溶于 10 mL 0.9% NaCl 溶液中。每天 70 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 水浴 1 次, 连续 3 d, 对两种溶液进行灭菌。将 PC-3 细胞制成 1×10^6 cells/mL 细胞悬液, 与明胶溶液和海藻酸钠溶液以 1 : 2 : 2 的体积比均匀混合为前列腺癌细胞/水凝胶, 装入无菌打印筒, 2 000 r/min 离心 2 min 消除气泡, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min, 连接内径 0.17 mm 的打印枪头, 安装到 3D 生物打印机上。打印内部结构为网格状的结构体, 为 10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 0.8 mm。该网状结构体由圆柱状微丝逐层交错堆积形成。料桶温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 气压 150 kPa, 打印速度 15 mm/s, 无菌操作下挤压制造。将打印好的前列腺癌细胞/水凝胶结构体立即滴加 5% CaCl_2 化学交联 5 min, 即为 3D 前列腺癌模型。PBS 轻轻洗涤 2~3 次, 放入 24 孔板中培养, 每孔含 1 mL 培养基, 隔天换液。

1.2.3 3D 条件下检测 PC-3 细胞的药物敏感性
上述 3D 前列腺癌模型培养 1 d 后, 弃上清, 分别加入不同浓度的唑来膦酸 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度设 3 个复孔。继续培养 48 h 后, 将 Live/Dead 双荧光染色剂 4 $\mu\text{mol/L}$ 钙黄绿素-AM 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 碘化丙啶混合并通过 0.22 μm 过滤器过滤后, 均匀滴加于 3D 前列腺癌模型上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境下孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次。荧光倒置显微镜分别在 488 nm (钙黄绿素-AM 的激发波长) 和 543 nm (碘化丙啶的激发波长) 处进行图像采集。每个样本选择 3 个随机位置, 同一位置、深度拍摄细胞, 绿色为活细胞, 红色为死细胞, 并合并活/死图像。细胞存活率= (绿色染色细胞数/细胞总数) $\times$ 100%。

1.2.4 ELISA 试剂盒检测 2D/3D 细胞培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白浓度
取对数期 PC-3 细胞, 以 2.5×10^4 个/mL 的密度种于 24 孔板中, 1 mL/孔均匀接种, 作为 2D 前列腺癌模型。将 1.2.2 项通过 3D 打印技术构建的模型作为 3D 前列腺癌模型将上述 2D/3D 前列腺癌模型培养 24 h 后, 弃去原培养基, 分别加入不同终浓度唑来膦酸 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$, 加药完毕后, 于培养箱中培养 36 h。收集细胞上清液 3 000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上清液, 分装后冻存于 -80°C 。每个浓度均设 5 个复孔。按照试剂盒说明书操作, 检测上清液中 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白浓度。

1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 进行统计学处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 两两比较采用配对 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

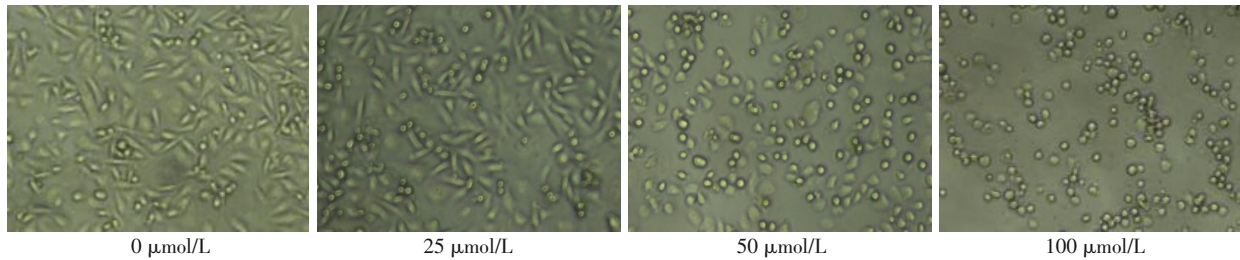


图 1 不同浓度唑来膦酸对 2D 培养的前列腺癌 PC-3 细胞存活的影响 ($\times 100$)

2.4 2D/3D 条件下唑来膦酸对 PC-3 细胞培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白分泌的影响

ELISA 检测结果显示, 不同浓度唑来膦酸于 2D/3D 条件下作用于 PC-3 细胞 36 h, 均可导致 MMP-2 和 MMP-9 的分泌减少, 并呈剂量依赖关

2 结果

2.1 2D 培养条件下唑来膦酸对前列腺癌细胞增殖的影响

当唑来膦酸浓度 25 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 PC-3 细胞时, 细胞受到一定程度的抑制。当浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞出现明显抑制。当浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, PC-3 细胞大量死亡。见图 1 及表 1。

2.2 3D 条件下唑来膦酸对 PC-3 细胞生长的影响

图 2 表明, 不同浓度唑来膦酸对 3D 条件下前列腺癌细胞-水凝胶结构体中 PC-3 细胞增殖活性, 随着药物唑来膦酸浓度的递增, PC-3 活细胞数量逐渐减少, 死细胞数量逐渐增多。结果显示当唑来膦酸 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, PC-3 死亡细胞数量有所增多。当唑来膦酸浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用时, PC-3 死亡细胞数量明显增多。见图 2 及表 1。

2.3 2D/3D 条件下唑来膦酸对 PC-3 细胞存活率影响的比较

与 2D 培养条件下相比, 不同浓度的唑来膦酸对 3D 培养条件下对 PC-3 前列腺癌细胞的整体药物敏感性显著低于 2D 培养条件下的药物敏感性。即与 2D 培养相比, 3D 细胞培养的整体耐药性显著增加。见表 1。

表 1 2D/3D 培养条件下不同浓度唑来膦酸对 PC-3 细胞存活率的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

唑来膦酸剂量	2D 培养细胞存活率	3D 培养细胞存活率	t	P
25 $\mu\text{mol/L}$	64.31 $\pm$ 4.63	73.36 $\pm$ 7.45	1.787	0.062
50 $\mu\text{mol/L}$	19.39 $\pm$ 3.74	58.45 $\pm$ 4.92	10.947	<0.001
100 $\mu\text{mol/L}$	2.65 $\pm$ 0.68	43.78 $\pm$ 4.41	15.965	<0.001

系。与空白 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 各浓度组 MMP-2 和 MMP-9 的分泌减少。3D 培养上清液 MMP-2 和 MMP-9 蛋白分泌浓度的下降速度均明显慢于 2D 培养模型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

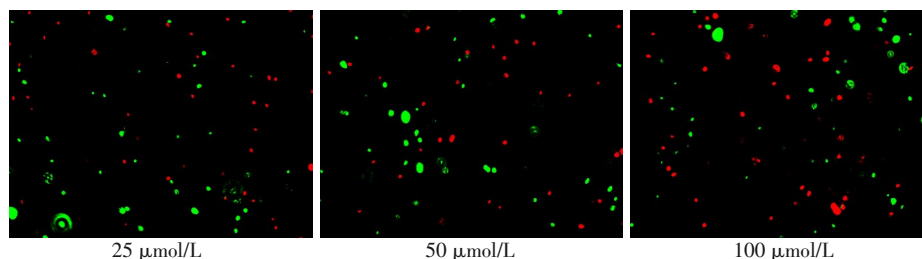


图 2 不同浓度唑来膦酸对 3D 培养前列腺癌 PC-3 细胞存活的影响 (×100)

表 2 唑来膦酸对 PC-3 细胞培养上清液 MMP-2、MMP-9 蛋白分泌的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

唑来膦酸剂量	2D 培养上清液		3D 培养上清液	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
0 $\mu\text{mol/L}$	336.45 $\pm$ 29.32	86.53 $\pm$ 9.82	118.32 $\pm$ 10.88 ²⁾	22.95 $\pm$ 2.17 ²⁾
5 $\mu\text{mol/L}$	284.61 $\pm$ 27.28 ¹⁾	72.31 $\pm$ 6.97 ¹⁾	112.93 $\pm$ 11.65 ²⁾	21.66 $\pm$ 1.90 ²⁾
10 $\mu\text{mol/L}$	247.54 $\pm$ 22.57 ¹⁾	59.56 $\pm$ 4.75 ¹⁾	105.50 $\pm$ 8.91 ¹²⁾	19.92 $\pm$ 1.88 ¹²⁾
20 $\mu\text{mol/L}$	201.85 $\pm$ 20.92 ¹⁾	47.65 $\pm$ 3.84 ¹⁾	95.67 $\pm$ 7.92 ¹²⁾	18.05 $\pm$ 1.69 ¹²⁾

注: 1) 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $P<0.05$; 2) 与 2D 比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

尽管在癌症研究和药物发现/开发方面有重大投资, 但新癌症药物批准率 $\leq 5\%$, 大多数转移性癌症仍然无法治愈。绝大多数的癌症新药在临床开发中失败, 因为缺乏治疗效果和/或不可接受的毒性。抗癌药物开发成功率低的主要原因之一是临床前模型未能充分概括人类癌症的复杂性和异质性。在体内测试之前, 大多数癌症生物学家仍然依赖传统的 2D 单层培养技术, 在体外测试抗肿瘤药物^[17]。尽管易于处理, 2D 培养的结果往往不能有效地转化为体内临床前研究, 绝大多数有前景的临床前药物对真正的肿瘤患者无效, 从而延误了成功治疗方法的发现。这是因为 2D 培养缺乏细胞与细胞、以及细胞与肿瘤微环境的接触, 这在肿瘤信号传导和药物反应中很重要, 从而导致与真实肿瘤相比恶性表型减少^[18]。无论是 2D 癌细胞培养, 还是动物实验, 都难以破解其药物测试的局限性^[19]。生物工程的进步尤其令人鼓舞的简单经济的 3D 技术快速发展, 具体而言, 三维培养最近获得了肿瘤和基质细胞模型, 在模拟癌症生态位和肿瘤微环境, 以及与其之间的相互作用方面显示了巨大的潜力。从这个意义上说, 更好地重现体内细胞环境的癌细胞 3D 培养成为科学上准确和低成本的癌症模型, 用于临床前筛选和测试新药候选药物, 然后再转向昂贵和耗时的动物模型^[20]。此外, 尽管动物模型是临床前研究的关键, 但已经实施了更严格的指令, 以促进替代生

物系统的使用。在此背景下, 3D 肿瘤模型的开发和整合到临床前研究工作流程尤其具有吸引力, 在减少体内模型数量的同时, 促进临床试验治疗学的进步和成功^[21]。3D 肿瘤模型弥合了 2D 细胞培养模型和体内模型之间的一些差异, 其中包括形态、极性、药物渗透性和基因表达。可提高新型治疗药物的预测性能, 并为个性化治疗提供机会^[22]。

3D 模式下药物可能无法完全穿透 3D 系统到达核心附近的癌细胞, 与 2D 培养系统相比, 这些细胞对药物具有更强的抵抗力, 往往更好地预测体内药物反应^[23]。3D 模型通常显示的药物反应行为比 2D 培养更接近实际肿瘤^[24]。因此, 为癌症研究增加另一个维度既不会取代现有的 2D 细胞培养, 也不会取代动物试验, 但它肯定会有助于提高疗效的可预测性^[25-26]。由于化疗药物研发具有高成本和所需时间长的特性, 应继续研发更加精准的筛选平台。利用 3D 打印机构建的 3D 在肿瘤细胞模型, 精准性高, 可重复连续打印, 耗时短且开发成本较为低廉^[27]。利用 3D 生物打印机构建的肿瘤模型有望成为 2D 肿瘤细胞培养和动物实验支架的桥梁。3D 生物打印水凝胶的优势在于能够更为准确地模仿细胞外基质^[28]。3D 环境中的前列腺癌细胞埋藏于不同层次的前列腺癌模型中, 大部分细胞生长阶段不同, 处于 3D 条件下的前列腺癌细胞与正常体内癌细胞更为接近^[17]。

3D 生物打印水凝胶前列腺癌模型为癌细胞提供了广阔的空间, 3D 前列腺癌模型中的肿瘤细胞

成多层结构,可使癌细胞持续增长。同时 3D 前列腺癌模型充分模拟了细胞外基质与癌细胞之间的通讯功能,并造成细胞缺氧状态,增加了癌细胞增殖时间^[21]。与 2D 细胞培养评估药物敏感性相比,3D 生物打印技术的使用使研究人员获得更加准确的结果。但当前的 3D 打印生物打印仍然受细胞类型和模型设计的限制,需要进一步的工作开发生物材料和打印方法来构建可以更好地模仿动态生化和机械环境的肿瘤模型。

考虑到超过 25 $\mu\text{mol/L}$ 唑来膦酸对 2D 培养的 PC-3 细胞有较大的损伤,所以本实验采用 $\leq 20 \mu\text{mol/L}$ 唑来膦酸检测其在 2D/3D 条件下对 PC-3 细胞培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白分泌的影响。实验结果显示,随着唑来膦酸浓度的升高,PC-3 细胞存活率成下降趋势。唑来膦酸的药敏性在 2D 和 3D 条件下有显著差异,在 3D 环境中前列腺癌细胞的存活率显著高于 2D 环境。随着唑来膦酸浓度的升高,3D 细胞培养上清液 MMP-2 和 MMP-9 蛋白分泌的下降速度均明显慢于 2D 培养模型。可能是因为 3D 培养方法在能够维持细胞生长的前提下,允许细胞与基质之间的相互作用,可能更好地反映了真实的肿瘤微环境,比单层细胞培养更类似于体内生长的形态。

综上所述,使用 3D 生物打印技术构建的 PC-3 前列腺癌细胞水凝胶结构体(3D 前列腺癌模型)具有比 2D 培养更高的耐药性,细胞培养的空间维度及其与基质之间的相互作用对药物的耐药性评估有显著影响。

参 考 文 献

- [1] ZHANG XY. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer[J]. Cancer Commun, 2019, 39(1): 76.
- [2] LAW AMK, DE LA FUENTE LR, GRUNDY TJ, et al. Advancements in 3D cell culture systems for personalizing anti-cancer therapies[J]. Front Oncol, 2021, 11: 782766.
- [3] TRIVEDI P, LIU R, BI HJ, et al. 3D modeling of epithelial tumors-the synergy between materials engineering, 3D bioprinting, high-content imaging, and nanotechnology[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6225.
- [4] BARROS AS, COSTA EC, NUNES AS, et al. Comparative study of the therapeutic effect of Doxorubicin and Resveratrol combination on 2D and 3D (spheroids) cell culture models[J]. Int J Pharm, 2018, 551(1/2): 76-83.
- [5] KATTI KS, MOLLA MS, KARANDISH F, et al. Sequential culture on biomimetic nanoclay scaffolds forms three-dimensional tumoroids[J]. J Biomed Mater Res A, 2016, 104(7): 1591-1602.
- [6] GU Q, TOMASKOVIC-CROOK E, LOZANO R, et al. Functional 3D neural mini-tissues from printed gel-based bioink and human neural stem cells[J]. Adv Health Mater, 2016, 5(12): 1429-1438.
- [7] ALBRITTON JL, MILLER JS. 3D bioprinting: improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments[J]. Dis Model Mech, 2017, 10(1): 3-14.
- [8] MENG FB, MEYER CM, JOUNG D, et al. 3D bioprinted *in vitro* metastatic models via reconstruction of tumor microenvironments[J]. Adv Mater, 2019, 31(10): e1806899.
- [9] RODRIGUES T, KUNDU B, SILVA-CORREIA J, et al. Emerging tumor spheroids technologies for 3D *in vitro* cancer modeling[J]. Pharmacol Ther, 2018, 184: 201-211.
- [10] BASSI G, GRIMAUDO MA, PANSEI S, et al. Advanced multi-dimensional cellular models as emerging reality to reproduce *in vitro* the human body complexity[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3): 1195.
- [11] UNNIKRISHNAN K, THOMAS LV, RAM KUMAR RM. Advancement of scaffold-based 3D cellular models in cancer tissue engineering: an update[J]. Front Oncol, 2021, 11: 733652.
- [12] KARMAKAR D, MAITY J, MONDAL P, et al. E2F5 promotes prostate cancer cell migration and invasion through regulation of TFPI2, MMP-2 and MMP-9[J]. Carcinogenesis, 2020, 41(12): 1767-1780.
- [13] ILHAN S, DILEKCI G, GUNER A, et al. Newly synthesized benzimidazoles inhibit vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and-9 levels in prostate cancer cells[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(11): 2109-2115.
- [14] FURUTA S, BISSELL MJ. Pathways involved in formation of mammary organoid architecture have keys to understanding drug resistance and to discovery of druggable targets[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2016, 81: 207-217.
- [15] LANGER EM, ALLEN-PETERSEN BL, KING SM, et al. Modeling tumor phenotypes *In Vitro* with three-dimensional bioprinting[J]. Cell Rep, 2019, 26(3): 608-623. e6.
- [16] FINIANOS A, ARAGON-CHING JB. Zoledronic acid for the treatment of prostate cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2019, 20(6): 657-666.
- [17] DUVAL K, GROVER H, HAN LH, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture[J]. Physiology, 2017, 32(4): 266-277.
- [18] HUGHES AM, KOLB AD, SHUPP AB, et al. Printing the pathway forward in bone metastatic cancer research: applications of 3D engineered models and bioprinted scaffolds to recapitulate the bone-tumor niche[J]. Cancers, 2021, 13(3): 507.
- [19] LI YF, KILIAN KA. Bridging the gap: from 2D cell culture to 3D microengineered extracellular matrices[J]. Adv Health Mater, 2015, 4(18): 2780-2796.
- [20] HOARAU-VÉCHOT J, RAFII A, TOUBOUL C, et al. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 181.
- [21] SHEHZAD A, RAVINAYAGAM V, ALRUMAIH H, et al.

- Application of three-dimensional (3D) tumor cell culture systems and mechanism of drug resistance[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(34): 3599-3607.
- [22] SBIRKOV Y, MOLANDER D, MILET C, et al. A colorectal cancer 3D bioprinting workflow as a platform for disease modeling and chemotherapeutic screening[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 755563.
- [23] CHEEMA U, BROWN RA, ALP B, et al. Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(1): 177-186.
- [24] UNGER C, KRAMER N, WALZL A, et al. Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 79/80: 50-67.
- [25] FONTOURA JC, VIEZZER C, DOS SANTOS FG, et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 107: 110264.
- [26] LV DL, HU ZT, LU L, et al. Three-dimensional cell culture: a powerful tool in tumor research and drug discovery[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6999-7010.
- [27] LANGHANS SA. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 6.
- [28] MA XY, LIU J, ZHU W, et al. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and *in vitro* disease modeling[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 132: 235-251.
- (方丽蓉 编辑)