



· 论 著 ·

三维生物打印胆囊癌模型的构建与评价

王铭洋^{1, 2}, 赵成^{1, 2}, 王紫迎^{1, 2}, 宋晓玲^{1, 2}, 顾钧^{1, 2},
龚伟^{1, 2}, 杨自逸^{1, 2}

1. 上海交通大学医学院附属新华医院普外科, 上海 200092;
2. 上海胆道疾病研究重点实验室, 上海 200092

[摘要] 背景与目的: 胆囊癌是一种具有高度侵袭性的消化系统恶性肿瘤, 患者5年生存率不足10%。现有二维 (two-dimensional, 2D) 细胞培养模型难以真实反映肿瘤的三维 (three-dimensional, 3D) 组织学特征及药物反应, 限制了药物筛选和机制研究。3D生物打印技术能够通过可控方式构建复杂结构的肿瘤模型, 模拟体内微环境。本研究旨在利用甲基丙烯酸酯化明胶 (gelatin methacryloyl, GelMA) 构建3D生物打印胆囊癌模型, 并比较其与2D模型在分子特征及药物敏感性方面的差异。方法: 本研究采用NOZ人胆囊癌细胞系与GelMA水凝胶生物墨水构建3D胆囊癌模型, 通过挤出式生物打印技术实现肿瘤微环境的仿真。3D模型的细胞形态和增殖活性通过显微镜、活/死细胞染色和细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 进行评估。RNA提取后, 采用Illumina NovaSeq™ 6000平台进行RNA测序, 结合DESeq2进行差异表达分析, 并通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 验证部分差异表达基因。药物敏感性检测通过吉西他滨 (gemcitabine, GEM)、顺铂 (cisplatin, DDP)、白蛋白结合型紫杉醇 (nab-paclitaxel) 及5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 的剂量反应实验, 计算半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 评估模型对不同药物的敏感性。统计学分析使用GraphPad Prism 9.0和R 4.4.0软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果: 3D模型结构稳定, 细胞在水凝胶中保持较高活力并形成球状聚集, 增殖能力显著高于2D模型。转录组测序共鉴定出617个差异表达基因, 其中235个上调、382个下调, 主要富集于细胞周期、炎症反应及细胞因子信号转导通路。RTFQ-PCR验证结果与RNA测序结果一致。药物敏感性检测结果显示, 3D模型对多种化疗药物的IC₅₀均高于2D模型, 提示其更接近临床肿瘤耐药特征。结论: 本研究构建了3D生物打印胆囊癌模型。与2D培养相比, 3D模型对GEM、DDP、nab-paclitaxel和5-FU的敏感性更低、IC₅₀更高, 更符合临床实体瘤的耐受特征。因此, 3D模型在模拟临床药物耐受和低敏感性方面优于2D, 可用于耐药机制研究及候选药物/联合方案筛选验证。

[关键词] 胆囊癌; 三维生物打印; GelMA水凝胶; 转录组学; 药物敏感性; 体外模型

中图分类号: R735.8 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.03.006

基金项目: 上海市抗癌协会“雏鹰”计划 (SACA-CY23C11); 上海交通大学“交大之星”计划医工交叉研究基金青年项目 (YG2024QNA19)。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 不需要。

知情同意: 不需要。

引用本文: 王铭洋, 赵成, 王紫迎, 等. 三维生物打印胆囊癌模型的构建与评价 [J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(3): 258-267.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0.

Funding: Shanghai Anti-Cancer Association EYAS PROJECT (SACA-CY23C11); Shanghai Jiao Tong University "Jiaoda Star" Program Medical-Engineering Interdisciplinary Research Fund, Young Investigator Project (YG2024 QNA19).

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: not required.

Informed consent: not required.

Cite this article: WANG M Y, ZHAO C, WANG Z Y, et al. 3D-bioprinted gallbladder cancer model: construction and evaluation [J]. Chin Oncol, 2026, 36(3): 258-267.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

3D-bioprinted gallbladder cancer model: construction and evaluation WANG Mingyang^{1,2}, ZHAO Cheng^{1,2}, WANG Ziyi^{1,2}, SONG Xiaoling^{1,2}, GU Jun^{1,2}, GONG Wei^{1,2}, YANG Ziyi^{1,2} (1. Department of General Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Biliary Tract Disease Research, Shanghai 200092, China)

Correspondence to: YANG Ziyi E-mail: yangziyi@xinhumed.com.cn

[Abstract] Background and purpose: Gallbladder cancer is a highly aggressive gastrointestinal malignancy with a 5-year survival rate of less than 10%. Conventional two-dimensional (2D) cell cultures poorly mimic the tumor microenvironment, limiting

translational drug screening. Three-dimensional (3D) bioprinting enables the construction of biomimetic tumor models with controllable structure and function. This study aimed to establish a 3D bioprinted gallbladder cancer model and compare its biological and pharmacological features with 2D cultures. **Methods:** The NOZ human gallbladder cancer cell line and GelMA hydrogel bioink were used to construct a 3D gallbladder cancer model via extrusion-based 3D bioprinting, aiming to simulate the tumor microenvironment. The morphology, viability, and proliferation of cells in the 3D constructs were assessed using microscopy, live/dead cell staining, and the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Following RNA extraction, RNA sequencing was performed on the Illumina NovaSeq™ 6000 platform. Differential gene expression analysis was conducted using DESeq2, and the results for selected genes were validated by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). Drug sensitivity was evaluated by determining the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) through dose-response experiments with gemcitabine (GEM), cisplatin (DDP), nab-paclitaxel and 5-fluorouracil (5-FU). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 and R software (version 4.4.0), and $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results:** The 3D model showed stable lattice structures with high cell viability and spheroid formation, accompanied by significantly enhanced proliferation compared with 2D cultures ($P < 0.001$). Transcriptome analysis revealed 617 differentially expressed genes (235 upregulated, 382 downregulated), enriched in cell cycle regulation, cytokine signaling, and extracellular matrix remodeling. RTFQ-PCR confirmed consistency with RNA-seq results. Drug response assays demonstrated higher IC₅₀ in 3D models versus 2D for all agents tested, indicating reduced chemosensitivity and stronger resemblance to clinical resistance. **Conclusion:** This study established a 3D bioprinted gallbladder cancer model. Compared with 2D culture, the 3D model showed lower sensitivity and higher IC₅₀ to GEM, DDP, nab-paclitaxel, and 5-FU, consistent with drug-tolerant phenotypes of clinical solid tumors. Therefore, the 3D model is superior to the 2D model in recapitulating clinically relevant drug resistance and tolerance and can be utilized for investigating drug resistance mechanisms and for screening/validating candidate drugs or combination regimens.

[**Key words**] Gallbladder cancer; Three-dimensional bioprinting; GelMA hydrogel; Transcriptomics; Drug sensitivity; *In vitro* model

胆囊癌是常见的胆道系统恶性肿瘤之一，在南美洲和亚洲部分国家或地区的发病率较高^[1-2]。由于早期缺乏典型症状，大多数患者确诊时已处于中晚期，失去根治性手术机会^[1-3]。目前的治疗手段主要包括手术治疗、化疗及放疗，但疗效有限，5年生存率不足10%^[4-5]。近年来，分子层面的研究^[6]揭示了胆囊癌发生、发展的多种关键机制，包括KRAS、TP53、ERBB2及PI3K/AKT等通路异常，但其临床转化仍面临关键瓶颈。

肿瘤研究与药物筛选传统上依赖二维（two-dimensional, 2D）细胞培养和动物模型。然而，2D模型缺乏真实的三维（three-dimensional, 3D）结构与细胞外基质（extracellular matrix, ECM）支撑，无法模拟缺氧、炎症及免疫逃逸等关键特征，导致药物反应与临床结果差异显著^[7]。动物模型虽然能在一定程度上重现肿瘤生态，但是存在伦理限制、成本高、周期长等问题^[8-9]。3D培养方法（如类器官、三明治培养和水凝胶包埋）在一定程度上恢复了肿瘤微环境，但仍存在结构不稳定、规模有限和批次间差异大等问题^[7, 10]。为开发更好的体外模型，3D生物打印作为一种新兴技术，能够通过空间可控方式精确组装细胞与ECM材料，构建具有预先设计结构和仿生微环境的类肿瘤组织模型^[11-12]。已有研究^[10, 13]显示，3D生物打印肝脏和胆管肿瘤模

型在维持细胞活性、模拟肿瘤基因表达谱及呈现药物耐受特征方面均优于传统模型。因此，3D生物打印被认为是一种理想的技术手段，可用于构建具有仿生微环境的体外肿瘤组织模型，并进一步应用于病理学研究及药物评价^[14]。然而，针对胆囊癌的3D生物打印研究仍相对少见。本研究利用3D生物打印技术系统比较了胆囊癌2D与3D模型在转录组和药物反应上的差异。利用胆囊癌细胞系与甲基丙烯酸酯化明胶（gelatin methacryloyl, GelMA）复合体系作为生物墨水，构建了3D胆囊癌模型。该体系在细胞量方面不超过10⁵数量级，能够模拟临床穿刺活检获取的有限细胞量，具有更高的临床转化潜力；同时可在室温条件下打印，操作简便且细胞存活率高，后续培养仅需常规DMEM或Williams培养基。与传统方法相比，3D生物打印具备简便、快速、低廉、可规模化的优势，为大批量制备体外胆囊癌模型创造了条件^[15]。2D培养是胆囊癌体外研究的常用体系，但其难以模拟实体瘤3D结构及微环境相关相互作用，可能导致细胞增殖、药物反应及分子表型的偏差。为提高模型的生理学相关性，本研究拟构建3D生物打印胆囊癌模型，并从增殖特性、药物敏感性及转录组学特征3个层面与2D模型进行系统比较，以支持后续机制研究和药物筛选。

1 资料和方法

本研究的整体实验流程包括模型构建、RNA提取与测序、差异分析及实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 验证等步骤 (图1)。

1.1 主要材料和试剂

1.1.1 细胞系

NOZ人胆囊癌细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 培养基和常用试剂

高糖型DMEM购自美国Gibco公司, 胎牛血

清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国Gibco公司 (货号: 10099-141), 1%青霉素/链霉素购自美国Gibco公司 (货号: 15140-122), 0.25%胰酶-乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA) 购自美国Invitrogen公司 (货号: 25200-056), 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.1.3 生物材料和裂解液

GelMA水凝胶 (EFL-GM-30) 和GelMA裂解液 (EFL-GM-LS-001) 购自苏州永沁泉智能设备有限公司。

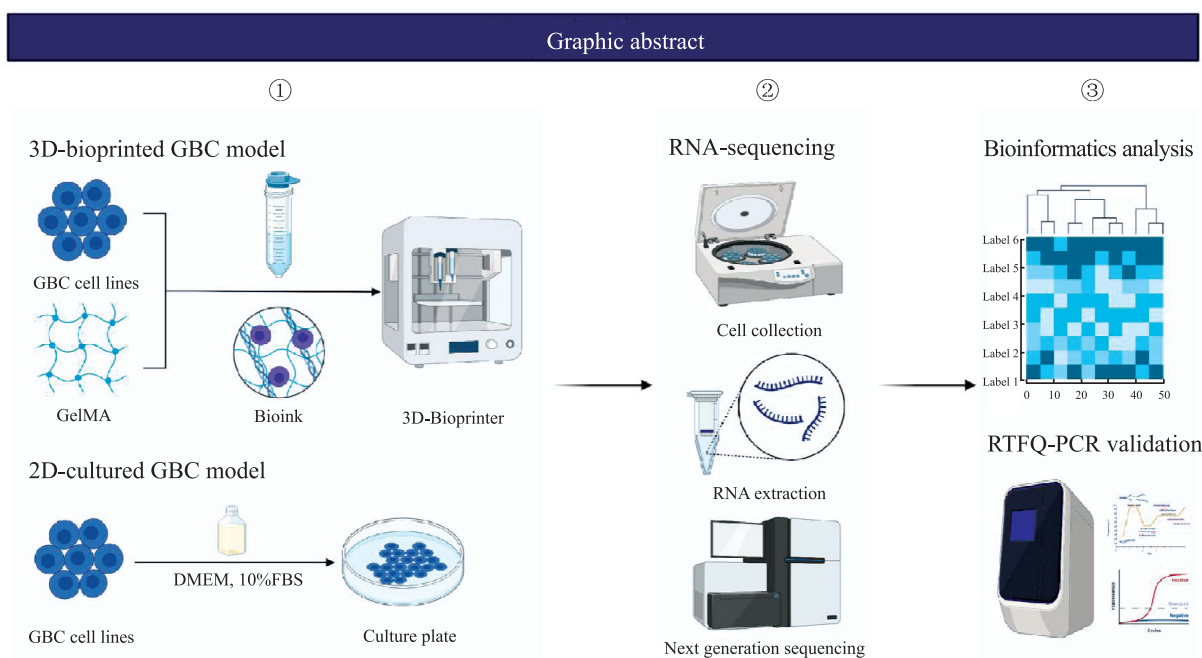


图1 3D生物打印胆囊癌模型的构建与分析流程图

Fig. 1 Flow diagram of model construction and analysis in the 3D-bioprinted gallbladder cancer study

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将NOZ细胞加入高糖型DMEM (含10%FBS、1%青霉素/链霉素), 置于37℃、CO₂体积分数为5%的恒温培养箱中培养。当细胞密度约80%融合时, 用0.25%胰酶-EDTA消化传代。培养基每隔1d更换1次。

1.2.2 3D生物打印模型构建

采用Bio X挤出式生物打印机 (瑞典CELLINK公司) 进行3D生物打印, 将NOZ细胞重悬于浓度为5%~10%的预配GelMA溶液中, 加入0.25% (w/v) 光引发剂苯基-2, 4, 6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂 (lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP), 最终细胞密

度为 5×10^5 个/mL。将含细胞的GelMA生物墨水装入无菌注射器, 在喷嘴温度20℃、成型腔温度4℃下, 以 $150 \text{ mm}^3/\text{min}$ 的速率逐层打印为格栅状结构。打印完成后, 于405 nm发光二极管光源下照射30~60 s, 使其发生光交联固化。构建体收集于经0.012 5%聚-L-赖氨酸预处理的培养皿中, 转入含完全培养基的DMEM中培养, 每2d更换1次培养液。

1.2.3 RNA提取和测序

使用GelMA裂解液收集3D打印的NOZ细胞, 经PBS洗涤后提取细胞沉淀。按说明书使用TRIzol试剂 (美国Invitrogen公司) 分离总RNA, 评估RNA纯度和完整性。合格的RNA样品采用NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit (美国

NEB公司)建库,并在Illumina NovaSeq™ 6000平台上进行150 bp双端测序。

1.2.4 RTFQ-PCR

从RNA-seq差异表达基因集合中分别在上调和下调基因列表中随机抽样用于RTFQ-PCR验证。抽样前先剔除低表达及注释不明确的基因,随后在R中设置固定随机种子[set.seed(20250108)]并使用sample()函数,在上调和下调列表中各随机选取10个基因进行验证(表

1)。总RNA使用EZBioscience反转录试剂盒,按其说明书操作,以0.5-1.0 μg RNA在20 μL体系内(含基因组DNA去除步骤)反转录合成cDNA;定量PCR采用南京诺唯赞生物科技股份有限公司ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Q711, 2×)进行(20 μL体系,引物各0.4 μmol/L)。扩增程序:95 °C 30 s;随后40个循环:95 °C 10 s, 60 °C 30 s;末端进行熔解曲线分析以确认特异性。每个样本与基因均设3个技术重复;内参基因选用GAPDH。

表1 RTFQ-PCR引物序列
Tab. 1 RTFQ-PCR primer sequences

Gene name	PrimerBank ID	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Amplicon length/bp
TNF	25952110c1	CCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG	220
FOSB	166999782c1	GCTGCAAGATCCCCTACGAAG	ACGAAGAAGTGTACGAAGGGTT	249
BPIFA1	167614491c1	CCACCGTCTCTATGTCACCAT	CCTCAACAGACTTGCACCGA	79
EGR1	31317226c1	GGTCAGTGGCCTAGTGAGC	GTGCCGCTGAGTAAATGGGA	149
EGR3	31317227c1	GACATCGGTCTGACCAACGAG	GGCGAACTTTCCCAAGTAGGT	105
FOS	254750707c1	CCGGGGATAGCCTCTCTTACT	CCAGGTCCGTGCAGAAAGTC	93
SERPINA3	73858562c2	GCTCATCAACGACTACGTGAA	CACCATTACCCACTTTTTCTTGC	190
CXCL2	-	GGCAGAAAAGCTTGTCTCAACCC	CTCCTTCAGGAACAGCCACCAA	185
LTB	-	GGTTTCAGAAGCTGCCAGAGGA	CGTCAGAAACGCCTGTTCCCTTC	156
SOST	61676080c1	ACACAGCCTTCCGTGTAGTG	GGTTCATGGTCTTGTGTCTCTCC	129
POTEF	-	TGCTGCTGAGGACTACATCG	CAGGTTCTTGGTGGTGATGG	121
ANKRD2	194018402c1	CTGCGGAAGAAACGCAAGC	AGGGCCAGTGATCTCCTCG	87
RRM2	260064011c2	GTGGAGCGATTAGCCAAGAA	CACAAGGCATCGTTTCAATGG	172
EDN2	208973218c1	CGTCTCATCTCATGCCCAAG	AGGCCGTAAGGAGCTGTCT	142
MYBL2	31652260c1	CCGGAGCAGAGGGATAGCA	CAGTGCGGTTAGGGAAGTGG	130
MCM10	296011026c2	CCCCTACAGACGATTTCTCGG	CAGATGGGTTGAGTCGTTTCC	98
CDC45	295821204c2	CTTGAAGTTCGCCCTATGAAG	GCATGGTTTGCTCCACTATCTC	136
EXO1	284055275c1	TGAGGAAGTATAAAGGGCAGGT	AGTTTTTCAGCACAAAGCAATAGC	82
ZWINT	53729319c1	AGGACACTGCTAAGGGTCTCG	GCCTCTACGTGCTCCCTGTA	118
GAPDH	378404907c2	ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC	101

-: The primer was designed in this study and was not obtained from the PrimerBank database.

1.2.5 活/死细胞染色和成像

打印完成后即进行活/死细胞染色,用1 μmol/L钙黄绿素-AM和2 μmol/L碘化丙啶(propidium iodide, PI)混合液室温避光温育15 min,采用PBS冲洗后在激光共聚焦显微镜(C2/C2si,日本Nikon公司)下观察并成像。

1.2.6 细胞增殖实验

采用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8),在细胞接种后第0、1、3、5、7天分别进行检测,其中第0天定义为细胞接种并贴壁后的时间点(8 h)。分别取2D或3D培养的NOZ细胞,加入体积分数为10%的CCK-8工作液(培养液:CCK-8=9:1),37 °C温育2 h,测定450 nm处的吸光度($D_{450\text{nm}}$)值。同时在96孔板中接种

不同数量的NOZ细胞以建立 $D_{450\text{nm}}$ -细胞数标准曲线。

1.2.7 扫描电镜样品制备

构建体经PBS清洗后固定于2.5%戊二醛(4 °C过夜),随后采用梯度乙醇(30%、50%、70%、90%、100%,各10 min)脱水。样品经临界点干燥/冻干处理后置于样品台,表面喷金(约10 nm);用扫描电镜(JSM-IT800,日本JEOL公司)在加速电压5~10 kV下观察并拍照。

1.2.8 药物敏感性检测

采用CCK-8检测2D与3D模型在不同化疗药物浓度下的细胞活力。选取吉西他滨(gemcitabine, GEM, 10~200 μmol/L^[16])、顺铂(cisplatin, DDP, 1~80 μmol/L^[17])、白蛋白结合型紫杉醇(nab-

paclitaxel, 0.4~16.0 $\mu\text{mol/L}$ [18]) 及5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU, 100~1 600 $\mu\text{mol/L}$ [19]) 进行处理, 药物作用48 h后测定 $D_{450\text{nm}}$ 值。以未经药物处理组作为对照, 通过四参数逻辑回归模型拟合剂量-反应曲线, 计算半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.3 判定方法

1.3.1 细胞存活率判定

每个样本随机采集5个视野, 使用ImageJ软件计数活细胞数和总细胞数; 细胞存活率按公式计算: 存活率 (%) = (活细胞数/总细胞数) \times 100%。

1.3.2 细胞增殖活性判定

以 $D_{450\text{nm}}$ 读数为指标, 利用96孔板建立的 $D_{450\text{nm}}$ -细胞数标准曲线对3D样品读数进行归一化, 比较2D与3D条件下的增殖差异。

1.3.3 差异表达判定标准

对RNA-seq原始计数矩阵, 先去除低表达基因 [至少一半样本每百万读数计数 (counts per million, CPM) >1], 再使用DESeq2进行标准化和离散度估计。差异表达分析结果用于后续可视化 (火山图、热图) 和功能富集分析。

1.3.4 功能富集判定标准

采用clusterProfiler对差异表达基因进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析; 以本研究检测到的全部基因为背景, 富集结果用于后续可视化展示; 条目冗余时使用simplify () 进行语义合并。

1.3.5 数据处理

内参为 *GAPDH*, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量; 每个基因设3个技术重复。

1.3.6 采用扫描电镜观察

用扫描电镜在5~10 kV加速电压下记录代表性视野, 评价打印构建体的3D支架网络和表面形貌并存档。

1.4 统计学处理

所有统计分析在GraphPad Prism 9.0和R 4.4.0软件中完成。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组比较采用双侧独立样本 *t* 检验 (数据不满足正态分布时采用Mann-Whitney *U* 检验); 多组比较采用单因素方差分析并进行事后多重比较校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。RNA-seq差异表达分析采用DESeq2, *P* 值经本杰米尼-霍赫伯格方法进行多重检验校正并计算 *q* 值; 差异表达基因筛

选标准为 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ 且 $q < 0$ 。

2 结 果

2.1 3D生物打印胆囊癌模型的构建

为评估3D生物打印NOZ胆囊癌模型的构建效果及细胞存活情况, 我们首先观察了模型的整体形态及结构特征。打印模型在培养皿中呈规则立体格栅状 (图2A), 局部放大可见打印结构排列均匀 (图2B)。扫描电镜显示, GelMA水凝胶形成了致密且规则的3D支架网络, 为细胞提供了适宜的黏附和生长环境 (图2C)。

进一步采用钙黄绿素-AM/PI荧光染色对模型内的细胞活力进行检测。结果显示, 在打印后24 h, 大量绿色荧光阳性 (钙黄绿素-AM) 活细胞均匀分布于水凝胶结构内, 而红色荧光 (PI) 阳性死细胞数量较少 (图2D), 提示NOZ细胞在打印初期具有较高的存活率。为探究不同打印条件对细胞活力的影响, 我们在打印后24 h分别比较了不同GelMA浓度及光交联时间下的细胞存活情况 (图2E)。结果表明, GelMA浓度和交联时间对NOZ细胞存活率影响有限, 整体均能维持在较高水平。此外, 打印后24 h的不同温度条件下的细胞存活率分析显示, 26 $^{\circ}\text{C}$ 下细胞活力最佳, 而在10和4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存活率显著下降 ($P < 0.001$, 图2F)。

为比较不同培养条件下NOZ细胞的生长差异, 我们在2D和3D条件下分别进行了形态学和增殖检测。结果显示, 2D培养中细胞逐渐铺展, 随着时间延长出现死亡和脱落; 而在3D水凝胶支架内, 细胞均匀分布并逐步形成类球状结构, 显示出更好的空间生长状态 (图2G)。进一步的CCK-8检测结果表明, 3D培养条件下细胞增殖活性显著高于2D条件 ($P < 0.001$, 图2H)。此外, 对3D培养形成的细胞球直径进行统计发现, 其主要分布在50~90 μm 区间 (图2I), 提示3D微环境能够促进细胞聚集和类球生长。

2.2 差异表达基因分析

RNA-seq分析共鉴定出617个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 其中235个基因上调, 382个基因下调 (图3A)。聚类热图结果显示, 3D与2D培养组在转录水平上差异显著, 提示3D微环境可系统性地改变NOZ细胞的基因表达模式 (图3B)。GO功能富集分析进一步表明, 这些DEGs主要集中在细胞周期与有丝分裂相关过程, 同时也涉及炎症反应及细胞因子信号转导通路 (图3C~3D)。在分子功能层面,

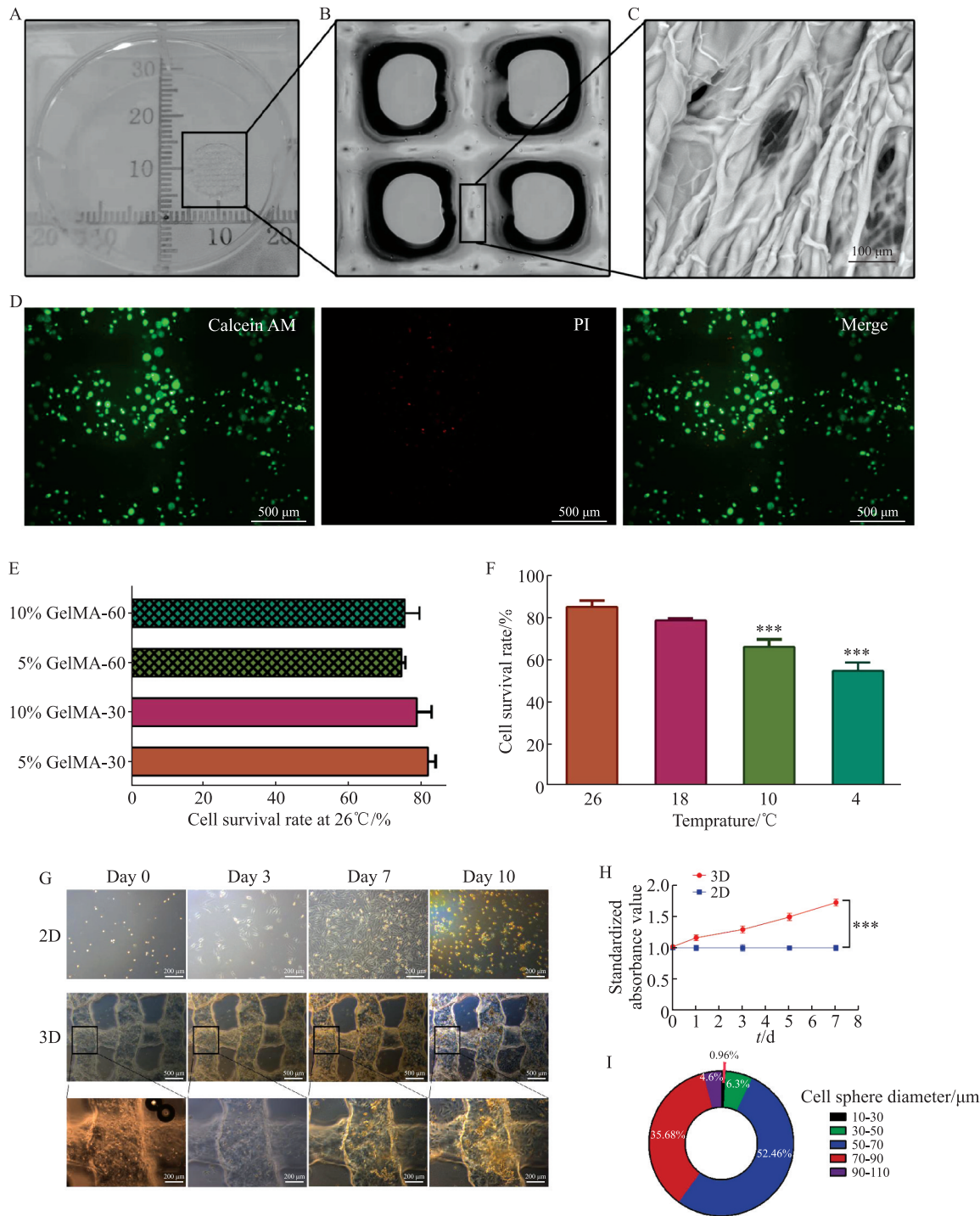


图2 3D生物打印胆囊癌模型的构建与细胞活力检测

Fig. 2 Construction and viability assessment of 3D bioprinted gallbladder cancer model

A: Overall morphology of the printed 3D model; B: Enlarged view showing the regular grid structure; C: SEM image showing a dense scaffold network formed by GelMA; D: Calcein-AM/PI staining showing high cell viability; E: Cell survival rates under different GelMA concentrations and crosslinking conditions; F: Cell survival rates under different temperature conditions; G: Morphological comparison of NOZ cells under 2D and 3D culture; H: CCK-8 assay comparing cell proliferation between 2D and 3D culture; I: Distribution of cell sphere diameters in 3D culture. ***: $P < 0.001$.

DEGs 与受体结合、细胞因子活性、转录调控及酶抑制等功能密切相关 (图 3E); 在细胞组分层面, 则显著定位于染色体、着丝粒、纺锤体及染色体乘客复合物等有丝分裂装置, 同时也包括细胞外空间等结构 (图 3F)。上述结果提示 3D 培养不仅增强了与细胞分裂和染色体动力学相关的转录程序, 还伴随着炎症因子及微环境重塑相关通

路的激活, 表明 3D 微环境在促进 NOZ 细胞增殖的同时, 还能够对 NOZ 细胞的免疫应答和适应性调控产生影响。

2.3 RTFQ-PCR 验证

为验证 RNA-seq 的可靠性, 我们对部分 DEGs 进行了 RTFQ-PCR 检测。结果显示, 与 2D 组相比, 3D 组中 *P2RY11*、*TNF*、*FOSB*、

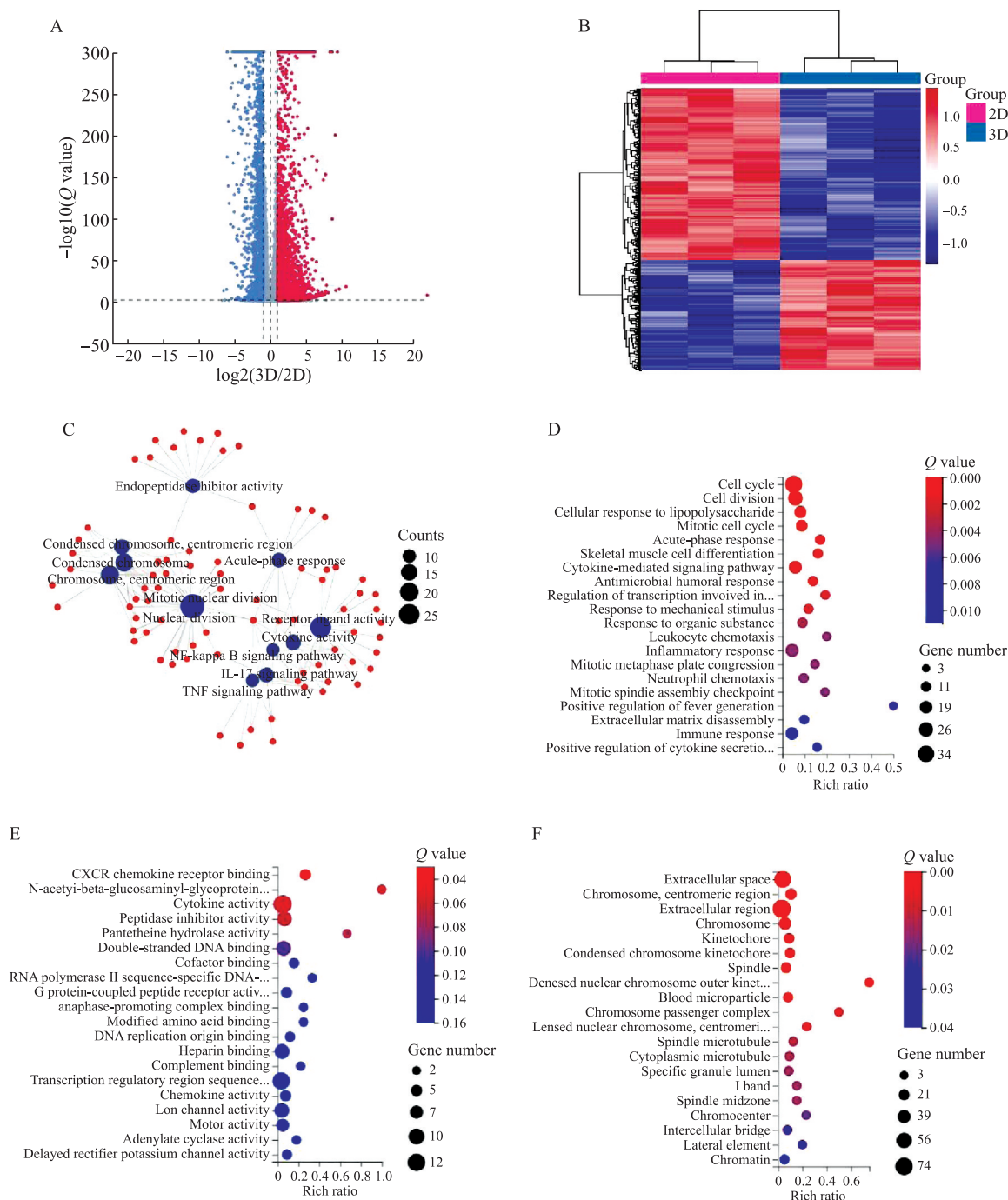


图3 3D与2D胆囊癌模型的差异表达基因及功能富集分析

Fig. 3 Differentially expressed genes and functional enrichment analysis between 3D and 2D gallbladder cancer models

A: Volcano plot of differentially expressed genes between 3D and 2D models; B: Heatmap showing clustering of DEGs; C: Functional and pathway interaction network of DEGs; D: GO enrichment analysis for biological processes; E: GO enrichment analysis for molecular functions; F: GO enrichment analysis for cellular components.

BPIFA1、*EGR1*、*EGR3*、*FOS*、*CXCL2*、*SERPINB10* 及 *LTB* 的表达水平显著上调 (图 4A), 而 *SOST*、*POTEF*、*ANKRD22*、*RRM2*、*EDN2*、*MYBL2*、*MCM10*、*CDC45*、*EXO1* 及 *ZWINT* 的表达水平则显著下调 (图 4B)。这些结果与 RNA-seq 分析结果一致 (图 4C), 进一步证明了转录组数据的可靠性, 并提示 3D 培养条件下 DEGs 的变化具有一定的稳定性和生物学意义。

2.4 抗肿瘤药物敏感性检测

为比较 3D 与 2D 胆囊癌模型对化疗药物的反应, 我们分别检测了 GEM、DDP、nab-paclitaxel 及 5-FU 的剂量-反应曲线并计算 IC_{50} (图 5)。结果显示, 3D 模型对上述药物均表现出较低的敏感性, IC_{50} 普遍高于 2D 模型 (GEM: 143.4 $\mu\text{mol/L}$ vs 99.59 $\mu\text{mol/L}$; DDP: 26.67 $\mu\text{mol/L}$ vs 14.89 $\mu\text{mol/L}$; nab-paclitaxel: 6.662 $\mu\text{mol/L}$ vs 3.732 $\mu\text{mol/L}$; 5-FU:

698.7 $\mu\text{mol/L}$ vs 640.3 $\mu\text{mol/L}$, 图5A~5D)。上述结果提示3D胆囊癌模型比2D细胞对化疗药物更

具有耐受性, 更接近临床肿瘤细胞的药物反应特征。

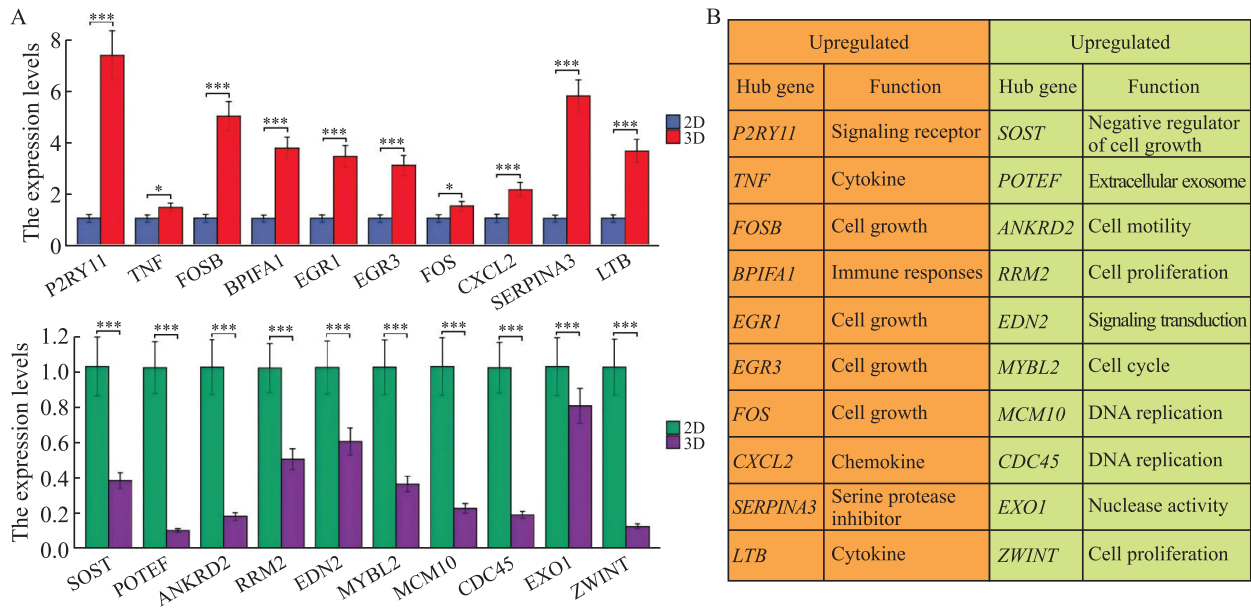


图4 RTFQ-PCR验证3D与2D胆囊癌模型的DEGs表达

Fig. 4 Validation of DEGs between 3D and 2D gallbladder cancer models by RTFQ-PCR

A: Validation of 10 upregulated genes in the 3D model by RTFQ-PCR; B: Validation of 10 downregulated genes in the 3D model; C: Functional annotation of selected DEGs, involving signaling, cytokines, cell proliferation, immune response, DNA replication, and cell cycle regulation. ***: $P < 0.001$, compared with 2D.

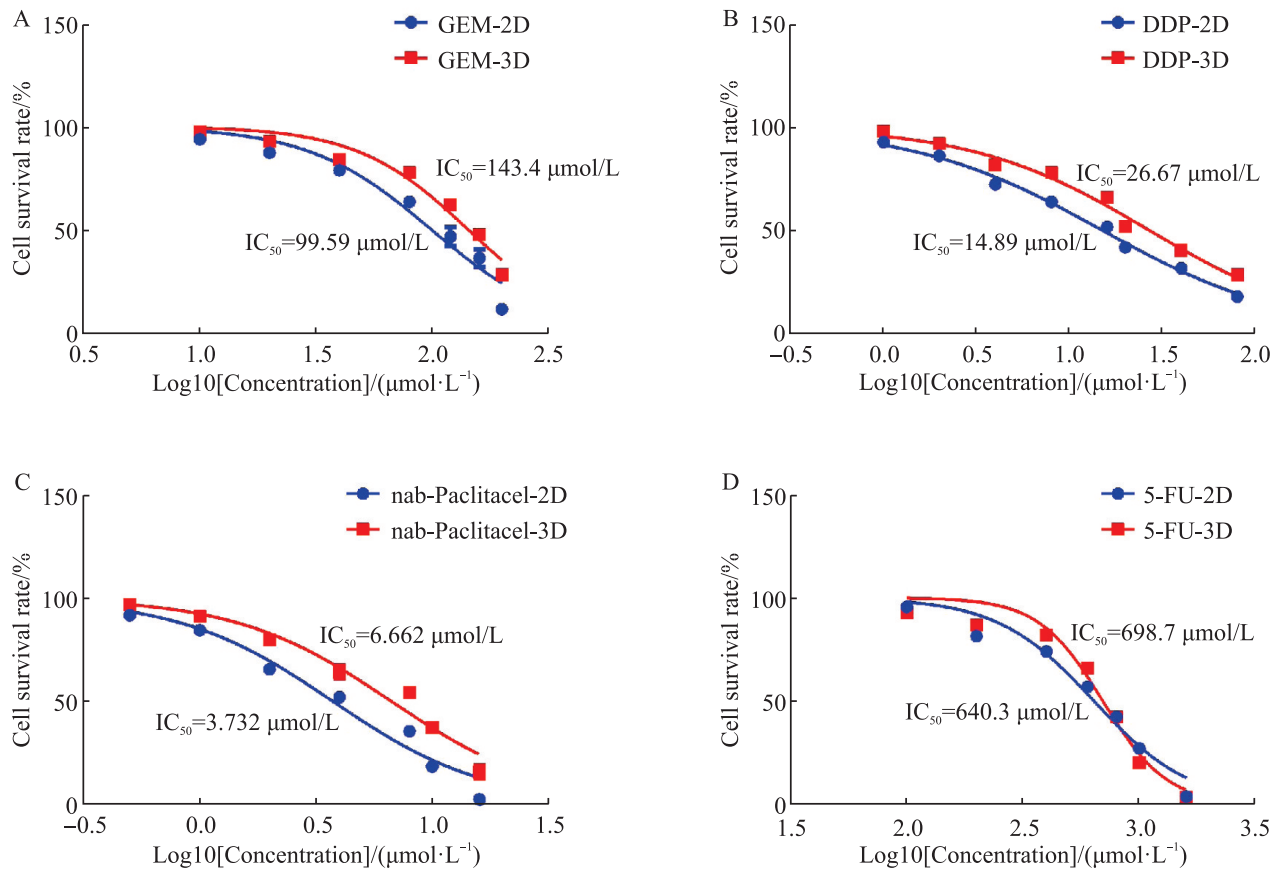


图5 3D与2D胆囊癌模型对化疗药物的敏感性比较

Fig. 5 Comparison of chemosensitivity between 3D and 2D gallbladder cancer models

A-D: Dose-response curves and IC_{50} values of GEM, DDP, nab-paclitaxel and 5-FU in 2D and 3D gallbladder cancer models.

3 讨 论

近年来, 2D 培养模型在药物筛选中的外推性不足逐渐显现, 核心原因在于其难以再现体内的 3D 结构与 ECM 相关力学/生化线索, 导致药效和毒性评估与临床反应不一致^[20-21]。相关研究^[22]证实, 3D 生物打印技术能够在空间维度上精准调控细胞与基质的排列和分布, 从而更真实地模拟体内肿瘤微环境, 不仅提高了模型与体内环境的相关性, 也显著改善了药物反应预测的准确性。我们的 3D 打印-NOZ 模型在形态、增殖及基因表达层面均与 2D 模型存在系统性差异, 这与既往 3D 生物打印肿瘤模型“更接近体内”的结论一致。

本研究所采用的肿瘤模型基于挤出式生物打印技术构建, 具有操作简便、快速高效、成本较低等优点。所形成的 3D-NOZ 模型不仅结构稳定、具备良好的物质交换环境, 而且无需额外的特定诱导因子即可维持培养。同时, 该模型还表现出较高的细胞存活率。

我们还从转录组学的角度确定了 3D 打印-NOZ 模型的关键特征。相比 2D 培养, 在 3D 培养条件下, 细胞呈现出广泛的基因表达差异。GO 富集结果整体指向两大核心模块: 一方面是细胞周期与有丝分裂相关程序的持续活化, 另一方面是炎症与细胞因子信号的显著增强, 并伴随细胞外空间和分泌相关特征的出现。这些变化提示, 3D 微环境不仅推动了增殖优势, 还重塑了炎症-免疫信号网络, 从而更接近肿瘤体内微环境的状态, 这与既往研究^[15, 23]结果高度吻合。既往研究显示, 3D 条件下的肿瘤细胞通常表现出更强的增殖能力和耐药特征, 部分归因于有丝分裂机制的改变和与 DNA 复制相关基因的持续激活。

已有研究^[24]表明, 肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 在肿瘤的耐药性和侵袭性中发挥核心作用, 其典型特征包括自我更新、上皮-间质转化潜能及对化疗的抵抗力。本研究对 GEM、DDP、nab-paclitaxel 及 5-FU 等常用化疗药物进行了敏感性检测, 结果显示, 这些药物在 3D-NOZ 模型中的抗肿瘤效应均明显弱于 2D 培养条件。3D 打印构建的体内富集的 CSC 群体表现出更强的化疗耐受性。这一现象提示, 在具有明确空间结构和肿瘤微环境的 3D 系统中, NOZ 细胞能够维持干性特征并表现出更高的恶性程度, 从而导致药物敏感性下降。与 2D 模型相比, 3D-

NOZ 模型更接近临床中观察到的胆囊癌耐药特征, 进一步证实了 2D 培养在预测药物疗效方面的局限性。

本研究仍存在一定的局限性。真实的肿瘤组织往往由多种细胞类型构成, 包括肿瘤细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞及免疫细胞等, 它们通过复杂的细胞-细胞和细胞-基质相互作用共同塑造了肿瘤微环境^[25], 而本研究的 3D 打印 NOZ 模型仅包含肿瘤细胞, 缺乏这些关键的间质和免疫成分。因此, 尽管 3D-NOZ 模型能够较好地模拟肿瘤细胞的增殖和耐药特征, 但其在完整反映肿瘤微环境复杂性方面仍存在不足。未来可以开展更复杂的构建体研究, 将肿瘤细胞与内皮细胞、免疫细胞等共同整合, 以期建立更接近临床的多细胞 3D 打印肿瘤模型。

综上, 本研究成功地构建了 3D 生物打印胆囊癌模型, 证明其在细胞增殖、分子特征及药物反应方面均显著有别于 2D 模型, 为胆囊癌机制研究和新药筛选提供了更具仿生性的实验平台。使用 3D 打印 NOZ 模型开展药物研究, 可获得更接近体内真实状态的药效学结果, 显示出良好的转化应用潜力。总体而言, 3D 生物打印肿瘤模型在药物开发领域具有广阔的应用前景。

第一作者:

王铭洋 (ORCID: 0009-0007-6794-8380), 硕士在读。

通信作者:

杨自逸 (ORCID: 0000-0002-6130-859X), 博士, 主治医师, E-mail: yangziyi@xinhumed.com.cn。

作者贡献声明:

王铭洋: 参与研究设计、实验实施、数据分析与论文撰写; 王紫迎: 参与实验实施与数据整理; 赵成: 参与研究设计与实验操作, 协助论文修订; 宋晓玲: 参与数据统计与图表绘制, 协助论文撰写; 顾钧: 协助实验实施与结果分析; 龚伟: 参与研究方案讨论, 提供技术支持; 杨自逸: 指导研究设计, 审核实验数据, 指导论文写作与修改。

[参 考 文 献]

- [1] 邵国凯, 宇洋, 王志东. 胆囊癌的诊治进展[J]. 临床外科杂志, 2025, 33(7): 688-692.
TAI G K, YU Y, WANG Z D. Advances in the diagnosis and treatment of gallbladder cancer [J]. J Clin Surg, 2025, 33(7): 688-692.
- [2] YANG Z Y, LIU S L, CAI C, et al. Progress in clinical diagnosis and treatment of gallbladder cancer [J]. Zhonghua Wai Ke Zhi, 2022, 60(8): 784-791.
- [3] ROA J C, GARCÍA P, KAPOOR V K, et al. Gallbladder cancer

- [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8: 69.
- [4] 刘颖斌, 贾子衡, 陈 炜, 等. 重视胆道恶性肿瘤诊断与治疗新知识的应用[J]. *中国实用外科杂志*, 2025, 45(1): 52-58.
LIU Y B, JIA Z H, CHEN W, et al. Emphasizing the application of new knowledge in the diagnosis and treatment of biliary tract cancers[J]. *Chin J Pract Surg*, 2025, 45(1): 52-58.
- [5] SONG X L, HU Y P, LI Y S, et al. Overview of current targeted therapy in gallbladder cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 230.
- [6] ZHOU T, WU Y H, LI S, et al. Multi-omic analysis of gallbladder cancer identifies distinct tumor microenvironments associated with disease progression[J]. *Nat Genet*, 2025, 57(8): 1935-1949.
- [7] DERMAN I D, RIVERA T, GARRIGA CERDA L, et al. Advancements in 3D skin bioprinting: processes, bioinks, applications and sensor integration [J]. *Int J Extrem Manuf*, 2025, 7(1): 012009.
- [8] MCGONIGLE P, RUGGERI B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(1): 162-171.
- [9] MAK I W, EVANIEW N, GHERT M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment [J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(2): 114-118.
- [10] RAVI M, PARAMESH V, KAVIYA S R, et al. 3D cell culture systems: advantages and applications [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 16-26.
- [11] MONTEIRO M V, ZHANG Y S, GASPAR V M, et al. 3D-bioprinted cancer-on-a-chip: level-up organotypic *in vitro* models[J]. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(4): 432-447.
- [12] 胡淇芑. 3D打印的多孔微凝胶用于肺癌细胞体外培养[D]. 成都: 四川大学, 2021.
HU Q P. 3D printed porous microgel for lung cancer cells culture *in vitro*[D]. Chengdu: Sichuan University, 2021.
- [13] MAO S S, HE J Y, ZHAO Y, et al. Bioprinting of patient-derived *in vitro* intrahepatic cholangiocarcinoma tumor model: establishment, evaluation and anti-cancer drug testing [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(4): 045014.
- [14] OZBOLAT I T, PENG W J, OZBOLAT V. Application areas of 3D bioprinting[J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(8): 1257-1271.
- [15] ABBAS Z N, AL-SAFFAR A Z, JASIM S M, et al. Comparative analysis between 2D and 3D colorectal cancer culture models for insights into cellular morphological and transcriptomic variations [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18380.
- [16] 陈 平, 吴见春, 阳 镇, 等. 外泌体 circ-0001328 靶向 miR-545-3p 对胆囊癌细胞吉西他滨耐药的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2025, 33(2): 208-217.
CHEN P, WU J C, YANG Z, et al. Effect of exosomal circ-0001328 on gemcitabine resistance in gallbladder cancer cells by targeting miR-545-3p [J]. *J Mod Oncol*, 2025, 33(2): 208-217.
- [17] 赵向阳. M2型巨噬细胞通过分泌 IL-10 调控胆囊癌细胞增殖和转移及顺铂敏感性的研究[D]. 安徽: 蚌埠医科大学, 2024.
ZHAO X Y. M2 macrophage regulate proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells and cisplatin sensitivity by secreting IL-10[D]. Anhui: Bengbu Medical University, 2024.
- [18] WANG N Y, MEI X P, CAO Y, et al. Nab-paclitaxel promotes radiosensitization by inducing DNA damage and inhibiting macrophage M2 polarization in cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2025, 40(5): 352-363.
- [19] CHEUNG H, CHEN H R, CHEN D Y, et al. YTHDF1 targets the chemotherapy response by suppressing NOTCH1-induced stemness in colorectal cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 409.
- [20] PENG Z, LV X L, SUN H, et al. 3D tumor cultures for drug resistance and screening development in clinical applications [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 93.
- [21] PAMARTHY S, SABAAWY H E. Patient derived organoids in prostate cancer: improving therapeutic efficacy in precision medicine[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 125.
- [22] CHOI Y M, NA D, YOON G, et al. Prediction of patient drug response *via* 3D bioprinted gastric cancer model utilized patient-derived tissue laden tissue-specific bioink[J]. *Adv Sci*, 2025, 12(10): 2411769.
- [23] SOOD D, TANG-SCHOMER M, POULI D, et al. 3D extracellular matrix microenvironment in bioengineered tissue models of primary pediatric and adult brain tumors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4529.
- [24] ZHOU J B, ZHANG Y. Cancer stem cells: models, mechanisms and implications for improved treatment[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(10): 1360-1370.
- [25] KIM T K, VANDSEMB E N, HERBST R S, et al. Adaptive immune resistance at the tumour site: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(7): 529-540.

(收稿日期: 2025-11-18 修回日期: 2026-01-20)

(责任编辑: 李广涛)