

靶向类药物抗肿瘤作用研究与应用专题

论 著

口腔鳞状细胞癌-血管内皮细胞共培养微流控芯片的构建及验证

陈俞彤, 谢尚, 蔡志刚*

北京大学口腔医学院口腔医院口腔颌面外科/国家口腔医学中心/国家口腔疾病临床医学研究中心/口腔生物材料和数字诊疗装备国家工程研究中心, 北京 100081

[中图分类号] R739.81 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2525.2026.0304

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 陈俞彤, 谢尚, 蔡志刚. 口腔鳞状细胞癌-血管内皮细胞共培养微流控芯片的构建及验证[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(4): 488-499.

[收稿日期] 2025-12-09

[录用日期] 2026-01-04

[上线日期] 2026-03-04

[摘要] **目的** 构建口腔鳞状细胞癌-血管内皮细胞共培养的微流控芯片, 验证两种细胞的相互作用, 并将芯片用于测试化疗药与抗血管生成药物的疗效。**方法** 设计以多孔聚对二甲苯膜分隔的双层聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片, 上下腔室分别接种人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人舌鳞癌细胞(WSU-HN6)。进行流体力学分析, 计算芯片内的相对压力、流速和剪切力。对上层HUVEC与下层HN6细胞分别设置单独培养及二者共培养的条件。将HUVEC分为单独培养组(即对照组)与在芯片下层添加HN6细胞的共培养组。将HN6细胞也分为单独培养组(即对照组)与在芯片上层添加HUVEC的共培养组。采用qRT-PCR检测两组HUVEC的血管内皮生长因子(VEGF)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)、白细胞介素-8(IL-8) mRNA表达水平; 免疫荧光染色检测VE-钙黏蛋白(VE-cadherin)的表达情况, 跨细胞电阻检测HUVEC屏障功能, 血管形成实验检测HUVEC的成管能力。采用CCK-8试剂盒检测HN6细胞活力, qRT-PCR检测HN6细胞的VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin) mRNA表达水平, 免疫荧光染色检测上皮-间充质转化(EMT)相关标志物表达情况, 划痕实验检测HN6细胞迁移能力, TUNEL染色检测HN6细胞凋亡情况。**结果** 芯片入口培养基流速设为100 $\mu\text{m/s}$, 可模拟生理状态下的流动条件。共培养组HUVEC的VEGF和ICAM-1 mRNA表达水平明显升高($P<0.01$), 血管形成实验连接点数($P<0.05$)和小管总长度($P<0.01$)明显增加, 跨细胞电阻降低, VE-cadherin形态不完整。qRT-PCR检测结果显示, 与单独培养的HN6细胞相比, 共培养组HN6细胞活力无明显变化, VEGF、N-cadherin mRNA表达水平明显升高($P<0.05$), E-cadherin mRNA表达水平明显降低($P<0.05$)。免疫荧光染色显示, EMT相关标志物的蛋白表达变化与qRT-PCR结果一致, Vimentin($P<0.001$)、N-cadherin($P<0.01$)蛋白表达水平明显升高, E-cadherin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。共培养组HN6细胞24 h划痕愈合率明显高于单独培养组($P<0.01$), 添加贝伐珠单抗可抑制细胞迁移($P<0.0001$)且后者浓度越高、抑制作用越强。贝伐珠单抗对HN6细胞没有杀伤作用, 也不能改变其对化疗药物的敏感性。**结论** 本研究设计的双层微流控芯片可模拟HN6与HUVEC的相互作用, 进而用于药物筛选。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 微流控芯片; 血管内皮细胞; 共培养

Fabrication and validation of a microfluidic chip for the co-culture of oral squamous cell carcinoma and vascular endothelial cells

Chen Yu-Tong, Xie Shang, Cai Zhi-Gang*

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School and Hospital of Stomatology/National Center for Stomatology/National Clinical Research Center for Oral Diseases/National Engineering Research Center of Oral Biomaterials and Digital Medical Devices, Beijing 100081, China

*Corresponding author, E-mail: c2013xs@163.com

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFC2504200); 国家自然科学基金(82373434)

[作者简介] 陈俞彤, 博士研究生, 主要从事口腔鳞癌临床与基础方面的研究

[通信作者] 蔡志刚, E-mail: c2013xs@163.com

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2504200), and the National Natural Science Foundation of China (82373434)

[Abstract] Objective To fabricate a microfluidic chip for the co-culture of oral squamous cell carcinoma cells and vascular endothelial cells, validate the interaction between the two cell types, and test the efficacy of combined chemotherapeutic and anti-angiogenic drugs. **Methods** A double-layer polydimethylsiloxane (PDMS) chip was fabricated, separated by a porous parylene membrane, with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) seeded in the upper chamber and human tongue squamous cell carcinoma cells (WSU-HN6) seeded in the lower chamber, respectively. Hydrodynamic analysis was performed to calculate the relative pressure, flow velocity, and shear stress within the chip. Monoculture (control) and co-culture conditions were separately established for upper-layer HUVECs and lower-layer HN6 cells: HUVECs were cultured alone or co-cultured with HN6 cells in the lower chip chamber, and HN6 cells were grouped in the same way in the upper chip chamber. For HUVECs, mRNA expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and interleukin-8 (IL-8) were detected by qRT-PCR, in the two groups, and vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) protein expression was detected by immunofluorescence staining. Barrier function was assessed by transendothelial electrical resistance (TEER), while tube formation ability of HUVECs was evaluated using the tube formation assay. For HN6 cells, viability was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. mRNA expression levels of VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), neural cadherin (N-cadherin), epithelial cadherin (E-cadherin), and Vimentin were detected by qRT-PCR. Immunofluorescence staining was performed to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related markers. HN6 cell migration was evaluated by the scratch wound assay. HN6 cell apoptosis was detected by TUNEL staining. **Results** The medium flow rate at the chip inlet was set to 100 $\mu\text{m/s}$ and was able to simulate *in vivo* physiological flow conditions. Hydrodynamic analysis confirmed that the flow conditions were consistent with physiological parameters. In co-culture group, HUVECs showed significantly elevated mRNA expression levels of VEGF and ICAM-1 ($P<0.01$), compared to monoculture control group. Co-cultured HUVECs also significantly increased the number of tube junctions ($P<0.05$) and total tube length ($P<0.01$) in the tube formation assay, along with reduced trans-epithelial electrical resistance (TEER) as well as incomplete morphology of VE-cadherin. For HN6 cells, qRT-PCR results showed that, compared with monocultured HN6 cells, co-culture with HUVECs did not significantly affect cell viability but led to significant mRNA expression changes: VEGF and N-cadherin were significantly elevated ($P<0.05$), E-cadherin was reduced ($P<0.05$). The results of immunofluorescence staining confirmed corresponding protein-level changes during EMT-related markers, consistent with the qRT-PCR results: Vimentin ($P<0.001$), N-cadherin ($P<0.01$) protein expression levels significantly increased, and E-cadherin expression significantly decreased ($P<0.05$). Co-cultured HN6 cells also exhibited a significantly higher 24 h scratch wound healing rate than the monoculture group ($P<0.01$), which was inhibited by bevacizumab in a concentration-dependent manner. Bevacizumab showed no cytotoxicity on HN6 cells nor did it change their sensitivity to chemotherapeutic agents. **Conclusion** The double-layer microfluidic chip fabricated in this study can simulate the interaction between HN6 cells and HUVECs, thus enabling its use in drug screening.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; microfluidic chip; endothelial cells; co-culture

血管生成是肿瘤进展过程中的关键事件, 肿瘤细胞的持续增殖分裂需要新的血管, 以获得营养和氧气, 而肿瘤相关脉管系统通透性高, 灌注效率低下^[1-2], 有利于肿瘤细胞转移且对药物递送不利。许多研究发现, 肿瘤细胞可以通过与内皮细胞的直接或间接的相互作用, 调控血管生成过程^[3-4]。血管内皮生长因子(VEGF)是血管生成的关键调节因子, 在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)中常呈过表达状态^[5]; 其过表达与患者较差的总生存期显著相关^[6]。目前关于口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)与血管内皮细胞相互作用的研究较为有限, 探究抗血管生成药对OSCC作用机制时, 多数研究只使用OSCC细胞, 未引入内皮细胞参与^[7-8], 或将二者分别进行测试^[9]。因此, 需要构建允许OSCC细胞与血管内皮细胞相互作用的平台。器官芯片是基于微流体平台

的体外细胞培养新兴技术, 可模拟细胞在体内的微环境, 并容纳多个细胞层^[10-11], 从而为研究OSCC细胞与内皮细胞的相互作用提供支持。本研究设计了一款以多孔聚对二甲苯膜分隔的双层微流控芯片, 构建人舌鳞状细胞癌细胞系(WSU-HN6)与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的共培养体系, 用以模拟和研究OSCC细胞与内皮细胞的相互作用, 并在芯片上对HN6细胞进行化疗药和抗血管生成药物疗效测试。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂 人舌鳞状细胞癌细胞系WSU-HN6和HUVEC系购自武汉普诺赛公司, 青链霉素双抗、胰蛋白酶、改良Eagle培养基(DMEM)购自美国Gibco公司, 内皮细胞培养基(ECM)购自美国ScienCell公司, 胎牛血清(FBS)购自德国PAN-Biotech公司, Sylgard® 184有机硅弹性体基料和固化剂购自

美国 Dow Corning 公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)引物购自上海生工生物工程公司, RNA反转录试剂盒(RK20429)、SYBR 混合物(RK21203)、E-cadherin 抗体(A20798)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, CCK-8 试剂盒(AQ308-500T)购自北京翱擎生物科技有限公司, VE-钙黏蛋白(VE-cadherin)抗体(ab313632)、波形蛋白(Vimentin)抗体(ab8069)购自英国 Abcam 公司, N-cadherin 抗体(22018-1-AP)购自美国 Proteintech 公司, DAPI 染色液(G1012)购自武汉塞维尔生物科技有限公司, Alexa Fluor[®] 488 标记的山羊抗兔 IgG(ZF-0511)、Alexa Fluor[®] 494 标记的山羊抗小鼠 IgG(ZF-0513)购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Matrigel(354234)购自美国康宁公司, 贝伐珠单抗(HY-P9906)、顺铂(HY-17394)、5-氟尿嘧啶(HY-90006)购自美国 MCE 公司, TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒(E-CK-A322)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 微流控芯片的设计与制造 使用 AutoCAD 2024 设计芯片结构并输出 CAD 文件, 用于加工聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)模具, 将聚二甲基硅氧烷(PDMS)预聚物与固化剂按 10:1(w/w)的比例混合, 浇灌至 PMMA 模板上, 抽真空去除气泡, 于 80 ℃烘箱内固化 60 min。揭下 PDMS 层, 使用 1 mm 打孔器在流道入口与出口处打孔。氧等离子体处理 PDMS 与载玻片表面, 实现不可逆键合。将孔径 8 μm 的聚对二甲苯 C(paralene C)多孔膜裁剪为直径约 6 mm 的圆片, 覆盖于下层 PDMS 的细胞培养腔室上, 最后键合上层 PDMS 完成芯片组装。

1.2.2 细胞培养 WSU-HN6 使用增殖培养基[90% DMEM(高糖)+10% FBS+1% 青链霉素]培养。HUVEC 使用内皮细胞完全培养基(95% ECM+5% FBS+1% 内皮细胞生长添加剂+1% 青链霉素)培养。所有细胞均于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中常规培养。消化收集对数生长期细胞, 分别重悬于相应的完全培养基中。将密度为 1.5×10⁶/ml 的 HUVEC 细胞悬液接种于芯片上层, 密度为 2×10⁵/ml 的 HN6 细胞悬液接种于芯片下层。静态培养 24 h 后, 将两种细胞的完全培养基以 1:1 的体积比混合, 使用注射泵持续灌注培养。

1.2.3 流体力学分析 利用 COMSOL Multiphysics 6.2 软件模拟芯片内的流体流动模式。将芯片的三维模型导入软件。重力作用于整个系统。仿真中使用的参数: 流体密度 ρ 为 1000 kg/m³, 动力黏度 μ 为 8.5×10⁻⁴ Pa·s, 上层通道入口流速设为 100 μm/s, 计算得雷诺数 Re 约为 4.1×10⁻², 确认上层培养基通道内流

动状态属于蠕动流。在此条件下, Navier-Stokes 方程中的惯性项可忽略, 流动遵循斯托克斯方程^[12]。

1.2.4 跨细胞电阻(TEER)测定 使用 Millicell[®] ERS-2 细胞电阻仪在培养的第 1、3、5、7 天测量内皮细胞层电阻值(R), 同时测量无细胞的空白膜电阻值(R₀)。TEER 值通过以下公式计算: TEER=(R-R₀)×A, A 为有效细胞培养面积, 在本研究中为直径 5 mm 的圆形区域, 面积约为 0.196 cm²。

1.2.5 免疫荧光染色 破坏芯片, 对多孔膜上的 HUVEC 和载玻片上的 HN6 细胞分别进行免疫荧光染色。4%多聚甲醛溶液固定 20 min, PBS 清洗 5 min×3 次, 0.1% Triton 通透 10 min, PBS 清洗 5 min×3 次, 3% BSA 封闭 30 min, 使用 VE-cadherin 抗体(兔单克隆抗体, 1:200); Vimentin 抗体(小鼠单克隆抗体, 1:200)、N-cadherin 抗体(兔多克隆抗体, 1:300)和 E-cadherin 抗体(兔单克隆抗体, 1:200)4 ℃孵育过夜, PBS 洗 3 次, 二抗使用 Alexa Fluor[®] 488 标记的山羊抗兔 IgG 和 Alexa Fluor[®] 494 标记的山羊抗小鼠 IgG(稀释比均为 1:200), 室温下避光孵育 1 h。DAPI 用于细胞核染色, 采用共聚焦显微镜随机选取 3 个视野拍照记录。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 VEGF、ICAM-1、IL-8、N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、bFGF 的 mRNA 表达水平 采用 Trizol 裂解收集的 HUVEC 或 HN6 细胞, 提取总 RNA, 采用微量分光光度计测定 260 nm、280 nm 处的吸光度值, 检测 VEGF、ICAM-1、IL-8、N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、bFGF 的 RNA 浓度。使用 ABclonal 反转录试剂盒合成 cDNA。配置 20 μl 体系进行 qRT-PCR 检测, 其中包括 1 μl cDNA、1 μl 引物混合物、8 μl DEPC 水和 10 μl SYBR Green 混合物。PCR 反应条件为 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次, 数据分析采用 2^{-ΔΔCt} 方法。引物序列见表 1。

1.2.7 血管形成实验 将 Matrigel 置于冰上融化, 移液枪头及 96 孔板 4 ℃预冷, 每孔加入 50 μl 基质胶, 37 ℃恒温箱孵育 30 min 使胶凝固。HUVECs 消化、离心并重悬于无血清培养基中, 每孔基质胶上接种 1×10⁴ 个细胞, 每组 3 个复孔, 6 h 后观察小管形成情况。随机选取 3 个视野拍照记录, 应用 ImageJ 软件对小管长度、分支数和连接点数进行测量。

1.2.8 细胞活力检测 破坏芯片, 取出多孔膜及其上的 HUVEC, 将下层通道内 HN6 细胞消化后接种于 96 孔板内, 每个芯片内的 HN6 细胞对应 96 孔板 1 个孔。待细胞贴壁后, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。将 CCK-8 溶液与无血清 DMEM 基础培养基按 1:9 的比例混匀, 配置成工作液。每孔使用 100 μl 工作液替换培养基, 在无细胞的空白孔中每孔同样加

表1 qRT-PCR引物序列
Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(3'-5')
VEGF	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
ICAM-1	GGAGCTTCGTGTCTGTATGG	TGGCACATTGGAGTCTGCTG
IL-8	CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT	ACTCTCAATCACTCTCAGTTCT
N-cadherin	AGCCAACCTTAACTGAGGAGT	GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
E-cadherin	CGAGAGCTACACGTTACGG	GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
Vimentin	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC	CATTTACGCATCTGGCGTTC
bFGF	AAGAGCGACCCTCACATCAA	ACGGTTAGCACACACTCCTT
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

VEGF. 血管内皮生长因子; ICAM-1. 细胞间黏附分子-1; IL-8. 白细胞介素-8; N-cadherin. N-钙黏蛋白; E-cadherin. E-钙黏蛋白; Vimentin. 波形蛋白; bFGF. 碱性成纤维细胞生长因子; GAPDH. 人甘油醛-3-磷酸脱氢酶

入100 μl工作液。于37 ℃, 5% CO₂培养箱中避光孵育1 h, 使用酶标仪检测450 nm波长下的吸光度(OD值), 各组OD值减去空白孔的OD值以校正背景。细胞活力按以下公式进行计算: 细胞活力(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)×100%。

1.2.9 划痕愈合实验 将芯片上的HN6细胞消化后接种于24孔板中, 每组3个复孔。在孔板中培养至80%~90%汇合, 使用无菌枪头在孔板底面沿直径划线, 吸去培养基, PBS清洗除未贴壁的细胞后, 加入新鲜无血清培养基继续培养。于0、12、24、36 h在显微镜下观察划痕并拍照记录图像, 并使用ImageJ软件测量划痕面积。

1.2.10 药物筛选 将5-氟尿嘧啶溶于二甲基亚砜(DMSO)中, 顺铂溶于N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 储液浓度均为10 mmol/L, 贝伐珠单抗溶液浓度为100 mg/ml。使用培养基稀释建立不同药物的浓度梯度(顺铂: 0、1、5、10、20、50 μmol/L; 5-氟尿嘧啶: 0、5、10、20、50、100 μmol/L; 贝伐珠单抗: 0、0.01、0.1、1、10 μg/ml), 用于芯片的灌注。药物处理3 d后破坏芯片, 对HN6细胞进行细胞活力检测或TUNEL染色, 实验重复3次。

1.2.11 TUNEL染色 破坏芯片, 对下层的HN6细胞使用4%多聚甲醛溶液固定20 min, PBS清洗, 0.2% Triton通透10 min, PBS清洗5 min×3次, 滴加TdT平衡液, 37 ℃孵育10 min, 随后加入TUNEL标记工作液(TdT平衡液:dUTP:TdT酶=7:2:1), 置于37 ℃下孵育1 h, PBS清洗5 min×3次, DAPI避光孵育5 min复染细胞核。使用共聚焦显微镜随机选取3个视野拍照记录, 采用ImageJ软件进行细胞计数, 计算TUNEL染色阳性细胞率。

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计分析。所有数据均为符合正态分布的计量资

料, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验; 涉及多组药物浓度和不同培养方式的数据采用两因素方差分析, 若存在明显的交互作用, 则进一步进行事后检验: 采用Tukey's检验比较不同药物浓度间的差异, 采用Sidak's检验比较不同培养条件间的差异。根据剂量-反应曲线通过非线性回归计算半数抑制浓度(IC₅₀)。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 芯片结构设计及流体力学分析 本研究设计的芯片由2层PDMS结构、1层多孔膜和玻璃基板组成, 通过微流控注射泵实现芯片内培养基的持续灌注(图1A、B)。芯片上层PDMS厚度2.0 mm, 其底面制作深0.2 mm, 宽1.0 mm, 长18.0 mm的微通道(图1C绿色), 用于培养基灌注, 通道中央为直径5.0 mm的HUVEC培养区域。下层PDMS厚度1.0 mm, 其微通道深1.0 mm, 宽1.0 mm, 长18.0 mm(图1C黄色), 方向与上层微通道呈45°角, 中央圆形细胞培养区域与上层重叠, 用于培养HN6细胞。两条微通道的细胞培养区域由多孔膜隔开, 显微镜下检查多孔膜孔隙分布如图1D所示。

为评估芯片内的流体环境, 使用COMSOL Multiphysics软件进行流体力学分析。设置入口流速为100 μm/s, 出口压力为0 Pa, 计算结果显示, 芯片内相对出口处的压力为0~0.375 Pa(图1E), 芯片内的流速为0~1.66×10⁻⁴ m/s(图1F), 上层通道底面, 即内皮细胞培养区域的剪切应力为0~4.14×10⁻³ Pa(图1G)。

2.2 微流控芯片上共培养WSU-HN6对HUVEC的作用 qRT-PCR结果显示, 与单独培养的对照组HUVEC相比, 共培养条件下HUVEC的VEGF、ICAM-1的mRNA表达水平明显升高(P<0.01), 而IL-8 mRNA表达水平差异无统计学意义(P>0.05)(图2A)。

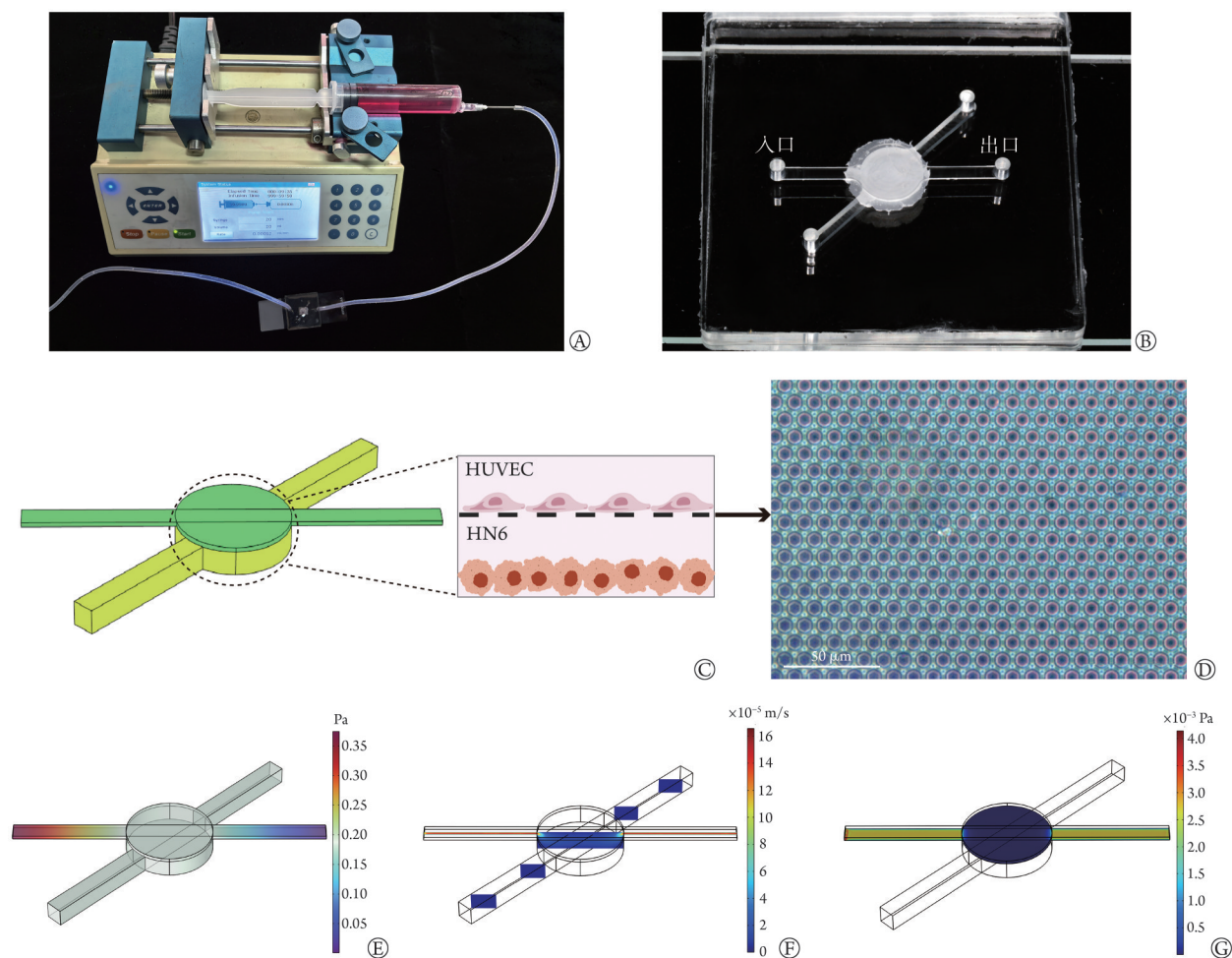


图1 口腔鳞状细胞癌-血管内皮细胞共培养微流控芯片的结构设计与流体力学分析

Fig. 1 Structural design and fluid dynamic analysis of a microfluidic chip for co-culture oral squamous cell carcinoma and vascular endothelial cells

A. 微流控系统灌流照片; B. 芯片实物照片; C. 双层微流控芯片结构及其纵切面模式图; D. 多孔膜的镜检照片; E. 芯片内的相对压力分布; F. 芯片内的培养基流速分布; G. 芯片上层通道底面的剪切应力分布

培养第4天时, VE-cadherin 免疫荧光染色显示, 共培养组荧光信号形态不连续(图2B)。跨内皮细胞电阻(TEER)值测量结果显示, 随着培养时间的延长, 各组 TEER 均逐渐升高, 于第5天后趋于稳定; 培养第7天时, 共培养组 TEER 值明显低于对照组($P<0.01$)(图2C)。血管形成实验结果显示, 共培养组形成更密集且结构复杂的小管网络(图2D); 定量分析显示, 共培养组小管连接点数($P<0.05$)与总长度($P<0.01$)明显高于对照组, 而分支数虽有所增加, 但差异无统计学意义($P>0.05$, 图2E)。

2.3 微流控芯片上与 HUVEC 共培养对 WSU-HN6 的影响 CCK-8 法检测结果显示, 与单独培养的对照组比较, 与 HUVEC 共培养的共培养组 HN6 细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$, 图3A)。qRT-PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 共培养组 HN6 细胞 VEGF mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$), bFGF mRNA 表达无明显变化($P>0.05$, 图3B); 此外, 与对

照组比较, 共培养组 HN6 细胞的上皮-间充质转化(EMT)相关标志物中, *N-cadherin* mRNA 表达水平升高($P<0.05$), *E-cadherin* mRNA 表达水平降低($P<0.05$), *Vimentin* mRNA 表达呈升高趋势, 但差异无统计学意义($P=0.0861$)(图3C)。免疫荧光染色结果显示, 共培养组 HN6 细胞 Vimentin、N-cadherin 蛋白表达水平升高($P<0.001$, $P<0.01$), 而 E-cadherin 表达水平降低($P<0.05$)(图3D)。划痕愈合实验显示, 共培养组 HN6 细胞迁移能力更强, 在 12、24、36 h 的划痕愈合率均明显高于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$, 图3E)。

2.4 贝伐珠单抗对 HN6 细胞的作用 划痕实验结果显示, 贝伐珠单抗可抑制 HN6 细胞迁移能力, 无论是否与 HUVEC 共培养都有此趋势(图4A)。两因素方差分析结果显示, 贝伐珠单抗浓度与培养方式均对划痕愈合率有明显影响(浓度: $P<0.0001$; 培养方式: $P<0.001$), 且两者存在明显交互作用($P=0.01$)。贝伐珠单抗可抵消与 HUVEC 共培养对 HN6 迁移的促进

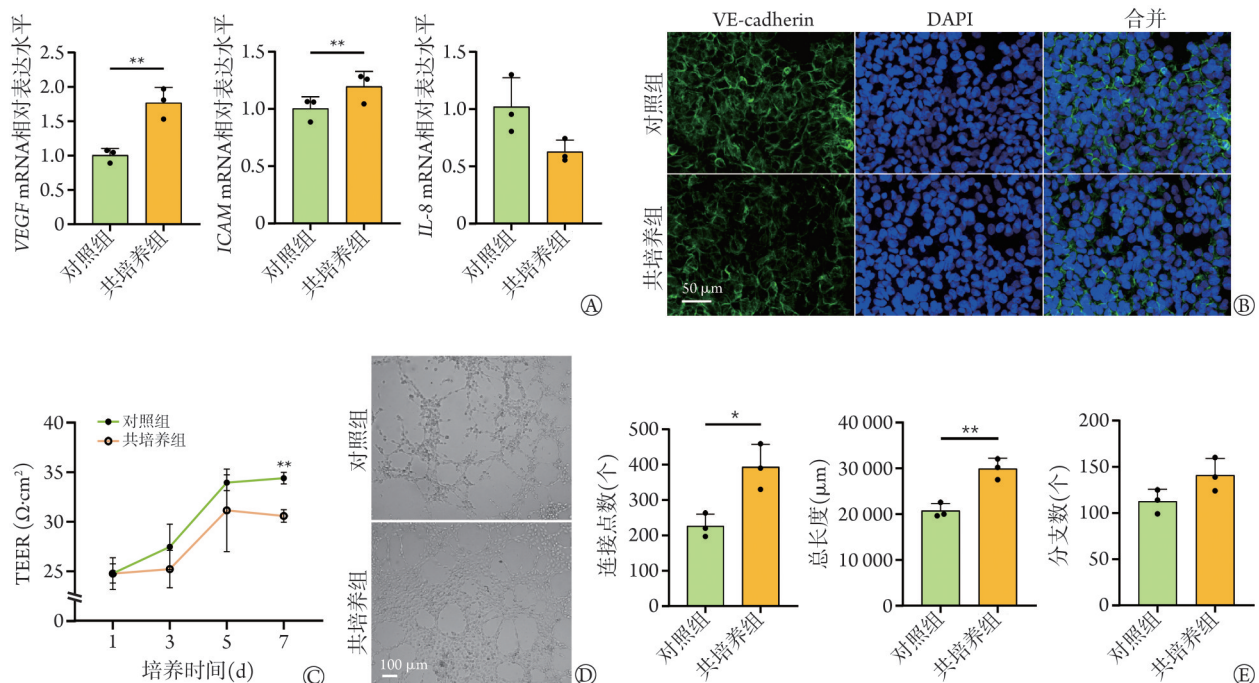


图2 基于芯片的共培养体系中HN6细胞对HUVEC促血管生成相关基因mRNA表达水平、屏障功能和成管能力的影响
Fig.2 Effect of HN6 cells on angiogenesis-related gene expression at mRNA level, barrier function and tube formation ability of HUVEC in the chip-based co-culture system

A. qRT-PCR 检测促血管生成相关基因表达情况; B. VE-cadherin 免疫荧光染色; C. 随培养时间的延长内皮细胞层跨细胞电阻的变化; D. 血管形成实验显微镜照片($\times 10$); E. 成管实验的定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。VEGF. 血管内皮生长因子; ICAM-1. 细胞间黏附分子-1; IL-8. 白细胞介素-8; TEER. 跨内皮细胞电阻

作用。Sidak 多重比较发现, 在 $0 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0.001$) 和 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0.01$) 贝伐珠单抗作用下, 共培养组划痕愈合率明显高于对照组, 当浓度升至 $2 \mu\text{g/ml}$ 时, 两组细胞划痕愈合率差异无统计学意义 ($P = 0.5529$), 继续升高药物浓度则差异更小。贝伐珠单抗对 HN6 迁移的抑制作用随浓度升高而增强。Tukey 多重比较发现, 在对照组中, $2 \mu\text{g/ml}$ 贝伐珠单抗处理后的划痕愈合率明显低于 $0 \mu\text{g/ml}$ 处理组 ($P < 0.05$), 在共培养组中, 该差异更显著 ($P < 0.0001$)。共培养组在 $2 \mu\text{g/ml}$ 与 $50 \mu\text{g/ml}$ 的贝伐珠单抗处理后, 划痕愈合率也存在显著差异 ($P < 0.01$) (图 4B)。CCK-8 检测结果显示, 与对照组比较, 不同浓度贝伐珠单抗处理对 HN6 细胞活力无明显影响 ($P > 0.05$), 各组细胞活力都接近 100% (图 4C), 且 TUNEL 染色未见阳性细胞 (图 4D)。

2.5 基于芯片平台的药物筛选 采用 CCK-8 法检测不同浓度顺铂或 5-氟尿嘧啶处理后的 HN6 细胞活力, 并计算 IC_{50} 值; 结果显示, 在各个药物浓度处理组, 单独培养的对照组 HN6 细胞和与 HUVEC 共培养的共培养组 HN6 细胞活力差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 两组 HN6 细胞对顺铂 (图 5A) 或 5-氟尿嘧啶的敏感性 (图 5B) 差异也无统计学意义 ($P > 0.05$), 对照组 HN6 细胞 IC_{50} 值分别为顺铂 $9.913 \mu\text{mol/L}$ 和 5-氟

尿嘧啶 $12.61 \mu\text{mol/L}$, 而共培养组 HN6 细胞 IC_{50} 值分别为顺铂 $10.98 \mu\text{mol/L}$ 和 5-氟尿嘧啶 $12.77 \mu\text{mol/L}$ 。

进一步评估贝伐珠单抗的联合效应, 在 IC_{50} 附近选取顺铂 ($10.5 \mu\text{mol/L}$) 及 5-氟尿嘧啶 ($12.5 \mu\text{mol/L}$) 浓度, 添加不同浓度贝伐珠单抗, 实现药物联合应用。CCK-8 法检测各组 HN6 细胞活力, 结果显示, 联合应用贝伐珠单抗对两组 HN6 细胞的顺铂 (图 6A) 和 5-氟尿嘧啶 (图 6B) 的敏感性无明显影响。TUNEL 染色结果显示, 顺铂与不同浓度贝伐珠单抗联合应用 (图 6C), 5-氟尿嘧啶与不同浓度贝伐珠单抗联合应用 (图 6D) 均显示联合应用贝伐珠单抗不能显著改变 HN6 细胞凋亡情况。

3 讨 论

尽管手术、放疗、化疗, 以及靶向治疗、免疫治疗等手段不断进步^[13], 局部晚期及复发转移性 OSCC 患者的预后依然较差, 5 年生存率分别为 69.1% 和 39.3%^[14]。血管生成作为肿瘤微环境的重要特征, 在肿瘤的生长、侵袭和远处转移过程中至关重要。对于无法手术或放疗的晚期及复发转移患者, 全身系统性药物治疗往往是延续生命的关键。然而, 虽然血管生成在 OSCC 进展中扮演重要角色, 抗血管生成治疗仍未成为其常规治疗策略的组成部分。

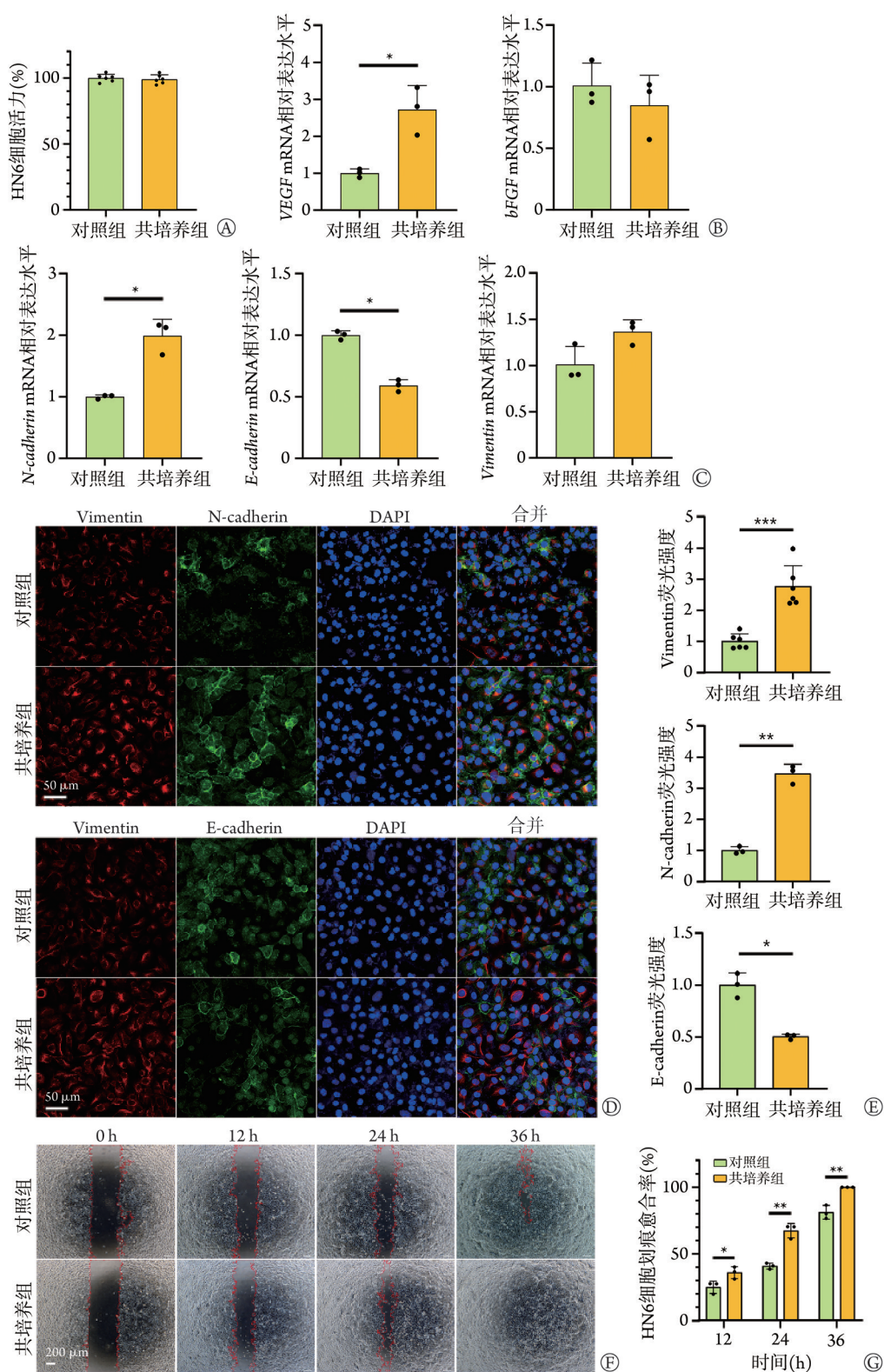


图3 基于芯片的共培养体系中HUVEC对HN6细胞活力、促血管生成相关基因mRNA表达水平、EMT相关基因mRNA和蛋白表达水平以及迁移能力的影响

Fig. 3 Effect of HUVEC on cell viability, angiogenesis-related gene expression at mRNA level, EMT-related gene expression at both mRNA and protein levels, and migratory capacity of HN6 cells in the chip-based co-culture system

A. HN6细胞活力; B. qRT-PCR检测HN6细胞促血管生成相关基因表达; C. qRT-PCR检测上皮-间质转化相关基因表达; D. 上皮-间质转化标志物免疫荧光染色; E. 免疫荧光强度分析; F. HN6细胞划痕愈合实验显微镜照片; G. 划痕愈合率统计分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。VEGF. 血管内皮生长因子; bFGF. 碱性成纤维细胞生长因子; N-cadherin. N-钙黏蛋白; E-cadherin. E-钙黏蛋白; VIM. 波形蛋白; HUVEC. 人脐静脉内皮细胞; HN6细胞. 人舌鳞癌细胞

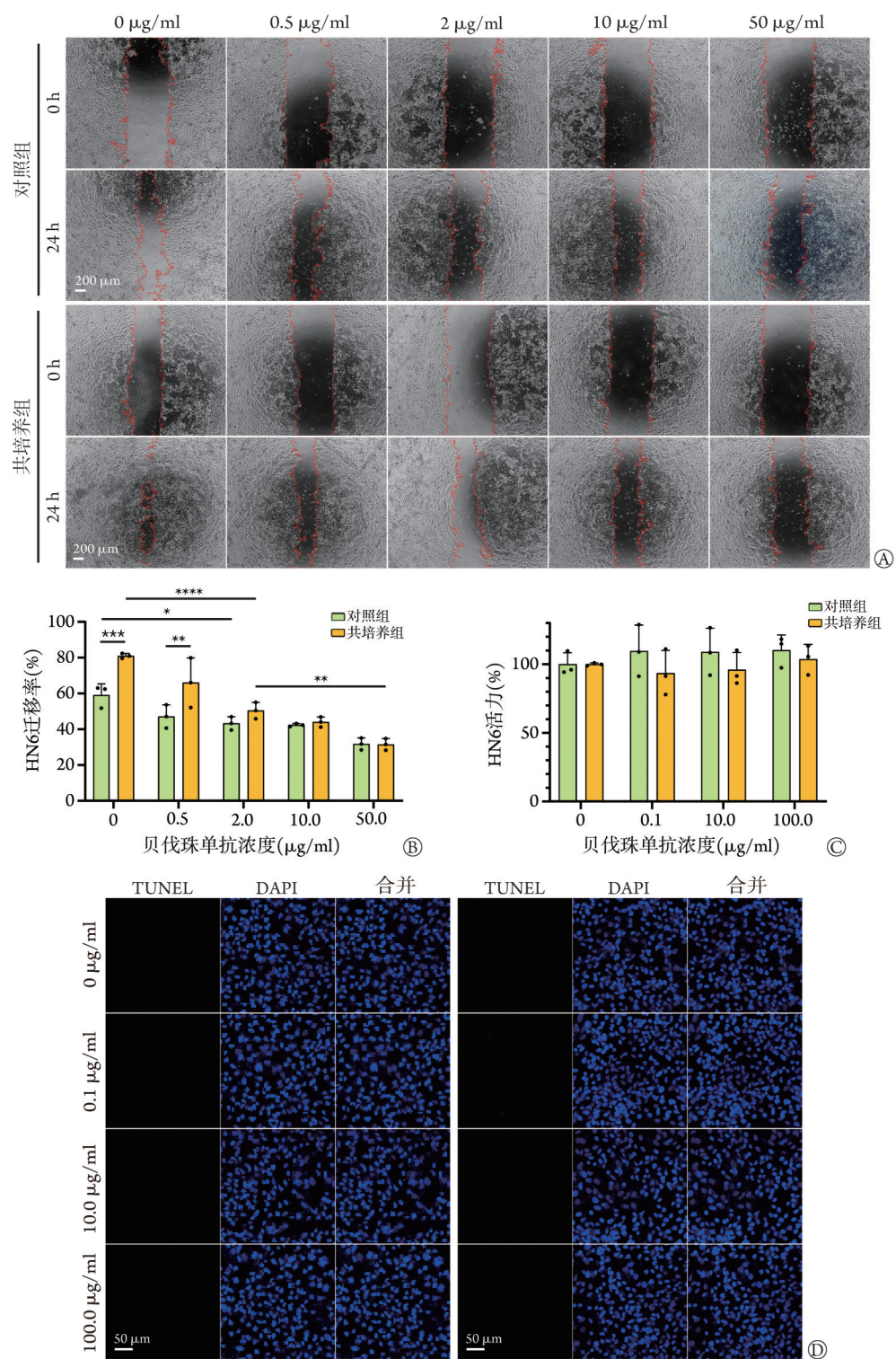


图4 不同浓度贝伐珠单抗对HN6细胞迁移能力、活力及凋亡情况的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of bevacizumab on the migration ability, viability and apoptosis of HN6 cells

A. 划痕愈合实验显微镜照片; B. HN6细胞划痕愈合面积统计分析; C. HN6细胞活力; D. HN6细胞的TUNEL染色。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

其临床转化受阻可能部分归咎于现有体外药效评价模型的局限性。既往研究多聚焦于药物对OSCC细胞的直接抑制作用，例如，贝伐珠单抗被证实可抑制OSCC细胞的VEGF分泌及迁移能力^[15-16]，或在异种移植模型中存在贝伐珠单抗与化疗药的协同抗肿

瘤效应，却在细胞系中未观察到此现象^[7]。研究发现，肿瘤相关成纤维细胞^[17]或OSCC细胞^[18]分泌的囊泡结合型VEGF可被内皮细胞摄取并激活血管生成信号，且这种作用无法被贝伐珠单抗中和，提示传统单层细胞培养模型可能忽略了细胞间相互作用

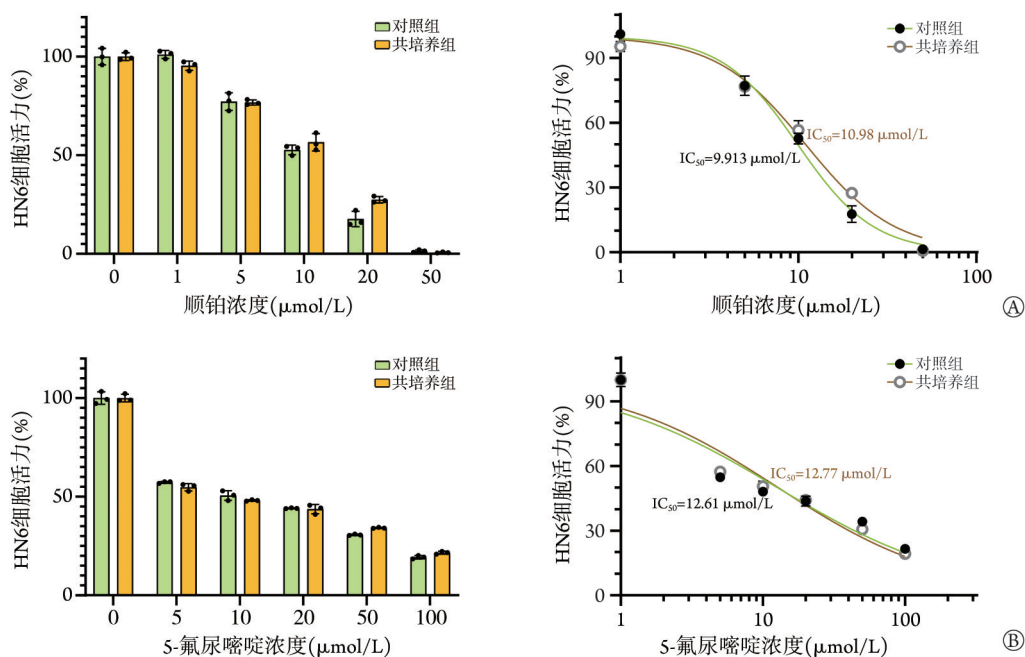


图5 与HUVEC共培养对HN6细胞化疗药物敏感性的影响

Fig.5 Impact of co-culture with HUVECs on the chemotherapeutic drug sensitivity of HN6 cells

A. 不同浓度顺铂处理后的HN6细胞活力及剂量-反应曲线; B. 不同浓度5-氟尿嘧啶处理后的HN6细胞活力及剂量-反应曲线

对药效的影响, 缺乏内皮细胞参与及动态微环境的传统筛选模型, 难以准确反映药物在体内的真实效能。因此, 构建能够复现OSCC细胞与内皮细胞相互作用的体外模型, 对于抗血管生成药物的筛选和机制研究具有重要意义。

近年来, 双层微流控芯片被广泛应用于两种细胞的共培养及复合系统的药效评价^[19-20]; 但在OSCC领域尚缺乏成熟的共培养芯片用于研究肿瘤-内皮相互作用及抗血管生成药物筛选。芯片构建的重点与难点在于实现OSCC细胞与血管内皮细胞的空间隔离与功能性共培养, 模拟血管-肿瘤界面的物质交换, 并保证细胞活性和功能的稳定。本研究构建的微流控芯片的双层结构可模拟血管-口腔鳞癌交互界面, 并模拟血管中药物向肿瘤组织的输运, 且其生理相关剪切应力在既往文献报道^[21]范围内。与传统的单层培养或Transwell共培养体系相比, 该平台具有以下优势: (1)实现流体剪切力作用下的内皮细胞培养, 更接近生理状态; (2)利用微通道结构模拟药物经血管运输至肿瘤组织的过程; (3)可以观测药物在肿瘤-血管复合系统中的综合效应。基于该平台, 本研究对HN6细胞与HUVEC细胞的相互作用及贝伐珠单抗在共培养体系中的效应进行了初步探索。

PDMS和Paralene C是生物相容性良好的材料^[22], HUVEC和HN6在芯片上培养24h后, 可观察到细胞黏附、伸展、增殖, 状态良好。本研究发现, 与

HN6细胞共培养后, HUVEC的成管能力增强, 其促血管生成相关基因中VEGF和ICAM-1 mRNA表达明显上调。VEGF是调控血管生成的关键因子, ICAM-1可调控内皮细胞迁移和黏附, 而IL-8是肿瘤和慢性炎症环境中重要的促血管生成因子, 与VEGF通路存在交互作用, 而本研究发现IL-8 mRNA的表达量无明显变化, 提示HN6可能主要通过调控VEGF通路而非依赖IL-8来促进内皮细胞的成管行为。本研究VE-cadherin免疫荧光染色显示, 在共培养组HUVEC中VE-cadherin形态不完整, 共培养组TEER值较对照组降低, 提示共培养可破坏HUVEC单层的屏障完整性, 且与肿瘤相关血管结构破碎、高通透性的特点相符合^[23]; 其潜在的机制可能包括: 肿瘤细胞释放蛋白水解酶, 如MMP等, 促进VE-cadherin裂解, 或通过分泌组胺等炎症因子, 增加血管通透性^[24]。

既往研究通过分析OSCC肿瘤标本发现, 组织中的微血管密度及VEGF表达量与临床病理特征密切相关, VEGF阳性病例微血管密度较高, 且伴有更高的淋巴结转移率和更晚的临床分期^[25]。在机制层面上, VEGF等促血管生成因子在OSCC中过表达, 激活磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)与丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)等信号通路, 诱导EMT并促进血管生成, 从而驱动OSCC的转移^[26]。在芯片上与HUVEC共培养的HN6细胞中VEGF、N-cadherin mRNA表达水平升高,

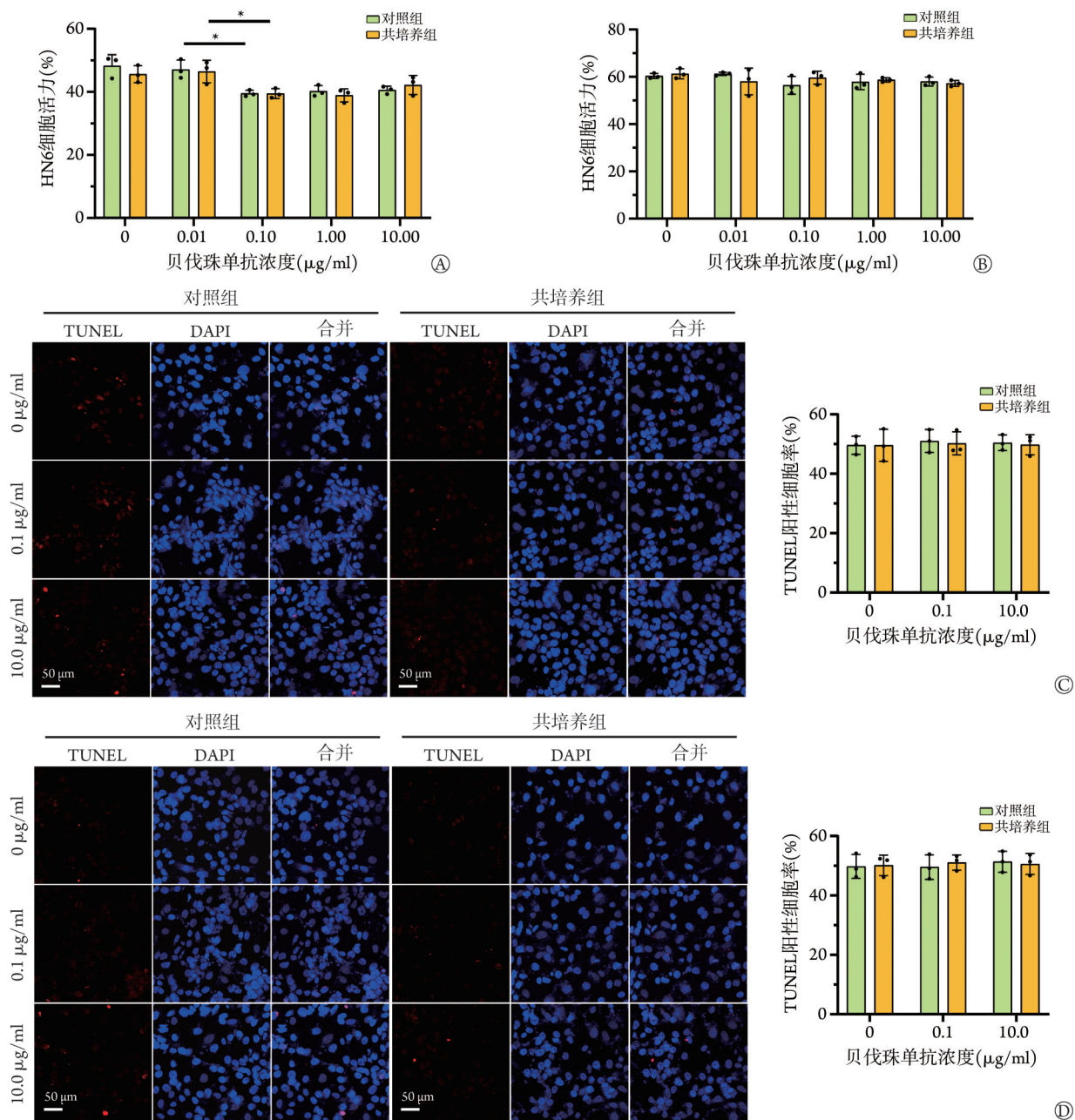


图6 贝伐珠单抗与化疗药物联合应用对HN6细胞活力及凋亡情况的影响

Fig.6 Effect of combined application of bevacizumab and chemotherapeutic drugs on HN6 cell viability and apoptosis.

A. 顺铂与不同浓度贝伐珠单抗联合应用时HN6细胞活力; B. 5-氟尿嘧啶与不同浓度贝伐珠单抗联合应用时HN6细胞活力; C. 顺铂与不同浓度贝伐珠单抗联合应用时HN6细胞凋亡情况; D. 5-氟尿嘧啶与不同浓度贝伐珠单抗联合应用时HN6细胞凋亡情况。* $P<0.05$

E-cadherin mRNA表达水平降低;免疫荧光染色也证实, *N-cadherin*、波形蛋白表达水平升高, *E-cadherin*表达水平降低,提示共培养可能促进HN6细胞向EMT表型的转变,这一分子层面的变化与共培养组HN6细胞划痕愈合加快的功能表型相符。

贝伐珠单抗作为靶向VEGF的抗血管生成药物,已成为多种实体瘤靶向治疗的重要组成部分^[27]。传统观点认为,贝伐珠单抗的抗肿瘤机制主要通过以下两条途径:(1)抑制新生血管形成使肿瘤缺乏营养和氧气,从而抑制肿瘤生长;(2)在特定时间窗内校

准异常的肿瘤血管,修剪其迂曲、渗漏的结构,降低血管壁通透性,间接抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,并改善联合用药向瘤内的输送效率^[28]。本研究结果与之相符,共培养可诱导HN6和HUVCEC细胞中多种促血管生成因子,尤其是VEGF的表达上调;而贝伐珠单抗靶向结合VEGF,可抑制HN6细胞的迁移,且抑制能力呈浓度依赖性,当贝伐珠单抗浓度 $<2\mu\text{g/ml}$ 时,抑制能力随浓度升高而增强,而在 $\geq 2\mu\text{g/ml}$ 时,则可抵消共培养对HN6细胞划痕愈合的促进作用。

既往多项Ⅱ期及Ⅲ期临床试验试图探索靶向VEGF或其受体的药物是否能为HNSCC患者带来临床获益^[29-30]。一项Ⅲ期临床试验发现,在化疗中加入贝伐珠单抗可改善复发或转移性HNSCC患者的客观缓解率和无进展生存期,但不能延长总生存期,可能需要基于分子肿瘤特征的个体化抗血管生成治疗^[31]。本研究中贝伐珠单抗对HN6细胞无直接杀伤能力,未能促进其凋亡,也未改善其他联合应用的化疗药物敏感性,这可能与当前芯片模型结构相对简单、尚未构建具有管腔样结构的血管网有关。

HUVEC易于获取且在微流控系统中应用广泛,为本研究提供了稳定可靠的内皮细胞来源。然而,作为大静脉来源的永生化细胞系,HUVEC与口腔鳞状细胞癌肿瘤微环境中实际参与血管生成的微血管内皮细胞在组织起源与功能特性上存在固有差异。为构建更具生理相关性的模型,可考虑其他内皮细胞来源:人脑微血管内皮细胞系是来源于微血管的永生化细胞系,在来源上优于HUVEC,但其高屏障特性更适用于血脑屏障,而非肿瘤微环境的模拟^[32];从手术标本中分离的原代口腔鳞状细胞癌相关内皮细胞在来源及功能方面均具有优势,但获取较困难,体外扩增能力有限;人诱导多能干细胞来源的内皮细胞或血管类器官具备无限扩增与成管能力强的潜力,但面临分化流程复杂、功能需长期验证等挑战^[33]。此外,构建更完善的血管模型还需引入周细胞、成纤维细胞等细胞进行共组装,以及添加纤维蛋白水凝胶、透明质酸、Matrigel等作为细胞外基质成分,为微流控系统提供更具真实的黏附及生长微环境^[34]。

综上所述,本研究设计的双层微流控芯片可模拟HN6和HUVEC的相互作用,并用于抗血管生成药物的体外筛选,结果发现贝伐珠单抗对HN6细胞无直接杀伤作用,不能促进其凋亡,也未改善联合应用的化疗药物敏感性,与现有的临床研究结果一致。未来的研究可进一步引入水凝胶支架等材料,使用患者来源的原代肿瘤细胞、内皮细胞或类器官代替细胞系,建立更复杂、真实的血管结构,以更准确地模拟肿瘤血管的相互作用,从而为患者提供个性化的抗血管生成药物筛选平台。

【参考文献】

- [1] Wei X, Chen Y, Jiang X, *et al.* Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 7.
- [2] 刘志远,潘文杰,王珍,等.肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素-1 β 预处理人脐带间充质干细胞对大鼠缺血创面愈合的影响[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2025, 41(9): 867-876.
- [3] Wu C, Liu X, Gu L, *et al.* The tumor-to-endothelial transfer of FTO promotes vascular remodeling and metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025: e09524.
- [4] Ji S, Wu W, Jiang Q. Crosstalk between endothelial cells and tumor cells: a new era in prostate cancer progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(23): 16893.
- [5] Micaily I, Johnson J, Argiris A. An update on angiogenesis targeting in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancers Head Neck*, 2020, 5: 5.
- [6] Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, *et al.* Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(6): 856-866.
- [7] Itashiki Y, Harada K, Takenawa T, *et al.* Antitumor effects of bevacizumab in combination with fluoropyrimidine drugs on human oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(4): 730.
- [8] 胡媛媛,牛玉明. lncRNAs与口腔鳞状细胞癌及癌前病变因果关联的孟德尔随机化研究[J]. *医学新知*, 2025, 35(10): 1188-1194.
- [9] Hujanen R, Salo T, Eklund KK, *et al.* Ex vivo evaluation of antiangiogenic drugs in oral cancer: potential implications for targeting vasculogenic mimicry[J]. *Anticancer Res*, 2024, 44(6): 2377-2392.
- [10] Koyilot MC, Natarajan P, Hunt CR, *et al.* Breakthroughs and applications of organ-on-a-chip technology[J]. *Cells*, 2022, 11(11): 1828.
- [11] 魏莱,胡大海. 皮肤类器官在皮肤创面愈合中的应用研究进展[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2025, 41(11): 1090.
- [12] Shirure VS, Bi Y, Curtis MB, *et al.* Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(23): 3687-3702.
- [13] Cramer JD, Burtneis B, Le QT, *et al.* The changing therapeutic landscape of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(11): 669-683.
- [14] Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, *et al.* Epidemiology, risk factors, and prevention of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Med Sci (Basel)*, 2023, 11(2): 42.
- [15] Heydar H, Mansouri K, Norooznezhad M, *et al.* Bevacizumab inhibits angiogenic cytokines in head and neck squamous cell carcinoma: from gene to the protein[J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2018, 12(2): 136-141.
- [16] Ganjibakhsh M, Monshizadeh R, Nasimian A, *et al.* Anti-angiogenic efficacy of aflibercept and bevacizumab in primary oral squamous cell carcinoma cells[J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(6): 575-582.
- [17] Li J, Liu X, Zang S, *et al.* Small extracellular vesicle-bound vascular endothelial growth factor secreted by carcinoma-associated fibroblasts promotes angiogenesis in a bevacizumab-resistant manner[J]. *Cancer Lett*, 2020, 492: 71-83.
- [18] Zhou J, Liu X, Dong Q, *et al.* Extracellular vesicle-bound VEGF in oral squamous cell carcinoma and its role in resistance to Bevacizumab Therapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 296.
- [19] Testa M, Gaggiani M, D'Accardo C, *et al.* A novel tumor on chip mimicking the breast cancer microenvironment for dynamic drug screening[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1028.
- [20] Du S, Wang Z, Zhu H, *et al.* Flavonoids attenuate inflammation of HGF and HBMSC while modulating the osteogenic differentiation based on microfluidic chip[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 992.
- [21] Rutkowski JM, Swartz MA. A driving force for change: interstitial

- flow as a morphoregulator[J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(1): 44-50.
- [22] Gholizadeh S, Lincoln DM, Allahyari Z, *et al.* Optimization of Parylene C and Parylene N thin films for use in cellular co-culture and tissue barrier models[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 4262.
- [23] Kabir AU, Subramanian M, Kwon Y, *et al.* Linking tumour angiogenesis and tumour immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2026, 26: 35-51.
- [24] Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(1): 2-8.
- [25] Niklander S, Bordagaray MJ, Fernández A, *et al.* Vascular endothelial growth factor: a translational view in oral non-communicable diseases[J]. Biomolecules, 2021, 11(1): 85.
- [26] Pomella S, Melaiu O, Dri M, *et al.* Effects of angiogenic factors on the epithelial-to-mesenchymal transition and their impact on the onset and progression of oral squamous cell carcinoma: an overview [J]. Cells, 2024, 13(15): 1294.
- [27] Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, *et al.* Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: a review of 15 years of clinical experience and future outlook[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86: 102017.
- [28] Wang Z, Li J, Guo J, *et al.* Direct antitumor activity of bevacizumab: an overlooked mechanism? [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1394878.
- [29] Argiris A, Kotsakis AP, Hoang T, *et al.* Cetuximab and bevacizumab: preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Ann Oncol, 2013, 24(1): 220-225.
- [30] Cohen EEW, Davis DW, Karrison TG, *et al.* Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(3): 247-257.
- [31] Argiris A, Li S, Savvides P, *et al.* Phase III randomized trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(34): 3266-3274.
- [32] Qi D, Lin H, Hu B, *et al.* A review on *in vitro* model of the blood-brain barrier (BBB) based on hCMEC/D3 cells[J]. J Control Release, 2023, 358: 78-97.
- [33] Quintard C, Tubbs E, Jonsson G, *et al.* A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 1452.
- [34] Wang Z, Mithieux SM, Weiss AS. Fabrication techniques for vascular and vascularized tissue engineering[J]. Adv Healthc Mater, 2019, 8(19): e1900742.

(责任编辑: 张小利)

解放军医学杂志®