華東理工大學学报 自然科学版 Natural Science Edition
JOURNAL OF EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

壳聚糖修饰海藻酸钙微球构建肿瘤–内皮细胞共培养模型

王柳欢 岑莲 张洪波 单美慧

Chitosan-Modified Calcium Alginate Microspheres for Constructing Tumor-Endothelial Cell Co-culture Models

WANG Liuhuan, CEN Lian, ZHANG Hongbo, SHAN Meihui

在线阅读 View online: http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20260312002

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

电喷雾法构筑MOFs/壳聚糖荷正电纳滤膜

Preparation of MOFs/Chitosan Positively Charged Nanofiltration Membrane by Electrospray Method

华东理工大学学报（自然科学版）. 2022, 48(5): 616–623 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20210609002

聚丙烯酰胺/壳聚糖/二氧化硅水凝胶亲水疏油筛网的制备与性能

Preparation and Performance of Hydrophilic and Oleophobic Mesh Modifed with Polyacrylamide/Chitosan/SiO_2 Hydrogel

华东理工大学学报（自然科学版）. 2023, 49(5): 631–638 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20220704002

壳聚糖仿生黏合剂的一步原位制备及性能研究

One–Step *in situ* Preparation and Properties of Chitosan–Based Bioadhesive

华东理工大学学报（自然科学版）. 2022, 48(3): 324–331 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20210307001

多肽修饰牛血清白蛋白递送体系构建及其肝癌细胞靶向诊疗研究

Construction of Peptide–Modified Bovine Serum Albumin Delivery System for the Targeted Diagnosis and Treatment of Liver Cancer Cells

华东理工大学学报（自然科学版）. 2026, 52(2): 176–184 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20250512001

喹啉腈荧光微球构建及在荧光免疫层析中对SAA的检测应用

Construction of Quinoline–Malononitrile Fluorescent Microspheres for the Detection of SAA via Fluorescent Immunochromatography

华东理工大学学报（自然科学版）. 2022, 48(4): 419–426 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20220414001

高钙镁气田水中碳酸钙结垢行为研究与趋势预测

Scaling Behavior and Scaling Potential Prediction of Calcium Carbonate in Gas Field Water with High Calcium and Magnesium Contents

华东理工大学学报（自然科学版）. 2021, 47(4): 401–407 http://doi.org/10.14135/j.cnki.1006–3080.20200325001

扫码关注公众号，获取更多信息！

文章编号：1006-3080(2026)05-0638-09 DOI：10.14135/j.cnki.1006-3080.20260312002

壳聚糖修饰海藻酸钙微球构建肿瘤-内皮细胞共培养模型

王柳欢[1]， 岑 莲[1]， 张洪波[2]， 单美慧[3]

（1. 华东理工大学化工学院, 上海 200237； 2. 华东理工大学机械与动力工程学院, 上海 200237；
3. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830011）

摘要：为构建具有空间分区结构的肿瘤-内皮细胞共培养模型，本研究采用壳聚糖静电吸附涂层策略对海藻酸钙微球进行表面修饰，以乳腺肿瘤细胞MCF-7包载于微球内部，人脐静脉内皮细胞(HUVEC)定植于微球表层，模拟实体瘤中肿瘤细胞团与血管内皮的空间关系。通过考察不同质量浓度(1、3、5、7 g/L)壳聚糖对微球粒径、表面电荷、尺寸稳定性及HUVEC黏附的影响，筛选出最优涂层条件，并在此基础上评估共培养模型中肿瘤细胞的增殖行为。结果表明，质量浓度为5 g/L的壳聚糖修饰的微球其粒径稳定性最优，表面Zeta电位达(9.00±0.57)mV，HUVEC黏附密度最高且铺展良好，同时对MCF-7内部无明显细胞毒性。基于该优化涂层构建的共培养模型中，HUVEC在微球表面形成连续细胞层，将分散微球连接成组织样聚集体，且共培养组的MCF-7细胞活性较单独培养组有所提升(第7天达115%)。该模型在肿瘤-内皮细胞互作机制研究、药物评价及个性化医疗等方面具有潜在应用价值，为模拟肿瘤微环境提供了新的体外平台。

关键词：壳聚糖；海藻酸钙微球；肿瘤-内皮细胞共培养；空间分区模型；表面修饰

中图分类号：Q813.1 **文献标志码：**A

肿瘤微环境是由肿瘤细胞、内皮细胞、免疫细胞、成纤维细胞以及细胞外基质共同构成的复杂动态系统，其中内皮细胞不仅构成肿瘤血管的结构基础，还通过旁分泌信号及自身代谢状态调控肿瘤的增殖、干性与耐药性[1-2]。因此，在体外模型中引入内皮细胞，对于模拟肿瘤微环境、研究肿瘤-内皮细胞互作机制具有重要意义。

近年来，随着组织工程和微加工技术的发展，多种肿瘤-内皮共培养模型被相继开发。最简单的策略是将肿瘤细胞与内皮细胞进行二维共培养，虽操作简便，却难以模拟实体瘤中肿瘤细胞与内皮细胞的三维空间关系[3]。为弥补这一不足，研究者发展了三维共培养方法。例如，将肿瘤细胞与内皮细胞按一定比例混合后接种于低吸附板中，使其自组织形成球体；或将两种细胞共同包埋于水凝胶材料中。这些方法能在一定程度上模拟细胞间的三维接触，但肿瘤细胞和内皮细胞在空间中随机分布，缺乏对二者空间定位的精确控制[4-5]。

内皮细胞与肿瘤细胞的空间位置关系对肿瘤生长和血管相关行为具有重要影响。在实体瘤中，肿瘤细胞通常形成团块或核心结构，而内皮细胞则分布于其外围并构成血管界面，二者之间通过直接接触和旁分泌作用持续发生双向调控[2,6]。因此，在体外模型中以特定位置引入内皮细胞，不仅有助于模拟肿瘤血管微环境，也有利于解析肿瘤-内皮细胞互作对肿瘤进展的影响。

为实现更精确的空间分区，研究者探索了多种策略。一类是利用微流控芯片构建分区共培养体

收稿日期：2026-03-12

基金项目：新疆医科大学附属肿瘤医院重点实验室开放项目(XJKLO-2025S006)；新疆维吾尔自治区科技厅科技援疆计划项目(2026E02074)

作者简介：王柳欢(2001—)，女，苗族，硕士生，主要研究方向为生物医用材料。E-mail: Y82230004@mail.ecust.edu.cn

通信联系人：单美慧，E-mail: 65048296@qq.com

引用本文：王柳欢，岑 莲，张洪波，等. 壳聚糖修饰海藻酸钙微球构建肿瘤-内皮细胞共培养模型 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版)，2026，52(5)：638-646.

Citation: WANG Liuhuan, CEN Lian, ZHANG Hongbo, *et al*. Chitosan-Modified Calcium Alginate Microspheres for Constructing Tumor-Endothelial Cell Co-culture Models[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(5): 638-646.

系, 通过微柱阵列或水凝胶界面将肿瘤细胞区域与内皮细胞区域分隔开, 实现两类细胞的空间定位[7]。这类模型具有较高的空间精度, 但芯片制作工艺复杂, 对设备和技术要求较高。另一类是采用核-壳结构微球, 将肿瘤细胞封装于核心、内皮细胞种植于壳层, 形成内外分区的共培养单元[8]。该方法在空间控制上具有优势, 但核-壳结构的制备通常需要特殊设计的微流控芯片或多步操作, 构建门槛较高。此外, 生物 3D 打印技术也被用于构建血管化肿瘤模型, 通过逐层沉积含不同细胞的生物墨水实现多细胞空间排布[9]。该方法可以创建高度复杂的结构, 但设备昂贵, 且打印过程中的机械剪切力可能影响细胞活性。

在上述背景下, 基于海藻酸钙微球的包载体系因其优异的生物相容性和温和的交联条件而受到关注[10]。微流控技术的引入进一步实现了尺寸均一、可重复性高的海藻酸钙微球的制备。然而, 未修饰海藻酸钙微球表面亲水性强且带负电, 不利于内皮细胞的黏附和生长, 限制了其在构建肿瘤-内皮细胞共培养模型中的应用[10]。

通过表面修饰改善材料界面性能是调控细胞行为的有效手段[11-12]。壳聚糖作为一种天然聚阳离子多糖, 可通过静电吸附在海藻酸钙微球表面形成涂层, 改变其表面电荷、亲/疏水性及界面蛋白吸附行为。由于内皮细胞膜表面通常带负电, 壳聚糖赋予的正电性有助于增强其初始黏附; 同时, 壳聚糖表面更有利于纤连蛋白等的吸附, 并可通过整合素介导促进内皮细胞铺展、细胞骨架重组及细胞间连接形成, 适合作为促进内皮细胞表面定植的修饰材料[13-14]。因此, 这种涂层策略为构建具有分区结构的共培养模型提供了可能, 即将肿瘤细胞包封于微球内部模拟实体瘤核心, 内皮细胞黏附于涂层表面模拟血管内皮层, 这种设计更贴近实体瘤中肿瘤细胞团与周围血管内皮的空间关系[1,9]。

基于此, 本研究采用微流控技术制备包载乳腺肿瘤细胞 MCF-7 的海藻酸钙微球, 通过壳聚糖静电吸附涂层实现人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在微球表面的稳定黏附, 构建具有分区结构的肿瘤-内皮细胞共培养模型, 并初步评估其在模拟肿瘤微环境方面的可行性。该模型有望为肿瘤生物学研究、抗肿瘤药物筛选及个性化治疗方案的体外评估提供新的平台。

1　实验部分

1.1　原料和试剂

海藻酸钠(SA): M_n=10^5, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 油酸: 试剂级, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 乙二胺四乙酸二钙(Ca-EDTA): 纯度>98%(质量分数), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 司盘 80(Span 80): 非离子表面活性剂, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 吐温 80(Tween 80): 生物技术级, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 无水氯化钙: 纯度 96%(质量分数), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 乙酸: 色谱纯, 纯度≥99.99%(质量分数), 上海灵峰化工有限公司; 壳聚糖季铵盐: 取代度 90%, 上海源叶生物科技有限公司; 含钙 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲溶液, 20 mmol/L, 北京兰杰柯科技有限公司。

1.2　测试与表征

倒置显微镜(日本尼康, Ti-DH 型): 将清洗后的海藻酸钙微球悬浮在去离子水中, 并静置 5 min, 待微球沉降后, 使用 10×和 20×镜头拍摄并记录样品的图像。

Zeta 电位分析仪(英国 Malvern Panalytical Ltd, Nano-ZSE 型): 分散相设置为水相, 平衡温度 25 ℃, 平衡时间 120 s, 单次测试 11 个循环, 每个循环 10 s, 测试 3 次取平均值。

酶标仪(美国伯腾仪器有限公司, Bio Tek SYNERGY H1 型): 检测模式为吸光度, 检测波长 450 nm。检测前低速振荡 10~30 s, 检测温度为室温 25 ℃。

离心机(中国湘仪离心机仪器有限公司, L600A 型): 1200 r/min, 3 min(用于细胞消化后的收集); 600 r/min, 3 min(用于微球清洗后的收集)。

1.3　海藻酸钙微球的制备

采用同轴结构微流控技术制备海藻酸钙微球。分散相为含 10 g/L SA 和 50 mmol/L Ca-EDTA 的水溶液, 体积流量为 0.1 mL/h; 连续相为含体积分数 2% Span 80 的油酸溶液, 体积流量为 6 mL/h; 预凝胶相为含体积分数 2% Span 80 和体积分数 2% 乙酸的油酸溶液, 体积流量为 12 mL/h。生成的液滴收集于含 10 g/L 氯化钙和体积分数 2% Tween 80 的水溶液中, 在搅拌(300 r/min, 2 h)条件下进行完全交联。随后通过离心收集微球, 并用去离子水洗涤 3 次以去除残留油脂。

1.4　包载肿瘤细胞的海藻酸钙微球

分散相溶液用 0.22 μm 滤菌筛进行滤菌处理, 连续相与预凝胶相使用巴氏灭菌法进行高温灭菌, 配制含 10 g/L 氯化钙和体积分数 2% Tween 80 的接收相溶液, 溶剂为无菌水与 MCF-7 专用培养基按体积比 4∶1 配制的混合液。

MCF-7细胞用专用培养基(含体积分数10%胎牛血清、体积分数1%双抗、10 μg/mL胰岛素的最低必需培养基(MEM))培养,用2.5 g/L胰酶消化计数后与分散相溶液混合,调整细胞密度为7×10^6个/mL。将三相溶液连接至微流控装置,每30 min向含细胞的分散相注入新鲜无菌空气,最终形成包载细胞的海藻酸钙微球。

1.5 壳聚糖修饰海藻酸钙微球

将壳聚糖溶于体积分数1%的乙酸溶液,分别配制质量浓度为1、3、5、7 g/L的壳聚糖溶液,调节pH至5.5。将海藻酸钙微球与上述4种壳聚糖溶液均匀混合,室温下振荡反应10 min。壳聚糖涂覆后,用含钙HEPES缓冲液清洗并通过离心收集。

使用倒置显微镜进行观察并拍照。从光学图像中随机选取100个微球,利用显微镜平台分析微球的平均粒径及粒径分布。根据统计数据,通过下列公式计算微球的变异系数(CV):

$$\mathrm{CV}=\frac{\sigma}{D_\mathrm{P}}$$

其中,σ为粒径标准差(μm),D_P为平均粒径(μm)。将微球分散于去离子水中,使用Zeta电位分析仪测定表面Zeta电位,每组重复3次。

将微球置于培养基中,于细胞培养箱中孵育,分别于第0、1、2、3、4、5、6、7天取样测量粒径。微球的尺寸稳定性采用尺寸比(R_d)进行表征:

$$R_\mathrm{d}=\frac{D_t}{D_0}\times100\%$$

其中,D_t为孵育第t天后的微球平均粒径(μm),D_0为初始微球平均粒径(μm)。

1.6 壳聚糖修饰海藻酸钙微球的细胞相容性评价

1.6.1 *内部包载MCF-7的细胞活性检测* 制备包载MCF-7细胞的海藻酸钙微球。按照1.4节方法,首先,使用0.22 μm滤菌筛和巴氏灭菌法对相关试剂进行灭菌处理,并配制新鲜的接收相溶液。将MCF-7细胞重悬于分散相溶液中,调整细胞密度为7×10^6个/mL,利用微流控装置生成包载细胞的微球,经离心、洗涤后分为两组:无涂层组(直接培养)和涂层组(按照1.5节方法进行壳聚糖修饰,生成壳聚糖修饰海藻酸钙微球)。另设两组空白微球对照:无细胞无涂层微球,用于无涂层组的基底校正;无细胞涂层微球,用于涂层组的基底校正。

将修饰当天设置为第0天,在修饰后第1、4、7天加入含体积分数10% CCK-8试剂的培养基,37 ℃孵育4 h后使用酶标仪检测吸光度(OD值),每个样本设置3个复孔。数据处理时,各组OD值减去对应空白微球OD值作为校正值,以无涂层组校正值为100%计算相对细胞活力。

1.6.2 *对HUVEC表面黏附行为的影响* 将杜氏改良Eagle培养基(DMEM)与MCF-7专用培养基按体积比1∶1配制成混合培养基,壳聚糖修饰的海藻酸钙微球先置于细胞培养箱中2 h,后转移至低黏附96孔板,每孔装载50 μL微球悬液,含20~30个微球。

HUVEC用DMEM培养基(含体积分数10%胎牛血清、体积分数1%双抗)培养于细胞培养箱,用2.5 g/L胰酶消化后重悬于混合培养基中,每孔加入100 μL细胞悬液,含1×10^4个细胞,静置培养。

1.7 肿瘤-内皮细胞共培养模型的建立与评价

将包载MCF-7细胞的最优壳聚糖修饰海藻酸钙微球接种于低黏附96孔板中,分为两组:单独培养组(仅含包载MCF-7细胞的微球)和共培养组(按1.6节方法加入HUVEC悬液)。另设两组对应的空白微球对照:无细胞涂层微球,用于单独培养组的基底校正;共培养空白微球(微球表面定植HUVEC但不含内部MCF-7),与共培养组同批次、同条件培养,用于共培养组的基底校正。

将共培养当天设置为第0天,在共培养后第1、4、7天进行MCF-7细胞活性检测。对于共培养组及其空白微球对照,检测前均以2.5 g/L胰酶(不含EDTA)消化,显微镜下确认HUVEC脱附后立即加入培养基终止。收集各组微球后按1.6节方法进行细胞活性检测。

1.8 统计学分析

数据以均值±标准差表示。采用t检验评估组间统计学差异,$p<0.05$视为具有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖修饰对微球理化性能的影响

2.1.1 *微球形态与粒径分布* 不同质量浓度壳聚糖涂层微球的明场图像及粒径分布如图1所示,其中D和CV分别表示样本微球的平均粒径和变异系数。未修饰微球的形貌见图1(a1),经壳聚糖修饰后的微球明场图像如图1(b1)~(e1)所示。随着壳聚糖质量浓度增加,微球边界逐渐清晰。这一现象表明壳聚糖分子成功吸附于微球表面,形成具有一定厚度的涂层,改变了微球的光学折射特性。

粒径分析结果(图1(a2)~(e2))显示,微球平均粒径随壳聚糖涂层的出现和壳聚糖质量浓度增加而减小,当壳聚糖质量浓度分别为0、1、3、5、7 g/L时,微球平均粒径分别为(223.45±1.92)、(217.03±3.90)、

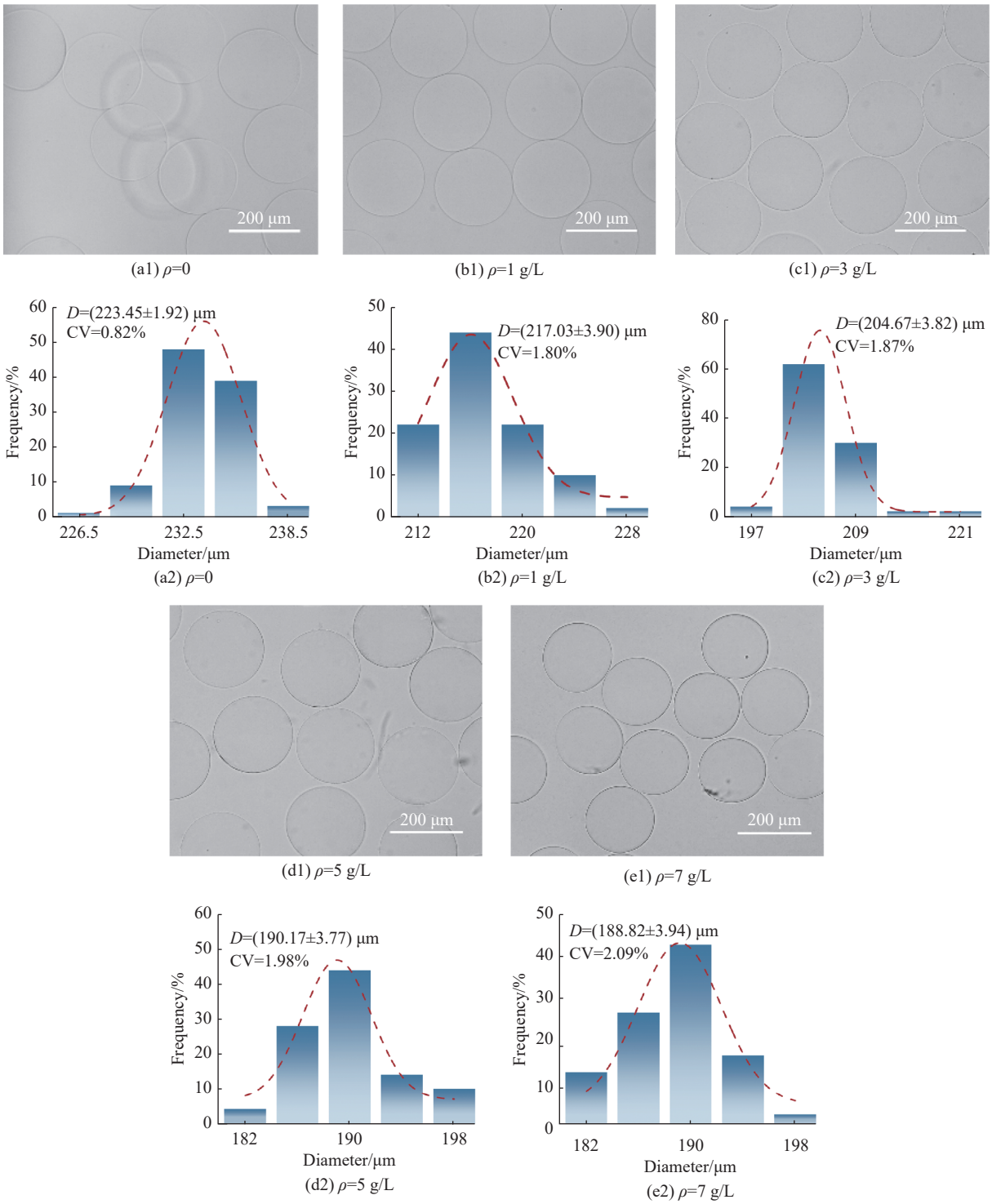


图 1　不同质量浓度壳聚糖涂层微球的明场图像(a1~e1)及粒径分布(a2~e2)

Fig. 1　Bright-field images(a1~e1) and particle size distributions(a2~e2) of microspheres coated with different mass concentrations of chitosan

(204.67±3.82)、(190.17±3.77)、(188.82±3.94)μm。这一现象可从聚电解质复合的机理进行分析, 海藻酸钙微球表面的羧基与壳聚糖分子的氨基之间形成聚电解质复合物, 这种复合过程伴随着水分子的排出和网络的紧缩[15]。随着壳聚糖浓度增加, 更多的交联点形成, 网络收缩更彻底, 导致微球直径减小[16]。Chen 等[17]也报道了类似的结果, 认为更强的静电相互作用是导致粒径减小的主要原因之一。另外, 所有涂层组的粒径分布保持均一, 变异系数小于 3%, 这表明壳聚糖涂层过程具有良好的可控性和重复性, 未因壳聚糖质量浓度变化导致微球黏连或团聚。

2.1.2　Zeta 电位变化　表面 Zeta 电位的变化既可验证涂层的成功, 也为后续内皮细胞黏附行为提供重要依据。如图 2(a)所示, 海藻酸钙微球表面带负电荷,

Zeta电位为(−19.87±1.11)mV,这是海藻酸盐分子中羧基电离所致。经壳聚糖涂层后,微球表面电位均发生反转,呈现正电性:壳聚糖质量浓度分别为1、3、5、7 g/L的修饰组其表面Zeta电位分别升至(2.59±0.84)、(3.85±0.47)、(9.00±0.57)、(3.19±1.05)mV。

电位反转证实了壳聚糖分子通过静电作用成功结合到微球表面。值得注意的是,当壳聚糖质量浓度为1~5 g/L时,电位随质量浓度的升高而上升,而当壳聚糖质量浓度为7 g/L时,电位下降。这可能源于微球表面吸附构象的转变。当壳聚糖质量浓度较低时,分子链有足够的空间在带负电荷的海藻酸钙微球表面铺展开来,形成紧密平铺的吸附构象,此时氨基正电荷充分暴露于表面,使Zeta电位随壳聚糖质量浓度升高而增大;当壳聚糖质量浓度较高时,微球表面的负电荷位点趋于饱和,新加入的壳聚糖分子会倾向于以环状或尾状的构象吸附在已形成的壳聚糖层上,此时部分正电荷远离微球本体表面,导致Zeta电位下降[18]。这一构象转变机制也与2.1.1节粒径分析中壳聚糖质量浓度高于5 g/L时粒径减小变缓的现象相对应。

同时,Zeta电位的变化直接关系到后续内皮细胞的黏附行为。研究表明,哺乳动物细胞膜表面通常带负电荷,HUVEC的膜电位约为(−16.3 ± 12.7)mV[19-20]。因此,带正电荷的微球表面可通过静电作用促进细胞的初始黏附。

2.1.3 尺寸稳定性分析 微球在培养环境中的尺寸稳定性对维持内部细胞的微环境具有重要意义。如图2(b)所示,壳聚糖修饰后微球尺寸的稳定性显著提升。未修饰的海藻酸钙微球在培养基中发生收缩,最终尺寸比为83.84%(即相对于初始尺寸收缩了16.16%),且测试期间由于更换新鲜培养基带来的瞬时尺寸波动达71.19%,表明海藻酸钙微球在换液刺激下发生收缩,这一现象可能与海藻酸钙水凝胶在培养基中的离子交换有关。培养基中含有较高浓度的Na^+等一价阳离子,这些离子可与海藻酸钙网络中的Ca^{2+}发生置换,导致交联密度下降及网络结构重排,同时凝胶内外渗透压差发生变化,从而引起水分排出和体积收缩。而壳聚糖修饰后,各组微球的尺寸稳定性得到改善。壳聚糖质量浓度为1、3、5、7 g/L的组其微球最终尺寸比分别为91.30%、94.35%、98.96%、98.38%,尺寸变化幅度均小于未修饰组。其中,5 g/L壳聚糖修饰组在整个培养周期内的尺寸变化最为平缓,由于更换新鲜培养基带来的瞬时尺寸波动也最小(仅93.90%)。综上所述,5 g/L壳聚糖修饰组微球对环境变化的敏感度最低,尺寸稳定性最佳。

2.2 内皮细胞黏附行为

微球进行壳聚糖涂层修饰的目的是促进内皮细胞的黏附与生长,为构建共培养模型奠定基础。因此,将HUVEC与不同涂层浓度的微球共培养,并于5 min和24 h两个时间点进行明场观察,结果如图3所示。共培养5 min后(图3(a1)~(d1)),各组微球周围的HUVEC均呈圆形、悬浮状态,尚未发生明显的黏附或铺展,说明此时细胞与微球表面的相互作用尚处于初始接触阶段。共培养24 h后(图3(a2)~(d2)),不同壳聚糖浓度修饰组之间呈现出明显的差异。1 g/L涂层组微球表面几乎无细胞黏附,细胞仅自身团聚;3 g/L涂层组细胞黏附数量明显增加,且在微球表面铺展;5 g/L涂层组细胞黏附密度最高,细胞形态良好,铺展面积大且连接成片;7 g/L涂层组细胞黏附数量反而下降。

该现象与2.1.2节中阐述的Zeta电位的变化密切相关,表面正电荷密度最高的5 g/L涂层组具有最优的细胞黏附效果。除了电荷变化外,壳聚糖本身也通过调控蛋白吸附参与此过程。研究发现,壳聚糖组分对纤连蛋白存在优先吸附,且这种吸附能力

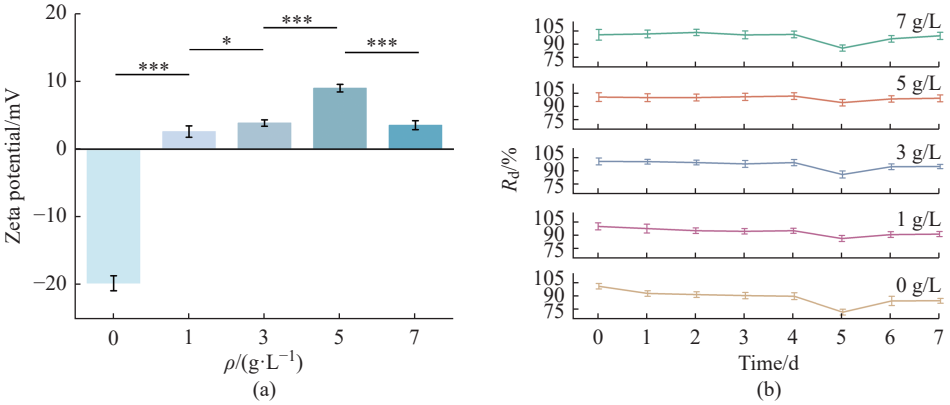


图2 不同质量浓度壳聚糖涂层微球的Zeta电位(a)与尺寸稳定性(b)

Fig. 2 Zeta potential (a) and size stability (b) of microspheres coated with different mass concentrations of chitosan

随壳聚糖含量升高而显著增强, 而纤连蛋白是介导细胞黏附的关键细胞外基质蛋白, 其吸附后可通过整合素受体介导细胞铺展和骨架重排[13-14,21]。

综合微球形态、粒径、Zeta 电位、尺寸稳定性及内皮细胞黏附效果, 确定 5 g/L 为最优涂层质量浓度, 用于后续实验。

2.3　壳聚糖修饰海藻酸钙微球内部肿瘤细胞活性的影响

涂层策略在促进表面内皮细胞黏附的同时, 不应影响内部包封肿瘤细胞的活性。采用 5 g/L 质量浓度的壳聚糖修饰包载 MCF-7 细胞的微球, 培养 1、4、7 天后, 用 CCK-8 进行检测, 得到的相对于未修饰组的细胞活力结果如图 4 所示。

第 1 天, 涂层组细胞活力为无涂层组细胞活力的 102.60%, 表明涂层过程本身及壳聚糖的引入对初始包封的细胞无显著影响甚至有微小的促进趋势。这一促进趋势可能源于壳聚糖溶液的微酸性环境。文献表明, pH=6.5 的酸性条件对 MCF-7 细胞表现出有效的促肿瘤活性[22], 而本研究中壳聚糖溶液配制于体积分数 1% 的乙酸溶液中, 因此涂层后微球表面残留的微酸性环境可能在培养初期对细胞代谢产生短暂激活作用。

第 4 天及第 7 天, 涂层组细胞活力分别为无涂层组细胞活力的 91.99% 与 98.43%, 表明 5 g/L 壳聚糖涂层对内部 MCF-7 细胞并未引起明显的细胞毒性反应。在 7 d 的测试周期内, 涂层组的相对细胞活力均保持在 90% 以上。结合尺寸稳定性结果可推测, 壳聚糖修饰后微球在培养基中的尺寸变化幅度减小, 可能有助于维持微球内部微环境的稳定。相关研究也证实, 海藻酸-壳聚糖的通透性可影响肿瘤细胞簇的形态发生, 但对细胞活力无显著影响[23]。

2.4　肿瘤-内皮细胞共培养模型的建立与细胞生长行为

基于上述优化的 5 g/L 壳聚糖修饰微球, 构建 MCF-7(核心)-HUVEC(表面)共培养模型, 结果如图 5 所示。为了区分两种细胞的空间位置, 在微球与 HUVEC 细胞共同孵育 5 min 时, 拍摄了同区域不同焦距的对比图像(图 5(a)), 图 5(a1)聚焦面为 HUVEC 细胞层, 图 5(a2)聚焦于微球内部。

共培养第 1 天(图 5(b1))时, HUVEC 细胞层生长行为与 2.2 节中描述的内皮细胞黏附行为一致, HUVEC 已在微球表面完全铺展, 且细胞间的连接将部分微球连接成片; 第 4 天(图 5(b2))时, HUVEC 增殖显著, 微球之间通过内皮细胞层的连接形成更为紧密的结构, 已难以观察到完全孤立的微球; 至第 7 天(图 5(c))时, 不同空间位置的微球通过 HUVEC 的连接聚集成团, 共培养体系呈现葡萄串状(图 5(c1))或团状(图 5(c2)), 前者保留了个体微球的轮廓, 后者则融合成更大的组织样结构。

作为对照, 单独培养组(无 HUVEC)的 MCF-7 微球的第 1、7 天图像分别如图 5(d1)、(d2)所示, 可观察到 MCF-7 细胞在微球内部有聚团的趋势, 但微球之间无连接, 始终保持分散状态。这一对比清晰地表明, HUVEC 在微球表面的黏附与增殖不仅形成了内皮细胞层, 还通过细胞间连接将分散的微球整合为具有一定空间结构的组织样聚集体。

2.5　共培养对肿瘤细胞活性的影响

微球表面 HUVEC 的生长状态可通过明场图直接观察得到, 而内部 MCF-7 细胞的生长状态则通过 CCK-8 进行检测。单独培养组(Control)与共培养组(Co-culture)中 MCF-7 细胞的活性检测结果(以 OD 值表示)如图 6 所示。第 1 天, 共培养组与单独培养组的 MCF-7 细胞活性无显著差异; 第 4 天, 共培养组

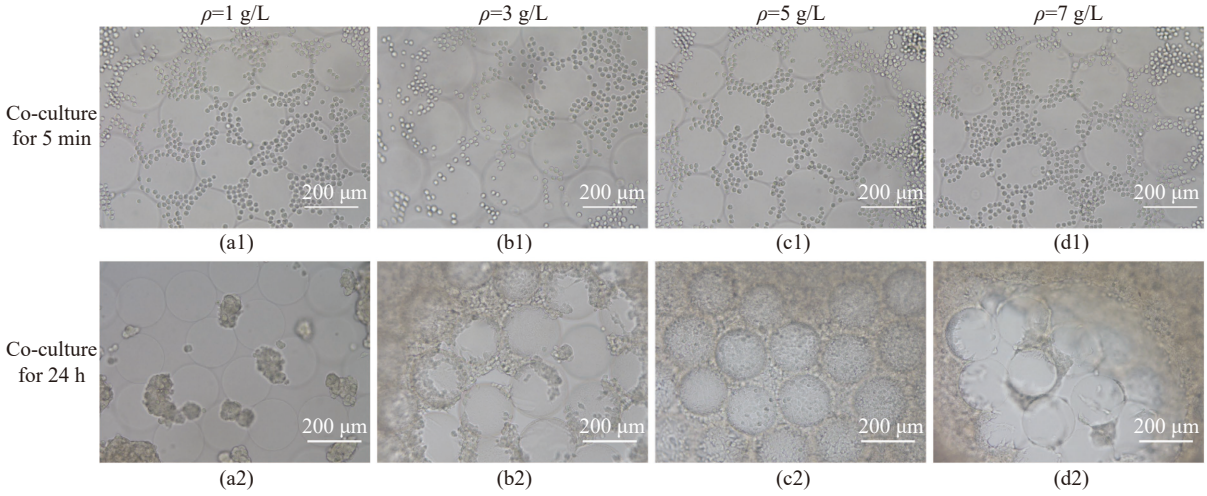


图 3　HUVEC 在不同质量浓度壳聚糖涂层微球表面的黏附行为

Fig. 3　Adhesion behavior of HUVECs on the surfaces of microspheres coated with different mass concentrations of chitosan

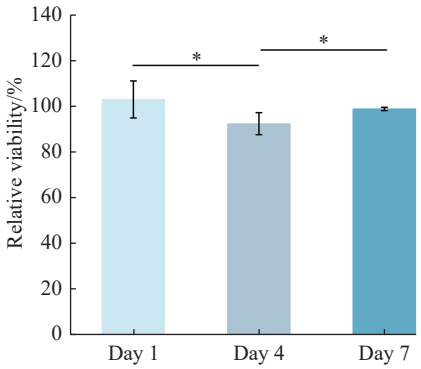


图 4 壳聚糖修饰海藻酸钙微球对包载 MCF-7 细胞活力的影响

Fig. 4 Effect of chitosan-modified calcium alginate microspheres on the viability of loaded MCF-7 cells

和单独培养组的 OD 值分别为 0.685 与 0.625; 第 7 天, 两组差异进一步扩大, 共培养组细胞活性为单独培养组细胞活性的 115%。

这一结果表明, 内皮细胞的存在显著促进了微球内部 MCF-7 细胞的增殖。已有研究显示, 内皮细胞可通过分泌旁分泌因子调控肿瘤生长, 同时增强肿瘤细胞的致瘤性、干性及侵袭性[24], 也可能通过调控微环境中的氧气张力分布等物理化学参数间接影响肿瘤细胞代谢[25]。确切的机理和原因则有待进一步考察。

2.6 讨论和展望

本研究构建的肿瘤-内皮细胞空间分区共培养模型, 在结构设计上突出了肿瘤细胞与内皮细胞的空间分布关系, 在功能上初步体现了内皮细胞对肿瘤细胞生长行为的促进作用, 因此具有较好的拓展应用前景。

由于内皮细胞的引入, 本模型在针对肿瘤血管疗法的研究领域具有明确的应用价值。肿瘤组织中的血管往往是扭曲、脆弱和不成熟的, 导致血管结构和功能异常[26]。以往临床上常使用血管生成抑制剂以抗血管生成从而达到肿瘤治疗的目的, 但近年来发现该方法仅能获得短暂疗效, 肿瘤预后效果差[27]。在此背景下, “血管正常化” 策略应运而生, 其可通过修复肿瘤血管内皮细胞的结构与功能, 有效改善血流灌注使肿瘤缺氧得到缓解, 从而增强放疗、化疗效果[2]。本模型通过壳聚糖涂层实现 HUVEC 在微球表面的稳定定植, 可直接观测内皮细胞形态、细胞间连接完整性及屏障功能, 并可进一步结合 CD31等标志物检测内皮表型变化, 为相关药物的体外筛选提供了可操作的平台。

在此基础上, 本模型有望进一步用于血管正常化与免疫疗法联合策略的研究。当前研究表明, 血管正常化不仅有助于提高肿瘤区域的药物输送效率, 还能重新表达 ICAM1、VCAM1 等黏附分子, 恢复与免疫细胞的交流, 并增强 T 细胞浸润, 协同增强免疫系统对肿瘤的杀伤能力[2,26]。本模型建立的连续内皮细胞层为相关免疫细胞的引入提供了基础, 后续可共接种巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞, 探究内皮细胞对免疫细胞募集与功能极化的调控机制。同

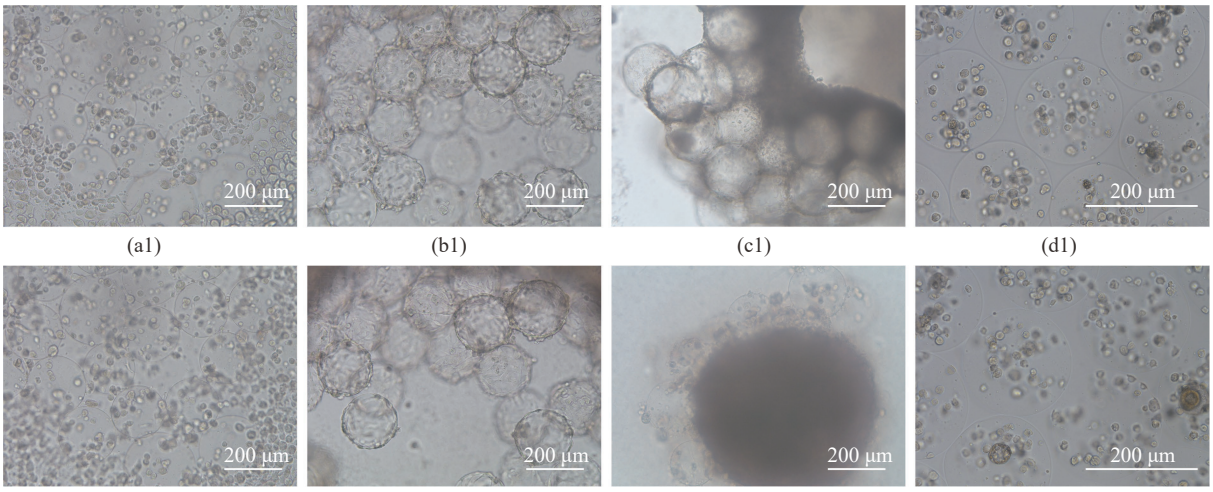


图 5 肿瘤-内皮细胞共培养模型的建立与细胞生长行为: (a)共培养开始 5 min 后同一区域聚焦于 HUVEC 细胞层(a1)和聚焦于包载 MCF-7 的微球(a2)的图像; (b)共培养第 1 天 (b1)和第 4 天(b2)的细胞形态; (c)共培养第 7 天呈现的葡萄串状(c1)和团块状(c2)形态; (d)单独培养组(无 HUVEC)包载 MCF-7 微球第 1 天(d1)和第 7 天的细胞形态(d2)

Fig. 5 Establishment of tumor-endothelial co-culture model and cellular growth behavior: (a) Images of the identical field captured 5 min after the initiation of co-culture, with focal plane positioned on the HUVEC monolayer (a1) and microspheres loaded with MCF-7 cells (a2), respectively; (b) Cellular morphology on day 1 (b1) and day 4 (b2) of co-culture; (c) Grape-like (c1) and massive clustered (c2) morphologies observed on day 7 of co-culture; (d) Cellular morphology of MCF-7-laden microspheres in the monoculture group (without HUVECs) on day 1 (d1) and day 7 (d2)

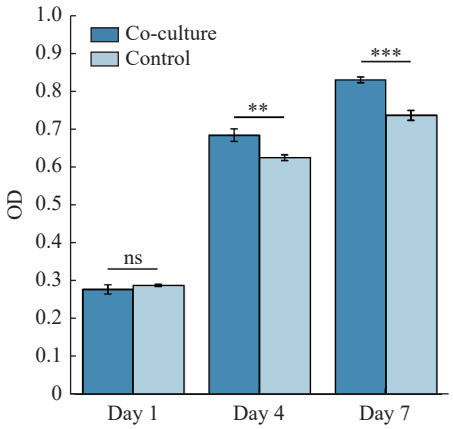


图 6　共培养对 MCF-7 细胞活性的影响

Fig. 6　Effect of co-culture on MCF-7 cell viability

时, 本模型可作为核心单元, 结合生物 3D 打印或微流控技术, 进一步拓展为多细胞体系以更全面地重塑肿瘤微环境。

在精准医疗方面, 若将患者来源肿瘤细胞、内皮细胞及免疫细胞整合到该平台中, 有望建立个体化肿瘤模型, 用于评价不同患者对血管调控治疗及联合治疗的敏感性, 为个体化治疗方案优化提供体外依据。

3　结　论

(1) 本研究采用微流控技术成功制备了尺寸均一、重复性良好的海藻酸钙微球, 并通过壳聚糖静电吸附实现了微球表面功能化修饰, 为构建肿瘤-内皮细胞共培养模型提供了基础载体。

(2) 壳聚糖质量浓度显著影响海藻酸钙微球的粒径、表面电荷、尺寸稳定性及内皮细胞黏附效果。随着壳聚糖质量浓度增加, 微球粒径由(217.03±3.90)μm 减小到(188.82±3.94)μm; Zeta 电位由最初的负电位反转为正电位, 且表现出先升高后降低的趋势; 尺寸稳定性也有所提升。综合上述指标后确定了 5 g/L 为最优涂层质量浓度。该质量浓度下微球表面 Zeta 电位最高, 达(9.00±0.57) mV, HUVEC 黏附密度也最高且铺展良好。

(3) 在优化涂层条件的基础上, 成功构建了具有空间分区特征的 MCF-7-HUVEC 肿瘤-内皮细胞共培养模型。其中, MCF-7 细胞包载于微球内部模拟肿瘤核心, HUVEC 黏附于微球表面模拟血管内皮界面, 实现了两类细胞在体外模型中的定位。在共培养过程中, HUVEC 可在微球表面形成连续细胞层, 并通过细胞间连接将分散微球整合为葡萄串状或团块状组织样聚集体; 同时, 共培养条件可促进内部 MCF-7 细胞增殖, 第 7 天细胞活性达到单独培养组细胞活性的 115%, 表明该模型能够在一定程度上反映肿瘤-内皮细胞互作对肿瘤生长行为的调控作用。

参考文献:

[1] HAN Y, ZHU B, MENG S. Endothelial cell in tumor angiogenesis: Origins, mechanisms, and therapeutic implication[J]. Genes & Diseases, 2025, 12(6): 101611.

[2] KANE K, EDWARDS D, CHEN J. The influence of endothelial metabolic reprogramming on the tumor microenvironment[J]. Oncogene, 2025, 44(2): 51-63.

[3] BAHCECEIOGLU G, BASARA G, ELLIS B W, *et al*. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment[J]. Acta Biomaterialia, 2020, 106: 1-21.

[4] WU K Z, ZENG B, SEAH D H, *et al*. Advances in *in-vitro* modeling of cancer-stromal interactions: From fundamental insights to translational applications[J]. Advanced Materials, 2025, 37(50): e12252.

[5] XIE Y, YANG X, PAN R, *et al*. Co-culture of natural killer cells and tumor spheroids on a heterogeneous multilayer paper stack[J]. Journal of Zhejiang University. Science. B, 2024, 25(12): 1097-1107.

[6] FRANCO M, ROSWALL P, CORTEZ E, *et al*. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression[J]. Blood, 2011, 118(10): 2906-2917.

[7] RO J, KIM J, PARK J, *et al*. ODSEI chip: An open 3D microfluidic platform for studying tumor spheroid-endothelial interactions[J]. Advanced Science, 2025, 12(13): 2410659.

[8] YANG M, HONG M, WANG G, *et al*. Preparation of 3D zonal and interactional glomerular models based on composite core-shell hydrogel microspheres[J]. ACS Materials Letters, 2024, 6(11): 5154-5162.

[9] NING L, SHIM J, TOMOV M L, *et al*. A 3D bioprinted *in vitro* model of neuroblastoma recapitulates dynamic tumor-endothelial cell interactions contributing to solid tumor aggressive behavior[J]. Advanced Science, 2022, 9(23): 2200244.

[10] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: Properties and biomedical applications[J]. Progress in Polymer Science, 2012, 37(1): 106-126.

[11] YU Y, WANG X, ZHU Y, *et al*. Is polydopamine beneficial for cells on the modified surface?[J]. Regenerative Biomaterials, 2022, 9: rbac078.

[12] 胡萍, 张双英, 李洁, 等. 壳聚糖/海藻酸钙/自组装多肽微凝胶纤维的制备及应用 [J]. 高分子通报, 2020, 33(8): 49-54.

[13] 贺庆, 敖强, 韩大庆, 等. 基于琼脂糖/壳聚糖共混凝胶模型的壳聚糖生物相容性的机理研究 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2012, 35(2): 65-69.

[14] PARISI L, TOFFOLI A, BIANCHI M G, *et al*. Functional fibronectin adsorption on aptamer-doped chitosan modulates cell morphology by integrin-mediated pathway[J]. Materials, 2019, 12(5): 812.

[15] GONG J, SCHUURMANS C, GENDEREN A, *et al*. Complexation-induced resolution enhancement of 3D-printed

hydrogel constructs[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1267.
[16] CIARLANTINI C, FRANCOLINI I, SILVESTRO I, *et al*. Design of bioactive and biomimetic scaffolds based on chitosan-alginate polyelectrolyte complexes for tissue engineering[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 327: 121684.
[17] CHEN K Y, ZENG S Y. Preparation and characterization of quaternized chitosan coated alginate microspheres for blue dextran delivery[J]. Polymers, 2017, 9(6): 210.
[18] STOLL S, CHODANOWSKI P. Polyelectrolyte adsorption on an oppositely charged spherical particle: Chain rigidity effects[J]. Macromolecules, 2002, 35(25): 9556-9562.
[19] OUYANG L, SHAIK R, XU R, *et al*. Mapping surface charge distribution of single-cell via charged nanoparticle[J]. Cells, 2021, 10(6): 1519.
[20] VARGAS F F, CAVIEDES P F, GRANT D S, *et al*. Electrophysiological characteristics of cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. Microvascular Research, 1994, 47(2): 153-165.
[21] AMARAL I F, SOUSA S R, NEIVA I, *et al*. Kinetics and isotherm of fibronectin adsorption to three-dimensional porous chitosan scaffolds explored by ^{125}I-radiolabelling[J]. Biomatter, 2013, 3(2): e24791.
[22] DAMAGHI M, GILLIES R. Phenotypic changes of acid-adapted cancer cells push them toward aggressiveness in their evolution in the tumor microenvironment[J]. Cell Cycle, 2017, 16(19): 1739-1743.
[23] PENG X, JANICIGEVIC Z, LEMM S, *et al*. Shell engineering in soft alginate-based capsules for culturing liver spheroids[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(6): 2200365.
[24] GHIABI P, JIANG J, PASQUIER J, *et al*. Endothelial cells provide a notch-dependent pro-tumoral niche for enhancing breast cancer survival, stemness and pro-metastatic properties[J]. Plos One, 2014, 9(11): e112424.
[25] CHIANG K H, CHANG W, LIU Y, *et al*. Quantification of oxygen tension variation in an in vitro tumor microenvironment model based on co-culture of tumor spheroid and endothelial cells in a microfluidic device[J]. Sensors and Actuators Reports, 2025, 10: 100396.
[26] KABIR A U, SUBRAMANIAN M, KWON Y, *et al*. Linking tumour angiogenesis and tumour immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2026, 26(1): 35-51.
[27] WANG J, PAN X, ZHANG J, *et al*. Active molecule-based theranostic agents for tumor vasculature normalization and antitumor efficacy[J]. Chinese Chemical Letters, 2024, 35(8): 109187.

Chitosan-Modified Calcium Alginate Microspheres for Constructing Tumor-Endothelial Cell Co-culture Models

WANG Liuhuan[1], CEN Lian[1], ZHANG Hongbo[2], SHAN Meihui[3]
(1. School of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Mechanical and Power Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: To establish a tumor-endothelial cell co-culture model with a spatially partitioned structure, this study employed a chitosan electrostatic adsorption coating strategy to surface-modify calcium alginate microspheres. Breast tumor cells (MCF-7) were encapsulated within the microspheres, while human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were seeded on the microsphere surface, mimicking the spatial relationship between tumor cell clusters and vascular endothelium in solid tumors. By systematically investigating the effects of varying chitosan mass concentrations (1, 3, 5, 7 g/L) on microsphere particle size, surface charge, dimensional stability, and HUVECs adhesion, the optimal coating conditions were identified, and the proliferation behavior of tumor cells in the co-culture model was evaluated. Results indicated that microspheres modified with 5 g/L chitosan exhibited optimal particle size stability, a surface zeta potential of (9.00±0.57) mV, the highest HUVECs adhesion density with good spreading, and no significant cytotoxicity toward internal MCF-7 cells. In the co-culture model constructed using this optimized coating, HUVECs formed a continuous cell layer on the microsphere surface, connecting dispersed microspheres into tissue-like aggregates. MCF-7 cell activity in the co-culture group was enhanced compared to the monoculture group (reaching 115% on day 7). This model showed potential applications in studying tumor-endothelial cell interaction mechanisms, drug evaluation, and personalized medicine, providing a novel *in vitro* platform for simulating the tumor microenvironment.

Key words: chitosan; calcium alginate microsphere; tumor-endothelial cell co-culture; compartmental model; surface modification

（责任编辑：张欣）