

基于液滴微流控的多细胞共培养系统的建立及在抗肿瘤药物敏感性分析中的应用*

张雪桐 陈 铄 方 瑾**

(中国医科大学生命科学学院, 医学细胞生物学教育部重点实验室暨国家卫生健康委员会细胞生物学重点实验室, 细胞生物学教研室, 沈阳 110122)

摘要 **目的** 构建基于液滴微流控的细胞共培养芯片, 研究复杂微环境中多细胞相互作用对抗肿瘤药物敏感性的影响。**方法** 构建由12个共培养单元构成, 每个单元含有4个容纳细胞液滴的微井(well)的芯片, 可以实现4种细胞的共培养。通过细胞共培养实验考察微环境细胞及肿瘤细胞之间的相互作用。通过蓝色墨水及模型药物扩散实验考察药物在芯片中扩散和被细胞摄取的能力。通过细胞共培养及药物作用实验探究微环境细胞存在条件下肿瘤细胞药物敏感性的变化, 并通过免疫荧光技术检测其DNA双链损伤标志物, 探究共培养条件下肿瘤细胞产生药物抗性的原因。**结果** 细胞共培养实验显示, 微环境中癌症相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast, CAF)、内皮细胞HUVCEC、巨噬细胞与肿瘤细胞之间存在明显的相互作用。蓝色墨水及模型药物扩散实验显示, 药物在芯片内可以均匀有效地向不同方向well中扩散, 不同well中的相同细胞具有一致性的增殖能力和药物摄取能力。细胞共培养实验及药物作用发现, 由CAF、内皮细胞HUVCEC、巨噬细胞构成的复杂微环境通过细胞之间的相互作用明显降低肿瘤细胞LoVo对奥沙利铂的药物敏感性。免疫荧光结果显示, 共培养条件下LoVo细胞内 γ H2AX的表达量下降。**结论** 本研究首次通过构建的液滴微流控细胞共培养系统探讨了在多种微环境细胞存在条件下肿瘤细胞对药物敏感性的改变, 为监测临床药物反应、发现新的药物作用靶点提供了新的方法和手段。

关键词 液滴微流控, 肿瘤微环境, 共培养, 药物敏感性

中图分类号 Q2

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0441

CSTR: 32369.14.pibb.20250441

肿瘤是威胁人类健康的重大疾病, 目前常规的肿瘤治疗策略中, 化疗等药物治疗仍是除手术以外的主要治疗手段^[1], 评估药物作用疗效并适时调整和制定有效的用药方案是肿瘤治疗中的重大挑战^[2]。药物敏感性分析是目前体外评价药物作用的主要方法, 通常采用细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK8) 法等实验来测定细胞活力, 但常规的分析对象多针对单独的肿瘤细胞。越来越多的研究显示, 肿瘤发生是多细胞参与的复杂过程, 除了肿瘤细胞, 肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的微环境细胞如癌症相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)、巨噬细胞、内皮细胞等可通过与肿瘤细胞的相互作用参与并强烈影响药物敏感性^[3-5], 而目前基于单独肿瘤细胞的药物敏感性分析策略难以模拟和再现体内微环境对药物敏感性的影响。因此,

研究多种微环境细胞作用下肿瘤药物敏感性的改变对肿瘤治疗具有重要意义。目前体外实现多细胞共培养最为常用的方法是Transwell小室^[6], 但基于Transwell小室的共培养方法有一定的局限性。例如, 在分析细胞药物敏感性时只能评估下室细胞的变化, 无法同时评价上室细胞的行为及增殖改变。因此, 亟需发展更为有效的体外细胞相互作用研究方法以进行药物敏感性研究。

微流控芯片技术(microfluidic)是一种微型分析系统, 微型化和集成化的特点使其能够模拟体内的生理环境, 便于通过多个反应单元完成对不同细

* 国家自然科学基金(82473153, 82073291, 81672920)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13386887570, E-mail: jfang@cmu.edu.cn

收稿日期: 2025-10-10, 接受日期: 2025-12-15

胞行为的多指标分析^[7]。已有文献报道建立基于微流控的细胞共培养系统,用于肿瘤细胞与TME细胞之间相互作用及药物敏感性的研究。Mi等^[8]利用微流控芯片研究了乳腺癌细胞与肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)之间的相互作用及对紫杉醇的药物敏感性改变。在本课题组之前的工作中,我们建立了微流控共培养系统,研究了结直肠癌细胞与CAF之间的相互作用以及药物敏感性变化^[9-10]。但这些研究大多局限于研究两种细胞相互作用下的药物敏感性改变。

液滴微流控技术是使用不相容的两相液体形成纳升及以下体积液滴的一种微纳技术,由于可将不同特性的细胞包裹于独立的分析单元中,已成为多细胞相关研究的理想体系。液滴微流控系统所具有的微型化和高通量的特点使其在进行抗肿瘤药物筛选及药物敏感性分析的研究中颇具优势^[11]。首先,微型化的特点使液滴微流控技术能够更精确的模拟体内的肿瘤微环境;其次,开口式的结构及高通量的特点使液滴微流控技术能够实现不同条件下肿瘤药物敏感性的平行分析;此外,独立的分析单元使得不同分析单元之间彼此互不干扰。Du等^[12]利用基于顺序操作液滴阵列技术的集成液滴微流控系统进行了基于肺癌细胞A549的抗肿瘤药物组合筛选。Lee等^[13]利用液滴微流控技术研究了乳腺癌细胞MCF-7和成纤维细胞球体对阿霉素的敏感性变化。但已有研究局限于在独立单元内研究单独肿瘤细胞,或仅与一种微环境细胞之间相互作用下的药物敏感性变化。由于TME中细胞种类多样,这些研究难以模拟复杂TME并探究肿瘤细胞在此环境下的药物敏感性改变。为此,本研究旨在构建基于液滴微流控的多孔细胞共培养阵列,将肿瘤细胞与TME的主要构成细胞血管内皮细胞、CAF及巨噬细胞等进行共培养以模拟复杂TME,探究微环境细胞与肿瘤细胞之间的相互作用以及在此环境下肿瘤细胞对化疗药物奥沙利铂的药物敏感性改变。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640/DMEM培养基,美国Corning公司;DMEM-F12培养基,美国Corning公司;EGM-2培养基,美国Lonza公司;胎牛血清(FBS),中国生工生物公司;胰蛋白酶,美国Thermo Fisher公司;青霉素-链霉素-两性霉素B混合溶液,中国索莱宝科技有限公司;Calcein AM染料、Ethidium homodimer-1染料(EthD-1),美国

Invitrogen公司;聚二甲基硅氧烷(PDMS),美国迈图公司;FC-40生物氟化液,美国3M公司;阿霉素(分析纯),中国阿拉丁试剂有限公司;奥沙利铂(分析纯),中国阿拉丁试剂有限公司。佛波酯(PMA),美国MCE公司;组织固定液,中国索莱宝科技有限公司;TritonX-100,中国索莱宝科技有限公司; γ H2AX多克隆抗体(鼠),美国Invitrogen公司。

1.2 细胞培养

人结直肠癌细胞系LoVo, HCT 116培养于含10% FBS、1%青霉素-链霉素-两性霉素B抗生素的RPMI-1640完全培养基中。人脐静脉内皮细胞HUVEC培养于EGM-2完全培养基中。患者来源的结直肠癌CAF培养于含10% FBS、1%青霉素-链霉素-两性霉素B抗生素的DMEM/F12培养基中。人单核白血病细胞系THP-1培养于含10% FBS、1%青霉素-链霉素-两性霉素B抗生素的RPMI-1640培养基中。将THP-1细胞以每皿 1×10^6 个细胞接种于6 cm培养皿中,加入含有浓度为50 μ g/L PMA的RPMI-1640完全培养基,24 h后观察到大部分细胞贴壁生长,分化为M0型巨噬细胞。以上细胞均置于37°C, 5% CO₂的细胞培养箱中培养。

1.3 微流控芯片的设计与制作

通过3D打印技术构建一个由12个共培养单元构成的4×3阵列式微流控芯片模具,芯片的实物图如图1a所示,每个单元包含4个用于细胞培养的微井(well),每个单独well的直径为0.96 mm,可用于培养一种细胞;各well至十字通道中心的长度为1.5 mm;well的深度为500 μ m。将PDMS预聚物和固化剂以10:1的质量混合比均匀,浇筑在模具上,放入60°C恒温干燥箱中固化1 h。将PDMS芯片揭下,置于细胞培养皿底中固定。使用前经紫外线照射1 h进行灭菌,并一定程度改善PDMS表面亲水性。

1.4 液滴内的细胞共培养

微流控芯片的示意图和细胞共培养的操作流程如图1b所示。在放有芯片的培养皿中加入盖过芯片的无菌FC-40氟化液。调整泵速为0.08 ml/h,吸取细胞悬液,依次在4个well位置处插入油下滴入细胞悬液,每0.5 s生成一个液滴,体积约为110 nl。待细胞完全沉降后用毛细管向十字通道滴入培养基并滑动毛细管使液滴融合。

液滴内细胞共培养操作流程为:调整所需细胞

密度为 1×10^6 个/ml，将细胞悬液分别滴加在4个well中。待细胞沉降贴壁后将液滴融合。48 h后吸

出培养基，滴加稀释后的 Calcein AM、EthD-1 染料染色 30 min 成像。

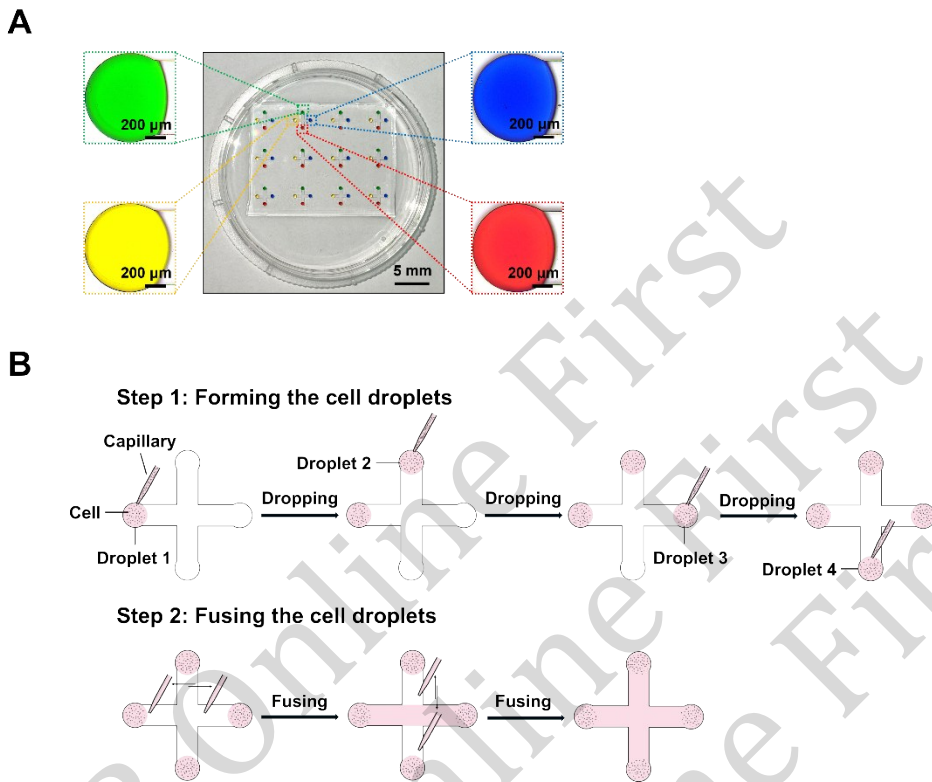


Fig. 1 The illustration (a) and operation process (b) of the co-culture droplet microfluidic chip

1.5 液滴内药物扩散模拟

依前在4个well中均匀地滴加PBS并连通。在十字通道中心滴加蓝色墨水后成像。以每个well与十字通道连接处为起点，使用ImageJ软件将墨水颜色转换为灰度值并进行定量分析。

进一步考察阿霉素药物在液滴内扩散及被细胞摄取的情况，调整LoVo细胞密度为 1×10^6 个/ml，在单个well中均匀地滴加细胞悬液，待细胞沉降贴壁后将液滴融合，并在十字通道中心滴加浓度为25 mg/L的阿霉素。分别在加入阿霉素后0 h、12 h时拍照。

1.6 液滴内多细胞共培养及药物敏感性分析

消化LoVo（或HCT 116）、CAF、HUVEC、THP-1细胞，调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。将4种细胞悬液分别滴加在4个well中。待细胞沉降贴壁后将液滴融合，12 h后在十字通道的中间位置滴加药物。48 h后吸出培养基，滴加Calcein AM、EthD-1染料染色30 min成像。

1.7 单独培养的LoVo细胞和共培养的LoVo细胞的免疫荧光分析

在液滴中用组织固定液固定芯片中的细胞，然后用PBS洗涤。将细胞与 γ H2AX一抗（在此之前加入0.5%TritonX-100增加细胞膜的通透性）在4°C下孵育过夜，次日加入荧光二抗孵育2 h，最后用DAPI染色5 min后成像。

1.8 数据统计与分析

对每个实验条件的所有测量值均由3个或更多个独立或重复实验装置进行测定，并重复至少3次。显示的测量值表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。使用GraphPad Prism软件中的非配对t检验进行数据比较与差异分析。

2 结果与讨论

2.1 液滴内的细胞培养

为了探讨在构建的液滴系统中细胞是否能够正常存活和增殖，在4个well中分别加入相同密度的LoVo细胞，形成单独的细胞液滴。如图2a所示，

48 h内可见每个液滴内的细胞数量增加, 增殖现象明显。细胞死活染色结果显示, 细胞均呈现绿色荧光, 未见明显的红色荧光显示 (图 2b)。从 0 h 至 48 h, 4 个 well 中细胞数的定量分析如 2c 所示, 4 个 well 内的 LoVo 细胞数量随时间延长而增加, 且

同一时间点 4 个 well 内的细胞数量无显著性差异。结果提示, 每个液滴内的细胞均具有良好的增殖能力且具有细胞状态的一致性, 为进行多种细胞的共培养奠定了基础。

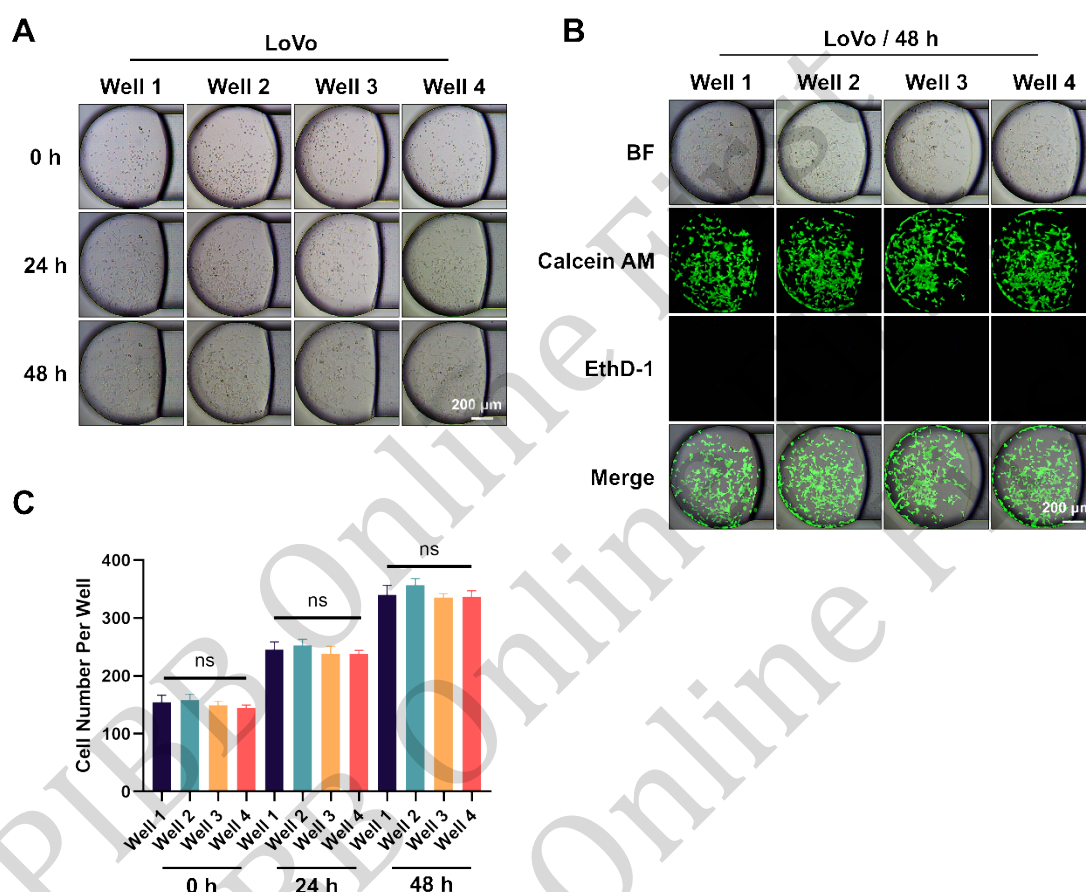


Fig. 2 Cell culture in co-culture droplet microfluidic chip

(a) Images of LoVo cells cultured in co-culture droplet microfluidic chip. (b) Live/dead staining of LoVo cells in different wells after 48 h. (c) Statistical analysis of cell number in different wells. $n=3$ for each data set. $ns>0.05$ as calculated from Student's t -test.

2.2 液滴内模拟微环境的多种细胞共培养

为了评价在液滴共培养体系下是否可以实现多种细胞的共培养以及观察和分析不同种类细胞之间的相互作用, 我们选择 TME 中的主要构成细胞来模拟肿瘤微环境, 包括结直肠癌细胞 LoVo、癌症相关成纤维细胞 CAF、人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和由 THP-1 诱导分化后的巨噬细胞, 将 4 种细胞分别加至 4 个不同的 well 中, 构建多细胞共培养体系。培养 48 h 后的细胞死活染色结果显示 (图 3a, b), 大多数细胞处于存活状态。定量结果显示, 培养 48 h 后, 与单独培养组相比, 共培养组除 CAF

外, LoVo 细胞、HUVEC 及巨噬细胞数量均明显增加 (图 3c)。上述结果提示, 在共培养条件下, 液滴内的细胞可正常存活和增殖。已有研究显示, 肿瘤微环境中的 CAF 可通过激活转化生长因子 β (TGF- β) 和核因子 $\kappa\beta$ (NF- κB) 通路促进肿瘤细胞增殖^[14]; HUVEC 能够通过分泌表皮生长因子 (EGF) 和成纤维细胞生长因子 β (FGF- β) 促进肿瘤细胞增殖^[15]; 巨噬细胞具有通过调节 TGF- β 、Wnt、Hippo 等信号通路来增强肿瘤细胞增殖的能力^[16], 因此, 我们推测, 共培养组细胞尤其是肿瘤细胞高于对照组的增殖能力可能来自不同种类细

胞的相互作用。此外, Cords 等^[17]的研究表明, CAF 具有异质性。大部分类型的 CAF 如 mCAFs、iCAFs、vCAFs 等主要通过分泌生长因子或趋化因子以促进肿瘤进展, 而具有较强增殖能力的 dCAFs 占 CAF 群体中最小的比例。在本共培养体系下, CAF 数量并未明显增加, 可能的原因是 CAF 主要

通过分泌功能促进肿瘤进展而非通过自身的活跃增殖。

2.3 液滴内的药物扩散行为评价

为了构建稳定的能够进行药物敏感性评价的共培养体系, 我们首先分析了药物在系统内的扩散行为, 如图 4a 所示, 将药物滴加到芯片单元的中心

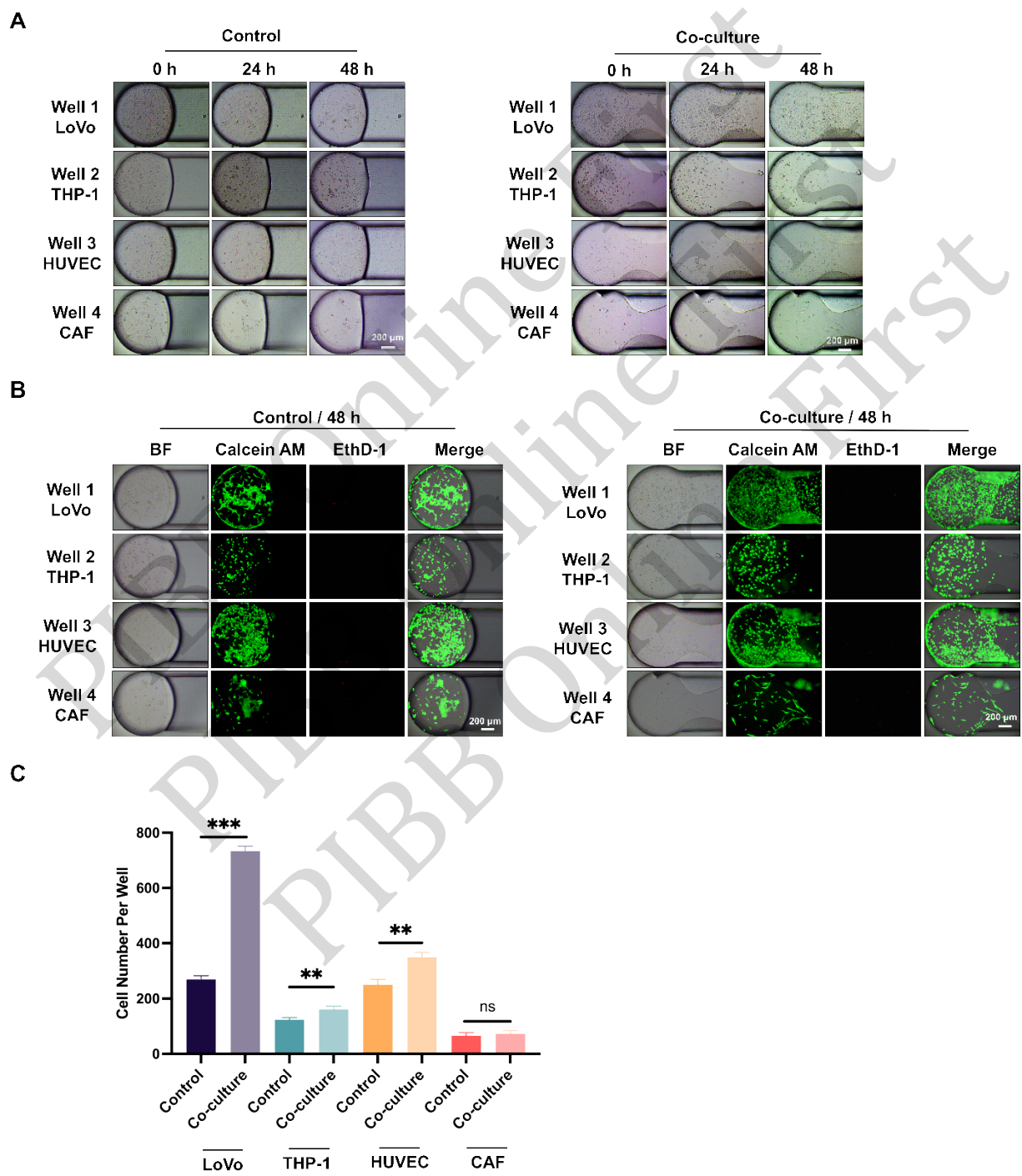


Fig. 3 Cell co-culture in co-culture droplet microfluidic chip
(a) Image of LoVo cells and different microenvironmental cells co-cultured in co-culture droplet microfluidic chip. (b) Live/dead staining of LoVo cells and microenvironmental cells in chip after 48 h. (c) Statistical analysis of cell number in different wells after 48 h. $n=3$ for each data set. $***<0.001$, $**<0.01$, $ns>0.05$ as calculated from Student's t -test.

位置, 药物可通过自由扩散进入到液滴体系的各培养well中。首先采用蓝色墨水模拟药物分子, 结果如图4b所示, 滴加于芯片中心的墨水从0 h开始扩散, 至3 h时扩散至4个well, 定量分析结果(图4c)显示, 在4个well方向上墨水在不同时间点的扩散速度一致。进一步, 以抗肿瘤药物阿霉素为模型, 分析共培养体系中不同液滴中细胞对药物的实际摄取能力。阿霉素是一种天然荧光化合物, 被细胞摄取后会嵌入DNA而高效发出红色荧光。在芯片4个well中同时培养LoVo细胞, 观察LoVo细胞对阿霉素的摄取情况。结果如图4d1所示, 阿霉素作用12 h后, 细胞中呈现明显的红色荧光, 提示药物被有效摄取。我们对每个well内LoVo细胞发出红色荧光的强度进行定量分析, 结果如图4d2所示, 每个well内不同LoVo细胞对阿霉素的摄取能力不同。在各个液滴中随机选取80个细胞, 通过荧光指数评价其药物摄取能力, 80个细胞的平均

荧光强度定量分析结果如图4d3所示, 不同well间的平均荧光强度无显著性差异, 提示不同well中的细胞对阿霉素的总体摄取量具有一致性。上述结果提示, 在所建立的共培养系统中, 药物可有效扩散, 并被不同well中的细胞一致性地摄取, 为进一步进行复杂环境下的药物敏感性分析奠定了基础。

2.4 应用共培养体系分析LoVo细胞对奥沙利铂的药物敏感性

前述实验证明, 模型药物可以均匀扩散至培养单元的不同well中并被细胞均一性摄取。在此基础上, 我们首先应用共培养体系探讨了LoVo细胞对结直肠癌一线治疗药物奥沙利铂的药物敏感性, 根据文献中报道^[18-20], 及前期实验确定奥沙利铂药物的使用浓度。在共培养单元的4个well中培养相同的LoVo细胞, 并在阵列的不同单元中加入不同浓度的奥沙利铂(0、40、80和160 $\mu\text{mol/L}$)。48 h后的细胞培养(图5a)、死活染色结果(图5b)及定

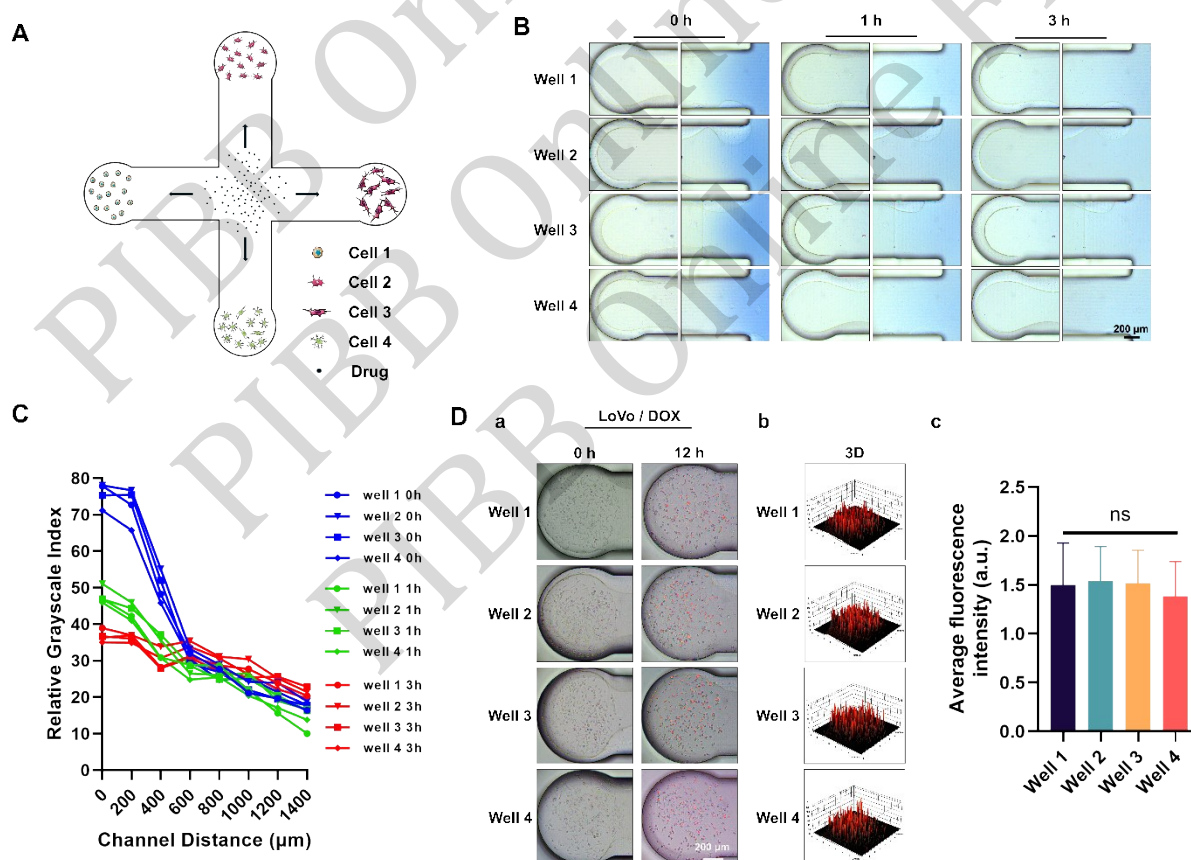


Fig. 4 Analysis of the diffusion of drug in co-culture droplet microfluidic chip

(a) Work principle of co-culture droplet microfluidic chip. (b) Blue ink was injected from the center of the chip, and the diffusion of ink was observed at 0 h, 1 h and 3 h. (c) Quantitative analysis of (b). (d) Assessment of drug intake status in co-culture droplet microfluidic chip. d1, DOX was injected from the center of the chip, and the intake of DOX by LoVo cells was observed at 0 h and 12 h. d2, Fluorescence intensity quantitative analysis of DOX. d3, Average fluorescence intensity quantitative analysis of DOX. $n=3$ for each data set. $ns>0.05$ as calculated from Student's t -test.

量分析结果 (图 5c) 显示, LoVo 细胞的存活率随奥沙利铂浓度的增加而降低, 表现出明显的剂量依赖性, 符合该药物的细胞毒性作用特点^[21], 且 4 个 well 内细胞的存活率具有一致性, 上述结果为应用该系统进行多细胞相互作用下的药物敏感性分析奠定了基础。

2.5 应用共培养体系分析多细胞环境下奥沙利铂的药物敏感性

前述实验中已经证实, 在我们构建的微环境液滴体系中可以观察到不同细胞之间的相互作用, 并且强烈影响肿瘤细胞的增殖活性; 同时培养于不同 well 中的相同细胞具有一致性的药物反应, 在此基础上, 我们选取 TME 中影响药物敏感性的主要细胞, 结直肠癌细胞 (LoVo)、癌症相关成纤维细胞 (结直肠癌患者来源的 CAF)、巨噬细胞 (由 THP-1

诱导成为 M0 型巨噬细胞) 和血管内皮细胞 (HUVEC), 构建模拟微环境的共培养系统, 加入不同浓度的奥沙利铂, 研究复杂微环境对药物敏感性的影响。图 6a~d 显示, 奥沙利铂药物对 LoVo、THP-1、HUVEC 和 CAF 细胞显示不同程度的生长抑制。其中, 图 6a 显示药物对共培养系统中 LoVo 细胞的作用结果, 随着药物浓度的增加, 细胞存活率下降。但值得关注的是, 与奥沙利铂作用于单独培养的 LoVo 细胞 (图 5) 相比, 共培养下的 LoVo 细胞表现出明显的药物抗性, 即药物敏感性降低。共培养 48 h 后, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ 的作用浓度下, 单独培养的 LoVo 细胞存活率只有 25%, 而共培养条件下为 96%。在 160 $\mu\text{mol/L}$ 的作用浓度下, 单独培养的 LoVo 细胞存活率仅有 2%, 而共培养条件下为 50%。此外, 共培养 48 h 后, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利

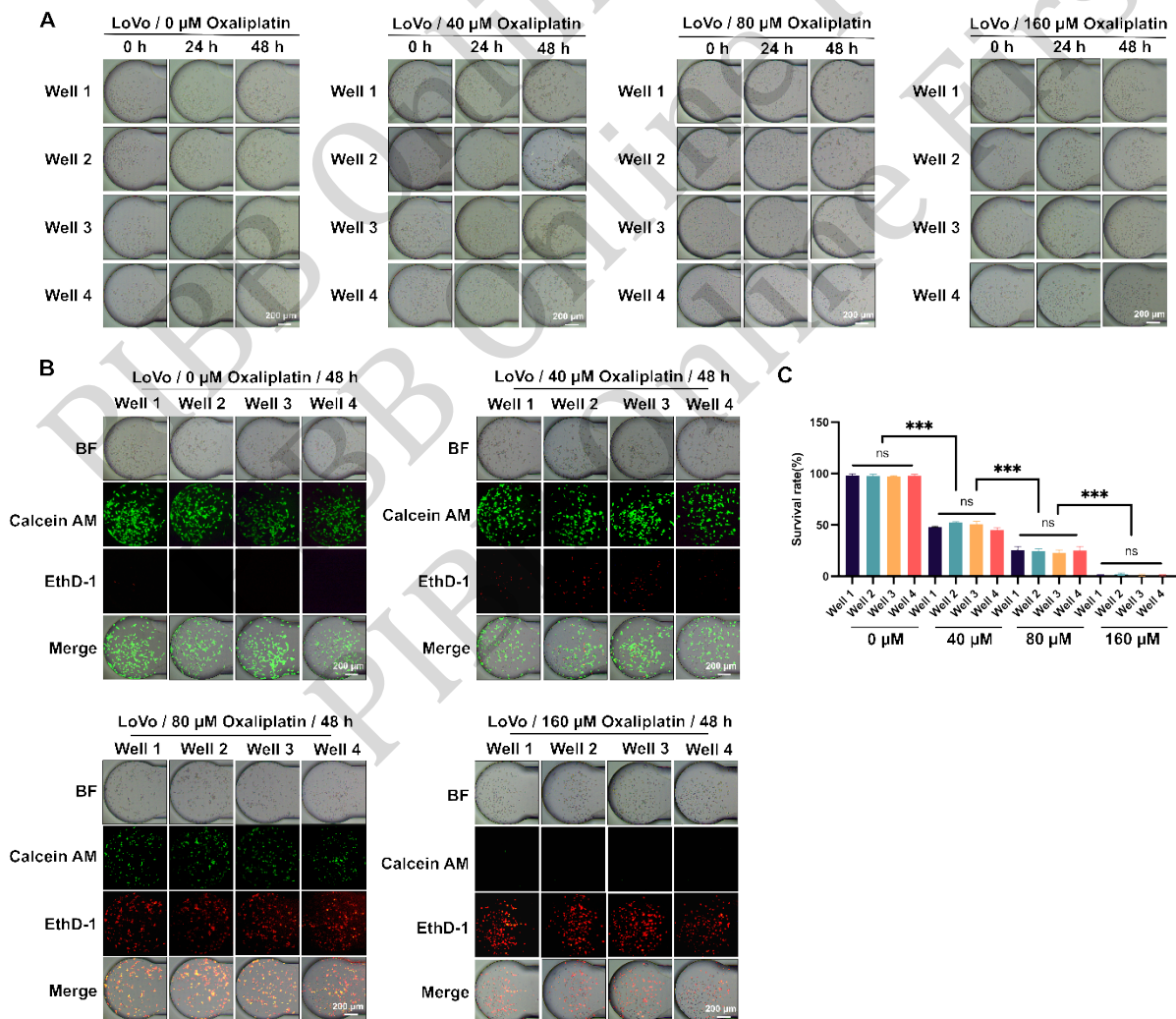


Fig. 5 Parallel analysis of drug action in co-culture droplet microfluidic chip

(a) Images of LoVo cells under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (b) Live/dead staining of LoVo cells under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip after 48 h. (c) Survival rate of LoVo cells under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip after 48 h. $n=3$ for each data set. *** <0.001 as calculated from Student's t -test.

铂的作用浓度下, THP-1、HUVEC 和 CAF 细胞的存活率几乎不受影响; 在 160 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂的作用浓度下, THP-1 存活率为 3%, HUVEC 存活率为 41%, CAF 存活率为 84%, THP-1、HUVEC 细胞存活率明显下降 (图 6b~d)。前述实验中证明, 与微环境细胞共培养条件下的 LoVo 细胞增殖能力明显增强。因此, 我们推测, LoVo 细胞药物敏感性的改变可能源于共培养体系中微环境细胞对 LoVo 细胞行为的影响。

研究表明, 奥沙利铂可通过引起 DNA 双链损伤导致结直肠癌细胞凋亡。 γH2AX 是 DNA 双链损伤的标志物^[22]。研究表明, γH2AX 被证明是研究各种抗癌药物治疗效果的标志物, 检测 γH2AX 的表达情况是评估肿瘤治疗中肿瘤细胞耐药性的有效方法^[23-24]。图 6e 显示, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂作用浓度下, 与单独培养的 LoVo 细胞相比, 共培养组的 LoVo 细胞内 γH2AX 的表达量更低。因此, 我们推测在本研究中, 微环境细胞可能通过减弱 LoVo 细胞的 DNA 双链损伤以影响其对奥沙利铂药物的敏感性。

研究表明, CAF 能够促进肿瘤细胞的生长增殖并影响药物抗性。Wang 等^[25]的研究表明, CAF 可以通过分泌基质金属蛋白酶 11 (MMP11) 促进胰腺癌细胞的增殖。Zhou 等^[26]的研究表明, CAF 通过分泌 COL8A1 诱导 EMT, 从而增加结直肠癌细胞对奥沙利铂药物的耐药性。巨噬细胞在肿瘤微环境中可极化为 M2 型巨噬细胞, 即 TAM^[27-29], TAM 能够促进肿瘤细胞的增殖和耐药。研究显示, TAM 通过分泌分泌性磷蛋白 (secreted phosphoprotein 1, SPP-1)^[30] 和促进自噬^[31] 等方式促进肿瘤细胞对奥沙利铂药物的抗性。此外, 有研究显示, 肿瘤微环境中的肿瘤细胞可诱导内皮细胞分化为 TEC, 进而促进肿瘤细胞的药物治疗抵抗及转移^[32-34]。

为了进一步明确各种微环境细胞影响 LoVo 细胞药物敏感性的程度, 我们将结直肠癌细胞 LoVo 分别与 CAF、THP-1 细胞和 HUVEC 各自进行共培养, 并加入奥沙利铂药物。48 h 后的细胞死活染色结果 (图 7a~c) 及定量分析结果 (图 7d) 显示, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂作用浓度下, 与 CAF 或 THP-1 共培养的 LoVo 细胞存活率均在 95% 以上。而与 HUVEC 共培养的 LoVo 细胞存活率为 86%, 低于与 3 种微环境细胞共培养时的存活率。

因此, 我们推测在本研究体系中存在肿瘤细胞

与微环境细胞的相互作用, 各种微环境细胞不同程度参与了肿瘤细胞 LoVo 对奥沙利铂的药物抗性。其中, CAF 细胞与巨噬细胞的作用更为主要。但从结果可以看到, 相对于 CAF, 奥沙利铂对 HUVEC 和巨噬细胞的增殖抑制作用更为明显, 因此, 从对抗药性的影响程度而言 CAF 的贡献可能更大。

此外, 有研究表明在 TME 中的基质细胞之间也存在相互作用, 如 CAF 可以促进巨噬细胞极化为 TAM^[35]; CAF 外泌体中的微小 RNA-10a-5p (miR-10a-5p) 能够促进内皮细胞的增殖和血管生成^[36]。TAM 外泌体中的微小 RNA-221-3p (miR-221-3p) 能促内皮细胞增殖^[37]。因此推测, 在本体系中 CAF、THP-1 细胞及 HUVEC 之间也可能存在相互作用, 间接影响了 LoVo 细胞对奥沙利铂药物的敏感性, 这也提示本研究建立的共培养体系在明确肿瘤微环境对药物敏感性作用方面具有良好的应用潜能。

2.6 共培养体系分析多细胞环境下奥沙利铂药物敏感性的适用性评估

前述实验证明, 本体系中微环境细胞与肿瘤细胞之间存在相互作用, 各种微环境细胞不同程度参与了肿瘤细胞 LoVo 对奥沙利铂的药物抗性。为了考察本体系是否适用于研究其他肿瘤细胞与微环境细胞之间的相互作用及药物敏感性, 我们选取了另外一种结直肠癌细胞 HCT 116、结直肠癌患者来源的 CAF、巨噬细胞 (由 THP-1 诱导成为 M0 型巨噬细胞) 和血管内皮细胞 (HUVEC), 构建共培养系统并加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的奥沙利铂药物, 研究此微环境对 HCT 116 细胞药物敏感性的影响。图 8a~c 显示, 共培养 48 h 后, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂药物的作用浓度下, 单独培养的 HCT 116 存活率为 78%, 而共培养条件下为 96%。共培养条件下的 HCT 116 细胞表现出明显的药物抗性, 药物敏感性发生了改变。Gonçalves-Ribeiro 等^[38]的研究显示, CAF 分泌的细胞因子、趋化因子和其他可溶性因子通过影响 HCT 116 细胞的增殖促进其对奥沙利铂药物的抵抗作用。Lan 等^[39]的研究表明, TAM 可通过提高 METTL3 介导的细胞 m6A 修饰实现其对奥沙利铂药物抗性。因此, 我们认为, HCT 116 细胞的药物敏感性的改变可能同样源于共培养体系中微环境细胞对 HCT 116 细胞行为的影响。并且本体系可用于分析不同肿瘤细胞在复杂环境下药物敏感性的变化。

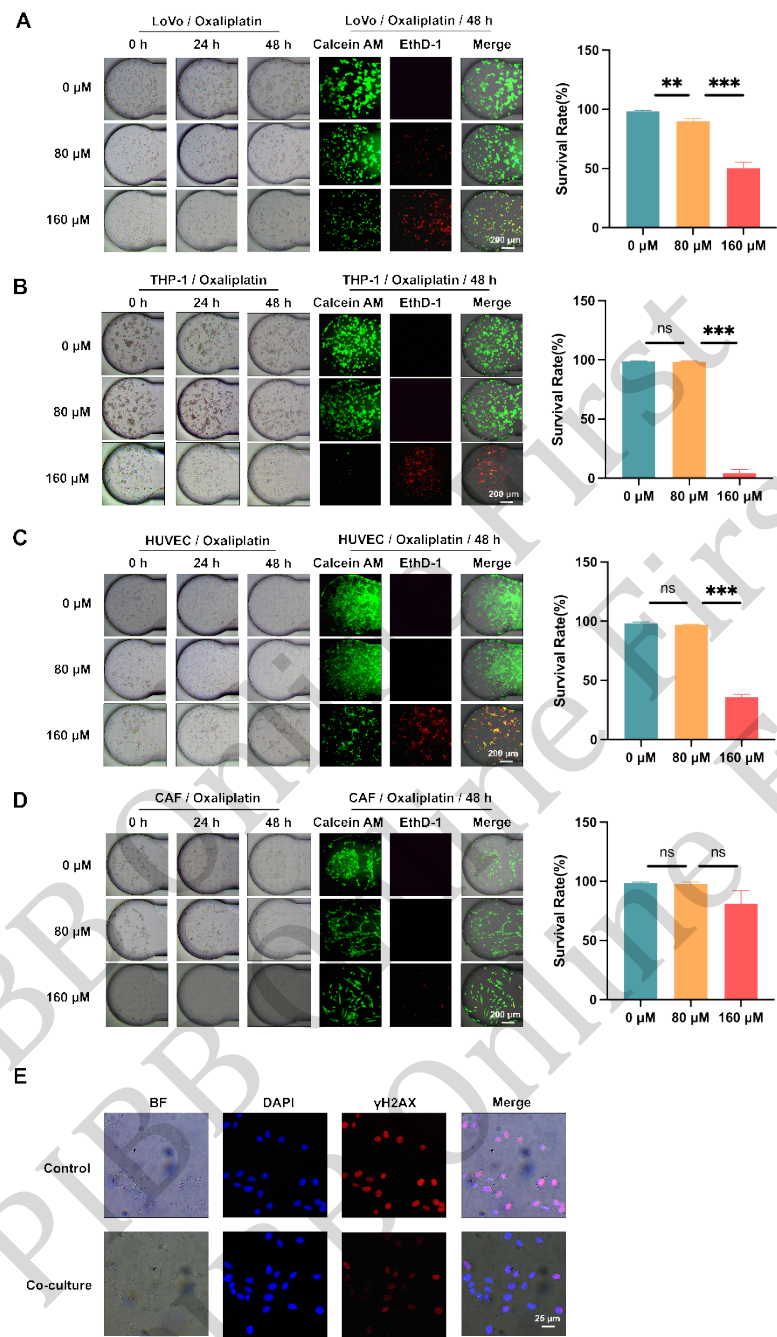


Fig. 6 Co-culture of tumor-microenvironment cells and analysis of oxaliplatin sensitivity

(a) Images, live/dead staining and survival rate of LoVo cells under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (b) Images, live/dead staining and survival rate of THP-1 under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (c) Images, live/dead staining and survival rate of HUVEC under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (d) Images, live/dead staining and survival rate of CAF under different concentrations of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (e) Immunofluorescence detection of DNA double-strand breaks related molecular under co-culture condition. $n=3$ for each data set. $***<0.001$, $**<0.01$, $ns>0.05$ as calculated from Student's t -test.

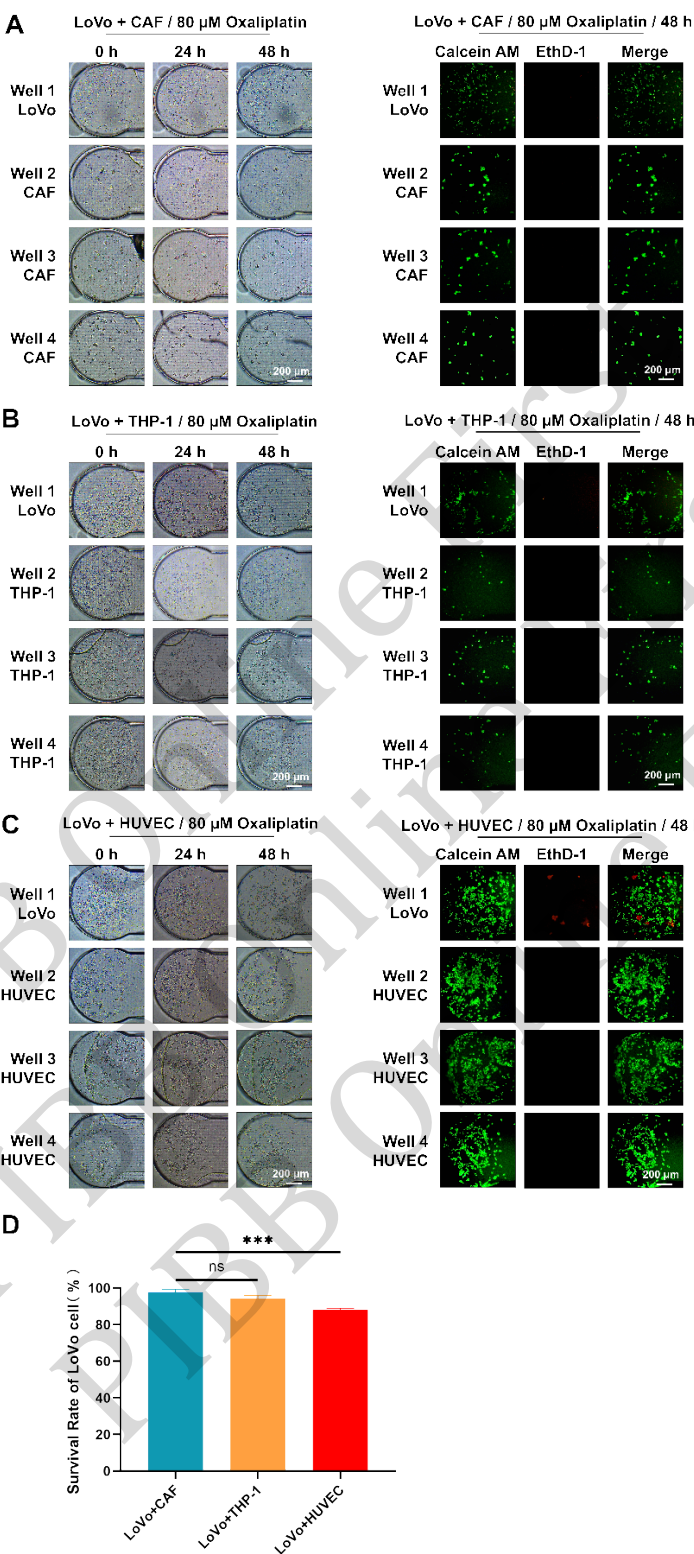


Fig. 7 Oxaliplatin sensitivity analysis of LoVo cell co-cultured with different microenvironment cells in co-culture droplet microfluidic chip

(a) Images and live/dead staining of LoVo cells co-cultured with CAF under effect of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (b) Images and live/dead staining of LoVo cells co-cultured with THP-1 under effect of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (c) Images and live/dead staining of LoVo cells co-cultured with HUVEC under effect of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (d) Survival rate of LoVo cells co-cultured with different microenvironment cells under effect of oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip after 48 h. $n=3$ for each data set. *** <0.001 , $ns>0.05$ as calculated from Student's t -test.

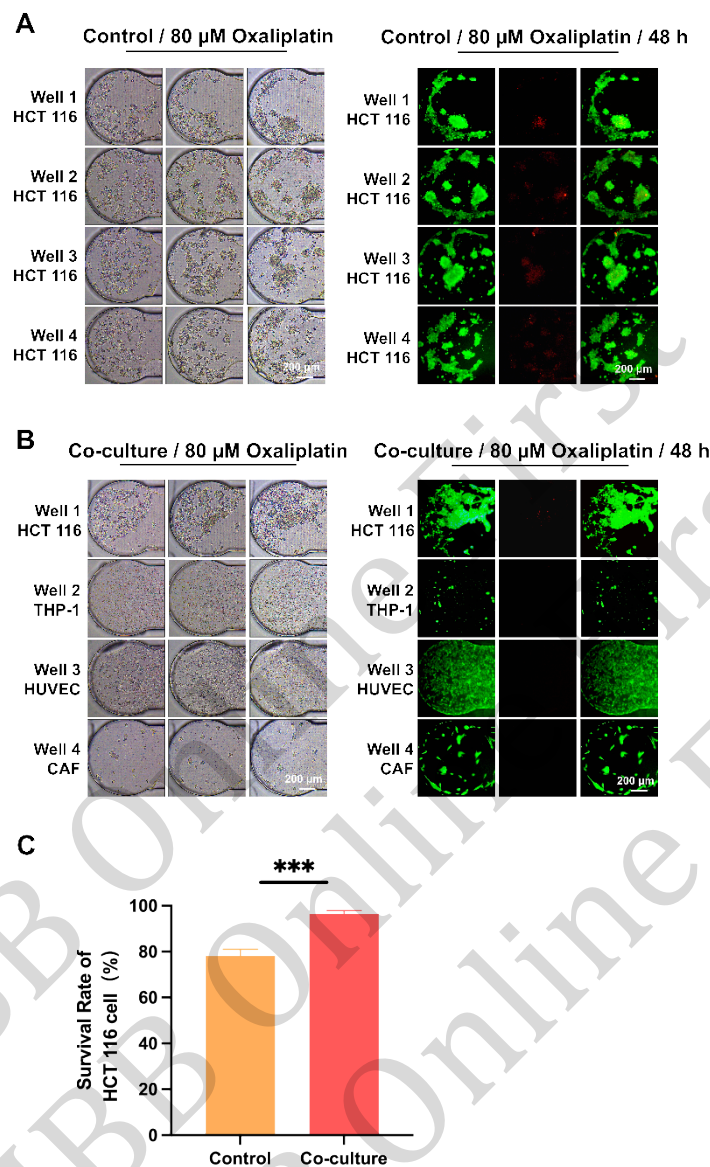


Fig. 8 Oxaliplatin sensitivity analysis of HCT 116 cell under co-culture condition in co-culture droplet microfluidic chip
(a) Images and live/dead staining of HCT 116 cells under 80 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (b) Images and live/dead staining of HCT 116, THP-1, HUVEC and CAF under 80 $\mu\text{mol/L}$ oxaliplatin in co-culture droplet microfluidic chip. (c) Survival rate of HCT 116 under under control or co-culture condition. $n=3$ for each data set. *** <0.001 , as calculated from Student's t -test.

3 结论

本研究首次在液滴体系中实现了肿瘤微环境主要构成细胞的共培养及药物敏感性分析。研究发现，不同微环境细胞间的串扰强烈影响肿瘤细胞对奥沙利铂的药物敏感性，提示靶向肿瘤微环境细胞间的相互作用是改善肿瘤治疗疗效的有效策略。本研究为抗肿瘤药物的疗效评估以及新型药物的筛选提供了新的方法和手段。此外，不同于常规微流控芯片的键合式封闭结构，本研究采用开口式的结构

设计，可方便地移取液滴内的细胞，结合各种组学技术，进行共培养及药物作用下的细胞分子特性分析，可望为阐述药物作用机制及发现微环境条件下新的药物作用靶点提供新方法和实验依据。

液滴的小体积特性使其营养供给有限，不太适合细胞的长期生存。后续拟通过发展换液技术实现液滴中多种细胞的长时间共培养，以探究不同类型肿瘤细胞与其特定微环境之间的长程相互作用及药物敏感性变化。此外，目前的液滴生成方式还需人工辅助，后续拟通过与自动化液滴生成装置结合，

实现特定TME中不同药物剂量或药物组合治疗效果的高通量检测和评估, 便于针对性地指导临床用药及治疗。

参考文献

- [1] Pomeroy A E, Schmidt E V, Sorger P K, *et al.* Drug independence and the curability of cancer by combination chemotherapy. *Trends Cancer*, 2022, **8**(11): 915-929
- [2] Knezevic C E, Clarke W. Cancer chemotherapy: the case for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*, 2020, **42**(1): 6-19
- [3] Baskar G, Palaniyandi T. Advancing triple-negative breast cancer therapy: 3D *in vitro* models to unravel drug resistance mechanisms and tumor microenvironment interactions. *Acta Histochem*, 2025, **127**(4): 152282
- [4] Franzè M S, Saffioti F, Mavroedis V K. Interactions between tumor microenvironment and resistance to transarterial and systemic treatments for HCC. *Cancer Drug Resist*, 2025, **8**: 33
- [5] Soysal S D, Tzankov A, Muenst S E. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. *Pathobiology*, 2015, **82**(3/4): 142-152
- [6] Yoo J, Jung Y, Char K, *et al.* Advances in cell coculture membranes recapitulating *in vivo* microenvironments. *Trends Biotechnol*, 2023, **41**(2): 214-227
- [7] Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, **25**: 95-102
- [8] Mi S, Liu Z, Du Z, *et al.* Three-dimensional microfluidic tumor-macrophage system for breast cancer cell invasion. *Biotechnol Bioeng*, 2019, **116**(7): 1731-1741
- [9] Li X, Li W, Wang J, *et al.* Establishment of a novel microfluidic co-culture system for simultaneous analysis of multiple indicators of gefitinib sensitivity in colorectal cancer cells. *Mikrochim Acta*, 2024, **191**(5): 279
- [10] Chen S, Yue S, Ba W, *et al.* A novel radial co-culture microfluidic device for parallel and control detection of tumor cell invasiveness. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2025, **334**: 125942
- [11] Shi L, Liu S, Li X, *et al.* Droplet microarray platforms for high-throughput drug screening. *Microchim Acta*, 2023, **190**(7): 260
- [12] Du G S, Pan J Z, Zhao S P, *et al.* Cell-based drug combination screening with a microfluidic droplet array system. *Anal Chem*, 2013, **85**(14): 6740-6747
- [13] Lee S I, Choi Y Y, Kang S G, *et al.* 3D multicellular tumor spheroids in a microfluidic droplet system for investigation of drug resistance. *Polymers*, 2022, **14**(18): 3752
- [14] Liu X, Wang C, Mao H, *et al.* Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and inflammation in tumor microenvironment: a novel perspective in cancer therapy (Review). *Oncol Rep*, 2025, **54**(2): 93
- [15] Huang Z, Wang N, Dong Y, *et al.* Hypertension-related genes *STOM* *MEF2C* promote proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Cell Res*, 2025, **450**(2): 114692
- [16] Zhang H, Ding Y, Gu L, *et al.* Macrophage regulation of tumor cell dormancy and the dormant niche: an overview in solid tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 2025, **44**(3): 63
- [17] Cords L, Tietscher S, Anzeneder T, *et al.* Cancer-associated fibroblast classification in single-cell and spatial proteomics data. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 4294
- [18] Huang Y, Yang W, Yang L, *et al.* Nrf2 inhibition increases sensitivity to chemotherapy of colorectal cancer by promoting ferroptosis and pyroptosis. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 14359
- [19] Zhang Q, Su M. Sufentanil attenuates oxaliplatin cytotoxicity *via* inhibiting connexin 43-composed gap junction function. *Mol Med Rep*, 2017, **16**(1): 943-948
- [20] Hoshida T, Tsubaki M, Takeda T, *et al.* Oxaliplatin and 5-fluorouracil promote epithelial-mesenchymal transition *via* activation of KRAS/ERK/NF- κ B pathway in KRAS-mutated colon cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2025, **480**(5): 2985-2999
- [21] Carrato A, Gallego J, Díaz-Rubio E. Oxaliplatin: results in colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, **44**(1): 29-44
- [22] Chiu S J, Lee Y J, Hsu T S, *et al.* Oxaliplatin-induced γ H2AX activation *via* both p53-dependent and-independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact*, 2009, **182**(2/3): 173-182
- [23] Dibitetto D, Liptay M, Vivalda F, *et al.* H2AX promotes replication fork degradation and chemosensitivity in BRCA-deficient tumours. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 4430
- [24] Leifert W R, Siddiqui S M. γ H2AX is a biomarker of modulated cytostatic drug resistance. *Cytometry A*, 2015, **87**(8): 692-695
- [25] Wang Z, Guo X, Li X, *et al.* Cancer-associated fibroblast-derived MMP11 promotes tumor progression in pancreatic cancer. *Cancer Sci*, 2025, **116**(3): 643-655
- [26] Zhou X, Han J, Zuo A, *et al.* THBS2⁺ cancer-associated fibroblasts promote EMT leading to oxaliplatin resistance *via* COL8A1-mediated PI3K/AKT activation in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2024, **23**(1): 282
- [27] Pan Y, Yu Y, Wang X, *et al.* Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front Immunol*, 2020, **11**: 583084
- [28] Munir M T, Kay M K, Kang M H, *et al.* Tumor-associated macrophages as multifaceted regulators of breast tumor growth. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(12): 6526
- [29] Li C, Xu X, Wei S, *et al.* Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J Immunother Cancer*, 2021, **9**(1): e001341
- [30] Umeda H, Shigeyasu K, Takahashi T, *et al.* ADAR1-high tumor-associated macrophages induce drug resistance and are therapeutic targets in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2025, **24**(1): 116
- [31] Fu X T, Song K, Zhou J, *et al.* Tumor-associated macrophages modulate resistance to oxaliplatin *via* inducing autophagy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*, 2019, **19**: 71
- [32] Ribatti D. The crossroad between tumor and endothelial cells. *Clin Exp Med*, 2024, **24**(1): 227
- [33] De Sanctis F, Ugel S, Facciponte J, *et al.* The dark side of tumor-associated endothelial cells. *Semin Immunol*, 2018, **35**: 35-47

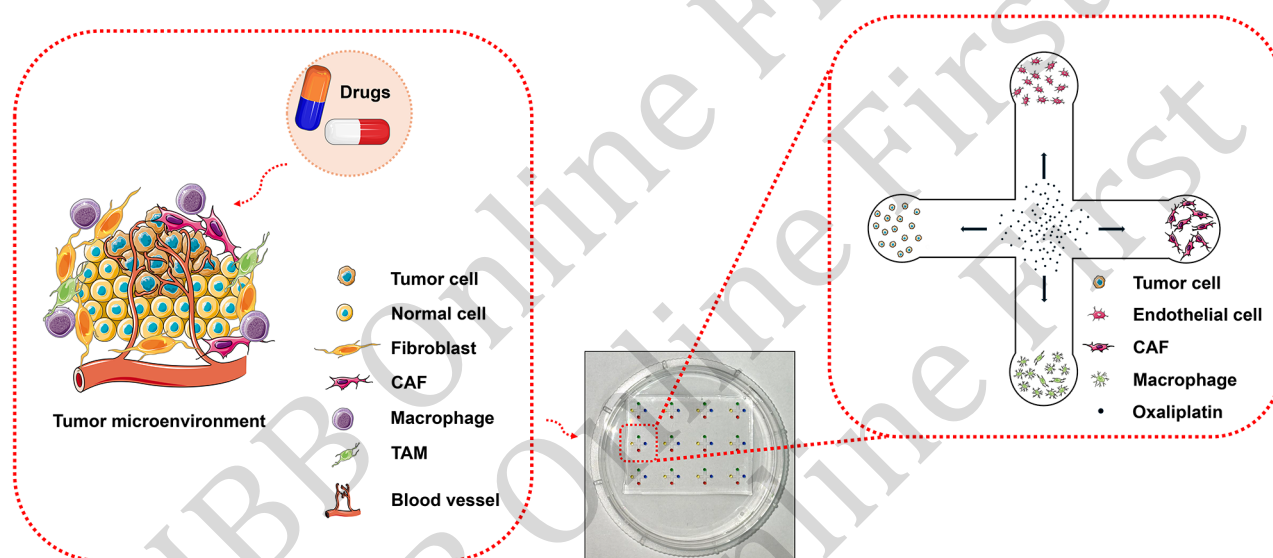
- [34] Hida K, Kikuchi H, Maishi N, *et al.* ATP-binding cassette transporters in tumor endothelial cells and resistance to metronomic chemotherapy. *Cancer Lett*, 2017, 400: 305-310
- [35] Gunaydin G. CAFs interacting with TAMs in tumor microenvironment to enhance tumorigenesis and immune evasion. *Front Oncol*, 2021, **11**: 668349
- [36] Zhang X, Wang Y, Wang X, *et al.* Extracellular vesicles-encapsulated microRNA-10a-5p shed from cancer-associated fibroblast facilitates cervical squamous cell carcinoma cell angiogenesis and tumorigenicity *via* Hedgehog signaling pathway. *Cancer Gene Ther*, 2021, **28**(5): 529-542
- [37] Cheng X, Zhou H, Zhou Y, *et al.* M2 macrophage-derived exosomes inhibit apoptosis of HUVEC cell through regulating miR-221-3p expression. *Biomed Res Int*, 2022, **2022**: 1609244
- [38] Gonçalves-Ribeiro S, Díaz-Maroto N G, Berdiel-Acer M, *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts affect sensitivity to oxaliplatin and 5FU in colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 2016, **7**(37): 59766-59780
- [39] Lan H, Liu Y, Liu J, *et al.* Tumor-associated macrophages promote oxaliplatin resistance *via* METTL3-mediated m(6)A of TRAF5 and necroptosis in colorectal cancer. *Mol Pharm*, 2021, **18**(3): 1026-1037

Establishment of a Multicellular Co-culture System Based on Droplet Microfluidic Chip for Analysis of Antitumor Drug Sensitivity*

ZHANG Xue-Tong, CHEN Shuo, FANG Jin**

(Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Education, Key Laboratory of Cell Biology, National Health Commission, School of Life Science, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Graphical abstract



Abstract Objective This study aimed to construct a cell co-culture microfluidic chip based on droplet microfluidic to investigate the influence of multicellular interactions in complex microenvironments on the sensitivity of anti-tumor drugs. **Methods** We constructed a droplet microfluidic chip consisting of 12 co-culture units, with each unit containing 4 microwells for holding cell droplets, enabling the co-culture of 4 types of cells. To evaluate whether the co-culture of multiple cell types can be achieved in the droplet microfluidic chip, as well as to observe and analyze the interactions between different cell types, we investigated the interaction between microenvironmental cells and tumor cells through cell co-culture experiments. To construct a stable co-culture system capable of evaluating drug sensitivity, we conducted diffusion experiments with blue ink and model drugs to investigate the ability of drugs to diffuse in the chip and be taken up by cells. To investigate the effect of the complex microenvironment on cellular drug sensitivity, we carried out cell co-culture experiments combined with drug treatment to explore the changes in the drug sensitivity of tumor cells in the presence of microenvironmental cells. To explore the reasons for drug resistance in tumor cells under co-culture conditions, we detected DNA double-strand break marker using immunofluorescence. **Results** Experiments on cell culture within droplets showed that cells in each droplet exhibited good proliferation ability and consistent cell status, laying a foundation for the co-culture of multiple kind of cells. Cell co-culture experiments showed that compared with the mono-culture group, the numbers of LoVo cells, HUVECs, and macrophages in the co-culture group increased significantly. This confirms that there are obvious interactions between cancer-associated fibroblasts (CAFs),

endothelial cells (HUVECs), macrophages, and tumor cells in the microenvironment, which promotes cell proliferation in the co-culture chip. Experiments on blue ink diffusion showed that drugs could diffuse uniformly and effectively into wells in different directions within the chip. Experiments on the diffusion of doxorubicin (a model drug) demonstrated that identical cells in different wells exhibited consistent drug uptake capacity for the drug. Additionally, cell co-culture experiments combined with oxaliplatin treatment revealed that with the concentration of 80 $\mu\text{mol/L}$, the survival rate of LoVo cells cultured alone was only 25%, whereas it reached 96% under co-culture conditions. with the concentration of 160 $\mu\text{mol/L}$, the survival rate of LoVo cells cultured alone was merely 2%, while that under co-culture conditions was 50%. These results indicate that the complex microenvironment composed of CAFs, HUVECs, and macrophages significantly reduces the drug sensitivity of LoVo cells to oxaliplatin through intercellular interactions. The immunofluorescence results showed that the expression level of γH2AX in LoVo cells decreased under co-culture conditions. **Conclusion** Our study achieved co-culture of the main constituent cells of the tumor microenvironment and analysis of their drug sensitivity in a droplet microfluidic chip for the first time. The research found that crosstalk between different microenvironmental cells strongly affects the drug sensitivity of tumor cells to oxaliplatin, suggesting that targeting the interactions between tumor microenvironmental cells is an effective strategy to improve the efficacy of tumor therapy. Our study provides new methods and approaches for the efficacy evaluation of anti-tumor drugs and the screening of new drugs. In addition, the open structural design of the co-culture chip can be combined with various omics technologies to analyze the molecular characteristics of cells under co-culture and drug treatment conditions. This is expected to provide new methods and experimental evidence for elucidating the mechanisms of drug action and identifying novel drug targets in the context of the microenvironment.

Key words droplet microfluidic, tumor microenvironment, co-culture, drug sensitivity

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0441

CSTR: 32369.14.pibb.20250441

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82473153, 82073291, 81672920).

** Corresponding author.

Tel: 86-13386887570, E-mail: jfang@cmu.edu.cn

Received: October 10, 2025 Accepted: December 15, 2025