

基于 3D 生物打印的鼻咽癌微球体模型构建及其对免疫治疗 药物响应情况研究

李 谊^{*}, 麻文来[#], 谢玉菊, 胡浩磊, 邢培梅, 张亚戈, 岳 玮, 蔡一宁, 袁 星

中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院耳鼻喉科 河南郑州

【摘要】目的 基于 3D 生物打印构建鼻咽癌微球体模型并分析该模型对免疫治疗药物的响应情况, 以期为临床制定个性化治疗计划和方案提供指导。**方法** 通过 3D 生物打印技术构建含有免疫细胞与肿瘤细胞的复杂微球体模型, 将未经处理的微球体模型归入至对照组, 将添加 PD-1 抗体的微球体模型归入至 PD-1 抗体组, 将添加 CTLA-4 抗体的微球体模型归入至 CTLA-4 模型, 将同时添加 PD-1 抗体与 CTLA-4 抗体的微球体模型归入至联合组。通过体内实验验证基于 3D 生物打印的鼻咽癌微球体模型对免疫治疗药物的响应, 将未经处理的人源化小鼠归入至对照组, 将接受 PD-1 抗体的小鼠归入至 PD-1 抗体组, 将接受 CTLA-4 抗体的小鼠归入至 CTLA-4 抗体组, 将同时接受 PD-1 抗体与 CTLA-4 抗体的小鼠归入至联合组。分析各组体外实验结果及体内实验结果。**结果** 与 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组及联合组相比, 对照组鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞 G₀/G₁ 期占比、细胞凋亡率更第, PD-L1、CD8⁺ 键蛋白表达水平及 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素 γ (IFN- γ) 水平更高 (P<0.05), 与联合组相比, PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞 G₀/G₁ 期占比、细胞凋亡率更低, PD-L1、CD8⁺ 及 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 表达水平更高 (P<0.05)。PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组不同时间肿瘤体积均小于对照组, 联合组不同时间肿瘤体积均小于对照组及 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组 (P<0.05)。对照组 CD45、CD8⁺ 表达水平高于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组及合组 (P<0.05), 联合组 CD45、CD8⁺ 表达水平低于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组, CD4⁺ 表达水平高于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组 (P<0.05)。**结论** 通过 3D 生物打印构建鼻咽癌微球体模型可对免疫治疗药物响应情况进行准确评估, 能够为临床合理选择治疗药物提供指导。

【关键词】 鼻咽癌; 3D 生物打印; 鼻咽癌微球体模型; 免疫治疗药物; 响应情况

【基金项目】 国家卫生健康委能力建设和继续教育中心科研基金资助 (GWJJB202510022177): 基于 3D 生物打印的鼻咽癌微球体模型构建及其对免疫治疗药物的响应研究; 联勤临床重点学科建设项目经费自资助

【收稿日期】 2026 年 4 月 17 日

【出刊日期】 2026 年 5 月 19 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20260224

Construction of nasopharyngeal carcinoma microsphere model based on 3d bioprinting and its response to immunotherapy drugs

Yi Li^{*}, Wenlai Ma[#], Yuju Xie, Haolei Hu, Peimei Xing, Yage Zhang, Wei Yue, Yining Cai, Xing Yuan

Department of Otolaryngology, 988th Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Zhengzhou, Henan

【Abstract】 Objective To construct a nasopharyngeal carcinoma microsphere model based on 3D bioprinting and analyze its response to immunotherapy drugs, aiming to provide guidance for the development of personalized treatment plans and protocols in clinical practice. **Methods** Complex microsphere models containing immune cells and tumor cells were constructed using 3D bioprinting technology. Untreated microsphere models were assigned to the control group, microsphere models with added PD-1 antibody were assigned to the PD-1 antibody group, microsphere models with added CTLA-4 antibody were assigned to the CTLA-4 model group, and microsphere models with added PD-1 and CTLA-4

[#]共同第一作者: 李谊, 麻文来;

^{*}通讯作者: 李谊, 男, 河南人, 主任医师, 医学博士, 主要研究方向为鼻咽部肿瘤。

antibodies were assigned to the combined group. In vivo experiments were conducted to verify the response of a 3D bioprinted nasopharyngeal carcinoma microsphere model to immunotherapy drugs. Untreated humanized mice were assigned to the control group, mice receiving PD-1 antibody were assigned to the PD-1 antibody group, mice receiving CTLA-4 antibody were assigned to the CTLA-4 antibody group, and mice receiving both PD-1 and CTLA-4 antibodies were assigned to the combination group. The in vitro and in vivo experimental results for each group were analyzed. **Results** Compared with the PD-1 antibody group, CTLA-4 antibody group, and combination group, the control group had a lower proportion of nasopharyngeal carcinoma cells and PMBCs in the G_0/G_1 phase, a lower apoptosis rate, and higher levels of PD-L1, CD8⁺ bond protein expression, TNF- α , IL-2, IFN- γ , tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), and interferon- γ (IFN- γ) ($P < 0.05$). Compared with the combination group, the PD-1 antibody group and CTLA-4 antibody group had a lower proportion of nasopharyngeal carcinoma cells and PMBCs in the G_0/G_1 phase, a lower apoptosis rate, and higher levels of PD-L1, CD8⁺, TNF- α , IL-2, and IFN- γ expression ($P < 0.05$). The tumor volume in the PD-1 antibody group and CTLA-4 antibody group was smaller than that in the control group at different time points, while the tumor volume in the combination group was smaller than that in the control group, the PD-1 antibody group, and the CTLA-4 antibody group at different time points ($P < 0.05$). The expression levels of CD45 and CD8⁺ in the control group were higher than those in the PD-1 antibody group, CTLA-4 antibody group, and the combined group ($P < 0.05$). In the combined group, the expression levels of CD45 and CD8⁺ were lower than those in the PD-1 antibody group and CTLA-4 antibody group, while the expression level of CD4⁺ was higher than that in the PD-1 antibody group and CTLA-4 antibody group ($P < 0.05$). **Conclusion** Constructing a nasopharyngeal carcinoma microsphere model using 3D bioprinting can accurately assess the response to immunotherapy drugs, providing guidance for the rational selection of treatment drugs in clinical practice.

【 Keywords 】 Nasopharyngeal carcinoma; 3D bioprinting; Nasopharyngeal carcinoma microsphere model; Immunotherapy drugs; Response

癌症属于全世界范围内公共卫生及安全问题，癌症与全球 1/6 非传染性疾病及 1/4 死亡存在关联^[1-2]。鼻咽癌属于临床多发性头颈部恶性肿瘤，患者面临较高的死亡风险，免疫治疗对于控制癌症进展等能够发挥重要作用，临床常用程序性死亡受体 1 (PD-1) 抗体及细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4) 抗体等免疫治疗药物可通过使肿瘤微环境中免疫抑制获得解除的方式使机体免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用得到激活^[3-4]。但是由于不同患者对免疫治疗的响应存在差异，部分患者预后较好，而部分患者则会出现耐药现象，故而建立能够对准确预测患者对免疫治疗药物响应的体外模型有助于辅助临床制定治疗方案。3D 生物打印模型能够针对复杂细胞的空间分布情况进行精准控制，而且能够减少制作成本并提高制作速度，适用于高通量稍差以及肿瘤微环境相关的肿瘤研究^[5-6]。3D 肿瘤模型在临床用药及治疗效果研究等方面的应用价值均较高，可通过针对患者来源组织 3D 模型进行打印的方式实现个性化治疗，能够辅助免疫治疗等多种手段，可作为临床治疗癌症的重要手段^[7-9]。本次研究构建基于 3D 生物打印的鼻咽癌微球体模型并针对该模型对免疫治

疗药物的响应情况进行分析，报告如下。

1 资料与方法

1.1 细胞株及实验动物

本研究使用人高转移鼻咽癌细胞系 5-8F (上海弘顺生物科技有限公司) 80 份和人外周血单个核细胞 (PBMCs) (由上海赛笠百傲生物医药有限公司) 80 份。将细胞分为 4 组 (每组 20 份): 对照组、PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组、联合组, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。同时, 将 80 只人源化小鼠 (珠海百事通生物科技有限公司) 随机分为上述 4 组, 每组 20 只。

1.2 方法

以甲基丙烯酸酯明胶 (GelMA) 作为生物相容性材料并通过 3D 生物打印技术构建含有免疫细胞与肿瘤细胞的复杂微球体模型。自培养瓶中收集鼻咽癌细胞 (人高转移鼻咽癌细胞系 5-8F) 并计数。自健康供者血液中分离出 PBMCs 并应用 Ficol 密度梯度离心法进行分离, 使 GelMA 溶解于 PBS 中, 将 PBMCs 与 5-8F 细胞人高转移鼻咽癌细胞系按照一定比例混合并加入至有光引发剂的 GelMA 溶液中, 应用 3D 生物打印机将混合物逐层打印成微球体模型 (直径: 500 μ m),

完成打印后以紫外光照射固化微球体模型并将模型置于 DMEM 模型 (含 10%FBS) 中, 在培养箱 (培养条件: 5% CO₂、37°C) 中连续孵育 24h 以使其稳定生长。将未经处理的微球体模型归入至对照组, 将添加 PD-1 抗体的微球体模型归入至 PD-1 抗体组, 将添加 CTLA-4 抗体的微球体模型归入至 CTLA-4 模型, 将同时添加 PD-1 抗体与 CTLA-4 抗体的微球体模型归入至联合组^[10-11]。

通过体内实验验证基于 3D 生物打印的鼻咽癌微球体模型对免疫治疗药物的响应, 构建人源化小鼠异种移植肿瘤模型, 选择具有功能性人类 T 细胞的 BLT 小鼠或 hu-PBMC-NSG 小鼠建立人源化小鼠异种移植瘤模型, 确保微球体在小鼠皮下组织中均匀分布, 避免出现过度聚集现象。将未经处理的人源化小鼠归入至对照组, 将接受 PD-1 抗体的小鼠归入至 PD-1 抗体组, 将接受 CTLA-4 抗体的小鼠归入至 CTLA-4 抗体组, 将同时接受 PD-1 抗体与 CTLA-4 抗体的小鼠归入至联合组。

1.3 观察指标

(1) 分析体外实验结果, 包括鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞周期分布、细胞凋亡率情况, 通过 MTT 法联合荧光标记技术标记鼻咽癌细胞与 PMBCs, 通过 FACs 分析细胞周期分布、细胞凋亡率与免疫细胞浸润

情况。通过酶联免疫吸附法检测细胞因子分泌情况, 包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素 γ (IFN- γ), 通过 IHC 检测关键蛋白表达情况包括 PD-L1 及 CD8⁺。

(2) 分析体内实验结果, 体内实验后第 7d 计算各组小鼠肿瘤体积, 通过游标卡尺测量肿瘤最短径与最长径并计算肿瘤体积: $V=(L \times W^2)/2$ 。通过 Western blot 法检测免疫细胞浸润指标水平, 包括 CD45、CD4⁺、CD8⁺。

1.4 统计学分析

以 SPSS 26.0 分析数据, 均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示计量资料, 组间差异通过 t 检验; 两组数据间的方差比值用 F 检验; 频数 (n) 与百分比 (%) 表示计数资料, χ^2 检验样本率差异。P 值 < 0.05: 差异显著。

2 结果

2.1 体外实验结果分析

对照组鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞 G₀/G₁ 期占比、细胞凋亡率低于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组及联合组, PD-L1、CD8⁺ 键蛋白表达水平及 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 水平更高 (P < 0.05), PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞 G₀/G₁ 期占比、细胞凋亡率表达水平低于联合组, PD-L1、CD8⁺ 及 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 水平更高 (P < 0.05), 见表 1、表 2、表 3。

表 1 鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞周期分布、细胞凋亡率情况 [n (%); n=20]

分组	鼻咽癌细胞				PMBCs 细胞			
	细胞周期分布			细胞凋亡率 (%)	细胞周期分布			细胞凋亡率 (%)
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	
对照组	6 (30.00)	11 (55.00)	3 (15.00)	20.07 \pm 3.04	12 (60.00)	8 (40.00)	0	18.97 \pm 2.75
PD-1 抗体组	13 (65.00)	7 (35.00)	0	25.09 \pm 3.11	17 (85.00)	3 (15.00)	0	21.37 \pm 2.68
CTLA-4 抗体组	14 (70.00)	6 (30.00)	0	26.14 \pm 3.05	16 (80.00)	4 (20.00)	0	21.42 \pm 2.65
联合组	18 (90.00)	2 (10.00)	0	30.01 \pm 3.02	19 (95.00)	1 (5.00)	0	24.67 \pm 2.39
χ^2/F	8.014	5.359	2.907	4.010	7.219	7.025	-	5.146
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	-	<0.05

表 2 细胞因子分泌情况 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$; n=20)

分组	TNF- α	IL-2	IFN- γ
对照组	2369.27 \pm 57.26	35.26 \pm 6.75	678.26 \pm 31.79
PD-1 抗体组	1987.26 \pm 48.16	30.01 \pm 5.24	520.14 \pm 29.26
CTLA-4 抗体组	1991.37 \pm 49.02	29.97 \pm 5.20	517.19 \pm 25.69
联合组	1523.06 \pm 45.06	22.31 \pm 4.89	375.16 \pm 20.06
F	72.014	5.119	21.309
P	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 关键蛋白表达情况 (% , $\bar{x} \pm s$, n=20)

分组	PD-L1	CD8 ⁺
对照组	49.57±8.06	25.36±4.02
PD-1 抗体组	42.01±7.82	22.05±3.75
CTLA-4 抗体组	41.98±7.75	21.89±3.47
联合组	32.06±7.56	17.58±3.42
<i>t</i>	5.017	4.897
<i>P</i>	<0.05	<0.05

2.2 体内实验结果分析

对照组小鼠第 3d、第 5d、第 7d 肿瘤体积呈升高趋势 ($P<0.05$)，PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组、联合组第 3d、第 5d、第 7d 肿瘤体积呈下降趋势 ($P<0.05$)。PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组不同时间肿瘤体积均小于对照组，联合组不同时间肿瘤体积均小于对照组及 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组 ($P<0.05$)。PD-1 抗体组及 CTLA-4 抗体组不同时间肿瘤体积差异无统计

学意义 ($P>0.05$)。对照组 CD45、CD8⁺表达水平高于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组及合组 ($P<0.05$)，联合组 CD45、CD8⁺表达水平低于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组，CD4⁺表达水平高于 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组 ($P<0.05$)，PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组各项免疫细胞表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见表 4、表 5。

表 4 肿瘤体积 (mm³, $\bar{x} \pm s$)

分组 (n=20)	第 3d	第 5d	第 7d
对照组	521.26±26.09	578.36±21.09	631.68±23.45
PD-1 抗体组	407.26±30.06	358.26±20.06	327.25±20.01
CTLA-4 抗体组	411.29±32.08	355.79±21.06	330.19±20.17
联合组	303.15±24.06	227.58±20.76	187.26±19.87
<i>F</i>	29.307	31.260	33.024
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

表 5 免疫细胞浸润 (10⁸/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	CD45	CD4 ⁺	CD8 ⁺
对照组	51.26±4.21	30.57±3.19	22.47±3.65
PD-1 抗体组	45.17±4.17	33.59±3.06	20.05±3.21
CTLA-4 抗体组	44.24±4.06	31.01±3.12	20.19±3.20
联合组	30.01±4.19	39.17±3.02	17.59±3.20
<i>F</i>	3.215	3.078	4.562
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

3D 生物打印技术可针对细胞与基质空间分布进行精确控制，现已成为构建体外肿瘤模型的重要选择。3D 生物打印技术不但能够对真实的肿瘤微环境进行模拟，还能够针对多种细胞类型进行整合，从而形成多细胞生态系统，有助于使肿瘤的生物学特性获得全面反映^[12-14]。

此次研究中，对照组、PD-1 抗体组、CTLA-4 抗

体组及联合组鼻咽癌细胞及 PMBCs 细胞周期分布、细胞凋亡率、细胞因子分泌以及关键蛋白表达水平差异具有统计学意义 ($P<0.05$)，对照组小鼠与 PD-1 抗体组、CTLA-4 抗体组、联合组小鼠肿瘤体积、免疫细胞浸润水平差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)^[15-17]。通过分析可知，通过 3D 生物打印构建的肿瘤模型能够对免疫治疗药物对肿瘤细胞增殖、迁移以及凋亡等行为产生的影响进行监测，还可针对免疫微环境中的免

疫细胞浸润等关键指标变化情况进行检测,有助于为实施个性化医疗以及研发新型免疫治疗药物提供技术支持与理论依据,能够使研究人员深入了解免疫治疗药物对鼻咽癌微球体模型的响应情况,有望为临床精准治疗鼻咽癌提供参考和指导,使患者的治疗有效率获得提高^[18-20]。

综上所述,基于 3D 生物打印构建的鼻咽癌微球体模型能够在一定程度上模拟肿瘤微环境并反映免疫治疗药物的效应,为临床前药物筛选和个性化治疗方案的探索提供了新的实验工具,但其临床转化价值仍需进一步验证。

参考文献

- [1] Bray F,Laversanne M,Sung H,et al.Global cancer statistics 2022:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].CA Cancer J Clin,2024,74(3):229-263.
- [2] Sharma R,Restan PM,Dasilva VA,et al.3D bioprinting complex models of cancer[J].Biomater Sci,2023,11(10):3414-3430.
- [3] Cheng SN,Li YX,Yu CG,et al.3D bioprinted tumour-vascular co-culture scaffold for breast cancer bone metastasis modeling and drug testing[J].Chem Eng J,2023,476:146685.
- [4] 刘畅,胡雪峰.3D 生物打印技术及其应用[J].生物学教学,2023,48(2):4-7.
- [5] 邵静,魏鑫鑫,范栩嫚.鼻咽原发肿瘤微环境中免疫反应对鼻咽癌预后的影响[J].实验与检验医学,2023,41(4):526-529.
- [6] 裴玉,唐春慧.鼻咽癌同步放化疗治疗进程中免疫微环境变化及其与预后的关系[J].中国免疫学杂志,2025,41(4):931-937.
- [7] 刘腾,肖磊,韦波,等.单、双指数模型扩散加权成像及动脉自旋标记预测复发性鼻咽癌近期疗效的应用价值[J].磁共振成像,2023,14(9):63-69.
- [8] 刘一帆,保莎莎,徐男,等.单、双指数模型快速自旋回波扩散加权成像在 T1 期鼻咽癌与淋巴组织增生鉴别诊断中的价值[J].实用放射学杂志,2022,38(9):1410-1414.
- [9] 刘新菊,刘冬梅,邱荣良.综合治疗对局部晚期鼻咽癌的疗效及对外周血 PD-1、sE-cad 和免疫功能的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2024,16(4):661-664,669.
- [10] 徐歆宇,赵朝芬,贺前勇,等.外周血 PD-1、CTLA-4、T-reg、pDC 与鼻咽癌患者临床特征及疗效的相关性[J].现代肿瘤医学,2024,32(1):53-60.
- [11] 张再兴,贾玉静.CTLA-4、FOXP3 在鼻咽癌中的表达及临床价值[J].中国煤炭工业医学杂志,2023,26(5):456-460.
- [12] 高婧婧,宗丹,徐婧姝,等.抗血管生成药物联合 PD-1 抑制剂及化疗对晚期鼻咽癌的疗效与安全性分析[J].南京医科大学学报(自然科学版),2025,45(7):963-972.
- [13] 包俊杰,刘立志,樊卫,等.晚期鼻咽癌患者基线 18F-FDG PET/CT 代谢参数预测免疫治疗效果及预后的价值[J].中华核医学与分子影像杂志,2025,45(3):138-143.
- [14] 吴晓峰,赵建红,李思维,等.基于临床生化参数识别 p16 阴性鼻咽癌同步放化疗联合诱导化疗候选老年人群的列线图模型构建[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2025,32(7):432-438.
- [15] 俞璐璐,万晶,葛宜枝,等.鼻咽癌放化疗治疗患者外周血 PD-1 及免疫指标水平的变化及其临床意义[J].临床和实验医学杂志,2024,23(12):1324-1327.
- [16] 朱绍元,叶远梅,徐歆宇,等.局部晚期鼻咽癌患者诱导化疗联合同期放化疗治疗前后外周血免疫相关指标的变化和意义[J].肿瘤预防与治疗,2024,37(9):757-766.
- [17] 严颀丹,刘利,赵灵逸,等.一项单中心回顾性研究:真实世界中 PD-1 抑制剂在晚期癌症患者免疫治疗中的有效性和安全性[J].肿瘤,2023,43(3):161-170.
- [18] 李霞,李锦,龚华松,等.外周血免疫细胞亚型及 PD-1 表达对鼻咽癌患者免疫状态评估及治疗的指导价值[J].重庆医学,2023,52(8):1166-1170,1176.
- [19] 王瑞莲,谭锦云,卢梓荣,等.鼻咽癌患者经调强放疗序贯抗 PD-1 免疫治疗后甲状腺功能减退的影响因素[J].实用医学杂志,2021,37(16):2114-2118.
- [20] 林冰,周平,刘沙,等.吉西他滨联合顺铂联合程序性细胞死亡受体 1 抗体免疫治疗转移性鼻咽癌有效性及安全性分析[J].临床军医杂志,2022,50(6):642-644,648.

版权声明: ©2026 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

