

·肿瘤机理·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2022.08.0194

# 基于三维培养模型的辐射诱导表观遗传改变研究进展

刘雁<sup>1</sup>, 杜亚蓉<sup>2\*</sup>, 孙坤<sup>1\*</sup>

(1. 西北师范大学 生命科学学院, 中国甘肃 兰州 730070; 2. 中国科学院近代物理研究所, 中国甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 相比于传统的单层细胞培养, 三维细胞培养(three-dimensional cell culture, TDCC)可以更准确地模拟体内细胞的生长环境, 近年来被越来越多地应用于生物基础研究。表观遗传修饰与细胞癌变等许多细胞过程联系紧密。辐射是肿瘤放射治疗的主要手段之一, 肿瘤放射治疗过程常常伴随着细胞表观遗传的动态变化, 它会诱导机体产生包括 DNA 甲基化、染色质重塑、组蛋白修饰和非编码 RNA 调控在内的表观遗传的改变。基于 TDCC 模型探究辐射诱导表观遗传调控发生的机制, 对于肿瘤患者的治疗和防护具有重要意义。

**关键词:** 三维细胞培养(TDCC); 表观遗传调控; 电离辐射; 微 RNA; DNA 甲基化; 染色质重塑

中图分类号: Q813.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)03-0223-06

## Research Progress of Radiation-induced Epigenetic Changes Based on Three-dimensional Culture Model

LIU Yan<sup>1</sup>, DU Yarong<sup>2\*</sup>, SUN Kun<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China; 2. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China)

**Abstract:** Compared with the traditional monolayer culture, three-dimensional cell culture (TDCC) can more accurately simulate the growth environment of cells *in vivo*. In recent years, TDCC has been increasingly used in basic biological research. Epigenetic modification is closely linked to many cellular processes such as cell canceration. Radiation is one of the main means of tumor radiotherapy, the process of which is often accompanied by dynamic epigenetic changes, leading to DNA methylation, chromatin remodeling, histone modification and regulation of non-coding RNA. Exploring the mechanism of radiation-induced epigenetic regulation based on TDCC model is of great significance for treatment and protection of cancer patients.

**Key words:** three-dimensional cell culture (TDCC); epigenetic regulation; ionizing radiation; microRNA; DNA methylation; chromatin remodeling

(Life Science Research, 2023, 27(3): 223-228)

三维细胞培养(three-dimensional cell culture, TDCC)是肿瘤研究的一项重大突破, 因为它可以模拟原发性肿瘤的三维(three-dimensional, 3D)结构。传统的二维(two-dimensional, 2D)单层细胞培养模型反映体内肿瘤发生机制的能力有限, TDCC 模型有助于人们更好地概括体内肿瘤的一些生物学和分子特征, 例如: 肿瘤细胞异质性、细胞-细胞外

基质(extracellular matrix, ECM)相互作用、缺氧微环境、信号通路活动、药物反应以及特定的基因表达和表观遗传模式<sup>[1]</sup>。TDCC 技术为识别肿瘤细胞的生物学特性提供了一个有用的平台, 特别是在转化医学的药物敏感性领域<sup>[2]</sup>, 它有望成为传统 2D 细胞培养和动物实验之间的桥梁, 对肿瘤生物学的进一步研究具有重要意义。

收稿日期: 2022-08-22; 修回日期: 2022-09-28; 网络首发日期: 2022-11-24

基金项目: 甘肃省重点研发计划项目(18YF1NA051); 国家自然科学基金青年科学基金项目(11705248)

作者简介: 刘雁(1996—), 女, 甘肃会宁人, 硕士研究生; \*通信作者: 孙坤(1965—), 男, 甘肃民勤人, 博士, 教授, 主要从事寒旱区植物的物种形成、进化发育等方面的研究, E-mail: kunsun@nwnu.edu.cn; 杜亚蓉(1984—), 女, 陕西韩城人, 博士, 副研究员, 主要从事肿瘤免疫学方向的研究, E-mail: duyrlive@impcas.ac.cn。

表观遗传改变是通过调节基因组的结构和功能而形成的基因表达可遗传的改变,它不是由DNA序列本身变化引起的,它包括一系列分子修饰,如DNA甲基化、染色质重塑、组蛋白修饰和非编码RNA调节等<sup>[3]</sup>。表观遗传调控与恶性肿瘤、神经系统疾病、代谢性疾病等众多疾病不可分割<sup>[4]</sup>,参与从基因达到细胞增殖的许多生物过程,细胞的表观遗传状态异常会导致癌变<sup>[5]</sup>。放射疗法是治疗肿瘤的主要方法之一,它通过电离辐射(ionizing radiation, IR)诱导DNA双链断裂(double-strand breakage, DSB),从而杀死肿瘤细胞,这是最致命的DNA损伤,会改变细胞表观遗传。表观遗传调控可能在辐射与细胞反应之间起重要作用。有学者证明,辐射后基因组DNA甲基化的变化与细胞反应之间存在潜在相关性<sup>[6-8]</sup>。相关研究显示,与2D细胞相比,3D结构细胞具有更高的辐射抗性,其相关机理还有待进一步探究<sup>[9]</sup>。在本综述中,我们将讨论基于TDCC模型的辐射诱导发生的表观遗传修饰,主要包括DNA甲基化、染色质重塑、组蛋白修饰和非编码RNA调控,为肿瘤临床放疗和增敏研究提供坚实的理论基础。

## 1 三维培养模型概述

自20世纪40年代以来,肿瘤学研究都是基于传统的2D单层培养,细胞黏附在特殊设计的玻璃或塑料培养皿底部<sup>[10]</sup>,形成扁平的单层细胞,无限制地暴露于营养、氧气以及药物中,缺乏细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用、肿瘤微环境是这类培养模式的局限性<sup>[11-12]</sup>。此外,2D培养的细胞会改变细胞形态,并导致细胞骨架重排,获得人工极性,进而导致基因和蛋白质表达异常<sup>[13-14]</sup>。与2D培养不同,3D培养形成立体的细胞团,很好地保持了细胞的形态和极性,促进了细胞-细胞和细胞-细胞外基质的相互作用<sup>[15]</sup>,重现了体内肿瘤细胞的微环境,可以更好地反映肿瘤细胞的特征,因而成为肿瘤细胞行为研究的理想模型<sup>[16-17]</sup>。在肿瘤生物学研究中,TDCC能够更好地反映组织结构 and 细胞微环境,能有效缩小2D细胞、动物模型和临床研究之间的差距<sup>[18]</sup>。

TDCC模型为基础研究和医学应用开辟了新的方向。目前,TDCC模型主要包括:球体模型、器官模型和类器官模型。球体是生长于悬浮液的细胞聚集体。在低黏附性塑料板或惰性基质(如琼脂糖)中,球体模型在不存在基质胶的情况下通过连

续搅拌的方式形成<sup>[19]</sup>。有学者使用超低附着板或涂有惰性基质(如琼脂糖或聚甲基丙烯酸2-羟乙酯)的标准塑料板来降低细胞黏附水平,使细胞聚集形成球体<sup>[20]</sup>,以研究肿瘤细胞对放射治疗的反应。

在器官模型中,细胞培养在含有细胞外基质的基质胶上,该基质胶提供模拟体内肿瘤微环境某些特征的半固体支持物,能够激活细胞信号转导的相互作用<sup>[21-22]</sup>。器官模型中的培养物会根据细胞的固有性质和培养条件显示出不同的形态,例如:乳腺癌细胞经培养可形成圆形、块状、葡萄状和星状4种不同的形态<sup>[23]</sup>。

类器官模型的形成主要分为两种方式。1) 分化的多能干细胞衍生细胞用于衍生类器官。经诱导性多能干细胞建立的类器官始于从原发性或转移性肿瘤样本中分离和培养恶性细胞<sup>[24-25]</sup>,然后借助逆转录病毒或慢病毒,通过SOX2 [sex determining region Y (SRY)-box transcription factor 2]、KLF4 (Krüppel-like factor 4)、c-MYC和OCT4 (octamer-binding transcription factor)等转录因子的基因转移进行重编程<sup>[26]</sup>,最后这些细胞分化成初始肿瘤起源的细胞类型。2) 活检后收集肿瘤组织以构建由瘤组织衍生的类器官,它们通常培养在模拟细胞外基质的基质胶中<sup>[27]</sup>。该系统保留了原始肿瘤组织结构,包括肿瘤微环境的细胞和非细胞成分以及细胞-细胞相互作用,但是由于肿瘤具有异质性而难以重复<sup>[17, 28]</sup>。

## 2 辐射诱导三维培养模型产生的表观遗传变化

### 2.1 DNA甲基化

DNA甲基化是表观遗传调控最常见的机制之一,是将甲基(-CH<sub>3</sub>)基团添加到DNA分子的过程,该过程不改变DNA序列而通过基因沉默的方式来调控基因表达<sup>[29]</sup>。DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)可以参与DNA中胞嘧啶和腺嘌呤核苷的甲基化过程<sup>[30]</sup>,在该过程中,DNA分子的活性很容易发生改变,但其序列不会中断<sup>[31]</sup>。DNA甲基化可以直接改变染色质结构并阻止转录因子结合,参与胚胎发育、染色体稳定性维持和X染色体失活等众多生物过程,同时在调节转录、染色体复制等方面起着重要作用<sup>[32]</sup>。

有文献报道,在小鼠模型系统中,电离辐射暴露对全基因组DNA低甲基化具有剂量依赖性、性别和组织特异性影响<sup>[7]</sup>。Sowa等<sup>[33]</sup>直接比较了

人乳腺上皮组织模型暴露于低传能线密度(linear energy transfer, LET)的电离辐射下,不同培养条件对辐射诱导细胞毒性的影响,发现3D培养对照射后的细胞活性具有保护作用,能够显著降低人乳腺上皮细胞经辐射诱导产生的细胞毒性,并且认为这是由于细胞生长环境的性质使得3D结构具有保护作用,而不是由于细胞外基质的存在或辐射诱导的细胞周期延迟。

辐射后的DNA损伤和基因组不稳定性表现为生殖细胞死亡、连续传代效率降低、凋亡增加和染色体畸变的比例增加。Wang等<sup>[34]</sup>发现,敲低自噬相关基因(*Beclin 1*和*ATG7*)可以增加3D培养细胞的放射敏感性,细胞在经受辐射后多发生非凋亡性死亡;该研究还发现电离辐射可能改变细胞表型和细胞因子的形成,而且自噬机制也可能在这些过程中发挥作用。

## 2.2 组蛋白修饰

组蛋白修饰包括组蛋白的乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等多种修饰方式,其中乙酰化修饰和甲基化修饰的研究最为广泛<sup>[35]</sup>。放射治疗造成DSB,而DSB修复与表观遗传修饰水平的动态变化密切相关,组蛋白甲基化水平的升高是调控DSB修复的关键,该变化可招募DNA修复蛋白,从而改变局部染色质结构并促进修复。Le Beyec等<sup>[36]</sup>报道,在乳腺上皮细胞中,与单层细胞相比,3D生长减少了组蛋白H3、H4的乙酰化以及基因的表达,引起染色质的高度凝集。Paullin等<sup>[37]</sup>研究了经转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )诱导向间充质转化的球形和单层卵巢癌细胞中基因表达的变化,经分析发现3D生长体系中的上皮间质转化因子、压力效应以及表观遗传过程都发生显著的变化,且DNA甲基化和组蛋白乙酰化在3D培养体系中都是增加的。Peitzsch等<sup>[38]</sup>发现,经辐射刺激后,肿瘤干细胞启动子处发生组蛋白H3甲基化,刺激其基因转录;若抑制其甲基化,将引发细胞凋亡,促进放射增敏,并降低具有放射抗性的前列腺癌细胞的成瘤性。此外,Rath等<sup>[39]</sup>发现,抑制组蛋白H3K27去甲基化酶UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X)的表达,可增强肿瘤细胞的放射敏感性,并且H3K27去甲基化酶抑制剂GSKJ4在治疗胶质瘤小鼠时可显著抑制肿瘤细胞的生长。以上研究结果表明,特异性组蛋白甲基转移酶抑制剂与放射治疗结合能够增加肿瘤的放

射敏感性,这为肿瘤的放射治疗提供了新的途径。

## 2.3 染色质重塑

染色质重塑涉及基因表达、DNA复制和修复、染色体凝聚、分离和细胞凋亡等多种生物学过程<sup>[40]</sup>。在DNA包装过程中,DNA甲基化和染色质修饰具有强烈依赖性。在染色质的转录过程中,组蛋白修饰和DNA甲基化存在密切互动。肿瘤细胞中DNA高甲基化调控的沉默基因,可以作为模型来检验染色质对基因表达的调控<sup>[41-42]</sup>。此外,转录的表观遗传沉默可通过翻译后组蛋白修饰、染色质重塑和基因核定位的改变而发生<sup>[40]</sup>,这些和其他染色质过程的失调均与肿瘤的发展有关<sup>[43]</sup>。

肿瘤的放射治疗依赖于导致肿瘤细胞毒性的DSB的持续存在,通过靶向修复蛋白阻断肿瘤细胞中的DSB修复,可以使肿瘤细胞对电离辐射敏感并提高放疗效果<sup>[44]</sup>。Storch等<sup>[45]</sup>报道,3D细胞通过染色质密度修饰增加放射抗性。Yang等<sup>[46]</sup>的研究结果表明,染色质重塑基因*ARID1A* (*AT-rich interaction domain 1A*)表达的缺失通过抑制细胞凋亡、损害G2-M期检查点阻滞以及激活PI3K/Akt信号通路来增强胰腺癌的放射抗性。Kwon等<sup>[44, 47]</sup>的研究结果显示,染色质重塑酶BRG1 (Brahma-related gene 1)通过溴结构域(bromodomain, BRD)与DSB上的乙酰化组蛋白结合,促进 $\gamma$ -H2AX ( $\gamma$ -H2A histone family member X)的形成,进而辅助DSB修复;BRG1-BRD的异位表达会破坏 $\gamma$ -H2AX及其下游53BP1 (p53-binding protein 1)途径,导致DNA修复效率低下、G2-M检查点缺陷和细胞凋亡增加,从而提高包括HT29结肠癌细胞在内的多种肿瘤细胞的放射敏感性。这些研究均证实,染色质重塑与放射敏感性之间存在密切联系,为染色质重塑作为改善肿瘤放射疗法的靶标提供了实例。

## 2.4 非编码RNA

近年来,针对哺乳动物的转录组研究发现,非编码RNA (non-coding RNA, ncRNA)分子在细胞表达的转录物中占据了很大比例。人类基因组90%以上参与编码ncRNA<sup>[48]</sup>,它们与DNA、RNA、蛋白质和脂质之间的相互作用可以解释其在细胞生长、迁移、自噬、凋亡和分化等多种生物学机制中的作用。除此之外,ncRNA还参与调控肿瘤、心血管疾病和神经疾病等<sup>[49]</sup>。根据长度,ncRNA分为短链非编码RNA和长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。其中,短链非编码RNA主

要包括微 RNA (microRNA, miRNA)和干扰小RNA (small interfering RNA, siRNA)等<sup>[50]</sup>。lncRNA 和miRNA 在表观遗传调控中发挥的作用尤为关键<sup>[51-52]</sup>。

lncRNA 是指长度超过 200 nt 的 RNA, 尽管 lncRNA 几乎不编码蛋白质, 但它们可以通过 RNA 干扰、基因共抑制、基因沉默、基因印迹和 DNA 去甲基化等途径调控基因表达<sup>[53-54]</sup>。Liu 等<sup>[55]</sup>建立了一种新的恶性神经胶质瘤人脑类器官模型, 人神经胶质瘤细胞在这些 3D 组织中侵袭性生长, 研究结果显示, 靶向 *lncGRS-1* 的反义寡核苷酸能够有选择性地抑制肿瘤生长, 同时增强神经胶质瘤细胞的放射治疗敏感性, 表明 *lncGRS-1* 可作为治疗神经胶质瘤的特异性靶点, 这为快速识别庞大的非编码基因组中的新治疗靶点建立了一种可推广的方法。有证据支持, 大部分癌症基质由肿瘤相关成纤维细胞(tumour-associated fibroblast, TAF)构成, 这些细胞通过促进肿瘤起始、血管生成、侵袭和转移等方面影响肿瘤微环境, 在乳腺癌中, 肿瘤微环境作为主要调节因子发挥着重要作用<sup>[56]</sup>。Basak 等<sup>[57]</sup>通过构建 3D 类器官和具有低传代 TAF 的 2D 共培养物评估 lncRNA H19 表达对细胞活力和内分泌治疗耐药(endocrine therapy resistance, ETR)的影响, 发现在 TAF 存在的情况下, 使用药物抑制剂阻断 Notch 和 c-MET (cellular-mesenchymal epithelial transition factor)受体信号转导, 可以显著降低 lncRNA H19 的表达水平, 同时有助于乳腺癌细胞克服对氟维司群和他莫昔芬的耐药性。

miRNA 是一类参与基因表达调控的内源性非编码小分子 RNA, 通过与信使 RNA 中的特定序列结合来调节基因表达<sup>[58]</sup>, 参与包括细胞增殖、凋亡、发育和癌变在内的许多生理和病理过程<sup>[59]</sup>。近年来, miRNA 因其在调节基因表达方面对放疗具有重要作用而备受关注, 深入了解 miRNA 的调控功能对于改善当前的肿瘤治疗至关重要。Pan 等<sup>[60]</sup>针对肺癌和乳腺癌的研究显示, miR-29b-3p 过表达通过干扰 DNA 损伤修复的动力学过程和抑制癌基因(*RBL1*、*PIK3R1*、*Akt2*、*Bcl-2*), 降低 3D 培养细胞及体内肿瘤的辐射抗性, 敲低 miR-29b-3p 会增强癌细胞的侵袭和迁移能力。Arabkari 等<sup>[61]</sup>分析发现, 一些 miRNA 在 2D 和 3D 培养的 CD34+ 细胞中呈现差异表达, 培养在纳米纤维支架上的 CD34+ 细胞中的一些下调 miRNA, 其靶基因参与细胞迁移、细胞-细胞和细胞-基质的相互作用。例

如, miR-3941 是一种下调最明显的 miRNA, 靶向细胞骨架蛋白——黏着斑蛋白(vinculin), 该蛋白质在控制细胞形状、力学和运动方面发挥作用<sup>[62]</sup>。

### 3 展望

与 2D 细胞相比, 3D 细胞更接近机体内细胞真实的生长状态, 是药物学与生物效应研究的理想模型。3D 细胞培养在很大程度上弥补了 2D 细胞培养的不足, 基于其更加接近活体细胞生活微环境的优势, 该模型在肿瘤治疗研究领域受到越来越多的重视。通过探究 2D 与 3D 生长的肿瘤细胞之间辐射敏感性差异的机理, 可以得到更接近于活体细胞的辐射应答机制。而表观遗传调控可在不改变 DNA 序列的情况下, 通过改变基因转录的条件, 调控基因表达, 进而改变细胞的表型和其对外界刺激的响应能力。同时, 表观遗传调控与细胞的辐射应答也有着密切的关联。因此, 研究表观遗传调控可为肿瘤治疗以及新药的研发提供新思路。

随着生命科学的不断发展, TDCC 俨然已经成为一种新兴的细胞培养技术。从最简单的球体模型到 3D 生物打印, TDCC 在基础研究和临床医学中扮演的角色愈发重要, 不仅被应用于乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌等不同类型肿瘤的治疗, 在细胞毒性等方面也得到广泛应用, 比如: 在辅助药物评价体外肝细胞毒性的研究中, 研究人员建立了三明治培养肝细胞模型、肝细胞球以及微流控肝芯片等多种 TDCC 模型<sup>[63]</sup>; 在 3D 支架中生长的神经球可用来实现神经毒性的复合测试<sup>[64]</sup>。此外, 通过添加计算机建模, 研究者可以为 3D 模型创造更系统的环境<sup>[65]</sup>。总的来讲, TDCC 系统通过建立复杂的多细胞模型, 为将来的肿瘤治疗和靶向药物研发等提供了便利。从表观遗传调控角度探讨 2D 与 3D 培养的肿瘤细胞之间的辐射敏感性差异, 寻找引起 3D 生长的肿瘤细胞辐射抗性的内在原因, 可为肿瘤临床辐射治疗增敏药物的研发提供充足的理论依据。

### 参考文献(References):

- [1] SALINAS-VERA Y M, VALDÉS J, PÉREZ-NAVARRO Y, et al. Three-dimensional 3D culture models in gynecological and breast cancer research[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 826113.
- [2] POORNIMA K, FRANCIS A P, HODA M, et al. Implications of three-dimensional cell culture in cancer therapeutic research[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 891673.

- [3] JIRTLE R L, SKINNER M K. Environmental epigenomics and disease susceptibility[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(4): 253–262.
- [4] 申有承, 谷宁, 赵永超, 等. 表观遗传学在冠状动脉粥样硬化性心脏病中的研究进展[J]. 海南医学(SHEN Youcheng, GU Ning, ZHAO Yongchao, *et al.* Research progress of epigenetics in coronary atherosclerotic heart disease[J]. *Hainan Medical Journal*), 2022, 33(10): 1342–1345.
- [5] JONES P A, BAYLIN S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(6): 415–428.
- [6] TAWA R, KIMURA Y, KOMURA J, *et al.* Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues[J]. *Journal of Radiation Research*, 1998, 39(4): 271–278.
- [7] POGRIBNY I, RAICHE J, SLOVACK M, *et al.* Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 320(4): 1253–1261.
- [8] KOVALCHUK O, BAULCH J E. Epigenetic changes and non-targeted radiation effects: is there a link?[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2008, 49(1): 16–25.
- [9] 薛刚. 表观遗传学调控介导二维与三维生长癌细胞的辐射敏感性差异[D]. 兰州: 中国科学院研究生院近代物理研究所(XUE Gang. Epigenetics Modulation Mediate the Different Radiosensitivity Between Two- and Three-dimensional Cultured Cancer Cells[D]. Lanzhou: Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences), 2015.
- [10] ANDERSEN T, AUK-EMBLEM P, DORNISH M. 3D cell culture in alginate hydrogels[J]. *Microarrays*, 2015, 4(2): 133–161.
- [11] PAMPALONI F, REYNAUD E G, STELZER E H K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue[J]. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2007, 8(10): 839–845.
- [12] CUKIERMAN E, PANKOV R, STEVENS D R, *et al.* Taking cell-matrix adhesions to the third dimension[J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1708–1712.
- [13] MSEKA T, BAMBURG J R, CRAMER L P. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization[J]. *Journal of Cell Science*, 2007, 120(24): 4332–4344.
- [14] WEISWALD L B, BELLET D, DANGLES-MARIE V. Spherical cancer models in tumor biology[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(1): 1–15.
- [15] BAAL N, WIDMER-TESTE R, MCKINNON T, *et al.* *In vitro* spheroid model of placental vasculogenesis: does it work?[J]. *Laboratory Investigation*, 2009, 89(2): 152–163.
- [16] MEHTA G, HSIAO A Y, INGRAM M, *et al.* Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 164(2): 192–204.
- [17] NATH S, DEVI G R. Three-dimensional culture systems in cancer research: focus on tumor spheroid model[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 163: 94–108.
- [18] 江杨帆, 何素冰, 吴纳新, 等. 细胞三维培养与传统细胞培养的应用现状[J]. 安徽医学(JIANG Yangfan, HE Subing, WU Naxin, *et al.* Application status of three-dimensional cell culture and traditional cell culture[J]. *Anhui Medical Journal*), 2018, 39(5): 625–627.
- [19] KATT M E, PLACONE A L, WONG A D, *et al.* *In vitro* tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2016, 4: 12.
- [20] KELM J M, TIMMINS N E, BROWN C J, *et al.* Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(2): 173–180.
- [21] LEE G Y, KENNY P A, LEE E H, *et al.* Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(4): 359–365.
- [22] NGUYEN H T, LI C, LIN Z, *et al.* The microRNA expression associated with morphogenesis of breast cancer cells in three-dimensional organotypic culture[J]. *Oncology Reports*, 2012, 28(1): 117–126.
- [23] KENNY P A, LEE G Y, MYERS C A, *et al.* The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression[J]. *Molecular Oncology*, 2007, 1(1): 84–96.
- [24] CLEVERS H C. Organoids: avatars for personalized medicine[J]. *The Keio Journal of Medicine*, 2019, 68(4): 95.
- [25] KIM J, HOFFMAN J P, ALPAUGH R K, *et al.* An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression[J]. *Cell Reports*, 2013, 3(6): 2088–2099.
- [26] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(3): 183–193.
- [27] KONDO J, ENDO H, OKUYAMA H, *et al.* Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2011, 108(15): 6235–6240.
- [28] RITTER C A, PEREZ-TORRES M, RINEHART C, *et al.* Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab *in vivo* overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(16): 4909–4919.
- [29] CHOUDHURI S. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2011, 21(4): 252–274.
- [30] JONES P A, BAYLIN S B. The epigenomics of cancer[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 683–692.
- [31] XIAO F H, WANG H T, KONG Q P. Dynamic DNA methylation during aging: a “prophet” of age-related outcomes[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 107.
- [32] NASRULLAH, HUSSAIN A, AHMED S, *et al.* DNA methylation across the tree of life, from micro to macro-organism[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1666–1685.
- [33] SOWA M B, CHRISLER W B, ZENS K D, *et al.* Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells[J]. *Mutation Research*, 2010, 687(1/2): 78–83.
- [34] WANG T, X S M, KONG D, *et al.* Effect of ionizing radiation on acinar morphogenesis of human prostatic epithelial cells under three-dimensional culture conditions[J]. *Neoplasia*, 2012, 59(3): 269–281.
- [35] DAWSON M A, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 12–27.
- [36] LE BEYEC J, XU R, LEE S Y, *et al.* Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2007, 313(14): 3066–3075.
- [37] PAULLIN T, POWELL C, MENZIE C, *et al.* Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182930.
- [38] PEITZSCH C, COJOC M, HEIN L, *et al.* An epigenetic reprogramming strategy to resensitize radioresistant prostate cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(9): 2637–2651.
- [39] RATH B H, WAUNG I, CAMPHAUSEN K, *et al.* Inhibition of the histone H3K27 demethylase UTX enhances tumor cell radiosensitivity[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018, 17(5): 1070–1078.
- [40] PAN D, DU Y R, HU B R. The role of epigenetic modulation in the cellular response to ionizing radiation[J]. *International Journal of Radiology*, 2015, 2(1): 7–14.
- [41] KOTURBASH I, POGRIBNY I, KOVALCHUK O. Stable loss of global DNA methylation in the radiation-target tissue: a possible mechanism contributing to radiation carcinogenesis?[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 337(2): 526–533.
- [42] KAUP S, GRANDJEAN V, MUKHERJEE R, *et al.* Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes[J]. *Mutation Research*, 2006, 597(1/2): 87–97.
- [43] KIM J S, KIM S Y, LEE M, *et al.* Radioresistance in a human laryngeal squamous cell carcinoma cell line is associated with DNA methylation changes and topoisomerase II $\alpha$ [J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2015, 16(4): 558–566.

- [44] KWON S J, LEE S K, NA J R, *et al.* Targeting BRG1 chromatin remodeler via its bromodomain for enhanced tumor cell radiosensitivity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2015, 14(2): 597–607.
- [45] STORCH K, EKE I, BORGMANN K, *et al.* Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(10): 3925–3934.
- [46] YANG L, YANG G H, DING Y J, *et al.* Inhibition of PI3K/Akt signaling pathway radiosensitizes pancreatic cancer cells with ARID1A deficiency *in vitro*[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(5): 890–900.
- [47] WILSON B G, ROBERTS C W M. SWI/SNF nucleosome remodelers and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(7): 481–492.
- [48] BHATTACHARYA A, CHAMPARAMARY S, TRIPATHI T, *et al.* Identification of the conserved long non-coding RNAs in myogenesis[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22: 336.
- [49] ASHRAFIZADEH M, ZARRABI A, MOSTAFAVI E, *et al.* Non-coding RNA-based regulation of inflammation[J]. *Seminars in Immunology*, 2022, 59: 101606.
- [50] 黄慧, 戴瑶, 李永生, 等. 非编码 RNA 在骨组织工程细胞与支架构建中的研究与应用[J]. *中国组织工程研究* (HUANG Hui, DAI Yao, LI Yongsheng, *et al.* Application and research of non-coding RNA in bone tissue engineering with cells and scaffold[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2020, 24(4): 596–605.
- [51] CECH T R, STEITZ J A. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones[J]. *Cell*, 2014, 157(1): 77–94.
- [52] ADAMS B D, PARSONS C, WALKER L, *et al.* Targeting non-coding RNAs in disease[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(3): 761–771.
- [53] EDDY S R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(12): 919–929.
- [54] COSTA F F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology[J]. *Gene*, 2005, 357(2): 83–94.
- [55] LIU S J, MALATESTA M, LIEN B V, *et al.* CRISPRi-based radiation modifier screen identifies long non-coding RNA therapeutic targets in glioma[J]. *Genome Biology*, 2020, 21: 83.
- [56] MAO Y, KELLER E T, GARFIELD D H, *et al.* Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer[J]. *Cancer Metastasis Reviews*, 2013, 32(1/2): 303–315.
- [57] BASAK P, CHATTERJEE S, BHAT V, *et al.* Long non-coding RNA H19 acts as an estrogen receptor modulator that is required for endocrine therapy resistance in ER+ breast cancer cells[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 51(4): 1518–1532.
- [58] KATOH S, YOSHIOKA H, SENTHILKUMAR R, *et al.* Enhanced miRNA-140 expression of osteoarthritis-affected human chondrocytes cultured in a polymer based three-dimensional (3D) matrix[J]. *Life Sciences*, 2021, 278: 119553.
- [59] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [60] PAN D, DU Y R, LI R, *et al.* miR-29b-3p increases radiosensitivity in stemness cancer cells via modulating oncogenes axis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 741074.
- [61] ARABKARI V, AMIRIZADEH N, NIKOUGOFTAR M, *et al.* MicroRNA expression profiles in two- and three-dimensional culture conditions of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 20072–20084.
- [62] SEHGAL P, KONG X Y, WU J, *et al.* Epidermal growth factor receptor and integrins control force-dependent vinculin recruitment to E-cadherin junctions[J]. *Journal of Cell Science*, 2018, 131(6): jcs206656.
- [63] LAUSCHKE V M, HENDRIKS D F G, BELL C C, *et al.* Novel 3D culture systems for studies of human liver function and assessments of the hepatotoxicity of drugs and drug candidates[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, 29(12): 1936–1955.
- [64] HELLWIG C, BARENYS M, BAUMANN J, *et al.* Culture of human neurospheres in 3D scaffolds for developmental neurotoxicity testing[J]. *Toxicology in Vitro*, 2018, 52: 106–115.
- [65] JUBELIN C, MUÑOZ-GARCIA J, GRISCOM L, *et al.* Three-dimensional *in vitro* culture models in oncology research[J]. *Cell & Bioscience*, 2022, 12: 155.

(上接第 222 页)

- [3] BIANCHINI G, BALKO J M, MAYER I A, *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016, 13(11): 674–690.
- [4] LEBERT J M, LESTER R, POWELL E, *et al.* Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer[J]. *Current Oncology*, 2018, 25(Suppl. 1): S142–S150.
- [5] NEDELJKOVIĆ M, DAMJANOVIĆ A. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer—how we can rise to the challenge[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 957.
- [6] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 61–70.
- [7] FREED-PASTOR W A, PRIVES C. Mutant p53: one name, many proteins[J]. *Genes & Development*, 2012, 26(12): 1268–1286.
- [8] STIEWE T, HARAN T E. How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance[J]. *Drug Resistance Updates*, 2018, 38: 27–43.
- [9] KOTLER E, SHANI O, GOLDFELD G, *et al.* A systematic p53 mutation library links differential functional impact to cancer mutation pattern and evolutionary conservation[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(1): 178–190.e8.
- [10] MANTOVANI F, WALERYCH D, SAL G D. Targeting mutant p53 in cancer: a long road to precision therapy[J]. *FEBS Journal*, 2017, 284(6): 837–850.
- [11] MA K, ZHANG C, LI W Y. Gamabufotalin suppressed osteosarcoma stem cells through the TGF- $\beta$ /periostin/PI3K/AKT pathway[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 331: 109275.
- [12] TANG N, SHI L, YU Z L, *et al.* Gamabufotalin, a major derivative of bufadienolide, inhibits VEGF-induced angiogenesis by suppressing VEGFR-2 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 3533–3547.
- [13] LI D, MARCHEÑO N D, SCHULZ R, *et al.* Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells[J]. *Molecular Cancer Research*, 2011, 9(5): 577–588.
- [14] ZHANG L Y, YU Z L, WANG Y, *et al.* Quantitative proteomics reveals molecular mechanism of gamabufotalin and its potential inhibition on Hsp90 in lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 76551–76564.
- [15] 朱激扬, 陈华, 徐燕芳, 等. 小檗胺联合拉帕替尼对三阴性乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国医药导报* (ZHU Jiyang, CHEN Hua, XU Yanfang, *et al.* Effects of Berberine combined with lapatinib on proliferation and apoptosis of triple negative breast cancer cells[J]. *China Medical Herald*), 2020, 17(20): 123–126.
- [16] 周建林. 癌症中 p53 失活的分子机制和靶向 p53 的抗癌药物研究进展[J]. *生命科学* (ZHOU Jianlin. Research progress on molecular mechanism of p53 inactivation in cancers and drugs targeting p53[J]. *Life Science Research*), 2021, 25(3): 189–196.
- [17] 丁笠, 张新跃. 靶向突变型 p53 的抗肿瘤药物研究进展[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)* (DING Li, ZHANG Xinyue. Research progress on the development of anticancer drugs targeting mutant p53[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*), 2020, 41(6): 57–63.
- [18] XIAO G, LUNDINE D, ANNOR G K, *et al.* Gain-of-function mutant p53 R273H interacts with replicating DNA and PARP1 in breast cancer[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(3): 394–405.