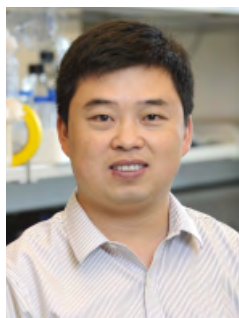


特约综述



高栋博士, 2016年8月起, 任中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员、博士生导师、研究组长。该实验室以成体组织类器官、肿瘤类器官和肿瘤小鼠模型为基础, 运用分子细胞生物学的实验手段研究肿瘤病理进展过程中的分子调控网络和肿瘤细胞抗药性的分子机理。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=166>

类器官及其在肿瘤研究中的应用

李 飞 高 栋*

(中国科学科系统生物学重点实验室, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 类器官(organoid)作为一种新型的肿瘤研究模型能够高度模拟原位组织的生理结构和功能, 可以稳定地维持肿瘤细胞在体内的特征, 同时也适用于高通量的药物筛选和个性化治疗。此外, 类器官模型又是干细胞研究的有力工具, 可以在体外重构具有部分生理功能的类器官组织。基于这些优点, 类器官模型将会在肿瘤和干细胞研究中扮演着越来越重要的角色。该综述将从类器官的发展简史、主要类型、研究应用和未来展望四个方面进行讨论。

关键词 类器官; 3D培养; 肿瘤研究; 干细胞

Organoid and Its Application in Cancer Research

Li Fei, Gao Dong*

(Key Laboratory of Systems Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The emerging organoid technology allows the *in vitro* long-term culture of patients derived cancer cells which faithfully recapitulate the *in vivo* phenotype. This technology facilitates high-throughput drug screening and personalized therapies. Recent advances in organoid technology allow embryonic and adult mammalian stem cells to reflect key structural and functional properties of organs *in vitro*. Based on these advantages, organoid technology will play a more important role in cancer research and stem cell studies. In this review, we will discuss the development of organoid technology, main sources, current applications in cancer research and future tendency.

Keywords organoid; three-dimensional culture; cancer research; stem cell

类器官(organoid)是体外三维(3 dimensional, 3D)培养构建出的多细胞团, 具有自我更新和自我组织能力, 并且维持了其来源组织的生理结构和功能的特点^[1-2], 是肿瘤生物学和干细胞生物学研究的有力工具。近年来, 国内外的类器官研究主要集中在疾病的

体外模型和体外器官重建等问题上, 将会为生物学的研究开辟新的途径。针对类器官的模型的开发和应用将是未来肿瘤和干细胞研究的热点问题之一。

目前, 肿瘤研究的主要模型仍然是肿瘤细胞系(patient-derived cancer cell lines, PDC)。1951年, HeLa细胞系的成功建立开辟了肿瘤研究的新领域, 让PDC成为了肿瘤生物学研究的主要模型。肿瘤细胞系培养条件简单, 体外能够无限增殖, 适宜于

*通讯作者。Tel: 021-54921117, E-mail: dong.gao@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921117, E-mail: dong.gao@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2017-03-28 16:20:40

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170328.1620.010.html>

大规模的药物筛选。但是, 肿瘤细胞系也具有严重的缺陷, 即体外培养的过程中丢失了肿瘤细胞的异质性和肿瘤细胞在体内的特征。以前列腺肿瘤细胞系为例, 目前常用的细胞系只有7株, 即: DU145、LNCaP、PC3、C42、22RV1、VCap及MDA-PCA。但是临床上一些常见的基因突变在以上部分细胞株中却不存在, 例如 *Spop* (speckle type BTB/POZ protein) 突变、*FoxA1* (forkhead box protein A1) 突变和 *Chd1* (chromodomain helicase DNA binding protein 1) 缺失^[3]。另一种肿瘤研究的重要模型是人体肿瘤组织小鼠移植模型 (patient-derived xenografts, PDX)。PDX模型是将来源于患者的肿瘤切成小块, 然后移植到免疫缺陷型的小鼠体内。虽然, PDX模型能够很大程度地维持肿瘤的异质性, 而且目前已经应用于肿瘤的药物测试和筛选, 但是该模型仍然面临着包括移植成功率低、肿瘤样本量大和实验周期较长在内的诸多问题^[4]。肿瘤类器官 (patient-derived organoids, PDO) 与PDC和PDX相比, 不仅在体外培养条件下能够无限增殖, 很好地保持了肿瘤异质性, 适用于大规模的药物筛选, 同时还可以对该模型进行包括基因敲低、过表达和突变在内的基因编辑操作, 所以类器官的成功建立对于肿瘤的研究有着重要的意义。本文旨在探讨类器官及其在肿瘤研究中的应用。

1 发展简史

二十世纪九十年代, Lindberg等^[5]和Pellegrini等^[6]率先将角膜缘干细胞培养在3T3滋养层细胞之上, 体外成功培养出了人源3D眼角膜结构, 开辟了人源细胞三维类器官培养的新领域。Li等^[7]将乳腺上皮细胞培养在一种从小鼠肉瘤中分离得到的可溶性再生基底膜上, 发现包括酪蛋白在内的乳蛋白分泌量相对于传统的2D培养方法有了很大的提升。后续的形态学分析也表明, 3D培养体系中的乳腺上皮细胞形成了具有导管、小导管和空腔的特殊结构,

类似于乳腺中的分泌腺泡。2009年, Hans Clevers^[8]实验室将小鼠肠段中分离出来的隐窝细胞培养在含有ENR (EGF、Noggin、R-spondin) 的三维Matrigel培养体系中, 发现在该培养体系下隐窝细胞能够形成类似于肠的微型结构, 即隐窝-绒毛样复合体。他们也利用了该培养体系对前期分离并鉴定出来的单个Lgr5⁺肠干细胞进行培养, 发现也能形成具有上述特殊结构的类器官; 同时, 他们的追踪实验表明, 该类器官仍然具有Lgr5⁺肠干细胞的存在, 所以该模型能够很好地模拟体内小肠的形态结构和功能^[9]。这种肠类器官体系的成功建立开启了类器官研究的新篇章, 迅速成为新的研究热点。目前, 三维类器官培养技术已经成功地培养出具有部分关键生理结构和功能的肾、肝、肺、肠、脑、前列腺、胰腺和视网膜等类组织器官, 具体可以参见表1。

2 主要类型

2.1 正常成体组织类器官

成体干细胞具有自我更新能力和多向分化潜能, 很有可能是癌症发生的靶点。尽管成体干细胞如此重要, 但是人们对于它的性质和发挥作用的分子机制的了解仍然非常有限, 因此, 成体干细胞的体外培养体系将会极大地促进我们对成体干细胞的认识。Hans Clevers^[8]实验室已经利用小肠组织中Lgr5⁺肠干细胞成功构建出小肠类器官培养体系。目前, 已经发展出了针对不同上皮组织细胞的类器官培养体系。Karthaus等^[16]在小鼠前列腺类器官培养体系的基础上, 额外添加FGF10 (fibroblast growth factor 10)、FGF2和PGE2 (prostaglandin E2) 等成分, 利用来源于人前列腺切除手术中的正常组织成功培养出前列腺类器官。为了进一步确认该培养体系的遗传稳定性, 研究人员分别选取了培养至第2代和第7代的类器官进行外显子测序。SNVs (single-nucleotide variants) 和 Indels (insertions and deletions)

表1 常见组织的类器官研究现状
Table 1 Research status of organoids from common tissue

组织类型 Tissue types	来源 Sources	首次报道时间 First reported time	参考文献 References
Colon	Normal tissue/iPSCs/tumor	2011	[10-12]
Brain	ESC/iPSCs/skin fibroblasts	2012	[13-14]
Lung	ESC/iPSCs	2014	[15]
Prostate	Normal tissue and tumor	2014	[3,16]
Pancreas	Normal tissue and tumor/normal tissue	2013	[17-18]
Liver	Human iPSCs	2013	[19-20]
Kidney	Human iPSCs	2013	[21-22]

在2代类器官中几乎完全吻合,表明了该培养体系能很好地维持细胞的遗传稳定性。基底上皮细胞和管腔上皮细胞是前列腺上皮细胞的两个主要类群,目前认为,基底细胞包含前列腺成体干细胞,而一直没有直接的证据表明管腔成体干细胞的存在。该工作还分别利用人正常前列腺组织的基底细胞和管腔细胞去构建类器官,发现后者构建出的类器官在组织学特征上更加符合实际的前列腺结构。即通过免疫组化分析表明,来源于管腔细胞的类器官中大部分为管腔细胞,而只有少部分基底细胞分布在腔的外侧,但是基底细胞来源的类器官表型却并非如此。这一结果也为前列腺成体管腔干细胞的存在提供了有力证据。Jung等^[10]在来源于结肠黏膜的细胞群中发现EPHB2(ephlin type-B receptor 2)高表达(EPHB2^{high})的细胞其细胞分化相关基因表达水平低。与此相反,细胞增殖相关基因和肠干细胞标记基因则表达水平较高。于是,他们利用分离出的EPHB2^{high}细胞进行结肠类器官的培养,发现培养出来的类器官可以进行长期的增殖,并且具有多种谱系的细胞分化潜能。该工作成功进行了结肠类器官的培养,为研究结肠的发育和结肠癌的发生机制提供了很好的模型。Huch等^[23]将小鼠肝脏类器官培养体系进行条件优化后,利用来源于人的肝脏导管细胞成功获得人的肝脏类器官。该类器官在长期培养的过程中能够维持基因组的稳定性,并且在体外培养和移植的条件下能够转变为具有功能的肝细胞。

2.2 ESCs和iPSCs类器官

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是来源于早期胚胎内细胞团的一类细胞,它具有体外培养能够无限增殖和多向分化的特点^[24-25]。诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)需要在体细胞中外源表达OCT4(octamer-binding transcription factor 4)、KLF4(kruppel-like factor 4)、SOX2(sex determining region Y-box 2)、MYC(avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)等4种细胞因子,进而使其去分化形成具有多向分化潜能的iPSCs^[26]。由于ESCs和iPSCs都具有多向分化潜能,所以两者也成为了类器官培养的重要来源。Mariani等^[13]利用两株人的iPSCs细胞系(PGP1-1和i03-01#9),在含有FGF2、BMP(bone morphogenetic protein)、Wnt通路和TGF- β (transforming growth factor-beta)通路抑制剂的培养基中进行3D培养,发现能够形成具有中间神经

元、皮层神经元和放射状胶质细胞的多层结构。转录组数据进一步表明,该3D结构比较符合8到10周龄的胚胎端脑背侧的发育和生长模式。该工作成功建立的3D模型可以用于研究大脑发育和大脑皮层紊乱的机制。Dye等^[27]先用Activin A、Noggin和TGF- β 抑制剂去诱导人的ESCs向内胚层分化,发现SOX2和FOXA2表达水平均有提升,然后基于肺发育过程中HH(Hedgehog)和FGF通路所扮演的角色,它们分别激活HH通路和抑制FGF通路而最终获得肺的类器官。在结构上,该类器官具有气管样和肺泡样结构;在基因水平上, RNA测序表明该类器官的转录组与人类胎儿的肺组织非常相似。因此,肺类器官模型适用于体外研究肺的分化、稳态和疾病。人脑的复杂性使得脑部疾病的体外研究变得比较困难。Lancaster等^[14]利用人的多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)建立起来的脑类器官在结构上分为不同的脑部区域,而且包含了一个能够产生多种细胞亚型的祖细胞群,同时该类器官的培养过程能够模拟人脑的发育模式。Takasato等^[22]同样也是利用hPSCs建立了肾类器官的培养体系,该类器官模型兼具肾单位和集合管在内的两种类型的上皮细胞,同时基质细胞分布在上皮细胞周围,并且随着培养时间的延长这几种类型的细胞逐渐成熟。该工作还选取了不同培养时间点的类器官进行转录组测序,测序数据表明,体外培养至第11 d和第18 d的类器官与人类3月龄胎儿的肾高度相似。该类器官体系的成功建立为研究肾相关疾病和药物的毒性试验提供了良好的体外模型。

2.3 肿瘤组织类器官

我们实验室利用前列腺肿瘤转移灶样本成功地建立起前列腺肿瘤类器官,将前列腺肿瘤细胞的培养效率从几乎为0提高到20%。前列腺肿瘤类器官从基因拷贝数变化、突变图谱和组织形态学特征等多方面都能很好地维持肿瘤细胞在体内的特征,并且可以在体外无限地扩增培养。值得一提的是,在这些成功培养的7株类器官中,其中1株是来源于去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)患者的肿瘤循环细胞(circulating tumor cells, CTCs)。前列腺癌循环肿瘤细胞类器官的成功建立为研究前列腺癌恶性转化和转移的机制研究提供了理想的模型^[3]。胰腺癌是世界上最致命的癌症之一,目前没有有效的诊疗手段。而在胰腺癌的研究

究中, Tuveson实验室的Boj等^[28]利用来源于基因敲除小鼠的肿瘤组织成功地建立起胰腺肿瘤类器官, 并且可以很好地模拟小鼠早期胰腺癌的生理特征。他们又在这些工作的基础上优化培养体系培养来自于人胰腺导管癌组织的类器官, 并且取得了80%左右的培养成功率, 经过测序分析后发现, 这些类器官具有胰腺癌常见的基因突变, 如*Smad4*(mothers against decapentaplegic homolog 4)和*Tp53*(tumor protein p53)突变及*Myc*的扩增, 而且将这些类器官的*Kras*突变状态和原位肿瘤进行比较后发现能够很好地吻合。该项工作也为研究胰腺癌的分子机制提供了合适的模型^[28]。Wetters等^[12]利用结肠癌患者手术切除的肿瘤组织成功构建了具有22株结肠癌类器官的生物库。基因组测序和基因表达水平分析表明, 该类器官与原位肿瘤的分子亚型十分相似。同时, 该工作还检测了O-乙酰转移酶Porcupine的一种小分子抑制剂IWP-2对部分肿瘤类器官的影响, 发现该抑制剂对一株RNF43(ring finger protein 43)突变的类器官具有很强的抑制作用, 为临床上治疗RNF43突变的结肠癌提供了方向。肿瘤类器官培养只需要非常小的肿瘤穿刺样品, 具有成功率高、周期短、花费低的优势, 将在肿瘤的个性化治疗领域发挥其不可替代的作用, 尤其对晚期肿瘤患者的个性化治疗有着巨大的应用前景。

3 研究应用

3.1 肿瘤的发生发展

肿瘤从起始到发展、恶化, 再到病灶转移和药物抵抗是一个相互关联的过程, 所以针对肿瘤发生、发展的每一步具体机制的研究具有重要意义。如何构建肿瘤发生发展不同阶段的体外模型是肿瘤生物学重点研究领域之一, 目前3D肿瘤类器官模型有望在这一领域实现突破。胃癌的高度转移性使其在全球癌症的致死率中排名第二, 也使得胃癌转移机制的研究成为热点。Nadauld等^[29]在钙黏蛋白基因1(cadherin 1, *Cdh1*)和*Tp53*双敲的小鼠胃类器官中敲低*TGFR2*(transforming growth factor, beta receptor 2), 结果发现, 类器官在体外变得具有侵略性, 进一步的体内实验也证明了*TGFR2*敲低的类器官细胞具有肺转移的潜能, 表明*TGFR2*具有抑制胃癌转移的作用。Chio等^[30]通过比较NRF2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)在胰腺癌患者的肿瘤类器官和正常

组织类器官中的表达水平, 发现前者中NRF2的表达水平较高, 于是他们将NRF2敲低, 发现正常组织类器官不受影响而肿瘤类器官却不能正常生长。然后他们通过研究细胞中氧化水平的变化, 进而证实了NRF2对于胰腺肿瘤细胞的生长维持有很大的作用, 同时提出了通过降低癌细胞抗氧化剂水平来“杀死”肿瘤这一概念。同样也是使用类器官模型进行基因操作, Li等^[31]在野生型小鼠的胃肠类器官中突变*Apc*、*Tp53*、*Kras*或*Smad4*这4个基因, 在后续移植的活体上发现产生了具有侵略性腺癌样的组织学特征, 同时该工作也丰富了用于研究胃癌和结肠癌的模式。肿瘤中典型的入侵方式可能是以集体入侵的方式实现, 即以一个紧密结合的多细胞复合体为一单元进行入侵, 而究竟有多少种亚型肿瘤细胞参与了这一过程和这一过程是如何被起始的仍然未知。Cheung等^[32]在乳腺肿瘤类器官的培养过程中发现, 入侵发生最早的细胞是表达Ck14和P63的细胞, 同样在临床患者的原位肿瘤和肺转移的肿瘤上发现Ck14在入侵的边界处表达水平较高。然后将*Ck14*敲低的肿瘤类器官移植到小鼠体内发现该肿瘤失去了侵略性, 最终利用乳腺肿瘤类器官模型证明了该入侵行为是由一群基底样的上皮细胞所“领导”起始的, 该工作为研究乳腺癌转移的起始机制奠定了理论基础。利用类器官培养的技术体系构建肿瘤发生发展不同阶段的体外模型, 将对解析肿瘤发展的分子机制提供全新的模型体系。

3.2 药物筛选及个性化治疗

癌症的个性化治疗和精准治疗逐渐成为全世界医学研究的热点, 但是能够维持癌细胞在体内特征的癌症体外模型的匮乏已成为癌症病人个性化治疗和精准治疗研究的瓶颈。类器官具有体外培养无限增殖能力, 最大程度地维持了肿瘤细胞在体内的特征, 而且在长期培养的过程中并不会引入新的基因突变, 所以是一个可供药物测试和筛选的理想模型, 也是将基础研究转向应用研究的合适工具, 具体的应用模式可以参见图1。2015年, 桑格研究所和霍布雷斯希特研究所联合建立了首个肿瘤类器官库(living organoid biobank)。研究人员利用这些类器官进行了83种试验药物及癌症药物的测试, 并且发现不同遗传背景的肿瘤类器官针对这些药物会产生不同的敏感性^[12]。当然, 除了大规模的药物筛选, 也有不少研究利用类器官进行特定的一种或者几

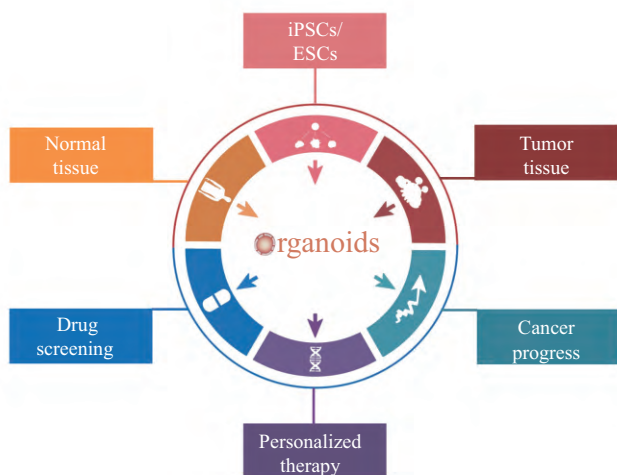


图1 类器官在肿瘤研究中的应用模式

Fig.1 Diagram of applications of organoids in cancer research

种药物的测试。Soragni等^[33]利用来源于卵巢肿瘤的一类器官作为药物筛选的模型,通过实验表明一种名为ReACp53的多肽能够部分恢复P53的功能,同时在小鼠腹腔注射该多肽后,发现移植的肿瘤体积很快地减小,证明了ReACp53具有作为卵巢癌以及其他类型的P53突变癌症的治疗潜能。Huang等^[34]利用建立起来的胰腺导管癌类器官培养体系测试其对临床药物的敏感性,发现不同类器官对于药物A366、UNC1999和吉西他滨的反应和临床上患者的反应是一致的,证明了肿瘤类器官作为药物筛选和个性化治疗的可行性。

3.3 与其他技术结合

3.3.1 微移动阵列 微移动阵列(microrraft array, MRA)是一种用于研究单细胞生物学的微阵列,这种阵列的材质是聚苯乙烯,其微小透明、有磁性,每个体积都非常小。研究人员通过这种装置可以将细胞均匀地铺到每孔一个细胞,然后可以进行矩阵成像。Gracz等^[33]利用MRA技术进行细胞的长期培养和成像,分析小肠类器官形成过程中形态的变化和基因表达水平的差异,表明了一种已知的肠干细胞巢组分——潘氏细胞(Paneth cell)能够以相互接触的方式促进小肠类器官的增殖分裂及形态的形成,同时该高通量平台与类器官培养技术相结合有望应用于干细胞巢和肿瘤发展的研究。

3.3.2 高内涵筛选 高内涵筛选(high-content screening, HCS)是一种新型的细胞分析及药物筛选技术,该技术同时兼具高灵敏度的显微成像、多靶点的数据分析及灵敏的细胞染色三个特点。大部分肿瘤细胞的特征之一就是能够维持增殖,因此,化学

疗法主要聚焦在细胞周期的调控上。然而,由于一些肿瘤细胞处于“休眠状态”,因此,这些细胞对于细胞周期调控的疗法并没有很好的响应。Wenzel等^[34]利用乳腺癌肿瘤细胞系来源的类器官和高内涵筛选技术筛选出一些药物会特异性地作用于类似于肿瘤组织中“休眠状态”的细胞——类器官内侧细胞,但是对于外侧的细胞和2D培养的细胞却没有影响,同时表明这些药物与常规抑制细胞增殖的药物进行联合治疗具有广阔的应用前景。

3.3.3 CRISPR-Cas9 毫无疑问,当前最流行的基因编辑技术就是CRISPR-Cas9(clustered regularly interspersed short palindromic repeats-caspase9),该技术具有高效地进行基因编辑的特点^[35-36],现在已经被应用于生命科学的各个领域。Matano等^[37]利用CRISPR-Cas9基因编辑系统对结肠类器官的Apc、Smad4、Tp53等抑癌基因和Kras及Pik3ca等原癌基因进行编辑,通过改变类器官培养体系中的组分而进行类器官的筛选,进而获得不同表型的结肠癌模型,该高效的类器官基因编辑系统可以用于研究结肠癌发展的分子机制,例如异倍体、拷贝数变异或者表观遗传学的改变等。

4 展望

类器官在肿瘤研究上具有独特的优势:(1)维持肿瘤细胞的高度异质性;(2)维持肿瘤细胞与微环境基质的接触极性,更好地模拟体内的肿瘤微环境;(3)来源于临床组织的类器官培养效率高、耗时少;(4)肿瘤类器官同时具备肿瘤细胞系可进行遗传操作的优点和小鼠PDX模型的三维复杂系统特性。基于这些优势,在未来,类器官将可能在以下领域发挥重要的作用。

4.1 肿瘤的发生和耐药抵抗机制

细胞命运可塑性在肿瘤的起始、发展和转化过程中都扮演着重要角色。随着癌症的肿瘤干细胞假说的提出,近几年来,不断有证据表明,肿瘤干细胞参与癌症的转化、转移、药物抵抗及复发^[38-41]。类器官结构的形成和功能的发挥更是与干细胞有着直接的联系,同时,肿瘤类器官模型很好地维持了肿瘤细胞的异质性,而肿瘤干细胞和肿瘤细胞的异质性又可能是肿瘤耐药复发的原因。所以,类器官模型很适合用于研究成体干细胞、肿瘤干细胞和肿瘤细胞耐药复发之间错综复杂的关系,进而为揭示肿瘤发生和耐药

性产生的具体机制提供接近于体内的研究模型。

4.2 肿瘤细胞与其微环境的互作

肿瘤微环境主要是由免疫细胞、成纤维基质细胞、血管以及各种细胞因子、趋化因子等组成,其在肿瘤的发展、转移和复发中都发挥着重要的作用。研究人员发现,可以通过调整类器官培养体系中的组分去模拟不同的肿瘤微环境。Fong等^[42]将来源于前列腺癌PDX模型的肿瘤细胞与成骨细胞共同培养,在该培养体系下形成的3D模型能够很好地维持细胞的增殖活性,也能够维持成骨的状态,这与前列腺肿瘤骨转移的表型比较一致。所以,该类器官模型可以用于研究肿瘤细胞与包括基质细胞在内的微环境之间的互作关系。未来的肿瘤类器官研究也会更加注重培养体系的完善,如加入基质细胞、脂肪细胞或者淋巴细胞等使得类器官的培养体系更加接近于活体的肿瘤微环境,进而为研究微环境与肿瘤的之间关系提供一个理想的模型。

4.3 临床的个体化治疗

肿瘤的个性化治疗需要快速、高效地建立病人特异的个性化体外模型,同时,该体外模型需要维持肿瘤细胞在体内的特征,并且能进行一定规模的药物筛选。目前,PDC和PDX都不能同时满足以上条件,虽然PDC易于培养,适于进行高通量分析,是应用最为广泛的癌症体外模型,但是PDC体外建系的成功率相对较低,不具备维持体内特征的微环境条件。PDX是近年来广泛采用的癌症患者肿瘤组织小鼠体内培养和药物测试的平台,但是PDX建模的成功率低、培养周期长、价格昂贵,而且很多晚期的肿瘤患者都不适合用PDX模型来进行个性化用药指导。肿瘤类器官培养只需要非常小的肿瘤穿刺样品,具有成功率高、周期短、维持肿瘤细胞体内特征的优势,将在肿瘤的个性化治疗领域发挥其不可替代的作用,尤其对晚期肿瘤患者的个性化治疗有着巨大的应用前景。

4.4 与液体活检的联合应用

液体活检是近几年发展较为迅猛的生物技术,其在2015年被MIT Technology Review杂志评为年度十大突破技术之一。该技术主要是利用患者的少量血液(也有研究利用尿液和唾液),然后通过物理或者生化的方法分离其组分进而获得肿瘤循环细胞,再利用二代测序技术制定针对不同病况病人的个性化治疗方案^[43]。但是,由于该技术在肿瘤细胞的检

测和富集上存在一些缺陷导致肿瘤循环细胞的获得量较少,所以许多信息并不能通过单独的该项技术获得。而肿瘤类器官的培养技术恰恰可以弥补这一缺陷。通过类器官的培养技术可以扩大肿瘤循环细胞的数量,建立起属于患者的特定细胞库,然后用于研究肿瘤的转移、病理进程的实时分析和药物的个性化测试。相信随着液体活检和类器官培养技术的不断创新和提高两者最终会为肿瘤个性化诊疗的发展提供新的机遇。

当然,类器官培养技术的发展才刚刚开始,仍面临着一些需要解决的问题。一方面,类器官培养体系与活体相比缺少肿瘤微环境成分(如免疫细胞和血管内皮细胞),并不能完全代表肿瘤在体内所处的环境。另一方面,在类器官的培养体系中含有众多组分,其中包括多种通路抑制剂和细胞因子,而这些组分之间存在着功能上的联系,甚至在要研究的目的信号通路中也扮演着重要角色。所以,未来更需要结合临床实践,发展新一代的类器官培养体系。总的来说,类器官在基因水平和形态特点上能够很好地模拟患者体内相应的组织,也适用于高通量的药物筛选,同时为疾病的个性化治疗提供了研究模型。相信随着类器官研究的不断深入和技术的不断革新,类器官作为一种理想的模型在人类研究癌症的征途上将会扮演越来越重要的角色。

参考文献 (References)

- 1 Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345(6194): 1247125.
- 2 Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat Cell Biol* 2016; 18(3): 246-54.
- 3 Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinia PJ, Karthaus WR, Gopalan A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014; 159(1): 176-87.
- 4 Gao D, Chen Y. Organoid development in cancer genome discovery. *Curr Opin Genet Dev* 2015; 30: 42-8.
- 5 Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. *In vitro* propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(9): 2672-9.
- 6 Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, de Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997; 349(9057): 990-3.
- 7 Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(1): 136-40.
- 8 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and

- colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; 449(7165): 1003-7.
- 9 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van de Wetering M, Barker N, Stange DE, *et al.* Single *Lgr5* stem cells build crypt villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459(7244): 262-5.
 - 10 Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, *et al.* Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 2011; 17(10): 1225-7.
 - 11 Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, van Es JH, van Den Brink S, *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011; 141(5): 1762-72.
 - 12 van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, *et al.* Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015; 161(4): 933-45.
 - 13 Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, *et al.* Modeling human cortical development *in vitro* using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(31): 12770-5.
 - 14 Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013; 501(7467): 373-9.
 - 15 Mondrinos MJ, Jones PL, Finck CM, Lelkes PI. Engineering *de novo* assembly of fetal pulmonary organoids. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(21/22): 2892-907.
 - 16 Karthaus WR, Iaquinata PJ, Drost J, Gracanin A, Van Boxtel R, Wongvipat J, *et al.* Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 2014; 159(1): 163-75.
 - 17 Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, Van De Wetering M, *et al.* Unlimited *in vitro* expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the *Lgr5/R-spondin* axis. *EMBO J* 2013; 32(20): 2708-21.
 - 18 Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, Gobaa S, Ranga A, Semb H, *et al.* Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*. *Development* 2013; 140(21): 4452-62.
 - 19 Huch M, Dorrell C, Boj SF, Van Es JH, Li VS, Van De Wetering M, *et al.* *In vitro* expansion of single *Lgr5*⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013; 494(7436): 247-50.
 - 20 Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013; 499(7459): 481-4.
 - 21 Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, Gallegos T, Suzuki K, Okamura D, *et al.* Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol* 2013; 15(12): 1507-15.
 - 22 Takasato M, Pei XE, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, *et al.* Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015; 526(7574): 564-8.
 - 23 Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MMA, *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 2015; 160(1/2): 299-312.
 - 24 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluri-potential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
 - 25 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
 - 26 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
 - 27 Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, Tsai YH, Nagy MS, Dyal R, *et al.* *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 2015; 4: e05098.
 - 28 Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, *et al.* Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015; 160(1): 324-38.
 - 29 Nadauld LD, Garcia S, Natsoulis G, Bell JM, Miotke L, Hopmans ES, *et al.* Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer. *Genome Biol* 2014; 15(8): 428.
 - 30 Chio II, Jafarnejad SM, Ponz-Sarvisé M, Park Y, Rivera K, Palm W, *et al.* NRF2 promotes tumor maintenance by modulating mrna translation in pancreatic cancer. *Cell* 2016; 166(4): 963-76.
 - 31 Li X, Nadauld L, Ootani A, Corney DC, Pai RK, Gevaert O, *et al.* Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat Med* 2014; 20(7): 769-77.
 - 32 Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z, Ewald AJ. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell* 2013; 155(7): 1639-51.
 - 33 Gracz AD, Williamson IA, Roche KC, Johnston MJ, Wang F, Wang Y, *et al.* A high-throughput platform for stem cell niche co-cultures and downstream gene expression analysis. *Nat Cell Biol* 2015; 17(3): 340-9.
 - 34 Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, *et al.* 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experi Cell Res* 2014; 323(1): 131-43.
 - 35 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
 - 36 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
 - 37 Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, *et al.* Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* 2015; 21(3): 256-62.
 - 38 Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007; 11(1): 69-82.
 - 39 Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010; 468(7325): 829-33.
 - 40 Wang Y, Cardenas H, Fang F, Condello S, Taverna P, Segar M, *et al.* Epigenetic targeting of ovarian cancer stem cells. *Cancer Res* 2014; 74(17): 4922-36.
 - 41 Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 2012; 488(7412): 527-30.
 - 42 Fong EL, Wan X, Yang J, Morgado M, Mikos AG, Harrington DA, *et al.* A 3D *in vitro* model of patient-derived prostate cancer xenograft for controlled interrogation of *in vivo* tumor-stromal interactions. *Biomaterials* 2016; 77: 164-72.
 - 43 Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clinical Oncol* 2013; 10(8): 472-84.