

# 胃肠肿瘤类器官应用研究进展与挑战

陈景耀,洪春虹,王小群\*

中山大学附属第七医院 消化医学中心,广东 深圳 518107

**【摘要】** 癌症是全球健康问题,是患者死亡的主要原因。恶性肿瘤的早期诊断、早期治疗的策略已经大大改善了患者的总生存率,同时个性化的靶向药物为晚期肿瘤患者治疗提供了新的机会。然而随着化疗、免疫治疗、靶向治疗日新月异的发展,晚期肿瘤患者治疗后出现药物耐药的情况层出不穷,这极大地限制了治疗效果。近年来类器官的发展为这类患者带来了治疗的福音。类器官能在体外高效培养肿瘤组织细胞,同时保留原代肿瘤细胞的生物特点。在肿瘤的测序分析、药物筛选、个性化治疗等领域发挥重要作用。本文就类器官在胃肠肿瘤临床治疗的不同应用进行综述,为晚期恶性肿瘤治疗提供新的治疗思路。

**【关键词】** 胃肠肿瘤; 类器官; 精准医疗

## Research progress and challenges in the application of gastrointestinal cancer organoids

Chen Jingyao, Hong Chunhong, Wang Xiaoqun\*

Center of Digestive Disease, The Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen, 518107, Guangdong

**【Abstract】** Cancer is a global health problem and the main cause of death in the world. The strategies of early diagnosis and early treatment have greatly improved the overall patients survival, meanwhile personalized targeted drugs provide new opportunities for patients with advanced tumors. However, after receiving treatment of chemotherapy, immunotherapy, and targeted therapy, many patients have developed drug resistance, which greatly limits the therapeutic effect. The development of organoids in recent years has brought the lights for such patients. The organoid efficiently cultivates tumor tissue cells in vitro, while retaining the biological characteristics of primary tumor cells. It plays an important role in tumor sequencing analysis, drug screening, personalized treatment and other fields. This article reviews the research progress and challenges in the application of gastrointestinal cancer organoids, and provides new treatment ideas for advanced malignant tumors.

**【Key words】** Gastrointestinal cancer; Organoids; Personalized treatment

近几十年来,随着我们对肿瘤发生、发展机制地不断深入认识,早期诊断、早期治疗策略改善癌症患者的总体生存率。基于肿瘤基因改变的个体化靶向治疗药物为晚期肿瘤患者治疗提供了新的选择。尽管如此,癌症作为全球第一大致死病因,仍然是我们不得不面临的主要健康问题。为应对严峻挑战,及时将相关的癌症研究成果转化为临床应用显得迫在眉睫。此时选择合适的肿瘤模型显得事半功倍。传统的癌症模型由于其细胞系不能保留肿瘤的异质性,常常出现某个药物在实验室传统疾病模型中表现良好,却在临床试验应用中失败的窘况<sup>[1]</sup>。相反,患者来源的肿瘤移植模型能很好避免该问题。

近年来类器官的出现为癌症研究开辟了新的机遇。类器官是由干细胞驱动,以自我组装的方式构建形成的3D细胞复合体,能够模拟人体器官的结构和功能<sup>[2]</sup>。类器官能保留患者来源的癌症组织的遗传特征和肿瘤异质性。不仅可用于原代培养,还可以传代培养,同时还具有培养时间短、效率高的特点。但是类器官培养需要模拟真实的细胞生长环境,因此需要特殊的复杂的生长因子混合物以及细胞外基质,这造成了类器官费用高昂。由于类器官为肿瘤的研究提供了类似大型生物样本库的功能,为我们深入研究分析癌症生物学信息与转化临床医学提供了不可多得的机会。本综述将探讨类器官在胃肠肿瘤治疗中的应用研究现状与挑战。

作者简介:陈景耀,E-mail: doctorchenjy147@163.com;洪春虹,E-mail: hongchh13@163.com

\*通信作者:王小群,E-mail: wangxqun@mail2.sysu.edu.cn

## 1 胃肠类器官的研究现状

自2009年,荷兰的Hans Clevers博士团队发现了维持

小肠干细胞在3D环境中分裂、分化所需的培养因子组合后,类器官研究在全球范围内迅速发展起来。目前已建立食管<sup>[3]</sup>、胃、小肠、结肠等多种正常或者肿瘤组织类器官模型。随后Sato等<sup>[4]</sup>描述了如何从肠道隐窝或者从富含亮氨酸重复G蛋白偶联受体5(LGR4/5/6)表达的肠道干细胞中建立小鼠小肠类器官的培养。证实了EGF、Noggin、R-spondin-1、烟酰胺和胃泌素的加入促进了肠道出芽类器官的产生。另外,通过添加EGF、Noggin、R-应答蛋白-1和PGE-2<sup>[5]</sup>,胎儿肠道来源的祖细胞也可用于生成肠道类器官。目前该方法已被用于从小鼠和人类胃肠道上皮组织的类器官研究,包括胰腺、肝脏、胃和食管等。一般来说,成体干细胞衍生的类器官嵌入富含层粘连蛋白的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,再覆盖添加了生长因子的培养基,以维持干细胞的生长微环境。此类方法所培育的组织细胞保留了原代细胞的生理功能和组织学特点<sup>[6-8]</sup>。而且来自非肿瘤组织的类器官还具有长时间传代的基因稳定性的特点。2009年Kuo实验室则描述了另一种使用气-液界面(ALI)系统的小鼠肠上皮类器官培养方法<sup>[9]</sup>。在ALI系统中上皮细胞和周围基质(包含成纤维细胞和免疫细胞)共培养,是一种更类似于器官环境的类器官培养方法。通过细胞外基质成分分泌促进类器官生产的所需细胞因子已经成功培养出由上皮细胞和间充质细胞组成的肠、结肠、胃和胰腺类器官<sup>[9,10]</sup>。

## 2 类器官在胃肠肿瘤中的应用

类器官可分别应用于正常细胞和肿瘤细胞的培养,两者的培养方法及培养条件相似。由于肿瘤细胞具有异质性,不同个体来源的肿瘤类器官特征各不相同。因此,有必要建立肿瘤类器官生物样本库。目前已被建立的胃肠肿瘤样本库包含结直肠癌<sup>[11-13]</sup>、胃癌<sup>[14,15]</sup>。基于这些胃肠类器官生物样本库,科学家已成功验证了部分胃肠肿瘤的发生发展机制。例如Matano等<sup>[16]</sup>利用CRISPR/Cas9技术在结肠类器官中引入突变基因,证明关键驱动通路的基因突变是结直肠癌形成的主要决定因素。

**2.1 基于类器官技术建立的胃肠疾病模型** 以往由于缺少成熟稳定的胃肠疾病模型而限制了胃肠领域的研究进步。在未来基于类器官技术的广泛应用将有助于我们建立更加合适的胃肠肿瘤模型,为研究胃肠疾病的发生发展机制以及肿瘤的个性化治疗的选择提供新的助力。最近的研究报道,研究人员已经使用CRISPR/Cas9技术将结直肠癌常见致癌突变引入健康的人类肠道类器官,导致结直肠癌发生<sup>[16,17]</sup>。研究利用CRISPR/Cas9技术设计了APC、KRAS、P53、SMAD4<sup>[18]</sup>突变的结直肠类器官,这些基因分别是Wnt、EGFR、P53和TGF- $\beta$ 通路信号通路的关键基因。将这些修饰后的类器官细胞原位移植到小鼠,成功制作出转移性结直肠癌肿瘤模型<sup>[16]</sup>。同样,来自人胃癌组织的类器官已成功生成用于模拟人类胃癌的发病机制研究<sup>[14]</sup>。总体而言,类器官建立的疾病模型相比于传统的二维单分子培养模

型具有多种优势,例如类器官保留了实际肿瘤的异质性,表现出高水平的基因组稳定性及易于扩增和维护的特点,同时也有助于减少对动物模型的潜在需求。

**2.2 研究胃肠肿瘤的发病机制及肿瘤微环境** 胃肠肿瘤已被证实包含有不同程度的特有基因型和表型,类器官为研究肿瘤异质性的相关功能提供了新的平台,即基因差异是否会影响生物学行为和药物反应。Fuji等<sup>[12]</sup>从同一患者的肿瘤不同区域获取细胞并培养成结直肠类器官,发现具有组织异质性的原发肿瘤以不同形态的类器官分离并可独立发展。同一研究中通过比较来自患者原发和转移部位的类器官,研究人员发现转移部位来源的类器官在异种移植后具有更高的转移能力,这说明同一患者原发和转移部位的肿瘤类器官功能不同。Yan等<sup>[18]</sup>在分析了原发胃癌与胃癌淋巴结转移来源的类器官后得出在弥漫性胃癌患者中两者差异较少,而在混合型胃癌患者中却有显著的差异。总体而言,目前所进行的类器官研究有助于揭示胃肠癌的发病发展机制。

肿瘤微环境是由细胞外基质及非恶性的基质细胞、免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞等组成,是肿瘤发生、发展以及药物反应的重要影响因素<sup>[19-20]</sup>。最近的研究显示通过将类器官与肿瘤微环境的免疫细胞或成纤维细胞共培养,从而杀死肿瘤类器官细胞<sup>[21-23]</sup>。不同的肿瘤类器官与肿瘤微环境中细胞外基质、免疫细胞、CAR-T细胞的相互作用的研究有利于发现和开发新的治疗靶点。

**2.3 抗肿瘤药物的研发及精准医疗的应用** 类器官技术在抗肿瘤药物的开发中具有广泛的应用价值。科研人员建立相关肿瘤类器官生物样本库,通过基因测序捕获肿瘤异质性,并允许使用高通量药物筛选技术来识别潜在的治疗靶点和药物。同时类器官样本库可以排除因非特异性结合或基因多态性引起的药物相关毒性。因此类器官技术的发展有助于我们筛选出专门针对癌细胞的药物,并将药物毒性降至最低。

针对胃肠肿瘤的药物研发和精准医疗应用,2015年Clevers实验室首次利用结直肠癌类器官样本库进行药物筛查<sup>[11]</sup>。该研究将类器官培养的肿瘤细胞接种在384个孔板中,83种具有广泛抗癌靶点的药物被用来处理肿瘤细胞。研究结果发现类器官中基因突变与药物敏感性间的密切联系,例如E3连接酶RNF43突变对porcupine抑制剂敏感,TP53突变对MDM2抑制剂nutlin-3a具有极强的抗性,kras突变的类器官细胞对ERBB抑制剂具有耐药性。该研究证明了结直肠癌类器官的药物筛查的可行性。类似的研究中,Yan等<sup>[18]</sup>则用37种抗癌药物对7例患者的胃癌类器官培养细胞中进行处理。结果显示肿瘤对常用化疗药物的不同敏感性。这突出说明了患者来源的肿瘤类器官样本库用于临床实践的巨大潜力。

## 3 类器官在胃肠肿瘤的应用挑战

类器官作为新兴的疾病模型,与传统的PDX模型相

比具有一定优势。在研究胃肠道疾病方面发挥了巨大的潜力,但它仍存在诸多缺点。一方面,类器官的培养需要ECM与细胞因子的参与,良好的ECM可以通过适当的细胞-基质信号通路来促进类器官生长,目前大多数研究把Matrigel作为ECM的类似物。然而,由于存在可能致癌的不确定因素,至今仍未获准在人类临床试验中使用<sup>[24]</sup>。另一方面,不同批次的ECM类似物由于空间结构、细胞因子成分各不相同,难以模拟天然的肿瘤微环境(包括免疫成分、血管等)。这增加了培养结果不可预测性,限制了类器官技术的发展,因此研究探索新的ECM类似物迫在眉睫。最后,由于类器官受限于缺乏血管系统导致氧气、代谢物和营养物质的传输有限,类器官模型最终大小有限<sup>[25]</sup>。目前有研究者已采用内皮管平行生长的水凝胶纤维来克服该问题<sup>[26]</sup>。

此外,类器官本质上来源于干细胞,干细胞的使用绕不开伦理问题,人体组织的药物测试和基因修饰面临着伦理挑战。尽管药物试验和基因修饰已在动物实验中得到验证,但过渡到人体类器官实验受道德、经验、感知等伦理问题影响<sup>[27]</sup>。目前类器官在法律和道德上还是灰色地带,急需全社会及政府相关部门对当前伦理原则和法规进行修订。

#### 4 展望

目前类器官在转化医学和精准医学上已经展示出巨大的应用潜力。已建立的胃肠类器官生物样本库已经协助临床医生在预测抗癌药物反应以及个体水平上实现精准医疗发挥重要作用。同时类器官样本库运用于新药开发,为晚期肿瘤患者带来新的希望。然而类器官在实体瘤的培养中面临诸如生长受限、培养成本过高、培养流程缺乏标准化等困扰。随着类器官技术的进一步发展,例如新一代类器官基因芯片模型建立等,将提高类器官在肿瘤研究与治疗中的应用价值。

#### 参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] BALLARD DH, BOYER CJ, ALEXANDER JS, et al. Organoids - Preclinical Models of Human Disease [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(20):1981-1982.
- [3] TRISNO SL, PHILO KE, MCCracken KW, et al. Esophageal Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Delineate Sox2 Functions during Esophageal Specification [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 501-515.
- [4] SATO, T, VRIES RG, SNIPPET HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244):262-265.
- [5] FORDHAM, RP, YUI S, HANNAN NR, et al. Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 734-744.
- [6] KRETZSCHMAR K, CLEVERS H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish [J]. *Dev Cell*, 2016, 38(6):590-600.
- [7] MIN S, KIM S, CHO SW. Gastrointestinal tract modeling using organoids engineered with cellular and microbiota niches [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(2):227-237.
- [8] NAKAMURA T, SATO T. Advancing Intestinal Organoid Technology Toward Regenerative Medicine [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(1):51-60.
- [9] OOTANI A, LI X, SANGIORGI E, et al. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche [J]. *Nat Med*, 2009, 15(6):701-706.
- [10] LI X, NADAULD L, OOTANI A, et al. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture [J]. *Nat Med*, 2014, 20(7):769-777.
- [11] VAN DE WETERING M, FRANCIES H, FRANCIS J, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients [J]. *Cell*, 2015, 161(4):933-945.
- [12] FUJII M, SHIMOKAWA M, DATE S, et al. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6):827-838.
- [13] GANESH K, WU C, O'ROURKE KP, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation [J]. *Nat Med*, 2019, 25(10):1607-1614.
- [14] SEIDLITZ T, MERKER SR, ROTHE A, et al. Human gastric cancer modelling using organoids [J]. *Gut*, 2019, 68(2):207-217.
- [15] NANKI K, TOSHIMITSU K, TAKANO A, et al. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis [J]. *Cell*, 2018, 174(4):856-869.
- [16] MATANO M, DATE S, SHIMOKAWA M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3):256-262.
- [17] MIURA S, SUZUKI A. Generation of Mouse and Human Organoid-Forming Intestinal Progenitor Cells by Direct Lineage Reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(4):456-471.
- [18] YAN H, SIU HC, LAW S, et al. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6):882-897.
- [19] SENTHEBANE DA, ROWE A, THOMFORD NE, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7).
- [20] BALKWILL FR, CAPASSO M, HAGEMANN T. The tumor

- microenvironment at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 23): 5591-5596.
- [21] CHAKRABARTI J, HOLOKAI L, SYU L, et al. Mouse-Derived Gastric Organoid and Immune Cell Co-culture for the Study of the Tumor Microenvironment [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1817: 157-168.
- [22] TSAI S, MCOLASH L, PALEN K, et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):335.
- [23] NEAL JT, LI X, ZHU J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7):1972-1988.
- [24] KIM Y, KO H, KWON HK, et al. Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering [J]. *Int Neurorol J*, 2016, 20(Suppl 1):S23-S29.
- [25] LANCASTER MA, RENNER M, MARTIN CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467):373-379.
- [26] TIBBITT MW, ANSETH KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(4):655-63.
- [27] TAKIS PG, TADDEI A, PINI R, et al. Fingerprinting Acute Digestive Diseases by Untargeted NMR Based Metabolomics [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11):3288.

---

·读者·作者·编者·

## 本刊对视频投稿的要求

为了促进同行之间的技术交流、强化继续教育,本刊特开辟的视频之窗栏目,为此提供一个极佳的交流平台。本刊视频发表要求如下:可采用 AVI、MPEG 和 RAM 等常用格式。视频文件的压缩格式需计算机常用操作系统支持。视频文件的音频和视频图像要同步。窗口尺寸要能够清晰显示图像细节,不低于 352×288 像素。字幕工整、清晰、易于辨认。字幕出现时间应与配音或者内容相协调一致。视频时长 20 min 左右为宜。需要有对该手术进行文字说明和简要的步骤说明,此外需附上个人照片和简介,包括目前任职情况、主攻方向、已经发表的文章情况,以及主持的科研项目等。来稿请发送至本刊编辑部 E-mail: [digestiveoncology@163.com](mailto:digestiveoncology@163.com) 或通过我刊网上投稿系统投稿。此栏目不收取任何费用,欢迎各位作者踊跃投稿。