

胃癌类器官的建立及应用研究进展

李涛¹ 宋晓玉² 褚福浩³ 李园¹ 薄荣强¹ 杨晔¹ 苏泽琦⁴ 丁霞^{3*}

(¹北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; ²中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥 230027;

³北京中医药大学中医学院, 北京 100029; ⁴北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029)

摘要 胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 其发病率与死亡率高, 预后差。目前, 由于缺乏表征胃癌发生发展特性的研究模型, 胃癌发病机制研究与治疗药物的开发受到一定限制。类器官是一种干细胞来源的三维培养的细胞群, 具有多细胞组装、自我更新的活体组织特性。可传代扩增的胃癌类器官研究模型, 能够保持基因组稳定性与肿瘤异质性, 模拟肿瘤微环境, 弥补了传统细胞与动物模型的不足。该文综述了胃癌类器官的建立方法及其在胃癌发病机制探究、肿瘤微环境模拟、胃癌相关基因功能检测、药物敏感性筛选以及胃癌个体化治疗方面的最新进展; 此外还讨论了类器官在胃癌研究中的优势与不足, 为揭示胃癌发病机制、研发胃癌防治药物提供模型参考。

关键词 胃癌; 类器官; 研究模型; 三维; 个体化治疗

Research Progress on the Construction and Application of Gastric Cancer Organoid

LI Tao¹, SONG Xiaoyu², CHU Fuhao³, LI Yuan¹, BO Rongqiang¹, YANG Ye¹, SU Zeqi⁴, DING Xia^{3*}

(¹Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

²Hefei National Science Center for Physical Sciences at Nanoscale, University of Science & Technology of China, Hefei 230027, China;

³School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

⁴Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Gastric cancer is a common malignant tumor of digestive system with high morbidity and mortality, and poor prognosis. Currently, due to the lack of research models that mimic the characteristics of the occurrence and development in gastric cancer, the researches on the pathogenesis and the development of therapeutic drugs are limited. Organoid is a kind of stem cell-derived three-dimensional cultured cell group with multicellular-assembly and self-renewal characteristics. The research model of gastric cancer organoids, can expand from generation to generation, maintain the stability of the genome, possess the tumor heterogeneity and simulate tumor microenvironment, to overcome the deficiencies of traditional two-dimensional cultured cell lines and animal models. This article recapitulates the establishment method of gastric cancer organoids and the latest progress in the study of gastric cancer pathogenesis, the simulation of the tumor microenvironment, the detection of gastric cancer related gene function, drug sensitivity screening and personalized treatment of gastric cancer. Furthermore, the advantages and disadvantages of organoids in the study of gastric cancer are discussed, in order to provide a model reference

收稿日期: 2020-04-20 接受日期: 2020-05-27

国家自然科学基金(批准号: 81630080、81703931和81903792)、国家重点研发计划(批准号: 2018YFC1704100、2018YFC1704106)和中国博士后科学基金(批准号: 2019M650600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13611184842, E-mail: dingx@bucm.edu.cn

Received: April 20, 2020 Accepted: May 27, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81630080, 81703931 and 81903792), the National Key Research and Development Project of China (Grant No.2018YFC1704100, 2018YFC1704106) and China Postdoctoral Science Foundation Grant (Grant No.2019M650600)

*Corresponding author. Tel: +86-13611184842, E-mail: dingx@bucm.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5340>

for revealing the pathogenesis of gastric cancer and developing drugs for the prevention and treatment of gastric cancer.

Keywords gastric cancer; organoid; research model; three-dimensional; personalized treatment

胃癌(gastric cancer)作为常见的消化系统恶性肿瘤,是导致全球癌症负担的重要原因^[1]。在中国的癌症疾病谱中,胃癌发病率居于第二位,死亡率居第三^[2]。胃癌的发生常常经历慢性非萎缩性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌的慢性演变过程,涉及多种细胞类型及功能改变^[3]。胃癌研究模型包括癌症细胞系、动物模型以及患者来源的肿瘤异种移植模型等。其中,传统二维培养的细胞系由于连续传代、染色体改变、原癌特性的丧失以及三维结构的缺乏导致其无法代表原始活体组织特性^[4]。动物模型在胚胎发育及胃上皮组织结构方面与人差异显著,且难以模拟整个炎症转化的演变过程^[5]。肿瘤异种移植模型通过原位或皮下移植肿瘤细胞或者肿瘤组织,呈现原发肿瘤的基因型和表型特征以及接近生理状态的微环境相互作用等特征,但由于物种差异,且构建模型需要花费大量时间与费用,限制了其在研究中的应用^[6]。由于缺乏表征胃癌发生发展特性的研究模型,胃癌发病机制研究与治疗药物的开发受到一定限制。

类器官是一种干细胞来源,在体外进行三维培养,具有自我组装、自我更新等多种活体组织特性的细胞群,是器官发育研究、发病机制揭示、疾病建模及药物筛选等生命科学基础研究和临床应用研究的有利工具^[7-9]。胃类器官与胃上皮组织在组织结构、细胞类型及特定功能方面极其相似。形态上胃类器官呈现为由单层上皮细胞构成的球体结构,中心为空腔,与胃腔类似,内含胃酸及细胞分泌物^[10]。胃类器官包含主细胞、壁细胞、干细胞、表面黏液细胞、颈黏液细胞及多种内分泌细胞等所有类型的终末分化胃上皮细胞^[11-12],胃类器官具有上皮屏障、细胞重建及胃酸分泌等生理功能^[13],可快速增殖、更新、分化并在组胺刺激下,腔内pH值降低,而质子泵抑制剂奥美拉唑可以逆转这一变化^[14]。胃癌类器官的建立能够保持基因组稳定性与肿瘤异质性的特征,在胃癌发病机制探究、肿瘤微环境模拟、胃癌相关基因功能检测、药物敏感性筛选以及胃癌个体化治疗方面具有较大的研究应用价值^[13,15]。本文综述了胃癌类器官的构建方法及其在胃癌研究中的

应用进展,并讨论了其优势与不足,为揭示胃癌发病机制,研发胃癌防治药物提供模型参考。

1 胃癌类器官的建立与培养

类器官一般来源于多能干细胞(包括胚胎干细胞与诱导多能干细胞)、成体干细胞以及肿瘤干细胞^[16]。目前,已经证实可通过手术切除标本、组织活检等方式获得人的胃癌类器官^[17-19]。使用含有1×青霉素/链霉素(1× Penicillin/Streptomycin, 1× P/S)的Advanced DMEM/F12培养液冲洗胃癌组织2次,然后置于含有消化缓冲液的10 cm培养皿中,刀片切碎组织(2~5 mm²),在37 °C条件下,肿瘤细胞从组织块中被释放出来。细胞分离后悬浮在基质胶上,显示为三维矩阵成群细胞。胃癌类器官的基础培养基由Advanced DMEM/F12、Glutamine、HEPES(*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-ethane-sulphonic acid)、P/S等组成^[20]。此外,还包括对胃上皮细胞增殖与成熟比较重要的细胞因子,如Wnt3A、R-spondin、Noggin、hEGF(human epidermal growth factor)、hFGF10(human fibroblast growth factor 10)和胃泌素等,以促进类器官生长和相关干细胞的干性维持^[10]。类器官在37 °C、5% CO₂的条件下孵育,在3~4天时发展成由分化的细胞,包括胃干细胞、黏液细胞、主细胞、壁细胞和内分泌细胞所包围的球面囊,类器官通过不断地增殖与传代,用于直接检测或者冷冻备用^[15,18]。胃癌类器官的培养流程如图1所示。

2 胃癌类器官的应用

目前,胃癌类器官主要应用于探究胃癌发病机制、模拟肿瘤微环境、检测胃癌相关基因功能、药物敏感性筛选以及胃癌个体化治疗等方面。胃癌类器官的应用模式如图2所示。

2.1 研究胃癌发生、发展机制

研究证实,胃癌前组织源性的干细胞诱导的类器官可以呈现癌变的整个过程,而来源于同一患者原发肿瘤组织与淋巴结转移组织的类器官表现出不同差异,预示着在癌症发展与转移过程中,类器官可以表示特有的基因型与表型,与其他模型相比具有

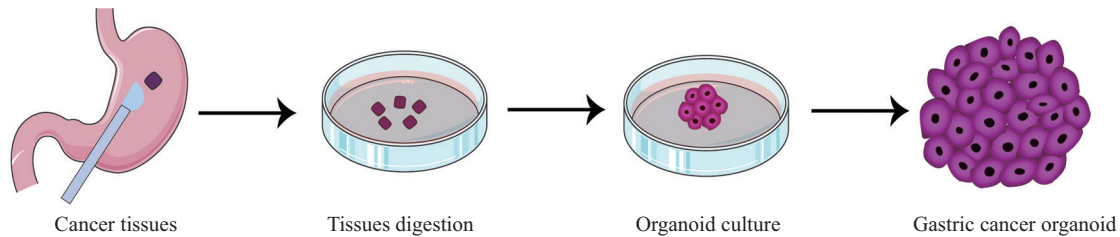


图1 胃癌类器官的培养示意图

Fig.1 Schematic representation of culture of gastric cancer organoid

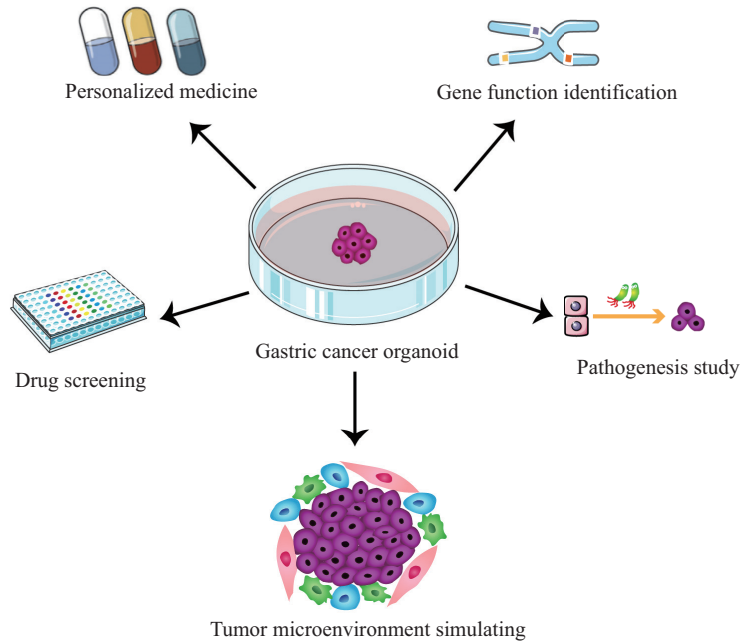


图2 胃癌类器官的应用示意图

Fig.2 Schematic representation of application of gastric cancer organoid

独特优势^[18,21]。由于类器官相较于细胞培养与动物模型的显著优势,通过直接干预类器官中的某些特定分子,可用来研究其促进或抑制胃癌发生、发展的作用及背后机制。有研究对构建的胃癌类器官过表达环状RNA NRIP1(CircRNA NRIP1, CircNRIP1)证明, CircNRIP1具有促使胃癌细胞存活与增殖的作用^[22]。NADAULD等^[23]采用小鼠胃类器官培养系统,通过敲低转化生长因子 β 受体2(transforming growth factor beta receptor 2, *TGFBR2*)的表达,证明TGFBR2是诱发弥漫性胃癌转移的重要驱动分子。

胃癌是一种炎症相关的癌症,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染被认为是诱导胃炎癌变的最重要危险因素^[24-25]。传统的细胞培养技术无法培养黏液腺细胞与壁细胞。而众所周知, HP诱发慢性胃炎的一个主要病理特征是壁细胞的丢失,胃类器官模型的成功建立可弥补细胞系培养无法开展

的诸如壁细胞研究的缺点,通过向类器官上皮空腔内微注射HP,模拟宿主与病原的相互作用,成为揭示HP诱发胃黏膜免疫炎症反应、腺体萎缩机制以及炎癌转化过程演变规律的有力工具^[12,26]。二维细胞培养模型缺乏上皮细胞的多样性和极性,难以分析细菌和宿主细胞之间的相互作用。相比之下,将HP微注射到具有极性上皮结构的三维类器官空腔中,可以更好地模拟胃中HP感染后的病理变化^[12,26]。有研究直接诱导分化多能干细胞产生类器官,通过向空腔内注射HP,证明HP诱发的炎症反应依赖于CagA(cytotoxin-associated gene A)与c-Met(hepatocyte growth factor receptor)的相互作用^[11]。

2.2 模拟肿瘤微环境

肿瘤微环境(tumor microenvironment)是由肿瘤细胞、基质细胞、免疫细胞、内皮细胞等组成,参与肿瘤发生、发展以及药物反应的整个过程^[28-29]。

二维培养的细胞无法表征肿瘤微环境与细胞间的信号传导, 肿瘤动物模型尽管能够克服上述困难, 但是却难以对相关微环境因子进行干预并实时进行高分辨率的动态观察, 另外, 存在物种之间的差异^[30]。最新开展的研究中, 将肿瘤类器官与微环境其他类型细胞如成纤维细胞、免疫细胞共培养, 可在体外对肿瘤微环境进行表征^[31-33]。CHAKRABARTI等^[31]采用转基因小鼠模型来源的胃癌组织类器官与固有免疫细胞共培养模拟胃癌肿瘤微环境, 研究程序性细胞死亡受体-1/程序性细胞死亡配体1(programmed cell death protein-1/programmed cell death ligand 1, PD-1/PDL1)之间的相互作用。CHEN等^[34]培养了含有上皮细胞与间充质基质的p53缺失小鼠胃类器官模拟微环境及信号传导, 使用单细胞RNA测序技术测定了4 391个细胞的转录组, 并鉴定了类器官模型中存在上皮细胞、成纤维细胞与巨噬细胞, 最终确定该体系可用于研究胃组织微环境与免疫反应。

2.3 胃癌相关基因功能检测

胃癌是一种伴随突变负荷的基因组异质性疾病, 大约有一半的胃癌表现为染色体不稳定性, 包括基因拷贝数的增减, 而微卫星不稳定性的高突变胃癌样本中存在DNA错配修复与较高的肿瘤突变负荷, 含有的突变基因可编码靶向致癌的信号蛋白^[35-36]。通过拷贝数增益过表达癌基因参与胃癌的发生、发展, 而这些基因区域的局灶性扩增及其扩增频率的增加也与侵袭性临床病理特征及疾病预后不良相关^[37-38]。随着第三代基因编辑技术的迅速发展, 基于类器官模型开展靶向敲除或过表达胃癌相关基因成为验证特定基因功能的有效工具。NANKI等^[39]通过CRISPR-Cas9技术敲除正常胃类器官肿瘤抑制基因*CDH1*(cadherin 1)可诱导出胃癌样实体结构, 富有迁移活性的形态学改变, 而敲除癌基因*RHOA*(ras homolog gene family member A)后, 类器官形态恢复正常。在参与临床研究的592例胃癌患者中, 发现*C8orf76*(chromosome 8 open reading frame 76)基因出现过度表达与扩增, 并与显著缩短的生存期有关; 进一步的细胞及类器官模型研究明确, *C8orf76*基因显著抑制细胞凋亡, 促进胃癌细胞增殖、细胞周期转化和迁移/侵袭, 而沉默*C8orf76*基因表达可明显抑制患者源性胃癌类器官的生长^[40]。

2.4 胃癌防治药物筛选

药物筛选是选用多种检测方法测试候选药物

或化合物库以期获得目的药物的方法, 涉及药物的活性检测、安全性评价以及毒性测试。传统的二维和三维培养的细胞无法模拟在体有序的组织结构与动态生理变化, 缺乏机体与细胞之间的相互作用, 其数据可靠性面临挑战。据统计, 2000年1月至2015年10月进入I~III期临床试验的化合物超过21 143种, 最终只有13.8%的研发药物获得FDA批准, 而针对癌症的药物研发成功率仅为3.4%, 最常见的原因因为药物有效性的缺乏^[41]。癌症是一种高度异质性的疾病, 因此建立生理、病理以及临床药物反应层面与胃癌病人相近的模型, 对于药物潜在效果的评估以及对患者自身救治的有效性等至关重要^[42]。通过分离培养胃癌患者类器官构建胃癌类器官生物样本库, 整个过程成本相对较低、时间短且比肿瘤异种移植模型更适合基因操作, 可用于大规模的高通量药物筛选, 是研究筛选防治胃癌药物的重要平台^[4,42-43]。

一项基于32例胃癌患者63个类器官的外显子和转录组数据分析表明, 这些类器官保留了原始肿瘤的形态、蛋白表达、遗传特征和分子亚型, 同时, 基于该样本库对美国FDA批准的治疗胃癌药物Napabucasin及临床试验药物Vistusertib与VE-822进行检测, 均显示具有良好的敏感性^[18]。恶性腹水与腹膜转移癌是晚期胃癌的常见表现, 然而一直缺乏能够准确模拟腹水恶性细胞特性的体外模型。有研究者构建了11种胃癌患者恶性腹水肿瘤细胞来源的胃癌类器官, 采用免疫组化比较病理形态, 全外显子测序比较基因组差异, 发现这些类器官具有不同的生长特性、形态及相应恶性细胞的基因组特征, 表现出针对化疗的异质性, 可用于药物筛选^[44]。

2.5 胃癌个体化治疗

目前, 针对胃癌不同时期的治疗药物发展迅速, 然而处方治疗通常基于药物的一般成功率, 而不是特定患者对药物的反应。虽然, 对疾病进行分期、病理分型以及基因测序技术的发展与分子分型的提出有助于指导胃癌患者的临床用药, 但是仍需有效的工具来支持预测特定个体对药物的反应^[45-46]。通过构建胃癌类器官可直接针对患者来源胃癌样本开展研究, 传代稳定性好, 且病人组织来源的类器官培养保存了原始肿瘤的组织结构、基因表达和基因组全景图, 即使在相同的培养基条件下长期扩大培养, 仍然保留不同肿瘤组织和亚型的特性^[47-49]。与传统基因表达检测及药物敏感性测试等个体化治疗相

比,类器官应用于个体化治疗所需时间明显缩短,为每个病人提供了一个可实时评估效果的模型,基于此模型的相关实验数据可迅速转化为临床决策的依据,不仅给出了最佳的治疗组合的证据,也减少了无效治疗^[48,50]。

SEIDLITZ等^[51]使用三苯氧胺诱导CreERT2系统构建胃癌转基因小鼠的不同亚型,通过培养不同亚型胃癌小鼠的类器官发现,来源于GS-TGBF和GS-Wnt小鼠肿瘤的类器官对多西紫杉醇耐药,而来源于染色体不稳定型胃癌的类器官对曲美替尼更具耐药性。STEELE等^[52]建立了基于7例胃癌患者样本来源的类器官样本库, RNA测序显示,胃癌患者来源类器官的转录组信息与病人原肿瘤组织相似。采用标准的化疗药物(表阿霉素、奥沙利铂以及5-氟尿嘧啶)对构建的胃癌类器官进行干预,并与患者本人对几种化疗药物的敏感性进行对比,进而发现建立的胃癌类器官有助于预测类器官来源患者本人对化疗药物的敏感性。

3 小结

类器官在胃癌研究中的应用能有效模拟胃腺在体有序的动态病理变化,通过向类器官上皮空腔内微注射HP,模拟宿主与病原的相互作用^[53];将胃癌类器官与宿主免疫细胞及其他细胞共培养为揭示微环境在肿瘤发生、发展中的作用提供条件^[54]。与传统细胞造模方式相比,胃癌类器官能够保持基因组稳定性与肿瘤异质性的特征,提供了更为贴近原癌组织特性的模型;与肿瘤异种移植模型相比,胃癌类器官成本低、耗时少^[13]。此外,通过建立胃癌类器官生物样本库,为临床药物高通量筛选与个体化治疗提供优选模型,也有助于不同国家、研究机构及团队之间的研究合作^[55-56]。

虽然胃癌类器官呈现出许多独特的体外模型优势,但也存在一些限制与不足。胃癌类器官的建立需要多种技术与后勤支持,分离病人胃癌组织建立类器官样本库对技术要求较高,且获得足够的胃癌样本亦受患者数量限制^[18]。胃癌微环境中既有肿瘤组织,也有很多支持细胞和间质以及新生血管等,参与肿瘤的生长与转移^[57]。而类器官毕竟生长在人为提供的最佳生长环境和促生长基质中,缺乏血管生成从而无法完全模拟癌组织在体内的肿瘤微环境^[58]。KUO团队^[59-60]从2009年开始就在探索运用气

液交互类器官培养技术模拟肿瘤微环境,新技术保留了肿瘤组织原位基质和具有免疫检查点阻断功能的肿瘤浸润淋巴细胞群,在应用类器官模式模拟肿瘤免疫微环境方面跨出了重大一步。后续研究应该基于类器官培养开展进一步的技术优化,为揭示肿瘤的发生发展机制,研发胃癌防治药物提供最佳的模型服务。

参考文献 (References)

- [1] COLLABORATORS G S C. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(1): 42-54.
- [2] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*(ZHEN R S, SUN K X, ZHANG S W, et al. Epidemiological analysis of malignant tumors in China in 2015 [J]. *Chinese Journal of Oncology*), 2019, 41(1): 19-28.
- [3] CORREA P. A human model of gastric carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(13): 3554-60.
- [4] SIMIAN M, BISSELL M J. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(1): 31-40.
- [5] EICHER A K, BERNIS H M, WELLS J M. Translating developmental principles to generate human gastric organoids [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(3): 353-63.
- [6] HIDALGO M, AMANT F, BIANKIN A V, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(9): 998-1013.
- [7] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [8] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(3): 246-54.
- [9] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 407-18.
- [10] MERKER S R, WEITZ J, STANGE D E. Gastrointestinal organoids: how they gut it out [J]. *Dev Biol*, 2016, 420(2): 239-50.
- [11] MCCracken K W, CATA E M, CRAWFORD C M, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids [J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 400-4.
- [12] POMPAIAH M, BARTFELD S. Gastric organoids: an emerging model system to study *Helicobacter pylori* pathogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 400: 149-68.
- [13] LAU H, KRANENBURG O, XIAO H, et al. Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4): 203-22.
- [14] SCHUMACHER M A, AIHARA E, FENG R, et al. The use of murine-derived fundic organoids in studies of gastric physiology [J]. *J Physiol*, 2015, 593(8): 1809-27.
- [15] SEIDLITZ T, MERKER S R, ROTHE A, et al. Human gastric cancer modelling using organoids [J]. *Gut*, 2019, 68(2): 207-17.
- [16] XU H, LYU X, YI M, et al. Organoid technology and applications

- in cancer research [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 116.
- [17] GAO M, LIN M, RAO M, et al. Development of patient-derived gastric cancer organoids from endoscopic biopsies and surgical tissues [J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 25(9): 2767-75.
 - [18] YAN H, SIU H C, 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): 882-97.
 - [19] BARTFELD S, CLEVERS H. Organoids as model for infectious diseases: culture of human and murine stomach organoids and microinjection of *Helicobacter pylori* [J]. *J Vis Exp*, 2015, 105: 53359
 - [20] SATO T, CLEVERS H. SnapShot: growing organoids from stem cells [J]. *Cell*, 2015, 161(7): 1700.
 - [21] LIN M, GAO M, CAVNAR M J, et al. Utilizing gastric cancer organoids to assess tumor biology and personalize medicine [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(7): 509-17.
 - [22] ZHANG X, WANG S, WANG H, et al. Circular RNA circNRP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mTOR pathway [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 20.
 - [23] NADAULD L D, GARCIA S, NATSOULIS G, et al. Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(8): 428.
 - [24] HARDBOWER D M, PEEK R J, WILSON K T. At the Bench: *Helicobacter pylori*, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(2): 201-12.
 - [25] SUGANO K. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the incidence of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gastric Cancer*, 2019, 22(3): 435-45.
 - [26] YAO X, SMOLKA A J. Gastric parietal cell physiology and *Helicobacter pylori*-induced disease [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8): 2158-73.
 - [27] BERTAUX-SKEIRIK N, FENG R, SCHUMACHER M A, et al. CD44 plays a functional role in *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell proliferation [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2): 1004663.
 - [28] SENTHEBANE D A, ROWE A, THOMFORD N E, et al. The role of tumor microenvironment in chemoresistance: to survive, keep your enemies closer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1586.
 - [29] BALKWILL F R, CAPASSO M, HAGEMANN T. The tumor microenvironment at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 23): 5591-6.
 - [30] SAGLAM-METINER P, GULCE-IZ S, BIRAY-AVCI C. Bioengineering-inspired three-dimensional culture systems: organoids to create tumor microenvironment [J]. *Gene*, 2019, 686: 203-12.
 - [31] 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: 157-68.
 - [32] 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.
 - [33] NEAL J T, LI X, ZHU J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-88.
 - [34] CHEN J, LAU B T, ANDOR N, et al. Single-cell transcriptome analysis identifies distinct cell types and niche signaling in a primary gastric organoid model [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4536.
 - [35] LI X, WU W K, XING R, et al. Distinct subtypes of gastric cancer defined by molecular characterization include novel mutational signatures with prognostic capability [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(7): 1724-32.
 - [36] ADAM J B, VESTEINN T, ILYA S, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202-9.
 - [37] WANG X, LIU Y, SHAO D, et al. Recurrent amplification of MYC and TNFRSF11B in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(1): 116-27.
 - [38] LI X, PASCHKE B, ZHANG W, et al. Association of MUC16 mutation with tumor mutation load and outcomes in patients with gastric cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(12): 1691-8.
 - [39] 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): 856-69.
 - [40] WANG X, LIANG Q, ZHANG L, et al. C8orf76 promotes gastric tumorigenicity and metastasis by directly inducing lncRNA DUSP5P1 and associates with patient outcomes [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(10): 3128-40.
 - [41] WONG C H, SIAH K W, LO A W. Estimation of clinical trial success rates and related parameters [J]. *Biostatistics*, 2019, 20(2): 273-86.
 - [42] KONDO J, INOUE M. Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 470.
 - [43] JEON J, CHEONG J H. Clinical implementation of precision medicine in gastric cancer [J]. *J Gastric Cancer*, 2019, 19(3): 235-53.
 - [44] LI J, XU H, ZHANG L, et al. Malignant ascites-derived organoid (MADO) cultures for gastric cancer *in vitro* modelling and drug screening [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(11): 2637-47.
 - [45] CHEONG J H, YANG H K, KIM H, et al. Predictive test for chemotherapy response in resectable gastric cancer: a multi-cohort, retrospective analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(5): 629-38.
 - [46] ISHII T, KAWAZOE A, SHITARA K. Dawn of precision medicine on gastric cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2019, 24(7): 779-88.
 - [47] PRAHARAJ P P, BHUTIA S K, NAGRATH S, et al. Circulating tumor cell-derived organoids: current challenges and promises in medical research and precision medicine [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1869(2): 117-27.
 - [48] ABERLE M R, BURKHART R A, TIRIAC H, et al. Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer [J]. *Br J Surg*, 2018, 105(2): 48-60.
 - [49] CORSO S, ISELLA C, BELLOMO S E, et al. A comprehensive PDX gastric cancer collection captures cancer cell intrinsic transcriptional MSI traits [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(22): 5884-96.
 - [50] ZHANG F, WANG W, LONG Y, et al. Characterization of drug responses of mini patient-derived xenografts in mice for predicting cancer patient clinical therapeutic response [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 60.
 - [51] SEIDLITZ T, CHEN Y T, UHLEMANN H, et al. Mouse models of human gastric cancer subtypes with stomach-specific Cre-

- ERT2-mediated pathway alterations [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(6): 1599-614.
- [52] STEELE N G, CHAKRABARTI J, WANG J, et al. An organoid-based preclinical model of human gastric cancer [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(1): 161-84.
- [53] BURKITT M D, DUCKWORTH C A, WILLIAMS J M, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(2): 89-104.
- [54] BERTAUX-SKEIRIK N, CENTENO J, FENG R, et al. Co-culture of gastric organoids and immortalized stomach mesenchymal cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 23-31.
- [55] JIN M Z, HAN R R, QIU G Z, et al. Organoids: an intermediate modeling platform in precision oncology [J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 174-80.
- [56] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-97.
- [57] WU T, DAI Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61-8.
- [58] TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 952-5.
- [59] 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): 701-6.
- [60] LI X, OOTANI A, KUO C. An air-liquid interface culture system for 3D organoid culture of diverse primary gastrointestinal tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 33-40.