



高栋博士,中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原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。高栋课题组以成体组织类器官、肿瘤类器官和小鼠模型为基础,运用分子细胞生物学的实验手段,研究成体干细胞调控机理和肿瘤病理进展与耐药的分子机制,近年来以通讯或共同通讯作者身份在*Nature Genetics*、*Cell Stem Cell*、*Journal of Clinical Investigation*、*Nature Communications*等杂志上发表多篇论文。

<http://www.sibcb.ac.cn/gaolab/>

类器官模型在前列腺研究中的应用

刘壮^{1#} 于波^{2#} 于晨³ 高栋^{1*}

(¹中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 细胞生物学国家重点实验室, 上海市分子男科学重点实验室, 上海 200031; ²大庆师范学院, 生物工程学院, 大庆 163712; ³深圳湾实验室, 深圳 518132)

摘要 前列腺癌(prostate cancer, PCa)是欧美国家发病率第一的男性恶性肿瘤,其在中国的发病率呈逐年上升趋势。前列腺细胞命运调控机理的研究对前列腺疾病的诊断和治疗具有重要的意义,但是前列腺研究的细胞模型极其匮乏,严重影响了前列腺相关的基础和临床应用研究进展。近年来,类器官培养技术为干细胞和肿瘤研究领域带来了革命性的变化,同时也极大地推动了前列腺研究的进展。该综述概述了前列腺类器官培养技术在前列腺相关研究领域中的应用,讨论了该项技术的优势以及不足之处,并对该技术广阔的应用前景进行了展望。

关键词 类器官;干细胞;肿瘤研究;前列腺

Application of Organoid Model in Prostate Research

LIU Zhuang^{1#}, YU Bo^{2#}, YU Chen³, GAO Dong^{1*}

(¹State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

²School of Biological Engineering, Daqing Normal College, Daqing 163712, China;

³Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518132, China)

收稿日期: 2021-04-12 接收日期: 2021-05-20

国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0505500)、中国科学院A类战略性先导科技专项(批准号: XDA16020905、XDB19000000)、国家自然科学基金(批准号: 81830054、81772723)和国家科技重大专项课题项目(批准号: 2018ZX10302207-004-002)资助的课题

[#]共同第一作者

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

Received: April 12, 2021 Accepted: May 20, 2021

This work was supported by the Grants from the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFA0505500), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA16020905, XDB19000000), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81830054, 81772723), and the State Key Project for Infectious Diseases (Grant No.2018ZX10302207-004-002)

[#]These authors contributed equally to this work

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

Abstract PCa (prostate cancer) is the most common cancer in males in Western countries, and its incidence is increasing in China. The studies of prostate cell fate regulation are critical for PCa diagnosis and therapy. However, prostate research is hampered by the lack of suitable cell models. In recent years, the emerging organoid culture technology has brought revolutionary changes to the field of stem cell and tumor research, which has greatly promoted the progress of prostate research. This review summarizes the application of organoid culture technology in prostate stem cell and PCa research, discusses its advantages and disadvantages, and looks forward to the future directions of organoid culture technology.

Keywords organoid; stem cell; cancer research; prostate

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是欧美国家发病率第一、死亡率第二的男性恶性肿瘤^[1]。随着中国经济的发展、人民生活水平的提高和平均寿命的延长,前列腺癌在中国的发病率和死亡率也呈逐年上升趋势。正常前列腺上皮组织由管腔细胞、基底细胞和极少量的神经内分泌细胞组成^[2-3]。前列腺上皮组织的细胞谱系在其组织发育,肿瘤发生、进展及恶性转化过程中会出现细胞谱系命运的转变。绝大多数早期前列腺癌组织仅由雄激素受体(androgn receptor, AR)阳性的管腔细胞组成,而基底细胞丢失。随着前列腺肿瘤的进展,很多前列腺癌细胞会由AR阳性的管腔细胞转变为AR阴性的管腔细胞或者AR阴性的神经内分泌细胞^[3]。前列腺癌的细胞起源及前列腺癌进展过程中细胞谱系命运转变机理的解析对我们研究前列腺组织发育及其相关疾病都具有重要的意义^[4-6]。正常前列腺管腔细胞和前列腺癌细胞在体外均极难培养,导致前列腺研究的细胞模型极少并且难以模拟前列腺癌起始、进展、转移和治疗抵抗等肿瘤发展的各个阶段,严重影响了前列腺相关的基础研究和临床应用研究。近年来,类器官培养技术的出现初步解决了前列腺相关研究的细胞模型构建问题,极大地推动了前列腺发育和疾病相关领域的研究进展。

生物学基础研究和疾病诊疗应用研究都离不开合适的研究模型。经典的二维(2-dimentional, 2D)培养人源细胞模型及人体肿瘤组织小鼠移植模型(patient-derived xenograft, PDX)都极大地促进了生物学基础研究和疾病诊疗应用研究的进展,但是这两种模型同时也存在着严重的缺陷。2D细胞培养往往细胞类型单一,不能全面地反映细胞在体内的特征;而PDX模型则存在着严重依赖大量肿瘤组织、构建成功率低、成本过高等问题,而且难以结合基因编辑操作等生物学研究的技术手段^[7]。类器

官模型是近年来新出现的生物学研究模型,兼具2D细胞培养的简单操作特性和PDX模型的复杂结构特征,是极佳的生物学基础研究和疾病诊疗应用研究模型。类器官是由不同谱系来源的细胞,在三维(3-dimentional, 3D)培养条件下自发形成类似于体内组织结构的多细胞团,具有自更新和自组织能力,并且可以在一定程度上保持其来源组织的生理结构和功能^[7],是开展肿瘤生物学和干细胞生物学的有力工具。类器官模型在研究组织构建与再生,疾病发生、发展和治疗等方面都具有独特优势,比如能够在体外长时间增殖,很好地保持了生理和病理状态下的组织结构和细胞异质性,适用于大规模的药物筛选,可以对其进行基因敲低、过表达和突变等基因编辑操作^[8-11],这些优势使得类器官技术在生物学基础研究及疾病诊疗等领域都有巨大的应用前景。类器官培养技术已经被用于遗传发育和癌症研究等诸多生物学的专业领域,并极大地推动了这些领域的研究进展^[10-19,22-26]。本文着眼于总结类器官培养技术在前列腺研究中的应用,在此基础上对该项技术的优势以及不足之处进行讨论,并对类器官在前列腺研究领域的应用前景进行了展望(图1)。

1 类器官在前列腺肿瘤研究中的应用

1.1 前列腺癌类器官研究模型的构建

2009年,SATO等^[9]通过对肠道成体干细胞的研究,主要利用EGF、Noggin、R-spondin三因子体系在体外重构肠道干细胞巢微环境,成功地将单个*Lgr5*(leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5)阳性的小肠成体干细胞培养成具有肠隐窝和绒毛结构的肠道类器官。肠道类器官培养体系开创了体外利用类器官培养技术探索成体干细胞功能的研究范式,极大地促进了后续多种正常组织和

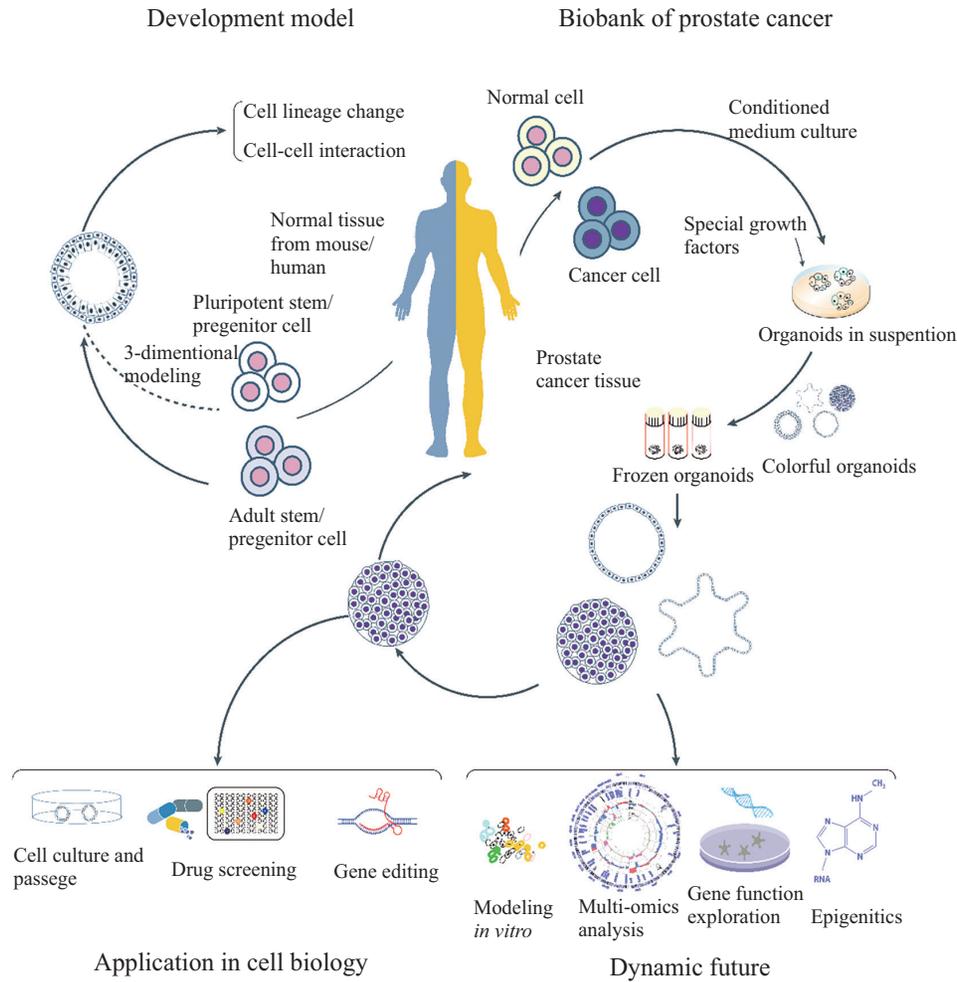


图1 类器官模型在前列腺研究中的应用

Fig.1 Application of organoids in prostate research

肿瘤组织类器官培养体系的发展。我们在肠道类器官培养基的基础上开发了正常前列腺和前列腺肿瘤组织类器官培养体系，前列腺癌类器官在基因组的基因拷贝数变化、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，并且既能在体外无限地扩增培养，又可以作为临床前的药物敏感性研究模型为临床治疗提供依据^[10-11]。同年，CHEE等^[16]利用去势抵抗条件下表达Nkx3.1的前列腺干细胞(castration-resistant Nkx3-1-expressing cells, CARNs)也成功构建了小鼠正常前列腺类器官培养体系。相较于我们所开发的培养体系，CHEE等在培养基中加入了血清，并进行了其他一系列的的生长因子的调整。前列腺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，后续前列腺癌类器官培养方法的提出也为研究者们进一步开展相关

的研究铺平了道路^[11]。

神经内分泌前列腺肿瘤是前列腺肿瘤中一个亚型，预后极差，且非常容易产生治疗耐药性，目前对于研究神经内分泌肿瘤尚缺少有效的模型。BEL-TRAN课题组^[13]构建了一些包含神经内分泌样前列腺癌在内的前列腺癌肿瘤的组织类器官模型，为我们进一步了解和揭示神经内分泌样前列腺肿瘤的特征作出了贡献。BESHIRI等^[14]则利用前列腺癌类器官文库的构建方法，在之前研究提供的培养基配方的基础上进一步调整培养基的组分，发现剔除p38抑制因子SB202109可以将前列腺癌PDX模型构建成为可以部分稳定传代的前列腺癌类器官模型，为探索基于PDX模型的组织类器官模型构建提供了经验。

1.2 类器官模型在探索前列腺肿瘤的发生和进展中的应用

1.2.1 揭示前列腺肿瘤起始细胞的身份属性 肿

瘤起始细胞的身份属性解析是肿瘤研究的重要领域。成体干细胞具有自我更新和分化潜能, 是位于组织器官细胞谱系分化顶端的细胞, 其在各种组织器官的发育和损伤修复中发挥极其重要的作用。正常前列腺上皮是一种惰性的组织, 细胞的更替极其缓慢, 而且早期前列腺癌的进展也极其缓慢。但是在雄激素去势条件下, 大约有90%的前列腺上皮组织细胞会因细胞凋亡而丢失, 而当雄激素水平恢复以后, 前列腺组织又会迅速的再生。前列腺成体干细胞极有可能是前列腺癌的起始细胞, 但是其身份属性研究却存在着巨大的争议。实际上, 在类器官水平上进行基因编辑, 就可以模拟前列腺癌发生的过程^[15-19]。这对我们探索前列腺癌的发生和起源, 理解相关的生物学过程等都有着重要的意义。

2014年, MICHAEL课题组^[16]证明了将敲除了*PTEN*并引入了*KRAS G12D*突变的前列腺管腔细胞培养产生的类器官注射入免疫缺陷小鼠的皮下, 过一段时间后可以产生前列腺上皮内瘤 (prostatic intraepithelial neoplasia, PIN)。而在今年, 我们课题组在了一项研究中利用单细胞测序技术和谱系示踪系统发现并鉴定了一类定位于前列腺管腔内陷末端的前列腺成体干细胞, 将其命名为Luminal-C^[15]。借助类器官培养技术和基因工程小鼠模型的实验有力表明, 这类细胞可以作为管腔细胞的祖细胞而存在, 具备前列腺干细胞的潜能并可以起始PIN的发生。这项研究成果为进一步理清前列腺癌的起源, 探究肿瘤发生的过程, 提供了关键性的证据。ABDULKADIR实验室^[17]利用分离得到的前列腺上皮细胞, 通过慢病毒转染的方式过表达*MYC*, 并敲低*PTEN*和*P53*后, 发现基底细胞有向管腔细胞转变的趋势, 这既证明了*MYC*作为前列腺癌的原癌基因发挥功能, 也为探索前列腺肿瘤的起源提供了潜在的细胞群。

1.2.2 探索肿瘤发生和进展中发挥关键作用的基因
目前前列腺研究领域普遍认为, 前列腺肿瘤的发生是一个由多基因调控的过程, 那么定义这个过程的关键基因的功能, 据此寻找临床治疗的药物靶点就有了重要的意义。而类器官培养技术在这方面也逐渐展露出了不俗的潜力。

肿瘤的起始和进展过程中往往伴随着肿瘤细胞的退分化现象, 但是早期对去势治疗敏感的前列腺癌细胞却维持着终末分化的管腔细胞表型。前列腺癌细胞中基因突变较少, 但是却存在大量的染色

体缺失、重排、融合、扩增等异常现象。有50%的前列腺癌病人中存在*TMPRSS2*基因与*ERG*基因融合现象, 这也是目前在前列腺癌中最普遍的一种染色体重排, 据此构建的前列腺肿瘤小鼠模型也已经有了研究报道^[20-21], 后续的研究也将其构建成了类器官模型^[22]。我们课题组^[23]的研究表明, 前列腺癌细胞中这种大量存在的染色体异常可能与前列腺细胞的命运决定密切相关。在这项研究中, 我们利用类器官培养、基因工程编辑小鼠等多种技术, 最终发现*TMPRSS2-ERG*融合基因通过调控染色质的相互作用来决定前列腺细胞的命运, 与前列腺癌细胞的管腔细胞表型高度相关。

实际上, 早在2015年, PIETRZAK课题组^[24]通过类器官培养, 并结合基因工程小鼠证明了*TIP5*基因的功能, 在敲除*PTEN*基因的前列腺管腔细胞中, 进一步敲除*TIP5*, 会使前列腺的类器官更加透明化并且出现两层细胞的分化, 这样就使来源于小鼠的上皮细胞出现了向有侵略性的肿瘤分化的趋势, 暗示*TIP5*基因在起始前列腺肿瘤过程中可能发挥着重要作用。BARBIERI等^[26]借助类器官模型证明了在*PTEN*敲除的背景下*SPOP*突变也可以诱发前列腺癌, 同样为寻找致使前列腺肿瘤发生的关键基因提供了证据。有趣的是, WITTE课题组^[17]向正常的管腔细胞类器官和基底细胞类器官中转染了过表达*c-MYC*和*myrAKT1*的病毒, 并将其移植到免疫缺陷小鼠的皮下, 最终均发现了高度分化的前列腺癌 (well-differentiated acinar adenocarcinoma) 结构。这些研究都为人们进一步理清前列腺进展过程中关键基因的功能提供了重要的线索。

1.2.3 探究影响前列腺肿瘤细胞命运和使其产生药物抵抗的关键转录因子
基因的突变、染色体扩增和重排都会导致病人对肿瘤治疗药物的耐受性发生改变。针对临床上不同病人发生的差异性的突变, 可以提出不同的药物治疗方案, 进而选择性地靶向杀伤肿瘤, 为改善病人的预后提供可能。

前列腺肿瘤在临床上最为知名的靶向药物是AR抑制剂, AR作为前列腺肿瘤中最为重要的转录因子, 靶向抑制其活性可以极大地改善雄激素依赖性前列腺癌病人的预后, 但随着肿瘤的进展, 病人往往还会发展到雄激素非依赖的阶段, 这个阶段的肿瘤就很难通过靶向雄激素的方法获得有效的治疗。所以寻找影响前列腺肿瘤细胞命运和使其产生

药物抵抗的关键转录因子,并且筛选出相应的抑制剂是领域内一直关注的焦点^[2-3],而类器官模型因其本身所具备的独特优势,在其中就显得尤为关键和重要。

转录因子 *FOXA1* 的突变是前列腺癌的一个独特的基因突变,但是这些突变的功能尚不清楚。利用类器官模型,过表达了野生型 *FOXA1* 和 14 个 *FOXA1* 突变体之后,发现实验组小鼠前列腺类器官增殖功能增强。这些突变体中的 12 个,以及野生型 *FOXA1*,都能促进上皮细胞向管腔细胞分化的进程,而 2 个不同的 R219 位突变则能阻断上皮细胞向管腔细胞的分化并激活间充质和神经内分泌转录过程。测序的数据则将 *FOXA1* 的调控进一步细化到具体的结合位点上。该研究证明, *FOXA1* 突变会改变它在调控正常的管腔上皮细胞分化中的功能,进一步影响细胞的谱系可塑性从而在癌症进展中发挥作用^[27]。我们实验室近期发表的一项研究表明, *ERG* 是一个不依赖于 AR 的,能够发挥其独特功能的转录因子,且在前列腺肿瘤细胞命运中发挥重要的作用^[23]。体内小鼠实验和体外类器官培养实验也证明, *ERG* 可以独立地决定前列腺管腔细胞的细胞命运。

治疗抵抗的肿瘤细胞是如何抵抗治疗过程的,仍是目前前列腺癌研究领域的一大难题。利用类器官模型, EUGEN 等^[53]发现,治疗抵抗的肿瘤细胞可以采用一种独特的、可逆的转录程序,类似于胚胎滞育,出现一种抑制 MYC 活性的休眠阶段。在肿瘤细胞中,通过敲除 MYC 或抑制 MYC 转录辅激活因子 Brd4,可以有效减少凋亡,借此适应药物的细胞毒性。这项研究表明,癌症与滞育相似的机制以及 MYC 的适应性失活在治疗过程中持续存在。

1.3 药物敏感性测试与临床关联研究

由于类器官可以准确地反映人类前列腺肿瘤的遗传和表型特性,现有的前列腺类器官已经被广泛应用于药物敏感性研究。我们和其他课题组的工作已经证明了这种做法的可行性, DAI 等^[30]利用 *PTEN* 缺失的前列腺肿瘤类器官和来自基因编辑小鼠模型和人类前列腺肿瘤类器官,发现抑制 PI3K/AKT 和 AR 信号通路对抑制前列腺肿瘤进展有协同作用。与传统的前列腺癌 *PTEN* 缺失小鼠模型或移植瘤模型的临床前研究相比,类器官培养的筛选方法大大减少了药物疗效评估所需的时间和成本。同

样地, BESHIRI 和他的同事们^[36]使用类器官培养系统重现了治疗 *BRCA2* 基因丢失的前列腺癌患者的 PARP 抑制剂 Olaparib 的疗效,再次突出了使用特异性抑制剂为患者提供及时的治疗选择的优势。此外,其他的课题组还利用类器官评价靶向治疗对去势抵抗前列腺癌和神经内分泌前列腺肿瘤不同基因改变引发的细胞毒性,包括 *EZH2*^[35]、*AR* 突变和扩增以及 *AR-v7*^[37-38]、*SPOP* 突变^[39-40] 和 *Aurora A*^[41] 的过表达。更重要的是,一些独立的研究也证明了使用肿瘤类器官模型进行药物敏感性评估的可行性^[29-33]。例如, WEI 实验室^[30]的研究显示,携带前列腺肿瘤类器官的 *SPOP* 突变对 BET 抑制剂更具抵抗力; ABDULKADIR 和同事们^[31]发现,表达 *ALK F114C* 的肿瘤类器官对各种 ALK 抑制剂表现出不同的反应;而 BELTRAN 课题组^[32]的研究则显示, *SLFN11* 的表达水平可以预测来自 CRPC (castration-resistant prostate cancer) 的前列腺肿瘤类器官的铂类化疗效果。此外,类器官也可用于鉴定新药候选药物。特别是, SCHREIBER 的研究小组^[33]利用前列腺肿瘤类器官模型证明,靶向抑制 GPX4 (glutathione peroxidase 4, 一种前列腺癌神经内分泌分化的重要调节因子) 会导致亚铁性细胞死亡。此外, WATT 等^[34]的研究证明,脂肪酸摄取和新生脂肪通路的双靶向作用可以显著抑制由移植瘤分离得到的前列腺癌类器官的生长,同时发现 Inisoquinoline TOP1 抑制剂和 Olaparib 在同源重组缺失和 *SLFN11* 阳性的前列腺肿瘤类器官中的协同作用。总之,这些结果表明,可以将类器官构建成为一个有效的体外药物测试平台。

2 类器官在前列腺干细胞研究中的应用

2.1 寻找有前列腺干细胞或祖细胞特性的细胞群

2.1.1 探究前列腺组成细胞的分化潜能 人类成年前列腺上皮主要由基底细胞、管腔细胞和神经内分泌细胞组成,这些细胞形成高度内陷的导管结构^[4-5]。成年前列腺是一种惰性的组织且在体内发育过程中前列腺细胞的更新迭代极其缓慢。由化学或手术阉割引起雄激素剥夺后,小鼠前列腺体积与其完整体积相比较将减少 90%,再次为小鼠补充雄激素后,前列腺可以再生,而哪些细胞在这个过程中扮演着重要角色呢?这是前列腺研究领域重要的科学问题。成体前列腺干/祖细胞的鉴定有四种主要的实验方法,包括三维细胞培养法、组织重

建法、基因谱系追踪法和单细胞测序结合生物学预测法,其中三维细胞培养法就应用到了类器官培养技术中。

过去普遍认为,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。早期的研究表明,前列腺球体培养体系可以用于评估前列腺基底细胞的分化潜能,而管腔细胞在这种培养条件下则难以生长与分化^[51]。几个独立的研究小组也分别建立了正常前列腺3D类器官培养条件,可以有效支持前列腺基底细胞、腔细胞的生长和分化^[10-11,16]。研究表明,基底细胞和管腔细胞衍生的前列腺器官都可以长期扩增,形成分化的基底细胞和管腔细胞谱系^[10,23]。类器官为探索前列腺组成细胞的分化潜能提供了便利的条件。

2.1.2 寻找有更强功能的干细胞或者祖细胞特性的细胞亚群 前列腺癌的治疗仍然以雄激素去势治疗为主,但是大多数病人最终会发展成去势抵抗性前列腺癌。寻找去势抵抗性前列腺干细胞的研究一直是前列腺研究领域悬而未决的重要科学问题。近年来,前列腺干细胞的研究集中在前列腺的基底细胞、去势条件下的前列腺干细胞,以及近侧端的前列腺细胞上。但很多研究结果存在巨大的争议,近年来,类器官培养技术逐渐成为另一种主要的干细胞或祖细胞特性测定方法^[12,14]。值得一提的是,我们课题组近期的一项研究表明,在管腔细胞中存在着一种生理状态下的前列腺成体干细胞Luminal-C, Luminal-C细胞是去势抵抗性前列腺干细胞,而且Luminal-C细胞也具备作为前列腺肿瘤祖细胞的潜能^[15]。

MICHAEL课题组^[16]证明了CARN,一个腔内祖细胞群体在作为类器官培养时能够表现出对雄激素的双潜能和反应性。其他研究团队的后续研究也借鉴了这样一种分析思路来研究前列腺中各种新的干细胞或祖细胞群,包括*Scal*阳性的管腔祖细胞^[42]、*Ly6d*阳性的管腔祖细胞^[43]、*Zeb1*阳性的基底细胞^[44]以及共同表达管腔和基底标记物的管腔祖细胞群和细胞亚群^[45]。值得注意的是,在鉴定这些干细胞或祖细胞的功能时都用到了类器官培养的方法^[10,15,41-43]。这也进一步证明了类器官可以作为一种强有力的工具,在鉴定新的前列腺上皮干细胞或祖细胞群中发挥作用。

3 类器官培养技术在前列腺研究中的不足与局限

尽管类器官的培养技术在前列腺研究领域获得了越来越广泛的关注,但该技术仍存在着诸多的限制。比如,转移灶的前列腺肿瘤更容易被培养成类器官,而原发灶的前列腺肿瘤的培养成功率则不尽人意^[9-10],这就使得整体的肿瘤类器官形成效率并不高。另外,前列腺肿瘤具有多种病理亚型,由于类器官的培养技术尚未达到尽善尽美的地步,肿瘤患者的样本的获取也存在着有限性,目前前列腺类器官库仍无法涵盖临床上所有的病理亚型,这就使得前列腺肿瘤类器官能否全面反映前列腺肿瘤的异质性尚需进一步的探讨^[10-11,13-14]。相较于传统的2D细胞培养技术,前列腺肿瘤类器官具有更高的培养成本,这也在一定程度上限制了该模型的推广^[8,10-11]。

4 与其他技术的联合应用

4.1 高内涵大批量药物筛选

前文已经提及,前列腺肿瘤具备包括去势抵抗性前列腺癌以及神经内分泌前列腺癌等在内的多种病理亚型,不同的病理亚型及不同的病人对于药物的响应存在着较大的差异^[35]。这使得我们在进行临床诊断及辅助性治疗过程中需要对病人对于药物的反应提前进行判断,以更好地实现治疗的效果,高内涵筛选(high-content screening, HCS)技术的出现为我们利用前列腺类器官实现大批量药物的筛选提供了可能。

高内涵筛选是一种新型的细胞分析及药物筛选技术,该技术同时具备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3个特点。利用高内涵药物筛选体系,我们可以大批量地筛选得到与类器官药物敏感性相关的数据,同时还可以对细胞进行有效的图像拍摄和染色分析,结合药物敏感性测试的数据进一步定义药物对细胞的作用,极大地提升药物的筛选效率。

已经有研究证明,批量筛选技术可以用于检测前列腺肿瘤类器官对药物的敏感性,预测临床病人对于包括ponatinib在内的多种临床药物的响应,标志着类器官模型作为临床前诊断模型的进一步成熟^[59]。这就为个性化大规模药物筛选提供了可能。

4.2 基因编辑技术

在类器官模型中利用基因编辑技术(gene editing technology)已经十分广泛,对细胞进行包括基

因敲低、过表达和突变在内的基因编辑操作已经为研究人员提供了极大的便利^[17,23,28]，在前列腺肿瘤的研究中，LI等^[23]在前列腺管腔细胞中过表达了ERG，并将其进行异位移植后，细胞呈现出了单一的管腔细胞分化趋势，而没有过表达ERG的管腔细胞异位移植后则可以分化成管腔细胞和基底细胞，证明了ERG有可能是管腔细胞命运的关键调控因子。DEGN等^[54]在探究BRG1对前列腺肿瘤进展的影响时，通过体外分离PTEN缺失的管腔细胞并敲低BRG1，发现类器官的体积受到了显著的抑制，证明了BRG1在前列腺肿瘤进展中可能扮演重要的角色。基因编辑技术在类器官模型上的应用为进一步揭示基因功能提供了可能。

4.3 组织芯片技术

3D基质模型中衍生类器官的方法，往往会导致具有封闭的囊性结构的组织随机发育，这不仅限制了组织的寿命和大小，以及实验可操作性，同时也使得体外培养的类器官组织一直无法形成生物体内的血管网络，不利于营养代谢和组织的生态平衡，极大地限制了相关研究领域的进展。以前列腺研究为例，前列腺在体内是一种惰性的组织，更新迭代是比较缓慢的，但是其所处的环境仍然具备相对复杂的结构，目前我们的类器官培养技术尚不能模拟这些复杂的结构。但这些不足之处在一定程度上可以通过组织工程和精密加工技术得以解决，这就衍生了类器官芯片(organoids-on-a-chip)。类器官芯片可以广义地定义为被设计用于在体外模拟人体(或动物)器官功能单元的超微加工的细胞培养设备。该技术在体外3D培养类器官技术的基础上，同时融合物理、工程学和微机电、生物学及材料学等多个学科的典型交叉前沿科学技术，是类器官研究发展的一大方向。

至今前列腺研究领域没有相关的类器官芯片成果发表，但JIN等^[55]开发并构建了在组织芯片上的类器官，3D-iHep(3D-induced hepatic)类器官芯片培养体系，该体系使用肝细胞外基质(liver extracellular matrix, LEM)水凝胶和微流控装置来重现体内肝脏中细胞-细胞、细胞-基质相互作用的空间微环境。这为进一步完善前列腺类器官的培养体系提供了非常好的范式。

5 前景与展望

5.1 探索前列腺癌肿瘤细胞与其微环境的相互作用

探索肿瘤与其微环境之间的相互作用，是未来

肿瘤学研究的重要方向。而关于这类间质细胞的功能研究，却极少被报道，其中很大一部分原因是传统的2D细胞培养本身不具备模拟病人体内环境的功能，而目前的3D类器官培养则将这样一种细胞与细胞共培养模拟体内微环境的想法变成了现实。ZHANG等^[55]证明了前列腺肿瘤细胞附近的成纤维细胞可以通过分泌NRG1来活化肿瘤细胞的HER3信号通路，进而影响细胞对雄激素的响应。

除此之外，研究人员还利用体外类器官培养模拟血管系统，探究肿瘤细胞或其他细胞与血管系统的相互作用^[56]；通过体外类器官培养模拟神经系统，揭示细胞与神经系统间的相互作用关系^[57]。体外培养免疫细胞，以及肿瘤类器官共培养^[58]，都是本领域未来重要的研究方向。

5.2 揭示表观遗传改变对前列腺肿瘤进展及细胞命运的影响

表观遗传学是研究不依赖于遗传物质本身的改变，而是通过对于遗传物质的载体进行的修饰，进而影响遗传物质命运的一门新兴的学科门类。

传统的表观遗传学研究主要集中在DNA甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑上^[46]。已经有大量的研究表明，这些过程同癌症的进展相互关联^[47]。近年来，RNA的多样化和可逆的化学修饰作为一种新的表观遗传调控修饰出现，而RNA表观遗传修饰对于癌症发生发展的作用尚未被阐明。但越来越多的证据表明，表观遗传修饰确实同细胞命运转变和肿瘤进展密切相关^[48-51]。前期的实验发现，m6A在前列腺癌的进展过程中，也有可能参与细胞可塑性的调控过程，进而对前列腺癌的进展产生影响，借助前列腺肿瘤类器官模型，我们实验室发现了支持这一观点的重要证据。这为从表观遗传的角度理解前列腺肿瘤的进展找到了线索。

5.3 多组学联合分析，全方位多维度展现体外体内前列腺细胞的多样性

对包括前列腺肿瘤类器官在内的多种类器官的特征进行全面的分析，最大程度地去展现类器官的多样性，也是本领域未来的研究方向之一。在早期对类器官模型特点的研究中，对其进行全基因组和转录组测序已经凸显了类器官模型可以有效反映体内细胞的特征这一巨大的优势。而近年来，随着染色质开放性测序技术(assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing,

ATAC-seq)的兴起^[57]、染色体三维基因组学测序(Bridge Linker-Hi-C, BL-Hi-C)^[58]和蛋白质组研究的进一步深入, 科研人员对于体内获取的病人组织和体外培养的类器官往往会采取多组学联合分析的方式去定义其特征。这样就完成了从遗传信息的开放程度, 到遗传信息的转录, 再到遗传信息的修饰, 最终到遗传信息的翻译整个过程的全景展示。这样既有利于人们更好地理解疾病的多样性, 又为进一步探索研究这些疾病提供了可能。利用类器官模型, 并结合体内外样本进行多组学联合分析, 是类器官研究的重要方向。

5.4 前列腺病人临床个体化治疗与前瞻性药物筛选

随着基因组学研究的进一步深入及后基因组学时代的到来, 了解每个人具体存在哪些基因的突变已经成为了可能。癌症的个性化治疗与精准治疗也成为全世界临床医学及生命科学研究的重点, 但是能够维持癌细胞在体内特征的肿瘤体外模型的匮乏已成为癌症病人实现个性化治疗和精准治疗研究难以突破的瓶颈。前文也提到, 类器官具有在体外无限培养和传代的能力, 可以最大程度地维持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。2014年, 世界上就建立了首个前列腺肿瘤类器官库, 并利用这些类器官进行了多种试验药物及抗癌药物的测试, 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^[10]。我们课题组也进一步扩大了前列腺肿瘤类器官库样本的数量, 使它能更好地反映临床病人的多样性, 并为进一步解决前列腺病人临床个体化治疗瓶颈与完善前瞻性药物筛选体系提供了重要的范式。后续也有研究证明, 前列腺肿瘤类器官模型可以用于测试包括sorafenib等在内的临床小分子化合物的敏感性, 这也证明了类器官系统具备作为临床前的药理预测模型的潜力^[59]。相信随着未来技术的进一步发展, 利用类器官模型进行前瞻性药物敏感性研究将成为临床治疗的重要辅助手段。

类器官培养作为一项方兴未艾的技术, 在当下前列腺研究中已经展现出了它独特的优势和巨大的潜力。但不可否认的是, 前列腺的类器官培养也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可以稳定传代的微环境组分(比如间质细胞), 并不能完全反映细胞在体内所处的状

态。另一方面, 目前分离和培养类器官的技术也需要进一步的优化, 原位取得的前列腺肿瘤组织的培养成功率仍不尽人意, 而且在培养过程中也有着诸多挑战, 比如体外培养的正常细胞往往比肿瘤细胞更具备生长优势, 而长期的体外培养同样也会导致细胞本身出现一些变化, 无法全面地反映体内的情况等问题。相信随着类器官培养技术的进一步革新和人们对类器官培养认识的深化, 类器官培养技术在前列腺肿瘤研究领域也必将大放异彩。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] SHEN M M, ABATE-SHEN C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(18): 1967-2000.
- [3] WU J, CANG S, LIU C, et al. Development of human prostate cancer stem cells involves epigenomic alteration and PI3K/AKT pathway activation [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020, 9(1): 12.
- [4] PALMGREN J S, KARAVADIA S S, WAKEFIELD M R. Unusual and underappreciated: small cell carcinoma of the prostate [J]. *Semin Oncol*, 2007, 34(1): 22-9.
- [5] GOLDSTEIN A S, HUANG J, GUO C, et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer [J]. *Science*, 2010, 329(5991): 568-71.
- [6] LEONG K G, WANG B E, JOHNSON L, et al. Generation of a prostate from a single adult stem cell [J]. *Nature*, 2008, 456(7223): 804-8.
- [7] GAO D, CHEN Y. Organoid development in cancer genome discovery [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 30: 42-8.
- [8] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [9] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.
- [10] KARTHAUS W R, IAQUINTA P J, DROST J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 163-75.
- [11] GAO D, VELA I, SBONER A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 176-87.
- [12] DROST J, KARTHAUS W R, GAO D, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(2): 347-58.
- [13] PUCA L, BAREJA R, PRANDI D, et al. Patient derived organoids to model rare prostate cancer phenotypes [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2404.
- [14] BESHIRI M L, TICE C M, TRAN C, et al. A PDX/organoid biobank of advanced prostate cancers captures genomic and phenotypic heterogeneity for disease modeling and therapeutic screening [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(17): 4332-45.
- [15] GUO W X, LI L, HE J, et al. Single-cell transcriptomics identi-

- fies a distinct luminal progenitor cell type in distal prostate invagination tips [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(9): 908-18.
- [16] CHUA C W, SHIBATA M, LEI M, et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(10): 951-61.
- [17] PARK J W, LEE J K, PHILLIPS J W, et al. Prostate epithelial cell of origin determines cancer differentiation state in an organoid transformation assay [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(16): 4482-7.
- [18] UNNO K, ROH M, YOO Y A, et al. Modeling African American prostate adenocarcinoma by inducing defined genetic alterations in organoids [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 51264-76.
- [19] AGARWAL S, HYNES P G, TILLMAN H S, et al. Identification of different classes of luminal progenitor cells within prostate tumors [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(10): 2147-58.
- [20] CHEN Y, CHI P, ROCKOWITZ S, et al. ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss [J]. *Nat Med*, 2013, 19(8): 1023-9.
- [21] GAO D, ZHAN Y, DI W, et al. A Tmprss2-CreERT2 knock-in mouse model for cancer genetic studies on prostate and colon [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161084.
- [22] DRIEHUIS E, CLEVERS H. CRISPR-induced TMPRSS2-ERG gene fusions in mouse prostate organoids [J]. *JSM Biotechnol Biomed Eng*, 2017, 4(1): 1076.
- [23] LI F, YUAN Q, DI W, et al. ERG orchestrates chromatin interactions to drive prostate cell fate reprogramming [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 5924-41.
- [24] PIETRZAK K, KUZYAKIV R, SIMON R, et al. TIP5 primes prostate luminal cells for the oncogenic transformation mediated by PTEN-loss [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(7): 3637-47.
- [25] BLATTNER M, LIU D L, ROBINSON B D, et al. SPOP mutation drives prostate tumorigenesis *in vivo* through coordinate regulation of PI3K/mTOR and AR signaling [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 436-51.
- [26] SHOAG J, LIU D L, BLATTNER M, et al. SPOP mutation drives prostate neoplasia without stabilizing oncogenic transcription factor ERG [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(1): 381-6.
- [27] SANDOVAL G J, PULICE J L, PAKULA H, et al. Binding of TMPRSS2-ERG to BAF chromatin remodeling complexes mediates prostate oncogenesis [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(4): 554-6.
- [28] ADAMS E J, KARTHAUS W R, HOOVER E, et al. FOXA1 mutations alter pioneering activity, differentiation and prostate cancer phenotypes [J]. *Nature*, 2019, 571(7765): 408-12.
- [29] DING Y F, LI N, DONG B J, et al. Chromatin remodeling ATPase BRG1 and PTEN are synthetic lethal in prostate cancer [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 759-73.
- [30] DAI X P, GAN W J, LI X N, et al. Prostate cancer-associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4 [J]. *Nat Med*, 2017, 23(9): 1063-71.
- [31] CARNEIRO B A, PAMARTHY S, SHAH A N, et al. Anaplastic lymphoma kinase mutation (ALK F1174C) in small cell carcinoma of the prostate and molecular response to alectinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(12): 2732-9.
- [32] CONTEDECA V, KU S Y, PUCA L, et al. SLFN11 expression in advanced prostate cancer and response to platinum-based chemotherapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(5): 1157-64.
- [33] VISWANATHAN V S, RYAN M J, DHRUV H D, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway [J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 453-7.
- [34] MARZI L, SZABOVA L, GORDON M, et al. The indenoisoquinoline TOP1 inhibitors selectively target homologous recombination-deficient and schlafen 11-positive cancer cells and synergize with olaparib [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20): 6206-16.
- [35] NAMEKAWA T, IKEDA K, HORIE-INOUE K, et al. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells [J]. *Cells*, 2019, 8(1): 74.
- [36] BESHIRI M L, TICE C M, TRAN C, et al. A PDX/organoid biobank of advanced prostate cancers captures genomic and phenotypic heterogeneity for disease modeling and therapeutic screening [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(17): 4332-45.
- [37] WELTI J, SHARP A, YUAN W, et al. Targeting bromodomain and extra-terminal (BET) family proteins in castration-resistant prostate cancer (CRPC) [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(13): 3149-62.
- [38] ZADRA G, RIBEIRO C F, CHETTA P, et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(2): 631-40.
- [39] YAN Y Q, AN J, YANG Y H, et al. Dual inhibition of AKT-mTOR and AR signaling by targeting HDAC3 in PTEN- or SPOP-mutated prostate cancer [J]. *Embo Mol Med*, 2018, 10(4): 1759-68.
- [40] YAN Y Q, MA J, WANG D J, et al. The novel BET-CBP/p300 dual inhibitor NEO2734 is active in SPOP mutant and wild-type prostate cancer [J]. *Embo Mol Med*, 2019, 11(11): e10659.
- [41] MOSCONA A A. Analysis of cell recombinations in experimental synthesis of tissues *in vitro* [J]. *J Cell Compar Physl*, 1962, 60(2): 65-80.
- [42] KWON O J, ZHANG L, XIN L. Stem cell antigen-1 identifies a distinct androgen-independent murine prostatic luminal cell lineage with bipotent potential [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(1): 191-202.
- [43] BARROS-SILVA J D, LINN D E, STEINER I, et al. Single-cell analysis identifies LY6D as a marker linking castration-resistant prostate luminal cells to prostate progenitors and cancer [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(12): 3504-18, e6.
- [44] WANG X, XU H B, CHENG C P, et al. Identification of a Zeb1 expressing basal stem cell subpopulation in the prostate [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 706.
- [45] CROWLEY L, CAMBULI F, APARICIO L, et al. A single-cell atlas of the mouse and human prostate reveals heterogeneity and conservation of epithelial progenitors [J]. *Elife*, 2020, 9: e59465.
- [46] VARAMBALLY S, CAO Q, MANI R S, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer [J]. *Science*, 2008, 322(5908): 1695-9.
- [47] MURAI M, TOYOTA M, SUZUKI H, et al. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1021-7.
- [48] BATISTA P J, MOLINIE B, WANG J, et al. m(6)A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707-19.
- [49] YOON K J, RINGELING F R, VISSERS C, et al. Temporal

- control of mammalian cortical neurogenesis by m(6)A methylation [J]. *Cell*, 2017, 171(4): 877-89, e17.
- [50] VU L P, PICKERING B F, CHENG Y M, et al. The N-6-methyladenosine (m(6)A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. *Nat Med*, 2017, 23(11): 1369.
- [51] CHEN M N, WEI L, LAW C T, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254-70.
- [52] GARRAWAY I P, SUN W Y, TRAN C P, et al. Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration *in vivo* [J]. *Prostate*, 2010, 70(5): 491-501.
- [53] DHIMOLEA E, SIMOES R D, KANSARA D, et al. An embryonic diapause-like adaptation with suppressed Myc activity enables tumor treatment persistence [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(2): 240-56.
- [54] JIN Y, KIM J, LEE J S, et al. Vascularized liver organoids generated using induced hepatic tissue and dynamic liver-specific microenvironment as a drug testing platform [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28(37): 1870266.
- [55] ZHANG Z D, KARTHAUS W R, LEE Y S, et al. Tumor microenvironment-derived NRG1 promotes antiandrogen resistance in prostate cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(2): 279-96.
- [56] CARROLL J A, FOLIAKI S T, HAIGH C L. A 3D cell culture approach for studying neuroinflammation [J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 358: 109201.
- [57] BUENROSTRO J D, GIRESI P G, ZABA L C, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(12): 1213-8.
- [58] LIANG Z, LI G, WANG Z, et al. BL-Hi-C is an efficient and sensitive approach for capturing structural and regulatory chromatin interactions [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1622.
- [59] KARKAMPOUNA S, LA MANNA F, BENJAK A, et al. Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1117.