



孙朝阳,华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科,医学博士,教授,博士研究生导师。社会兼职:中国抗癌协会肿瘤微环境专业委员会青年副主任委员,中国抗癌协会肿瘤代谢专业委员会炎癌转化学组委员,湖北省妇科肿瘤防治学组青年副主任委员,海医会妇科专委会委员。专业特长:卵巢癌靶向治疗和免疫治疗。科研成果:主持国家自然科学基金项目2项;主持湖北省杰青项目1项;近5年以(共同)通讯作者在*Cancer Cell*、*Science Translational Medicine*、*Annals of Internal Medicine*、*Journal of the National Cancer Institute*、*Nature Communication*、*Cancer Research*、*Oncogene*等SCI杂志上发表论文20余篇。



陈刚,华中科技大学同济医学院附属同济医院妇科肿瘤专科副主任,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师。社会兼职:中华医学会妇科肿瘤学分会青年委员会副主任委员,中国抗癌协会妇科肿瘤专委会委员,湖北省医学会妇产科学分会常委兼秘书。专业特长:妇科恶性肿瘤的规范化治疗,卵巢癌靶向治疗和免疫治疗。科研成果:主持国家自然科学基金项目5项;主持湖北省重点研发项目1项;近5年以(共同)通讯作者在*Advanced Science*、*Annals of Internal Medicine*、*Journal of Hematology Oncology*、*Cancer Research*、*Oncogene*等SCI杂志上发表论文20余篇。

卵巢癌类器官模型的构建与应用

黄雨涵 刘陈 秦天予 孙朝阳* 陈刚*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科,武汉 430030)

摘要 该文详述了卵巢癌中病人来源的类器官(patient-derived organoids, PDOs)模型的构建及培养方式,以证实该实验方式具有可重复性与较高的性价比。分析药物筛选结果与临床药物反应性,旨在证明该模型对临床治疗的价值。同时,为扩展类器官模型的应用范围,采用了DNA损伤相关的彗星实验、DNA fiber实验以及免疫荧光、蛋白电泳等实验技术,探索以该模型为基础的各项实验技术的可行性。结果表明, PDOs模型中的药物筛选结果可以模拟临床病人对药物的反应性,铂类化疗治疗效果与PDOs模型中的药物敏感性具有显著相关性。除常规使用的化疗药物以外,也可以通过该模型的药物筛选摸索病人治疗的最佳用药方式,并推动未进入临床的新药的研发。

关键词 卵巢癌;类器官模型;药物筛选

收稿日期: 2021-04-21 接受日期: 2021-05-20

国家自然科学基金(批准号: 81974408)资助的课题

*通讯作者。Tel: 027-83662688, E-mail: suncydoctor@163.com; Tel: 027-83663821, E-mail: gumpc@126.com

Received: April 21, 2021 Accepted: May 20, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81974408)

*Corresponding authors. Tel: +86-27-83662688, E-mail: suncydoctor@163.com; Tel: +86-27-83663821, E-mail: gumpc@126.com

Construction and Application of Patient-Derived Organoids Model of Ovarian Cancer

HUANG Yuhan, LIU Chen, QIN Tianyu, SUN Chaoyang*, CHEN Gang*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract This study aims to introduce a cost-effectiveness way to establish and culture a PDOs (patient-derived organoids) model of high grade serous ovarian cancer in detail. The results reveal the clinical value of PDOs model in choosing drugs for chemotherapy. To further extend the application of this model, techniques including comet assay, DNA fiber, immunofluorescence and Western blot are also successfully applied in PDOs models. By comparing the results of drug screening and clinical outcome after platinum treatment, a significant correlation of organoids and primary tumor tissue in drug sensitivity is found. In this article, PDOs model is verified to be necessary for exploring the best way to treat patients and promote the development of new drugs.

Keywords ovarian cancer; patient-derived-organoids model; drug screening

自从类器官的概念被系统化地提出并应用于肿瘤的研究以来,多种肿瘤类器官模型在实验室中得以成功构建。基因测序等技术手段已经验证了类器官能够保持原肿瘤的体细胞突变和拷贝数变异^[1],该模型与所来源的标本之间具有高度的同质性^[2-3]。类器官作为优于传统肿瘤细胞系的一种体外癌症培养模型也逐渐被认定为是有效且可行的。目前,在前列腺癌、胰腺癌、结直肠癌等癌种中这一模型已得到较为广泛的应用^[4-6]。类器官模型的建立,使得癌症用药的筛选能够个性化地进行,为精准化医疗在肿瘤中的实现提供了帮助^[7]。

卵巢癌是在妇科肿瘤中死亡率居于首位的恶性肿瘤^[8]。由于卵巢癌具有较高的复发率,伴随着复发常出现化疗药物耐药,因此对该癌种的治疗是有一定的困难的^[9]。随着化疗疗程的增加,肿瘤也在不断进展和发生变异。小分子抑制剂作为卵巢癌治疗的研究热点,它的优势在于精准性和靶向性。然而这一特性也提示了此类药物的使用需要针对肿瘤的突变进行选择和调整。现在常通过病理诊断加上基因检测来初步选取可用药物。由于卵巢癌基因的不稳定性^[10-11],这些方式往往只能用于推测哪一类药物可能在病理诊断和基因检测中起效,不确定性较大。类器官的使用,则可以更明确地对该病人的用药进行筛选和预测^[12]。鉴于以上特点,亟需此类能够

高度模拟病人原位肿瘤的新的卵巢癌模型,在初治时或复发后通过大规模的药物筛选获得对肿瘤用药情况的个体化、精准化的预测^[13]。研究者在结直肠癌及食道癌中,将病人来源的类器官(patient-derived organoids, PDOs)模型中测得的常用化疗药药物反应性与患者临床反应性进行了对比,发现类器官药物筛选具有88%的阳性预测值和100%的阴性预测值^[14]。也有研究对22例高级别浆液性卵巢癌标本来源的 PDOs模型进行了PARP抑制剂、ATR抑制剂和CHK1抑制剂的药物筛选,药物筛选结果表明,药物敏感性与细胞DNA修复功能相关^[15]。而限制卵巢癌类器官模型发展的,则是其培养较结直肠癌等更加困难,细胞球体生长较缓慢,造模成功率较低。目前,不断有研究者希望通过尝试找到一个更高性价比的方式来对卵巢癌类器官进行培养^[16-17]。

而以类器官为基础的实验则能够对患者肿瘤快速地进行药物作用机制层面的研究。针对类器官进行的基因敲除已在结直肠癌研究中得以实现^[17-18],提示了针对细胞系的实验操作也可以在类器官模型中进行。经过多次治疗和耐药后,卵巢癌将在不同患者中形成具有极大异质性的难治性癌灶^[19]。这类患者肿瘤的基因特点难以用某种已有的细胞系进行模拟。其治疗方式的探索必将与其独特的肿瘤特性相联系^[20]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 本研究中所用的原代卵巢癌病人腹水及术中取得的肿瘤组织均来自于同济医院妇产科, 收集于2018年至2021年间, 标本的术中快检及术后病检均证实其为高级别浆液性卵巢癌。本研究获得了患者签署的知情同意书及华中科技大学同济医学院伦理委员会针对人体标本取材的审批许可。伦理申请材料详述了对患者标本的处理及实验过程。

1.1.2 主要试剂 IdU、ClIdU、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于美国Sigma公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)购于美国Thermo Fisher公司; RIPA蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂购于上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白凝胶试剂盒购于达科为生物技术有限公司; BRD4抑制剂、PARP抑制剂、紫杉醇(paclitaxel, PTX)、顺铂(cisplatin, DDP)、CHK抑制剂、CDK4/6抑制剂、DNMT1抑制剂均购于美国Selleck公司; DMEM/F12培养基、胎牛血清购于美国Gibco公司; 培养基所用细胞因子购于美国BD公司; CELLTiter GLO 3D发光法细胞检测试剂盒购于美国Promega公司。

1.1.3 主要仪器 生物安全柜购于美国Thermo Fisher公司; 二氧化碳恒温细胞培养箱购于德国Heraeus公司; 正置荧光显微镜与倒置荧光显微镜购于日本OLYMPUS公司。

1.2 方法

1.2.1 原代卵巢癌组织的分离以及类器官(PDO)模型的培养 在无菌手术中, 医生取下卵巢癌癌灶(包括原位灶、网膜转移灶及盆腹腔转移灶等)后, 立即将癌灶装入无菌管中, 用培养基浸泡, 置于冰上。将癌灶转移至无菌细胞台上, 用PBS及加入双抗的培养基冲洗后, 选取活性较好、形态学上可见恶性程度高的癌组织, 切下待用。如癌灶较小, 则仅修剪明显仅有脂肪的部分及术中烧灼碳化的部分, 余下组织待用。用高压蒸汽灭菌后的眼科剪将待用组织剪碎后, 用无菌细胞刮继续将组织刮碎, 使组织碎片悬液呈匀浆状。将组织碎片悬液用加入双抗(青霉素、链霉素)的培养基重悬后, 依次过70 mm及40 mm滤网, 取直径为40~70 mm的细胞球。于1 200 r/min离心5~10 min, 弃上清(需小心网膜灶脂肪层沾于管壁上难以倒出)。加入

裂红液, 颠倒摇匀, 室温静置5 min后, 1 200 r/min离心5~10 min, 弃上清。去除细胞悬液中的红细胞。加入PBS清洗一遍。据细胞量加入适量原代培养基及基质胶, 比例为1:2, 重悬细胞, 置于冰上待用。混合液根据实验所需细胞量接种于细胞培养板或细胞培养皿内, 保持适当的悬滴大小, 以免浮力导致的脱胶。

将接种了细胞球的培养板置于37 °C细胞培养箱中静置30 min, 等待基质胶凝固。取出细胞培养板置于无菌细胞台上, 在孔板中加入对应的原代培养基及各处理组所需的药物, 然后置于37 °C细胞培养箱中培养。类器官培养基: 卵巢癌PDOs模型用混有青霉素、链霉素(100 U/mL)及各类细胞因子的DMEM/F12(1:1)培养基培养。类器官培养基的细胞因子配方如下: 1× Glutanmax、1× HEPES、100 ng/mL R-spondin、100 ng/mL Noggin、50 ng/mL EGF、10 ng/mL FGF10、10 ng/mL FGF2、50× B27、10 mmol/mL Nicotinamide、25 mmol/mL N-Acetylglycine、1 μmol/mL Prostaglandin E2、10 μmol/mL SB02190、500 nmol/mL A8301、10 μmol/mL Y27632、万古霉素适量。

1.2.2 PDOs模型的细胞收取 从细胞培养箱中取出细胞培养板, 吸净培养基, 轻柔贴壁加入PBS, 清洗一遍。每孔加入适量PBS, 用1 mL移液枪将基质胶吹散, 然后将悬液转移入EP管中, 1 500 r/min离心5~10 min, 用移液枪吸去上清。每管加入5 mL类器官采集液(organoids harvesting solution), 混匀后于冰上静置15~30 min, 1 500 r/min离心10 min, 可见细胞渣离至管底, 胶已被溶解。弃上清后取得细胞沉淀。

1.2.3 萤火虫实验 收取以PDOs模型培养的细胞球, PBS清洗一遍后, 使用PBS重悬至 1×10^5 个/mL。用PBS配制1%浓度的低熔点琼脂糖凝胶(low melting agarose, LMA)(开水浸泡至融化完全)。取50 μL细胞悬液与200 μL LMA胶混合均匀, 滴于萤火虫实验专用载玻片上。用长方形盖玻片压胶后, 避光放于冰上冷却30 min(防止光线导致的DNA损伤影响实验结果)。揭去压胶用盖玻片, 加入预冷的裂解液。没过胶面, 置于冰上浸泡60 min。使用新鲜配置并预冷的解旋液浸泡没过胶面30 s。之后, 使用新鲜配制并预冷的电泳液, 于21 V或300 mA电泳30 min。用双蒸水洗一至两遍后, 于室温避光放置10~15 min晾干。

SYBR染液没过胶面, 染色5 min, 用双蒸水清洗后滴加抗荧光淬灭剂, 长方形盖玻片封片。于湿盒中避光保存, 3天内用荧光显微镜观察。解旋液配方: 6 g NaOH、2.5 mL EDTA(200 mmol/L)、500 mL双蒸水。电泳液配方: 12 g NaOH、2 mL EDTA(500 mmol/L)、1 L双蒸水。

1.2.4 DNA fiber实验 使用DMSO配制5 mmol/L的IdU和25 mmol/L的ClIdU溶液。在PDO培养基中加入配置好的IdU溶液, 使其终浓度为5 μ mol/L, 然后给细胞换液。于37 °C细胞培养箱中孵育30 min。弃去培养基, 用PBS洗两遍。在细胞培养基中加入配置好的ClIdU溶液, 使其终浓度为25 μ mol/L, 给细胞换液。于37 °C细胞培养箱中孵育1 h。PBS清洗一遍后, 收取细胞球体, 1 500 r/min离心5 min待用。使用预冷的PBS将细胞球体重悬至适宜浓度, 置于冰上待用。将2 μ L细胞悬液滴在玻片上, 瞄8 min, 至半干未干状态。加7 μ L裂解液于细胞悬液上, 用枪头轻柔水平铺展5 mm左右。水平裂解2 min后, 将玻片倾斜, 让液体向下划出轨迹。晾干至可见一条水渍线。用组化笔圈住该线条。在玻璃槽中, 用固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定玻片10 min。用双蒸水洗净固定液。将玻片置于干燥玻片盒中于4 °C过夜。次日, 将玻片浸泡于浓盐酸(36.38%盐酸)与水比例约为1:4的盐酸(2.5 mol/L)中80 min, 变性DNA。之后用双蒸水洗去玻片上的酸性液体。配制PBST, 并使用PBST配制5% BSA+0.05% Triton X-100的溶液, 在湿盒中室温封闭30 min。在湿盒中封一抗, ClIdU和IdU选取不同来源的一抗, 1:150~1:300配制, 一抗液体量要覆盖住组化笔圈住的全部区域。室温孵育45 min。使用PBST在摇床上洗三遍, 每遍5 min。选取对应来源的二抗(1:3 000稀释), 覆盖组化笔圈住的区域。使用PBST在摇床上洗两遍, 每遍5 min。再使用双蒸水洗两遍。用抗荧光淬灭剂封片后, 再用共聚焦显微镜观察并拍照, 玻片于4 °C保存, 不超过2天。共聚焦显微镜所得实验结果通过蔡司显微镜系统专用软件进行长度的测量和图片的截取。

1.2.5 免疫印迹技术 在收取的PDO细胞球体中加入含有磷酸酶抑制剂和cocktail的RIPA裂解液, 混匀, 置于冰上裂解30 min。用超声仪裂解细胞悬液至清亮, 4 °C、12 000 r/min离心20 min。吸取EP管中上清液, 即为提取出的蛋白液。测蛋白浓度, 定量取蛋白液至EP管中。加入蛋白液体积

四分之一的5×上样缓冲液, 混匀并用小甩机轻甩。沸水煮10 min后将蛋白样置于-80 °C冰箱中待用。使用快速制胶试剂盒制备蛋白电泳凝胶, 将蛋白样品按顺序和计算的上样量加入蛋白凝胶中, 恒压进行电泳。先用90 V电压电泳30 min, 至蛋白Marker完全分开, 将电压调至120 V, 继续电泳至目标蛋白完全分开后停止。转膜前配制转膜缓冲液, 并将PVDF膜浸泡于甲醇中预激活10 s至1 min, 再将其放于双蒸水中润洗后进行转膜操作。将转膜槽置于冰水混合物中, 恒流350 mA, 转膜2.5 h。捞摸并置于TBST配制的5% BSA中, 于摇床上室温封闭非特异性抗原1 h。切膜, 对应一抗(1:1 000稀释)于4 °C孵育过夜。复温, 用TBST缓冲液于摇床上洗条带三遍, 每遍10 min。使用对应的HRP标记二抗(1:5 000稀释)于摇床上室温孵育1 h。使用TBST缓冲液洗膜三遍, 每遍15 min。使用ECL曝光液浸泡条带, 用曝光仪曝光。

1.2.6 细胞抑制率测定 使用CellTiter Glo 3D发光法细胞检测试剂。吸干96孔板中的培养基, 将试剂复温至室温后, 加入孔板内, 每孔100 μ L(需没过基质胶)。将孔板避光, 置于摇床中孵育30 min。使用多功能酶标仪测定各孔发光值。

1.2.7 统计分析 在本研究中, 各实验所得结果均独立重复至少3次, 结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据分析利用Graphpad Prism 8.0及IBM SPSS Statistics 26软件完成。通过One-Way ANOVA进行多组间数据比较, 通过Spearman统计方法进行相关性分析。当P值小于0.05时, 认为该数据具有显著性的差异。

2 结果

2.1 类器官培养卵巢癌细胞球体形态学观察

通过模型构建过程中的观察, 可见在经过培养后, PDOs由小颗粒状逐渐增大为单一球状或呈多个大小不一球体聚集连接的孢子样。这一培养过程依肿瘤自身特性, 需要7至14天不等。图1中白光结果可清晰显示此类器官模型中细胞增殖时的特殊形态。通过图1, 我们可以观察到各个不同来源的卵巢癌类器官模型的形态结构, 并将其与卵巢癌原代肿瘤进行对比。卵巢癌原代PDOs模型通过HE染色可见细胞类腺体样, 球体中细胞紧密相连, 内部存在腔状结构, 小腔中内容物无细胞成分, 为浆液性卵巢癌的分泌物由于无导管结构排出而聚积在球体内。在小腔周边, 细

胞未见顶部或基质部的分化,类器官模型中全部细胞均存在异型性极度增高、细胞显著大小不一、核分裂数多的肿瘤细胞特点,与卵巢癌原代肿瘤组织通过HE染色所见的组织形态学特征具有相似性。

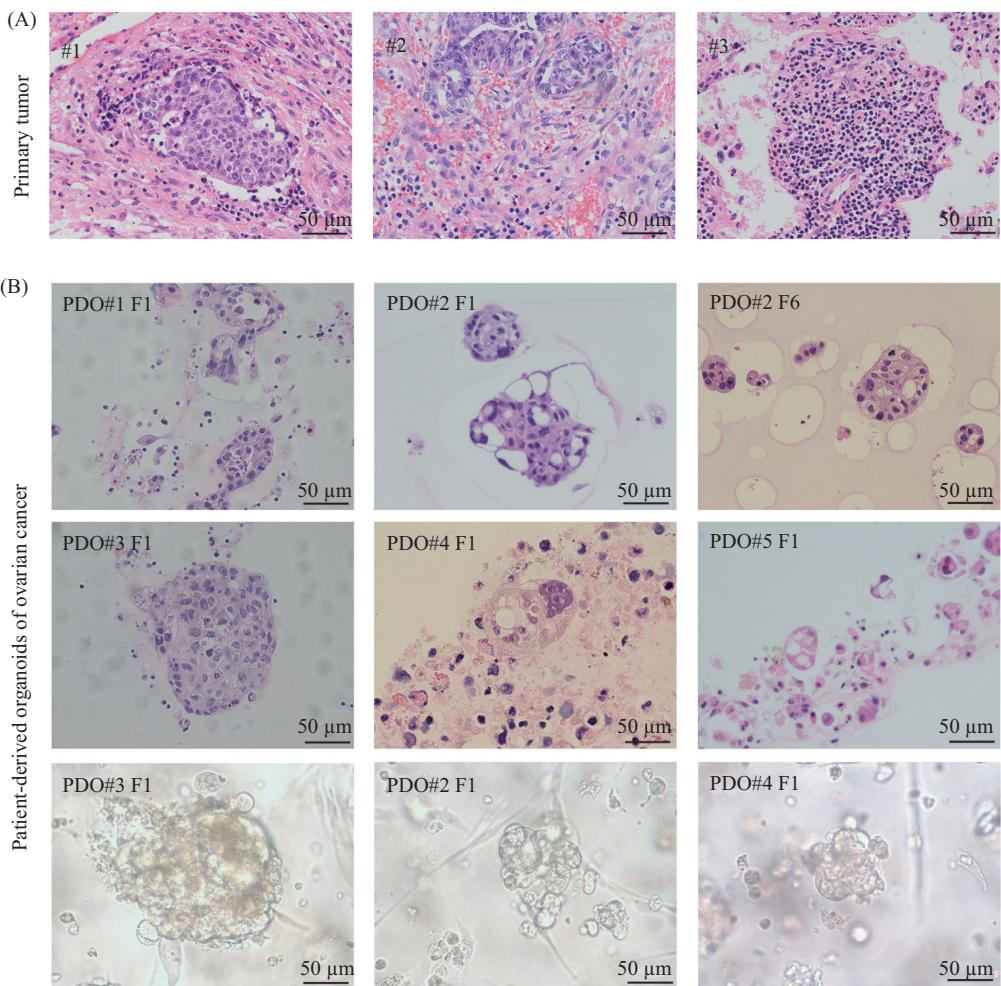
2.2 类器官的多种药物筛选实验

在本研究中,选取了顺铂作为传统化疗药物的代表,同时选取了已进入临床的PARP抑制剂和一些未进入临床的小分子抑制剂进行药物筛选。通过化学发光法检测药物对病人来源类器官培养模型的抑制率,可见本研究所检测的多种药物对卵巢癌的作用效果。以前期验证能够使PDOs模型产生一定反应性的浓度作为筛选所用药物浓度,进行了统一浓度的抑制率监测。顺铂所用浓度为20 $\mu\text{mol/L}$,

CDK4/6抑制剂、PARP抑制剂、紫杉醇所用浓度均为10 $\mu\text{mol/L}$,BRD4抑制剂为2 $\mu\text{mol/L}$,DNMT1抑制剂为1 $\mu\text{mol/L}$,CHK1抑制剂为200 nmol/L,顺铂在加药及药物处理全程中均进行了避光处理。图2中可见不同来源的PDOs对不同卵巢癌治疗药物存在不同的反应性。其中,针对复发卵巢癌患者标本的铂类药物反应性筛选结果显示,复发患者全部表现为铂类药物无反应或仅有15%左右的抑制率,提示已产生伴随复发而产生的铂耐药。

2.3 类器官卵巢癌模型对病人化疗效果的预测作用

在前期的药物筛选中,铂类作为卵巢癌化疗药物,在本院病人中有广泛应用。我们将本研究所筛选出的药物反应情况与临床中病人的紫杉醇/



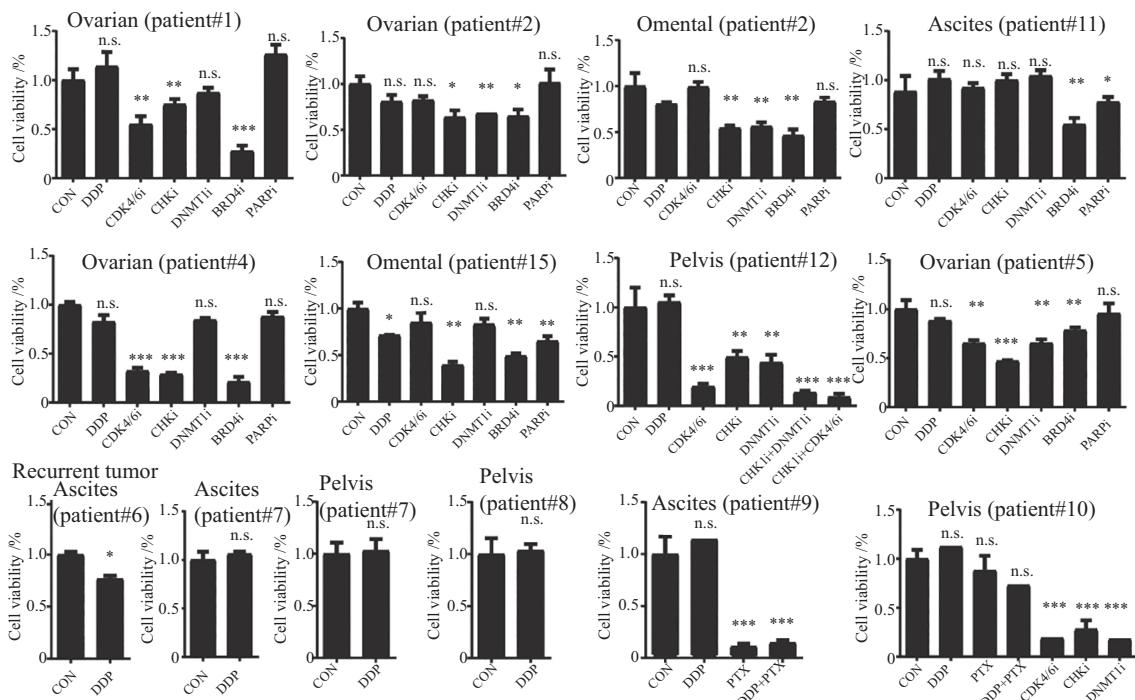
A: HE染色的肿瘤组织; B: HE染色、显微镜白光所见的PDO球体。左上角标记为该模型编号与传代次数。可见类器官模型在组织形态上与原肿瘤组织具有相似性,在细胞层面上也呈现出高度异型性的癌细胞特性。

A: the primary tumor tissue stained with HE; B: the PDO sphere stained with HE and observed by microscope under white light. The upper left corner is marked with the model number and the times of generations. It can be seen that the organoid model is similar to the original tumor tissue in morphology. It also presents a highly heteromorphic characteristics of cancer cells at the cellular level.

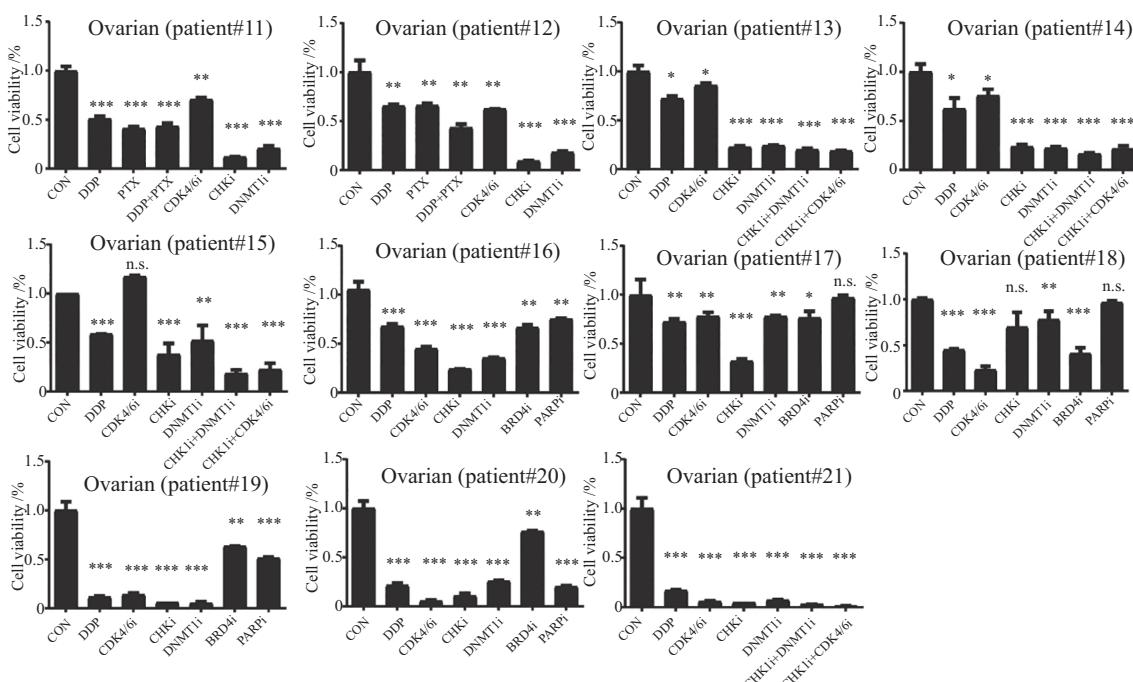
图1 卵巢原代肿瘤及类器官培养模型的组织形态学

Fig.1 Histomorphology of primary ovarian cancer tissue and PDOs model

(A) Platinum resistant initial tumor



(B) Platinum sensitive initial tumor



A: 铂类相对耐药(platinum resistant)的类器官模型; B: 铂类相对敏感(platinum sensitive)的类器官模型。肿瘤样本的来源分为原发病灶(initial tumor)与复发病灶(recurrent tumor), 标于左上角。肿瘤样本取样的具体部位包括卵巢(ovarian)、盆腔(pelvis)、腹水(ascites), 分别标于图上方。柱状图显示为对应药物作用下细胞的存活率。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比。n.s.: 无显著差异。

A: platinum resistant PDO models; B: platinum sensitive PDO models. The tumor tissue is collected from initial tumor or recurrent tumor, which are marked in the upper left corner. The specific sites of each tumor including ovarian, pelvis, ascites are showed above each graph. The bar chart shows the survival rate of cells treated with the corresponding drug. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group. n.s.: without significant difference.

图2 类器官模型药物筛选结果

Fig.2 Drug screening results of PDOs model

表1 药物作用下类器官抑制率与临床铂类反应性的相关性

Table 1 Correlation between PDO-based drug inhibition rate and clinical platinum sensitivity

相关性 Correlation	DDP	CDK4/6i	CHK1i	DNMT1i	BRD4i	PARPi
Relevance	0.759	0.359	0.536	0.358	0.155	0.011
Significance	<0.010	0.131	<0.010	0.133	0.581	0.968

顺铂(docetaxel/cisplatin, TP)方案化疗反应性进行了对照。CA125是卵巢癌相关的典型肿瘤标志物,也是入院后必需监测的指标。CA125在铂类药物治疗前后降低的百分率,可以部分反映患者对铂类化疗的反应性^[21]。通过SPSS 26.0软件进行相关性分析,可得DDP用药后抑制率与患者收取标本最近的含铂方案化疗前后CA125降低的百分率呈正相关,相关系数为0.759, *P*值小于0.01,具有显著性(表1)。这一点可以说明,在类器官模型中的药物筛选与临床用药的反应性是存在一致性的。而除CHK1抑制剂外,其他药物反应性与含铂方案化疗后CA125的变化并无显著相关性(表1)。这一结果与推论是一致的。在此结果中,一方面PDO对铂类反应性与化疗效果的显著相关提示PDO可以预测铂类药物反应性,另一方面,其他药物的无显著相关性提示小分子抑制剂与铂类药物不存在交叉耐药。卵巢癌小分子抑制剂与化疗联合用药,共同杀伤肿瘤一直是研究的热点。铂类药物不与其他小分子抑制剂有交叉耐药,正说明了联合用药的可行性。而CHK1抑制剂反应性与铂类药物反应性的关联有待进一步探索。

2.4 类器官药物作用效果的多类型观察方法

为更好地观察类器官在经受药物处理后的变化,我们通过吖啶橙/碘化丙啶(acridine orange/propidium iodide, AOPI)染色、显微镜白光、免疫荧光等多种方式对其进行了形态学上的观测。为了更好地观测到该模型在药物损伤后的改变,我们选用了BRD4抑制剂进行研究。在药物损伤PDO球体后,球体周边细胞开始逐渐死亡并解离,以死细胞的状态散落于周边基质中。AOPI染色后,可清晰地看见红色荧光标记的死亡细胞(图3A)。以石蜡切片和PDOs模型培养后以细胞形式所进行的免疫荧光染色均表明,球体中损伤指标 γ H2AX的水平增高(图3C和图3D),这与蛋白电泳所得的结果(图3E)相一致。通过显微镜明场可在白光下观测到经相同时间

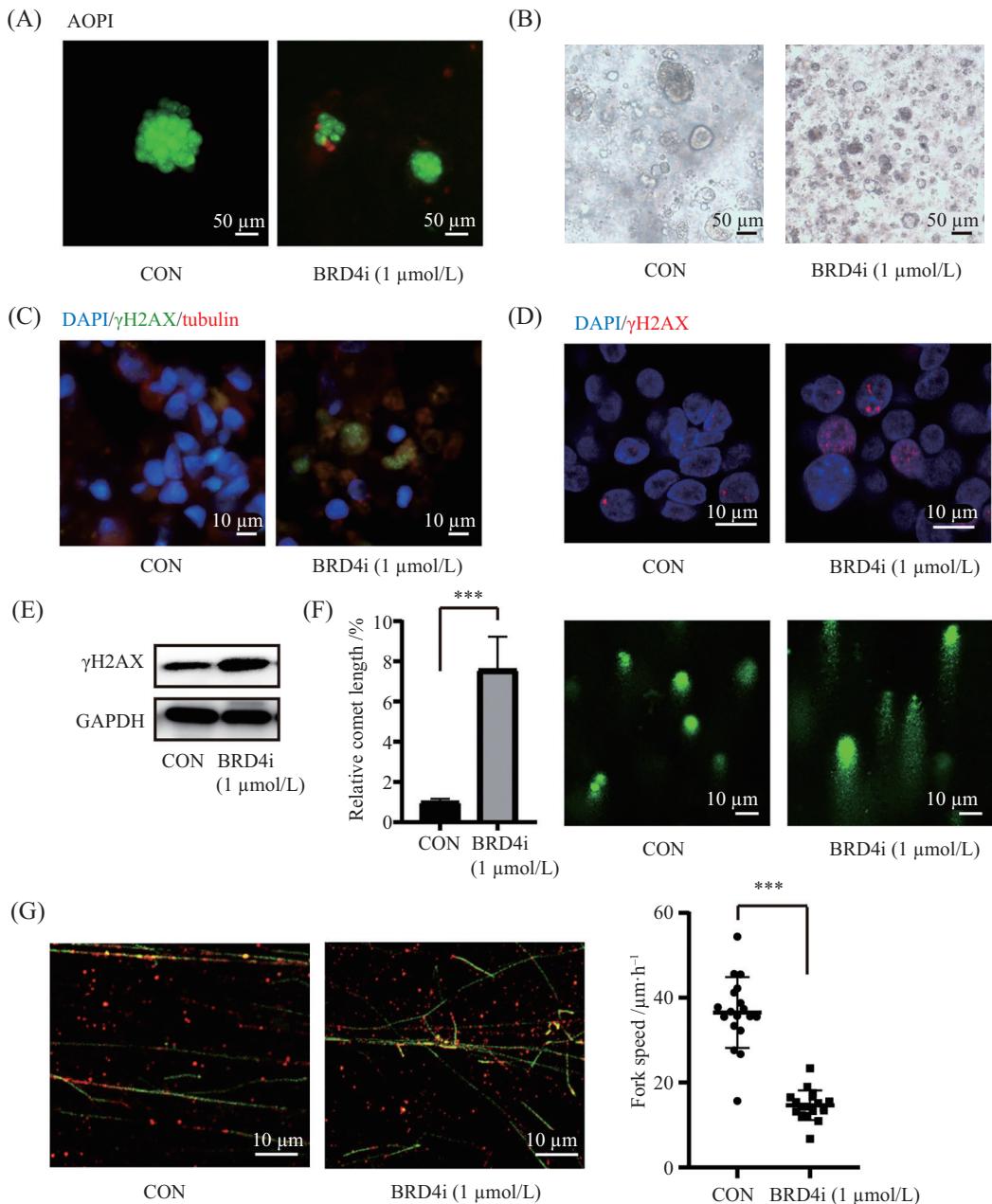
培养后药物处理组PDO球体大小也显著小于对照组(图3B)。

2.5 通过基础实验方法对类器官药物作用机制的探索

为了更好地发挥类器官模型的作用,我们尝试以该模型为基础,进行基础实验的研究。除前文所提到的细胞球体免疫荧光染色、石蜡切片免疫荧光染色、基质胶中原位AOPI染色等偏向组织形态方向的实验之外,还尝试了将PDOs模型培养与DNA研究中更深层次的实验相结合。化疗药物的作用效果往往与DNA损伤相关。由此,我们选用了彗星实验与DNA fiber实验^[22]这两类能够检测DNA功能的实验来检测药物作用后相应的蛋白表达变化。从图中可见,应用BRD4抑制剂AZD5153处理后,彗星尾部较对照组显著增长(图3F),而DNA fiber实验可见DNA的正常复制在用药后受阻(图3E)。在相同标记时间内, BRD4抑制剂处理组中新复制的DNA较对照组明显缩短。这提示了在PDOs模型中进行此两类基础实验的可行性。通过PDOs模型与基础实验的结合,可以在短时间内得到病人使用特定药物后其肿瘤发生的机制变化,对以个性化用药为独特优势的小分子抑制剂的发展将有促进作用。

3 讨论

迄今为止,类器官模型已经在多种癌症的研究中起到了重要作用,而类器官模型的应用,也已经从单纯的药物筛选发展到了针对癌组织的异质性、免疫微环境等的研究^[23]。卵巢癌具有难以造模和培养的特性,在此癌种中,类器官的使用仍停留在通过短期传代进行药物筛选这一初级阶段^[15]。我们在短期传代的情况下,一方面寻找具有相似的药物筛选结果的病例之间的共性,另一方面使用卵巢癌替代细胞系进行一系列基础实验的尝试,希望能在在一个比细胞系更贴近临床的模型中,找到药物作用的特性^[24]。



A: AOPI对基质胶中类器官的原位染色; B: 显微镜白光所见的类器官球体; C、D: 免疫荧光染色处理后的类器官球体; E: PDOs模型在BRD4抑制剂用药后的蛋白水平改变; F: PDOs球体在用药后的彗星实验及彗尾长度统计; G: PDOs模型DNA fiber实验及DNA复制速度统计。*** $P<0.001$ 。

A: *in situ* staining of organoids in matrix gel by AOPI; B: organoid spheroid observed by microscope under white light; C,D: immunofluorescence staining of organoid spheroid; E: protein level change of PDOs model after BRD4 inhibitor treatment; F: comet assay of PDOs model and quantify of comet tail length after BRD4 inhibitor treatment; G: DNA fiber assay of PDOs model and quantify of DNA replicating fork speed after BRD4 inhibitor treatment. *** $P<0.001$.

图3 PDOs模型对BRD4抑制剂的药物反应性

Fig.3 Drug reaction of PDOs model after BRD4 inhibitor treatment

类器官构建所需的标本量根据最终培养后需要获得的细胞量而定。类器官球体在培养时将逐渐增大,但增大至一定程度后,将表现为球体聚集更加紧密,而非产生新的球体。此时其生长会受到限制,也代表着需要进行采集、溶胶及传代。而药物筛选

由于后续不需要采集细胞,所需的标本量较少。术中只需要收取直径为2~3 cm的肿瘤组织就可在96孔板中完成多肿瘤药物的筛选。由于网膜转移灶的标本充斥着大量脂肪组织,在标本收取时需要更大的肿瘤组织,并在标本前期处理阶段手工挑取肿瘤成

分,剔除大块的脂肪,才能获得足够的癌细胞来进行后续实验。而对于腹水标本,以无菌管和注射器在术前抽取50 mL即可获得足量细胞进行药物筛选。总而言之,药物筛选所需要的标本量是较少的。卵巢癌的转移灶和复发灶往往较小,复发后治疗过程中的腹水量也往往不多。以类器官模型为基础的药物筛选能够以少量标本完成,使得观察复发后小病灶对药物的反应性具有可行性。收取标本后12 h内进行类器官模型的构建,使用F1代进行药物筛选有90%以上的成功率。失败多由于标本的污染,但从手术室至实验操作,其中的变数较大,这一成功率说明类器官模型构建技术已经足够具有普适性,值得作为一个平台来加以使用。而类器官的实验操作则需要大量标本。收取标本时,需尽量取得能够获取的最大量,其标本量决定了能否进行实验、能做哪一类实验。一般仅能得到初次手术和复发伴大量腹水的患者的足量标本。

若将类器官培养与原代肿瘤细胞培养相对比,我们认为在这两种模型中,类器官的应用具有一定的优势。原代细胞培养主要是通过将肿瘤组织研碎或消化后,制备成适宜细胞浓度的悬液,直接于培养基中进行培养。由于卵巢癌是成分复杂、肿瘤组织与非肿瘤组织混杂生长的实体瘤,因此,在培养时,剔除非癌的成分(如间质和脂肪)是提高其成功率的关键。但通过机械法与酶消化法的处理,大量细胞的丢失是难以避免的。在培养中,细胞中混杂的构成肿瘤微环境的其他成分也逐渐与肿瘤细胞相分离,原代细胞逐渐丢失原肿瘤微环境。而类器官的培养则可以部分地避免这些缺憾。在类器官构建成功率较高,且标本大小有限制的卵巢癌中,我们倾向于使用类器官来进行药物作用的观测。

在本研究中,我们对所获得的病人肿瘤组织类器官进行了多种药物的疗效筛查。其中包括传统的肿瘤化疗药物以及卵巢癌研究热点的小分子抑制剂。已用于临床的化疗药物有助于观察类器官药物筛选是否与临床治疗的反应性具有相似性,而针对未上市的小分子抑制剂的药物筛选则可以为药物的进一步开发和使用指明新的方向^[25]。这一模型的构建和药物筛选技术的尝试具有临床转化意义。

本研究也存在一些不足之处。在类器官模型的构建中,我们发现构建失败的原因往往是间质细胞

过度生长,超过肿瘤细胞球体的生长速度。据文献报道,肿瘤类器官可能由于其有丝分裂的障碍和异常分裂后的死亡而导致生长速度慢于周边的间质成分^[26]。在本研究中观察到这一情况往往发生在恶性程度不够高的病理类型中。因此,建模时成功率较高的往往是恶性程度高、已发生侵袭转移或已产生腹水的高级别浆液性卵巢癌。为了避免建模成功率带来的选择偏倚,本研究中选取的均为高级别浆液性卵巢癌。依据患者的不同情况,分别选取了来源于原位、转移灶和腹水的癌组织作为用于建模的病灶。在同一患者的肿瘤组织中,也会出现腹水和转移灶易成功建模,而原位难以成功的情况。这一偏倚还需要通过后续提升技术手段来加以避免。

此外,在研究中,我们发现卵巢癌患者的不同转移灶之间具有不同的药物敏感性。在实验中,可大致发现腹水最为耐药,其次为盆、腹腔转移灶,最敏感的为原位病灶。但由于同时收取的如上三类病灶的患者总量较少,难以通过分析得到一个确定性的结论,只能把它作为一个推测,留待后续分析与实验。

在实验中,我们对一些复发耐药的患者来源的PDOs模型也进行了紫杉醇的药物敏感性测定,以模拟TP方案在该类型患者中的反应性。在联合应用紫杉醇与顺铂时,复发耐药肿瘤来源的PDOs模型对紫杉醇的反应性具有较大差别,提示肿瘤在铂类耐药的同时,并未对紫杉醇产生耐药性。联合用药时肿瘤的反应性与紫杉醇单独用药的反应性区别不大,提示紫杉醇在铂类耐药后,可能不能产生较为显著的增敏效果。此结果印证了临床指南中针对铂耐药患者的治疗方式,即使用多项铂类以外的化疗药物进行治疗。由于收取的复发患者样本量极少,不能够得出肯定的结论,此现象也需留待进一步观察与分析。

总而言之,本研究的侧重点在于通过尝试在卵巢癌中得到了一个具有较高性价比的类器官模型构建方式,通过此模型的构建,可以得到足量的细胞进行后续基础实验。在据本文实验方法所示的培养基中,肿瘤细胞球体在基质胶包裹的状态下可以稳定生长,这一浓度的外源添加的细胞因子不会影响肿瘤细胞球体对大部分化疗药物及小分子抑制剂的反应性,也不会影响药物对肿瘤细胞DNA层面的损伤效果。此模型的深入研究和不断发展,可以为卵巢

瘤患者用药前的个体化选择以及药物的研发、测试提供帮助。

参考文献 (References)

- [1] LEE H, SHIN S, CHUNG H, et al. Salinomycin reduces stemness and induces apoptosis on human ovarian cancer stem cell [J]. *J Gynecol Oncol*, 2017, 28(2): e14.
- [2] XU R, ZHOU X, WANG S, et al. Tumor organoid models in precision medicine and investigating cancer-stromal interactions [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 218(9): 107668.
- [3] SACHS N, DE LIGT J, KOPPER O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity [J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 373-86, e10.
- [4] BESHIRI M, TICE C, 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.
- [5] GAO D, VELA I, SBONER A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 176-87.
- [6] SATO T, STANGE D, FERRANTE M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762-72.
- [7] SEIDLITZ T, KOO B, STANGE D J C D, et al. Gastric organoids—an *in vitro* model system for the study of gastric development and road to personalized medicine [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1): 68-83.
- [8] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [9] NEZHAT F, APOSTOL R, NEZHAT C, et al. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(3): 262-7.
- [10] BOWTELL D D L. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(11): 803-8.
- [11] TAMURA N, SHAIKH N, MULIADITAN D, et al. Specific mechanisms of chromosomal instability indicate therapeutic sensitivities in high-grade serous ovarian carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(22): 4946-59.
- [12] OOFT S, WEEBER F, DIJKSTRA K, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(513): eaay2574.
- [13] SEMERTZIDOU A, BROSENS J, MCNEISH I, et al. Organoid models in gynaecological oncology research [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 90: 102103.
- [14] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. *Science*, 2018, 359(6378): 920-6.
- [15] HILL S, DECKER B, ROBERTS E, et al. Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(11): 1404-21.
- [16] MARU Y, TANAKA N, ITAMI M, et al. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors [J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 154(1): 189-98.
- [17] MARU Y, ONUMA K, OCHIAI M, et al. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(3): 858-66.
- [18] ONUMA K, OCHIAI M, ORIHASHI K, et al. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(27): 11127-32.
- [19] MCMULLEN M, MADARIAGA A, LHEUREUX S. New approaches for targeting platinum-resistant ovarian cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, doi: 10.1016/j.semancer.2020.08.013.
- [20] JABS J, ZICKGRAF F, PARK J, et al. Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations [J]. *Mol Syst Biol*, 2017, 13(11): 955.
- [21] MOSS H, BERCHUCK A, NEELY M, et al. Estimating cost-effectiveness of a multimodal ovarian cancer screening program in the United States: secondary analysis of the UK collaborative trial of ovarian cancer screening (UKCTOCS) [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(2): 190-5.
- [22] QUINET A, CARVAJAL-MALDONADO D, LEMACON D, et al. DNA fiber analysis: mind the gap [J]. *Methods Enzymol*, 2017, 591: 55-82.
- [23] SASAKI N, CLEVERS H. Studying cellular heterogeneity and drug sensitivity in colorectal cancer using organoid technology [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2018, 52: 117-22.
- [24] SINGH T, NEAL A, MOATAMED N, et al. Exploring the potential of drug response assays for precision medicine in ovarian cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 305.
- [25] PEREZ-FIDALGO J, GRAU F, FARIÑAS L, et al. Systemic treatment of newly diagnosed advanced epithelial ovarian cancer: From chemotherapy to precision medicine [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 158: 103209.
- [26] DROST J, VAN JAARSVELD R, PONSIEN B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells [J]. *Nature*, 2015, 521(7550): 43-7.