



蔡尚博士, 西湖大学生命科学学院研究员, 博士生导师。2003年获北京大学学士学位。2009年获印第安纳大学博士学位。2010至2017年在斯坦福大学干细胞与再生医学研究所从事博士后/助理研究员工作。2017年底回西湖大学组建干细胞与癌症实验室, 围绕干细胞的再生、谱系分化以及疾病状态下的功能异常开展全方位研究。近期发表的研究建立了体外乳腺功能性微器官, 并阐释了肿瘤菌群在乳腺癌转移过程中的重要生理功能。在*Cell*、*Science*和*Cell Stem Cell*等杂志发表多个重要工作。

乳腺类器官技术发展与应用

唐若兰 蔡尚*

(西湖大学, 生命科学学院, 杭州 310000)

摘要 乳腺类器官是一种基于三维培养体系构建的体外微型乳腺组织模型, 已成为乳腺生物学与乳腺癌研究的重要工具。近年来, 该技术从早期简单的球状体培养发展为具有复杂分支结构的类器官系统, 并逐步实现功能上的模拟。特别是新型“迷你腺乳腺类器官”平台的建立, 通过三维动态共培养体系, 使单个乳腺干细胞依次经历球体形成、极性建立、对称性破坏、分支形态发生以及假发情周期模拟, 成功再现了乳腺树状分支导管结构、动态激素响应、干细胞命运追踪以及肿瘤起始的时空调控, 为乳腺癌机制研究和个体化治疗提供了高保真模型。该文系统回顾了乳腺类器官培养体系的发展历程, 重点介绍了其在乳腺癌发生、侵袭转移和药物筛选中的核心应用, 并深入探讨了新型迷你腺系统在肿瘤生物学研究中的技术优势与创新方向。尽管当前体系仍面临微环境简化和人源化适配等挑战, 但是未来随着多组学整合、类器官芯片与人工智能等多学科交叉融合, 乳腺类器官将在乳腺癌精准医学研究中发挥更广泛而深远的作用。

关键词 乳腺类器官; 乳腺癌; 迷你腺系统; 乳腺干细胞; 肿瘤建模

Advances in Mammary Organoid Technology and Their Applications in Breast Cancer Research

TANG Ruolan, CAI Shang*

(School of Life Sciences, Westlake University, Hangzhou 310000, China)

Abstract Mammary organoids, three-dimensional culture-derived miniature models of breast tissue, have become essential tools for advancing breast biology and breast cancer research. In recent years, this technology has evolved from early simple mammosphere cultures to more complex organoid systems with branched structures,

收稿日期: 2025-06-12 接受日期: 2025-07-31

*通信作者。Tel: 0371-88119519, E-mail: caishang@westlake.edu.cn

国家自然科学基金(批准号: 32170803、32450812、82002814)和西湖教育基金资助的课题

Received: June 12, 2025

Accepted: July 31, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32170803, 32450812, 82002814), and the Westlake Education Foundation

*Corresponding author. Tel: +86-371-88119519, E-mail: caishang@westlake.edu.cn

progressively achieving functional mimicry. Notably, the development of a novel “mini-gland culture system” employs a dynamic three-dimensional co-culture approach that enables individual mammary stem cells to undergo sequential processes including spheroid formation, polarity establishment, symmetry breaking, branching morphogenesis, and simulated estrous cycling. This system effectively recapitulates the tree-like branched ductal architecture of the mammary gland, dynamic hormonal responses, lineage tracing of stem cells, and spatiotemporal regulation of tumor initiation, offering a high-fidelity platform for mechanistic studies of breast cancer and the development of personalized therapies. This article systematically reviews the evolution of organoid culture systems, highlights their key applications in studying breast cancer initiation, the invasion-metastasis cascade, and drug screening, and explores the technical advantages and future potential of the emerging mini-gland culture system in tumor biology research. Although current systems still face limitations such as a simplified microenvironment and challenges in humanization, organoids are expected to play increasingly significant roles in breast cancer precision medicine through the integration of multi-omics approaches, organoid-on-a-chip technologies, and artificial intelligence in the future.

Keywords mammary organoids; breast cancer; mini-gland culture system; mammary stem cells; disease modeling

乳腺类器官(mammary organoids)是一种基于三维(three-dimensional, 3D)培养技术构建的微型乳腺组织模型,由乳腺消化片段或乳腺干细胞在三维基质中增殖分化形成,能够模拟乳腺组织的极性结构、细胞异质性及生理病理功能^[1]。相比于传统二维细胞培养,类器官更贴近体内真实微环境,具备更高的生物学相关性,已成为研究乳腺发育与疾病的重要工具^[2-3]。

乳腺癌是全球女性中发病率最高的癌症^[4-5],其发病机制复杂,个体差异显著,目前在肿瘤起源细胞的命运调控、微环境相互作用以及肿瘤异质性等方面仍存在诸多未解之谜^[6-9]。传统研究模型如细胞系^[10]和动物模型^[11-13]在模拟肿瘤异质性、微环境互作及药物反应方面存在明显局限(表1)。类器官技术则兼具体外操作的便利性与体内功能的保真性,能够长期维持乳腺上皮结构与功能特征,适用于高通量药物筛选、基因编辑与个体化治疗研究^[14]。近年来,患者来源的乳腺癌类器官(breast cancer organoids, BCOs)已成功再现了原发肿瘤的分子特征和药

敏反应,进一步验证了其临床转化潜力^[15-16]。

因此,乳腺类器官为解析乳腺发育机制、肿瘤发生及个体化治疗提供了高效、可控的体外研究平台,正逐步成为乳腺癌基础与转化研究的重要支撑。本文旨在综述乳腺类器官发展历程及其在肿瘤生物学研究中的应用。

1 乳腺类器官培养系统开发

乳腺类器官已成为乳腺研究中的重要工具^[17-18]。然而,由于乳腺组织具有高度分支的结构、复杂的细胞组成以及在繁殖周期中的动态变化,其体外建模仍面临较大挑战。构建能够真实模拟乳腺组织的类器官模型,对于研究乳腺发育机制、疾病发生过程及药物筛选具有重要意义。近年来,基于三维培养技术的乳腺类器官模型不断发展,并已在多个物种中取得显著进展^[19]。

乳腺类器官培养技术的早期研究可追溯至20世纪80年代。其发展历程经历了从简单的三维结构构建到逐步实现功能模拟的转变(图1)。小鼠乳腺类

表1 乳腺癌现有研究模型的优缺点对比

Table 1 Comparison of the advantages and disadvantages of existing research models of breast cancer

模型 Model	异质性保持 Heterogeneity maintenance	微环境模拟 Microenvironment simulation	临床相关性 Clinical relevance	通量 Throughput	伦理/成本 Ethics/cost
Cell line	Low	None	Low	High	Low
Animal model	Medium	Medium	High	Low	High
Organoid model	High	Medium-high	High	Medium	Low

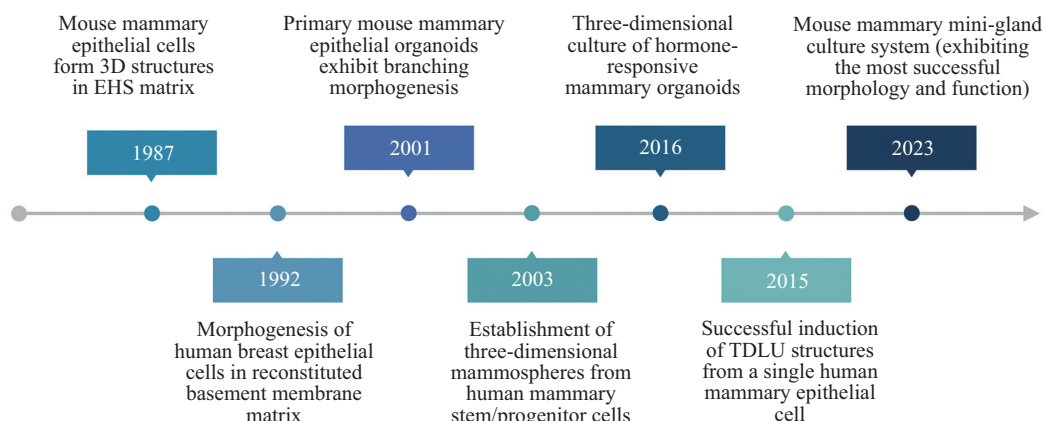


图1 乳腺类器官发展简史(上层为小鼠乳腺类器官, 下层为人类乳腺类器官)

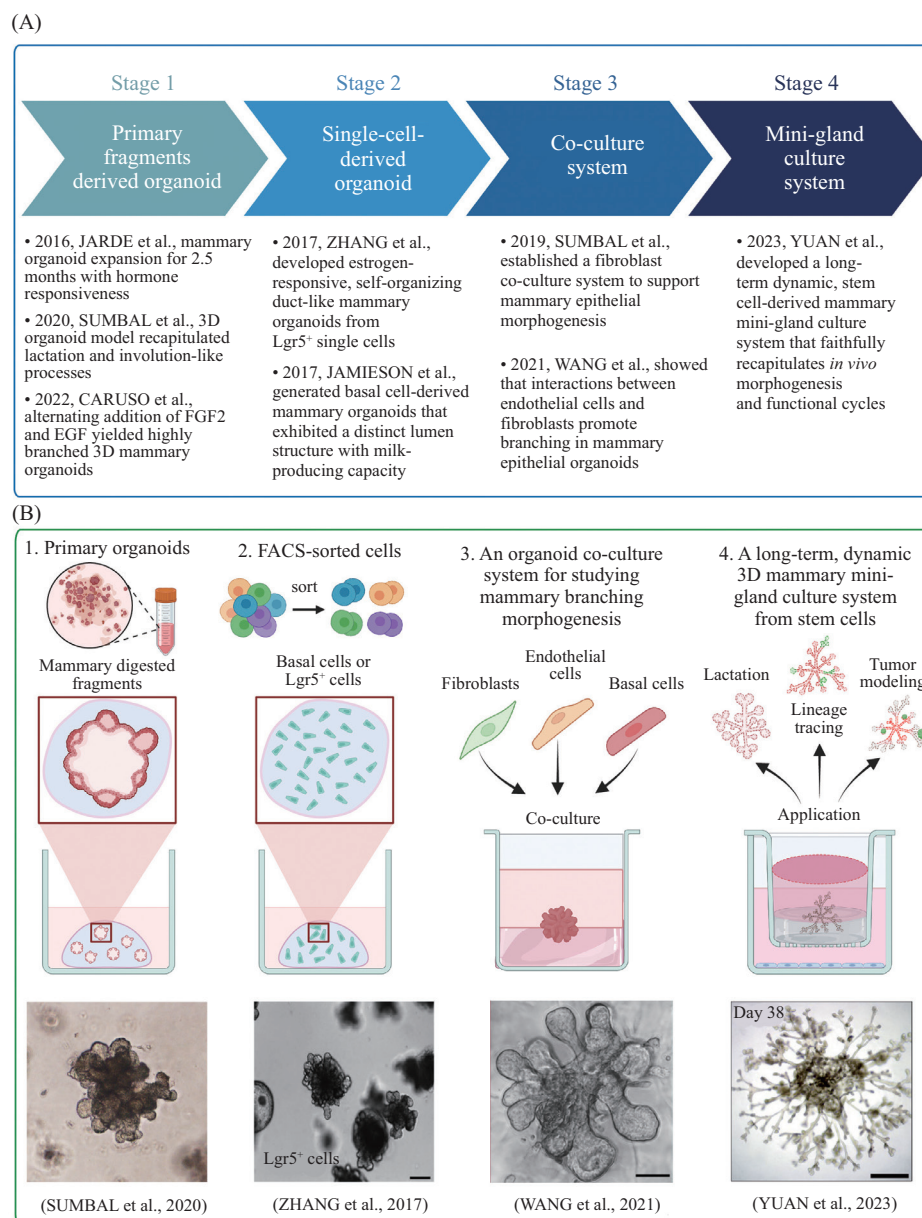
Fig.1 A brief history of mammary organoid development (upper panel: mouse mammary organoids; lower panel: human mammary organoids)

器官是最早被开发且目前最成功的乳腺类器官模型^[20-21]。19世纪80年代, BISSELL团队^[22-23]首次成功建立了小鼠乳腺上皮细胞的三维球体培养体系, 为后续研究奠定了基础。20世纪10年代, 该技术进入系统优化阶段。研究人员逐渐认识到, 合适的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 对小鼠乳腺分支形态的发生至关重要^[24-28]。NGUYEN-NGOC等^[29-30]研究发现, 相比于纯Matrigel培养体系, 添加I型胶原 (collagen I) 的混合基质能显著促进来源于消化组织碎片的乳腺类器官出芽和分支, 证实了细胞外基质 (ECM) 在导管形成中的关键作用。近年来, CARUSO等^[31]进一步优化ECM比例, 并结合Fgf2与Egf交替培养策略, 显著促进了复杂分支导管网络 (ductal network) 的形成, 使小鼠乳腺类器官成为了研究乳腺发育形态建成的理想模型。然而, 早期的小鼠乳腺类器官缺乏功能性模拟。直到2016年, JARDÉ团队^[32]成功培育出可响应固醇类激素的乳腺类器官, 尽管其形态结构较为简单, 但可维持长达2.5个月。通过进一步优化培养条件, 2020年后LI团队^[33-34]实现了泌乳功能及退化过程的体外模拟。尽管如此, 该模型在结构复杂性和稳定性方面仍存在不足。基于包含多种细胞类型的乳腺消化组织片段的研究表明, 构建兼具形态与功能模拟的乳腺类器官, 仍需进一步优化。随着单细胞分选技术的发展, 研究人员通过分离成体乳腺干细胞^[35-36]并结合间质细胞共培养体系^[37-38], 成功在维持精细分支结构的同时, 保留了完整的激素响应机制^[20](图2)。

与小鼠相比, 人类乳腺类器官研究也紧迫其后。

1992年, PETERSEN团队^[39]首次利用从Engelbreth-Holm-Swarm肿瘤中提取的胶原蛋白 (EHS, 后标准化为Matrigel) 构建了三维培养体系, 成功诱导正常人乳腺上皮细胞形成了具有腔体结构并分泌乳蛋白的球状体, 为后续体外建模奠定了基础。在此基础上, 研究者开始搭建系统化的培养体系, 其中MCF10A细胞系因其接近正常乳腺上皮的表型, 成为早期三维培养研究的重要工具^[40]。研究表明, Matrigel与I型胶原的特定组合可有效促进上皮分支结构的形成^[41-42]。2003年, DONTU等^[1]提出“乳腺球体”(mammosphere)概念, 通过非黏附培养富集人乳腺干细胞 (mammary stem cells, MaSCs), 并证实其可在三维体系中分化为多种上皮谱系, 标志着以干细胞为核心的类器官技术初步建立。2015年, LINNEMANN等^[43]利用原代单个乳腺上皮细胞培养体系, 成功构建了具有终末导管小叶单位 (terminal ductal lobular units, TDLUs) 特征的类器官模型。近年来, 随着细胞外基质和水凝胶体系的持续优化, 人类乳腺类器官能够维持雌激素受体阳性 (ER⁺) 等分化标志物的表达^[44], 并对催乳素产生响应, 引发小叶扩张和脂滴聚集^[45], 逐步实现功能层面的体外模拟。

在其他哺乳动物中, 乳腺类器官研究相对较少, 大多数仍处于三维乳腺球阶段^[46]。近期, KIM等^[47]成功在8种真兽下纲哺乳动物 (包括兔子、大鼠、狗、猪、山羊、雪貂、仓鼠和牛) 以及1种有袋类动物 (灰短尾袋鼠) 中建立乳腺类器官培养体系。这是首次报道有袋类哺乳动物的分支型乳腺类器官, 为研究乳腺进化提供了新的工具。该研究还揭示了ROCK



A: 简述小鼠乳腺类器官培养的四种主要策略。B: 图例展示小鼠乳腺类器官培养方式。1. 原代乳腺片段培养——通过梯度离心去除单细胞与基质成分, 获得乳腺类器官片段, 嵌入Matrigel中以“圆顶状物”形式滴于24孔板, 适用于短期扩增与结构研究。2. FACS分选单细胞培养——消化乳腺组织获得单细胞悬液, 利用流式细胞术分选特定细胞群(如基底细胞或Lgr5⁺干细胞), 再进行Matrigel三维培养, 适用于谱系特异性研究。3. 共培养体系——在乳腺上皮类器官培养中引入成纤维细胞或内皮细胞等间质成分, 模拟体内微环境, 促进分支形态发生, 适用于细胞互作机制研究。4. 新型迷你腺乳腺类器官系统——结合基底细胞分选、Transwell共培养体系与L1-Wnt3A饲养细胞, 并通过动态分期培养基调控, 成功模拟乳腺发育全过程, 形态与功能最接近原生乳腺, 具有广泛的应用前景, 尤其适用于乳腺发育与肿瘤起始机制研究。

A: briefly describe four main strategies for mouse mammary organoid culture. B: schematic illustration of mouse mammary organoid culture methods.

1. Primary mammary fragment culture—mammary organoid fragments are isolated via gradient centrifugation to remove single cells and stromal components, then embedded in Matrigel and seeded as “domes” in 24-well plates. This method is suitable for short-term expansion and structural analysis.

2. FACS-sorted single-cell culture—single-cell suspensions are generated by digesting mammary tissues, followed by FACS to isolate specific cell populations, such as basal cells or Lgr5⁺ stem cells. These sorted cells are subsequently cultured in 3D Matrigel systems, ideal for lineage-specific investigations.

3. Co-culture system—stromal components, including fibroblasts or endothelial cells, are incorporated into mammary epithelial organoid cultures to simulate the *in vivo* microenvironment and enhance branching morphogenesis. This system is particularly useful for studying cell-cell interaction mechanisms.

4. Novel mini-gland mammary organoid system—this approach integrates basal cell sorting, a Transwell co-culture system, and L1-Wnt3A feeder cells, along with dynamically regulated staged media, to fully recapitulate mammary gland development. The resulting organoids exhibit morphology and functionality closely resembling native mammary tissue, offering significant potential for studies on mammary development and tumor initiation mechanisms.

图2 现有小鼠乳腺类器官培养方式(根据参考文献[20,31-32,34-38]修改)

Fig.2 Schematic diagram of existing mouse mammary gland organoid culture systems (modified from references [20,31-32,34-38])

蛋白在不同哺乳动物中调控分支形态发生中的差异性作用,进一步证明了三维类器官模型在解析信号通路进化适应性方面的应用价值。

总体而言,乳腺类器官培养技术正从简单的球体结构向复杂的分支组织发展,不同物种间存在显著的技术差异和发展不平衡。随着单细胞分选技术、新型基质材料以及动态培养系统的不断进步,乳腺类器官在结构与功能模拟方面的能力将持续提升,为乳腺生物学研究及临床转化提供更有力的支持。

2 新型迷你腺乳腺类器官培养系统

以往的乳腺类器官培养方法多依赖于静态三维培养系统,虽然在一定程度上再现了乳腺上皮的极性结构与基本功能,但难以同时满足分支导管结构的形成、细胞异质性的维持、激素响应性、周期性发育重塑、基因编辑兼容性以及疾病建模等多重需求。为突破这些瓶颈,YUAN等^[20-21]于近年开发了一种基于小鼠乳腺基底干细胞的“迷你腺乳腺类器官”(mini-gland mammary organoid)培养体系,实现了从结构模拟到功能重建的关键跨越。

该体系采用了动态分期培养策略,结合了优化的细胞外基质成分与激素周期模拟,成功模拟了乳腺发育的多个关键阶段,包括青春期、发情周期、泌乳及退化过程,同时具备长期稳定培养、细胞谱系多样性维持及肿瘤建模能力,代表了当前乳腺类器官技术的重要进展。具体培养体系构建流程如下。

2.1 乳腺干细胞的分离与初始球体形成

从青春期小鼠乳腺组织中,科研人员通过FACS分选获得CD49f^{high}EpCAM^{med}Lin⁻表型的乳腺基底干细胞。将单细胞悬液嵌入Matrigel中进行三维克隆培养,7天后可形成结构均一的乳腺球状体^[48]。

2.2 极性建立与对称性破坏

将形成的乳腺球体转移至优化的细胞外基质系统,即在由I型胶原与Matrigel按1:3比例混合而成的基质胶(简称C1M3)中进行培养。该基质支持乳腺上皮细胞建立基底-顶端极性:外层为Krt14⁺基底细胞,内层为Krt8⁺管腔细胞。随后,通过添加Fgf2诱导细胞极性破坏,形成多细胞突起,从而模拟乳腺导管早期分支形态发生过程^[49]。

2.3 分支导管结构的诱导

为了模拟体内原生乳腺导管的树状分支结构,体系中添加Igfl^[50]、Fgf10^[51]以及全反式维甲酸(all

trans retinoic acid, ATRA)^[52-53],以促进萌芽凸起延伸并形成侧枝。随后,采用激素周期模拟策略,在4天周期内间歇性地加入 β -雌二醇(0.15~0.25 nmol/L)和孕酮(5~60 nmol/L),模拟体内发情周期中的激素波动。该处理有效促进了侧支分支的形成和导管延伸,显著提高了类器官分支结构的复杂性。

2.4 细胞身份与异质性维持

为增强类器官的细胞谱系多样性与功能稳定性,体系引入L1-Wnt3A辐照饲养细胞,通过Transwell共培养系统提供持续的细胞信号交流支持。这一策略不仅维持了基底细胞、ER⁺管腔细胞与ER⁻管腔细胞的共存,还支持了类器官的长期稳定培养(超过4个月),使其导管结构高度类似于原代乳腺组织。

最终,该体系可在体外稳定维持乳腺类器官超过4个月,显著优于传统静态培养方法(通常不超过1个月),为长期功能研究和遗传操作提供了可靠平台。通过C1M3基质与饲养层细胞共培养,类器官可维持包括基底细胞、ER⁺与ER⁻管腔细胞在内的多种细胞类型,并在不同激素刺激下表现出功能可塑性,为研究细胞命运转变与乳腺稳态调控提供了理想模型。

此外,该体系通过激素脉冲模拟发情周期,成功再现了乳腺发育的多个关键阶段,如青春期、发情、泌乳和退化,具备高度的体内功能模拟能力。更令人振奋的是,该体系兼容CRISPR/Cas9等基因编辑技术,可用于构建致癌基因(如PyMT、PIK3CA)突变诱导的肿瘤模型。结合谱系追踪技术,可实现对肿瘤起始细胞的可视化追踪,为乳腺癌发生机制研究与个体化治疗策略开发提供了有力支持。

综上所述,YUAN等^[20]开发的迷你腺乳腺类器官系统,通过动态培养策略、激素模拟与多因子协同调控,成功构建了一个兼具结构复杂性、功能完整性与遗传可操作性的新型乳腺类器官平台。该体系不仅在乳腺发育研究中展现出显著优势,也为乳腺癌等疾病的机制解析与精准医疗提供了高保真、可重复的体外模型。

3 乳腺类器官在乳腺癌研究中的应用

乳腺类器官技术因其能再现乳腺上皮结构与功能动态,在乳腺癌机制研究与精准治疗中展现出强大应用潜力。近年来,研究者利用类器官模型解析了乳腺癌发生、侵袭和耐药等关键生物学过程,

推动了从静态描述向动态干预的研究范式转变。

早期研究表明, I型胶原能够诱导乳腺癌细胞在体外培养中形成持续性侵袭突起, 模拟体内的恶性进展过程^[54]。CHEUNG等^[55]进一步利用类器官模型验证发现, 原发乳腺癌中的“侵袭性触角”细胞同样存在于类器官中, 并主要由一群高表达Krt14的基底样细胞主导。敲低Krt14可破坏肿瘤-间质边界处的集体侵袭行为, 为科学家揭示体外研究肿瘤侵袭的分子机制提供依据。

随着基因编辑技术的发展, 研究者开始在正常乳腺类器官中敲除关键抑癌基因, 模拟肿瘤发生的早期事件。DEKKERS等^[56]通过CRISPR/Cas9技术在类器官中同时敲除TP53、PTEN、RBI和NF1四种抑癌基因, 成功诱导恶性转化, 为研究乳腺癌发生时序依赖机制提供了可操控模型。此外, ROUKENS团队^[57]利用PyMT小鼠来源的类器官研究了转录因子SOX4的功能, 发现了其缺失可抑制肿瘤类器官细胞增殖并促进细胞分化。这些研究展示了类器官平台在肿瘤起始机制解析中的强大能力。

乳腺类器官因其高度保留原发肿瘤分子与组织特征, 已成为个体化医疗和药物研发的重要工具。SACHS团队^[15]和ROSENBLUTH等^[44]分别建立了包含100多种乳腺癌亚型的患者来源类器官库和癌前类器官模型, 其激素受体状态ER/PR(estrogen and progesterone receptors)、HER2表达水平及组织病理学特征与原发肿瘤高度一致, 为乳腺癌异质性研究和精准治疗策略开发提供了高保真模型。BISCHEL团队^[58]则利用导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)类器官模型再现了癌细胞从腔内增生到侵袭性转化的过程, 并结合药物干预预测了肿瘤进展风险。

在此基础上, 类器官的可扩增性与遗传可操作性进一步推动了高通量药物筛选与耐药机制研究。FANG团队^[59]开发了一种基于无黏附海藻酸盐和微流控液滴技术的高通量类器官培养系统, 显著提升了乳腺肿瘤类器官的生成效率, 为临床前靶点验证提供了新策略。DUARTE团队^[60]利用BRCA缺陷型乳腺肿瘤类器官解析了PARP抑制剂(如奥拉帕利)的耐药机制, 通过靶向耐药相关基因(如Trp53bp1), 建立了可用于快速验证治疗靶点的模型系统。此外, LEE团队^[61]发现钠-碳酸氢盐协同转运蛋白(Na^+ , HCO_3^- -cotransporter, NBC)在乳腺癌类器官中

高表达, 且与恶性程度呈正相关, 提示其可能作为新的治疗靶点。

乳腺类器官技术为乳腺癌研究提供了从机制探索到临床转化的系统性平台。未来, 随着多组学整合与共培养体系的发展, 乳腺类器官将在乳腺癌精准医疗中发挥更大作用。

4 新型迷你腺乳腺类器官在肿瘤生物学的研究

与以往用于肿瘤研究的类器官模型相比, YUAN等^[20]开发的新型迷你腺乳腺类器官平台突破了传统模型的静态局限, 实现了从干细胞命运追踪到肿瘤动态建模的多维研究(图2)。该平台的独特性主要体现在以下两个方面。

4.1 谱系可塑性追踪

干细胞对于组织的稳态和修复至关重要。当机体遭遇损伤或处于应激状态时, 干细胞可迅速切换“身份”, 启动修复程序, 扩大再生谱系。这种在稳态状态下所不具备的响应能力被称为干细胞可塑性^[62]。该特性是伤口修复过程中至关重要的生存机制, 同时也被认为是肿瘤发生的重要细胞基础。

乳腺干细胞的异质性主要体现在: 胚胎期存在具有双向分化潜能的干细胞, 而出生后则多数转变为单能干细胞^[6-7, 63]。然而, 如何在体外动态追踪干细胞的命运转变, 一直是研究中的难点。为了评估迷你腺乳腺类器官在体外追踪干细胞命运的潜力, YUAN等^[20]采用源自Krt14rtTA/TetO-Cre/Rosa-mTmG基因编辑小鼠的迷你腺乳腺类器官, 首次实现了干细胞命运转变的体外全程可视化追踪。通过多西环素时空诱导标记Krt14⁺的基底细胞, 研究者观察到其在培养过程中从双能性(可分化为基底和管腔细胞)逐步转变为单能性(仅分化为基底细胞), 并揭示了干细胞命运转换的关键时间窗口(第6天)。该系统摆脱了体内复杂微环境的干扰, 具备高度可控性, 可进一步用于研究代谢物、信号通路或小分子抑制剂对干细胞命运的影响, 为肿瘤起始细胞的识别与干预提供了全新路径。

4.2 肿瘤起始的时空调控

为验证迷你腺类器官在肿瘤建模中的可行性, YUAN等^[20]利用病毒介导的基因编辑技术, 在类器官中激活了PyMT癌基因的表达, 成功诱导出了具有侵袭性特征的肿瘤样结构。具体而言, 研究人员筛

选出整合了 *dsRed-LSL-GFP-PyMT* 外源基因的乳腺克隆。这些成功转导的细胞带有 *dsRed* 红色荧光信号。当细胞内存在 Cre 蛋白时, Cre 可切除包含 *dsRed* 的 *loxP* 序列, 从而激活 *PyMT* 癌基因的表达, 并同时获得 GFP 标记。这些肿瘤类器官既可通过固定、切片或三维成像进行形态学分析, 也可经消化后进行流式细胞术分析以评估绿色肿瘤病灶的分型, 还可将其原位移植至小鼠体内, 形成真实肿瘤组织, 从而验证其致瘤能力。

尤为关键的是, 该系统支持在特定细胞谱系中时空控制致癌基因表达。例如, 通过病毒转导 *Krt14rtTA/TetO-Cre* 谱系追踪小鼠来源的类器官, 可实现 *PyMT* 或其他癌基因 (如 *PIK3CA*) 突变在 *Krt14*⁺ 基底干细胞中的精准诱导, 从而在体外完整追踪肿瘤起始细胞的恶性转化过程。这一能力使该类器官培养系统为解析不同亚型乳腺癌的起源细胞、比较不同谱系细胞的致瘤潜力、揭示细胞可塑性在肿瘤发生中的作用机制等, 提供了高度可控的研究平台。

此外, 迷你腺类器官系统还具备与多种细胞类型共培养的兼容性。例如, 研究者可引入免疫细胞、成纤维细胞或内皮细胞等, 构建更接近体内微环境的动态肿瘤模型, 从而研究肿瘤-微环境互作、免疫逃逸机制或血管生成调控等关键问题。

5 挑战与展望

YUAN 等^[20]开发的迷你腺乳腺类器官系统为研究乳腺发育与肿瘤起始提供了高保真体外模型, 但仍面临若干关键挑战。

首先, 当前体系缺乏完整的体内微环境。乳腺形态发生与肿瘤进展依赖于脂肪垫中多种间质细胞 (如成纤维细胞、脂肪细胞、内皮细胞与免疫细胞) 的复杂互作。尽管该系统通过引入 L1-Wnt3A 饲养细胞在一定程度上模拟了上皮-间质信号交流, 但微环境仍被简化, 缺少血管生成与免疫调控等关键要素。已有研究表明, 内皮细胞对乳腺分支形态发生至关重要^[38], 而巨噬细胞等免疫细胞则在乳腺发育与癌变中发挥调控作用^[64]。未来需在类器官系统中逐步引入这些细胞类型, 以更真实地再现生理与病理过程。其次, 该系统基于小鼠乳腺干细胞构建, 其培养基与生长因子组合难以直接适用于人类乳腺类器官培养。尽管小鼠乳腺发育机制具有相似性, 但物种特异性差异仍需通过优化生长因子组合与培养

条件^[19], 推动该体系向人源化方向拓展, 以实现乳腺癌机制解析与个体化治疗的临床转化。

值得期待的是, 多学科的进步推动了类器官的复杂性与功能性跃升^[65]。例如, 微芯片系统可用于引导类器官的形态发生^[66]; 微流控平台则被用于构建血管化的乳腺肿瘤类器官, 以模拟药物在血管间的传输过程^[67]。此外, 光遗传学工具实现了对致癌信号通路的时空精确调控^[68-69]。研究者还通过引入多种间质细胞, 尝试在类器官中重建肿瘤微环境的时空动态变化^[70-71]。

未来, 多学科交叉技术 (如器官芯片、人工智能辅助表型筛选) 与前沿成像及组学技术 (如高分辨率活细胞成像、空间转录组) 的组合, 将进一步提高类器官模型的解析能力与临床预测价值^[70,72-73]。兼具高时空分辨率与功能模拟能力的乳腺类器官系统, 有望成为连接基础研究与精准医疗的关键桥梁, 推动乳腺癌研究向机制驱动与个体化干预的新阶段迈进。

参考文献 (References)

- [1] DONTU G, ABDALLAH W M, FOLEY J M, et al. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(10): 1253-70.
- [2] DON F K, HUCH M. Organoids, where we stand and where we go [J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27(5): 416-8.
- [3] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-97.
- [4] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [6] RIOS A C, FU N Y, LINDEMAN G J, et al. *In situ* identification of bipotent stem cells in the mammary gland [J]. *Nature*, 2014, 506(7488): 322-7.
- [7] VAN KEYMEULEN A, ROCHA A S, OUSSET M, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance [J]. *Nature*, 2011, 479(7372): 189-93.
- [8] STINGL J, EIREW P, RICKETSON I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells [J]. *Nature*, 2006, 439(7079): 993-7.
- [9] SHACKLETON M, VAILLANT F, SIMPSON K J, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell [J]. *Nature*, 2006, 439(7072): 84-8.
- [10] HOLLIDAY D L, SPEIRS V. Choosing the right cell line for breast cancer research [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(4): 215.
- [11] WHITTLE J R, LEWIS M T, LINDEMAN G J, et al. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power [J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17(1): 17.

- [12] ATTALLA S, TAIFOUR T, BUI T, et al. Insights from transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer: recapitulating human breast cancer progression *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2021, 40(3): 475-91.
- [13] GUY C T, CARDIFF R D, MULLER W J. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease [J]. *Mol Cell Biol*, 1992;12(3): 954-61.
- [14] CLEVERS H, TUVESON D A. Organoid models for cancer research [J]. *Annual Rev*, 2019, 3: 223-34.
- [15] SACHS N, DE LIGT J, KOPPER O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity [J]. *Cell*, 2018, 172(1): 373-86.e10.
- [16] TZENG Y D T, HSIAO J H, TSENG L M, et al. Breast cancer organoids derived from patients: a platform for tailored drug screening [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 217: 115803.
- [17] INMAN J L, ROBERTSON C, MOTT J D, et al. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment [J]. *Development*, 2015, 142(6): 1028-42.
- [18] FU N Y, NOLAN E, LINDEMAN G J, et al. Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100: 36.
- [19] CARUSO M, SABERISEYEDABAD K, MOURAO L, et al. A decision tree to guide human and mouse mammary organoid model selection [J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2764: 77-105.
- [20] YUAN L, XIE S, BAI H, et al. Reconstruction of dynamic mammary mini gland *in vitro* for normal physiology and oncogenesis [J]. *Nat Methods*, 2023, 20(12): 1-13.
- [21] YUAN L. A dynamic culture system that models the intricacy of the mammary gland [J]. *Nat Rev*, 2024, 25(4): 248.
- [22] LI M L, AGGELER J, FARSON D A, et al. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(1): 136-40.
- [23] BARCELLOS-HOFF M H, AGGELER J, RAM T G, et al. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane [J]. *Development*, 1989, 105(2): 223-35.
- [24] EWALD A J, BRENOT A, DUONG M, et al. Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(4): 570-81.
- [25] FATA J E, MORI H, EWALD A J, et al. The MAPK1-2 pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGF α and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium [J]. *Dev Biol*, 2007, 306(1): 193-207.
- [26] SIMIAN M, HIRAI Y, NAVRE M, et al. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells [J]. *Development*, 2001, 128(16): 3117-31.
- [27] WISEMAN B S, STERNLICHT M D, LUND L R, et al. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(6): 1123-33.
- [28] STERNLICHT M D, SUNNARBORG S W, KOUROS-MEHR H, et al. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin [J]. *Development*, 2005, 132(17): 3923-33.
- [29] NGUYEN-NGOC K V, SHAMIR E R, HUEBNER R J, et al. 3D culture assays of murine mammary branching morphogenesis and epithelial invasion [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1189: 135-62.
- [30] NGUYEN-NGOC K V, EWALD A J. Mammary ductal elongation and myoepithelial migration are regulated by the composition of the extracellular matrix [J]. *J Microsc*, 2013, 251(3): 212-23.
- [31] CARUSO M, HUANG S, MOURAO L, et al. A mammary organoid model to study branching morphogenesis [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 826107.
- [32] JARDÉ T, LLOYD-LEWIS B, THOMAS M, et al. Wnt and Neuregulin1/ErbB signalling extends 3D culture of hormone responsive mammary organoids [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 13207.
- [33] CHARIFOU E, SUMBAL J, KOLEDova Z, et al. A robust mammary organoid system to model lactation and involution-like processes [J]. *Bio-Protocol*, 2021, 11(8): e3996.
- [34] SUMBAL J, CHICHE A, CHARIFOU E, et al. Primary mammary organoid model of lactation and involution [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00068.
- [35] ZHANG L, ADILEH M, MARTIN M L, et al. Establishing estrogen-responsive mouse mammary organoids from single Lgr5⁺ cells [J]. *Cell Signal*, 2017, 29: 41-51.
- [36] JAMIESON P R, DEKKERS J F, RIOS A C, et al. Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics [J]. *Development*, 2017, 144(6): 1065-71.
- [37] SUMBAL J, KOLEDova Z. FGF signaling in mammary gland fibroblasts regulates multiple fibroblast functions and mammary epithelial morphogenesis [J]. *Development*, 2019, 146(23): dev185306.
- [38] WANG J, SONG W, YANG R, et al. Endothelial Wnts control mammary epithelial patterning via fibroblast signaling [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(13): 108897.
- [39] PETERSEN O W, RØNNOV-JESSEN L, HOWLETT A R, et al. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(19): 9064-8.
- [40] DEBNATH J, MUTHUSWAMY S K, BRUGGE J S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures [J]. *Methods*, 2003, 30(3): 256-68.
- [41] QU Y, HAN B, YU Y, et al. Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131285.
- [42] KRAUSE S, MAFFINI M V, SOTO A M, et al. A novel 3D *in vitro* culture model to study stromal-epithelial interactions in the mammary gland [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2008, 14(3): 261-71.
- [43] LINNEMANN J R, MIURA H, MEIXNER L K, et al. Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3239-51.
- [44] ROSENBLUTH J M, SCHACKMANN R C J, GRAY G K, et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1711.

- [45] SOKOL E S, MILLER D H, BREGGIA A, et al. Growth of human breast tissues from patient cells in 3D hydrogel scaffolds [J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 19.
- [46] FENG R, MA S, BAI R, et al. Establishment and characterization study of ovine mammary organoids [J]. *BMC Veter Res*, 2025, 21(1): 184.
- [47] KIM H Y, SINHA I, SEARS K E, et al. Expanding the evo-devo toolkit: generation of 3D mammary tissue from diverse mammals [J]. *Development*, 2024, 151(2): dev202134.
- [48] CAI S, KALISKY T, SAHOO D, et al. A quiescent Bcl11b high stem cell opulation is required for maintenance of the mammary gland [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(2): 247-60,e5.
- [49] ZHANG X, MARTINEZ D, KOLEDOVA Z, et al. FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis [J]. *Development*, 2014, 141(17): 3352-62.
- [50] KLEINBERG D L, FELDMAN M, RUAN W. IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2000, 5(1): 7-17.
- [51] MAILLEUX A A, SPENCER-DENE B, DILLON C, et al. Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo [J]. *Development*, 2002, 129(1): 53-60.
- [52] KI M H, PAIK K J, LEE J H, et al. All-trans retinoic acid induced differentiation of rat mammary epithelial cells cultured in serum-free medium [J]. *Arch Pharm Res*, 1998, 21(3): 298-304.
- [53] CABEZUELO M T, ZARAGOZÁ R, BARBER T, et al. Role of vitamin A in mammary gland development and lactation [J]. *Nutrients*, 2019, 12(1): 80.
- [54] NGUYEN-NGOC K V, CHEUNG K J, BRENOT A, et al. ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2595-604.
- [55] CHEUNG KEVIN J, GABRIELSON E, WERB Z, et al. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1639-51.
- [56] DEKKERS J F, WHITTLE J R, VAILLANT F, et al. Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human breast organoids [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(5): 540-4.
- [57] ROUKENS M G, FREDERIKS C L, SEINSTRA D, et al. Regulation of a progenitor gene program by SOX4 is essential for mammary tumor proliferation [J]. *Oncogene*, 2021, 40(45): 6343-53.
- [58] BISCHHEL L L, BEEBE D J, SUNG K E. Microfluidic model of ductal carcinoma *in situ* with 3D, organotypic structure [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 12.
- [59] FANG G, LU H, RODRIGUEZ DE LA FUENTE L, et al. Mammary tumor organoid culture in non-adhesive alginate for luminal mechanics and high-throughput drug screening [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(21): e2102418.
- [60] DUARTE A A, GOGOLA E, SACHS N, et al. BRCA-deficient mouse mammary tumor organoids to study cancer-drug resistance [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(2): 134-40.
- [61] LEE S, AXELSEN T V, ANDERSEN A P, et al. Disrupting Na⁺,HCO₃⁻-cotransporter NBCn1 (Slc4a7) delays murine breast cancer development [J]. *Oncogene*, 2016, 35(16): 2112-22.
- [62] GE Y, FUCHS E. Stretching the limits: from homeostasis to stem cell plasticity in wound healing and cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(5): 311-25.
- [63] LIN Z, GUO Y, BAI H, et al. Distinct mammary stem cells orchestrate long-term homeostasis of adult mammary gland [J]. *Cell Dis*, 2025, 11(1): 1-18.
- [64] DAWSON C A, PAL B, VAILLANT F, et al. Tissue-resident ductal macrophages survey the mammary epithelium and facilitate tissue remodelling [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(5): 546-58.
- [65] LESAVAGE B L, SUHAR R A, BROGUIERE N, et al. Next-generation cancer organoids [J]. *Nat Materials*, 2021, 21(2): 143-59.
- [66] NIKOLAEV M, MITROFANOVA O, BROGUIERE N, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis [J]. *Nature*, 2020, 585(7826): 574-8.
- [67] SHIRURE V S, BI Y, CURTIS M B, et al. Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(23): 3687-702.
- [68] TODA S, BLAUCH L R, TANG S K Y, et al. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling [J]. *Science*, 2018, 361(6398): 156-62.
- [69] LORENZO-MARTÍN L F, HÜBSCHER T, BOWLER A D, et al. Spatiotemporally resolved colorectal oncogenesis in minicolons *ex vivo* [J]. *Nature*, 2024, 629(8011): 450-7.
- [70] XU H, JIAO D, LIU A, et al. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 58.
- [71] DEKKERS J F, ALIEVA M, CLEVEN A, et al. Uncovering the mode of action of engineered T cells in patient cancer organoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(1): 60-9.
- [72] VENINGA V, VOEST E E. Tumor organoids: opportunities and challenges to guide precision medicine [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9): 1190-201.
- [73] MARX V. Closing in on cancer heterogeneity with organoids [J]. *Nat Methods*, 2024, 21(4): 551-4.