

· 研究简报 ·

## 脊索瘤类器官模型构建与鉴定

毛永鑫<sup>1</sup> 李俊晓<sup>2</sup> 许炜<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>山东第二医科大学, 临床医学院, 潍坊 261000; <sup>2</sup>海军军医大学第二附属医院, 骨肿瘤科, 上海 200003)

**摘要** 脊索瘤是一种罕见的骨肿瘤, 起源于胚胎脊索残留组织。这类肿瘤通常生长在靠近重要血管和神经的解剖复杂区域, 使得手术完全切除极具挑战性。此外, 脊索瘤对放射治疗和化学药物治疗反应不佳, 导致其高复发率和较差预后。目前治疗手段有限, 亟需新型研究模型以深入理解其发病机制并开发更有效疗法。传统细胞系模型无法准确模拟脊索瘤的体内特征, 而类器官技术为疾病建模和药物筛选提供了新途径。该文详述了从患者肿瘤组织建立脊索瘤类器官的方案, 包括组织消化、类器官培养、传代及特定基因表达验证等流程。通过该方法成功构建了脊索瘤类器官模型, 同时经检测证实了其表达Brachyury和KRT19等脊索瘤特异性标志物, 表明了该模型能真实再现体内肿瘤特征。该模型为研究脊索瘤发生发展的分子机制及药物研发提供了重要的体外研究平台。

**关键词** 脊索瘤; 类器官模型; Brachyury; KRT19

## The Construction and Characterization of Chordoma Organoid Models

MAO Yongxin<sup>1</sup>, LI Junxiao<sup>2</sup>, XU Wei<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China;

<sup>2</sup>Department of Orthopedic Oncology, the Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China)

**Abstract** Chordoma is a rare type of bone tumor that arises from remnants of the embryonic notochord. These tumors typically develop in anatomically challenging locations near the critical blood vessels and nerves, making complete surgical removal difficult. Additionally, chordomas are generally unresponsive to radiotherapy and chemotherapy, leading to high rates of recurrence and poor overall prognosis. Current treatment options for chordoma are limited, underscoring the urgent need for novel research models to better understand its pathogenesis and to develop more effective therapies. Traditional cell line models fail to accurately mimic the *in vivo* characteristics of chordoma, whereas organoid technology offers promising new avenues for disease modeling and drug screening. Here, describe a protocol for generating chordoma organoids from patient tumor tissues, detailing processes such as tissue dissociation, organoid culture and passage, and verification of specific gene expression. Using this method, Chordoma organoid models were successfully established and confirmed to express chordoma-specific markers such as Brachyury and KRT19, demonstrating their ability to faithfully recapitulate the features of *in vivo* tumors. This model provides an important *in vitro* research platform for studying the molecular mechanisms of chordoma development and progression, as well as for drug development.

**Keywords** chordoma; organoid models; Brachyury; KRT19

收稿日期: 2025-06-13 接受日期: 2025-10-21

上海市2022年度“曙光计划”(批准号: 22SG36)资助的课题

\*通信作者。Tel: 021-81886999, E-mail: xuweichangzheng@hotmail.com

Received: June 13, 2025 Accepted: October 21, 2025

This work was supported by the Shanghai's 2022 Dawn Plan (Grant No.22SG36)

Corresponding author. Tel: +86-21-81886999, E-mail: xuweichangzheng@hotmail.com

脊索瘤(chordoma)是一种罕见的恶性肿瘤,通常被认为其源于胚胎期残存于椎体内的脊索残留组织<sup>[1]</sup>。该肿瘤约23.0%~32.8%概率发生在活动脊柱段,约29.2~45.0%概率发生在骶骨,26%~35%概率位于枕颈交界区,四肢骨骼或骨外部位发病极为罕见<sup>[2]</sup>。流行病学特征显示,其发病高峰集中于50岁至60岁年龄段,男性发病率略高于女性,患者中位生存期约6年<sup>[3]</sup>。该肿瘤主要累及成年人,儿童病例相对罕见<sup>[4]</sup>。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)组织学分类标准,脊索瘤可分为传统型、去分化型和低分化型三类<sup>[5]</sup>,此三种类型均为恶性肿瘤,其中低分化型因恶性程度最高,故预后情况最差<sup>[6]</sup>。综上,脊索瘤具有侵袭性强、复发率高的生物学特性,加之高昂的长期治疗费用与复杂治疗方案,给患者带来沉重的经济负担,最终导致患者生活质量断崖式下降甚至面临生存危机。

目前,手术切除是脊索瘤的首选治疗方式,然而受限于肿瘤常毗邻神经血管关键结构的解剖特性,根治性切除难度极高,患者术后5年局部无复发生存率仅约50%<sup>[7]</sup>。该肿瘤普遍对传统化疗药物及靶向药物呈现耐药性,在一项针对32例无法手术切除患者的II期临床试验中,接受达沙替尼治疗的患者6个月无进展生存率(progression-free survival, PFS)仅为54%<sup>[8]</sup>,与既往研究中的伊马替尼<sup>[9]</sup>和拉帕替尼<sup>[10]</sup>数据相似。值得注意的是,其惰性生物学特征虽在一定程度上可以延缓病程进展,却导致治疗反应评估困难,形成“低增殖-高复发-弱响应”的恶性循环。目前针对该瘤种的基础研究进展严重滞后,从分子机制探索到新型靶向药物开发均存在显著空白,亟需系统解析其侵袭与耐药的分子机制,并开展基于新靶点的创新药物研发工作,以期突破当前治疗瓶颈。

机制探寻与药物靶点筛选工作的顺利开展,高度依赖于合适研究模型的构建与运用,然而当前脊索瘤的研究模型仅有几例细胞系模型。主流细胞系模型虽可部分解析肿瘤特征,但存在无法维持肿瘤原位异质性、药物反应谱偏移显著等固有缺陷,严重制约分子机制的深入探索与精准药物的有效筛选<sup>[11]</sup>。相比之下,肿瘤类器官模型凭借其三维结构优势,不仅能保留亲本肿瘤的遗传特征和微环境互作网络,还可以重现不同个体间治疗反应差异,尽管该技术目前尚处于起步阶段,但已经在疾病的个性化治疗和高通量药物筛选领域得到了广泛应用<sup>[12]</sup>。脊索瘤类器

官模型的构建将创建跨组学整合分析平台,通过三维微环境模拟与分子分型动态验证,为建立临床前-临床转化级药物敏感性预测系统提供核心实验体系。然而,目前国内外关于脊索瘤类器官的研究成果相对较少,尤其是缺乏对构建脊索瘤类器官步骤的系统性描述,限制了该领域的进一步发展。

因此,本研究旨在系统阐述构建脊索瘤类器官模型的相关步骤,涵盖脊索瘤患者肿瘤组织的解剖与消化、脊索瘤类器官模型的初始建立、脊索瘤类器官的传代以及类器官的冻存与复苏等关键环节。同时,为验证构建的脊索瘤类器官模型能够有效保留亲本肿瘤的遗传特征,我们还将对所构建的类器官模型中脊索瘤特异性基因Brachyury及角蛋白19(Keratin 19, KRT19)进行检测。

## 标本来源

所构建类器官模型的肿瘤细胞来源于长征医院脊柱肿瘤中心,样本经病理证实为脊索瘤,标本收集均征得病人知情同意。收集到的新鲜组织标本用基础培养基于4 °C保存,于24 h内进行类器官培养。最终,本研究成功收集到采集18例脊索瘤患者手术标本,并最终培养出10例肿瘤类器官模型,培养成功率为55.6%。构建的类器官培养情况如下。

## 主要试剂及仪器

本部分主要用到的试剂主要包括:增强型DMEM/F12培养基、HEPES缓冲液、1× GlutaMAX-I、1× B27补充剂、Primocin购自ThermoFisher公司;1× 青/链霉素(终浓度1 IU/mL)、ALK5抑制剂、Y-27632购自上海碧云天生物技术有限公司;N-acetylcysteine, Nicotinamide、人成纤维细胞生长因子(FGF)10、II型胶原酶购自美国Sigma公司;Forskolin购自美国Selleck公司;30% Wnt3A条件培养基、2% R-spondin条件培养基、4% Noggin条件培养基购自乔默生物技术(上海)有限公司;RPMI 1640培养基及Keratin 19(BA17) Mouse mAb及Brachy-ury抗体(A-4): sc-374321购自Thermo Fisher公司;红细胞裂解液自行配制(表2)。

本实验主要仪器包括:CO<sub>2</sub>培养箱(型号:Scientific formia 311)购自德国ThermoFisher公司;生物型安全柜(型号: BSC-100II B2)购自上海博迅医疗生物

表1 实验中原代细胞的培养以及类器官模型的培养情况  
**Table 1 Establishment of primary cells and organoid models in the experiment**

患者编号 Patient ID	病理类型 Pathological type	性别 Sex	年龄 Age	肿瘤位置 Tumor location	结果 Outcome
Ch-1	Conventional chordoma	Male	49	Sacrum	Failure
Ch-2	Conventional chordoma	Female	53	Cervical spine	Failure
Ch-3	Conventional chordoma	Female	38	Sacrum	Success
Ch-4	Conventional chordoma	Female	67	Sacrum	Success
Ch-5	Conventional chordoma	Male	62	Sacrum	Failure
Ch-6	Conventional chordoma	Male	70	Sacrum	Success
Ch-7	Conventional chordoma	Male	52	Sacrum	Success
Ch-8	Conventional chordoma	Male	65	Sacrum	Failure
Ch-9	Conventional chordoma	Male	26	Cervical spine	Success
Ch-10	Conventional chordoma	Male	59	Sacrum	Success
Ch-11	Conventional chordoma	Male	56	Sacrum	Failure
Ch-12	Conventional chordoma	Female	64	Cervical spine	Success
Ch-13	Conventional chordoma	Female	54	Sacrum	Failure
Ch-14	Conventional chordoma	Female	55	Lumbar spine	Success
Ch-15	Conventional chordoma	Female	80	Sacrum	Failure
Ch-16	Conventional chordoma	Female	60	Cervical spine	Failure
Ch-17	Conventional chordoma	Female	74	Sacrum	Success
Ch-18	Conventional chordoma	Female	66	Lumbar spine	Success

表2 红细胞裂解液配制  
**Table 2 Formulation of red blood cell (RBC) lysis buffer**

名称 Name	用量 Dosage
双蒸水	500 mL
KHCO <sub>3</sub>	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	4.15 g
EDTA·Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.020 5 g

仪器股份有限公司; 水平转子离心机购自长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司; 倒置相差显微镜购自德国ZEISS公司等。

### 培养基及其他试剂

预先配制好完全培养基, 所用试剂及用量如表3所示。按表3可配制完全培养基, 若配制基础培养基, 仅需配制增强型DMEM/F12、HEPES缓冲液、Primocin、1×青霉素/链霉素溶液、1×GlutaMAX-I补充剂, 用量同表3。

对于组织消化液胶原酶II(ColII)的配制, 向200 mL基础培养基加入1 g ColII、20 μL Y-27632混匀, 用0.22 μm过滤器过滤到15 mL离心管中, 分装为8 mL/支, 并置于-20 °C冰箱长期保存; 对于清洗液

(wash buffer)的配制, 取500 mL RPMI 1640培养基, 加入1 mL primocin、50 μL Y-27632, 混匀后, 置于4 °C环境中存放备用; 对于10×柠檬酸钠抗原修复液的配制: 分别称取1.825 g无水柠檬酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)和11.910 g二水合柠檬酸三钠(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O), 将上述试剂溶于800 mL双蒸水中, 然后用浓盐酸调pH值至6.4, 最后加双蒸水定容至1 000 mL, 改为使用前, 将其稀释至1×工作浓度。

### 脊索瘤类器官模型构建

在原代脊索瘤细胞提取流程中, 手术收取的组织需尽快放入4 °C预冷的基础培养基中, 并置于冰盒中, 24 h内进行类器官模型构建; 在处理组织之前, 提前准备好灭菌的手术器械, 将II型胶原酶置于室

表3 类器官所用培养基配制  
Table 3 Formulation of organoid culture medium

名称 Name	用量 Dosage
Advanced DMEM/F12	500 mL
HEPES Buffer	10 mmol/L
Primocin	50 mg
1× Penicillin-streptomycin	5 mL
1× glutaMAX-I	5 mL
ALK5 inhibitor	500 nmol/L
Y-27632	10 μmol/L
N-acetylcysteine	1.56 mmol/L
Nicotinamide	10 mmol/L
FGF10	5 μg
1× B27 supplement	10 mL
Forskolin	10 μmol/L
30% Wnt3A conditioned medium	150 mL
2% R-spondin conditioned medium	30 mL
4% Noggin conditioned	20 mL

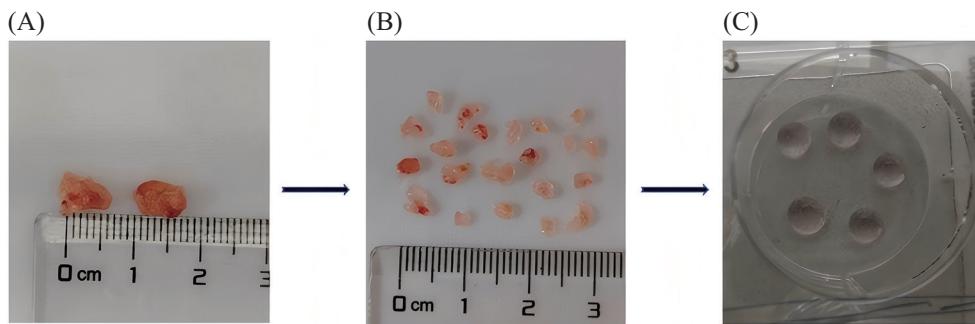
温下解冻, Matrigel胶置于冰上解冻(防止提前凝胶化, 并应避免反复冻融以维持其生物活性及基质完整性); 在超净台中, 用配制的清洗液清洗2遍洗涤肿瘤组织, 用灭菌的显微镊和眼科剪剔除坏死组织和明显的血管; 而后剪碎消化, 用于分离原代细胞的组织, 每50 mg组织中加入5 mg/mL II型胶原酶1 mL, 用显微镊和眼科剪剪碎, 将组织剪碎至约1 mm×1 mm×1 mm大小的碎片(图1B)。将剪碎的组织置于离心管中, 在37 °C温箱中的混悬仪上, 消化时间可根据组织来源和质地适当调整(通常为30~60 min), 直至肉眼观察无明显大块组织团块, 或可在显微镜下确认主要为单细胞或小型细胞团为止。放入离心机, 1 500 r/min在室温下离心3 min, 之后用清洗液清洗沉淀物, 再次放入离心机1 500 r/min, 在室温下离心3 min, 弃上清; 去除组织中的红细胞, 加入200 μL红细胞裂解液进行裂解, 4 min后注入3倍PBS终止, 在室温下离心3 min(1 500 r/min), 弃上清, 用清洗液清洗沉淀物。在室温下离心3 min(1 500 r/min), 轻轻吸走上清; 根据先前观测到的细胞量决定种细胞的孔数, 6孔板可加入200 μL/孔完全培养基及150 μL/孔Matrigel胶, 每个孔呈水滴状注入, 把相应体积的完全培养基和Matrigel胶混匀后, 在6孔板中接种(图1C)。于5% CO<sub>2</sub>、37 °C的细胞培养箱中放置30 min, 使Matrigel胶固化, 凝固后可加入2 mL/孔完全培养基, 之后每四天换液, 光镜下检查细胞形态。

## 类器官传代

于培养孔内吹打细胞, 直到大多数细胞悬浮。再转移到15 mL离心管内, 在室温下1 500 r/min离心3 min, 去上清(可留1~2 mL); 离心管和培养皿各加入2 mL冷PBS清洗, 收集至离心管, 1 500 r/min离心3 min, 弃上清。若上清液有浑浊Matrigel胶, 则不要吸走, 防止吸走细胞, 可加入PBS继续在室温下1 500 r/min离心3 min, 去上清; 随后加入相应体积的完全培养基及Matrigel胶, 按1:2传代, 种植在6孔板上; 于5% CO<sub>2</sub>、37 °C的细胞培养箱放置30 min, 使Matrigel胶固化, 凝固后可加入2 mL/孔完全培养基, 之后每四天换液。

## 类器官的冻存及复苏

于培养孔内轻轻吹打, 去除Matrigel胶, 直到大多数细胞悬浮。转移到15 mL离心管内, 在室温下离心3 min(1 500 r/min); 去上清, 留1 mL培养基并用1 mL的移液枪使用最大量程抵住离心管底吹吸50次左右; 离心管和培养皿各加入2 mL冷PBS清洗, 收集至离心管, 在室温下离心3 min(1 500 r/min); 弃上清。若上清液有浑浊Matrigel胶, 可加入PBS继续离心3 min(1 500 r/min), 去上清; 根据细胞量加入含10% DMSO的完全培养基, 分装入冻存管; 将冻存管放入预冷至4 °C的冻存盒, 然后将冻存盒转移至-80 °C冰箱; 在-80 °C冰箱放置过夜后, 将冻存管移至气相液



A: 收集到的脊索瘤标本; B: 将收集到的脊索瘤标本剪成3-4 mm的小块; C: 在6孔板上均匀接种。

A: collected chordoma specimens; B: the collected chordoma specimens were cut into 3-4 mm small fragments; C: uniform seeding on a 6-well plate.

图1 对收集的脊索瘤标本进行处理

Fig1 Processing of collected chordoma specimens

氮罐长期保存。根据编号确认在液氮罐中的位置; 将冻存管放于37 °C水浴锅; 再移入15 mL离心管, 加2 mL清洗液, 放入离心机, 室温下1 500 r/min离心5 min; 去上清, 加入相应体积的培养基和Matrigel; 种植在6孔板上; 于5% CO<sub>2</sub>、37 °C的细胞培养箱放置30 min, 使Matrigel胶固化, 凝固后可加入2 mL/孔完全培养基, 每四天换液。

### 脊索瘤类器官的石蜡切片

提前准备冷的PBS, 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定液, 包埋盒, 洁净的石蜡切片机配套刀片。于培养孔内轻轻吹打, 去除Matrigel胶, 直到大多数细胞悬浮。全部转移到15 mL EP管内; 在室温下离心3 min(1 500 r/min), 去上清, 留1 mL左右培养基; 离心管和培养皿各加入2 mL冷PBS清洗, 收集至离心管, 室温下离心3 min(1 500 r/min), 弃上清。若上清液有浑浊Matrigel胶, 则不要吸走, 防止吸走细胞, 可加入PBS继续放入离心机, 1 500 r/min离心3 min, 去上清; 加入PFA固定10 min; 混匀, 用PBS清洗3遍, 离心3 min(1 500 r/min), 去上清; 依次加入75%酒精I; 75%酒精II; 95%酒精; 无水乙醇I和无水乙醇II室温孵育10 min进行脱水; 之后在二甲苯I和二甲苯II中各浸泡15 min, 使其透明化; 完成透明化后, 组织样本需要进行浸蜡处理, 将样本浸泡在65 °C提前熔融的石蜡中。每隔30 min更换1次蜡, 一共浸泡3次, 整个浸蜡过程需要大约1.5至2 h; 提前打开石蜡包埋机, 预热融化石蜡至65 °C, 并将包埋用的金属基底托放在石蜡液体中预热, 然后把类器官组织置于基底托中央, 再滴加液体石蜡浸没, 组织包埋盒压实后, 再向组织包埋盒中加入适量液

体石蜡, 最后将金属基底托放置冷却台上使其快速凝固。使用石蜡切片机进行切片并用载玻片收集, 切片厚度调制5 μm; 先将蜡块进行修理, 然后切成5 μm的片子, 于37 °C水中展片、捞片, 并于室温中过夜。

### H&E染色

将收集好的切片转移到烤片机, 烤片机温度调至65 °C, 烤片2 h; 将切片从65 °C的烘箱中取出后迅速将其放入二甲苯1号中, 上下晃动切片10下用于充分脱蜡, 之后依次室温下在二甲苯1号、二甲苯2号、二甲苯3号、无水乙醇1号、无水乙醇2号、95%乙醇1号、95%乙醇2号、75%乙醇和水中放置5 min; 将上述处理好的载玻片去除水分, 滴上苏木素染液进行染色, 计时5 min, 然后用流水冲洗5 min; 返蓝1 s, 返蓝前将水甩干, 继续流水冲洗5 min; 用伊红染色8 s; 在75%乙醇、80%乙醇、95%乙醇、无水乙醇1号、无水乙醇2号、二甲苯1号、二甲苯2号、二甲苯3号中分别放置5 min, 中性树脂胶封片保存, 显微镜观察。

### 验证类器官中脊索瘤特异性表达产物的表达

选择在脊索瘤中特异性表达的KRT-19及Brachyury进行染色; 将收集好的切片转移至65 °C预热的烤片机, 烤片2 h; 将切片从65 °C的烘箱中取出后迅速将其放入二甲苯1号中, 上下晃动切片10下用于充分脱蜡, 之后依次在二甲苯1号、二甲苯2号、二甲苯3号、无水乙醇1号、无水乙醇2号、95%乙醇1号、95%乙醇2号、75%乙醇和PBS中放

置5 min。提前水浴加热1× 柠檬酸钠抗原修复液(配制方法见1.3), 将其加热至浑浊, 将切片于100 °C水浴加热下抗原修复20 min; 倒掉修复液, 将切片放入染片盒里PBS清洗5 min, 清洗时置于摇床上, 转速为20 r/min; 用封水笔画圈, 将切片放入染片盒里, 用PBS-t(PBS+Tween)清洗5 min, 清洗时置于摇床上; 将载玻片放入湿盒中, 在室温下将3%内源性过氧化物加入含有脊索瘤类器官的疏水圈内, 每个疏水圈可以滴加50 μL, 封闭组织的内源性过氧化物酶, 共封闭15 min; 将切片放入染片盒里, 用PBS-t清洗3次, 每次5 min, 清洗时置于摇床上, 转速20 r/min; 将载玻片放入湿盒中, 在室温下将封闭液2% BSA加入含有脊索瘤类器官的疏水圈内, 每个疏水圈滴加50 μL, 共封闭1 h; 将载玻片放在湿盒内, 用封闭液将所需一抗稀释至所需要的最终浓度, 去除封闭液, 不用清洗。本实验采用Keratin 19(BA17) Mouse mAb及Brachyury抗体(A-4): sc-374321作为一抗, 分别按1:800及1:500比例稀释, 让一抗完全覆盖脊索瘤类器官, 置于4 °C冰箱, 孵育过夜; 将切片放入染片盒里, 用PBS-t清洗3次, 每次5 min, 清洗时置于摇床上, 转速为20 r/min; 滴加入生物素标记山羊抗兔/鼠IgG聚合物, 室温孵育30 min, 孵育结束后于摇床上用PBST洗3次, 每次5 min, 转速为20 r/min。滴加入辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温孵育30 min, 孵育结束后于摇床上用PBST洗3次, 每次5 min, 转速为20 r/min, 全程避光; 将配制好的DAB工作液加入疏水圈内, 孵育约1.5 min显褐色后立刻插入PBSt终止反应, 流水洗5 min; 将上述处理好的载玻片去除水分, 滴上苏木素染液进行染色, 计时3 min, 用流水

冲洗5 min; 反蓝1 s, 反蓝前将水甩干, 继续流水冲洗5 min; 用乙醇和二甲苯清洗后, 滴加中性树脂胶封片保存, 显微镜观察。

### 脊索瘤类器官模型的建立情况

本研究依托上海长征医院, 采集18例脊索瘤患者手术标本, 如表3所示, 其中病理显示全部为经典性脊索瘤。肿瘤位置方面, 骶骨肿瘤12个, 颈椎肿瘤4个, 腰椎肿瘤2个。最终成功构建了10个脊索瘤类器官模型, 成功率为55.6%。其中来自骶骨的肿瘤6个, 来自腰椎的肿瘤2个, 来自颈椎的2个。仅从本实验的类器官模型构建来看, 颈椎脊索瘤收集的比重远低于骶骨脊索瘤, 其原因是因为颈椎肿瘤往往体积较小, 由于患者手术后病理检查的需求, 难以收集足够的脊索瘤肿瘤细胞。而腰骶椎肿瘤往往体积较大, 直径在5 cm以上的腰骶椎肿瘤很常见, 较容易采集到比较典型的脊索瘤肿瘤细胞。

### 脊索瘤类器官的原代培养及形态学观察

如图2所示, 记录了脊索瘤类器官原代培养后第1、7、13天, 及首次传代后第1天细胞的形态特征。种植在6孔板上的脊索瘤细胞在光镜下可见细胞大小较为均一, 10~50 μm, 形状较为不规则, 略有抱团趋势, 折光率高。随着时间进展, 细胞数目不断增多, 于初代培养后第13天表现出明显的簇状或巢状的细胞结构, 细胞排列成条或岛状, 埋于疏松的黏液组织之间, 与正常脊索瘤特征表现一致。

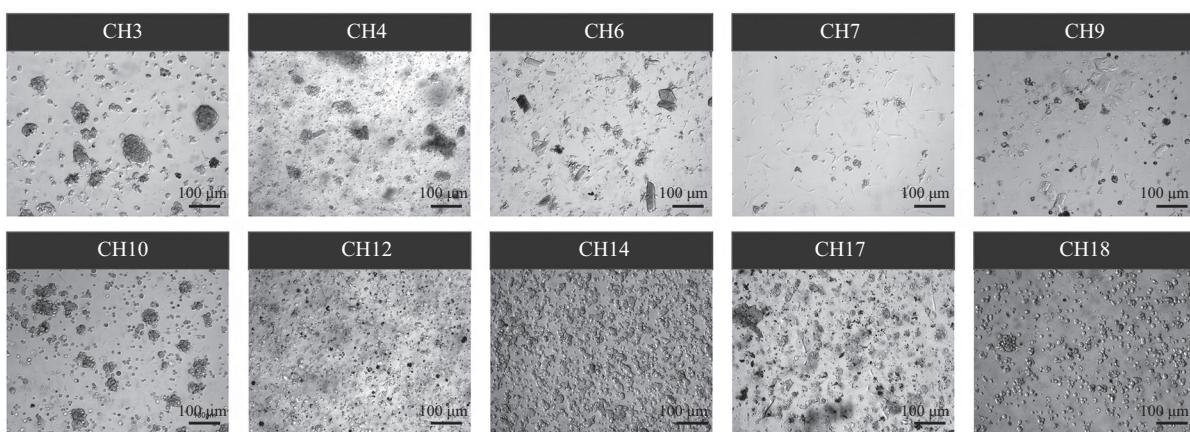
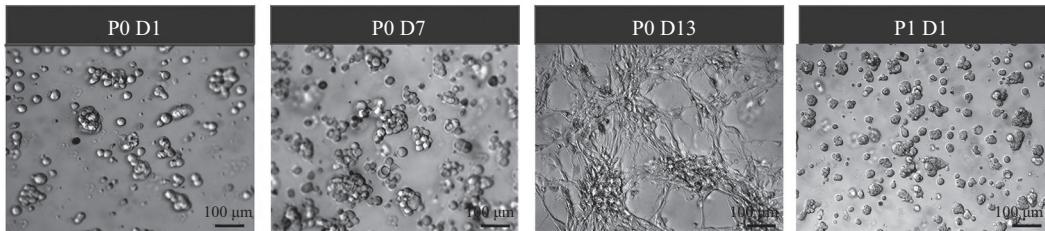


图2 镜下观察所建立的10例脊索瘤类器官的生长情况

Fig.2 Microscopic observation of the growth status of the established 10 cases of chordoma organoids

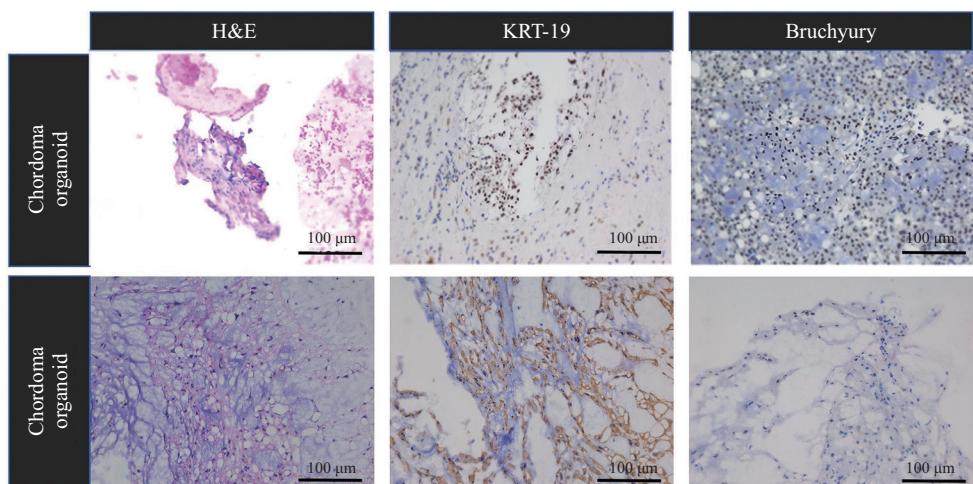


P0: 原代培养; P1: 初次传代。

P0: primary culture; P1: first passage.

图3 脊索瘤类器官的形态

Fig.3 Morphology of chordoma organoids



来自类器官的固定石蜡包埋切片用H&E、KRT19和Brachyury染色。所有类器官都再现了母体肿瘤的特征。

Formalin-fixed paraffin-embedded sections derived from organoids were stained with H&E, KRT19, and Brachyury. All organoids recapitulated the histological and molecular features of the parental tumors.

图4 脊索瘤肿瘤样本和对应类器官的组织学和免疫组织病理学表征

Fig.4 Histological and immunohistopathological characterization of chordoma tumor samples and corresponding organoids

## 脊索瘤类器官与脊索瘤母体细胞的特异基因表达

如图4所示,为检测所构建的脊索瘤类器官模型是否具备脊索瘤原位组织的特征,经H&E染色技术及免疫组化染色技术(IHC实验),检测了脊索瘤原位组织及脊索瘤类器官模型中细胞形态及KRT19及Brachyury两种脊索瘤特异性表达分子的表达情况,上述分子在所构建的脊索瘤类器官模型中均表达阳性,证明该类器官模型能够准确反映脊索瘤的体内特征。

## 脊索瘤类器官技术的现状

类器官(organoids)技术是近年新兴起的一种具有3维结构的一种研究工具。一般可以从胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)、体细胞干细

胞(somatic stem cells, somatic SCs)以及患者或动物来源的癌细胞在特定的三维培养系统中培养而成<sup>[13]</sup>。近年来,随着其理论的不断完善与发展,越来越多肿瘤相关的研究选择了类器官模型作为研究工具。自2014至2024年间,类器官技术相关研究呈现持续增长趋势,其在肿瘤学研究中的关键作用(如精准模拟肿瘤微环境、药物筛选及个体化治疗等)已获得学术界广泛认可,成为转化医学领域的重要研究方向。因此,类器官目前被普遍认为是研究肿瘤发生和癌症进展的卓越体外工具,在基础研究和临床相关中展现出巨大潜力<sup>[14]</sup>。

然而,目前国内关于脊索瘤类器官的研究仍处于起步阶段,相关文献报道较为有限。与其他常见肿瘤(如结直肠癌、乳腺癌)类器官模型相比,脊索瘤类器官的培养体系尚未形成统一的技术标准。在

关键实验环节,包括组织处理方法、消化酶的选择与作用时间、培养基成分的优化(如生长因子的种类与浓度)、三维培养基质的选用以及传代培养的标准化流程等方面,仍缺乏系统性的研究数据支持。此外,由于脊索瘤本身的发病率较低,样本获取难度大,这也进一步限制了相关研究的深入开展。因此,建立稳定、可重复的脊索瘤类器官培养方案,并制定规范化的操作流程,对于推动该领域的科研进展和临床转化应用具有重要意义。

## 脊索瘤类器官模型的构建

本研究描述了一种从人类脊索瘤组织中建立类器官培养物的有效方法。为确保脊索瘤类器官模型具有较高的存活率与稳定的增殖能力,必须使用在4℃下储存不超过1周新鲜培养基,并确保其中有有效且适当储存的生长因子和化合物。本研究通过查阅并学习此前国内外学者针对其他肿瘤类器官模型如肺癌类器官、前列腺癌类器官、食管癌类器官等模型的建立方法<sup>[15-17]</sup>,总结肿瘤类器官培养物质的共性,通过反复优化培养基中细胞因子的配比,最终确定了适合脊索瘤类器官培养的完全培养基配方。如针对肿瘤组织中混杂的非癌细胞(如正常上皮或基质细胞)可能影响类器官纯度和生长稳定性的问题,我们采用了选择性培养基调控策略。培养基中添加的Wnt3A和R-spondin1旨在协同激活Wnt/β-catenin通路,这对于维持脊索瘤细胞的干性至关重要;而FGF10则可能通过促进上皮细胞增殖,模拟肿瘤微环境中的关键生长信号。

本研究成功收集到采集18例脊索瘤患者手术标本,并最终培养出10例肿瘤类器官模型,培养成功率为55.6%。通过总结,先前脊索瘤类器官构建失败的原因可能包括:取材组织中骨骼占比较多,质地较硬,难以消化完全导致消化后单个肿瘤细胞数量不足,以及如骨渣,脂肪组织,血块等杂质较多导致细胞活性较差等。同时,菌类感染也是脊索瘤类器官模型构建失败的一大因素。为了提高脊索瘤类器官的存活率,在后续研究中,我们计划从以下几个方面进行改进:取材时选择质地稍韧的组织,避免取到坏死部分,并严格注意无菌环境,避免感染;优化肿瘤生长因子的浓度和组合,并改进培养方式以更好地支持类器官的生长。通过以上改进措施,我们有望进一步提高脊索瘤类器官模型的构建成功率,为后续研究提供更可靠的工具。

脊索瘤类器官模型构建后,通常可以在光镜下观测到大小较为均一且不断生长的细胞形态。本实验培育的脊索瘤类器官一般于原代培养2周后表现出明显的簇状或巢状的细胞结构(图2),并可在此时进行第一次传代。

## 对建立脊索瘤类器官能否反应原位肿瘤特征的验证

在本实验针对脊索瘤类器官模型的验证中,肿瘤类器官和原发肿瘤组织在组织病理学上的一致性主要是通过苏木精伊红染色和免疫组织化学染色鉴定的,本研究选择了KRT-19及Brachyury两种表达产物作为验证脊索瘤类器官能否表达原发肿瘤组织特征的标志物,KRT-19是一种上皮细胞特异性标志物,在多种肿瘤(包括脊索瘤)中表达<sup>[18]</sup>;而Brachyury是一种转录因子,被认为是脊索瘤的特异性标志物<sup>[19]</sup>,与其发生和发展密切相关。Brachyury同时也是脊索发育的重要调控因子<sup>[20]</sup>,因此,相关领域内认为脊索瘤源于残余的脊索细胞。最终通过我们的验证,证实该培养体系下建立的肿瘤类器官模型能很好地与原肿瘤组织保持一定的同源性。通过上述实验结论,我们认为该培养体系下构建的类器官模型具备成为脊索瘤临床诊疗和基础研究新型科研平台的潜力。

## 结论

针对脊索瘤的治疗研究,脊索瘤类器官模型技术能够提供一个更为先进的体外工具来模拟体内脊索瘤的生存状态,并且可以为药物筛选、药效评价提供更真实的病理环境,从而助力于未来肿瘤药物的开发。同时,其还具有高效率、易于操作和维护等独特优势,可以更好地替代动物实验,更符合人道、伦理等现代科学的研究要求<sup>[21]</sup>。本文详细介绍了脊索瘤类器官模型的构建、传代、冻存及复苏。并验证了脊索瘤类器官模型中脊索瘤特异性表达因子的表达。最终成功构建了脊索瘤类器官模型,并验证了其能够表达脊索瘤特异性标志物(如Brachyury和KRT19),表明该模型能够较好地模拟脊索瘤在体内的特征。

展望未来,类器官模型技术无疑是一个新兴领域。目前,在结肠癌<sup>[22]</sup>、胃癌<sup>[23]</sup>、胰腺癌<sup>[24]</sup>、肝癌<sup>[25]</sup>、肺癌<sup>[26]</sup>和食管癌<sup>[27]</sup>等多种实体瘤中,研究人员已能利用患者来源的肿瘤类器官在体外模拟肿瘤的生物

学行为, 并进行高通量药物敏感性检测。这种方法可以快速筛选出对患者最有效的治疗方案, 从而显著提高治疗的精准性, 同时还能帮助预测患者对特定药物的反应, 最大限度地减少不必要的药物副作用, 并降低肿瘤复发的风险。在这一背景下, 类器官技术也为脊索瘤研究提供了强有力的体外平台。为进一步推动该领域发展, 我们有必要加强对脊索瘤类器官模型的构建与系统优化, 持续改进其培养体系与技术流程。未来, 通过引入微流控芯片<sup>[28]</sup>等先进工程技术, 有望进一步提升类器官模型模拟脊索瘤肿瘤特征的准确性, 增强其在致病机制解析、药物筛选及个体化治疗策略开发中的应用能力。这将为脊索瘤的基础研究与临床转化提供更加可靠的工具与支持。

### 参考文献 (References)

- [1] DESAI R, PELARGOS P E, DUNN I F. Chordoma: genetics and contemporary management [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5877.
- [2] CHEN S, ULLOA R, SOFFER J, et al. Chordoma: a comprehensive systematic review of clinical trials [J]. *Cancers*, 2023, 15(24): 5800.
- [3] KARPATHIOU G, DUMOLLARD J M, DRIDI M, et al. Chordomas: a review with emphasis on their pathophysiology, pathology, molecular biology, and genetics [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(9): 153089.
- [4] HUNG Y P, DIAZ-PEREZ J A, COTE G M, et al. Dedifferentiated chordoma: clinicopathologic and molecular characteristics with integrative analysis [J]. *Am J Surg Pathol*, 2020, 44(9): 1213-23.
- [5] ULICI V, HART J. Chordoma [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2022, 146(3): 386-95.
- [6] TAUZIEDE-ESPARIAT A, BRESSON D, POLIVKA M, et al. Prognostic and therapeutic markers in chordomas: a study of 287 tumors [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2016, 75(2): 111-20.
- [7] STACCHIOTTI S, SOMMER J, CHORDOMA GLOBAL CONSENSUS G. Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(2): e71-83.
- [8] SCHUETZE S M, BOLEJACK V, CHOY E, et al. Phase 2 study of dasatinib in patients with alveolar soft part sarcoma, chondrosarcoma, chordoma, epithelioid sarcoma, or solitary fibrous tumor [J]. *Cancer*, 2017, 123(1): 90-7.
- [9] HINDI N, CASALI P G, MOROSI C, et al. Imatinib in advanced chordoma: A retrospective case series analysis [J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(17): 2609-14.
- [10] STACCHIOTTI S, TAMBORINI E, LO VULLO S, et al. Phase II study on lapatinib in advanced EGFR-positive chordoma [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(7): 1931-6.
- [11] BEN-DAVID U, SIRANOSIAN B, HA G, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 325-30.
- [12] BAI J, SHI J, LI C, et al. Whole genome sequencing of skull-base chordoma reveals genomic alterations associated with recurrence and chordoma-specific survival [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 757.
- [13] XU H, LYU X, YI M, et al. Organoid technology and applications in cancer research [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 116.
- [14] XU H, JIAO D, LIU A, WU K. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 58.
- [15] 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.
- [16] KARAKASHEVA T A, KIJIMA T, SHIMONOSONO M, et al. Generation and characterization of patient-derived head and neck, oral, and esophageal cancer organoids [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2020, 53(1): e109.
- [17] WANG H M, ZHANG C Y, PENG K C, et al. Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: a real-world study [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(2): 100911.
- [18] GULLUOGLU S, TURKSOY O, KUSKUCU A, et al. The molecular aspects of chordoma [J]. *Neurosurg Rev*, 2015, 39(2): 185-96.
- [19] BARRESI V, IENI A, BRANCA G, et al. Brachury: a diagnostic marker for the differential diagnosis of chordoma and hemangioblastoma versus neoplastic histological mimickers [J]. *Dis Markers*, 2014, doi: 10.1155/2014/514753.
- [20] SHARIFNIA T, WAWER M J, CHEN T, et al. Small-molecule targeting of brachury transcription factor addiction in chordoma [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 292-300.
- [21] WOOD L D, EWALD A J. Organoids in cancer research: a review for pathologist-scientists [J]. *J Pathol*, 2021, 254(4): 395-404.
- [22] MERTENS S, HUISMANS M A, VERISSIMO C S, et al. Drug repurposing screen on patient-derived organoids identifies therapy-induced vulnerability in KRAS-mutant colon cancer [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(4): 112324.
- [23] ZHAO Y, LI S, ZHU L, et al. Personalized drug screening using patient-derived organoid and its clinical relevance in gastric cancer [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(7): 110627.
- [24] DUAN X, ZHANG T, FENG L, et al. A pancreatic cancer organoid platform identifies an inhibitor specific to mutant KRAS [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(1): 71-88.e8.
- [25] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M M A, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1424-35.
- [26] KIM M, MUN H, SUNG C O, et al. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3991.
- [27] SATO T, STANGE D E, 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.
- [28] HU Y, SUI X, SONG F, et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2581.