

胃癌恶性腹水来源类器官培养与药物敏感性筛查

胡蕾¹, 陈伟¹, 张世维², 蒋菲¹, 文璋¹, 刘宇虹³, 胡臻然², 曹清华^{4*}, 杨峥^{1*}

1. 中山大学附属第七医院 病理科, 广东 深圳 518000

2. 中山大学附属第七医院 消化医学中心, 广东 深圳 518000

3. 中山大学附属第七医院 普外科, 广东 深圳 518000

4. 中山大学附属第一医院 病理科, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 建立胃癌恶性腹水来源类器官模型, 并将该模型用于化疗药物筛查。方法 收集4例胃癌患者的腹水, 离心处理后与基质胶混合种板, 然后添加含有生长因子的培养基进行类器官培养。采用苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色法对胃癌腹水来源类器官和原始恶性腹水肿瘤细胞进行病理形态学及相关免疫标志物分析。通过对2种化疗药物顺铂和氟尿嘧啶的敏感性筛查, 评估胃癌恶性腹水来源类器官用于药物筛选的适用性。结果 成功培养3例胃癌恶性腹水来源类器官, 类器官的形态和生长特征存在个体差异性, 所有类器官均可稳定传代、冻存与复苏。胃癌恶性腹水来源类器官保留了相应恶性腹水肿瘤细胞的组织结构特征, 相关免疫标志物表达基本保持一致。3例类器官对2种化疗药物表现出不同的药物敏感性, 对氟尿嘧啶均耐药, 对顺铂的耐药存在个体差异。结论 本研究成功建立胃癌恶性腹水来源类器官模型, 该模型很好地保持了胃癌恶性腹水原始肿瘤细胞的病理学特征。类器官对2种化疗药物的反应初步证实其作为体外药物筛选模型的可行性。

【关键词】 胃癌恶性腹水; 类器官; 药物敏感性筛查; 个性化医疗

Gastric cancer malignant ascites derived organoid culture and drug sensitivity screening

Hu Lei¹, Chen Wei¹, Zhang Shiwei², Jiang Fei¹, Wen Zhang¹, Liu Yuhong³, Hu Zhenran², Cao Qinghua^{4*}, Yang Zheng^{1*}

1. Department of Pathology, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China

2. Digestive Diseases Center, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China

3. General Surgery, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China

4. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: Cao Qinghua, E-mail: bpigeon@163.com; Yang Zheng, E-mail: yangzheng@sysush.com

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to establish a gastric cancer-derived organoid model from malignant ascites and to use this model for chemotherapeutic drug screening. **Method** The ascites of 4 patients with gastric cancer were collected, they were mixed with Matrigel and seeded after centrifugation. The medium containing growth factors was added for organoid culture. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining were used to analyze the pathological morphology and related immune markers of gastric cancer ascites-derived organoids and primitive malignant ascites tumor cells. The applicability of gastric cancer-derived organoids from malignant ascites for drug screening was assessed by sensitivity screening to two chemotherapeutic drugs include cisplatin and fluorouracil. **Result** Three cases of gastric cancer-derived organoids from malignant ascites were successfully cultured. There were

基金项目: 中山大学附属第七医院博士后启动基金(ZSQYRSFPD0008), 中山大学青年教师培育项目(2021qntd37)

* 通信作者: 曹清华, E-mail: bpigeon@163.com; 杨峥, E-mail: yangzheng@sysush.com

individual differences in the morphology and growth characteristics of the organoids. All organoids could be stably passaged, cryopreserved, and resuscitated. The malignant ascites-derived organoids of gastric cancer retained the histological characteristics of the corresponding malignant ascites tumor cells, and the expression of related immune markers remained basically the same. The three organoids showed different drug sensitivities to the two chemotherapeutic drugs, all were resistant to fluorouracil, and there were individual differences in the resistance to cisplatin. **Conclusion** In this study, an organoid model derived from malignant ascites of gastric cancer was successfully established, which maintained the pathological characteristics of the original tumor cells of malignant ascites of gastric cancer well. The organoid response to two chemotherapeutic drugs preliminarily confirmed its feasibility as an in vitro drug screening model.

【Key words】 Malignant ascites of gastric cancer; Organoids; Drug screening; Personalized medicine

2018年全球新诊断胃癌100余万例,成为世界第五大常见癌症。据统计,2018年全球约有78.3万人死于胃癌^[1]。胃癌患者中约10%存在恶性腹水,而其出现是肿瘤细胞扩散的终末表现,通常提示预后不良,平均生存期仅约5.2个月^[2,3]。胃癌伴恶性腹水的患者接受化疗的疗效有限,迫切需要新的治疗药物。然而,多药耐药性是导致化疗无效的关键因素之一,这使得穿刺术和利尿剂等姑息性治疗措施成为仅有的方法^[4,5]。因此,对于胃癌合并恶性腹水患者的治疗,除了逆转胃癌细胞的耐药性外,更需获得敏感的化疗或靶向药物。而选择合适的研究模型在治疗前预测疗效显得尤为重要。

传统的涂片和细胞块方法通常用于恶性腹水的细胞学诊断,用于恶性腹水肿瘤细胞体外或体内研究模型较少,经典的研究模型包括细胞培养模型,患者来源的异种移植(patient-derived xenograft, PDX)模型及肿瘤细胞衍生异种移植(tumor cell line-derived xenograft, CDX)模型。细胞培养模型因其可用性和适宜大规模处理而被广泛使用。然而,细胞系模型的结果与临床试验的结果往往存在差异,并非是预测新药疗效最合适的模型。PDX模型是将患者肿瘤中的组织或细胞植入免疫缺陷小鼠中^[6],其优点是保留了肿瘤组织结构,弥补了细胞培养模型的不足^[7]。尽管PDX的可用性有限且难以处理,但其被认为是在肿瘤学中开发新疗法时评估药物敏感性比细胞培养模型更合适的临床前模型。

近年来,患者来源肿瘤类器官(patients derived organoids, PDOs)模型诞生,并且被应用于肿瘤基础研究和测试候选药物的敏感性。类器官技术发明至今,全球研究者已经成功建立结直肠癌^[8]、胃

癌^[9]、乳腺癌^[10]、肝癌^[11]、食管腺癌^[12]等多种肿瘤来源类器官,这些肿瘤类器官模型在表型和基因组变异方面都与原发肿瘤相似。有研究表明,胃癌恶性腹水肿瘤类器官保留了恶性腹水中原始肿瘤细胞的特征,可作为体外药物筛选模型,帮助优化胃癌恶性腹水患者的治疗方案^[13]。

本研究目的是建立胃癌恶性腹水来源类器官(gastric cancer peritoneal effusion derived organoids, PFOs)疾病模型,并将该模型用于化疗药物筛查。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料

Dulbecco改良的Eagle培养基/Ham的F-12(Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F-12, Advanced DMEM/F-12), (Thermo Fisher, 美国); L-丙氨酸-L-谷氨酰胺(GlutaMAX)(1×)(Thermo Fisher, 美国); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-erhanesulfonic acid, HEPES)(1×)(Thermo Fisher, 美国); N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine)(Sigma-Aldrich, 美国); B-27添加剂(B-27 supplement)(Thermo Fisher, 美国); 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(Sigma-Aldrich, 美国); 重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(Sigma-Aldrich, 美国); 重组人FGF10蛋白(fibroblast growth factor10, FGF10)(Peprotech, 美国); 青霉素-链霉素混合液(penicillin-streptomycin solution)(Solarbio, 中国); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Thermo Fisher, 美国); 转化生长因子-β1型受体抑制剂(A83-01)(transforming growth factor-β1 receptor inhibitors, TGFβ1)(Tocris, 美国); 烟酰胺(nicotinamide)(Sigma-Aldrich, 美国); 胃泌素[(Leu15)-Gastrin],

(Sigma-Aldrich, 美国); ROCK 抑制剂 (Y-27632) (Rho associated coiledcoil forming protein kinase inhibitors, ROCKi) (Sigma-Aldrich, 美国); Wnt3A 条件培养基 (稳定的细胞系); R-spondin1 条件培养基 (稳定的细胞系); Noggin 条件培养基 (稳定的细胞系); 基质胶 (Matrigel) (Corning, 美国); TrypLETM Express (Thermo Fisher, 美国); 磷酸缓冲盐溶液(1×) (phosphate buffer saline, PBS) (Biosharp, 中国); 复苏细胞冻存液 (Thermo Fisher, 美国); 384 孔培养板 (Corning, 美国); 96 孔培养板 (NEST, 中国); 24 孔板培养板 (NEST, 中国); 20 ml 移液管 (Thermo Fisher, 美国); 50 ml 离心管 (NEST, 中国); 15ml 离心管 (NEST, 中国); 2 ml 冻存管 (Corning, 美国)。

1.2 患者入组与标本采集 将内镜或既往手术病理证实为胃癌或者胃癌复发入院的患者纳入恶性腹水样本收集范围, 收集的样本来源于正在接受姑息性穿刺术的胃癌患者的腹水或是病理诊断不需要的剩余腹水。收集的腹水样本为当日新鲜引流或放置不超过 24 h, 将收集的腹水标本尽快转移至细胞超净台中处理。该实验方案经中山大学附属第七医院伦理委员会批准(KY-2020-042-01)。

1.3 胃癌恶性腹水类器官的培养 收集胃癌恶性腹水后, 分装于 15 ml 离心管中, 以 1500 转/min 的转速离心 5 min。收集离心后的恶性腹水细胞沉淀, 用含双抗的 PBS 反复洗涤 3~5 遍。取 500 μ l 细胞悬液加入 10 μ l 台盼蓝染料进行细胞活性检测, 观察记录每个腹水样本的细胞活性状况。洗涤后的细胞重新悬浮于 50 μ l 生长因子减量型的 Matrigel 胶 (Corning, 美国) 中, 以每孔 10 μ l 种板于 37 $^{\circ}$ C 预热的 96 孔细胞培养板中。种好细胞的 96 板放置于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的培养箱中 15 min, 待胶滴完全凝固后取出, 每孔加入 100 μ l 完全培养基。将加完培养基的细胞板转移到 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中, 每天在显微镜下观察细胞生长情况, 每 3 天更换 1 次完全培养基, 每 5~7 天传代 1 次。类器官传代时, 用 1 ml 枪头吸取 PBS 轻轻地 将基质胶吹下, 吸取含类器官的 PBS 转移至 1.5 ml EP 管中, 离心去除 PBS 后加入适量的 TrypLETM Express (Thermo Fisher, 美国) 消化液。类器官消化 5~10 min 后, 离心去除消化液后用含 10% 血清的 DMEM 培养基 (Thermo Fisher, 美国) 重悬细胞终止消化, 终止消化后离心获取的细胞用 1 ml PBS 重悬后进行

细胞计数, 将计数好的细胞以每 10 μ l 细胞胶滴含 1000 个肿瘤细胞的密度接种于 37 $^{\circ}$ C 预热的 24 孔板中。种好细胞的 96 板放置于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的培养箱中 15 min, 待胶滴完全凝固后取出, 每孔加入 500 μ l 完全培养基。类器官长期培养, 传代至第三代 (F3) 类器官消化成单个细胞后于含 10% DMSO 的 1 ml 血清中冻存细胞。

1.4 组织学与免疫组织化学 收集的恶性腹水标本离心后的细胞沉淀, 室温固定 24 h, PBS 洗涤, 后用 70% 乙醇处理, 石蜡包埋、脱水、切片; 收集培养 3 代后的恶性腹水来源类器官在室温下用 4% 多聚甲醛固定 2 h, 1% 琼脂糖包裹固定后石蜡包埋、脱水、切片。恶性腹水细胞和类器官切片均进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 苏木精溶液染细胞核, 伊红溶液染细胞质, 染色完成后脱水使用中性树脂封片, 倒置显微镜下对切片进行观察。对恶性腹水细胞和类器官进行免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色, 使用的抗体有: 反映肿瘤细胞增殖指数的 Ki-67, 反映肿瘤突变的 P53, 以及常联用来判断肿瘤细胞为胃肠道肿瘤来源的 CDX2、CK20, 采用 DAB 系统进行 IHC 染色。上述图片均由全自动数字病理切片扫描仪 KF-PRO020 (宁波江丰, 中国) 采集。

1.5 化疗药物敏感性试验 收集传代数在第 3~5 代的类器官, TrepLE Express (Thermo Fisher, 美国) 消化液消化类器官 15 min, 离心收集后以每孔 1000 个细胞的密度将类器官种植于 384 孔板 (Corning, 美国) 中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 24 h 后, 利用高通量加药仪器加入临床上常用的化疗药物氟尿嘧啶、顺铂, 2 种药物均采用 3 个副孔 6 个浓度梯度, 氟尿嘧啶浓度梯度为: 100 μ mol/L、40 μ mol/L、12 μ mol/L、4 μ mol/L、2 μ mol/L、1 μ mol/L, 顺铂浓度梯度为: 33 μ mol/L、13 μ mol/L、4 μ mol/L、1.3 μ mol/L、0.6 μ mol/L、0.3 μ mol/L。加药 96 h 后采用 ATP 检测试剂盒检测细胞增殖情况。ATP 试剂盒检测前使用活细胞成像仪采集相应类器官加药后的图像。绘制 2 种化疗药物的剂量-效应曲线, 根据剂量效应曲线判断胃癌腹水来源类器官对 2 种药物的敏感程度。

2 结果

2.1 实验设计和样本基本信息 本实验设计如下: 取胃癌患者腹水标本, 分离细胞后进行类器官

培养、传代、建库;对培养成功的类器官及其原始肿瘤细胞进行病理学分析鉴定,包括HE染色、IHC染色;最后利用类器官检测常用化疗药物敏感性,探索其作为肿瘤个体化治疗模型的价值。

本研究共收集4份胃癌患者的恶性腹水,患者信息如表1所示:男1例、女3例,年龄30~75岁,肿瘤病理分型主要为胃腺癌,部分含有印戒细胞癌。4份腹水标本中,除PF1腹水因肿瘤细胞状态差导致培养失败以外,其他3份肿瘤细胞状态好的样本均成功培养类器官。

2.2 恶性胃癌腹水来源类器官培养 胃癌腹水癌细胞离心后采用基质胶包埋种板,胶滴凝固后添加完全培养基。选取其中1例胃癌腹水来源类器官(PF4)在传代种板后连续7d拍摄明场图片。如图2所示,基质胶中包裹的肿瘤细胞最初为单个散在分布,第1、2天时肿瘤细胞变化不明显,仍为单个透亮的大细胞,在培养3d后形成连接松散的多细胞球形团状结构,在第6~7天增殖形成“葡萄串样”结构。采用同样的培养条件,3例胃癌恶性腹水标本成功培养出PFOs,PFOs在生长速度

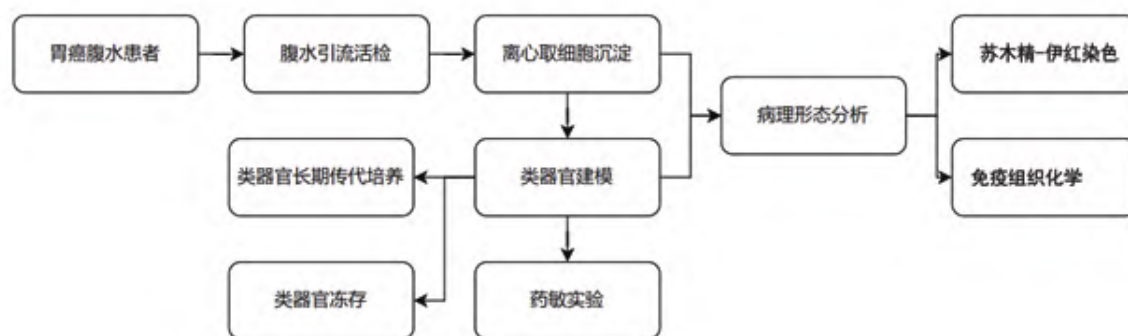


图1 胃癌腹水来源类器官培养与药物敏感性研究流程图

表1 胃癌腹水样本基本信息

类器官编号	性别	年龄	样本类型	肿瘤病理分型	细胞活性	传代数
PF1	女	48岁	胃癌腹水	胃腺癌	差	/
PF2	女	35岁	胃癌腹水	胃腺癌	好	P25
PF3	男	73岁	胃癌腹水	胃腺癌	好	P23
PF4	女	40岁	胃癌腹水	胃腺癌、部分印戒细胞癌	好	P20

注:PF,腹水;P,传代次数。

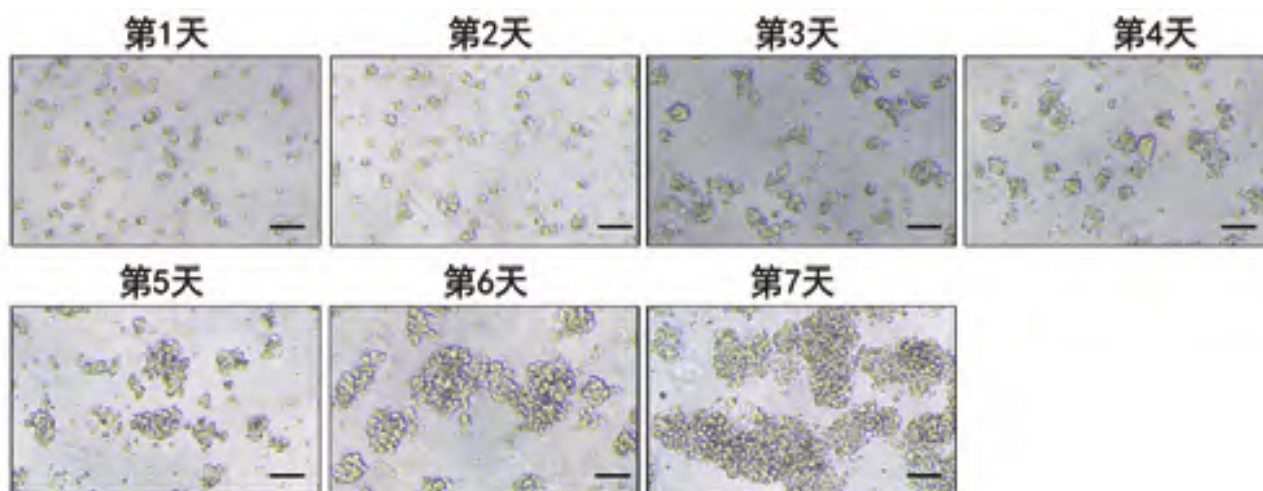


图2 胃癌腹水来源类器官(PF4)7d培养动态观察

注:选取1例胃癌腹水来源类器官(PF4)传代后连续7d拍摄明场图片。胃癌腹水癌细胞类器官采用基质胶包埋种板,然后添加完全培养基。肿瘤细胞最初为单个散在分布,培养3d后形成连接松散的多细胞球形团状结构,在第6~7天增殖形成“葡萄串样”结构。比例尺为200 μm。

和形态学上表现出个体差异性。按照如前所述的培养方法,细胞活性好的3份样本(PF2、PF3、PF4)成功培养类器官并稳定传代,类器官冻存后复苏状态好。

2.3 恶性胃癌腹水来源类器官长期稳定传代培养 为了证实类器官培养的传代能力和稳定性,对PFOs进行连续传代培养。3例胃癌腹水来源类器官的原代培养(F0)中除了肿瘤细胞,还包含其他的腹水成分细胞,如淋巴细胞、间皮细胞等。经过传代培养的筛选,腹水中原始的淋巴细胞、间皮细胞等均在传代过程中慢慢被清除。胃癌腹水类器官传至第3代(F3)时,镜下观察基质胶中包裹的细胞中只剩下胃癌腹水中能稳定增殖的肿瘤细胞。在连续不断的长期扩增过程中,3例胃癌腹水类器官在连续传代10次后(F10)仍能保持稳定的扩增。3例胃癌腹水类器官在形态学方面有明显的异质性,其中PF2、PF4为连接松散的多细胞球团,PF3是连接稍紧密的多细胞球团,且3例胃癌腹水类器官在传代10次后的形态与原始类器官(F0)形态仍然保持一致。

2.4 恶性胃癌腹水来源类器官的病理学特征 腹水中的恶性肿瘤细胞呈悬浮状态,没有细胞外基

质的支持,但在细胞外基质包裹培养时,能够生长成3D细胞球团结构。如图4光镜下:PF2、PF3、PF4在细胞外基质包埋培养条件下,生长成3D细胞球团状类器官结构。对恶性腹水肿瘤细胞及恶性腹水肿瘤细胞来源类器官的石蜡包埋切片进行组织病理学分析,探究PFOs是否保留了恶性腹水肿瘤细胞的组织学特征。HE染色显示:PFOs均由明显的恶性细胞组成,与原始恶性腹水肿瘤细胞具有相似的典型癌变特征:细胞核增大、核分裂增加、部分核偏位、核仁大、染色质粗、部分胞浆可见黏液分泌的异型细胞,少数为印戒细胞。原始腹水中除肿瘤细胞外还包含腹水中其他常见的细胞类型,如间皮细胞和免疫细胞。对比PFOs的光镜图、PFOs的HE染色图和原始胃癌恶性腹水切片的HE染色图(图4),3例胃癌腹水来源类器官细胞与原始肿瘤细胞在病理学形态上保持一致。

2.5 胃癌腹水来源类器官的免疫组织化学染色 CDX2通常用于胃肠道和胰腺恶性肿瘤的腹水细胞学,常与CK20联用来判断肿瘤细胞是否胃肠道肿瘤来源。对胃癌腹水类器官及其原始腹水细胞石蜡包埋,切片进行IHC染色,结果如图5所示。CK20 IHC显示:PF2中无阳性细胞,对应的腹水沉

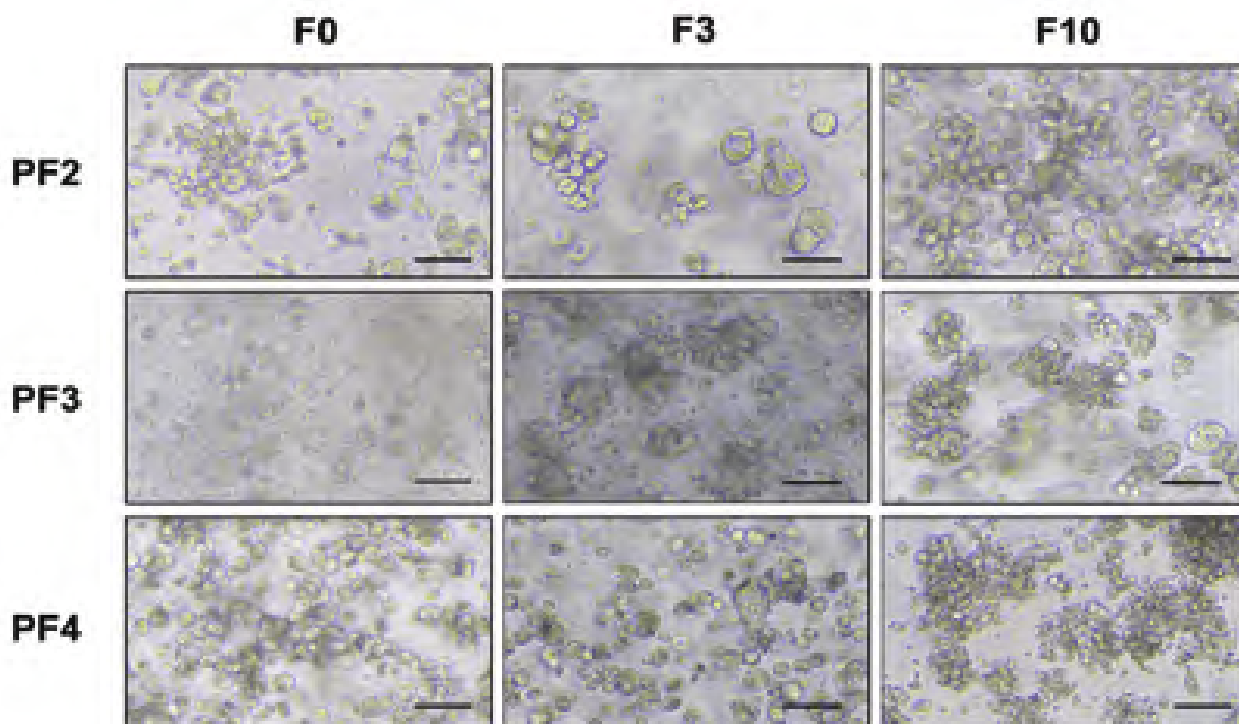


图3 胃癌腹水来源类器官长期稳定传代培养

注:图为3例成功培养的胃癌腹水来源类器官的原代(F0)、第3代(F3)、第10代(F10)的明场图片。在传代过程中,胃癌腹水来源类器官的形态保持不变,所有成功培养的胃癌腹水来源类器官均可长期稳定传代、扩增。比例尺为200 μm。

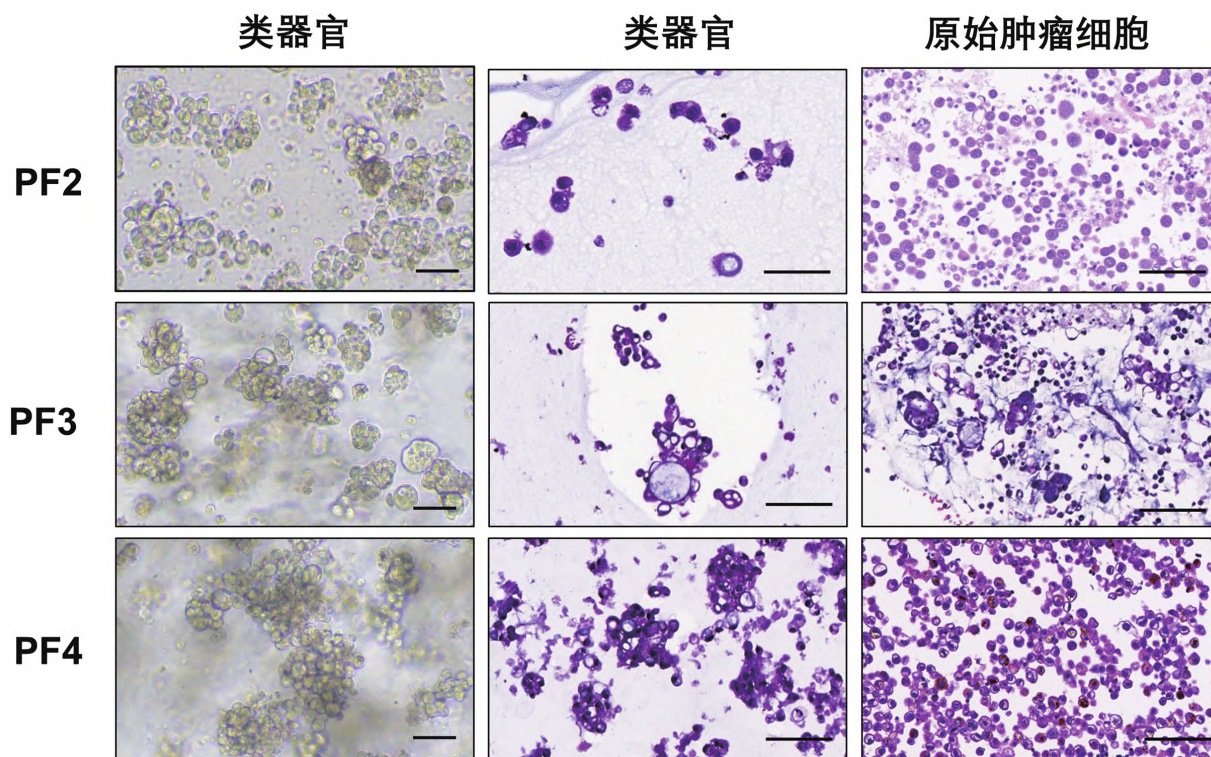


图4 胃癌腹水来源类器官与腹水原始肿瘤细胞组织学特征

注:左边第1列为3例胃癌腹水类器官的明场图片、中间列为3例胃癌腹水来源类器官石蜡包埋制片后的苏木精-伊红染色图片,最右边1列为3例胃癌腹水细胞沉渣包埋制片后的苏木精-伊红染色图片。比例尺为200 μm 。

渣肿瘤细胞部分阳性;PF3中部分细胞阳性,对应的腹水沉渣肿瘤细胞无阳性细胞;PF4中部分细胞阳性,对应的腹水沉渣肿瘤细胞中阳性细胞比例高。CDX2染色显示:PF2中阳性细胞比例高,对应的腹水沉渣肿瘤细胞无阳性细胞;PF3中部分细胞阳性,对应的腹水沉渣肿瘤细胞中阳性细胞比例高;PF4中部分细胞阳性,对应的腹水沉渣肿瘤细胞中部分细胞阳性,两者一致。

Ki-67为细胞增殖的一种标记,其与许多肿瘤分化程度、浸润、转移、预后密切相关,Ki-67阳性率越高,肿瘤增殖越快,恶性程度越高。P53是一种抑癌基因,在很多肿瘤中都会出现P53突变,P53表达蛋白可见于乳腺肿瘤、胃肠道肿瘤、肺癌、肝细胞肿瘤等多种肿瘤细胞中。P53阳性辅助判断疾病的良恶性及判断疾病预后,P53阳性,通常提示预后不佳。3例胃癌腹水类器官P53染色细胞核阳性,提示TP53基因突变,对应的腹水沉渣肿瘤细胞p53染色结果一致。Ki-67染色显示PF2中阳性细胞比例较低,而PF3、PF4中阳性细胞比例较高,对应的腹水沉渣肿瘤细胞Ki-67染色结果一致,提示不同的细胞增殖速度。

综上,PF2与腹水沉渣肿瘤细胞均表达CK20、P53、Ki-67;而CDX2的表达上存在差异,PF2表达,而腹水沉渣肿瘤细胞不表达;PF3与腹水沉渣肿瘤细胞均表达CDX2、P53、Ki-67,在CK20的表达上存在差异,PF3不表达,而腹水沉渣肿瘤细胞表达;PF4与腹水沉渣肿瘤细胞均表达CK20、CDX2、P53、Ki-67。3例胃癌腹水类器官与原始恶性腹水肿瘤细胞的免疫表达情况基本保持一致。

2.6 恶性胃癌腹水来源类器官的化疗药物筛查 为了研究腹水来源类器官模型是否能用于药物敏感性研究,选择胃癌常用的全身化疗及腹腔灌注化疗药物顺铂和氟尿嘧啶,每个药物设置6个浓度,拟合剂量效应反应曲线,确定半数最大抑制浓度(IC50),根据剂量效应曲线判断胃癌腹水来源类器官对2种药物的敏感程度。药物治疗后测量PFOs的细胞增殖活性,与未治疗的对照组相比,细胞增殖活性的变化被用作类器官存活率的衡量标准(图6a)。3例类器官对2种常规化疗药物的敏感程度不同,3例PFOs对氟尿嘧啶均耐药,未能计算出IC50值;3例PFOs对顺铂的反应不同,

对应的 IC₅₀ 值分别为 12.6 μmol/L (PF2)、20 μmol/L (PF3, PF4); PF2 为中度敏感, PF3、PF4 为耐药。综上, 顺铂对 3 例 PFOs 的杀伤性强于氟尿嘧啶。光镜图(图 6b)展示了 PF2 对 2 种药物的不同浓度的反应, 随着 2 种药物浓度的增加, PF2 的增殖受到明显抑制, 胃癌腹水来源类器官数量减少, 类器官体积变小。在最高浓度氟尿嘧啶的作用

下, PF2 的细胞活性尚可, 但在最高浓度顺铂的作用下, PF2 的细胞活性差, 未见明显增殖的细胞, 与剂量效应曲线的绝对定量结果一致。

3 讨论

恶性腹水是腹膜种植和腹膜癌的常见并发症, 然而目前对恶性腹水肿瘤细胞的研究较少。在

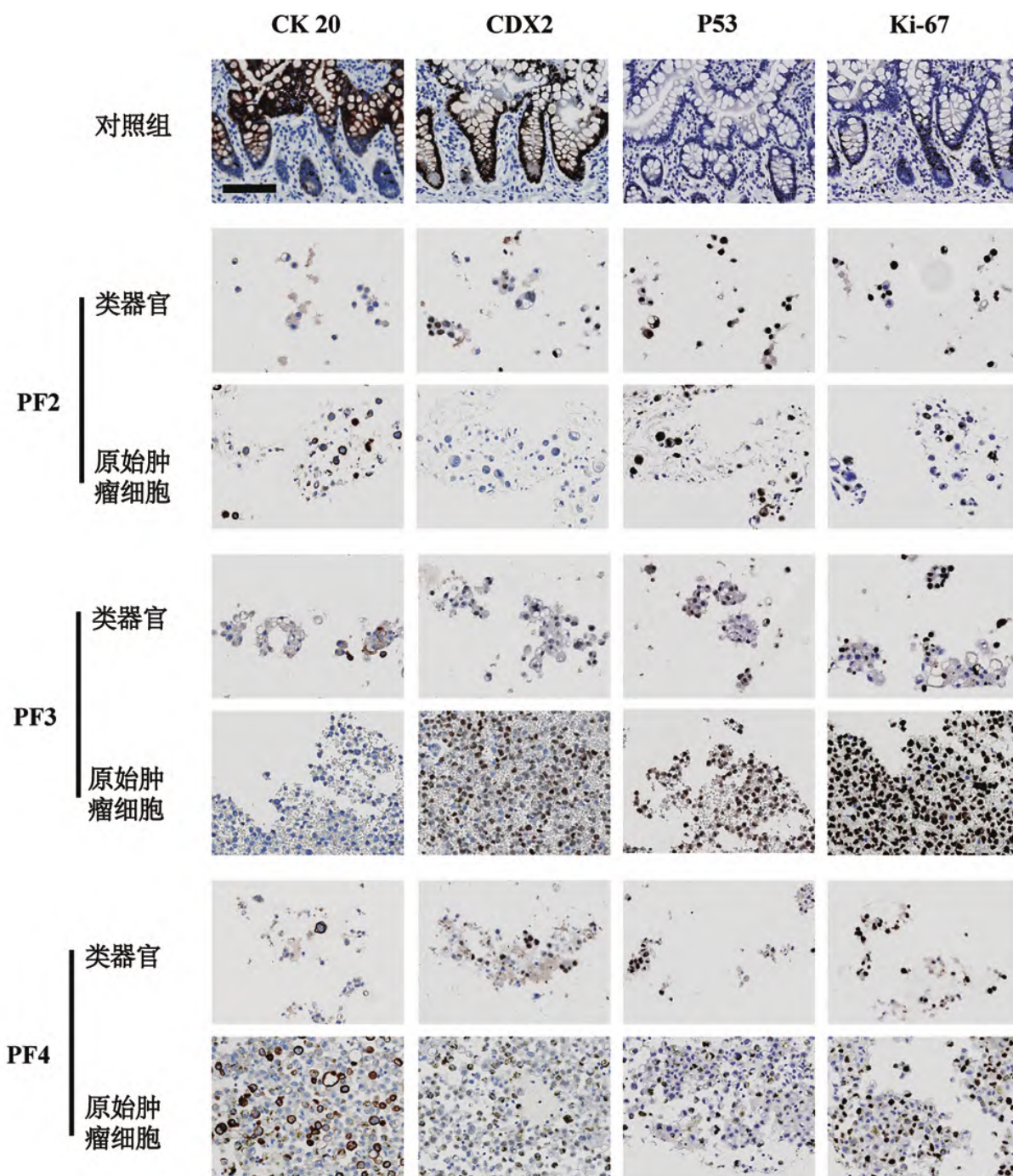


图 5 胃癌腹水来源类器官的免疫组化染色

注: 图中第一行为胃上皮癌组织阳性对照, 下面 6 行分为三组, 分别为胃癌腹水来源类器官与其腹水原始细胞沉渣的免疫组织化学对比图。比例尺为 100 μm。

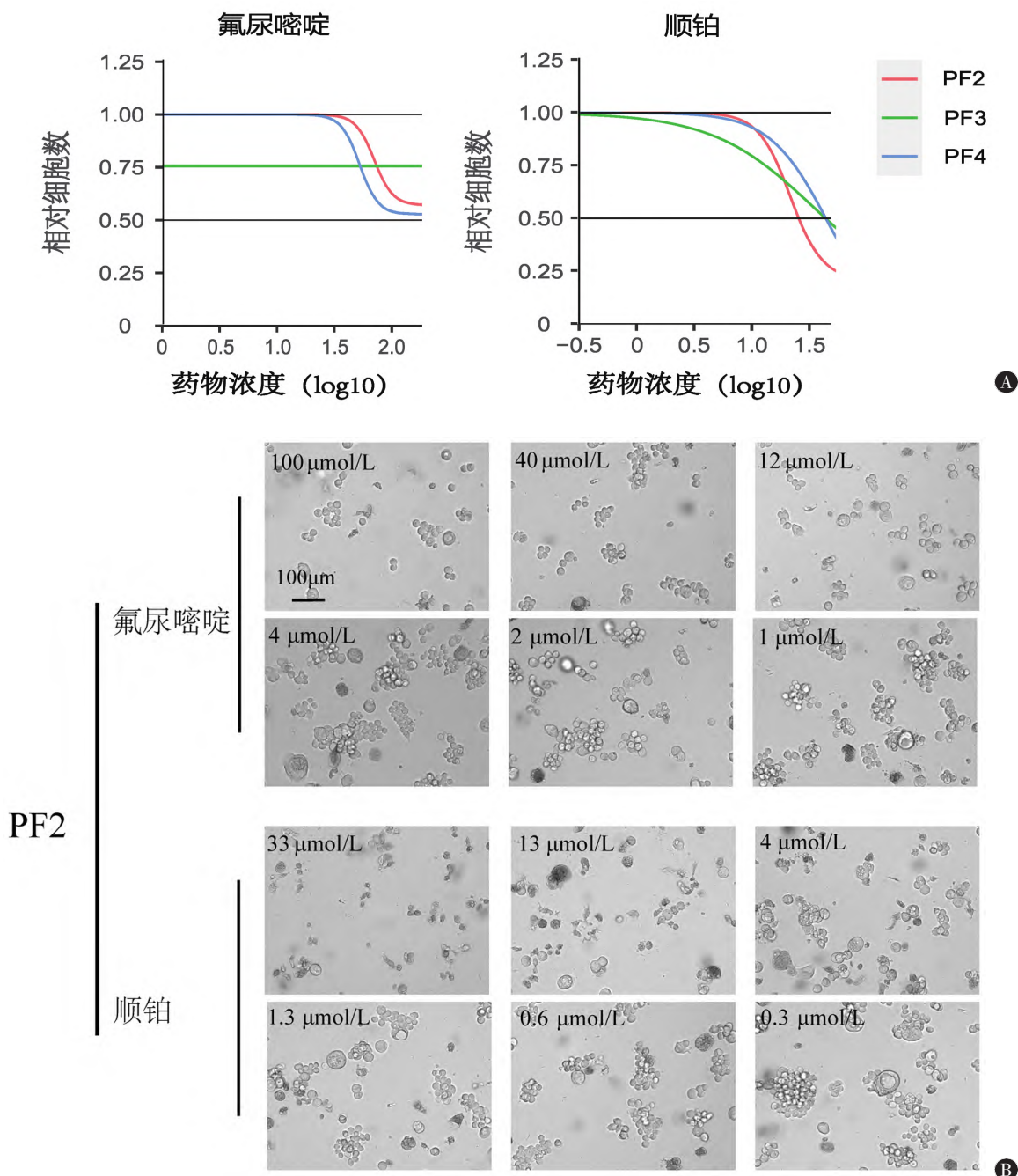


图6 胃癌腹水类器官(PF2)对2种常规化疗药物的反应

注:a. 3例胃癌腹水类器官分别用6个药物浓度梯度的氟尿嘧啶、顺铂处理96 h,绘制剂量效应反应曲线。横坐标为药物浓度的对数值(lg),纵坐标为类器官相对细胞数量;b. 胃癌腹水来源类器官经药物处理后代表性的明场图像,第1、2行为6个浓度梯度氟尿嘧啶作用后的图像,第3、4行为6个浓度梯度的顺铂作用后的图像。比例尺为100 μm。

类器官技术发明以前,研究者尝试利用传统细胞培养方法进行肿瘤原代培养。Golan等^[14]用胰腺癌患者腹水建立了腹水来源胰腺导管腺癌原代细胞培养模型,用于进行药物筛选。但是该研究未对腹水来源培养细胞与原始肿瘤细胞的表型一致性进行探索。该研究发现大多数腹水培养细胞在5~6次传代后无法继续增殖传代,表明该研究的细

胞培养体系存在明显的不足。Wu等^[15]对恶性胸腹水来源肿瘤细胞进行2D、3D培养,然后对所得细胞进行体外药物筛选研究。他们成功培养4例恶性腹水来源肿瘤细胞,分别为胃肠道癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤。作者发现2D培养条件下肿瘤细胞的肿瘤标志物出现丢失,且容易出现间皮细胞过度生长,导致肿瘤细胞培养失败;相反,3D

培养具有更高的原代肿瘤细胞培养成功率。

类器官技术的诞生让原代细胞培养进入了时代,能够显著提高原代培养成功率。对患者来源类器官的研究发展迅速,目前科学界已将成功培养了不同类型的肿瘤细胞来源类器官作为疾病临床前模型,包括胃肠道癌^[16, 17]、肺癌^[18]、膀胱癌^[19]、胰腺癌^[20]、前列腺癌^[21]等,大多数肿瘤类器官来源于手术标本或活检,取材不够便利且标本不可重复使用。相比之下,恶性腹水来源类器官培养更经济、更方便,目前文献报道成功培养包括结直肠癌^[22]、卵巢癌^[23]、胃癌^[13]来源的恶性腹水类器官。上述腹水来源类器官的样本量均不多,结直肠癌腹水类器官样本仅1例,卵巢癌腹水类器官样本为14例,胃癌腹水类器官样本为11例。结直肠癌、卵巢癌腹水来源类器官均为短期培养,用于经验药物敏感性测试的平台,有助于在个体化治疗方案之前筛选新的或现有的治疗药物。

相关研究证实从胃癌患者的恶性腹水肿瘤细胞中建立的类器官体外模型,很好地反映了原始恶性腹水肿瘤细胞的组织病理学特征和分子突变模式,在药物敏感性筛选试验中对临床标准化疗药物表现出异质性反应,表明其可以用作功能性体外疾病模型^[13]。上述研究中,研究者加入不同比例的腹水离心上清液来维持类器官的稳定培养。本研究中我们优化了类器官培养基,无需加入腹水上清就可以很好地维持类器官培养,且适用于不同患者来源的类器官培养,去除原始细胞状态不好的PF1,类器官培养成功率为100%。与CDX、PDX模型相比,PDO的优势大,克服了体外细胞系研究发现向临床转化及PDX、CDX模型作为高通量药物敏感性筛查平台耗时长、成本高的问题^[24]。

本研究成功培养了来自3例不同胃癌患者的PFOs,胃癌腹水总培养成功率为75%。不同患者来源类器官之间的形态和生长速度存在差异,所培养成功的3例PFO均可长期稳定传代10代以上,且类器官细胞可以冻存复苏以备后续实验研究使用,优于只能短期培养用作药物敏感性测试平台的结直肠癌、卵巢癌腹水类器官。对3例胃癌腹水类器官进行病理学特征分析,表明胃癌腹水来源类器官细胞与原始肿瘤细胞在病理学形态上保持一致。胃癌腹水来源类器官的IHC染色结果显示:PF2与腹水沉渣肿瘤细胞一致表达CK20、P53、Ki-67,PF2表达CDX2,而腹水沉渣肿瘤细胞不表

达;PF3与腹水沉渣肿瘤细胞一致表达CDX2、P53、Ki-67,PF3不表达CK20,而腹水沉渣肿瘤细胞表达;PF4与腹水沉渣肿瘤细胞一致表达CK20、CDX2、P53、Ki-67。PF2、PF3与腹水沉渣肿瘤细胞在CK20和CDX2的表达差异可能是由于培养条件的筛选作用,表达CDX2的PF2在此条件下成功扩增,不表达CK20的腹水肿瘤细胞在此条件下扩增成为PF3。在对化疗药物的筛查结果显示,同一患者对常用的2种化疗药物的敏感性不同,同一药物在患者之间体现出个体耐药差异性。为了测试PFOs能否指导个体化用药,需要对PFOs和相应患者临床药物敏感性反应进行平行分析。

本研究存在的不足之处:样本量少,未能对胃癌腹水类器官及其原始肿瘤细胞进行全外显子测序分析其突变情况,无法进一步在分子水平分析患者耐药机制;作为药物敏感性平台测试的临床药物种类可以增加,如奥沙利铂、伊立替康等。

综上所述,本研究建立了胃癌恶性腹水肿瘤细胞的体外类器官模型,并在组织病理学上显示PFOs和恶性腹水肿瘤细胞的良好一致性。本研究观察了PFOs对2种化疗药物的不同反应。PFOs未来有望用于恶性腹水症状患者的药物筛选和优化患者的临床治疗方案。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] MAEDA H, KOBAYASHI M, SAKAMOTO J. Evaluation and treatment of malignant ascites secondary to gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(39): 10936-10947.
- [3] FANG N, ZHANG H Q, HE B, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of gastric cancer with malignant ascites [J]. *Tumour Biology*, 2014, 35(4): 3261-3268.
- [4] JEHN C F, KVPFERLING S, OSKAY-ÖZCELIK G, et al. A survey of treatment approaches of malignant ascites in Germany and Austria [J]. *Support Care Cancer*, 2015, 23(7): 2073-2078.
- [5] JIA W, ZHU Z, ZHANG T, et al. Treatment of malignant ascites with a combination of chemotherapy drugs and intraperitoneal perfusion of verapamil [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(6): 1585-1590.
- [6] GAO H, KORN J M, FERRETTI S, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11):

- 1318–1325.
- [7] KREPLER C, SPROESSER K, BRAFFORD P, et al. A Comprehensive Patient –Derived Xenograft Collection Representing the Heterogeneity of Melanoma [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(7): 1953–1967.
- [8] VAN DE WETERING M, FRANCIES H E, FRANCIS J M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients [J]. *Cell*, 2015, 161(4): 933–945.
- [9] YAN H H N, SIU H C, LAW S, et al. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 882–897.
- [10] 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): 373–386.
- [11] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M M, et al. Human primary liver cancer–derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1424–1435.
- [12] LI X, FRANCIES H E, SECRIER M, et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2983.
- [13] LI J, XU H, ZHANG L, et al. Malignant ascites –derived organoid (MADO) cultures for gastric cancer in vitro modelling and drug screening [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(11): 2637–2647.
- [14] GOLAN T, ATIAS D, BARSHACK I, et al. Ascites –derived pancreatic ductal adenocarcinoma primary cell cultures as a platform for personalised medicine [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(9): 2269–2276.
- [15] WU C G, CHIOVARO F, CURIONI–FONTECEDRO A, et al. In vitro cell culture of patient derived malignant pleural and peritoneal effusions for personalised drug screening [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 163.
- [16] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIUO A, et al. Patient –derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. *Science (New York, NY)*, 2018, 359(6378): 920–926.
- [17] YAO Y, XU X, YANG L, et al. Patient –Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer [J]. *Cell stem cell*, 2020, 26(1): 17–26.
- [18] KIM M, MUN H, SUNG C O, et al. Patient –derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening [J]. *Nature communications*, 2019, 10(1): 3991.
- [19] LEE S H, HU W, MATULAY J T, et al. Tumor Evolution and Drug Response in Patient–Derived Organoid Models of Bladder Cancer [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 515–528.
- [20] HUANG L, HOLTZINGER A, JAGAN I, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell– and patient–derived tumor organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1364–1371.
- [21] 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.
- [22] UBINK I, BOLHAQUEIRO A C F, ELIAS S G, et al. Organoids from colorectal peritoneal metastases as a platform for improving hyperthermic intraperitoneal chemotherapy [J]. *Br J Surg*, 2019, 106(10): 1404–1414.
- [23] CHEN H, GOTIMER K, DE SOUZA C, et al. Short –term organoid culture for drug sensitivity testing of high–grade serous carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 157(3): 783–792.
- [24] WEEBER F, OOF T S N, DIJKSTRA K K, et al. Tumor Organoids as a Pre–clinical Cancer Model for Drug Discovery [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(9): 1092–1100.