

肺癌类器官的研究进展

贾梓淇^{1,2}, 王艳宇¹, 王亚东¹, 邴钟兴¹, 梁乃新^{1*}, 李单青^{1*}

- (1. 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 胸外科, 北京 100730;
2. 北京协和医学院 八年制临床医学专业, 北京 100005)

摘要:肺癌发病率和病死率在中国均位居第一位,相关新药研发亟需体外功能学模型衔接其基础-临床转化。其中类器官在基础研究和临床转化等诸多方面具有明显优势。目前已可实现对穿刺、手术以及循环肿瘤细胞等标本进行成功培养,有广阔的应用前景,是良好的肿瘤转化研究模型。本文就肺癌类器官模型的历史研究进展和应用作一综述。

关键词: 肺癌;类器官

中图分类号:R734.2 文献标志码:A

Advances in lung cancer organoid research

JIA Zi-qi^{1,2}, WANG Yan-yu¹, WANG Ya-dong¹, BING Zhong-xing¹, LIANG Nai-xin^{1*}, LI Shan-qing^{1*}

- (1. Department of Thoracic Surgery, Peking Union Medical College Hospital, CAMS & PUMC, Beijing 100730;
2. Eight-Year MD Program, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: Lung cancer has high morbidity and mortality rate. Thus, an efficient pre-clinical model that can serve the translational study is urgently needed. The application of organoid should be compared to existing *in vitro* and *in vivo* models under different circumstances. The development of organoids of lung cancer has undergone three stages as tissue-specific stem cell differentiation, mixed cell manipulation, and 2-dimensional cultivation. Now, lung cancer organoid can be developed from samples harvested through surgery, biopsy, and circulating tumor cells, with a wide range of application. This review aims to summarize the historical development and application of lung cancer organoids.

Key words: lung cancer; organoid

肺癌(lung cancer)是目前全世界发病率和病死率最高的恶性肿瘤,尽管亚洲人群中约有25%左右的肺腺癌携带意义明确且可治的驱动基因突变,但绝大多数晚期肺癌仍属难治性。目前针对这一群体尚无明确的精准治疗方案,故肿瘤体外功能学模型成

为目前针对难治性肺癌探究肿瘤药物敏感性的研究热点。其中,类器官(organoid)是一种从干细胞增殖而来且微观下具有自组装特性的三维体外肿瘤模型,其囊括了原始肿瘤的结构和功能特征,并具有时效快、增殖能力强、可操纵性好等优点,可以用于研

收稿日期:2020-01-20 修回日期:2020-04-30

基金项目:北京市级大学生创新训练计划项目(2019zlgc0629);北京协和医学院青年教师项目(2014zlgc0717);小规模特色办学教学改革专项(2014zlgc0135)

*通信作者(corresponding author):pumchnelson@163.com; pumchlishanqing@163.com

究瘤内多细胞间相互作用、原始肿瘤的发生发展和药物敏感性。目前肺癌类器官已经可以从多种不同病理类型的肺癌原始肿瘤成功培养,并具有一定的基因可操作性。越来越多的证据表明类器官可以用于精准预测实体瘤患者体内肿瘤的药物敏感性,未来或可用于肺癌全程管理中的精准治疗方案选择。本文将从历史发展和基础-临床转化应用方面对肺癌类器官进展进行综述。

1 肿瘤类器官概述

患者肿瘤组织培养的类器官(patient-derived organoid, PDO)是取材自患者的穿刺、手术标本、循环肿瘤细胞、胸水或肺泡灌洗液等经过体外培养得到的有增殖和空间自组织能力的三维多细胞团^[1]。其形成有赖于标本中有增殖分化能力的肿瘤细胞、组织中的干细胞和经诱导分化的多能细胞。PDO培养成功率较高,约为50%~80%^[2],为利用患者肿瘤标本建立大型生物标本库提供了机会。多类肿瘤目前已可构建PDO,且成功培养的PDO在组织结构^[2]、基因组^[3]、转录组以及功能上都与原始肿瘤组织高度相似,能够很好地浓缩原始肿瘤的主要特征。目前,肿瘤类器官的培养是在含有细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的Matrigel三维(three dimension, 3D)胶中添加含Wnt、R-spondin1、EGF和Noggin等^[1-2]生长因子的培养基来完成,不同种类的肿瘤培养基成分略有不同,而最终形成的三维多细胞团可以在96孔板或384孔板上进行药敏检测。目前有越来越多的证据表明, PDO的药敏结果可以用于临床指导患者体内肿瘤的精准治疗。

2 肺癌研究中的功能学模型

目前已有的肿瘤研究模型分为体内(*in vivo*)和体外(*in vitro*)两类。体外模型包括肿瘤细胞系(patient-derived cell line, PDCL)、肿瘤细胞原代培养和类器官模型;体内模型包括基因工程小鼠模型(genetically engineered mouse model, GEMM)、细胞系来源的异种移植瘤模型(cell-line derived xenograft, CDX)和患者肿瘤来源异种移植瘤模型(patient-derived xenograft, PDX)等。其中PDCL具有易于培养、增殖迅速、费效比低等诸多优点,故PDCL是目前应用最为广泛的肿瘤模型。但PDCL同时存在丢

失原始肿瘤内部异质性、对肿瘤的分子生物学和生理特点描述差等缺点。而肿瘤细胞原代培养在这些方面略有优势,但培养条件复杂,培养周期长(约6个月),在时效性上难以用于肿瘤患者的临床选药^[4]。同时,无论是PDCL还是肿瘤细胞原代培养都无法描述肿瘤微环境,而目前已知肿瘤微环境中的成纤维细胞及其分泌的生长因子会影响肿瘤细胞对靶向药物的敏感性和耐药性。相比之下, GEMM和PDX可以在小鼠体内提供肿瘤微环境,但小鼠和人类肿瘤微环境的一致性仍需探究。而且,小鼠模型构建成功率低、价格高、时间长,故亦难以实际应用于高通量药物筛选和临床患者焦急的选药场景^[5]。因此就综合培养成功率、时效性、费用及对肿瘤药敏描述的准确性而论,混合细胞培养得到的类器官优于其他模型^[4]。相比于PDCL, PDO和PDX二者则具备可以模拟肿瘤组织学特征且肿瘤的基因组及表达组异质性保存良好的特征,是目前实验室研究肿瘤生物学特性和药物敏感性的重要模型,尤其是PDX可以用于验证在PDO中发现的肿瘤的药敏特性。目前认为, PDO可以保留绝大多数原始肿瘤的主克隆,同时,在结直肠癌和卵巢癌的研究中证实,类器官在大量扩增之后发生遗传突变的概率很小,传代稳定性较高^[6],但是能否高度还原原始肿瘤内部的异质性尚待研究。为更好地模拟肿瘤的生物环境, PDO与血管生成间充质干细胞及免疫细胞的共培养体系也在研究进程中^[7]。

因此, PDO具有汇集原始肿瘤特征、可操作性强、增殖较快、稳定性较高、可高流量筛选、可建库保存等优点。尽管肿瘤类器官的临床应用仍需大规模临床随机对照试验的探索,但结合以上优点, PDO在精准医学治疗癌症的临床前用药决策中有着巨大的价值潜力。

3 肺癌类器官模型构建的研究进展

肺癌类器官的探索经过了原代肿瘤细胞培养、肿瘤细胞间质细胞混合培养(2D-类器官)^[4]、肺癌类器官3个阶段的探索。培养标本来源也从手术及穿刺标本进而发展到可以通过循环肿瘤细胞^[8]、胸水或支气管肺泡灌洗液培养。近年来,尸检材料也已被用于成功建立PDX和PDO,这对于

确定导致患者死亡的肿瘤最终状态以及探究肿瘤的进化和异质性非常重要。尸检材料的研究还可以对常规手段无法获得的原发性和多发转移性病灶进行分子分析,并通过类器官研究其不同的药物敏感性。同时,通过尸检获得大标本可以协助研究肿瘤微环境中的基质成分,这些成分可能是肿瘤进展的重要驱动因素。

实体瘤类器官的培养相对于血液系统恶性肿瘤来说成功率较低。对于肺癌而言,穿刺标本和血液标本中的肿瘤细胞数量稀少、间质细胞数量多,手术标本同样有间质细胞混杂,且面临组织消化过程对细胞的损伤,故实体瘤的类器官培养难度较大。

实现肺癌类器官培养经历了多种培养方式,包括促人多能干细胞分化^[9]、调控原代细胞和肺癌细胞转化^[10]以及通过“条件重编程”方法增加对肿瘤活检物培养的成功性^[11]等。有干性的细胞可以通过荧光激活细胞分选系统或磁珠抗体细胞分选系统进行分离,并在2D培养基或含有Matrigel的3D培养基中进行进一步培养^[5]。目前,气管纤毛上皮类器官可以在数周内从小鼠和人类气管和上支气管分离出的基底细胞成功培养构建,同时可以对类器官的正常和组织修复状态分别进行分子生物学分析。由干细胞培养出含有2型呼吸上皮(alveolar type 2 cells/type 2 alveolar epithelial cell, AT2 / AEC2)肺泡样类器官过程中需不含有基底细胞,而研究发现通过共培养表面活性蛋白C(surfactant protein C, SFT-PC)阳性的AT2/AEC2干细胞和表达PDGF受体 α 的基质成纤维细胞有利于培养出不含基底细胞的类器官。在类器官中尚未能重现在谱系标记肺模型损伤后出现的1型呼吸上皮(alveolar type 1 cells/type 1 alveolar epithelial cell, AT1 / AEC1)祖细胞重建和AT2 / AEC2细胞扩增现象,提示这一过程可能需要某些特殊的生长因子,或需要共培养AT1 / AEC1和AT2 / AEC2祖细胞来完成^[5]。诱导多能干细胞的方法则多用于形成同时具有上皮和间质成分的肺类器官,以用于构建肺的器官发育和疾病模型,并用于探究多种生长因子信号通路^[5]。这些通过多能干细胞形成的类器官可用于在3D情况下研究上皮和间质细胞的相互作用以及研究微环境中的独立细胞^[12]。

构建具有腺癌、鳞癌和神经内分泌肿瘤特征的

肺癌类器官可以通过在培养基中添加促分裂原,如配体激活剂神经调节蛋白(neuregulin)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-酪氨酸激酶受体3(Erb-B2 receptor tyrosine kinase 3, ERBB3)或酪氨酸激酶受体2(Erb-B2 receptor tyrosine kinase 3, ERBB2)-ERBB3异二聚体来完成^[13]。充分解决了肺癌分类多,治疗方式不同的研究难题。

正常组织肺类器官可以用于构建肺癌发生模型,即通过感染原癌基因过表达互补DNA(cDNA)或shRNA(short hairpin RNA)等基因表达调控技术,在器官发育关键点诱发细胞异常增殖。利用该模型已先后证明了 β -连环蛋白(β -catenin)和Wnt信号通路在维持肺祖细胞增殖稳定性中的关键作用^[14],以及SOX2(SRY-like HMG box 2)基因和Notch通路对KRAS(KRAS proto-oncogene)基因突变2型呼吸上皮细胞腺癌发生的影响^[15]。通过该方法构建的KRAS突变肺癌类器官可用于评估多种丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)抑制剂的疗效,并与化疗药物和EGFR酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)对比,进行中通量单药及联合用药筛选^[16]。肺类器官也已被用于研究与肺癌发生发展相关的炎性反应和组织损伤反应,包括对肺纤维化^[17]、博莱霉素诱导的组织损伤的反应与上皮增殖状态相关性^[18]等。

4 肺癌类器官的临床应用

类器官作为功能学模型可以在以下场景中应用于临床:

第一,进行肿瘤药物敏感性检测。肿瘤细胞原代培养是最早以患者原始肿瘤直接构建的药物敏感性体外实验模型,用于EGFR TKI和ALK TKI耐药机制的探究^[19]。相比于原代培养,肺癌PDO是肿瘤细胞和基质细胞的混合多细胞团,可以一定程度综合微环境中的成纤维细胞对药物敏感性的影响。目前有多项研究利用小鼠移植瘤模型验证了PDO与PDX的药敏一致性,并有病例报道验证了PDO挑选的化疗、靶向药物在患者体内对原始肿瘤有效^[13, 20]。随着免疫治疗的不断发展,成纤维细胞和免疫细胞的类器官共培养成为了解癌症及其肿瘤微环境之间免疫相互作用的新方法,并将用于肺癌免

疫治疗疗效的研究。而肺类器官用于炎症反应机制的研究已发现抗白介素-6(interleukin-6, IL-6)联合顺铂作为 IL-6⁺肺癌的潜在联合用药方案^[21]。

第二,高通量药物敏感性筛选。PDO 的药物敏感性筛选可以通过在 96 孔^[22]和 384 孔^[23]板中实时观察其增殖和死亡情况^[22],同时对上百种药物进行药物敏感性的筛查。故其在药敏检测上更为高效。

第三,临床试验。肺癌类器官的临床应用尚待临床试验证实其有效性,目前欧洲有两项随机对照试验正在进行,分别对晚期肺癌的标准治疗能否在类器官中验证疗效(TUMOROID, NL49002.031.14)以及借助肺癌类器官进行终线选药的疗效(SENSOR, NL50400.031.14)进行研究。

5 肺癌类器官的局限性及展望

肺癌发病率高且其患者预期寿命有限,临床上亟需可改善其预后的转化研究,故针对肺癌的功能学临床前模型的研究十分重要。尽管类器官

模型研究正高歌猛进,但其临床应用仍受到如下制约:1)类器官培养的开销较高;2)类器官与原始肿瘤的一致性反映的是原始肿瘤的主克隆还是部分亚克隆仍待研究;3)类器官药物敏感性指标的解读仍需研究,不同作用机制的药物药敏结果如何比较尚无定论;4)类器官培养成功率仍需提高,若希望将类器官技术应用于一线选药,其培养所需时间仍需缩短。类器官虽然在诸多方面体现出优势,但由于各个模型的适用场景各异,在进行实验室研究前,权衡利弊选择合适的肿瘤功能学模型显得尤为重要。

而类器官作为对原始肿瘤模拟性好、易于扩增保存并能用于高通量药敏筛选的临床前模型成为目前肺癌转化医学中的研究热点。肺癌类器官可以用于构建肿瘤发生模型、研究病因学机制、转移线索、药敏筛选,并通过与其他细胞共培养研究肿瘤微环境,最终将会作为肺癌的个性化精准治疗的补充与现有的多组学精准医学决策体系相互补充。

参考文献:

- [1] Clevers H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165: 1586-1597.
- [2] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, *et al.* Single lgr5 stem cells build crypt villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, 2009, 459: 262.
- [3] Weeber F, Van De Wetering M, Hoogstraat M, *et al.* Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 13308-13311.
- [4] Kodack DP, Farago AF, Dastur A, *et al.* Primary patient-derived cancer cells and their potential for personalized cancer patient care[J]. *Cell Rep*, 2017, 21: 3298-3309.
- [5] Barkauskas CE, Chung MI, Fioret B, *et al.* Lung organoids: current uses and future promise [J]. *Development*, 2017, 144: 986-997.
- [6] Kopper O, De Witte CJ, Lohmussaar K, *et al.* An organoid platform for ovarian cancer captures intra-and interpatient heterogeneity [J]. *Nat Med*, 2019, 25: 838-849.
- [7] Aboulkheyr Es H, Montazeri L, Aref AR, *et al.* Personalized cancer medicine: an organoid approach[J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36: 358-371.
- [8] Praharaaj PP, Bhutia SK, Nagrath S, *et al.* Circulating tumor cell-derived organoids: current challenges and promises in medical research and precision medicine[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1869: 117-127.
- [9] Hogan BL, Barkauskas CE, Chapman HA, *et al.* Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 123-138.
- [10] Sato T, Stange DE, Ferrante M, *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141: 1762-1772.
- [11] Liu X, Krawczyk E, Supryniewicz FA, *et al.* Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens [J]. *Nature Protocols*, 2017, 12: 439.
- [12] Zepp JA, Zacharias WJ, Frank DB, *et al.* Distinct mes-

- enchymal lineages and niches promote epithelial self-renewal and myofibrogenesis in the lung [J]. *Cell*, 2017, 170: 1134-1148, e1110.
- [13] Endo H, Okami J, Okuyama H, *et al.* Spheroid culture of primary lung cancer cells with neuregulin 1/her3 pathway activation [J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8: 131-139.
- [14] Ostrin EJ, Little DR, Gerner-Mauro KN, *et al.* β -catenin maintains lung epithelial progenitors after lung specification [J]. *Development*, 2018, 145. doi: 10.1242/dev.160788.
- [15] Xu X, Huang L, Futtner C, *et al.* The cell of origin and subtype of k-ras-induced lung tumors are modified by notch and sox2 [J]. *Genes Dev*, 2014, 28: 1929-1939.
- [16] Mas C, Boda B, Caulfuty M, *et al.* Antitumour efficacy of the selumetinib and trametinib mek inhibitors in a combined human airway-tumour-stroma lung cancer model [J]. *J Biotechnol*, 2015, 205: 111-119.
- [17] Wilkinson DC, Alva-Ornelas JA, Sucre JMS, *et al.* Development of a three-dimensional bioengineering technology to generate lung tissue for personalized disease modeling [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 622-633.
- [18] Chen H, Matsumoto K, Brockway BL, *et al.* Airway epithelial progenitors are region specific and show differential responses to bleomycin-induced lung injury [J]. *Stem Cells*, 2012, 30: 1948-1960.
- [19] Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, *et al.* Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer [J]. *Science*, 2014, 346: 1480-1486.
- [20] Zhang Z, Wang H, Ding Q, *et al.* Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2018, 13: e0194016. doi: 10.1371/journal.pone.0194016.
- [21] Ogawa H, Koyanagi-Aoi M, Otani K, *et al.* Interleukin-6 blockade attenuates lung cancer tissue construction integrated by cancer stem cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 12317.
- [22] Jabs J, Zickgraf FM, Park J, *et al.* Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations [J]. *Mol Syst Biol*, 2017, 13: 955.
- [23] Hild M, Jaffe AB. Production of 3-D airway organoids from primary human airway basal cells and their use in high-throughput screening [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2016, 37. <https://doi.org/10.1002/cpsc.1>.

新闻点击

多喝咖啡肠胃更健康

最近在美国德克萨斯州圣安东尼奥市的美国胃肠病学年会上发表一项新的研究,将咖啡因的摄入与健康的肠道微生物组联系起来,研究认为多喝咖啡会对肠道微生物群有益。

在这项研究中,科学家第一次把直接来自各地的肠道微生物样品纳入结肠镜检查中(其他研究仅检查了粪便样本)。总体而言,每天喝两杯或更多杯咖啡的34位参与者表现出的肠道微生物群特征优于喝或少喝咖啡的肠道菌群。大量喝咖啡的人的细菌种类较多,并且在大肠中分布更均匀,具有更丰富的抗感染特性,并且可能不包含 *Erysipelatoclostridium*,这是一种与代谢异常和肥胖有关的细菌。

研究人员称,目前仍然不知道咖啡为什么会为肠道微生物组产生如此积极的影响,但他们认为,咖啡因可能会影响新陈代谢的细菌,反过来,细菌代谢产物再影响人的身体。

研究人员称,饮食中的高脂肪和加工食品往往会在肠道中容纳更多的内毒素,以及与肥胖、胰岛素抵抗和心血管疾病相关的“坏”细菌的有毒成分。相反,咖啡中的多酚和其他抗氧化剂(天然存在于植物性食物中的化合物)可能是提供更健康的微生物群的原因。

刘晓荻 译
薛惠文 编