

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240770

· 论 著 ·

基于人源胶质母细胞瘤的肿瘤类器官的构建及鉴定

吕宗强^{1,2}, 王洪祥¹, 孙波¹, 罗宁¹, 李荣¹, 王春琳^{2*}, 陈菊祥^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院神经外科, 上海 200433

2. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院神经外科, 合肥 230031

[摘要] **目的** 建立和鉴定成熟稳定的胶质母细胞瘤(GBM)类器官,为GBM的研究和诊治提供准确和个体化的临床前模型。**方法** 通过外科手术获得患者来源新鲜GBM组织样本,经初步处理后,利用干细胞培养基分选出胶质母细胞瘤干细胞(GSC)并对其进行鉴定。将GSC在类器官培养基中进行三维培养、传代,成功培养出GBM类器官。通过H-E染色观察GBM类器官组织学形态,通过免疫荧光染色进行干性和亲本肿瘤相似性鉴定,通过裸小鼠原位成瘤实验对其进行体内原位成瘤能力鉴定。**结果** 从9例人源GBM样本中构建了7个GBM类器官,其形态似“神经球”,平均类器官形成时间为1周。H-E染色结果显示,GBM类器官在高倍镜下的组织学形态与GBM肿瘤组织极为相似;免疫荧光染色结果表明,GBM类器官具有干性特征及组织细胞学相似性;裸小鼠原位成瘤实验结果显示,GBM类器官相比于普通GBM细胞成瘤能力更强。**结论** 本研究成功构建了人源GBM类器官,该类器官保留了原始GBM组织细胞学特征,为未来GBM的研究与诊疗提供了新的模型。

[关键词] 胶质母细胞瘤;胶质母细胞瘤干细胞;类器官;胶质母细胞瘤类器官

[引用本文] 吕宗强,王洪祥,孙波,等.基于人源胶质母细胞瘤的肿瘤类器官的构建及鉴定[J].海军军医大学学报,2025,46(5):577-585. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240770.

Construction and identification of tumor organoids derived from human glioblastoma

LÜ Zongqiang^{1,2}, WANG Hongxiang¹, SUN Bo¹, LUO Ning¹, LI Rong¹, WANG Chunlin^{2*}, CHEN Juxiang^{1*}

1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Neurosurgery, No. 901 Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Hefei 230031, Anhui, China

[Abstract] **Objective** To establish and verify a mature and stable glioblastoma (GBM) organoid model, so as to provide an accurate and personalized preclinical model for the research and treatment of GBM. **Methods** Fresh GBM tissues obtained through surgical procedures were initially processed, and then GBM stem cells (GSCs) were isolated using stem cell culture medium and were identified. Subsequently, GSCs were cultured in organoid culture medium for 3D cultivation, and GBM organoids were successfully obtained. The histological morphology of GBM organoids was observed by hematoxylin-eosin (H-E) staining; the stemness and similarity to the parental tumor were identified by immunofluorescence staining; and the *in vivo* tumorigenic ability of GBM organoids was identified by orthotopic tumorigenesis experiments in nude mice. **Results** A total of 7 GBM organoids were constructed from 9 human GBM samples, with a morphology resembling “neurosphere”, and the average duration for organoid formation was 1 week. H-E staining results showed that the histological morphology of GBM organoids under high-power microscope was very similar to that of GBM tumor tissues; immunofluorescence staining results indicated that the GBM organoids possessed stemness characteristics and histological cellular similarity; and GBM organoids had a stronger tumorigenic ability compared to ordinary GBM cells in nude mice. **Conclusion** This study presents a stable and reliable method for constructing GBM organoids retaining the histological characteristics of the original GBM tissue, which providing new insights for future GBM research and clinical practice.

[Key words] glioblastoma; glioblastoma stem cells; organoids; glioblastoma organoids

[收稿日期] 2024-11-13 [接受日期] 2025-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金(82272715, 82272904),上海市科学技术委员会科研项目(19JC1415000)。Supported by National Natural Science Foundation of China (82272715, 82272904) and Science Research Project of Science and Technology Committee of Shanghai Municipality (19JC1415000)。

[作者简介] 吕宗强, 硕士生, 主治医师。E-mail: lzqfmmu@163.com

*通信作者(Corresponding authors)。E-mail: sprlin1105@126.com, juxiangchen@126.com

[Citation] LÜ Z, WANG H, SUN B, et al. Construction and identification of tumor organoids derived from human glioblastoma[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(5): 577-585. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240770.

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是中枢神经系统中最常见的原发性恶性肿瘤, 侵袭性强、复发率高, 预后差, 中位生存期仅为 14~16 个月, 其治疗方法主要包括传统的手术切除、放疗、化疗及新兴的靶向治疗和免疫治疗, 但作用有限, 目前仍无理想的治疗手段^[1-2]。近年研究表明, GBM 在遗传、表型和微环境方面表现出高度的异质性, 导致 GBM 对治疗反应不一致, 这可能是大量 GBM 临床试验失败的重要原因^[3-4]。如何针对肿瘤的异质性进行表征并开发出与其相适应的模型, 以便及时对 GBM 患者进行个体化诊疗, 仍然是一个巨大的挑战。

类器官 (organoid) 是一种体外培养的三维细胞结构, 它们由干细胞或祖细胞衍生而来, 能够在一定程度上模拟原发器官的组织结构和功能^[5]。胶质母细胞瘤干细胞 (glioblastoma stem cell, GSC) 是 GBM 中具有干细胞特性的肿瘤细胞群体, 这些细胞在肿瘤的发生、发展、侵袭、复发和治疗抵抗性中扮演着关键角色^[6]。已有研究以肿瘤干细胞为种子细胞进行体外三维培养以获得肿瘤类器官^[7]。肿瘤类器官是从肿瘤细胞或癌症患者的组织样本中培养而来的一种特殊类型类器官, 近年来相关研究取得了显著进展, 极大地推动了人们对肿瘤生物学的理解和认识, 肿瘤类器官模型已经成为研究肿瘤生物学、药物反应和肿瘤微环境相互作用的重要工具^[8-9]。然而 GBM 类器官由于组织来源少、异质性高、培养困难等原因, 目前研究较少, 且未进行 GSC 的提取培养及鉴定, 不能很好地还原亲本肿瘤特性^[10-11]。本研究首先从人源 GBM 组织中分离培养出 GSC, 再以 GSC 为种子细胞构建 GBM 类器官模型, 该模型制备方法简便易行, 适合高通量大规模实验, 同时能够更好地模拟体内 GBM 的异质性及复杂性, 为研究 GBM 的生物学特性提供了一个更真实的模型。

1 材料和方法

1.1 组织标本与试剂 人源 GBM 标本来自 2022—2024 年海军军医大学第一附属医院神经外科收治

的 21 例行手术治疗并经术后病理证实为 WHO IV 级 GBM 患者, 其中男 13 例、女 8 例, 年龄 51~76 岁, 中位年龄 64 岁。纳入标准: (1) 经病理确诊的 WHO IV 级 GBM; (2) 术前未接受放疗或化疗; (3) 肿瘤组织样本完整性符合实验要求; (4) 具有完整临床随访资料。本研究已通过海军军医大学伦理委员会审批 (CHEC2022-032), 所有患者及其家属均签署知情同意书。

人恶性胶质瘤细胞系 U87 购自中国科学院细胞库 (上海), 细胞以含青霉素 G (100 U/mL)、链霉素 (100 mg/mL) 和 8% FBS 的 DMEM 培养, 并置于 37 °C 恒温、含 5% CO₂ 的湿空气的细胞培养箱中培养。SPF 级雌性裸小鼠由上海市肺科医院 SPF 级动物实验室 [动物生产许可证号: SCXK (沪) 2022-0011] 提供。细胞培养皿/板为美国 Thermo 公司产品; 青霉素/链霉素双抗 (货号 15140-122)、DMEM/F12 培养基 (货号 11330032)、Hank 平衡盐溶液 (货号 14175095)、干细胞培养添加因子 N2 (货号 A130701)、干细胞培养添加因子 B27 (货号 17504044)、层粘连蛋白 (货号 1925916) 购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶-EDTA 溶液 (TrypLE, 货号 T4049)、Y-27632 二盐酸盐 (货号 129830-38-2)、多聚赖氨酸 (货号 P1399)、中性蛋白酶 dispase II (货号 D4693) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) (货号 C046)、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (货号 C029) 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 肝素钠 (货号 1170GR005) 购自德国 BioFroxx 公司; 低生长因子型基底膜基质胶 (货号 356231) 购自美国 Corning 公司; CD133 抗体 (货号 ab16518)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (货号 ab33922)、巢蛋白 (nestin) 抗体 (货号 ab11306) 购自英国 Abcam 公司, 性别决定区 Y 框蛋白 2 (sex determining region Y box protein 2, SOX2) 抗体 (货号 66411-1-Ig)、 β III 微管蛋白 (class III β -tubulin, TUJ1) 抗体 (货号

10094-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; 其他试剂和耗材均购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 试剂配制 (1) dispase II: 用生理盐水溶解 dispase II 粉末, 终浓度为 75 U/mL, 分装至 0.5 mL 离心管中, -80°C 保存备用, 使用前在 4°C 下融化, 按照 1 : 50 比例添加于无血清培养基中。

(2) 干细胞 DMEM/F12 培养基: 将干细胞添加剂 N2 和 B27 自 -20°C 取出, 在 37°C 水浴解冻后, 添加于 DMEM/F12 培养基中, N2 和 B27 终浓度分别为 1% 和 2%, 同时以 1% 的比例添加青霉素/链霉素双抗, 分装至 50 mL 离心管中, 4°C 保存备用。干细胞因子 FGF、EGF 和肝素钠在使用前按照 1 : 2 500 现用现加。(3) 类器官培养基: 在干细胞 DMEM/F12 培养基的基础上按照 10 nmol/L 的浓度添加 Y-27632 二盐酸盐, 现用现加。

1.3 样本处理与类器官培养、传代、冻存与复苏

1.3.1 原代 GSC 提取、培养 将手术获取的新鲜 GBM 组织浸泡在 4°C 预冷的 DMEM/F12 无血清培养基中, 置于冰盒中, 2 h 内送至实验室。用含青霉素/链霉素双抗的 Hank 平衡盐溶液洗涤肿瘤组织 2 次, 用灭菌的显微镊和眼科剪剔除坏死组织和明显的血管; 用剪刀剪碎组织, 用注射器注射柄研磨组织碎块至匀浆后, 加入 37°C 预热的含 dispase II 的 DMEM/F12 无血清培养基, 37°C 消化 20~30 min, 适当摇晃使组织消化充分并呈匀浆状均匀散开; 预先用 PBS 润洗 200 目滤网, 在消化的组织匀浆中加入等体积 DMEM/DF12 培养基, 将悬液滤过 200 目滤网, 将滤液离心(若红细胞数量较多, 可酌情加入 1 mL 红细胞裂解液, 室温裂解 1 min), 离心后用适量干细胞 DMEM/F12 培养基重悬, 铺至胶原蛋白包被过的 6 孔板中培养。培养过程中, 前 48 h 不进行换液, 第 3~4 天可补加 1 mL 干细胞 DMEM/F12 培养基, 或收集细胞后用新鲜干细胞 DMEM/F12 培养基重悬, 重新添加回孔内继续培养。

1.3.2 类器官培养 在 24 孔板中央呈水滴状注入 40 μL 低生长因子型基底膜基质胶; 将细胞重悬后计数, 制备成 2 000 个/ μL 的细胞悬液, 在基质胶未凝固前将细胞悬液按照每孔 20 000 个细胞(10 μL) 注入基质胶内; 将 24 孔板小心翻转后在 5% CO_2 、 37°C 的细胞培养箱内倒置 15~30 min, 使基质胶固化。用枪头小心挑起固化的基质胶(防

止基质胶黏附在培养板底面), 在孔内小心加入 500 μL 类器官培养基, 之后每 2~3 d 更换 1 次类器官培养基直至第 7 天; 随后的培养使用不含 Y-27632 二盐酸盐的干细胞 DMEM/F12 培养基。

1.3.3 类器官传代 收集培养基中的类器官至 15 mL 离心管, 加 0.5 mL TrypLE 在 37°C 下消化 5 min(放置摇床上), 用 5 mL 含 5% FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化, 4°C 、 $200\times g$ 离心 5 min。加入 80 μL 基质胶重悬沉淀, 按 40 μL /孔加入 24 孔板中(即 1 : 2 传代)。将 24 孔板倒置放入培养箱中 15 min 使基质胶固化。每孔加入 500 μL 预热的类器官培养基, 放入培养箱中继续培养, 每 2~3 d 更换类器官培养基直至第 7 天; 随后的培养使用不含 Y-27632 二盐酸盐的干细胞 DMEM/F12 培养基。

1.3.4 类器官冻存与复苏 吸去孔内培养基, 用 1 mL 枪头吸取 1 mL TrypLE(含 10 nmol/L Y-27632 二盐酸盐)重悬基质胶。将悬液转移至 15 mL 离心管中, 37°C 孵育 5~10 min(可在孵育后用 1 mL 枪头吹打类器官将其吹散), 添加 10 mL 4°C 低温类器官培养基, 4°C 、 $200\times g$ 离心 5 min。每个来自于 24 孔板培养的类器官用 500 μL 冻存液重悬, 转移至冻存管, 存放于 -80°C (最长 1 个月), 存放超过 1 个月者转移至液氮罐。复苏时, 用 37°C 水浴解冻, 将冻存管中的悬液转移至 15 mL 离心管中, 并添加类器官培养基, 4°C 、 $200\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用适量基质胶重悬。

1.4 GBM 类器官形态观察及常规 H-E 染色 于培养的不同时间点于倒置显微镜下观察类器官的形态并拍照。对已经培养成功的类器官, 吸去培养基, 加入 PBS 浸洗 1~2 次, 每次 5 min; 加入 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 弃多聚甲醛, 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min; 分别经 70% 乙醇 3 min、85% 乙醇 3 min、95% 乙醇 3 min、无水乙醇 3 min 进行脱水处理, 二甲苯 10 min 进行透明处理, 移入石蜡液中浸蜡处理与包埋; 以 4 mm 厚度进行切片, 将蜡片贴附于载玻片上, 在 45°C 烘箱中烤片 30 min; 干燥后的切片分别经二甲苯(I) 10 min、二甲苯(II) 10 min、二甲苯(III) 10 min 进行脱蜡处理, 无水乙醇 3 min、95% 乙醇 3 min、85% 乙醇 3 min、70% 乙醇 3 min、蒸馏水 3 min 进行水化处理, 苏木精染色 5 min, 流水冲洗 5 min, 1% 盐酸

乙醇洗 30 s, 水洗 30 s, 蒸馏水过洗 5 s, 0.5% 伊红液染色 1~3 min; 切片依次经蒸馏水 3 min、70% 乙醇 3 min、85% 乙醇 3 min、95% 乙醇 3 min、无水乙醇 3 min 进行脱水处理, 二甲苯 10 min 进行透明处理, 中性树胶封固。

1.5 免疫荧光染色鉴定 GSC、GBM 类器官的干性及诱导分化能力 对成功提取并培养成功的 GSC, 吸去细胞培养基, 加入 PBS 浸洗 1~2 次, 每次 5 min; 加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 弃多聚甲醛, 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min; 加入 0.5% Triton-100 室温孵育 20 min 打孔, 弃 Triton-100, PBS 浸洗 3 次; 用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h, 吸去封闭液, 加入合适浓度的一抗 (SOX2、CD133、nestin、TUJ1、GFAP 抗体), 4 °C 湿盒孵育过夜, 吸去一抗后用 PBS 室温浸洗 3 次, 每次 5 min; 滴加荧光二抗, 室温避光孵育 1 h, 用 PBS 浸洗 3 次; 滴加 DAPI 复染细胞核, 避光孵育 20 min, 用 PBS 室温轻柔浸洗细胞 3 次, 每次 5 min; 洗去多余的 DAPI, 用 PBS 浸润后在荧光显微镜下观察、拍照。GBM 类器官免疫荧光染色方法同上, 其中一抗为 SOX2、CD133、nestin、GFAP、Ki-67、caspase 3 抗体。

1.6 GBM 类器官裸小鼠原位成瘤实验 为了鉴定 GBM 类器官的体内成瘤能力, 选择 7 周龄 SPF 级雌性裸小鼠进行颅内原位成瘤实验。将 2 株培养至稳定状态的 GBM 类器官 (12#、17#) 消化后计数细胞, 用 PBS 和高浓度基质胶等比例混合后制备成 1×10^5 个/ μL 的细胞悬液置于冰上备用, 使用同样的方法配制浓度为 1×10^5 个/ μL 的 U87 细胞系悬液作为对照。动物实验分 6 组, 分别使用 U87 细胞系、12# 类器官和 17# 类器官进行颅内原位成瘤实验, 每种肿瘤细胞设置 2 个细胞接种剂量, 分别为 2.5×10^5 个/只和 5×10^5 个/只。称量裸小鼠, 用 3% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 腹腔注射麻醉裸小鼠。待麻醉成功后, 用手术刀片纵行切开裸小鼠正中头部皮肤, 暴露出颅骨, 用棉签蘸取少量双氧水摩擦颅骨表面, 清晰暴露前囟, 以前囟骨性标志交叉点为中心, 靠前 1 mm、靠外侧 2 mm 作为注射点, 利用 5 mL 针头在该点打孔。

将裸小鼠固定在脑立体定位仪上, 利用微量注射器按照分组要求吸取相应注射量的混合了高浓度基质胶的细胞悬液, 固定好进针位置后, 利用脑立

体定位仪从钻孔处垂直进针 3.5 mm (该定位点即为成瘤位点, 位于裸小鼠的杏仁核处), 细胞悬液利用 1 min 时间缓慢推入。注射完毕后停留 30 s, 回抽微量注射器, 缝合头皮。定期观察裸小鼠精神、饮食、活动情况。30 d 后处死裸小鼠, 取大脑浸泡于 4% 多聚甲醛中固定, 进行切片及常规 H-E 染色, 观察成瘤情况。

2 结果

2.1 原代 GSC 鉴定 从 21 例新鲜获取的人源 GBM 标本经过初步处理、在干细胞培养基中进行培养及传代后, 得到了 9 株可以稳定培养及传代的 GSC, 其形态不完全相同, 从细胞层面体现了 GBM 的异质性 (图 1)。选取其中 3 株 GSC 进行 SOX2 (神经干细胞标志物)、GFAP (活化星形胶质细胞标志物) 和 CD133 (肿瘤干细胞特异性标志物) 免疫荧光染色, 结果显示这些标志物均呈阳性表达 (图 2)。以上结果表明所得到的细胞具有肿瘤干细胞特性, 可以判定为 GSC。

2.2 GSC 经三维培养形成 GBM 类器官 将筛选培养出的 GSC 使用特殊的无血清培养基在基质胶中进行三维培养, 分别于培养第 4、14、21 天在倒置显微镜下观察 GBM 类器官形态, 结果显示, GBM 类器官在培养 1 周内即开始呈球形生长, 形态似“神经球” (图 3A)。本研究从人源肿瘤标本中提取到的 9 株稳定培养及传代的 GSC 利用三维培养技术成功制备了 7 个 GBM 类器官, 培养成功率为 77.8%, 类器官形成时间平均为 1 周, 形成的类器官可以传代 (图 3B)、冷冻保存和复苏。对培养至第 8 周的 GBM 类器官行固定、石蜡包埋切片及常规 H-E 染色, 结果显示, GBM 类器官在高倍镜下的组织学形态与 GBM 肿瘤组织极为相似 (图 4)。

2.3 GBM 类器官与亲本肿瘤的组织细胞学相似性 GBM 类器官由肿瘤干细胞培养而来, 应当能够模拟原始肿瘤的组织结构和功能, 包括维持肿瘤细胞在体内的特征, 如肿瘤干细胞的特性。对固定后的 GBM 类器官进行 SOX2、CD133 及 nestin 免疫荧光染色, 结果显示, 在 GBM 类器官中心及边缘都可检测到 SOX2、CD133 及 nestin 的表达 (图 5), 说明培养出的 GBM 类器官具有干性特征。

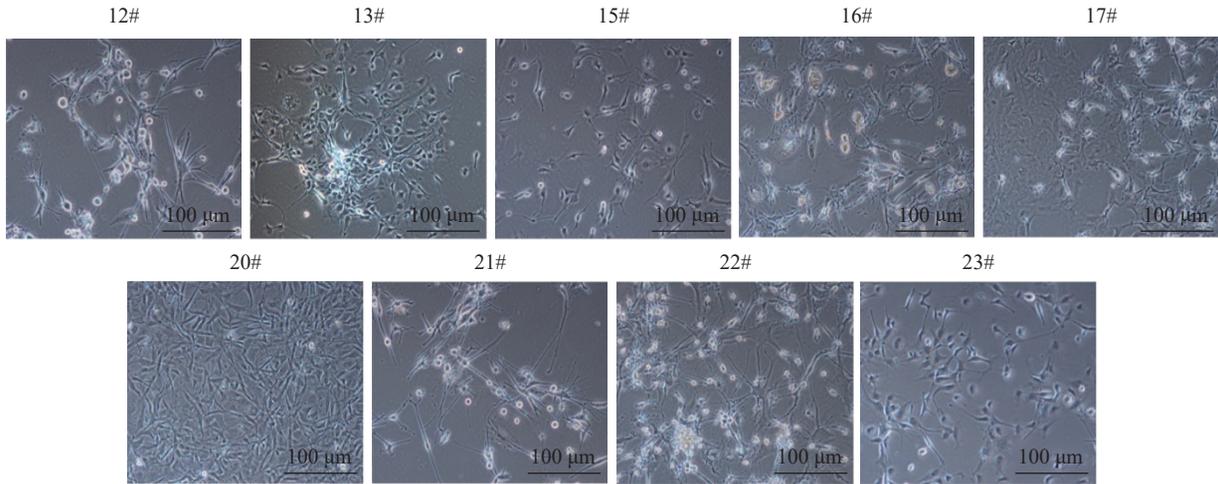


图 1 从不同人源 GBM 标本培养筛选出的 9 株稳定状态下的 GSC

Fig 1 Nine stable GSC lines derived from different patient-derived GBM specimens

GBM: Glioblastoma; GSC: Glioblastoma stem cell.

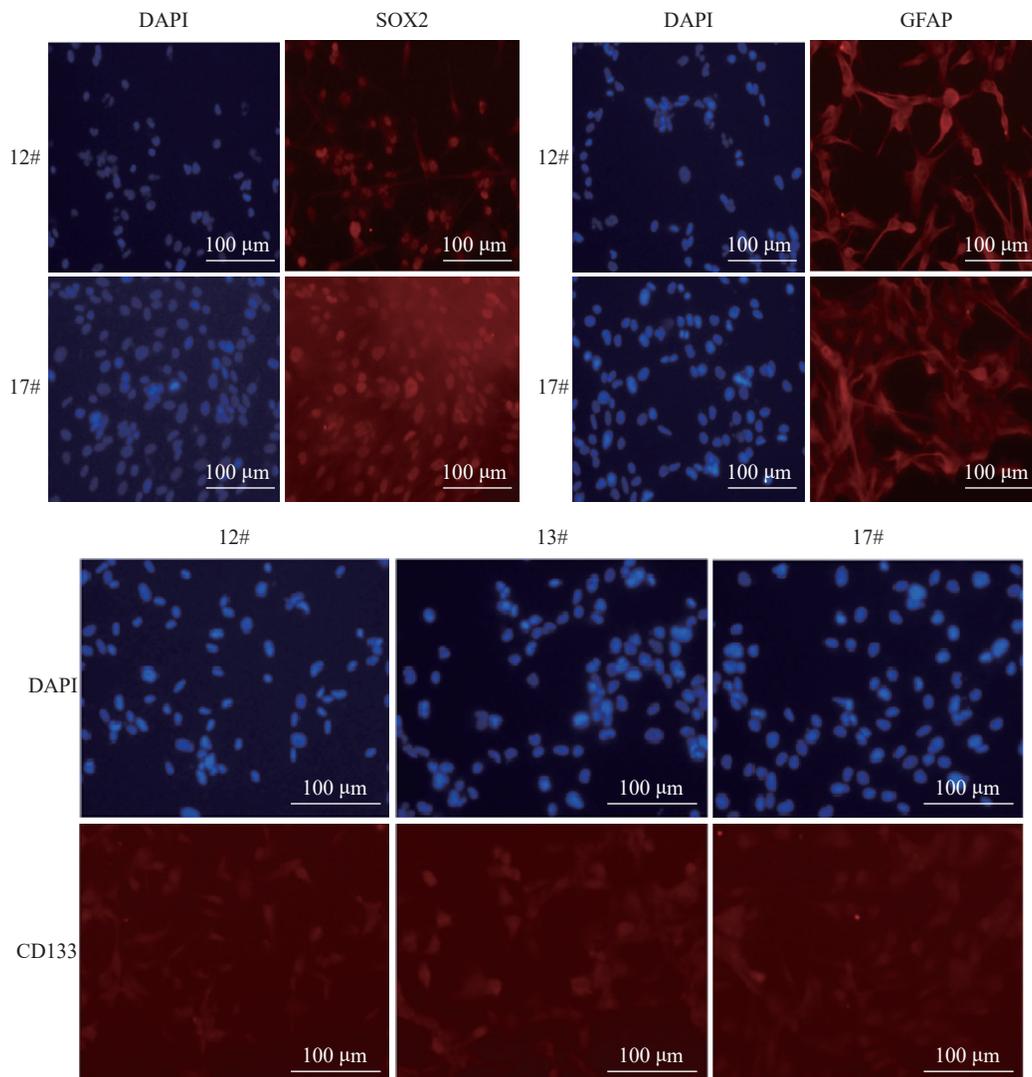


图 2 人源 GBM 标本培养出的 GSC 免疫荧光染色

Fig 2 Immunofluorescence staining of GSC lines cultured from human GBM specimens

GFAP is a glioma cell marker, and SOX2 and CD133 are tumor stem cell-specific markers. GBM: Glioblastoma; GSC: Glioblastoma stem cell; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; SOX2: Sex determining region Y box protein 2; GFAP: Glial fibrillary acidic protein.

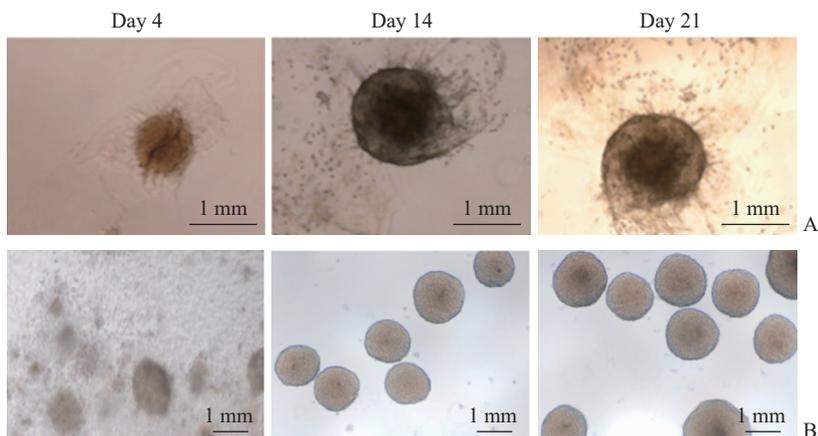


图3 GBM类器官培养及传代形态特征

Fig 3 Morphological characteristics of GBM organoid culture and passage

A: Primary organoids; B: Passaging organoids. GBM: Glioblastoma.

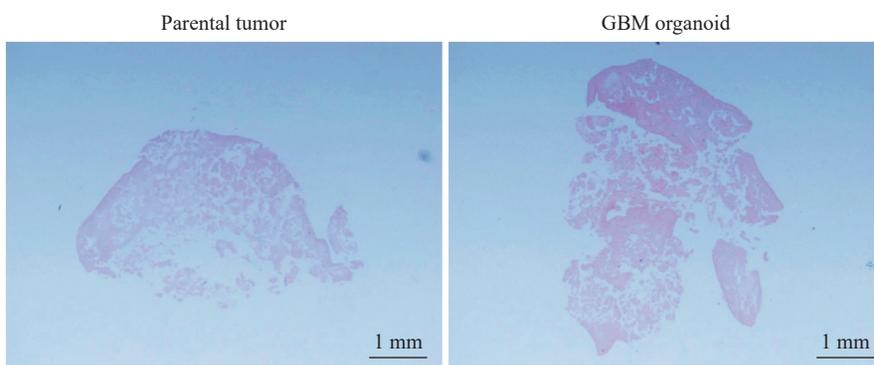


图4 亲本肿瘤与第8周的GBM类器官组织学形态对比

Fig 4 Histological morphology of parental tumor tissue and GBM organoids at week 8

Hematoxylin-eosin staining. GBM: Glioblastoma.

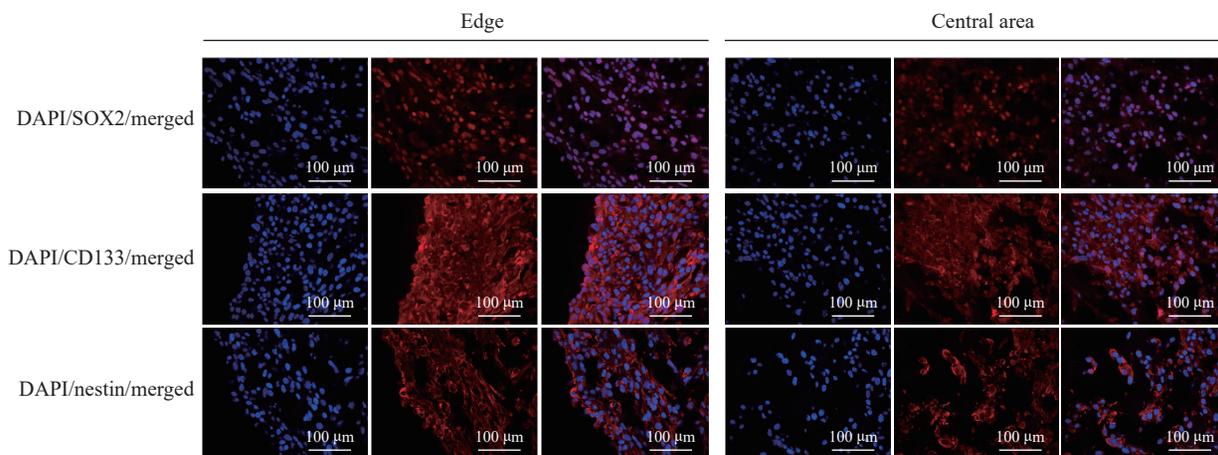


图5 GBM类器官边缘及中心SOX2、CD133、nestin免疫荧光染色图

Fig 5 Immunofluorescence staining of SOX2, CD133 and nestin at the edge and central area of GBM organoids

SOX2, CD133, and nestin are neural and glioma stem cell markers. GBM: Glioblastoma; SOX2: Sex determining region Y box protein 2; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

为了进一步了解GBM类器官内部增殖与凋亡分布特征,本研究分别从GBM类器官边缘及中心取材进行Ki-67、GFAP、caspase 3免疫荧光染色,

结果显示Ki-67和GFAP在GBM类器官边缘表达较多、中心区域表达较少,caspase 3在类器官边缘表达较少、中心区域表达较多(图6),这与体内

GBM 组织中观察到的现象一致,即 Ki-67 和 GFAP 在肿瘤边缘高表达、肿瘤中心表达相对较低,

而 caspase 3 在肿瘤边缘表达较少、肿瘤中心表达较多^[12-14]。

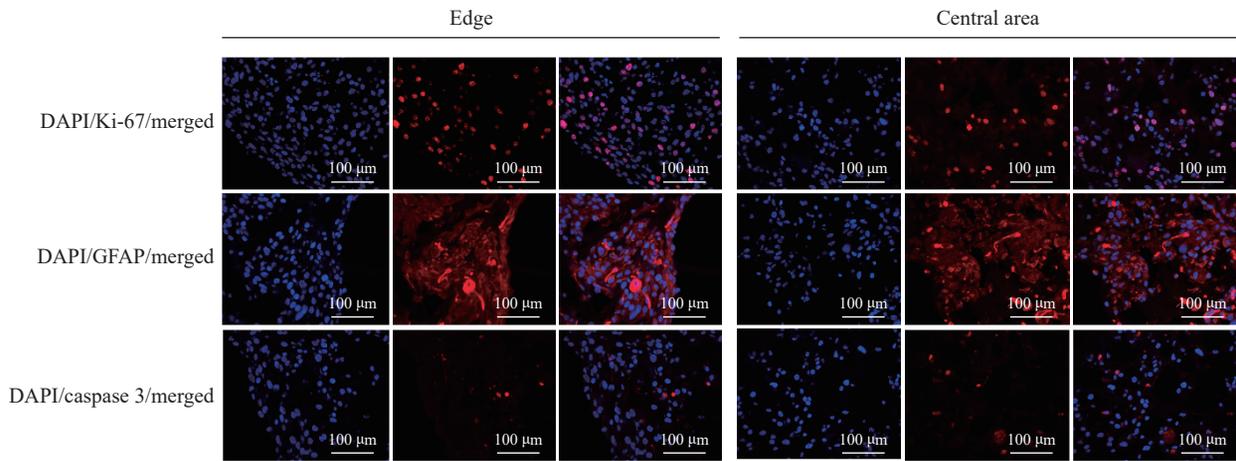


图 6 GBM 类器官边缘及中心区域 Ki-67、GFAP、caspase 3 免疫荧光染色

Fig 6 Immunofluorescence staining of Ki-67, GFAP and caspase 3 at the edge and central area of GBM organoids. Ki-67 is a cell proliferation marker, GFAP is an activated astrocyte marker, and caspase 3 is a cell apoptosis marker. GBM: Glioblastoma; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; caspase 3: Cysteine aspartic acid specific protease 3; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.4 GBM 类器官体内成瘤能力鉴定 采用裸小鼠原位成瘤实验观察 GBM 类器官体内成瘤能力,结果显示注射 GBM 类器官细胞悬液 30 d 后,裸小鼠均出现消瘦、行走不稳等症状。处死裸小鼠后将大脑完整取出、固定,石蜡包埋后切片并行常规 H-E 染色,结果提示 2.5×10^5 和 5×10^5 个/只剂量的

GBM 类器官细胞悬液均可以原位形成肿瘤(图 7);与 U87 细胞系相比,数量相同的 GBM 类器官细胞悬液在裸小鼠体内形成的肿瘤体积更大,说明相比于肿瘤细胞系,GBM 类器官在异种移植动物体内能更好地浸润与生长,体内成瘤能力更强。

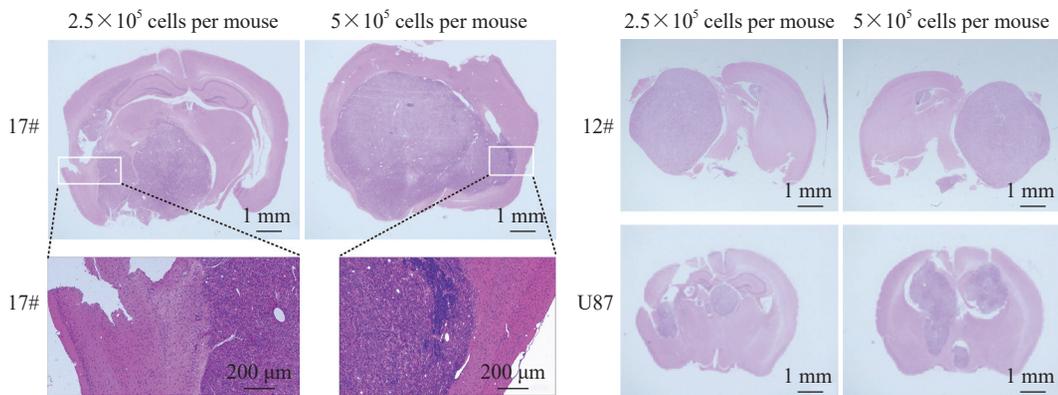


图 7 GBM 类器官裸小鼠原位成瘤实验结果

Fig 7 Orthotopic tumorigenesis of GBM organoids in nude mice

Compared with tumor cell line U87, tumor organoids show stronger tumor-forming ability *in vivo*. Hematoxylin-eosin staining. GBM: Glioblastoma.

3 讨论

脑胶质瘤模型能够在人体外或动物体内模拟脑胶质瘤的发生和发展过程,在脑胶质瘤基础和临床研究中应用广泛。传统的细胞模型和动物移植模

型简便易行、技术成熟,在脑胶质瘤研究中的地位和作用在未来一段时间内仍不可取代,但传统的研究模型如二维细胞培养、人源肿瘤细胞异种移植(patient-derived xenografts, PDX)等培养条件与人体差异较大,无法模拟脑胶质瘤的真实生物学特

性,也丧失了异质性,其局限性越来越成为脑胶质瘤研究的阻碍。

肿瘤类器官模型能够克服传统细胞模型的局限性,在基因药物相关性研究、抗癌药物筛选、预测新药物疗效及癌症个体化治疗等方面具有巨大潜力^[15]。GBM治疗难度大、预后差,然而目前肿瘤类器官模型在GBM方面的研究与实际应用还很少,其关键在于如何培养更成熟的GBM类器官模型。本研究利用来源于GBM患者的肿瘤手术标本提取到GSC,并以GSC为种子细胞在体外三维培养条件下成功构建出GBM类器官,通过H-E染色对比GBM类器官与原GBM肿瘤的组织学形态,发现两者组织学形态相似;通过免疫荧光染色检测GBM类器官SOX2、CD133、nestin表达情况,发现GBM类器官具有干性和诱导分化能力;通过免疫荧光染色检测GBM类器官Ki-67、GFAP、caspase 3表达情况,发现GBM类器官具有与体内GBM组织类似的增殖与凋亡分布特征;通过裸小鼠原位成瘤实验证实了GBM类器官具备比传统肿瘤细胞系更强的体内原位成瘤能力。

本研究提出的GBM类器官构建方法与目前存在的肿瘤类器官构建方式在多个方面存在显著的不同,具有以下优势:(1)患者源性GSC的直接应用与三维培养环境的模拟。现有的肿瘤类器官构建方法多采用患者来源普通肿瘤细胞、肿瘤细胞系或多能干细胞诱导生成的肿瘤细胞等细胞来源^[16-18],本研究直接从患者手术标本中分离出GSC,GSC的自我更新能力和多向分化潜能使构建的GBM类器官能够更真实地模拟原始肿瘤的异质性和微环境,这种高度的相似性为研究GBM的复杂生物学行为提供了一个更为精确的模型。另外,GSC在GBM的治疗抵抗性中起着核心作用^[6,19],使用GSC构建的类器官可以更深入地研究治疗抵抗性的机制,并开发新的治疗策略。(2)高通量和大规模制备的可行性。本研究的构建方法简便易行,适合高通量大规模实验,同时保持了较高的成功率和可重复性。这一点对于药物筛选和个体化治疗策略的开发尤为重要。(3)长期稳定性和可复苏性。本研究的构建方法允许GBM类器官进行长期冷冻保存和复苏,这意味着可以构建一个可复苏利用的GBM类器官样本库。这种长期稳定性和可复苏性为未来的研究和临床应用提供了宝贵的资源。

本研究还存在一定的局限性,今后需要进一步完善和探索。(1)培养条件的优化。类器官的培养需要特定的生长因子和激素,以及特殊的生

长环境,这使得目前培养成本仍较高。此外,类器官的培养条件可能影响其表型和功能,需进一步优化培养条件以提高模型的稳定性和可重复性。

(2)肿瘤微环境的模拟。尽管本研究构建的GBM类器官能够保留原始肿瘤的异质性和部分组织生物学特征,重现了GBM组织增殖与凋亡分布特征,但未能对缺氧环境、酸性/碱性环境等微环境特征进行检测。更重要的是,仍缺乏重要的肿瘤微环境,如肿瘤代谢、血脑屏障、血肿瘤屏障、脑-肿瘤屏障、免疫微环境、细胞外基质等^[15],有待后续进一步拓展研究,以更好、更全面地模拟GBM的微环境。(3)基因组稳定性。虽然类器官在短期内能够保持基因组的稳定性,但在长期培养中可能会出现新的突变或选择性扩增,这可能影响模型的准确性。(4)GBM生物学特性。本研究只进行了U87细胞系与GBM类器官体内成瘤能力的对比实验,并未进行原代GBM细胞与GBM类器官成瘤能力的对比,原代GBM细胞与GBM类器官成瘤能力的对比将有助于直接评估类器官模型的临床相关性,并更全面地理解其在模拟GBM生物学行为方面的能力,我们将在后续研究计划中增加该部分研究内容。(5)个体化诊疗探索。本研究没有使用抗肿瘤药物进行药物敏感性试验,基于肿瘤类器官的个体化诊疗策略的探索还比较少,在下一步的工作中可以进行转录组测序、全外显子组测序、单细胞测序,以及对不同抗肿瘤药物敏感性甚至嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)免疫疗法、肿瘤免疫治疗及放化疗的效果评估,从而真正实现临床获益。

肿瘤类器官研究目前仍处于初期发展阶段,未来的研究需要整合肿瘤微环境中的细胞成分和物理化学因素,如血管系统、免疫系统、细胞外基质、电刺激、力学刺激等,提升其结构复杂性和功能完整性。基于微流体技术的器官芯片(organs-on-a-chip)模型为解决这个问题提供了一种可能的思路,器官芯片通过微流控模拟人体器官的结构和功能,使用微芯片和生物学元件的组合来复制生物体内器官的微环境,提供一个更接近人体生理和病理状态的模型^[20]。肿瘤类器官芯片可以集成多种细胞类型和组织界面,如脉管系统、细胞外基质、免疫系统、血脑屏障等,模拟肿瘤的微环境以及肿瘤的侵袭和转移行为,使肿瘤类器官模型更加完善,为深入理解肿瘤的生理病理特征提供独特的见解^[21]。随着技术的不断进步,肿瘤类器官芯片有望与生物三维打印、生物材料、人工智能及基因编

辑等其他先进技术有效集成^[9,22-23],进一步提高类器官模型的准确性和复杂性,拓展其在肿瘤领域的应用。相信在不久的将来,GBM类器官模型的发展和應用将进一步延长GBM患者的生存期甚至攻克GBM作出重要贡献。

[参考文献]

- [1] TAN A C, ASHLEY D M, LÓPEZ G Y, et al. Management of glioblastoma: state of the art and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(4): 299-312. DOI: 10.3322/caac.21613.
- [2] WU W, KLOCKOW J L, ZHANG M, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): an overview of current therapies and mechanisms of resistance[J]. Pharmacol Res, 2021, 171: 105780. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105780.
- [3] EISENBARTH D, WANG Y A. Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution[J]. Oncogene, 2023, 42(27): 2155-2165. DOI: 10.1038/s41388-023-02738-y.
- [4] TIROSH I, SUVÀ M L. Tackling the many facets of glioblastoma heterogeneity[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(3): 303-304. DOI: 10.1016/j.stem.2020.02.005.
- [5] ZHAO Z, CHEN X, DOWBAJ A M, et al. Organoids[J]. Nat Rev Methods Primers, 2022, 2: 94. DOI: 10.1038/s43586-022-00174-y.
- [6] WANG Z, ZHANG H, XU S, et al. The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 124. DOI: 10.1038/s41392-021-00491-w.
- [7] TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology[J]. Science, 2019, 364(6444): 952-955. DOI: 10.1126/science.aaw6985.
- [8] VENINGA V, VOEST E E. Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine[J]. Cancer Cell, 2021, 39(9): 1190-1201. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.07.020.
- [9] QU J, KALYANI F S, LIU L, et al. Tumor organoids: synergistic applications, current challenges, and future prospects in cancer therapy[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(12): 1331-1353. DOI: 10.1002/cac2.12224.
- [10] 赖名耀,李少群,李新晨,等.患者肿瘤组织来源的胶质母细胞瘤类器官的制备方法[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2022,29(7):659-664. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.008.
- [11] JACOB F, SALINAS R D, ZHANG D Y, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity[J]. Cell, 2020, 180(1): 188-204.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.036.
- [12] DAHLROT R H, BANGSØ J A, PETERSEN J K, et al. Prognostic role of Ki-67 in glioblastomas excluding contribution from non-neoplastic cells[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 17918. DOI: 10.1038/s41598-021-95958-9.
- [13] VAN BODEGRAVEN E J, VAN ASPEREN J V, ROBE P A J, et al. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma[J]. Glia, 2019, 67(8): 1417-1433. DOI: 10.1002/glia.23594.
- [14] FENG X, YU Y, HE S, et al. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism[J]. Cancer Lett, 2017, 385: 12-20. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.10.042.
- [15] NEAL J T, LI X, ZHU J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. Cell, 2018, 175(7): 1972-1988.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.021.
- [16] 刘二冬,侯明慧,王向,等.携带TP53和ERBB2基因突变的肝细胞癌类器官的培养及药物敏感性鉴定[J].海军军医大学学报,2022,43(6):597-603. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20211266.
LIU E D, HOU M H, WANG X, et al. Culture and drug sensitivity identification of a hepatocellular carcinoma organoid with TP53 and ERBB2 mutations[J]. Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(6): 597-603. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20211266.
- [17] SEINO T, KAWASAKI S, SHIMOKAWA M, et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(3): 454-467.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.12.009.
- [18] KÜSTERMANN C, NARBUTE K, MOVČANA V, et al. iPSC-derived lung and lung cancer organoid model to evaluate cisplatin encapsulated autologous iPSC-derived mesenchymal stromal cell-isolated extracellular vesicles[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 246. DOI: 10.1186/s13287-024-03862-6.
- [19] LI Y, WANG Z, AJANI J A, et al. Drug resistance and cancer stem cells[J]. Cell Commun Signal, 2021, 19(1): 19. DOI: 10.1186/s12964-020-00627-5.
- [20] VUNJAK-NOVAKOVIC G, RONALDSON-BOUCHARD K, RADISIC M. Organs-on-a-chip models for biological research[J]. Cell, 2021, 184(18): 4597-4611. DOI: 10.1016/j.cell.2021.08.005.
- [21] SUN W, LUO Z, LEE J, et al. Organ-on-a-chip for cancer and immune organs modeling[J]. Adv Healthc Mater, 2019, 8(4): 1801363. DOI: 10.1002/adhm.201801363.
- [22] CHEN H, CHENG Y, WANG X, et al. 3D printed *in vitro* tumor tissue model of colorectal cancer[J]. Theranostics, 2020, 10(26): 12127-12143. DOI: 10.7150/thno.52450.
- [23] LEE R Y, WU Y, GOH D, et al. Application of artificial intelligence to *in vitro* tumor modeling and characterization of the tumor microenvironment[J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12(14): e2202457. DOI: 10.1002/adhm.202202457.