



· 综 述 ·

# 人源胰腺癌类器官模型的构建及应用新进展

陈 虹<sup>1, 2, 3</sup>, 曹治云<sup>1, 2, 3</sup>

1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;
2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122;
3. 福建省高校中西医结合基础重点实验室, 福建 福州 350122

[摘要] 胰腺癌严重威胁人类健康, 其高度异质性和恶性表型使患者的5年生存率仅为7.2%。胰腺癌的发病机制及药物开发研究常依赖于传统的二维培养模型(细胞系)和患者来源异种移植瘤模型, 但因细胞系缺乏肿瘤的三维环境和异质性特征, 而异种移植瘤模型则存在培养时间长、成功率低、难以开展高通量药物筛选等问题, 急需开发可高度反映胰腺癌特征和分子变异的三维培养模型。人源胰腺癌类器官作为近年发展起来的三维培养模型, 是从组织样本中提取的多细胞单位, 在机械和酶消化后嵌入细胞外基质凝胶中, 可再现原患者的组织学特征及器官特点, 甚至具有原器官的功能。随着胰腺癌类器官培养体系的不断发展及完善, 其简便、经济及稳定的培养技术已经逐步建立, 推动人源胰腺癌类器官的应用扩展到药物高通量筛选、个体化精准治疗、更深入的发病机制及针对性的药物开发研究。同时, 人源胰腺癌类器官亦是胰腺癌临床分子分型研究的优势全新半体内模型, 特别在针对研究高突变及高异质性患者的病因、分子特征、组织形态及体细胞突变负荷方面表现优越。大样本量人源胰腺癌类器官生物样本库的构建, 将成为生物学、基础医学和临床肿瘤学研究的全新平台, 有助于胰腺癌发病机制的深入研究及治疗策略的优化。人源胰腺癌类器官可再现临床患者特征的实验室模型的应用, 将使药物筛选、发病机制研究、个体化治疗的实现成为可能。本文综述人源胰腺癌类器官的最新研究进展, 希望该文为从事相关人源胰腺癌类器官研究的人员提供借鉴。

[关键词] 胰腺癌; 人源类器官; 发病机制; 药物筛选; 精准治疗

中图分类号: R735.9 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.06.007

**Recent progress in the construction and application of patient-derived pancreatic cancer organoid models** CHEN Hong<sup>1,2,3</sup>, CAO Zhiyun<sup>1,2,3</sup> (1. Institute of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; 2. Key Laboratory of Integrative Medicine for Geriatric Diseases of Fujian Province, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; 3. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine, Fujian University, Fuzhou 350122, Fujian Province, China)

Correspondence to: CAO Zhiyun E-mail: caozhiyun@fjtc.edu.cn

[Abstract] Pancreatic cancer is a worldwide medical and health problem. Due to its high heterogeneity and malignant phenotype, the 5-year survival rate of pancreatic cancer is only 7.2%, which is a serious threat to human health. The biological mechanism and drug development research of pancreatic cancer often rely on the traditional two-dimensional culture models (cell lines) and patient-derived xenograft models. However, cell lines lack the three-dimensional environment and heterogeneity of the tumor, while xenograft models have the disadvantages of long culture time, low success rate and difficulty in carrying out high-throughput drug screening. There is an urgent need to develop three-dimensional culture models that can highly reflect the characteristics and molecular variation of pancreatic cancer. As a three-dimensional culture model developed in recent years, human-derived pancreatic cancer organoids are multicellular units extracted from tissue samples and embedded in extracellular matrix gels after mechanical and enzymatic digestion, which can reproduce the histological characteristics and organ characteristics of the original patient, and even have the functions of the original organ. With the continuous development and improvement of pancreatic cancer organoids culture system, its simple, economical and stable culture technology has been gradually established, which promotes the application

基金项目: 漳州片仔癀药业股份有限公司横向联合项目(YHT-21104)。

第一作者: 陈 虹 (ORCID: 0009-0005-6889-077X), 硕士。

通讯作者: 曹治云 (ORCID: 0000-0002-4873-149X), 研究员, 博士研究生导师。E-mail: caozhiyun@fjtc.edu.cn。

of human pancreatic cancer organoids to high-throughput drug screening, individualized precision treatment and deeper pathogenesis and targeted drug development research. At the same time, human-derived pancreatic cancer organoids are also a novel semi-in vivo model for the study of clinical molecular typing of pancreatic cancer, especially for the study of etiology, molecular characteristics, histomorphology and somatic mutation burden of patients with high mutation rate and high heterogeneity. The construction of human pancreatic cancer organoid biobank with large sample size is a new platform for biology, basic medicine and clinical science oncology research, which provides a reliable resource for the in-depth study of the pathogenesis of pancreatic cancer and the development of treatment strategies. In summary, the research progress of human pancreatic cancer organoids promotes the application of laboratory models that recapitulate the characteristics of clinical patients, improves the connection between basic laboratory research and clinical patients, and provides clinical sources for drug screening, pathogenesis research, individualized treatment strategies and the construction of biobanks. Therefore, this article reviewed the latest research progress of human pancreatic cancer organoids, in order to provide reference for researchers engaged in the research of human pancreatic cancer organoids.

[ **Keywords** ] Pancreatic cancer; Patient-derived organoids; Pathogenesis; Drug screening; Precision treatment

人源肿瘤类器官在精准医疗中的应用日渐广泛。胰腺癌是恶性程度极高的消化道肿瘤之一，本文从临床特征显著的人源胰腺癌类器官模型、不断优化提升的3D胰腺癌类器官培养体系、精准复现临床的组织学特征和分子分型、人源胰腺癌类器官的应用前景及不足与展望5个方面，对人源胰腺癌类器官在胰腺癌研究中的应用进展进行综述，以期科研或临床提供参考。

### 1 临床特征显著的人源胰腺癌类器官模型

人源类器官 (patient-derived organoids, PDO) 是在类器官构建基础上基于人体来源的胚胎干细胞、成体干细胞或诱导干细胞在体外培育而成的具有多细胞的3D微器官结构。利用三维细胞培养技术及细胞与基质相互作用，在添加生长因子的培养体系中干细胞以与体内相似的方式经细胞分裂和空间限制性分化而实现自我组建，形成类似于人体原组织或器官的微结构。2009年Hans Clevers<sup>[1]</sup>实验室利用小鼠肠隐窝细胞在3D Matrigel基质胶中成功培养出隐窝-绒毛样复合体，该模型可以很好地模拟体内小肠的形态结构及功能，促进了类器官研究的规模化发展。目前，已经成功构建了多种PDO模型，包括胰腺类器官<sup>[2]</sup>、肝脏类器官<sup>[3]</sup>、心脏类器官<sup>[4]</sup>、肺类器官<sup>[5]</sup>、肾脏类器官<sup>[6]</sup>、肠道类器官<sup>[1]</sup>、血管类器官<sup>[7]</sup>和神经系统类器官<sup>[8-9]</sup>等。

与其他肿瘤不同，胰腺癌具有更高度的异质性和恶性表型，目前所用的临床治疗手段难以使患者获益，患者的5年生存率仅为7.2%。而针

对胰腺癌建立的患者来源类器官与传统的二维培养及患者来源的肿瘤异种移植模型相比能更准确地反映肿瘤的遗传异质性，可保留原始肿瘤的结构、细胞组成及分子特征，再现原组织的表型特征、突变特征及异质性，而且具有建模成功率高、培养时间短等优势<sup>[10]</sup>。胰腺癌类器官的构建允许不同来源的组织如穿刺活检、手术标本甚至循环肿瘤细胞进行体外模型扩增，能实现对胰腺癌不同分期、不同分化程度的类器官构建，以进行胰腺癌发生、发展的分子演进研究，给予个体化治疗的用药指导及进行高通量药物筛选，构建胰腺癌类器官生物样本库及相关分子信息库等，为明确胰腺癌的发病机制及寻找有效的治疗药物提供一种全新的三维培养模型。

总之，人源胰腺癌类器官具有保留和再现原始肿瘤的遗传异质性、组织结构、细胞组成及分子特征，且建模成功率高、培养时间短等优势。

### 2 不断优化提升的3D胰腺癌类器官培养体系

第1例胰腺类器官由Hans Clevers<sup>[11]</sup>实验室于2013年构建成功，产生可自我复制的囊肿样结构，这些囊肿样结构的类器官仍然是多能的，可以分化成特定的细胞类型，如腺泡细胞或导管细胞。同年Grappin-Botton<sup>[12]</sup>实验室也成功地构建了胰腺类器官模型。两个实验室同时开发了适合不同功能的胰腺类器官模型培养基和培养体系。

第1例胰腺癌类器官是由Hans Clevers和Tuveson<sup>[2]</sup>实验室于2015年共同构建的，基于2013年建立小鼠胰腺类器官的经验，通过优化

添加R-spondin等生长因子以促进WNT信号转导通路活化并诱导类器官生长的体系,成功地从*Kras*<sup>+LSL-G12D</sup> *Pdx1-Cre* (KC)小鼠低级别胰腺上皮肿瘤中建立了首个胰腺癌类器官模型。在此基础上,该实验室经过进一步优化首次以胰腺切除的肿瘤组织建立了人源胰腺癌类器官模型,此类器官模型经冻存、复苏后,显示出与疾病分期、肿瘤组织学和病理学改变一致的典型胰腺导管特征。当进行小鼠原位移植后该类器官生长演变为早期的胰腺上皮肿瘤并逐步进展为局部侵袭性癌,最后发生转移。该类器官的原位移植表现出胰腺癌的正常疾病进展过程和低血管密度的间质细胞应答两种典型特征,而通常2D肿瘤细胞在进行体内移植时不会表现出间质细胞应答这一特征,表明人源胰腺癌类器官可更好地反映胰腺癌的发生、发展过程。

在临床上,多数胰腺癌患者确诊时已至晚期而无法进行手术治疗,不具备手术指征的胰腺癌患者约占总病例的85%,为解决无法从手术获得组织来源的患者胰腺癌类器官建立的难题,Boj等<sup>[2]</sup>通过去除Matrigel基质胶悬浮液和解离等手术组织来源的建模步骤,通过优化建模条件,成功地从内镜活检的少量组织中建立了首例胰腺癌类器官模型,该模型推动了为非手术胰腺癌患者组织来源的类器官构建。随后,Tiriac等<sup>[13]</sup>在初始诊断时通过内镜超声细针活检术采样成功地创建了33例胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)类器官,建模成功率高达87%,其中有25例类器官均能稳定传代5代以上,该类器官的构建对于胰腺癌患者的精准治疗至关重要。目前人源胰腺癌类器官的构建体系已日趋成熟,对于手术或非手术患者均能构建出类器官模型。

综上,经过研究者近年来不断地探索与改进,已经形成相对成熟的人源胰腺癌类器官建模体系,也可以稳定传代、冻存和复苏。

### 3 精准复现临床患者的组织学特征和分子分型

胰腺癌主要包括PDAC、腺泡细胞癌(acinar cell carcinoma, ACC)、腺鳞状细胞癌(adenosquamous carcinoma, ASC)、胰腺间

变性癌(anaplastic carcinoma of the pancreas, ACP)几大类型,其中PDAC占胰腺癌的80%~90%,主要由分化程度不同的导管样结构的腺体构成,伴有丰富的纤维间质;ACC约占胰腺癌的2%,ASC占胰腺癌1%~4%,ACP约占1%,后3种皆属于胰腺癌的罕见亚型<sup>[14]</sup>。胰腺癌基因组学研究支持疾病起始事件的同质性概念,确定了不同类型胰腺癌的4个常见突变基因:*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*和*SMAD4*<sup>[15-16]</sup>。不同类型的人源胰腺癌类器官可在传代后24 h内自组装成3D结构,并在第3天继续生长到直径100~400 μm,一般胰腺癌类器官会从薄壁囊性结构到管腔的致密类器官,形成具有不同形态的内聚腺结构。有研究<sup>[17-19]</sup>显示,人源胰腺癌类器官的石蜡包埋切片的病理组织学形态与原发肿瘤标本的病理组织学形态具有高度相似性,主要表现在胰腺肿瘤类器官呈现出典型的常见的导管和偶发的筛状结构,同时,胰腺癌类器官与原发肿瘤的分化等级评估比较发现同样具有高度一致性,类器官的组织形态也如原肿瘤组织一样,可观察到典型细胞核特征,包括细胞核增大、多个核仁、有丝分裂和细胞凋亡。

开发胰腺癌疾病进展的模型对于了解基因表达变化所带来的病理生理学效应十分重要。导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)是胰腺前体病变,属于胰腺上皮内瘤变,是一种囊性前体,逐渐进展为恶性肿瘤的时间可达10年之久,该病变可借助CT或MRI进行检查但较难区分是否为恶性表型,切除位于胰腺导管处的该肿瘤中约70%具有高度发育不良或侵袭性特征,而侵袭性特征的复发风险高达65%,恶性概率较大<sup>[20-21]</sup>。因永生化学胰腺癌细胞株中致癌性基因突变已经发生,较难真实再现胰腺癌驱动基因的致瘤过程,而基因工程小鼠模型虽已经描述了IPMN,但体内模型昂贵、耗时及不具有人类IPMN中存在的遗传复杂性都阻碍了对胰腺肿瘤前驱病变的研究,也使得早期筛查和诊断成为胰腺癌临床治疗的瓶颈之一<sup>[22-23]</sup>。有研究<sup>[24]</sup>报道了针对IPMN所构建的PDO, IPMN组织病理学类型主要为胃、肠上皮

化生、胰腺和导管内嗜酸性乳头状肿瘤，该类器官与原肿瘤具有一致的病理学特征和分子分型。IPMN全外显子组或靶基因测序显示*KRAS*、*CDKN2A*、*TP53*、*SMAD4*、*GNAS*、*RNF43*为主要的发生驱动基因，上述基因已被指定用于组织分型及正常导管肿瘤和浸润性导管肿瘤的区别。Huang等<sup>[25]</sup>课题组也报道了该肿瘤类器官模型的建立，通过约2周的培养可获得成熟的类器官，并可进行传代和冷冻保存，病理学分级为低级别与高级别不同特征患者的类器官之间生长率存在差异，高级别的生长速度更慢，这可能与不同的遗传驱动基因有关，显微镜下可见其形态特征为具有囊性填充的球体，全基因组测序结果显示，*KRAS*、*GNAS*、*CDKN2A*、*TP53*、*RNF43*等驱动基因的突变性特征与原组织保持一致，H-E和免疫组织化学检测结果显示类器官团簇核心被肿瘤细胞包围，与原患者组织形态学高度相似，并且表达相同水平的MUC5AC、CK19蛋白，Ki-67增殖指数也相同。还有研究者应用胰腺癌不同亚型来源的组织建立了28种人源胰腺癌类器官模型，包括IPMN和PDAC等，经过各种测序发现IPMN类器官携带*GNAS*、*RNF43*或*KLF4*突变，与PDAC相比显示出不同的表达谱。*MNX1-HNF1B*轴控制多个基因，包括*MYC*、*SOX9*和*OLFM4*<sup>[26]</sup>。

综上所述，人源胰腺癌类器官的组织形态与原肿瘤具有高度相似的病理学特征和分子分型，可作为反映患者个体化特征的半体内模型进行发病机制研究及药物筛选。

#### 4 人源胰腺癌类器官的应用前景

4.1 精准复现临床胰腺癌的发生、发展，是深入研究胰腺癌发病机制的新模型

胰腺癌类器官是具有单一上皮细胞类型的肿瘤模型，适用于集中分析肿瘤细胞的DNA或RNA突变位点及基因表达，而不受相关间质细胞、血管内皮细胞及免疫细胞的影响，因为这些肿瘤微环境中上皮外细胞类型通常在早期传代中被逐渐消除，结合三维类器官对原组织的保真度和易于实验操作性，使胰腺癌类器官成为探讨胰腺癌发生、发展的驱动基因的高效工具。

在已建立的IPMN类器官模型中，发现有的类器官含有过量的体细胞突变，表现为以T为主的突变谱如T和C的或T和A的颠换<sup>[24]</sup>。也有研究<sup>[25]</sup>表明，IPMN的恶性改变与微卫星不稳定性及外源性致癌物如马兜铃酸导致的特定体细胞突变有关。IPMN测序的RNA-Seq数据分析确定了体细胞基因融合事件在胰腺癌中频繁发生，如导管内嗜酸细胞乳头状肿瘤中*ATP1B1-PRKACB*、*DNAJB1-PRKACA*或*ATP1B1-PRCACA*之间频繁的融合。IPMN类器官可作为研究高突变患者的病因、分子特征、组织形态和体细胞突变负荷的良好模型。另有基因组测序研究<sup>[27]</sup>表明，*GNASR201C*的突变仅在IPMN中观察到，但是使用人类干细胞衍生出的胰腺导管和腺泡类器官中发现，与腺泡类器官相比，*GNASR201C*在诱导导管类器官增殖方面更有效，且不依赖下游蛋白激酶A发挥作用。

正常人胰管类器官或胰腺切除标本的癌前上皮细胞类器官能够在优化条件下分离出足够的DNA和RNA用于基因组和转录组分析，该类器官模型可作为富集人体来源的生物大分子（包括核酸和蛋白），用于分析罕见组织样本的胰腺癌癌前病变分子特征和异质性<sup>[28]</sup>。

4.2 真实反映药物对患者的疗效，是推进胰腺癌个体化精准治疗的新方法

多项研究报道了人胰腺癌类器官作为半体内模型用于化疗、靶向治疗及免疫治疗的疗效评估。有研究人员<sup>[29]</sup>开发了一种从PDAC患者中生成的患者来源的PDO分类为对化疗方案敏感或耐药的方法，以预测患者的临床疗效，研究结果显示，PDO的药物敏感性测试与个体患者对治疗的临床反应具有相关性，可以指导PDAC前瞻性介入试验的治疗。Tiriach等<sup>[30]</sup>从159例患者的原发性肿瘤和转移瘤中获取了138份PDAC样本，并采用5种临床常见的化疗药物，如吉西他滨（gemcitabine, Gem）、紫杉醇（paclitaxel, TAXOL）、伊立替康（irinotecan, CPT-11）、5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil, 5-FU）和奥沙利铂（oxaliplatin, L-OHP）分别干预类器官，用于研究药物分型与患者治疗反应的关系，结果显示，

不同患者产生的类器官在化疗反应中表现出明显的不同。而Farshadi等<sup>[31]</sup>构建了未接受治疗和已经接受8周FOLFIRINOX方案治疗并显示出耐药的人源PDAC类器官模型,并对类器官与来源患者的组织学、遗传学和转录组特征进行评估,结果表明,FOLFIRINOX处理后类器官与原组织在分子突变及组织病理学特征方面具有高度一致性,其耐药性也与临床一致。Hem等<sup>[32]</sup>报道了利用人源胰腺癌类器官模型进行放疗及放化疗联合治疗的疗效评估,结果表明,胰腺肿瘤类器官表现出类似的纤维化微环境和分子反应(如细胞凋亡相关标志物变化),10 d后未经治疗的肿瘤类器官和体内肿瘤均表现出原体积的6倍增长,而类器官和体内肿瘤经8 Gy的分级放疗后,肿瘤生长被抑制。当采用4和6 Gy分级放疗处理时,肿瘤类器官的生长速率显著降低。与3-溴丙酮酸盐或4 Gy放疗单独治疗相比,100 μmol/L的3-溴丙酮酸盐联合4 Gy的放疗对类器官的生长表现出显著的抑制。

目前,肿瘤免疫疗法在胰腺癌治疗方面显示出较好的前景,利用胰腺癌类器官模型与CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞进行共培养,发现免疫细胞的细胞毒性显著降低,同时细胞凋亡率显著增加,而当免疫疗法与Pin1靶向药物联合作用时,则对PDAC细胞显示出杀伤作用<sup>[33]</sup>。

4.3 培养及给药具有简便性和经济性,是高通量抗胰腺癌药物筛选的新体系

PDO是预测药物疗效和药物发现的新型三维培养模型,因建立PDO模型耗时短,易于传代保存以及更具备保留患者肿瘤的异质等特点,更适用于高通量药物筛选,在预测胰腺癌患者靶向治疗方面有着巨大的潜力<sup>[34]</sup>。肿瘤类器官的药物筛选方案一般是将肿瘤类器官种植在384孔板或96孔板中并用药物处理3~6 d,然后测试类器官的活性、生长数量及面积。

Zhou等<sup>[35]</sup>建立了153例人源PDAC类器官模型的生物库,涵盖了一系列具有代表性的PDAC肿瘤亚型,同时应用该生物库筛选出了1 304种可有效地克服化疗耐药性的候选化合物。通过高通量药物筛选发现厄贝沙坦,一种血管紧张素1型

受体拮抗剂,可以协同增强化疗药物疗效,通过Hippo/YAP1/c-Jun/干性/铁代谢轴逆转PDAC细胞的耐药。Seino等<sup>[36]</sup>应用胰腺癌类器官库建立药物敏感性与患者临床疗效的高通量筛选体系,并表征了39种胰腺癌类器官DNA突变特征。Tiriac等<sup>[30]</sup>建立了含有66个胰腺癌类器官的生物库,这些组织来自于多位临床机构收集的细针活检和外科手术PDAC标本并据此建立了PDAC特异性类器官药物筛选体系,可以在具有临床意义的时间范围内为每位患者生成药物敏感性谱,晚期PDAC患者的类器官化疗敏感性曲线则可真实反映患者对治疗的反应性,化疗耐药患者的类器官也表现出对化疗药物的抗性,而有些患者类器官对靶向药物表现出较好的敏感性,同时对化疗敏感的PDAC患者建立的类器官还可进行基因测序以探讨化疗敏感性患者的基因特征,该回顾性研究对帮助PDAC患者在临床治疗中选择合理治疗药物具有重要意义。

有研究<sup>[37]</sup>表明,胰腺癌类器官是预测患者特异性化疗反应可靠的体外模型,临床测序往往无法检测到PDAC相关的体细胞突变,对化疗表现出良好反应的手术组织所衍生的类器官进行测序,增加了体细胞突变的检测,并实现了突变基因的拷贝量化,随着类器官的扩增,样本的变异及结构性改变可以更好地被检测到,应用上述类器官模型结合肿瘤标志物糖类抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)及影像学检查,构建了新辅助化疗药物敏感性预测体系,可以较好地晚期患者的化疗药效评估。

4.4 高度保持患者的个体化特征,是胰腺癌生物样本库的新模式

人源胰腺癌类器官培养方法的日渐成熟为后续胰腺癌大规模建库提供了可能,类器官生物样本库是生物学、基础医学和临床肿瘤学研究的实用平台,与传统的肿瘤生物样本库相比,类器官肿瘤生物样本库可以存储兼具活性和功能性的生物样本。有研究者为了评估患者来源的类器官是否可以预测胰腺癌患者对新辅助化疗的反应,建立了包括手术切除和细针穿刺/活检等137个PDO样本,证实PDO生成能够评估动态化

疗敏感性。PDO可以用来快速筛查,并且有可能发展为对患者进行初始分层,以接受最有效的新辅助化疗方案<sup>[38]</sup>。另有研究人员建立了囊括31个不同遗传背景的人源PDAC类器官生物库,涵盖了一系列具有代表性的肿瘤亚型,并证明其可反映原代PDAC组织的分子和表型异质性。通过使用CRISPR-Cas9基因组编辑和药物筛选来表征药物与ARID1A和BRCA2的基因相互作用后,发现PDAC驱动基因ARID1A的错义突变与激酶抑制剂达沙替尼和VE-821的敏感性增加有关<sup>[39]</sup>。Driehuis等<sup>[40]</sup>详细描述了30例的胰腺癌类器官模型的生物库生成情况,证实类器官可以在培养物中稳定维持和扩增,正常胰腺类器官的扩增跨度有限(通常可扩增至第18~20次),之后类器官停止增殖,而肿瘤类器官通常不会表现出这种衰老。Seino等<sup>[36]</sup>通过39例外科手术、细针抽吸和腹水标本建立了PDAC患者的肿瘤和正常类器官生物库,主要研究肿瘤发生过程中的干细胞生态位,并确定了3类功能性PDAC类器官亚型,包括不产生Wnt的亚型(但需要肿瘤相关成纤维细胞产生Wnt)、产生Wnt的亚型(可自主分泌Wnt配体)以及R-spondin非依赖性亚型(可在没有Wnt和R-spondin的情况下生长)等,不同类型的类器官亚型具有不同的Wnt生态位要求,明确了通过改进Wnt或R-spondin配方,培养不同类型的胰腺癌类器官的具体方法。团队还收集培养了胰腺癌的肿瘤相关成纤维细胞提供类器官生长所需的Wnt分泌蛋白,并为后续肿瘤-成纤维类器官共培养体系提供了思路。

#### 4.5 突出反映患者的个体化特征,是胰腺癌异质性研究的优秀模型

相对于其他恶性肿瘤,胰腺癌其所处的微环境呈现出明显的异质性,肿瘤周围的血管密度、纤维化程度、免疫细胞浸润和细胞外基质成分在不同病例之间存在差异。这些微环境因素对肿瘤的生长、转移和治疗反应具有重要影响。微环境中的成纤维细胞导致胰腺癌被纤维化包裹,且胰腺癌细胞与相关成纤维细胞相互作用容易引发肿瘤细胞代谢信号转导通路的失调,从而促进肿瘤的发生、发展,极大地阻碍了药物进入及免疫

细胞浸润,因此具有很强的肿瘤异质性。PDAC多由含有缺氧适应细胞的异质细胞群组成,缺氧作为PDAC的微环境会导致上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)和对治疗的耐药性。然而目前的类器官培养系统通常在常氧下培养,由于类器官建立时的选择性偏倚而失去适应缺氧的细胞。为了克服任何潜在的选择偏倚,有研究人员在建立3D类器官的过程中对相同的PDAC手术样本进行常氧(20%)或缺氧(1%)的处理,分别产生腺体和实体类器官形态。与在常氧条件下建立的类器官相比,在缺氧下建立的胰腺癌类器官显示出更高的EMT相关蛋白表达、基底样亚型转录组和更高的5-FU抗性,这些表明缺氧条件导致胰腺癌类器官恶性特征的形成,为阐明和开发针对PDAC的新治疗策略提供了基本来源<sup>[41]</sup>。2021年Krieger等<sup>[42]</sup>对来自PDAC患者的24种类器官进行的单细胞RNA-seq研究。研究人员发现PDAC类器官中缺乏具有基底样特征的细胞,这表明体外条件使得PDAC类器官由于选择压力而获得典型特征,同时实验结果揭示了PDAC不同细胞状态的功能层次结构,并支持使用PDAC类器官作为肿瘤异质性体外研究的临床相关模型。

综上,人源胰腺癌类器官可以运用于探索胰腺癌发生、发展的演变过程、个体化精准治疗、体外药物高通量筛选、建立胰腺癌生物样本库和研究胰腺癌异质性特征等,可为胰腺癌的发病机制研究及药物筛选提供更加有力的研究模型。

## 5 展望

目前,类器官还不是一个很成熟的模型。与体内模型相比,类器官中要构建合适的细胞外基质、免疫环境和血管连接相对困难,类器官不能完全解释包括免疫细胞在内的环境相关基质细胞的作用,并且癌症类器官的亚型可能在培养过程中发生改变<sup>[43-44]</sup>。因此,探索各种成分之间的相互作用并构建具有遗传多态性的模型将为类器官研究提供新的线索。在培养基中添加生态位因子以构建各种类型的类器官模型已成为类器官研究中不可或缺的组成部分。此外,由于类器官大多在基质胶中建立,其成分尚未完全定义,潜在

的未知成分可能会对类器官模型的后续研究产生不利影响。

即使当前面临许多挑战,类器官技术对基础疾病研究和临床诊治产生积极影响的可能性是值得肯定的。类器官与CRISPR-Cas9基因编辑技术的结合使得肿瘤模型能够更快地构建到靶体中,同时产生与患者癌症高度相似的组织,并能够改进对晚期癌症的研究。虽然目前尚未完全了解类器官的培养环境,但无基质胶的水凝胶和脱细胞基质培养方案正在逐步完善,并取得重要进展。此外,近年来类器官与芯片技术的融合进一步优化了类器官的培养环境。这些技术通过将类器官与周围基质、免疫和内皮细胞之间的连接模式系统地整合来增加类器官灌注,并允许细胞与特定因子进行更广泛的接触,从而产生更高质量的类器官,以满足基础研究和高通量药物筛选的需求。

综上,虽然人源胰腺癌类器官还有很多需要改进的地方,但是它的出现对于我们研究胰腺癌微观特征、寻找更有效的临床治疗用药及改善患者的预后仍具有指导意义。

**利益冲突声明:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [ 1 ] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [ J ] . Nature, 2009, 459(7244): 262-265.
- [ 2 ] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [ J ] . Cell, 2015, 160(1/2): 324-338.
- [ 3 ] 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.
- [ 4 ] CHO J, LEE H, RAH W, et al. From engineered heart tissue to cardiac organoid [ J ] . Theranostics, 2022, 12(6): 2758-2772.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] SCHUTGENS F, ROOKMAAKER M B, MARGARITIS T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling [ J ] . Nat Biotechnol, 2019, 37(3): 303-313.
- [ 7 ] SALEWSKI K, PENNINGER J M. Blood vessel organoids for development and disease [ J ] . Circ Res, 2023, 132(4): 498-510.
- [ 8 ] DENG J, ZHANG J, GAO K, et al. Human-induced pluripotent stem cell-derived cerebral organoid of leukoencephalopathy with vanishing white matter [ J ] . CNS Neurosci Ther, 2023, 29(4): 1049-1066.
- [ 9 ] DA COSTA B L, LI Y, LEVI S R, et al. Generation of CRB1 RP patient-derived iPSCs and a CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair strategy for the CRB1 c.2480G>T mutation [ J ] . Adv Exp Med Biol, 2023, 1415: 571-576.
- [ 10 ] SAJJAD H, IMTIAZ S, NOOR T, et al. Cancer models in preclinical research: a chronicle review of advancement in effective cancer research [ J ] . Animal Model Exp Med, 2021, 4(2): 87-103.
- [ 11 ] HUCH M, BONFANTI P, BOJ S F, et al. Unlimited *in vitro* expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis [ J ] . EMBO J, 2013, 32(20): 2708-2721.
- [ 12 ] GREGGIO C, FRANCESCHI F D, FIGUEIREDO-LARSEN M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro* [ J ] . Development, 2013, 140(21): 4452-4462.
- [ 13 ] TIRIAC H, BUCOBO J C, TZIMAS D, et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment [ J ] . Gastrointest Endosc, 2018, 87(6): 1474-1480.
- [ 14 ] CHOI W, KIM Y H, WOO S M, et al. Establishment of patient-derived organoids using ascitic or pleural fluid from cancer patients [ J ] . Cancer Res Treat, 2023, 55(4): 1077-1086.
- [ 15 ] PISHVAIAN M J, BENDER R J, HALVERSON D, et al. Molecular profiling of patients with pancreatic cancer: initial results from the know your tumor initiative [ J ] . Clin Cancer Res, 2018, 24(20): 5018-5027.
- [ 16 ] Cancer Genome Atlas Research Network Electronic Address: Andrew\_Aguirre@Dfci Harvard Edu, Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma [ J ] . Cancer Cell, 2017, 32(2): 185-203.e13.
- [ 17 ] HE J, BLAIR A B, GROOT V P, et al. Is a pathological complete response following neoadjuvant chemoradiation associated with prolonged survival in patients with pancreatic cancer? [ J ] . Ann Surg, 2018, 268(1): 1-8.
- [ 18 ] SEPPÄLÄ T T, ZIMMERMAN J W, SERENI E, et al. Patient-derived organoid pharmacotyping is a clinically tractable strategy for precision medicine in pancreatic cancer [ J ] . Ann Surg, 2020, 272(3): 427-435.
- [ 19 ] VAES R D W, VAN DIJK D P J, WELBERS T T J, et al. Generation and initial characterization of novel tumour organoid models to study human pancreatic cancer-induced cachexia [ J ] . J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2020, 11(6): 1509-1524.
- [ 20 ] CHOI S H, PARK S H, KIM K W, et al. Progression of unresected intraductal papillary mucinous neoplasms of the

- pancreas to cancer: a systematic review and Meta-analysis [ J ] . Clin Gastroenterol Hepatol, 2017, 15(10): 1509–1520.e4.
- [ 21 ] ELTA G H, ENESTVEDT B K, SAUER B G, et al. ACG clinical guideline: diagnosis and management of pancreatic cysts [ J ] . Am J Gastroenterol, 2018, 113(4): 464–479.
- [ 22 ] IDENO N, YAMAGUCHI H, GHOSH B, et al. GNASR201C induces pancreatic cystic neoplasms in mice that express activated *Kras* by inhibiting YAP1 signaling [ J ] . Gastroenterology, 2018, 155(5): 1593–1607.e12.
- [ 23 ] KOPP J L, DUBOIS C L, SCHAEFFER D F, et al. Loss of pten and activation of *Kras* synergistically induce formation of intraductal papillary mucinous neoplasia from pancreatic ductal cells in mice [ J ] . Gastroenterology, 2018, 154(5): 1509–1523.e5.
- [ 24 ] BEATO F, REVERÓN D, DEZSI K B, et al. Establishing a living biobank of patient-derived organoids of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas [ J ] . Lab Invest, 2021, 101(2): 204–217.
- [ 25 ] HUANG B, TRUJILLO M A, FUJIKURA K, et al. Molecular characterization of organoids derived from pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms [ J ] . J Pathol, 2020, 252(3): 252–262.
- [ 26 ] KATO H, TATEISHI K, FUJIWARA H, et al. MNX1–HNF1B axis is indispensable for intraductal papillary mucinous neoplasm lineages [ J ] . Gastroenterology, 2022, 162(4): 1272–1287.e16.
- [ 27 ] DESAI R, HUANG L, GONZALEZ R S, et al. Oncogenic GNAS uses PKA-dependent and independent mechanisms to induce cell proliferation in human pancreatic ductal and acinar organoids [ J ] . Mol Cancer Res, 2024, 22(5): 440–451.
- [ 28 ] ROMERO-CALVO I, WEBER C R, RAY M, et al. Human organoids share structural and genetic features with primary pancreatic adenocarcinoma tumors [ J ] . Mol Cancer Res, 2019, 17(1): 70–83.
- [ 29 ] GROSSMAN J E, MUTHUSWAMY L, HUANG L, et al. Organoid sensitivity correlates with therapeutic response in patients with pancreatic cancer [ J ] . Clin Cancer Res, 2022, 28(4): 708–718.
- [ 30 ] TIRIAC H, BELLEAU P, ENGLE D D, et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer [ J ] . Cancer Discov, 2018, 8(9): 1112–1129.
- [ 31 ] FARSHADI E A, CHANG J, SAMPADI B, et al. Organoids derived from neoadjuvant FOLFIRINOX patients recapitulate therapy resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma [ J ] . Clin Cancer Res, 2021, 27(23): 6602–6612.
- [ 32 ] SHUKLA H D, DUKIC T, ROY S, et al. Pancreatic cancer derived 3D organoids as a clinical tool to evaluate the treatment response [ J ] . Front Oncol, 2022, 12: 1072774.
- [ 33 ] KOIKAWA K, KIBE S, SUIZU F, et al. Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy [ J ] . Cell, 2021, 184(18): 4753–4771.e27.
- [ 34 ] GRANAT L M, KAMBHAMPATI O, KLOSEK S, et al. The promises and challenges of patient-derived tumor organoids in drug development and precision oncology [ J ] . Animal Model Exp Med, 2019, 2(3): 150–161.
- [ 35 ] ZHOU T X, XIE Y J, HOU X P, et al. Irbesartan overcomes gemcitabine resistance in pancreatic cancer by suppressing stemness and iron metabolism via inhibition of the Hippo/YAP1/c-Jun axis [ J ] . J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 111.
- [ 36 ] 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.
- [ 37 ] SEPPÄLÄ T T, ZIMMERMAN J W, SURU R, et al. Precision medicine in pancreatic cancer: patient-derived organoid pharmacotyping is a predictive biomarker of clinical treatment response [ J ] . Clin Cancer Res, 2022, 28(15): 3296–3307.
- [ 38 ] DEMYAN L, HABOWSKI A N, PLENKER D, et al. Pancreatic cancer patient-derived organoids can predict response to neoadjuvant chemotherapy [ J ] . Ann Surg, 2022, 276(3): 450–462.
- [ 39 ] HIRT C K, BOOIJ T H, GROB L, et al. Drug screening and genome editing in human pancreatic cancer organoids identifies drug-gene interactions and candidates for off-label treatment [ J ] . Cell Genom, 2022, 2(2): 100095.
- [ 40 ] DRIEHUIS E, GRACANIN A, VRIES R G J, et al. Establishment of pancreatic organoids from normal tissue and tumors [ J ] . STAR Protoc, 2020, 1(3): 100192.
- [ 41 ] KUMANO K, NAKAHASHI H, LOUPHRASITTHIPHOL P, et al. Hypoxia at 3D organoid establishment selects essential subclones within heterogeneous pancreatic cancer [ J ] . Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1327772.
- [ 42 ] KRIEGER T G, BLANC S L, JABS J, et al. Single-cell analysis of patient-derived PDAC organoids reveals cell state heterogeneity and a conserved developmental hierarchy [ J ] . Nat Commun, 2021, 12(1): 5826.
- [ 43 ] JABS J, ZICKGRAF F M, PARK J, et al. Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations [ J ] . Mol Syst Biol, 2017, 13(11): 955.
- [ 44 ] XU H X, LYU X D, YI M, et al. Organoid technology and applications in cancer research [ J ] . J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 116.

(收稿日期: 2024-01-03 修回日期: 2024-04-11)