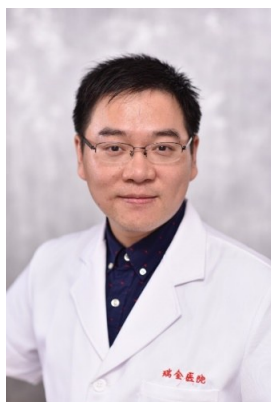




· 专题论著 ·



孙晶, 主任医师、副教授、副研究员、博士研究生导师, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科副主任, 上海交通大学医学院附属瑞金医院胃肠外科副主任, 上海消化外科研究所执行副所长。澳大利亚悉尼大学BOSCH INSTITUTE访问学者, 美国MAYO CLINIC访问学者, 中国医师协会肿瘤多学科诊疗专业委员会委员, 中国医学装备协会腔镜微创技术分会常委, 中国老年学和老年医学学会转化医学分会常委、副主任委员, 中国医师协会外科医师分会专业信息传播和教育专家工作组委员, 中国医师协会内镜分会腹腔镜与内镜外科学组青年委员, 中国普通外科青年学者攀登计划成员, 中国医学装备协会转化医学分会微创外科创新转化学组委员, 海归医协青委会委员, 上海市医学会普外科专业委员会微创外科学组委员, 上海市抗癌协会胃肠肿瘤腔镜专业委员会委员, 国家卫健委外科基础技能提升项目培训讲师。国家自然科学基金评审专家, 国家科技部专家库评审专家, 上海市科委专家库评审专家。The Innovation Medicine、Chinese Journal of Cancer Research 等杂志青年编委。

结直肠癌腹膜转移患者来源的转移灶和腹水类器官模型的构建及鉴定

邵岩飞^{1, 2}, 陈欣仪¹, 郑煌¹, 陈朝朝¹, 刘楠钦¹, 孙晶^{1, 2}

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科, 上海 200025;
2. 上海消化外科研究所, 上海 200025

[摘要] **背景和目的:** 结直肠癌腹膜转移 (colorectal cancer peritoneal metastasis, CRC-PM) 是结直肠癌患者预后极差的转移类型之一, 常伴腹水形成、弥漫性种植播散及对系统治疗反应不佳, 目前临床缺乏可重复、可扩增且能较真实地反映患者肿瘤生物学特征的体外模型, 限制了其转移机制研究和个体化治疗评估。患者来源类器官 (patient-derived organoid, PDO) 可在三维 (three dimension, 3D) 条件下长期培养并保留肿瘤相关表型和遗传特征, 但针对CRC-PM, 尤其是腹膜转移灶和腹水双来源的PDO模型构建及鉴定仍相对不足。本研究旨在构建能够稳定生长和传代的CRC-PM PDO (包括转移灶及腹水来源) 模型, 并从组织形态、蛋白表达和基因组学等维度评估其与原发灶肿瘤样品的生物学一致性。**方法:** 收集CRC-PM患者来源的临床样本, 逐步解离转移灶及腹水并建立其3D类器官模型及二维 (two dimension, 2D) 细胞系。PDO形态学特征采用明场显微镜动态观察。将PDO制备为细胞块后进行H-E染色以评估腺样结构和上皮样组织学特征。利用免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 技术对比类器官模型与原发灶肿瘤的病理学特征; IHC结果采用积分光密度 (integrated optical density, IOD) 进行描述性分析。运用全外显子测序 (whole-exome sequencing, WES) 分析类器官模型、2D细胞系和原发肿瘤的突变图谱及基因表达模式。**结果:** 成功地构建出能够稳定传代的CRC-PM患者来源的转移灶及腹水类器官模型, 并通过反复传代构建出其对应的2D肿瘤细胞系。类器官模型均可形成典型囊状/致密球状3D结构。H-E染色显示, 其具有上皮样腺样结构特征。IHC分析结果显示, 类器官在组织学形态及肿瘤核心标志

基金项目: 国家自然科学基金 (82273344); 上海交通大学医学院附属瑞金医院“青年培育计划”项目 (2025PY088)。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 2020临伦审第 (411) 号。

知情同意: 有。

引用本文: 邵岩飞, 陈欣仪, 郑煌, 等. 结直肠癌腹膜转移患者来源的转移灶和腹水类器官模型的构建及鉴定[J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(3): 221-231.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: National Natural Science Foundation of China (82273344); "Young Talent Cultivation Program" of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (2025PY088).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest

Ethics approval: 2020 Clinical Ethics Review No.411

Informed consent: available.

Cite this article: SHAO Y F, TAN X Y, ZHENG H, et al. Establishment and characterization of patient-derived organoid models from peritoneal metastatic lesions and ascites in colorectal cancer[J]. Chin Oncol, 2026, 36(3): 221-231.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

物(包括CK20、E-cadherin、Pan-CK、 β -catenin)的表达及Ki-67增殖指数上均与原发性肿瘤特征高度一致,且整体表达强度均无明显差异。WES数据证实,类器官、细胞系均与原发性肿瘤组织在核心突变基因(如TTN、FAT2等)及突变类型上具有很高的重合度。**结论:**本研究建立并验证了CRC-PM来源的转移灶与腹水的类器官模型及其配对的肿瘤细胞系,该类器官模型和细胞系在基因和遗传学层面均能保留原发性肿瘤特征,该体系能够为CRC-PM的机制研究和个体化药物筛选提供可靠的方法学借鉴和实验室工具。

[关键词] 结直肠癌;腹膜转移;腹水;类器官;一致性检验

中图分类号: R735.3 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.03.002

Establishment and characterization of patient-derived organoid models from peritoneal metastatic lesions and ascites in colorectal cancer SHAO Yanfei^{1,2}, TAN Xinyi^{1*}, ZHENG Huang¹, CHEN Chaozhao¹, LIU Nanqin¹, SUN Jing^{1,2} (1. Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China)

Correspondence to: SUN Jing E-mail: sj11788@rjh.com.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Colorectal cancer peritoneal metastasis (CRC-PM) represents one of the lethal metastatic patterns of colorectal cancer and is frequently characterized by malignant ascites, diffuse peritoneal seeding, and poor responsiveness to systemic therapy. A major barrier to mechanistic and translational research in CRC-PM is the lack of reproducible, expandable *in vitro* models that faithfully capture patient's tumour biology. Patient-derived organoid (PDO) can be maintained long-term in three dimension (3D) culture while preserving tumour-associated phenotypes and genomic features; however, PDO establishment and rigorous characterization specifically for CRC-PM remain limited. Here, we aimed to establish stably expandable CRC-PM PDO derived from metastatic lesions and ascites, generate matched two dimension (2D) tumour cell lines, and evaluate their biological concordance with the corresponding tumour specimens across histomorphology, protein expression, and genomic profiles. **Methods:** Clinical specimens were obtained from patients with CRC-PM. Peritoneal metastatic lesions and ascites were processed by stepwise dissociation to establish 3D PDO cultures and matched PDO-derived 2D tumour cell lines. Organoid morphology was monitored longitudinally by bright-field microscopy. PDO was recovered and processed into cell blocks for H-E staining to assess epithelial/glandular architecture. Immunohistochemistry (IHC) was performed to compare pathological features between PDO and matched primary tumours; IHC signals were assessed using integrated optical density (IOD) for descriptive semi-quantification. Whole-exome sequencing (WES) was conducted on primary tumour tissues, PDO, and matched 2D cell lines to delineate somatic mutational landscapes and mutation-type compositions. **Results:** We successfully established CRC-PM PDO derived from both peritoneal metastatic lesions and ascites, which could be stably expanded and serially passaged, and generated the corresponding PDO-derived 2D tumour cell lines through repeated subculture. Both organoid models formed typical cystic and/or compact spheroid 3D structures. H-E staining of PDO cell blocks demonstrated epithelial, gland-like histological features. IHC analysis showed that PDO closely recapitulated the histomorphology and the expression patterns of key tumour markers (including CK20, E-cadherin, pan-cytokeratin and β -catenin) and Ki-67 proliferation index observed in the matched primary tumours, with no apparent differences in overall staining intensity across these markers. WES further confirmed a high degree of concordance in recurrently mutated genes (such as TTN and FAT2) and in mutation-type composition among PDO, matched 2D cell lines, and corresponding primary tumour tissues. **Conclusion:** We established and validated paired CRC-PM PDO derived from peritoneal metastatic lesions and ascites, together with matched PDO-derived tumour cell lines. These models largely preserve the key pathological and genomic features of the corresponding primary tumours and provide a reproducible experimental platform for mechanistic studies and personalised drug testing in CRC-PM.

[Key words] Colorectal cancer; Peritoneal metastasis; Ascites; Organoid; Concordance analysis

结直肠癌腹膜转移(colorectal cancer peritoneal metastasis, CRC-PM)是结直肠癌晚期进展中预后极差的临床类型之一,常伴随腹水、肠梗阻及恶病质等问题,患者生存期短且生存质量显著下降^[1-2]。与肝、肺等血行转移不同,腹膜转移多呈弥漫播散、微小病灶多发及空间分布复杂的特点^[3],影像学检查和有限取样通常难以准确评估真实肿瘤负荷^[4];同时,腹腔微环境中

的间皮细胞、免疫细胞、成纤维细胞及细胞外基质等共同参与肿瘤细胞的动态过程^[5-9]。因此,即便目前的减瘤手术联合腹腔热灌注化疗等综合治疗在部分患者中可获益,但适用人群筛选、疗效预测及复发监测仍存在不确定性^[4, 10]。更重要的是,CRC-PM特异的分子驱动机制和可干预靶点尚未被系统阐明,主要归因于缺乏可反复验证且可转化的研究模型,限制了其精准治疗和新药研发的推进^[11]。

*: 陈欣仪为马来西亚籍,英文名为TAN Xinyi。

患者来源类器官 (patient-derived organoid, PDO) 为突破上述瓶颈提供了新的技术路径。类器官能够在三维 (three dimension, 3D) 基质中长期扩增, 并在一定程度上保留原肿瘤的组织形态、分化状态及关键基因特性, 具有接近真实肿瘤生物学状态的特征^[12]。近年来, 类器官已在多种消化道肿瘤的异质性解析、疗效评估及伴随诊断探索中展现出潜力^[13-15]。然而, 就CRC-PM而言, 其类器官建模仍面临多重挑战, 主要包括: 转移灶常纤维化明显且肿瘤细胞比例不均, 导致建模成功率和稳定性波动; 腹水样本虽获取便捷, 但肿瘤细胞数量及活性差异大, 且存在污染风险; 传统类器官体系以肿瘤上皮细胞扩增为主, 微环境成分容易在培养过程中丢失, 影响对腹膜转移微环境特征的模拟^[16-18]。基质和培养条件带来的选择压力亦可能造成亚克隆漂移, 从而影响模型与原肿瘤的一致性和可重复性^[19-20]。因此, 建立CRC-PM的标准化取材、培养和多维度鉴定流程, 并构建转移灶和腹水来源的类器官模型, 是推动其机制探索和临床治疗的关键基础性工作^[21]。基于此, 本研究通过收集CRC-PM患者转移灶组织及腹水样本, 构建可稳定生长和连续传代的3D类器官, 并同步建立二维 (two dimension, 2D) 细胞系作为补充体系。在鉴定层面, 通过组织形态学观察和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 检测关键标志物 (如 CK20、E-cadherin、Ki-67、Pan-CK、 β -catenin), 评估类器官与原肿瘤病理学特征的一致性。结合全外显子测序 (whole-exome sequencing, WES) 和转录组分析, 验证类器官与原肿瘤在突变谱、核心分子及表达方面的一致性。本研究旨在建立一套可推广的CRC-PM类器官构建和鉴定范式, 为腹膜转移机制研究、个体化药物筛选及新型治疗策略的前临床验证提供可靠平台, 从而为CRC-PM的精准诊疗提供助力。

1 材料和方法

1.1 组织来源

CRC-PM组织和腹水均取自2024年于上海交通大学医学院附属瑞金医院就诊的1例CRC-PM患者。患者为男性, 54岁, 原发灶考虑为右半结肠癌, 无吸烟史、职业暴露史等环境暴露因素。入院后接受腹腔镜下探查+腹膜转移灶及腹水活检手术。术后组织病理学检查确诊为中分化腺癌, 溃疡型, 病理学分期为T4aN1M1。患者的美国东部肿瘤协作组 (Eastern Cooperative

Oncology Group, ECOG) 体力状态评分为3级, 腹膜转移癌指数 (peritoneal cancer index, PCI) 为27分。分子病理学检测结果显示, 人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阴性, 错配修复状态为微卫星稳定型 (microsatellite stable, MSS)。患者术前和术后均未接受任何全身性治疗, 术后自愿主动出院。本研究经上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会批准 [批号: 2020临伦审第(411)号], 患者已签署知情同意书。

1.2 人肠癌转移灶及腹水类器官培养

1.2.1 腹膜转移灶组织来源类器官的建立

手术切除获得的腹膜转移灶组织样本 (取自大网膜结节, 大小为1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm, 切面灰白, 质中) 在无菌条件下保存于提前预冷至4~8 °C的杜尔贝科磷酸盐缓冲溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) (美国Gibco公司, 货号: 14190144) 中, 置于含温度计的样本运输箱内, 运输箱内放置冰袋用于维持温度, 2 h内转运至实验室。鉴于腹腔样本污染风险较高, 组织首先在含青霉素/链霉素/两性霉素B (北京索莱宝科技有限公司, 货号: P7630) 的DPBS中反复漂洗 (至少3次, 每次30 s以上), 并去除表面凝血块、坏死灶及明显纤维化/脂肪组织, 保留质地较软、颜色灰白或呈鱼肉样的肿瘤区域。最终获得一块肿瘤整体占比大于80%、坏死灶小于20%的组织, 随后使用无菌剪刀或手术刀将组织剪切至1~2 mm³小块, 以提高消化效率并减少过度机械损伤。组织块加入预温的组织消化液 (瑞士Roche公司, 货号: 11088815001), 在37 °C下以50 r/min的速率温和振荡消化约15 min。考虑到腹膜转移灶常伴间质比例高、黏液和纤维成分多, 消化过程中每5 min轻柔吹打3~5次以促进细胞簇释放, 并根据组织碎解程度动态调整消化时间, 避免过度消化导致细胞活性下降。消化终止后, 将混悬液通过100 μ m细胞滤网过滤以去除未消化组织残渣, 收集滤液获得单细胞/小细胞簇悬液。将细胞在4 °C下以500×g的速率离心5 min, 弃上清后用肠癌类器官培养基 (苏州先觉生物科技有限公司, 货号: CM01011A) 轻柔重悬。为提高初代建系效率并维持转移灶细胞的3D生长优势, 将细胞与基质胶 (美国Corning公司, 货号: 356231) 按终体积比约70%混匀, 点滴接种于6孔板中央形成圆顶 (dome)。37 °C温育约20 min待基质胶凝固后, 加入预温的以Advanced DMEM/F12 (美国

Gibco公司, 货号: 12634010) 为基础的完整培养体系: 补充 Primocin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 法国 InvivoGen 公司)、GlutaMax (2 mmol/L, 美国 Thermo 公司)、HEPES (10 mmol/L, 美国 Thermo 公司)、N-Acetyl-L-cysteine (1.25 mmol/L, 美国 Sigma 公司)、Nicotinamide (10 mmol/L, 美国 Sigma 公司)、Noggin (100 ng/mL, 美国 ACRO 公司)、Gastrin (5 nmol/L, 美国 MCE 公司) 及相应的肠癌类器官培养基组分。类器官在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为 5% 的条件下培养, 培养基每周更换 3 次。初代培养早期重点观察污染和细胞死亡情况, 如出现明显碎屑可在不扰动基质胶的前提下轻柔换液并尽量减少换液冲击。

1.2.2 腹水来源类器官的建立

腹水样本采集后立即置于聚丙烯离心管 (全部离心不分装) 中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 100 \times g 的速率离心 5 min 以富集细胞成分。弃上清后用 DPBS 重悬并重复清洗 1 次以减少游离蛋白和黏液的干扰。考虑腹水常含大量红细胞和炎性细胞, 加入 5 mL 红细胞裂解液 (美国 Thermo 公司, 货号: A1049201) 去除红细胞, 室温静置约 5 min, 随后加入等体积 DPBS 终止裂解并离心收集细胞沉淀。若样本黏稠或细胞团块较多, 可在重悬过程中轻柔吹打并视情况用 100 μm 滤网过滤, 以获得更均一的细胞悬液。将腹水细胞沉淀, 用少量肠癌类器官培养基重悬后, 与基质胶按“含 30% 肠癌类器官培养基的基质胶”配制混匀并接种于聚苯乙烯培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min 待基质胶凝固后加入完整培养体系。由于腹水肿瘤细胞比例可能较低, 初代培养阶段建议密切观察上皮样球体/腺样结构形成情况, 并通过连续传代逐步富集可持续生长的肿瘤类器官群体。

1.2.3 转移灶类器官传代和扩增

当转移灶/腹水类器官直径增大且腔体结构明显、密度达到可传代标准时, 弃上清后加入 TrypLE (美国 Gibco 公司, 货号: 12605010), 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化约 10 min, 使类器官解离为单细胞或小细胞簇 (建议保留部分小簇以提高复苏和再生效率)。加入含 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 DMEM 终止消化, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 500 \times g 的速率离心 5 min。沉淀用含约 30% 肠癌类器官培养基的基质胶重悬后重新铺板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min, 待凝固后加入培养基继续培养。

1.2.4 腹膜转移灶组织及腹水来源类器官的冻存

腹膜转移灶组织及腹水来源类器官稳定扩增

后, 即可进行冻存保种。最后 1 次传代后, 每天观察类器官状态, 待类器官生长至直径 20~40 μm (通常在传代后 1~4 d 内), 即可冻存。先打破胶滴并收集类器官, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 100 \times g 的速率离心 5 min, 弃上清; 加入 TrypLE (美国 Gibco 公司, 货号: 12605010), 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化约 10 min, 使类器官解离为单细胞或小细胞簇; 再加入 DMEM 终止消化, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 500 \times g 的速率离心 5 min。弃上清后, 使用冻存液 (加拿大 StemCell 公司, 货号: 07955) 重悬沉淀, 每支冻存管加入 1 mL 含类器官的冻存悬液; 将冻存管放入程序降温盒, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 第 2 天转入液氮中长期保存。两种类器官传代冻存次数为 4 次, 复苏后的存活率约为 90%, 应尽量避免反复冻融 (限制在 10 次内)。

1.3 转移灶及腹水类器官来源的肿瘤细胞系构建

以稳定传代的转移灶来源类器官及腹水来源类器官为起始材料, 采用“去基质胶-单细胞化-贴壁适应-稳定扩增”的流程进行构建。首先以预冷 DPBS 反复吹打分散基质胶圆顶并离心收集类器官沉淀, 用 DPBS 清洗以尽量去除基质残留; 随后加入 TrypLE 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化约 10 min, 并间歇轻柔吹打使类器官解离为单细胞或以 2~5 个细胞为主的小细胞簇 (首次转 2D 阶段保留部分小簇以提高腹膜转移细胞存活和贴壁效率), 加入含 5% BSA 的 DMEM 终止消化后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 500 \times g 的速率离心 5 min。沉淀用 DMEM+10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司, 货号: C11995500BT) 重悬后接种至经组织培养处理的培养瓶/孔板; 为提升腹膜转移来源细胞的贴壁率并降低早期漂浮死亡率, 接种前向培养板内加入 iPSC 铺底工作液 (以胶原相关成分为主的细胞外基质涂层), 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被温育约 4 h 后, 弃去涂层液立即铺板。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为 5% 的条件下培养, 接种后 24 h 内尽量减少扰动, 24~48 h 后根据贴壁和碎屑情况进行半量换液, 随后每 2~3 d 换液 1 次; 对于腹水来源细胞, 早期常伴有较多碎屑和非贴壁成分, 可采用轻柔 PBS 漂洗结合半量换液逐步富集持续增殖的上皮样肿瘤细胞群。待其形成稳定贴壁克隆并连续传代后, 进入常规 2D 培养。

1.4 肿瘤组织和类器官模型的 IHC 检测及定量分析

1.4.1 IHC 检测

组织标本用 4% 甲醛溶液于 4~8 $^{\circ}\text{C}$ 固定 18~

24 h, 常规石蜡包埋并切片(包埋方向为横向, 确保切片包含最大肿瘤/类器官模型面积); 类器官样本在基质胶中回收后充分洗去基质成分, 轻柔离心富集类器官团块并以相同流程制备“类器官细胞块”后石蜡包埋, 以减少基质胶背景并保证切片结构完整。切片脱蜡复水后进行热诱导抗原修复, 采用内源性过氧化物酶封闭并用封闭液降低非特异性结合, 随后分别温育CK20 (1:150, 英国Abcam公司, 货号: ab76126)、Pan-CK (0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 英国Abcam公司, 货号: ab216014)、E-cadherin (1:500, 英国Abcam公司, 货号: ab40772)、Ki-67 (1:200, 英国Abcam公司, 货号: ab16667) 及 β -catenin (1:500, 英国Abcam公司, 货号: ab32572) 一抗并采用辣根过氧化物酶/二氨基联苯胺显色体系显色, 苏木精复染后封固。

1.4.2 IHC定量分析

上述每张IHC切片选择染色均匀、无脱片且无明显背景干扰的3个视野($\times 200$)进行观察。采用显微镜自带成像系统采集图像, 并以TIFF格式保存。利用ImageJ图像分析软件对各视野进行积分光密度(integrated optical density, IOD)测定。IOD值作为定量指标, 可同时反映阳性染色区域的面积和染色强度, 从而对目的蛋白表达水平进行综合评价。IOD值越高, 表示相应蛋白(CK20、E-cadherin、Pan-CK、 β -catenin)的表达水平及Ki-67增殖指数越高。

1.5 肿瘤组织、类器官模型和细胞系的WES

1.5.1 WES实验方法: DNA抽提和文库构建

对配对的原发/腹膜转移灶组织、腹水细胞沉淀、转移灶类器官、腹水类器官及其PDO衍生2D细胞系进行WES。组织样本优先选取肿瘤细胞含量较高区域; 腹水样本经离心富集细胞并进行红细胞裂解/去碎屑处理后取细胞沉淀; 类器官样本在回收时充分洗去基质胶以降低外源基质残留带来的抑制效应和背景干扰。2D细胞系在对数生长期收集。基因组DNA采用Agilent SureSelect Human All Exon V6试剂盒体系进行提取和外显子捕获建库。DNA浓度和纯度由Nanodrop分光光度计测定, 完整性通过1%琼脂糖电泳评估。建库流程为: 试剂盒酶切/打断基因组DNA获得目标片段长度范围, 片段纯化后进行末端修复与接头连接, 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增获得预文库; 随后将扩增文库与外显子捕获探针杂交富集目标序列, 经洗涤与洗脱获得捕获文库。最终文

库在Illumina NovaSeq 6000平台进行150 bp双端测序。测序和基础数据产出由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

1.5.2 WES分析方法

原始测序数据以FASTQ格式输出。首先使用fastp(v0.20.0)软件进行质控和预处理: 去除接头序列, 过滤平均碱基质量 <20 的低质量碱基, 剔除含不明确碱基(N)或长度 <75 bp的读段, 获得纯净读段。随后使用BWA(v0.7.17)将纯净读段比对至人参考基因组GRCh37, 采用SAMtools(v1.9)软件完成比对结果的格式转换、排序和索引等处理。GATK(v4.1.9.0)软件用于碱基质量重校准并生成下游变异检测所需文件; 体细胞单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)和插入/缺失(insertion/deletion, INDEL)采用MuTect2软件进行识别, 并使用ANNOVAR软件将变异注释至RefSeq、1000 Genomes、COSMIC、OMIM等数据库。体细胞拷贝数变异采用Control-FREEC(v11.3)软件进行分析(默认参数), 结构变异采用Lumpy(v0.2.13)软件进行检测。考虑到腹水样本可能存在肿瘤细胞比例波动和克隆异质性更强的特点, 在模型一致性评估中重点关注关键驱动事件的重合度、突变谱型分布及PDO/2D细胞系相对原始样本的克隆保留情况, 以综合评价不同来源模型的遗传稳定性和可转化应用潜力。

2 结果

2.1 CRC-PM类器官构建及形态学特征

本研究首先对CRC-PM患者的临床样本进行系统评估并建立与之匹配的体外模型。增强计算机断层成像(computed tomography, CT)提示结肠局部肠壁明显增厚并呈不均匀强化, 符合侵袭性占位病变影像学特征(图1A); 术中切除标本为灰白色实性肿块, 质地较硬、切面结构紊乱(图1B), 与晚期肿瘤常见的致密间质和浸润性生长一致。在严格的无菌处理和质量控制基础上, 对转移相关样本进行分区取材并经机械剪切联合酶学消化获得肿瘤细胞/细胞簇, 在3D Matrigel体系中成功构建PDO。明场显微镜动态观察显示, 接种后早期细胞簇逐步聚集并形成紧密的上皮样团块, 随后在基质中出现典型的球状或囊状3D结构, 边界清晰、细胞排列紧密, 并可见腔样结构逐渐形成(图1C)。值得注意的是, 该模型在连续传代过程中保持稳定增殖能力: 类器官可在多代培养后维持相对一致的形态

学特征 (主要表现为致密球状与囊状结构并存), 整体结构完整, 未出现明显的碎裂、塌陷或长期

生长停滞 (图1D), 提示其具备良好的体外扩增潜力和可重复性。

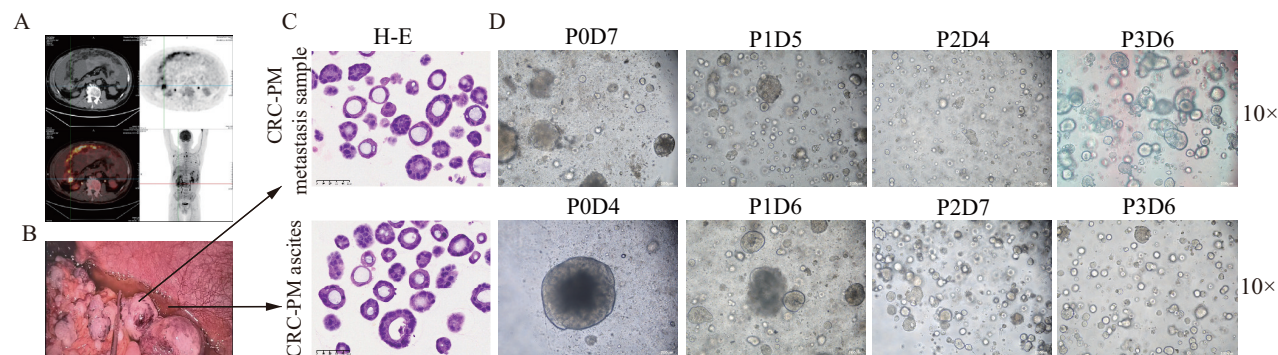


图1 CRC-PM转移类器官构建及形态学特征

Fig. 1 Establishment and morphological characterization of CRC-PM organoids

A: Contrast-enhanced CT image demonstrating the primary colorectal tumor lesion. B: Gross appearance of the surgically resected colorectal tumor specimen. C: H-E staining of the primary tumor tissue, showing typical histopathological features of colorectal adenocarcinoma ($\times 200$). D: Bright-field images of patient-derived colorectal cancer organoids cultured in Matrigel across multiple passages, demonstrating stable 3D growth morphology ($\times 10$).

2.2 CRC-PM类器官与原肿瘤组织的分子表型一致性分析

在确认CRC-PM类器官可稳定形成3D结构并可连续传代后, 进一步采用IHC法对配对的原肿瘤组织与类器官样本进行分子表型一致性评估。结果显示, 类器官与对应组织均表达CK20和Pan-CK, 且主要分布于腺样/上皮样细胞成分, 染色强度及分布模式相近, 提示类器官在体外扩增过程中仍保持结直肠癌肿瘤上皮谱系特征。E-cadherin在两者中均为阳性, 主要定位于细胞膜, 提示类器官在体外培养条件下仍维持上皮细胞间黏附相关表型。 β -catenin在组织和类器官中均可

检出, 主要位于细胞膜及细胞质, 无明显表达强度差异 (组织、转移灶类器官和腹水类器官的IOD值分别为8 270、8 433和8 367)。Ki-67免疫染色在组织和类器官中均呈阳性, 且无明显差异 (组织、转移灶类器官和腹水类器官的IOD值分别为10 679、10 282和10 467), 提示细胞具有持续增殖能力并支持长期扩增 (图2)。总体而言, 上述关键标志物在表达水平与亚细胞定位上的一致性表明, CRC-PM类器官能够较好地再现配对肿瘤组织的主要免疫表型特征, 为后续基因组学一致性验证及基于模型的药物敏感性研究提供了依据。

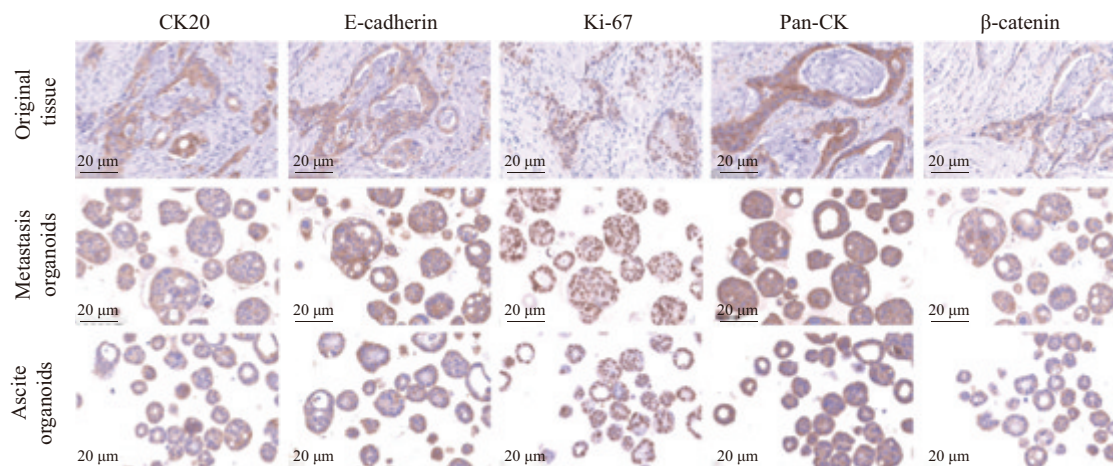


图2 CRC-PM类器官与原肿瘤组织的分子表型一致性分析

Fig. 2 Immunohistochemical characterization of CRC-PM organoids

Immunohistochemical staining was performed to compare phenotypic features between primary colorectal tumor tissues and corresponding organoids. Representative images show the expression of colorectal cancer-related markers, including CK20, E-cadherin, Pan-CK and β -catenin and Ki-67 proliferation index in primary tumor tissues and organoid samples ($\times 200$).

2.3 CRC-PM 类器官衍生 2D 细胞系的建立及生长特征

为进一步评估结直肠癌类器官在不同培养体系下的生长潜能，本研究在 2D 培养条件下建立类器官衍生的细胞系。经消化处理后，类器官来源细胞逐渐贴壁生长，并形成单层细胞群体。明场显微镜观察显示，实体瘤来源类器官衍生细胞在培养早期即可出现明显贴壁现象，随后细胞数量逐渐增加，并在连续传代过程中维持稳定生

长。腹水来源类器官衍生细胞同样能够在 2D 培养条件下贴壁并持续增殖。随着传代次数增加，细胞形态整体保持相对一致，未见明显生长停滞或大规模凋亡现象。不同来源的 2D 细胞系在形态上存在一定差异，但均表现出较强的体外生长能力（图 3）。上述结果表明，结直肠癌类器官不仅能够在 3D 培养体系中稳定生长，还可成功建立衍生的 2D 细胞系，为后续功能实验和机制研究提供了多层次的体外研究模型。

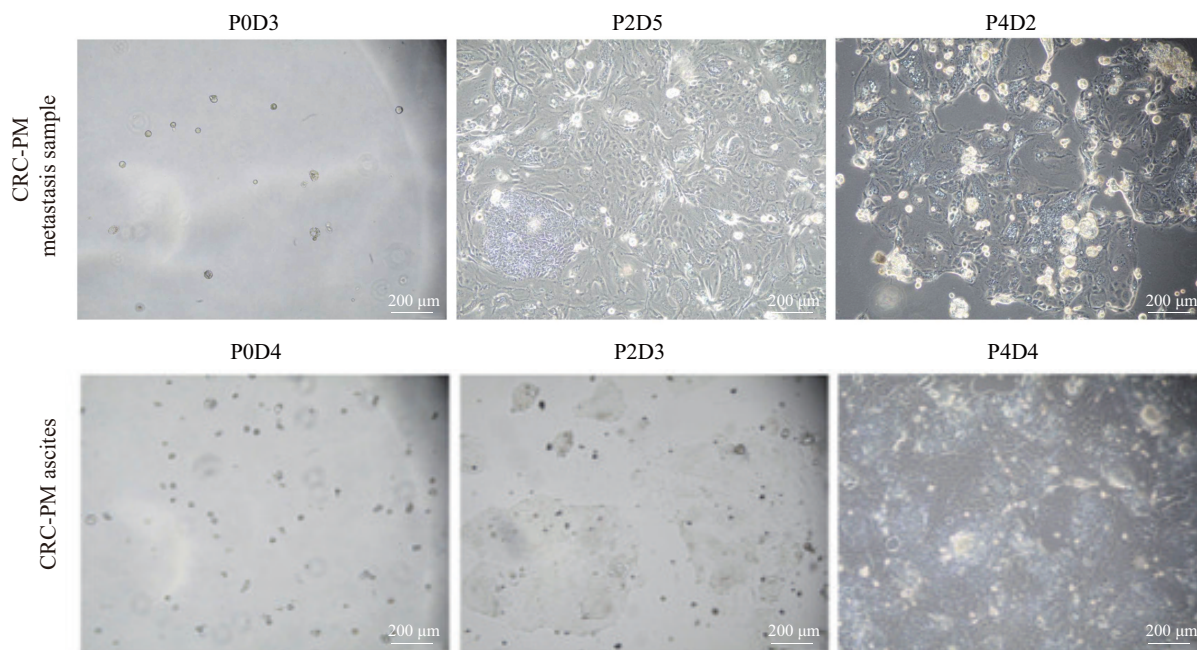


图3 结直肠癌类器官衍生 2D 细胞系的建立及生长特征

Fig. 3 Establishment of 2D cell lines derived from colorectal cancer organoids

Colorectal cancer organoids were dissociated and cultured under 2D conditions to establish organoid-derived cell lines. Bright-field images show morphological changes and growth characteristics of cell lines derived from solid tumor organoids and ascites organoids at different passages ($\times 10$).

2.4 WES 的 CRC-PM 原发肿瘤、类器官及细胞系的突变谱一致性分析

为系统评估 CRC-PM 类器官及其衍生 2D 细胞系在遗传层面与原发肿瘤的一致性，本研究对原发肿瘤组织、类器官及对应细胞系进行了 WES 分析。突变瀑布图显示，3 类样本在多种体细胞突变基因上存在较高重叠，核心突变事件在组织与类器官之间具有良好一致性，提示体外模型在整体突变谱方面与原发肿瘤具有较高一致性（图 4A）。进一步对样本间突变谱的相似性进行定量分析，发现原发肿瘤、类器官与对应 2D 细胞系在突变水平上具有较高相关性，且在无监督聚类中，同一患者来源的不同样本倾向于聚为一类，提示体外培养并未改变其主要遗传背景（图 4B）。同时，我们也观察到个别突变位点在不同培养体系间存在差异，符合体外培养选择压力及

肿瘤内异质性导致的亚克隆比例变化的常见现象。总体而言，这些结果支持 CRC-PM 类器官及其衍生 2D 细胞系能够在遗传层面较好地保留患者肿瘤的关键突变特征，为后续以该模型开展机制研究和药物评估奠定了基础。

2.5 WES 检测的变异类型及突变负荷特征分析

在确认 CRC-PM 类器官与配对肿瘤组织在整体突变谱上具有较高一致性后，本研究进一步对 WES 获得的体细胞变异类型、碱基替换模式及突变负荷特征进行了分析。功能注释结果显示，各类器官样本中体细胞变异以错义突变为主，移码插入和缺失次之，无义突变、剪接位点突变及起始密码子相关变异所占比例相对较低（图 5A），提示类器官样本以导致氨基酸改变的非同义突变为主要突变形式。按变异类别分层，SNV 在所有样本中占主导，比例明显高于 INDEL（图 5B），

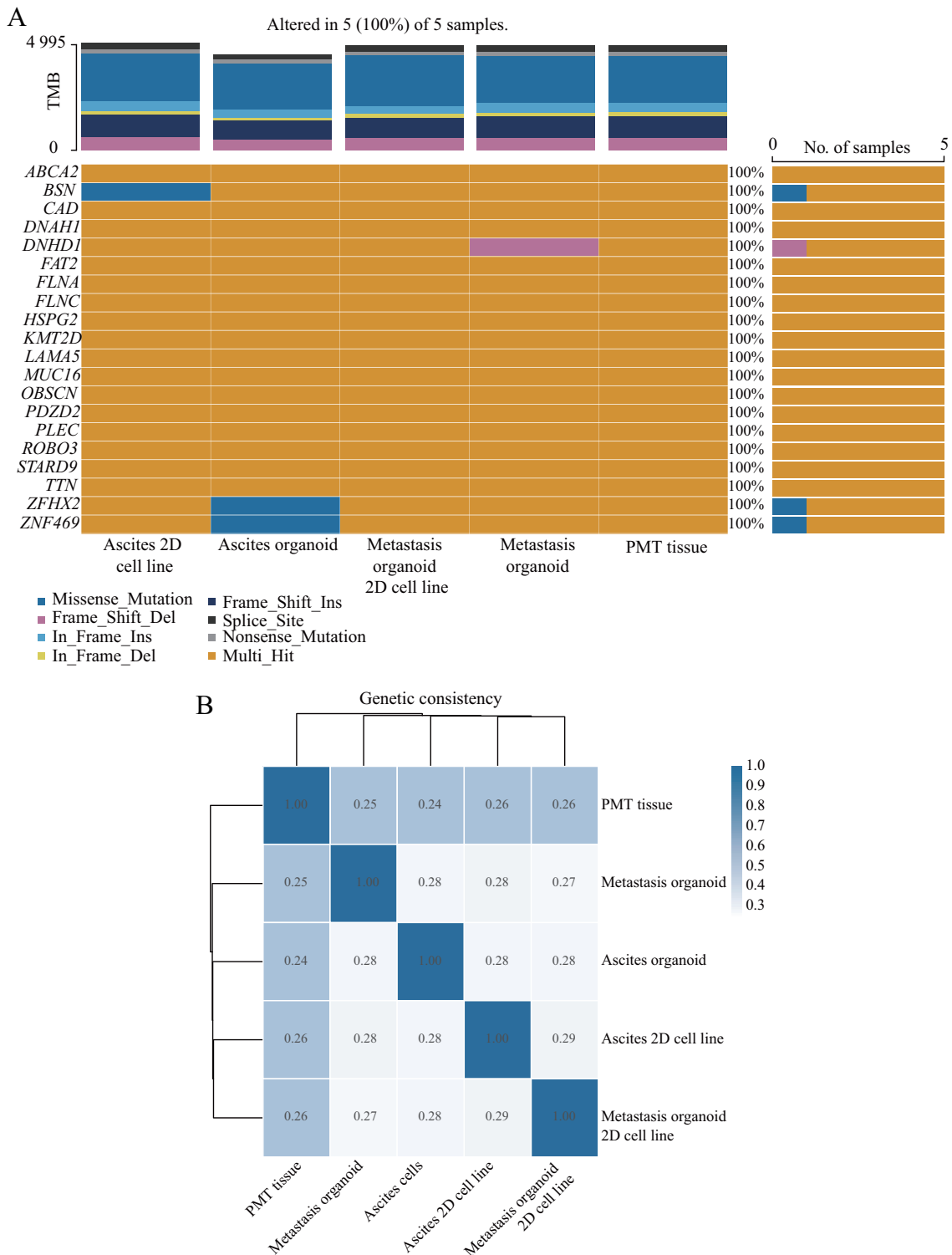


图4 CRC-PM原发肿瘤、类器官及2D细胞系的突变谱一致性分析

Fig. 4 Comparative analysis of mutation profile consistency among primary tumors, organoids, and 2D cell lines of CRC-PM

A: Mutation waterfall plot of primary tumor, organoids and derived 2D cell lines; B: Correlation heatmap showing genetic similarity among samples.

提示点突变是该队列类器官体细胞变异的主要来源。进一步对SNV的碱基替换谱进行分析，C>T和C>G是最常见的两种替换类型（图5C），与结直肠癌常见的替换特征一致。突变负荷方面，不同类器官样本的体细胞变异数量存在一定个体差异，但整体分布相对集中，中位突变数为4 877个（图5D）。将变异按功能类别进一步拆分后，

各样本在错义、移码及其他类型变异的构成比例方面整体一致（图5E），未见明显的“变异类型偏移”，提示在当前培养和传代条件下类器官未出现显著的突变类型结构改变。高频突变基因统计显示，TTN、DNHDI、FAT2、FLNC及FLNA等在多个类器官样本中具有较高出现频率（图5F）。需要说明的是，部分基因（如TTN）本身

编码序列较长，易在外显子测序中呈现较高突变检出率，因此其高频性更适合作为总体突变负荷与样本间一致性比较的参考指标，而非直接推断特异驱动事件。总体而言，上述结果表明，

CRC-PM类器官在体外扩增过程中能够较稳定地维持其体细胞变异的类型构成和突变负荷分布，为后续开展遗传背景控制下的功能研究和药物反应评估提供了依据。

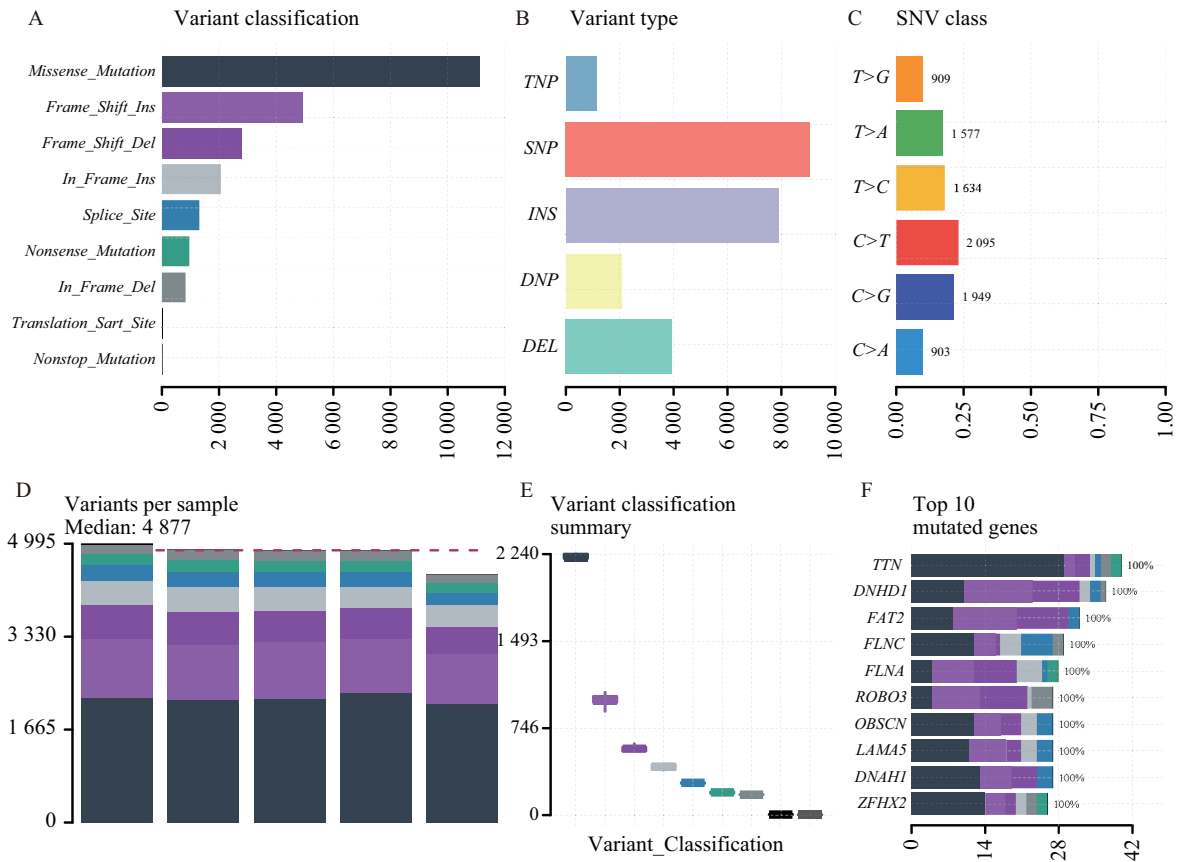


图5 CRC-PM类器官的突变类型及突变负荷特征分析

Fig. 5 Analysis of mutation types and mutational burden characteristics in CRC-PM organoids

A: Distribution of functional categories of somatic mutations. B: Classification of mutation types, including single nucleotide polymorphism (SNP), insertions (INS) and deletions (DEL). C: Base substitution patterns of single nucleotide variants. D: Distribution of tumor mutational burden across samples, with the dashed line indicating the median value. E: Summary of mutation counts across different functional categories. F: Top 10 most frequently mutated genes identified in colorectal cancer organoid samples.

3 讨论

CRC-PM具有播散范围广、病灶异质性高、疗效评估及取材困难等特点，临床上迫切需要能够反映患者真实生物学特征且便于重复验证的体外模型^[22]。高保真模型的不足一直限制了CRC-PM机制研究和精准治疗策略的推进。既往CRC类器官模型的研究多以原发灶或单一部位转移灶为主要对象，而针对CRC-PM这一临床预后差、治疗选择有限且取材困难的亚群，尤其是同时覆盖腹膜转移灶和腹水来源的类器官模型构建和鉴定的研究相对有限。本研究建立了转移灶来源和腹水来源的CRC-PM类器官体系，并结合临床病理学特征及外显子测序技术，对模型的表型与基因型一致性进行了系统验证，提供了一套可

用于后续研究和转化的标准化模型构建和鉴定体系。本研究主要基于1例同时拥有腹膜转移灶和腹水双病灶样本的CRC-PM患者，构建了其相应的类器官模型，因此本研究重点在于模型构建流程及其验证，所得结论以方法学和探索性结果为主。结合目前累计处理的5例CRC-PM患者样本的经验，腹膜转移灶和腹水双来源类器官建模的总体成功率约为20%，提示该类样本在体外建模中存在一定技术难度。分析建模失败或扩增困难的原因可以发现，腹膜转移组织及腹水样本中非肿瘤细胞比例较高，尤其是成纤维细胞在培养早期可能快速增殖并抑制肿瘤上皮类器官的生长，同时腹水样本中肿瘤细胞比例波动较大且起始细胞量有限，会大大降低类器官建立效率。针对上述问题，本研究在成功案例中总结了有助于提高

首代存活率和后续稳定传代的操作经验, 主要包括: 在首代培养阶段短期加入 Y-27632 试剂以减少细胞凋亡; 在出现少量成纤维细胞时通过降低接种密度减缓其扩增; 在传代过程中将消化后的类器官团块大小控制在 30 μm 左右, 以兼顾复苏效率与生长速度。

模型可靠性首先取决于是否能稳定维持肿瘤上皮结构及关键分子表型。本研究显示, 所建类器官在相应的培养条件下可形成稳定的 3D 球状结构并可连续传代; IHC 进一步证实, 类器官在上皮谱系标志物 (CK20、Pan-CK)^[23]、细胞黏附分子 (E-cadherin)^[24]、Wnt 通路相关蛋白 (β -catenin)^[25] 及增殖活性 (Ki-67 增殖指数)^[26] 方面与配对肿瘤组织具有较高一致性。上述结果提示该体系能够在体外维持肿瘤上皮细胞的主要分化状态和空间表达特征, 为后续开展靶点干预、耐药机制及药效评价提供了必要的表型基础。在同一 CRC-PM 患者来源的腹膜转移灶和腹水样本中同时建立类器官及其衍生的 2D 肿瘤细胞系, 也为比较不同来源肿瘤细胞的共有和差异特征提供了配对模型。两种类器官在蛋白表达层面均表现出结直肠癌肿瘤上皮特征的一致性, 而在培养过程及生长行为方面仍存在一定差异: 腹膜转移灶来源类器官整体生长较为平稳, 形态相对均一, 其衍生 2D 细胞系多表现为稳定贴壁生长; 腹水来源的类器官则更易出现生长速度偏快及形态波动较大的表现, 其衍生 2D 细胞系常呈现半悬浮或贴壁不牢的培养特征。上述现象提示, 尽管两类模型共享相似的肿瘤上皮谱系特征, 但腹膜种植灶与腹腔游离肿瘤细胞在体外生长行为上可能仍存在适应性差异。

在遗传层面, WES 结果显示, 类器官及其衍生 2D 细胞系总体保留了原始肿瘤的主要体细胞突变事件, 不同样本间突变谱具有可量化的一致性; 在变异类型方面以 SNV 为主, C>T 替换较为常见, 整体符合结直肠癌的典型突变特征。相较传统细胞系易出现克隆选择和遗传漂移的局限, 本研究在类器官层面观察到较稳定的突变构成和突变负荷分布, 提示该体系在一定程度上可作为“遗传背景相对恒定”的功能研究平台。需要强调的是, 本研究也观察到部分位点/基因在组织、类器官与 2D 细胞系之间存在差异, 这更可能反映肿瘤内异质性及体外培养选择压力下亚克隆比例的变化^[27], 提示在开展机制推断或药敏关联分析时应优先关注重复出现的核心事件, 并结合

配对样本进行交叉验证。

本研究仍存在一定局限性。当前体系主要富集肿瘤上皮成分, 缺乏成纤维细胞、免疫细胞及间皮细胞等关键微环境组分, 因此对免疫治疗反应、基质屏障与细胞间相互作用的模拟仍不充分。此外, 本研究获得的组织和腹水样本主要来自同一患者, 大部分研究结果是基于描述性分析, 且主要围绕形态学、免疫表型及基因组层面的模型一致性评价, 在功能学和转化应用方面仍有待进一步完善, 例如, 尚未系统开展基于类器官的化疗药物敏感性评估以及迁移、侵袭或克隆形成等肿瘤生物学功能实验, 目前尚未建立体外药物反应与患者临床疗效之间的对应关系。下一步工作可聚焦于: ① 构建肿瘤类器官与自体免疫细胞/腹水免疫细胞的共培养体系, 以提高对腹腔微环境的还原度; ② 在多时间点和多部位取材基础上, 结合单细胞或空间组学追踪亚克隆动态, 评估培养过程中可能的选择性富集; ③ 将类器官药敏结果与实际治疗反应进行前瞻性对照验证, 明确其在治疗决策支持中的可行性和边界。

总体而言, 本研究提供了一个经过多维度验证的 CRC-PM 患者来源模型体系, 能够为腹膜转移机制解析、药物筛选及转化研究提供可重复的实验平台。

第一作者:

邵岩飞 (ORCID: 0000-0003-4228-4833), 博士, 住院医师。

通信作者:

孙晶 (ORCID: 0000-0003-2110-5189), 博士, 主任医师, E-mail: sj11788@rjh.com.cn。

作者贡献声明:

邵岩飞: 负责类器官及其细胞系模型的构建与验证, 主导论文撰写与修改; 陈欣仪: 参与模型构建和鉴定相关实验, 论文撰写和修改; 郑煌: 采集患者标本和临床信息; 陈朝朝: 参与模型构建和鉴定相关实验; 刘楠钦: 论文撰写和修改; 孙晶: 负责研究的整体思路设计与执行, 指导论文撰写与修改。

[参 考 文 献]

- [1] 中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会. 结直肠癌腹膜转移诊治专家共识(2025版)[J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2025, 17(3): 275-281.
Colorectal Cancer Professional Committee, Chinese Medical Doctor Association. Expert consensus on the diagnosis and treatment of colorectal cancer peritoneal metastasis (2025 edition)[J]. J Dig Oncol Electron Version, 2025, 17(3): 275-281.
- [2] KRANENBURG O, VAN DER SPEETEN K, DE HINGH I.

- Peritoneal metastases from colorectal cancer: defining and addressing the challenges[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 650098.
- [3] FOSTER J M, ZHANG C M, REHMAN S, et al. The contemporary management of peritoneal metastasis: a journey from the cold past of treatment futility to a warm present and a bright future[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 49–71.
- [4] FRANKO J, SHI Q, MEYERS J P, et al. Prognosis of patients with peritoneal metastatic colorectal cancer given systemic therapy: an analysis of individual patient data from prospective randomised trials from the Analysis and Research in Cancers of the Digestive System (ARCAD) database [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(12): 1709–1719.
- [5] RAMOS C, GERAKOPOULOS V, OEHLER R. Metastasis-associated fibroblasts in peritoneal surface malignancies[J]. *Br J Cancer*, 2024, 131(3): 407–419.
- [6] SANDOVAL P, JIMÉNEZ-HEFFERNAN J A, RYNNE-VIDAL Á, et al. Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells *via* mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis[J]. *J Pathol*, 2013, 231(4): 517–531.
- [7] SERRATÌ S, PORCELLI L, FRAGASSI F, et al. The interaction between reactive peritoneal mesothelial cells and tumor cells *via* extracellular vesicles facilitates colorectal cancer dissemination [J]. *Cancers*, 2021, 13(10): 2505.
- [8] WOLF D, SALCHER S, PIRCHER A. The multivisceral landscape of colorectal cancer metastasis: implications for targeted therapies[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(5): e178331.
- [9] REN Q H, VERMEULEN L. Shaping the microenvironment in peritoneal metastases[J]. *Nat Cancer*, 2025, 6(3): 412–414.
- [10] KAPPEN J, ABDEL-RAHMAN O. Advances in pharmacotherapy for the treatment of peritoneal metastases from colorectal cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2025, 26(1): 17–30.
- [11] QI G X, ZHAO R X, GAO C, et al. Recent advances and challenges in colorectal cancer: from molecular research to treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2025, 31(21): 106964.
- [12] LIU S X, ZHANG R, LIU Y C, et al. Cancer patient-derived organoids: novel models for the study of natural products[J]. *Int J Biol Sci*, 2025, 21(10): 4485–4503.
- [13] LESAVAGE B L, SUHAR R A, BROGUIERE N, et al. Next-generation cancer organoids [J]. *Nat Mater*, 2022, 21(2): 143–159.
- [14] FURBO S, URBANO P C M, RASKOV H H, et al. Use of patient-derived organoids as a treatment selection model for colorectal cancer: a narrative review [J]. *Cancers*, 2022, 14(4): 1069.
- [15] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. *Science*, 2018, 359(6378): 920–926.
- [16] 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.
- [17] POGGI A, MATIS S, BENELLI R. The *in vitro* adaptation of patient-derived organoids suggests alternative strategies against CMS1 colorectal cancer: when the microenvironment does make the difference[J]. *Cancers*, 2022, 14(24): 6086.
- [18] AL-KABANI A, HUDA B, HADDAD J, et al. Exploring experimental models of colorectal cancer: a critical appraisal from 2D cell systems to organoids, humanized mouse avatars, organ-on-chip, CRISPR engineering, and AI-driven platforms—challenges and opportunities for translational precision oncology [J]. *Cancers*, 2025, 17(13): 2163.
- [19] HOGENSON T L, XIE H, PHILLIPS W J, et al. Culture media composition influences patient-derived organoid ability to predict therapeutic responses in gastrointestinal cancers [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(22): e158060.
- [20] RIZZO G, BERTOTTI A, LETO S M, et al. Patient-derived tumor models: a more suitable tool for pre-clinical studies in colorectal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 178.
- [21] VARINELLI L, BATTISTESSA D, GUAGLIO M, et al. Colorectal carcinoma peritoneal metastases-derived organoids: results and perspective of a model for tailoring hyperthermic intraperitoneal chemotherapy from bench-to-bedside [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 132.
- [22] KAUR H, WRIGHT J A, WORTHLEY D L, et al. Precision medicine for peritoneal carcinomatosis: current advances in organoid drug testing and clinical applicability [J]. *Organoids*, 2025, 4(1): 2.
- [23] DESETTE A, GUICHET P O, EMAMBUX S, et al. Deciphering brain metastasis stem cell properties from colorectal cancer highlights specific stemness signature and shared molecular features [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 16(5): 757–782.
- [24] SHIN A E, GIANCOTTI F G, RUSTGI A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(4): 222–236.
- [25] ZHAO H, MING T Q, TANG S, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144.
- [26] KASPRZAK A. Prognostic biomarkers of cell proliferation in colorectal cancer (CRC): from immunohistochemistry to molecular biology techniques [J]. *Cancers*, 2023, 15(18): 4570.
- [27] 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.

(收稿日期: 2026-02-28 修回日期: 2026-03-21)

(责任编辑: 李广涛)