

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.008

· 技术方法 ·

患者肿瘤组织来源的胶质母细胞瘤类器官的制备方法

赖名耀^{1a}, 李少群^{1a}, 李新晨², 邵媛², 郁洁², 李海南^{1b}, 李娟^{1a}, 胡清军^{1a}, 周江芬^{1a}, 艾茹玉^{1a}, 周兆明^{1a}, 林涛^{1c}, 金鑫^{1c}, 穆林森^{1c}, 欧阳辉^{1c}, 鲁明^{1c}, 范晓虎², 蔡林波^{1a} (1. 广东三九脑科医院 a. 肿瘤科; b. 病理科; c. 神经外科, 广东 广州 510510; 2. 南京传奇生物科技有限公司, 江苏 南京 211100)

[摘要] **目的:** 探讨胶质母细胞瘤(GBM)患者肿瘤组织来源的GBM类器官(GBO)模型的制备方法。**方法:** 选取2021年广东三九脑科医院新诊断经病理确诊的8例GBM患者的新鲜肿瘤组织标本, 将其剪成0.5~1 mm大小的组织碎片并用特制的培养基进行培养, 待其成球且直径达到1 mm时剪小传代, 同时选取培养2周以上的GBO进行石蜡包埋、切片, 后进行H-E染色和免疫组化染色检测, 并与亲本GBM组织进行组织学与细胞学的比较。**结果:** 成功培养2例可传代冻存的GBO, 并建立GBO生物库。H-E染色结果显示, GBO保留了与亲本GBM组织相似的组织结构和细胞形态; 免疫组化实验结果显示, GBO与GBM组织中GFAP、OLIG2、Ki67和ATR X分子的表达情况一致。**结论:** 将患者来源的GBM组织在体外剪小并用特制培养基培养, 可构建与GBM患者肿瘤组织在组织和细胞层面一致的GBO。

[关键词] 胶质母细胞瘤; 类器官; 制备方法; 组织鉴定

[中图分类号] R739.41; R73-35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)07-0659-06

A preparation method for the organoid model of patient-derived glioblastoma

LAI Mingyao^{1a}, LI Shaoqun^{1a}, LI Xinchun², SHAO Yuan², YU Jie², LI Hainan^{1b}, LI Juan^{1a}, HU Qingjun^{1a}, ZHOU Jiangfen^{1a}, AI Ruyun^{1a}, ZHOU Zhaoming^{1a}, LIN Tao^{1c}, JIN Xin^{1c}, MU Linsen^{1c}, OUYANG Hui^{1c}, LU Ming^{1c}, FAN Xiaohu², CAI Linbo^{1a} (1. a. Department of Oncology; b. Department of Pathology; c. Department of Neurosurgery, Guangdong 999 Brain Hospital, Guangzhou 510510, Guangdong, China; 2. Nanjing Legend Biotech Co., Ltd, Nanjing 211100, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore a preparation method for glioblastoma organoid (GBO) derived from patients with glioblastoma (GBM). **Methods:** The fresh tumor tissue samples of eight GBM patients newly diagnosed and pathologically confirmed in Guangdong 999 Brain Hospital in 2021 were selected, cut into tissue fragments of 0.5-1 mm in size and cultured in a special medium. When the tissue fragments grew into a spherical shape and the diameter reached 1 mm, they were cut into small pieces and passaged. GBOs cultured for more than 2 weeks were selected for paraffin-embedding, sectioned, and then stained with H-E and immunohistochemical staining. Histological and cytological comparisons were performed with parental GBM tissues. **Results:** Two cases of GBO that could be passaged and cryopreserved were successfully prepared and a GBO biobank was established. The results of H-E staining showed that GBOs retained tissue structure and cell morphology similar to those of the parental GBM tissues. The results of immunohistochemical analysis showed that the expressions of GFAP, OLIG2, Ki67 and ATRX in GBO and parental GBM tissues were basically consistent. **Conclusion:** GBO can be generated *in vitro* by trimming patient-derived GBM tissue and culturing it in a suitable medium. The GBO prepared by this method is consistent with the parental GBM tissue at the histological and cytological levels.

[Key words] glioblastoma (GBM); organoids; preparation method; tissue identification

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(7): 659-664. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.008]

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)为颅内最常见的原发性恶性脑肿瘤, 发病率为3.2/10 000^[1], 治疗手段有限, 临床上常用手术、放疗、化疗及肿瘤电场治疗^[2], 患者预后差, 复发率极高, 中位生存期仅为14~15个月, 5年生存率不足10%^[3]。近年来, 新兴疗法如靶向治疗和免疫治疗已成为GBM的研究热点, 但肿瘤异质性^[4]和免疫微环境^[5]等问题导致临床研究结果不佳^[6]。在临床前研究^[7-8]中, 常用的GBM肿瘤

模型采用人源肿瘤细胞异种移植和人源肿瘤组织来源移植瘤模型, 但两者均无法再现临床肿瘤的异质性和微环境, 用于药物开发和临床疗效预测具有一定的局限性。近年来兴起的肿瘤组织类器官模型弥

[作者简介] 赖名耀(1980—), 男, 硕士生, 主要从事胶质瘤的放射治疗研究, E-mail: sanjiubraintumort@163.com

[通信作者] 蔡林波, E-mail: cailinbo999@163.com

补了以上缺点。类器官作为3D细胞培养物高度模拟人体组织,具有与亲本组织相似的结构和功能,使得体外研究结果更加接近体内真实情况^[9-10]。肿瘤组织类器官已广泛覆盖各种类型的实体瘤^[11-18],并应用于体外肿瘤免疫微环境的建立^[19]、药物敏感性检测、肿瘤发展与耐药机制研究^[13,20]等各个方面。本研究探索胶质母细胞瘤类器官(glioblastoma organoid, GBO)的制备方法,通过将肿瘤组织剪成小的碎片,在三维条件下培养形成类器官球组织,为后续GBM患者的个体化治疗研究提供实验模型。

1 材料与方法

1.1 GBM标本来源

肿瘤组织标本取自2021年3月至11月在广东三九脑科医院新诊断GBM患者,纳入研究患者共8例,所有患者均行MRI影像检查,按照2016年WHO中枢神经系统肿瘤诊断标准确认为GBM,研究方案经广东三九脑科医院伦理委员会批准(伦理审批编号:2020-040-073)。

1.2 主要试剂

两性霉素B(货号:S1636)购自美国Selleckchem公司,Hibernate-A培养基(货号:A12475-01)、神经基质培养基(货号:21103-049)、DMEM/F12培养基(货号:11320-033)、100×N2添加剂(货号:17502-048)、50×B27添加剂(货号:17504-044)、100×GlutaMAX(货号:35050-061)、100×MEM NEAA(货号:11140-050)、青链霉素双抗(货号:15140-122)均购自美国Gibco公司,人胰岛素(货号:I9278-5ML)购自Sigma公司, β -巯基乙醇(货号:21985023)购自赛默飞世尔科技有限公司,6孔低吸附培养板(货号:3471)购自美国康宁公司,Y-27632(货号:72306)购自加拿大Stemcell公司。免疫组化抗体:一抗GFAP抗体(货号:CGM-0150)购自赛诺特生物,OLIGO2抗体(货号:GT221302)、ATRX抗体(货号:GT224102)、Ki67抗体(货号:GT209407)均购自基因科技股份有限公司。

1.3 培养基配制

组织清洗液:含青链霉素双抗的DPBS溶液;组织剪切液:Hibernate-A培养基中加入1×GlutaMax、100 U/mL青链霉素双抗、2 μ g/mL两性霉素B;类器官完全培养基:参考文献[21]并做了如下改进:向50% DMEM/F12培养基中加入50%神经基质培养基、1×N2添加剂、1×B27添加剂、1×GlutaMAX、1×MEM NEAA、100 IU/mL青链霉素双抗、2.5 μ g/mL人胰岛素、50 μ mol/L β -巯基乙醇,并混合均匀;类器官冻存液:向类器官完全培养基中加入10% DMSO

和10 μ mol/L的Y-27632。

1.4 GBO的培养

取术中切除的新鲜GBM组织,严格按照无菌操作原则将肿瘤组织放入提前预冷的Hibernate-A培养基中保存,取回的肿瘤组织标本放入90 mm培养皿内,用组织清洗液清洗3次,尽可能地去血块、坏死及非肿瘤组织;将清理干净的组织放入组织切割液中,将肿瘤组织剪成0.5~1 mm直径的肿瘤组织碎片,收集于15 mL无菌离心管,用10 mL DPBS缓冲液清洗2次后,用红细胞裂解液去除红细胞,再用10 mL DMEM/F12培养基清洗2次,最后用GBO培养液重悬肿瘤组织碎片;取干净的低吸附6孔培养板,每孔加入4 mL类器官培养液,每孔加入的肿瘤组织碎片约为20个,然后放入培养箱进行培养。在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、90%湿度培养箱中培养,每隔48 h换液1次,1~2周后GBM组织碎片可培养形成球形的GBO。

1.5 GBO的传代、冻存和复苏

GBO传代:肿瘤组织生长到一定程度,组织球中间会因缺氧和营养出现坏死。因此,GBO培养时间超过4周或组织球的直径大于1 mm时可进行传代培养;将直径大于1 mm的GBO放置在玻璃皿中,用精细剪刀将GBO剪成0.5 mm左右的肿瘤组织碎片。剪完后收集组织球碎片至15 mL离心管,弃上清液,用DMEM/F12培养基清洗3次,再用GBO培养基重悬肿瘤组织碎片,放置于低吸附6孔板中继续培养。

GBO冻存:用精细剪刀将GBO剪成0.3 mm左右的肿瘤组织碎片,用GBO培养基清洗1次去除细胞碎片,用含有10 μ mol/L的Y-27632的GBO培养基重悬,孵育1 h后收集肿瘤组织碎片于15 mL离心管,弃上清液,再用GBO冻存液重悬组织碎片,室温中静置15 min,后按照每管20个GBO进行分装,放入程序降温盒中进行冻存,24 h后转移至液氮罐中长期保存。

GBO复苏:从液氮罐中取出冻存管,采用37 $^{\circ}$ C水浴快速复温,将液体转移至15 mL离心管,然后逐滴加入含有10 μ mol/L的Y-27632的GBO培养基,同时轻摇离心管缓慢稀释DMSO,弃上清液,用DMEM/F12培养基清洗1次,然后用含有10 μ mol/L的Y-27632的GBO培养基重悬,温箱过夜培养,第2天将培养基换成无Y-27632的GBO培养基继续培养,培养1~2周后组织可呈球形并用于后续实验。

1.6 H-E染色法观察GBO的形态

将培养的球形类器官转移至吸水纸上,包裹好后经4%多聚甲醛溶液中固定24 h,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋和切片。切片厚度为4 μ m,常规二甲苯脱蜡、透明、梯度乙醇下行复水,苏木精染色、1%盐酸乙醇分色,流水冲洗、返蓝后,伊红

复染,梯度乙醇上行脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,室温阴干。对患者原发灶的亲本肿瘤组织和类器官的H-E染色结果进行鉴定。鉴定的标准为GBO组织保留与GBM(亲本)组织一致的细胞类型和形态。

1.7 免疫组织化学染色法观察GBO中GFAP、OLIG2、Ki67和ATRX的表达

包埋、切片、烤片、脱蜡、复水方法同上。置于高压锅内沸水中进行抗原修复3 min,3% H₂O₂阻断非特异性,室温封闭30 min,在GFAP抗体、OLIG2抗体、ATRX抗体、Ki67抗体(抗体均为工作液,直接使用)37℃处理1 h,二抗酶标羊抗兔/小鼠IgG聚合物(工作液,直接使用)37℃处理1 h,DAB显色1 min,苏木精复染30 s后脱水透明、中性树胶封片,室温阴干。对患者原发灶的亲本肿瘤组织和类器官的免疫组化分子检测结果进行鉴定。鉴定的标准为类器官保留与GBM组织表达相同的分子,包括GFAP、OLIG2、Ki67和ATRX,以验证

培养出的GBO与GBM组织的一致性。

2 结果

2.1 剪小的GBM组织可培养形成球形的GBO

与国内报道的用单细胞与基质胶共培养的方法建立类器官不同,本实验采用的是将GBM组织剪成细小的组织碎片,在特殊的无血清培养基中培养形成球形组织,该方法制备的类器官更加接近亲本肿瘤组织。8例GBM组织中,003号与007号剪碎的GBM组织碎片在1周内即可形成紧密的球形GBO,并能够持续生长(表1、图1A);当初代GBO球体培养到2周或球体直径大于1 mm时进行传代,剪小的肿瘤组织碎片可在1周内再次成球,形成GBO(图1B)。实验结果表明,GBM类器官在体外可进行传代。此外,还发现GBO冻存复苏后仍能继续生长形成紧密的球体,由此建立GBO生物库。

表1 8例GBM患者临床资料和GBO制备的情况

编号	性别	年龄/岁	肿瘤位置	肿瘤切除程度	IDH-1 突变	Ki67/%	术后治疗	GBO 制备
001	男	59	左侧额叶	全切	否	20	放疗+化疗	失败
002	男	67	右侧颞叶、侧脑室室管膜,左侧额岛叶-基底节区	全切	否	15	无	失败
003	男	72	左侧颞岛叶-基底节区	次全切	否	50	放疗+化疗	成功
004	男	65	右侧颞叶	全切	否	30	放疗+化疗	失败
005	女	56	右侧颞岛叶	全切	否	3	单纯化疗	失败
006	男	57	左侧额顶叶-胼胝体膝部	大部分切	否	30	放疗+化疗	失败
007	女	81	右侧颞叶	近全切	否	15	无	成功
008	女	49	右侧额顶叶-侧脑室后角	大部分切	否	40	无	失败

2.2 GBO保留了亲本肿瘤的组织细胞学特征

H-E染色结果(图2)显示,003、007号患者GBM组织和GBO组织均表现出细胞的多形性和核分裂象,两者在结构上高度相似。此外,003号与007号患者的GBM组织与培养至第2代的GBO组织免疫组化染色结果(图3)显示,两组织中GFAP、OLIG2、Ki67和ATRX的表达程度也高度相似。实验结果表明,2例GBO均保留了与GBM一致的组织学与细胞学特征。

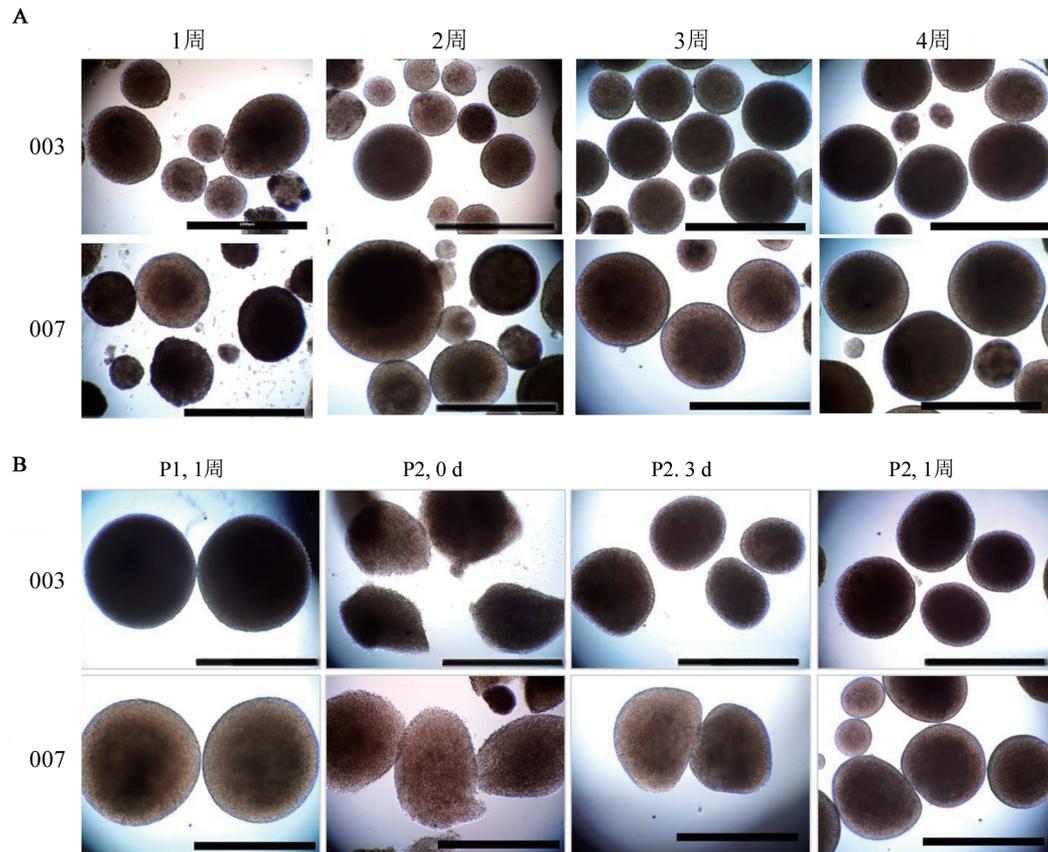
3 讨论

早期研究^[22-23]报道,将GBM组织解离成单细胞悬液,再和基质胶混合在含有碱性成纤维细胞生长因子和表皮生长因子的培养基中,经2个月后培养成最大直径约3~4 mm的类器官,相比肿瘤细胞构建的

类器官,更好地保留了细胞的异质性,再现了体内肿瘤的低氧梯度和肿瘤干细胞的异质性,但是此方法也具有一些不足之处:(1)可能不利于敏感细胞类型的存活并破坏天然细胞与细胞之间的相互作用;(2)在外源性生长因子、小分子或血清存在的情况下培养,会有克隆选择和无法保留的原始肿瘤细胞的类型,这些成分的添加可能与正在测试的药物相互作用,使药物治疗后结果的解释也变得复杂了;(3)培养周期长且通量小,不能完整概括母体肿瘤的特征,培养成功率尚不明确。还有其他类器官模型,如使用胶质瘤细胞的生物打印和芯片上的细胞外基质来实现高通量药物测试等,但这些类器官概括肿瘤的细胞异质性和组织的能力尚不确定^[24]。本研究采用的是无血清培养基,这种方法没有将肿瘤标本解离消化,而是将标本剪成0.5~1 mm左右的碎片,较好地

保留了细胞之间的相互作用及肿瘤异质性,培养出的类器官更接近亲本组织。类器官的鉴定主要依靠与原组织进行H-E染色和免疫组化染色相关分子表达进行对比,有条件的还会进行基因组测序,在基因水平上进行对比^[25]。本研究成功构建了GBO并使用

H-E染色和免疫组化染色法进行了鉴定。培养出的GBO表现出与亲本肿瘤组织类似的组织细胞特征,GFAP、Ki67、OLIG2和ATRX的表达情况也相似。因此,初步认为本次构建的GBO在组织和细胞层面可以代表原GBM组织。



P1: 第一代类器官;P2: 第二代类器官
图1 GBM组织碎片制备的GBO的成球实验(A)及可传代性(B)(标尺=1 mm)

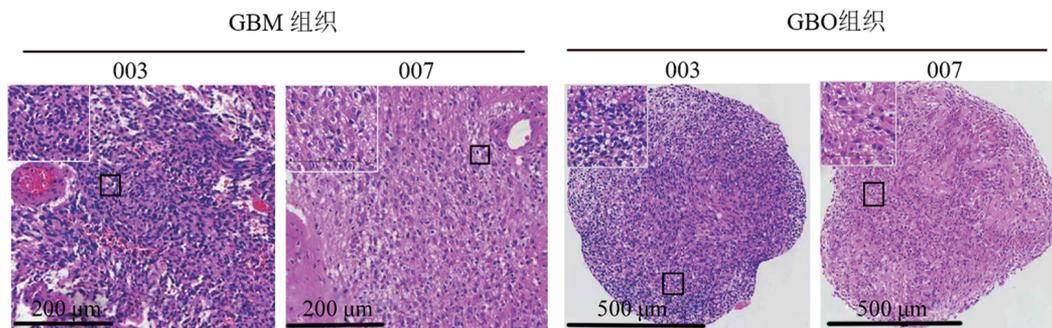


图2 003、007号患者GBM组织与GBO组织H-E染色结果比较

在国内鲜有成功培养脑肿瘤类器官的情况下,本研究参考国外已发表的研究成果^[21],共收集8例GBM,其中2例成功培养出与亲本肿瘤在组织和细胞形态上相似的GBO,在实验过程中总结的经验和注意事项如下:(1)严格限制从组织切除到处理的时间,制备培养类器官的肿瘤样本应确保新鲜,肿瘤组

织离体时间太长会影响其组织活性,001号组织就是因为离体时间太久、活性降低而制备失败;(2)肿瘤组织取材方法很关键,需要与外科医生密切协调,在不进行烧灼的情况下整体切除肿瘤组织,并与病理学家快速确认诊断,尽可能去除非肿瘤组织或坏死组织,004号与006号的类器官均因切取的肿瘤组织

中有坏死组织无法存活而致培养失败;(3)肿瘤组织质量极大地影响类器官的形成和保真度,低肿瘤细胞密度可以影响类器官衍生效率,镜下观察002号培养出的类器官发现球体不够密实,为低质量的GBO,后续无法继续长大存活;(4)肿瘤本身的特性及取材

过少也会导致类器官培养不成功,如005号与008号。总之,新鲜、细胞密集的GBM组织比重度烧灼、经抽吸或高度坏死和细胞稀疏的GBM组织更易培养成功。

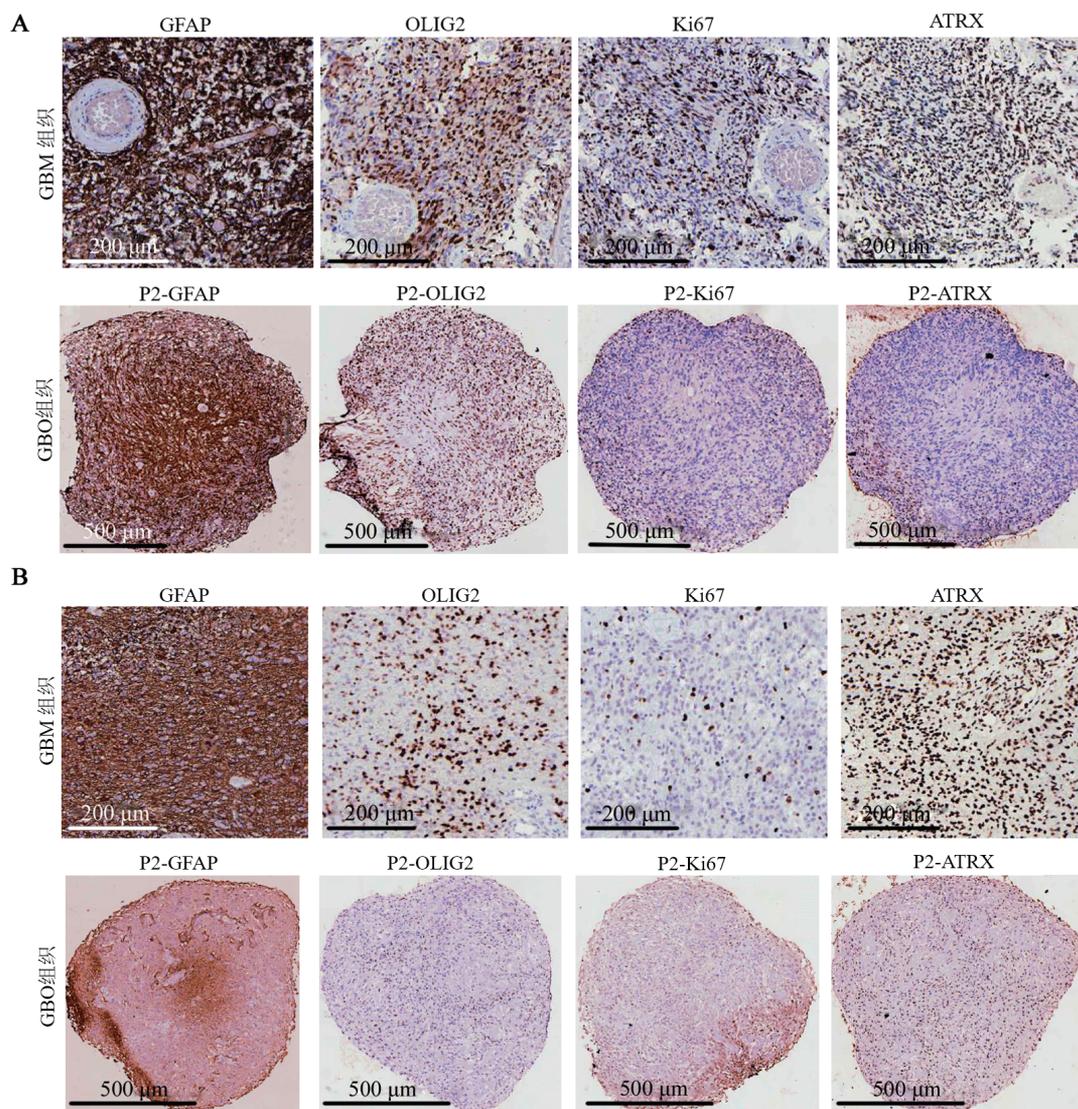


图3 003、007号患者GBM和GBO组织中GFAP、OLIG2、Ki67和ATRX的表达

GBO培养成功到其应用于实验模型还有许多问题需要解决,如GBO中可能存在一些非肿瘤细胞,如何精确地评估类器官中的肿瘤细胞数是后续研究中需要解决的问题。另外,当GBO生长到直径大于1 mm时,球体中心由于缺氧及无法获取足够的营养物质可能会出现坏死,所以鉴定时GBO直径基本在1 mm左右,经过脱水包埋后会萎缩,导致包埋制片难度加大,这为鉴定带来了一定难度。因此,本课题组今后将从取材、剪裁大小、培养液成分、包埋、切片等方面进一步完善GBO的培养和标本制备方法,使其适于大规模培养和广泛鉴定,为类器官应用于GBM研究

打下更坚实的基础。

[参考文献]

- [1] OSTROM Q T, CIOFFI G, GITTLEMAN H, *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016[J/OL]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(Suppl 5): v1-v100[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6823730/>. DOI:10.1093/neuonc/noz150.
- [2] WEN P Y, WELLER M, LEE E Q, *et al.* Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions[J/OL]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(8): 1073-1113[2022-

- 03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7594557/>. DOI:10.1093/neuonc/noaa106.
- [3] STUPP R, TAILLIBERT S, KANNER A, *et al.* Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial[J/OL]. JAMA, 2017, 318(23): 2306-2316[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820703/>. DOI: 10.1001/jama.2017.18718.
- [4] KLUGHAMMER J, KIESEL B, ROETZER T, *et al.* The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space[J/OL]. Nat Med, 2018, 24(10): 1611-1624[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6181207/>. Nat Med, 2018, 24(10): 1611-1624. DOI: 10.1038/s41591-018-0156-x.
- [5] WANG L B, KARPOVA A, GRITSENKO M A, *et al.* Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma[J/OL]. Cancer Cell, 2021, 39(4): 509-528.e20[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8044053/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.01.006.
- [6] TAN A C, ASHLEY D M, LÓPEZ G Y, *et al.* Management of glioblastoma: state of the art and future directions[J]. CA A Cancer J Clin, 2020, 70(4): 299-312. DOI:10.3322/caac.21613.
- [7] LEDUR P F, ONZI G R, ZONG H, *et al.* Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? [J/OL]. Oncotarget, 2017, 8(40): 69185-69197[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5620329/>. DOI:10.18632/oncotarget.20193.
- [8] PATRIZII M, BARTUCCI M, PINE S R, *et al.* Utility of glioblastoma patient-derived orthotopic xenografts in drug discovery and personalized therapy[J/OL]. Front Oncol, 2018, 8: 23[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816058/>. DOI: 10.3389/fonc.2018.00023.
- [9] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease[J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(3): 246-254. DOI:10.1038/ncb3312
- [10] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J/OL]. Science, 2014, 345(6194): 1247125[2022-03-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035496/>. DOI:10.1126/science.1247125.
- [11] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, *et al.* Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer[J/OL]. Cell, 2015, 160(1/2): 324-338 [2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334572/>. DOI:10.1016/j.cell.2014.12.021.
- [12] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M M, *et al.* Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening[J/OL]. Nat Med, 2017, 23(12): 1424-1435 [2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5722201/>. DOI:10.1038/nm.4438.
- [13] GAO D, VELA I, SBONER A, *et al.* Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer[J/OL]. Cell, 2014, 159(1): 176-187[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4237931/>. DOI:10.1016/j.cell.2014.08.016.
- [14] KOPPER O, DE WITTE C J, LÖHMUSSEAR K, *et al.* An organoid platform for ovarian cancer captures intra-and interpatient heterogeneity[J]. Nat Med, 2019, 25(5): 838-849. DOI: 10.1038/s41591-019-0422-6.
- [15] LEE S H, HU W H, MATULAY J T, *et al.* Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J/OL]. Cell, 2018, 173(2): 515-528.e17[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890941/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.03.017.
- [16] 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.e10. DOI:10.1016/j.cell.2017.11.010.
- [17] 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/OL]. Cell Stem Cell, 2018, 23(6): 882-897.e11[2022-03-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224780/>. DOI:10.1016/j.stem.2018.09.016.
- [18] 刘董剑, 杨凌. 食管鳞状细胞癌研究模型: 细胞系、动物移植模型和 3D 培养模型[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(2): 199-210. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.015.
- [19] 罗建华, 刘秋燕. 肿瘤免疫研究新平台——肿瘤组织微环境类器官研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(2): 142-149. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.02.009.
- [20] KARKI R, MAN S M, MALIREDDI R K S, *et al.* NLRC3 is an inhibitory sensor of PI3K-mTOR pathways in cancer[J/OL]. Nature, 2016, 540(7634): 583-587[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5468516/>. DOI:10.1038/nature20597.
- [21] 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/OL]. Cell, 2020, 180(1): 188-204.e22 [2022-03-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883794/>. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.036.
- [22] HUBERT C G, RIVERA M, SPANGLER L C, *et al.* A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found *in vivo*[J/OL]. Cancer Res, 2016, 76(8): 2465-2477[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4873351/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.
- [23] 刘志雄, 刘方琨, 黄兢, 等. 胶质母细胞瘤类器官模型的构建方法和应用: CN110484506B[P]. 2021-04-02.
- [24] YI H G, JEONG Y H, KIM Y, *et al.* A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy[J]. Nat Biomed Eng, 2019, 3(7): 509-519. DOI: 10.1038/s41551-019-0363-x.
- [25] HILL S J, DECKER B, ROBERTS E A, *et al.* Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids[J/OL]. Cancer Discov, 2018, 8(11): 1404-1421[2022-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365285/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0474.

[收稿日期] 2022-03-24

[修回日期] 2022-05-24

[本文编辑] 党瑞山