



评述

结直肠癌类器官的构建与应用

杨志琴¹, 常娟娟¹, 聂尊珍³, 郭英^{1,2,3*}

1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069

2. 延安大学延安医学院, 延安 716000

3. 西安大兴医院, 西安 710069

* 联系人, E-mail: yingguo2nd@aliyun.com

收稿日期: 2024-07-22; 接受日期: 2024-09-12; 网络版发表日期: 2025-01-15

国家自然科学基金(批准号: 82260319)资助

摘要 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一, 对人类健康构成严重威胁. 结直肠癌类器官(colorectal cancer organoids)是通过从患者体内提取肿瘤细胞, 结合三维培养技术在实验室中构建的微型肿瘤模型. 与传统的二维培养系统相比, 结直肠癌类器官能够保留原发肿瘤的分子特征和细胞组成, 在培养环境中模拟真实肿瘤的生物学特性和组织结构. 正因如此, 类器官成为了癌症生物学、药物筛选和个性化治疗等领域的重要研究工具, 并展现出广泛的应用前景. 本文综述了结直肠癌类器官的相关研究进展, 详细探讨了类器官的培养条件, 并总结了其在结直肠癌建模、CRC类器官生物库建设、药物筛选、毒性评估以及个体化治疗等方面的应用进展. 本文旨在为结直肠癌类器官技术在基础研究和临床治疗中的进一步应用提供有益的借鉴与参考.

关键词 结直肠癌, 结直肠癌类器官, 构建, 应用

癌症是世界范围内的一个重要公共问题, 也是全球主要的死亡原因之一, 不仅会给人的身心健康带来极大损伤, 还会造成严重的社会负担^[1]. 研究表明, 胃肠道癌是癌症中导致死亡的主要原因之一, 而结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是近年来诊断较多和较为致命的胃肠道肿瘤^[2]. 手术切除、放疗、化疗是治疗结直肠癌最常用的手段^[3], 但由于CRC起病时具有隐匿性, 绝大多数的CRC患者在初次诊断时就已经处于中后期, 失去了手术切除的机会. 虽然粪便潜血试验和内镜检查等结直肠癌筛查手段能够显著提高患者的生存率, 但由于筛查普及程度有限, 加之结直肠癌发病率的持续上升, 结直肠癌仍然是全球癌症死亡的第二

大原因^[4]. 因此, 探索和开发新的治疗策略, 已成为当前癌症研究的热点之一.

目前, 结直肠癌的研究多基于传统的肿瘤生物学模型, 包括二维癌细胞系和患者来源的肿瘤异种移植(patient-derived xenografts, PDXs)^[5]. 在过去的研究中这两种模型对癌症研究做出了巨大贡献, 然而, 这两种模型存在一些缺陷, 癌细胞系不存在空间组织, 不能模拟体内微环境, 而且它不具备保留肿瘤遗传特性和异质性的能力^[6]. PDX虽然经历了小鼠特异性肿瘤的进化, 但其价格昂贵, 且制作该模型一般长达4个月之久, 不能很好地满足现在的科研需求^[7]. 因此, 迫切需要建立一种能够更好地辅助结直肠癌的临床诊断和治疗的

引用格式: 杨志琴, 常娟娟, 聂尊珍, 等. 结直肠癌类器官的构建与应用. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 239–249

Yang Z Q, Chang J J, Nie Z Z, et al. Construction and application of colorectal cancer organoids (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 239–249, doi: 10.1360/SSV-2024-0143

模型。

近年来,类器官作为一个研究热点,在肿瘤的各类研究中显现出了重要的前景。相较于传统的癌细胞系和肿瘤组织异种移植模型,类器官成本低,生长快速,且构建成功率高,能够模拟人体器官的结构和功能,同时也包含了原代组织的细胞异质性,在研究过程中经过特殊培养,没有完全丢失肿瘤微环境,类器官的出现彻底改变了生物医学研究的体外培养工具。肠道类器官对于探索包括结直肠癌在内的各种肠道疾病的病理机制与治疗方法具有重要意义^[8]。CRC类器官在体外能够复现结直肠癌组织病理的绝大部分特征。近年来,CRC类器官的临床研究取得了巨大的进展。本文就CRC类器官、CRC类器官的模型构建、CRC类器官库的构建、药物筛选、个体化治疗、毒性研究等方面的应用进行综述。

1 肠道类器官的介绍

类器官是在体外构建而成三维细胞团,由多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs)衍生成^[9]。迄今为止,科研工作者们已经成功地开发了小鼠和人体组织的各种类器官培养物,包括食道^[10]、肠^[11]、肾脏^[12]、肝脏^[13,14]、乳腺^[15]、脑^[16,17]和皮肤^[18]等,这些类器官可以有效地模拟正常组织和癌组织的形态结构和表观遗传学^[19]。

肠道类器官又称“迷你肠”^[20],可以分化出几乎所有类群的肠细胞,其中包括干细胞、潘氏细胞、杯状细胞、上皮细胞、内分泌细胞等各种成熟细胞^[21]。肠道类器官主要包括两类:肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)衍生的上皮类器官和PSCs衍生的多细胞类器官^[22]。PSCs衍生的类器官是通过模拟体内发育过程中的相互作用的信号而获得的,成本很高,培养过程比较复杂,主要用于研究类器官的发育,而ISCs衍生的类器官是通过复制各自成体组织固有的信号获得的,其培养周期短且成功率较高^[23]。与肠道干细胞相比,多能干细胞具有更广泛的潜能,可以定向分化为许多成体组织的类器官^[24]。PSCs衍生的类器官不需要活检,由不同的上皮细胞群和周围的未分化间充质细胞层组成,而ISCs是上皮衍生的,不包含组织微环境的组分,但基于ISCs的类器官准确地涵盖了成体组织的稳态条件和再生过程^[23,25]。

成体干细胞衍生的CRC类器官不仅可以从患者切除的肿瘤标本中产生,也可以从活检标本中产生^[26]。构建成体干细胞衍生的CRC类器官首先要将癌细胞从肿瘤组织中分离出来,再将细胞接种到基质胶中,并添加CRC类器官培养基进行培养和传代。使用多能干细胞衍生的类器官进行癌症研究时,发现其并不具有获得性癌症基因突变这一特点。为了解决这个问题,研究团队通过CRISPR-Cas9的方法将癌基因突变转染到PSCs,然后诱导PSCs分化为特定的类器官满足科研需求^[27]。

2 肠道类器官的发展史

肠道黏膜层主要由肠绒毛组成,绒毛基底部有称为隐窝(crypts)的瓮状结构,隐窝内含有负责肠上皮持续更新的干细胞^[28]。在体外类器官出现之前,许多学者致力于重建隐窝-绒毛结构,并研究肠组织的培养物。1996年,Sträter等人^[29]专注于从肠上皮细胞中分离和培养隐窝。然而,离体隐窝在培养后仅4 h就出现凋亡。后续研究表明,要实现肠腺的长期培养,必须添加一些特定的生长因子。2007年,Barker等人^[30]发现,旁分泌的Wnt和Notch信号对于肠道再生至关重要。这些信号通过调控肠道干细胞表面富含亮氨酸重复单位的G蛋白偶联受体(Lgr5⁺)发挥作用,这一发现被认为是类器官培养发展中的重要里程碑。2009年,Ootani等人^[31]不仅进一步证实了Wnt和Notch信号对长期类器官培养至关重要,还解决了小鼠隐窝特定培养条件的问题。同年,荷兰的研究者Sato等人^[32]利用小鼠肠道上皮隐窝底部的Lgr5⁺柱状细胞,在基质胶(Matrigel)中成功建立了第一个类器官。经过8个月的培养,隐窝的特征仍然得以保持。

2011年,Spence等人^[33]成功构建了第一个基于人类多能干细胞的肠道类器官。他们的研究首先将PSCs诱导分化为内胚层,然后使用特定的培养基处理生成肠球,最后将其转移到促进类器官形成的培养体系中,成功生成极化的柱状上皮细胞。这一过程通过体外诱导的方式,将多能干细胞有效转化为肠道类器官,此外,这种类器官不仅可以进行传代,还能通过冷冻和复苏保持稳定的遗传特性和生物学特征。2015年,van de Wetering等人^[34]成功建立了多个结直肠癌肿瘤类器官和癌旁类器官,且其构建成功率高达90%。这些类器官在冷冻和复苏后,成功率达80%。三年后,Fujii等

人^[35]对类器官培养基进行了改进, 调整了Wnt信号通路, 成功建立了5种不同亚型的CRC类器官, 并且这些类器官均保留了原始肿瘤的病理学特征. 从此, 针对不同亚型CRC类器官的培养方法在后续科研中得到广泛应用, 其他癌症类器官的建立也逐渐在国际上取得进展(图1).

3 肠道类器官的培养

模拟肠干细胞微环境是培养肠道类器官的基本原则. Wnt和Notch信号通路对肠道类器官的培养至关重要, 再现肠道干细胞生态位的条件是关键一步. 通常, 肠道类器官的培养基采用高糖DMEM/F12培养基, 并添加多种生长因子以支持细胞生长. 例如, Rspondin-1可激活Wnt通路, EGF促进Lgr5⁺干细胞的增殖, Noggin则通过抑制BMP信号来防止过早分化, 同时也有助于隐窝数量的增加. 为了维持细胞的稳定性, 基础培养基中还常常添加Hepes、谷氨酰胺和抗生素等成分. 值得注意的是, 虽然小鼠肠道类器官可以在上述基础培养条件下成功培养, 但人类正常肠道类器官的培养基需要做一些调整. 例如, 人类结肠类器官培养基通常需要额外添加胃泌素和烟酰胺等成分, 以适应人类肠道干细胞的生长需求^[36]. 在肠道类器官的培养过程中, 建立三维培养体系至关重要, 这可以通过有支架或无支架技术来实现. 常用的三维支架材料包括Matrigel、天然水凝胶和合成水凝胶. Matrigel主要由胶原

蛋白、肌动蛋白、层粘连蛋白、硫酸肝素等黏附蛋白组成, 并包含多种生长因子和基质金属蛋白酶, 能够模拟细胞外基质, 提供结构支持并参与信号传递^[37], 然而, 由于Matrigel的机械强度有限, 且难以精确调控, 近年来研究者逐渐转向水凝胶作为替代材料^[38]. 天然的水凝胶包括多糖类水凝胶(海藻酸钠^[39]、壳聚糖^[40]及透明质酸^[41]等)和蛋白质类水凝胶(I型胶原蛋白^[42]及明胶^[43]等), 而常见的合成类的水凝胶主要有聚乙二醇^[44]、聚丙烯酰胺^[45]、聚异氰多肽^[46]等. 然而, 要在体外构建与体内器官相似的类器官模型, 还需要设计一些技术来调整材料与细胞之间的相互作用, 从而建立一个能够支持类器官稳定生长的三维培养体系^[47]. 目前, 气-液界面培养法用于CRC类器官培养中最常见的方法. 这种方法的优势在于能够改善体外培养环境中的氧气供应, 同时也为类器官的生理学研究提供了更好的可控性^[48]. 此外, 最新研究的微流控技术、生物反应器技术、3D生物打印技术和类器官芯片技术^[49]等也为解决传统类器官培养中的一些挑战提供了有效的方案. 对于无支架技术, 其主要原理是利用重力和表面张力, 将细胞悬浮在平板上特定培养基的液滴中培养, 进而在培养过程中形成所需的三维结构, 促进类器官的生长^[50].

当肠干细胞的信号通路出现异常时, 可能导致结直肠癌的发生. 这些异常的信号通路参与了结直肠癌的凋亡、侵袭、发生及转移. 结直肠癌的发生通常由Wnt信号通路的过度激活及其下游基因突变引发. 在

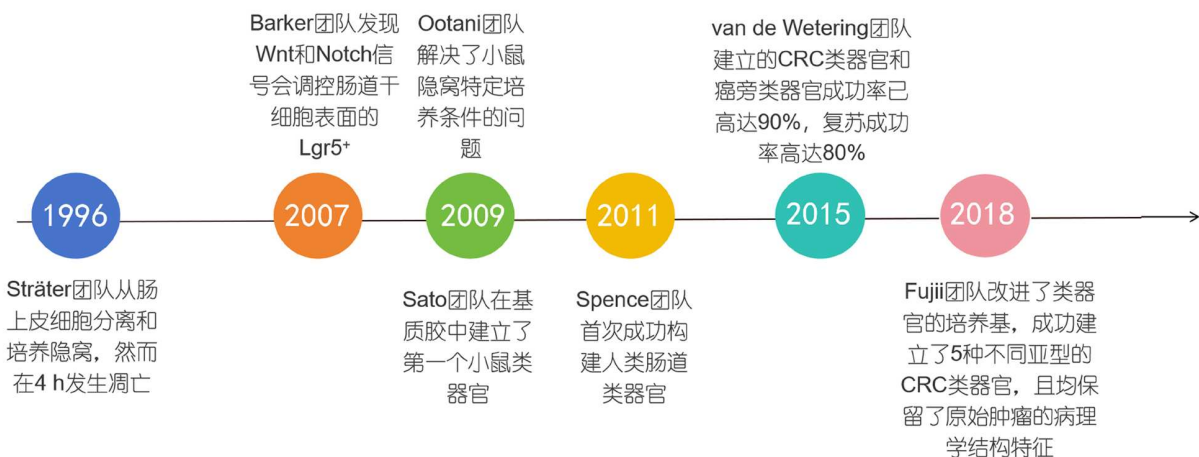


图1 结直肠癌类器官构建的简史图

Figure 1 A brief history map of organoids construction in colorectal cancer

Wnt信号通路中, *APC*基因的突变是结直肠癌早期发展的关键因素, 而下游靶基因*CyclinD1*和*C-Myc*的过度表达则有助于肿瘤的进展^[51]。此外, 在结直肠癌中, Notch信号也常常失调, Notch1能够抑制肿瘤细胞的凋亡并促进其增殖。总之, 肿瘤的生长依赖于Wnt和Notch信号的高活性, 以维持其自我更新能力, 研究结直肠癌中信号通路的变化, 有助于深入理解其发生机制, 并为构建结直肠癌类器官模型提供重要支持。

CRC类器官的建立方法与正常人肠道类器官的培养方法相似, 只需要对正常肠道类器官的培养基进行一定的改造即可培养出CRC类器官。然而, 由于肿瘤细胞对生态位因子的依赖性较低, 因此来源于患者的肿瘤类器官不依赖于培养基中特定的生长因子^[52]。Sato等人^[32]在CRC类器官建立的初期就发现, 在CRC类器官的长期培养过程中, Wnt3A并不是必需的, 这可能与结直肠癌过程中Wnt/ β -catenin信号通路的异常激活有关。尽管Wnt3A, SB202190以及氧浓度等培养条件对CRC类器官的增殖具有重要影响, 并且优化培养条件能够提高类器官的生成效率, 但随着CRC从腺瘤向肿瘤的进展, CRC类器官对这些生态因子的依赖性逐渐降低, 其对某些因素的需求变得可选^[53]。

4 类器官在结直肠癌研究中的应用

肠道类器官是第一个成功培养的一类器官, 也是目前研究最为成熟的一类器官之一。随着类器官技术的不断发展, CRC类器官逐渐成为一个重要的临床前模型, 广泛应用于多个领域。这些领域包括疾病模型的构建、活体类器官库的建立、药物筛选、毒性检测以及个性化医疗等(图2)。这些应用不仅为肠道癌症的研究提供了一个可靠的实验平台, 也为临床治疗方案的优化和个性化治疗的实施提供了新思路。

4.1 结直肠癌模型构建

CRC的发生通常与多个信号通路的基因突变密切相关, 其中包括Wnt/ β -catenin, TGF- β , TP53, RAS-MAPK和PI3K等信号通路^[54], 这些突变会导致细胞增殖、分化、迁移等生物学过程的异常, 从而促进结直肠癌的发生和发展。CRISPR-Cas9是用于基因编辑的突破性技术, 利用CRISPR-Cas9技术, 可以在正常肠道类器官中引入特定的基因突变, 成功构建携带各种突

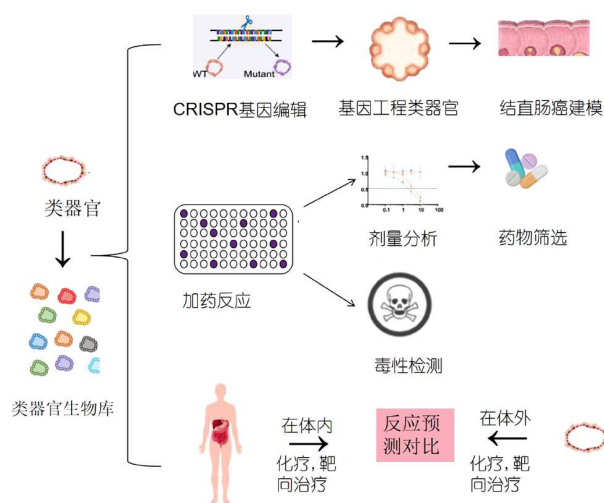


图2 结直肠癌类器官在基础和临床研究中的应用示意图
Figure 2 Schematic diagram of the application of colorectal cancer organoids in basic and clinical research

变基因的结肠类器官模型, 这些模型为研究CRC的发生机制及相关信号通路提供了强有力的工具。

Takeda等人^[55]利用CRISPR-Cas9技术, 在小鼠肠道肿瘤类器官和人结直肠癌的类器官中验证了CRC的驱动基因。该实验使用了携带*Apc*和*Kras*突变的肿瘤衍生类器官, 表明*Acvr1b*, *Acvr2a*和*Arid2*可能作为肿瘤抑制基因(tumor suppressor genes, TSGs)在CRC中发挥作用, 并揭示了*Trp53*基因在肿瘤转移中的作用。同时, 研究发现, 激活素受体和TGF- β 受体的共现突变能够协同促进肿瘤的发生, 并进一步阐明了*Acvr1b*和*Acvr2a*等激活素受体在CRC中的作用。Hu等人^[56]通过CRISPR-Cas9基因编辑技术和慢病毒载体介导的*DACHI*过表达及敲除, 调节了细胞系和CRC类器官中*DACHI*的表达, 并基于肠类器官功能模型进行了分析。研究揭示了*DACHI*在CRC细胞增殖、干细胞特性及肿瘤发生中的作用。结果表明, *DACHI*在隐窝基底细胞中具有特异性表达, 并且在CRC的所有阶段均发现*DACHI*表达水平升高。更重要的是, *DACHI*的高表达被证明是CRC预后不良的独立预测因子。谢朝正等人^[57]利用CRISPR/Cas9技术敲低结直肠癌细胞中*MIEF2*的表达, 构建了*MIEF2*低表达的细胞系和类器官模型。研究发现, *MIEF2*的缺失是CRC中奥沙利铂(OXL)耐药的关键驱动因素。进一步的机制研究表明, *MIEF2*缺失会影响线粒体中细胞色素C的释放, 从而抑制内源性细胞凋亡, 最终导致CRC对OXL的耐药性。

总之, CRISPR/Cas9技术为癌症基因及其相关途径的机制研究提供了一个强有力的实验平台. 通过基因编辑构建的结直肠癌类器官模型, 为研究CRC的发病机制和探索基因突变提供了重要支持.

4.2 CRC类器官库的构建

自肿瘤类器官成功建立以来, 国内外研究人员积极致力于构建肿瘤类器官的活体生物库. 目前, 类器官能够覆盖患者肿瘤的遗传多样性, 识别特定的药物-基因相互作用, 为癌症患者的个性化治疗提供了更多可能.

Vlachogiannis等人^[58]在四项I/II期临床试验中, 使用来自71名患者的110份新鲜活检样本, 构建了活体CRC类器官生物库. 组织学评价显示, 类器官与患者来源组织之间具有显著的形态学相似性. 类器官的基因组测序和药物反应分析表明, 类器官的表型和基因型与患者肿瘤高度一致. 类器官的分子特征与药物筛选结果相匹配, 能够有效预测患者对不同药物的临床反应. 对于患者来说, 最显著的好处是能够在无需患者直接参与的情况下进行药物测试. 如果没有找到合适的药物, 类器官将被保存在生物库中, 一旦有新药问世, 便可重新进行药物筛选. Farin等人^[59]建立了一个结直肠癌器官间质生物库, 该库包含来自30名患者的匹配患者源性肿瘤类器官(patient-derived tumor organoid, PDO)和肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF). 该生物库旨在强调在共培养模型中进行功能分析对于优化临床前试验和识别间质耐药机制的重要性. He等人^[60]通过利用结直肠癌患者手术切除的原发灶或转移灶肿瘤组织, 成功构建了一个包含42种结直肠癌类器官的生物库. 随后, 这些类器官被用于免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)和药物敏感性测试.

CRC类器官生物库已广泛应用于基因编辑及其他研究领域, 如新治疗策略的开发和新药研制. 此外, 类器官生物库还可用于快速验证新药及已上市药物的疗效与安全性, 研究罕见病, 并推动临床研究项目. 类器官生物库的出现为癌症生物学研究提供了强大的前景.

4.3 药物筛选

类器官为体外药物筛选和测试提供了一个新平台, Ashley等人^[61]是首批使用CRC原代培养物进行临

床前药物测试的研究者. 此后, 许多研究者进一步评估了CRC类器官在抗癌药物筛选中的有效性.

2018年, 研究人员利用患者来源的类器官活体生物库模拟了靶向药物和化疗对结直肠癌及胃食管癌的治疗反应, 并观察了基因型与药物表型的相关性. 例如, *ERBB2*过表达的CRC类器官对*ERBB2*/*EGFR*双重抑制剂拉帕替尼显示出良好反应, 而对具有正常*ERBB2*等位基因状态的*EGFR*扩增系则无效^[58]. De Oliveira等人^[62]为了评估新开发的靶向糖酵解的*PFKFB3*抑制剂KAN0438757对结直肠癌的效果, 使用该化合物治疗了患者来源的CRC类器官和正常结肠类器官, 并通过显微镜观察类器官形态和生长的变化. 结果表明, 正常结肠类器官保持其形态, 而结直肠癌类器官的结构发生显著变化, 表现为崩解、尺寸显著减小和周围单细胞数量增加. 这些变化表明该化合物能诱导CRC细胞死亡, 并降低类器官的生存能力. 2024年, Smabers等人^[63]优化了药物筛选方法, 从23个转移性结直肠癌治疗患者的PDO中, 每次选择5~11个PDO, 分别接受以5-氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂为主的化疗, 并设置了不同的对照组. 研究采用了五步优化策略, 以捕捉与患者反应最强的关联. 同年, 毛玉诺等人^[64]结合药物文库和药物预测的方法, 利用类器官测试了335种药物, 鉴定出34种对结直肠癌具有抗效的药物. 通过转录组分析, 他们发现非卓替尼、曲美替尼和波特佐米展现了有效的抗癌作用, 且体外类器官和体内药物反应特征一致.

近几年来, 研究表明来源于患者的结直肠癌类器官和活体生物库不仅可用于大规模药物筛选还可以对个体的有效抗肿瘤药物进行检测. 类器官作为临床研究模型, 可以加快药物的研发进程, 降低新药的研制成本.

4.4 个体化治疗

精准医学旨在根据每位患者的遗传、转录组学和功能信息, 制定最合适的治疗方案. 肿瘤个体化治疗是迈向精准医学的重要一步. 目前, 药物实验已证明类器官在个性化医疗中的价值, CRC类器官构建时间较短, 能够保留原始肿瘤的遗传特性和异质性, 为制定个体化治疗方案奠定了基础.

利用CRC类器官实现个性化治疗主要依赖于两个条件: 一是CRC类器官信号通路的异常及其潜在药物

靶点;二是确定类器官体外药物敏感性或耐药性测试结果与患者体内结直肠癌实际情况的匹配程度^[65]。通过类器官药物敏感性检测技术,患者可以快速筛选出最合适的药物,制定最有效的治疗方案,同时减少药物副作用、耐药性和肿瘤复发的风险,从而获得最佳的治疗效果。类器官模型还可用于分析耐药机制,为制定下一步有效的治疗策略提供依据,从而为晚期耐药患者带来新的希望。

Lv等人^[66]的研究探讨了在晚期直肠癌患者的放疗过程中加入伊立替康,重点分析患者来源的肿瘤类器官对治疗的敏感性与患者临床反应的相关性。结果显示,类器官的治疗反应与患者临床反应高度一致。该研究通过测量类器官和单细胞水平的治疗异质性,揭示了结直肠癌在化疗和放疗中的差异性反应,为个体化治疗提供了新的依据。Cho等人^[67]为了比较不同患者的体外药物反应,利用54名结直肠癌患者的组织建立了类器官,并在抗癌治疗反应中开发了一种“类器官评分”系统。研究结果显示,在匹配的患者中,评分较高的类器官与标准治疗后较低的肿瘤消退率显著相关。为了进一步评估潜在的药物再利用,他们使用了FDA批准的药物库,并将来自这些患者的十个CRC类器官应用于模拟平台。通过综合考虑,研究表明这一类器官评分不仅有助于预测抗癌治疗的疗效,还能够通过药物筛选帮助患者确定个性化的治疗方案。2024年,Thng等人^[68]建立了一组CRC患者来源的类器官,并在这些PDO中应用表型分析药物联合平台,旨在确定患者对基于表观遗传学的联合治疗的药物敏感性特征。通过这种分析,研究人员能够预测患者对特定药物的治疗反应,从而推动结直肠癌患者个性化治疗的实施。

综上所述,结直肠癌类器官作为一种预测模型,能够准确预测患者对治疗的反应。基于这些预测结果,临床医生可以更加精准地选择个体化治疗方案,从而提高治疗效果并减少不良反应。这一研究成果凸显了CRC类器官在个体化癌症治疗中的潜力,验证了其作为预测癌症患者反应的实验模型的可行性。

4.5 毒性研究

药物的疗效和毒副作用是药物开发过程中面临的主要挑战,尤其是在药物上市后,由于无法准确预测其对人体的潜在不良反应,很多药物不得不停止使用。药物的毒性通常通过细胞实验和动物模型进行筛选,然

而这些方法并不总能准确模拟人体的反应^[69]。目前,许多抗癌药物在治疗过程中会对患者的重要器官,如心脏、肾脏和肝脏,产生毒害作用,尤其是这些毒性反应通常是不可预测的,导致部分患者发生器官功能衰竭,利用类器官进行药物毒性试验可以很大程度上解决这一问题。

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是一种广泛用于治疗CRC的化疗药物,其疗效显著,但也伴随着一定的副作用。Cho等人^[70]的研究表明,5-FU通过激活WNT/ β -catenin信号通路,促进结直肠癌干细胞的激活,从而增强肿瘤的生长和耐药性。研究还显示,5-FU与WNT抑制剂联合使用可能成为避免肿瘤复发的有效策略。然而,5-FU的使用也伴随着一系列的副作用,尤其是在对肠道及其他重要器官的毒性反应方面。为了预测这些副作用,近年来,研究者开始利用类器官模型来进行药物的毒性评估。Christensen等人^[71]的研究中,使用了小鼠模型中的肠隐窝类器官来研究药物代谢和毒性。通过对基因正常的人小肠类器官和转移性结直肠癌患者的肿瘤样本进行全基因组分析,发现5-FU治疗后,两个系统都表现出了突变特征,进一步证明了5-FU可能具有诱变性。这些突变特征表明,5-FU不仅能够引起DNA损伤,还可能促进肿瘤的演变,增加继发性恶性肿瘤的发生风险。

随后,Sever等人^[72]研究了通过 β -羟基丁酸(β -hydroxybutyrate, BOHB)改变结直肠癌代谢,进而增强奥沙利铂细胞毒性作用的机制。研究结果表明,低剂量的BOHB与奥沙利铂联合使用,能够显著增强结直肠癌类器官的细胞毒性。BOHB通过改变癌细胞的代谢状态,增强了化疗药物的疗效,其作用机制与奥沙利铂在结直肠癌治疗中的作用机制相似。

CRC类器官作为药物毒性研究的模型,不仅能够更准确地预测治疗药物在人体内的有效性和毒性,还能避免传统动物实验带来的物种差异问题。此外,使用类器官模型可以在一定程度上缓解临床试验中的伦理困境,因为它们能够提供更为真实的肿瘤微环境,减少对动物的依赖,从而推动药物筛选和毒性评估的更高效、更人道的研究进程。

5 讨论

长期以来,结直肠癌一直是全球健康关注的重点

问题,但由于缺乏合适的体外模型,研究进展受到了一定限制.结直肠癌类器官的出现为解决这一难题开辟了新的途径,并在结直肠癌的研究中展现出巨大的潜力.然而,结直肠癌类器官系统仍面临若干亟需解决的关键问题,其中最为突出的是如何在类器官培养过程中有效模拟肿瘤微环境.尽管类器官培养物通常能够支持上皮(癌)细胞的生长和扩增,但来自肿瘤微环境的其他重要成分,如免疫细胞、基质细胞、癌症相关成纤维细胞、肿瘤血管系统、共生菌群以及细胞外基质等常常会在培养过程中迅速流失,这限制了类器官在模拟原发肿瘤特征方面的能力^[73].因此,如何维持和重建肿瘤微环境,尤其是在体外环境中完整再现肿瘤细胞与微环境间的相互作用,已成为类器官研究领域中的主要挑战之一.

目前,将CRC类器官与其他细胞共培养是解决相关问题的一种重要思路.2019年,Schnalzger等人^[74]开发了一种平台,用于评估嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)细胞对患者结肠类器官的细胞毒性.在该实验中,研究者将上皮细胞黏附分子引入NK-92细胞,并将表达EGF受体变体III的CRC类器官与靶向该受体的CAR-NK92细胞共培养.研究结果表明,CAR-NK92细胞能够特异性地杀伤大肠癌类器官,而不损伤正常的类器官.这项研究表明,除了将结直肠癌类器官与免疫细胞共培养外,还能深入研究免疫细

胞与肿瘤之间的相互作用.2024年,Strating等人^[75]开发了CRC类器官与成纤维细胞的共培养系统,其中成纤维细胞通过分泌IV型胶原蛋白,为癌细胞提供了支持其形成腺体结构的基底膜.该研究表明,共培养模型不仅能够有效重建肿瘤微环境,还可用于研究免疫抑制机制.然而,尽管已有许多相关研究取得了重要进展,如何更全面地增强肿瘤微环境的模拟仍然是研究人员面临的一个重大挑战.

尽管如此,CRC类器官的评估为临床决策提供了重要支持,能够通过个性化治疗方案改善患者的生存预期.目前,CRC类器官已被广泛认为是研究结直肠癌发生和发展的首选模型.该模型有效地融合了基础研究与临床治疗的需求,不仅推动了结直肠癌治疗方式的革新,也真正使得结直肠癌患者进入了个性化医疗的新时代.此外,类器官模型与生物库和CRISPR-Cas9技术的结合,为癌症模型的构建和进一步的研究提供了强有力的工具,这将为结直肠癌的深入研究做出重要贡献.类器官还可用于药物筛选和毒性研究,基于患者来源的类器官进行的这些应用已经在延长患者生存期方面取得了显著成果,对挽救生命具有重要意义.然而,未来类器官的应用仍面临许多挑战.要克服这些挑战,需要生物学家、临床医生和生物工程师之间的密切合作,进一步探索更为精准和有效的治疗策略,以为结直肠癌患者带来更多的生存希望.

参考文献

- 1 Liu J H, Li Z, Zhang Y, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020 (in Chinese). *J Multidisciplinary Cancer*, 2021, 7: 1–14 [刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020全球癌症统计报告解读. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2021, 7: 1–14]
- 2 Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72: 7–33
- 3 Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*, 2021, 14: 101174
- 4 Schmitt M, Greten F R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 653–667
- 5 Luo L, Ma Y, Zheng Y, et al. Application progress of organoids in colorectal cancer. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 815067
- 6 Workman M J, Mahe M M, Trisno S, et al. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat Med*, 2017, 23: 49–59
- 7 Mittal R, Woo F W, Castro C S, et al. Organ-on-chip models: implications in drug discovery and clinical applications. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 8352–8380
- 8 Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, et al. Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 605–614
- 9 Fatehullah A, Tan S H, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 246–254
- 10 Li X, Francies H E, Secrier M, et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics. *Nat Commun*, 2018, 9: 2983

- 11 Sugimoto S, Sato T. Establishment of 3D intestinal organoid cultures from intestinal stem cells. *Methods Mol Biol*, 2017, 1612: 97–105
- 12 Schutgens F, Rookmaaker M B, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 303–313
- 13 Wang S, Wang X, Tan Z, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury. *Cell Res*, 2019, 29: 1009–1026
- 14 Lin L, Lei M, Lin J M, et al. Advances and applications in liver organoid technology (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 185–195 [林丽, 雷妙, 林佳漫, 等. 肝脏类器官的研究进展及应用. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 185–195]
- 15 Rosenbluth J M, Schackmann R C J, Gray G K, et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nat Commun*, 2020, 11: 1711
- 16 Lancaster M A, Knoblich J A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2329–2340
- 17 Pang W, Liu Y T, Xiang Y F. Current progress in brain organoid technology (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 161–174 [庞激, 刘彦彤, 向阳飞. 脑类器官技术研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 161–174]
- 18 Lee J, Rabbani C C, Gao H, et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells. *Nature*, 2020, 582: 399–404
- 19 Ren X, Chen W, Yang Q, et al. Patient-derived cancer organoids for drug screening: Basic technology and clinical application. *J Gastro Hepatol*, 2022, 37: 1446–1454
- 20 Wang C, Gao J J, Hua G Q. Application of intestinal organoids in precision medicine (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 171–179 [王楚, 高建军, 华国强. 肠道类器官在精准医学中的应用. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 171–179]
- 21 Sprangers J, Zaalberg I C, Maurice M M. Organoid-based modeling of intestinal development, regeneration, and repair. *Cell Death Differ*, 2021, 28: 95–107
- 22 Simian M, Bissell M J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol*, 2017, 216: 31–40
- 23 Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 2016, 165: 1586–1597
- 24 Brassard J A, Lutolf M P. Engineering stem cell self-organization to build better organoids. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 860–876
- 25 Broda T R, McCracken K W, Wells J M. Generation of human antral and fundic gastric organoids from pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2019, 14: 28–50
- 26 Fujii M, Shimokawa M, Date S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 827–838
- 27 Li J, Liu J, Xia W, et al. Deciphering the tumor microenvironment of colorectal cancer and guiding clinical treatment with patient-derived organoid technology: progress and challenges. *Technol Cancer Res Treat*, 2024, 23: 15330338231221856
- 28 Wang W D, Zhou X, Fu W. Progress in the application of organoids in colorectal cancer research (in Chinese). *Chin J Mini Invas Surg*, 2017, 17: 1126–1128+1136 [王文东, 周鑫, 付卫. 类器官在结直肠癌研究中的应用进展. 中国微创外科杂志, 2017, 17: 1126–1128+1136]
- 29 Sträter J, Wedding U, Barth T F, et al. Rapid onset of apoptosis *in vitro* follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology*, 1996, 110: 1776–1784
- 30 Barker N, van Es J H, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 2007, 449: 1003–1007
- 31 Ootani A, Li X, Sangiorgi E, et al. Sustained *in vitro* intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*, 2009, 15: 701–706
- 32 Sato T, Vries R G, Snippert H J, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459: 262–265
- 33 Spence J R, Mayhew C N, Rankin S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 2011, 470: 105–109
- 34 van de Wetering M, Francies H E, Francis J M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 2015, 161: 933–945
- 35 Fujii M, Matano M, Toshimitsu K, et al. Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 787–793.e6
- 36 Lin J W, Chen H, Sha W H, et al. Modeling colorectal cancer with organoids: clinical applications and challenge (in Chinese). *Sci Technol Rev*, 2022, 40: 28–41 [李精伟, 陈浩, 沙卫红, 等. 结直肠癌类器官的应用进展与挑战. 科技导报, 2022, 40: 28–41]

- 37 Kozłowski M T, Crook C J, Ku H T. Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol*, 2021, 4: 1387
- 38 Klotz B J, Oosterhoff L A, Utomo L, et al. A versatile biosynthetic hydrogel platform for engineering of tissue analogues. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: e1900979
- 39 Capeling M M, Czerwinski M, Huang S, et al. Nonadhesive alginate hydrogels support growth of pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 381–394
- 40 Liu H, Wang Y, Wang H, et al. A droplet microfluidic system to fabricate hybrid capsules enabling stem cell organoid engineering. *Adv Sci*, 2020, 7: 1903739
- 41 Loebel C, Weiner A I, Eiken M K, et al. Microstructured hydrogels to guide self-assembly and function of lung alveolospheres. *Adv Mater*, 2022, 34: e2202992
- 42 Wakamatsu T, Ogawa H, Yoshida K, et al. Establishment of organoids from human epithelioid sarcoma with the air-liquid interface organoid cultures. *Front Oncol*, 2022, 12: 893592
- 43 Liang L, Cui R, Zhong S, et al. Analysis of the potential role of photocurable hydrogel in patient-derived glioblastoma organoid culture through RNA sequencing. *Biomater Sci*, 2022, 10: 4902–4914
- 44 Drumheller P D, Hubbell J A. Densely crosslinked polymer networks of poly(ethylene glycol) in trimethylolpropane triacrylate for cell-adhesion-resistant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 1995, 29: 207–215
- 45 Shkumatov A, Baek K, Kong H. Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies. *PLoS One*, 2014, 9: e94764
- 46 Ye S, Boeter J W B, Mihajlovic M, et al. A chemically defined hydrogel for human liver organoid culture. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 2000893
- 47 Qin X Y, Liu H T, Gan Z J, et al. Application of hydrogel materials for organoids (in Chinese). *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 182–195 [覃馨园, 刘海涛, 甘忠桥, 等. 水凝胶材料在类器官研究中的应用进展. 中国科学: 化学, 2024, 54: 182–195]
- 48 Li X, Nadauld L, Ootani A, et al. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat Med*, 2014, 20: 769–777
- 49 Wang Y Q, Tao T T, Qin J H. Organoids-on-a-chip (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 211–220 [王亚清, 陶婷婷, 秦建华. 类器官芯片. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 211–220]
- 50 Wang M Q, Li Q H, Sun J, et al. Culture methods and application prospects of organoids (in Chinese). *China Anim Husband Vet Med*, 2023, 50: 2688–2696 [王曼茜, 李庆豪, 孙娟, 等. 类器官的培养方法及应用前景. 中国畜牧兽医, 2023, 50: 2688–2696]
- 51 Yan X Z, Xia W L, Xia J W, et al. Research progress of Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer (in Chinese). *Chin J Lab Diagn*, 2021, 25: 1856–1861 [焉秀章, 夏文龙, 夏俊伟, 等. Wnt/ β -catenin信号通路在结直肠癌中的研究进展. 中国实验诊断学, 2021, 25: 1856–1861]
- 52 Bergin C J, Benoit Y D. Protocol for serial organoid formation assay using primary colorectal cancer tissues to evaluate cancer stem cell activity. *STAR Protoc*, 2022, 3: 101218
- 53 Drost J, van Jaarsveld R H, Ponsioen B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 2015, 521: 43–47
- 54 Kondo J, Endo H, Okuyama H, et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 6235–6240
- 55 Takeda H, Kataoka S, Nakayama M, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 15635–15644
- 56 Hu X, Zhang L, Li Y, et al. Organoid modelling identifies that DACH1 functions as a tumour promoter in colorectal cancer by modulating BMP signalling. *Ebiomedicine*, 2020, 56: 102800
- 57 Xie C, Li K, Li Y, et al. CRISPR-based knockout screening identifies the loss of MIEF2 to enhance oxaliplatin resistance in colorectal cancer through inhibiting the mitochondrial apoptosis pathway. *Front Oncol*, 2022, 12: 881487
- 58 Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 2018, 359: 920–926
- 59 Farin H F, Mosa M H, Ndreshkjana B, et al. Colorectal cancer organoid-stroma biobank allows subtype-specific assessment of individualized therapy responses. *Cancer Discov*, 2023, 13: 2192–2211
- 60 He X, Jiang Y, Zhang L, et al. Patient-derived organoids as a platform for drug screening in metastatic colorectal cancer. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1190637
- 61 Ashley N, Jones M, Ouaret D, et al. Rapidly derived colorectal cancer cultures recapitulate parental cancer characteristics and enable personalized

- therapeutic assays. *J Pathol*, 2014, 234: 34–45
- 62 De Oliveira T, Goldhardt T, Edelmann M, et al. Effects of the novel PFKFB3 inhibitor KAN0438757 on colorectal cancer cells and its systemic toxicity evaluation *in vivo*. *Cancers*, 2021, 13: 1011
- 63 Smabers L P, Wensink E, Verissimo C S, et al. Organoids as a biomarker for personalized treatment in metastatic colorectal cancer: drug screen optimization and correlation with patient response. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43: 61
- 64 Mao Y, Wang W, Yang J, et al. Drug repurposing screening and mechanism analysis based on human colorectal cancer organoids. *Protein Cell*, 2024, 15: 285–304
- 65 Aberle M R, Burkhart R A, Tiriach H, et al. Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer. *Br J Surg*, 2018, 105: e48–e60
- 66 Lv T, Shen L, Xu X, et al. Patient-derived tumor organoids predict responses to irinotecan-based neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Intl J Cancer*, 2023, 152: 524–535
- 67 Cho Y, Min D, Kim H, et al. Patient-derived organoids as a preclinical platform for precision medicine in colorectal cancer. *Mol Oncol*, 2022, 16: 2396–2412
- 68 Thng D K H, Hooi L, Siew B E, et al. A functional personalised oncology approach against metastatic colorectal cancer in matched patient derived organoids. *npj Precis Onc*, 2024, 8: 52
- 69 Jamal S, Ali W, Nagpal P, et al. Computational models for the prediction of adverse cardiovascular drug reactions. *J Transl Med*, 2019, 17: 171
- 70 Cho Y H, Ro E J, Yoon J S, et al. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nat Commun*, 2020, 11: 5321
- 71 Christensen S, Van der Roest B, Besselink N, et al. 5-Fluorouracil treatment induces characteristic T>G mutations in human cancer. *Nat Commun*, 2019, 10: 4571
- 72 Sever T, Ellidokuz E B, Basbınar Y, et al. Beta-hydroxybutyrate augments oxaliplatin-induced cytotoxicity by altering energy metabolism in colorectal cancer organoids. *Cancers*, 2023, 15: 5724
- 73 Lau H C H, Kranenburg O, Xiao H, et al. Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17: 203–222
- 74 Schnalzger T E, de Groot M H, Zhang C, et al. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *EMBO J*, 2019, 38: e100928
- 75 Strating E, Verhagen M P, Wensink E, et al. Co-cultures of colon cancer cells and cancer-associated fibroblasts recapitulate the aggressive features of mesenchymal-like colon cancer. *Front Immunol*, 2023, 14: 1053920

Construction and application of colorectal cancer organoids

YANG ZhiQin¹, CHANG JuanJuan¹, NIE ZunZhen³ & GUO Ying^{1,2,3*}

¹ *The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China*

² *Yan'an Mechanical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China*

³ *Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710069, China*

* *Corresponding author; E-mail: yingguo2nd@aliyun.com*

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors and poses a serious threat to human health. Colorectal cancer organoids are miniature tumor models built in the laboratory by extracting tumor cells from patients and combining three-dimensional culture technology. Compared with traditional two-dimensional culture systems, colorectal cancer organoids can retain the molecular characteristics and cellular composition of the primary tumor and simulate the biological characteristics and organizational structure of real tumors in a culture environment. Because of this, organoids have become important research tools in the fields of cancer biology, drug screening and personalized treatment, and have shown broad application prospects. This article reviews the research progress on colorectal cancer organoids, discusses the culture conditions of organoids in detail, and summarizes its application in colorectal cancer modeling, CRC organoid biobank construction, drug screening, toxicity assessment, and personalized treatment. Progress. Through these contents, this paper aims to provide useful reference and reference for the further application of colorectal cancer organoid technology in basic research and clinical treatment.

colorectal cancer, colorectal cancer organoids, construction, application

doi: [10.1360/SSV-2024-0143](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0143)