

结直肠癌类器官的应用进展与挑战

李精伟^{1,2}, 陈浩¹, 沙卫红¹, 熊霞², 周健^{2,3*}

1. 广东省人民医院消化内科, 广东省医学科学院, 广州 510080

2. 畜禽养殖污染控制与资源化技术国家工程实验室, 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125

3. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要 结直肠癌(CRC)是全球发病率最高的消化道肿瘤之一, 严重威胁人类的健康。近年来, 类器官技术取得了令人欣喜的进展, 已成为结直肠癌发生机制和临床转化研究的重要新工具。回顾了结直肠癌生态位信号通路的变化, 总结了类器官技术在结直肠癌建模、肿瘤微环境研究、药物筛选、个体化治疗等方面的应用进展, 讨论了当前类器官面临的挑战, 并从类器官培养技术标准化和工程技术应用等角度展望了类器官的未来发展方向。

关键词 类器官; 结直肠癌; 干细胞生态位; 肿瘤微环境; Wnt 信号

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)病理学方面取得长足的进展让临床有更多方法可供选择, 包括内镜和手术切除、放疗、免疫治疗、姑息化疗、靶向治疗以及广泛的手术和转移灶的局部消融治疗等^[1]。这些治疗方法有效地抑制CRC发展并延长了患者总生存期。实施以人群为基础的CRC筛查, 如粪便潜血试验和内镜检查, 也大大提高了总体生存率, 并带来了治愈CRC的良好前景^[1-2]。然而, 由于实际的筛查普及水平并不高、治疗策略不明确和CRC发病率不断增加, CRC仍然是近年来第三大最常见的诊断癌症, 也是全球癌症死亡的第二大原因^[2]。2020年, CRC占全球癌症发病率的

10%, 占癌症死亡人数的9.4%。根据对老龄化、人口增长和人类发展的预测, 预计2040年全球新发CRC病例数将达到320万人^[1]。CRC发病率的增加主要归因于生活方式和饮食向西化转变导致环境危险因素暴露增加^[1,3]。因此, 通过基础和临床转化研究开发新的治疗策略迫在眉睫。

癌细胞系易建立, 成本低, 可快速获得实验结果, 因此长期被用于CRC的肿瘤发生、肿瘤生物学和药物治疗等方面的研究。CRISPR-Cas9基因编辑系统的出现进一步拓宽了癌细胞系的用途, 使人们可以更深入地探究肿瘤的基因突变和发病机制。尽管癌细胞系被普遍使用并对癌症研究作出了巨

收稿日期: 2022-05-07; 修回日期: 2022-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(82171698, 82170561, 81741067, 81300279); 广东省自然科学基金杰出青年项目(2021B1515020003); 广东省人民医院登峰计划项目(DFJH201803)

作者简介: 李精伟, 博士研究生, 研究方向为肠道类器官临床应用, 电子信箱: 352757782@qq.com; 周健(通信作者), 助理研究员, 研究方向为类器官基础科学研究与应用开发, 电子信箱: zj@zlab.ac.cn

引用格式: 李精伟, 陈浩, 沙卫红, 等. 结直肠癌类器官的应用进展与挑战[J]. 科技导报, 2022, 40(12): 28-41; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2022.12.003

大的贡献,但它仍存在一些弊端。癌细胞系中的细胞均可充分利用培养基的营养成分以及受到抗肿瘤药物的作用,这与体内的肿瘤微环境不符^[4]。其次,癌细胞系不能完全重现肿瘤的生理特性。其中一个主要原因是癌细胞系缺乏构成肿瘤微环境的重要成分,包括肿瘤间质细胞、免疫细胞、成纤维细胞、肿瘤血管和细胞外基质等。另外,癌细胞系在多次传代后会逐渐丢失肿瘤的遗传异质性和瘤内异质性,这意味着癌细胞系与患者原始肿瘤组织存在差异,不能完全代表原始肿瘤组织。这是为什么许多经细胞系筛选的抗肿瘤药物最终会在后续试验中失效的关键原因^[5]。研究肿瘤进展、肿瘤转移和测试药物疗效的另一种实验方案是建立肿瘤动物模型,但动物的生理环境与人体的生理环境有较大的差异,患者来源的肿瘤异种移植也同样面临这一问题。患者来源的肿瘤异种移植确实能够保留肿瘤的部分形态特征和异质性,然而,费用高昂、成功率低、构建模型耗时等缺点会阻碍研究进程。

类器官是在体外长期生长和自我更新的三维细胞组织。肠道类器官,也被称为“迷你肠(mini-gut)”^[6],是通过将分离的肠道隐窝或干细胞嵌入细胞外基质并添加必需生长因子和培养基建立的。肠道类器官可以分化出几乎所有类群的肠细胞,包括干细胞、潘氏细胞、杯状细胞、内分泌细胞、短暂扩增细胞和上皮细胞等^[7]。衍生自肠隐窝成体干细胞的肠道类器官与来源肠段组织的生物表型高度一致,这些特征包括基因组成与表达,蛋白质表达规律、生物力学效应和各种生物化学特点^[7-8]。因此,肠道类器官是简化合适的3D体外细胞模型,可以用于探索包括结CRC在内各种肠道疾病的病理与治疗方法^[9]。近年来多个研究团队开发了各种培养方法建立肠道类器官模型,并将肠道类器官应用于多种胃肠道疾病的研究,包括肠道感染、炎症性肠病、胃癌和CRC等^[10]。肠道类器官在体外建模、药物测试和筛选^[11]、再生医学^[12]、个体化医学^[13]等领域具有广泛应用。

衍生自成体干细胞或重编程干细胞的CRC类器官将是研究CRC肿瘤发生、癌症相关机制和抗肿瘤药物治疗的重要工具。与癌细胞系、动物模型

相比,CRC类器官保留了肿瘤基因特征、异质性和瘤内细胞异质性,在体外几乎完美复现了CRC组织病理特征^[14]。近年来,CRC类器官的临床研究取得了令人兴奋的进展,本研究就类器官技术在CRC建模、研究肿瘤微环境、指导临床治疗等方面的应用以及当前临床类器官研究面临的挑战和未来发展进行综述。

1 结直肠癌生态位信号通路变化

肠干细胞生态位是指维持肠干细胞自我更新和增殖必需的微环境^[15],由潘氏细胞、基质细胞、平滑肌细胞、神经细胞、细胞外基质和复杂的信号通路共同构成,调控着肠干细胞的丰度、寿命和活性^[16]。肠干细胞生态位主要的信号通路包括无翅型MMTV整合位点家族蛋白(Wnt)、骨形态发生蛋白(BMP)、Notch和表皮生长因子(EGF)信号通路^[17]。Wnt是维持肠干细胞自我更新最重要的信号通路,R-Spondin为Wnt增强因子,由周围的上皮细胞和间充质细胞分泌,包括潘氏细胞^[18]。Wnt信号的溶解性差,绝大多数Wnt信号传递通过细胞间直接接触进行,这种接触会使Wnt信号形成梯度,随着离隐窝距离增加,Wnt信号逐渐减少^[19]。Notch是维持肠干细胞稳定所需的另一关键生态位因子。潘氏细胞通过表达Notch配体为肠干细胞提供必要的Notch信号^[18]。Notch信号会阻止肠干细胞向分泌谱系分化,维持隐窝底部肠干细胞稳定和调控分泌祖细胞与吸收祖细胞之间的比例。活跃的Notch信号决定吸收细胞的命运,而低Notch信号决定分泌细胞的命运。BMP属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族,BMP信号通路的作用是抑制干细胞增殖,促进细胞分化。Noggin、Gremlin 1、Gremlin 2和Chordin-like 1等BMP抑制剂主要由隐窝底部的肌成纤维细胞和平滑肌细胞分泌。BMP抑制剂通过抑制BMP产生了从隐窝底部至绒毛间逐渐增加的活性梯度,维持隐窝底部增殖和向上分化之间的微妙平衡。因此,BMP信号在绒毛处浓度较高,而隐窝底部较少。EGF通过不同的信号通路调节肠干细胞活性,由于过度激活的EGF信号与肿

瘤增殖和致癌相关,所以该通路活性受到严格控制。虽然 EGF 信号调控肠干细胞分裂速率,但它不是维持肠干细胞特性必需的生态位因子。研究发现,阻断肠道类器官中的 EGF 信号可使增殖的富含亮氨酸重复序列 G 蛋白偶联受体 5 阳性 (Lgr5⁺) 肠干细胞进入静止状态,并阻碍类器官生长^[20]。然而,一旦 EGF 信号恢复,肠干细胞能重新进入增殖状态,这是 EGF 与 Wnt、Notch 信号的区别,后两者是维持干细胞特性所必需的。

研究 CRC 的信号通路变化可进一步理解 CRC 发生机制,并能指导构建 CRC 类器官。当肠干细胞生态位发生改变,尤其各个信号通路出现异常时,人体可能会发生 CRC。这些紊乱的信号通路参与了 CRC 发生、增殖、凋亡、侵袭和转移。多项研究表明隐窝中的 Lgr5⁺ 干细胞是 CRC 的起源细胞^[21-22]。CRC 的进展与各个信号通路失调相关,包括 Wnt、Notch、BMP 等通路。

CRC 由 Wnt 信号通路的过度激活及其下游基因的突变启动^[23]。Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路被异常激活的机制包括 β -catenin 异常积累、基因突变和非编码 RNA 异常等。Wnt 通路最常发生突变的基因为 APC 基因,APC 基因对 CRC 的早期发展有重要作用。APC 参与 Wnt 信号通路的关键分子 β -catenin 的降解,发挥负性调控 Wnt 信号的作用。特异性缺失 APC 的 Lgr5⁺ 肠干细胞会导致小鼠产生小肠腺瘤。相反,当 APC 基因在转运放大细胞中被敲除时,腺瘤的生长很快会停止^[22]。因此,APC 突变会显著上调 Wnt 通路活性,破坏隐窝至绒毛的 Wnt 浓度梯度,通过上调 Wnt 通路下游靶基因 *CyclinD1* 和 *C-Myc* 的表达促进 CRC 发生发展。除了 APC 和 β -catenin, *Axin1*、*Axin2* 突变也见于部分 CRC,它们参与启动 CRC 的肿瘤发生过程。另外,在 CRC 癌细胞中常可检测到 *RNF43* 突变, Eto 等^[24] 发现 *RNF43* 突变可通过激活 Wnt 信号促进 CRC 患者的肿瘤生长并增加肿瘤复发率。异常的 Wnt 信号可将肠干细胞转化为癌症干细胞,具有高 Wnt 信号的癌细胞拥有自我更新和诱导肿瘤形成的能力^[25]。靶向抑制 Wnt 信号通路是 CRC 治疗的重要手段。

癌症干细胞通过不断地分裂增殖维持自我更新,理论上正常 BMP 信号能影响癌症干细胞增殖。最近一项研究发现 BMP4 可促进 CRC 癌症干细胞分化,并抑制 CRC 生长^[26]。BMP 信号在大多数 CRC 组织中被下调,这可能与 BMP 通路多种分子的基因表达异常相关。Notch 信号在 CRC 中失调,异常的 Notch 信号与 CRC 的发生密切相关^[27]。Notch 信号被异常激活的主要原因是其受体和配体发生改变^[28]。Notch1 在 CRC 中表达升高,促进了肿瘤细胞增殖,抑制了肿瘤细胞凋亡^[29]。此外,Notch1 通过诱导齿状蛋白 1 激活 Notch3,增加了上皮间质转化/干性相关蛋白 CD44、Slug 和 SMAD3 的表达,最终导致 CRC 表型变化^[30]。通过抑制 Notch1,可逆转上皮间质转化过程,减少肿瘤迁移^[31]。这些结果表明 Notch 信号参与介导 CRC 的上皮间质转化进程。Notch 信号与 Wnt 信号之间的串扰对 CRC 的发生和增殖也是至关重要的。在敲除小鼠转录因子 4 基因后,激活 Notch 信号不会增加细胞增殖^[32]。相反,在 APC 缺失的小鼠中抑制 Notch 信号促使腺瘤中的增殖细胞分化成杯状细胞^[33]。总之,肿瘤细胞需要高活性的 Notch 信号和 Wnt 信号来维持自我更新。针对 Notch1 分子开发抑制剂可能是未来 CRC 治疗的潜在选择。

2 结直肠癌类器官培养

2.1 正常肠道类器官培养

培养肠道类器官的基本原则是模拟肠干细胞所处的微环境。隐窝底部的干细胞生态位是肠道干细胞生长的环境,Wnt、Notch 信号激活及 BMP 信号抑制是维持肠干细胞增殖的必要条件。将分离的隐窝、干细胞或癌细胞种植至细胞外基质,再添加特定的生态位因子组合,模拟隐窝底部的干细胞生态位,即可形成相应的类器官^[6,34-35]。肠道类器官主要起源于成体干细胞或多能干细胞(图 1)。肠道类器官培养基以高级 DMEM/F12 培养基为基础,再添加 HEPES、谷氨酰胺、N2、B27、N-乙酰半胱氨酸、抗生素、Wnt3a、R-spondin、Noggin、EGF 等即可培养小鼠正常肠道类器官。目前广泛使用的细胞

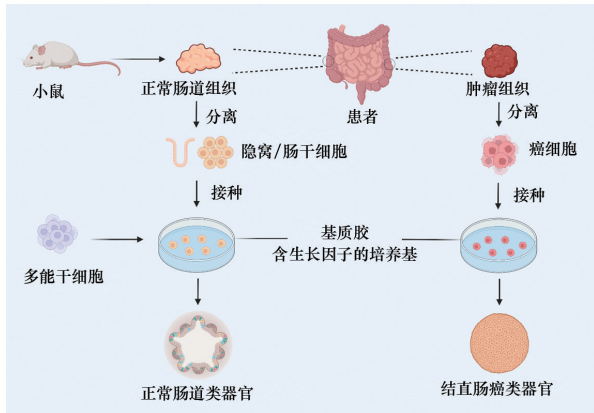


图1 正常肠道类器官和结直肠癌类器官培养

外基质是 Engelbreth-Holm-Sarm 小鼠肉瘤中提纯的基质胶(Matrigel)或基底膜提取物(BME),它的主要成分是层黏连蛋白、IV型胶原和黏连蛋白。

另外,Matrigel还含有少量的TGF- β 、EGF、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)。人正常结肠类器官培养所需培养基的成分与小鼠肠道类器官培养基不同,人结肠类器官培养基需额外添加胃泌素、烟酰胺、A83-01、SB202190等^[34,36]。A83-01是TGF- β 抑制剂,可抑制TGF- β 的抗增殖作用。SB202190是p38抑制剂,可阻断p38丝裂原活化蛋白激酶对EGF受体的负反馈作用。此外,在肠道类器官培养的初始阶段,为了防止失巢凋亡,提高存活率,可在培养基添加ROCK抑制剂Y-27632。上述这些生态位因子使类器官能够长期扩张,但不能进行分化。撤除Wnt3a、烟酰胺和SB202190能使人结肠类器官沿分泌谱系和吸收谱系完成分化,产生各种类型的成熟肠上皮细胞^[34-35]。表1总结了用于培养人肠道类器官的不同培养基成分。

表1 人肠道类器官扩增培养基的生长因子组成

组织	培养基成分										文献
	Wnt3a	R-spondin	Noggin	EGF	胃泌素	烟酰胺	TGF- β 抑制剂	p38抑制剂	其他		
小肠	√	√	√	√	√	√	√	√	—	—	[34]
结肠	√	√	√	√	√	√	√	√	—	—	[34]
	√	√	√	√	√	√	√	—	IGF-1,FGF-2	—	[36]
结直肠癌	—	—	—	○	√	—	○	○	—	—	[34]
	√	√	√	√	√	—	√	√	—	—	[41]
	—	—	—	√	—	—	—	—	bFGF	—	[42]

注:√,需要此成分;○,非必需成分;—,不需此成分。

各研究团队对培养条件和培养方法进行了优化,提高了肠道类器官培养的效率以及成功率。Fujii等^[36]发现,使用IGF-1和成纤维细胞生长因子2(FGF-2)替代p38抑制剂能显著提高人肠道类器官的形成能力,并且可稳定培养超过6个月。Matrigel是类器官培养中最常使用的细胞外基质,尽管Matrigel已实现商业化生产、价格可接受,但它有一些缺点:Matrigel成分复杂,含有1000多种蛋白质,不同批次的Matrigel之间存在差异^[37]。这将导致实验结果的可重复性变差。因此,脱细胞细胞外基质、合成水凝胶、工程化细胞外基质蛋白等应运而生,可替代Matrigel用于肠道类器官培养,进而出现了无基质胶的类器官培养技术^[8]。2019

年,Giobbe等^[38]对猪小肠组织进行脱细胞处理,设计了一种脱细胞细胞外基质,人小肠干细胞可以在这种脱细胞细胞外基质中生长并且最终成功形成人小肠类器官。基于透明质酸和明胶等材料合成的生物水凝胶也可代替Matrigel用于培养CRC类器官,并应用于共培养体系^[39]。对基质刚度、基质应力松弛率和基质整合素-配体浓度3个重要变量进行定量调控,Hunt等^[40]利用工程技术重组合成了一种工程化细胞外基质-透明质酸弹性蛋白样蛋白,肠道上皮类器官能在透明质酸弹性蛋白样蛋白中生长、分化及传代。这种工程化细胞外基质具有较好的可重复性,支持生物降解,为当前类器官研究提供了一个有前途的细胞外基质替代物。

2.2 结直肠癌类器官培养

对人正常结肠类器官培养基成分进行改进即可将其用于培养人CRC类器官^[34, 41]。Wnt3a不是维持人CRC类器官长期扩张所必需的,因为大多数CRC的Wnt/ β -catenin信号通路的关键基因存在突变,使CRC患者来源肿瘤类器官的Wnt通路被异常激活。由于腺瘤-肿瘤进展过程中突变的积累,肿瘤细胞对生态位因子的依赖性降低,患者来源肿瘤类器官的培养并不依赖培养基中某些特定的生长因子^[43-44]。目前已开发了多种CRC类器官的培养方法,其中大多数研究是从原始肿瘤组织培养肿瘤类器官。CRC类器官不仅可以从手术切除的肿瘤标本中产生,也能从常规的活检标本中产生^[14]。从人CRC组织建立类器官的方法与正常人肠道类器官的建立方法类似(图1)。简而言之,首先从CRC肿瘤组织中分离癌症干细胞,再将癌症干细胞接种到基质胶中并添加CRC类器官培养基,进行数次传代以及完成后续的实验分析^[42]。有趣的是,de Angelis等^[45]从循环肿瘤细胞中成功培养出类器官,由此衍生的循环肿瘤细胞类器官可作为研究转移性CRC特征和发现新生物标志物的模型。除了上述经典的培养方法,Li等^[46]创新性地使用气液界面方法进行CRC类器官建模。气液界面培养方法的优势是可以改善体外氧合,能在受控制的情况下进行器官生理研究。此外,最新的工程化类器官技术,如微流控技术、类器官芯片等,可以应对和解决传统类器官培养方法带来的一些局限性。

3 类器官技术在结直肠癌的应用

随着类器官技术的发展,目前类器官已成为CRC疾病模型构建、发病机制研究、肿瘤微环境研究、药物筛选和个体化治疗的良好模型系统。图2总结了类器官模型在CRC研究中的应用。

3.1 结直肠癌建模

类器官具有良好的遗传和表观遗传稳定性^[47-48]。由CRC原发肿瘤或转移瘤衍生的类器官均保留了其母体肿瘤的遗传多样性和形态稳定性^[14, 49]。CRC的发生是由Wnt/ β -catenin、TGF- β 、

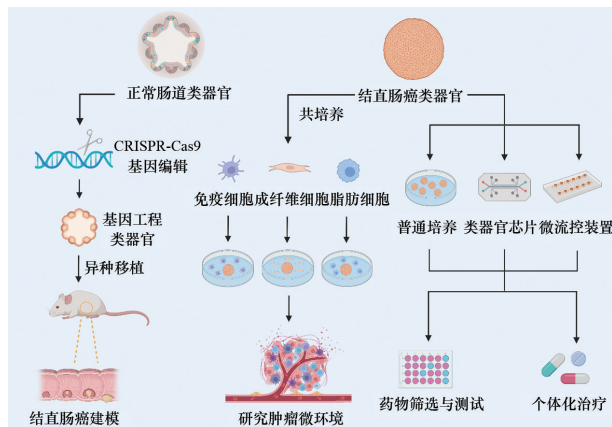


图2 类器官技术在结直肠癌中的应用

TP53、RAS-MAPK和PI3K等信号通路的相关基因突变所致^[50-51]。CRISPR-Cas9基因编辑系统是一项突破性的技术,利用CRISPR-Cas9技术可以实现对正常肠道类器官特定基因或基因组的精确编辑,模拟体内肿瘤发生过程。CRC的发生途径有腺瘤-腺癌途径和锯齿状途径。腺瘤-腺癌途径是CRC发生的经典途径,该模型认为,APC基因的突变激活了Wnt信号,导致肠道发生结肠息肉,后续SMAD4、TP53等基因的突变诱使结肠息肉转变为侵袭性和转移性表型^[52]。利用CRISPR-Cas9技术构建携带各种基因突变的结肠类器官模型可用于观察基因突变的效应。Drost等^[43]利用CRISPR-Cas9技术靶向修饰癌基因Kras和抑癌基因APC、P53和SMAD4,随后通过移除培养基中特定的生态位因子筛选突变的肠道类器官,携带4种基因突变的类器官才能在缺乏Wnt3a、Noggin、R-spondin1和EGF等所有生态位因子的培养基中生长。将这些突变的类器官原位移植到免疫缺陷小鼠体内,具有APC、Kras、TP53这3种突变而无SMAD4突变的类器官仅形成了腺瘤,而携带4种基因突变的类器官移植后能成功形成腺癌。该研究初步建立了腺瘤-腺癌途径的CRC类器官模型。Matano等^[53]利用CRISPR-Cas9技术进行了一项类似的研究,除了修饰上述4个突变基因外,额外引入了PIK3CA突变,将基因编辑的肠道类器官植入小鼠体内后成功形成了肿瘤。这些研究表明,携带APC和TP53基因连续突变的结肠类器官会表现出非整倍体特性,这

意味着染色体不稳定途径中CRC发生进展。而持续的染色体不稳定性与CRC类器官肿瘤演变密切相关^[54]。

锯齿状途径CRC模型的构建方法与经典途径相似。锯齿状通路是由*BRAF*癌基因的突变启动的^[55]。Fessler等^[56]通过将*BRAF*^{V600E}突变引入肠道类器官,构建了锯齿状腺瘤模型。Kawasaki等^[57]进一步利用CRISPR-CAS9技术将含*R-spondin*基因的染色体重排导入人正常结肠类器官,并同时转入*BRAF*^{V600E}突变,由此构建的类器官形成了扁平锯齿状病变。除了*BRAF*^{V600E}和*R-spondin*基因的融合蛋白外,过表达*Grem1*基因的类器官在植入小鼠体内后形成了具有锯齿状腺瘤特征的肿瘤。2019年,Lannagan等^[58]借助CRISPR-Cas9技术开发了一个具有多种基因突变的类器官模型来模拟锯齿状途径。作者通过分析TCGA基因数据库中锯齿状CRC的基因改变特征,选择*Tgfr2*、*ZnRF2*、*RNF43*、*CdKN2a*和*BRAF*^{V600E}作为CRISPR-Cas9编辑的靶基因,将这些修饰后的基因导入小鼠结肠类器官,然后再将这些类器官移植到免疫缺陷小鼠结肠内。近一半移植了具有*BRAF*^{V600E}和*Tgfr2*突变类器官的小鼠产生了腺癌,这些小鼠存活时间大于3个月。而移植了携带5个靶基因突变类器官的小鼠几乎全部产生了腺癌,且它们的存活时间缩短至4~6周。为了探究CRC相关突变特征的起源,Drost等^[59]利用CRISPR-Cas9技术敲除了人结肠类器官中的一种关键DNA修复基因*MLH1*,全基因组测序结果显示*MLH1*缺陷的结肠类器官中的突变特征与错配修复缺陷的CRC的突变特征相似,成功建立了微卫星不稳定的CRC模型。

为了探索特定基因突变对CRC转移中的贡献,需进一步将基因编辑后的工程类器官异种移植至免疫缺陷小鼠体内。2018年的一项研究发现,相比于其他突变基因组合,将具备*APC*、*Kras*和*Tgfr2*突变的小鼠肠道类器官移植到免疫缺陷小鼠的脾脏内,其肝转移发生率是最高的^[60]。这表明,激活肠上皮细胞的Wnt和*Kras*以及抑制TGF β 信号足以导致CRC发生肝转移。多个研究团队利用工程类器官移植构建了从结肠腺瘤到结肠腺癌

再到远处转移的复杂模型,完整概括了CRC的进展过程^[61-62]。这些团队的工作为基因研究和临床前研究贡献了宝贵的经验。此外,Roper等^[63]的研究证实基因工程结肠类器官和患者来源CRC类器官原位移植至远端结肠后均能形成肝转移。总之,基因编辑结肠类器官是CRC发病机制研究以及探索基因突变在各个信号通路作用的优秀工具。这些体外CRC类器官模型在深入探究疾病进展、进行抗肿瘤药物筛选和制定个体化治疗策略方面具有很大的应用前景。

3.2 共培养研究肿瘤微环境

CRC类器官模型的建立使肿瘤微环境相关的研究得以开展。肿瘤微环境由免疫细胞、癌症相关成纤维细胞、间质细胞和细胞外基质等构成^[64]。重要的是,肿瘤微环境中的组成成分可以维持癌症干细胞的干性,影响CRC的发生、进展、转移和耐药等生物学行为^[65]。肿瘤具有改变其所处周围环境的能力,这是其发生远处转移的重要基础和独有特征。目前多数CRC类器官模型只有肿瘤细胞,缺乏肿瘤微环境成分。因此,国内外团队构建了共培养体系探索肿瘤微环境与CRC类器官之间的相互作用。

免疫细胞作为肿瘤微环境最重要的成员之一,与CRC的发生、发展和治疗密切相关^[66]。肿瘤类器官构建肿瘤微环境的方法有两种,一种是通过气液界面方法建立肿瘤类器官模拟肿瘤微环境。例如,Neal等^[67]使用气液界面方法整合原发性肿瘤和肿瘤浸润淋巴细胞模拟抗程序性死亡受体1和抗程序性死亡因子配体1抗体对类器官的毒性。另一种方法是借助可实现高通量分析的微流控芯片模拟肿瘤微环境。Zheng等^[68]设计了一种微流控芯片,可以对芯片上每个腔室的氧气浓度进行精确调控,成功在体外模拟了肺癌类器官的缺氧环境和肝脏类器官的有氧环境,并实现了缺氧诱导的肿瘤转移现象,为缺氧环境下的抗肿瘤药物筛选提供了一个很好的模型。癌症免疫治疗是近年来兴起的一种很有潜力的肿瘤治疗手段。Dijkstra等^[69]建立了一种分离肿瘤反应性T细胞的方法,通过共培养干扰素 γ 预刺激的CRC类器官与外周血中的淋巴细

胞,获得了肿瘤反应性T淋巴细胞。这些T细胞被引入体内后能帮助消除患者体内的肿瘤。这一方法可以用来评价肿瘤免疫治疗的体外疗效。Schnalzger等^[70]开发了一个测试嵌合抗原受体细胞对患者来源结肠类器官的细胞毒性的平台。在NK92细胞中引入嵌合抗原受体靶向上皮细胞普遍表达的上皮细胞黏附分子,然后共培养表达表皮生长因子受体变异体III(一种肿瘤新抗原)的CRC类器官与针对表皮生长因子受体变异体III的嵌合抗原受体-NK92细胞,结果显示嵌合抗原受体-NK92细胞能够特异性杀伤CRC类器官而不损伤正常类器官。因此,上述研究表明,CRC类器官与免疫细胞共培养不仅可研究免疫细胞与肿瘤的相互作用而且可测试肿瘤免疫治疗的疗效以开发新的免疫治疗策略。

当脂肪细胞与小鼠CRC类器官共培养时,脂肪细胞可通过刺激癌症干细胞相关基因表达促进癌细胞的增殖以及去分化^[71]。癌症相关成纤维细胞主要来源于细胞外基质中的成纤维细胞,成纤维细胞最初可以阻止早期CRC的发展,但在肿瘤微环境中TGF- β 的作用下被转化为癌症相关成纤维细胞^[72]。有研究报道,在缺氧条件下,成纤维细胞衍生的细胞外囊泡可能通过递送Wnt和EGF信号诱导CRC类器官细胞的集落生成,进而促进CRC的发生^[73-74]。2017年,Hlund等^[75]将人胰腺导管腺癌类器官和小鼠癌症相关成纤维细胞共培养,结果发现癌症相关成纤维细胞形成了另一种不同的亚群,它们位于肿瘤远端,可以分泌白介素6等炎症因子,有促肿瘤特性,进而揭示了癌症相关成纤维细胞的异质性。在治疗CRC时应选择性靶向促肿瘤的癌症相关成纤维细胞亚群。综上所述,CRC类器官与免疫细胞、成纤维细胞等共培养在肿瘤微环境研究和开发肿瘤免疫治疗策略方面具有一定的价值和前景。

3.3 指导临床治疗

为临床药物治疗决策提供依据和指导是类器官研究的主要目标。CRC类器官模型更好地保留了原始CRC的瘤内异质性和遗传异质性,带来了更可信的实验结果。最近,许多团队的研究证实了

CRC类器官在指导临床药物治疗方面的巨大潜力。

3.3.1 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。van de Wetering等^[76]通过建立类器官生物库进行CRC类器官药物筛选,这一生物库包含了20位CRC患者肿瘤组织衍生的类器官。该研究使用包括化疗药、靶向药以及临床试验药物等83种药物处理CRC类器官,结果表明该类器官生物库平台可完成高通量药物筛选,并可明确药物与不同基因之间的相关性。例如,环指蛋白*RNF43*突变的CRC类器官对Porcupine抑制剂敏感,而*Kras*突变的CRC类器官对酪氨酸激酶受体抑制剂表现为耐药。该研究展示了CRC类器官在药物筛选应用方面的潜力。Kondo等^[77]使用CRC患者来源的类器官对2427种药物完成了筛选测试,CRC类器官对不同药物表现出不同的敏感性。Du等^[78]开发了一个更高通量的类器官药物筛选平台,高效完成了数千种药物的筛选测试。这些研究再次证实了类器官进行高通量药物筛选分析制定新治疗方案的潜力。

针对奥沙利铂耐药的CRC患者,后续分子靶向药物选择及其疗效预测是临床上面临的一大难题。为了解决这个问题,Shen等^[79]使用患者来源的CRC类器官模型进行体外药物筛选实验,成功筛选出一种Kruppel样因子5抑制剂ML264,ML264通过恢复CRC类器官中的细胞凋亡,从而重新恢复了耐药的CRC类器官对奥沙利铂的敏感性。这是CRC类器官在筛选潜在治疗药物应用上又一有力的证明。此外,人类诱导多能干细胞来源的类器官亦可作为CRC模型用于药物测试^[80]。类器官作为临床前模型,加快了新药研发的进程,降低了新药研发成本。CRC类器官模型可测试正在进行临床试验的药物的有效性,作为临床试验的补充,推进新药研发的进程^[81]。

3.3.2 个体化治疗

肿瘤个体化治疗是迈向精准医学的重要一步。构建CRC类器官模型所需的时间较短,数周内即可获得药物测试结果。在对CRC耐药原因进行分析后,可制定真正有效的治疗策略。CRC类器官存

在潜在药物靶点和信号通路异常是实现个体化治疗的先决条件。另一个重要条件是需要确定基于CRC类器官的体外药物敏感性或耐药性测试结果是否与CRC患者体内的真实情况相匹配^[82]。因此,需比较CRC类器官模型中的药物反应与患者的实际反应。2015年,Weeber等^[14]对转移性CRC患者衍生的类器官进行全基因测序发现CRC类器官与活检标本之间有90%体细胞突变是相同的,DNA拷贝数的相关系数为0.89。这一发现证明CRC类器官基本保留了原始肿瘤的基因和表型特征,类器官在肿瘤个体化治疗的应用是可行的。2018年,Vlachogiannis等^[11]使用转移性CRC患者衍生的类器官建立活体生物库,对类器官表型和基因型分析的结果提示患者来源类器官与原始肿瘤高度相似,CRC类器官对药物的反应与患者对药物的反应基本一致,证明了类器官在个体化医疗中的预测价值。2019年,Ooft等^[83]测试了CRC类器官对化疗药物疗效的预测能力,CRC类器官能预测80%使用伊立替康化疗患者的疗效,但未能准确预测使用5-氟尿嘧啶和奥沙利铂治疗患者的疗效,表明类器官对不同化疗药物疗效的预测能力存在差异。2020年,Yao等^[84]研究表明类器官可以预测局部晚期直肠癌患者的放化疗反应,CRC类器官预测患者放化疗疗效的准确度为84.43%,敏感性为78.01%,特异性为91.97%,其中值得注意的是,研究中有19位患者放疗和化疗的疗效良好,然而由这些患者的肿瘤组织培养的CRC类器官却耐受放疗。这可能归因于肿瘤的瘤内异质性。Schumacher等^[85]评估了肿瘤异质性对CRC类器官Kras/MAPK信号通路活性的影响以及对EGFR靶向药治疗反应的影响。靶向蛋白质组学分析发现CRC类器官的MAPK信号激活表现出异质性,这种异质性与对EGFR抑制的不同反应相关,在对抗EGFR靶向药敏感和耐药的CRC类器官之间观察到不同的MAPK通路激活模式。这表明,对各肿瘤亚群进行单独的药物疗效测试可能有助于提高对患者的真实治疗反应预测。

临床上根据类器官对放化疗和靶向治疗的反应,可确定哪些患者将从放化疗和靶向治疗中获益,从而个体化定制治疗方案。部分CRC患者化

疗后会出现复发,Cho等^[86]构建人CRC类器官探究5-氟尿嘧啶耐药的相关机制,他们发现5-氟尿嘧啶可以通过Wnt/ β -catenin通路活化残留病灶中的癌症干细胞。基于这一发现,Wnt抑制剂和5-氟尿嘧啶的联合治疗策略能有效避免CRC肿瘤复发。一般来说,靶向药物应用前需完成全基因测序,当患者具有特定基因突变靶点时才具备使用特定靶向药物的适应征。然而,某些不具备基因突变的患者也可能从靶向药物中获益,因此需更好的方式确定患者的最佳治疗方案。Pauli等^[87]同时使用CRC类器官模型和异种移植模型测试了靶向药物与其他药物联合治疗晚期CRC患者的疗效。联用阿法替尼和伏立诺他显著抑制了小鼠体内异种移植肿瘤的生长,并且肿瘤体积缩小到仅为标准化疗对照组肿瘤体积的10%。这一方法可以为晚期CRC患者提供个性化治疗方式,给晚期CRC患者带来了新选择。2020年,Narasimhan等^[88]应用类器官技术成功指导临床制定了伴腹膜转移的CRC患者的精准治疗策略,取得了良好的疗效。综上所述,这些研究表明CRC类器官可以准确地预测患者治疗疗效,具有良好的预测价值,根据预测结果定制个体化治疗方案可降低耐药发生率、避免过度治疗、减少不良反应,具有巨大的临床应用潜力,有望在前瞻性临床试验中应用。

4 挑战

随着类器官技术的发展,各研究团队开发了不同的类器官培养方法。使用特定细胞系自制的条件培养基可以降低实验成本,这必然会带来不可控的实验室差异以及结果可重复性的问题。另外,目前多数类器官培养体系依赖于基质胶。然而,基质胶的具体组成成分尚不明确,各个批次间的基质胶亦有差异。类器官冻存、DNA和RNA提取、蛋白质提取、基因编辑等操作均需去除基质胶。基质胶的溶解方法还会影响类器官的蛋白质组学分析结果^[89]。研究表明,正常人结肠组织和CRC组织的细胞外基质在蛋白质组成、血管网络形成和肿瘤增殖方面存在明显差异,肿瘤细胞外基质会促进肿瘤血

管化以及肿瘤血管代谢转变^[90]。这意味着每种类器官都有其培养所需的最佳细胞外基质。最重要的是,目前尚无标准化的、统一的类器官培养操作指南。

为了应对这些挑战,一些团队开发了以支架为基础的类器官培养技术,借助工程技术合成水凝胶和工程化细胞外基质蛋白代替基质胶,运用微流控和器官芯片等工程技术改进类器官培养方法。比如,人工合成的细胞外基质可以培养人小肠类器官,提高实验结果的可重复性,阐明类器官扩张的机械现象^[91]。胃肠道组织衍生的脱细胞细胞外基质水凝胶是基质胶的良好替代品,由此培养的胃肠道类器官的生长和发育甚至要优于基质胶中培养的种类器官^[92]。这种胃肠道组织衍生的脱细胞细胞外基质水凝胶可以模拟胃肠道组织微环境,使类器官能够长期传代培养和移植。类器官芯片是采用微流控芯片技术建立的体外模拟人体器官功能单元的超微加工的细胞培养装置。类器官芯片可从微环境层面对类器官进行控制,建立组织之间以及多器官之间的互作,减少类器官发育的可变性和随机性,进而解决类器官研究中的统一标准化问题。Gjorevski等^[93]使用模块化的合成水凝胶网络确定了控制肠道干细胞扩张和类器官形成的关键细胞外基质参数,创造了一个完全定义的种类器官培养系统。在这一系统中,合成水凝胶由混合I型胶原和基质凝胶组成,这些合成水凝胶被整合在可灌注的平台上形成了一个混合微芯片系统,高硬度基质使肠道干细胞通过YAP依赖机制维持扩张,而软基质和层粘连蛋白的黏附力促进肠道干细胞分化和类器官形成。这种完全定义、环境最小的培养系统可以满足组织在发育、动态平衡和修复等过程中的动态需求。2020年,Nikolaev等^[94]设计了一种与众不同的类器官培养方法,通过支架微芯片引导肠道干细胞形成具有管腔、隐窝、绒毛样空间结构的管型上皮类器官。这一管型类器官能稳定维持长达1个月,含有M细胞和肠内分泌细胞等普通肠道类器官中罕见的细胞类型,具有与人肠道相似的细胞多样性、关键生理特征和强大的再生能力,并且其管腔内可定植微生物。2022年,Gjorevski等^[95]设计

了另一种可在时间和空间上控制类器官形成的标准化方法。肠道干细胞被嵌入到含光敏性聚乙二醇的合成水凝胶中,405 nm波长的光照处理可将局部基质软化,实现对局部基质时空特异性的控制,进而能够精确控制肠道类器官的大小和性状。研究还揭示了类器官中隐窝-绒毛轴形成的关键分子机制,为控制肠道类器官的尺寸和形状提供了深刻的见解,也为肠道对称性破坏和图示形成提供了统一的参考。综上,工程技术可以帮助解决当前类器官系统面临的标准化问题。统一类器官的培养标准可进一步推动类器官发展。

再者,类器官模型无法完全重现人体内动态且复杂的微环境,缺乏血管系统、神经系统、免疫系统是当前类器官模型的主要缺点。尽管有上述共培养方法,但目前的共培养体系较为简单,细胞类型和不同细胞的组成比例差异也影响对研究结果的阐释。类器官还无法全面概括器官的整体结构和功能,仅能模拟疾病的部分过程^[96]。CRC类器官亦无法完全模拟肿瘤的侵袭和转移行为。类器官内部产生的代谢废物随着增殖不断增多且无法顺利排出,影响了类器官的活性和生长。另外,体内肿瘤组织具有独特的血管网络,组织对氧气的利用能力不同,肿瘤内部存在缺血坏死区域,这也是影响抗肿瘤药物体内疗效的重要原因之一。气液界面培养方法在一定程度上克服了气体交换的问题,然而当前的类器官模型无法模拟体内的血管分布,无法建立正常营养代谢。类器官的血管化是当前研究的一个重要挑战。当前类器官模型的血管化需要使用血管内皮细胞,但由此培养的内皮细胞无法形成完整的血管系统。Holloway等^[97]在多能干细胞衍生的肠道类器官培养的早期阶段发现了内皮细胞群体,而随着培养时间增加,内皮细胞数量会逐渐减少。当在培养基中加入EGF、VEGF、bFGF和BMP4等细胞因子时可以诱导内皮细胞分化形成血管化小肠类器官。最近,多个研究团队借助微流控芯片构建了血管化或血管灌注的肠道类器官模型^[98-99]。Nashimoto等^[100]将癌细胞、脐静脉内皮细胞和成纤维细胞整合到微流体装置中创造了血管化的肿瘤类器官。然而,大多数血管只在类器官周

围生长,并未真正渗入癌细胞内形成血管网。微流控技术创建的血管化类器官仍存在一定局限性,类器官的血管化还有待进一步研究。2022年,Enrico等^[101]的研究为实现具备复杂微血管系统的类器官模型提供一种全新的思路,利用飞秒激光照射水凝胶创建了直径20~60 μm 的稳定的3D微通道,再通过内皮细胞培养或细胞培养基灌注3D微通道即可形成人工微血管。更为关键的是,这种3D微通道可以在含有类器官和细胞的水凝胶中创建,而不会影响管腔外物质的活性。

此外,人体内的器官与器官、组织与器官之间有密切的信息传递和相互作用。目前类器官培养体系缺乏来自其他器官的交互信息。例如,在使用类器官进行药物测试时,各种药物对肝脏、肾脏和心脏等重要脏器的毒性无法得知。各种不同组织的类器官共培养是未来的研究方向之一。整合多个组织的类器官在药物筛选和个体化治疗方面具有重要意义。类器官芯片和微流控等工程技术可能是应对这些挑战的有效措施,未来的研究需要更全面地模拟肿瘤微环境和器官间的互动,进一步优化类器官模型^[102-103]。

5 结论

尽管类器官模型存在一定的局限性,临床应用还有很长的路需要前行,但与传统体外模型相比,类器官仍然具有极大的模型优势与应用价值。随着类器官工程化改进如微流控芯片和气液交互培养系统等标准化的技术发展,类器官模型复杂度和精确性也会不断提高。另外,随着技术发展,从类器官模型获得的读数也会不断增加,以CRC为代表的肿瘤类器官研究也会步入新的阶段。相应地,CRC类器官模型的应用也能够促进CRC临床治疗模式优化,使得CRC真正进入个体化治疗时代。

参考文献(References)

[1] Xi Y, Xu P F. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040[J]. *Translational Oncology*, 2021,

- 14(10): 101174.
- [2] Schmitt M, Greten F R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2021, 21(10): 653-667.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [4] Auman J T, McLeod H L. Colorectal cancer cell lines lack the molecular heterogeneity of clinical colorectal tumors [J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2010, 9(1): 40-47.
- [5] Hay M, Thomas D W, Craighead J L, et al. Clinical development success rates for investigational drugs[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(1): 40-51.
- [6] 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.
- [7] Sprangers J, Zaalberg I C, Maurice M M. Organoid-based modeling of intestinal development, regeneration, and repair[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28(1): 95-107.
- [8] Kozłowski M T, Crook C J, Ku H T. Towards organoid culture without matrigel[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 1387.
- [9] Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, et al. Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(6): 605-614.
- [10] Wallach T E, Bayrer J R. Intestinal organoids: New frontiers in the study of intestinal disease and physiology[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2017, 64(2): 180-185.
- [11] 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.
- [12] Sampaziotis F, Justin A W, Tysoe O C, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(8): 954-963.
- [13] Durinikova E, Buzo K, Arena S. Preclinical models as patients' avatars for precision medicine in colorectal cancer: Past and future challenges[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 2021, 40(1): 185.
- [14] Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(43): 13308-13311.

- [15] Barker N, van Es J H, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*[J]. *Nature*, 2007, 449(7165): 1003–1007.
- [16] Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 274–284.
- [17] Sailaja B S, He X C, Li L H. The regulatory niche of intestinal stem cells[J]. *The Journal of Physiology*, 2016, 594(17): 4827–4836.
- [18] Sato T, van Es J H, Snippert H J, et al. Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 415–418.
- [19] Vries R G J, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine[J]. *Molecular Oncology*, 2010, 4(5): 373–384.
- [20] Basak O, Beumer J, Wiebrands K, et al. Induced quiescence of *Lgr5*⁺ stem cells in intestinal organoids enables differentiation of hormone-producing enteroendocrine cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(2): 177–190.e4.
- [21] Hilkens J, Timmer N C, Boer M, et al. *RSP03* expands intestinal stem cell and niche compartments and drives tumorigenesis[J]. *Gut*, 2017, 66(6): 1095–1105.
- [22] Barker N, Ridgway R A, van Es J H, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer[J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 608–611.
- [23] Nusse R, Clevers H. *Wnt/β-catenin* signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985–999.
- [24] Eto T, Miyake K, Noshō K, et al. Impact of loss-of-function mutations at the *RNF43* locus on colorectal cancer development and progression[J]. *The Journal of Pathology*, 2018, 245(4): 445–455.
- [25] Wend P, Holland J D, Ziebold U, et al. *Wnt* signaling in stem and cancer stem cells[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(8): 855–863.
- [26] Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, et al. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(1): 297–309.e6.
- [27] Gopalakrishnan N, Sivasithamparam N D, Devaraj H. Synergistic association of Notch and *NFκB* signaling and role of Notch signaling in modulating epithelial to mesenchymal transition in colorectal adenocarcinoma[J]. *Biochimie*, 2014, 107: 310–318.
- [28] Kopan R, Ilagan M X G. The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism[J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216–233.
- [29] Zhang Y, Li B, Ji Z Z, et al. Notch1 regulates the growth of human colon cancers[J]. *Cancer*, 2010, 116(22): 5207–5218.
- [30] Fender A W, Nutter J M, Fitzgerald T L, et al. Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, 116(11): 2517–2527.
- [31] Pal D, Tyagi A, Chandrasekaran B, et al. Suppression of Notch1 and AKT mediated epithelial to mesenchymal transition by Verrucarin J in metastatic colon cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9: 798.
- [32] Fre S, Pallavi S K, Huyghe M, et al. Notch and *Wnt* signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(15): 6309–6314.
- [33] van Es J H, van Gijn M E, Riccio O, et al. Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells[J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 959–963.
- [34] Sato T, Stange D E, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and barrett's epithelium[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762–1772.
- [35] Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, et al. Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(10): 1225–1227.
- [36] Fujii M, Matano M, Toshimitsu K, et al. Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 787–793.e6.
- [37] Hughes C S, Postovit L M, Lajoie G A. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture[J]. *Proteomics*, 2010, 10(9): 1886–1890.
- [38] Giobbe G G, Crowley C, Luni C, et al. Extracellular matrix hydrogel derived from decellularized tissues enables endodermal organoid culture[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5658.
- [39] Luo X B, Fong E L S, Zhu C J, et al. Hydrogel-based colorectal cancer organoid co-culture models[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 132: 461–472.
- [40] Hunt D R, Klett K C, Mascharak S, et al. Engineered matrices enable the culture of human patient-derived intestinal organoids[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(10): 2004705.
- [41] Fujii M, Shimokawa M, Date S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 827–838.
- [42] Bergin C J, Benoit Y D. Protocol for serial organoid formation assay using primary colorectal cancer tissues to

- evaluate cancer stem cell activity[J]. *STAR Protocols*, 2022, 3(1): 101218.
- [43] Drost J, van Jaarsveld R H, Ponsioen B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells[J]. *Nature*, 2015, 521(7550): 43–47.
- [44] Fumagalli A, Oost K C, Kester L, et al. Plasticity of Lgr5-negative cancer cells drives metastasis in colorectal cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 569–578.e7.
- [45] de Angelis M L, Francescangeli F, Nicolazzo C, et al. An organoid model of colorectal circulating tumor cells with stem cell features, hybrid EMT state and distinctive therapy response profile[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 2022, 41(1): 86.
- [46] Li X N, Nadauld L, Ootani A, et al. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(7): 769–777.
- [47] Wang X, Yamamoto Y, Wilson L H, et al. Cloning and variation of ground state intestinal stem cells[J]. *Nature*, 2015, 522(7555): 173–178.
- [48] Lewis S K, Nachun D, Martin M G, et al. DNA methylation analysis validates organoids as a viable model for studying human intestinal aging[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 9(3): 527–541.
- [49] Buzzelli J N, Ouaret D, Brown G, et al. Colorectal cancer liver metastases organoids retain characteristics of original tumor and acquire chemotherapy resistance[J]. *Stem Cell Research*, 2018, 27: 109–120.
- [50] Wan M L, Wang Y, Zeng Z, et al. Colorectal cancer (CRC) as a multifactorial disease and its causal correlations with multiple signaling pathways[J]. *Bioscience Reports*, 2020, 40(3): BSR20200265.
- [51] Angius A, Scanu A M, Arru C, et al. Portrait of cancer stem cells on colorectal cancer: Molecular biomarkers, signaling pathways and miRNAome[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 1603.
- [52] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu V E, et al. Cancer genome landscapes[J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546–1558.
- [53] Matano M, Date S, Shimokawa M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(3): 256–262.
- [54] Bolhaqueiro A C F, Ponsioen B, Bakker B, et al. Ongoing chromosomal instability and karyotype evolution in human colorectal cancer organoids[J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(5): 824–834.
- [55] Bae J M, Kim J H, Kang G H. Molecular subtypes of colorectal cancer and their clinicopathologic features, with an emphasis on the serrated neoplasia pathway[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2016, 140(5): 406–412.
- [56] Fessler E, Drost J, van Hooff S R, et al. TGF β signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2016, 8(7): 745–760.
- [57] Kawasaki K, Fujii M, Sugimoto S, et al. Chromosome engineering of human colon-derived organoids to develop a model of traditional serrated adenoma[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(3): 638–651.e8.
- [58] Lannagan T R M, Lee Y K, Wang T T, et al. Genetic editing of colonic organoids provides a molecularly distinct and orthotopic preclinical model of serrated carcinogenesis[J]. *Gut*, 2019, 68(4): 684–692.
- [59] Drost J, van Boxtel R, Blokzijl F, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer[J]. *Science*, 2017, 358(6360): 234–238.
- [60] Sakai E R, Nakayama M, Oshima H, et al. Combined mutation of Apc, kras, and Tgfr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(5): 1334–1346.
- [61] Fumagalli A, Drost J, Suijkerbuijk S J E, et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(12): E2357–E2364.
- [62] O’rourke K P, Loizou E, Livshits G, et al. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(6): 577–582.
- [63] Roper J, Tammela T, Cetinbas N M, et al. *In vivo* genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(6): 569–576.
- [64] Chen Y P, Zheng X, Wu C P. The role of the tumor microenvironment and treatment strategies in colorectal cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 792691.
- [65] Crotti S, Piccoli M, Rizzolio F, et al. Extracellular matrix and colorectal cancer: How surrounding microenvironment affects cancer cell behavior[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(5): 967–975.
- [66] Markman J L, Shiao S L. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer[J]. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2015, 6(2): 208–223.
- [67] Neal J T, Li X N, Zhu J J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. *Cell*, 2018, 175

- (7): 1972–1988.e16.
- [68] Zheng L L, Wang B, Sun Y F, et al. An oxygen–concentration–controllable multiorgan microfluidic platform for studying hypoxia–induced lung cancer–liver metastasis and screening drugs[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(3): 823–832.
- [69] Dijkstra K K, Cattaneo C M, Weeber F, et al. Generation of tumor–reactive T cells by Co–culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1586–1598.e12.
- [70] Schnalzger T E, de Groot M H, Zhang C C, et al. 3D model for CAR–mediated cytotoxicity using patient–derived colorectal cancer organoids[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(12): e100928.
- [71] Wen Y G, Xing X P, Harris J W, et al. Adipocytes activate mitochondrial fatty acid oxidation and autophagy to promote tumor growth in colon cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(2): e2593.
- [72] Hawinkels L J A C, Paauwe M, Verspaget H W, et al. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF– β signaling in cancer–associated fibroblasts[J]. *Oncogene*, 2014, 33(1): 97–107.
- [73] Oszvald Á, Szvicsek Z, Sándor G O, et al. Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche[J]. *Stem Cells*, 2019, 38(2): 291–300.
- [74] Szvicsek Z, Oszvald Á, Szabó L, et al. Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(12): 2463–2476.
- [75] Öhlund D, Handly–Santana A, Biffi G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2017, 214(3): 579–596.
- [76] 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.
- [77] Kondo J, Ekawa T, Endo H, et al. High–throughput screening in colorectal cancer tissue–originated spheroids[J]. *Cancer Science*, 2019, 110(1): 345–355.
- [78] Du Y H, Li X N, Niu Q K, et al. Development of a miniaturized 3D organoid culture platform for ultra–high–throughput screening[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2020, 12(8): 630–643.
- [79] Shen X H, Zhang Y C, Xu Z Q, et al. KLF5 inhibition overcomes oxaliplatin resistance in patient–derived colorectal cancer organoids by restoring apoptotic response[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13: 303.
- [80] Crespo M, Vilar E, Tsai S Y, et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(7): 878–884.
- [81] Costales–Carrera A, Fernández–Barral A, Bustamante–Madrid P, et al. Plocabulin displays strong cytotoxic activity in a personalized colon cancer patient–derived 3D organoid assay[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(11): 648.
- [82] Aberle M R, Burkhart R A, Tiriach H, et al. Patient–derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer[J]. *British Journal of Surgery*, 2018, 105(2): e48–e60.
- [83] Ooft S N, Weeber F, Dijkstra K K, et al. Patient–derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(513): eaay2574.
- [84] Yao Y, Xu X Y, Yang L F, et al. Patient–derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 17–26.e6.
- [85] Schumacher D, Andrieux G, Boehnke K, et al. Heterogeneous pathway activation and drug response modelled in colorectal–tumor–derived 3D cultures[J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(3): e1008076.
- [86] 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[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5321.
- [87] Pauli C, Hopkins B D, Prandi D, et al. Personalized *in vitro* and *in vivo* cancer models to guide precision medicine[J]. *Cancer Discovery*, 2017, 7(5): 462–477.
- [88] Narasimhan V, Wright J A, Churchill M, et al. Medium–throughput drug screening of patient–derived organoids from colorectal peritoneal metastases to direct personalized therapy[J]. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2020, 26(14): 3662–3670.
- [89] Wang M, Yu H, Zhang T, et al. In–depth comparison of matrigel dissolving methods on proteomic profiling of organoids[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2022, 21(1): 100181.
- [90] Romero–López M, Trinh A L, Sobrino A, et al. Recapitulating the human tumor microenvironment: Colon tumor–derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth[J]. *Biomaterials*, 2017, 116: 118–129.
- [91] Hernandez–Gordillo V, Kassis T, Lampejo A, et al. Fully synthetic matrices for *in vitro* culture of primary human intestinal enteroids and endometrial organoids[J].

- Biomaterials, 2020, 254: 120125.
- [92] Kim S, Min S, Choi Y S, et al. Tissue extracellular matrix hydrogels as alternatives to Matrigel for culturing gastrointestinal organoids[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1692.
- [93] Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture[J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 560–564.
- [94] Nikolaev M, Mitrofanova O, Broguiere N, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis[J]. *Nature*, 2020, 585(7826): 574–578.
- [95] Gjorevski N, Nikolaev M, Brown T E, et al. Tissue geometry drives deterministic organoid patterning[J]. *Science*, 2022, 375(6576): eaaw9021.
- [96] Clevers H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586–1597.
- [97] Holloway E M, Wu J H, Czerwinski M, et al. Differentiation of human intestinal organoids with endogenous vascular endothelial cells[J]. *Developmental Cell*, 2020, 54(4): 516–528.e7.
- [98] Rajasekar S, Lin D S Y, Abdul L, et al. IFlowPlate—a customized 384-well plate for the culture of perfusable vascularized colon organoids[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(46): e2002974.
- [99] Seiler K M, Bajinting A, Alvarado D M, et al. Patient-derived small intestinal myofibroblasts direct perfused, physiologically responsive capillary development in a microfluidic gut-on-a-chip model[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 3842.
- [100] Nashimoto Y, Okada R, Hanada S, et al. Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid[J]. *Biomaterials*, 2020, 229: 119547.
- [101] Enrico A, Voulgaris D, Östmans R, et al. 3D microvascularized tissue models by laser-based cavitation molding of collagen[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(11): 2109823.
- [102] Akhtar A A, Sances S, Barrett R, et al. Organoid and organ-on-a-chip systems: New paradigms for modeling neurological and gastrointestinal disease[J]. *Current Stem Cell Reports*, 2017, 3(2): 98–111.
- [103] Shirure V S, Hughes C C W, George S C. Engineering vascularized organoid-on-a-chip models[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2021, 23: 141–167.

Modeling colorectal cancer with organoids: Clinical applications and challenges

LI Jingwei^{1,2}, CHEN Hao¹, SHA Weihong¹, XIONG Xia², ZHOU Jian^{2,3*}

1. Department of Gastroenterology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China
2. National Engineering Laboratory for Pollution Control and Waste Utilization in Livestock and Poultry Production; Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract The colorectal cancer is one of the most common digestive tract tumors globally, which seriously threatens the human health. In recent years, a gratifying progress has been made in the organoid culture technology, making the organoid technology an essential new tool for studying the colorectal cancer mechanisms and the clinical translation. This paper reviews the niche signaling pathways in the colorectal cancer, the application progress of the organoid technology in the colorectal cancer modeling, the tumor microenvironment research, the drug screening and the individualized therapy, as well as the current challenges of the organoid technology and the future development directions of the organoids from the perspectives of the organoid culture technology standardization and the engineering technology applications.

Keywords organoids; colorectal cancer; stem cell niche; tumor microenvironment; Wnt signaling ●



(责任编辑 刘志远)