

基于多肽水凝胶材料的肿瘤类器官培养体系的建立

王慧斌^{1,2}, 赵东东², 张璐^{2,3}, 魏占东², 梁俊^{1*}, 毕昌昊²

1 天津科技大学 轻工科学与工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034

王慧斌, 赵东东, 张璐, 魏占东, 梁俊, 毕昌昊. 基于多肽水凝胶材料的肿瘤类器官培养体系的建立[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4157-4170.

WANG Huibin, ZHAO Dongdong, ZHANG Lu, WEI Zhandong, LIANG Jun, BI Changhao. Development of a tumor organoid culture system with peptide-based hydrogels[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4157-4170.

摘要: 多肽水凝胶是一类具有特殊网络结构的高分子材料, 因其性质稳定、生物相容性良好等特点被广泛应用于生物医药领域。环境响应型自组装多肽水凝胶在环境改变时发生响应, 多肽自组装形成纳米纤维网状结构, 更好地模拟了细胞外基质和细胞生长微环境, 可用于细胞的 3D 培养和类器官培养。为了建立 CulX II 多肽水凝胶材料的肿瘤类器官培养体系, 本研究选用了 Panc-1、U87、H358 细胞, 采用半球体的培养方式, 通过 CulX II 多肽水凝胶材料包裹肿瘤细胞在 24 孔板中培养 15 d。胰腺癌肿瘤类器官呈现出 3D 立体球体的形态, 类器官大小随培养时间的延长而增大, 最终直径大小为 150–300 μm 。肿瘤类器官数量较多、大小不一、细胞活力较好、边缘轮廓清晰、形态较好, 培养比较成功。本研究在 CulX II 多肽水凝胶材料基础上建立了肿瘤类器官模型, 为研究肿瘤发病机制、新药研发、肿瘤抑制提供了研究模型。

关键词: 自组装; 多肽水凝胶; 类器官; 3D 培养; 肿瘤

资助项目: 国家自然科学基金(32271483); 国家重点研发计划(2021YFC2101400)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32271483) and the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101400).

*Corresponding author. E-mail: jliang1118@yeah.net

Received: 2024-02-26; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-17

Development of a tumor organoid culture system with peptide-based hydrogels

WANG Huibin^{1,2}, ZHAO Dongdong², ZHANG Lu^{2,3}, WEI Zhandong², LIANG Jun^{1*},
BI Changhao²

1 College of Light Industry Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology,
Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: Peptide-based hydrogel, the polymer materials with a special network structure, are widely used in various fields of biomedicine due to their stable properties and biocompatibility. Environment-responsive self-assembled peptide aqueous solutions can respond to environment changes by the self-assembly of peptides into nanofiber networks. Peptide-based hydrogels well simulate the extracellular matrix and cell growth microenvironment, being suitable for 3D cell culture and organoid culture. To establish a tumor organoid culture system with peptide-based hydrogels, we cultured Panc-1, U87, and H358 cells in a 3D spherical manner using CulX II peptide-based hydrogels in 24-well plates for 15 days. The organoids showed a 3D spherical shape, and their sizes increased with the extension of the culture time, with a final diameter ranging from 150 to 300 μm . The organoids had a large number, varying sizes, good cell viability, clear edges, and a good shape, which indicated successful organoid construction. The tumor organoid culture system established in this study with CulX II peptide-based hydrogels provides a model for studying tumor pathogenesis, drug development, and tumor suppression.

Keywords: self-assembly; peptide-based hydrogel; organoid; 3D culture; tumor

水凝胶是一种高度亲水的三维网络凝胶材料,在水中能够快速吸收大量水分,迅速膨胀,且不会被溶解^[1]。水凝胶作为一种柔性材料,被广泛应用于生物医学的多个领域,如组织工程、药物递送、细胞三维(three-dimensional, 3D)培养、癌症治疗及再生医学^[2-6]。多肽水凝胶是一种以短肽链为主要成分的水凝胶材料^[7]。根据形成方式可分为化学交联肽水凝胶和物理肽水凝胶^[8]。物理肽水凝胶通过分子内和分子间的自组装形成^[9],其作用力来源于非共价相互作用,包括氢键^[10]、静电相互作用^[11]、疏水相互作用^[12]和 π - π 堆积^[13]。自组装多肽水凝胶属物理肽水凝胶类,通常表现出分级的微观结构,

这是由于它们是从分子到纳米纤维,再到最终的水凝胶网络逐渐形成的^[14]。肽组分为水凝胶提供了优异的生物相容性和生物降解性,使其成为了生物医学领域中最有前景的选择之一^[15]。自组装多肽水凝胶与细胞外基质具有相似的结构,且其降解速率与许多组织的生长速率相适应,因此被广泛用作组织工程中的细胞 3D 培养支架^[2-3]。

类器官是一种利用成体干细胞或多能干细胞进行体外 3D 培养而形成的具有一定空间结构并能模拟真实器官部分功能的组织类似物。类器官可以稳定地保留器官的部分关键特征。类器官模型可以最大程度模拟体内相应组织器

官的空间结构和生理功能,从而提供与人体高度一致的生理或病理系统^[16]。肿瘤类器官是一种人工构建的模拟人类真实肿瘤的体外模型。它由多种细胞类型组成,包括肿瘤细胞、周围免疫细胞和其他支持细胞类型。这些细胞类型在肿瘤类器官中相互作用,形成类似于真实肿瘤的微环境。肿瘤类器官模型具有多种优势,可以捕获亲代肿瘤异质性和药物敏感性特征的细胞组成。肿瘤类器官为填补癌症研究和临床结果之间的差距提供了新的机会^[17-18]。

近些年来,类器官技术在肿瘤及癌症中的研究迅速增加,特别是在药物筛选和精准医学方面。患者来源的类器官(patient driven organoid, PDO)提供了有效的临床前癌症模型,能更好地模拟肿瘤组织的成分,并可从患者样本中有效建立^[19-21]。PDO中的肿瘤内多样性在单细胞水平上捕捉了肿瘤异质性,并为癌症研究提供了宝贵资源^[22]。患者来源的肿瘤类器官的培养使切除的人类肿瘤组织的常规原代培养成为可能^[22-24]。目前已利用患者肿瘤组织建立了大量的PDO模型,包括结肠、肝脏^[24]、胃^[25]、肺^[26]、膀胱^[27]、乳腺^[28]和胰腺癌^[29-30]以及头颈鳞状细胞癌^[31]模型。肿瘤类器官作为药物研发和个性化治疗的良好癌症模型,为患者肿瘤治疗提供了可能^[32-33]。然而,目前肿瘤类器官的体外培养条件并不成熟,培养环境要求十分严格,体外培养体系构建比较复杂。因此,开发新型的细胞3D培养材料,构建更加完善的培养体系对于肿瘤类器官的研究具有重要意义。同时,自组装多肽水凝胶的发展,为肿瘤类器官体外培养体系的构建提供了新的可能,为研究肿瘤的发生及治疗提供了契机。本研究采用体外细胞3D培养技术,使用自组装多肽水凝胶材料建立了一种新的肿瘤类器官培养体系,通过对肿瘤类器官形态观察、标志物鉴定、检测活力和增殖、细胞

染色等方式,在体外构建了多种癌细胞来源的肿瘤类器官,这些肿瘤类器官模型为了解肿瘤的生长机制以及治疗方法提供了研究模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

人胰腺癌细胞 Panc-1、人脑星形胶质母细胞瘤 U87、人非小细胞肺癌细胞 H358 来自国家生物医学实验细胞资源库/中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂

本研究所用主要试剂为仿生基质冻干粉 CulX II (天津矩阵生物科技有限公司),细胞基础培养基 DMEM (赛默飞世尔科技有限公司),脑胶质瘤类器官培养基(广州创芯国际生物科技有限公司),胎牛血清、青链霉素混合液、胰蛋白酶(天津凯思博生物科技有限公司),PBS 缓冲液(天津百倍生物科技有限公司),CCK-8 试剂盒(北京沃格东方科技有限公司),Calcein-AM/PI 活死细胞染色试剂(上海攸碧艾贸易有限公司),DAPI 染色液(上海碧云天生物技术有限公司),YF488 标记鬼笔环肽(YF488-Phalloidin) (广州睿卓生物科技有限公司),人糖链抗原 19-9 (CA19-9) ELISA 试剂盒(北京冬歌博业生物科技有限公司)。

1.1.3 CulX II多肽水凝胶材料水溶液的配制

多肽水凝胶材料冻干粉 CulX II 购买自天津矩阵生物科技有限公司,按照说明进行使用。准确称量 100 mg CulX II 冻干粉于 15 mL 无菌离心管中,加入 5 mL 蒸馏水,配制成 2.0% (质量百分比)的 CulX II 多肽水凝胶材料水溶液,涡旋混匀,121 °C 灭菌 25 min,室温保存。

1.1.4 细胞完全培养基的配制

在细胞基础培养基 DMEM 中按比例添加 10% (体积百分比)胎牛血清和 1% (体积百分比)

的青链霉素混合液,混匀,4℃保存。

1.2 方法

(以下与细胞培养相关的实验操作均需要在无菌环境中进行)

1.2.1 细胞复苏

将冻存的细胞在 37℃水浴锅中快速摇晃解冻,离心弃掉上层液体,用预温过的细胞培养基缓慢重悬细胞沉淀,转移至细胞培养皿中,添加适量培养基,水平和竖直摇晃 3 次,置于细胞培养箱中培养(37℃、5% CO₂),每 48 h 更换新鲜培养基。

1.2.2 细胞传代

当细胞生长密度达到 80%–90%即可进行传代,弃掉上层培养基,加 PBS 缓冲液清洗 2 次,用胰蛋白酶消化细胞,待消化完全后加入培养基终止消化,离心弃上清,重悬细胞沉淀后按照 1:3 的比例进行传代,继续培养。

1.2.3 CCK-8 细胞增殖标准曲线绘制

传代收集对数生长期的细胞,计数,配制一定浓度的细胞悬液,接种 100 μL 于 96 孔板中,梯度稀释使得每个孔细胞接种量依次为 200 000、100 000、50 000、25 000、12 500、6 250 个/孔,每个梯度做 3 个平行,培养 4–6 h 使细胞贴壁,观察细胞形态,贴壁后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂盒溶液,孵育 3 h,使用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值,以细胞接种量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制细胞增殖标准曲线。

1.2.4 肿瘤类器官培养

收集对数生长期的细胞,配制成浓度 5×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液,吹打混匀后取 18 μL 的细胞悬液加入 12 μL 的 2.0% (质量百分比)的 CulX II 多肽水凝胶材料水溶液,缓慢吹匀后滴加在 24 孔板的孔中央,每个孔接种 5 000–10 000 个细胞,培养箱中孵育 1 h 使 CulX II

液滴凝胶化,之后添加 500 μL 的细胞培养基继续培养,每 3 d 更换新鲜培养基。

1.2.5 肿瘤类器官的形态观察和大小统计

在显微镜下观察肿瘤类器官的形态,在培养过程中的不同时间段对肿瘤类器官的数量和直径大小进行计数统计,每次 3 个视野,重复 3 次。

1.2.6 CCK-8 法检测胰腺癌肿瘤类器官活力和增殖

在 24 孔板中更换 500 μL 的细胞培养基,加入 50 μL 的 CCK-8 试剂盒溶液,培养箱中孵育 3 h,使用酶标仪测定上清培养基在 450 nm 处的吸光度值,结合细胞增殖标准曲线综合评估肿瘤类器官培养过程中的类器官活力和增殖情况。

1.2.7 胰腺癌肿瘤类器官的肿瘤标志物鉴定

用人糖链抗原 19-9 (CA19-9)试剂盒来检测胰腺癌肿瘤类器官培养过程中的肿瘤标志物 CA19-9 的表达量,对胰腺癌肿瘤类器官进行鉴定。收集肿瘤类器官的培养上清培养基,1 000×g 离心 20 min,取上清检测。按照操作说明依次加入试剂盒中的检测抗体-HRP、底物 A、底物 B、终止液,在 450 nm 波长处测定标准品孔和样本孔的吸光度值。依据标准品的标准曲线来计算出样品中 CA19-9 的含量。贴壁培养的 Panc-1 细胞系做阴性对照,检测肿瘤类器官培养过程中的肿瘤标志物的表达量。

1.2.8 肿瘤类器官的分离

弃掉肿瘤类器官的上清培养基,用 10 mL 的粗口的移液管将 CulX II 多肽水凝胶材料包裹的类器官移取至 15 mL 离心管中,用 10 mL 的 PBS 缓冲液清洗,多次缓慢吹打使 CulX II 多肽水凝胶材料分散,使肿瘤类器官从多肽水凝胶分离出来,重力沉降法收集类器官,重复 2 次,将收集的肿瘤类器官用于后续实验。

1.2.9 胰腺癌肿瘤类器官的 Calcein-AM/PI 细胞活死染色

Calcein-AM/PI 复合染色液的配制:在 5 mL 的 PBS 缓冲液中加入 10 μL 的 Calcein-AM 染色液和 20 μL 的 PI 染色液,混匀,将分离收集到的肿瘤类器官进行染色,每孔的类器官加 500 μL 的 Calcein-AM/PI 复合染色液,培养箱中避光孵育 30 min,分别在 490 nm 和 535 nm 波长激发光下观察细胞活死染色效果,评估肿瘤类器官培养的过程中的细胞存活情况。

1.2.10 胰腺癌肿瘤类器官的 DAPI 和鬼笔环肽染色

在 2 mL 的 PBS 缓冲液中加入 500 μL 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液和 10 μL 的鬼笔环肽染色液,混匀,将分离收集到的肿瘤类器官进行染色,每孔的类器官中加入 500 μL 的复合染色液,培养箱中避光孵育 30 min,分别在 340 nm 和 490 nm 波长激发光下观察细胞荧光染色效果,观察肿瘤类器官的结构形态,主要是不同区域的细胞的细胞核与细胞骨架形态。

2 结果与分析

2.1 胰腺癌肿瘤类器官的形态观察和大小统计

贴壁细胞常见的 3D 培养方法,是用水凝胶将细胞包裹起来,使细胞被水凝胶的纳米纤维网状结构支撑起来,在培养体系中立体分布,

从而实现细胞 3D 培养(图 1)。肿瘤类器官的培养方法与细胞 3D 培养的方法是一致的,但半球体、液滴式的培养方式更适用于类器官的培养(图 1)。这种模式下的培养环境更加接近细胞真实环境,多肽水凝胶包裹的类器官可以更好地与外界进行物质交换,更适合类器官的培养。

从人胰腺癌 Panc-1 细胞系出发培养的肿瘤类器官在培养的 15 d 前后,24 孔板内的 CulX II 多肽水凝胶形态基本一致。CulX II 多肽水凝胶提供了一定机械强度的支撑使得在类器官培养的 15 d 时间内维持类器官的形态及培养环境,且保持一致的形态。

在胰腺癌肿瘤类器官的培养过程中,每个视野中均可以观察到大小不一、轮廓清晰的肿瘤类器官,同时存在少量零散的单个细胞(图 2)。培养 3 d,细胞开始出现聚集,存在一些细胞球,多数的细胞球直径在 60 μm 左右。培养 7 d,细胞球数量明显增多,细胞球体积明显增大,存在比较多的细胞球,多数的细胞球直径达到 100 μm 。培养至 15 d,视野中存在比较多的较为成熟的类器官,直径在 270 μm 左右(图 3),部分较大的比较成熟的类器官直径达到 390 μm ,呈现立体球型、轮廓清晰、中心透光度较低(图 2)。培养 15 d 后,在 24 孔板中央可以明显观察到 CulX II 多肽水凝胶材料包裹着类器官的存在,肿瘤类器官呈现典型的球型形态,分散于多肽水凝胶的不同位置(图 4)。

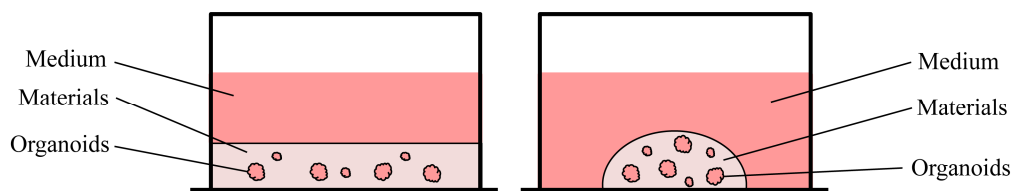


图 1 细胞 3D 培养(左)和类器官培养(右)的示意图

Figure 1 Schematic diagram of cell 3D culture (left) and organoid culture (right).

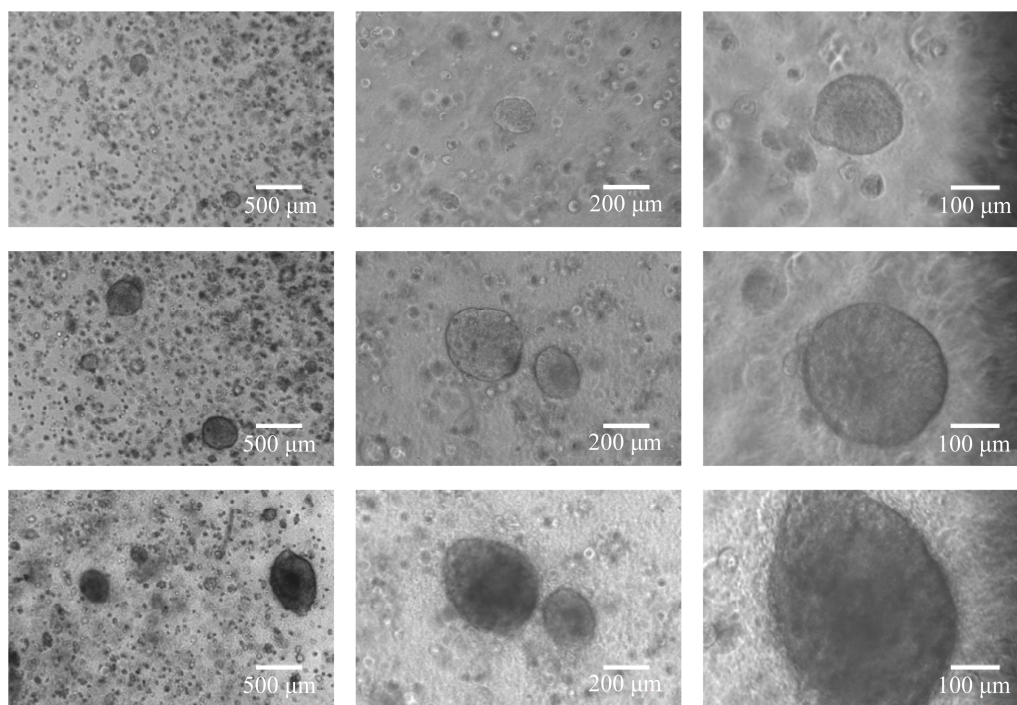


图2 胰腺癌肿瘤类器官在培养 15 d 内不同视野下的形态

Figure 2 Morphology of pancreatic cancer tumor organoids under different fields of view during 15 d of culture.

2.2 胰腺癌肿瘤类器官的活力和增殖

用 CCK-8 试剂盒来测定胰腺癌肿瘤类器官培养过程中的活力和增殖情况, 通过测定加入 CCK-8 的上清培养基在 450 nm 波长下的吸光

度, 结合 Panc-1 细胞的增殖标准曲线, 综合评估肿瘤类器官的活力和增殖情况。在培养的 14 d 内, 胰腺癌肿瘤类器官活力较好(图 5), 通过在 96 孔板中接种一定数量的细胞并测定其吸光度, 绘制了细胞数-吸光度的细胞增殖标准曲线(图 6)。培养 14 d 时间内, 胰腺癌肿瘤类器官增

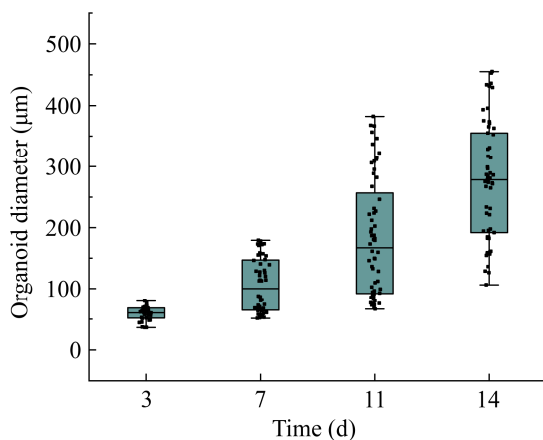


图3 胰腺癌肿瘤类器官的直径大小统计

Figure 3 Statistical analysis of the diameter sizes of pancreatic cancer tumor organoids.

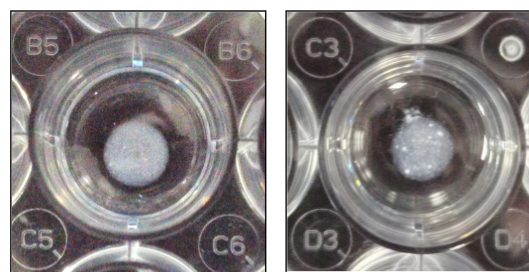


图4 胰腺癌肿瘤类器官培养的 15 d 前(左)后(右)在 24 孔板内的水凝胶形态

Figure 4 Gelatin hydrogel shapes on a 24-well plate before (left) and after (right) 15 d of pancreatic cancer tumor organoid culture.

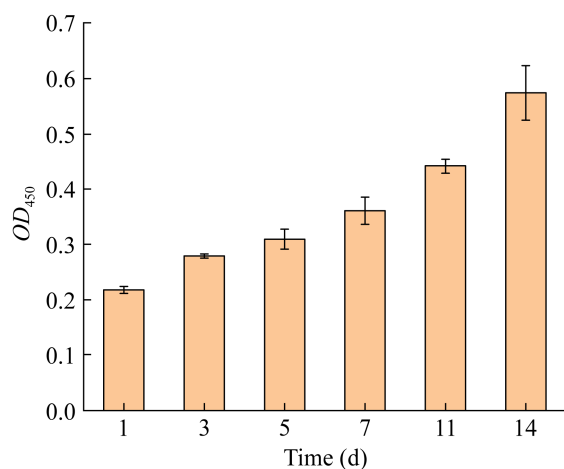


图5 胰腺癌肿瘤类器官培养14 d的活力测定
Figure 5 Viability measurements of pancreatic cancer tumor organoids during 14 d of culture.

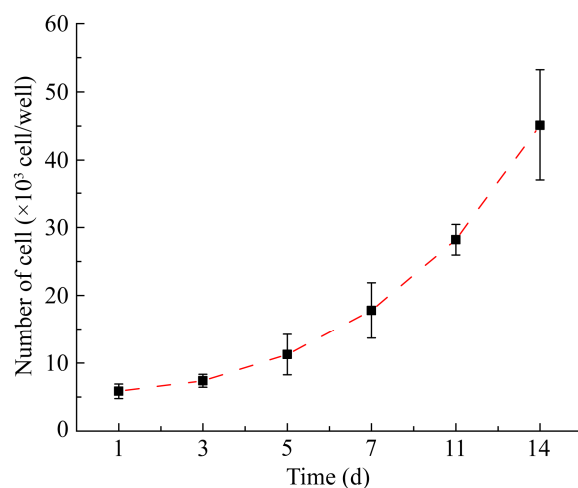


图7 胰腺癌肿瘤类器官培养14 d的细胞增殖曲线
Figure 7 Cell proliferation curve of pancreatic cancer tumor organoids during 14 d of culture.

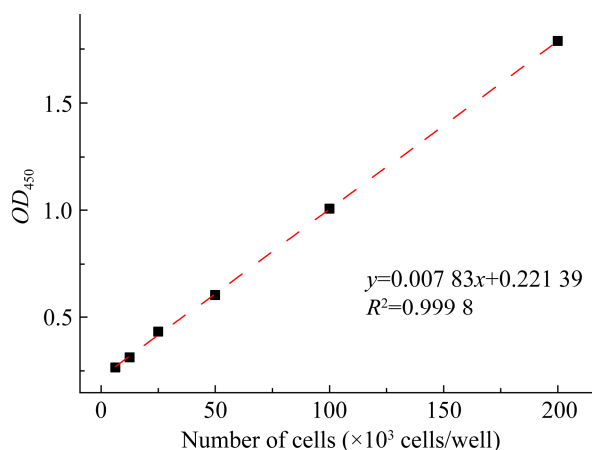


图6 Panc-1细胞的CCK-8细胞增殖标准曲线
Figure 6 CCK-8 cell proliferation standard curve of Panc-1 cells.

殖较快,细胞数从最初接种的5 000个增长到50 000个左右(图7),生长情况良好。

2.3 胰腺癌肿瘤类器官的细胞活死染色

使用 Calcein-AM/PI 染色试剂进行细胞活死染色实验,用于评估肿瘤类器官培养过程中的细胞存活情况。Calcein-AM 可以与活细胞相互作用,产生绿色荧光,可用于活细胞的生存能力测试和短期标记。PI 能穿过死细胞的细胞

膜到达细胞核,与细胞内的 DNA 相互作用产生红色荧光,可用于死细胞染色。Calcein-AM 和 PI 染色剂联合使用,进行活死细胞的双重荧光染色。将胰腺癌肿瘤类器官从多肽水凝胶材料分离出来之后进行染色实验。结果显示,包括肿瘤类器官形态在内的 95%以上的活细胞均呈现绿色荧光,存在极少数的零星死细胞呈现红色荧光,在培养 7 d 的不同视野下的活死细胞荧光染色结果一致(图8)。培养 14 d 后,细胞存活情况依旧较好,存在极少数的死细胞。即使培养 14 d 的较成熟的肿瘤类器官直径达到 300 μm ,死细胞依旧比较少,说明胰腺癌肿瘤类器官在整个培养过程中细胞存活情况较好,活力较高(图9)。

2.4 胰腺癌肿瘤类器官的细胞结构染色

联合使用 DAPI 和鬼笔环肽(phalloidin)染色液对肿瘤类器官的整体结构进行染色,进一步评估类器官培养过程中的细胞结构和凋亡情况。DAPI 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,与 DNA 双链结合后,在 340 nm 激发光激发下可以产生很强的蓝色荧光,用于细胞核染

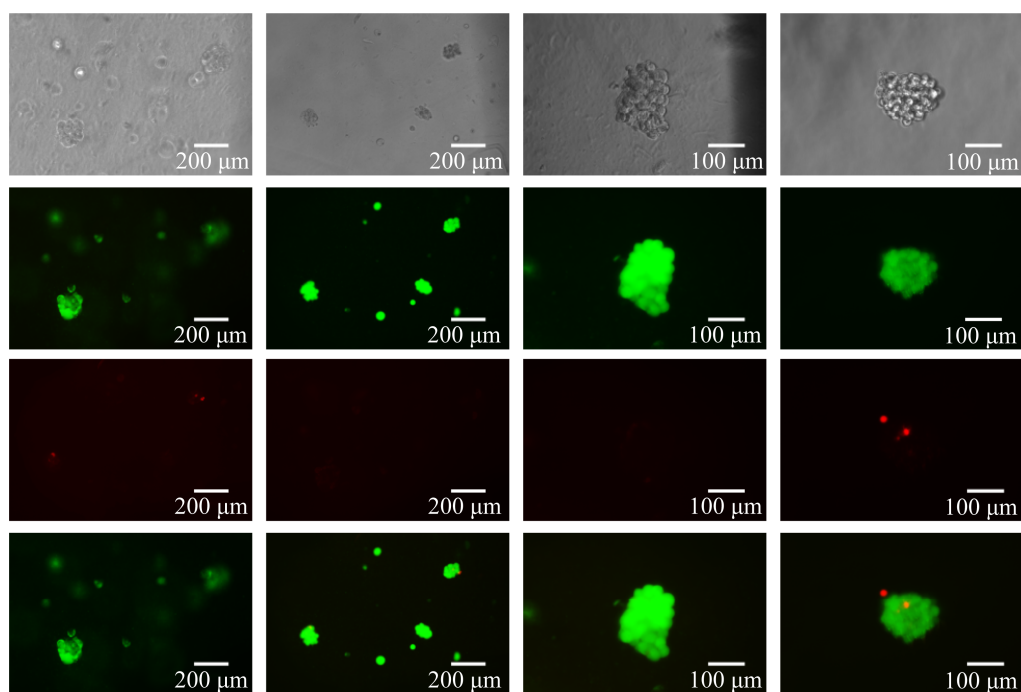


图 8 胰腺癌肿瘤类器官培养 7 d 不同视野下的细胞活死染色效果

Figure 8 Live/dead cell staining effects under different fields of view in pancreatic cancer tumor organoids cultured for 7 d.

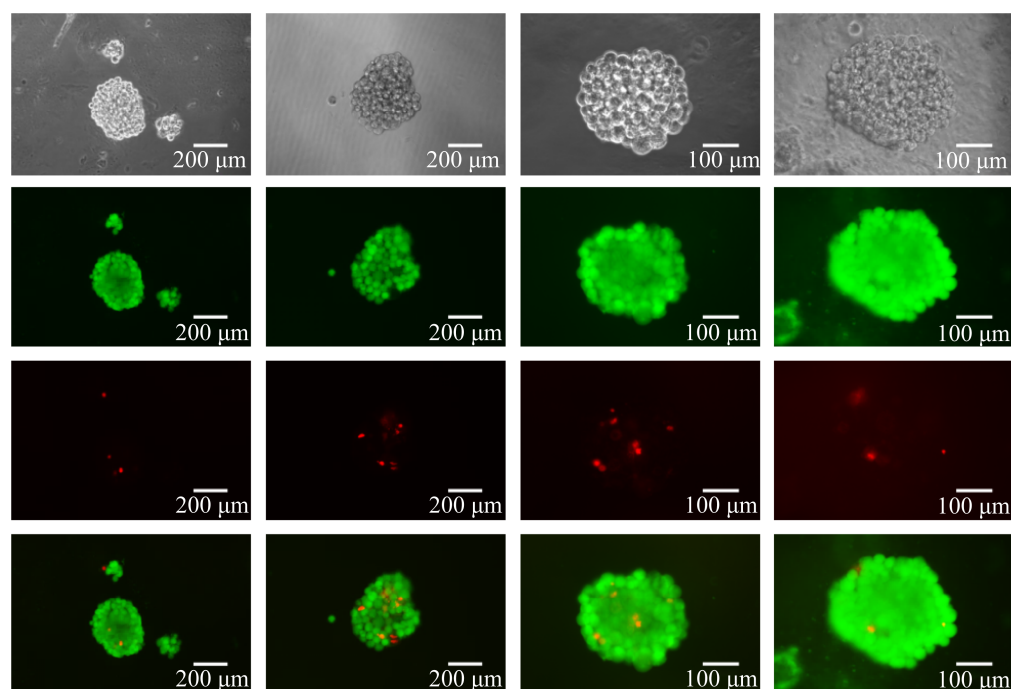


图 9 胰腺癌肿瘤类器官培养 14 d 不同视野下的细胞活死染色效果

Figure 9 Live/dead cell staining effects under different fields of view in pancreatic cancer tumor organoids cultured for 14 d.

色。细胞骨架是网状纤维结构,是高度动态的,不同时期有不同的形态。鬼笔环肽通过结合和稳定纤维状肌动蛋白(F-actin)发挥功能,从而显示微丝骨架在细胞中的分布,在 490 nm 激发光激发下可以呈现出较强的绿色荧光,从而对细胞骨架进行荧光标记。联合使用 DAPI 和鬼笔环肽对胰腺癌肿瘤类器官进行染色。结果显示,胰腺癌肿瘤类器官整体形态比较紧凑,结构比较完整,肿瘤类器官构建和培养比较成功(图 10)。

2.5 胰腺癌肿瘤类器官的肿瘤标志物鉴定

使用人糖链抗原 19-9 (CA19-9) ELISA 试剂盒来检测胰腺癌肿瘤类器官的 CA19-9 的表达量。CA19-9 是胰腺癌的特异性肿瘤标志物之一。试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验。向预先包被 CA19-9 捕获抗体的包被微孔中,依次加入标本、标准品、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的检测

抗体,进行温育并彻底洗涤。用底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 CA19-9 含量呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度,计算样品浓度。在培养 7 d 时间内,胰腺癌肿瘤类器官 CA19-9 的表达量要高于相同条件下的贴壁培养的 Panc-1 细胞系(图 11)。与贴壁培养的 Panc-1 细胞系相比较,3D 培养的胰腺癌肿瘤类器官在肿瘤标志物表达水平上更加接近于真实的胰腺癌肿瘤组织。该肿瘤类器官模型可以模拟真实肿瘤生长条件及微环境,在胰腺癌研究和治疗上更有优势。

2.6 其他肿瘤类器官的形态特征

为了探究 CuIX II 多肽水凝胶材料在肿瘤类器官领域的综合应用,除了胰腺癌肿瘤类器官之外,还培养了人脑星形胶质母细胞瘤类器官和

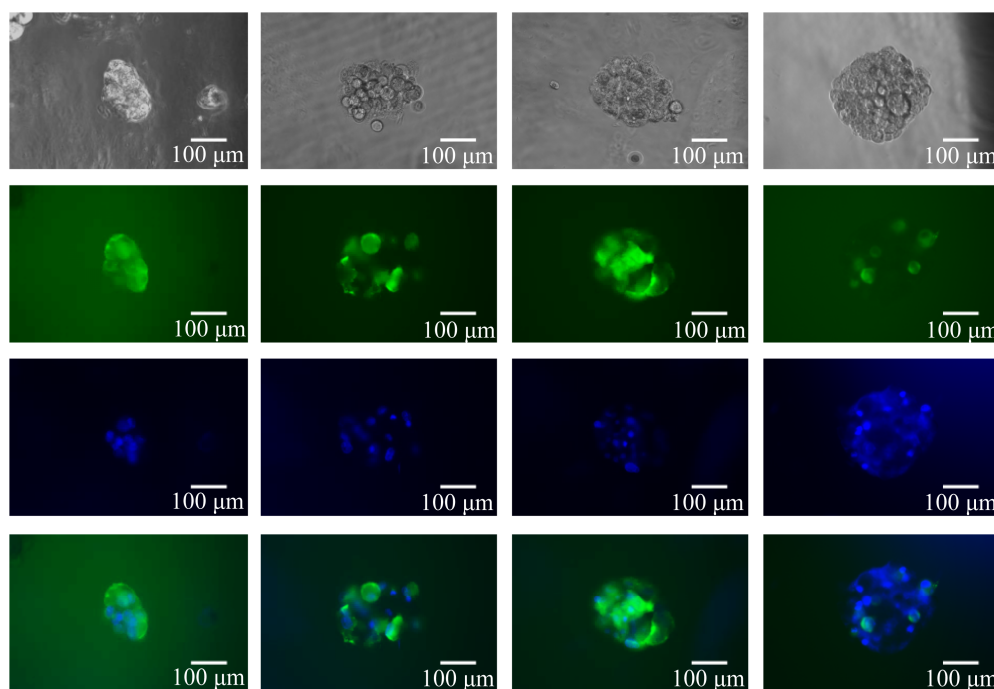


图 10 胰腺癌肿瘤类器官培养 7 d 的细胞结构染色效果

Figure 10 Cell structure staining effects of pancreatic cancer tumor organoids cultured for 7 d.

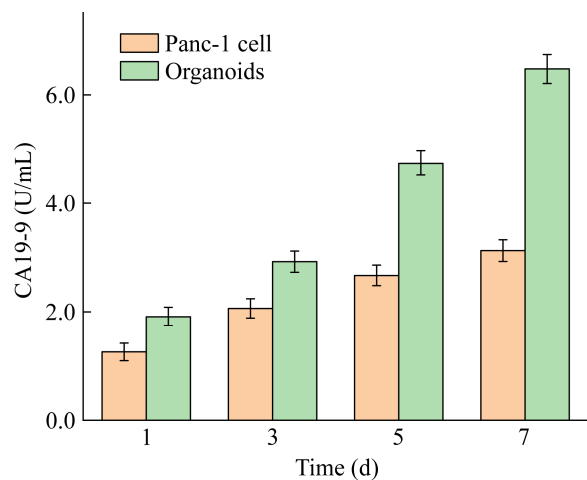


图 11 胰腺癌肿瘤类器官和 Panc-1 细胞系的 CA19-9 表达量

Figure 11 CA19-9 expression levels of pancreatic cancer tumor organoids and Panc-1 cells.

人非小细胞肺癌肿瘤类器官,来综合评估 CulX II 多肽水凝胶材料用于构建肿瘤类器官培养体系的可行性,使用的培养方案和胰腺癌 Panc-1 细胞系一致。

2.6.1 人脑星形胶质母细胞瘤类器官的形态

使用脑胶质瘤类器官培养基培养 3 d, U87 细胞呈现典型的细胞球圆球型形态。脑胶质瘤类器官大小不一、轮廓清晰,存在少量增殖缓慢、尚未成球的单个细胞。继续培养至 15 d, 肿瘤类器官数量增多、体积增大,多数肿瘤类器官直径在 180–250 μm 范围内,部分直径达到 300 μm 左右,呈现出光滑边缘,轮廓清晰的细胞球体形态,脑胶质瘤类器官达到一定体积后,中央透光度显著降低(图 12)。

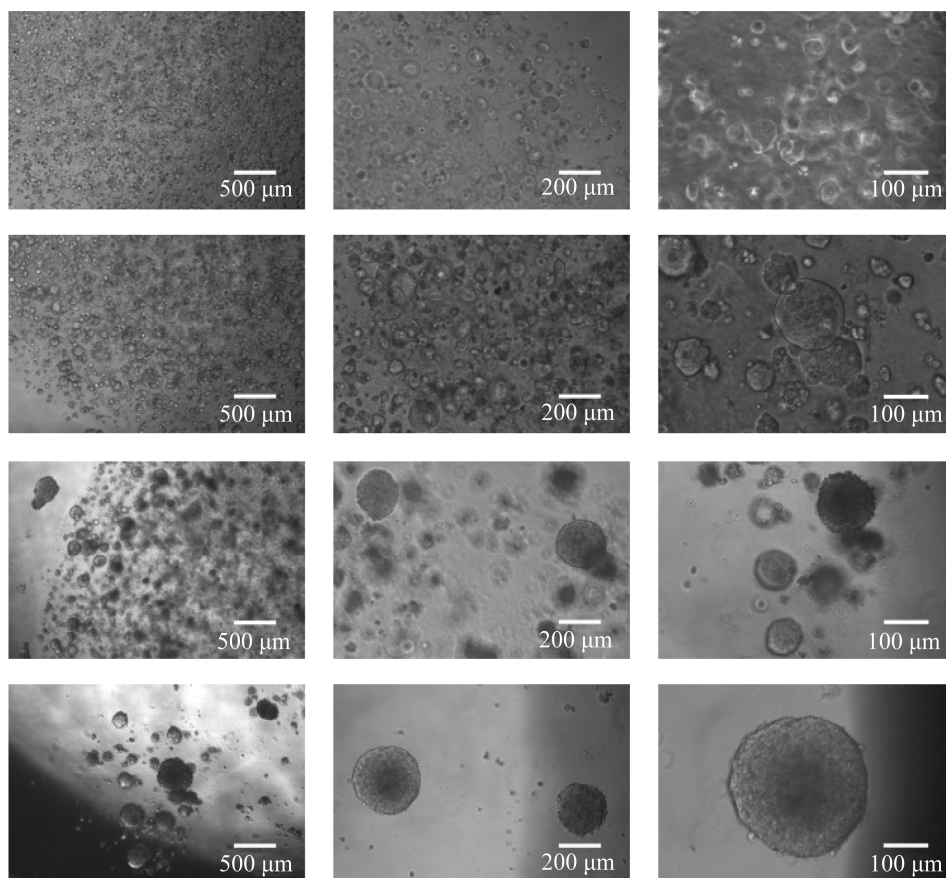


图 12 人脑星形胶质母细胞瘤类器官的形态

Figure 12 Morphology of human brain astrocytoma organoids.

2.6.2 人非小细胞肺癌肿瘤类器官的形态

人非小细胞肺癌 H358 细胞培养的肿瘤类器官在培养 14 d 后, 培养效果较好, 肿瘤类器官在视野中比较显著, 呈现立体球型, 直径在 150–200 μm 范围内, 数量较多, 形态较好(图 13)。

3 讨论与结论

综上所述, 本研究以新型多肽水凝胶材料 CulX II 为基础, 建立了一种肿瘤类器官培养体系, 构建了多个肿瘤类器官模型。通过 CCK-8 方法检测了胰腺癌肿瘤类器官活力和增殖情况, 并通过 4 种荧光染色液进一步表征了胰腺癌肿瘤类器官的形态、活力及结构。同时通过检测肿瘤标志物 CA19-9 的表达量来对胰腺癌肿瘤类器官进行鉴定。与贴壁培养的 Panc-1 细胞系相比较, 胰腺癌肿瘤类器官在形态、结构以及肿瘤标志物的表达等方面更加接近于真实

的肿瘤组织, 其肿瘤细胞生长的环境因多肽水凝胶材料的存在而实现了细胞 3D 培养, 使其更接近于肿瘤真实的生长环境。作为体外研究模型, 肿瘤类器官模型在组织病理学特征、基因表达和药物反应等方面可以模拟真实的肿瘤组织, 这些是贴壁培养的细胞系无法实现的。多种肿瘤类器官模型的成功构建, 证明 CulX II 作为一种新型的自组装多肽水凝胶材料, 在肿瘤类器官模型构建和培养方面有广阔的应用前景。

肿瘤类器官是一种三维细胞培养模型, 由肿瘤细胞在三维环境中自我组织形成。这种模型能够模拟肿瘤真实生长及其微环境, 因此在肿瘤研究和药物开发中广泛应用。然而, 肿瘤类器官的培养体系环境无法摆脱来源于动物的 matrigel 基质胶材料, 这些材料包含未确定的细胞外成分, 这些成分可能会意外地改变细胞及类器官的行为。相比较之下, 成分来源明确的

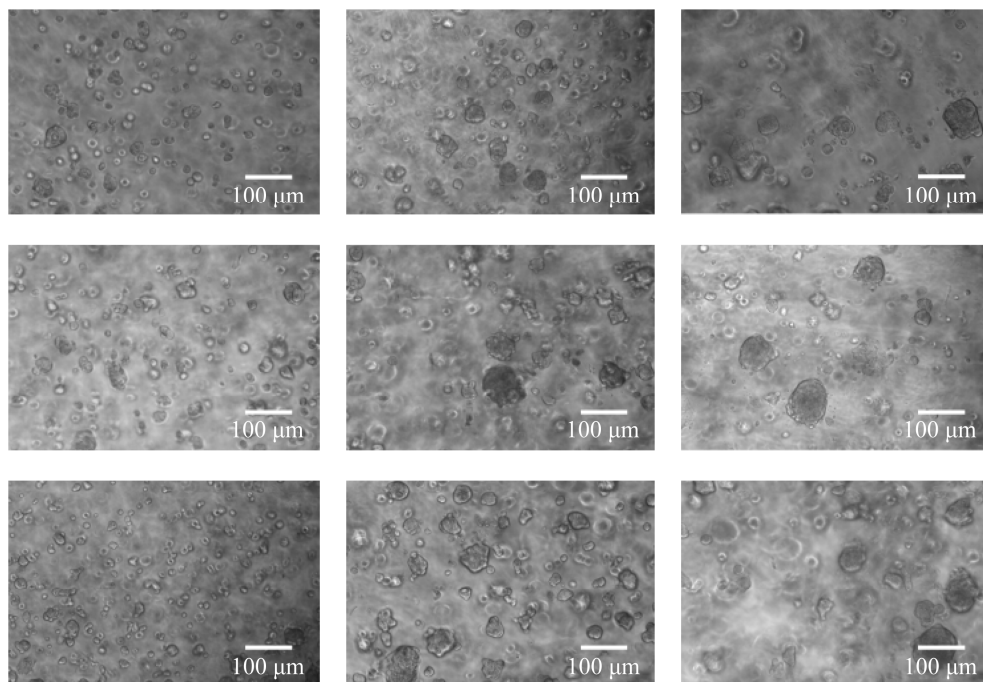


图 13 人非小细胞肺癌肿瘤类器官形态

Figure 13 Morphology of human non-small cell lung cancer tumor organoids.

多肽水凝胶材料的出现解决了该问题。近些年,自组装多肽水凝胶的探索与发展,为构建更加适用的类器官培养体系提供了可能。CulX II作为一种新型的多肽水凝胶材料,在细胞 3D 培养方面有广阔的应用前景。多肽水凝胶材料 CulX II 在环境改变时发生响应,通过多肽分子自组装形成纳米纤维网状结构,该结构可以实现对细胞的黏附和支撑,从而实现细胞的 3D 培养,最终用于肿瘤类器官的构建和培养。多肽水凝胶材料 CulX II 在材料属性、微观结构、物理性质及功能上高度模拟天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的关键特征,从而在体外创造与组织内细胞生长类似的微环境,在肿瘤类器官构建及培养方面具有更加独特的优势。多肽水凝胶材料 CulX II 来源天然且成分明确,性能稳定,生物相容性良好,机械强度适宜,相比于商业化的 matrigel 基质胶材料而言,CulX II 更加适用于肿瘤类器官的构建与培养。尽管通过自组装多肽在细胞 3D 培养方面已经取得了很多进展,但依旧存在一些未解决的问题。例如,在肽自组装过程中,很难准确地控制纳米纤维的大小和形态,因此这些纳米纤维在一定程度上是异质的。开发更加稳定的多肽水凝胶材料将会进一步地拓展多肽水凝胶的应用范围。

本研究构建的肿瘤类器官模型是通过肿瘤细胞系在三维培养中自发聚集形成的 3D 肿瘤细胞球,并在此基础上进一步培养和成熟,使其成为具备部分功能的肿瘤类器官。它们可以较好地模拟肿瘤的三维生长环境和细胞间相互作用。肿瘤细胞在这种模型中表现出更接近体内的行为,包括增殖率、存活率和对治疗的反应,可用于研究肿瘤生长、侵袭和药物筛选。但肿瘤类器官模型也存在一定局限性,它们主要由一个细胞类型组成,不包括其他类型的细

胞,使得该模型复杂性相对较低,无法完全再现真实肿瘤的异质性和复杂的体内微环境。患者衍生的类器官(PDO)相比于本研究中的肿瘤类器官,提供了更复杂、更接近实际肿瘤的模型,因此它们在模拟肿瘤微环境和评估药物效果方面更为精确。PDO 模型是一种先进的生物模型,它们通过从病人肿瘤组织的样本中培养得到,包含多种细胞类型和更加复杂的结构,保留了原始肿瘤的细胞异质性,用于更加深入的癌症机理研究、更精准的药物测试和个性化医疗研究。但 PDO 模型也存在一定局限性,与传统的细胞培养相比,PDO 模型需要更多的资源和成本。PDO 的建立和维护需要特定的技术和条件,可能会限制其应用。从获取样本到建立并扩增 PDO 需要较长的时间。相比较之下,本研究中建立的肿瘤类器官模型因其简便性和较低成本而在药物筛选和肿瘤基础研究中仍具有一定价值。

本研究实现了体外多个肿瘤类器官的构建和培养,为进一步研究肿瘤发病机制以及癌症治疗的药物筛选提供了研究模型。但初步建立的肿瘤类器官目前并不成熟,肿瘤类器官中的细胞组成和结构与真实肿瘤还存在一定差异。进一步开发新的自组装多肽水凝胶材料,优化体外培养条件,建立更加完善的肿瘤类器官培养体系,获得在细胞组成、结构和表型与真实肿瘤组织更为一致的肿瘤类器官是未来的重要研究方向。

REFERENCES

- [1] YU ZQ, XU Q, DONG CB, LEE SS, GAO LQ, LI YW, D'ORTENZIO M, WU J. Self-assembling peptide nanofibrous hydrogel as a versatile drug delivery platform[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21(29): 4342-4354.
- [2] AGARWAL R, GARCÍA AJ. Biomaterial strategies for

- engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 94: 53-62.
- [3] HE B, YUAN X, WU J, BAI Y, JIANG DM. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Science of Advanced Materials*, 2015, 7(7): 1221-1232.
- [4] JAYAWARNA V, ALI M, JOWITT T, MILLER A, SAIANI A, GOUGH J, ULIJN R. Nanostructured hydrogels for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl-dipeptides[J]. *Advanced Materials*, 2006, 18(5): 611-614.
- [5] KOUTSOPOULOS S. Self-assembling peptide nanofiber hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine: progress, design guidelines, and applications[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104(4): 1002-1016.
- [6] LIU W, ZHANG WS, YU XQ, ZHANG GH, SU ZQ. Synthesis and biomedical applications of fluorescent nanogels[J]. *Polymer Chemistry*, 2016, 7(37): 5749-5762.
- [7] ZHOU M, SMITH AM, DAS AK, HODSON NW, COLLINS RF, ULIJN RV, GOUGH JE. Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(13): 2523-2530.
- [8] JONKER AM, LÖWIK DWPM, van HEST JCM. Peptide- and protein-based hydrogels[J]. *Chemistry of Materials*, 2012, 24(5): 759-773.
- [9] PARAMONOV SE, JUN HW, HARTGERINK JD. Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(22): 7291-7298.
- [10] TSONCHEV S, SCHATZ GC, RATNER MA. Electrostatically-directed self-assembly of cylindrical peptide amphiphile nanostructures[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108(26): 8817-8822.
- [11] de GROOT NS, PARELLA T, AVILES FX, VENDRELL J, VENTURA S. Ile-phe dipeptide self-assembly: clues to amyloid formation[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(5): 1732-1741.
- [12] BOWERMAN CJ, LIYANAGE W, FEDERATION AJ, NILSSON BL. Tuning β -sheet peptide self-assembly and hydrogelation behavior by modification of sequence hydrophobicity and aromaticity[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(7): 2735-2745.
- [13] 王韵晴, 卢婷利, 陈婷, 马玉樊, 赵雯, 陈涛. 自组装多肽支架材料的研究进展[J]. *材料科学与工程学报*, 2012, 30(2): 324-328, 311.
- WANG YQ, LU TL, CHEN T, MA YF, ZHAO W, CHEN T. Research advances in self-assembling peptide scaffolds[J]. *Journal of Materials Science and Engineering*, 2012, 30(2): 324-328, 311 (in Chinese).
- [14] GONG CC, SUN SW, ZHANG YJ, SUN L, SU ZQ, WU AG, WEI G. Hierarchical nanomaterials *via* biomolecular self-assembly and bioinspiration for energy and environmental applications[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(10): 4147-4182.
- [15] 杨桃, 孙宇, 陈佳佳, 刘清桂, 王敏君, 胡以平, 陈费. 类器官的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(3): 494-500.
- YANG T, SUN Y, CHEN JJ, LIU QG, WANG MJ, HU YP, CHEN F. Advances in organoid technology[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(3): 494-500 (in Chinese).
- [16] van de WETERING M, FRANCIES HE, FRANCIS JM, BOUNOVA G, IORIO F, PRONK A, van HOUTD W, van GORP J, TAYLOR-WEINER A, KESTER L, MCLAREN-DOUGLAS A, BLOKKER J, JAKSANI S, BARTFELD S, VOLCKMAN R, van SLUIS P, LI VSW, SEEPO S, PEDAMALLU CS, CIBULSKIS K, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients[J]. *Cell*, 2015, 161(4): 933-945.
- [17] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18: 407-418.
- [18] DIJKSTRA KK, CATTANEO CM, WEEBER F, CHALABI M, van de HAAR J, FANCHI LF, SLAGTER M, van der VELDEN DL, KAING S, KELDERMAN S, van ROOIJ N, van LEERDAM ME, DEPLA A, SMIT EF, HARTEMINK KJ, de GROOT R, WOLKERS MC, SACHS N, SNAEBJORNSSON P, MONKHORST K, 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.
- [19] PAULI C, HOPKINS BD, PRANDI D, SHAW R, FEDRIZZI T, SBONER A, SAILER V, AUGELLO M, PUCA L, ROSATI R, McNARY TJ, CHURAKOVA Y, CHEUNG C, TRISCOTT J, PISAPIA D, RAO RM, MOSQUERA JM, ROBINSON B, FALTAS BM, EMERLING BE, et al. Personalized *in vitro* and *in vivo* cancer models to guide precision medicine[J]. *Cancer Discovery*, 2017, 7(5): 462-477.
- [20] SCHUTGENS F, CLEVERS H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases[J].

- Annual Review of Pathology, 2020, 15: 211-234.
- [21] ARTEGIANI B, CLEVERS H. Use and application of 3D-organoid technology[J]. Human Molecular Genetics, 2018, 27(R2): R99-R107.
- [22] NEAL JT, LI XN, ZHU JJ, GIANARRA V, GRZESKOWIAK CL, JU JH, LIU IH, CHIOU SH, SALAHUDEEN AA, SMITH AR, DEUTSCH BC, LIAO L, ZEMEK AJ, ZHAO F, KARLSSON K, SCHULTZ LM, METZNER TJ, NADAULD LD, TSENG YY, ALKHAIRY S, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. Cell, 2018, 175(7): 1972-1988.
- [23] NUCIFORO S, FOFANA I, MATTER MS, BLUMER T, CALABRESE D, BOLDANOVA T, PISCUOGLIO S, WIELAND S, RINGNALDA F, SCHWANK G, TERRACCIANO LM, NG CKY, HEIM MH. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies[J]. Cell Reports, 2018, 24(5): 1363-1376.
- [24] WANG K, YUEN ST, XU JC, LEE SP, YAN HHN, SHI ST, SIU HC, DENG SB, CHU KM, LAW S, CHAN KH, CHAN ASY, TSUI WY, HO SL, CHAN AKW, MAN JLK, FOGLIZZO V, NG MK, CHAN AS, CHING YP, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer[J]. Nature Genetics, 2014, 46: 573-582.
- [25] KIM M, MUN H, SUNG CO, CHO EJ, JEON HJ, CHUN SM, JUNG DJ, SHIN TH, JEONG GS, KIM DK, CHOI EK, JEONG SY, TAYLOR AM, JAIN S, MEYERSON M, JANG SJ. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3991.
- [26] CHANG SS. Re: tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. The Journal of Urology, 2019, 202(5): 865.
- [27] SACHS N, de LIGT J, KOPPER O, GOGOLA E, BOUNOVA G, WEEBER F, BALGOBIND AV, WIND K, GRACANIN A, BEGTHEL H, KORVING J, van BOXTEL R, DUARTE AA, LELIEVELD D, van HOECK A, ERNST RF, BLOKZIIL F, NIJMAN IJ, HOOGSTRAAT M, van de VEN M, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity[J]. Cell, 2018, 172(1/2): 373-386.
- [28] HUANG L, HOLTZINGER A, JAGAN I, BeGORA M, LOHSE I, NGAI N, NOSTRO C, WANG RN, MUTHUSWAMY LB, CRAWFORD HC, ARROWSMITH C, KALLOGER SE, RENOUEF DJ, CONNOR AA, CLEARY S, SCHAEFFER DF, ROEHRL M, TSAO MS, GALLINGER S, KELLER G, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell-and patient-derived tumor organoids[J]. Nature Medicine, 2015, 21: 1364-1371.
- [29] BOJ SF, HWANG CI, BAKER LA, CHIO IIC, ENGLE DD, CORBO V, JAGER M, PONZ-SARVISE M, TIRIAC H, SPECTOR MS, GRACANIN A, ONI T, YU KH, van BOXTEL R, HUCH M, RIVERA KD, WILSON JP, FEIGIN ME, ÖHLUND D, HANDLY-SANTANA A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer[J]. Cell, 2015, 160(1/2): 324-338.
- [30] DRIEHUIS E, KOLDERS S, SPELIER S, LÖHMUSSEAR K, WILLEMS S, DEVRIESE L, de BREE R, de RUITER ED, KORVING J, BEGTHEL H, van ES J, GEURTS V, HE GW, van JAARSVELD RV, OKA R., MURARO MJ, VIVIÉ J, ZANDVLIET M, HENDRICKX A, IAKOBACHVILI N, et al. Oral mucosal organoids as a potential platform for personalized cancer therapy[J]. Cancer Discovery, 2019, 9(7): 852-871.
- [31] YAN HHN, SIU HC, LAW S, HO SL, YUE SSK, TSUI WY, CHAN D, CHAN AS, MA S, LAM KO, BARTFELD S, MAN AHY, LEE BCH, CHAN ASY, WONG JWH, CHENG PSW, CHAN AKW, ZHANG JW, SHI J, FAN XD, et al. A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening[J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(6): 882-897.
- [32] CALANDRINI C, SCHUTGENS F, OKA R, MARGARITIS T, CANDELLI T, MATHIJSEN L, AMMERLAAN C, van INEVELD RL, DERAKHSHAN S, de HAAN S, DOLMAN E, LIJNZAAD P, CUSTERS L, BEGTHEL H, KERSTENS HHD, VISSER LL, ROOKMAAKER M, VERHAAR M, TYTGAT GAM, KEMMEREN P, et al. An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1310.
- [33] 李飞, 高栋. 类器官及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(4): 394-400.
- LI F, GAO D. Organoid and its application in cancer research[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2017, 39(4): 394-400 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)