

上皮性卵巢癌类器官的基础和转化研究进展

陈琳, 杨红

(空军军医大学第一附属医院, 陕西 西安 710032)

摘要: 卵巢癌是致死率最高的妇科恶性肿瘤, 其中上皮性卵巢癌占 90%, 5 年生存率仅 47%。缺乏有效的肿瘤研究模型是上皮性卵巢癌治疗难以取得突破性进展的原因之一, 新近出现的肿瘤类器官模型保留了体内肿瘤的组织遗传特性, 并且操作简单、易与先进技术结合, 可用于研究肿瘤发生发展机制、药物筛选和个体化治疗。全文就现阶段肿瘤类器官在上皮性卵巢癌基础和转化研究中的进展进行综述。

关键词: 类器官; 上皮性卵巢癌; 药物筛选; 个体化治疗

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2022)09-0740-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2022.09.A010

Advances on Basic and Translational Studies of Epithelial Ovarian Cancer Organoids

CHEN Lin, YANG Hong

(The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Ovarian cancer is the most deadly gynecological malignant tumor, among which epithelial ovarian cancer accounts for 90%, and the five-year survival rate is only 47%. The lack of effective tumor research model is one of the reasons why it is difficult to achieve breakthrough in the treatment of ovarian cancer. The newly emerged tumor organoids not only faithfully retain the histological and genetic characteristics of the original tumor, but also are simple to operate and combine with advanced technology. Tumor organoids are expected to be used for studying the mechanism of tumor development, drug screening and individual therapy. This article reviews the basic and translational research progress of tumor organoids in epithelial ovarian cancer.

Key words: organoid; epithelial ovarian cancer; drug screening; individualized therapy

卵巢癌是致死率最高的妇科恶性肿瘤^[1], 其中上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 占 90%^[2], 且由于起病隐匿, 患者诊断时已是 FIGO III 期 (占 37%) 或 IV 期 (占 28%)^[3]。目前卵巢癌的治疗主要是肿瘤细胞减灭术和以铂类为基础的辅助化疗, 但复发率高达 80%^[4], 并且随化疗次数增加逐渐对铂类产生耐药。近年来, 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂 (poly ADP-ribose polymerase inhibitors, PARPi) 被批准用于卵巢癌维持治疗, 对于携带 *BRCA* 基因突变的卵巢癌患者有显著疗效^[5], 但卵巢癌患者的 5 年生存率仍然没有明显改善, 仅有 47%^[3]。传统研究模型的局限性是卵巢癌治疗难以取得突破性进展的

原因之一。类器官 (organoid) 是体外三维培养的多细胞团, 来源于成体干细胞、诱导多能干细胞或原发组织, 具有自我更新和自我组织的能力, 表现出与原始组织相似的结构和功能^[6], 是一个有潜力的疾病研究模型。肿瘤类器官高度模拟了原肿瘤的遗传和分子特征, 在肿瘤的机制研究、药物筛选、个体化治疗等方面有广阔的应用前景。本文就类器官在 EOC 基础和转化研究中的进展进行综述, 阐明其对于卵巢癌研究的价值。

1 肿瘤类器官概述

目前, 肿瘤研究常用的模型有肿瘤细胞系和来源肿瘤异种移植模型 (patient-derived tumor xenograft,

收稿日期: 2022-02-27; 修回日期: 2022-05-07

基金项目: 陕西省重点研发计划高校联合项目 (2020GXLH-Y-009)

通信作者: 杨红, E-mail: yanghong@fmmu.edu.cn

PDTX)^[7]。肿瘤细胞系培养条件简单、可以无限增殖,是最常用的肿瘤研究模型,但二维培养的贴壁细胞无法重现体内肿瘤细胞的极性,缺乏肿瘤微环境,长期传代后形成相对均一的克隆,丧失了肿瘤原有的异质性^[8],并且存在其他细胞系交叉污染^[9],这无疑会影响实验结果的可靠性。PDTX 是另一种常见的肿瘤研究模型,是将患者的肿瘤组织植入免疫缺陷小鼠的体内^[7],很大程度上模拟了肿瘤体内微环境,但培养周期长、移植成功率低,无法用于高通量药物筛选。为了克服传统模型的局限性,近年来出现了体外三维培养的肿瘤类器官模型。

2009 年 Clevers 团队在 *Nature* 杂志上首次报道了肠道类器官^[10],随后该技术被运用于多种疾病建模。人源肿瘤类器官(patient-derived tumor organoids, PDTO)是将患者的肿瘤组织消化成单细胞,嵌入基质胶中培养形成的细胞团^[7]。PDTO 保留了原始肿瘤的组织特征,稳定性优于传统肿瘤细胞系,可以较好地反应原始肿瘤的异质性;基质胶模拟细胞间质使细胞保持三维结构;PDTO 可以在体外相对快速增殖和超低温保存,易于基因编辑和微环境操纵,有效弥补了传统模型的缺陷。目前已有多种肿瘤应用该模型进行研究,如:胃肠道肿瘤^[11]、非小细胞肺癌^[12]、前列腺癌^[13]、膀胱癌^[14]等。PDTO 与肿瘤细胞系和 PDTX 互为补充,满足了生物医学研究中药测试、基因编辑和体内移植的需求,从而推进肿瘤的基础和转化研究。

2 EOC 类器官

EOC 根据临床病理因素进一步分为 I 型和 II 型^[3],I 型卵巢癌进展缓慢,通常认为是由卵巢外良性病变发展而来,包括子宫内膜样癌(endometrioid carcinoma, EMC)、透明细胞癌(clear cell carcinoma, CCC)、黏液性癌(mucinous carcinoma, MC)、低级别浆液性癌(low-grade serous carcinoma, LGSC),具有相对稳定的突变,如 *KRAS*、*BRAF* 和 *ERBB2*; II 型进展迅速,侵袭性强,包括高级别浆液性癌(high-grade serous carcinoma, HGSC)、癌肉瘤和未分化癌,基因组不稳定。HGSC 是最常见的组织类型,约占 EOC 的 75%,具有高度异质性,95%存在 *TP53* 功能性突变^[15],80%的患者对初始治疗敏感,但复发率高达 75%,

预后差,晚期患者的 5 年生存率不足 30%^[2]。EOC 治疗亟待解决的问题是探索耐药机制,寻找新的药物靶点,并开发和筛选有效的个体化用药方案,但是传统的研究模型不能反映卵巢癌患者的异质性,阻碍了个体化研究,因此卵巢癌类器官应运而生。

2.1 EOC 类器官构建

2018 年 Hill 等^[16]用 EOC 新鲜组织和胸腹腔积液中的卵巢癌细胞构建了 23 个 EOC 类器官,成功率在 80%到 90%之间。2019 年 Kopper 等^[17]构建了来自 32 例患者的 56 个 EOC 类器官,涵盖了 EOC 的所有常见组织类型(HGSC、LGSC、MC、CCC、EMC),成功率为 65%,培养周期为 7~14 d。PDTO 培养时生长因子的添加是维持肿瘤细胞干性的关键,Wnt/ β -catenin 信号通路及其配体 Rspodin-1 和 Wnt3a 在调节肿瘤干细胞更新方面起着核心作用^[18]。Clevers 等发现当 Rspodin-1、EGF (表皮生长因子)、Noggin(BMP 抑制剂)同时存在时,LGR5⁺隐窝干细胞可以形成“迷你肠”^[10]。但肿瘤干细胞的生化需求不同于普通干细胞,培养条件需要优化。Hoffmann 等^[19]发现 HGSC 类器官在缺乏 Wnt 通路和 Noggin 的微环境中可以长期扩增,而正常输卵管类器官生长依赖 Noggin 对 BMP 的抑制,说明 Wnt 通路的抑制以及活跃的 BMP 信号对于维持卵巢癌细胞干性至关重要。此外,EGF、神经调节因子-1 (NRG-1) 对于 HGSC 类器官生长也是必不可少的^[20]。胰岛素、氢化可的松、雌二醇等激素虽不是类器官生长所必需,但对于类器官长期稳定扩增很重要。Maru 等^[21]用经典的基质胶双层培养法(matrigel bilayer organoid culture, MBOC)培养卵巢癌类器官,成功率仅有 45%,考虑到妇科肿瘤对常规消化酶的抵抗,他们将组织先用 Accumax 酶消化,再用胶原酶常规消化,培养成功率提升到 83%,说明了类器官培养过程中优化培养条件的必要性。

EOC 类器官保留了体内肿瘤的组织学特征,呈囊实性或实性,细胞核高度异型,表达 p53 和 PAX8 等生物标志物^[16-17]。全基因组测序支持 EOC 类器官在多次传代后仍保留原肿瘤的基因拷贝数变异、体细胞单核苷酸变异等基因组特性^[17]。EOC 具有高度异质性,特别是 HGSC,50%存在同源重组修复缺陷(homologous recombination deficiency, HRD),携带 *BRCA1/2*、*RAD51C*、*RAD51D*、*BRIPI* 等基因突变^[2],

基因组不稳定,对化疗药、靶向药和免疫抑制剂的反应参差不齐。de Witte 等^[22]构建了小规模 EOC 类器官生物样本库,包括来自 23 例卵巢癌患者的 36 个类器官,检测了类器官对 PARPi 及卡铂联合紫杉醇的敏感性,发现其药敏特性与基因组特征和临床疗效显著相关^[16],EOC 类器官可以捕获肿瘤内部和肿瘤之间的异质性,忠实地反映原肿瘤的特征。

2.2 研究 EOC 发生发展机制

EOC 起源因组织类型不同而各异,一般认为 MC 和 CCC 起源于子宫内膜,HGSC 起源于输卵管上皮 (the fallopian tube, FT) 或卵巢表面上皮 (the ovarian surface epithelium, OSE), 但仍存在争议^[15]。有研究构建了小鼠 FT 和 OSE 类器官,并通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术引入常见的 HGSC 突变基因,如 *TP53*、*BRCA1*、*NF1* 和 *PTEN* 基因,发现两种上皮细胞均可以衍生成 HGSC,证明了 HGSC 的双重起源假说,但 FT 来源的 HGSC 类器官增殖速度更快,移植体内后更容易形成恶性表型^[23]。Hoffmann 等^[19]发现同时敲除 OSE 类器官中 *TP53*、*PTEN* 和 *RB* 基因可以引起恶性表型,如:核异型性及 DNA 双链断裂增加、细胞周期蛋白 E1 及磷酸化的 Akt 上调,但类器官中仍保留了细胞极性和纤毛成分,表明这种三重突变不足以诱导完全恶性转变。此外,还可将 EOC 类器官移植到免疫缺陷小鼠体内,构建类器官源性卵巢癌异种移植瘤^[24],这些先进技术的结合有助于验证许多基因的致癌潜力。

耐药是卵巢癌患者死亡的主要原因。Sun 等^[25]构建了顺铂敏感和耐药的卵巢癌类器官,并发现丝氨酸/苏氨酸激酶 Aurora-A 参与调控细胞衰老和葡萄糖代谢,是潜在的克服铂类耐药的靶点。HRD 是公认的 PARPi 发挥合成致死效应的先决条件,最近有研究发现 PARPi 的耐药机制除了同源重组修复恢复外,DNA 复制叉保护也参与对 PARPi 的抵抗^[26]。EOC 类器官研究证实了这一结论,1 例 *BRCA2* 胚系突变的卵巢癌患者的类器官却对 PARPi 无反应,而对卡铂、CHK1 抑制剂和 ATR 抑制剂敏感,说明该病例中 *BRCA2* 突变导致复制叉保护缺陷,而非 HRD,患者随后接受 CHK1 抑制剂治疗,病情平稳^[16]。这对铂类和 PARPi 耐药患者的治疗提供了新思路,由于同源重组和复制叉保护机制不同,可以将 CHK1 抑制剂或 ATR 抑制剂与铂类联用,从而增加基因复制

压力,减少耐药发生。

2.3 药物筛选与个体化治疗

2017 年,Jabs 等^[27]比较了二维和三维培养的卵巢癌细胞对药物反应的差异,检测了包括卡铂、紫杉醇等在内 22 种抗肿瘤药物,发现两种培养方式下药物对卵巢癌细胞活性的抑制率存在差异,三维培养时的药物反应更为多样,更能体现肿瘤细胞的异质性。携带 *BRCA1* 突变的 EOC 类器官对顺铂和奥拉帕利更敏感,患者的无瘤间期也更长^[28]。HGSC 类器官对铂类治疗敏感,而非 HGSC 类器官则相对耐药,复发肿瘤衍生的类器官对铂类的耐药性增加^[17],这些数据与临床研究一致,说明类器官可以作为卵巢癌药物筛选的可靠工具。

根据基因组分析,50% 的 HGSC 患者存在 HRD,但临床上有超过 40% 的 *BRCA1/2* 突变的患者对 PARPi 无效^[26],因此有必要筛选出真正功能性的 HRD。2018 年 Hill 等^[16]利用 23 例 EOC 患者的类器官对 DNA 修复进行功能检测,发现只有 2 例患者对 PARPi 有反应,部分患者仅存在 *BRCA1/2* 的微变异,不足以引起 HRD,甚至在类器官中可以检测到 RAD51 灶,表现出对 PARPi 耐药。但不管基因突变状态如何,类器官的功能分析与患者的临床疗效完全一致,基因组分析与类器官功能检测的结合,使卵巢癌个体化治疗成为可能。

2.4 免疫治疗

肿瘤细胞系缺乏免疫细胞等肿瘤间质成分,阻碍了对肿瘤免疫的研究,PDTO 通过与 PDTX 模型结合或与免疫细胞共培养可以实现对免疫疗法的研究。Zhang 等^[29]通过 CRISPR-Cas9 技术将小鼠 FT 类器官进行基因编辑,形成携带不同基因突变组合的 EOC 类器官,发现 HRD 和非 HRD 类器官的增殖、分化、基因拷贝数存在很大差异,非 HRD 类器官对 T 细胞治疗有很好反应。另有研究用 PD-1/PD-L1 特异性双抗处理 HGSC 类器官/免疫细胞共培养物,可以实现关键检查点封锁,并且诱导 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞从惰性表型向细胞毒性表型转变^[30],这些数据为 EOC 免疫疗法提供了依据。

3 局限与展望

EOC 类器官技术处于探索阶段,缺乏标准化,

培养成功率差异很大,培养技术缺乏重复性和有效性;类器官生长不均匀,导致药物暴露量存在差异。对此,Jiang 等^[31]提出了自动化的类器官平台,可以高通量生成类器官,同时减少人为误差,使培养及检测可以在短时间内高效完成。此外,类器官体外培养条件与体内肿瘤微环境存在差异,缺乏肿瘤间质成分,无法评价免疫及炎症在肿瘤中的重要作用。目前正在进行三项关于 EOC 类器官的临床试验(NCT04279509、NCT04768270 和 NCT04555473),以评估 PDTO 对抗癌药物疗效的预测作用。总之,类器官技术作为基础研究与临床研究的桥梁,并不断与新技术结合,将成为 EOC 及其他肿瘤机制研究和个体化治疗的有用模型。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7–30.
- [2] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10177): 1240–1253.
- [3] Torre LA, Trabert B, Desantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284–296.
- [4] Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 280–304.
- [5] Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer[J]. BMJ, 2020, 371: m3773.
- [6] Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease[J]. Nat Cell Biol, 2016, 3(18): 246–254.
- [7] Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, et al. Xenograft and organoid model systems in cancer research [J]. EMBO J, 2019, 38(15): e101654.
- [8] Ben-David U, Siranosian B, Ha G, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response [J]. Nature, 2018, 560(7718): 325–330.
- [9] Korch C, Spillman MA, Jackson TA, et al. DNA profiling analysis of endometrial and ovarian cell lines reveals misidentification, redundancy and contamination [J]. Gynecol Oncol, 2012, 127(1): 241–248.
- [10] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche[J]. Nature, 2009, 459(7244): 262–265.
- [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] Shi R, Radulovich N, Ng C, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(5): 1162–1174.
- [13] Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer [J]. Cell, 2014, 159(1): 176–187.
- [14] Lee S H, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. Cell, 2018, 173(2): 515–528.
- [15] Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma[J]. Ann Oncol, 2013, 24(Suppl 10): x16–x21.
- [16] Hill SJ, Decker B, Roberts EA, et al. Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids[J]. Cancer Discov, 2018, 8(11): 1404–1421.
- [17] Kopper O, de Witte CJ, Lohmussaar K, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity[J]. Nat Med, 2019, 25(5): 838–849.
- [18] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(5): 387–398.
- [19] Hoffmann K, Berger H, Kulbe H, et al. Stable expansion of high-grade serous ovarian cancer organoids requires a low-Wnt environment[J]. EMBO J, 2020, 39(6): e104013.
- [20] Maenhoudt N, Defrayer C, Boretto M, et al. Developing organoids from ovarian cancer as experimental and pre-clinical models[J]. Stem Cell Reports, 2020, 14(4): 717–729.
- [21] Maru Y, Tanaka N, Itami M, et al. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors[J]. Gynecol Oncol, 2019, 154(1): 189–198.
- [22] De Witte CJ, Espejo VJ, Hami N, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids mimic clinical response and exhibit heterogeneous inter- and intrapatient drug responses [J]. Cell Rep, 2020, 31(11): 107762.
- [23] Lohmussaar K, Kopper O, Korving J, et al. Assessing the origin of high-grade serous ovarian cancer using CRISPR-modification of mouse organoids[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2660.
- [24] Maru Y, Onuma K, Ochiai M, et al. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids [J]. Cancer Sci, 2019, 110(3): 858–866.
- [25] Sun H, Wang H, Wang X, et al. Aurora-A/SOX8/FOKK1 signaling axis promotes chemoresistance via suppression of

- cell senescence and induction of glucose metabolism in ovarian cancer organoids and cells[J]. *Theranostics*, 2020, 10(15):6928–6945.
- [26] Li H, Liu ZY, Wu N, et al. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 107.
- [27] Jabs J, Zickgraf FM, Park J, et al. Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations[J]. *Mol Syst Biol*, 2017, 13(11):955.
- [28] Nanki Y, Chiyoda T, Hirasawa A, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumors applicable for drug sensitivity and resistance testing[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):12581.
- [29] Zhang S, Iyer S, Ran H, et al. Genetically defined, syngeneic organoid platform for developing combination therapies for ovarian cancer [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(2): 362–383.
- [30] Wan C, Keany MP, Dong H, et al. Enhanced efficacy of simultaneous PD-1 and PD-L1 immune checkpoint blockade in high-grade serous ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(1): 158–173.
- [31] Jiang S, Zhao H, Zhang W, et al. An automated organoid platform with inter-organoid homogeneity and inter-patient heterogeneity[J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1(9):100161.

《中国肿瘤》对图和要求

1 图的基本要求

(1) 论文中的图是对正文文字进行说明、补充, 因此主题要明确, 用于强调事物的性状或参数变化的总体趋势, 不要与正文的文字内容重复, 图的性质应与资料性质匹配。

(2) 一个完整的图应该具有图题、标目、标值、图形、图注等。

(3) 图应该有“自明性”, 即只看图、图题、图文或图例, 不阅读正文就可以理解图意。图中的缩略语应有注释, 且图中的量、单位、符号、缩略语等应与正文一致。

(4) 正文中提及图的内容时应标注图序号。图随文排, 一般排在相应正文段落之后, 即先见文字后见图。

(5) 组织病理学图片应注明染色方法和放大倍数。

(6) 应保护受试者的隐私。图中涉及受试者的个人信息应当隐去; 人体照片只显示必要部位; 颜面或全身照片, 若不需要显示眼或者阴部的则需加以遮挡。

(7) 引用的图应注明来源, 宜获得著作权人的书面许可。

(8) 编排时, 要注意图的大小和图中文字、版面的整体协调性。

(9) 引用我国的地图, 应维护国家的统一、主权和领土完整, 维护民族尊严和民族团结, 体现我国的外交政策和立场, 保障国家安全和利益。地图插图应符

合《地图管理条例》相关规定。须在国家测绘地理信息局等权威机构提供的最新标准底图上绘制; 凡涉及国界线及省、地、县级行政区域线, 必须认真核对, 保证准确无误; 不能泄露保密信息; 保证重要地理要素及名称等齐全。

(10) 需提供中、英文图各一份。

2 表的基本要求

(1) 表应有“自明性”, 即在不阅读正文的情况下也能理解表的内容。正文中论述表中内容时应注明表序号。正文中所有表依次按顺序编码, 先见文字后见表。

(2) 按照统计学制表原则设计, 力求结构简洁, 采用三线表, 即顶线、底线、栏目线。

(3) 表的纵横标目间为主谓关系, 主语在表的左侧, 谓语在表的右侧。

(4) 表中的量、单位、符号、缩略语必须与正文一致, 缩略语应在表下注释。

(5) 表内数据要求同一指标小数点后有效位数一致, 且与正文中保持一致。

(6) 各栏参数的单位相同, 可写在表题之后的括号内; 参数单位不同, 写在各栏标目词之后的括号内。

(7) 表中不设“备注”, 需要释义的可在表中相关处注释符号, 如 a、b、c 等, 然后在表下注释。

(8) 需提供中、英文表各一份。