



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：多肽水凝胶培养患者乳腺肿瘤类器官及鉴定
作者：刘嘉琦，孙宇，司惠妍，董研博，陈思屹，梁俊
DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20250092
收稿日期：2025-06-09
网络首发日期：2026-01-29
引用格式：刘嘉琦，孙宇，司惠妍，董研博，陈思屹，梁俊. 多肽水凝胶培养患者乳腺肿瘤类器官及鉴定[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250092>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250092

多肽水凝胶培养患者乳腺肿瘤类器官及鉴定

刘嘉琦¹, 孙宇², 司惠妍³, 董研博², 陈思屹^{3,4}, 梁俊¹

(1. 天津科技大学轻工科学与工程学院, 天津 300457; 2. 首都医科大学附属北京友谊医院耳鼻咽喉头颈外科, 北京 100050; 3. 中国人民解放军总医院第一医学中心普通外科, 北京 100853; 4. 中国人民解放军医学院, 北京 100853)

摘要: 患者来源类器官 (patient-derived organoid, PDO) 是近年来蓬勃兴起的新型体外模型, 培养 PDO 使用的传统基质胶因其动物源性等问题, 限制了 PDO 在医学领域的进一步应用。为探究非动物源多肽水凝胶 CuIX II 在 PDO 培养中的可行性, 使用多肽水凝胶 CuIX II 培养乳腺肿瘤 PDO; 与 Matrigel 中培养的 PDO 对比, 观察其形态学特征。免疫荧光技术检测两种基质胶培养的 PDO 中乳腺肿瘤标志物 HER-2、ER、PR 表达, 苏木精-伊红染色 (HE 染色) 和免疫组织化学染色观察两种 PDO 与原发肿瘤患者病理切片的组织病理学形态相似性, ATP 酶法检测 PDO 对紫杉醇药物敏感性。结果表明: 使用 CuIX II 成功培养了乳腺肿瘤 PDO, 并在数量和形态上略优于传统基质胶; CuIX II 培养的 PDO 在病理学及特征蛋白表达上显示出与原发肿瘤的一致性, 对化疗药物紫杉醇表现出敏感性。多肽水凝胶 CuIX II 可用于乳腺肿瘤 PDO 的培养, 与传统基质胶相比具有操作便捷、经济实用等优势, 在 PDO 的培养中具有较大潜力。

关键词: 类器官; 多肽水凝胶; 3D 培养; 乳腺肿瘤

中图分类号: R318

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Culture and Characterization of Patient-Derived Breast Tumor Organoid with Peptide-Based Hydrogels

LIU Jiaqi¹, SUN Yu², SI Huiyan³, DONG Yanbo², CHEN Siyi^{3,4}, LIANG Jun¹

(1. College of Light Industry Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. Department of General Surgery, The First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 4. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Patient-derived organoid (PDO) represent a novel in vitro model that has witnessed vigorous development in recent years. However, the traditional matrix gel utilized for PDO culture, owing to issues such as its animal-derived origin, imposes restrictions on the further application of PDO in the medical field. To investigate the feasibility of a non-animal-derived polypeptide hydrogel, CuIX II, in the culture of PDO. The breast tumor PDO were cultivated using the polypeptide hydrogel CuIX II, and their morphological characteristics were observed by comparing them with the PDO cultured in Matrigel. The expressions of breast tumor markers HER-2, ER, and PR in the PDO cultured in the two types of matrix gels were detected by the immunofluorescence technique. The similarities in the histopathological morphology between the two types of PDO and the pathological sections of the primary tumor patients were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemical staining. The sensitivity of the PDO to the drug paclitaxel was

收稿日期: 2025-06-09; 修回日期: 2025-09-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82303642)

作者简介: 刘嘉琦(1999—), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生; 通信作者: 梁俊, 教授, jliang1118@yeah.net

detected by the ATPase method. Breast cancer PDO were successfully cultured in CulX II and were slightly superior to traditional Matrigel in terms of quantity and morphology. PDO cultured in CulX II showed consistency with the primary tumour in terms of pathology and expression of characteristic proteins, and were sensitive to the chemotherapeutic drug paclitaxel. The polypeptide hydrogel CulX II can be used to culture breast cancer PDO. Compared with traditional Matrigel, CulX II has the advantages of being easy to use and economical, and has great potential in the culture of PDO.

Key words: organoid; peptide-based hydrogel; 3D culture; breast cancer

患者来源类器官 (patient-derived organoid, PDO) 是近年来在医学领域蓬勃发展的一种新兴体外模型^[1]。它是通过组织活检等手段从患者组织中获得,并在三维 (three-dimensional, 3D) 培养条件下自组装形成的细胞培养物^[2-4],相比传统的细胞系模型和动物模型能更好地模拟生物体内的环境,为研究肿瘤异质性和评估治疗反应提供了更精准的模型^[5-6]。PDO 的发展依赖于在可控、可复制和生理相关环境中培养肿瘤模型的能力,需要能模拟细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的支架或材料来支持类器官的生长和分化^[7]。

目前使用最广泛的基质胶是 Matrigel,它是一种来源于小鼠肉瘤的增溶基底膜提取物 (basement membrane extract, BME),包含多种细胞外基质蛋白和生长因子^[8]。Matrigel 能模拟体内环境,提高贴壁依赖性上皮细胞相关的 PDO 培养成功率,极大地推动了 PDO 模型的研究进展^[9-11]。然而 Matrigel 作为从小鼠肉瘤里提取出的天然基质存在不同批次之间的差异性和动物源性等问题,限制了 PDO 在高通量药物筛选和再生医学中的应用^[12-14]。

为了解决这一问题,研究人员尝试使用复合水凝胶代替动物来源的 BME^[15-17]。CulX II 细胞培养仿生基质胶 (以下简称 CulX II),原材料为自组装重组胶原蛋白肽,可共价嵌入 RGD 等细胞黏附序列,可在材料特性、物理属性、结构功能等多个层面上高度模拟天然 ECM^[18]。相较于 Matrigel 等动物组织提取物以及其他基于交联产生的水凝胶,CulX II 在具备良好的生物相容性的同时,不含动物源组分及对细胞有毒的交联剂等成分。目前 CulX II 在细胞系的 3D 培养中有成熟的应用^[19],但在培养方法更加复杂的 PDO 培养中尚未有相关报道。

本研究使用 CulX II 成功培养了乳腺肿瘤 PDO,鉴定了 PDO 的生物标志物和组织病理学特征,旨在为后续使用 CulX II 建立和鉴定 PDO 模型提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳腺肿瘤

本研究所使用肿瘤组织标本由中国人民解放军总医院提供,使用人体样本进行实验经中国人民解放军总医院伦理委员会审查批准 (编号为 S2024-675-02),共 38 例手术取得的新鲜肿瘤标本,采集样本前均已获得患者的知情同意书。

1.1.2 主要试剂

仿生基质冻干粉 CulX II,天津矩阵生物科技有限公司; Matrigel,美国 Corning 公司; Advanced DMEM/F12 培养基、红细胞裂解液、TrypLE™ Express 酶,美国 Gibco 公司; R-脊椎蛋白 1 (R-spondin-1) 重组蛋白、Noggin 重组蛋白、FGF10,北京义翘神州科技股份有限公司; B27+Vita、磷酸盐缓冲液,北京中生奥邦生物科技有限公司; Nicotinamide、N-乙酰半胱氨酸、SB202190,美国 Sigma 公司; 吐温 20,北京索莱宝科技有限公司; Triton X-100,北京吉普赛生物技术有限公司; Primocin,法国 Invivogen 公司; Y-27632 盐酸盐、神经调节蛋白 1 (neuregulin 1, NRG1) 重组蛋白、紫杉醇,美国 MCE 公司,成纤维细胞生长因子 7 (fibroblast growth factor 7, FGF7)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF),美国 PeproTech 公司; 抑制剂 A83-01,英国 Tocris Bioscience 公司; 通用型组织固定液 (中性),武汉赛维尔生物科技有限公司; 牛血清蛋白 (BSA),晶美生物工程有限公司; 青霉素-链霉素溶液 (双抗)、IV 型胶原酶,武汉翌圣生物科技有限公司; 类器官冻存液,杭州艾名医学科技有限公司; 兔单克隆抗体 ER、HER-2、PR,武汉三鹰生物技术有限公司; 驴抗兔 IgG (H+L) 高交叉吸附二抗,美国 Invitrogen

公司; CellTiter-Glo 发光法细胞活力检测试剂盒, 美国 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 配制多肽水凝胶

在无菌操作台取 15 mg 仿生基质冻干粉 CulX II, 加入 1.5 mL 完全培养基, 使用移液枪轻柔吹打, 配制成 1% CulX II 多肽水凝胶。充分混匀后将水凝胶转移至无菌离心管, 涡旋 30~60 s 至完全溶解, 4000 r/min 离心 5 min, 除去气泡。

1.2.2 配制乳腺肿瘤类器官培养基

乳腺肿瘤类器官培养基: 以 AdDMEM/F12 为母液, R-spondin-1 250 ng/mL, Noggin 100 ng/mL, B27+Vita 1×, Nicotinamide 10 mmol/L, N-Acetyl-L-cysteine 1.25 mmol/L, Primocin 100 μg/mL, Y-27632 盐酸盐 5 μmol/L, NRG1-β1 5 nmol/L, FGF-7 5 ng/mL, FGF-10 20 ng/mL, A83-01 0.5 μmol/L, EGF 5 ng/mL, SB202190 1 μmol/L。

1.2.3 类器官原代培养

将手术取得的乳腺癌原发肿瘤标本放入 PBS 和 5% 双抗 (青霉素-链霉素) 混合溶液中冲洗并浸泡 15 min 后, 转移到 10 cm 培养皿中使用无菌钳和手术刀剔除脂肪和多余组织, 并取部分组织放入 -80 °C 超低温冰箱保存。将修剪好的肿瘤组织剪碎, 不断剪切直至组织呈肉糜状, 放入 5 mL 离心管中 (分装的管数根据组织块的大小决定, 保证剪切后的组织可以和酶充分接触), 每管加入 3 mL 1 mg/mL IV 型胶原酶, 37 °C 摇床孵育 40 min, 每隔 15 min 取出离心管摇晃混匀。将消化好的组织混悬液使用 100 μm 细胞筛过滤, 使用基础培养基重悬滤液, 若滤液中仍含有白色组织碎屑, 则使用 40 μm 细胞筛二次过筛, 将过滤好的滤液按每管 3 mL 分装并置于 15 mL 离心管中, 向离心管中加入 5 mL 基础培养基重悬, 250g 离心 5 min, 弃上清液, 重复操作 2 次。观察离心后的细胞沉淀, 若所含红细胞数目过多, 则需要进行裂红。向离心管中加入红细胞裂解液, 轻柔吹打, 混合均匀后静置 3 min, 加入基础培养基重悬洗涤, 250g 离心 5 min, 弃上清液, 将所得细胞沉淀使用完全培养基重悬, 吸取细胞悬液计数。细胞悬液离心后需吸尽上清液, 避免稀释 CulX II 胶, 影响成胶效果。将配好的 CulX II 胶与细胞沉淀混合均匀, 过程中避免产生气泡, 若产生气泡可使用高速离心机离心 3 s 消泡。使用 200 μL 移液枪将细胞悬液滴加在低黏附 24 孔板中 (每孔 80 μL, 含 $1 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^5$ 个细

胞), 接种完成后翻转培养板, 放入 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱倒置培养 10 h, 随后取出细胞培养板, 翻正后沿孔壁缓慢加入完全培养基 (500 μL/孔), 避免损伤胶体, 显微镜下观察细胞状态, 确认无误后放入细胞培养箱继续培养, 每天观察细胞状态, 每隔 2 d 换一次液。

1.2.4 类器官传代

显微镜观察类器官状态, 当类器官状态较好, 密度较大时进行类器官传代。配制 1% 无菌 PBS-BSA 溶液, 此步骤用到的离心管和枪头均需使用无菌 PBS-BSA 混合溶液润洗, 以减少类器官的损失。使用移液枪将培养板中的培养基和凝胶一同收集到 15 mL 离心管中, 每孔使用 1 mL PBS 冲洗 2 次, 确保类器官都被收集。将收集到的类器官及凝胶混合物 250g 离心 5 min, 离心管底部可见白色类器官沉淀, 吸取上清液和凝胶层, 加入 3 mL PBS 重悬, 250g 离心 5 min, 弃上清液, 吸除胶块。加入 1 mL TrypLE 酶消化 3 min, 加入 1 mL 培养基, 250g 离心 5 min, 弃上清液, 将细胞按 1:2 至 1:4 的比例重悬于 CulX II 胶中, 接种于 24 孔板中继续培养。

1.2.5 类器官冻存

显微镜观察类器官的状态, 选取类器官密度较大的胶滴进行冻存。取得细胞沉淀后, 使用 1 mL 类器官冻存液重悬, 混合均匀后将混悬液放入细胞冻存管, 置于细胞冻存盒, 放入 -80 °C 超低温冰箱储存 48 h 后, 放入液氮中储存保藏。

1.2.6 类器官复苏

将类器官冻存管从液氮罐中取出, 使用 37 °C 水浴锅将冻存的类器官快速解冻, 取出细胞悬液放入 15 mL 离心管中, 加入 3~5 mL 类器官完全培养基, 250g 离心 5 min, 裹胶、铺板, 最后加入类器官完全培养基进行培养。

1.2.7 类器官免疫荧光染色

配制 PBT 试剂: 将吐温 20 和 PBS 按照 1:1000 的比例配制成 0.1% PBS-Tween (PBT) 溶液。配制类器官洗涤缓冲液 OWB: 按照 1 L 中 PBS 中加入 1 mL Triton X100 和 2 g BSA 的比例配制 OWB 溶液。配制 PBS-BSA 试剂: 按 100 mL PBS 添加 1 g BSA 的比例制备 1% PBS-BSA 溶液。使用 15 mL 离心管收集类器官沉淀, 向离心管中加入 5 mL 4% 多聚甲醛重悬, 4 °C 固定 1 h, 70g 离心 10 min, 弃上清液, 向离心管中加入 5 mL PBT, 4 °C 过夜, 离心弃上清液, 使用 200 μL OWB 溶液重悬类器官沉淀, 转移

至24孔板, 4℃孵育15 min。去除OWB溶液后, 向板中滴加稀释后的一抗(HER-2、ER、PR), 4℃过夜, 次日用OWB冲洗3次后滴加相应种属二抗, DAPI染核后进行观察并拍照记录。

1.2.8 类器官的HE染色

使用15 mL离心管收集类器官沉淀, 加入5 mL 4%多聚甲醛重悬, 置于4℃冰箱固定1 h, 70g离心5 min, 弃上清液, 加入1 mL PBS重悬后转移至1.5 mL EP管, 70g离心5 min, 弃上清液。将融化的琼脂糖溶液加入EP管, 置于冰上待其凝固。将含有类器官沉淀的琼脂糖块在梯度乙醇中脱水, 二甲苯处理后浸蜡、包埋, 切成5 μm切片, 待切片烘干后进行脱蜡处理, 使用苏木精和伊红染液染色, 脱水封片后进行组织病理学观察并拍照记录。

1.2.9 免疫组织化学染色

制作类器官石蜡切片, 将切片置于60℃烤箱烤片1.5 h, 将切片转入二甲苯溶液处理, 使用100%~75%梯度乙醇溶液处理后蒸馏水清洗。将切片先放入EDTA抗原修复液中进行热修复, 再放入3% H₂O₂溶液中处理, 去除内源性过氧化氢酶。取出切片去除多余水分后, 使用封闭液进行封闭, 随后去除封闭液, 滴加稀释后的一抗(HER-2、ER、和PR), 置于4℃冰箱过夜, 滴加相应种属二抗。滴加DAB显色液, 静置显微镜下观察, 使用自来水冲洗终止显色。用苏木精染液对组织进行复染, 使用75%~100%梯度乙醇对切片进行脱水, 二甲苯处理后使用中性感胶封片并晾干, 进行染色强度观察并拍照记录。

1.2.10 类器官的药物敏感性检测

使用15 mL离心管收集类器官沉淀, 向离心管中加入2 mL Tryple酶重悬, 置于37℃培养箱消化15 min, 将类器官消化为单细胞后使用基质胶重悬, 接种在96孔板上(每孔3000个细胞); 常规培养2 d后, 吸出原培养基, 加入对应浓度的培养基稀释的药物, 紫杉醇的浓度梯度为10、1、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001 μmol/L, 继续培养3 d。将CellTiter-Glo检测试剂复温至室温, 每孔加入100 μL试剂, 常温下避光摇板30 min。将类器官混合悬液转移至不透光白板, 使用酶标仪读取化学发光值。

1.3 统计学分析

使用GraphPad Prism进行数据处理及绘图, 实验数据均以“平均值±标准差”表示。采用Student t

检验比较类器官数量、直径差异和免疫组织化学染色定量分析结果中各组单位面积内染色物质的平均光密度的组间差异。采用拟合药物浓度-细胞活力曲线确定能使细胞活力抑制50%的药物浓度, 使用似然比检验(Likelihood ratio test)评估两组IC₅₀值是否具有统计学差异, 通过F检验比较两模型的拟合优度; 以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 乳腺肿瘤PDO的建立及培养

实验同时使用CulX II和Matrigel两种基质胶培养乳腺肿瘤PDO, 除使用基质胶的种类不同外, 其余培养条件均相同。研究共培养乳腺肿瘤PDO 38例, CulX II培养成功率为86.84%(33/38), Matrigel培养成功率84.21%(32/38), 其中CulX II培养的26例和Matrigel培养的25例于传代2次后用于后续实验并冻存于-80℃留存样本, 其余两种基质胶培养的7例乳腺肿瘤PDO持续进行传代培养, 目前最高传代次数为第14代。乳腺肿瘤PDO具有明显的个体差异性, PDO的生长速度和形态不一。在PDO培养过程中, 前7 d的生长状态尤其重要, 它与PDO培养的成功率呈正相关。

选取来自3例患者的乳腺肿瘤PDO培养的明场图像, 两种基质胶中的乳腺肿瘤PDO均正常生长(图1A), 利用ImageJ对明场图片进行量化统计, CulX II中培养的乳腺肿瘤PDO的数量略多、直径略大于Matrigel的(图1B)。在明场放大图像中可见培养第九天时CulX II中的乳腺肿瘤PDO直径更大, 最大直径达231.68 μm; Matrigel中乳腺肿瘤PDO直径较小, 最大直径173.56 μm(图1C)。

2.2 乳腺肿瘤PDO免疫荧光鉴定

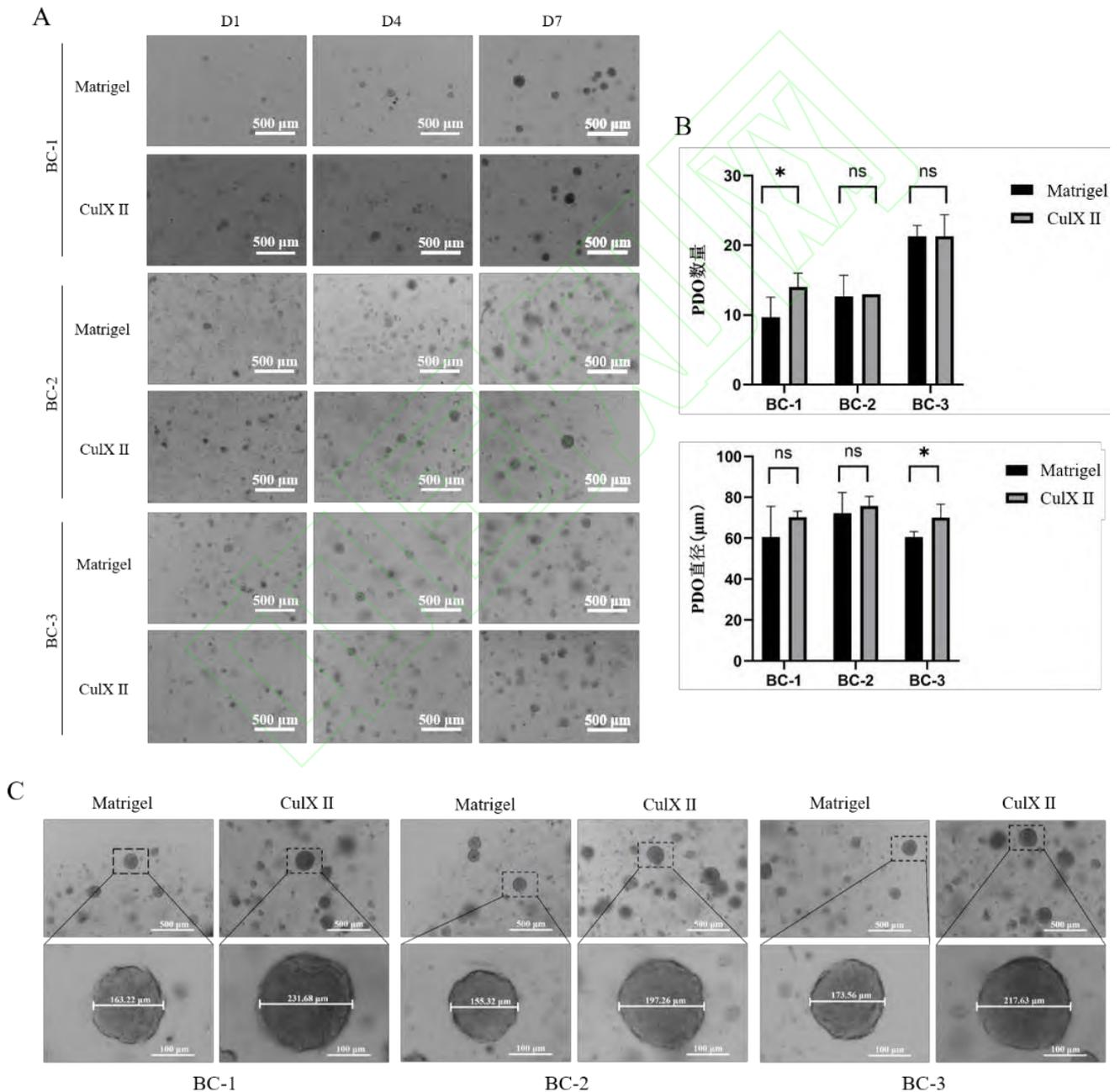
为了鉴定CulX II培养的乳腺肿瘤PDO的肿瘤特征, 免疫荧光染色法检测乳腺癌肿瘤特定蛋白的表达情况。在两种基质胶培养的同一种患者来源的乳腺肿瘤PDO中检测发现, 人表皮生长因子受体(HER-2)、雌激素受体(ER)均有较强表达, 孕激素受体(PR)表达较低, 符合乳腺肿瘤原发灶表型特征, 与患者临床组织病理检测结果一致(图2)。

2.3 乳腺肿瘤PDO HE及免疫组化染色鉴定

为验证CulX II培养的乳腺肿瘤PDO是否保留了原发肿瘤的特性, 将两种基质胶培养的乳腺肿瘤

PDO HE 染色及免疫组化染色后, 与医院病理科的原发肿瘤病理切片对比。乳腺肿瘤 PDO 镜下纤维间质内可见较多排列结构紊乱的肿瘤细胞, 且部分排列成腺管样, 腺管结构不规则, 分支成角, 肿瘤细胞呈浸润性生长, 部分肿瘤细胞散在分布在间质内, 细胞可见异型性, 胞浆丰富, 细胞核大小不一, 核浆比增大, 局灶管腔内可见肿瘤细胞坏死, 可见肿瘤细胞残影及少许核碎片, 表现出细胞组织发育不良、核不规则等明显的肿瘤特征, 乳腺肿瘤 PDO 的

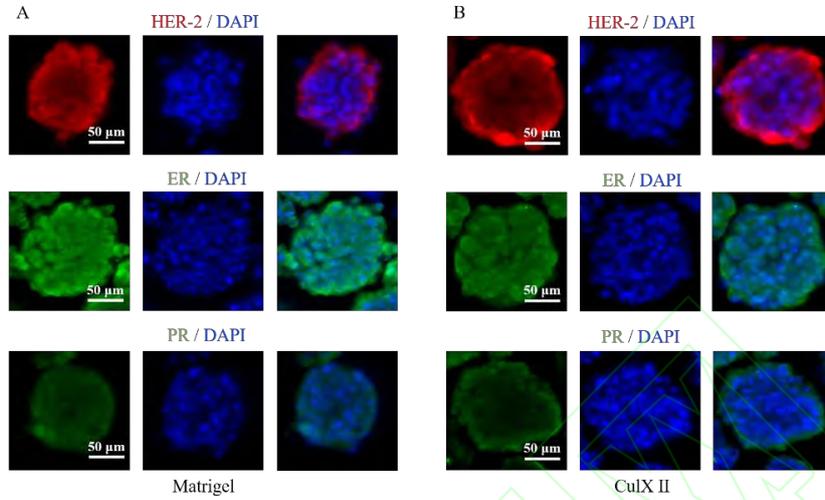
HE 染色切片与病理科原发肿瘤对比, 特征一致 (图 3A)。对免疫组化染色图像进行量化统计, 乳腺肿瘤 PDO 与原发组织的单位面积内染色物质的平均光密度 (AOD) 基本一致, 且 CulX II 和 Matrigel 两种基质胶培养的乳腺肿瘤 PDO 在 HER-2、ER、PR 表达上无统计学差异 ($P>0.05$) (图 3B)。基于 HE 及免疫组化染色鉴定, 证明 CulX II 所培养的乳腺肿瘤 PDO 具有肿瘤特性, 并保留了原发肿瘤的异质性。



A. Matrigel 和 CulX II 两种基质胶培养的不同时间乳腺肿瘤 PDO 形态; B. Matrigel 和 CulX II 两种基质胶培养七天后乳腺肿瘤 PDO 的数量、直径统计数据 ($n = 3$, ns. $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$); C. Matrigel 和 CulX II 两种基质胶培养九天后乳腺肿瘤 PDO 明场代表性图像。

图 1 基质胶培养乳腺肿瘤 PDO

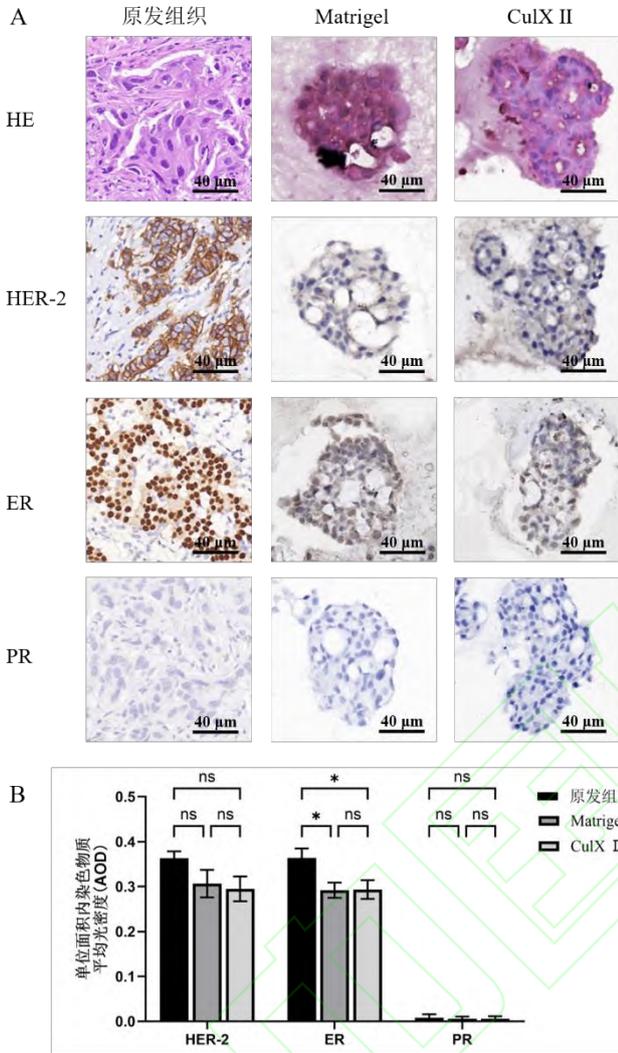
Fig. 1 Culture of breast tumor PDO with matrix gel



A.免疫荧光检测 Matrigel 培养的乳腺肿瘤 PDO 分子标志物表达 (ER+/PR-/HER2+); B.免疫荧光检测 CulX II培养的乳腺肿瘤 PDO 分子标志物表达 (ER+/PR-/HER2+)

图 2 免疫荧光检测乳腺肿瘤 PDO 分子标志物表达

Fig. 2 Immunofluorescence detection of molecular markers expression in breast tumor organoids



A. Matrigel 和 CulX II 两种基质胶培养的乳腺肿瘤 PDO 模型的 HE 及免疫组织化学染色鉴定 (ER+/PR-/HER2+); B. 原发组织和 Matrigel、CulX II 两种基质胶培养的乳腺肿瘤 PDO 免疫组织化学染色定量分析 ($n=3$, ns, $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$)

图 3 两种基质胶培养的乳腺肿瘤 PDO 模型的 HE 及免疫组织化学染色鉴定

Fig. 3 HE and immunohistochemical staining identification of breast tumor PDO models cultured with different matrigel

2.4 乳腺肿瘤 PDO 药物敏感性测试

为了检测两种基质胶 CulX II 和 Matrigel 培养乳腺肿瘤 PDO 在化疗药物紫杉醇 (PTX) 作用下的细胞活力变化情况, 进行药物敏感性测试。通过对实验数据的详细分析与处理, 获取了相应的药物敏感

性曲线 (图 4)。CulX II 培养的乳腺肿瘤 PDO 的 IC_{50} 为 $0.01355 \mu\text{mol/L}$ (95% 置信区间为 $0.006331 \sim 0.02620$), Matrigel 培养的乳腺肿瘤 PDO 的 IC_{50} 为 $0.01049 \mu\text{mol/L}$ (95% 置信区间为 $0.006690 \sim 0.01742$)。对比两条敏感性曲线, 发现其走势相似, 二者 IC_{50} 没有显著差异 ($P=0.4589$)。同一药物对同一患者来源的类器官都显示出较强的肿瘤细胞毒性, 乳腺肿瘤 PDO 均表现出对紫杉醇的高敏感性。这证明使用 CulX II 培养的乳腺肿瘤 PDO 能较好反映体内肿瘤对药物的敏感性。

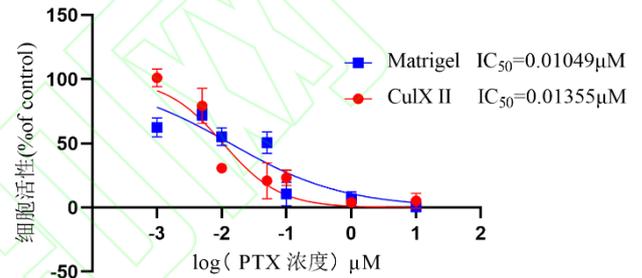


图 4 乳腺肿瘤 PDO 的药敏结果 ($n=3$)

Fig. 4 Drug sensitivity results of breast tumor PDO ($n=3$)

3 讨论

本研究首次使用多肽水凝胶 CulX II 培养了乳腺肿瘤 PDO, 并对其进行了鉴定和药物敏感性测试, 相较于传统基质胶 Matrigel, CulX II 在 PDO 培养和生物医学领域的应用有着明显的优势。

在 PDO 培养过程中, CulX II 相比 Matrigel 更加便利、操作上更为简单。由于 Matrigel 对温度非常敏感, 在低温条件 (如 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$) 下呈现液体状态, 在 $22 \sim 37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下才能形成凝胶, 所以其操作受到温度的严格制约。日常需要置于 $-20 \sim -80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 冰箱储存; 使用需提前置于冰上, 在 $2 \sim 6 \text{ } ^\circ\text{C}$ 冰箱中过夜融化; 进行溶胶时需要反复将 PDO 置于低温条件下, 不仅操作繁琐, 而且低温会对 PDO 的生长状态产生影响。与之相比, CulX II 的存储、分装和使用都不受温度的限制, 即取即用, 操作简便的同时避免了低温对 PDO 造成损伤。此外, Matrigel 还有溶胶困难的问题, 为了更好的溶胶效果需要额外购买并使用康宁细胞回收液, 而 CulX II 仅需使用 PBS 重悬后离

心即可轻松溶胶, 不需要添加其他辅助成分, 降低了经费和时间成本。

传统的生物源基质胶 Matrigel 是从 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤中提取的 BME, 成分组成非常复杂。研究检测, 即使经过特殊处理, Matrigel 在蛋白质含量上也仅表现出约 53% 的批次间一致性, 无法消除的批次差异性导致难以进行稳定可靠的药筛实验^[20-22], 复杂的不确定成分又使得对研究进行物理和生化特性的精准调控变得困难重重。Matrigel 来源于小鼠, 还有携带病原体感染巨噬细胞并影响免疫系统的可能^[23]。CulX II 原材料为重组胶原蛋白肽, 比 Matrigel 更能适应大规模、批量化的工业生产, 其稳定的批次可以使研究者得到更可靠的实验结果。此外, CulX II 在类器官生长过程中仅起 3D 支架的功能, 不含任何影响类器官表征的生长因子, 方便研究者对实验因素进行精准调节。最后, CulX II 不含任何动物源成分, 在类器官移植等再生医学领域降低了异种源风险, 因此更能满足生物医学领域未来发展的需求。

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤, 目前乳腺癌患者的治疗仍是以手术为主的综合治疗^[24-26]。在手术后, 患者通常有多种治疗选择, 而一个理想的试药模型可以为患者筛选出合理的治疗方案, 从而降低时间成本提高治疗成功率。PDO 可在较短时间内以较高的成功率从患者肿瘤中获得, 并准确地再现其亲代肿瘤的结构和生物学特征, 为研究疾病生物学和评估治疗反应提供了更准确的模型^[27-29]。此外, 乳腺癌在患者间也表现出高度的异质性^[30]。这对类器官的培养也具有一定的影响, 在既往研究中, K_{i67} 指数被证明可反映乳腺癌的增殖活性, 在本研究中这一点也在 PDO 培养中得到证实: 当 K_{i67} 指数 > 60% 时, 乳腺肿瘤 PDO 的构建效率显著更高, 将在后续研究中展示更多相关研究内容。

综上, CulX II 具有代替 Matrigel 作为 PDO 3D 培养支架的能力, 具有操作便捷、经济实用等优势的优势, 在癌症建模、药物开发和测试、个体化医疗和再生医学等领域具有广泛潜力。

参考文献:

- [1] PORTER R J, MURRAY G I, MCLEAN M H. Current concepts in tumour-derived organoids [J]. British journal of cancer, 2020, 123(8): 1209-1218.
- [2] MARGIT B, MARC V D W, HANS C, et al. Xenograft and organoid model systems in cancer research [J]. The EMBO journal, 2019, 38(15): e101654.
- [3] DRIEHUIS E, VAN HOECK A, MOORE K, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2019, 116(52): 26580-26590.
- [4] NAGLE P W, PLUKKER J T M, MUIJS C T, et al. Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response[C]//Seminars in cancer biology. Academic Press, 2018, 53: 258-264.
- [5] LESAVAGE B L, SUHAR R A, BROGUIERE N, et al. Next-generation cancer organoids[J]. Nature materials, 2022, 21(2): 143-159.
- [6] SANDHYA S, HOGENSON T L, FERNANDEZ-APICO M E. Patient-derived organoids, creating a new window of opportunities for pancreatic cancer patients[J]. EMBO molecular medicine, 2022, 14(4): e15707.
- [7] KHORSANDI D, YANG J W, FOSTER S, et al. Patient-derived organoids as therapy screening platforms in cancer patients[J]. Advanced healthcare materials, 2024, 13(21): 2302331.
- [8] PASSANITI A, KLEINMAN H K, MARTIN G R. Matrigel: history/background, uses, and future applications[J]. Journal of cell communication and signaling, 2022, 16(4): 621-626.
- [9] BOJ S F, HWANG C-I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer[J]. Cell, 2015, 160(1): 324-338.
- [10] ZACHARIAS W J, FRANK D B, ZEPP J A, et al. Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor[J]. Nature, 2018, 555(7695): 251-255.
- [11] SHI X, LI Y, YUAN Q, et al. Integrated profiling of human pancreatic cancer organoids reveals chromatin accessibility features associated with drug sensitivity[J]. Nature communications, 2022, 13(1): 2169.
- [12] REZAKHANI S, GJOREVSKI N, LUTOLF M P. Low-defect thiol-michael addition hydrogels as matrigel substitutes for epithelial organoid derivation [J]. Advanced functional materials, 2020, 30(48): 2000761.
- [13] TALBOT N C, CAPERNA T J. Proteome array identification of bioactive soluble proteins/peptides in Matrigel: relevance

- to stem cell responses[J]. *Cytotechnology*, 2015, 67: 873-883.
- [14] REDMOND J, MCCARTHY H, BUCHANAN P, et al. Advances in biofabrication techniques for collagen-based 3D in vitro culture models for breast cancer research[J]. *Materials science and engineering: C*, 2021, 122: 111944.
- [15] GEUENS T, RUITER F A, SCHUMACHER A, et al. Thiol-ene cross-linked alginate hydrogel encapsulation modulates the extracellular matrix of kidney organoids by reducing abnormal type 1a1 collagen deposition[J]. *Biomaterials*, 2021, 275: 120976.
- [16] WANG Y, LIU H, ZHANG M, et al. One-step synthesis of composite hydrogel capsules to support liver organoid generation from hiPSCs[J]. *Biomaterials science*, 2020, 8(19): 5476-5488.
- [17] ZHANG Z, GAO S, HU Y N, et al. Ti3C2TxMXene composite 3D hydrogel potentiates mTOR signaling to promote the generation of functional hair cells in cochlea organoids[J]. *Advanced science*, 2022, 9(32): 2203557.
- [18] WANG H, LI J, FENG H, et al. Engineering injectable composite scaffolds for enhanced bone healing: Integration of stem cells, hydrogels, and microspheres[J]. *Chemical engineering journal*, 2025, 507: 160593.
- [19] 王慧斌, 赵东东, 张璐, 等. 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.
- [20] BI H, YE K, JIN S. Proteomic analysis of decellularized pancreatic matrix identifies collagen V as a critical regulator for islet organogenesis from human pluripotent stem cells[J]. *Biomaterials*, 2020, 233: 119673.
- [21] 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.
- [22] HOFER M, LUTOLF M P. Engineering organoids[J]. *Nature reviews materials*, 2021, 6(5): 402-420.
- [23] LV J, DU X, WANG M, et al. Construction of tumor organoids and their application to cancer research and therapy [J]. *Theranostics*, 2024, 14(3): 1101-1125.
- [24] 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.
- [25] GOBBINI E, EZZALFANI M, DIERAS V, et al. Time trends of overall survival among metastatic breast cancer patients in the real-life ESME cohort[J]. *European journal of cancer*, 2018, 96: 17-24.
- [26] MARCOTTE R, SAYAD A, BROWN K R, et al. Functional genomic landscape of human breast cancer drivers, vulnerabilities, and resistance[J]. *Cell*, 2016, 164(1): 293-309.
- [27] YUKI K, CHENG N, NAKANO M, et al. Organoid models of tumor immunology[J]. *Trends in immunology*, 2020, 41(8): 652-664.
- [28] TONG L, CUI W, ZHANG B, et al. Patient-derived organoids in precision cancer medicine[J]. *Med*, 2024, 5(11): 1351-1377.
- [29] QU J, KALYANI F S, LIU L, et al. Tumor organoids: synergistic applications, current challenges, and future prospects in cancer therapy[J]. *Cancer communications*, 2021, 41(12): 1331-1353.
- [30] GIAQUINTO A N, SUNG H, NEWMAN L A, et al. Breast cancer statistics 2024[J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2024, 74(6): 477-495.