

患者来源肾盂癌类器官模型的构建及其在化疗药敏反应中的应用

刘晓青^{1,2}, 李学超³, 马洁², 张继泉¹, 朱云平^{1,2*}

1 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002

2 军事医学研究院生命组学研究所 国家蛋白质科学中心(北京) 北京蛋白质组研究中心 医学蛋白质组国家重点实验室, 北京 102206

3 解放军总医院第五医学中心, 北京 100700

刘晓青, 李学超, 马洁, 张继泉, 朱云平. 患者来源肾盂癌类器官模型的构建及其在化疗药敏反应中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2211-2222.

LIU Xiaoqing, LI Xuechao, MA Jie, ZHANG Jiquan, ZHU Yunping. Patient-derived renal pelvic carcinoma organoids: establishment and sensitivity to chemotherapeutic drugs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2211-2222.

摘要: 肾盂癌是一种较为常见的上尿路上皮癌, 由于缺乏理想的体外模型, 严重阻碍了该类疾病治疗策略研究的进展。本研究基于肾盂癌患者来源肿瘤组织样本, 建立肾盂癌类器官培养方法, 并基于肾盂癌类器官构建肿瘤化疗药物反应模型。通过免疫组化和荧光实验证实, 培养获得的肾盂癌类器官核异型性明显, 与亲本肾盂癌组织一致; 肾盂癌类器官中肿瘤标志分子 CD44 和细胞增殖标志分子 Ki67 均呈强阳性, 表明类器官富集肿瘤干细胞, 具有较强增殖能力。药物反应实验显示肾盂癌类器官对吡柔比星高度敏感, 杀伤作用明显。本研究成功建立了肾盂癌类器官体外培养体系, 并进行了初步体外药敏试验, 为以肾盂癌为代表的上尿路上皮癌的个体化诊疗提供了新的体外实验模型。

关键词: 肾盂癌; 类器官; 肿瘤干细胞; 药物测试

资助项目: 国家自然科学基金(32270697)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270697).

*Corresponding author. E-mail: zhuyunping@ncpsb.org.cn

Received: 2023-11-21; Accepted: 2024-03-20; Published online: 2024-04-25

Patient-derived renal pelvic carcinoma organoids: establishment and sensitivity to chemotherapeutic drugs

LIU Xiaoqing^{1,2}, LI Xuechao³, MA Jie², ZHANG Jiquan¹, ZHU Yunping^{1,2*}

1 School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

2 State Key Laboratory of Medical Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 102206, China

3 The Fifth Medical Center of the General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100700, China

Abstract: Renal pelvic carcinoma is a common upper urothelial cancer. The lack of an ideal *in vitro* model seriously hinders the research progress in the treatment for this disease. This study established a pipeline for the culture of renal pelvic carcinoma organoids based on the tumor tissue samples derived from the patients and tested the organoids to chemotherapeutic drugs. The results of immunohistochemistry and fluorescence experiments confirmed that the renal pelvic carcinoma organoids obtained from culture presented obvious nuclear heteromorphism, which was consistent with the tissue samples from renal pelvic carcinoma patients. The tumor marker molecule CD44 and the cell proliferation marker molecule Ki67 were positive in the organoids, indicating that the organoids were enriched with tumor stem cells and had strong proliferative ability. The renal pelvic carcinoma organoids were highly sensitive to pirarubicin, which had obvious killing effects. In brief, this study successfully established an *in vitro* model of renal pelvic cancer organoids and tested the sensitivity of the model to chemotherapeutic drugs. The results provide a new laboratory model for the individualized diagnosis and treatment of epithelial carcinomas represented by renal pelvic carcinoma.

Keywords: renal pelvic carcinoma; organoids; tumor stem cells; drug test

肾盂癌是一种较为常见的上尿路上皮癌(upper tract urothelial carcinomas, UTUC), 是一种源自移行上皮细胞的恶性肿瘤^[1-2]。它在尿路上皮肿瘤中占比 5%–10%, 占肾相关肿瘤的 7%–10%^[3]。肾盂癌主要并发症状为血尿^[4]。最常用的诊断方法为排泄尿路造影和断层扫描, 通过尿液细胞学检查对该病的诊断不够准确^[5]。部分肾盂癌患者曾有过膀胱癌病史, 但相对膀胱癌而言肾盂癌更难诊断治疗。肾盂癌若发展状况为局部或低级别状态可以选择切除肿瘤部分; 情况较为严重的则需要切除整个肾脏、输尿管及膀胱袖带^[6], 术后还需要进行大量药物化疗, 防止肿瘤复发。化疗虽在一定程度上降低了癌细胞复发的几率,

但肾盂癌的复发率仍维持在 13.4%–50%^[7]。现有研究表明, 肿瘤干细胞又被称为肿瘤起始细胞, 具有与干细胞相似的自我更新能力与分化途径^[8], 是维持肿瘤恶性生长、移行造成其他部位癌变的主要原因^[9], 以及维持自我更新和异质性的主要因素。在肿瘤干细胞中, 修复酶高度表达, 可以应对放射或化疗产生的细胞损伤, 使得该细胞对化疗与放疗产生抵抗作用, 导致化疗药物失去作用^[10]。因而, 肿瘤干细胞对药物的抵制作用也成为了肿瘤复发的潜在原因^[11]。针对肾盂癌细胞这一特性筛选出肾盂癌细胞敏感性药物将对肾盂癌的治疗与术后复发产生极为重要的影响。

类器官技术可以在体外模拟器官的多种细胞类型、结构和功能特征^[10-12], 已经被广泛应用于干细胞命运调控、发育和衰老研究, 以及遗传疾病、肿瘤癌症模型等领域^[13]。而患者来源的类器官(patient derived organoids, PDOs)培养系统已经成为体外模拟肿瘤异质性及肿瘤微环境相互作用的代表性平台^[14]。肿瘤类器官不仅保留了母体肿瘤的关键组织病理学、遗传和表型特征^[15], 与传统二维细胞培养模式相比, 三维肿瘤类器官包含多种细胞类型, 高度保持源肿瘤的异质性和患者之间的异质性^[16]。此外, 类器官个体间形态、尺度基本均一, 为肿瘤发病机理研究、药物筛选、个性化精准医疗领域提供了快速、优良的实验模型^[12-17]。目前, 尿路上皮癌类器官的研究主要集中于以膀胱癌为主的下尿路上皮癌^[18-19], 针对 UTUC 肿瘤类器官的研究很少^[20]。本研究基于临床收集的肾盂癌患者肿瘤组织样本, 开展肾盂癌类器官培养方法的探索, 并基于肾盂癌类器官构建肿瘤化疗药物反应模型, 为以肾盂癌为代表的 UTUC 个体化诊疗提供新的体外实验模型。

1 材料与方法

1.1 肾盂癌组织获取

五例肾盂癌组织均来自中国人民解放军总医院第五医学中心, 为 2022 年 5 月至 2023 年 5 月期间接受根治性肾盂癌切除手术患者切除的肾盂癌组织。本研究全部入组样本及整体研究方案均获得中国人民解放军总医院第五医学中心伦理委员会的审核和批准(批准号: KY-2022-6-40-1)。

1.2 试剂

本研究中使用的主要试剂包括: 胶原酶II、胶原酶IV、烟酰胺、N-乙酰半胱氨酸、A83-01 (Sigma 公司), Gluta MAX 添加剂、HEPES 缓

冲剂、青霉素-链霉素(双抗)、B-27 添加剂、LIVE/DEAD™ 试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司), 人重组蛋白 FGF-10、FGF-7、FGF-basic、EGF (Pepro Tech), Matrigel (康宁公司), Cultrex Basement Membrane Extract (R&D Systems, Inc.), Y-26732 (Selleck), Cell Titer-Glo® cell viability Assay 试剂盒(Promega 公司)。

抗体: CD44、FOXA1、Uroplakin III (UPIII)、MACC1、Ki67、GATA3、CK5 (Abcam)。

1.3 设备

本研究中使用的主要仪器设备包括: 生物安全柜(亚泰公司), 二氧化碳培养箱(松下公司), 石蜡包埋机、石蜡切片机(赛默飞世尔科技有限公司), 数字切片扫描系统(滨松光子学商贸有限公司), 超高分辨率共聚焦显微镜成像系统(尼康公司), 低速离心机(可成科技股份有限公司), 冰箱(海尔集团)。

1.4 方法

1.4.1 肾盂癌组织的取样、消化和培养

手术切除的肾盂癌组织在离体 1 h 内放入组织保存液中, 并在低温环境下运输至实验室, 所有操作过程均保持无菌, 避免组织污染。运输至实验室后, 使用预冷的含有 2% 双抗的 PBS 清洗 3 次, 同时使用无菌器械除去组织表面的血丝及沉淀杂质。将肿瘤组织转移到无菌六孔板中, 使用眼科剪剪至 1-2 mm³, 加入浓度为 1 mg/mL 的胶原II与胶原IV混合酶, 在培养箱中酶解 1 h, 结束后添加 2 mL PBS, 终止酶解。获得的组织解离悬液依次使用孔径为 70 μm 和 40 μm 的无菌过滤网去除未消化的组织; 然后转移到 15 mL 离心管内进行离心(1 200 r/min, 5 min); 使用 1 mL PBS 对获得的细胞沉淀重悬, 加入 3 mL 红细胞裂解液, 进行红细胞裂解处理后再次离心(1 200 r/min, 5 min), 对最终得到的细胞沉淀再次使用 1 mL PBS 重悬, 取出 10 μL

细胞悬液进行细胞计数。然后,将细胞浓度调整为 1 000 cells/ μ L,采用包埋形式,即用基质胶重悬细胞沉淀,吸取 20 μ L 加入空白低吸附 24 孔板后,37 $^{\circ}$ C 静置 30–40 min,待基质胶凝固后,每孔加入 500 μ L 培养液。培养过程中,定期取出培养板通过显微镜观察并记录肾盂癌类器官的生长状态,前期类器官体积较小需隔天半量换液,待其长至肉眼可见时需 2–3 d 全量换液。

本研究参考了文献[19–21]来源的 3 种试验方案,具体介绍如下(每种培养方法第一次接种或传代需加入 10 μ mol/L Y-26732)。

方法 A: Advance DMEM, B-27 1 \times N-乙酰半胱氨酸 1.25 mmol/L, 烟酰胺 10 mmol/L, A83-01 1.5 μ mol/L, FGF-10 100 ng/mL, FGF-basic 25 ng/mL, FGF-7 50 ng/mL, 青霉素-链霉素 1 \times 。

方法 B: Advance DMEM, Gluta MaX 1 \times , HEPES 10 mmol/L, B-27 1 \times , N-乙酰半胱氨酸 1.25 mmol/L, 烟酰胺 10 mmol/L, A83-01 500 nmol/L, 青霉素-链霉素 1 \times 。

方法 C: Advance DMEM, Gluta MaX 1 \times , HEPES 10 mmol/L, B-27 0.5 \times , N-乙酰半胱氨酸 1.25 mmol/L, 烟酰胺 10 mmol/L, A83-01 500 nmol/L, EGF 50 ng/mL, 青霉素-链霉素 1 \times 。

1.4.2 组织包埋和石蜡切片

收集生长 15–20 d 肾盂癌类器官,弃培养液,使用 PBS 清洗 3 次,在最后一次清洗时,使用移液枪将聚集的类器官吹散,静置,待其完全沉淀后去除上清加入 1 mL 10%中性福尔马林过夜固定。次日,轻轻吸走上层固定液,加入 80%乙醇过夜,第 2 天分别更换 90%、95%乙醇,静置 1 h,并重复 2 次。结束后更换无水乙醇每次 1 h,重复 2 次,每次加入 20 μ L 伊红溶液。结束后加入 1 mL 二甲苯,每次 20 min,重复 2 次。除去二甲苯后加入液体石蜡,浸泡

40 min,重复 2 次。最后一次石蜡浸泡结束后取出,待其在试管底部沉淀凝固后使用小刀在距离 EP 管底部 0.5 cm 处切断,用直头镊子轻轻旋转出底部凝固的石蜡,放置于包埋模具中,待其融化后暴露出类器官固定包埋。

肾盂癌组织较大,需在脱水缸里进行脱水,具体步骤如下:将固定好的组织放入包埋盒里流水冲洗过夜,后放入 75%酒精缸内过夜,第 2 天依次使用 80%乙醇(I, II)、95%乙醇(I, II)、100%乙醇(I, II),二甲苯(I, II)脱水,除二甲苯外其余每个缸子脱水 40 min,二甲苯浸泡 20 min。最后将其放入蜡缸中浸泡 40 min,重复 2 次。对包埋好的肾盂癌原组织及类器官进行石蜡切片,每片厚度为 4 μ m,之后将其放入 65 $^{\circ}$ C 烘箱,至少烘干 4 h。

1.4.3 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色

每次切片染色前需将其放入烘箱烘烤 30 min 左右即可脱蜡。苏木素染色肾盂癌原组织及类器官的时间需要控制在 4 min,伊红染色控制在 1 min。染色完成后脱水,用树脂封片,显微镜下观察染色状况。

1.4.4 免疫组化染色

按照免疫组化试剂盒说明书(北京中杉金桥生物技术有限公司),石蜡切片在完成脱蜡后先使用蒸馏水浸泡 3 min,再使用 PBS 缓冲液清洗,并进行抗原修复。待修复液自然冷却后,使用 PBS 进行清洗 3 min,重复 3 次。完成后用组织笔将目标组织圈出,并加入 H_2O_2 阻断剂室温孵育 10 min。再次清洗完成后使用山羊血清常温封闭 1 h,结束后按照抗体比例使用封闭液对其进行稀释。加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,一抗孵育完成后用 PBS 清洗 3 次,完成后加入增强液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,结束后再次清洗,按照抗体种属加入对应二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。

最后用显色液进行显色。不同抗体显色时间不同,待组织变为棕色即可停止,10 min 还未显色则可判定为阴性。显色完成后将切片放入苏木素溶液内对细胞核染色,时间为 5 min,稍分化 3 s 后,使用流水冲洗 20 min,组化脱水并用树脂封片,待其风干后即可成像。

1.4.5 免疫荧光染色

荧光染色方法在抗原修复及前期操作与免疫组化操作相同,不同点在于免疫荧光不需要阻断剂阻断,封闭完成后可以直接使用封闭液稀释抗体于 4 °C 过夜。第 2 天使用 PBS 对切片进行清洗。完成后加入 PBS 稀释的二抗,在避光条件室温孵育 1 h,结束后再次清洗,加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核进行染色,染色时间为 5 min,结束后再次清洗,加抗荧光淬灭剂,盖上盖玻片,用指甲油将四周固定后即可成像。

1.4.6 药物测试

将成长至第 15 天的肾盂癌类器官培养液吸出后用 PBS 清洗 3 次后,加入 500 μL 浓度为 0.125% 的胰蛋白酶。更换低吸附枪头轻轻将类器官吹散后放入培养箱,酶解时间约 3–5 min,及时观察细胞状态,防止消化过度造成细胞死亡。镜下观察到球体变成分散的单个细胞即可加入 2 mL PBS 停止酶解。通过孔径为 40 μm 的过滤筛除去未被酶解成单个细胞的类器官。离心后(1 200 r/min, 5 min),使用台盼蓝试剂测试并记录细胞活率,按照 1 000 cells/ μL ,每孔 8 μL ,接种到 96 孔板中,培养 7 d 后加入 100 μL 含不同浓度的药物培养液。培养至 48 h 后,将 96 孔板取出,待其恢复室温后加入 100 μL Cell Titer-Glo™ cell Viability Assay,振荡 5 min 后室温孵育 25 min,通过酶标仪进行检测,并使用 GraphPad 软件(v9.0.0)计算不同药物浓度处理

下细胞的活性。

将测定的 IC_{50} 药物浓度加入到培养相同时间的肾盂癌类器官中,处理 48 h 后使用 LIVE/DEAD 细胞活力/细胞毒性试剂盒,对药物处理后的类器官进行细胞死活荧光探针标记,检验药物杀伤效果。活细胞和死细胞会分别与试剂盒中的钙黄绿素-AM 和同二聚乙胺-1 发生相互作用,使用光源(EX/EM=494/517, 517/617 nm)激发后分别发出绿色和红色的荧光。使用时,用 PBS 将试剂盒内试剂按照 1:1 000 的浓度稀释,然后将待测试的类器官去除培养液后加入混合,室温孵育 20 min 后即可成像。

2 结果与分析

2.1 肾盂癌类器官模型的建立

本研究共获得肾盂癌组织样本 5 例,其中 4 例成功分离并培养得到肾盂癌类器官。通过显微镜观察并记录不同培养液方法条件(A–C)下类器官的成长状态,结果如图 1 所示,按照方法 A 培养的一类器官生长速度最快,相同细胞密度接种后获得的类器官数目更多,因此在后续实验过程中均采用方法 A 对获得的肾盂癌组织细胞进行培养。

如图 2 所示,分离出的癌细胞在 Cultrex BME 基质胶的包被下由单个肾盂癌细胞开始分裂,随着培养时间的增加,逐步长成球体;培养 2–3 周后,肾盂癌类器官成长为肉眼可见的实心球体,若两个细胞团之间距离过近会发生融合的现象;多数类器官状态为圆形,少部分会因为融合导致形状不规则。培养后期,肾盂癌类器官在基质胶中生长较为密集,使透光性变差;如果将单个球体分离开使用基质胶包被后仍可继续培养,培养时间最长可达 120 d。

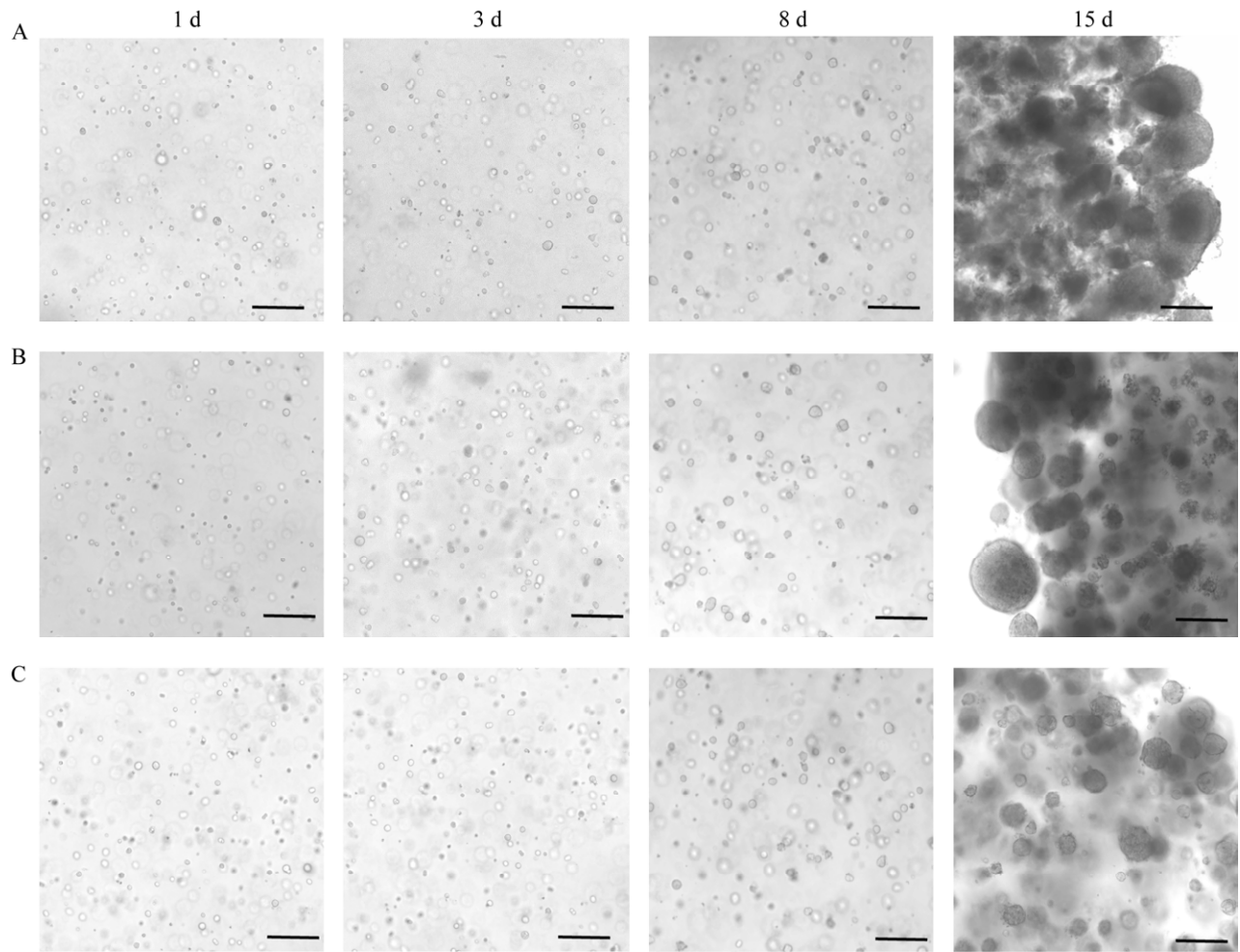


图 1 不同培养液方法条件下肾盂癌类器官状态的明场图 A: 方法 A; B: 方法 B; C: 方法 C. 标尺: 200 μm

Figure 1 Bright field images of the status renal pelvic carcinoma organoids with different culture methods. A: Method A; B Method B; C: Method C. Scale bar: 200 μm .

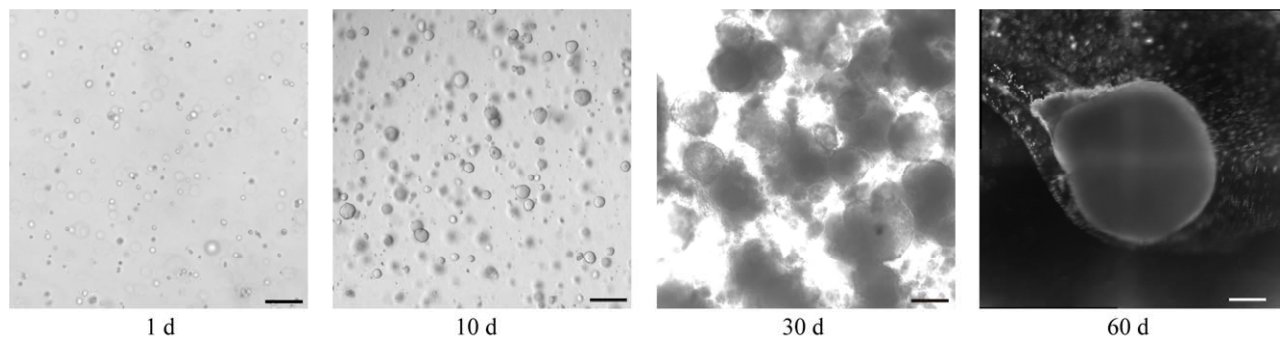


图 2 培养液方法 A 条件下不同时间类器官形态的明场图(标尺: 100 μm)

Figure 2 Bright field images of the renal pelvic carcinoma organoids grown from day 1 to day 60 with culture method A (scale bar: 100 μm).

2.2 肾盂癌肿瘤类器官鉴定

2.2.1 肾盂癌类器官组织病理学特征

为了检验肾盂癌类器官是否保留了肿瘤样本的病理学特征, 将肾盂癌类器官及其来源亲本肿瘤组织进行脱水包埋制成石蜡切片, 同时开展苏木素-伊红(ematoxylin-eosin staining, HE)染色实验。如图3所示, 肾盂癌类器官 HE 染色的结果与其来源肿瘤组织高度相似; 两者细胞核较大, 染色较深, 细胞核之间存在异型性, 具有较典型的肿瘤细胞形态特征, 在组织病理学层面显示了两者的同源性。

2.2.2 肾盂癌类器官组化染色和免疫荧光鉴定

进一步采用免疫组化对肾盂癌组织和类器官进行分析, 以评估肿瘤标志物的表达水平。免疫组化结果显示, 肿瘤干细胞标志分子 CD44 以及尿路上皮肿瘤标志分子 FOXA1、GATA3、

MCCA1 和 UPIII 在肾盂癌类器官和组织中均呈现强阳性, 表明肾盂癌类器官和其亲本肿瘤组织中均富集 CD44+ 的肾盂癌干细胞, 并且显示出尿路上皮肿瘤分子病理的特征(图4)。此外, 我们还验证了上泌尿上皮肿瘤标志分子 CK5 在肾盂癌组织和类器官中的表达, 免疫荧光染色结果显示, CK5 分子的信号在肾盂癌类器官及源肿瘤组织中表达强度和细胞定位相似(图5)。

免疫荧光染色结果显示(图6), 肾盂癌类器官中细胞增殖标志 Ki67 高表达, 其表达量占类器官总细胞整体的 30%, 表明类器官具有较强的增殖能力。

2.3 肾盂癌类器官药物反应测试结果

手术切除一直是治疗肿瘤的首选方法, 但在一些不符合手术条件或症状比较严重的患者中, 需要通过药物化疗或放疗进行治疗^[21]。肾

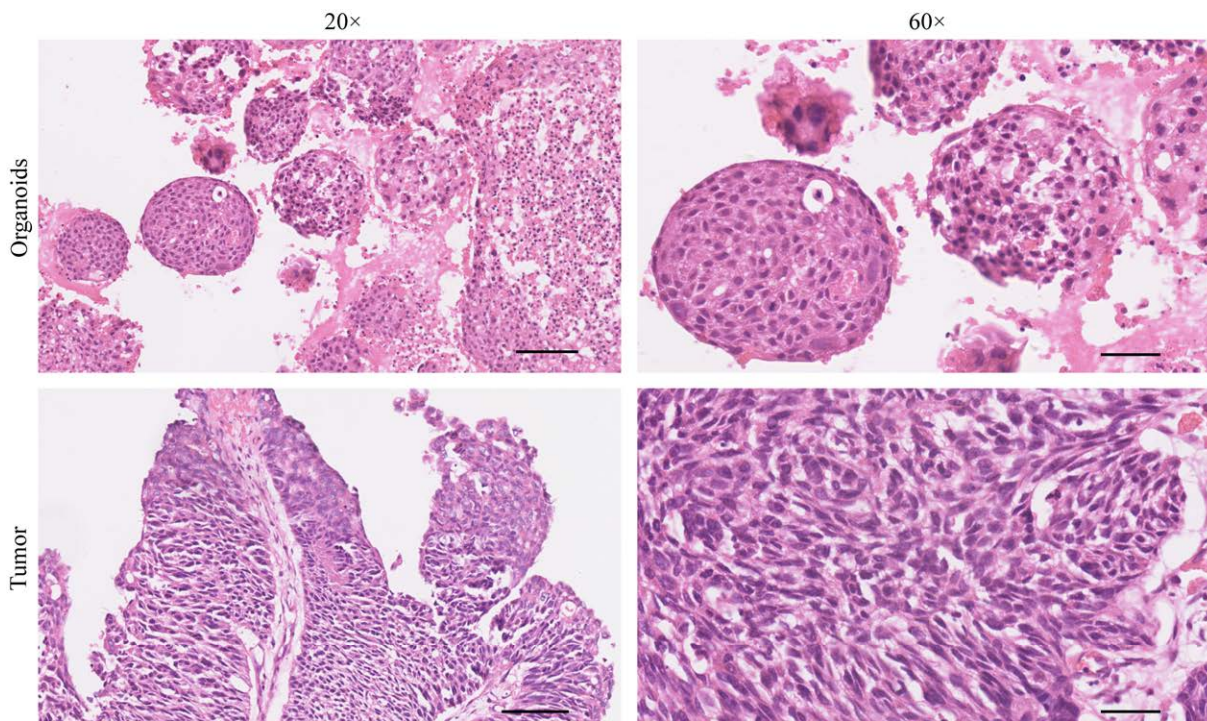


图3 肾盂癌类器官与来源肿瘤组织 HE 染色图(标尺: 250 μ m)

Figure 3 HE staining of the renal pelvis carcinoma organoids and the tumor tissue samples from renal pelvic carcinoma patients (scale bar: 250 μ m).

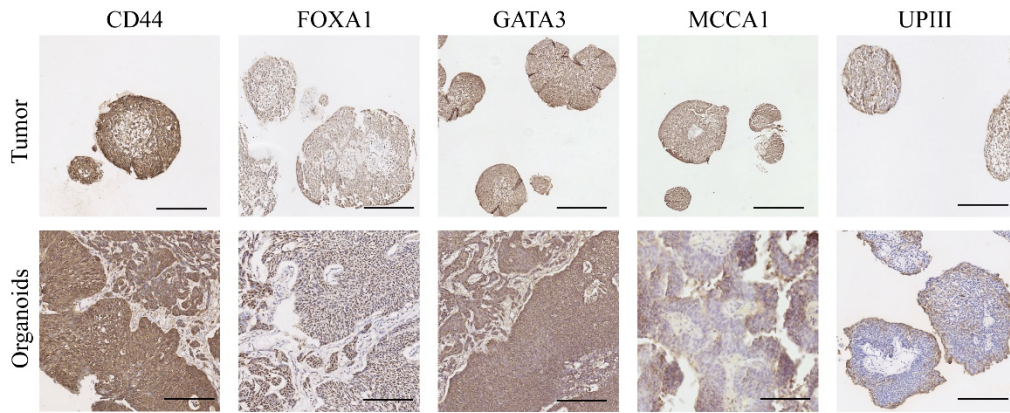


图 4 肾盂癌类器官与来源肿瘤组织组化染色图(标尺: 250 μm)

Figure 4 Immunohistochemistry staining of the renal pelvis carcinoma organoids and the tumor tissue samples from renal pelvic carcinoma patients (scale bar: 250 μm).

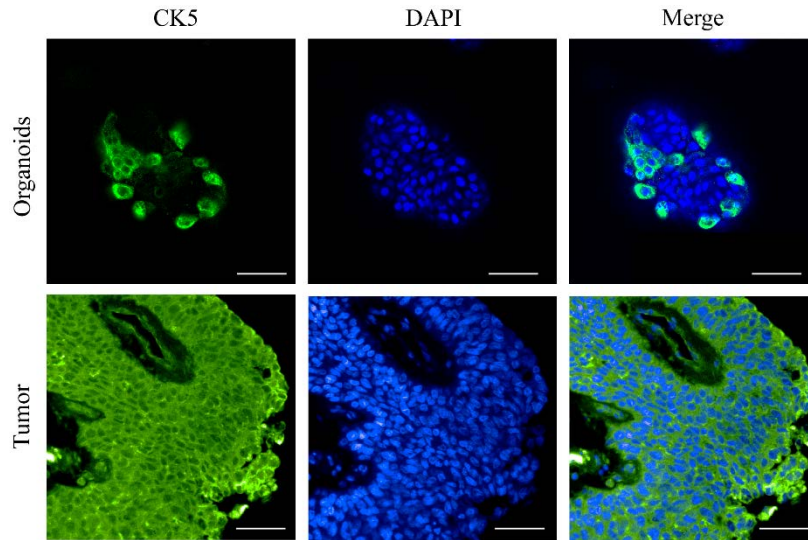


图 5 肾盂癌类器官与来源肿瘤组织免疫荧光染色图(标尺: 250 μm)

Figure 5 Immunofluorescence staining of the renal pelvis carcinoma organoids and the tumor tissue samples from renal pelvic carcinoma patients (scale bar: 100 μm).

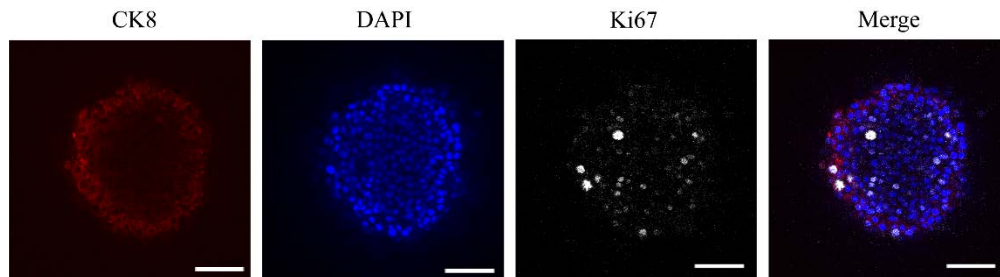


图 6 肾盂癌类器官切片免疫荧光染色图(标尺: 100 μm)

Figure 6 Immunofluorescence staining of the renal pelvis carcinoma organoids (scale bar: 100 μm).

盂癌作为一种常见的上尿路上皮癌，由于其与膀胱癌都具有尿路上皮肿瘤的属性，因此针对膀胱癌的治疗方法对肾盂癌的治疗也有一定的效果^[22-23]。例如，肾盂癌患者术后使用膀胱内灌注化疗在一定程度上可以预防肾盂癌的复发/转移^[24]；同时，针对肾盂癌患者也多选用铂类、吉西他滨、吡柔比星等药物进行治疗^[25]。本研究将培养成功的肾盂癌类器官作为体外模型，针对临床最常用的化疗药物吡柔比星开展药物有效浓度测试，并计算药物对细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 值。如图 7 所示，吡柔比星对肾盂癌类器官细胞的半抑制浓度数值 IC_{50} 为 $1.939 \mu\text{mol/L}$ 。进一步对 IC_{50} 浓度处理后的肾盂癌类器官采用 LIVE/DEAD[®] 细胞活力/细胞毒性试剂盒对药物杀伤效果进行检验，活细胞和死细胞会分别与试剂盒中的死活荧光探针相互作用发出绿色和红色的荧光。将肾盂癌类器官分别与 $1.939 \mu\text{mol/L}$ 吡柔比星及相同药物体积的 DMSO

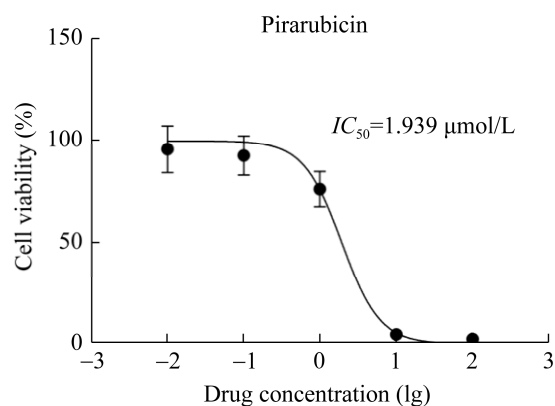


图 7 化疗药物吡柔比星对肾盂癌类器官作用 IC_{50} 曲线图

Figure 7 IC_{50} curve of the chemotherapeutic drug pirarubicin on renal pelvis carcinoma organoids.

培养液(对照组)共培养 48 h 后，使用试剂盒染色；如图 8 所示，药物处理组中代表死细胞的红色信号表达远大于对照组，说明肾盂癌类器官中大量细胞已经被化疗药物杀伤，细胞活性受到抑制。

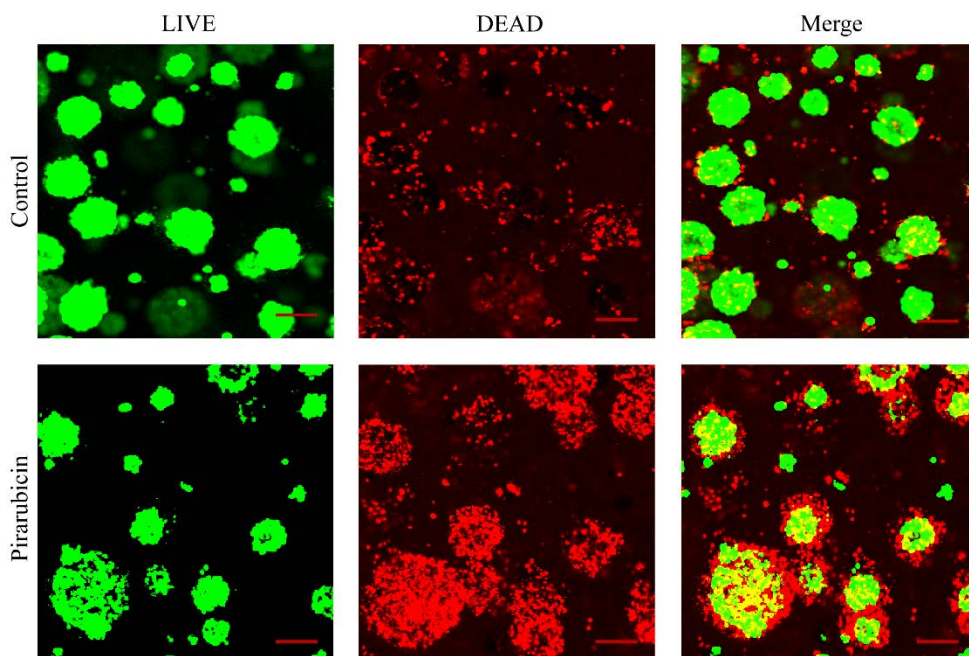


图 8 吡柔比星浓度为 $1.939 \mu\text{mol/L}$ 处理下类器官中细胞状态(标尺: $100 \mu\text{m}$)

Figure 8 Status of the renal pelvis carcinoma organoids treated by pirarubicin with a concentration of $1.939 \mu\text{mol/L}$ (scale bar: $100 \mu\text{m}$).

3 讨论与结论

上尿路上皮癌主要发生在肾盂或输尿管。肾盂癌又进一步细分为低级别、高级别以及脉管侵袭型肿瘤，对于后两种较为严重的癌症类型需采取根治性治疗，需要对整个器官进行切除，术后还需要通过膀胱实施化疗药物灌注^[26]。但这种治疗方法对肿瘤复发的抑制几率极低，患者预后较差^[27-28]，缺乏针对肾盂癌研究的体外模型阻碍了以肾盂癌为代表的 UTUC 有效治疗策略的发展。

肿瘤异质性是研究肿瘤进展和耐药性的驱动因素^[29-30]。因此，建立可以代表肿瘤异质性的体外模型，预测药物治疗反应，对肿瘤临床治疗和患者的个体化治疗至关重要^[31-32]。肿瘤类器官包含多种细胞类型，同时保留着与原始肿瘤更为相似的细胞-细胞和细胞-基质相互作用；肿瘤类器官可以维持体内肿瘤的遗传多样性和表型异质性，为临床前药物敏感性提供更准确的科学依据；患者组织来源的肿瘤类器官能够在体外大规模培养、冷冻保存、复苏传代，可以开展个性化的高通量药物筛选，为肿瘤发病机理研究、药物筛选、个性化医疗提供快速精准的模式^[15-17]。

本研究尝试建立肾盂癌类器官培养流程，并针对肾盂癌组织运输、解离到类器官培养过程中多个条件进行了探索和优化：在组织运输中，将肿瘤组织置入新鲜组织保存液中，保持低温环境运输，可以最大程度上保留肿瘤组织细胞的活性；在肿瘤组织解离为单细胞悬液的过程中，通过裂解红细胞去除组织中多余的红细胞，可以为肾盂癌细胞生长提供一个良好的生长环境；在肿瘤类器官培养液的选择上，通过总结对比 3 种培养液的实际培养效果，确定了较优的培养方案。本研究一共收集处理了 5 例肾盂

癌组织样本，有 4 例组织成功建立了肿瘤类器官培养体系，其中 3 例肾盂癌类器官成功进行冻存、复苏和传代，最长培养周期超过 120 d。对培养成功肾盂癌类器官与其来源肿瘤组织进行免疫组化比较，在原组织中阳性表达的肿瘤标志物分子在肾盂癌类器官中也呈阳性。此外，通过免疫荧光实验证实肾盂癌类器官中增殖标志物分子 Ki67 高表达，表明肾盂癌类器官中细胞具有较强的增殖能力。由于现有针对肾盂癌特异标志物的报道较少，而肾盂癌属于尿路上皮癌的一种，因此我们在染色时参考了多篇尿路上皮癌研究论文^[17-21]来选择标志物，除 CD44 为常用肿瘤干性标志物外，还包括尿路上皮肿瘤特异标志分子：FOXA1、GATA3、MCCA1 和 UPIII。同时我们还参考了最新的上泌尿系统肿瘤类器官的研究工作^[21]，验证了上泌尿系统肿瘤标志分子 CK5 的表达，结果显示上述标志分子在肾盂癌类器官和组织中的表达强度和定位均相似，说明两者具有相似的肿瘤分子病理的特征。

我们进一步利用培养的肾盂癌类器官进行常用化疗药物吡柔比星的药物反应测试获得药物 IC_{50} 浓度，并通过显微成像观察到化疗药物对类器官的明显杀伤作用，证明肾盂癌类器官可以为肾盂癌的药物研究提供精准的体外模型。患者来源肿瘤类器官来自于患者本身，与其他细胞系或动物模型相比，能够更准确地筛选出适合患者本身的药物，制定更适合患者的治疗方案，为肿瘤个体化治疗的实现提供了依据和保障。

综上所述，本研究建立了通用性高、成功率高的肾盂癌类器官培养流程，实现了肾盂癌类器官长期培养、保存和传代；同时，将肾盂癌类器官作为体外化疗药物反应的检测模型，

有望为肾盂癌基础研究及临床药物药效筛选提供新的实验模型。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2012[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] HOFSTÄDTER F. Renal pelvic carcinoma: a different urothelial tumor?[J]. *Der Pathologe*, 2009, 30(suppl 2): 185-187.
- [3] KORKES F, SILVEIRA TS, CASTRO MG, CUCK G, FERNANDES RC, PEREZ MD. Carcinoma of the renal pelvis and ureter[J]. *International Braz j Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 2006, 32(6): 648-653.
- [4] STROBEL SL, JASPER WS, GOGATE SA, SHARMA HM. Primary carcinoma of the renal pelvis and ureter. Evaluation of clinical and pathologic features[J]. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 1984, 108(9): 697-700.
- [5] NIELSEN K, OSTRIP. Primary tumors of the renal pelvis: evaluation of clinical and pathological features in a consecutive series of 10 years[J]. *The Journal of Urology*, 1988, 140(1): 19-21.
- [6] YLER A. Urothelial cancers: ureter, renal pelvis, and bladder[J]. *Seminars in Oncology Nursing*, 2012, 28(3): 154-162.
- [7] TSUJINO T, TAKAHARA K, MATSUNAGA T, YOSHIKAWA Y, TAKAI T, UCHIMOTO T, SAITO K, TANDA N, HIRANO H, NOMI H, IBUKI N, INAMOTO T, AZUMA H. Remarkable response to fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan therapy in urothelial cancer of the renal pelvis: a case report[J]. *Journal of Medical Case Reports*, 2017, 11(1): 99.
- [8] BLANPAIN C, HORSLEY V, FUCHS E. Epithelial stem cells: turning over new leaves[J]. *Cell*, 2007, 128(3): 445-458.
- [9] TIRINO V, DESIDERIO V, PAINO F, PAPACCIO G, de ROSA M. Methods for cancer stem cell detection and isolation[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 879: 513-529.
- [10] BAO SD, WU QL, McLENDON RE, HAO YL, SHI Q, HJELMELAND AB, DEWHIRST MW, BIGNER DD, RICH JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. *Nature*, 2006, 444: 756-760.
- [11] TAMURA K, AOYAGI M, WAKIMOTO H, ANDO N, NARIAI T, YAMAMOTO M, OHNO K. Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by gamma knife surgery plus external beam radiation[J]. *Journal of Neurosurgery*, 2010, 113(2): 310-318.
- [12] LANCASTER MA, KNOBLICH JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [13] SMITH RC, TABAR V. Constructing and deconstructing cancers using human pluripotent stem cells and organoids[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 12-24.
- [14] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18: 407-418.
- [15] LAU HCH, KRANENBURG O, XIAO HP, YU J. Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 17: 203-222.
- [16] LeSAVAGE BL, SUHAR RA, BROGUIERE N, LUTOLF MP, HEILSHORN SC. Next-generation cancer organoids[J]. *Nature Materials*, 2022, 21(2): 143-159.
- [17] VENINGA V, VOEST EE. Tumor organoids: opportunities and challenges to guide precision medicine[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9): 1190-1201.
- [18] LEE SH, HU WH, MATULAY JT, SILVA MV, OWCZAREK TB, KIM K, CHUA CW, BARLOW LJ, KANDOTH C, WILLIAMS AB, BERGREN SK, PIETZAK EJ, ANDERSON CB, BENSON MC, COLEMAN JA, TAYLOR BS, ABATE-SHEN C, McKIERNAN JM, AL-AHMADIE H, SOLIT DB, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 515-528.e17.
- [19] MULLENDERS J, de JONGH E, BROUSALI A, ROOSEN M, BLOM JPA, BEGTHEL H, KORVING J, JONGES T, KRANENBURG O, MEIJER R, CLEVERS HC. Mouse and human urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(10): 4567-4574.
- [20] MINOLI M, CANTORE T, HANHART D, KIENER M, FEDRIZZI T, La MANNA F, KARKAMPOUNA S,

- CHOUVARDAS P, GENITSCH V, RODRIGUEZ-CALERO A, COMPÉRAT E, KLIMA I, GASPERINI P, KISS B, SEILER R, DEMICHELIS F, THALMANN GN, KRUTHOF-DE J M. Bladder cancer organoids as a functional system to model different disease stages and therapy response[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2214.
- [21] LI ZC, XU HB, GONG YQ, CHEN W, ZHAN YH, YU L, SUN YY, LI AL, HE SM, GUAN B, WU YC, XIONG GY, FANG D, HE YH, TANG Q, YAO L, HU Z, MEI HB, HE ZS, CAI ZM, et al. Patient-derived upper tract urothelial carcinoma organoids as a platform for drug screening[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(4): e2103999.
- [22] DASANU CA, ONG-BACAY A, CODREANU I. Newer developments in the therapeutics of the transitional cell carcinoma of renal pelvis[J]. *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 2012, 18(1): 97-103.
- [23] ROUPRÊT M, BABJUK M, BURGER M, CAPOUN O, COHEN D, COMPÉRAT EM, COWAN NC, DOMINGUEZ-ESCRIG JL, GONTERO P, HUGH MOSTAFID A, PALOU J, PEYRONNET B, SEISEN T, SOUKUP V, SYLVESTER RJ, RHIJN BWGV, ZIGEUNER R, SHARIAT SF. European association of urology guidelines on upper urinary tract urothelial carcinoma: 2020 update[J]. *European Urology*, 2021, 79(1): 62-79.
- [24] GREEN DA, RINK M, XYLINAS E, MATIN SF, STENZL A, ROUPRET M, KARAKIEWICZ PI, SCHERR DS, SHARIAT SF. Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: disparate twins[J]. *The Journal of Urology*, 2013, 189(4): 1214-1221.
- [25] OZSAHIN M, UGURLUER G, ZOUHAIR A. Management of transitional-cell carcinoma of the renal pelvis and ureter[J]. *Swiss Medical Weekly*, 2009, 139(25/26): 353-356.
- [26] TANJI N, YOKOYAMA M. Treatment of metastatic renal cell carcinoma and renal pelvic cancer[J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2011, 15(3): 331-338.
- [27] LEOW JJ, CHONG YL, CHANG SL, VALDERRAMA BP, POWLES T, BELLMUNT J. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for upper tract urothelial carcinoma: a 2020 systematic review and meta-analysis, and future perspectives on systemic therapy[J]. *European Urology*, 2021, 79(5): 635-654.
- [28] MUFTI GR, GOVE JR, BADENOCH DF, FOWLER CG, TIPTAFT RC, ENGLAND HR, PARIS AM, SINGH M, HALL MH, BLANDY JP. Transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter[J]. *British Journal of Urology*, 1989, 63(2): 135-140.
- [29] ATTALLA K, PATNAIK S, VELLO T, MEHRAZIN R. Management of distal ureter and bladder cuff at the time of nephroureterectomy: surgical techniques and predictors of outcome[J]. *Future Oncology*, 2019, 15(20): 2385-2393.
- [30] TURAJLIC S, SOTTORIVA A, GRAHAM T, SWANTON C. Resolving genetic heterogeneity in cancer[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20: 404-416.
- [31] de SOUSA VML, CARVALHO L. Heterogeneity in lung cancer[J]. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 2018, 85(1/2): 96-107.
- [32] XU HX, JIAO DC, LIU AG, WU KM. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2022, 15(1): 58.

(本文责编 郝丽芳)