

膀胱癌类器官模型的研究进展

孙晓宇, 张志宏 综述, 张昌文 审校

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津 300211)

摘要 膀胱癌(BC)是泌尿外科常见恶性肿瘤之一,患者术后5年生存率较低。近年来,新兴的三维类器官模型在抗肿瘤药物筛选和疾病机制探索等方面为膀胱癌研究带来了极大推动。本文对膀胱癌类器官模型的建立、应用、面临的挑战进行了综述,并对未来应用进行了展望。

关键词 类器官;膀胱癌;肿瘤研究;3D肿瘤模型

中图分类号 R694

文献标志码 A

膀胱癌是一种高度异质性的恶性肿瘤,其中3/4为高复发率、预后较好的非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC),1/4为高转移率、预后较差的肌层浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC)^[1]。尽管如今基于肿瘤分子分型进行靶向治疗或者免疫治疗等方面取得了极大进步,但近30%的NMIBC进展为MIBC,患者5年总生存率(overall survival, OS)仅为50%^[2]。这与膀胱癌的高度异质性、较高的复发转移率和耐药性有关。

随着精准医疗的不断发展,亟需建立更有针对性的个体化治疗体系,新兴的体外三维培养类器官模型应运而生。类器官是将胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)或成体干细胞(somatic stem cells, SSCs)经过体外培养基培养,干细胞通过自我组织形式形成多种细胞类型组成的三维器官型结构^[3-5]。与传统的二维肿瘤细胞系及人源肿瘤异体移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)模型相比,类器官模型可以很好的保留肿瘤组织的异质性和更真实的肿瘤微环境,为肿瘤研究提供了良好的临床前模型^[6]。本文重点介绍膀胱癌类器官模型的研究进展,讨论其不足以及对未来应用前景进行展望。

1 膀胱癌类器官模型的建立

自2009年Sato等^[7]利用富含亮氨酸重复序列的G蛋白耦联受体5(leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5, Lgr5)阳性的肠道干细胞在添加Wnt通路激动剂R-spondin、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)抑制

剂Noggin、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等生长因子的基质胶培养基中培养出具有隐窝绒毛结构的肠道类器官后,类器官技术有了突破性的进展。胃^[8]、汗腺^[9]、大脑^[10]、乳腺^[11]等人源类器官逐步建立。近5年基于膀胱癌类器官模型的研究也相继发表(表1)。除了人源性膀胱癌类器官外,PDX类器官也已构建成功^[12-19]。2018年Lee等^[12]建立了22个膀胱癌类器官系组成的膀胱癌类器官生物样本库,并通过外显子及全基因组测序证实了膀胱癌类器官与原发肿瘤组织病理学特征、体细胞突变和DNA拷贝数改变等特征保持高度一致。同时在一定程度上阐述了膀胱癌类器官自身的进化特点,为膀胱肿瘤异质性研究提供了参考。2019年,Mullenders等^[20]从53例患者样本中培养成功133个膀胱癌类器官,并发现成纤维细胞生长因子(FGF)7和FGF10可以促进膀胱癌类器官的增殖,进而对培养基进行了优化。人类癌症模型组织(Human Cancer Models Initiative, HCMI)建立了类器官生物库(<https://ocg.cancer.gov/programs/HCMI>),可获取现有类器官的基因和临床信息。

2 膀胱癌类器官模型的应用

2.1 肿瘤机制研究 Shen等^[27]利用膀胱癌类器官模型联合体外和体内实验探索了磷酸甘油酯脱氢酶(phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH)的生物学功能,并验证了PHGDH可与聚结合蛋白2(poly(rC)-binding protein 2, PCBP2)相互作用,上调溶质载体家族7成员11(recombinant solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)表达,促进膀胱癌的恶性进展。Wang等^[29]建立了CRISPR-Cas9基因编辑的膀胱癌类器官模型用以研究膀胱肿瘤耐药问题,得出通过靶向组织蛋白酶H进行分化是治疗化疗耐药性MIBC的潜在治疗策略。Vlaar等^[18]借助膀胱癌

基金项目 国家重点研发计划项目(2021YFC2009303)

作者简介 孙晓宇(1995-),男,博士在读,研究方向:泌尿肿瘤疾病;

通信作者:张昌文, E-mail: zhangchangwen05@163.com。

表1 膀胱癌类器官模型的文献回顾

细胞来源	培养基	类器官数量	参考文献
PDX	DMEM/F-12, B27, EGF, bFGF	2	Ooki 等 ^[13]
膀胱肿瘤组织, PDX	Hepatocyte, medium Glutamax, EGF, ROCKi, FBS	22	Lee 等 ^[12]
膀胱肿瘤组织	DMEM/F-12, Glutamax, BSA, β -met	4	Yoshida 等 ^[21]
膀胱肿瘤组织, PDX	DMEM/F-12, Glutamax, BSA, β -met	8	Kita 等 ^[14]
膀胱正常和肿瘤组织	Adv DMEM/F-12, B27, Nac, NAM, A83-01, FGF2/7/10, ROCKi	77	Mullenders 等 ^[20]
膀胱正常和肿瘤组织	Adv DMEM/F-12, Glutamax, HEPES, B27, Nac, NAM, A83-01, EGF, ROCKi	9	Kim 等 ^[22]
膀胱肿瘤组织	Adv DMEM/F-12, B27, Nac, NAM, A83-01, FGF2/7/10, HER3, ROCKi	4	Whyard 等 ^[23]
膀胱肿瘤组织	DMEM/F-12, Glutamax, BSA, bFGF, ROCKi	2	Namekawa 等 ^[24]
膀胱肿瘤组织	Adv DMEM, Glutamax, HEPES, B27, Nac, NAM, A83-01, EGF, ROCKi	2	Yoon 等 ^[25]
PDX	RPMI-1640, FBS, L-glut, neaa	2	Amaral 等 ^[15]
膀胱肿瘤组织, PDX	DMEM/F-12, Glutamax, StemPro, BSA, β -met	7	Murakami 等 ^[16]
膀胱肿瘤组织	Adv DMEM/F-12, Glutamax, HEPES, B27, Nac, NAM, A83-01, R-spondin, Noggin, EGF, FGF2/10, SB202190	3	Yu 等 ^[26]
PDX	Adv DMEM/F-12, B27, NAC, A83-01, R-spondin, Noggin, EGF, ROCKi	2	Cai 等 ^[17]
膀胱肿瘤组织	DMSO medium	3	Shen 等 ^[27]
PDX	DMEM/F-12, HEPES, Glutamax, penicillin, streptomycin, Nicotinamide, N-Acetylcysteine, FGF7/10, A83-01, B27, primocin	未提及	Vlaar 等 ^[18]
肾盂、膀胱肿瘤组织	HCM enriched by 5% charcoal-stripped FBS, Sigma-Aldrich, Chemie, Taufkirchen, Germany, Y-27632	7	Wei 等 ^[28]
膀胱肿瘤组织, PDX	DMEM/F-12, FGF2/7/10, B27, A83-01, N-acetylcysteine, nicotinamide	5	Rangsitratkul 等 ^[19]

类器官模型证明了异常芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)信号转导是尿路上皮肿瘤发生的重要驱动因素。这些研究都为人们进一步理清膀胱癌发病和耐药等过程中关键基因的功能提供了重要线索。

2.2 抗肿瘤药物筛选 膀胱癌类器官模型具有高保真特性,是药物测试的极佳模型。Mullenders 等^[20]用3个膀胱癌类器官系暴露于6种针对膀胱癌一线化疗药物中,验证了不同膀胱癌类器官其敏感化疗药物不同。Kita 等^[14]同样验证了膀胱癌类器官的药物敏感性与PDX平行,类器官模型在快速建立、低成本和技术可行性等方面显示出重要优势。

除了对化疗药物进行敏感性检测外,Neal 等^[30]建立了一种气-液界面(air-liquid interface, ALI)培养类器官模型的方法来保留免疫细胞,可在7 d内对免疫治疗药物的功能测试。证实了在膀胱癌类器官模型中模拟肿瘤免疫微环境和对免疫检查点抑制剂的反应是可行的。Yin 等^[31]建立了一种包含免疫微环境的肿瘤样细胞簇模型,可在14 d内完成抗肿瘤药物筛选。

2.3 生物打印 近几年3D生物打印技术日益成熟,促进了膀胱癌类器官模型不断优化。Kim 等^[22]利用3D打印技术,组建了包含肌肉层、肿瘤相关成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞的膀胱组装体(assembly)。通过该组装体验证了FOXA1-BMP-hedgehog信号轴在肿瘤和基质之间控制肿瘤可塑性的重

要作用。

Yoon 等^[25]利用压电喷墨打印(piezoelectric inkjet printing, IJP)技术,将膀胱癌类器官解离成单个肿瘤细胞制备为生物墨水,通过喷墨打印将单个细胞精确地分配到微孔板中培养成类器官。验证了IJP技术可以有效地对细胞进行分类,对肿瘤异质性研究具有重大意义。

2.4 微流控技术 Gheibi 等^[32]使用75 μ m微流体装置可以在较长时间内维持BC细胞,并成功验证了膀胱癌类器官模型的药物反应性和耐药性。罗升昌等^[33]借助微流控技术构建支架系统,进行了肿瘤类器官的血管化及多细胞共培养模式的探索,为类器官模型的工程化提供了宝贵经验。2021年, Serex 等^[34]将微流控技术和生物打印技术相结合,建立了一种能够实时调节细胞浓度的微流控打印头,打印出了标准化的膀胱癌类器官,获得了可靠和可重复的结果。

3 膀胱癌类器官模型的挑战

3.1 规范标准的培养体系 目前全球类器官模型研究团队大多采用从小鼠肉瘤中提取的基质胶作为类器官的三维培养基质,但其各组分却各有特点,且具有潜在的免疫原性。因此难以通过一个统一的评价体系去定性定量。

有多个研究报道了在肿瘤类器官模型的构建过程中,正常细胞的生长速度和数量超过了肿瘤细胞,在后续传代中肿瘤类器官甚至消失^[35-37]。因此亟

需高选择性的培养基,实现目标类器官的快速生长。

我国今年发布了《肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022年版)》^[38],《类器官药物敏感性检测指导肿瘤精准治疗临床应用专家共识(2022年版)》^[39]。两部共识初步制订了肿瘤类器官质量及药敏检测相关标准。不同疾病类器官模型有其特有的特点,目前尚未有专病类器官模型的相应规范。

3.2 血管化及共培养体系 尽管目前膀胱癌类器官在药物研发、药敏检测等领域显现出独特的优势,但缺乏维持肿瘤生长的血管系统、免疫细胞等是其很大的局限。目前已有多个共培养体系报道^[6,40-41],但仍不能完全模拟体内肿瘤微环境。除了血管系统,Carroll等^[42]探索通过类器官模型在体外模拟神经系统。目前多个领域专家在共同研发含多传感器的类器官芯片平台,努力将生物力学及体内微环境融入到集合类器官模型中。

4 膀胱癌类器官模型的展望

首先,膀胱癌类器官模型在肿瘤机制探索、新药研究等方面是一种绝佳的临床前模型。实验动物因其价格昂贵、转运困难及福利运动等多方面因素越来越受到制约,在未来类器官模型代替动物模型是一种趋势。2022年9月29日,美国参议院通过了食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)现代化法案(FDA Modernization Act 2.0),允许药物研究在可行的条件下使用替代方法。类器官模型将为未来制药行业和临床试验提供更有力的支持。

其次,类器官技术发展日益成熟,建立更加准确、快速、高通量、自动化的类器官模型是大势所趋。目前高内涵成像分析系统和基于机器学习的图像分析^[43]研究正在不断探索。类器官模型结合染色质开放性测序技术(assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq)^[44]、染色体三维基因组学测序技术(Bridge Linker-Hi-C, BL-Hi-C)^[45]、代谢组学和蛋白组学的多组学联合研究,是未来疾病机制研究的重要部分。

最后,类器官芯片为核心,结合3D打印技术和高内涵成像分析系统实现高精度、一体化、集成化、自动化是类器官发展的未来趋势。在未来,膀胱癌类器官模型有可能完全替代目前的二维肿瘤细胞系及PDX模型,成为广泛应用的临床前模型。

参考文献:

[1] BABJUK M, BURGER M, CAPOUN O, et al. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (ta, t1, and carcinoma in situ)[J]. Eur Urol, 2022, 81(1): 75-94.

[2] ALFRED WITJES J, LEBRET T, COMPRAT E M, et al. Updated 2016 eau guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer[J]. Eur Urol, 2017, 71(3): 462-475.

[3] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J]. Science, 2014, 345(6194): 1247-125.

[4] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(7): 407-418.

[5] LI M, IZPISUA BELMONTE J C. Organoids—preclinical models of human disease[J]. N Engl J Med, 2019, 380(6): 569-579.

[6] JACOB F, SALINAS R D, ZHANG D Y, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity[J]. Cell, 2020, 180(1): 188-204.e22.

[7] 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.

[8] BARTFELD S, BAYRAM T, VAN DE WETERING M, et al. *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection[J]. Gastroenterology, 2015, 148(1): 126-136.e6.

[9] DIAO J, LIU J, WANG S, et al. Sweat gland organoids contribute to cutaneous wound healing and sweat gland regeneration[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 238.

[10] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly[J]. Nature, 2013, 501(7467): 373-379.

[11] SACHS N, DE LIGT J, KOPPER O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity[J]. Cell, 2018, 172(1-2): 373-386.e10.

[12] LEE S H, HU W, MATULAY J T, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. Cell, 2018, 173(2): 515-528.e17.

[13] OOKI A, VANDENBUSSCHE C J, KATES M, et al. Cd24 regulates cancer stem cell(csc)-like traits and a panel of csc-related molecules serves as a non-invasive urinary biomarker for the detection of bladder cancer[J]. Br J Cancer, 2018, 119(8): 961-970.

[14] KITA Y, HAMADA A, SAITO R, et al. Systematic chemical screening identifies disulfiram as a repurposed drug that enhances sensitivity to cisplatin in bladder cancer: a summary of preclinical studies[J]. Br J Cancer, 2019, 121(12): 1027-1038.

[15] AMARAL R, ZIMMERMANN M, MA A-H, et al. A simple three-dimensional *in vitro* culture mimicking the *in vivo*-like cell behavior of bladder patient-derived xenograft models[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(5): 1304.

[16] MURAKAMI K, KITA Y, SAKATANI T, et al. Antitumor effect of wee1 blockade as monotherapy or in combination with cisplatin in urothelial cancer[J]. 2021, 112(9): 3669-3681.

[17] CAI E Y, GARCIA J, LIU Y, et al. A bladder cancer patient-derived xenograft displays aggressive growth dynamics *in vivo* and in organoid culture[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 4609.

[18] VLAAR J M, BORGMAN A, KALKHOVEN E, et al. Recurrent exon-deleting activating mutations in AHR act as drivers of urinary tract cancer[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 10081.

[19] RANGSITRATKUL C, LAWSON C, BERNIER-GODON F, et al. In-

- travesical immunotherapy with a GM-CSF armed oncolytic vesicular stomatitis virus improves outcome in bladder cancer[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 24: 507–521.
- [20] MULLENDERS J, DE JONGH E, BROUSALI A, et al. Mouse and human urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(10): 4567–4574.
- [21] YOSHIDA T, SOPKO N A, KATES M, et al. Three-dimensional organoid culture reveals involvement of Wnt/ β -catenin pathway in proliferation of bladder cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(13): 11060–11070.
- [22] KIM E, CHOI S, KANG B, et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer[J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 664–669.
- [23] WHYARD T, LIU J, DARRAS F S, et al. Organoid model of urothelial cancer: establishment and applications for bladder cancer research[J]. *Biotechniques*, 2020, 69(3): 193–199.
- [24] NAMEKAWA T, IKEDA K, HORIE-INOUE K, et al. ALDH1A1 in patient-derived bladder cancer spheroids activates retinoic acid signaling leading to TUBB3 overexpression and tumor progression[J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(4): 1099–1113.
- [25] YOON W H, LEE H-R, KIM S, et al. Use of inkjet-printed single cells to quantify intratumoral heterogeneity[J]. *Biofabrication*, 2020, 12(3): 035030.
- [26] YU L, LI Z, MEI H, et al. Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells[J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(2): e1248.
- [27] SHEN L, ZHANG J, ZHENG Z, et al. Phgdh inhibits ferroptosis and promotes malignant progression by upregulating slc7a11 in bladder cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(14): 5459–5474.
- [28] WEI Y, AMEND B, TODENHÖFER T, et al. Urinary tract tumor organoids reveal eminent differences in drug sensitivities when compared to 2-dimensional culture systems[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6305.
- [29] WANG M, CHEN X, TAN P, et al. Acquired semi-squamatization during chemotherapy suggests differentiation as a therapeutic strategy for bladder cancer[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(9): 1044–1059.
- [30] NEAL J T, LI X, ZHU J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972–1988.
- [31] YIN S, XI R, WU A, et al. Patient-derived tumor-like cell clusters for drug testing in cancer therapy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(549): eaaz1723.
- [32] GHEIBI P, ZENG S, SON K J, et al. Microchamber cultures of bladder cancer: a platform for characterizing drug responsiveness and resistance in pdx and primary cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12277.
- [33] 罗升昌, 王颖, 王士斌, 等. 基于微流控技术构建 3D 肿瘤模型用于药物筛选[J]. *科学通报*, 2021, 66(34): 4395–4410.
- [34] SEREX L, SHARMA K, RIZOV V, et al. Microfluidic-assisted bio-printing of tissues and organoids at high cell concentrations[J]. *Biofabrication*, 2021, 13(2): 10.1088/1758-5090.
- [35] YUKI K, CHENG N, NAKANO M, et al. Organoid models of tumor immunology[J]. *Trends immunol*, 2020, 41(8): 652–664.
- [36] GAO D, VELA I, SBONER A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 176–187.
- [37] DROST J, KARTHAUS W R, GAO D, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(2): 347–358.
- [38] 赵冰, 宋伟, 王海霞. 肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022 年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2022, 32(07): 657–668.
- [39] 王树滨, 高静, 朱宇, 等. 类器官药物敏感性检测指导肿瘤精准治疗临床应用专家共识(2022 年版)[J]. *中国癌症防治杂志*, 2022, 14(03): 234–239.
- [40] RINGQUIST R, GHOSHAL D, JAIN R, et al. Understanding and improving cellular immunotherapies against cancer: from cell-manufacturing to tumor-immune models[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 179: 114003.
- [41] FORSYTHE S D, ERAI R A, SASIKUMAR S, et al. Organoid platform in preclinical investigation of personalized immunotherapy efficacy in appendiceal cancer: feasibility study[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(18): 5141–5150.
- [42] CARROLL J A, FOLIAKI S T, HAIGH C L. A 3D cell culture approach for studying neuroinflammation[J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 358: 109201.
- [43] KASSIS T, HERNANDEZ-GORDILLO V, LANGER R, et al. Organaguant: human intestinal organoid localization and quantification using deep convolutional neural networks[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12479.
- [44] BUENROSTRO J D, GIRESI P G, ZABA L C, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(12): 1213–1218.
- [45] LIANG Z, LI G, WANG Z, et al. BL-Hi-C is an efficient and sensitive approach for capturing structural and regulatory chromatin interactions[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1622.

(2023-01-28 收稿)