

李梦瑶,黄敏丽,李鹏,等. 基因编辑在肿瘤类器官中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 721-729.

LI M Y, HUANG M L, LI P, et al. Research progress in gene-editing technology in tumor organoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 721-729.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.010

基因编辑在肿瘤类器官中的研究进展

李梦瑶^{1,2}, 黄敏丽^{1,2}, 李鹏^{2,3}, 谢俊科², 郭梦甜², 张永斌^{3*}, 师长宏^{2*}

(1. 广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032;

3. 广州中医药大学动物实验中心, 广州 510405)

【摘要】 类器官已成为肿瘤研究的重要技术平台,但在模拟肿瘤组织结构 and 功能方面依旧存在问题。基因编辑技术的发展,尤其与肿瘤类器官相结合时,为精准、全面地模拟体内肿瘤模型特征提供了新的途径。通过基因编辑技术在肿瘤类器官中引入特定基因变异或修正突变,可以深入解析肿瘤的发生发展机制,探索潜在的治疗靶点,并加速药物筛选过程,为肿瘤个体化治疗提供了新的思路。本文综述了肿瘤类器官的形成及基因编辑策略应用于肿瘤类器官研究的技术要点,重点阐述了基因编辑技术在肿瘤类器官上的独特应用及前景。同时,提出准确模拟体内微环境,推动类器官基因编辑技术的标准化和稳定性,优化基因编辑效率,可以加速肿瘤类器官在精准医学研究中的应用。

【关键词】 基因编辑;肿瘤类器官;CRISPR/Cas9;干细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0721-09

Research progress in gene-editing technology in tumor organoids

LI Mengyao^{1,2}, HUANG Minli^{1,2}, LI Peng^{2,3}, XIE Junke², GUO Mengtian², ZHANG Yongbin^{3*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Innovation Centre for Science and Technology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou

510405, China; 2. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;

3. Animal Laboratory Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn;

ZHANG Yongbin. E-mail: yongbinzhang@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Organoids have become an important technological platform in cancer research, but simulating the primary tumor tissue structure and function still presents problems. The development of gene-editing technology, especially when combined with tumor organoids, provides a new approach for accurately and comprehensively simulating the *in vivo* characteristics of tumor models. Introducing specific gene mutations or correcting mutations in tumor organoids through gene-editing technology can allow detailed analysis of the mechanisms of tumor initiation and progression, as well as exploring potential therapeutic targets, accelerating the drug-screening process, and providing new insights for personalized cancer treatment. This article reviews the formation of tumor organoids and the technical aspects of gene-editing strategies, emphasizing their unique applications and prospects in tumor organoids. We also

【基金项目】 国家自然科学基金(32070532,32270566)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(32070532, 32270566).

【作者简介】 李梦瑶,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合基础。Email: 18211574812@163.com

【通信作者】 师长宏,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

张永斌,男,博士,正高级实验师,硕士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: yongbinzhang@gzucm.edu.cn。

* 共同通信作者

propose that accurately simulating the *in vivo* microenvironment, promoting the standardization and stability of organoid gene-editing technology, and optimizing the efficiency of gene editing can accelerate the application of organoids in precision medicine research.

【Keywords】 gene-editing; tumor organoids; CRISPR/Cas9; stem cell

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

全球癌症每年致使近 1000 万人失去生命,且这一数字预计仍将持续攀升^[1]。令人遗憾的是,有效的癌症治疗手段数量却未能跟上这一严峻趋势。其中一个关键因素在于缺乏能够精准模拟人类肿瘤形态、分子特征以及微环境多样性的体外临床前模型。鉴于此,研究人员提出了肿瘤类器官这一概念。肿瘤类器官是在体外培养的 3D 细胞模型,在适当的培养条件下,肿瘤细胞或肿瘤干细胞可自行组装成与原始肿瘤组织相似的细胞结构和功能特征^[2]。相比于细胞系,类器官更能代表人类肿瘤的多样性,因为细胞系通常无法再现体内细胞的结构、功能和生理方面^[3]。且由于肿瘤细胞系随着时间推移会发生多个额外突变,导致其细胞极性和酶活性等发生改变^[4-5]。虽患者源性异种移植 (patient-derived xenografts, PDX) 模型有助于克服与细胞系使用相关的局限性,保留原始患者肿瘤的基因组特征、组织病理学和异质性,但其构建周期长、成功率低,因此,在患者临床治疗中并不适用。此外, PDX 模型只适用于检测有限数量的药物组合,并不适于高通量筛选。而类器官模型可以降低实验的复杂性,构建效率明显提升,且可快速扩增、长期培养,并且适合应用实时成像技术^[6-8]。总之,与细胞系和 PDX 模型相比,类器官具有前沿性、精准性、高效性,以及功能多样性等优势。但如何使类器官更好地发挥其优势,使其更加精确、全面地模拟各种肿瘤,为研究人员提供一个良好的体外模型,成为了当前研究重点。

在过去数年中,基因编辑技术的发展,尤其是 CRISPR/Cas9 系统的发现,将与肿瘤相关的遗传变异精准设计到干细胞中成为可能,进而培养了各式各样的类器官^[9],这些类器官保留着患者特定的致病突变与表观遗传背景,为有效模拟体内肿瘤特征开辟了全新的路径。此外,由于 CRISPR/Cas9 系统具备高精度、可重复性、易用性、成本效益以及在众多研究领域广泛的实用性

等诸多优势^[10],其与类器官培养技术的有机结合为深入探究肿瘤相关信息以及推动精准医学的发展构建了一个独一无二的模型。

构建基因编辑的肿瘤类器官模型不仅为肿瘤研究提供了更为精准的工具,还有助于在肿瘤发生发展机制、药物筛选、个性化治疗等多方面取得更为显著的突破,从而为应对肿瘤这一全球性健康挑战带来新的希望与可能。在这篇综述中,讨论了肿瘤类器官的形成以及用于肿瘤类器官的基因编辑方法和递送靶基因的方式,重点关注了基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术在肿瘤类器官中的关键作用和应用潜能,期望为肿瘤研究提供一个新的实验工具。

1 肿瘤类器官的来源

干细胞作为原始且未分化的细胞,具备自我更新能力,同时还能够分化产生某种特定组织类型的细胞。鉴于其自我更新以及多向分化的潜能,类器官得以从干细胞中构建生成,包括诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)、胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)、成体干细胞 (adult stem cells, ASCs) 以及肿瘤组织^[11]。在肿瘤类器官的培育过程中,正常干细胞通常会被置于三维培养系统内的基质胶 (如 Matrigel) 之中,并且会添加适宜的细胞因子,以此来模拟组织发育过程中的各类信号^[12]。干细胞发展演变成类器官后,利用 CRISPR/Cas9 技术对驱动突变进行序列敲除和敲入,生成肿瘤类器官,作为进一步研究肿瘤发病机制的方法^[13]。

1.1 成体干细胞来源

ASCs 衍生的类器官技术有助于模拟不同肿瘤的表型,利用这些模型,不仅可进行药物筛选,还可开展基础研究。例如,通过 CRISPR/Cas9 技术构建小鼠结肠癌类器官,揭示 SOX17 在早期结肠癌免疫逃避中的关键作用^[14]。且 ASCs 衍生类器官培养方案简单、耗时短且成熟度高,与成

人组织相似度高^[15-16]。但其细胞成分单一,主要为上皮细胞^[11],且对不同组织的培养基了解有限,这些都限制了 ASCs 衍生类器官的应用。

1.2 诱导多能干细胞来源

除了 ASCs,类器官还能源自 ESCs 或 iPSCs。人类 ESCs 因受到伦理法规的约束,其应用范围受到限制,无法广泛普及。相较而言,iPSCs 是通过特定转录因子对体细胞进行重编程而获得,具备与 ESCs 相似的多能性,能够分化成多种不同类型的细胞^[17]。通过在不同发育阶段引入癌基因过表达或抑癌基因的功能丧失来从 iPSCs 建立肿瘤类器官。这种来源的类器官可用于研究基因突变在肿瘤发生和肿瘤发展中的作用^[18-19]。然而,在从 iPSCs 产生类器官的过程中存在一个难点,传统的分化方法通常只能使 iPSCs 分化为特定类型的细胞,难以形成构成肿瘤中的多种细胞类型,这就导致了 iPSCs 衍生的类器官肿瘤细胞之间缺乏关键的相互作用^[20]。

1.3 肿瘤组织来源

基于 ASCs 衍生类器官的培养方案,研究人员可以从肿瘤组织(包括原发性肿瘤、循环肿瘤细胞和继发性转移瘤)中分离的肿瘤细胞或肿瘤干细胞在特定培养条件下形成肿瘤类器官,该种类器官很好地保留了肿瘤的组织病理学特征、基因特征和异质性,可用于肿瘤研究、药物筛选和个性化医疗,如胰腺癌^[21]、前列腺癌^[22]、肺癌^[23]、胃癌^[24]等多种肿瘤的种类器官模型已被成功建立。

类器官的来源多种多样,每种来源都有其独特的优势和应用场景,为肿瘤的研究和治疗提供了重要的工具和模型。

2 肿瘤类器官基因编辑技术的类型

2.1 应用于肿瘤类器官的基因编辑技术

类器官培养体系为探索肿瘤相关机制提供了良好的实验工具,但深入揭示基因在肿瘤中的作用需要精确的基因编辑方法。传统的同源重组技术在小鼠 ESCs 中展现出较高的基因编辑效率,但当应用于人类 ESCs 或 iPSCs 时,其靶向效率存疑。为了切实提高基因编辑效率,科研人员成功研发出了基于锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)和 TALE 核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术的基

因编辑方法^[25]。然而,设计 ZFN 和 TALENs 以精准地靶向不同序列在技术层面仍然充满困难,并且需要投入较高的成本^[26]。CRISPR 和 CRISPR 相关蛋白的发现与发展,因其编程相对简便、具有高度特异性以及多功能性,为肿瘤类器官的研究提供了良好的基因编辑方法。

其中,CRISPR/Cas9 是一种 RNA 介导的 DNA 内切酶,通过与目标序列互补的单引导 RNA(single guide RNA, sgRNA)引导识别靶 DNA。为了使 Cas9 结合并切割 DNA,目标序列下游需要存在一个原间隔邻接基序(protospacer adjacent motif, PAM),从而在 DNA 上产生钝端或交错末端的双链断裂(double-strand break, DSB)。随后,通过同源定向修复(homology-directed repair, HDR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)等不同的 DNA 修复机制,实现基因工程的应用^[27-28]。基于 CRISPR/Cas9 的特点,只需针对目标序列与其互补的 sgRNA 设计,便可降低操作的复杂性和成本。此外,通过表达不同的 sgRNA,可以在同一细胞中进行多个基因位点的编辑,为系统化、网络化研究肿瘤发生发展的分子机制提供了有效途径^[29-30]。

肿瘤相关的基因突变通常受多因素调控,在类器官模型中应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以更好地模拟临床病例的遗传异质性,这对于全面深入地理解肿瘤发生发展的原因,以及开发适宜的治疗手段具有重要意义^[31-32]。然而,CRISPR/Cas9 仍面临脱靶效应、DNA 损伤引起的细胞毒性以及免疫原性等限制因素^[33-34]。在 2D 细胞培养中,NHEJ 的效率足以实现群体基因敲除,验证结果时,可以直接对细胞进行分析,避免了扩大单细胞克隆的要求。然而,在类器官中进行基因编辑时,CRISPR/Cas9 诱导的 NHEJ 效率不如在 2D 细胞系中高,因此编辑后需要对单个克隆进行验证,以确保靶向需求的准确性^[35]。

2.2 编辑基因的递送方式

在进行基因编辑时,也需要慎重考虑采用何种方式将基因精准地运送至目标细胞,进而实现最佳的转染效率。目前用于类器官编辑基因递送的方式主要有两种:病毒法(如逆转录病毒、慢病毒和腺病毒)和非病毒方法(如电穿孔和脂质体感染)。

逆转录病毒和慢病毒转染利用病毒的感染机制来稳定整合外源基因序列,使其表达可以持续传递给后代。然而,逆转录病毒需要宿主细胞处于分裂状态才能将遗传信息整合到基因组中,因此无法感染终末分化和非分裂的细胞。此外,逆转录病毒感染需要高病毒滴度,可能引起免疫反应,从而降低基因组整合的效率。相比之下,慢病毒具有规避此限制的适应性,因此常用于难以感染的细胞,如免疫细胞或非分裂细胞^[36]。然而,慢病毒方法的实验周期长以及构建过程复杂,载体本身存在的致病性和生物安全性问题,并且可能导致宿主基因突变。另一种方法是腺病毒转染,它通过转染后保持为表位体,从而避免了永久整合,适用于分裂和非分裂细胞。腺病毒转染还可以轻松生成高病毒滴度,以实现更高水平的转基因表达。然而,由于缺乏基因组整合,引入的基因可能在宿主细胞分裂过程中丢失^[34]。

在选择病毒颗粒作为基因编辑的载体时,由于 Matrigel 作为类器官营养支持和结构支撑,对类器官的存活不可或缺^[35],但病毒颗粒却无法穿过 Matrigel。因此,如何让病毒在成功感染类器官的同时又不影响其存活成为了一大挑战。目前常用方法是使用 TrypLE Express 消化液将类器官解离成单细胞,然后与病毒颗粒混合^[36]。混合后在 37 ℃ 的二氧化碳培养箱中培养 6 h,随后将类器官包埋在 30 μ L 的 Matrigel 中,再覆盖培养基。但这样的感染过程涉及到对类器官的多次离心,可能导致类器官细胞活性的降低。为了避免细胞的二次损耗,有研究提出将类器官和慢病毒混合液直接平铺在 Matrigel 上孵育过夜^[37]。于第 2 天,吸除含死细胞的培养基,再次覆盖 Matrigel,覆盖底部附着的细胞,Matrigel 凝固后添加培养基。

在非病毒载体中,脂质转染利用 Lipofectamine 或相关脂质分子形成脂质体,封装 DNA 并将其引入细胞。这种方法相对简单,通常对多数细胞有效,但转基因表达通常是短暂的,且其转染效率相对较低。相比之下,电穿孔技术会比脂质体的转染效率高 30% ~ 70%^[38],但电穿孔需要相对昂贵的设备和广泛的实验,且可能会对类器官造成不可逆的损伤。

此外,在对类器官进行电穿孔时,是否需要将类器官解离成单个细胞需要考虑细胞的类型。最近一项研究发现,对单个完整的肝导管类器官不需要消化直接进行电穿孔就可以确保细胞的存活^[39]。但与之不同,肝细胞类器官由于具有致密的结构,通常需要将类器官制备成单细胞悬浮液才能进行有效转染。但同时,需要注意的是,过度解离可能会限制类器官从单细胞到重新聚团的能力。

3 基因编辑技术在肿瘤类器官的应用

3.1 靶向肿瘤的发生发展

肿瘤发生是基因突变累积的动态过程^[9]。利用基因组工程技术改造的肿瘤类器官模型,因其三维结构与细胞异质性特征,能够精准模拟正常-癌变转化过程中转录调控网络的时序性演变。通过将 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术整合到人类 iPSCs、ESCs 及 ASCs 来源的类器官体系,研究者可系统解析未转化细胞与转化细胞间的互作机制,并动态追踪早期分子事件如何驱动恶性转化。

针对结直肠癌的多阶段演进,DROST 等^[40]通过 CRISPR/Cas9 在肠道类器官中依次引入 APC、P53、KRAS 和 SMAD4 突变,首次建立了体外模拟“腺瘤-癌序列”的类器官模型。该模型不仅再现了 APC/P53 共缺失诱导的染色体不稳定性 and 异倍体演化过程,更重要的是通过类器官的传代培养系统,动态捕捉到突变累积与肿瘤恶性表型间的定量关系。类似地,MATANO 等^[41]在肠上皮类器官中同步编辑 APC、P53、KRAS、SMAD4 及 PIK3CA 基因,发现染色体不稳定性是类器官突破基底膜侵袭的关键节点,这一发现得益于类器官微环境中细胞-基质互作的精确模拟。

在脑肿瘤研究中,BIAN 等^[42]基于脑类器官模型构建了人类中枢神经系统原始神经外胚层肿瘤 (central nervous system primitive neuroectodermal tumor, CNS-PNET) 病理模型。通过 CRISPR-Cas9 特异性过表达 MYC 致癌基因,成功诱导类器官产生与 CNS-PNET 高度一致的组织病理特征、细胞异质性和转录组特征。值得注意的是,该研究利

用脑类器官的发育可塑性,证实仅 *MYC* 单基因异常即可在脑类器官中快速诱发 CNS-PNET 样病变,而传统动物模型则需要联合 *P53* 缺失等额外突变且耗时更长,这凸显了类器官在单因素致癌机制中的独特价值。

肿瘤类器官的基因编辑平台还拓展至多种癌种的关键驱动突变研究^[43-45]。例如,GEURTS 等^[46]采用 CRISPR 碱基编辑器在 ASCs 源性类器官中引入组织特异性突变:在肝类器官中构建 *CTNNB1* 突变模拟肝癌起始,在子宫内膜类器官中敲除 *PTEN* (Q245/R130 位点)再现内膜癌早期病变。这种基于类器官的靶向编辑策略,能够保留组织特异性微环境对突变表型的影响,从而更真实地揭示 *PTEN* 缺失诱发癌变的微环境依赖性机制。

上述研究表明,肿瘤类器官与基因编辑技术的协同应用具有双重优势:一方面,类器官的三维结构为基因突变的表型表达提供了近似体内的微环境;另一方面,基因编辑使研究者能在类器官中精确重构肿瘤发生的时间与空间维度。这种结合不仅建立了从突变累积到临床表型转化的可调控研究体系,更重要的是为肿瘤发生机制研究和个体化治疗策略开发开辟了新途径。

3.2 靶向癌基因

类器官作为肿瘤研究的临床前模型,其三维结构允许观察基因编辑后细胞极性改变、侵袭伪足形成等表型,为解析基因突变在肿瘤演进中的作用提供了独特平台。TONELLI 等^[47]利用胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 类器官模型,发现转录因子 *SPDEF* 通过调控粘液分泌相关基因 (*AGR2*、*ERN2/IRE1 β*) 驱动肿瘤进展。研究通过在小鼠 PDAC 类器官中敲低 *SPDEF*,在三维环境中观察到肿瘤从粘液分泌型向基底样的转化,并证实其生长抑制效应。这种亚型转化的动态过程在传统二维细胞系中难以捕捉,凸显了类器官在模拟肿瘤可塑性方面的优势。

ROE 等^[48]基于 PDAC 类器官培养模型,该模型保留了正常、胰腺上皮内瘤变、肿瘤和转移病灶的独特生物学特征。通过对比原发灶与转移灶类器官的转录组特征,发现转移性肿瘤中增强子活性的重塑依赖于先驱因子 *FOXA1*,揭示

FOXA1 驱动的增强子重编程可激活胚胎前肠内胚层转录程序,进而促进类器官在侵袭实验中表现出更强的迁移能力。

转录共激活因子 *YAP1* 是 *Hippo* 通路的下游效应器,它能调节组织稳态、器官大小、再生和肿瘤发生^[49]。多种肿瘤细胞的增殖和存活发生都依赖于 *YAP1* 的持续表达,但相应的分子基础并不十分清楚。为了找出能在功能上替代 *YAP1* 的基因,KIM 等^[50]分别利用 *APC* 野生型 (*APC* wild-type, *APC* WT) 和 *APC* 基因敲除型 (*APC* knockout, *APC* KO) 小鼠建立了结肠癌类器官模型。发现 *Hippo* 通路效应因子 *YAP1* 的缺失可激活 *PRDM14-CALM2/SLC2A1* 代谢代偿轴。研究利用类器官的长期传代能力,动态追踪了 *YAP1* 抑制后葡萄糖转运通路的重编程过程,并证实 *PRDM14* 是 *YAP1* 驱动诱发肿瘤的治疗靶点。

上述研究展示了类器官结合基因编辑技术在类器官中精准模拟致癌基因的动态调控,并直接观察其对肿瘤生物学行为的影响,为生物医学机制研究提供了一种创新的工具。

3.3 靶向耐药基因

基因突变常与耐药性有关,而类器官的敏感性与其突变谱之间存在一定的关联。通过对类器官进行靶向测序,可以揭示与特定基因区域相关的突变,进而结合基因编辑技术可筛选出与耐药相关的关键基因^[51]。

BOOS 等^[52]通过从原发性和肝转移性结直肠癌患者构建类器官,并用典型的一线联合治疗^[53],FOLFIRI (亚叶酸、5-氟尿嘧啶、伊立替康) 联合西妥昔单抗 (cetuximab, Cmax) 处理,构建化疗耐受的类器官模型。使用 CRISPR/Cas9 技术,将 *KRASG12D* 突变通过电穿孔导入化疗耐受的结肠癌类器官中,结果显示 *KRASG12D* 突变使类器官对 FOLFIRI/Cmax 的耐药性增强。而 G2/M 检查点激酶 *AURKA* 可以降低 *KRAS* 突变体 FOLFIRI/Cmax 耐药类器官的细胞活力并引发细胞凋亡。数据表明,*AURKA* 是 *KRAS* 突变型结直肠癌的一个很有前景的治疗靶点。

另一项研究通过比较不同模型间的染色质可及性差异,筛选出影响药物敏感性的靶基因。XIANG 等^[54]建立了匹配的结直肠癌类器官、PDX 以及类器官衍生的异种移植瘤 (patient-derived

organoids xenografts, PDOX)。通过 ATAC-seq 和 RNA-seq 技术,发现相对于类器官,*KLF14* 和 *EGR2* 的表达在 PDOX 中更为富集。此外,*EPHA4* 作为 *KLF14* 和 *EGR2* 的共同下游靶基因,可能通过染色体重塑影响靶向药物的敏感性和耐药性。为了进一步探究 *KLF14* 和 *EGR2* 介导的 *EPHA4* 染色体重塑如何影响药物敏感性,作者在类器官中敲除了 *EPHA4*,发现其导致 *pERK1/2* 水平降低;相反,过表达 *EPHA4* 则导致 *pERK1/2* 水平升高。作者进一步使用类器官对 147 种 FDA 批准的抗癌化合物进行筛选,结果显示 *EPHA4* 会显著影响类器官对这些药物的反应。综上所述,*KLF14* 和 *EGR2* 的不同结合模式及其调控下游 *EPHA4* 的表达水平,可能在药物治疗中扮演关键角色,影响肿瘤细胞的药物敏感性。

总体而言,通过对类器官在耐药和敏感状态下的基因组、转录组和蛋白组的数据分析,人们能够识别出与药物耐药性相关的生物标志物,这有助于深入了解耐药的发生机制。此外,通过这种分析,可以探讨有效的应对策略,并针对耐药机制制定改进的治疗方案。最终,这些研究成果将有助于早期预测患者对特定治疗的反应,提高个体化医疗的精准性,从而优化治疗效果并减少不必要的副作用。

3.4 靶向药物研发与筛选

在类器官技术出现之前,细胞系和动物模型是药物筛选和研发的主要平台,但这两者都有显著的局限性。细胞系因其高效的时间和成本效益而受到关注,然而许多细胞系源自肿瘤或经过永生化处理,因此其基因表达谱与人类细胞存在差异。尽管动物模型在评估药物的疗效和安全性方面发挥了重要作用,但其长久的时间和高昂的经济成本以及伦理问题限制了其广泛应用。类器官技术的引入显著解决了细胞系和动物模型在预测人体临床试验结果时所面临的挑战,从而加快了药物开发进程,节约了资源。结合基因编辑技术,类器官作为药物测试的预测模型,能够更全面地模拟人类肿瘤的复杂性,并预测正常器官中的药物毒性反应,适用于大规模高通量药物筛选和开发。

ZHAO 等^[55]从胃癌患者的肿瘤组织中建立了 57 例患者来源的类器官,将其暴露于不同的化

疗药物中,包括 5-氟尿嘧啶和奥沙利铂等,分为 5-氟尿嘧啶敏感和耐药,奥沙利铂敏感和耐药的类器官。通过基因表达分析,发现了一些在 5-氟尿嘧啶敏感和耐药类器官中差异表达的基因,如 *MSMB* 和 *S1PR4* 等。敲除这些敏感基因会导致 PDOs 对 5-氟尿嘧啶的敏感性降低。同样,也鉴定出了一些在奥沙利铂敏感和耐药类器官中差异表达的基因,如 *MYO1A* 和 *NDUFA4L2* 等。该研究结果为胃癌的个性化治疗提供了重要的依据。通过分析患者肿瘤组织中的基因表达特征,可以确定患者对不同化疗药物的敏感性,从而选择最适合患者的治疗方案。并针对一些关键的信号通路和基因靶点,开发新的抗癌药物。

TAKEDA 等^[56]在小鼠结肠癌类器官中应用 CRISPR/Cas9 技术进行筛选和验证,研究发现了结直肠癌中新型的肿瘤抑制因子,包括 *Activins* (*Acr1b*, *Acr2a*) 和染色体重塑因子 *Arid2*,并确定了 *TP53* 是导致结直肠癌转移的候选基因。

利用类器官对肿瘤组织结构和功能的高度模拟,将高通量筛选与类器官技术相结合能够加速药物研发过程,缩短新药推向市场的时间,推动药物筛选和个性化治疗的快速发展。

4 总结和展望

肿瘤类器官与基因编辑技术的结合为肿瘤研究提供了前所未有的精准工具^[57],极大推动了肿瘤发生机制、药物筛选及个体化治疗的发展。通过 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术,研究者能够在类器官中精确模拟肿瘤的遗传异质性,动态追踪突变累积与表型演化的关联,并揭示耐药机制与潜在治疗靶点。然而,当前研究仍面临以下关键挑战:

首先,现有类器官多局限于上皮细胞,缺乏免疫细胞、血管系统及基质成分的整合,难以全面模拟肿瘤微环境的复杂性。尽管类器官芯片 (organoid-on-a-chip) 通过微流控系统实现了营养梯度和机械应力的调控,但血管化仍是技术难点^[58-59]。此外,通过共培养各种细胞 (包括癌细胞和其他辅助细胞,如基质细胞、血管细胞和免疫细胞) 来创造更完整类器官的方法仍在完善中^[60-61]。其次,类器官培养和基因编辑流程的标准化程度低,导致实验结果可重复性低。长期传

代中基因组的不稳定性可能引入额外突变,影响模型的临床预测价值,这一问题在高通量药物筛选中尤为突出^[62]。故必须建立国际统一的类器官培养与基因编辑操作指南,引入自动化培养系统以提高效率与一致性。再者,CRISPR/Cas9 的脱靶效应、递送系统对类器官结构的破坏,以及病毒载体的潜在生物安全性问题,限制了技术的临床应用。目前多数研究停留于基础阶段,如何将基因编辑类器官转化为临床诊断工具或治疗决策支持系统仍待突破。最后,需要促进多学科交叉融合,例如合成成像技术^[63]、人工智能^[64]、纳米医学^[65-66]等前沿技术与类器官平台的协同应用。

基因编辑肿瘤类器官,正逐步打破传统模型的局限。未来,通过技术革新与跨学科协作,这一平台有望在精准医学、药物开发及肿瘤生物学研究中发挥更核心的作用。

参 考 文 献 (References)

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] MEI J, LIU X, TIAN H X, et al. Tumour organoids and assembloids: patient-derived cancer avatars for immunotherapy [J]. Clin Transl Med, 2024, 14(4): e1656.
- [3] SAĞRAÇ D, ŞİŞLİ H B, ŞENKAL S, et al. Organoids in tissue transplantation [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1347: 45-64.
- [4] BROOKS A, LIANG X, ZHANG Y, et al. Liver organoid as a 3D *in vitro* model for drug validation and toxicity assessment [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105608.
- [5] 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.
- [6] YOSHIDA G J. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 4.
- [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] LI Y, GAO X, NI C, et al. The application of patient-derived organoid in the research of lung cancer [J]. Cell Oncol (Dordr), 2023, 46(3): 503-519.
- [9] SUN Y, DING Q. Genome engineering of stem cell organoids for disease modeling [J]. Protein Cell, 2017, 8(5): 315-327.
- [10] CHAI C, JI P, XU H, et al. Targeting cancer drug resistance utilizing organoid technology [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114098.
- [11] KIM J, KOO B K, KNOBLICH J A. Human organoids: model systems for human biology and medicine [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(10): 571-584.
- [12] DRIEHUIS E, KRETZSCHMAR K, CLEVERS H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications [J]. Nat Protoc, 2020, 15(10): 3380-3409.
- [13] CHO J, LEE H, RAH W, et al. From engineered heart tissue to cardiac organoid [J]. Theranostics, 2022, 12(6): 2758-2772.
- [14] GOTO N, WESTCOTT P M K, GOTO S, et al. SOX17 enables immune evasion of early colorectal adenomas and cancers [J]. Nature, 2024, 627(8004): 636-645.
- [15] SCHUTGENS F, CLEVERS H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 211-234.
- [16] VAN DER VAART J, BOSMANS L, SIJBESMA S F, et al. Adult mouse and human organoids derived from thyroid follicular cells and modeling of Graves' hyperthyroidism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(51): e2117017118.
- [17] MESSINA A, LUCE E, HUSSEIN M, et al. Pluripotent-stem-cell-derived hepatic cells: hepatocytes and organoids for liver therapy and regeneration [J]. Cells, 2020, 9(2): 420.
- [18] BREUNIG M, MERKLE J, WAGNER M, et al. Modeling plasticity and dysplasia of pancreatic ductal organoids derived from human pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(6): 1105-1124.
- [19] WEN J, LIU F, CHENG Q, et al. Applications of organoid technology to brain tumors [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(10): 2725-2743.
- [20] CSÖBÖNYEIOVÁ M, KLEIN M, KUNIAKOVÁ M, et al. Induced pluripotent stem cell-derived organoids: their implication in COVID-19 modeling [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3459.
- [21] PARTE S, KAUR A B, NIMMAKAYALA R K, et al. Cancer-associated fibroblast induces acinar-to-ductal cell transdifferentiation and pancreatic cancer initiation *via* LAMA5/ITGA4 axis [J]. Gastroenterology, 2024, 166(5): 842-858.
- [22] SU X A, STOPSACK K H, SCHMIDT D R, et al. *RAD21* promotes oncogenesis and lethal progression of prostate cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(36): e2405543121.
- [23] WANG H M, ZHANG C Y, PENG K C, et al. Using

- patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: a real-world study [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(2): 100911.
- [24] HUO C, ZHANG X, GU Y, et al. Organoids: construction and application in gastric cancer [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5): 875.
- [25] HOSSEINI S A, SALEHIFARD JOUNEGHANI A, GHATREHSAMANI M, et al. CRISPR/Cas9 as precision and high-throughput genetic engineering tools in gastrointestinal cancer research and therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 223: 732–754.
- [26] ZHOU H, YE P, XIONG W, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 screening in stem cells: theories, applications and challenges [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 218.
- [27] RAMAKRISHNA G, BABU P E, SINGH R, et al. Application of CRISPR-Cas9 based gene editing to study the pathogenesis of colon and liver cancer using organoids [J]. *Hepatol Int*, 2021, 15(6): 1309–1317.
- [28] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [29] NIE J, HASHINO E. Organoid technologies meet genome engineering [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(3): 367–376.
- [30] DRIEHUIS E, CLEVERS H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(3): G257–G265.
- [31] BORESTRÖM C, JONEBRING A, GUO J, et al. A CRISPR (e) R view on kidney organoids allows generation of an induced pluripotent stem cell-derived kidney model for drug discovery [J]. *Kidney Int*, 2018, 94(6): 1099–1110.
- [32] SONG T, KONG B, LIU R, et al. Bioengineering approaches for the pancreatic tumor organoids research and application [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(1): e2300984.
- [33] HENDRIKS D, CLEVERS H, ARTEGIANI B. CRISPR-cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(5): 705–731.
- [34] WANG L, YE Z, JANG Y Y. Convergence of human pluripotent stem cell, organoid, and genome editing technologies [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(7): 861–875.
- [35] MENCHE C, FARIN H F. Strategies for genetic manipulation of adult stem cell-derived organoids [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(10): 1483–1494.
- [36] 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.
- [37] LIN S C, HAGA K, ZENG X L, et al. Generation of CRISPR-Cas9-mediated genetic knockout human intestinal tissue-derived enteroid lines by lentivirus transduction and single-cell cloning [J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(4): 1004–1027.
- [38] MARU Y, ORIHASHI K, HIPPO Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 13–21.
- [39] HENDRIKS D, ARTEGIANI B, HU H, et al. Establishment of human fetal hepatocyte organoids and CRISPR-Cas9-based gene knockin and knockout in organoid cultures from human liver [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(1): 182–217.
- [40] DROST J, VAN JAARSVELD R H, PONSIOEN B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells [J]. *Nature*, 2015, 521(7550): 43–47.
- [41] MATANO M, DATE S, SHIMOKAWA M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256–262.
- [42] BIAN S, REPIC M, GUO Z, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(8): 631–639.
- [43] YAN H H N, CHAN A S, LAI F P, et al. Organoid cultures for cancer modeling [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(7): 917–937.
- [44] YUCER N, AHDOOT R, WORKMAN M J, et al. Human iPSC-derived fallopian tube organoids with BRCA1 mutation recapitulate early-stage carcinogenesis [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(13): 110146.
- [45] LEE B C H, ROBINSON P S, COORENS T H H, et al. Mutational landscape of normal epithelial cells in Lynch Syndrome patients [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2710.
- [46] GEURTS M H, GANDHI S, BORETTO M G, et al. One-step generation of tumor models by base editor multiplexing in adult stem cell-derived organoids [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4998.
- [47] TONELLI C, YORDANOV G N, HAO Y, et al. A mucus production programme promotes classical pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Gut*, 2024, 73(6): 941–954.
- [48] ROE J S, HWANG C I, SOMERVILLE T D D, et al. Enhancer reprogramming promotes pancreatic cancer metastasis [J]. *Cell*, 2017, 170(5): 875–888.
- [49] CHEUNG P, XIOL J, DILL M T, et al. Regenerative reprogramming of the intestinal stem cell state via hippo signaling suppresses metastatic colorectal cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 590–604.
- [50] KIM M, LY S H, XIE Y, et al. YAP1 and PRDM14 converge to promote cell survival and tumorigenesis [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(2): 212–227.

- [51] XIANG D, HE A, ZHOU R, et al. Building consensus on the application of organoid-based drug sensitivity testing in cancer precision medicine and drug development [J]. *Theranostics*, 2024, 14(8): 3300–3316.
- [52] BOOS S L, LOEVENICH L P, VOSBERG S, et al. Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(2): 517–540.
- [53] MZOUGH S, SCHWARZ M, WANG X, et al. Oncofetal reprogramming drives phenotypic plasticity in WNT-dependent colorectal cancer [J]. *Nat Genet*, 2025, 57(2): 402–412.
- [54] XIANG K, WANG E, MANTYH J, et al. Chromatin remodeling in patient-derived colorectal cancer models [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(16): e2303379.
- [55] ZHAO Y, LI S, ZHU L, et al. Personalized drug screening using patient-derived organoid and its clinical relevance in gastric cancer [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(7): 101627.
- [56] TAKEDA H, KATAOKA S, NAKAYAMA M, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(31): 15635–15644.
- [57] 李鹏, 黄敏丽, 谭邓旭, 等. 胰腺癌类器官模型的构建与应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(6): 40–46.
- LI P, HUANG M L, TAN D X, et al. Construction and application of patient-derived pancreatic tumor organoid model [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(6): 40–46.
- [58] DUZAGAC F, SAORIN G, MEMEO L, et al. Microfluidic organoids-on-a-chip: quantum leap in cancer research [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4): 737.
- [59] ZHANG J, TAVAKOLI H, MA L, et al. Immunotherapy discovery on tumor organoid-on-a-chip platforms that recapitulate the tumor microenvironment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 187: 114365.
- [60] ZHOU Z, CONG L, CONG X. Patient-derived organoids in precision medicine: drug screening, organoid-on-a-chip and living organoid biobank [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 762184.
- [61] HOFER M, LUTOLF M P. Engineering organoids [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(5): 402–420.
- [62] CHEN L, WEI X, GU D, et al. Human liver cancer organoids: biological applications, current challenges, and prospects in hepatoma therapy [J]. *Cancer Lett*, 2023, 555: 216048.
- [63] PICCA F, GIANNOTTA C, TAO J, et al. From cancer to immune organoids: innovative preclinical models to dissect the crosstalk between cancer cells and the tumor microenvironment [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19): 10823.
- [64] WANG F, SONG P, WANG J, et al. Organoid bioinks: construction and application [J]. *Biofabrication*, 2024, 16(3): 032006.
- [65] SUN Y, CHATTERJEE S, LIAN X, et al. *In vivo* editing of lung stem cells for durable gene correction in mice [J]. *Science*, 2024, 384(6701): 1196–1202.
- [66] TRIVEDI P, LIU R, BI H, et al. 3D modeling of epithelial tumors-the synergy between materials engineering, 3D bioprinting, high-content imaging, and nanotechnology [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6225.

[收稿日期] 2024-07-10