

ICS 11.100

CCS C 04



团 体 标 准

T/CRHA 018 —2023

人肝胆肿瘤细胞类器官构建、质量控制与 保藏操作指南

Guidelines for the establishment, quality control and storage
of Human hepatobiliary tumor organoids

2023-07-14 发布

2023-08-01 实施

中国研究型医院学会 发 布

目 次

前言..... II

引言..... III

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 缩略语..... 3

5 基本原则..... 4

6 操作流程与方法..... 5

7 检测指标与检测方法..... 8

附录 A（资料性）肝胆肿瘤类器官培养用试剂材料与操作技术要点..... 10

附录 B（资料性）短串联重复序列（STR）检测..... 13

附录 C（资料性）染色体核型检测..... 14

附录 D（资料性）肝胆肿瘤类器官鉴定..... 15

附录 E（资料性）标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法..... 17

参考文献..... 19

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第一部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

本文件由中国研究型医院学会肝胆胰外科专业委员会提出。

本文件由中国研究型医院学会归口。

本文件起草单位：清华大学附属北京清华长庚医院、中国食品药品检定研究院、中国计量科学研究院、中国医学科学院药物研究所、中国科学院上海药物研究所、上海美迪西生物医药股份有限公司。

本文件主要起草人：王韞芳、李迪、陈昱安、刁金美、耿兴超、王晶、傅博强、强桂芬、潘国宇、彭双清、李桦。

引 言

类器官（organoids）是具有器官关键性特征的三维（3D）细胞培养物，它包括一个自我更新干细胞群，可分化为多个器官特异性的细胞类型，与相对应的器官拥有类似的空间组织并能够重现对应器官的部分功能，从而提供一个高度生理相关系统。类器官与传统模型相比，具备细胞增殖分化、自我更新、自组装、可长期培养、遗传稳定性等特点，因此可以模拟体内器官发育和病理过程，是一种可用来开发模拟人类疾病的更好模型，和高效、低成本、精准的药筛平台。

作为近 10 年来生物学界和临床医学最热门的前沿技术之一，类器官技术取得突飞猛进的发展，人体各个器官均有其类器官建立的报道，同样肝脏肿瘤类器官的建立及应用也是研究的热点。肝胆肿瘤类器官培养起始细胞来自于肝癌，胆管癌，胆囊癌，胰腺癌患者的肿瘤细胞，包括手术中切取的原代肿瘤组织、原代穿刺组织原代肝脏组织等，由于人肝胆肿瘤组织的来源可能涉及的风险和伦理敏感性，运送的冷链保持，类器官建立所涉及的原代细胞分离、培养、扩增、冻存、复苏、质量控制、功能分析检测等具体试验操作的标准规范，以及整个过程中的污染控制，都体现了肝脏类器官建立及检测方案的多样性、复杂性和特殊性。

鉴于此，制定人肝胆肿瘤细胞类器官的构建、保藏及检测应遵循的技术通用要求，有助于规范人肝脏肿瘤细胞类器官的研究、开发与评价，从而推动肝脏肿瘤细胞类器官在基础医学和临床研究(包括肝脏生理稳态的研究、疾病模型的建立、药物的筛选、基因治疗和器官芯片的研发等)应用中的发展。

人肝胆肿瘤类器官构建、质量控制与保藏操作指南

1 范围

本文件提供了肝胆肿瘤类器官构建、质量控制与保藏的基本原则、操作流程方法以及检测指标与检测方法的指导与建议。

本文件适用于肝胆肿瘤细胞类器官的培养、传代、冻存、复苏、质量控制与保藏过程。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 37864—2019 生物样本库质量和能力通用要求（ISO 20387:2018）

GB/T 38736—2020 人类生物样本保藏伦理要求

GB/T 42060—2022 医学实验室样品采集、运送、接收和处理指南（ISO/TS 20658:2017）

WS 233—2017 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS 213—2018 丙型肝炎诊断

WS/T 299—2022 乙型病毒性肝炎诊断标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

类器官 organoids

类器官是干细胞、前体细胞和/或分化细胞通过细胞-细胞间以及细胞-基质间的互动而自发组织形成的体外三维结构，能在多个方面再现体内相应组织或器官的结构与功能。

3.2

患者来源肝胆肿瘤类器官 patient derived hepatobiliary tumor organoid

由病理诊断为肝胆肿瘤患者自体肿瘤组织或细胞样本中提取的肿瘤细胞，通过3D培养形成的，可以在体外扩增并重现原始肿瘤的病理形态和遗传特征类器官。

3.3

肝胆肿瘤类器官培养基 culture medium for human hepatobiliary tumor organoids

可以实现体外模拟肝胆肿瘤细胞生长及扩增所需微环境，能诱导肝胆肿瘤细胞长期体外扩增培养，维持原始肿瘤细胞特性，实现体外肝胆肿瘤活组织类器官的长期存活的培养介质。

3.4

3D 培养基质胶 matrix

组成成分包括但不限于层粘连蛋白、IV型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白，添加物包括但不限于生长因子、小分子化合物和/或微量元素、激素。在室温条件下能够聚合形成具有生物学活性的三维基质，模拟体内细胞基底膜结构和功能，能够为肝脏肿瘤细胞的生长提供支架。

3.5

类器官传代 passage

将培养至一定大小、状态良好的类器官采用物理机械吹打或联合酶消化方法使其解离为小细胞团或单细胞悬液，再重新接种于与原培养条件相同的培养体系内，继续进行类器官培养。新一代类器官与原来类器官具有相同的形态功能特征。

3.6

类器官冻存 cryopreservation

将类器官解离成小细胞团或单细胞悬液后，加入冻存保护剂，通过程序降温最终置于-196℃液氮中低温保存，使其暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，在需要的时候能够通过复苏用于试验的过程。

3.7

类器官复苏 thawing

将处于深低温冻存的类器官取出恢复其继续生长状态的过程。

3.8

伦理审查委员会 ethics review committee

负责对科学研究中涉及伦理道德进行评估和审查的专门组织。

3.9

知情同意 informed consent

有自主判断能力的供体或其法定监护人，在获得并充分了解样本和数据捐赠相关信息之后，供体所受到的风险最小，且没有受到任何利诱或恐吓等不当行为影响的前提下，自愿自主的捐赠个人生物样本及其关联数据，并与采集者/收集者共同签署的文件。

注：知情同意书由采集者/收集者和被收集者共同签署，一式两份。正本由采集者/收集者保存，被

收集者保存副本。

[来源：GB/T38736—2020]

3.10

肿瘤细胞存活率 tumor cell viability

能够增殖、保持代谢活性、能形成肿瘤类器官的细胞比例。

3.11

环境污染 environmental contamination

从环境或其他细胞中引入多余的化学或生物物质。

[来源：WS 233—2017]

3.12

无菌技术 aseptic technology

在实验室，用于防止细胞、试剂、物料、人员受到微生物感染的操作。

[来源：WS 233—2017]

3.13

肿瘤细胞纯度 cell purity

具有相同生物学特性(如肿瘤细胞表面标志物、遗传多态性及生物学活性等)的肝胆肿瘤类器官占全部细胞的百分比。

3.14

生长因子 growth factors

促进特定细胞类型或谱系增殖和/或分化的重组细胞因子。某些生长因子可用于体内（例如，造血祖细胞的动员）或离体（例如，细胞扩增，疫苗开发和过继性细胞疗法）。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AFP	——	甲胎蛋白 (Alfa fetal protein)
ALB	——	白蛋白 (Albumin)
BSA	——	牛血清白蛋白 (Bovine serum Albumin)
CA19-9	——	碳水化合物抗原 19-9/癌症抗原 19-9 (Carbohydrate antigen 19-9)
CEA	——	癌胚抗原 (Carcinoembryonic antigen)
CK-19	——	细胞角蛋白 19 (Cytokeratin 19)
CYP3A4	——	细胞色素蛋白 P450 酶 (Cytochrome P450)

DMSO	——	二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide)
DNA	——	脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)
EpCAM	——	上皮细胞黏附蛋白 (Epithelial cell adhesion molecule)
FBS	——	胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)
GPC3	——	甘比聚糖 3 (Glypican 3)
GS	——	谷氨酰胺合酶 (Glutamine Synthetase)
HBV	——	乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)
HCV	——	丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)
H&E	——	苏木精-伊红 (Hematoxylin and eosin)
HNF4 α	——	肝细胞核因子 (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha)
HSP70	——	HSPA1A 热休克蛋白家族 A (Heat shock protein 70)
IDH 1/2	——	异柠檬酸脱氢酶(NADP(+)) 1/异柠檬酸脱氢酶(NADP(+)) 2 (Isocitrate Dehydrogenase 1/2)
IL-6	——	白细胞介素 6 (Interleukin-6)
Ki67	——	细胞增殖蛋白 或 “MKI67” (Marker of(Kiel-67))
LGR5	——	亮氨酸重复序列 G 蛋白偶联受体 5 (Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5)
MUC1	——	粘蛋白 19 (Mucin-1)
p53	——	肿瘤蛋白 p53 (Tumor protein 53)
PBS	——	磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Saline)
SOX9	——	核转录因子 (SRY-Box Transcription Factor 9)
STR	——	短串联重复序列 (Short tandem repeat)
TBX3	——	T-盒转录因子 3 (T-Box Transcription Factor)
ZO-1	——	紧密连接蛋白 (Zonal occludin 1)
PCR	——	聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction)

5 基本原则

5.1 签署知情同意

应在样本采集前获得类器官细胞源供者的书面的知情同意,明确供者和样本收集方双方的利益和责任,知情同意的要求应符合GB/T 38736—2020中5.3的要求。

5.2 伦理要求

人肝胆肿瘤细胞类器官的构建和研究方案应由伦理审查委员会审查通过。

5.3 隐私保护

类器官细胞源供者享有个人隐私权，其个人隐私信息的保密和保护应符合GB/T 38736—2020中6的要求。

6 操作流程与方法

6.1 肝胆肿瘤类器官构建

6.1.1 组织的获取和运送

手术获取肝胆肿瘤组织，体积约 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 。新鲜组织应在离体30 min内放进密封罐，加满含双抗的冰冷（4℃）无菌基础培养基或者其他合适的缓冲液在4℃恒温的低温条件下运送到实验室。对运输过程的记录符合GB/T 37864—2019中A.3、B.3条，宜记录的内容包括但不限于运送方式、运送过程中的温度，接收时温度或温度范围、运送起止时间和日期。

6.1.2 组织的处理

6.1.2.1 组织的清洗

在超净台中将肝胆肿瘤组织取出，用预冷的含 $1\times$ 双抗的PBS缓冲液震荡漂洗3次（超净台内手动摇晃培养皿10 s）。

6.1.2.2 组织的分离和消化

用手术刀片将漂洗后的肝胆肿瘤组织机械解离成 1 mm^3 大小的组织块，加入消化酶（含 1 mg/mL 的IV型胶原酶、 $30,000\text{ units/mL}$ 的DNase I的混合液） $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化30 min，预冷PBS缓冲液离心漂洗2次（ 1000 r/min , 3 min）终止消化。

6.1.2.3 细胞的过滤

离心后的细胞沉淀用1640培养基重悬后通过 $70\text{ }\mu\text{m}$ 的筛网去除胞外基质杂质。

6.1.3 肿瘤类器官培养

可采用机械加酶消化法将人肿瘤细胞分散为单个细胞悬液，再将肿瘤上皮细胞与基质胶混合后形成3D培养空间结构，加入适用于肝胆肿瘤上皮细胞生长的类器官扩增培养用融化好的胶轻轻重悬细胞，避免产生气泡，24孔板按照 $15\text{ }\mu\text{L/孔}\times 3$ 层，共 $45\text{ }\mu\text{L/孔}$ 。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 电热板放置3 min。待胶凝固后，补充培养基（提前 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热）。每三天更换一次生长培养基，原代肝肿瘤类器官生长周期约为10-14天左右。构建流程图见图1。

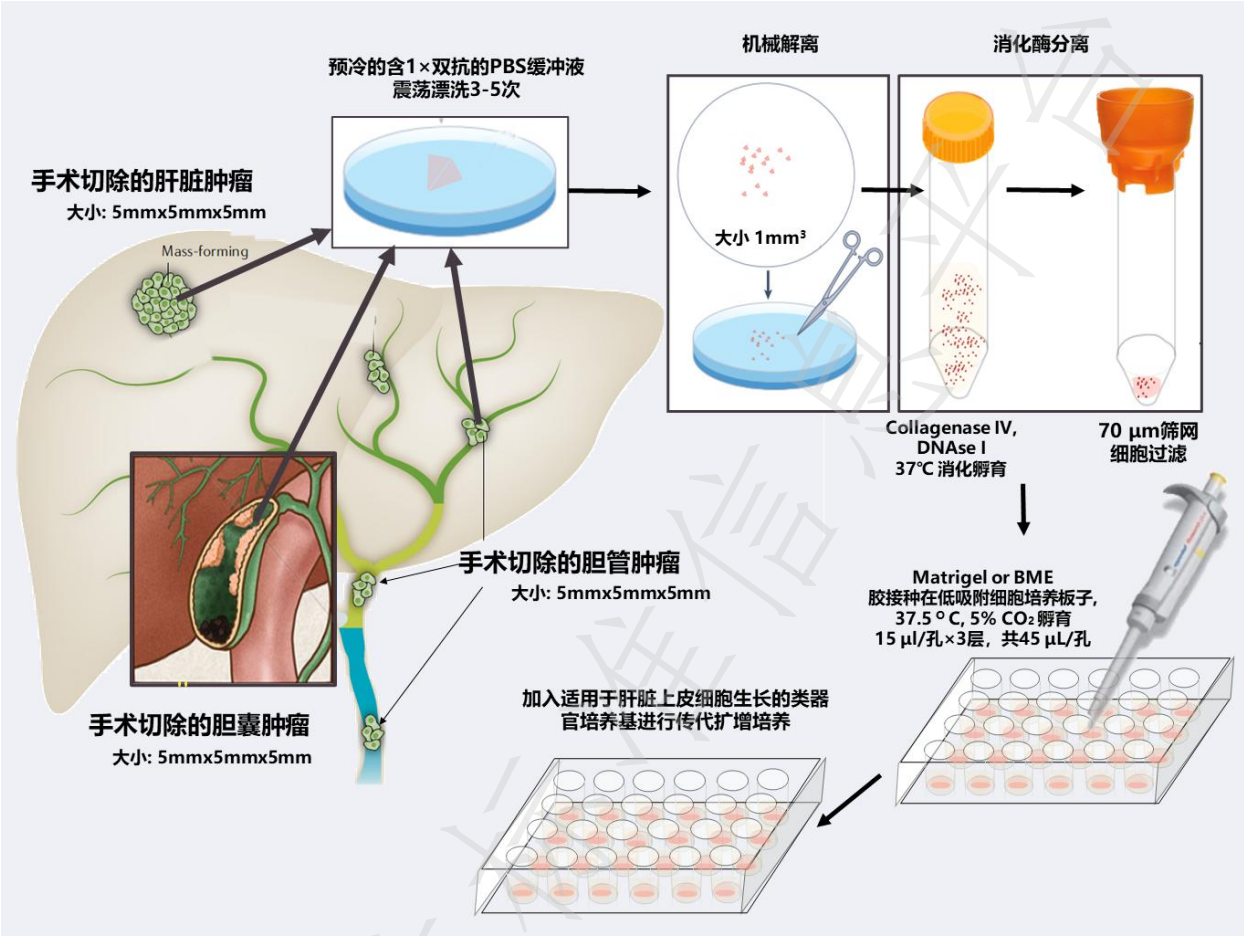


图 1 肝胆肿瘤类器官构建流程图

6.1.4 肿瘤类器官的传代与保藏

6.1.4.1 类器官传代

应选择合适的类器官进行科学试验或传代，一般为生长1周左右，饱满度达到80%左右，显微镜10×下可看到超过20个类器官，或者大小100-200 µm的类器官。肝胆肿瘤类器官构建过程中，培养传代简化流程见图2。

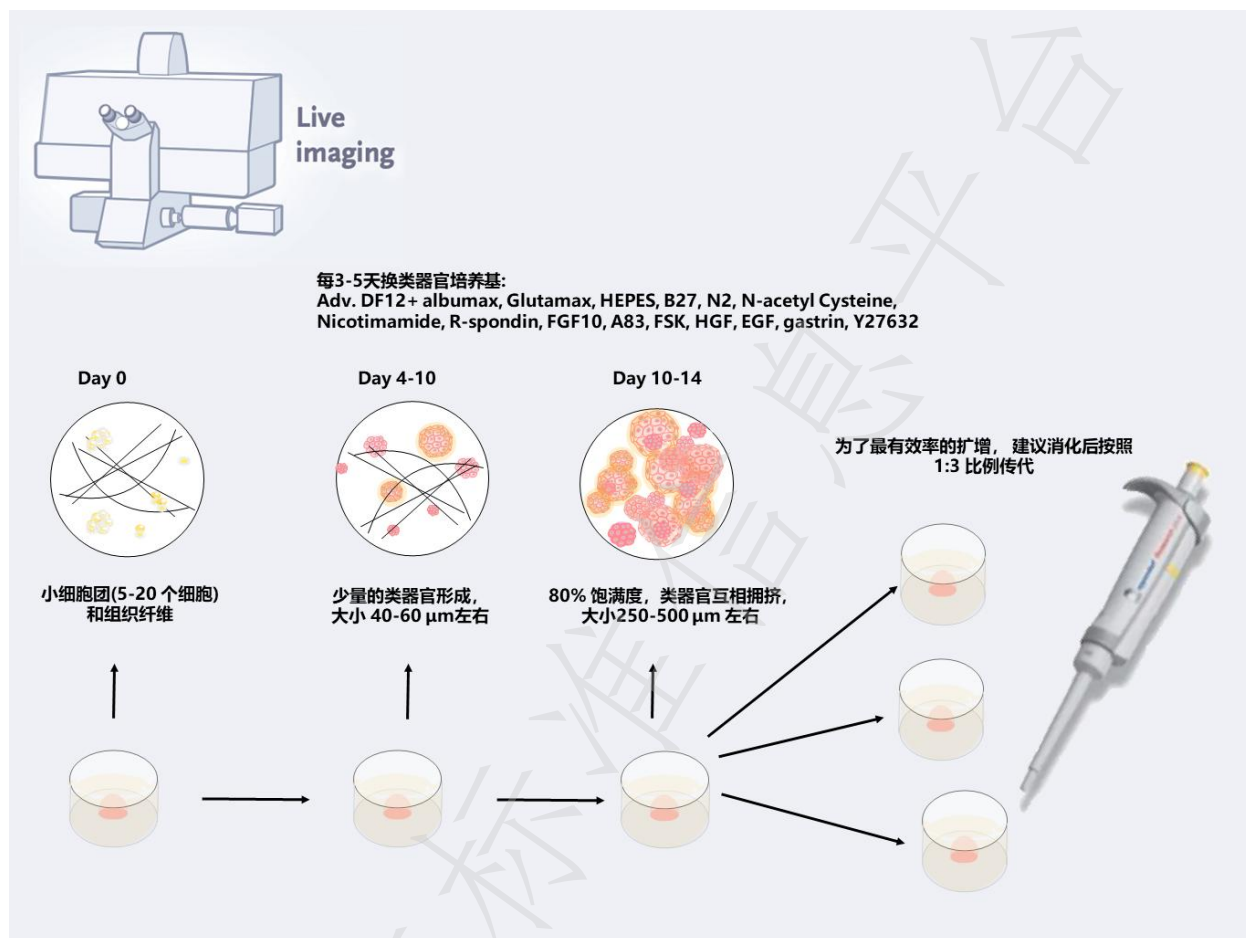


图 2 肝胆肿瘤类器官传代流程图

6.1.4.2 类器官冻存

暂不使用的类器官应进行按附录 A 处理, 加入冻存液后移入低温环境冻存。

6.1.4.3 类器官的复苏

类器官复苏遵循速融原则。使用 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴令其尽快融化, 选择合适的培养基进行培养、传代, 见附录 A。

6.2 废弃类器官处置

类器官构建和传代过程中产生的废弃物处置应符合国家或地方法规和标准规范要求, 符合 WS 233—2017 中 7.8 条规定, 对于不合格的或者污染的类器官细胞应遵循法律和实验室规定丢弃到指定地点, 最终处置应交由经当地环保部门资质认定的医疗废物处理单位集中处置。同时应由专人进行书面记录, 并存档。

6.3 操作注意事项

样本采集、运送、处理以及类器官的构建、传代、冻存、复苏等过程均应无菌操作, 以免污染。宜符合 GB/T 42060—2022 中附录 A 要求, 注意保持手卫生的时间点包括但不限于接触患者前、无菌操作前、体液暴露后、接触患者后、接触试验环境后、试验结束后。

7 检测指标与检测方法

编号	检测指标	指标描述	强 制 / 推 荐 检 测	检测方法
7.1	形态	光学显微镜下观察人肝胆肿瘤细胞类器官，应具备边缘清晰、透亮的状态。可看到类器官由多个细胞组合而成，呈现出致密球体囊状形态特征。为类球状或者圆管状，中间为空腔，外侧为紧密接触的柱状上皮细胞。空腔及与外界交界处的边缘清晰，细胞透亮。	强制	按照附录D检测。 参考文献[3]
7.2	体外可培养	从捐献者获得的人肝胆肿瘤组织，通过机械和消化酶联用的方法获得单细胞悬液，3D培养方式生成肝胆肿瘤细胞类器官后，可以在体外维持长期培养，且核型正常，传代10代以上。	强制	显微镜观察，消化后台盼蓝染色检测细胞活死，H&E 染色和 FFPE 组织病理切片对比
7.3	体外可重建	当类器官解离为 5-20 个细胞左右的小团块后，仍能进行体外重建成为新的类器官，新培养出的类器官与原来类器官具有相同的形态、细胞组成、细胞核型等特征。	强制	显微镜观察。 参考文献[14]
7.4	原代肿瘤细胞存活率	新复苏的类器官存活率不低于70%。且存活的类器官在体外可以进行连续传代培养。	强制	按照附录D检测。
7.5	染色体核型	正常核型应为46, XY或46, XX。	推荐	按照附录C检测。
7.6	标志基因表达	干性相关基因SOX9、EpCAM、LGR5等、增殖标志物Ki67、肝细胞标志物HNF4 α 、成熟肝细胞标志物ALB和CYP3A4等。肝胆癌细胞中：AFP，CA19-9，CK-19，CEA，GS，HSP70，TBX3，GPC3，MUC1，IL-6，IDH 1/2等	强制	基因表达按照附录 E 检测。 蛋白质表达按照附录D. 1. 2检测。
7.7	成瘤性	人源肝胆肿瘤类器官接种动物后在注射部位和（或）转移部位由接种细胞本身形成肿瘤的能力。即接种的细胞自身形成肿瘤的能力。	强制	按照《中华人民共和国药典（三部）》“附录2成瘤性检查法”项检测。
7.8	微生物	真菌、细菌、支原体、病毒等应为阴性。	强制	
7.8.1	细菌及真	真菌、细菌应为阴性。	强制	按照《中华人民共和国药典（四

	菌			部)》中“1101无菌检查法”项检测。
7.8.2	支原体	支原体应为阴性。	强制	按照《中华人民共和国药典(四部)》“3301支原体检测法”项检测。
7.8.3	外源病毒因子	外源病毒因子应为阴性。	强制	按照《中华人民共和国药典》中“3302外源病毒因子检查法”项检测。
7.8.4	HBV	HBV应为阴性。	强制	按照WS/T 299—2022核酸法检测。
7.8.5	HCV	HCV应为阴性。	强制	按照WS 213—2018核酸法检验。
7.9	STR	体外培养的组织器官,应进行STR检测及分型鉴定,无样品间的交叉污染。受检组织器官STR位点的基因分型数据与其对应的标准细胞系(其原始组织或衍生细胞系)STR基因分型数据进行比对,两者的匹配度应 $\geq 80\%$ 。	推荐	按照附录B检测。

附录 A (资料性)

肝胆肿瘤类器官培养用试剂材料与操作技术要点

A.1 主要试剂材料

A.1.1 培养基主要构成

表 A.1 肝胆肿瘤类器官培养基的主要成份表

中文名称	英文名称
基础培养基	Advanced DMEM/F12
谷氨酰胺	GlutaMAX
4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液	HEPES
青霉素/链霉素	penicillin/streptomycin
N-乙酰半胱氨酸	N-acetylcysteine
尼可酰胺	Niacinamide
无血清添加剂	B27
表皮生长因子	EGF
成纤维细胞生长因子10	FGF10
肝细胞生长因子	HGF
Wnt-3a重组蛋白	**Wnt-3a
胃泌素I	Gastrin I
R-Spondin1重组蛋白	**R-Spondin1
头蛋白	**Noggin
TGFβ抑制剂	A83-01
ROCK抑制剂*	Y-27632
地塞米松(诱导细胞增值)	**Dexamethasone
牛血清白蛋白	BSA
MDM2 抑制剂/p53激活剂	**Nutlin3a
**肿瘤培养可选不加或低浓度使用	

A.1.2 类器官培养3D支架材料

3D基质胶提取自基底膜的基质，主要由层粘连蛋白、IV型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等组成，还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。基质胶在室温条件下聚合形成具有生物学活性的三维支架，模拟体内细胞外基质的结构、组成、物理特性和功能。该结构不仅有利于体外细胞的培养和分化，而且能够为胃肠道上皮细胞的生长提供支架。基质胶在零度以下低温环境呈液态，故凡是涉及基质胶的试验操作皆应置冰盒操作。

A.1.3 组织消化酶

肝脏组织消化中涉及的消化酶主要有IV型胶原酶（Collagenase IV）与 DNase I。其作用是水解肝脏ECM中的胶原蛋白和细胞释放的核酸成分，从而使肝脏细胞从组织中充分分离出来，以利于制备为单细胞悬液。

A.1.4 类器官冻存液

类器官冻存液为无血清冻存液，一般宜含有10%的二甲基亚砜（DMSO）。

A.2 肝脏类器官培养操作要点

A.2.1 类器官污染的处置

肝胆肿瘤类器官培养过程中应定期观察、拍照，每3-5天更换一次类器官培养基。一般在第4-10天于倒置显微镜下可以观察到少量40-60 μm 的类器官小球，到第10-14天可观察到250-500 μm 的肝胆肿瘤类器官。定期观察有利于及时发现污染。如果在培养3天内出现基质胶浑浊，提示可能有霉菌和细菌污染，需及时采取丢弃处理。在类器官培养过程中也有可能出现支原体污染，被污染的类器官生长会变得缓慢，此时需进行支原体检测确认，若无法恢复类器官生长状态及时采取丢弃处理。

A.2.2 类器官培养物接种注意事项

将获取的细胞悬液与3D基质胶按照1:1混匀吹打，吹打过程中切忌产生大量气泡，以免影响后续培养物接种。24孔板可提前于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱预热30 min，以加速3D基质胶的凝固。

A.2.3 类器官传代注意事项

肝脏类器官可以连续传代超过10代或持续培养6个月以上。与类器官有关的试验研究宜在连续传代10代以内或者持续培养6个月内进行。

A.3 类器官冻存注意事项

冻存前每孔加入500 μL 的类器官收集液，将类器官吸至试管内，按照50 μL 胶加500 μL 的类器官收集液，置于冰上60 min，去除基质胶，离心清洗后，加入细胞消化酶 消化3-5 min，使其消化成单细胞悬液，1000 r/min离心5 min。弃上清后加入适量类器官冻存液混匀（1 mL左右），分装于500 μL 低温冻存管中，放入程序性冻存盒内于-80 $^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱过夜保存，次日将冻存管转移至液氮罐中长期保存。

A.4 类器官复苏注意事项

从液氮罐中取出的类器官冻存管要应快速放入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中令其尽快融化。吸出类器官冻存物移至15 mL无菌离心管中，再加入10倍体积的Advanced DMEM/F12培养基混匀。之后操作同前述的类器官传代培养过程。

附 录 B

(资料性)

短串联重复序列 (STR) 检测

STR检测流程详见图B.1，先提取细胞DNA，然后进行PCR扩增及测序，最后进行结果分析。



图B.1 STR检测流程

人源类器官STR鉴定结果判定标准：

受检类器官STR位点的基因分型数据与其对应的标准细胞系（其原始组织或衍生细胞系）STR基因分型数据进行比对：

- B.1 若两者的匹配度 $\geq 80\%$ ，则判定受检细胞系为标准细胞系或为标准细胞系的衍生细胞系。
- B.2 若两者的匹配度在 $56\%-80\%$ 之间，建议结合细胞系形态、细胞系特异性标记物等辅助分析进行综合判断。
- B.3 若两者的匹配度 $\leq 56\%$ ，则判定受检细胞样本与其对应的标准细胞系不相关。

附 录 C
(资料性)
染色体核型检测

C.1 试验当天保证细胞处于对数生长期, 一般一个6 cm的培养皿细胞长到80%的密度能做一次试验。

C.2将待测细胞从37 °C, 5% CO₂培养箱中拿出, 添加秋水仙素(终浓度为0.2 µg/mL), 摇匀后37 °C孵育1-2 h。

C.3等待的同时, 配制低渗溶液0.075M KCL(配制:8 mL无菌水+44.7 mg KCL), 放入37 °C水浴预热。孵育后的细胞用胰酶消化, 1200 r/min, 离心5 min, 收集于离心管中, 去除上清液, 用8 mL低渗液重悬, 打匀后放37 °C水浴箱40 min。

C.4加入新鲜配制的固定液(甲醇/冰乙酸=2/1~3/1)2 mL混匀, 室温下放10 min后, 1000 r/min离心10 min, 去上清液(留500 µL, 先将底部细胞吹匀), 新加入8 mL固定液, 1200 r/min, 离心10 min, 重复三次后, 滴片, 放入80 °C烘箱老化3 h。

C.5 再将烤干的玻片放入新鲜配制的胰酶(0.25%)中消化1 min(严格控制时间)后, 再放入吉姆萨染液中染色5-10 min(先用1片染5 min, 根据颜色调整后面的染色时间), 取出用流水冲去染液后, 在显微镜下观察结果。

附 录 D

(资料性)

肝胆肿瘤类器官鉴定

D.1 类器官形态学鉴定

D.1.1 显微镜下培养形态评估

将肝胆肿瘤类器官培养皿置于倒置显微镜下，在20倍视野下计数类器官数目。类器官数目不少于60个/视野表明类器官生长状态良好。生长活力好的类器官平均直径约为160-200 μm。若个别类器官体积过大（可达1000 μm）则提示类器官趋向衰老，应尽早传代，以防止衰老的类器官影响类器官传代。

D.1.2 肿瘤类器官的形态学及免疫标记鉴定

肝胆肿瘤组织或者肝胆肿瘤类器官成功构建后，通过制备冰冻切片或者石蜡包埋切片，进行苏木素/伊红染色（H&E）进行形态学鉴定，通过免疫荧光或者免疫组化染色进行生物标志物检测。肝细胞标志物HNF4α，干性细胞标志物SOX9、LGR5、EpCAM等，增殖标志物Ki67、肝细胞标志物HNF4α、成熟肝细胞标志物ALB和CYP3A4等，肝胆肿瘤标志物 AFP, CA19-9, CK-19, CEA, GS, HSP70, TBX3, GPC3, MUC1, IL-6, IDH-1/2等，紧密连接蛋白ZO-1。

同时进行类器官整体染色：培养大小约100-200um的类器官，加入类器官收集液，置于冰上放置1 h以溶解基质胶，预冷PBS漂洗类器官，低速离心（600 r/min）2次。加入0.125% Triton X-100破膜液，室温作用10 min，室温PBS漂洗3次后封闭用血清（10%二抗血清）封闭1 h。将类器官分别放置相应染色组别的共聚焦小室中，10%二抗血清作为配制一抗的稀释液，根据不同稀释比配制一抗抗体组合，滴加一抗，4℃孵育过夜后PBS漂洗3次。不同组别分别滴加各种荧光标记的二抗，室温避光作用1 h。PBS漂洗3次后加入DAPI衬核液，室温作用10 min后PBS漂洗3次。加入水性封片剂，避光湿盒保存，共聚焦显微镜下观察采集图像并三维重建类器官结构。

D.2 类器官存活率评估

D.2.1 肿瘤组织消化

肝脏肿瘤组织酶解后获得单细胞悬液，采用台盼蓝(Trypan blue)染色进行活细胞计数。将离心后的细胞沉淀用Advanced DMEM/F12培养基重悬（约100 μL），经吹打均匀后吸取18 μL置于1.5 mL的EP管，向EP（eppendorf）管中加入2 μL的0.4%的台盼蓝染液充分混匀，染色3 min，取10 μL细胞悬液加入血细胞计数板，在倒置显微镜10倍物镜下计数，分别计数四大格中未染成蓝色和染成蓝色的细胞总数。利用如下公式计算每100 μL体积中细胞总数和细胞存活率：

细胞总数按照公式D.1进行计算：

$$N_{总} = ((N_{活} + N_{死})/4) \times 10^3 \times 1.11 \times 100 \dots\dots\dots (D.1)$$

式中：

$N_{\text{总}}$ ：细胞总数；

$N_{\text{活}}$ ：未染成蓝色细胞数；

$N_{\text{死}}$ ：染成蓝色细胞数。

细胞存活率按照公式D.2进行计算：

$$X = N_{\text{活}} / (N_{\text{总}}) \times 100\% \dots\dots\dots (\text{D.2})$$

式中：

X ：细胞存活率；

$N_{\text{活}}$ ：未染成蓝色细胞数；

$N_{\text{总}}$ ：细胞总数。

注：活细胞比率应>90%可用于类器官细胞培养。

D.2.2 类器官传代及冻存复苏

类器官传代前、酶解为5-20个细胞的小细胞团后以及类器官复苏后，应使用D.2.1中方法进行类器官存活率计算。如果要利用类器官进行药物筛选或者化合物安全性评价，则使用商品化的CellTiter-Glo®发光法细胞活力检测试剂盒对类器官的活力进行检测。

D.3 肝胆肿瘤类器官遗传特征分析

D.3.1 使用基因测序仪对肝胆肿瘤类器官和相应的原发肿瘤组织进行全外显子组测序（WES），揭示肝胆肿瘤类器官的遗传特征，或 SNP/STR(单核苷酸多态/短串联重复)分析所获得的类器官可与原发肿瘤组织相匹配。确定所构建的肝胆肿瘤类器官确实可以代表患者肿瘤。

D.3.2 通过批量 DNA 测序检测肝胆肿瘤类器官的变异等位基因频率，揭示肿瘤细胞比例，确定肝胆肿瘤类器官的肿瘤纯度。

D.3.3 在类器官培养过程中，如果在形态上有区别，可以手动将类器官从培养物中取出，或根据其密度或大小进行分离，建议在分离后进行检查以确认取出的类器官的身份，例如，用定量 PCR 检测组织特异性标记或用 DNA 测序检测突变的缺失。

附录 E

(资料性)

标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法

E.1 肿瘤类器官样本制备

体外培养的肿瘤类器官，吸掉培养基。加入等体积的 PBS 缓冲液 (pH 为 7.4)，吸掉缓冲液。重复一次。

E.2 肿瘤类器官 RNA 提取

E.2.1 收集细胞：待肿瘤类器官长到一定的数量后，将 24 孔板中的培养基去除，加入 1mL 的 PBS 进行清洗 1 遍。去除 PBS 后，加入 1mL 的无动物源性重组胰酶，并用 1mL 量程的移液枪将基质胶打散，以利于消化酶与类器官进行充分的接触与消化。30 min 后，将细胞溶液转移至 RNase-Free 的离心管中离心 (300×g, 5 min)，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清；

E.2.2 裂解处理：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液 RL (350μL)，旋涡震荡；

E.2.3 将所有溶液转移至过滤柱 CS 上(过滤柱 CS 放在收集管中)，13,400×g 离心 2 min，收集滤液；

E.2.4 向滤液中加入 1 倍体积 70%乙醇 (通常为 350 μL 或 600 μL)，混匀 (此时可能会出现沉淀)，得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中 (吸附柱 CR3 放入收集管中)，13,400×g 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.5 向吸附柱 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1，13,400×g 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.6 DNase I 工作液的配制：取 10 μL DNase I 储存液放入新的 RNase-Free 离心管中，加入 70 μL 去除 DNA 缓冲液 RDD，轻柔混匀；

E.2.7 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μL 的 DNase I 工作液，室温放置 15 min；

E.2.8 向吸附柱 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1，13,400×g 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.9 向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 漂洗液 RW (按照说明加入乙醇)，室温静置 2 min，13,400×g 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR3 放回收集管中；

E.2.10 重复步骤 2.9；

E.2.11 离心 (13,400×g, 2 min)，倒掉废液。将吸附柱 CR3 置于室温放置至少 2 min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液；

E.2.12 将吸附柱 CR3 转入一个新的 RNase-Free 离心管中，加入 30-100 μL RNase-Free ddH₂O 室温放置 2 min，离心 (13,400×g, 2 min)，得到 RNA 溶液。

E.3 类器官 cDNA 制备

取 1 μg E.2.12 提取的 RNA，利用水浴锅，按照商品化 RNA 反转试剂盒进行类器官 RNA 反转，操作按照试剂盒说明书进行。

E.4 基因表达情况确定

取 E.3 类器官 cDNA，利用实时荧光定量 PCR 仪，按照商品化应该定量 PCR 扩增试剂盒说明书及相关基因引物，进行实时荧光定量检测，得到内参基因及目标基因表达值。

参 考 文 献

- [1] 科学技术部, 卫生部. 人胚胎干细胞研究伦理指导原则, 2003.
- [2] 清华长庚医院肝胆中心实验室生物样本库标准操作流程, 2020.
- [3] Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation, Broutier, L., Andersson-Rolf, A., Hindley, C. et al. *Nat Protoc* 11, 1724–1743 (2016).
- [4] Biomarkers and Genetic Markers of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma—What Do We Already Know. Baj, J.; Bryliński, Ł.; Woliński, F.; Granat, M.; Kostecka, K.; Duda, P.; Flieger, J.; Teresiński, G.; Buszewicz, G.; Furtak-Niczyporuk, M.; et al. *Cancers* 2022, 14, 1493. <https://doi.org/10.3390/cancers14061493>
- [5] Broutier L, Mastrogianni G, Verstegen MM, et al., Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*. 2017;23(12):1424-1435.
- [6] Prior N, Hindley CJ, Rost F, et al., Lgr5⁺ stem and progenitor cells reside at the apex of a heterogeneous embryonic hepatoblast pool. *Development*. 2019;146(12):dev174557.
- [7] Huch M, Boj SF, Clevers H. Lgr5(+) liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine. *Regen Med*. 2013; 8(4):385-7.
- [8] De Crignis E, Hossain T, Romal S, et al., Application of human liver organoids as a patient-derived primary model for HBV infection and related hepatocellular carcinoma. *Elife*. 2021; 10:e60747.
- [9] Marsee A, Roos FJM, Verstegen MMA, et al., Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell*. 2021; 28(5):816-832.
- [10] Gómez-Mariano G, Matamala N, Martínez S, et al., Liver organoids reproduce alpha-1 antitrypsin deficiency-related liver disease. *Hepatol Int*. 2020; 14(1):127-137.
- [11] 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. *Nat Protoc*. 2021; 16(1):182-217.
- [12] Wang S, Wang X, Tan Z, et al., Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver

injury. *Cell Res.* 2019;29(12):1009-1026.

[13] 王韞芳.基于类器官活库的肝胆精准诊疗新范式[J].中国医学前沿杂志(电子版),2022,14(12):6-10.

[14] Bergin CJ, Benoit YD. Protocol for serial organoid formation assay using primary colorectal cancer tissues to evaluate cancer stem cell activity. *STAR Protoc.* 2022 Mar 4;3(1):101218. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101218. PMID: 35265864; PMCID: PMC8899043.
