



中国生物医学工程学会团体标准

T/CSBME XXXX—XXXX

人食管鳞癌类器官构建、鉴定与保藏指南

Guideline of construction and preservation of organoids of esophageal squamous cell carcinoma

征求意见稿

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前言 II

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 缩略语 4

5 通则 4

6 操作流程 4

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国生物医学工程学会提出。

本文件由中国生物医学工程学会知识产权与标准化工作委员会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

人食管鳞癌类器官构建、鉴定与保藏指南

1 范围

本文件描述了从来源于人食管鳞状上皮肿瘤组织提取肿瘤细胞构建类器官的原理、实验方法、传代、冻存以及复苏方法。

本文件适用于科研用食管鳞状上皮肿瘤组织类器官的培养、类器官传代、类器官鉴定、类器官冻存和复苏及相应实验操作。

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 38736-2020 人类生物样本保藏伦理要求

3 术语和定义

GB/T 38736-2020 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

食管鳞癌类器官 organoids of esophageal squamous cell carcinoma

由食管鳞状上皮肿瘤组织分离的单细胞悬浮液或细胞聚集体接种到细胞外基底膜基质中发育的 3D 培养系统。在细胞成分、组织架构及功能上与患者肿瘤组织一致，可重现肿瘤的细胞异质性。

3.2

食管鳞癌类器官培养基 culture medium of gastrointestinal organoids

可以实现体外模拟食管鳞癌肿瘤细胞生长所需微环境，能维持食管鳞癌肿瘤干细胞活性，并保留其分化能力的培养系统。

3.3

类器官培养基质胶 matrigel matrix

基质胶是层粘连蛋白、IV型胶原、硫酸肝素蛋白聚糖、巢蛋白和其他生长因子的组合，其来源于小鼠肉瘤。可以为类器官提供生长所需的三维空间结构。

3.4

传代 passage

将培养状态良好的类器官采用酶解法使其解离为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，防止类器官过度生长死亡。新一代类器官与原来类器官具有相同的形态功能特征。

3.5

冻存 cryopreservation

使暂时不需要进行实验研究的类器官脱离生长状态，但又可以保持其细胞组成、形态和功能特征的低温冷冻过程。

3.6

复苏 thawing

将处于低温冻存的类器官取出恢复其继续生长状态的过程，复苏的类器官与冻存前状态一致。

3.7

类器官药物敏感性检测 drug sensitivity testing of organoids

将食管鳞癌类器官接种到不同梯度浓度化疗药物的多孔板（如96孔板）。随后，通过培养和检测ATP含量或AI图像分析，可以计算不同浓度对类器官的抑制率，以评估患者对该药物的敏感度。

3.8

半抑制浓度 half maximal inhibitory concentration

指当给定药物对食管鳞癌的生物活性的抑制率达到50%时，给定药物所对应浓度。

3.9

知情同意 informed consent

供体对生物样本捐赠的目的和研究用途等明了和认可。以生物样本供方自愿同意参与为原则，以当事双方共同签署知情同意书为具体体现。

【来源： GB/T 38736-2020 ； 3.7 】

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

DPBS: 杜氏磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)

HBSS: 汉克斯平衡盐溶液 (Hank's Balanced Salt Solution)

STI: 大豆胰蛋白酶抑制剂 (Soybean trypsin inhibitor)

ATP: 腺嘌呤核苷三磷酸 (Adenosine Triphosphate)

IC50: 半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration)

DNase I: 脱氧核糖核酸酶 I (Deoxyribonuclease I)

Y-27632: 选择性ROCK1和ROCK2抑制剂

H&E: 苏木精伊红染色 (Hematoxylin-Eosin Staining)

5 通则

- 5.1 食管鳞癌类器官采集与处理应获得伦理委员会审批。
- 5.2 提供者必须明确被病理诊断为食管鳞状上皮癌。
- 5.3 组织采集前应签署知情同意书，应在充分告知、尊重提供者权利的前提下签署知情同意书。
- 5.4 组织的采集与处理不可对患者的诊断与治疗产生任何干扰。
- 5.5 食管鳞癌类器官的组织采集与处理应由接受过专业培训的医护人员及工作人员进行。

6 操作流程

6.1 组织获取和类器官构建

6.1.1 组织的获取

切除食管鳞癌肿瘤组织时，应避免坏死区域，且切下的组织块不小于6mm³。新鲜组织应在离体30min内切取，并至于含Y-27632的冰冷HBSS溶液。

6.1.2 组织的清洗

切取的肿瘤组织应使用含青、链霉素和两性霉素B的冰冷HBSS溶液进行振荡清洗，去除污浊。

6.1.3 类器官构建

可采用机械破碎法结合酶消化法将人食管鳞癌组织分散为单个细胞悬液或细胞团块，再将癌细胞与基质胶混合后形成3D培养空间结构，加入适用于食管鳞癌类器官培养基进行培养，从而使其分化长成与食管鳞癌组织结构及功能类似的食管鳞癌活组织类器官。

注：附录A给出了食管鳞癌类器官培养用主要试剂材料与操作步骤。

6.2 类器官的传代与冻存复苏

6.2.1 类器官传代

类器官生长至直径大于等于80 μm ，可进行科学实验或传代，一般为生长1-2周左右，即可达到合适大小。（见A.2.6）

6.2.2 类器官冻存复苏

暂不使用的类器官应按相关规程处理，加入食管鳞癌类器官冻存液后移入液氮中冻存。食管鳞癌类器官复苏应迅速操作。37 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下令其迅速融化，选择类器官培养基进行培养、传代。（见A.2.7）

6.3 类器官的鉴定

食管鳞癌类器官鉴定主要包括与原始肿瘤组织的形态学鉴定（HE染色）、免疫学标记鉴定（Ki67、P53、P63表达）、遗传物质一致性鉴定（全外显子/全基因组测序）。

对于培养成功的类器官与培养该类器官所用的肿瘤组织，使用苏木素、伊红染色观察染色情况鉴定二者形态学一致性，使用Ki67、P53、P63分子进行免疫组化鉴定二者蛋白分子表达程度一致性，类器官及配套肿瘤组织染色一致以证明二者的一致性。具体试剂和操作步骤见附录B。

6.4 废弃类器官处置

类器官构建和传代过程中产生的废弃物应严格按照生物样本处置与管理规范操作。对于不合格的或者污染的类器官细胞应遵循生物医疗废弃物处理规范丢弃到指定地点。

附录 A
(资料性)
食管鳞癌类器官培养用主要试剂材料与操作

A.1 主要试剂材料**A.1.1 食管鳞癌类器官培养基主要构成**

食管鳞癌类器官培养基主要构成详见表A.1。

表 A.1

| 中文名称 | 英文名称 |
|--------------------|--|
| 分泌型 Wnt 信号通路激活剂 | R-Spondin-1 |
| 头蛋白 | Noggin |
| Wnt-3a 激活因子 | Wnt-3a |
| 表皮生长因子 | Epidermal Growth Factor |
| 胃泌素 | Gastrin |
| TGF- β 通路抑制剂 | A83-01 |
| p38 MAPK 通路激酶抑制剂 | SB202190 |
| B27 无血清添加剂 | B27 |
| N2 无血清添加剂 | N2 |
| 烟酰胺 | Nicotinamide |
| 乙酰半胱氨酸 | N-acetylcysteine |
| ROCK 激酶抑制剂 | Y-27632 |
| 青霉素/链霉素/两性霉素 B | Penicillin / Streptomycin / Amphotericin B |
| 高级杜氏改良伊格尔培养基与营养混合物 | Advanced DMEM/F12 |
| 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 | HEPES (1M) |
| 即用型细胞培养冻存培养基 | Recovery 细胞培养冻存培养基 |
| 非动物源性重组酶 | TrypLE Express 酶 (1X) |
| 脱氧核糖核酸酶 I | Dnase I |

A.1.2 类器官培养支架材料

食管鳞癌类器官生长需要 3D 空间结构支撑，目前存在水凝胶、纺丝、无动物源性仿生基质支架及基质胶等，其中基质胶能充分模拟细胞外基质状态并包含维持干性的生长因子，作为大部分类器官培养所需的支架材料。基质胶在大于等于 10℃ 即开始成胶，小于等于 4℃ 会转变为液态，4-10℃ 处于固液混合状态，因此操作时需注意基质胶放置及操作温度。

A.1.3 原代培养/传代培养消化酶

食管鳞癌上皮组织原代培养中涉及的消化酶主要有 IV 型胶原酶 (collagenase IV)、中性蛋白酶 (dispase II) 和胰蛋白酶。其作用是水解结缔组织中的基质和胶原蛋白成分，从而使食管鳞癌上皮细胞从组织中充分分离出来，以利于制备为单细胞悬液或细胞团。食管鳞癌传代消化酶为非动物源性重组酶 (1X)，可以较好保留类器官活性。

A.1.4 消化后细胞悬液活性判定

对消化后类器官细胞悬液进行活性判定有助于确定最佳消化时间及酶浓度，使用赤藓红 B 或者台盼蓝，赤藓红 B 相较于台盼蓝无细胞毒性及生物毒性，染色时间不受限制。染色细胞小于等于 30% 证明消化程度对细胞损伤较小。

A.1.5 类器官冻存液

推荐使用即用型冻存培养基或含 90% 胎牛血清、10% 二甲基亚砷的细胞冻存液，于液氮保存类器官，可以很好维持类器官活性。

A. 1.6 类器官培养载体

推荐使用超低吸附的孔板进行原代培养，可以减少非类器官细胞在板底粘附。

A. 2 类器官构建流程

A. 2.1 肿瘤组织清洗流程

将组织块用含 1%青霉素、链霉素及两性霉素 B 的 HBSS 缓冲液浸泡，每隔 5min 在振荡器上振荡清洗一次，弃污浊清洗液，加入 1%青霉素、链霉素及两性霉素 B 的 HBSS 继续振荡清洗，如术前准备不足可以多重复该步骤，每次 5min，直至肿瘤组织无血迹及污染。

A. 2.2 肿瘤组织消化流程

用组织剪将组织剪碎至乳糜大小，加入适量 IV 型胶原酶、中性蛋白酶 II、Y-27632 和青链霉素两性霉素 B，置于 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 震荡摇床中以 1000rpm 消化 40 min-50 min，随后同样设置条件加入胰蛋白酶和脱氧核糖核酸酶 I 消化 5 min-10min，使用 STI 终止消化。

A. 2.3 肿瘤组织细胞沉淀的获取

选用 $70\mu\text{m}$ 筛网进行过滤，去除组织液内的残渣。收集过滤液至 15 mL 无菌离心管，500g 离心 3min，弃去上清，根据沉淀颜色判断是否使用红细胞裂解液。如需裂解则使用 2mL 红细胞裂解液，混匀重悬，静置 1min 后，加入 4mL DPBS 终止裂解，500g 离心 3min，弃去上清。

A. 2.4 类器官接种至培养板

将沉淀物与 3D 培养基质胶按照 1:10 于冰水混合物或冰盒混合，以每孔 25-30 μL 混合物加入超低吸附 24 孔板，置于培养箱 $30\pm 5\text{min}$ 后加入静置至室温类器官培养基 500 μL （可选 15min 后倒置，使混合物形成圆顶）。在周围加入无菌 PBS 防止培养基蒸发。

A. 2.5 类器官培养过程

培养每隔 2-3 天进行食管鳞癌类器官培养基换液，第 1 和第 2 次加入的培养基可添加 Y-27632。注意观察真菌或者细菌污染，如有污染，需抽干孔内液体并加入 75%酒精清洗，以免影响未污染类器官。若类器官生长过大或出现中心坏死情况，需及时传代。类器官生长至直径大于等于 $80\mu\text{m}$ 可视为培养成功。

A. 2.6 类器官传代过程

小心吸取培养基后，使用 DPBS 将基质胶吹散，转移至 15mL 离心管，加入 DPBS 至 10mL，置于 $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 冰箱 5min，随后 500g 离心 3min 后弃去上清，加入 2 倍沉淀量的非动物源性重组酶，室温消化 5min 后，加入 3 倍体积的 DPBS 溶液终止消化，500g 离心 3min 后弃去上清，随后培养步骤同 A. 2. 4。

A. 2.7 类器官冻存复苏

冻存前期步骤同 A. 2. 6，弃去上清得到沉淀后，将其使用 1mL 即用型冻存培养基重悬后转移至冻存管，于 -80°C 冰箱梯度冻存后存放至液氮。从液氮罐中取出类器官冻存管，放入 37°C 水浴锅 2min。吸出类器官冻存物移至 15mL 无菌离心管中，使用食管鳞癌类器官培养基重悬至 10mL，500g 离心 3min 后弃上清，随后培养步骤同 A. 2. 4。

附录 B

(资料性)

食管鳞癌类器官分子实验操作流程

B.1 食管鳞癌类器官的形态学及免疫标记鉴定

B.1.1 类器官的包埋、切片

B.1.1.1 类器官固定

待食管鳞癌类器官生长至直径大于等于 $80\mu\text{m}$ ，即可进行类器官的鉴定。按照 A.2.6 的步骤将类器官收集于 5mL 管中，使用 4% 多聚甲醛 $4\pm 1^\circ\text{C}$ 固定 12h，随后加入 2mL 的 PBS 清洗后，300g 在 4°C 离心 5min 弃去液体。

B.1.1.2 类器官包埋

称取约 0.3g 琼脂糖加入烧杯中，再加入 9mL PBS，微波炉高温融化。待琼脂糖降温，将已经融化的琼脂糖溶液，加入离心管中重悬类器官，冰上放置，待其凝固。取出已经凝固的含有类器官沉淀的琼脂糖块，置于梯度乙醇中脱水。提前 4h 左右打开烘箱， 65°C 融蜡；将脱水完成后的琼脂糖块转移至包埋盒中，将包埋盒转移入二甲苯中。透明后立即转入已经融化的蜡缸中浸蜡。将融好的纯蜡倒入蜡盒，将琼脂块置于中间位置，再滴蜡包埋直到倒满，待蜡块完全凝固，小心脱下模具。

B.1.1.2 类器官切片

将包埋好的蜡块固定于切片机上，切成薄片，将包含有完整组织的切片置于 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴锅中。组织展开后，用载玻片捞起，置于架子上，在温箱中烘干。

B.1.2 食管鳞癌类器官的 HE 染色

依次将切片放入二甲苯、乙醇中脱蜡处理，蒸馏水洗涤。洗涤后的切片依次滴入苏木素伊红染色，自来水洗涤，将切片依次放入乙醇、二甲苯脱水透明后晾干，中性树脂胶封片。

B.1.3 类器官的免疫组化

将 B.1.2 步骤中脱蜡处理后的切片置于过氧化氢浸泡，PBS 清洗后，加入柠檬酸缓冲液，放入微波炉中重复蒸煮，冷却至室温后将柠檬酸修复液倒掉，用 PBS 清洗。擦干后，加上血清，置于 37°C 温箱中 30min。将温箱中的载玻片取出，用吸水纸擦干正反面组织周围血清，加一抗，于 4°C 冰箱 12h。将载玻片从冰箱中取出，用 PBS 清洗，擦干后加上二抗，置于 37°C 温箱 30min。将片子从温箱中取出，放入 PBS 中洗涤后擦干，再加入显色剂。将显色后的片子用清水冲 10min 后，浸泡于苏木精中染色，将复染后的片子置于水中冲洗后，放入酒精、二甲苯，最后取出放置于通风柜中晾干，再用中性树脂胶封片，置于通风柜中晾干后扫描切片。

B.2 类器官的活死染色

将食管鳞癌类器官接种至共聚焦皿，待其生长到直径大于等于 $80\mu\text{m}$ ，用 PBS 清洗后，加入配置好的钙黄绿素和碘化丙啶的双荧光染色法试剂 (1:1)，温箱孵育 30min，观察类器官发射荧光，红色荧光代表死亡类器官，绿色荧光代表具有活性类器官，观察红色荧光和绿色荧光比例确定类器官活性。

B.3 类器官的药物敏感性实验

根据 A.2.6 类器官传代过程，结合实验者所需类器官数目及设置的浓度梯度，将类器官接种至低吸附 96/384 孔板，待直径大于等于 $80\mu\text{m}$ 按梯度加入药物，每组药物设置三次重复，使用 ATP 生物发光法检测类器官活力并计算 IC50 及药敏曲线下面积。

B.4 类器官的实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 实验

食管鳞癌类器官直径大于等于 $80\mu\text{m}$ ，即可提取核糖核酸。根据 A.2.6 类器官传代过程获得类器官沉淀，加入 1ml μL 的 TRIzol，立即吹打，使类器官充分裂解，冰上放置 5-10min 充分裂解类器官，再加入 200 μL 氯仿 (有无推荐的加入量?)，在震荡仪上充分震荡，形成乳白色混悬液，再于冰上静置，形成溶液分层，离心后，可见溶液分为 3 层。将上层的水相转移入新的 1.5mL EP 管，加入等体积异丙醇，混匀静置。离心后倒出上清，加入 1mL 乙醇，涡旋使沉淀悬浮，再次离心，弃上清，倒置 EP 管于滤纸上，静置后可见乳白色沉淀逐渐透明，再加入双馏水溶解沉淀，混匀，用酶标仪检测吸光度，吸光度 $260/230 > 2.0$ 提示无盐污染。检测样本合格后，进行 cDNA 反转录。配制好第一链 cDNA 合成反应液，在反转录仪中进行第一链 cDNA 合成反应。在八连管中配置好混合液，进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应。

B.5 类器官的蛋白免疫印迹 (western blot) 实验

食管鳞癌类器官生长至直径大于等于 80 μm ，即可提取蛋白。根据 A.2.6 类器官传代过程获得类器官沉淀，加入预冷的蛋白裂解液，于冰上裂解，重复吹打破碎类器官，充分涡旋震荡，在提前预冷好的 4℃ 离心机 500g 离心 3min，将上清转移入新的 EP 管中，-20℃ 保存，BCA 定量后，进行蛋白电泳，转膜，封闭后孵育一抗、二抗曝光显影。

B.6 类器官慢病毒转染

小心吸出孔中的类器官培养基，PBS 清洗 2 遍，吹散基质胶后每孔加入约 1mL 非动物源性重组酶，转移到 15mL 离心管中。将离心管置于摇床室温孵育 10-15min。加入 10mL 预冷的食管鳞癌类器官培养基重悬，300g 4℃ 离心 5min。去除上清，加入 10mL 类器官培养基重悬，300g，4℃ 离心 5min。去除上清，加入类器官培养基重悬，慢病毒与重悬液以 1:5 的体积加入重悬混合， $37\pm 1^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 1-2 h。300g 4℃ 离心 5min，去除上清。加入相应体积的类器官培养基与基质胶 1:1 重悬，从 37℃ 培养箱中取出提前 2h 放入的 24 孔板，每孔加入 50ul 混合液，放入 37℃ 培养箱 5min 后倒置凝固 20min。凝固后加入 500uL 类器官培养基到 24 孔板，置于细胞培养箱中进行培养，每天观察类器官生长情况，以及荧光情况，每隔 2-3 天更换培养液。

参考文献

- [1] Karakasheva TA, Kijima T, Shimonosono M, et al. Generation and Characterization of Patient-Derived Head and Neck, Oral, and Esophageal Cancer Organoids. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2020;53(1):e109. doi:10.1002/cpsc.109
- [2] Sachdeva UM, Shimonosono M, Flashner S, Cruz-Acuña R, Gabre JT, Nakagawa H. Understanding the cellular origin and progression of esophageal cancer using esophageal organoids. *Cancer Lett.* 2021;509:39–52. doi:10.1016/j.canlet.2021.03.031
- [3] Karakasheva TA, Gabre JT, Sachdeva UM, et al. Patient-derived organoids as a platform for modeling a patient's response to chemoradiotherapy in esophageal cancer. *Sci Rep.* 2021;11(1):21304. Published 2021 Oct 29. doi:10.1038/s41598-021-00706-8
- [4] Li X, Francies HE, Secrier M, et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics. *Nat Commun.* 2018;9(1):2983. Published 2018 Jul 30. doi:10.1038/s41467-018-05190-9
- [5] Kijima T, Nakagawa H, Shimonosono M, et al. Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018;7(1):73–91. Published 2018 Sep 14. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.09.003
- [6] Jiang Y, Zhao H, Kong S, et al. Establishing mouse and human oral esophageal organoids to investigate the tumor immune response. *Dis Model Mech.* 2024;17(1):dmm050319. doi:10.1242/dmm.050319
- [7] Fuchino T, Kurogi S, Tsukamoto Y, et al. Characterization of residual cancer by comparison of a pair of organoids established from a patient with esophageal squamous cell carcinoma before and after neoadjuvant chemotherapy. *Hum Cell.* 2024;37(2):491–501. doi:10.1007/s13577-023-01020-3
- [8] Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications [published correction appears in *Nat Protoc.* 2021 Dec;16(12):5739. doi: 10.1038/s41596-021-00494-5.]. *Nat Protoc.* 2020;15(10):3380–3409. doi:10.1038/s41596-020-0379-4
- [9] Tsukamoto Y, Kurogi S, Shibata T, et al. Enhanced phosphorylation of c-Jun by cisplatin treatment as a potential predictive biomarker for cisplatin response in combination with patient-derived tumor organoids. *Lab Invest.* 2022;102(12):1355–1366. doi:10.1038/s41374-022-00827-2
- [10] Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science.* 2018;359(6378):920–926. doi:10.1126/science.aao2774
-