

第三章

肿瘤类器官标准化实验室及样本库建设方案

第一节 类器官应用困境及指南规范

类器官的应用主要面临四大问题，分别为类器官的血管化、类器官的免疫相容性、类器官的规范化与标准化、类器官的监管与伦理。

一、类器官的血管化

类器官的大小受限于营养和氧气的扩散，如果没有血管网络，类器官的中心部分容易发生坏死。因此，如何构建具有血管样结构的类器官以及如何与体内的血管系统相连接是类器官研究的重要难点。目前，科学家们采用了多种方法构建具有血管网络的类器官，如干细胞诱导共分化、细胞自组装、微血管片段移植、体内再血管化和组织工程等。血管化类器官不仅能提高类器官的生存能力和功能完善性，还能模拟血流灌注的机械力和血管内皮分泌的因子对类器官的影响。因此，与真正的人体器官相比，其功能和结构仍较简单，无法完全重现体内复杂环境下的一系列功能变化，无法包含全部功能库，可能影响对药物疗效、毒性和（或）药代行为的评价。

二、类器官的免疫相容性

类器官的来源细胞可能与受体的免疫系统不匹配，导致排斥反应或免疫耐受。因此，如何选择合适的细胞来源以及如何调节免疫系统的反应是类器官应用的关键问题。一种方法是利用患者自身的细胞或诱导多能干细胞（iPSCs）制备类器官，从而避免免疫排斥反应；另一种方法是在类器官中引入具有免疫系统的类器官，如肠道类器官，从而模拟免疫细胞和微生物的相互作用。

三、类器官的规范化和标准化

类器官的培养和评价涉及多种因素，如细胞类型、培养条件、功能检测等，这些因素可能导致类器官的质量和可重复性差异。标准的欠缺与空白导致缺乏横向对比，因此如何建立统一的类器官制备和评价的规范 and 标准以及如何保证类器官的重现性、稳定性、安全性和有效性是类器官转化的基础问题。目前，实验者对细胞自组装形成类器官时的干预以及控制是极少的。这种过程的缺乏控制会加剧系统和实验的可变性，影响实验的可重复性，使这些系统和实验无法充分发挥其应用潜力。此外，类器官培养所使用的关键细胞因子、基质材料等大多为科研级别，规范性与可靠性不足，可能影响实验结果的重复性、稳定性和准确性，从而无法实现产业化，因此这些生物材料均应纳入监管范围。

四、类器官的监管和伦理

类器官的研究和应用涉及人类遗传资源、生物安全、个人信息保护等方面，这些方面都需要相应的法律法规和伦理准则进行规范和指导。因此，如何制订合理的类器官监管和伦理政策以及如何平衡类器官技术及应用的创新和风险是类器官发展的重要问题。

五、现有标准化及规范化的不足

首先，覆盖范围较小，目前没有卵巢癌、胰腺癌类器官构建、药敏检测相关指南；现有肺、胃、乳腺的类器官构建、保藏、复苏指南中，各指南中操作及质控标准存在较多差异，较难形成统一的产业化标准；暂无针对具体单个癌种特异性的药物敏感性检测方法指南。其次，现有指南没有突出性地提示及强调对各环节关键点的把控。此外，现有指南仅针对手术取组织样本的类器官构建，未对内镜、穿刺、积液样本的类器官构建进行指导，临床应用场景范围有限。

六、法规政策及指南共识规范

（一）类器官相关法规与政策

- （1）美国 FDA 法案 FFDCA（21 U.S.C. 355）
- （2）《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则（试行）》
- （3）《基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则（试行）》
- （4）《人源干细胞产品非临床研究技术指导原则（征求意见稿）》

（二）类器官标准化指南及共识规范

- （1）中国团体标准 T/SHSYCXH 12—2022《人源肺癌类器官培养技术规范》
- （2）中国团体标准 T/CSCB 0014—2022《人肠癌类器官》
- （3）中国团体标准 T/CMBA 020—2023《人正常乳腺及乳腺癌类器官制备、冻存、复苏和鉴定操作指南》
- （4）中国团体标准 T/CMBA 017—2022《人胃肠上皮组织类器官的构建与保藏操作指南》
- （5）中国团体标准 T/CRHA 017—2023《人肝祖细胞类器官构建、质量控制与保藏操作指南》
- （6）中国团体标准 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》
- （7）中国团体标准 T/CRHA 019—2023《人胆上皮组织类器官构建、质量控制与保藏操作指南》
- （8）中国团体标准《人胃肿瘤类器官构建、质量控制与保藏操作指南（征求意见稿）》
- （9）中国团体标准《人肉瘤类器官（征求意见稿）》
- （10）中国团体标准《类器官个体化抗肿瘤药物敏感性检测方法规范（征求意见稿）》
- （11）《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》

第二节 类器官标准化实验室及样本库建设

随着个性化医疗的迅速发展，肿瘤类器官（patient-Derived organoids, PDOs）作为患者来源的3D肿瘤模型，日益成为预测患者药物敏感性、研究肿瘤异质性和开发新疗法的强有力工具。构建一个高效、标准化的PDOs实验室及样本库可为科研和临床应用提供高质量的研究平台。以下内容详细阐述了建设标准化PDOs实验室和样本库的步骤、标准及管理方法。

一、建设目标

通过标准化流程和高质量的样本采集，建立能够长期保存、快速复苏的肿瘤类器官库。该样本库将主要应用于药物敏感性测试、肿瘤基因组分析、免疫治疗研究和肿

瘤异质性研究。同时，通过标准化实验室及样本库建设为契机，帮助项目参与单位：

①熟练掌握包括肺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌和卵巢癌在内的五大常见实体肿瘤类器官的构建、保藏、复苏及药敏检测技术。②搭建院内高质量肿瘤类器官技术操作及科研开展实验室或实验平台。③培养若干高水平的类器官科研团队和高素质的科研人才。④构建较高水平的类器官操作及质控体系，并建立类器官生物样本库。⑤具备相关癌种类器官临床药敏检测服务能力。

二、总体规划

样本来源：收集来自多种癌症类型（如乳腺癌、结直肠癌、肺癌和胰腺癌等）患者的原发或转移性肿瘤样本。

应用场景：用于患者特异性药物筛选、药物耐药机制研究、基因突变功能研究和个体化治疗策略开发。

伦理合规：确保所有样本采集过程符合伦理规定，获得患者知情同意，并通过伦理委员会审批。

三、实验室设计与关键设备

（一）无菌环境

实验室需配备二级生物安全柜（BSC-2）及高效空气过滤系统，以保证无菌条件，防止样本污染。

（二）主要设备配置

CO₂ 培养箱：控制温度（37℃）、湿度和气体（5% CO₂），为 PDOs 提供适宜的生长环境。

显微成像系统：配备高分辨率显微镜，用于观察类器官的形态变化和生长情况。

冷冻存储设备：配置超低温冰箱（-80℃）和液氮罐，用于长期保存类器官。

数据管理系统：建立安全的电子数据库，包括患者信息、样本培养记录、基因及药物敏感性数据，以便于样本管理和后续研究。

四、样本采集与保存标准

（一）样本采集流程

肿瘤样本应在手术切除或穿刺活检后立即采集，保持无菌条件并迅速运输到实验室。快速处理可确保细胞活性和类器官的培养成功率。

（二）样本处理

将肿瘤组织切割成小块后通过酶消化法或机械分离得到细胞团，培养成类器官。

（三）保存与复苏

①短期保存：类器官短期存放于 4℃ 缓冲液中，以便快速处理。②长期保存：将类器官存储在液氮中，以确保细胞结构和基因表达的稳定性，便于后续复苏和应用。

五、类器官培养流程标准化

（一）培养基选择与优化

对于类器官培养而言，需要选择合适的组织或细胞和合适的培养方案、细胞外基质、生长因子等。类器官构建的主要基础取决于细胞进行自组织并重建原始组织的结构和功能的能力。自组织过程可分为一系列受到高度调控的形态发生模式化重排或细胞分化过程。传统的类器官构建方式包括用胶原酶消化组织干细胞，然后在含有生长因子条件培养基的 3D 支架中培养，如 Wnt-3a、R-spondin、表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）、成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor, FGF）、noggin 和胃泌素。单一的特定培养基无法对不同来源组织进行稳定的类器官构建，因此使用发育生物学研究确定特定器官的培养基成分是必须的。培养基环境需保持恒温（37℃）、湿度（95%）和气体组成（5% CO₂）。

（二）细胞外基质（extracellular matrix, ECM）

除了建立适当的生长因子条件培养基外，细胞外基质是类器官构建的另一个关键因素，不同的 ECM 特性会导致不同的类器官命运走向。在自然环境中，ECM 主要由纤维形成蛋白组成，如胶原蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白和糖胺聚糖，并含有各种生长因子、细胞因子和趋化因子，从而调节组织发育和稳态。因此，在类器官模型中，模拟 ECM 特性是必要的。目前，有多种基质可供选择，其中最常用的基质是“基质胶”。基质胶是一种凝胶状蛋白质混合物，类似于 ECM，由 Engelbreth-Holm-Swarm 小鼠肉瘤细胞分泌。其主要含有 ECM 成分的混合物，包括层粘连蛋白、IV 型胶原、肌动蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖和一些生长因子，如 TGF-β 和 FGF。最近开发的另一种基质是“合成水凝胶”，由天然或合成聚合物构成。与天然 ECM 凝胶相比，合成聚合物具有高度可定制性，并且可以通过掺入不同的蛋白质和其他分子根据特定培养物进行修饰。

（三）传代扩增与质量控制

设定标准化传代流程，确保类器官结构的稳定性和实验结果的一致性。根据类器官生长情况定期传代，以满足后续实验需求。

使用显微镜观察类器官形态，定期进行基因检测以确保类器官的基因型和表型与原始肿瘤一致。

六、数据管理与质量控制

（一）数据管理

每个样本的信息（如患者特征、癌症类型、样本来源、传代次数、药物敏感性等）需详细记录，且存储在安全的电子数据库中。此数据库需便于数据检索、更新和样本追踪。

（二）质量控制措施

质量控制内容包括定期对类器官形态、基因型、药物敏感性等指标进行验证，确保样本的质量和实验的重复性。

（三）数据分析与共享

数据库系统应支持数据分析工具，便于进行样本之间的对比分析，并在适当条件下支持数据共享，供内部和外部研究使用。

七、安全与伦理合规

所有参与样本采集和处理的人员需严格遵守伦理审查流程，所有样本均需患者签署知情同意书，且所有操作均需通过伦理委员会批准。

生物安全：在实验室和样本存储过程中，严格遵守生物安全规范，以避免操作过程中潜在的病原体感染风险。

八、标准操作流程的建立

（一）详细的标准操作流程（standard operating procedures, SOP） 制订

SOP 包括样本采集、处理、培养、传代、冷冻保存、数据记录等标准化操作，确保所有实验人员熟练掌握标准化流程，避免因操作不当引起样本变异。

（二）培训计划

对所有实验人员进行定期培训，以确保对 SOP 的熟悉和遵守，同时提升其 PDOs 相关技术能力。

九、样本库管理与应用

（一）样本借用与共享协议

样本库需制订明确的样本借用政策，以确保样本优先支持本研究项目的需求，并有条件开放给外部科研项目。样本借用需签署共享协议，明确研究目的及所需样本量。

（二）定期维护与更新

样本库中的样本需定期检测、更新记录，并保证储存条件符合标准。

回溯性分析与库内数据共享：定期分析类器官库的数据，优化样本库的管理和研究利用，提升样本库的研究价值。

十、人员培训与技术支持

为新加入的实验员和技术人员提供标准化培训，使其熟练掌握 PDOs 的培养和维护技术，了解各设备的使用方法及数据管理系统的操作。

技术支持：定期更新技术培训，确保实验室人员能够掌握前沿培养技术和数据库管理方法。

十一、持续改进与创新

（一）流程优化与更新

定期评估类器官培养和管理流程的效率和质量，根据研究需求及技术进展不断优化和更新培养方法及质控标准。

创新培养方法：尝试引入新型培养方法，例如联合使用微流体芯片、基质材料优化以及 3D 打印技术，以更好地模拟肿瘤微环境，提高 PDOs 模型的生理真实性和稳定性。

（二）研究应用拓展

将 PDOs 进一步应用于免疫治疗响应预测、药物筛选和基因组编辑技术（如 CRISPR）联合使用，扩展 PDOs 在个体化治疗和药物开发中的应用潜力。

标准化肿瘤类器官实验室及样本库的建立将极大提升肿瘤个体化医疗研究的准确性和实用性。通过严格的标准化操作、持续的质量控制和高效的数据管理，PDOs 实验室不仅可以为药物敏感性测试和基因组分析提供支持，还能为免疫治疗及新药研发提供稳定可靠的模型平台。