

# 人源结直肠腺瘤类器官模型的构建及其在中药活性成分筛选中的应用

王培<sup>1,2</sup>, 夏文婷<sup>1</sup>, 张臻<sup>3</sup>, 周炳文<sup>1,2</sup>, 黄楚月<sup>1</sup>, 王璐<sup>1,2\*</sup>, 樊志敏<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210022

2. 江苏省中医肛肠疾病临床医学创新中心, 江苏 南京 210022

3. 丹阳市中医院 肛肠科, 江苏 丹阳 212300

**摘要:** **目的** 构建人源结直肠腺瘤(CRA)复发类器官, 评价几种中药活性成分对 CRA 复发类器官活性的影响。**方法** 收集内镜下切除后再发腺瘤的 CRA 患者组织, 腺瘤数量数目超过 2 枚且少于 6 枚, 直径为 5~10 mm, 构建 CRA 复发三维(3D)类器官; 使用高内涵智能分析仪和光学显微镜观察类器官形态; 运用苏木精-伊红(HE)染色观察类器官组织学形态; 采用外显子组测序检测 CRA 复发类器官与源组织基因学特征的一致性; 采用 CellTiter-Glo 检测 1 000.00、100.00、10.00、1.00、0.10、0.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸小檗碱、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、大黄素、姜黄素、丹参酮 II<sub>A</sub>、黄芩素、异甘草素对 6 例 CRA 复发类器官活性的影响, 绘制活性曲线, 并计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值。**结果** 建成 CRA 复发类器官, 形态多以内部透亮、近圆的囊样结构为主, 且囊壁多有向外侧隆起的蕈状结构; 经过多次传代、冻存再复苏后其形态结构均能保持一致; 每组类器官与源组织之间的突变类型比例基本一致, 插入和缺失突变的长度和比例、拷贝变异数均具有较高相似性; 7 种中药活性成分对 6 例 CRA 复发类器官的 IC<sub>50</sub> 均值分别为盐酸小檗碱 69.79  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 110.92  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、大黄素 14.33  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、姜黄素 4 352.02  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、丹参酮 II<sub>A</sub> 1 772.97  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄芩素 16.01  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、异甘草素 78.48  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , CRA 复发类器官对大黄素和黄芩素具有更高的敏感性。**结论** 成功构建能够稳定传代、冻存和复苏的 CRA 复发类器官, 其能维持源组织的组织学和基因学特征; 经 CRA 复发类器官活性评价, 大黄素和黄芩素具有治疗 CRA 复发的潜力, 为中医药在治疗 CRA 复发和防治结直肠癌(CRC)领域的有效应用提供理论和方法学参考。

**关键词:** 结直肠腺瘤; 结直肠癌; 类器官; 大黄素; 黄芩素

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)08-2109-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.005

## Establishment of patient-derived colorectal adenoma organoids and its application in screening of active ingredients in traditional Chinese medicine

WANG Pei<sup>1, 2</sup>, XIA Wenting<sup>1</sup>, ZHANG Zhen<sup>3</sup>, ZHOU Bingwen<sup>1, 2</sup>, HUANG Chuyue<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1, 2</sup>, FAN Zhimin<sup>1, 2</sup>

1. Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210022, China

2. Jiangsu Clinical Innovation Center for Anorectal Diseases of TCM, Nanjing 210022, China

3. Department of Anorectal, Danyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Danyang 212300, China

**Abstract: Objective** To construct patient-derived colorectal adenoma (CRA) recurrence organoids, and to evaluate the effects of the ingredients of several traditional Chinese medicines on the activity of CRA recurrence organoids. **Methods** Tissues from CRA patients with recurrent adenomas after endoscopic resection were collected, and the number of adenomas was more than two and less than six, with diameters of 5—10 mm, to construct CRA recurrence 3D organoids; the morphology of the organoids was observed by using a high-content intelligent analyser and a light microscope; the histological morphology of the organoids was observed by using hematoxylin-eosin (HE) staining; whole-exome sequencing was used to test the consistency of the genetic characteristics of CRA

收稿日期: 2024-12-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(82305156, 82205024); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20230162); 江苏省省级重点研发计划(社会发展)项目(BE2021611); 南京市博士后优秀科研项目(NJSBSH2023)

作者简介: 王培, 主治中医师, 博士, 从事中西医结合临床胃肠疾病研究。E-mail: wp921126@163.com

\*通信作者: 樊志敏, 主任中医师, 博士生导师, 从事中医外科学肛肠疾病研究。E-mail: fanzm@njucm.edu.cn

王璐, 助理研究员, 博士, 从事临床中药学研究。E-mail: wanglu@njucm.edu.cn

recurrence organoids with those of the source tissues; CellTiter-Glo was used to test the effects of berberine, ginsenoside Rg<sub>3</sub>, emodin, curcumin, tanshinone II<sub>A</sub>, baicalein, and isoliquiritigenin of 1 000.00, 100.00, 10.00, 1.00, 0.10, 0.01 μmol·L<sup>-1</sup> on the activity of six CRA recurrence organoids, and the activity curves were plotted and the IC<sub>50</sub> values were calculated. **Results** The morphology of CRA recurrence organoids was mostly dominated by internal translucent, nearly rounded sac-like structures, and the sac walls were mostly myxoid with outward bulging; their morphology and structure could be maintained consistently after multiple passages, freezing and resuscitation; the proportions of mutation types were basically the same between the organoids and the source tissues of each group, and the lengths and proportions of insertion and deletion mutations as well as the number of copy variations had a high degree of similarity; the effects of the seven traditional Chinese medicines on the activity of six cases of CRA recurrence organoids were investigated. The mean IC<sub>50</sub> values of the seven active ingredients on the six CRA recurrence organoids were berberine 69.79 μmol·L<sup>-1</sup>, ginsenoside Rg<sub>3</sub> 110.92 μmol·L<sup>-1</sup>, emodin 14.33 μmol·L<sup>-1</sup>, curcumin 4 352.02 μmol·L<sup>-1</sup>, tanshinone II<sub>A</sub> 1 772.97 μmol·L<sup>-1</sup>, baicalein 16.01 μmol·L<sup>-1</sup>, and soliquiritigenin 78.48 μmol·L<sup>-1</sup>, and CRA recurrence organoids had higher sensitivity to emodin and baicalein. **Conclusion** The CRA recurrence organoids were successfully constructed to maintain the histological and genetic characteristics of the source tissues. Evaluated by the activities of CRA recurrence organoids, emodin and baicalein could be used as the effective ingredients for the treatment of CRA recurrence. These results provided theoretical and methodological references for the effectiveness of traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of CRA recurrence and the prevention of colorectal cancer (CRC).

**Key words:** colorectal adenoma; colorectal cancer; organoid; emodin; baicalein

结直肠癌 (CRC) 是一种常见的消化道恶性肿瘤, 在我国恶性肿瘤发病率中居第 2 位, 死亡率居第 4 位<sup>[1]</sup>。约有 90% 的 CRC 由结直肠腺瘤 (CRA) 进展而来, 尤其是出现 3 个及以上腺瘤的患者, 其复发高级别瘤变和癌变的风险均增加<sup>[2]</sup>。结直肠镜定期检查和手术切除 CRA 能降低 CRC 发病率和死亡风险, 但临床 CRA 复发率高<sup>[3]</sup>, 且频繁的侵入性检查和手术切除往往给患者带来巨大的身心痛苦和经济负担。目前报道的针对 CRA 复发的口服药物, 多是基于流行病学研究结果的“老药新用”, 存在诸多不良事件<sup>[4]</sup>。近年来, 中医药治疗 CRA 复发优势逐渐显现, 多项临床研究已证实中药复方及活性成分能够有效预防 CRA 复发<sup>[5-6]</sup>, 但其有效成分和作用机制还有待阐明。因此, 从众多中药活性成分中广泛、全面地筛选潜在成分可能是防治 CRA 复发的新方向。

当前, 缺乏用于药物筛选和机制研究的体外模型, 可能是开发安全、有效的 CRA 复发药物的主要困境之一。既往有研究报道建立了人绒毛状腺瘤和管状腺瘤细胞系<sup>[7]</sup>, 但受限于复杂的诱导和建立条件, 这些细胞系并没有被广泛应用。此外, 单一细胞系难以模拟不同细胞和组织类型的 CRA, 这就限制了高通量地筛选和评估潜在药物。类器官培养技术有望解决这些问题。类器官是与原器官或组织具有相似细胞、分子和功能特征的三维 (3D) 细胞团<sup>[8]</sup>。在肿瘤研究领域, 人源类器官已被证实能保留肿瘤组织的异质性, 并能准确预测抗肿瘤药物对

患者的疗效, 具有较高敏感性和特异性<sup>[9]</sup>, 在模型构建、药物开发和精准治疗方面显示出广阔的应用前景<sup>[10]</sup>。目前, APC<sup>Min/+</sup>小鼠来源和人源 CRA 类器官培养系统逐渐完善<sup>[11-13]</sup>, 但是鲜有建立用于药物筛选的人源 CRA 复发类器官。

本研究通过收集临床 CRA 复发患者的腺瘤组织, 构建人源 CRA 复发类器官, 评价候选中药活性成分对类器官活性的影响, 为提高 CRA 复发药物的筛选效率提供有力模型, 也为后期靶向 CRA 复发中药的开发及机制研究提供新的方法学参考, 从而推动中医药在 CRC 癌前预防领域的应用。

## 1 材料

### 1.1 组织样本

参照相关文献报道<sup>[5-6]</sup>, 收集: (1) 治疗前 6 个月内, 至少切除 1 枚及不超过 6 枚组织学证实的 CRA (包括管状、管状绒毛状和绒毛状腺瘤), 无残留; (2) 内镜下诊断为腺瘤性息肉, 数目超过 2 枚且少于 6 枚, 直径为 5~10 mm 的 CRA 组织。所有组织均来自南京中医药大学附属南京中医院肛肠中心的成年患者。本研究经南京市中医院伦理委员会批准 (KY2024082)。

### 1.2 主要试剂

Advanced DMEM/F12 培养基 (货号 12634028)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液 (货号 15630-056)、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺 (GlutaMAX-I) (货号 35050079)、补充剂 N2 (货号 17502001)、补充剂 B27 (货号 17504044) 和

TrypLE™ Express 酶 (货号 12604021) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 重组蛋白 R-Spondin-1、骨形态发生蛋白拮抗剂 (Noggin)、Wnt-3a 和表皮生长因子 (EGF) 购自近岸蛋白质科技有限公司; *N*-乙酰半胱氨酸、烟酰胺、A83-01 (货号 909910-43-6)、SB-202190 (货号 HY-10295) 和 Y-27632 (货号 HY-10071) 购自美国 MCE 公司; CellTiter-Glo® 2.0 细胞活力检测试剂盒 (货号 G924) 购自美国 Promega 公司; 基质胶 (货号 356231) 购自美国 Corning 公司; II 型胶原酶 (货号 C6885) 和透明质酸酶 (货号 H3506) 购自美国 Sigma 公司; 无血清冻存液 CryoStor® CS10 (货号 100-1061) 购自加拿大 Stem Cell 公司; 青霉素-链霉素 (货号 C100C5) 购自苏州新赛美生物科技有限公司; 对照品盐酸小檗碱 (货号 B21449, 质量分数 ≥ 98%)、人参皂苷 Rg<sub>3</sub> (货号 B21059, 质量分数 ≥ 98%)、黄芩素 (货号 B20571, 质量分数 ≥ 98%)、异甘草素 (货号 B21525, 质量分数 ≥ 98%)、大黄素 (货号 B20240, 质量分数 ≥ 98%)、姜黄素 (货号 B20614, 质量分数 ≥ 98%)、丹参酮 II<sub>A</sub> (货号 B20257, 质量分数 ≥ 98%) 购自上海源叶生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

Ava Insight 高内涵智能分析仪 (江苏艾玮得生物科技有限公司); TS2-S-SM 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); MEGAFUGE 8R 冷冻离心机、i150 CO<sub>2</sub> 培养箱、1300 A2 超净台 (美国 Thermo Fisher 公司); BioTek Synergy H1 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

## 2 方法

### 2.1 类器官培养

将内镜下切除的新鲜 CRA 组织用冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 5 遍, 然后转移至培养皿中, 于冰上切成 1~2 mm<sup>3</sup> 碎片后, 加入 3 mL 消化液 (1.5 mg·mL<sup>-1</sup> II 型胶原酶 + 10 μg·mL<sup>-1</sup> 透明质酸酶), 转移至离心管中, 37 °C 摇床消化 8 min。加入 3 mL Advanced DMEM/F12 培养基中止消化, 过 100 μm 滤网, 收集滤液, 置于 4 °C 离心机, 1 400 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。弃上清, 加入 10 mL Advanced DMEM/F12 培养基, 再次离心并弃上清, 重复 3 次。用 1:2 配制完全培养基和基质胶混合液重悬沉淀, 接种于 24 孔板, 在 37 °C 培养箱中静置 20 min 待基质胶完全凝固后, 加入完全培养基, 并在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养, 隔天更换

1 次完全培养基。完全培养基为: Advanced DMEM/F12 培养基添加 Wnt-3a (100 ng·mL<sup>-1</sup>)、R-Spondin-1 (500 ng·mL<sup>-1</sup>)、Noggin (100 ng·mL<sup>-1</sup>)、EGF (50 ng·mL<sup>-1</sup>)、*N*-乙酰半胱氨酸 (1 mmol·L<sup>-1</sup>)、烟酰胺 (10 mmol·L<sup>-1</sup>)、A83-01 (500 nmol·L<sup>-1</sup>)、SB-202190 (3 μmol·L<sup>-1</sup>)、Y-27632 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)、N2 (1×)、B27 (1×)、HEPES (10 mmol·L<sup>-1</sup>)、GlutaMAX-I (2 mmol·L<sup>-1</sup>)。

### 2.2 类器官传代和冻存

根据类器官生长情况, 一般 5~10 d 进行 1 次传代, 弃去原培养基, 将培养板置于冰上, 加入预冷 PBS 清洗 1 遍。每孔加入 500 μL 预热的 TrypLE™ Express 酶, 用移液枪反复吹打, 以吹散凝固的基质胶, 转移至离心管中, 37 °C 摇床消化 2 min。置于 4 °C 离心机, 1 400 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清。加入预冷 Advanced DMEM/F12 培养基中止消化, 4 °C、1 400 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清。再次加入 10 mL 预冷 Advanced DMEM/F12 培养基, 离心并弃上清, 重复 3 次, 然后重悬于完全培养基和基质胶混合液, 接种, 继续培养。

选取生长活力旺盛的 P3~P4 代类器官进行冻存。与传代方法相似, 经消化、清洗后, 用 1 mL 无血清冻存液重悬类器官沉淀, 放入梯度冻存盒, 于 -80 °C 放置 24 h 后转移至液氮长期保存。

### 2.3 类器官观察

取出待观察的培养板, 静止后, 使用倒置显微镜动态观察不同患者来源、不同培养时间点 (D0~D5)、不同传代代次 (P0~P5)、冻存前和复苏后的类器官形态变化。在 4× 物镜下系统观察多个代表性视野以获取类器官的大小、形状、结构、密度、异质等信息, 并初步评价活力; 在 10× 物镜下聚焦代表性的单个类器官精细结构。采集含标尺的显微图像, 标注实验参数, 由 2 名研究者独立观察并评估形态。

### 2.4 苏木精-伊红 (HE) 染色

将类器官消化后, 用含 10% 中性甲醛溶液重悬类器官沉淀, 并固定过夜。200×g 室温离心 30 s, 弃甲醛上清。200 μL 融化的琼脂糖凝胶-伊红染液重悬类器官, 迅速轻轻吹打混匀, 于 4 °C 冰箱中固化琼脂糖。取凝固的琼脂糖-类器官块, 浸泡在 10% 中性甲醛溶液, 固定过夜。腺瘤源组织经 4% 多聚甲醛固定过夜。琼脂糖-类器官块和腺瘤组织进行程序脱水, 石蜡包埋后, 制作 5 μm 切片, 经二甲苯脱

蜡，梯度乙醇和水进行水化，苏木精染色，盐酸乙醇分化，氨水反蓝，再梯度乙醇脱水，伊红染色，二甲苯透明，最后中性树脂封片。

### 2.5 外显子组测序

消化类器官后提取基因组 DNA，琼脂糖凝胶电泳分析 DNA，去除 RNA、蛋白质污染以及降解的 DNA，将含量在 0.3 μg 以上的 DNA 样品用以建库。使用 Illumina 公司的 TruSeq DNA PCR-free prep kit 试剂的标准建库流程制备测序文库，对提取的 DNA 进行超声随机打断和序列末端修复，连接目标序列和测序接头，经 PCR 扩增和磁珠富集纯化测序文库，通过琼脂糖凝胶电泳对文库做最终的片段选择和纯化。上机测序前，经文库质检和定量，将合格的测序文库梯度稀释，根据所需测序量按相应比例混合，并经 NaOH 变性为单链，使用 NovaSeq 测序仪将构建好的文库上机，进行 2×150 bp 的双端测序。数据分析包括测序数据质量和变异检测。

### 2.6 类器官活力测定

将类器官消化成单细胞后接种于 384 孔板中，24 h 后分别加入含浓度梯度为 1 000.00、100.00、10.00、1.00、0.10、0.01 μmol·L<sup>-1</sup> 的盐酸小檗碱、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、黄芩素、异甘草素、大黄素、姜黄素、丹参酮 II<sub>A</sub> 的培养基，含有 0.1% DMSO 培养基作为对照组，给药 72 h 后，CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 试剂盒检测细胞存活率，并使用高内涵智能分析仪拍照，记录类器官形态变化。

### 2.7 统计学方法

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示，两组间差异比较用 *t* 检验或秩和检验，多组之间差异比较采用 ANOVA 或非参数检验，多重检验校正采用 Tukey 或 Dunn's 检验。所有数据用 GraphPad Prism 8.0S 软件进行处理，并绘制图表。

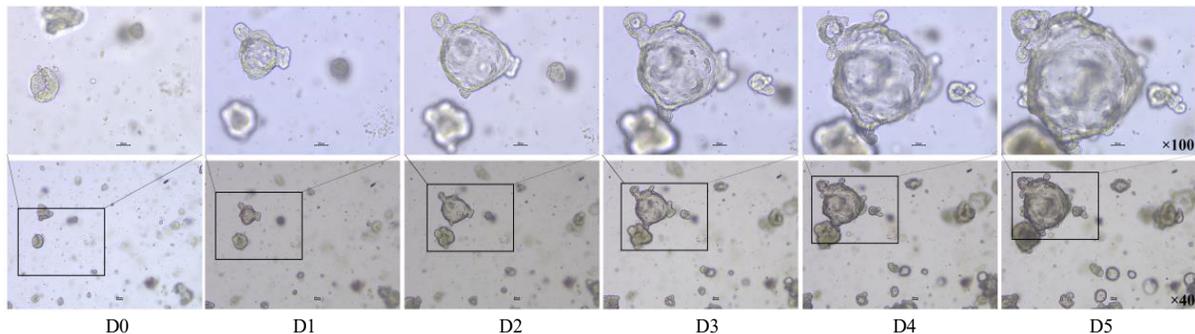


图 2 高倍和低倍视野下典型的 CRA 复发类器官生长图

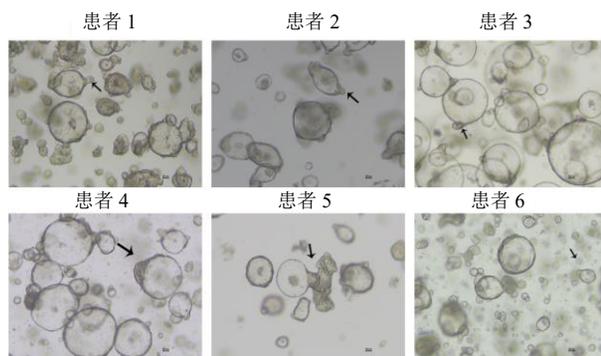
Fig. 2 Representative images of recurrent CRA organoids under high- and low-magnification views

## 3 结果

### 3.1 类器官模型的建立与优化

构建了来自不同患者的 CRA 复发类器官模型（图 1），观察生长趋于稳定的第 2 代第 5 天（P2D5）的类器官生长情况，结果发现，不同患者的 CRA 复发类器官形态具有一定差异，但多以内部透亮、近圆的囊样结构为主，且囊壁多有向外侧隆起的蕈状结构（黑色箭头），这与 CRA 突出肠腔的形态具有相似性。

如图 2 所示，典型的 CRA 复发类器官内部含有大小不等、分布不均的颗粒状代谢物，内部相对透亮；囊壁有一定厚度，内外层囊壁间为厚度、亮度不均的实质，内层囊壁相对光滑，外层囊壁有一个或多个向外侧隆起的蕈状结构。此外，CRA 复发类器官能够稳定传代、冻存和复苏，培养 5 代以内的 CRA 复发类器官（图 3），以及冻存再复苏后的类器官（图 4），其形态结构均能保持一致。因此，CRA 复发类器官模型的建立方法和类器官生长的稳定性，为后续中药活性成分筛选提供了保障。



黑色箭头指示 CRA 复发类器官向外侧隆起的蕈状结构。

Black arrows indicate outward-bulging mushroom-shaped protrusions.

图 1 6 例患者来源的 CRA 复发类器官 P2D5 培养形态 (×40)

Fig. 1 Representative morphology of recurrent CRA organoids derived from six distinct patients at P2D5 (×40)

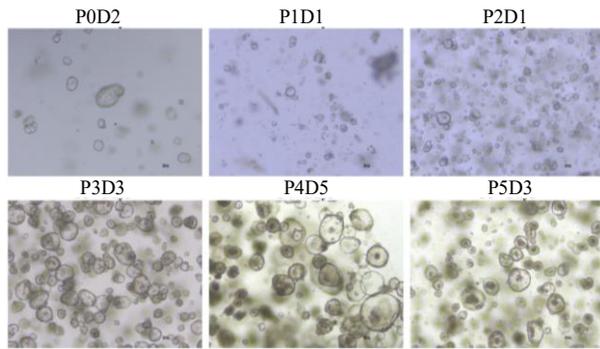


图 3 同一患者来源的 CRA 复发类器官 P0~P5 的培养形态 (×40)

Fig. 3 Serial culture morphology of recurrent CRA organoids (derived from a single patient) across P0 to P5 (×40)

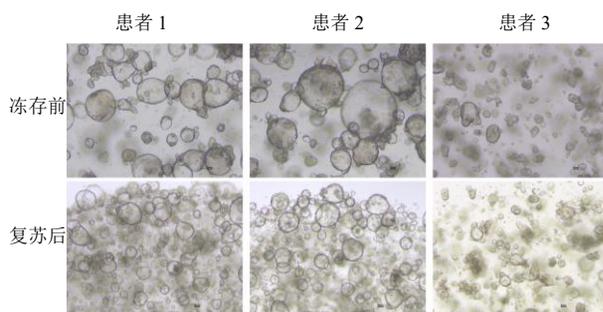


图 4 3 例患者来源的类器官冻存前和复苏后的培养形态 (×40)

Fig. 4 Comparative morphology of pre-cryopreservation versus post-recovery organoids derived from three independent recurrent CRA patients (×40)

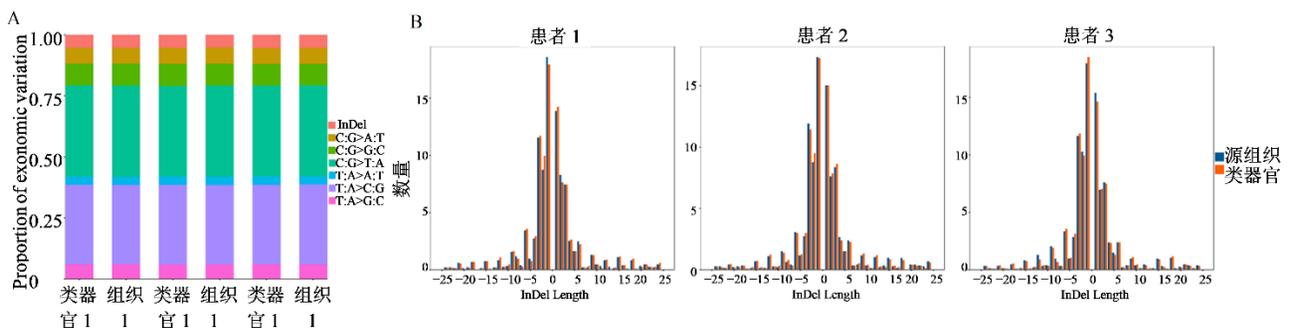


图 6 3 例类器官与源组织间 SNV+InDel 类型比例图(A)和 InDel 长度分布图(B)

Fig. 6 Three cases of proportion of SNV+InDel types (A) between organoids and source tissues and distribution of InDel length (B)

### 3.3 潜在中药活性成分对类器官的活性评价

基于已构建 CRA 复发类器官, 选取 6 例分别给予不同浓度的盐酸小檗碱、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、大黄素、姜黄素、丹参酮II<sub>A</sub>、黄芩素和异甘草素, 记录不同浓度下典型的类器官形态并绘制半数抑制浓

### 3.2 类器官的鉴定与验证

采用 HE 染色和人外显子组测序分析 CRA 复发类器官与源组织的一致性。如图 5 所示, 同一患者来源的 CRA 复发类器官和源组织, 在组织病理学形态上基本一致性。选取 3 例进一步验证 CRA 复发类器官与源组织在基因方面的一致性, 结果显示, 每组类器官与源组织之间的突变类型[单核苷酸变异 (SNV) + 插入/缺失 (InDel)]比例基本一致 (图 6-A), 插入/缺失突变的长度和比例具有高度相似性 (图 6-B); 拷贝数变异检测分析显示类器官与源组织之间具有较高的拷贝变异数相似性, 不同患者间的差异明显 (图 7)。结果提示构建的 CRA 复发类器官能维持源组织的组织学和基因学特征。

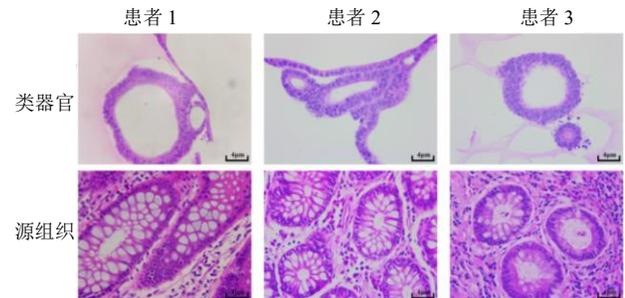


图 5 3 例患者来源的类器官与源组织间的组织病理学形态 (×400)

Fig. 5 Comparative histopathological morphology between patient-derived organoids and matched source tissues from three recurrent CRA cases (×400)

度 (IC<sub>50</sub>) 曲线。如图 8、9 所示, 7 种中药活性成分均可剂量相关性地抑制 CRA 复发类器官的生长, IC<sub>50</sub> 值见表 1, 不同患者的 CRA 复发类器官对药物的敏感性有所差异; 而与其他活性成分相比, 大黄素 IC<sub>50</sub> 平均值最小, 个体敏感性的差异也最小, 黄

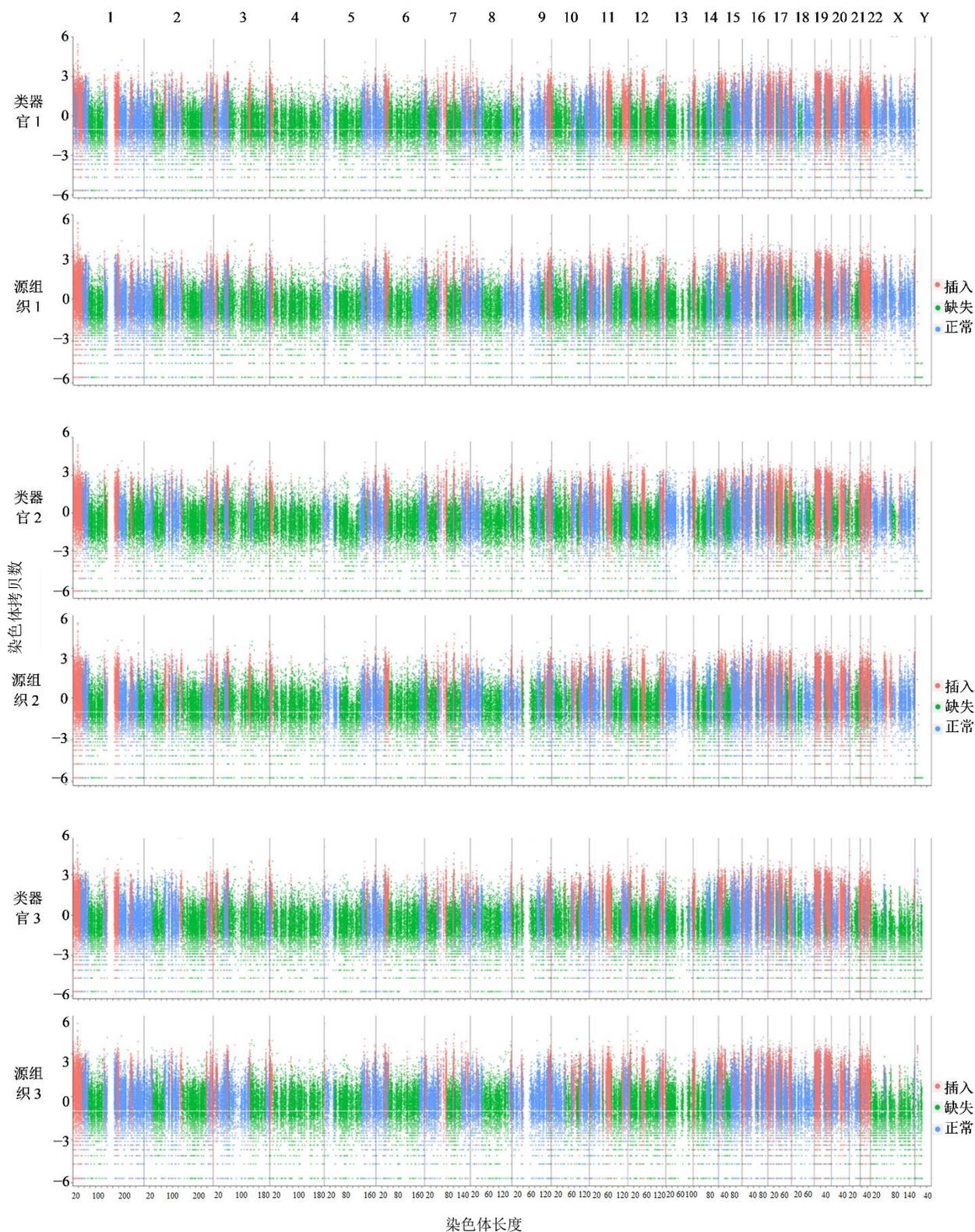


图 7 3 例类器官与源组织间拷贝数变异示意图

Fig. 7 Schematic representation of copy number variation profiles between patient-derived organoids and matched source tissues from three recurrent CRA cases

芩素均次之，且大黄素和黄芩素的  $IC_{50}$  均值显著小于姜黄素和丹参酮II<sub>A</sub> ( $P < 0.01$ )。因此，基于 CRA

复发类器官的有效性评价，推测大黄素和黄芩素对抑制 CRA 复发有较好疗效。

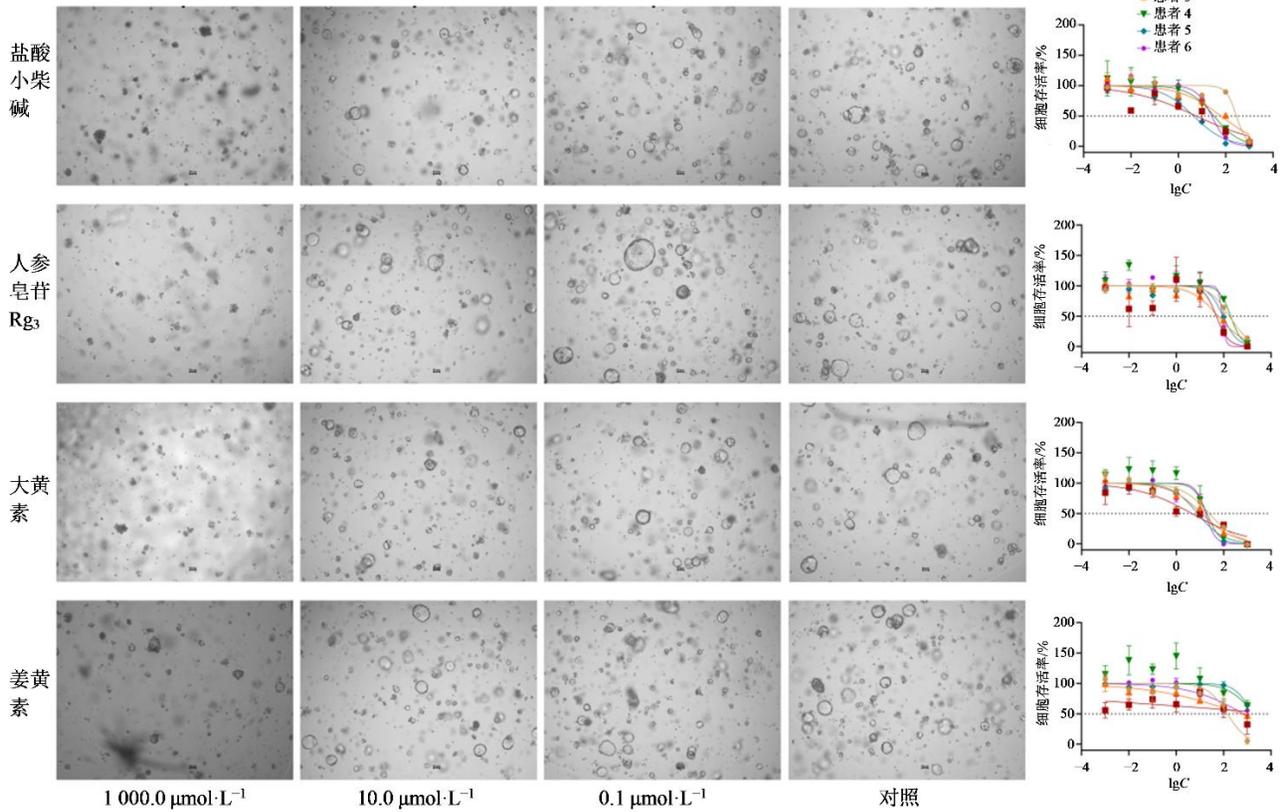


图 8 不同浓度盐酸小檗碱、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、大黄素和姜黄素对类器官的形态影响和活性抑制曲线

Fig. 8 Concentration-dependent effects of berberine, ginsenoside Rg<sub>3</sub>, emodin, and curcumin on recurrent CRA organoids morphology and viability

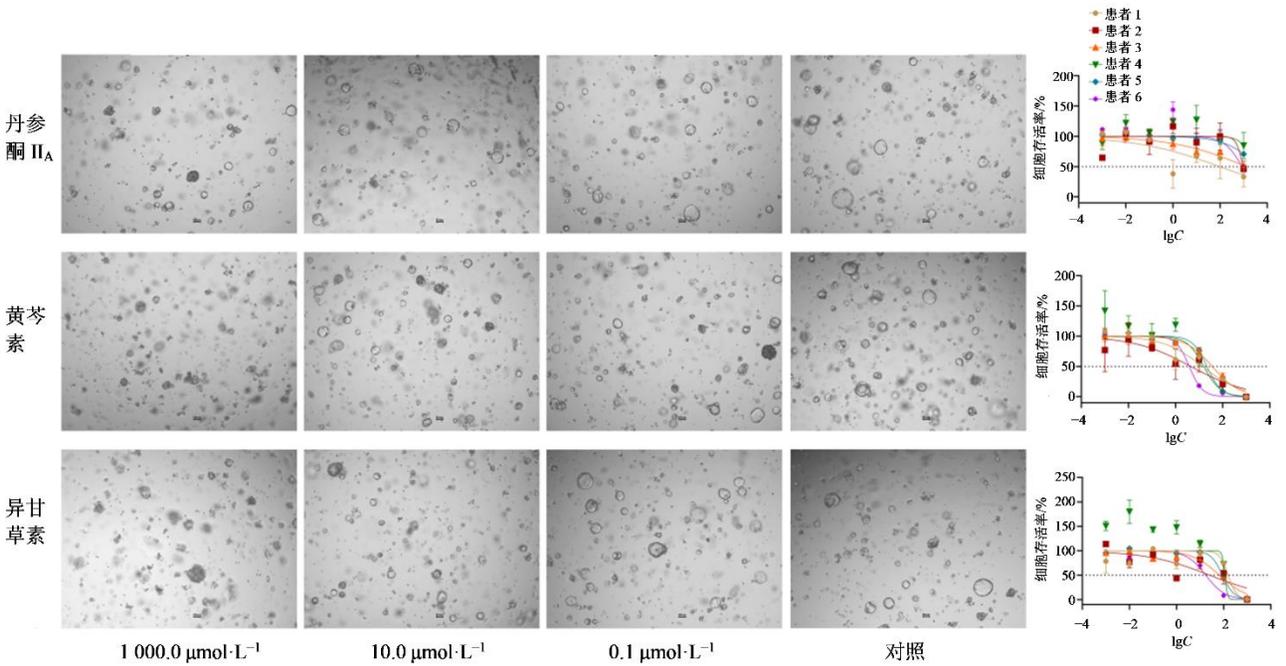


图 9 不同浓度丹参酮II<sub>A</sub>、黄芩素和异甘草素对类器官的形态影响和活性抑制曲线

Fig. 9 Concentration-dependent effects of tanshinone II<sub>A</sub>, baicalin, and isoliquiritigenin on recurrent CRA organoids morphology and viability

表 1 潜在中药活性成分对 CRA 复发类器官增殖抑制作用的 IC<sub>50</sub> 值

Table 1 IC<sub>50</sub> values of potential TCM active compounds for anti-proliferative effects in recurrent CRA organoids

活性成分	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )						均值/(μmol·L <sup>-1</sup> )	标准误差	95%置信区间
	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5	患者 6			
盐酸小檗碱	287.5	5.8	62.9	32.4	4.5	25.7	69.79±108.77	44.40	4.45~287.50
人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	177.0	49.4	58.2	198.7	94.6	87.6	110.92±62.36	25.46	49.45~198.70
大黄素	24.7	4.5	11.9	19.7	8.0	17.1	14.33±7.56	3.08	4.54~24.68
姜黄素	142.6	21 243.0	547.7	1 872.0	1 603.0	703.8	4 352.02±8 300.78* <sup>△</sup>	3 388.78	142.60~21 243.00
丹参酮II <sub>A</sub>	95.1	952.6	1 287.0	2 989.0	4 450.0	864.1	1 772.97±1 624.54* <sup>△</sup>	663.21	95.13~4 450.00
黄芩素	14.1	4.5	36.1	16.0	21.6	3.9	16.01±12.01	4.90	3.85~36.12
异甘草素	158.0	25.6	66.7	113.3	89.8	17.5	78.48±53.5	21.84	17.50~158.00

与大黄素比较: \*P<0.01; 与黄芩素比较: <sup>△</sup>P<0.01。

\*P<0.01 vs emodin; <sup>△</sup>P<0.01 vs baicalein.

#### 4 讨论

研究表明,在正常组织-CRA-CRC 途径中,CRA 作为良恶病变的过渡阶段具有严格的生态位因子依赖性,因而难以提取稳定的细胞系<sup>[14-15]</sup>。因此,Sato 等<sup>[12]</sup>率先使用 APC<sup>Min/+</sup>小鼠的腺瘤组织构建了鼠源 CRA 类器官,开发了 CRA 研究的全新模型。但该类器官模型源自基因缺陷小鼠,它产生的腺瘤能模拟人类家族性腺瘤性息肉病(FAP),与临床常见的散发 CRA 存在遗传背景、发病机制及临床表现方面的诸多差异。近年,人源 CRA 类器官培养系统逐渐完善。如 Devall 等<sup>[16]</sup>报道建立了人源 FAP 类器官,Kawasaki 等<sup>[17]</sup>建立了锯齿状腺瘤(SA)的人源类器官和基因编辑的鼠源 SA 类器官模型,Luo 等<sup>[11]</sup>构建了人源高危 CRA 类器官的生物样本库。与上述研究不同,本研究收集内镜下切除后再发多枚腺瘤的 CRA 患者组织,成功构建了人源 CRA 复发类器官模型。经 HE 染色鉴定,该模型能维持源组织的组织学特征。SNV 可能导致基因编码区的改变,从而影响蛋白质的结构和功能;InDel 可能导致基因编码区的框架移位,从而影响蛋白质的结构和功能,经外显子组测序技术鉴定,CRA 复发类器官与源组织 SNV+InDel 类型比例基本一致,这保证了两者蛋白结构和功能的一致性。同样,InDel 突变的长度和比例具有高度相似性也保证了类器官与源组织基因表达调控和功能一致性。拷贝数变异可能导致相关基因的表达剂量增加或减少,从而影响细胞的正常生理功能,CRA 复发类器官与源组织之间较高的拷贝变异数相似性,保证了两者基因剂量和细胞生理功能的一致性。此外,该模型能够稳定传代、冻存和复苏,为研究 CRA 复发的机

制和防治药物筛选提供了可靠的生物模型。

基于文献报道<sup>[18]</sup>,本研究将 7 种潜在中药活性成分分别作用于 6 例人源 CRA 复发类器官,结果提示大黄素、黄芩素和盐酸小檗碱对抑制 CRA 复发有较好疗效。与 CRA 复发类器官药效评价结果一致,既往动物研究结果也显示,大黄素能降低偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)模型中 CRA 发生率,预防 CRC 发生和进展<sup>[19]</sup>。临床研究显示盐酸小檗碱能有效减少 CRA 复发<sup>[6]</sup>,本研究结果也显示 CRA 复发类器官对盐酸小檗碱有较高的敏感性,仅次于大黄素和黄芩素,但个体敏感性差异可能较大。此外,在 1 项针对 FAP 的双盲随机试验中,姜黄素与服用安慰剂的患者相比,腺瘤的平均数量或大小没有差异<sup>[20]</sup>,与之相似,本研究结果也显示姜黄素对 CRA 复发类器官生长的抑制效果较差。这些结果均提示,本研究建立的人源 CRA 复发类器官能准确地预测药物疗效,是可靠的药物筛选模型。

目前,黄芩素、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、异甘草素和丹参酮II<sub>A</sub>都没有直接抑制 CRA 的相关报道。本研究结果显示黄芩素对抑制 CRA 复发有较好疗效,且有研究显示黄芩素能够通过抑制细胞周期、上皮-间质转化和细胞干性的多重抑制来诱导 CRC 细胞凋亡<sup>[21]</sup>。因此,黄芩素可能是预防 CRA 复发的重要活性成分,后续需要多维度评价疗效并深入探讨机制。人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和异甘草素均被证实具有抗癌活性<sup>[22-23]</sup>,本研究结果提示它们对 CRA 复发类器官具一定有抑制作用,但敏感性较低。丹参酮II<sub>A</sub> 虽然能够抑制人结肠癌细胞的增殖和迁移<sup>[24]</sup>,但本研究结果显示其抑制 CRA 复发类器官生长的效果较差。由此推

测, 不同中药成分对于 CRA-CRC 途径中的不同阶段, 疗效作用和机制可能也不同, 需要结合 CRC 类器官进行进一步研究。

本研究为深入探究 CRA 再发的生物学机制和优化 CRC 的防治策略提供了一种新方法学参考。但是, 本研究构建的多为管状腺瘤的 CRA 复发类器官, 组织类型单一。后续可继续完善绒毛状、锯齿状腺瘤等类型的 CRA 复发类器官模型, 为靶向开发针对不同组织类型 CRA 中药提供可能, 为推进中医药在 CRC 癌前预防领域的临床应用奠定基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(3): 221-231.  
Zheng R S, Chen R, Han B F, et al. Analysis of the prevalence of malignant tumors in China in 2022 [J]. Chin J Oncol, 2024, 46(3): 221-231.
- [2] Lieberman D A, Weiss D G, Harford W V, et al. Five-year colon surveillance after screening colonoscopy [J]. Gastroenterology, 2007, 133(4): 1077-1085.
- [3] Gao Q Y, Chen H M, Sheng J Q, et al. The first year follow-up after colorectal adenoma polypectomy is important: A multiple-center study in symptomatic hospital-based individuals in China [J]. Front Med China, 2010, 4(4): 436-442.
- [4] Wada H, Sato Y, Fujimoto S, et al. Resveratrol inhibits development of colorectal adenoma via suppression of LEF1; comprehensive analysis with connectivity map [J]. Cancer Sci, 2022, 113(12): 4374-4384.
- [5] Ni M X, Zhang Y, Sun Z Z, et al. Efficacy and safety of Shenbai Granules for recurrent colorectal adenoma: A multicenter randomized controlled trial [J]. Phytomedicine, 2024, 127: 155496.
- [6] Chen Y X, Gao Q Y, Zou T H, et al. Berberine versus placebo for the prevention of recurrence of colorectal adenoma: A multicentre, double-blinded, randomised controlled study [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(3): 267-275.
- [7] Paraskeva C, Finerty S, Mountford R A, et al. Specific cytogenetic abnormalities in two new human colorectal adenoma-derived epithelial cell lines [J]. Cancer Res, 1989, 49(5): 1282-1286.
- [8] Schutgens F, Clevers H. Human organoids: Tools for understanding biology and treating diseases [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 211-234.
- [9] Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. Science, 2018, 359(6378): 920-926.
- [10] Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology [J]. Science, 2019, 364(6444): 952-955.
- [11] Luo Z G, Wang B T, Luo F F, et al. Establishment of a large-scale patient-derived high-risk colorectal adenoma organoid biobank for high-throughput and high-content drug screening [J]. BMC Med, 2023, 21(1): 336.
- [12] Sato T, Stange D E, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1762-1772.
- [13] 黄楚月, 冷强, 周炳文, 等. 气液交互法构建患者来源的结直肠癌类器官模型及其在扶正类中药多糖活性评价中的应用 [J]. 中草药, 2024, 55(20): 6964-6972.  
Huang C Y, Leng Q, Zhou B W, et al. Establishment of patient-derived colorectal cancer organoids by air-liquid interface and its application in evaluating activity of "Fuzheng" traditional Chinese medicine polysaccharides [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(20): 6964-6972.
- [14] Prasetyanti P R, Zimmerlin C D, Bots M, et al. Regulation of stem cell self-renewal and differentiation by Wnt and Notch are conserved throughout the adenoma-carcinoma sequence in the colon [J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 126.
- [15] Fujii M, Shimokawa M, Date S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(6): 827-838.
- [16] Devall M A, Eaton S, Ali M W, et al. DNA methylation analysis of normal colon organoids from familial adenomatous polyposis patients reveals novel insight into colon cancer development [J]. Clin Epigenetics, 2022, 14(1): 104.
- [17] Kawasaki K, Fujii M, Sugimoto S, et al. Chromosome engineering of human colon-derived organoids to develop a model of traditional serrated adenoma [J]. Gastroenterology, 2020, 158(3): 638-651.e8.
- [18] Sun Q, He M, Zhang M, et al. Traditional Chinese medicine and colorectal cancer: Implications for drug discovery [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 685002.
- [19] Zhang Y S, Pu W L, Bousquenaud M, et al. Emodin inhibits inflammation, carcinogenesis, and cancer

- progression in the AOM/DSS model of colitis-associated intestinal tumorigenesis [J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 564674.
- [20] Cruz-Correa M, Hylind L M, Marrero J H, et al. Efficacy and safety of curcumin in treatment of intestinal adenomas in patients with familial adenomatous polyposis [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 668-673.
- [21] Yang B L, Bai H R, Sa Y L, et al. Inhibiting EMT, stemness and cell cycle involved in baicalin-induced growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11(8): 2303-2317.
- [22] Baba M, Asano R, Takigami I, et al. Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines XXV. Inhibitory effect of isoliquiritigenin on azoxymethane-induced murine colon aberrant crypt focus formation and carcinogenesis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(2): 247-250.
- [23] Yun T K, Lee Y S, Lee Y H, et al. Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds [J]. *J Korean Med Sci*, 2001, 16(Suppl): S6-18.
- [24] Xue J L, Jin X Z, Wan X W, et al. Effects and mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> in proliferation, apoptosis, and migration of human colon cancer cells [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 4793-4800.

[责任编辑 兰新新]