

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

黄楚月¹, 冷强^{1,2,3}, 周炳文^{1,2,3}, 王培^{1,2,3}, 路悦阳^{1,2,3}, 王璐^{1,2,3*}, 樊志敏^{1,2,3*}

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. 南京中医肛肠疾病临床医学研究中心, 江苏 南京 210022

摘要: **目的** 采用气液交互法构建患者来源的结直肠癌类器官, 探索该模型在扶正类中药成分免疫活性评价中的适用性。**方法** 选自南京中医药大学附属南京中医院肛肠中心收治入院的结直肠癌患者术中肿瘤组织, 运用气液交互法构建结直肠癌类器官模型; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色检测结直肠癌组织标本与类器官样本肿瘤组织的形态特点; 采用免疫组化法检测细胞角蛋白 20 (cytokeratin 20, CK20)、重组 Ki-67 蛋白 (recombinant Ki-67 protein, Ki-67)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 表达水平; 采用流式细胞术检测白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖及不同浓度的白术-茯苓多糖联用干预对类器官肿瘤细胞活性及免疫细胞比例的影响。**结果** 患者来源的结直肠癌类器官中含有 T 细胞与 B 细胞, 白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖能够提升类器官肿瘤微环境中 B 细胞的比例, 且白术-茯苓多糖联合使用时, 效果更显著。**结论** 采用气液交互法构建患者来源的结直肠癌类器官能够应用于扶正类中药活性多糖的药效评价, 该模型可为扶正类中药对结直肠癌免疫微环境的调节作用研究提供理论依据及方法学参考。

关键词: 结直肠癌; 类器官; 气液交互法; 免疫微环境; 扶正; 白术多糖; 茯苓多糖; 香菇多糖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)20-6964-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.013

Establishment of patient-derived colorectal cancer organoids by air-liquid interface and its application in evaluating activity of “Fuzheng” traditional Chinese medicine polysaccharides

HUANG Chuyue¹, LENG Qiang^{1,2,3}, ZHOU Bingwen^{1,2,3}, WANG Pei^{1,2,3}, LU Yueyang^{1,2,3}, WANG Lu^{1,2,3}, FAN Zhimin^{1,2,3}

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

2. Jiangsu Clinical Medical Innovation Center for Anorectal Diseases of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210022, China

3. Nanjing Clinical Medical Research Center for Anorectal Diseases of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210022, China

Abstract: Objective To construct organoids derived from colorectal cancer patients using the air-liquid interaction method, the applicability of this model in evaluating immune activity of components of “Fuzheng” traditional Chinese medicine was explored. **Methods** Intraoperative colorectal cancer tumor tissues were obtained from patients admitted to the Anorectal Center of Nanjing Hospital of Chinese Medicine. Organoids from colorectal cancer were constructed by air-liquid interaction method. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect morphological characteristics of colorectal cancer tissue samples and organoids. The expression levels of cytokeratin 20 (CK20), recombinant Ki-67 protein (Ki-67), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by immunohistochemistry. Flow cytometry was used to detect the effects of *Atractylodes macrocephala*, *Poria*

收稿日期: 2024-06-03

基金项目: 江苏省重点研发计划 (社会发展) 项目 (BE2021611); 南京中医药大学自然科学基金项目 (XZR2021044)

作者简介: 黄楚月, 博士研究生, 研究方向为中西医结合治疗结直肠肛门外科疾病及类器官研究。E-mail: huangchuyue@163.com

*通信作者: 樊志敏, 主任中医师, 博士生导师, 从事中西医结合治疗结直肠肛门外科疾病及类器官研究。E-mail: fanzm@njucm.edu.cn

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

cocos, *Lentinus edodes* polysaccharides and different concentrations of *A. macrocephala* koidz and *P. cocos* polysaccharides combined on the activity of organoid tumor cells and the proportion of immune cells. **Results** The patient-derived colorectal cancer organoids contained both T cells and B cells. Treatment with *A. macrocephala*, *P. cocos*, *L. edodes* polysaccharides led to an increase in the proportion of B cells within the tumor microenvironment of the organoids. This effect was more pronounced when the two polysaccharides, *A. macrocephala* and *P. cocos* polysaccharides, were combined. **Conclusion** The air-liquid interaction method can be applied to construct patient-derived colorectal cancer organoids for evaluating the efficacy of active polysaccharides from “Fuzheng” traditional Chinese medicine. This model can provide theoretical and methodological support for further study of the regulatory effects of “Fuzheng” traditional Chinese medicine on the immune microenvironment of colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; organoid; air-liquid interaction method; immune microenvironment; FuZheng; *Atractylodes macrocephala* Koidz. polysaccharides; *Poria cocos* (Schw.) Wolf polysaccharides; *Lentinus edodes* polysaccharides

近年来,免疫疗法的兴起为肿瘤治疗带来新的曙光。目前的免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、癌症疫苗、细胞因子、过继细胞治疗等^[1]。研究表明,中药在改善肿瘤恶病质、提升机体免疫力、缓解不良反应、预防治疗并发症、防治复发转移、延长生存期等方面具有显著优势^[2-3]。扶正类中药已被证实可以通过增强机体免疫杀伤能力、拮抗肿瘤抑制性免疫细胞的活化发挥双向抗肿瘤作用^[4],而多糖类成分是其发挥免疫功能的主要活性群之一。常见的扶正类中药活性多糖,例如香菇多糖、白术多糖、茯苓多糖等,能够促进淋巴细胞增殖分化,介导 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等通路,调节机体免疫反应,改善肿瘤微环境中的免疫失衡,发挥抗肿瘤作用^[5-7]。

目前,扶正类中药的体外活性评价模型尚不完善,常规的细胞共培养模型中细胞类型单一,且与组织间存在遗传差异^[8],患者来源的异种移植瘤模型成本高、建模耗时长、成功率低,机体间的差异影响结果的准确性,难以实现临床转化。采用气液交互法 (air-liquid interface, ALI) 培养的各类器官模型^[9]的出现很好地填补了这一空缺。这种不需要人工重建就可以还原供体组织肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 中不同免疫细胞亚群的临床前模型,在重现源组织结构与功能的同时,还能保留肿瘤特异性的肿瘤浸润淋巴细胞群,使靶向 TIME 治疗的实现成为可能。因此,本研究旨在构建一种能够再现结直肠癌患者 TIME 的体外模型,用于评价几种扶正类中药多糖成分 (包括香菇多糖、白术多糖、茯苓多糖) 在肿瘤免疫调节中的作用,同时验证 ALI 类器官模型的可操作性与科学性,为中医“扶正”治疗结直肠癌的科学内涵的阐释提供参考。

1 材料

1.1 组织样本

本研究所涉及的结直肠癌患者肿瘤组织均来自南京中医药大学附属南京中医院肛肠中心入院进行手术治疗的成年患者,其术前经活体组织病理学检查确诊为结、直肠癌。本研究已获得南京市中医院伦理委员会批准 (批准号 KY2021048),所有样本的病理分析均在本院病理科进行。

1.2 药品与试剂

重组蛋白 R-spondin-1 (批号 0333119PB08)、Noggin (批号 0332678NF047a)、Wnt3a (批号 0332957NM025)、重组人表皮生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, EGF, 批号 0333001PF09) 均购自近岸蛋白质科技有限公司; CellmatrixTypeI-A (批号 231227) 购自日本 FUJIFILM Wako Chemicals 公司; IV 型胶原酶 (批号 LS004212) 购自美国 Worthington 公司; F-12 营养混合粉末 (批号 21700075)、HEPES 缓冲液 (批号 5630-080) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS, 批号 20240109) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; DMEM/F-12 培养基 (批号 6123201)、B27 添加剂 (不含维生素 A, 批号 2584581)、添加剂 N₂ (批号 2584667)、TrypLe™ Express (批号 2783466)、氢氧化钠 (NaOH, 批号 A4782901) 均购自美国 Gibco 公司; A83-01 抑制剂 (批号 178866)、Y-27632 抑制剂 (批号 1103326)、p38 抑制剂 SB-202190 (批号 157161)、纳武利尤单抗 (批号 HY-P9903)、伊匹木单抗 (批号 HY-P9901)、布雷非德菌素 A (Brefeldin A, BFA, 批号 HY-16592) 均购自美国 MCE 公司; 烟酰胺 (批号 153816)、N-乙酰半胱氨酸 (批号 235861)、碳酸氢钠 (NaHCO₃, 批号 792519) 均购自美国 Sigma 公司; 重组 Ki-67 蛋

白 (recombinant Ki-67 protein, Ki-67) 抗体 (批号 AC240227046)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号 00152744)、CD3 抗体 (批号 Ab16669)、CD20 抗体 (批号 Ab64088) 均购自英国 Abcam 公司; 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (批号 GR244165-31) 购自美国 Bioworld 公司; CryoStor® CS10 冻存液 (批号 23010) 购自加拿大 Stemcell 公司; 4%多聚甲醛 (批号 23179318) 购自北京 Biosharp 公司; 颗粒酶 B (granzyme B, GZMB) 抗体 (批号 396406)、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 抗体 (批号 501420)、CD3 抗体 (批号 300442)、CD8 抗体 (批号 344732)、CD19 抗体 (批号 302238)、CD45 抗体 (批号 304037)、Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (批号 423106)、FITC Annexin V (批号 640945) 购自美国 BioLegend 公司; 青霉素-链霉素 (批号 C0222) 购自上海碧云天生物技术公司; 一水合柠檬酸 (批号 20210529)、二水合柠檬酸钠 (批号 20220531)、苏木素 (批号 20231009)、伊红染液 (批号 20210113) 购自南京伊尔美生物科技有限公司; Polymer-HRP 抗兔二抗试剂盒 (批号 20240115) 购自湖南艾方生物科技有限公司; 二甲苯 (批号 20240123)、无水乙醇 (批号 20240507) 购自上海沪试实验室器材股份有限公司; 中性树胶 (批号 20240308) 购自国药集团化学试剂有限公司; DAB Kit (批号 2309180031F) 购自福州迈新生物科技有限公司; 香菇多糖 (批号 CY220719, 质量分数 95%)、白术多糖 (批号 CY220305, 质量分数 98.07%) 购自慈缘生物技术有限公司; 茯苓多糖 (批号 JS238441, 质量分数 80%) 购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 仪器

Heracell 150i 型细胞恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), NU-543-400S 型超净工作台 (美国 NuAire 公司), Velocity 18R 型多功能高速冷冻离心机 (英国 Dynamica 公司), TS2-S-SM 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司), DM500 型透射电子显微镜 (德国 Leica 公司), BD FACSCelesta 型多色流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 完全培养基配制

在 DMEM/F-12 培养基中依次加入 200 ng/mL 的 Wnt3a、R-spondin-1、Noggin, 随后加入 10 mmol/L 烟

酰胺、1 mmol/L *N*-乙酰半胱氨酸、1×B27 添加剂 (不含维生素 A)、1×添加剂 N₂、0.5 mmol/L A83-01、1×青霉素-链霉素混合溶液、10 mmol/L SB-202190、50 ng/mL EGF, 混合均匀, 于 4 °C 冰箱保存^[9]。

2.2 类器官培养

2.2.1 取样及前处理 待肿瘤组织切除离体后, 在实体肿瘤中央或周围区域采集肿瘤组织, 大小约 1 cm³, 避开坏死组织。将获得的样本置于提前预冷的 PBS 溶液中。

2.2.2 凝胶制备 在 4 °C 的条件下, 将 F-12 营养混合粉末溶解于 100 mL 超纯水, 将 0.05 mol/L NaOH、200 mmol/L HEPES、2.2 g NaHCO₃ 溶解于 100 mL 超纯水, 将胶原蛋白基质与二者依次混匀, 混合比例为 8:1:1, 避免产生气泡, 置于冰上防止凝固^[9]。在超净台中, 将 30 mm Transwell 小室插入 6 孔板中, 取 1 mL 重组胶原蛋白凝胶溶液均匀铺在小室底层, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中凝固 30 min。

2.2.3 类器官构建 将肿瘤组织依次在含有抗生素的 PBS 和 DMEM/F-12 培养基中多次清洗, 洗净后将肿瘤组织在冰上切碎, 重悬于含有抗生素的 DMEM/F-12 培养基中, 4 °C、800 r/min 离心 5 min, 弃上清。将获得的细胞悬液重悬于 1 mL 胶原蛋白凝胶中, 均匀地铺设在底部凝胶的上层, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中凝固, 凝固后, 每孔加入 1.0~1.5 mL 完全培养基, 使培养基液面没过底部凝胶层, 而不超过含有细胞悬液的上层, 从而形成气体与液体相互交换的培养环境, 置于细胞培养箱中培养。

2.3 类器官的传代与冻存

2.3.1 传代 通常 2 d 更换 1 次培养基, 7~14 d 传代。当观察到类器官生长过密或细胞中央区域颜色变黑时可进行传代。在无菌条件下, 将 Transwell 小室中的凝胶剥离, 并移至 15 mL 离心管中, 加入 1.5 mL 300 μ g/mL IV 型胶原酶, 置于培养箱中消化 30 min, 吹打, 使消化液与类器官混合均匀, 并吹散凝固胶体, 终止消化后 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬, 继续培养。

2.3.2 冻存 消化后重悬于 CryoStor® CS10 冻存液中, 转移至梯度冻存盒, 置于 -80 °C 冰箱中 24 h 后, 转移至液氮中长时间储存。

2.4 类器官的鉴定

将培养在 6 孔板内的类器官样本置于 4%多聚甲醛室温固定过夜, 双蒸水漂洗, 梯度乙醇脱水, 脱水后, 将样本取出, 单层卷纸包裹放置, 在凝胶

周围标记定位,透明、浸蜡、石蜡包埋切片,切片厚度 3 μm 。手术离体后的新鲜肿瘤组织直接浸泡于 4%多聚甲醛中,常规固定、脱水、包埋、切片。脱蜡、水化后加入苏木素染色,清洗附着染料,0.5%盐酸乙醇分化 30 s,温水返蓝后伊红染色,清水浸泡、常规脱水、透明、封片,于显微镜下观察并拍照。

将肿瘤组织切片和类器官切片烘烤过夜、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、抗原修复、自然冷却、室温封闭,CK20 一抗孵育、二抗孵育、PBS 洗涤 3 次后,在切片中加 100 μL DAB 溶液显色,蒸馏水冲洗后苏木素染色 2 min,流水冲洗 5 min 返蓝,蒸馏水洗 1 min,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。同法获得 Ki-67、PCNA、 α -SMA、CD3、CD20 切片,于显微镜下观察并拍照。

2.5 类器官分组

依据预实验,选取长势较好的 ALI 类器官用于药物检测,将 ALI 类器官依照“2.3.1”项下的消化流程进行消化,均匀地接板至不同的培养皿中培养。消化后的 ALI 类器官分为对照组、香菇多糖(450 $\mu\text{g/mL}$)组、白术多糖(50 $\mu\text{g/mL}$)组、茯苓多糖(100 $\mu\text{g/mL}$)组、白术多糖与茯苓多糖联用低(16.33+33.33) $\mu\text{g/mL}$ 、中(50.00+100.00) $\mu\text{g/mL}$ 、高(150.00+300.00) $\mu\text{g/mL}$ 剂量组和纳武利尤单抗联合伊匹木单抗(10.00+3.33) $\mu\text{g/mL}$ 组,除对照组外,各给药组分别使用对应药物的

含药完全培养基培养,对照组使用“2.1”项下配制的完全培养基培养。给药 1 周,期间换液 2 次。

2.6 流式检测

药物干预结束后,使用含 BFA 的培养基处理类器官 6 h,依照“2.3.1”项下类器官消化流程进行消化,15 min 后加入 2 mL DMEM/F-12 培养基吹打,将凝胶吹散,静置,待大块组织沉底后,收集上清至新的离心管中,暂存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。在含有大块组织的离心管中加入 1 mL TrypLe™ Express 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化 15 min,直至消化成单细胞。将 2 个离心管中的细胞悬液混合,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min 收集单细胞。使用 Zombie Aqua 和 Annexin V 进行孵育,判断肿瘤细胞状态。随后使用 CD3、CD8、CD45、CD19 抗体孵育,4%多聚甲醛固定 10 min 后,进行细胞内 IL-10 和 GZMB 抗体染色,采用流式细胞仪检测类器官中肿瘤细胞凋亡情况及免疫细胞亚群。

3 结果

3.1 气液交互式类器官模型的建立与优化

如图 1 所示,不同患者来源的结直肠癌组织所形成的类器官呈现出不规则的结构特点,类器官结构致密、中央深厚、轮廓清晰、边界分明。除 ALI 法外,本研究同时使用浸没式基质胶培养法构建三维(three-dimensional, 3D)类器官^[10],如图 2 所示,3D 类器官早期多见短棒样结构,随着培养时间延长,逐渐呈现出“空泡状”的薄壁囊性结构。

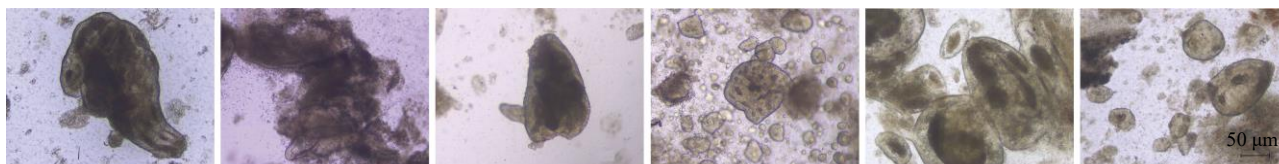


图 1 6 例不同患者来源的类器官培养形态

Fig. 1 Morphology of organoids derived from six different patients during culture

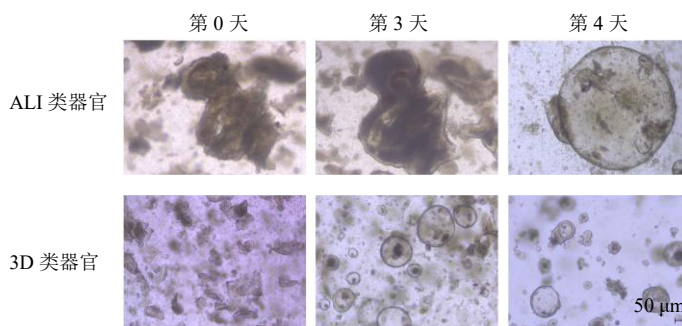


图 2 同一患者不同培养条件下类器官形态

Fig. 2 Organoid morphology in same patient under different culture conditions

3.2 气液交互式类器官的鉴定与验证

为进一步考察类器官与源肿瘤组织在形态结构、肿瘤及免疫相关标志物上的表达的一致性,本研究使用 HE 染色、免疫组化法对类器官及其来源肿瘤组织进行检测。如图 3 所示, HE 染色结果显示,类器官能够保持源肿瘤组织的形态特点,与源组织在形态学上保持一致。免疫组化结果表明,类器官在肿瘤相关标志物 CK20、Ki-67、PCNA、 α -SMA 的表达

与结直肠癌肿瘤组织保持高度一致,其中 CK20、Ki-67、PCNA 均呈阳性, α -SMA 均呈阴性。

ALI 类器官模型与 3D 类器官的不同之处在于,前者能够于体外重现 TIME。因此,本研究分别选取 CD3、CD20 作为 T、B 细胞的标志物对类器官及其对应的源肿瘤组织进行免疫组化染色,结果如图 4、5 所示,ALI 类器官能够较好的保留肿瘤组织的免疫细胞,而 3D 类器官中未见明显免疫细胞表达。

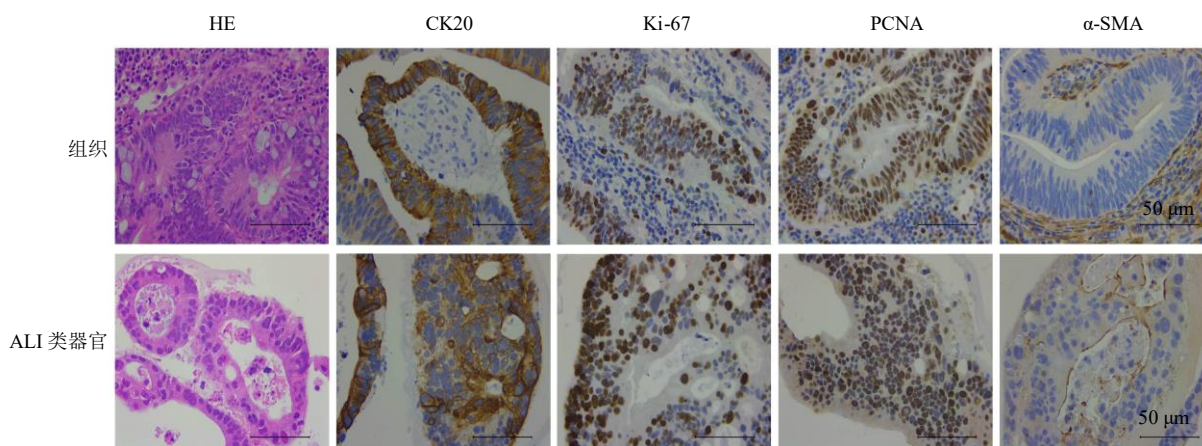


图 3 原发结直肠癌组织与类器官组织结构特点及表面 CK20、Ki-67、PCNA、 α -SMA 表达情况 ($\times 400$)

Fig. 3 Structural characteristics and surface expression of CK20, Ki-67, PCNA and α -SMA in primary colorectal cancer tissue and organoid ($\times 400$)

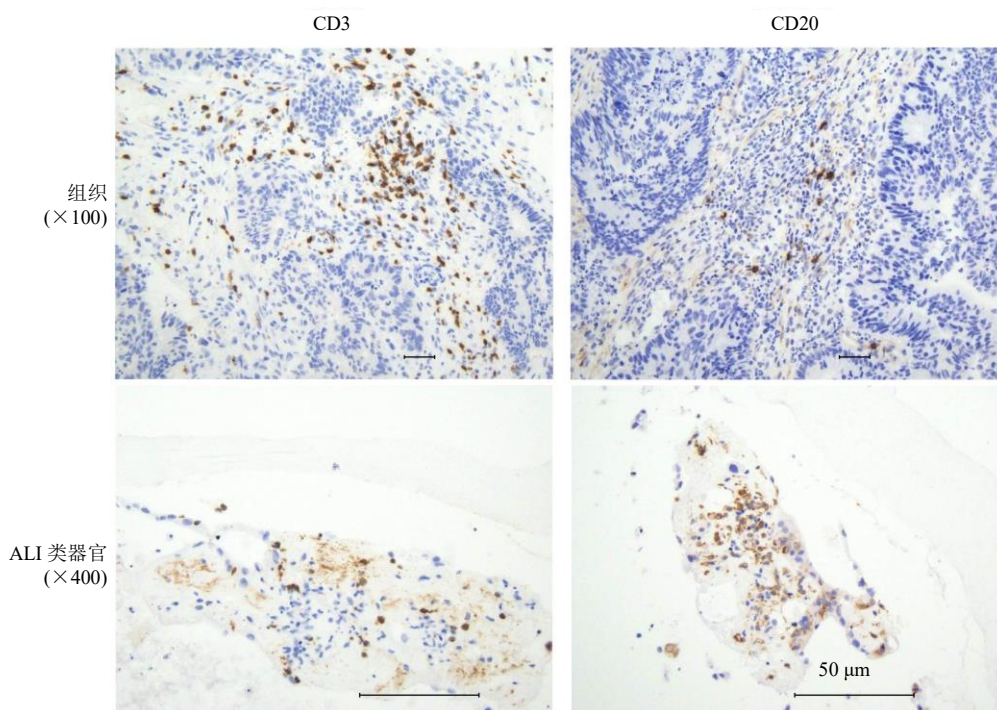


图 4 原发结直肠癌组织与类器官免疫细胞表达情况

Fig. 4 Expression of immune cells in primary colorectal cancer tissue and organoid

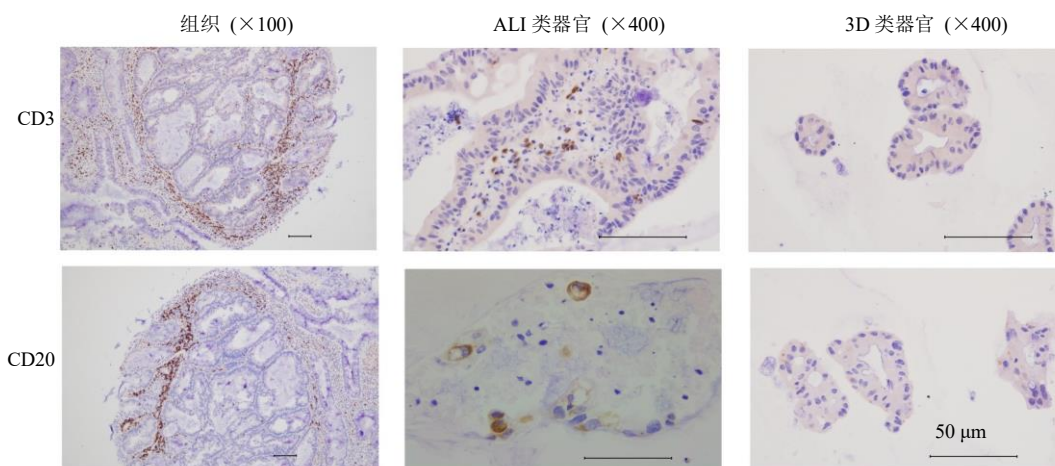


图 5 原发结直肠癌组织与不同培养条件下的类器官免疫细胞表达情况

Fig. 5 Immune cell expression in primary colorectal cancer tissue and organoids under different culture conditions

3.3 中药活性多糖对气液交互式类器官的影响

采用流式细胞术对中药多糖白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖以及纳武利尤单抗联合伊匹木单抗干预前后的类器官中肿瘤细胞凋亡情况及免疫细胞亚群进行了鉴定与分析。如图 6 所示，白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖对于结直肠癌类器官免疫微环境中 B 细胞的抗肿瘤性具有明显的促进作用，其中呈正相关的 GZMB 显著上升、呈负相关的 IL-10 下降。白术多糖与茯苓多糖以不同质量浓度梯度联合干预后发现，类器官免疫微环境中 B 细胞的抗肿瘤效用呈现出不同程度的上升趋势，当白术多糖质量浓度达 $16.67 \mu\text{g/mL}$ 、茯苓多糖质量浓度达 $33.33 \mu\text{g/mL}$ 时，二者联用的抗肿瘤效果最显著。同时，如图 7 所示，干预后的类器官中肿瘤细胞的凋亡率上升，说明白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖杀伤肿瘤的作用可能与提升 B 细胞的抗肿瘤能力有关。

4 讨论

扶正类的中药多通过调节免疫功能、增强免疫检查点阻断剂的疗效^[11-12]等环节发挥抗肿瘤作用。现阶段，包含扶正类中药在内的免疫调节药物的药效学评价常有赖于细胞共培养模型及动物成瘤模型，传统的平面细胞培养模型缺乏遗传信息表征和细胞间相互影响所需的结构，动物模型无法规避种属差异问题^[13-14]。类器官作为近年来新兴的体外研究模型，在药物评价、疾病研究、转化医学等领域展现出独特的应用前景。传统的类器官培养模式为浸没式基质胶培养的 3D 类器官，这种基于患

者自身肿瘤组织构建的体外模型，能够还原一定的组织生理功能并保留原生组织的异质性，拥有再生、分化、重组的能力^[15-16]，但仅代表源肿瘤组织的上皮部分^[14]，缺乏免疫细胞。ALI 类器官因其能在体外实现气体与液体的交换，改善细胞氧合，提升氧气传输效率^[9]，能够在维持亲代组织的功能结构及生物学特性的同时，保留肿瘤特异性的免疫细胞亚群。与传统的体外模型相比，类器官更接近于人体，能够反映人体器官的部分生物学特性，同时克服体内模型无法实现高通量药物敏感性筛查的弊端，为免疫治疗提供体外研究新策略，同时也为扶正类中药免疫活性评价提供参考。

本研究采用 ALI 法成功构建患者来源的结直肠癌类器官模型，并对其及供体组织在病理学层面进行比对，发现 ALI 类器官与源组织在形态学、肿瘤标志物及免疫细胞表达上保持高度一致，在确保细胞活力的同时，稳健地维持亲代组织的微环境与空间结构，使得 TIME 的体外再现成为现实。这种模型的出现，为深入探索免疫药物作用机制、开发新型免疫制剂提供帮助，也为提前预测癌症患者的免疫治疗反应提供平台，加速个性化精准治疗的实现，能够在一定程度上提升结直肠癌的诊疗效果。

本研究以免疫检查点抑制剂纳武利尤单抗和伊匹木单抗联用作为阳性对照，评价白术多糖、香菇多糖、茯苓多糖及白术与茯苓多糖联用对 ALI 类器官的活性及免疫细胞比例的影响。结果表明，4 种药物组合对 ALI 类器官均有生长抑制作用。经中药

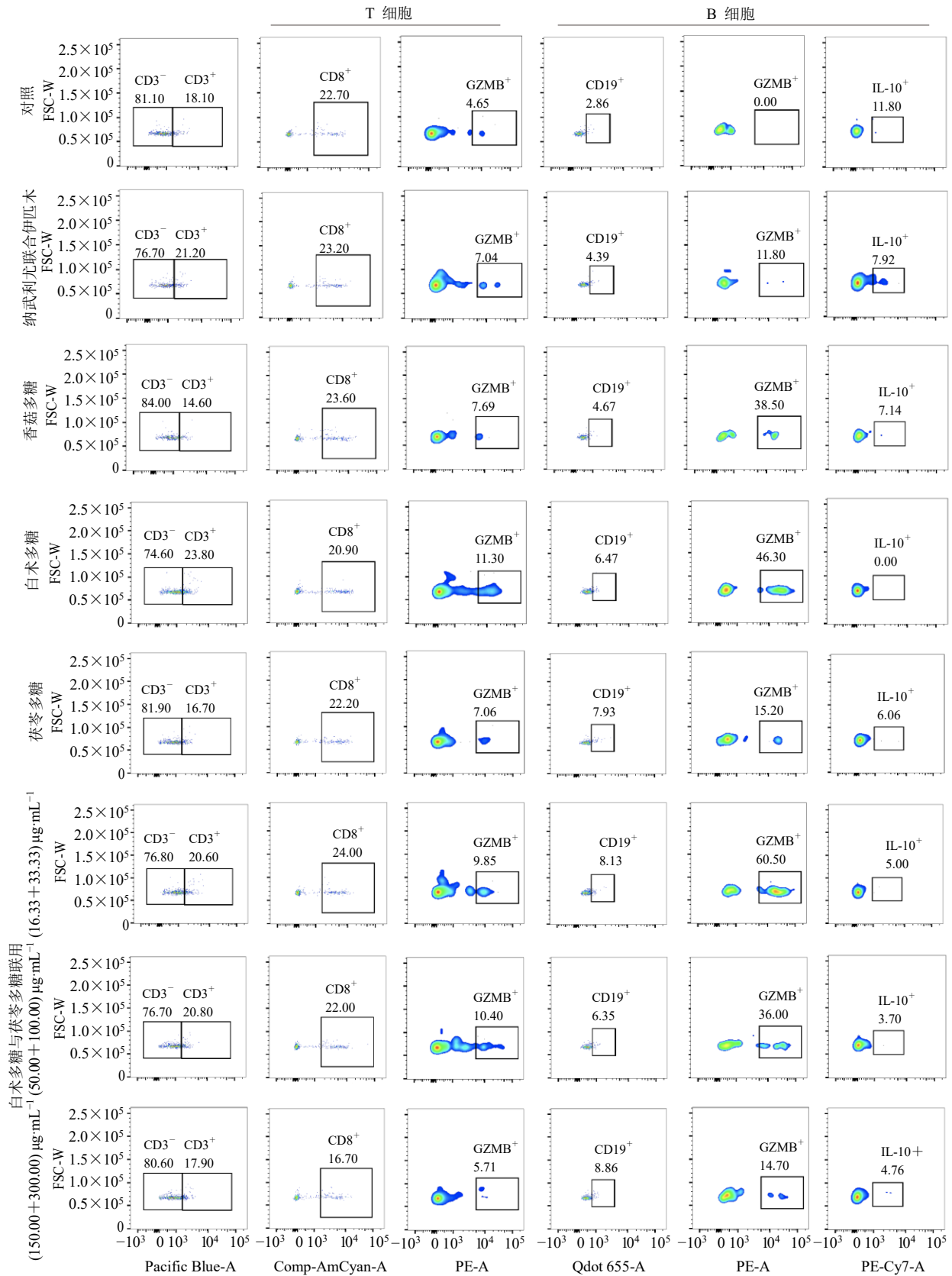


图 6 不同药物干预后类器官免疫细胞表达情况

Fig. 6 Immune cell expression in organoid after intervention with different drugs

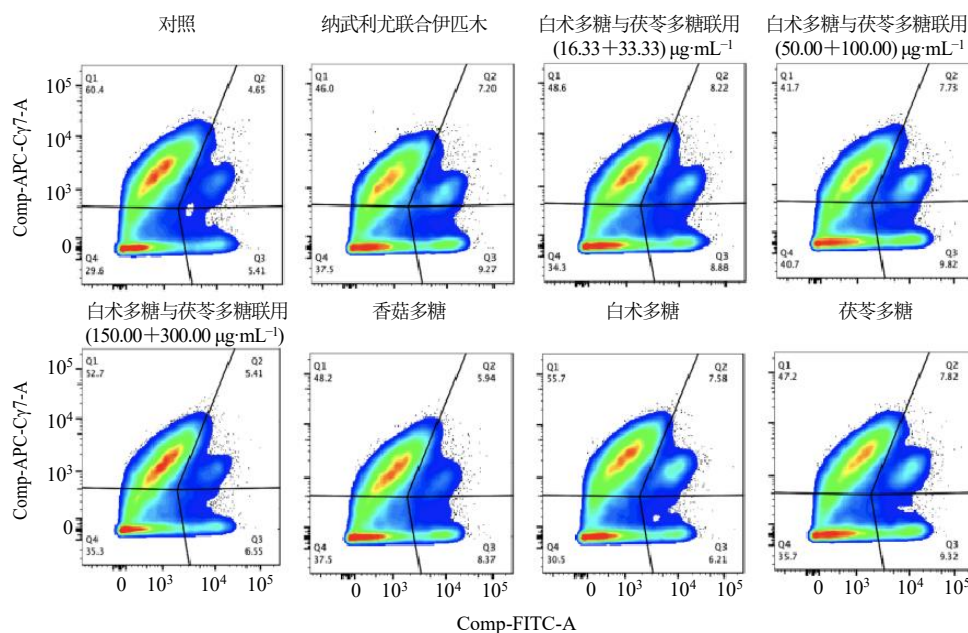


图 7 不同药物干预后类器官肿瘤细胞凋亡情况

Fig. 7 Tumor cell apoptosis in organoid after intervention with different drugs

活性多糖处理后的类器官中浸润性 T 淋巴细胞标志物 CD3⁺、杀伤性 T 细胞标志物 CD8⁺的比例无明显变化, CD8⁺ T 细胞毒性相关分子的比例小幅度提升, B 淋巴细胞标志物 CD19⁺比例上升, IL-10 比例下降、GZMB 上升。对比阳性药组, 白术多糖组、白术与茯苓多糖联用组均能显著提升 B 细胞抗原呈递能力指标 GZMB 的占比, 并下调调节性 B 细胞 (regulatory B cell, Breg) 相关效应分子 IL-10 占比。

在肿瘤免疫反应中, B 细胞具有双向调节功能, 一方面可以发挥抗原呈递作用, 产生 GZMB 直接杀伤肿瘤细胞, 另一方面可以通过抑制 T 细胞功能, 诱导免疫耐受, 促进肿瘤进展^[17]。肿瘤相关 B 细胞由免疫刺激性 B 细胞和免疫抑制性 B 细胞构成^[6], 其中 Breg 在包含结直肠癌在内的多种实体瘤的 TIME 中被证实大量浸润, 直接或间接助力肿瘤免疫逃逸^[18-19]。Breg 可通过效应分子 IL-10、转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β)、IL-35 发挥免疫抑制作用, 其中 IL-10 是其最主要的效应分子^[17-19]。本研究结果显示, 白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖能够不同程度地升调 TIME 中 GZMB 的比例、降低 IL-10 的比例, 并促进肿瘤细胞的凋亡, 说明提升 B 细胞的抗原呈递能力, 产生 GZMB, 抑制 IL-10 的生成, 拮抗免疫抑制性 B 细胞的活化可能是白术多糖、茯苓多糖、香菇多糖发挥抗肿瘤

作用的机制之一。

综上, 本研究构建了一个新的药物体外评价模型, 用于探究扶正类中药活性多糖对结直肠癌的治疗作用。未来可以通过优化培养模式、延长免疫细胞存活时间、深入研究其作用机制等方法, 为扶正类中药在结直肠癌免疫治疗中的应用提供更全面的数据支持。另外, 这种能够在体外重现 TIME 的类器官模型, 不仅可以为中医药“扶正”治疗结直肠癌潜在靶点的发现提供途径, 而且可以为筛选出对免疫治疗有反应的特定人群提供技术支持。如何将其灵活应用于基础研究并解决实际临床问题, 是类器官未来研究的方向。本研究在构建模型的过程中发现, 不同患者的免疫细胞在 TIME 中的表达强度存在差异, 同时, 随着传代次数的递增, 免疫细胞会有不同程度的衰退。因此, 如何长时间维持类器官中免疫细胞的活力和比例, 也是未来值得重点探索的问题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Saeed M, Chen F M, Ye J Y, *et al.* From design to clinic: Engineered nanobiomaterials for immune normalization therapy of cancer [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(30): e2008094.
- [2] Shang L R, Wang Y C, Li J X, *et al.* Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on

- network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302(Pt A): 115876.
- [3] Chen J F, Wu S W, Shi Z M, *et al.* Traditional Chinese medicine for colorectal cancer treatment: Potential targets and mechanisms of action [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 14.
- [4] 尹晓岚, 马祥雪, 张北华, 等. 健脾中药复方治疗脾虚证作用机制研究现状与展望 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2024, 26(3): 669-674
- [5] Mao Q Q, Min J, Zeng R, *et al.* Self-assembled traditional Chinese nanomedicine modulating tumor immunosuppressive microenvironment for colorectal cancer immunotherapy [J]. *Theranostics*, 2022, 12(14): 6088-6105.
- [6] Feng Z F, Yang R B, Wu L S, *et al.* *Atractylodes macrocephala* polysaccharides regulate the innate immunity of colorectal cancer cells by modulating the TLR4 signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7111-7121.
- [7] Liu X F, Wang X Q, Xu X F, *et al.* Purification, antitumor and anti-inflammation activities of an alkali-soluble and carboxymethyl polysaccharide CMP33 from *Poria cocos* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 127: 39-47.
- [8] Choi K G, Wu B C, Lee A H, *et al.* Utilizing organoid and air-liquid interface models as a screening method in the development of new host defense peptides [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 228.
- [9] Neal J T, Li X N, Zhu J J, *et al.* Organoid modeling of the tumor immune microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-1988.
- [10] Sato T, Vries R G, Snippert H J, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265.
- [11] 纪云飞, 王瑞君, 李晓波. 复方四君子汤的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 837-843.
- [12] Xu H C, van der Jeught K, Zhou Z L, *et al.* Atractylenolide I enhances responsiveness to immune checkpoint blockade therapy by activating tumor antigen presentation [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(10): e146832.
- [13] Alhaque S, Themis M, Rashidi H. Three-dimensional cell culture: From evolution to revolution [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018, 373(1750): 20170216.
- [14] 程婉莹. 基于气液交互式类器官培养技术构建肺癌免疫微环境模型 [D]. 济南: 济南大学, 2023.
- [15] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [16] Ashok A, Choudhury D, Fang Y, *et al.* Towards manufacturing of human organoids [J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107460.
- [17] 马佳男. 抑制 PPAR δ 可阻断 IL-10⁺ Breg 细胞的诱导和功能并增强癌症的免疫治疗 [D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [18] Michaud D, Steward C R, Mirlekar B, *et al.* Regulatory B cells in cancer [J]. *Immunol Rev*, 2021, 299(1): 74-92.
- [19] 王志强, 刘荣花, 储以微. 调节性 B 细胞与肿瘤免疫逃逸 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(4): 673-681.

[责任编辑 罗 曦]