

团 体 标 准

T/××××—××××

人肉瘤类器官

Human Sarcoma Organoids
(征求意见稿)

内部讨论资料，严禁未经授权使用

20×-××-××发布

20×-××-××实施

中国抗癌协会

发布

在本标准实施过程中，如发现需要修改或补充之处，请将意见和有关资料寄给中国抗癌协会，以便修订时参考。

本标准版权为中国抗癌协会所有。除了用于国家法律或事先得到中国抗癌协会的许可外，不得以任何形式或任何手段复制、再版或使用本标准及其章节，包括电子版、影印件，或发布在互联网及内部网络等。

内部讨论资料，严禁非授权使用

地址：天津市华苑新技术产业园区兰苑路 5 号 A 座 10 楼

邮编：300384 电话：022-23359958

邮箱：bgs@caca.org.cn 网址：www.caca.org.cn

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。

本标准由中国抗癌协会骨肿瘤和骨转移瘤专业委员会提出。

本标准由中国抗癌协会归口。

本标准主要起草人：

本标准起草单位：

内部讨论资料，严禁非授权使用

人肉瘤类器官

1 范围

本标准规定了人肉瘤类器官的伦理要求、技术要求和检测方法。

本标准适用于患者来源肉瘤类器官的制备和检测。

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必不可少的条款。其中，注明日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注明日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改版）适用于本文件。

GB/T 1.1-2020 人类生物样本保藏伦理要求

T/NAHIEM 6 医学研究伦理委员会通用要求

全国临床检验操作规程

WS 213 丙型肝炎诊断

WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

WS 299 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 Organoid

由成体干细胞或多能干细胞体外培养形成，可以自发进行自我更新、自组织、分化以形成与来源组织高度相似的，具有一定空间结构的体外3D细胞培养物。

3.2

肿瘤类器官 Tumoroids or Tumor Organoids

由患者的肿瘤组织或其他含肿瘤细胞的样本中提取的肿瘤细胞经体外培养形成的,可以在体外扩增并重现原始肿瘤病理形态、遗传特征和治疗反应特征的一类器官。

3.3

人肉瘤类器官 Human Sarcoma Organoids

人肉瘤类器官来源于骨肿瘤新鲜组织,具有自我更新、自我组装的功能,并能代表体内肿瘤的生物特征。

3.4

肉瘤类器官培养基 Culture Medium of Sarcoma Organoids

能够实现体外模拟骨肿瘤细胞生长所需的微环境,诱导具有干性的细胞分化为各种类型的骨(肿瘤)细胞,同时能够持续维持干性细胞的特征,实现肉瘤类器官长期培养的介质。

3.5

三维培养基质胶 Matrigel

三维培养基质胶是由层粘连蛋白、巢蛋白、硫酸胆囊素蛋白、IV型胶原等组成的一种细胞外基质,同时含有生长因子和基质金属蛋白酶。三维培养基质胶能够给类器官提供一定的孔隙和刚性的基质环境,帮助形成和维持稳定的组织结构,支持类器官的生长和分化,为肉瘤类器官的生长提供组织支架。

3.6

传代 Passage

将生长密度为70-80%,且培养状态良好的类器官采用物理吹打或者/和化学消化相结合的方法,使其解离成类器官团或者/和单细胞悬液,按照一定比例稀释后,重新接种于与原培养条件相同的体系内继续进行培养和扩增。

3.7

冻存 Cryopreservation

利用低温降低类器官代谢，使细胞暂时停止生长，但又可以保持类器官的细胞活性和功能的低温保存过程。

3.8

复苏 Thawing/Recovering

将冻存在液氮或者-80°C冰箱中的类器官解冻后重新培养，细胞恢复生长的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMSO: 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

HBV: 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus)

HCV: 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus)

HIV: 人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus)

H&E: 苏木精-伊红 (Hematoxylin and Eosin)

mRNA: 信使核糖核酸 (Messenger Ribonucleic acid)

PBS: 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate-buffered saline)

STR: 短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)

TB: 结核病 (Tuberculosis)

5 伦理要求

5.1 应与类器官原组织供者签署书面的合法有效的知情同意书，包括但不限于：合适条件下潜在研究

及治疗的应用、研究成果潜在的商业应用及其他问题所适用的内容。

5.2 骨肿瘤组织样本的处理和研究方案，应获得伦理审查委员会审查通过。

5.3 应对类器官原组织供者个人信息进行隐私保护。

6 技术要求

6.1 类器官形态

光学显微镜下观察人肉瘤类器官，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，呈现出致密球状体特征。部分类器官可见中间空腔，空腔及与外界交界处边缘清晰，细胞透亮。

6.2 类器官构建及生长

6.2.1 从骨肿瘤患者来源的人骨肿瘤组织或细胞，初次在体外构建成类器官后，需要满足在体外能够稳定传代至少 3 代。

6.2.2 传代后的类器官，应能进行体外重建成为新的类器官，重建的类器官应与传代之前代次的类器官形态等特征维持一致。

6.3 类器官细胞存活率

冻存和复苏的类器官存活率均不应低于 50%，且存活的类器官在体外可以持续进行类器官传代、冻存和复苏。

6.4 微生物

真菌、细菌、支原体、HBV、HCV、HIV 和外源病毒因子等应为阴性。

6.5 STR

对体外构建成功的类器官进行 STR 检测及分型鉴定，应与供体 STR 检测结果一致。

6.6 病理形态

6.6.1 类器官以及来源组织同时进行 HE 染色后，由具备病理鉴定资质的专业人员进行判定，其组成细胞应具有肿瘤细胞相关的异型性特征（如：核深染、核分裂异常、核质比例异常等）。

6.6.2 对体外构建成功的类器官进行免疫组化染色，检测结果应与来源肿瘤组织的结果维持一致，肉瘤类器官的免疫组化标志物可参考 Osteocalcin、Vim、SOX9、S100、Actin、SMA、CK、NSE、CD99、

SATB2、MDM2、CDK4、Ki67 及 P53 进行选择。

6.7 遗传特征和染色体核型

对体外构建成功的类器官进行基因组测序（如：WES），检测结果应与来源肿瘤组织的基因突变结果维持一致。

6.8 成瘤

将体外构建成功的肉瘤类器官，经皮下接种于免疫缺陷小鼠肋腹部，观察其成瘤能力。

7 检测方法

7.1 类器官形态结构

体外构建三维肉瘤类器官，使用倒置显微镜观察。按照附录 B 的方法进行检测。

7.2 类器官数量

通过倒置显微镜，对成功构建的肉瘤类器官进行拍照并记录，使用显微镜自带的标尺对类器官大小进行测量，类器官数量可以直接进行计数。

7.3 类器官细胞存活率

对包括培养中、复苏、传代和冻存的类器官进行类器官细胞活性检测。存活率可按照附录 A 检测。

7.4 微生物

7.4.1 细菌及真菌

按照《中华人民共和国药典（2020 年版）》中“1101 无菌检查法”检测。

7.4.2 支原体

按照《中华人民共和国药典（2020 年版）》中“3301 支原体检查法”检测。

7.4.3 外源病毒因子

按照《中华人民共和国药典（2020年版）》中“3302 外源病毒因子检查法”检测。

7.4.4 HIV

按照 WS293 核酸法检测

7.45 HBV

按照 WS299 核酸法检测

7.46 HCV

按照 WS213 核酸法检测。

7.5 STR

按照附录 C 检测。

7.6 病理特征

按照附录 B 检测。

7.7 遗传特征

按照附录 B 检测。

7.8 成瘤鉴定

人源性肉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。

内部讨论资料，严禁非授权使用

附录 A

(资料性)

肉瘤类器官培养的主要试剂材料与操作要点

A.1 主要试剂材料

A.1.1 类器官培养基主要成分

表 A.1 肉瘤类器官培养基主要成分表

组分	人肉瘤类器官
Advance DMEM-F12	√
HEPES	√
Glutamax	√
P/S	√
A83-01	√
B27	√
EGF	√
FGF-10	√
Forskolin	√
N2	√
Noggin	√
R-Spondin-1	√
Y-27632	√

A.1.2 类器官培养三维支架材料

三维支架材料为取自基底膜的支持性凝胶，主要由层粘连蛋白、巢蛋白、硫酸胆囊素蛋白、IV型胶原等组成，同时还含有生长因子和基质金属蛋白酶等。基质胶在4℃时为液态，室温条件下聚合形成具有生物学活性的三维支架结构，模拟细胞外基质的结构、组成、物理特性和功能，有利于肉瘤类器官的培养和分化。

A.1.3 组织消化酶

骨肿瘤组织消化所用的消化酶一般由IV型胶原酶、DNA酶和透明质酸酶构成。其作用是水解

细胞外基质和胶原蛋白等成分，使骨肿瘤细胞从组织中完全分离出来。消化条件为 37°C 恒速水平摇床，时间不超过 1 小时，可在消化中途取上清液置于镜下观察，出现 3-10 个的细胞团形成，则终止消化。

A.1.4 类器官冻存液

类器官冻存液为无血清冻存液，一般含有 10% 的二甲基亚砜 (DMSO)。

A.2 类器官构建步骤

A.2.1 组织的清洗

将组织样本放入装有清洗液的 10 cm 细胞培养皿中，用刀片或眼科镊子和剪刀去除坏死、钙化组织和脂肪组织（非脂肪组织样本）。随后将组织样本放入 15 mL Falcon 离心管，加入清洗液洗涤组织样本，洗涤次数不少于 3 次，每次洗涤时间不少于 1 min。

A.2.2 组织细胞的消化

将组织转移到适量容积的收集管中（如：1.5 mL EP 管、5 mL 或者 15 mL Falcon 管），用眼科剪和镊子将组织剪成 1-2 mm³ 的立方体碎片并混悬于适量的组织消化缓冲液中，37°C 孵育 15-60 min。当组织已解离至 >70% 为单细胞时，加入不少于消化液体积的终止液。

A.2.3 组织样本消化后处理

a) 如果沉淀有明显絮状物：

加入适量 DNaseI (1 mg/mL)，在 37°C 水浴中孵育 3-5 min 后加入不少于消化液体积的清洗液终止消化。

b) 如消化的组织液中含有较多的结缔组织：

依次用 100 μm 和 70 μm 的细胞筛过滤组织液，以去除大的结缔组织碎片，收集滤过液。

c) 如果沉淀有明显红色：

加入 1 mL RBC 裂解缓冲液，在冰中孵育 1-2 min 裂解红细胞后，加入不少于消化液体积的清洗液终止消化。

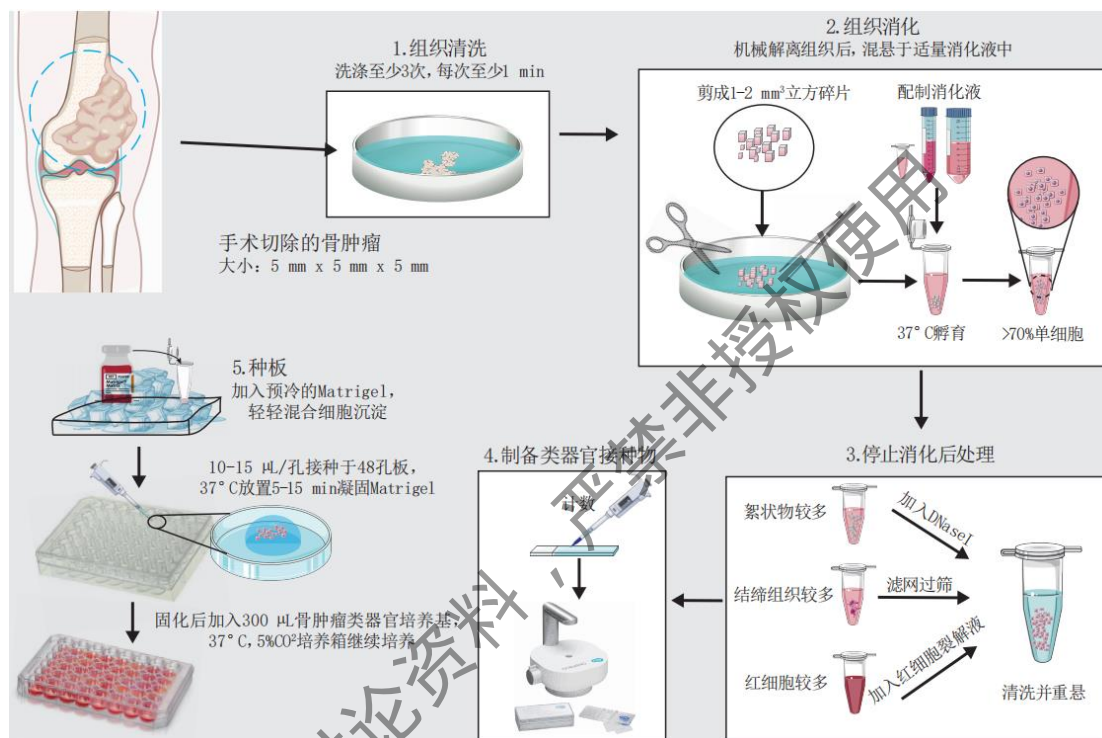
A.2.4 类器官接种培养物的制备

加入适量清洗液重悬细胞沉淀，制成均一的细胞悬液，用自动细胞计数器计数细胞：取 10 μL 细胞悬液采用 Cytosmart、Countstar 等全自动细胞计数仪进行细胞计数，评估样本质量，为细胞接种计

划提供参考依据。

A.2.5 类器官培养物的种板

将细胞沉淀置于冰上，加入适量体积的冰冷 Matrigel，轻轻重悬细胞沉淀并混匀，以每孔 $1-5 \times 10^4$ 细胞密度进行接种，避免产生气泡；将种有 Matrigel 和细胞的 48 孔板置于 37°C 培养箱中，静置 5-15 min，待 Matrigel 固化后每孔添加 300 μL 类器官完全培养基（图一）。



图一：肉瘤类器官构建流程

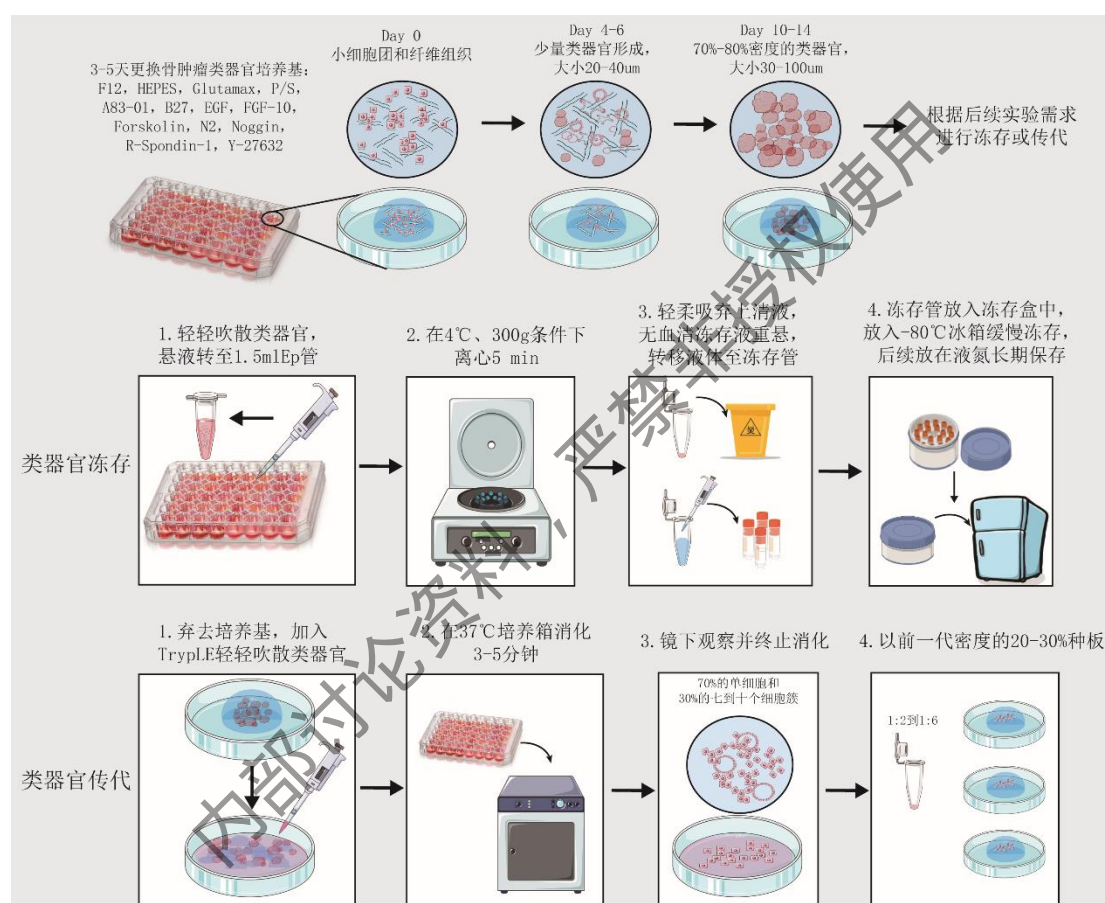
A.3 类器官传代、冻存与复苏

A.3.1 类器官传代

选择生长密度为 70-80% 的类器官进行传代。根据前一代类器官培养孔内的生长个数和大小综合考虑传代密度，一般以前一代密度的 20-30% 为宜。重要的类器官可以每 1-2 周以 1:2-1:6 的比例传代一次。相关实验试剂和操作方法见图二。

A.3.2 类器官冻存

类器官通常在扩增到 $>5 \times 10^5$ 个细胞数后被冻存，通常需要2-4周的培养时间，传2-4代。将暂不使用的类器官，加入冻存液后缓慢降温，放入液氮或 -80°C 冰箱低温保存。将冻存管放入冷冻容器中（如梯度降温盒 Mr Frosty），放置 -80°C 超低温冰箱存储过夜。次日转移至液氮长期保存。相关实验试剂和操作方法见图二。



图二：肉瘤类器官冻存与传代流程

A.3.3 类器官复苏

类器官复苏遵循快融原则。使用 37°C 水浴孵育1-3 min使其尽快融化，使用至少1-5倍体积的无血清培养基稀释冻存液，离心后选择合适的培养基进行类器官的培养及传代。根据细胞计数情况，添加适量基质胶使细胞终浓度为 $0.5-3 \times 10^4$ 个/ $10 \mu\text{L}$ ，进行细胞接种。

A.4 肉瘤类器官培养操作要点

A.4.1 类器官防污染处理

组织样本在取材及运输过程中可能会被污染，因此取材时应予注意，应将样本放在含有双抗的组织运送液中。组织处理过程要注意无菌操作，组织消化时也可以在消化液中加入抗生素防止污染。

类器官培养过程若发生污染，则应丢弃培养板。丢弃前应进行无害化处理。

A.4.2 类器官传代注意事项

解冻后的类器官应先进行 2 次传代后再进行实验。解冻后，类器官通常在 7-14 天后可以进行传代（图二）。

A.4.3 类器官冻存注意事项

将类器官在 4°C、200g 条件下离心 5 min。弃上清后加入适量（0.5-1 mL）无血清类器官冻存液轻轻完全混匀。将重悬后的类器官转移到标注好的冻存管中，将冻存管放入冻存盒中，放入-80°C冰箱缓慢降温，过夜之后将冻存管转移到液氮中长期保存（图二）。

A.4.4 类器官复苏注意事项

37°C水浴条件进行类器官的解冻过程。当冻存培养液变为液体时解冻完成，此时肉眼可观察到类器官沉降于冻存管底部。水浴时间约为 2-3 min，温度过高或水浴时间过长会影响解冻后类器官的生长。类器官解冻完成后应立即开始下一步，以免影响细胞活力。不建议将类器官暴露于反复的冷冻-解冻循环中（图二）。

附录 B

(资料性)

肉瘤类器官的鉴定

B.1 类器官的形态结构观察 (细胞水平)

将类器官培养板置于倒置显微镜下, 在 10 倍视野下观察并计数类器官。生长活力好的类器官直径约为 30-100 μm 。以常规 HE 染色进行肉瘤类器官形态结构观察: 肉瘤类器官构建成功后, 制备冰冻或石蜡切片, 通过 HE 染色进行形态学鉴定。

B.2 肿瘤标志物的染色鉴定 (蛋白水平)

类器官成构建立后, 制备石蜡包埋或冰冻切片, 通过免疫荧光或者免疫组化染色进行生物标志物检测, 确定类器官与来源组织具有相似的蛋白表达趋势。骨肿瘤可差异性表达 Osteocalcin、Vim、SOX9、S100、Actin、SMA、CK、NSE、CD99、SATB2、MDM2、CDK4、Ki67 及 P53。

类器官整体染色: 培养大小约 100-200 μm 的类器官, 加入类器官收集液, 置于冰上放置 1h 以溶解基质胶, 600r/min 离心 2 次。加入 0.125% TritonX-100 破膜液, 室温作用 10 min, 用血清 (10% 二抗血清) 封闭 1h。根据不同稀释比配制一抗, 滴加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。不同组别分别滴加各种荧光标记的二抗, 室温避光作用 1h。PBS 漂洗 3 次后加入 DAPI 染核液, 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。

类器官免疫组化染色: 1) 脱蜡: a) 将待检测石蜡组织片置于耐高温塑料染色架, 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 30 min; b) 二甲苯I 脱蜡 15 min; (c) 二甲苯II 脱蜡 10 min。2) 水化: 切片依次浸入无水乙醇 I、无水乙醇 II、95%乙醇、90%乙醇、75%乙醇、50%乙醇、流动的自来水水, 分别洗涤 3-5 min。然后, 将片子浸泡在自来水中, 静置 10 min。3) 抗原修复: 将片子浸泡在修复液中, 采用加热的方式使抗原修复液保持微沸状态, 加热 20 min。4) 热修复结束取出放置实验台, 静置, 自然冷却至室温, 流动的自来水洗涤 3~5 min。5) 内源性过氧化物酶阻滞剂去除组织片内源性过氧化物酶。PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min。6) 封闭: 添加动物非免疫羊血清, 室温静置 20 min。7) 一抗孵育: 添加一抗, 放入湿盒, 置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。8) 次日, 从 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出湿盒, 放置实验台, 室温静置 45 min。9) 0.05% PBST 洗涤三次, 每次 3 min。10) 二抗孵育: 添加二抗, 放入湿盒, 室温静置、避光孵育 30 min。11) 重复步骤 9。12) DAB 显色。13) 苏木素染色液染色 1 min, 流动的自来水洗涤 3~5 min。14) 1% 盐酸溶液浸泡 30 sec, 流动的自来水洗涤 3~5 min。15) 饱和碳酸锂溶液浸泡 30sec, 流动的自来水洗涤 3-5 min。16) 切片依次浸入 50%乙醇、75%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇 I、无

水乙醇 II 进行梯度脱水, 分别洗涤 3-5 min。17) 透明: 切片依次浸入二甲苯 I 5 min、二甲苯 II 5 min。18) 树胶封片: 将透明好的片子平稳摆放, 用巴氏吸管吸取适量中性树胶滴加在样本上, 盖上盖玻片轻压四角使得树胶均匀扩散。19) 晾片: 将封片完成的玻片放置在开启的通风橱内, 静置过夜以便二甲苯充分挥发。20) 上机检测, 整理数据并填写检测结果。

B.3 基因表达变化及基因突变分析 (基因水平)

对构建成功的第 4 代或第 5 代肉瘤类器官, 进行基因组测序 (如: WES), 比较类器官基因突变谱与来源组织的差异。肉瘤类器官与来源组织存在相同的基因突变位点, 在基因水平重现了来源组织的多样性和复杂性, 不会出现均一化的基因突变现象。

B.4 体外药敏检测 (功能应用)

利用肉瘤类器官模型, 完成抗肿瘤药物的体外敏感性评价。将患者体内的肿瘤组织 (细胞) 复制到体外, 建立多个肿瘤类器官平行样本, 验证所构建类器官的生物学功能; 同时在体外进行药物敏感性测试, 用于预测临床药物的疗效/指导肿瘤精准化治疗。

内部讨论资料, 严禁非授权使用

附录 C

(资料性)

短串联重复序列 (STR) 检测

类器官 DNA 的提取:

待类器官生长至 Matrigel 体积的 80%左右, 弃上清。加入 500 μ L PBS 清洗 1 次。吸去 PBS 后加入 250 μ L Tryple, 用移液枪将基质胶轻轻打散。5-10 min 后, 将类器官混合物转移至 RNase-Free 的 1.5 mL EP 管中离心 (300g, 5 min), 弃上清, 保留细胞沉淀。参照 GIAGEN DNA 提取试剂盒的详细步骤提取细胞 DNA, 进行 PCR 扩增及测序。随后进行 DNA 凝胶电泳、数据分析和提交结果。

人源细胞 STR 鉴定结果判定标准:

受检细胞 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:

- C.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;
- C.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;
- C.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。

参 考 文 献

- [1]T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求
- [2]国家卫生计生委.涉及人的生物医学研究伦理审查方法, 2016
- [3] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会, 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 经典型骨肉瘤诊疗指南 2020, 人民卫生出版社, 2020, p35.
- [4] WHO Classification of Tumours Editorial Board, Soft Tissue and Bone Tumours, WHO Classification of Tumors, 5TH Edition, p337-498.
- [5] Aina He, Yujing Huang, Wanying Cheng, et al. Organoid culture system for patient- derived lung metastatic osteosarcoma, Medical Oncology, 2020: 37:105. doi:10.1007/s12032-020-01429-y
- [6] Junhua Nie, Tao Yang, Hong Li, et al. Frequently expressed glypican-3 as a promising novel therapeutic target for osteosarcomas, Cancer Science, 2022;113:3618-3632.

内部讨论资料，严禁非授权使用