

结直肠癌类器官高通量药物筛选方法

High-throughput Drug Screening in Colorectal Cancer Organoids

杜辉^{1,#}, 陈世阳^{1,#}, 陈剑峰^{1,*}

¹细胞生物学国家重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院大学, 上海

*通讯作者邮箱: jfchen@sibcb.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 杜辉, 陈世阳, 陈剑峰. (2021). 结直肠癌类器官高通量药物筛选方法. *Bio-101* e1010843.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010843.

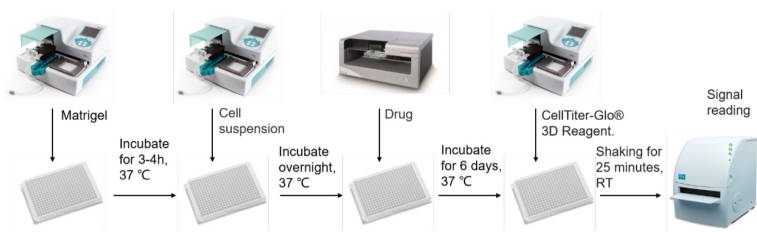
How to cite: Du, H., Chen, S. Y., Chen, J. F. (2021). High-throughput drug screening in colorectal cancer organoids. *Bio-101* e1010843. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010843. (in Chinese)

摘要: 类器官(organoid)是由不同类型和功能的细胞组成的类似于体内器官的 3D 培养细胞结构。与传统的 2D 培养的细胞系相比, 类器官能够更真实地模拟体内细胞的生存空间与生长状况, 因而在疾病研究和药物筛选等方面有着重要的前景(van de Wetering *et al.*, 2015)。肿瘤类器官(patient derived organoid, PDO) 作为研究肿瘤的新型工具, 在保留肿瘤原有的生物学特征之外, 还能够稳定的传代, 因此在肿瘤药物的开发与筛选上有着得天独厚的优势(Roerink *et al.*, 2018)。Vlachogiannis 等(Vlachogiannis *et al.*, 2018) 证明了患者来源的类器官能够模拟患者对药物的反映, 可以被用于个体化药物治疗。Verissimo 等(Verissimo *et al.*, 2016) 在体外利用原代肿瘤类器官库的基因多样性明确了 RAS 基因突变在结直肠癌中的耐药性机制。

本实验方案中, 我们利用 CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 来对细胞数目进行测定, 其原理是通过对 ATP 进行定量测定来检测培养物中活细胞数目, 目前该方法已被国内外广泛应用。该实验方案可以同时检测多株 PDO 对于多种药物的敏感性, 而且在 384 孔板中进行药物筛选可以极大程度节省实验成本。本文主要介绍了结直肠癌类器官的高通量药物筛选系统, 为药物研发以及临床个性化治疗提供新的思路和指导。

关键词: 类器官, 高通量, 药物筛选

图文摘要



类器官高通量药物筛选流程图

材料与试剂

1. 15 ml 离心管 (Gene Brick, catalog number: GP04-6500)
2. 50 ml 离心管 (Gene Brick, catalog number: GP04-7500)
3. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, catalog number: G9683)
4. 384 孔板 (Corning, catalog number: 3765)
5. Matrigel 胶 (Corning-Biocoat, catalog number: 356231)
6. Advanced DMEM/F12 (Life Technologies, catalog number: 12634028)
7. HEPES (Sigma)
8. GlutaMax (Gibco, catalog number: 35050061)
9. Penicillin-Streptomycin (Gibco, catalog number: 15140163)
10. B27 supplement (Gibco, catalog number: 17504044)
11. N-Acetyl-L-cysteine (Sigma, catalog number: A9165)
12. (Leu15) Gastrin-1, human (Anaspec, catalog number: AS-64149)
13. Human EGF (Pepro Tech, catalog number: AF-100-15-500)
14. Human Noggin (Novoprotein, catalog number: CB89)
15. 10% R-Spondin1 conditional medium
16. A83-01 (Tocris, catalog number: 2939)
17. Nicotinamide (MCE, catalog number: HY-B0150)
18. Prostaglandin E2 (MCE, catalog number: HY-101952)
19. Primocin (InvivoGen, catalog number: ant-pm-1)
20. TrypLE™ Express (Thermofisher-Invitrogen, catalog number: 12604013)
21. Countess™ 细胞计数腔室载玻片 (Thermofisher, catalog number: C10228)
22. T8+ Dispensehead Cassettes (Tecan, catalog number: 30097370)
23. 84 消毒液 (江苏爱特福, catalog number: LB1250)

24. PDO 培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 4 °C 离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
2. Multidrop 自动分液器 (Thermofisher, model: Multidrop Combi)
3. Envision 多标记微孔板检测仪 (PE, model: Envision)
4. 非接触式数码滴定仪 (Tecan, model: D300e)
5. Countess II FL 全自动细胞计数仪 (Thermofisher, catalog number: AMQAX1000)
6. 37 °C 水浴锅 (上海精宏, catalog number: DK-420)
7. 细胞培养箱 (Thermofisher, model: 3111)
8. TS-8 转移摇床调速 (其林贝尔, model: TS-8)
9. 荧光显微镜 (Olympus)

实验步骤

本实验方法可以同时检测多株 PDO 对于多种药物的敏感性, 在此以检测某药物对于一株 PDO 的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为例(实际操作时药物数量以及 PDO 数量依实验需求而定), 详细步骤如下:

一、384 孔板预铺 Matrigel 胶(仪器: Multidrop 自动分液器, 离心机)

1. 准备 Matrigel 悬液, 将 Matrigel 用预冷的 PDO 培养基稀释为约 50% 的 Matrigel 悬液(需无菌操作), 放置于冰上即可, 同时准备 6 管 50 ml 预冷的 Milli-Q 水, 2 管 50 ml 的 10% 84 消毒液(用 Milli-Q 水进行稀释)。
2. 打开 Multidrop 自动分液器, 选择合适的分液管以及管道, 以 Standard tubes 举例。
3. 注释: 如果体积较小, 可以选用 Small tubes 分液管, 依据实验需要而定。
4. 设置参数: 孔板类型: 384 孔板, 管道类型: Standard tubes, 分液体积: 10 μ l, 加样位置: 以实际需求为准(共 1-24 可选)。
5. 将 Multidrop 分液管浸泡在 10% 84 消毒液中 5-10 min, 随后用消毒液冲洗管道, 然后用 Milli-Q 水冲洗管道 3 次。
6. 注释: 在一管溶液冲洗完毕之后, 将管道内部残余液体排出, 然后用下一管溶液进行冲洗。

7. 将 Multidrop 的分液管放置于 Matrigel 悬液中，将孔板开盖放置于仪器上，进行加样。
8. 注释：在分液的时候，室温即可，无需保持 4 °C 环境。
9. 将孔板在 150 × g 的离心力条件下于室温离心 2 min，之后将 384 孔板放置于 37 °C 培养箱内 1 h 左右使 Matrigel 聚合。
10. 注释：若 1 h 后 Matrigel 未聚合，可能是由于 Matrigel 浓度较低，将 384 孔板于 37 °C 培养箱继续放置一段时间即可。
11. 对 Multidrop 的分液管依次用 10% 84 消毒液、Milli-Q 水冲洗，关闭机器，将分液管卸下。

二、制备并分装类器官细胞悬液(仪器：显微镜，Countess II FL 全自动细胞计数仪，Multidrop 自动分液器，离心机)

1. 用移液器直接将培养 PDO 的 Matrigel 吹破，将 PDO 和 Matrigel 从 24 孔板中转移至 15 ml 管中，用预冷的 Advanced DMEM/F12 培养基清洗细胞 2 次以去除 Matrigel，离心参数：300 × g，4 °C，5 min。
2. 用 1-2 ml TrypLE™ Express 消化液重悬，37 °C 水浴锅孵育 2-10 min。
3. 取 10 μl 的细胞悬液于显微镜下镜检，>80%细胞消化成单细胞即可(如图 1)。
4. 将细胞悬液离心 300 × g，4 °C 离心 5 min。
5. 用 Advanced DMEM/F12 培养基清洗细胞 2 次，离心步骤同 4。
6. 将细胞用含 5%的 Matrigel 的 PDO 培养基重悬，利用细胞计数仪进行计数，最终得到合适细胞密度(45×10^3 - 90×10^3 cells/ml)的悬液。

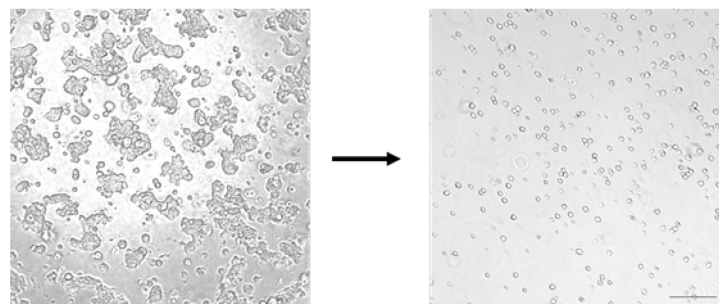


图 1. PDO 消化前后代表性图像。左侧为 PDO 代表性图像，无需消化即可观察到各种大小的 organoid，右侧为 PDO 消化后的图像。Scale bar，200 μm。

7. 利用 Multidrop 自动分液器将细胞铺至预铺好 Matrigel 的 384 孔板内，每孔体积 45 μ l 左右为宜(接种细胞数目为 2k - 4k/well)。
8. 将孔板在 150 \times g 的离心力条件下于室温离心 2 min，然后将其放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜。

三、药物处理(仪器：非接触式数码滴定仪，离心机)

1. 设置合适的药物浓度梯度，(例如，最高浓度为 30 μ M，然后以 2 倍稀释法稀释至 7 nM)。
2. 利用 D300e 设置每一个孔的药物浓度，然后选用最高浓度进行 Normalize 操作 (Normalize 方法有多种，按照实际需要即可)。
3. 按照 D300e 仪器操作提示进行操作即可(放置芯片-将对照以及药物加在对应的孔内-开盖-加样)。
4. 将孔板在 150 \times g 的离心力条件下于室温离心 2 min，之后将孔板放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 6 天。

四、细胞活力检测(仪器：Envision 多标记微孔板检测仪，离心机，TS-8 转移摇床调速，Multidrop 自动分液器)

1. 将 CellTiter-GLO 试剂解冻，按照说明书计算所需要的溶液量。
2. 利用 Multidrop 自动分液器将 CellTiter-GLO 试剂加至孔板内，将孔板在 150 \times g 的离心力条件下于室温离心 2 min，室温震荡孵育 20 min。
3. 利用 Envision 多标记微孔板检测仪检测荧光读值。
4. 将数据输入 GraphPad Prism 7 中，利用 Log(inhibitor) vs. response — Variable slope(four parameters)拟合出 IC₅₀。

注意事项

1. Milli-Q 水需要提前进行灭菌，由于 Matrigel 特性，Milli-Q 水必须预冷。
2. 在分液的时候 prime 键不能过久长按，否则会加快对机器的损耗。
3. 在消化 PDO 的时候，应确保至少 80%的细胞为单细胞状态，但时间又不能过久，

否则细胞状态会变差。

4. 在进行药物筛选试验的时候，细胞状态很重要，最好选用新复苏的 PDO 进行药物筛选试验。
5. 在利用 D300e 加药的时候避光，否则可能影响药物效果。
6. 在使用 CellTiter-GLO 试剂的时候，避免反复冻融。
7. 在遇到 Multidrop 堵塞的时候，用注射器进行反冲，将杂物冲出即可。

结果与分析

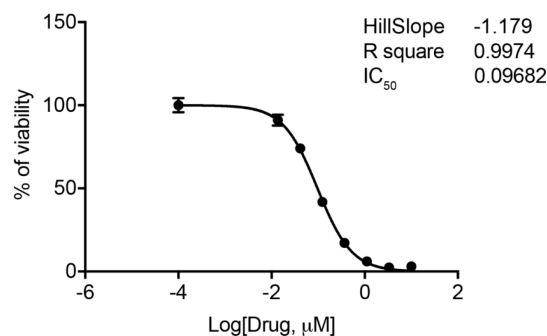


图 2. 药物作用的量-效关系曲线

由图 2 可知，该药物对于该 PDO 的半数抑制浓度(IC₅₀)约为 96.8 nM。HillSlope 越靠近-1，R square 越接近于 1，则得到的 IC₅₀ 值越准确。本实验每一个浓度设置 2 个复孔，为了得到比较准确的数据，可以设置多个复孔，并需要 2 - 3 次试验重复。

溶液配方

PDO 培养基

Advanced DMEM/F12, 1× Penicillin-Streptomycin, 1× GlutaMax, 10 mM HEPES, 1× B27, 10 nM Gastrin, 1 μM N-Acetyl-L-cysteine, 50 ng/ml EGF, 100 ng/ml Noggin, 10% R-Spondin1 conditional medium, 0.5 μM A83-01, 10 mM Nicotinamide, 1 μM Prostaglandin E2, 100 μg/ml Primocin.

致谢

该项研究得到了国家自然科学基金委的资助。该研究数据收集工作得到了中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台的大力支持。

参考文献

1. Roerink, S. F., Sasaki, N., Lee-Six, H., Young, M. D., Alexandrov, L. B., Behjati, S., Mitchell, T. J., Grossmann, S., Lightfoot, H., Egan, D. A., *et al.* (2018). [Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level.](#) *Nature* 556(7702): 457-462.
2. van de Wetering, M., Francies, H. E., Francis, J. M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., van Houdt, W., van Gorp, J., Taylor-Weiner, A., Kester, L., *et al.* (2015). [Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients.](#) *Cell* 161(4): 933-945.
3. Verissimo, C. S., Overmeer, R. M., Ponsioen, B., Drost, J., Mertens, S., Verlaan-Klink, I., Gerwen, B. V., van der Ven, M., Wetering, M. V., Egan, D. A., *et al.* (2016). [Targeting mutant RAS in patient-derived colorectal cancer organoids by combinatorial drug screening.](#) *Elife* 5.
4. Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernandez-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., *et al.* (2018). [Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers.](#) *Science* 359(6378): 920-926.