

结直肠癌 PTC 模型构建及药敏检测 专家共识及操作指南 (2025 年版)

(北京癌症防治学会)

【摘要】 结直肠癌是全球常见的恶性肿瘤之一，术后辅助治疗至关重要。然而，结直肠癌具有异质性，药物敏感性因人而异，传统体外肿瘤模型存在诸多问题。近年来，中国科学家发明了基于无基质、无血清、悬浮 3D 培养的微肿瘤 PTC 模型，克服了传统技术瓶颈，具有微量、安全、准确、及时等优势。2023 年 12 月 28 日已发表《微肿瘤模型构建及其药敏检测技术中国专家共识（2023 年版）》。为了精准指导结直肠癌 PTC 模型构建，规范其在结直肠癌临床诊疗中的应用，北京癌症防治学会组织国内相关领域专家，基于目前国内外研究报道数据制定了本专家共识及操作指南。本指南详细阐述了微肿瘤 PTC 模型的定义、应用、样本选择标准、药物类型、药敏结果判读标准以及构建和药敏检测的操作步骤，旨在为结直肠癌药物治疗提供个体化、精准化的参考，推动该技术在临床中的应用。

【关键词】 结直肠癌；微肿瘤模型构建；药物敏感性检测；专家共识；操作指南

中图分类号：R73-35+4

文献标识码：A

文章编号：2096-8965 (2025) 04-0084-09

Expert consensus and operating guidelines for construction of colorectal cancer PTC model and drug sensitivity testing (2025 Version)

(Beijing Cancer Prevention & Treatment Society)

【Abstract】 Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors worldwide. Postoperative adjuvant therapy is essential. However, CRC exhibits significant heterogeneity, resulting in variable drug sensitivity profiles. Traditional in vitro tumor models have many limitations. In recent years, Chinese researchers have invented a patient-derived tumor-like cell cluster (PTC) model utilizing matrix-free, serum-free, and suspended three-dimensional culture techniques. This innovative approach overcomes the technical limitations of conventional models, offering advantages including minimal, safe, accurate, and timely. On December 28, 2023, the “Chinese Expert Consensus on the Construction of Patient-Derived Tumor-Like Cell Cluster (PTC) Model and Anti-Tumor Drug Sensitivity Detection Technology (2023 Version)” was published. To precisely guide the construction of colorectal cancer PTC models and standardize its application in colorectal cancer clinical practice, the Beijing Cancer Prevention & Treatment Society convened domestic experts from related fields and, based on the latest domestic and international research data, formulated this expert consensus and operating guidelines. This guideline provides a comprehensive overview of the PTC model. It covers the

收稿日期：2025-11-11

基金项目：北京协和医院中央高水平医院临床科研专项项目（2022-PUMCH-B-005）

通信作者：林国乐（1972-），男，浙江乐清人，主任医师，教授，主要从事结直肠癌的外科手术及综合治疗方向研究，E-mail: linguolet@126.com

model’ s definition, application, sample selection criteria, drug types, and criteria for interpreting drug sensitivity results. Additionally, it details the operating procedures for constructing the model and conducting drug sensitivity tests. The aim of this consensus is to offer individualized and precise guidance for colorectal cancer drug treatment and to promote the clinical application of this technology.

【 Keywords 】 Colorectal cancer; Construction of patient-derived tumor-like cell cluster (PTC) model; Drug sensitivity testing; Expert consensus; Operating guidelines

结直肠癌是严重危害人类健康的常见消化道恶性肿瘤之一，是全球第三大最常诊断的癌症，也是癌症相关死亡的第二位原因^[1]。据 2022 年中国癌症统计报告显示：中国每年新发病例 50 万余例，死亡病例 20 万余例^[2]。根治性手术治疗是结直肠癌的最佳方法，但结直肠癌术后初次复发率约 40%，且大多数会在 3 年内出现^[3-4]，约 25% II 期结直肠癌术后 5 年内出现复发、转移，约 50% ~ 60% III 期结直肠癌术后 5 年内出现复发、转移^[5]。因此，药物治疗同样是结直肠癌治疗的重要部分，包括术前治疗、术后辅助治疗、姑息治疗^[4]。

但是结直肠癌具有明显异质性，不同患者间、同一肿瘤不同亚克隆间存在明显的分子学差异（时间、空间异质性），造成对药物敏感性的不同^[6-7]。病理类型、临床分期及其他基线指标相似的患者，在采用相同的治疗方案时也会出现不同的预后和转归。因此药物治疗的个体化、精准化亟待深入研究，药效预测模型则是重要手段。

体外肿瘤模型，尤其是源自患者的原代肿瘤模型是开展肿瘤研究以及服务患者个体化精准治疗的重要工具。目前，研究者已开发出多种类型的体外肿瘤模型，包括基于细胞系、原代肿瘤细胞^[8]、PDX 小鼠^[9-11]、肿瘤类器官^[12]等体外模型的药敏检测体系，但具有难以标准化、缺乏准确性、周期长等问题，临床转化存在困难。因此，亟需一种准

确、简便、高效、标准化的临床前体外肿瘤药效检测方法。

近年来，中国科学家发明了一种新的基于无基质、无血清、悬浮 3D 培养的肿瘤模型，即患者来源类肿瘤细胞簇（Patient-derived Tumor-like Cell Cluster, PTC），简称微肿瘤 PTC^[13]，其克服了传统技术在临床应用中的瓶颈问题，做到微量、安全、准确、及时，是药敏检测领域的突破性进展，在临床转化应用中具有较大潜力，辅助医生对临床方案的决策。2023 年 12 月 28 日已发表《微肿瘤模型构建及其药敏检测技术中国专家共识（2023 年版）》^[14]，为微肿瘤 PTC 模型在基础科研、医药研发以及肿瘤精准医疗领域中的应用与发展奠定了坚实基础。由于不同类型肿瘤的组织特征、细胞表型、微环境特征存在差异，因此微肿瘤 PTC 模型培养需要针对不同类型肿瘤开发专用培养基及相应的组织解离体系。

为了精准指导结直肠癌 PTC 模型构建，规范其在结直肠癌临床诊疗中的应用，北京癌症防治学会组织国内相关领域专家，基于目前国内外研究报道数据制定本专家共识及操作指南（证据级别及推荐强度评定见表 1^[15]）。同时，结直肠癌微肿瘤 PTC 模型以及药敏检测技术尚处于快速研发阶段，仍有部分技术问题尚未解决（如无法模拟肿瘤-血管交互作用等），其技术细节仍在不断完善过程中，因此后续将会根据研究进展，对本指南进行修订。

表 1 共识推荐、评估、开发和评价系统等级表

Table 1 Grades of recommendations, assessment, development, and evaluation system

等级	描述	获益与风险	证据的方法学质量	启示
1A	强烈推荐 高质量证据	获益明显大于风险和负担，反之亦然（即风险与负担明显高于获益）	来源于无重大缺陷的随机对照试验或观察性研究中所获得的明确证据	强烈推荐，即能够在绝大多数情况下无保留地适用于绝大多数患者
1B	强烈推荐 中等质量证据	同上	来源于有缺陷的随机对照试验（结果矛盾、方法学有缺陷、间接证据或设计不严谨）或观察性研究的格外强的证据	强烈推荐，即能够在绝大多数情况下无保留地适用于绝大多数患者

续表

等级	描述	获益与风险	证据的方法学质量	启示
1C	强烈推荐 低或极低质量证据	同上	来源于观察性研究或病例研究	强烈推荐, 但高质量证据出现时可进行调整
2A	推荐程度弱 高质量证据	获益接近于风险和负担	来源于无重大缺陷的随机对照试验或观察性研究中获得的明确的证据	推荐程度弱, 根据具体情况或患者所处社会的价值取向决策
2B	推荐程度弱 中等质量证据	同上	来源于有缺陷的随机对照试验 (结果矛盾、方法学有缺陷、间接证据或设计不严谨) 或观察性研究的格外强的证据	推荐程度弱, 根据具体情况或患者所处社会的价值取向决策
2C	推荐程度弱 低或极低质量证据	同上	来源于观察性研究或病例研究	几乎不作推荐其他的选择也可能同样合理

第一部分 专家共识

1 微肿瘤 PTC 模型定义

专家共识 1: 建议使用 “patient-derived tumor-like cell cluster” 作为该技术的标准英文名称, “PTC” 作为该技术的英文简称, “患者来源类肿瘤细胞簇” 作为该技术的标准中文名称, “微肿瘤 PTC” 作为该技术的中文简称。

证据等级: 1B

2020 年 *Science Translational Medicine* 杂志发表了一篇题为 “Patient-derived tumor-like cell clusters for drug testing in cancer therapy” 的文章, 在传统原代肿瘤微球培养的基础上, 优化了培养基, 开发了一种全新的 “patient-derived tumor-like cell cluster (PTC)”, 建立了以 PTC 为基础的肿瘤体外药敏检测技术^[13]。其后多篇文章均使用 “patient-derived tumor-like cell cluster” 作为该技术全称。在《微肿瘤 PTC 模型构建及其药敏检测技术专家共识》中, 将 “patient-derived tumor-like cell cluster” 译为 “患者来源类肿瘤细胞簇”, 并提出简称为 “微肿瘤 PTC”。

专家共识 2: 微肿瘤 PTC 模型是将患者来源新鲜肿瘤组织样本, 经单细胞化处理后在低黏附培养皿和微肿瘤 PTC 专用培养基中悬浮培养, 以肿瘤细胞为主的多组分细胞自发聚集形成的 3D 肿瘤微球。与原始肿瘤在形态结构、病理特征、遗传信息、细胞组成等多维度上都具有高度相似性。

证据等级: 1B

患者来源类肿瘤细胞簇是将患者肿瘤组织消化

成单细胞为主的状态, 在含有特定细胞因子的无血清培养基中培养, 使单细胞经自组装相互聚集并增殖形成质地均匀、直径为 40 μm ~ 300 μm 3D 结构的细胞簇。PTC 模型中包含多种肿瘤组织来源细胞类型, 包括肿瘤上皮细胞、肿瘤干性细胞、成纤维细胞、免疫细胞等, 可在较高程度上模拟肿瘤微环境。目前通过苏木精-伊红染色、免疫组织化学、免疫荧光检测、基因测序以及单细胞测序从细胞组成、细胞形态学、组织病理学、分子遗传学等多方面证实, 体外培养获得的微肿瘤 PTC 模型保持了与原始肿瘤组织的高度相似性^[13-14, 16-17]。目前适用于胃癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、胆囊癌、脑肿瘤、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、尿路上皮癌、骨与软组织肉瘤等癌种^[13, 16-18]。

2 PTC 模型在结直肠癌临床和科研中的应用

专家共识 3: PTC 药敏检测技术克服了传统技术在临床应用中的瓶颈问题, 做到微量、安全、准确、及时, 是药敏检测领域的突破性进展。对结直肠癌药物敏感性有较高的预测价值, 在临床转化应用中具有较大潜力。

证据等级: 1C

PTC 模型微量、安全、准确、及时, 克服了现有其他模型在临床应用中的瓶颈问题, 因此是开展抗肿瘤药敏检测的理想模型。PTC 药敏检测体系基于微肿瘤 PTC 模型, 可预测靶向肿瘤细胞产生细胞毒性作用的药物疗效, 一项前瞻性临床研究中, 其预测胃肠肿瘤药物临床疗效的准确性达到

96.6%^[13], 预期将为结直肠癌药物治疗提供临床价值。微肿瘤PTC药敏检测不仅能准确预测患者药物临床疗效, 也可以预测患者新辅助药物治疗后临床可以达到的病理缓解情况 (CR/PR/SD/PD), 实现结直肠癌药物治疗的个体化和精准化。

专家共识 4: 关于 PTC 药敏检测的适应症, PTC 药物敏感性检测指导结直肠癌患者用药选择仍处于起步阶段, 目前仅对于标准治疗失败的患者、尚缺乏标准治疗的罕见或难治性肿瘤患者以及现有指南推荐级别较低且很可能无法从指南推荐方案中获益的患者, 或临床研究中, 在征得患者知情同意下, 可建议进行 PTC 培养和药物敏感性检测。

证据等级: 1C

作为精准医疗时代的一种新型检测技术, PTC 药物敏感性检测指导结直肠癌患者用药选择仍处于起步阶段。在临床实践中, 对于临床诊疗指南有明确标准且证据级别较高的治疗方案, 推荐患者按照指南规范优先选择^[4]。而对于标准治疗失败的患者、目前尚缺乏标准治疗的罕见或难治性结直肠癌患者以及现有指南推荐级别较低且很可能无法从指南推荐方案中获益的患者等, 在征得患者知情同意下, 可建议进行 PTC 模型构建和药物敏感性检测, 为其药物选择提供参考。

除了上述应用场景, 医师还可在下述情况下根据患者意愿推荐其进行 PTC 药物敏感性检测: (1) 多原发结直肠癌患者或临床治疗很棘手的患者无法决定治疗策略时, 可根据 PTC 药物敏感性检测结果, 建议选择的药物方案与顺序; (2) 在临床上, 医师可根据患者情况向其推荐超说明书适应症的药物, 在遵守相应法律法规条件下, 可建议患者进行 PTC 药物敏感性检测, 综合判断超说明书适应症药物的潜在疗效; (3) 研究者发起的基于结直肠癌 PTC 模型药物敏感性指导患者个性化治疗的前瞻性临床研究^[14]。总之, PTC 药物敏感性检测的应用场景因人而异, 未来随着该技术的不断完善及医师和患者对该领域认识的提高, 其应用可能越来越多。

专家共识 5: PTC 可用于结直肠肿瘤发生、发展、耐药等机制的研究, 及寻找新的药物靶点、分析药物作用机制、寻找人群适应症, 进而服务于新药研发。

证据等级: 1C

实体瘤内部存在着复杂且高度异质化的肿瘤微环境, 影响不同肿瘤的发生、发展、耐药进程。微肿瘤 PTC 模型自组装 3D 微球结构可保留肿瘤组织特性, 包含多种肿瘤组织浸润免疫细胞以及成纤维

细胞, 高度模拟肿瘤微环境。通过高通量筛选技术, 在芯片上培养细胞, 进行细胞功能分析, 直接在细胞水平鉴定各种分子的生物学活性, 可以迅速发现致病基因, 适用于结直肠肿瘤发生、发展、耐药等机制的研究, 同时寻找新的药物靶点、分析药物作用机制、寻找人群适应症, 进而服务于新药研发^[19]。

3 结直肠癌 PTC 模型样本选择标准

专家共识 6: 拟进行微肿瘤 PTC 培养的新鲜肿瘤样本必须是包含活的肿瘤细胞的、新鲜无污染的临床样本, 优先选择原发灶样本培养, 如原发灶已切除, 也可选择转移灶样本。取材时优先选择手术切除样本, 也可选择穿刺活检、内镜活检样本, 必要时也可选择恶性胸腹水培养。如肿瘤发生进展, 需要重新取样, 以避免肿瘤突变耐药。

证据等级: 1C

由于肿瘤 PTC 培养需要患者的组织样本, 临床肿瘤样本采集直接影响微肿瘤 PTC 模型的培养成功率, 取材需注意避开坏死组织*、癌周组织, 选择新鲜癌组织区域。一般包括手术切除组织、穿刺活检、内镜活检、恶性肿瘤胸腹水**等。根据前文适应症, 将患者分为3类。

(1) 临床分期 II ~ III 期患者: 如手术可切除原发灶, 优先选择根治性手术切除后的肿瘤样本取材。如手术无法切除原发灶, 可考虑选择肠镜活检。

(2) 原发灶仍存在的临床分期 IV 期患者: 优先选择原发灶取材。如原发灶无法取材, 可考虑选择转移灶取材。如转移灶可切除, 优先选择手术切除后的肿瘤样本取材; 如转移灶不可切除, 可选择穿刺/部分切除活检样本取材。

(3) 原发灶已被切除的临床分期 IV 期患者: 如转移灶可切除, 优先选择手术切除后的肿瘤样本取材; 如转移灶不可切除, 可选择穿刺/部分切除活检样本取材。如患者存在恶性肿瘤胸腹水, 也可选择恶性肿瘤积液送检。

*对于直肠癌患者, 如患者曾行放疗, 取材时应格外注意避开坏死纤维化组织。

**结直肠癌患者较少出现恶性胸腹水, 如患者存在恶性肿瘤胸腹水, 且无法获得其他肿瘤样本时, 也可选择恶性肿瘤积液送检。

但是随着肿瘤治疗的进行, 肿瘤细胞在不断变化, 会产生新的耐药、新的基因突变。一旦肿瘤发生新的进展 (复发) 或耐药, 需要重新取样, 再次对药物 (方案) 进行评估, 以制定最佳用药方案。

4 可用于结直肠癌 PTC 药物敏感性检测的药物类型

专家共识 7: 可检测药物包括化疗药物和抗肿瘤靶向药物（具体信息详见附件一、二），检测方式可以是单药也可以是化疗药物或者靶向药物组合。免疫治疗药物相关研究正在开展。但微肿瘤 PTC 模型暂不能预测抗血管靶向药物的临床疗效。

证据等级: 1B

药物治疗是结直肠癌治疗中必不可少的手段。虽然基于二代测序（Next Generation Sequencing, NGS）的基因检测技术为肿瘤患者的个体化治疗和精准用药提供了极大的帮助^[20]，但这种检测主要针对的是靶向药物的选择和应用。对于广泛使用的化疗药物以及新兴的免疫检查点抑制剂等免疫治疗药物，NGS 技术在临床用药指导方面的价值相对有限。此外，在实际的临床治疗中，患者往往接受的不是单一药物治疗，而是多种药物的联合治疗，例如化疗药物的组合、化疗与靶向药物的联合，或是化疗与免疫治疗的结合等。然而，这些联合治疗策略目前缺少可靠的生物标志物来预测疗效。因此近年来，采用患者来源肿瘤模型开展体外抗肿瘤药物敏感性检测以提前预测临床疗效的技术受到广泛关注^[21-23]。

基于微肿瘤 PTC 模型，可预测靶向肿瘤细胞产生细胞毒性作用的药物疗效，包括化疗药物（见附件一）和部分靶向药物（见附件二）等。在微肿瘤 PTC 模型中，可对单一化疗、靶向药物以及化疗靶向药物联合的敏感性进行预测，可通过对比不同药物或不同药物组合对肿瘤 3D 微球的杀伤效率差异，提前预判不同药物治疗方案在患者个体中可能产生的疗效，从而为患者用药选择提供参考。由于微肿瘤 PTC 模型不具备模拟体内肿瘤血管系统特征，不能有效预测抗血管靶向药物的临床疗效。

因此，在结直肠癌微肿瘤 PTC 模型中开展抗肿瘤药物敏感性检测时，需全面了解待检测药物的抗肿瘤杀伤原理和作用靶点，从而明确检测结果的临床参考意义。针对部分需经过体内代谢产生抗肿瘤活性的化疗药物（如卡培他滨等），利用微肿瘤 PTC 开展药敏检测时应采用其活性成分，如 5-氟尿嘧啶代替卡培他滨等^[24]。

微肿瘤 PTC 能够重现肿瘤免疫微环境特征，其无需外源添加免疫细胞^[19]，在预测免疫治疗药物例如免疫检查点抑制剂疗效中也显示出独特的优势，相关临床研究正在开展^[17]，在预测免疫药物敏感性方面显示出巨大潜力。

由于原代肿瘤细胞数量有限，在 PTC 模型培养成功后，临床医师可根据对患者肿瘤及治疗情况的综合判断，决定拟优先检测的药物或药物组合，从而为患者用药选择提供参考。

5 结直肠癌 PTC 药敏结果判读标准

专家共识 8: PTC 药敏检测将药物杀伤效果划分为 5 个等级，分别为强杀伤、有效杀伤、稳定、耐药、强烈耐药，优先推荐强杀伤和有效杀伤的方案。

证据等级: 1B

PTC 药敏检测结果根据加药前后各孔位的 PTC 微球总面积变化和剩余细胞活力评估药效，并根据检测结果将杀伤效果划分为 5 个等级，分别为强杀伤、有效杀伤、稳定、耐药、强烈耐药，其中强杀伤和有效杀伤是优先推荐的方案^[13]，具体判断标准如表 2 所示。

联合用药方案的作用不等于单药作用的叠加。由于药物的协同作用和剂量（组合）的不同，药物组合方案对癌细胞的杀伤作用不等于单个药物的简单叠加，如：A 药和 B 药对癌细胞均不敏感，但 A+B 联合方案可能敏感。

表 2 结肠癌 PTC 药敏检测结果解读

Table 2 Interpretation of drug-sensitivity testing results for colorectal cancer PTCs

杀伤等级	死亡细胞比例	剩余活性细胞比例	内涵	用药方案
强杀伤	> 0.7	0 ~ 0.3	药物作用下，多数肿瘤细胞团瓦解凋亡或体积变小，极少数耐药细胞可能留存	当几个筛选方案的杀伤效率落在此区间时，如 A 和 B 方案，当死亡细胞比例（A-B）≥10% 时，选用 A 方案；当死亡细胞比例（A-B）<10% 时，则选择毒副作用小的方案
有效杀伤	0.3 ~ 0.7	0.3 ~ 0.7	药物作用下，部分肿瘤细胞团瓦解凋亡或体积变小，仍然可见明显耐药细胞团留存	

续表

杀伤等级	死亡细胞比例	剩余活性细胞比例	内涵	用药方案
稳定	0.1 ~ 0.3	0.7 ~ 0.9	药物作用下, 肿瘤细胞团增殖速度明显放缓, 部分细胞团体积略微变小, 药物杀伤效果不明显	当所有筛选方案的杀伤效率都落在此区间时, 则建议按照医生的临床经验指导用药
耐药	0 ~ 0.1	0.9 ~ 1.0	药物作用下, 肿瘤细胞团增殖速度明显放缓, 药物杀伤效果不明显, 但高剂量药物可能有效	
强烈耐药	0	1.0	药物作用下, 肿瘤细胞团快速增殖, 处于生长状态	

第二部分 操作指南

1 结直肠癌微肿瘤 PTC 模型构建

1.1 人员及实验室配备

微肿瘤 PTC 模型标本采集与处理应由接受过专业培训的医护人员/工作人员进行, 若医疗机构具备培养条件, 则在医疗机构内部实验室进行培养; 若医疗机构不具备培养条件, 则将样本送至第三方机构进行培养, 最后培养单位或部门将培养报告反馈给患者或接诊医师, 为治疗提供参考。

1.2 伦理审批、知情同意及隐私保护

组织采集前应在充分告知、尊重提供者权利的前提下签署知情同意书, 包括样本采集知情同意书、微肿瘤 PTC 模型构建及药物敏感性检测知情同意书。如为开展临床研究使用, 应获得伦理委员会审批, 并在相关的临床研究登记平台进行注册公示。样本临床数据需匿名化处理。

1.3 结直肠肿瘤组织取样

对于实体肿瘤组织, 切取时应取血管丰富的新鲜肿瘤组织 (新鲜组织应在离体 30 min 内切取), 避免坏死区域、纤维化区域、脂肪组织以及被电刀灼烧过的组织, 最大程度保持组织中的细胞活力, 要求肿瘤组织不少于 50 mg (体积约 5 mm×5 mm×5 mm)。切取的实体瘤组织应在生理盐水中进行振荡清洗, 去除污浊。

对于穿刺样本, 需要 2 条以上, 每条长度≥1 cm; 对于胃肠镜组织, 需要 2 块, 总长度≥1 cm。

对于胸腹水, 用引流袋取下段的 50 ~ 100 mL 液体。

实体肿瘤切除、穿刺、活检, 或者胸腹水等收集, 全部在洁净环境中完成取样, 如手术室、操作室等, 避免微生物污染样本。

1.4 样本保存

样本采集后, 立刻保存于含 5 mL 样本保存液的 15 mL 无菌离心管内, 4℃保存, 尽快送检。

1.5 结直肠癌微肿瘤 PTC 的构建

步骤 1 组织块的清洗: 组织样本收集后置于 4℃的 PBS 中 (添加 10 mmol/L HEPES 和 100 U/mL P/S 双抗), 及时将组织用 PBS 至少清洗 5 次, 并尽可能的去除样本中坏死区域和脂肪组织。

步骤 2 组织细胞的消化: 将组织剪切成小块后用组织消化酶*37℃消化 1 h, 在消化过程中每 15 min 用枪头进行吸吹, 组织消化液配置方法如下: 将胶原蛋白酶 I、II、IV 和 EDTA 加入 PBS 中, 其中三种胶原蛋白酶的终浓度均为 200 U/mL, EDTA 终浓度为 1 mmol/L。

*组织消化酶主要构成: I、II、IV 型胶原酶与 EDTA。

步骤 3 组织细胞消化物的过滤: 消化结束后用 100 μm 的滤网进行过滤收集细胞悬液。

步骤 4 重悬离心沉淀物: 在 4℃条件下 300 g 离心 10 min 收集细胞, 细胞沉淀用 PTC 培养基*进行重悬。

*培养基主要构成: 抗菌-抗真菌剂三抗、HEPES、GlutaMax、人重组蛋白 EGF、人重组蛋白 bFGF、人重组蛋白 HGF、人重组蛋白 Noggin、人重组蛋白 R-spondin、人重组蛋白 IL-2、人重组蛋白 IL-15、SB202190、皮质醇、Forskolin、A83-01、Primocin、N-乙酰-L-半胱氨酸、烟碱、N2 Supplement、霍乱毒素、B27、ITS-X、Y-27632 和 Advanced DMEM/F12 培养基。

步骤 5 PTC 培养物接种细胞培养基: 将细胞以 1×10⁵/cm² 的密度铺于低吸附孔板中*, 置于细胞培养箱 (37℃, 5% CO₂) 进行培养, 并每隔 2 ~ 3 d

进行加换液。

*将获取的细胞悬液用移液枪先吹打混匀, 再分装至对应的96孔板中(使每个孔中含有30~50个PTC微球), 此过程中切忌产生大量气泡, 以免影响后续拍照和AI识别。96孔板在培养物接种后可向周围多余空白孔内加入适量PBS缓冲液, 以减少培养基孵育过程中的液体挥发, 保持一定湿度。

1.6 PTC质量控制

细胞培养2~7 d, 显微镜明场视野下观察PTC克隆的形成情况。如7 d内始终无PTC克隆形成则宣告培养失败。如有PTC克隆形成则留存明场照片, 质检培养物中细菌、真菌、支原体感染情况, 鉴定为阴性的样本可以进行药物敏感性实验。

1.6.1 显微镜下形态评估

PTC在显微镜明场下观察到的形态近似球状, 质地较为均匀, 直径通常为40~300 μm ^[11, 13-14]。

1.6.2 细胞活力评估

ATP是活细胞新陈代谢的一个指标, 通过对培养的各类肿瘤组织细胞簇中的ATP进行定量测定来检测培养物中活细胞数目。检测步骤就是将单一试剂(Cell Titer-Glo®试剂)直接加入培养细胞中, 然后用仪器读取测定, 无需洗涤细胞、去除培养基或进行多步骤加样操作。

1.6.3 细胞免疫学、病理学状态评估

通过苏木精-伊红染色分析PTC形态; 通过组织特异性蛋白以及病理标志物的免疫荧光染色和免疫组化染色, 表征PTC组织特异性和病理特征; 通过基因组测序和转录组测序, 表征PTC分子和遗传学特征; 通过细胞特异性免疫荧光和流式细胞术, 表征PTC细胞学特征。

对应肿瘤组织亦进行以上表征, 比较肿瘤组织与微肿瘤PTC模型的相似性。

2 结直肠癌微肿瘤PTC药敏检测方法

2.1 PTC药敏检测

2.1.1 PTC微球筛选

PTC培养后通过40 μm 滤网收集直径>40 μm 的PTC微球。

2.1.2 清洗、重悬

用PBS清洗, 4℃条件下300 g离心10 min收集细胞后用PTC培养基重悬, 并以每孔100 μL 细胞悬液的量(包含30~50个PTC微球)加入聚四氟乙烯改性芯片(GeneX Health, GX-01)。

2.1.3 检测药物加样

将含有不同药物的50 μL PTC培养基加到对应的每个检测孔中。

2.1.4 初始图像采集

通过Nikon Ti-U显微镜系统获取每孔中PTC的图像。

2.1.5 药物处理

将培养板置于细胞培养箱(37℃, 5% CO_2)中继续培养。

2.1.6 药物处理后图像采集

药物处理7 d后, 分别再次通过Nikon Ti-U显微镜系统获取每个孔中PTC的图像。

2.2 药物工作浓度

根据临床治疗中药物的客观缓解率(Objective Response Rate, ORR)反向确定微肿瘤PTC药敏检测体系中药物的工作浓度(Efficacy concentration, Ec)。

如: 临床试验中显示伊立替康的ORR是33.3%^[25-29]。当伊立替康的Ec为1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 利用PTC药敏检测体系在所检测的21例患者中药物有效率(Efficacy Rate, ER)为33.3%(7/21)。该浓度下, $\text{ER}=\text{ORR}$ 。结肠癌PTC药敏检测体系用到的药物均利用以上方法确定最终工作浓度。

《结直肠癌PTC模型构建及药敏检测专家共识及操作指南(2025年版)》

编审组专家名单(按姓氏汉语拼音排序)

主任委员: 林国乐(中国医学科学院北京协和医院); 席建忠(北京大学)

编写组组长: 李 鹏(中国人民解放军总医院); 卢 云(青岛大学附属医院); 宁 宁(北京大学国际医院); 陶凯雄(华中科技大学同济医学院附属协和医院); 王晰程(中国医学科学院北京协和医院)

参与专家共识投票专家组成员:

安 焱(北京市第六医院); 陈景波(山东第一医科大学第一附属医院); 陈伟杰(中国医学科学院北京协和医院); 代 忠(北京市朝阳区恒兴肿瘤医院); 付 卫(北京大学第三医院); 郭 鹏(北京大学人民

医院); 韩加刚 (首都医科大学附属北京朝阳医院); 黄莹莹 (北京医院); 梁 军 (北京大学国际医院); 刘 骞 (中国医学科学院肿瘤医院); 陆君阳 (中国医学科学院北京协和医院); 汤庆超 (哈尔滨医科大学附属第二医院); 王桂华 (华中科技大学同济医学院附属协和医院); 武爱文 (北京大学肿瘤医院); 吴国举 (北京医院); 谢耕晨 (华中科技大学同济医学院附属协和医院); 姚宏伟 (首都医科大学附属北京友谊医院); 周 雷 (中日友好医院); 周皎琳 (中国医学科学院北京协和医院)

执笔: 邱小原 (中国医学科学院北京协和医院); 尹申意 (北京基石生命科技有限公司)

利益冲突声明: 本文所有专家组成员均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] SCHAEFER O, LANGER M. Detection of recurrent rectal cancer with CT, MRI and PET / CT[J]. *Eur Radiol*, 2007, 17(8): 2044-2054.
- [4] 国家卫生健康委员会医政司, 中华医学会肿瘤学分会. 国家卫健委中国结直肠癌诊疗规范(2023版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2023, 43(6): 602-630.
- [5] GOODWIN R A, ASMIS T R. Overview of systemic therapy for colorectal cancer[J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2009, 22(4): 251-256.
- [6] YATES L R, CAMPBELL P J. Evolution of the cancer genome[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(11): 795-806.
- [7] BEDARD P L, HANSEN A R, RATAIN M J, et al. Tumour heterogeneity in the clinic[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 355-364.
- [8] SEVIN B U, PENG Z L, PERRAS J P, et al. Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing[J]. *Gynecol Oncol*, 1988, 31(1): 191-204.
- [9] SHAMIR E R, EWALD A J. Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(10): 647-664.
- [10] GAO H, KORN J M, FERRETTI S, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response[J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1318-1325.
- [11] GENGENBACHER N, SINGHAL M, AUGUSTIN H G. Preclinical mouse solid tumour models: Status quo, challenges and perspectives[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(12): 751-765.
- [12] JIANG S, ZHAO H, ZHANG W, et al. An automated organoid platform with inter-organoid homogeneity and inter-patient heterogeneity[J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1(9): 100161.
- [13] YIN S, XI R, WU A, et al. Patient-derived tumor-like cell clusters for drug testing in cancer therapy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(549): eaaz1723.
- [14] 季加孚, 席建忠. 微肿瘤模型构建及其药敏检测技术中国专家共识(2023年版)[J]. *生物医学转化*, 2023, 4(4): 86-94.
- [15] GUYATT G H, OXMAN A D, KUNZ R, et al. Going from evidence to recommendations[J]. *BMJ*, 2008, 336(7652): 1049-1051.
- [16] LIU H, SU H, WANG F, et al. Pharmacological boosting of cGAS activation sensitizes chemotherapy by enhancing antitumor immunity[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(3): 112275.
- [17] YIN S, YU Y, WU N, et al. Patient-derived tumor-like cell clusters for personalized chemo- and immunotherapies in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(5): 717-733. e718.
- [18] GAO T, HE X, WANG J, et al. Self-assembled patient-derived tumor-like cell clusters for personalized drug testing in diverse sarcomas[J]. *Cell Rep Med*, 2025, 6(3): 101990.
- [19] LIN F, YIN S, ZHANG Z, et al. Multimodal targeting chimeras enable integrated immunotherapy leveraging tumor-immune microenvironment[J]. *Cell*, 2024, 187(26): 7470-7491. e7432.
- [20] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022, 20(2): 167-192.
- [21] VOSKOGLOU-NOMIKOS T, PATER J L, SEYMOUR L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(11): 4227-4239.
- [22] BRANCATO V, OLIVEIRA J M, CORRELO V M, et al. Could 3D models of cancer enhance drug screening?[J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119744.
- [23] LIU Y, WU W, CAI C, et al. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: Technologies and applications[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 160.

[24] SAKAI S, KOBUCHI S, ITO Y, et al. Assessment of drug -drug interaction and optimization in capecitabine and irinotecan combination regimen using a physiologically based pharmacokinetic model[J]. J Pharm Sci, 2022, 111(5): 1522-1530.

[25] VAN DE WETERING M, FRANCIES H E, FRANCIS J M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients[J]. Cell, 2015, 161(4): 933-945.

[26] MCCRACKEN K W, CATA E M, CRAWFORD C M, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids[J]. Nature, 2014, 516(7531): 400-404.

[27] JACOB F, SALINAS R D, ZHANG D Y, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity[J]. Cell, 2020, 180(1): 188-204. e122.

[28] ROERINK S F, SASAKI N, LEE-SIX H, et al. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level[J]. Nature, 2018, 556(7702): 457-462.

[29] 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.

附件一：

结直肠癌微肿瘤 PTC 可检测化疗药物名录	
编号	药物名称
1	氟尿嘧啶 ^a
2	奥沙利铂
3	SN-38 ^b
4	顺铂
5	卡铂
6	丝裂霉素
7	雷替曲塞
8	多西他赛
9	表柔比星
10	紫杉醇

注：a. 替吉奥、卡培他滨药物经体内代谢后实际发挥杀伤作用的为氟尿嘧啶，因此这两个药物的检测采用氟尿嘧啶；b. 伊立替康经体内代谢后实际发挥杀伤作用的为 SN-38，因此伊立替康检测采用 SN-38。

附件二：

结直肠癌微肿瘤 PTC 可检测靶向药物名录	
编号	药物名称
1	西妥昔单抗
2	帕尼单抗
3	曲妥珠单抗
4	帕妥珠单抗
5	瑞戈非尼
6	维莫非尼
7	拉罗替尼
8	恩曲替尼