·短篇论著·

患者来源肿瘤样细胞簇技术在肺腺癌精准治疗中的应用

Precision treatment of lung adenocarcinoma using patient-derived tumor-like cell cluster technology

于正伦，刘宽斌，邱俊雅
（中国医科大学附属第一医院胸外科，沈阳 110001）

摘要 探讨患者来源肿瘤样细胞簇（PTC）技术在肺腺癌诊断和治疗中的应用价值，特别是在个性化医疗和药物敏感性评估中的作用。利用基因检测技术和PTC技术分析5例肺腺癌患者的基因突变情况及模拟体外肿瘤微环境，评估患者的药物敏感性，验证基因检测结果的临床应用价值。发现在5例患者中，PTC检测结果与基因检测结果一致，能够准确评估药物敏感性。PTC技术在肺腺癌的个性化治疗中具有显著优势，能够有效验证基因检测结果的临床应用价值，指导精准用药。

关键词 肺腺癌；患者来源肿瘤样细胞簇技术；基因检测；个性化治疗
中图分类号 R734.2 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646（2026）05-0460-05
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260515.1538.026
DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2026.05.014

肺腺癌是非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）的主要亚型，约占所有肺癌的40%[1]，超过50%的晚期患者在接受一线靶向治疗后1~2年内出现耐药[2-3]，5年生存率仅约15%[4]。肿瘤异质性、耐药机制复杂及治疗方案局限成为制约疗效提升的关键问题[5]。患者来源肿瘤样细胞簇（patient-derived tumor-like cell cluster，PTC）技术通过原代培养患者的肿瘤组织，构建保留原发肿瘤生物学特征和微环境的三维细胞模型，为精准评估药物敏感性、解析耐药机制提供了活体平台[6]。目前PTC技术在肺腺癌中的应用尚处于探索阶段，其与基因检测结果的一致性、对临床疗效的预测价值仍需更多临床数据验证。本研究通过分析5例肺腺癌患者的基因检测结果与PTC药物敏感性检测数据，探讨PTC技术在精准医疗中的实际应用价值，旨在验证其对基因检测指导靶向治疗的补充作用，为个体化治疗方案的制定提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2024年1月1日至6月30日间中国医科大学附属第一医院胸外科收治的5例肺腺癌患者的肿瘤组织样本及临床病理信息。纳入标准：经病理组织学确诊为肺腺癌（根据世界卫生组织2021肺癌分类标准）；临床分期为ⅢB~Ⅳ期或术后复发转移患者，具有可获取的肿瘤组织样本（CT引导下肺穿刺活检）；未接受过系统性抗肿瘤治疗（靶向治疗、化疗、免疫治疗）或停药≥4周；患者或家属签署知情同意书，自愿参与本研究。排除标准：样本量不足（肿瘤组织<50 mg）或严重坏死；合并其他恶性肿瘤或严重心、肝、肾功能障碍；拒绝提供随访数据。本研究经中国医科大学附属第一医院医学伦理委员会批准（AF-SOP-07-1.2-01），所有患者签署知情同意书。

1.2 样本收集与处理

1.2.1 肿瘤组织获取：经CT引导下肺穿刺活检获取3~5条肿瘤组织（直径≥1 mm），直接转移至含培养基的离心管中，避免干燥。

1.2.2 样本处理：组织块经PBS洗涤2次后，加入含0.25%胶原酶Ⅳ（美国Sigma公司）和0.1%透明质酸酶（瑞士Roche公司）的消化液，37 ℃振荡孵育45 min，经70 μm细胞筛网过滤，1 500 r/min离心5 min，收集单细胞悬液。台盼蓝染色计数活细胞，确保细胞存活率>80%。

1.3 基因检测

基金项目：辽宁省自然科学基金（2024-MS-070）
作者简介：于正伦（1987-），男，副主任医师，博士.
通信作者：于正伦，E-mail：alan5915@126.com
收稿日期：2025-05-09
网络出版时间：2026-05-18 15:33:28

1.3.1　基因组DNA提取：采用 QIAamp DNA Mini Kit（德国QIAGEN公司）提取肿瘤组织及PTC细胞基因组DNA，用Nanodrop 2000（美国ThermoFisher Scientific公司）测定浓度（$A_{260/280}$=1.8~2.0），经Qubit 4.0荧光定量仪定量（>100 ng/μL）。

1.3.2　靶向高通量测序（next generation sequencing，NGS）：使用SureSelect XT Human All Exon V7 试剂盒（美国Agilent公司）捕获全外显子区域，基于Illumina NovaSeq 6000平台进行双端150 bp 测序，目标测序深度≥1 000×。数据经BWA-MEM比对至hg38参考基因组，Genome Analysis Toolkit 4.2基因组分析工具包进行变异检测，筛选肺癌相关驱动基因（*EGFR*、*ALK*、*MET*、*BRAF*、*RET*、*NTRK1*等）的点突变、插入缺失、融合及拷贝数变异。

1.3.3　突变解读：依据美国国家综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）NSCLC指南（2024版）、世界卫生组织分子病理标准及OncoKB数据库（https://www.oncokb.org/），判定突变临床意义。驱动基因突变定义为经美国食品药品监督管理局/欧洲药品管理局批准靶向药物对应的致病性变异（如 *EGFR* 19Del、*ALK*融合），伴随突变定义为可能影响疗效或预后的变异（如*TP53*、*KRAS*突变）。

1.4　PTC培养与鉴定

1.4.1　原代细胞培养：采用无血清培养基Advanced DMEM/F12（美国Gibco公司），添加10 mmol/L HEPES、1×N2 Supplement、2×B27 Supplement（不含维生素A，美国Gibco公司）、50 ng/mL Noggin（美国PeproTech公司）、100 ng/mL RSPO1（美国PeproTech公司）、50 ng/mL表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）（美国PeproTech公司）及1%青霉素-链霉素。单细胞悬液以2×10^4/孔接种于超低吸附96孔板（美国Corning公司），于37 ℃、5%CO_2培养箱培养，每48 h换液1次，培养7~14 d，至形成直径50~200 μm的PTC。

1.4.2　PTC鉴定：（1）形态学观察，倒置相差显微镜下每日观察PTC形态，记录生长速度、三维结构特征（如不规则形、上皮样、核仁特征）。（2）免疫荧光染色，PTC 经 4% 多聚甲醛固定后，依次孵育上皮标志物抗体（CK7，1∶200，英国abcam公司）、间质标志物抗体（Vimentin，1∶100，美国CST公司）及DAPI染核，荧光显微镜下观察细胞表型。

1.5　药物敏感性测试

1.5.1　药物处理：选取临床常用靶向药物及对照药物（顺铂、紫杉醇），溶于DMSO，配制成10 mmol/L母液，实验浓度设为5个对数梯度（如10^{-6}~10^{-2} μmol/L），每个浓度设3个复孔。取对数生长期 PTC（约50个细胞簇/孔）接种于96孔板，加入含药物的培养基，37 ℃孵育72 h。

1.5.2　细胞活力检测：采用CCK-8法检测细胞活力。每孔加入10 μL CCK-8溶液（日本Dojindo公司），孵育2 h后，酶标仪测定450 nm吸光度（optical density，OD）。细胞存活率（%）=（药物组OD值-空白组OD值）/（对照组OD值-空白组OD值）×100。通过 Graph Pad Prism 9拟合剂量-反应曲线，计算半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}），定义IC_{50}<1 μmol/L为敏感，IC_{50}≥1 μmol/L为耐药。

1.6　统计学分析

将基因检测结果（驱动基因、伴随突变）、PTC 形态学特征（细胞簇形态、核仁分级）及药物敏感性数据（IC_{50}值、敏感药物）录入 Excel 数据库，建立患者个体化档案。采用Kappa系数评估基因检测推荐药物与PTC药物敏感性结果的一致性（Kappa>0.75为高度一致，0.4~0.75为中度一致，<0.4为低度一致）。

2　结果

2.1　患者基线特征及基因检测结果

共纳入5例ⅢB~Ⅳ期肺腺癌患者，其中男3例，女 2例，年龄48~65岁（中位年龄56岁）。病理类型均为原发性肺腺癌。经CT引导下肺穿刺活检，所有样本均经病理确认肿瘤细胞占比>50%，细胞存活率>80%。

5例患者均检测到明确驱动基因突变，涵盖*EGFR*、*ALK*、*MET*、*BRAF*、*RET*等肺癌常见靶点。患者1，*EGFR*基因19外显子缺失（19Del，VAF=72%），伴随*TP53*基因p.R273H错义突变（VAF=45%）。患者2，*ALK*基因E6：*ALK*融合（EML4-ALK v3 型），伴随*KRAS*基因G12C 突变（VAF=38%）。患者3，*MET*基因14外显子跳跃突变（c.3091-1G>A），伴随*ERBB2*基因 p.V659E错义突变（VAF=22%）。患者4，*BRAF*基因V600E突变（VAF=68%），伴随*NRAS*基因Q61R突变（VAF=35%）。患者5，*RET*基因KIF5B-RET融合（exon12：exon10），伴随*NTRK1*基因E6：ETV6融合

（VAF=18%）。见表1。

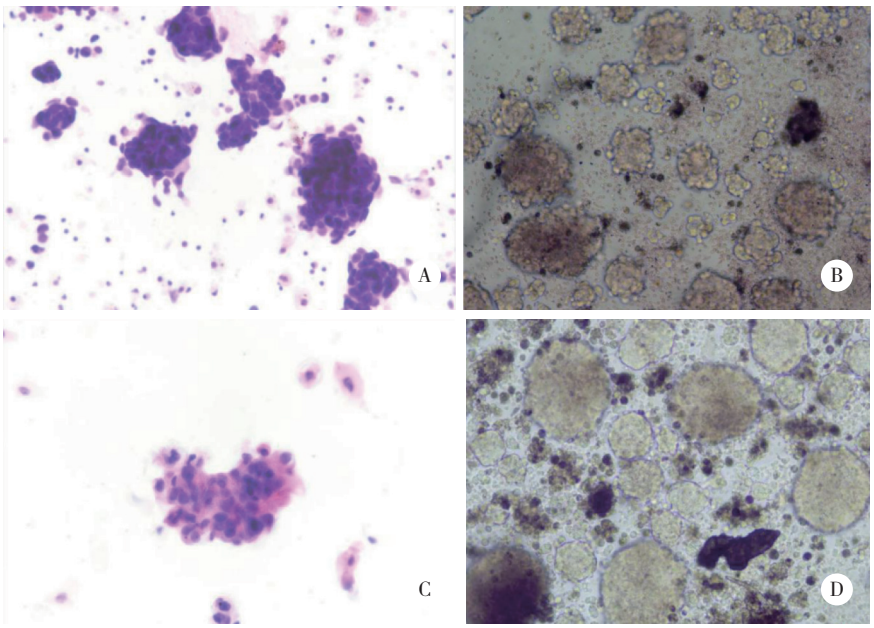
2.2　PTC培养与鉴定结果

5例患者肿瘤组织均成功培养PTC，培养成功率为100%，平均形成时间为（9.2±2.1）d。显微镜下观察到2种主要形态：（1）不规则形（患者1、4），细胞簇边界不清晰，细胞大小差异显著，核仁明显，提示高侵袭性表型；（2）上皮样形态（患者2、3、5），细胞排列紧密，呈腺泡状或铺路石样，核仁较均匀，保留腺癌细胞分化特征。见图1。

2.3　药物敏感性测试结果

表1　5例肺腺癌患者基线特征及基因检测结果

编号	性别	年龄（岁）	分期	驱动基因	伴随突变	靶向方案	备注
1	女	48	ⅢB	*EGFR* 19Del	*TP53* p.R273H	吉非替尼+贝伐珠单抗	*TP53*突变提示 TKI 耐药风险
2	男	53	ⅢB	*ALK* E6:*ALK*融合	*KRAS* G12C	克唑替尼+曲美替尼	*KRAS*突变可能削弱ALK疗效
3	男	56	Ⅳ	*MET* 14外显子跳跃	*ERBB2* p.V659E	卡马替尼+妥卡替尼	*ERBB2*突变需联合抗 HER2 治疗
4	男	61	Ⅳ	*BRAF* V600E	*NRAS* Q61R	维莫非尼+考比替尼	*NRAS*突变可能激活旁路通路
5	女	65	Ⅳ	*RET* KIF5B融合	*NTRK1* E6:ETV6	塞尔帕替尼+拉罗替尼	双靶点融合需双重抑制



A，患者1不规则形PTC，细胞簇边界不清晰（HE，×400）；B，患者1不规则形PTC，细胞球呈巢状分布（×400）；C，患者3上皮样PTC，细胞排列紧密呈巢状（HE，×400）；D，患者3上皮样PTC，类器官内部形成腔隙样结构（×400）.

图1　肺腺癌患者PTC形态学特征

2.3.1　靶向药物敏感性：PTC对对应靶点药物均表现出敏感性（IC_{50}<1 μmol/L），对非靶向药物耐药（IC_{50}≥1 μmol/L）。患者1，吉非替尼敏感（IC_{50}=0.12 μmol/L），奥希替尼耐药（IC_{50}>10 μmol/L），顺铂耐药（IC_{50}=8.5 μmol/L）。患者2，克唑替尼敏感（IC_{50}=0.08 μmol/L），紫杉醇耐药（IC_{50}=5.2 μmol/L）。患者3，卡马替尼敏感（IC_{50}=0.05 μmol/L），曲妥珠单抗耐药（IC_{50}≥10 μmol/L，因未针对*ERBB2*突变单独用药）。患者4，维莫非尼敏感（IC_{50}=0.2 μmol/L），MEK抑制剂考比替尼敏感（IC_{50}=0.3 μmol/L，联合用药协同效应）。患者5，塞尔帕替尼敏感（IC_{50}=0.03 μmol/L），拉罗替尼敏感（IC_{50}=0.05 μmol/L，因*NTRK*融合同时存在）。

2.3.2　伴随突变对药物敏感性的影响：患者1的*TP53*突变与奥希替尼耐药相关（IC_{50}>10 μmol/L），而患者2的*KRAS* G12C 突变未影响ALK抑制剂克唑替尼的敏感性（IC_{50}=0.08 μmol/L），提示伴随突变对药物反应的影响存在异质性。

2.4　基因检测结果与PTC药物敏感性结果的一致性分析

采用Kappa系数评估两者一致性，结果显示，Kappa=0.92（$P<0.001$），表明基因检测推荐药物与PTC药物敏感性结果高度一致。5例患者中，基因检测提示的靶向药物在PTC模型中均表现为敏感，且PTC进一步揭示了第3代TKI耐药（患者1）及双靶点融合药物选择（患者5）的个体化差异。见表2。

表2　基因检测与PTC药物敏感性检测结果对比

患者编号	基因检测推荐药物	PTC 药物敏感性	差异分析
1	第1代/第3代TKI	吉非替尼敏感（IC_{50}=0.12 μmol/L） 奥希替尼耐药（IC_{50}>10 μmol/L）	*TP53*突变可能介导第3代TKI 耐药
2	ALK抑制剂	克唑替尼敏感（IC_{50}=0.08 μmol/L）	*KRAS*突变未影响ALK直接作用
3	MET抑制剂	卡马替尼敏感（IC_{50}=0.05 μmol/L）	*ERBB2*突变需额外 HER2 治疗验证
4	BRAF抑制剂	维莫非尼敏感（IC_{50}=0.2 μmol/L）	*NRAS*突变未导致BRAF耐药（可能依赖MEK通路）
5	RET抑制剂	塞尔帕替尼敏感（IC_{50}=0.03 μmol/L）	*NTRK*融合未产生交叉耐药

3　讨论

本研究通过5例肺腺癌患者的临床应用，系统展示了PTC技术在肺腺癌个体化诊疗中的三重优势。

3.1　基因检测的活体功能验证平台

基因检测虽能明确驱动基因突变，但无法直接反映药物对肿瘤细胞的实际杀伤效应。本研究中，患者1基因检测结果提示可选用第1代/第3代EGFR-TKI，但PTC药敏试验显示奥希替尼耐药（IC_{50}>10 μmol/L），与*TP53* p.R273H突变介导的DNA损伤修复通路激活相关。这表明PTC技术可作为基因检测的“功能验证层”，避免单纯依赖基因型导致的治疗误判。患者5的*NTRK1*融合未对RET抑制剂产生交叉耐药，证实 PTC 能准确反映双靶点变异的药物兼容性，为罕见突变组合的治疗提供实证依据。

3.2　肿瘤异质性的体外映射模型

肺腺癌的高度异质性导致同一患者的不同病灶可能存在耐药亚克隆。本研究通过PTC形态学发现不规则形PTC（患者1、4）提示与高侵袭性表型相关。这种表型异质性在传统二维细胞培养中难以保留，而PTC技术通过三维培养体系成功模拟了肿瘤细胞的空间结构与功能亚群，为解析耐药机制（如上皮–间质转化介导的靶向耐药）提供了直观模型。

3.3　快速药物敏感性检测的临床实用价值

本研究中PTC培养成功率达100%，平均形成时间9.2 d，显著快于患者来源的异种移植模型（4~8周），且CCK-8法检测周期仅72 h，符合临床快速决策需求。5例患者的PTC药物敏感性结果与基因检测推荐药物高度一致（Kappa=0.92），尤其在伴随突变的影响评估中展现优势，患者2的*KRAS* G12C突变未削弱ALK抑制剂敏感性，提示靶向药物可绕过下游通路突变直接作用于融合蛋白，这一发现为复杂突变背景下的治疗选择提供了新视角。

此外，本研究结果有助于探索PTC技术与基因检测的协同诊疗模式。基因检测与PTC 技术的联合应用构建了“分子分型–功能验证–方案优化”的精准医疗闭环。分子分型：NGS检测明确驱动基因（*EGFR* 19Del、*ALK*融合）及伴随突变（如*TP53*、*KRAS*），划定潜在靶向药物范围。功能验证：PTC药敏试验排除基因检测中的“潜在耐药”（如患者1的奥希替尼耐药），补充药物反应的表型证据。方案优化：基于PTC形态学特征（如核仁明显提示高增殖活性），可考虑联合周期特异性药物（如紫杉醇），形成“靶向+化疗”的个体化组合方案。这种模式尤其适用于罕见突变（如*RET/NTRK*双融合）和复杂突变（如*BRAF* V600E+*NRAS* Q61R）患者，通过PTC技术验证药物协同效应（如患者4的维莫非尼+考比替尼联合敏感），避免经验性用药的局限性。

本研究还探索了伴随突变对药物反应的异质性影响，结果发现，伴随突变对药物敏感性的影响存在显著差异。耐药相关突变：患者1的*TP53* p.R273H突变与奥希替尼耐药直接相关，可能通过激活MDM2/p53信号通路降低第3代TKI的凋亡诱导效应，这与文献报道的*TP53*突变介导 EGFR-TKI耐药机制一致。无显著影响突变：患者2的*KRAS* G12C

突变未影响克唑替尼敏感性，推测ALK融合蛋白的强致癌依赖性可能抵消了KRAS通路激活的补偿效应，提示ALK抑制剂对融合基因的“驱动成瘾性”具有高度特异性。上述差异表明，伴随突变的临床意义需结合功能学验证，而非单纯依赖生物信息学预测。PTC技术通过保留原发肿瘤的突变背景与信号通路网络，为解析突变交互作用提供了独特平台。

3.4　转化研究方向

（1）技术优化：开发自动化PTC培养平台，将培养周期缩短至5~7 d，提升临床适用性；结合单细胞测序解析PTC内异质性细胞亚群，构建耐药预测模型。（2）临床扩展：开展多中心、前瞻性研究，验证PTC药物敏感性结果与临床疗效（如客观缓解率、无进展生存期）的相关性；探索胸腔积液、痰液等无创样本来源的PTC培养技术，降低样本获取创伤。（3）机制深挖：针对形态学–功能关联（如上皮样形态与EGFR 表达的正相关性），解析细胞极性调控对靶向药物敏感性的影响，为开发新型增敏策略提供靶点。

本研究存在局限性：仅纳入5 例患者，虽培养成功率达100%，但肺腺癌不同病理亚型（如微浸润腺癌、实性亚型）及耐药患者的PTC 培养效率仍需大样本验证；微环境简化问题，当前PTC模型未包含肿瘤相关成纤维细胞、免疫细胞等基质成分，可能影响药物渗透与免疫调节相关药物敏感性结果，需开发共培养体系；长期培养稳定性，本研究仅验证了2周内的基因稳定性，传代次数对PTC生物学特征的影响（如耐药亚群富集）尚需进一步研究。

综上所述，本研究基于PTC技术通过整合基因层面的分子特征与表型层面的功能反应，为肺腺癌的精准治疗提供了“双重保险”。未来可构建 PTC 药物敏感性指导下的靶向治疗临床路径，对新诊断患者同步进行NGS检测与PTC培养，7~10 d内出具“基因型推荐+表型验证”的个体化方案，尤其适用于一线治疗失败、需二线药物筛选的患者。随着技术标准化与成本优化，PTC技术有望成为继基因检测之后精准医疗时代又一核心工具，推动肺腺癌治疗从“基于指南的群体治疗”向“基于个体的精准干预”跨越。

参考文献：

[1] RIELY GJ，WOOD DE，ETTINGER DS，et al. Non-small cell lung cancer，version 4.2024，NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Cancer Netw，2024，22（4）：249-274. DOI：10.6004/jnccn.2204.0023.

[2] GANDHI S，CHEN HB，ZHAO YJ，et al. First-line treatment of advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer，2015，6：71-82. DOI：10.2147/LCTT.S63491.

[3] BARR KUMARAKULASINGHE N，ZANWIJK NV，SOO RA. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer（NSCLC）[J]. Respirology，2015，20（3）：370-378. DOI：10.1111/resp.12490.

[4] LIN JJ，CARDARELLA S，LYDON CA，et al. Five-year survival in EGFR-mutant metastatic lung adenocarcinoma treated with EGFR-TKIs [J]. J Thorac Oncol，2016，11（4）：556-565. DOI：10.1016/j.jtho.2015.12.103.

[5] CRUCITTA S，CUCCHIARA F，MATHIJSSEN R，et al. Treatment-driven tumour heterogeneity and drug resistance：lessons from solid tumours [J]. Cancer Treat Rev，2022，104：102340. DOI：10.1016/j.ctrv.2022.102340.

[6] 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. DOI：10.1126/scitranslmed.aaz1723.

（编辑　王又冬）