

类器官模型在恶性间皮瘤中的研究进展

雍盛^{1,2,3} 杨晓彤¹ 曹炜¹ 闵卫润¹ 金大成^{2,3} 苟云久^{2,3*}

(¹甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000; ²甘肃省胸部疾病临床医学研究中心, 兰州 730000;

³甘肃省人民医院胸外科, 兰州 730000)

摘要 恶性间皮瘤(malignant mesothelioma, MM)是一种和石棉暴露密切相关的罕见癌症, 其临床预后较差, 且由于临床病例的匮乏, 研究受到限制。传统的二维细胞和动物模型在模拟MM的复杂生物学特性方面存在局限性。类器官作为新兴的临床前模型, 为MM研究提供新的视角。类器官是经体外三维培养形成的微型细胞簇, 能够自组织并模拟体内器官结构和功能。类器官模型在肺癌、食管癌和胸腺癌等胸部疾病研究中已取得成功, 而MM类器官仍处于探索阶段。该文从构建方法、应用现状、面临挑战三个方面对类器官在MM的研究进展进行综述, 旨在为相关研究提供参考和依据。

关键词 恶性间皮瘤; 类器官; 疾病模型; 精准医学

Research Progress of Organoids Models in Malignant Mesothelioma

YONG Sheng^{1,2,3}, YANG Xiaotong¹, CAO Wei¹, MIN Weirun¹, JIN Dacheng^{2,3}, GOU Yunjiu^{2,3*}

(¹First Clinical Medical School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

²Gansu Provincial Thoracic Disease Clinical Medical Research Center, Lanzhou 730000, China;

³Department of Thoracic Surgery, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

Abstract MM (malignant mesothelioma) is a rare cancer closely associated with asbestos exposure, characterized by poor clinical prognosis and limited research due to the scarcity of clinical cases. Traditional two-dimensional cell and animal models exhibit limitations in replicating the complex biological characteristics of MM. Organoids, as emerging preclinical models, offer new insights into MM research. These are miniature cell clusters formed through *in vitro* three-dimensional culture, capable of self-organizing to mimic the structure and function of *in vivo* organs. Organoid models have been successfully applied in studies of thoracic diseases such as lung cancer, esophageal cancer, and thymic cancer, While MM organoids remain in the exploratory stage. This review summarizes the progress of organoids in MM research from three perspectives: construction methods, current applications, and challenges faced, aiming to provide reference and guidance for related studies.

Keywords malignant mesothelioma; organoids; disease models; precision medicine

恶性间皮瘤(malignant mesothelioma, MM)是一种和石棉暴露密切相关的罕见且高度侵袭性的癌症, 主要发生于胸膜、腹膜、心包及睾丸鞘膜的间皮细胞^[1]。数据显示, 2019年中国MM新发病例和死

亡病例分别为2 815例和2 773例^[2]。由于该病具有罕见性和长达20~40年的潜伏期, 误诊率较高, 进而导致患者预后不良, 中位生存期仅为12个月, 5年生存率为5%~10%^[3-4]。临床病例的匮乏限制了对其疾病

收稿日期: 2024-11-10 接受日期: 2025-02-10

甘肃省科技计划(批准号: 21JR7RA673)资助的课题

*通信作者。Tel: 13919127670, E-mail: gouyunjiu@163.com

Received: November 10, 2024

Accepted: February 10, 2025

This work was supported by the Science and Technology Projects in Gansu Province (Grant No.21JR7RA673)

*Corresponding author. Tel: +86-13919127670, E-mail: gouyunjiu@163.com

机制的深入研究。

传统的MM研究方法主要依赖于体外二维细胞系和体内动物模型。尽管二维细胞系具有无限传代的增殖潜力,但无法再现肿瘤的三维结构,缺少细胞与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)之间的动态相互作用,且长期培养后基因型和组织学表型会发生改变^[5]。动物模型虽然能够展示出与人类MM相似的特征,但由于研究周期长、成本高、种属差异及伦理问题,其临床应用性有限^[6]。由于癌症的复杂性和异质性,这些临床前模型往往不能准确反映肿瘤的原始特征,因此开发更适用的癌症模型显得尤为重要。

类器官是通过多能干细胞或组织干细胞在体外三维培养后自组织形成的微型细胞簇,具备自我更新和分化为功能性细胞类型的能力,能够模拟体内器官的结构和功能^[7]。近年来,类器官已成为癌症研究中极具前景的疾病模型工具。类器官保留了原始肿瘤的组织学结构、分子遗传特征和异质性多样性,更能代表患者的个体疾病特征^[8]。作为临床前模型,类器官不仅弥补了二维细胞培养与体内模型的差距,还提供了符合3R原则(替代、减少、优化)的替代方案,减少了对动物实验的依赖^[9]。

在胸部疾病研究中,类器官模型已成功应用于多种肿瘤,包括肺癌^[10]、食管癌^[11]和胸腺瘤^[12]。类器官这一前沿技术在疾病建模、生物样本库构建、药物筛选和毒性评估、精准医学和再生医学等多个领域中展现出发展潜力^[13]。本文将详细综述类器官模型在MM研究中的最新进展,分析其面临的挑战,并探讨其未来发展方向,为MM相关研究提供参考。

1 MM类器官模型的构建方法

1.1 MM类器官模型的来源

MM类器官是一种通过培养原代肿瘤细胞,或在正常类器官中引入致瘤突变构建的肿瘤模型^[14]。大多数已报道的MM类器官是从活检或手术获取的原始肿瘤组织中分离出含有成体干细胞的细胞簇而构建的^[15-19]。这种技术保留了肿瘤的原始特征,被广泛应用于类器官生物样本库的建立^[20-22]。MM主要发生在胸膜和腹膜,尽管80%的病例发生在胸膜,但腹膜常用于MM类器官模型采样,因为两者在分子特征上相似^[23]。在临床样本不足时,可以通过腹腔诱导的MM动物模型获取细胞,如ITO等^[16]通过向

小鼠腹腔注入青石棉和多壁碳纳米管构建了鼠源MM类器官。然而,采集的肿瘤组织可能只代表部分肿瘤特征,这使得采样质量至关重要^[24]。

除了传统的活检或手术外,胸腹水采集也是一种重要的补充方法^[25-27]。相比于直接获取肿瘤组织,胸腹水采集更具非侵入性,并可在治疗过程中持续监测药物反应^[28]。然而,MM患者的胸水中仅含上皮样MM和双相型MM的上皮样细胞,缺乏肉瘤样细胞,这可能会影响MM类器官的组织学分型^[29]。此外,血液中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)也被认为是潜在的肿瘤细胞来源,尽管尚未广泛应用于MM类器官构建。CTCs能够提供肿瘤基因组异质性的全面信息,并在研究肿瘤转移机制中具有潜力。然而,CTCs在外周血中的数量稀少,如何提高捕获效率是构建CTCs衍生类器官的主要挑战^[30]。

另一种构建肿瘤类器官的方法是向正常类器官中引入致瘤突变,即遗传工程肿瘤类器官。通过规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)等基因编辑工具在健康组织中引入特定突变,可以诱导肿瘤生长。虽然此方法在MM类器官中尚未被报道,但在其他肿瘤研究中已有成功应用^[31-32]。未来,针对MM常见突变基因如*BAP1*、*NF2*和*CDKN2A*的遗传工程类器官研究将成为可能^[33]。相较于经典的经原代肿瘤细胞构建类器官的技术,遗传工程肿瘤类器官结合了基因编辑的优势,能够从头研究基因功能,并筛查潜在的肿瘤抑制因子^[34]。尽管CRISPR-Cas9技术简化了基因工程过程,但脱靶效应仍是其主要风险^[35]。新兴的CRISPR-Cas9介导的同源性非依赖性类器官转基因(CRISPR-Cas9-mediated homology-independent organoid transgenesis, CRISPR-HOT)技术,可实现外源DNA序列的精准整合,提高癌症模型开发的精度,并允许实时动态观测^[36-37]。

此外,建立遗传工程类器官需要关注干细胞的选择。类器官的构建主要依赖于胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)和成体干细胞(adult stem cell, ASC)。ESC具有强大的自我更新和多向分化能力,但其使用涉及伦理争议; iPSC避免了伦理问题,但其培养要求精确复杂,这可能导致不同批次的类器官间存在差异; ASC在长期培养中表现出遗传稳定性,但其生长状况通常不如基于原代组织的类器

官^[38]。关于MM类器官模型的具体来源及基本信息, 详见表1。

1.2 MM类器官模型的培养条件

细胞外支架通过模拟体内的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 环境, 为类器官的体外生长提供必要的物理支撑和生物化学信号。水凝胶因其具有与天然组织相似的生物特性, 被广泛用作三维细胞培养的支架材料, 主要分为天然、半合成和合成类型^[39]。在构建MM类器官模型时, 最常用的支架材料是天然水凝胶中的基质胶。基质胶来源于Engelbreth-Holm-Swarm小鼠肉瘤的基底膜提取物, 其主要成分是层黏连蛋白和胶原蛋白, 能够促进细胞的生长、分化和血管生成, 被视为类器官培养的金标准生物材料^[40]。然而, 基质胶的化学成分不确定性和异种污染物的存在限制了其适用性。蛋白质组学分析揭示了基质胶中相当大的变异性, 每项新研究都发现了未记录或未检测到的蛋白质^[41]。且在多个批次的动物源性ECM产品中发现病毒污染的证据, 这可能会限制含基质胶培养物中扩增细胞的治疗潜力。此外, 基质胶批次间生化性质的不一致性可能导致实验结果的可重复性问题。基质胶的动物来源使得难以区分实验变量和基质胶本身引起的生物效应, 尤其是在与含血清培养基结合使用时, 这种模糊性和异种污染物的存在现象可能会加剧。因此, 在解释基于基质胶培养的细胞结果时需谨慎。

半合成水凝胶应用于MM类器官构建也有报道, 例如, 聚乙二醇二丙烯酸酯 (polyethylene glycol

diacrylate, PEGDA)改性的透明质酸^[15]和甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA)改性的胶原蛋白^[17]。这些半合成水凝胶通过化学改性结合了天然水凝胶的生物活性, 并具备了可调节的机械性能^[42]。合成水凝胶如聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 衍生物因其易于制备、成本相低、不可生物降解且机械性能可调, 成为应用最广泛的合成生物相容性材料, 然而, PEG衍生物本身具有生物惰性, 无法支持细胞黏附^[43]。一般来说, 天然水凝胶虽然具有良好的生物相容性和生物降解性, 但机械性能 (如刚度和拉伸性) 较差; 合成水凝胶则相反, 具有较高机械性能但生物活性差。半合成水凝胶作为折中方案, 通过化学改性结合了两者的优点, 但仍面临免疫原性反应和病原体污染的风险。

另外, OLIVETO等^[19]采用双光子聚合 (two-photon polymerization, 2PP) 3D打印技术合成了一种微工程多孔支架 Nichoids。这种支架能够在无需外源性细胞因子的条件下长期维持多能干细胞的功能^[44-45]。作为水凝胶的新兴替代品, 多孔支架也被用于脑^[46]、心脏^[47]、骨^[48]等类器官的构建。结合了类器官培养和生物打印技术的多孔支架, 可以对TME内空间异质性进行精确控制, 其结构更具细胞特异性和分离良好的特性, 更适合类器官的生长和成熟。

除了细胞外支架外, 构建MM类器官还需要添加特定的生长因子。生长因子通过与特异性跨膜受体结合, 调节细胞生长、迁移、分化和增殖^[49]。2023年, ITO等^[16]首次使用含表皮细胞生长因子 (epidermal

表 1 恶性间皮瘤类器官的来源及基本信息

Table 1 The origin and basic information of malignant mesothelioma organoids

年份 Year	国家 Country	部位来源 Source of body parts	组织分型 Histological type	样本来源 Sample source	形成时间 Formation time	成功率 Success rate	传代时间 Generation time	稳定性 Stability	最长维持时间 Maximum maintenance time
2018 ^[15]	America	HPE	EM	SRT	/	100% (2/2)	/	/	14 d
2023 ^[16]	Japan	RP	SM, BM	SRT	7 d	64% (7/11)	/	/	6 m
2023 ^[25]	Japan	CP	/	PE	3-6 d	/	7-14 d	/	P5-6
2023 ^[17]	America	HPE	EM, BM	SRT	7 d	94% (16/17)	7 d	/	/
2024 ^[18]	China	HPE	EM	SRT	7 d	86% (7/8)	14-20 d	P4	P9
2024 ^[19]	Italy	HPL	EM	SRT	/	/	/	/	/
2024 ^[26]	Austra	HPL	EM	PE	7-14 d	50% (5/10)	10-14 d	P18-20	P20
2024 ^[27]	Italy	HPL	EM, BM	PE	14 h-5 d	66% (8/12)	/	P3	P5

EM: 上皮样间皮瘤; SM: 肉瘤样间皮瘤; BM: 双相型间皮瘤; SRT: 手术切除组织; PE: 胸腔积液; HPE: 人源腹膜; HPL: 人源胸膜; RP: 鼠源腹膜; CP: 犬源心包膜。/: 未获得相关数据。

EM: epithelioid mesothelioma; SM: sarcomatoid mesothelioma; BM: biphasic mesothelioma; SRT: surgically resected tissues; PE: pleural effusions; HPE: human peritoneum; HPL: human pleura; RP: rat peritoneum; CP: canine pericardium. /: no relevant data obtained.

growth factor, EGF)、Noggin、R-spondin等基本干细胞因子的培养基构建MM类器官,发现EGF是其生长的必要条件。SATO等^[25]的研究进一步表明,添加Wnt、Noggin、R-spondin、EGF、成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)可显著提高类器官的增殖率,而FGF7、FGF10、胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)则无显著效果。EGF、FGF等生长因子因其具有促进细胞增殖的特点被用于类器官培养,然而,由于生态位细胞本身会产生EGF和FGF等生长因子,这使得外源性和内源性生长因子的分析具有挑战性^[50-51]。FANG等^[18]的研究采用其他癌症的培养基构建MM类器官,发现其在胃癌和结直肠癌组合培养基中生长最为明显,但部分MM类器官在第一次传代后出现衰老和死亡,提示现有的组合培养基可能缺乏支持MM类器官生长的关键因子。

HOCKING等^[26]发现将胸腔积液上清液加入培养基后,Noggin、R-spondin抑制了类器官的生长。这可能与胸腔积液中存在其他细胞亚群或细胞因子发挥抗肿瘤作用有关^[52-53]。研究发现恶性胸腔积液可以促进类器官的快速增殖,缩短培养时间,并表现出更高的化疗耐药性,但恶性胸腔积液会改变mRNA表达,需进一步评估其对药物反应特征的影响^[54]。此外,CIOCE等^[27]在培养基中添加了花生四烯酸(arachidonic acid, ARA),发现FGF9显著提高了类器官的产率和稳定性。ARA不仅是必需的多不饱和脂肪酸,还被证明可以介导MM细胞化疗耐药并赋予其生存特性^[55]。ARA由内皮细胞、单核细胞和血小板等TME成分在没有应激源的情况下产生。CIOCE等^[27]推测TME产生的细胞因子在传代中可能会丢失,而添加低剂量的ARA可能会抵消一部分缺失。这些研究表明,尽管生长因子在类器官培养中具有关键作用,但其具体影响可能因实验条件和细胞来源的不同而异。目前MM类器官的培养基及细胞因子成分尚无统一标准。构建MM类器官模型的细胞外支架材料和生长因子总结,详见表2。

1.3 MM类器官模型的表征和验证

在成功构建MM类器官后,评估其与原始肿瘤的相似性是关键步骤。目前,已提出多种验证方法,包括组织形态学、免疫组织化学和测序技术。MM类器官的组织形态学通常通过透射电子显微照片(transmission electron micrograph, TEM)和苏木精-伊

红染色(hematoxylin eosin staining, HES)进行评估。SATO等^[25]的TEM揭示了类器官内明显的核仁、常染色质分布、发育良好的微绒毛及随机排列的微丝,这与MM的特征相一致。FANG等^[18]的HES结果显示,MM类器官表现出与原始肿瘤组织相似的致密结构和囊性空泡。然而不同亚型的MM在形态上可能存在差异,因此,仅依赖组织形态学特征评估MM类器官是不够的。

免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)是用于区分MM类器官的另一种方法。常用标志物包括钙网膜蛋白(calretinin, CR)、平足蛋白(podoplanin, PDPN)、肾母细胞瘤抑癌基因1(wilms' tumor gene 1, WT1)和细胞角蛋白5/6(cytokeratin 5/6, CK5/6)。此外,间皮素、血栓调节蛋白等也被用于验证。CIOCE等^[27]采用流式细胞术替代IHC进行标记物验证。流式细胞术的优势在于可以对大量单细胞群进行表型分析,相较于IHC的人为控制更为客观^[56]。

测序技术用于确定类器官是否复制了原始肿瘤的基因组图谱和突变。FANG等^[18]的全基因组测序结果显示,类器官维持相应组织的肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)。HOCKING等^[26]的全基因组测序结果表明,类器官与原始标本具有共同的基因突变。OLIVETO等^[19]的RNA测序结果显示,三维培养的类器官在转录水平上与原始组织更为相似。因此,MM类器官的验证应包括组织形态学和IHC评估,并结合测序技术提供的分子生物学信息,以全面确认类器官与原始组织的相似性。构建MM类器官模型的评估方法总结,详见表2。

2 类器官模型在MM研究中的应用

2.1 疾病模型建立及机制研究

肿瘤类器官作为连接传统二维细胞和动物模型的桥梁,因其更高的生理相关性和易于操控的特性,已成为一种前途广阔的临床前模型。2018年,MAZZOCCHI等^[15]通过微流控技术与体外三维细胞培养相结合,成功构建了首例MM类器官。此类器官在14天内维持了高细胞活力和稳定的MM生物标志物,证明了其在肿瘤表型模拟中的有效性。在顺铂+培美曲塞与卡铂+培美曲塞的化疗药物筛选中,结果和临床治疗一致,揭示了患者间肿瘤的异质性。然而,样本量的限制使得这一结论需进一步验证。在机制研究方面,使用Zeste同源物2增强子(enhancer

表 2 恶性间皮瘤的培养条件和评估方法

Table 2 Cultivation conditions and evaluation methods for malignant mesothelioma

支架材料 Bracket material	细胞因子 Cytokine	表征和验证 Characterization and verification
PEGDA modified hyaluronic acid and gelatin ^[15]	/	IHC (CK5/6, CR, TM)
Matrigel ^[16]	EGF, R-spondin1, Noggin, Y-27632	HEs, ABs, MCs; IHC (WT1, MSLN)
Matrigel ^[25]	EGF, FGF2, Wnt3a, R-spondin1, Noggin	HEs, TEM; IHC (CKAE1/AE3, WT-1, MSLN, VIM, CDH1)
MAA modified collagen and hyaluronic acid ^[17]	EGF, GlutaMAX, Y-27632, SB202190	IHC (CK7)
Matrigel ^[18]	EGF, FGF10, GlutaMAX, Wnt3a, R-spondin1, Noggin, B27 supplement, A83-01, SB202190, N-acetylcysteine, nicotinamide, gastrin, prostaglandin E2	HEs; IHC (CK5/6, WT-1, MSLN); WGS
Photoresist ^[19]	/	PHs, NPs; RNA-seq
Matrigel ^[26]	EGF, GlutaMAX, Noggin, R-spondin1, N2 supplement, pleural effusion	HEs, TEM; IHC (BAP1, MTAP, CAM5.2, CR, PDPN, Ki67); WGS
Matrigel ^[27]	EGF, FGF2, FGF9, BSA, R-spondin1, Noggin, B27 supplement, insulin, ARA	FC (MSLN, CR, CK5/6, PDPN)

PEGDA: 聚乙二醇二丙烯酸酯; MAA: 甲基丙烯酸; EGF: 表皮生长因子; FGF: 成纤维细胞生长因子; GlutaMAX: L-丙氨酰-L-谷氨酰胺; BSA: 牛血清白蛋白; ARA: 花生四烯酸; IHC: 免疫组织化学; CK5/6: 细胞角蛋白5/6; CR: 钙网膜蛋白; TM: 血栓调节蛋白; HEs: 苏木精伊红染色; ABs: 阿尔新蓝染色; MCs: 黏蛋白卡红染色; WT1: 肾母细胞瘤抑癌基因1; MSLN: 间皮素; CKAE1/AE3: 细胞角蛋白AE1/AE3; VIM: 波形蛋白; CDH1: E-钙黏蛋白; TEM: 透射电子显微照片; CK7: 细胞角蛋白7; WGS: 全基因组测序; PHs: 鬼笔环肽染色; NPs: 核磷蛋白染色; RNA-seq: 转录组测序; BAP1: BRCA1相关蛋白1; MTAP: 甲硫腺苷磷酸化酶; PDPN: 平足蛋白; FC: 流式细胞术。

PEGDA: polyethylene glycol diacrylate; MAA: methacrylic acid; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; GlutaMAX: alanylglutamine; BSA: bovine serum albumin; ARA: arachidonic acid; IHC: immunohistochemistry; CK5/6: cytokeratin 5/6; CR: calretinin; TM: thrombomodulin; HEs: hematoxylin eosin staining; ABs: alcian blue staining; MCs: mucicarmine staining; WT1: Wilms' tumor gene 1; MSLN: mesothelin; CKAE1/AE3: cytokeratin AE1/AE3; VIM: vimentin; CDH1: E-cadherin; TEM: transmission electron micrograph; CK7: cytokeratin 7; WGS: whole genome sequencing; PHs: phalloidin staining; NPs: nucleophosmin staining; RNA-seq: RNA sequencing; BAP1: BRCA1 associated protein-1; MTAP: methylthioadenosine phosphorylase; PDPN: podoplanin; FC: flow cytometry.

of zeste homolog 2, EZH2)抑制剂3-去氮腺嘌呤A(3-deazaneplanocin A, DZNep)对BAP1突变类器官进行干预后,观察到MM细胞数量减少和增殖能力下降,显示出BAP1突变类器官对DZNep的敏感性。这与先前的二维细胞实验结果一致^[57]。此外,微流控技术为类器官研究的扩展提供了可能性,能够探索更多药物组合和剂量。HOCKING等^[26]通过收集恶性胸腔积液建立了类器官培养物。组织病理学分析表明,在MM类器官的早期(P2~P5)和晚期(P18~P20)传代中,BAP1、CDKN2A、MTAP等关键MM生物标志物的一致性得以维持。基因组测序显示,类器官与匹配的活检标本共享83.2%~94.1%的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)。胸腔积液不仅为类器官培养提供了一种微创来源,还能够更好地捕获肿瘤异质性,因为其含有从肿瘤多个

区域脱落的细胞^[58-59]。

类器官还能够模拟复杂的TME,研究免疫细胞、基质细胞和对肿瘤的生长和治疗反应的影响。OLIVETO等^[19]研究了微工程基板Nichoids上二维和三维培养物的生长特性。结果显示,与单层Nichoid相比,三维Nichoids中的细胞活力显著增强。RNA测序分析表明,三维培养的细胞在转录水平上与二维细胞相比具有更高的相似度。ECM成分、细胞骨架元件及细胞-基质相互作用因子的相关基因上调,表明三维Nichoids在转录水平上积极诱导ECM的重塑。ECM作为TME的关键组成部分,其失调是癌症的重要特征^[60]。深入了解TME中ECM的失调有助于发现潜在的癌症治疗靶点。此外,类器官模型能够模拟肿瘤免疫微环境,研究免疫细胞与肿瘤细胞的相互作用,为理解MM的免疫逃逸机制和开发新

的免疫治疗策略提供了新的视角。

2.2 药物筛选和耐药性研究

类器官模型在高通量药物筛选中发挥重要作用。类器官可以保留患者肿瘤的遗传和表型特征,比传统的二维细胞培养更能反映药物在体内的实际效果。通过将类器官暴露于不同药物组合,研究人员可以快速筛选出具有潜在治疗效果的化合物。类器官不仅可作为癌症患者的药物筛选平台,还通过类器官生物库测试临床试验中的药物,扩大其治疗适应症,为MM的治疗提供更多选择。FANG等^[18]评估了MM类器官对14种抗癌药物的敏感性。尽管培美曲塞和铂类药物是MM的首选治疗药物,但仅有部分类器官对其表现出敏感性。而丝裂霉素、长春新碱和氟尿嘧啶等二线药物在类器官中展现出更强的增殖抑制效果。进一步分析显示,虽然患者间的疗效差异显著,但患者的实际治疗效果与MM类器官的药物敏感性结果一致。这表明MM类器官能够在体外替代患者进行疗效分析,为个性化治疗方案的制定提供依据。

此外,由于类器官可以维持和原代肿瘤之间的基因组和转录组相似性,使得类器官在耐药性研究中具有独特优势^[61]。ITO等^[16]建立的鼠源MM类器官在基质胶中增殖为球状体,并在裸鼠皮下荷瘤实验中成功模拟了实际组织结构,在保持了原始组织学特征的同时,其增殖速度明显快于二维MM细胞系。与二维MM细胞系的胞质定位不同,MM类器官通过铜转运蛋白1(copper transporter 1, CTR1)的稳定膜定位对顺铂表现出更高的敏感性。CTR1是顺铂摄取的关键转运蛋白,其抑制可导致化疗耐药^[62]。尽管RNA测序分析显示MM类器官和二维MM细胞系的mRNA表达无显著差异,但后续通过糖基化抑制剂衣霉素(tunicamycin, TM)抑制了CTR1膜定位,验证了CTR1的翻译后修饰(糖基化)而非表达水平调节顺铂敏感性。这表明MM类器官模型为研究克服化疗耐药提供了有力工具。SATO等^[25]生成的犬源MM类器官在4种化疗药物(卡铂、顺铂、多柔比星和吉西他滨)敏感性检测中显示出耐药性。RNA测序分析揭示了MM类器官中细胞黏附分子通路的特异性上调,尤其是E-钙黏蛋白的高表达。E-钙黏蛋白的高表达通常与耐药性相关^[63]。此外,一项回顾性研究指出,与健康对照组相比,MM患者的血清E-钙黏蛋白水平显著升高,且胸腔积液E-钙黏蛋白水

平与疾病进展高风险相关^[64]。这表明与二维细胞相比,MM类器官更能保持其恶性生物学行为,重现实体瘤的耐药性特征。CIOCE等^[27]通过共培养MM类器官和间皮瘤相关成纤维细胞(mesothelioma-associated fibroblast, MAF),研究了MAF对培美曲塞和顺铂化疗应答的影响。结果显示,MAF的存在增强了MM类器官对这两种药物的耐药性。与未化疗的条件培养基相比,化疗处理的共培养物条件培养基中白介素-6(interleukin-6, IL-6)的分泌增加,类器官体积增加并表达肿瘤干细胞标志物。这表明MAF分泌的IL-6可能是导致化疗反应减弱的关键因素。作为TME重要组成部分的癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF),与类器官的共培养为研究肿瘤进展和耐药性提供了重要见解,因为CAF是TME中参与这些过程的主要细胞亚群^[65]。

2.3 个体化精准治疗

个性化治疗是目前癌症治疗的一个重要方向。由于肿瘤的高度异质性,精准医疗需要能够准确捕捉个体患者的肿瘤特征。类器官模型在预测个体化药物反应方面展现出独特优势,与基于大规模患者队列的静态分析不同,类器官模型允许对患者进行动态的个体化分析^[66]。通过从患者肿瘤组织中培养类器官,研究人员可以在体外测试多种药物和剂量组合,从而选择最适合患者的治疗方案,这种方法不仅避免了传统治疗中的“试错”过程,还能够预测治疗反应和优化方案,提高治疗的精准性和有效性。FORSYTHE等^[17]通过研究腹腔热灌注化疗(hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC)的个性化反应,采用顺铂或丝裂霉素C(mitomycin C, MMC)在高温(42 °C)和常温(37 °C)条件下对MM类器官进行处理。结果表明,尽管在整体队列中,顺铂和MMC在高温下的细胞毒性均有所增加,但在个体水平上,高温顺铂的效果更为显著。在16个MM类器官中,高温顺铂在8个(50%)MM类器官中显著增强细胞毒性,而MMC仅在4个MM类器官(25%)中表现出此效应。此外,同一患者不同解剖部位的治疗反应存在异质性。MM结肠转移的类器官对顺铂和MMC在常温和高温下均表现出高度敏感性,而MM卵巢转移的类器官对MMC表现出抗性,仅对加热的顺铂敏感。这种异质性可能与HIPEC中热量增加导致的DNA损伤修复反应有关^[67]。患者来源的肿瘤类器官可以作为测试临床治疗敏感性的有效平台,有

助于揭示患者间和患者内的异质性,并为MM的诊断和药物治疗开发个性化预后模型提供数据支持。

3 类器官模型在MM研究中面临的挑战

尽管类器官模型在MM的研究中展示了巨大的潜力,但其应用仍面临诸多挑战。首先,类器官模型的标准化亟待解决。类器官的培养涉及多种变量,如细胞来源、细胞外支架和生长因子等,缺乏统一的标准化操作流程可能导致实验结果难以比较和重复,进而影响研究结果的可靠性和可推广性。例如,作为三维培养关键组分的基质胶,其机械性能的异质性和批次间差异,使得识别类器官结构和功能所需的信号变得困难,从而影响实验的可重复性^[68]。此外,不同类型的类器官需要特定的培养基质和生长因子,这些培养条件的优化需要操作人员具备丰富的操作经验。其次,将类器官模型的研究成果转化为临床治疗方案仍需大量的临床试验验证。由于类器官培养和维护成本较高,样本量的限制成为显著瓶颈。尽管类器官在模拟TME和药物反应方面具有优势,但其仍无法完全替代体内环境,这需要在临床应用中谨慎评估和验证。最后,类器官的长期培养可能导致基因组不稳定性和肿瘤异质性的丧失,影响其作为疾病模型的准确性。因此,建议使用早期传代的类器官来识别有效药物。为充分发挥类器官模型在MM研究中的潜力,未来研究应在优化培养技术、标准化操作流程和加强多学科合作方面取得突破。这将为类器官模型在MM研究中的应用提供更坚实的基础,并推动其在临床转化中的进展。

4 结语与展望

类器官模型在MM研究中的应用前景广阔。商品化细胞外支架的质量控制是确保类器官培养稳定性、重复性和生理相关性的关键。目前,类器官培养主要依赖于基质胶,但其成分和批次间的差异可能导致培养结果的波动。因此,未来商品化支架的质控应注重成分的标准化和批次一致性。开发新型合成培养基质,能够精确调控其物理和化学性质,是解决这一问题的关键方向。这些新型基质经过严格的成分分析和质量控制,可确保不同批次间的高度一致性。

在质控过程中,商品化支架应整合特定的生物活性分子,如ECM蛋白和生长因子,以更好地模拟

体内微环境。这些分子在支架中均匀分布的同时,还可以保持其生物活性。质控措施应包括生物活性分子含量的定量检测,以及其在支架中分布的均匀性和稳定性测试。

此外,支架的物理和机械性质,如刚度、孔隙率和降解速率,对类器官的生长和分化有重要影响。质控应包括对这些性质的精确测量和调控,以确保它们在特定应用中的适用性。通过优化支架的物理和机械特性,可以为类器官提供更适宜的生长环境。

除了支架质控外,类器官和器官芯片、生物打印、CRISPR-HOT等新技术的协同应用将开发出更精准的新一代类器官模型。自动化培养技术的引入将提升类器官研究的效率和可重复性。未来的自动化系统可实现从细胞分离、培养基质准备、类器官形成到药物筛选的全流程自动化操作。这不仅减少了人为操作误差,还能实现大规模高通量的类器官培养和药物筛选。结合微流控技术,自动化系统可以提供更精细的培养条件控制和动态监测。

生物信息学的结合为类器官模型研究中的数据分析和解读提供了强有力的工具。通过对类器官的基因组、转录组、蛋白质组和代谢组数据进行综合分析,生物信息学可以揭示类器官在分子水平上的特征和变化,并用于构建和验证类器官模型的计算模型,预测基因突变和药物作用效果,指导实验设计和数据解释。高通量测序技术在类器官研究中的应用前景广阔。通过WGS、RNA测序和单细胞测序,研究人员可以全面了解类器官在基因表达、突变谱和细胞异质性方面的特征。这不仅有助于揭示MM的分子机制,还可筛选和验证新的治疗靶点。

类器官模型的研究成果向临床应用的转化是未来的重要目标。作为临床前研究的重要工具,类器官模型不仅用于药物疗效的评估,还可用于个性化治疗方案设计。通过测试患者肿瘤类器官对不同药物的敏感性,选择最适合的治疗方案,可提高临床效果和患者生存率。建立类器官库可以收集和保存来自不同患者和肿瘤亚型的类器官,为研究人员提供丰富的实验材料。通过类器官库,研究人员可以进行大规模的基因突变分析、药物筛选和机制研究,揭示MM的异质性和治疗反应,支持个体化治疗和临床试验。

综上所述,类器官模型在MM研究中的未来充满希望。通过技术改进、多学科交叉研究和临床转

化,类器官模型将为MM的机制研究和治疗策略开发提供强有力的支持。随着新型培养基质的开发、自动化培养技术的引入、生物信息学和高通量测序技术的结合,以及类器官库的建立,类器官模型在MM研究中的应用将更加广泛和深入,为患者带来更多的治疗选择和希望。

参考文献 (References)

- [1] MORAN C A. Mesothelioma: a tumor of ubiquitous distribution [J]. *Adv Anat Pathol*, 2023, 30(4): 241-2.
- [2] HUANG Q, CHEN Y, LIAN L, et al. Burden of malignant mesothelioma in China during 1990-2019 and the projections through 2029 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(3): 214-22.
- [3] JANES S M, ALRIFAI D, FENNELL D A. Perspectives on the treatment of malignant pleural mesothelioma [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(13): 1207-18.
- [4] JIANG Z, SHEN W, YING S, et al. Overexpression of fibulin-3 in tumor tissue predicts poor survival of malignant mesothelioma patients from hand-spinning asbestos exposed area in eastern China [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 20373.
- [5] SHAMSEDDIN M, OBACZ J, GARNETT M J, et al. Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma [J]. *Thorax*, 2021, 76(11): 1154-62.
- [6] 雍盛, 金大成, 董信春, 等. 恶性间皮瘤动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志* (YONG S, JIN D C, DONG X C, et al. Research progress on animal models of malignant mesothelioma [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2024, 34(9): 137-45.
- [7] CORRÒ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-65.
- [8] ABBASIAN M H, SOBHANI N, SISAKHT M M, et al. Patient-derived organoids: a game-changer in personalized cancer medicine [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2024, doi: 10.1007/s12015-024-10805-4.
- [9] ESPOSITO A, FERRARESI A, VALLINO L, et al. Three-dimensional in vitro cell cultures as a feasible and promising alternative to two-dimensional and animal models in cancer research [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(13): 5293-311.
- [10] CHEN X, YE L, WANG H, et al. Promising preclinical models for lung cancer research-lung cancer organoids: a narrative review [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2024, 13(3): 623-34.
- [11] BOLGER J C, ALLEN J, RADULOVICH N, et al. Patient-derived organoids for prediction of treatment response in oesophageal adenocarcinoma [J]. *Br J Surg*, 2024, doi: 10.1093/bjs/znad408.
- [12] WU Y H, CHAO H S, CHIANG C L, et al. Personalized cancer avatars for patients with thymic malignancies: a pilot study with circulating tumor cell-derived organoids [J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(25): 2591-600.
- [13] YAO Q, CHENG S, PAN Q, et al. Organoids: development and applications in disease models, drug discovery, precision medicine, and regenerative medicine [J]. *MedComm*, 2024, 5(10): e735.
- [14] TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 952-5.
- [15] MAZZOCCHI A R, RAJAN S A P, VOTANOPOULOS K I, et al. *In vitro* patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2886.
- [16] ITO F, KATO K, YANATORI I, et al. Matrigel-based organoid culture of malignant mesothelioma reproduces cisplatin sensitivity through CTR1 [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 487.
- [17] FORSYTHE S D, ERALI R A, EDENHOFFER N, et al. Cisplatin exhibits superiority over MMC as a perfusion agent in a peritoneal mesothelioma patient specific organoid HIPEC platform [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 11640.
- [18] FANG X, SHU L, CHEN T, et al. Organoids derived from patients provide a new opportunity for research and individualized treatment of malignant peritoneal mesothelioma [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 12.
- [19] OLIVETO S, RITTER P, DEROMA G, et al. The impact of 3D nichoids and matrix stiffness on primary malignant mesothelioma cells [J]. *Genes*, 2024, doi: 10.3390/genes15020199.
- [20] EBISUDANI T, HAMAMOTO J, TOGASAKI K, et al. Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined wnt dependency in lung adenocarcinoma [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(3): 112212.
- [21] YANG H, CHENG J, ZHUANG H, et al. Pharmacogenomic profiling of intra-tumor heterogeneity using a large organoid biobank of liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(4): 535-51.e8.
- [22] FARIN H F, MOSA M H, NDRESHKJANA B, et al. Colorectal cancer organoid-stroma biobank allows subtype-specific assessment of individualized therapy responses [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(10): 2192-211.
- [23] DAGOGO-JACK I, MADISON R W, LENNERZ J K, et al. Molecular characterization of mesothelioma: impact of histologic type and site of origin on molecular landscape [J]. *JCO Precis Oncol*, 2022, 6: e2100422.
- [24] THOREL L, PERRÉARD M, FLORENT R, et al. Patient-derived tumor organoids: a new avenue for preclinical research and precision medicine in oncology [J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(7): 1531-51.
- [25] SATO Y, ELBADAWY M, SUZUKI K, et al. Establishment of an experimental model of canine malignant mesothelioma organoid culture using a three-dimensional culture method [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114651.
- [26] HOCKING A J, MORTIMER L A, FARRALL A L, et al. Establishing mesothelioma patient-derived organoid models from malignant pleural effusions [J]. *Lung Cancer*, 2024, 191: 107542.
- [27] CIOCE M, GATTI V, NAPOLITANO F, et al. Mesothelioma-associated fibroblasts modulate the response of mesothelioma patient-derived organoids to chemotherapy via interleukin-6 [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, doi: 10.3390/ijms25105355.
- [28] CHOI W, KIM Y H, WOO S M, et al. Establishment of patient-derived organoids using ascitic or pleural fluid from cancer patients [J]. *Cancer Res Treat*, 2023, 55(4): 1077-86.
- [29] HJERPE A, ABD OWN S, DOBRA K. Integrative approach to cytologic and molecular diagnosis of malignant pleural mesothelioma [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9(3): 934-43.
- [30] HUANG L, XU Y, WANG N, et al. Next-generation prelini-

- cal functional testing models in cancer precision medicine: CTC-derived organoids [J]. *Small Methods*, 2024, 8(1): e2301009.
- [31] HENDRIKS D, PAGLIARO A, ANDREATTA F, et al. Human fetal brain self-organizes into long-term expanding organoids [J]. *Cell*, 2024, 187(3): 712-32, e38.
- [32] DEKKERS J F, WHITTLE J R, VAILLANT F, et al. Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9 mediated engineering of human breast organoids [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(5): 540-4.
- [33] HILTBRUNNER S, FLEISCHMANN Z, SOKOL E S, et al. Genomic landscape of pleural and peritoneal mesothelioma tumours [J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(11): 1997-2005.
- [34] 郭贝贝, 胡慧丽. 类器官在发育与再生中的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(GUO B B, HU H L. Research advances of organoids in development and regeneration [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(6): 1111-9.
- [35] 王琳琳, 李红玲. CRISPR/Cas9基因编辑技术在精准肿瘤学研究中的应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*(WANG L L, LI H L. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in the research of precision oncology [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*), 2024, 31(5): 519-27.
- [36] QU J, KALYANI F S, LIU L, et al. Tumor organoids: synergistic applications, current challenges, and future prospects in cancer therapy [J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(12): 1331-53.
- [37] ARTEGIANI B, HENDRIKS D, BEUMER J, et al. Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(3): 321-31.
- [38] RAUTH S, KARMAKAR S, BATRA S K, et al. Recent advances in organoid development and applications in disease modeling [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188527.
- [39] HO T C, CHANG C C, CHAN H P, et al. Hydrogels: properties and applications in biomedicine [J]. *Molecules*, 2022, doi: 10.3390/molecules27092902.
- [40] PASSANITI A, KLEINMAN H K, MARTIN G R. Matrigel: history/background, uses, and future applications [J]. *J Cell Commun Signal*, 2022, 16(4): 621-6.
- [41] AISENBREY E A, MURPHY W L. Synthetic alternatives to matrigel [J]. *Nat Rev Mater*, 2020, 5(7): 539-51.
- [42] PARK S, PARK K M. Engineered polymeric hydrogels for 3D tissue models [J]. *Polymers*, 2016, doi: 10.3390/polym8010023.
- [43] CAO H, DUAN L, ZHANG Y, et al. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 426.
- [44] ZANDRINI T, SHAN O, PARODI V, et al. Multi-foci laser microfabrication of 3D polymeric scaffolds for stem cell expansion in regenerative medicine [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11761.
- [45] TESTA C, OLIVETO S, JACCHETTI E, et al. Whole transcriptomic analysis of mesenchymal stem cells cultured in nichoid micro-scaffolds [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 945474.
- [46] MUÑIZ A J, TOPAL T, BROOKS M D, et al. Engineered extracellular matrices facilitate brain organoids from human pluripotent stem cells [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2023, 10(7): 1239-53.
- [47] MORIWAKI T, TANI H, HAGA K, et al. Scalable production of homogeneous cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep Methods*, 2023, 3(12): 100666.
- [48] BAPTISTA L S, KRONEMBERGER G S, CÔRTEZ I, et al. Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, doi: 10.3390/ijms19051285.
- [49] SHAN B H, WU F G. Hydrogel-based growth factor delivery platforms: strategies and recent advances [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(5): e2210707.
- [50] ABUD H E, CHAN W H, JARDÉ T. Source and impact of the EGF family of ligands on intestinal stem cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 685665.
- [51] XIE Y, SU N, YANG J, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 181.
- [52] NIU Y, ZHOU Q. Th17 cells and their related cytokines: vital players in progression of malignant pleural effusion [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(4): 194.
- [53] GE S, ZHAO Y, LIANG J, et al. Immune modulation in malignant pleural effusion: from microenvironment to therapeutic implications [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 105.
- [54] WANG L, YU Y, FANG Y, et al. Malignant pleural effusion facilitates the establishment and maintenance of tumor organoid biobank with multiple patient-derived lung tumor cell sources [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2024, 13(1): 115.
- [55] CIOCE M, CANINO C, PASS H, et al. Arachidonic acid drives adaptive responses to chemotherapy-induced stress in malignant mesothelioma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 344.
- [56] ROBINSON J P, OSTAFE R, IYENGAR S N, et al. Flow cytometry: the next revolution [J]. *Cells*, 2023, doi: 10.3390/cells12141875.
- [57] LAFAVE L M, BÉGUELIN W, KOCHE R, et al. Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1344-9.
- [58] MEILLER C, MONTAGNE F, HIRSCH T Z, et al. Multi-site tumor sampling highlights molecular intra-tumor heterogeneity in malignant pleural mesothelioma [J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 113.
- [59] SNEDDON S, DICK I, LEE Y C G, et al. Malignant cells from pleural fluids in malignant mesothelioma patients reveal novel mutations [J]. *Lung Cancer*, 2018, 119: 64-70.
- [60] HUANG J, ZHANG L, WAN D, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 153.
- [61] CHAI C, JI P, XU H, et al. Targeting cancer drug resistance utilizing organoid technology [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114098.
- [62] PABLA N, MURPHY R F, LIU K, et al. The copper transporter *ctr1* contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(3): F505-11.
- [63] YUEN M L, ZHUANG L, RATH E M, et al. The role of e-cadherin and microRNA on FAK inhibitor response in malignant pleural mesothelioma (MPM) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, doi: 10.3390/ijms221910225.
- [64] TSAGKOULI S, KYRIAKOULIS I G, KYRIAKOULIS K G, et al. Serum and pleural soluble cell adhesion molecules in mesothelioma patients: a retrospective cohort study [J]. *Cancers*, 2022,

- doi: 10.3390/cancers14122825.
- [65] PAPAÏT A, ROMOLI J, STEFANI F R, et al. Fight the cancer, hit the CAF [J]. *Cancers*, 2022, doi: 10.3390/cancers14153570.
- [66] VENINGA V, VOEST E E. Tumor organoids: opportunities and challenges to guide precision medicine [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9): 1190-201.
- [67] NI L P, SUN H T, WANG P, et al. Hyperthermia enhances the efficacy of chemotherapeutic drugs in heat-sensitive cells through interfering with DNA damage repair [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(8): 463.
- [68] KOZŁOWSKI M T, CROOK C J, KU H T. Towards organoid culture without matrigel [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1387.