

大脑类器官在胶质母细胞瘤中的应用进展

邵云香, 黄煜伦

苏州大学附属第一医院神经外科, 江苏 苏州 215000

摘 要: 胶质母细胞瘤 (GBM) 是成人最常见的中枢神经系统恶性肿瘤, 具有高度的异质性, 瘤内不同细胞和肿瘤微环境之间存在复杂的相互作用。目前体外模型还不能准确再现脑肿瘤微环境, 体内原位模型耗时长, 成本高昂, 且成功率不高。类器官作为一种新型的肿瘤研究模型能够高度模拟原位组织的生理结构和功能, 可以稳定地维持肿瘤细胞在体内的特征, 已被广泛应用于各种恶性肿瘤的研究。目前已经通过基因编辑技术诱导大脑类器官形成脑肿瘤, 用以研究肿瘤发生的早期阶段, GBM 干细胞与大脑类器官共培养可建立高通量药物筛选, 直接培养建立 GBM 类器官可用来研究肿瘤的生物学特性及预测治疗反应。该文对大脑类器官进行简要介绍, 回顾 GBM 类器官建立的不同实验技术方法, 并对 GBM 类器官的应用进行了归纳。

关键词: 胶质母细胞瘤; 类器官; 3D 培养

中图分类号: 739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.04.024

Advances in the application of cerebral organoids in glioblastoma

SHAO Yun-Xiang, HUANG Yu-Lun. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215000, China

Corresponding author: Huang Yu-Lun, Email: huangyulun@suda.edu.cn

Abstract: Glioblastoma (GBM) is the most common malignant tumor of the central nervous system in adults, with high heterogeneity and complex interactions between tumor cells and the tumor microenvironment. Current in vitro models cannot accurately reproduce the brain tumor microenvironment, and in vivo in situ models are time-consuming, costly, and often not successful. Organoids as a new model system can accurately simulate the physiological structure and function of in situ tumor tissues, and can maintain the characteristics of tumor cells in vivo. Cerebral organoids have been widely used in the study of various malignant tumors. Gene-editing technologies have been established to induce brain tumors in cerebral organoids to study the early stages of tumorigenesis. Cocultivation of GBM stem cells and cerebral organoids can be used for high-throughput drug screening. Alternatively, GBM organoids can be directly established and cultured to study tumor biology and predict treatment response. In this article we briefly introduce the cerebral organoids, review the various experimental techniques for the establishment of GBM organoids, and summarize the applications of GBM organoids.

Key words: glioblastoma; organoids; 3D culture

胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是最常见、最具侵袭性的原发性恶性脑肿瘤^[1]。尽管经过了数十年的深入研究, 患者的平均存活时间仍维持在 12 ~ 15 个月^[2]。标准的治疗包括最大限度的手术切除肿瘤结合放疗和化疗; 然而这些治疗手

段没有明显效果^[3-5]。两大挑战阻碍了 GBM 新疗法的发展。首先, 越来越多的证据表明, 不同患者的肿瘤之间以及同一肿瘤内部存在大量的基因^[6-7]和表观遗传^[8-9]以及转录组的异质性^[10]。最新单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 技术可在单个细胞水平

基金项目: 苏州市民生科技关键技术应用研究 (SS201864), 江苏省卫生计生委面上科研课题: (H2017064; H201621), 江苏省卫计委青年研究课题 (Q201606)

收稿日期: 2020-06-08; **修回日期:** 2020-08-03

作者简介: 邵云香 (1994-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事脑胶质瘤诊断和治疗机制研究。

通信作者: 黄煜伦 (1973-), 男, 博士后, 博士生导师, 主任医师, 主要进行脑肿瘤特别是胶质瘤的手术及综合治疗以及神经内镜微创手术。

上对许多肿瘤实体进行转录组分析。然而,目前对浸润性肿瘤和正常脑细胞之间相互作用的了解有限。GBM 细胞的异质性及其与正常脑细胞如何相互作用,是否与增殖或侵袭能力的差异相关,而这些差异最终决定了患者的预后,因此仍不清楚。

推进 GBM 治疗的第二个挑战是目前缺乏理想的模型来研究人类 GBM 的特性,特别是对周围脑组织的侵袭。传统的体外培养模型,无论是单层培养还是肿瘤球培养,都可能需要大量的时间来建株并使用外源性表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和/或血清,以克隆扩增的方式连续传代肿瘤细胞,这不利于维持亲本肿瘤的各种细胞亚型和关键驱动基因表达^[11-12],并且缺乏器官样组织学特征以及肿瘤与正常组织之间的相互作用。将分离的原代肿瘤细胞直接注入小鼠体内的患者源性异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型被认为可以更好地保留 GBM 的这些重要特征^[13]。然而,这些 PDX 模型的特点表现为低通量、移植成功率不高并且构建成功的肿瘤模型需要 2~11 个月的长时间潜伏期^[14]。基因工程小鼠模型(genetically engineered mouse models, GEMMs)相对准确地模拟了人类脑肿瘤的病理生理特征^[15],但其应用受到人类和啮齿动物大脑的遗传、形态和生理差异的限制,而且建立 GEMMs 也相对昂贵和耗时^[16-18]。因此我们需要更精准的模型,既能再现肿瘤表型以及复杂的肿瘤微环境,又具有支持我们对肿瘤发生发展机制进行详尽研究的能力,特别是考虑到需要对新疗法的治疗潜力提供更准确的预测。

近年来兴起的类器官模型弥补了以上缺点。类器官是指由具有干细胞潜能的细胞进行体外三维培养后形成的细胞团,其具有自我更新和自我组装的能力,并表现出与来源组织相似的结构和功能^[19-20]。与传统的细胞系模型不同,类器官不仅能够长期传代培养,且具有稳定的表型和遗传学特性。目前多种类型类器官在体外成功的培养形成,包括大脑类器官^[21-22]。并且类器官已被应用于各种癌症的模型,包括胰腺癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌和胃肠道癌,并且已被应用于药物敏感性检测^[23-24]、肿瘤发展与耐药机制^[25-26]等各个方向。所以类器官的成功建立对于 GBM 的研究有着重要的意义。本文旨在探讨类器官及其在

GBM 研究中的应用。

1 大脑类器官的建立

多能干细胞具有自我更新、多向分化的潜能。通过模拟多能干细胞的培养微环境,可以控制其增殖分化成为类器官。2009 年 Sato 等^[27]将单个小鼠肠干细胞^[28],在无间质条件下,通过在培养基中加入必要的生长因子模拟微环境,以基质胶为支架,在体外成功培养出包含肠腔上皮中所有的细胞类型、具有隐窝-绒毛样结构的肠道类器官。同时研究人员也摸索、建立起了类器官培养的通用培养基,根据不同的物种、器官加入其他生长因子可以培养出特定的类器官。从此开启了类器官研究的新篇章,迅速成为新的研究热点。

在此基础上,2013 年 Lancaster 等^[21]通过用基质胶包被胚状体无血清培养物(serum-free culture of embryoid body-like quick-aggregation, SFEBq)^[29-31],即先通过形成类胚体(embryoid body, EB),再将这些悬浮培养的 EB 样聚集体逐渐分化为几个极化的神经前体细胞花环结构,随后重新吹悬成神经球,再用含有神经元细胞外基质蛋白的基质胶包埋并转移到旋转生物反应器中以增强营养吸收,从而生成具有特异性皮质特征的大脑类器官。单一类器官内包含不同但相互依赖的大脑区域,包括背侧皮层、腹侧前脑、视网膜、海马体、脉络丛和中脑后脑边界,其模式与发育中的人类胎脑相似。此外,它们还表现出复杂的发育现象,即中间神经元在腹侧前脑产生并迁移到背侧皮质。自此,这种来自于人类多功能干细胞研究人类神经发育过程的体外培养体系建立起来,并在模拟人类神经发育和神经系统疾病的各个方面得到了广泛应用。

2 基因编辑大脑类器官诱导脑肿瘤形成

脑肿瘤的特征是多种 DNA 突变,这些突变会导致癌基因过表达或肿瘤抑制基因功能丧失^[16-18]。2016 年世界卫生组织在对脑肿瘤的分类中将 DNA 突变作为决定性特征之一^[32],强调了在基因层面建立脑肿瘤模型的重要性。Bian 等^[33]利用基因编辑技术在脑类器官中再现在人类肿瘤患者中发现的基因突变,生成了人类脑肿瘤的新体外模型系统并将其命名为肿瘤大脑类器官(neoplastic cerebral organoid, neoCORs)。研究人员通过转座子介导插入已知的致癌基因并利用 CRISPR/Cas-9 技术使肿瘤抑癌基因功能缺失,将这些突变诱导入大脑类器官中从而再现了肿瘤的发生。Ogawa 等^[34]亦通过

引入 CRISPR/Cas-9 和 sgRNAs, 结合激活的癌基因 HRasG12V, 同时破坏肿瘤抑制因子 TP53 在人类大脑类器官中诱导肿瘤。这种方法的主要优点是能够选择基因产生特定的初始致癌基因型。由此生成的类器官更适合于观察 GBM 的起始和肿瘤发生的早期阶段。

3 GBM 干细胞与大脑类器官共培养

多年来的研究表明, 患者来源的胶质瘤干细胞 (glioma stem cell, GSCs) 是亲代肿瘤中最具生物学和表型相关性的细胞^[35-36]。根据细胞的自我更新能力和多谱系分化能力来定义, 这种细胞亚群对于肿瘤在体内的形成、维持和侵袭是必不可少的。此外, GSCs 对电离辐射和细胞毒性药物的耐受性较一般 GBM 增强^[37], 说明 GSCs 在 GBM 的耐药中起重要作用。然而, 重要的是要认识到, 在体内的 GSCs 并不是细胞自主的, 而是与肿瘤宿主细胞、肿瘤细胞外基质和微环境的多种成分相互作用^[38-39]。尽管从理论上讲, 可以将各种脑细胞与 GSC 进行二维 (2D) 共培养以解决宿主-肿瘤细胞之间的相互作用, 但是由此产生的正常细胞的无序混合缺乏人类细胞外基质, 并且也不具有人类大脑组织中精细的三维结构。Linkous 等^[40]用 GFP 标记的患者来源的 GSCs 与大脑类器官共同培养, 发现 GSC 在大脑类器官内深入侵袭和增殖, 形成了脑内胶质母细胞瘤类器官 (cerebral organoid glioma, GLICO)。在这个系统中, 癌细胞不仅与原发的肿瘤细胞行为极为相似, 也能维持原发肿瘤的关键遗传变异。研究人员发现在 GLICO 模型维持患者特异性表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 扩增和磷酸化-RTK 信号转导, 并自发形成与原位肿瘤相似的微管网络, 这些微管深入正常大脑类器官为各种肿瘤亚群提供多细胞连接。这表明该模型可能为保存亲本肿瘤的遗传特性提供更合适的微环境。这种模型的优点是具有患者来源的特定的 GSC 遗传特征, 且该模型具有可扩展性, 可以生成数百个针对患者特异性的 GLICO 用于高通量药物筛选, 这是目前任何体内模型都不可能实现的。然而由于肿瘤的形成是由成熟的 GSC 引发的, 因此它无法控制导致早期癌症发展的致癌突变, 所以该模型不适宜用于研究肿瘤发生的早期阶段。

4 GBM 类器官

2016 年, Hubert 等^[41]开发了直接从 GBM 标本中衍生的肿瘤类器官培养系统。该方法将肿瘤细

胞混悬在基质胶中, 经过 2 个月培养可达到最大约 3~4 mm, 在随后的培养中类器官的生长速度明显减慢, 但在一年多的连续培养过程中没有传代, GBM 类器官仍可以保持稳定和存活。这些类器官再现了体内肿瘤的低氧梯度和肿瘤干细胞的异质性。作者发现在类器官周围有大量 Sox2⁺ 的肿瘤干细胞, 而核心处 Sox2⁺ 细胞的密度较低并且缺氧水平增加。当 Sox2⁺ 干细胞位于类器官的核心或边缘时, 也表现出不同的分子特性。因此, 多个 Sox2⁺ 种群可能在类器官中共存, 这表明类器官微环境可能能够维持不同的 CSCs 同时生长, 并允许肿瘤细胞层次结构的研究。尽管该类器官模型前景广阔, 但仍需要在多个 GBM 之间进行进一步的特性描述和验证。并且构建成功率尚未确定, 可能具有患者特异性。该模型构建的数量为相对较低至中等通量、建立培养所需的时间较长。

最近, Jacob 等^[42]报告了一种新的、更快 GBM 类器官建立方法。这种方法没有将肿瘤标本分离消化, 而是将标本切成 1 mm 左右的碎片, 并且在无基质凝胶和血清、不添加 EGF 和 FGF 的情况下建立类器官。并将其命名为胶质母细胞瘤类器官 (glioblastoma organoids, GBOs)。研究人员采用组织病理学、免疫组织化学、单细胞转录组学、突变分析等方法进行分析, 证实了该类器官可以准确再现亲代肿瘤的组织学特征、细胞多样性、基因表达和突变特征, 并生成一个活的 GBOs 生物库。

GBOs 再现了肿瘤组织结构而不是大脑, 更接近地再现了原发肿瘤的复杂性和异质性, 对研究 GBM 生物学和预测治疗反应具有很大的潜力。它们的主要限制是需要再移植回体内来研究它们与健康脑组织的相互作用。

5 应用

5.1 研究肿瘤的发生发展

GBM 细胞向周围正常大脑的扩散侵袭是 GBM 在生物学方面一个主要治疗挑战。研究表明 GBM 细胞的迁移侵袭伴随着干细胞标志物的表达, 根据这些标志物可以预测患者的预后。因此, 特别针对侵袭性 GBM 表型的干预措施是非常可取的。然而, GBM 细胞浸润特性的分子机制尚不清楚。此外, 开发能使 GBM 细胞浸润到正常组织的体外模型也是一个挑战。Jacob 等^[42]将 8 例 GBOs 样本成功地移植到成年小鼠的大脑中, 显示出癌细胞的快速侵袭性浸润, 并且在 3 个月后维持关键的突变基

因表达。Linkus 等^[40]将大脑类器官在与 GSCs 共培养产生的模型中,胶质瘤细胞浸润脑组织的模式与 GBM 患者的手术和尸体解剖标本相似。不同的患者来源的 GSC 系产生独特的迁移模式和肿瘤细胞侵袭和增殖的程度。da Silvia 等^[43]将患者来源的 GBM 球体与早期小鼠胚胎干细胞中来源的大脑器官类器官共培养。GBM 球状体自发地与类器官附着,随后融合并侵入脑组织。与对照神经祖细胞相比,GBM 细胞具有更大的迁移能力、更有效地向大脑类器官内层浸润。Ogawa 等^[34]在免疫缺陷小鼠海马单侧定位注射了来源于类器官的肿瘤细胞,这些小鼠在几个月内开始死亡。来源于类器官的肿瘤细胞沿血管扩散,HE 染色显示广泛的侵袭性和核多形性,与人 GBM 的生物学特征类似。肿瘤细胞病灶区域显示广泛的 Ki-67 表达,CD31 强染色证明肿瘤具有高度的血管生成,并显示了 GBM 肿瘤干细胞(SOX2 和 GFAP)标记。证明了类器官来源的 GBMs 具有人类肿瘤的全部致癌潜能和特征。综上所述,类器官模拟胶质母细胞侵袭具有时间优势,移植效率高,浸润性强,并保留了关键的驱动突变表达。这为进一步研究脑胶质瘤的潜在机制和后续治疗提供了良好的平台。

5.2 药物筛选与个性化治疗

目前,常规的体外培养筛选临床活性药物和其他干预措施的能力极为有限,特别是对 GBM 而言。并且 GBM 诊断后生存时间短,也需要一个及时、实用的疾病模型和药物检测平台。2D 筛选对临床活性药物识别的预测能力较差重要的原因是未能模拟肿瘤和正常组织微环境以及细胞间相互作用。而类器官可以作为一个及时有效并基于个体患者肿瘤特征的个性化治疗研究平台。Jacbo 等^[42]将辐射和化学制剂包括替莫唑胺(TMZ)、EGFR 抑制剂吉非替尼(gefitinib)、丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)抑制剂曲米替尼(trametinib)和哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)抑制剂埃弗雷莫斯(everolimus)对 GBOs 进行处理,结果显示,不同肿瘤标本来源的 GBOs 对不同药物治疗的反应具有异质性,靶向治疗的疗效在很大程度上与肿瘤的突变状态和通路富集相一致。这些结果证明了 GBOs 对个性化药物治疗反应的快速、功能测试的价值。Linkous 等^[40]亦用化疗药物及辐射对 GLICO 做了处理,结果均表现为细胞活力下降,并与在 2D 环境下相比,同基因 GSC 系在 GLICO 的微环境中生长时比

在传统 2D 条件下生长时对药物和辐射诱导的基因毒性应激具有更高的抵抗性,这与在体内的结果相似。这说明了 GLICO 在提高体外治疗筛选的预测效率方面的潜力。

5.3 免疫治疗

随着癌症免疫治疗在临床中发挥着越来越重要的作用,一些研究报告表明,患者来源的肿瘤类器官可以用来模拟这种新疗法的效果。Jacob 等^[42]将与 EGFRvIII⁺的肿瘤细胞有特异反应的 CAR-T 细胞与 GBOs 共培养,发现它们对携带 EGFRvIII 突变的 GBOs 表现出特效:CAR-T 细胞发生增殖,表达 EGFRvIII 的细胞在减少,而对 EGFR⁺ EGFRvIII⁻的肿瘤细胞无杀伤作用。证明了 GBOs 在利用内源性靶点快速检测抗原特异性 CAR-T 细胞治疗反应方面的实用性。Neal 等^[44]通过气液界面(ALI)方法建立了患者来源的肿瘤类器官,并与含有内源性、同基因的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)共同进行增殖,TIL 完全保留了原有的肿瘤 T 细胞受体谱。结果表明 ALI 类器官再现了 PD-1 依赖的免疫检查点,并阻断 PD-1 激活的肿瘤抗原特异性 TIL 引发的肿瘤细胞毒性。这种基于 ALI 类器官的方法使得针对个体的抗 PD-1 治疗的可行性得以测试,并且对于个体化 PD-1 抑制的胶质瘤的治疗是至关重要的。另一项研究表明患者来源的肿瘤类器官与外周血淋巴细胞共培养可获得肿瘤反应性 T 细胞。这种 T 细胞不识别自体健康的器官或组织,但对肿瘤细胞具有很强的细胞毒功能^[45]。该平台还可以评估肿瘤细胞对 T 细胞介导的杀伤敏感性,它可以扩展到分析免疫治疗过程中不同时间点的疗效。对于最初对免疫治疗方案有反应但最终面临肿瘤复发的胶质瘤患者,基于复发前后配对的肿瘤和血液样本建立共培养,提供了一个有价值的工具,可以剖析潜在的复发原因,有助于开发针对驱动耐药的通路的药物,以提高肿瘤对 T 细胞攻击的敏感性。

6 不足与展望

GBM 不是一组孤立的肿瘤细胞,而是由一组具有高度异质性和广泛浸润的功能细胞组成,伴有血管生成,受神经元活动支配,与肿瘤微环境密切相关。上述所说 GBOs 模型旨在精确模拟 GBM 的生物学特性,但由于缺乏免疫相互作用、血管化和神经支配,目前还没有完善的临床前模型。一些新的研究进展为改善目前类器官培养中的技术难

点提供了新思路甚至有望解决血管化、神经化问题。Kankala 等^[46]使用 3D 打印技术打造了心脏血管组织模型。Moldovan 等^[47]利用将内皮细胞和平滑肌祖细胞自组装成类似血管的结构。Krencik 等^[48]共同培养人类神经元和星形胶质细胞,再现了体内看到的神经元连接。与这些先进技术的结合有望打破现有生长瓶颈,并且为构建灵敏、准确、持续的类器官评价平台提供可能。

7 结语

总的来说,类器官在基因水平和形态特点上能够很好地模拟患者体内相应的组织,也适用于高通量的药物筛选,同时为疾病的个性化治疗提供了研究模型。尽管在模拟体内肿瘤生长上仍有许多方面有待改进,类器官仍不失为帮助我们研究 GBM 发生、发展的有效工具。相信随着类器官研究的不断深入和技术的不断革新,类器官作为一种理想的模型在人类研究癌症的征途上将会扮演越来越重要的角色。

参 考 文 献

- [1] Ricard D, Idbaih A, Ducray F, et al. Primary brain tumours in adults [J]. *The Lancet*, 2012, 379 (9830): 1984-1996.
- [2] Aldape K, Brindle KM, Chesler L, et al. Challenges to curing primary brain tumours [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(8): 509-520.
- [3] Wick W, Gorlia T, Bendszus M, et al. Lomustine and bevacizumab in progressive glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(20): 1954-1963.
- [4] Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT, et al. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, 6(12): 1475-1506.
- [5] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
- [6] Meyer M, Reimand J, Lan X, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(3): 851-856.
- [7] Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10): 4009-4014.
- [8] Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, et al. The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1611-1624.
- [9] Mazor T, Pankov A, Song JS, et al. Intratumoral heterogeneity of the epigenome [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4): 440-451.
- [10] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma [J]. *Science*, 2014, 344(6190): 1396-1401.
- [11] Ledur PF, Onzi GR, Zong H, et al. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 69185-69197.
- [12] Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(5): 391-403.
- [13] Giannini C, Sarkaria JN, Saito A, et al. Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme [J]. *Neuro Oncol*, 2005, 7(2): 164-176.
- [14] Patrizii M, Bartucci M, Pine SR, et al. Utility of glioblastoma patient-derived orthotopic xenografts in drug discovery and personalized therapy [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 23.
- [15] Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex [J]. *Cell*, 2011, 146(1): 18-36.
- [16] Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways [J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1061-1068.
- [17] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 462-477.
- [18] Parsons DW, Li M, Zhang X, et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 435-439.
- [19] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [20] Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(3): 246-254.
- [21] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-379.
- [22] Pasca AM, Sloan SA, Clarke LE, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(7): 671-678.

- [23] Astashkina A, Grainger DW. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 69-70: 1-18.
- [24] Zhang L, Zhao J, Liang C, et al. A novel biosensor based on intestinal 3D organoids for detecting the function of BCRP [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1453-1459.
- [25] Karki R, Man SM, Malireddi RKS, et al. NLRC3 is an inhibitory sensor of PI3K-mTOR pathways in cancer [J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 583-587.
- [26] Gao D, Vela I, Shoner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 176-187.
- [27] Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications [J]. *Science*, 2013, 340(6137): 1190-1194.
- [28] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265.
- [29] Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(50): 20284-20289.
- [30] Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(3): 288-296.
- [31] Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 519-532.
- [32] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820.
- [33] Bian S, Repic M, Guo Z, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(8): 631-639.
- [34] Ogawa J, Pao GM, Shokhirev MN, et al. Glioblastoma model using human cerebral organoids [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1220-1229.
- [35] Baysan M, Bozdog S, Cam MC, et al. G-cimp status prediction of glioblastoma samples using mRNA expression data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e47839.
- [36] Baysan M, Woolard K, Bozdog S, et al. Micro-environment causes reversible changes in DNA methylation and mRNA expression profiles in patient-derived glioma stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94045.
- [37] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760.
- [38] Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(4): 395-406.
- [39] Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental landscape of brain tumors [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 326-341.
- [40] Linkous A, Balamatsias D, Snuderl M, et al. Modeling patient-derived glioblastoma with cerebral organoids [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(12): 3203-3211.
- [41] Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, et al. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2465-2477.
- [42] Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity [J]. *Cell*, 2020, 180(1): 188-204.
- [43] da Silva B, Mathew RK, Polson ES, et al. Spontaneous glioblastoma spheroid infiltration of early-stage cerebral organoids models brain tumor invasion [J]. *SLAS Discov*, 2018, 23(8): 862-868.
- [44] Neal JT, Li X, Zhu J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-1988.
- [45] Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids [J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1586-1598.
- [46] Kankala RK, Zhu K, Li J, et al. Fabrication of arbitrary 3D components in cardiac surgery: from macro-, micro-to nanoscale [J]. *Biofabrication*, 2017, 9(3): 032002.
- [47] Moldovan L, Barnard A, Gil CH, et al. iPSC-derived vascular cell spheroids as building blocks for scaffold-free biofabrication [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12(12): 1700444. DOI: 10.1002/biot.201700444.
- [48] Krencik R, Seo K, van Asperen JV, et al. Systematic three-dimensional coculture rapidly recapitulates interactions between human neurons and astrocytes [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(6): 1745-1753.