

团 体 标 准

T/CHSA XXX—2026

人源性口腔鳞状细胞癌类器官培养 技术规范

Technical guidelines for the culture of patient-derived oral squamous cell
carcinoma organoids

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中华口腔医学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会提出。

本文件由中华口腔医学会归口。

本文件起草单位：北京大学口腔医院、上海交通大学医学院附属第九人民医院、四川大学华西口腔医院、武汉大学口腔医院、中国医科大学、吉林大学、北京基石生命科技有限公司、北京肿瘤医院、复旦大学附属中山医院、复旦大学附属华山医院、武汉大学人民医院、南昌大学、伯桢生物科技（苏州）有限公司、空军军医大学第三附属医院、中山大学附属口腔医院、南昌大学第一附属医院、新疆维吾尔自治区人民医院、中南大学湘雅医院、南京大学医学院附属口腔医院、郑州大学第一附属医院。

本文件主要起草人：蔡志刚、谢尚、单小峰、冯秋实、戴姿薇、张馨元、王鹿鸣、康一帆、李梓萌。

本文件论证专家组成员（按姓氏笔画排序）：王志勇、叶青松、安政雯、孙长伏、孙志军、孙宏晨、李龙江、李江、李军、何悦、何巍、张志愿、张陈平、张杰、张函槊、张彬、张雷、尚政军、季彤、周榕、胡浩、赵冰、赵晖、钟来平、侯劲松、章杰、蒋灿华、魏建华。

引 言

口腔鳞状细胞癌（口腔鳞癌）是口腔-头颈颌面部最常见的恶性肿瘤之一，且近年来在年轻人中发病率呈上升趋势^[1]。根据国家癌症中心最新数据，我国口腔癌的年均发病率已升至4.61/10万，年均死亡人数亦高达3.52万。尽管以手术、放化疗为核心的综合治疗策略不断改进，但患者五年总生存率仍仅为50%-60%，预后不理想^[2]。目前口腔鳞癌颈部淋巴结转移发生率高，局部复发及远处转移风险高，化疗特异性差，放疗抵抗，靶向免疫治疗应答率低等问题仍是制约临床诊治的难点^[3]。

目前，口腔鳞癌个体化精准治疗缺乏理想的临床前评价模型。二维肿瘤细胞系和小鼠移植瘤模型因存在较多固有缺陷及应用限制，并非临床研究及疗效评价的最佳选择^[4]。肿瘤类器官是指基于体外三维（3D）培养技术，利用肿瘤组织构建的结构和功能上都与亲本组织器官相似的3D细胞球体，其不仅能够忠实呈现原有肿瘤的生物特征，保持基因表达的稳定性，还可精确预测患者对肿瘤药物的治疗响应^[5]。

患者来源的肿瘤类器官模型被认为是疾病研究的重大突破，为个性化疾病治疗及疾病机制研究提供了新的思路。国内外现已相继建立直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、食管癌、鼻咽癌、胃癌等肿瘤类器官模型^[6-10]。尽管口腔鳞癌类器官模型已有多家单位在研，且取得一定进展。但由于口腔鳞癌源于外胚层，发育机制特殊，冻存复苏困难，迄今暂无口腔鳞癌类器官库构建的报道，直接导致口腔鳞癌个性化研究的样本不足，研究结果不可重复。令人鼓舞的是，近期北京大学口腔医院等合作研究团队已发明一种可以长期稳定传代、冻存及复苏的肿瘤类器官库的构建方法，目前已获国家发明专利^[11, 12]。

为充分发挥口腔鳞癌类器官模型在口腔肿瘤中的研究价值，更好地服务于基础医学和临床研究，规范和引导该技术的应用和发展，特制定本文件，以期推动该技术在基础医学和肿瘤个体化精准医疗中的规范化发展。

人源性口腔鳞状细胞癌类器官培养技术规范

1 范围

本文件规定了人源性口腔鳞癌类器官培养的伦理要求、设备和试剂、操作步骤、技术要求、检测方法。

本文件适用于医学和研究用途的人源性口腔鳞癌类器官的培养。

2 规范性引用文件

GB/T 38736-2020 人类生物样本保藏伦理要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

类器官 organoids

利用成体干细胞或多能干细胞进行体外3D培养而形成的具有部分亲本组织类型、形态结构及生理功能的微型组织器官培养物。

3.2

人源性口腔鳞癌类器官 patient-derived oral squamous cell carcinoma organoids

源自口腔鳞癌患者的肿瘤细胞在体外3D培养条件下形成的在细胞行为、组织病理特征、分子特性等方面与亲本肿瘤组织相近的类器官。

3.3

原代培养 primary culture

将自体组织消化而来的细胞首次置于体外环境进行培养的过程。

3.4

传代培养 passaging

利用物理或者化学方法将类器官解离或消化成单细胞或细胞团，并在原培养条件下再次进行培养的过程。

3.5

冻存 cryopreservation

将体外培养的肿瘤类器官转移至特定的低温环境中，使其生长代谢暂停的同时维持细胞活性及特性，以实现长期保存目的的过程。

3.6

复苏 thawing

将低温存储的肿瘤类器官置于特定的复苏条件下，使其恢复正常生长活力和代谢能力，并重新进入培养、扩增、传代流程的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA: 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin)

DMSO: 二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

FBS: 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)

PBS: 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate-Buffered Saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

5 伦理要求

开展人源性口腔鳞癌类器官培养活动应符合GB/T 38736-2020的规定。

6 设备和试剂

6.1 设备

6.1.1 生物安全柜。

6.1.2 细胞培养箱。

6.1.3 水平式离心机。

6.1.4 倒置显微镜。

6.1.5 水浴锅。

6.1.6 -80 °C超低温冰箱。

6.1.7 液氮罐。

6.1.8 恒温振荡培养箱。

6.1.9 移液器, 规格为10 μL、20 μL、200 μL和1000 μL。

6.1.10 耗材:

- a) 无菌细胞培养板, 规格为24孔和96孔;
- b) 无菌细胞离心管, 规格为1.5 mL、15 mL和50 mL;
- c) 无菌细胞培养皿, 直径规格为2.5 cm 和 6 cm;
- d) 无菌移液管, 规格为5 mL和10 mL;
- e) 无菌吸头, 规格为10 μL、200 μL和1000 μL;
- f) 无菌冻存管, 规格为2 mL;
- g) 无菌镊子;
- h) 无菌组织剪;

i) 无菌细胞过滤器，滤网孔径为100 μm ;

j) 细胞程序性降温冻存盒。

6.2 试剂

表1 实验试剂

实验试剂	体积
原代组织保存液	100 mL
癌症类器官基础培养基	500 mL
肿瘤组织消化液	100 mL
红细胞裂解液	100 mL
Fetal Bovine Serum(FBS) Superb	500 mL
庆大霉素-两性霉素 B 混合溶液	100 mL
类器官冻存液	100 mL
类器官消化液	100 mL
类器官培养基质胶	10 mL
口腔鳞癌类器官试剂盒	500 mL
4%多聚甲醛固定液	500 mL
DPBS缓冲液	500 mL

7 操作步骤

7.1 人源性口腔鳞癌组织样本的获取及运输

7.1.1 用于人源性口腔鳞癌类器官培养的组织样本，应于洁净环境下使用无菌器械从口腔鳞癌患者的病变部位获取；获取标本时应避开坏死区域、碳化区域及非肿瘤区域。

7.1.2 在肿瘤病灶浸润前缘获得口腔鳞癌组织标本，每份肿瘤组织直径0.5-1.0 cm（约黄豆粒大小），不宜过大或过小。

7.1.3 离体的肿瘤组织应使用含抗生素生理盐水即刻清洗2-3次后转入4 °C的组织保存液保存。

7.1.4 低温保存的肿瘤组织应在离体后尽快转运至生物安全柜进行实验，不宜超过48 h。

7.2 人源性口腔鳞癌组织样本的原代培养

7.2.1 修剪组织标本，去除残存坏死组织及脂肪、肌肉组织，使用含庆大霉素-两性霉素B混合溶液的PBS 清洗组织标本3-5次。

7.2.2 剪碎组织，转入离心管，加入预热肿瘤组织消化液于37 °C摇床振荡消化45 min-75 min，直至组织量减少1/4。

7.2.3 过滤消化液及残余肿瘤组织，室温下将过滤液以300×g离心3 min；

7.2.4 弃去上清，观察是否存在红色沉淀；若红色明显，则加入红细胞裂解液，裂解1 min后加入3倍体积的基础培养基终止裂解；

7.2.5 相同参数再次离心，弃去上清液；

7.2.6 加入基础培养基混悬沉淀，进行细胞计数并通过台盼蓝检测细胞活率（见附录A）；

7.2.7 室温下离心，于4 °C环境下加入基质胶，加入量根据接种孔数量确定，每孔30 μL基质胶；4 °C重悬组织细胞，按照每孔30 μL加入24孔板中；

7.2.8 于37 °C中倒置孔板30 min，避免组织细胞贴壁，待基质胶凝固后加入完全培养基500 μL/孔，于37 °C培养箱中培养。

7.2.9 根据类器官的成长速度及类器官数量每2-3天更换完全培养基，同时观察生长状态并拍照记录形态。

7.2.10 进行传代培养与冻存保留，以保存每一代类器官的原始信息。

7.3 人源性口腔鳞癌组织样本的传代培养

7.3.1 在类器官最大径长至100 μm-200 μm时，可进行传代。

7.3.2 弃去类器官培养基，每孔加入1 mL基础培养基，刮下类器官，转移至离心管中。

7.3.3 在4 °C环境静置20 min，使基质胶软化，吹打10次，室温下300×g离心3 min，去除上清。

7.3.4 加入预冷的基础培养基重悬类器官，室温下300×g离心3 min，去除残余基质胶。

7.3.5 弃去上清，加入类器官消化液重悬沉淀（根据类器官数量而定，每孔0.5 mL），在37 °C环境中消化10-15 min，加入胎牛血清200-500 μL并混匀，以终止消化。

7.3.6 室温下300×g离心3 min，弃去上清后加入1 mL基础培养基重悬细胞，转移至1.5 mL离心管中。室温下500×g瞬时离心，弃去沉淀，以去除无法消化的类器官角化中心。

7.3.7 对上述细胞悬液进行计数并通过台盼蓝检测细胞活率（见附录A）。

7.3.8 将细胞悬液室温下， $300\times g$ 离心3 min，去上清，保留沉淀，按每孔约12000个细胞对应30 μL 基质胶的比例计算加入基质胶，混匀后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰盒上待接种，注意避免气泡产生。

7.3.9 按照每孔30 μL 迅速将使用基质胶重悬的细胞加入24孔板中；

7.3.10 于37 $^{\circ}\text{C}$ 中倒置孔板30 min，避免组织细胞贴壁，待基质胶凝固后加入完全培养基500 μL /孔，于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。

7.3.11 根据类器官的生长速度及类器官数量每2-3天更换完全培养基，同时观察生长状态并拍照记录形态。

7.4 人源性口腔鳞癌组织样本的冻存

7.4.1 类器官收集：选择类器官生长状态良好且满足传代条件的培养皿，弃去类器官培养基，每孔加入1 mL基础培养基，刮下类器官，转移至离心管中。

7.4.2 在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境静置20 min，使基质胶软化，吹打10次，室温下 $300\times g$ 离心3 min，去除上清。

7.4.3 加入预冷的基础培养基重悬类器官，室温下 $300\times g$ 离心3 min，去除残余基质胶。

7.4.4 弃去上清，加入类器官消化液重悬沉淀（根据类器官数量而定，每孔0.5 mL），在37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中消化10-15 min，加入胎牛血清200-500 μL 并混匀，以终止消化。

7.4.5 室温下 $300\times g$ ，离心3 min，弃去上清后加入基础培养基重悬细胞，相同参数再行离心，洗去残余类器官消化液。

7.4.6 对上述细胞悬液进行计数并通过台盼蓝检测细胞活率（见附录A）。

7.4.7 按照细胞个数 10^4 - 10^7 个/管，1 mL冻存液/管，于4 $^{\circ}\text{C}$ 环境加入预冷类器官冻存液重悬细胞。

7.4.8 冻存液分装至冻存管，标记样本名称、编号、代数、冻存日期及操作人。

7.4.9 转移冻存管到程序降温盒，-80 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后转移到液氮长期保存（必要时可在-80 $^{\circ}\text{C}$ 环境短期保存，不得超过6个月）。

7.5 人源性口腔鳞癌组织样本的复苏后培养

7.5.1 按37 $^{\circ}\text{C}$ 预热水浴锅，从液氮中取出冻存管，待液氮挥发完全后，将冻存管浸入水浴锅，水面没过冻存管1/3摇晃3 min，溶解即可。

7.5.2 转移类器官悬液到15 mL离心管中，分次加入9 mL预热基础培养基，缓慢吹打重悬细胞。

7.5.3 室温 $300\times g$ 离心3 min，弃去上清后加入1 mL基础培养基，重悬类器官并转移到1.5 mL离心管中。

7.5.4 对上述细胞悬液进行计数并通过台盼蓝检测细胞活率（见附录A）。

7.5.5 将细胞悬液室温下 $300\times g$ ，离心3 min，去上清，保留沉淀，按每孔约12000个细胞对应30 μL 基质胶的比例计算加入基质胶，混匀后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰盒上待接种，注意避免气泡产生。

7.5.6 按照每孔30 μL 迅速将使用基质胶重悬的细胞加入24孔板中；

7.5.7 于37 $^{\circ}\text{C}$ 中倒置孔板30 min，避免组织细胞贴壁，待基质胶凝固后加入完全培养基500 μL /孔，于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。

7.5.8 根据类器官的成长速度及类器官数量每2-3天更换完全培养基，同时观察生长状态并拍照记录形态。

8 技术要求

8.1 采用倒置显微镜对原代培养的人源性口腔鳞癌类器官进行观察，原代培养人源性口腔鳞癌类器官的平均直径应在两周内生长至 50 μm 以上，且具有持续生长的能力。

8.2 人源性口腔鳞癌类器官应能传代三代以上，且维持生长一个月以上。

注：成功培养的人源性口腔鳞癌类器官的典型形态示例见附录B。

8.3 采用苏木精-伊红染色法对人源性口腔鳞癌类器官进行形态学特征鉴定，人源性口腔鳞癌类器官应与亲本组织在形态学特征方面具有一致性。

8.4 采用免疫组织化学染色或免疫荧光染色方法对口腔鳞癌类器官进行分子标志物表达鉴定，人源性口腔鳞癌类器官应与其亲本组织在至少2种所属亚型相关分子标志物的表达模式上保持一致。

8.5 采用高通量测序对类器官进行基因突变谱鉴定，人源性口腔鳞癌类器官应与来源口腔鳞癌组织表现出相似的肿瘤发生驱动基因突变谱、单核苷酸突变位点、拷贝数变异等特征。

9 检测方法

9.1 口腔鳞癌类器官尺寸检测

使用倒置显微镜拍摄和记录类器官图片，依据标尺测算类器官的最大径。

9.2 鉴定

9.2.1 形态学特征

采用苏木精-伊红染色法，按照附录C检测，比较染色后的人源性口腔鳞癌类器官和口腔鳞癌组织的细胞形态学特征及组织形态学特征。

注：染色后的人源性口腔鳞癌类器官和口腔鳞癌组织的形态学特征示例见附录D。

9.2.2 分子标志物表达

采用免疫组织化学染色或免疫荧光染色方法，按照附录E检测，比较人源性口腔鳞癌类器官和口腔鳞癌组织的分子标志物表达。分子标志物宜包括：肿瘤发生标志物TP63，上皮谱系标志物KRT5，肿瘤干性标志物CD44，增殖标志物Ki-67及PCNA等。

注：口腔鳞癌组织和人源性口腔鳞癌类器官的分子标志物免疫荧光染色示例见附录F。

9.2.3 基因突变

委托具备临床基因扩增检验资质且通过ISO 15189或CNAS认可的医学实验室或相关机构，对人源性口腔鳞癌类器官和来源口腔鳞癌组织的DNA样本进行全基因组或全外显子测序(参见附录G)。

附录 A

(规范性)

细胞计数及存活率检测（台盼蓝染色法）

A.1 细胞计数原理

台盼蓝是一种常用的细胞活性鉴别染色剂，可选择性地进入死细胞或组织并将其染成蓝色，而具有完整细胞膜的活细胞不着色。在显微镜下，死细胞呈现明显蓝染与膨大，而活细胞未被染色且形态正常。染色状态及形态差异可用于活死细胞鉴别与计数。

A.2 仪器、设备和试剂

A.2.1 显微镜。

A.2.2 血细胞计数板。

A.2.3 0.4%台盼蓝染液。

A.3 检测方法

收集目标细胞并制成细胞悬液，吸取90 μL 重悬液至离心管中，随后加入10 μL 台盼蓝染色液混匀。吸取10 μL 经过染色的细胞悬液加入血细胞计数板，并于3 min内在显微镜下分别计数活细胞和死细胞。

A.4 细胞存活率计算

细胞存活率计算见下列计算公式。

$$X=L / (L+D) \times 100\%$$

式中：

X—细胞存活率；

L—活细胞数量，单位为个每毫升(个/mL)；

D—死细胞数量，单位为个每毫升(个/mL)。

附录 B

(资料性)

培养成功的人源性口腔鳞癌类器官的典型形态示例

B.1 培养成功的口腔鳞癌类器官的典型形态图

镜下观察原代类器官时，可见部分坏死的细胞碎片，视野内存在一定的杂质。

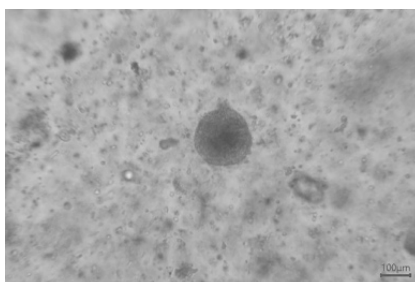


图 B.1 原代口腔鳞癌类器官培养镜下图示例，20×，比例尺100 μm。

B.2 P1代口腔鳞癌类器官培养镜下图

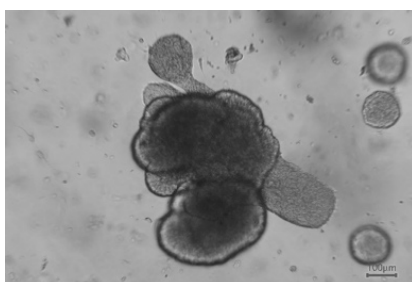


图 B.2 P1代口腔鳞癌类器官培养镜下图示例，20×，比例尺100 μm。

B.3 P3代口腔鳞癌类器官培养镜下图

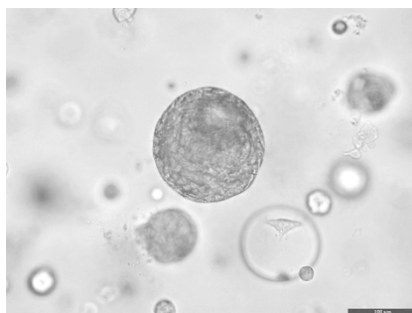


图 B.3 P3代口腔鳞癌类器官培养镜下图示例，20×，比例尺100 μm。

B.4 口腔鳞癌类器官复苏后的镜下图

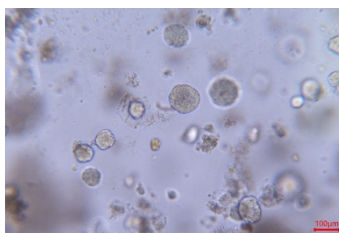


图 B.4 口腔鳞癌类器官复苏后的镜下图示例，10×，比例尺100 μm 。

B.5 口腔鳞癌类器官复苏后传代培养的镜下图

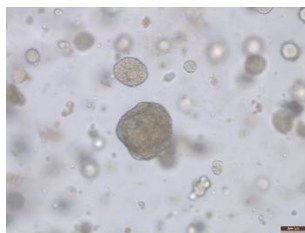


图 B.5 口腔鳞癌类器官复苏后传代培养的镜下图示例，10×，比例尺100 μm 。

附录 C

(规范性)

形态学特征检测（苏木精-伊红染色法）

C.1 检测原理

苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, H&E staining), 是石蜡切片技术中最常用的染色法之一, 临床上广泛用于观察正常组织和病变组织的结构形态。其原理为: 苏木精染液呈碱性, 可与细胞核内带负电荷的DNA等酸性成分结合, 使细胞核呈蓝紫色; 伊红为酸性染料, 可与细胞质及细胞外基质中带正电荷的蛋白质成分结合, 使细胞质、胶原纤维等结构呈粉红至红色。通过核质差异着色, H&E染色能够显示组织中细胞的排列方式、分布特征及整体结构, 为组织形态学观察和病理学判断提供基础依据。

C.2 仪器、设备和试剂

C.2.1 石蜡包埋仪: 满足石蜡切片机对石蜡块规格的要求。

C.2.2 石蜡切片机: 满足4 μm 至7 μm 厚度的石蜡连续切片要求。

C.2.3 石蜡切片制备试剂: 固定液、脱水液、石蜡、脱蜡液、复水液、乙醇、二甲苯、封片剂等。

C.2.4 H&E染色试剂: 苏木精、伊红。

C.2.5 显微镜。

C.3 操作方法

C.3.1 选取生长状态良好且数量充足的人源口腔鳞癌类器官进行形态学检测。使用4%多聚甲醛固定人源性口腔鳞癌类器官1小时后, 将其包埋于3%琼脂糖中, 使其在琼脂糖中均匀分布。

C.3.2 以人源性口腔鳞癌类器官-琼脂糖为整体, 进行脱水、透明和浸蜡处理, 使用石蜡包埋仪进行包埋。随后使用石蜡切片机将石蜡块切成标准厚度, 制成石蜡切片。

C.3.3 将人源性口腔鳞癌类器官石蜡切片进行脱蜡、复水处理后, 使用苏木精染色并使用流水冲洗。而后使用1%盐酸酒精分化并使用流水冲洗。在使用伊红染色后并使用流水冲洗后, 依次进行梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封片处理。

C.3.4 将切片放置在显微镜下观察, 并拍照记录。

C.4 结果分析

比对人源性口腔鳞癌类器官与来源肿瘤组织的细胞与组织形态特征。

- a) 口腔鳞癌细胞常见形态特征如下: 癌细胞呈现不规则形状、大小不等、核浆比例失衡等。
- b) 口腔鳞癌组织常见形态特征如下: 角化不良、异型增生等。

附录 D

(资料性)

形态学特征示例 (苏木精-伊红染色法)

苏木精-伊红染色法鉴定结果显示, 口腔鳞癌类器官呈无极性排布, 边界细胞为棘层细胞, 中心区域角质化较明显。

图D. 1、图D. 2分别为染色后的口腔鳞癌组织和配对口腔鳞癌类器官组织。

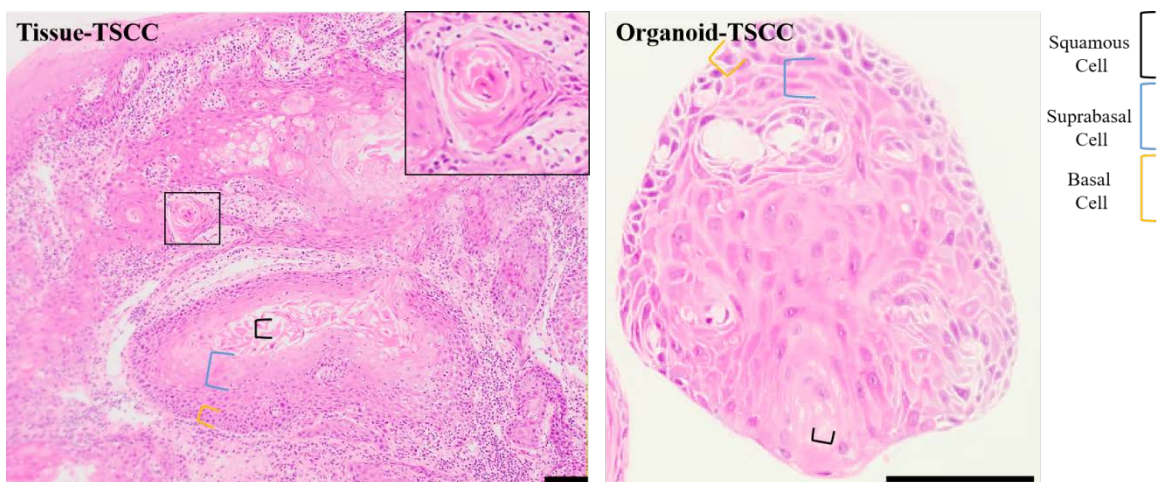


图 D. 1 (比例尺500 μm , 4 \times)

图 D. 2 (比例尺100 μm , 20 \times)

组织H&E鉴定 (图D. 1): 口腔鳞癌组织H&E染色结果显示, 细胞核较小、核占比较高的基底细胞在上皮中浸润性存在, 并在组织内部单独形成分化腔室。

类器官H&E鉴定 (图D. 2): 在肿瘤类器官中, 来源于基底的干细胞在体外三维培养过程中可逐渐向内分化并发生角化。基底层样细胞不仅分布于类器官外周, 也可在类器官内部呈现一定程度的分布。

附录 E

(规范性)

分子标志物表达检测（免疫荧光染色法或免疫组织化学染色法）

E.1 检测原理

基于抗原-抗体特异性结合的原理，将不影响抗体活性的化合物或荧光分子标记在抗体上，并以该标记抗体作为探针检测组织或细胞中的相应抗原，随后在显微镜下观察探针信号的强度和位置，从而确定样本中目标抗原的表达情况。

E.2 仪器、设备和试剂

- E.2.1 石蜡包埋仪:满足石蜡切片机对石蜡块规格的要求。
- E.2.2 石蜡切片机:满足4 μm 至7 μm 厚度的石蜡连续切片要求。
- E.2.3 石蜡切片制备试剂:固定液、脱水液、石蜡、脱蜡液、复水液、乙醇、二甲苯等。
- E.2.4 染色试剂:抗原修复液、封闭液、一抗、二抗、PBS、显色底物、封片剂等。
- E.2.5 显微镜。

E.3 操作方法

E.3.1 选取生长状态良好且数量充足的人源口腔鳞癌类器官进行分子标志物表达检测。使用4%多聚甲醛固定人源性口腔鳞癌类器官1小时后，将其包埋于3%琼脂糖中，使其在琼脂糖中均匀分布。

E.3.2 以人源性口腔鳞癌类器官-琼脂糖为整体，进行脱水、透明和浸蜡处理，使用石蜡包埋仪进行包埋。随后使用石蜡切片机将石蜡块切成标准厚度，制成石蜡切片。

E.3.3 将人源性口腔鳞癌类器官石蜡切片进行脱蜡、复水及抗原修复处理后，添加封闭液进行封闭，依次再添加一抗和相应二抗进行孵育。

E.3.4 若使用免疫组织化学染色法，还需添加相应显色底物进行孵育。

E.3.5 使用封片剂进行封片。将切片放置在显微镜下观察，并拍照记录。

E.4 结果分析

若在显微镜下出现探针信号，则判定为阳性；否则判定为阴性。

附录 F

(资料性)

分子标志物表达示例（免疫荧光染色法和免疫组织化学染色法）

图F. 1和图F. 2分别为口腔鳞癌组织及配对类器官的分子标志物免疫荧光染色的示例。图F. 3为口腔鳞癌组织及配对类器官的分子标志物免疫组织化学染色的示例

在口腔鳞癌组织中，TP63标记组织上皮细胞中的基底层，Ki-67及PCNA标记基底层中的增殖细胞，CD44标记基底层干细胞细胞质膜，KRT5标记了所有上皮细胞的细胞质膜。

在口腔鳞癌类器官中，TP63标记类器官最外层基底细胞，内部有散点分布和非特异性着色；Ki-67及PCNA标记类器官最外层的增殖细胞，内部有散点分布，CD44标记类器官基底细胞层，内部为阴性；KRT5标记类器官所有细胞。

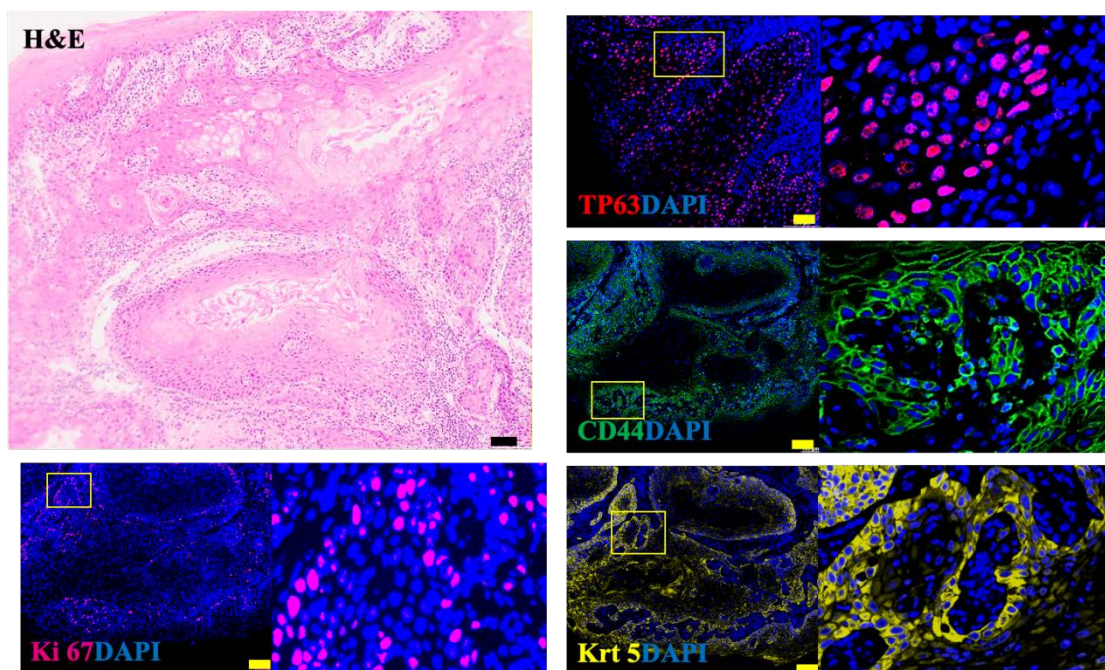


图 F. 1 口腔鳞癌组织的分子标志物免疫荧光染色的示例，4×，比例尺500 μm 。

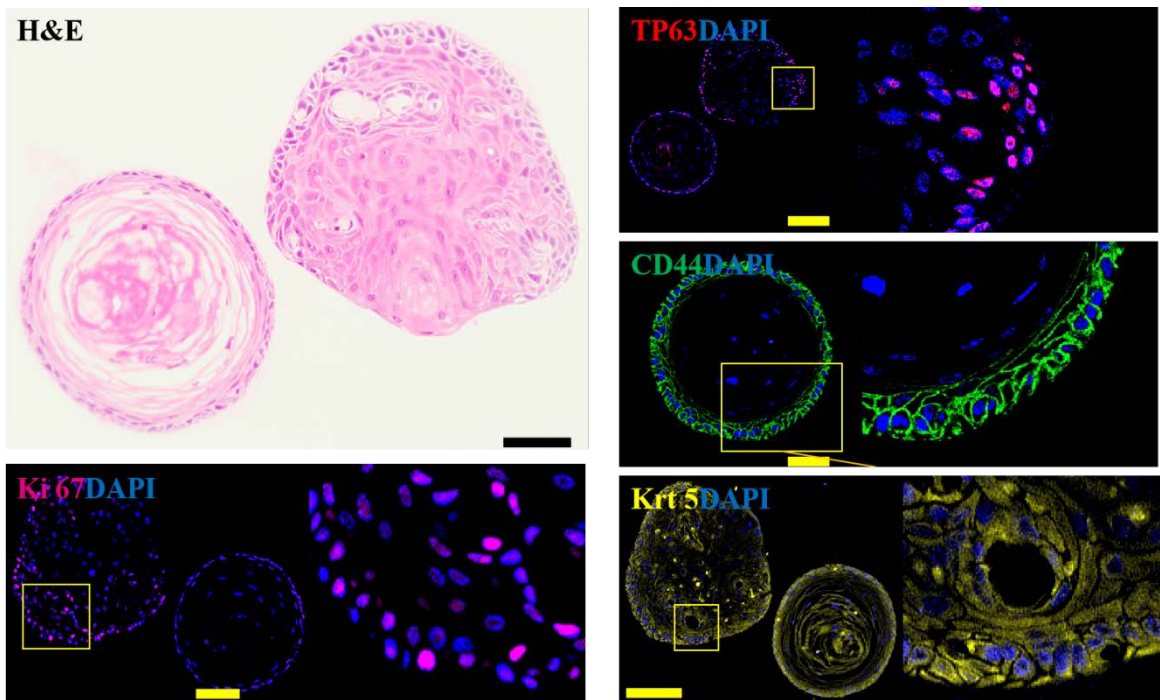


图 F.2 口腔鳞癌组织对应类器官的分子标志物免疫荧光染色的示例，20×，比例尺50 μm 。

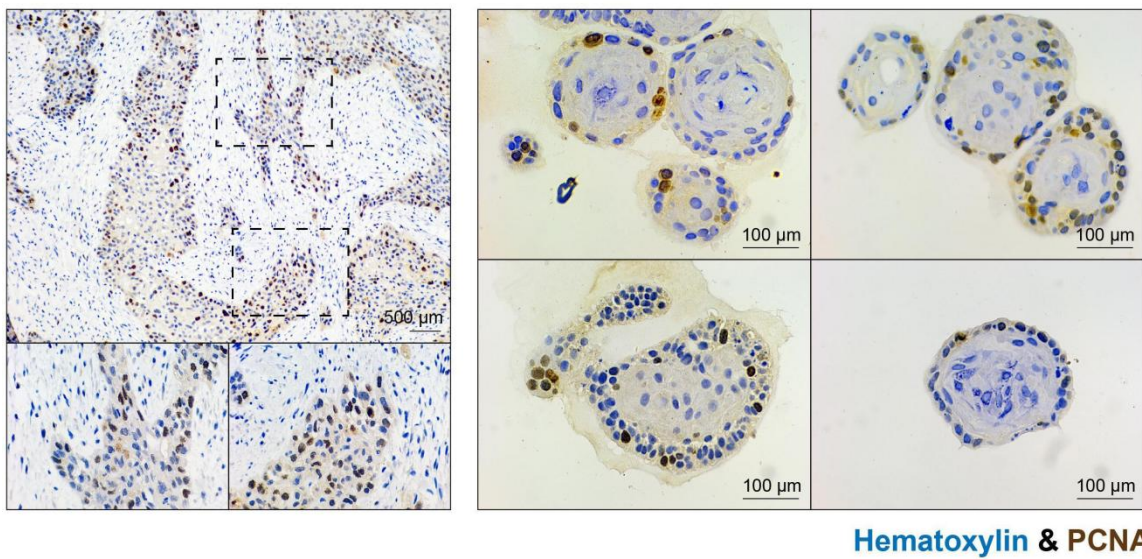


图 F.3 口腔鳞癌组织对应类器官的分子标志物免疫组织化学染色的示例（左侧：4×，比例尺500 μm ；右侧：20×，比例尺100 μm ）

附录 G

(资料性)

基因突变检测（高通量基因测序）

G.1 检测原理

高通量基因测序是在PCR和基因芯片等基础上发展而来的DNA测序技术，其基本原理是在DNA复制过程中，通过捕捉新掺入标记碱基所携带的特异性信号(通常为荧光分子标记)实现对DNA序列信息的大规模分析。

G.2 仪器、设备和试剂

G.2.1 离心机。

G.2.2 细胞DNA抽提试剂盒。

G.2.3 高通量基因测序仪。

G.3 操作方法

选取生长状态良好且数量充足的人源性口腔鳞癌类器官进行基因突变检测。将人源性口腔鳞癌类器官转移至离心管中。按照细胞DNA抽提试剂盒说明书对人源性口腔鳞癌类器官基因组DNA进行抽提。并将提取后的DNA样本保存于-80℃环境中备用。

委托具备临床基因扩增检验资质且通过ISO 15189或CNAS认可的医学实验室或相关机构，对人源性口腔鳞癌类器官和来源口腔鳞癌组织的DNA样本进行全基因组或全外显子测序，并按照操作手册使用相关软件进行数据处理与结果判读。

G.4 结果分析

若人源性口腔鳞癌类器官与来源肿瘤组织具有显著相似的肿瘤发生驱动基因突变谱、单核苷酸突变位点及拷贝数变异等特征，则判定为一致，否则判定为不一致。

参考文献

- [1] DUNN L A, HO A L, PFISTER D G. Head and Neck Cancer: A Review [J]. *Jama*, 2026, 335(6): 531-41.
- [2] STOOPLER E T, VILLA A, BINDAKHIL M, et al. Common Oral Conditions: A Review [J]. *Jama*, 2024, 331(12): 1045-54.
- [3] GUPTA S, SINGH A, DEORAH S, et al. Immunotherapy in OSCC: Current trend and challenges [J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2025, 209: 104672.
- [4] FENG Q S, SHAN X F, YAU V, et al. Facilitation of Tumor Stroma-Targeted Therapy: Model Difficulty and Co-Culture Organoid Method [J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2025, 18(1).
- [5] ZHAO R, FENG Q, XIA Y, et al. Iteration of Tumor Organoids in Drug Development: Simplification and Integration [J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2025, 18(10).
- [6] XIONG L, XU Y, GAO Z, et al. A patient-derived organoid model captures fetal-like plasticity in colorectal cancer [J]. *Cell research*, 2025, 35(9): 642-55.
- [7] SACHS N, DE LIGT J, KOPPER O, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity [J]. *Cell*, 2018, 172(1-2): 373-86.e10.
- [8] KO K P, HUANG Y, ZHANG S, et al. Key Genetic Determinants Driving Esophageal Squamous Cell Carcinoma Initiation and Immune Evasion [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(3): 613-28.e20.
- [9] GONG L, LUO J, ZHANG Y, et al. Nasopharyngeal carcinoma cells promote regulatory T cell development and suppressive activity via CD70-CD27 interaction [J]. *Nature communications*, 2023, 14(1): 1912.
- [10] LI K, LI W, FU S, et al. Organoid models of drug resistant gastric adenosquamous carcinoma: Recapitulating tumor features and refining precision treatment [J]. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 2025, 79: 101201.
- [11] ZHANG X Y, SUI Y, SHAN X F, et al. Construction of oral squamous cell carcinoma organoids in vitro 3D-culture for drug screening [J]. *Oral diseases*, 2025, 31(1): 99-109.
- [12] XIE S, WANG L, ZHANG X, et al. [Construction and application of oral squamous cell carcinoma organoid bank] [J]. *Beijing da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Peking University Health sciences*, 2025, 57(5): 847-51.