



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 肿瘤药物敏感性检测 3D 生物打印技术规范 第 1 部分：组织取样及其前处理过程

Regulations in Three-dimensional Cell Culture Systems for Tumor Drug Sensitivity  
Testing Part I: Tissue Sampling and Pre-processing

草案版次选择

(本草案完成时间：)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 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。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

癌症正严重威胁着人类的健康，传统化疗和靶向治疗存在药物敏感性差异大、耐药性频发等问题，亟需精准的体外模型指导用药选择。传统体外模型存在局限性。3D 生物打印技术在肿瘤个性化治疗领域实现了突破，细胞在三维空间中生长，并与基质相互作用，模拟了自然生理属性和条件促进细胞表现出真实的细胞行为和相互作用，3D 生物打印已成为许多基础研究和精准诊疗中的有力工具，

在肿瘤个性化精准诊疗中，3D 生物打印模拟人体内肿瘤微环境，可长期保持肿瘤的异质性，更加客观准确的反应药物疗效和安全性。

对肿瘤药物敏感性 3D 生物打印统的相关过程进行标准化。将有助于肿瘤敏感性 3D 生物打印相关体外诊断产品的研究、开发与评价，从而有助于为患者提供个性化的诊疗方案，在提高患者临床获益中具有重要意义。

GB/T XXXXX规定了肿瘤药物敏感性检测3D生物打印技术规范，拟由2个部分组成。

- 第1部分：组织取样及其前处理过程
- 第2部分：鉴定、质量控制规范

# 肿瘤药物敏感性检测 3D 生物打印技术规范 第 1 部分：组织取样及其前处理过程

## 1 范围

本文件规定了肿瘤药物敏感性检测3D生物打印取样及样品前处理过程的指标参数和评价方法，规定了实验室对于肿瘤药物敏感性检测3D生物打印取样和培养方法的操作步骤和技术要求。

本文件适用于实验室进行实体肿瘤的药物敏感性检测3D生物打印模型培养系统取样和培养及其在药物敏感性检测系统中的取样和培养方法。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 细胞外基质水凝胶 Extracellular matrix hydrogel

使用人或动物正常/肿瘤组织的细胞外基质制备而成的；能在体外为细胞和类器官三维培养提供细胞外基质支持的水凝胶。

### 3.2

#### 基础培养基 Basal culture medium

用于体外培养细胞或组织的一种基本营养液，为其提供生存和增殖所必需的营养物质及适宜的环境。

### 3.3

#### 完全培养基 Complete culture medium

在基础培养基的基础上，添加了血清、生长因子、激素等其他成分，能够满足特定细胞在体外生长、增殖和维持正常生理功能所需的所有营养和条件的培养基。

### 3.4

#### 细胞活性 Cell viability

测定细胞群总体活力的指标，指标的测定取决于试验终点和所用的设计方案，并与细胞总数和/或活性细胞数量相关。

### 3.5

#### 药物敏感性检测 Drug sensitivity tests

测定药物在体外对细胞活性有无抑制作用的试验

### 3.6

#### 3D 生物打印 3D bioprinting

将生物材料和/或生物单元（细胞/细胞团簇/类器官/蛋白质/DNA 等）按仿生形态学，生物体结构或细胞特定环境等要求用“三维打印”的技术手段制造出具有功能化的体外三维生物模型。

### 3.7

#### 生物墨水 Bio-ink

一种适用于生物制造技术的细胞与载体材料组合配方。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Saline)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

EUS-FNB: 细针穿刺活检术 (endoscopic ultrasound-guided fine needle biopsy)

EUS-FNA: 细针穿刺抽吸术 (endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration)

## 5 操作步骤

### 5.1 肿瘤样本的获取和运输

#### 5.1.1 总体原则

用于肿瘤药物敏感性检测 3D 细胞培养系统的肿瘤样本, 应首选从肿瘤患者病变部位进行手术切除获取。如无法取得手术样本或临床诊疗需要, 可以利用穿刺或镜检的方式获得肿瘤组织样本, 或利用恶性浆膜腔积液以及脑脊液获得肿瘤样本。

获取肿瘤组织样本时, 应尽量避免有明显坏死区域和非肿瘤区域。针对食管、胃、结直肠等肿瘤, 尽量选择肿瘤实体部位进行取样, 对于存在异质性的病变, 应在全面观察的基础上多点取样。

样本采集过程中应严格遵守无菌操作规范, 同时尽量缩短组织样本离体时间。样本离体后, 应立即完全浸泡于样本保存液中。

#### 5.1.2 肿瘤样本的获取

##### 5.1.2.1 手术切除样本

新鲜手术样本取出后, 首先用无菌生理盐水清洗1遍 ~ 3遍 (消化道样本极易造成污染, 需清洗3-5遍), 待样本没有明显血渍及污渍后, 选择无坏死的肿瘤组织区域。

肿瘤组织样本, 体积宜不小于5 mm × 5 mm × 5 mm。肿瘤细胞含量宜不低于50%。颜色苍白, 质地坚实, 血痂、结石、污物、黏液质等杂质较少的为佳。样本采集过程中应严格遵守无菌操作规范, 同时尽量缩短组织样本离体时间。样本离体后, 应立即完全浸泡于样本保存液中。

##### 5.1.2.2 穿刺及镜检样本

###### 5.1.2.2.1 整体原则

鉴于活检钳取样和穿刺取样均为有创操作，具有严重出血倾向的患者应视为禁忌。对于正在服用抗血小板药物或抗凝药物的患者，应根据操作风险和患者血栓栓塞风险等级，在咨询相关专科后选择是否停用部分或全部抗血小板或抗凝药物。

#### 5.1.2.2.2 穿刺取样

穿刺样本宜用标号为16G或18G全轴穿刺针获取总长度不少于3cm的组织。肿瘤细胞含量宜不低于50%。

#### 5.1.2.2.3 镜检取样

对食管、胃、结直肠等肿瘤，可根据肿瘤生长方式选择深挖或多点采样的活检方式：

- (1) 隆起型病变，于病变顶部或侧缘表现为充血、糜烂、凹凸不平等部位取样；
- (2) 溃疡型病变，于溃疡边缘隆起部位取样；
- (3) 弥漫浸润型病变，于黏膜充血、肿胀、糜烂、溃疡、凹陷等病变显著的部位取样。

针对食管、胃、结直肠等肿瘤取样，推荐使用适配各单位常用内镜工作通道参数的最大规格一次性活检钳。

针对胰腺癌取样，应于肿瘤内部实体部分取样，根据具体情况可对胰腺癌转移灶进行补充取样。推荐根据病灶部位、大小、操作难易程度和安全性选择19G或22G穿刺针进行EUS-FNB取样；若EUS-FNB无法进行，可考虑EUS-FNA取样

#### 5.1.2.3 其他样本

使用无菌的一次性引流瓶或引流袋直接引流收集含有肿瘤细胞的恶性积液50 mL ~ 200 mL，或使用无菌注射器抽取恶性积液，立即置于无菌的一次性加有双抗的引流瓶或引流袋。液体颜色黄色至深黄色或橘红色至红色，浑浊但仍具有一定的透光性，血块、黏液质较少者为佳。

建议恶性心包积液样本宜不少于100mL，恶性胸腹腔积液样本宜不少于500mL。

通过腰穿获取脑脊液，样本量宜不少于10mL。

### 5.1.3 肿瘤样本的运输

肿瘤样本放入专用组织保存液时，管内最终液面不要接近管口，放入过程时不要接触管口，务必确认样本完全浸泡于组织保存液中；以上均需封口膜缠绕盖口3圈。应将装有样本的无菌管储存于低温（2℃ ~ 8℃）环境中。低温（2℃ ~ 8℃）保存下快速运转至实验室，尽量保证采样后2 h -8 h内送到。

用引流瓶或引流袋装恶性浆膜腔积液或脑脊液样本时，不能装满，需封口膜缠绕瓶或袋口3圈。应将装有样本的引流瓶或引流袋储存于低温（2℃ ~ 8℃）环境中。低温（2℃ ~ 8℃）保存下快速运转至实验室，尽量保证采样后2 h ~ 8 h内送到。

## 5.2 肿瘤样本的前处理

### 5.2.1 整体要求

该过程需要在细胞培养室无菌操作完成，肿瘤样本进入细胞培养室前用75%医用酒精擦拭样本收集器物外表面。

### 5.2.2 肿瘤组织样本的前处理

#### 5.2.2.1 消化前处理

使用无菌 PBS 或生理盐水对肿瘤样本进行清洗（建议3次~ 5次），去除表面的坏死、钙化组织、脂肪组织和血凝块等。随后转移至装有新的无菌 PBS 或生理盐水的细胞培养皿中，使用无菌器械充分去除非肿瘤组织及坏死的肿瘤组织。

### 5.2.2.2 消化

使用无菌器械将肿瘤组织样本剪碎至大小为 $0.5\text{ mm}^3 \sim 1\text{ mm}^3$ 的组织碎片，并转移至新的无菌细胞离心管内，加入适量消化液（根据不同癌种或样本视实际情况选择合适的消化液），并置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ （对于某些对温度敏感的肿瘤组织，可适当降低温度，如 $35\text{ }^\circ\text{C}$ ，并延长消化时间从而达到较好的效果）恒温培养箱中或水浴锅中进行消化。

根据肿瘤类型适当选择消化时间，每 $10\text{ min} \sim 15\text{ min}$ 通过剧烈摇晃和使用无菌移液管对其进行吹打，以充分消化，每 $5\text{ min} \sim 10\text{ min}$ 镜检观察组织消化情况。

终止消化可参考以下标准：

- a) 组织块体积缩小，质地变疏松；
- b) 组织消化液因单细胞数量增多、组织碎片的释放澄清度下降，粘稠度增加；
- c) 可取少量消化液在显微镜下观察是否出现明显的细胞团块（由 2 个 ~ 10 个细胞组成）。

注：仔细监测消化过程，因为过度消化可能会显著降低生长效率。

### 5.2.2.3 终止消化

当组织消化可以终止时，使用无菌移液管上下移动 10 次 ~ 20 次吹打消化组织，进一步帮助细胞从组织中解离出来。加入基础培养基清洗，然后在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下以  $200\text{g}$  离心  $5\text{ min}$ 。

### 5.2.2.4 重悬过滤

将沉淀重悬于基础培养基中，用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 或 $100\text{ }\mu\text{m}$ 的细胞网筛进行过滤(细胞网筛预先用无菌 PBS 浸润)。将过滤后的组织消化悬液收集至无菌细胞离心管中，在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $200\text{g} \sim 300\text{g}$ 离心  $3\text{ min} \sim 5\text{ min}$ ，弃去上清液，保留沉淀物。

如细胞沉淀存在红细胞，加入 $1\text{ mL} \sim 3\text{ mL}$ 红细胞裂解液，室温孵育 $3\text{ min}$ 。在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $200\text{g} \sim 300\text{g}$ 离心  $3\text{ min} \sim 5\text{ min}$ ，弃去上清液，保留沉淀物。

### 5.2.2.5 清洗重悬

使用含抗生素的无菌 PBS 或无菌基础培养基清洗沉淀物，随后以 $100\text{g} \sim 300\text{g}$ 离心力离心  $3\text{ min} \sim 5\text{ min}$ ，弃去上清液。

## 5.2.3 肿瘤非组织样本的前处理

### 5.2.3.1 分装离心

将获取的其他样本（恶性浆膜腔积液、脑脊液样本）分装至合适的离心管，于 $200\text{g} \sim 300\text{g}$ 离心  $3 \sim 5\text{ min}$ 后弃去上清液。

如细胞沉淀存在红细胞，加入 $1\text{ mL} \sim 3\text{ mL}$ 红细胞裂解液，室温孵育 $3\text{ min}$ 。在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $200\text{g} \sim 300\text{g}$ 离心  $3\text{ min} \sim 5\text{ min}$ ，弃去上清液，保留沉淀物。

### 5.2.3.2 重悬清洗

使用含抗生素的无菌 PBS 或无菌基础培养基清洗沉淀物并按附录A进行计数，随后以 $100\text{g} \sim 300\text{g}$ 离心力离心 $3\text{ min} \sim 5\text{ min}$ ，弃去上清液。

注：建议当细胞数量大于 $10^4$ ，且细胞存活率大于 90% 时，认为肿瘤样品前处理合格。

## 5.3 肿瘤 3D 生物打印

### 5.3.1 细胞悬液

根据将5.3.4中获得的细胞计数情况，将沉淀用适量的完全培养基（建议根据癌种、同一癌种不同类型或不同转移部位等选择合适的细胞因子加入培养基）重悬，建议得到的细胞浓度不低于 $5 \times 10^6$ 个活细胞/mL。

### 5.3.2 模型打印

建议根据癌种、同一癌种不同类型或不同转移部位等选择合适的3D 生物打印方式。以目前应用较多的基于挤出的3D 生物打印为例。

将肿瘤细胞（目前较为稳定的模型体仅包含单一的肿瘤细胞，不含间质细胞等）与液态生物材料均匀混合成生物墨水，将配制好的生物墨水移至螺口注射器中，排出气泡，装配口点胶针头，通过温度或者其他方式在不损伤/少损伤肿瘤细胞的情况下使生物墨水满足可打印性（改变流变学特性），放置于冰箱至生物墨水凝胶形成以备打印。

上述装有可打印的液态、半凝胶态或者凝胶态生物墨水的螺口注射器，生物墨水成凝胶状后装置安装于 3D 生物打印机中，温度平衡后（如果生物墨水是温度敏感的）检查确定挤出的生物墨水为均匀丝滑的凝胶，根据癌种、生物墨水的体积和种类等选择合适的打印条件（如温度、是否开启紫外光等）及模型种类（如逐层网格状）和大小（如 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$ ）进行打印。模型可被直接打印于孔板、培养皿或者支撑凝胶中。

### 5.3.3 培养观察

根据选择生物墨水的不同选择合适的交联方式（如蓝光照射或氯化钙浸泡等），洗涤后加入完全培养基，于 $37^\circ\text{C}$ ， $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养。

培养过程中应密切观察模型的生长状态，根据癌种不同，选择对应肿瘤的完全培养基，每隔2天 -3天更换培养基。通过计数活细胞和死细胞数量来计算细胞活力。对肿瘤模型状态进行密切观察，把控扩增时机。

## 附录 A

(资料性)

## 细胞计数以及活性检测 (台盼蓝染色法)

## A.1 原理

台盼蓝是一种重要的染色剂, 广泛用于选择性地将死细胞或组织染成蓝色。当细胞受损或死亡时, 台盼蓝可以进入细胞。加入台盼蓝后在显微镜下观察, 可见死细胞呈现明显的蓝色并膨大, 无光泽; 而具有完整细胞膜的活细胞不着色并保持正常形态, 有光泽。通过二者的形态及颜色差异可分别对活细胞和死细胞进行计数。

## A.2 试剂:

4%台盼蓝染液

配制方法:

- a) 称取台盼蓝粉末 4g, 加双蒸水 100ml, 混匀。
- b). 用滤纸过滤, 4 度保存。
- c). 使用时, 用 PBS 稀释至 0.4%

## A.3 仪器和设备:

显微镜、血细胞计数板

## A.4 检测方法:

- a). 收集目标细胞并制成细胞悬液后, 并作适当稀释 ( $10^6$  个细胞/mL)。
- b). 吸取 90 $\mu$ L 重悬液至无菌细胞离心管中, 加入 10 $\mu$ L 台盼蓝染色液, 轻轻混匀。
- c). 吸取 10 $\mu$ L 经过染色的细胞, 在 3min 内用血细胞计数板在显微镜下分别计数活细胞和死细胞。

细胞存活率计算见公式 (A.1)。

$$X = L / (L + D) \times 100 \% \quad \text{A.1}$$

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)

## 参 考 文 献

- [1] 体外诊断试剂主要原材料研究注册审查指导原则（2024年第1号），国家药品监督管理局
- [2] 类器官药物敏感性检测指导肿瘤精准治疗临床应用专家共识(2022年版)编写专家组，王树滨，高静，朱宇，黄卫人，& 李刚等. (2022). 类器官药物敏感性检测指导肿瘤精准治疗临床应用专家共识(2022年版). 中国癌症防治杂志(014-003).
- [3] 中华医学会消化病学分会医工交叉协作组. (2024). 中国经内镜消化系统常见恶性肿瘤组织取样及类器官培养专家共识(2024, 成都). 中华消化内镜杂志, 41(05), 337-350.
- [4] 中国抗癌协会肿瘤多学科诊疗专业委员会, & 中国抗癌协会肿瘤内分泌专业委员会. (2022). 肿瘤类器官诊治平台的质量控制标准中国专家共识(2022年版). 中国癌症杂志, 32(7), 657-668.
- [5] 孙铭浩, 杨华瑜, 孙乐家, 孙航, 张健刚, & 庞媛等. (2023). 3d生物打印肿瘤模型诊治平台质量控制标准. 肿瘤, 43(7), 559-569.
- [6] Park CH, Park JH, Suh YJ. Perspective of 3D culture in medicine: transforming disease research and therapeutic applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1491669.
- [7] Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?. *Front Mol Biosci.* 2020;7:33.
- [8] Barozzi D, Scielzo C. Emerging Strategies in 3D Culture Models for Hematological Cancers. *Hemasphere.* 2023;7(8):e932.
- [9] Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12200.
- [10] Polak R, Zhang ET, Kuo CJ. Cancer organoids 2.0: modelling the complexity of the tumour immune microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2024 Aug;24(8):523-539.
- [11] Driehuis E, Kretschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc.* 2020 Oct;15(10):3380-3409.
- [12] Zhao J, Fong A, Seow SV, Toh HC. Organoids as an Enabler of Precision Immunology. *Cells.* 2023 Apr 14;12(8):1165-1183.
- [13] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009 May 14;459(7244):262-265.
- [14] Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020 Jul 1;319(1):C151-C165.

- [15] Wood LD, Ewald AJ. Organoids in cancer research: a review for pathologist-scientists. *J Pathol*. 2021 Jul;254(4):395–404.
- [16] Xu H, Jiao D, Liu A, Wu K. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine. *J Hematol Oncol*. 2022 May 12;15(1):58.
- [17] Dijkstra KK, Monkhorst K, Schipper LJ, Hartemink KJ, Smit EF, Kaing S, de Groot R, Wolkers MC, Clevers H, Cuppen E, Voest EE. Challenges in Establishing Pure Lung Cancer Organoids Limit Their Utility for Personalized Medicine. *Cell Rep*. 2020 May 5;31(5):107588.
- [18] Dekkers JF, van Vliet EJ, Sachs N, Rosenbluth JM, Kopper O, Rebel HG, Wehrens EJ, Piani C, Visvader JE, Verissimo CS, Boj SF, Brugge JS, Clevers H, Rios AC. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc*. 2021 Apr;16(4):1936–1965.
- [19] Xu H, Lyu X, Yi M, Zhao W, Song Y, Wu K. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2018 Sep 15;11(1):116.
- [20] Ingber DE. Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies?. *Adv Sci (Weinh)*. 2020;7(22):2002030. Published 2020 Oct 12. doi:10.1002/advs.202002030
- [21] Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(2):65–81.
- [22] Nolan J, Pearce OMT, Screen HRC, Knight MM, Verbruggen SW. Organ-on-a-Chip and Microfluidic Platforms for Oncology in the UK. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3):635.
- [23] Akhtar AA, Sances S, Barrett R, Breunig JJ. Organoid and Organ-On-A-Chip Systems: New Paradigms for Modeling Neurological and Gastrointestinal Disease. *Curr Stem Cell Rep*. 2017;3(2):98–111.
- [24] Sean G, Banes AJ, Gangaraju R. Organoids and tissue/organ chips. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):241.
- [25] R N, Aggarwal A, Sravani AB, Mallya P, Lewis S. Organ-On-A-Chip: An Emerging Research Platform. *Organogenesis*. 2023;19(1):2278236.
- [26] van den Berg A, Mummery CL, Passier R, van der Meer AD. Personalised organs-on-chips: functional testing for precision medicine. *Lab Chip*. 2019;19(2):198–205.
- [27] Danku AE, Dulf EH, Braicu C, Jurj A, Berindan-Neagoe I. Organ-On-A-Chip: A Survey of Technical Results and Problems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:840674.
- [28] Gungor-Ozkerim PS , Inci I , Zhang YS , Khademhosseini A , Dokmeci MR . Biopinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*. 2018;6(5):915–946.
- [29] Mota C, Camarero-Espinosa S, Baker MB, Wieringa P, Moroni L. Bioprinting: From Tissue and Organ Development to *in Vitro* Models. *Chem Rev*. 2020;120(19):10547–10607.
- [30] Langer EM, Allen-Petersen BL, King SM, et al. Modeling Tumor Phenotypes In Vitro with Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Rep*. 2019;26(3):608–623. e6.