



华国强博士, 于中国科学院生物物理研究所获肿瘤生物学博士学位。2009至2015年在美国纪念斯隆凯特琳肿瘤研究中心(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)从事肠道干细胞辐射损伤再生及肿瘤放疗研究。2015年受聘于复旦大学上海医学院放射医学研究所和附属肿瘤医院组建干细胞和再生医学实验室。课题组目前研究的重点是癌症患者的个性化精准治疗和组织损伤再生。与传统研究手段不同, 课题组依托于最新的干细胞类器官(organoid)培养技术。目前已经建立300个类器官模型, 包括正常组织类器官和肿瘤类器官, 并在此基础进行多种抗肿瘤药物和正常组织促再生新药的高通量筛选。先后在国际知名杂志*Cell Stem Cell*、*International Journal of Radiation Oncology/Biology/Physics*、*Stem Cell Reports*、*Ebiomedicine*、*Protein & Cell*、*Cancer Research*、*Cancer Letters*、*Carcinogenesis*、中国科学等上发表研究工作。在类器官转化医学研究方面, 迄今申请专利9项, 授权专利6项。

类器官在再生医学中的应用

李潇萌^{1#} 管若羽^{1#} 高建军¹ 华国强^{1,2*}

(¹复旦大学上海医学院放射医学研究所, 上海 200032; ²复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 上海 200032)

摘要 类器官是干细胞在体外基质材料支撑条件下培养出来的一种三维微器官, 与来源组织器官高度相似。类器官技术为基础研究、药物筛选、再生医学等领域提供了一个新的强大的研究模型和技术手段。再生医学的目的是帮助组织或器官恢复其正常的生理功能, 通过与组织工程或基因工程相结合, 类器官为再生医学提供了新的移植物来源。该文将介绍类器官在再生医学中的应用, 并讨论该领域发展过程中所面临的主要挑战。

关键词 类器官; 再生医学; 应用

Applications of Organoids in Regenerative Medicine

LI Xiaomeng^{1#}, GUAN Ruoyu^{1#}, GAO Jianjun¹, HUA Guoqiang^{1,2*}

(¹Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China)

Abstract Organoids, known as three-dimensional micro-organs obtained by culturing stems cells in matrix materials *in vitro*, are highly similar to the source tissues and organs. The organoid technology provides a new

收稿日期 2021-04-07 接受日期: 2021-05-06

国家自然科学基金(批准号: 31470826、31670858)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 18217140039, E-mail: guoqianghua@fudan.edu.cn

Received: April 7, 2021 Accepted: May 6, 2021

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (Grant No.31470826, 31670858)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-18217140039, E-mail: guoqianghua@fudan.edu.cn

powerful research model and technical tools for basic research, drug screening and regenerative medicine. The aim of regenerative medicine is to help tissues or organs to restore their normal physiological functions. By combining with tissue engineering or genetic engineering, organoids provide a new source of transplants for regenerative medicine. This review presents the applications of organoids in regenerative medicine and discusses the main challenges in this field.

Keywords organoid; regenerative medicine; application

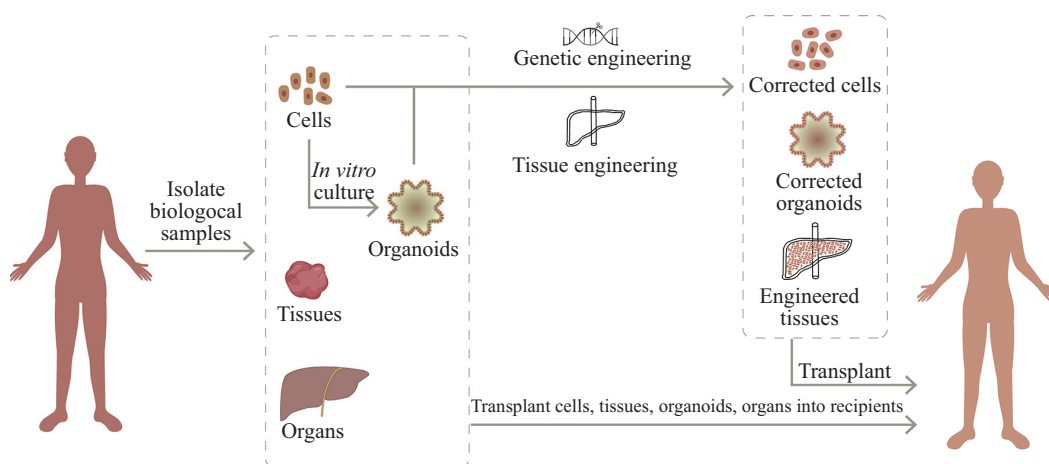
类器官是一种三维(three-dimensional, 3D)细胞培养产物, 是将干细胞接种于基质胶或基底膜提取物中, 在特定细胞因子混合物的作用下经过培养获得的具有器官特异性的产物^[1-2]。类器官往往包含着器官特异性的多种类型的细胞并且能够在体外重现部分器官功能, 相比于传统细胞模型, 类器官模型在体外培养过程中有着更为稳定的基因和表型特征, 以及更为丰富的细胞类型^[3-4]。在过去的十余年间, 再生医学学科有着飞速的发展并进入了临床领域^[5]。类器官的出现丰富了再生医学领域的移植物来源(图1)。本文总结了类器官及再生医学领域近年来的研究进展并对类器官于再生医学中的应用进行综述。

1 类器官与再生医学的研究进展

1.1 类器官的研究进展

自2009年荷兰科学家CLEVERS团队^[1]开发出肠道类器官技术以来, 经过十余年的发展, 科学家们现已建立起了多种类器官模型, 包括胃肠道^[1,6]、食

管^[7-8]、肝脏^[9-10]、胰腺^[11-12]、脑^[13-14]、肺^[15]、前列腺^[16-17]、乳腺^[18-19]、皮肤^[20]、肾脏^[21]、心脏^[22-23]、味蕾^[24-25]、唾液腺^[26-27]、角膜^[28]等类器官模型。类器官可以来源于多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)或成体干细胞(adult stem cells, ASCs), 而多能干细胞又包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)两种来源^[3]。多能干细胞来源的类器官是研究生物体生长发育过程和基因病的完美模型, 但其模型构建过程较为复杂。成体干细胞来源的类器官虽然在结构上比多能干细胞来源的类器官简单^[3], 但是其具有模型构建相对方便快捷的优势。此外, 以肿瘤干细胞为基础发展起来的肿瘤类器官模型可以帮助我们了解肿瘤的发生机制与发展过程, 病人来源的肿瘤类器官在一定程度上可以反映活体肿瘤的药物反应性及放疗敏感性^[2,29], 以肿瘤类器官为模型的临床应用测评体系的建立促进了精准医疗和个性化治疗的发展(图2)。

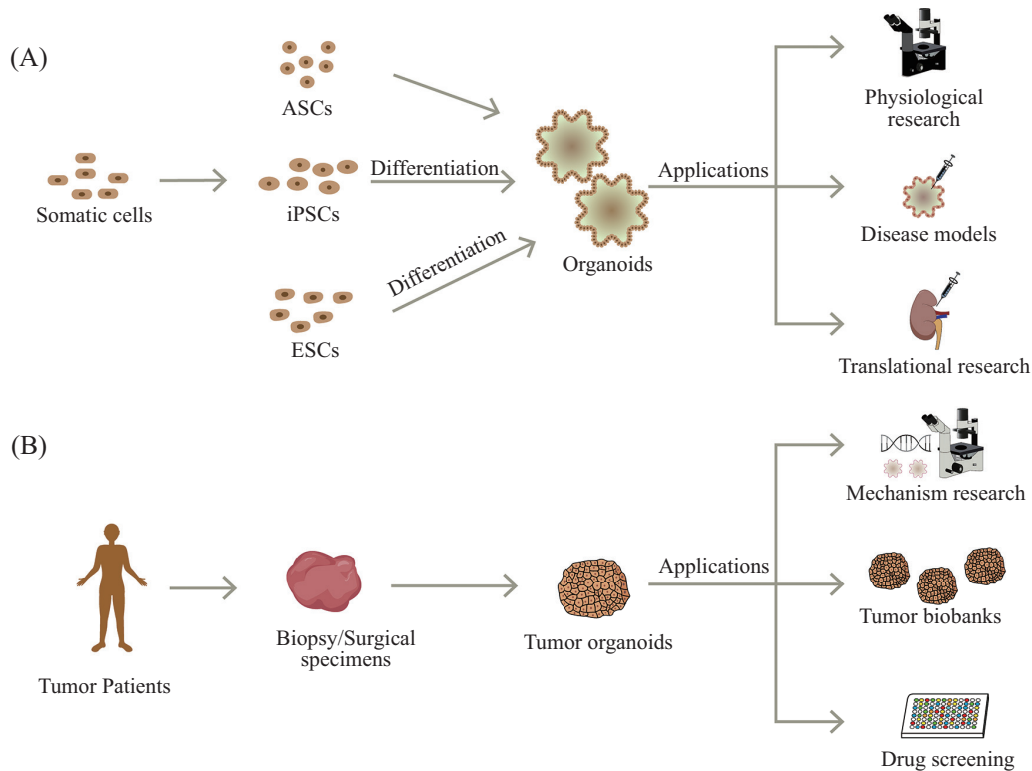


在再生移植中, 细胞、组织和器官可以直接从供体分离获得, 类器官可以通过细胞的体外培养获得。细胞、类器官、组织和器官都可作为移植物用于再生医学。同时, 通过与基因编辑和生物工程技术相结合改造后的细胞和类器官也可用于再生移植。

Cells, tissues and organs can be directly isolated from donors, and organoids can be obtained by culturing cells *in vitro*. Cells, organoids, tissues and organs can all be used as transplants for regenerative transplantation. Cells and organoids can also be used in regenerative medicine after genetic modification and bioengineering reconstruction.

图1 细胞、类器官及器官移植等在再生医学中的应用

Fig.1 Cells, organoids or organs used in regenerative medicine



A: 源自成体干细胞(ASCs)、诱导多能干细胞(iPSCs)、胚胎干细胞(ESCs)的类器官可用于生理学研究、疾病建模和转化研究等。B: 肿瘤来源的类器官可用于研究疾病机制、建立肿瘤生物库和筛选药物等。

A: organoids derived from ASCs (adult stem cells), iPSCs (induced pluripotent stem cells), ESCs (embryonic stem cells) can be used for physiological research, disease modeling and translational research. B: tumor-derived organoids can be used to study disease mechanisms, build tumor biobanks, and screen drugs.

图2 类器官的培养及应用

Fig.2 Culture methods and applications of organoids

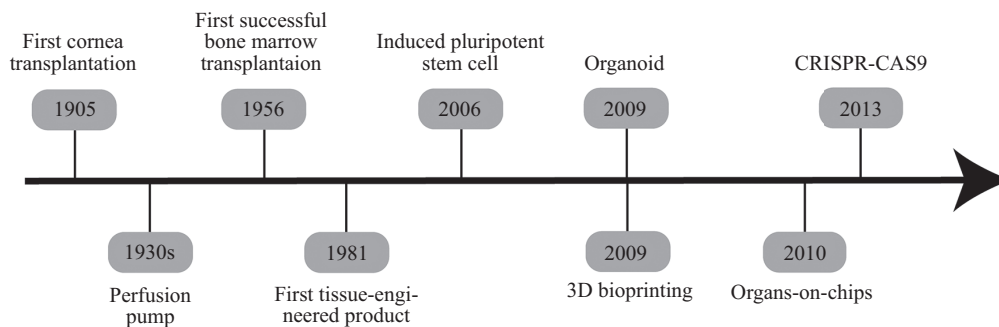


图3 再生医学发展过程中的里程碑事件

Fig.3 Milestones in the development of regenerative medicine

1.2 再生医学的研究进展

作为现代医学重要的一部分,再生医学旨在通过替代缺失或修复功能缺陷受损的细胞、组织或器官,促进机体再生,进而帮助机体恢复或者建立正常的功能^[5]。上世纪30年代,CARREL与LINDBERGH^[30]合作开发出可以使离体器官存活并充氧的泵,为再生医学的发展奠定了基础,之后基因工

程与组织工程的出现促进了再生医学的发展,进入21世纪以来,诱导多能干细胞技术^[31]、类器官培养技术^[1]、3D生物打印技术^[32]、器官芯片技术^[33]、CRISPR-CAS9基因编辑技术^[34]等的出现与发展极大地推动了再生医学领域的进步(图3)^[5,32,35-36]。目前,临床上完整的器官移植主要受限于供体来源匮乏及移植后的免疫排斥反应、成本效果的不确定性等^[5,37]。

类器官有着发展成为整个器官的潜能, 同时具备体外扩增的能力, 其可以为临床的再生移植提供丰富的个体来源细胞。同时, 类器官与其他生物技术的结合使用极大地扩展了类器官在再生医学领域的应用范围。

2 类器官应用于再生医学

2.1 肠道类器官应用于再生医学

肠道类器官是类器官模型中较为成熟的体系, 其最先应用于再生医学领域。研究人员通过将不同来源的肠道类器官以原位或异位的方式移植到受体中, 以求寻找肠炎、短肠综合征等肠道疾病的新的治疗方法。

YUI等^[38]将结肠类器官以碎片的形式灌肠注入到葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎模型中, 于移植后第6天在受体小鼠结肠中观察到了多个界限清楚的增强绿色荧光蛋白阳性(enhanced green fluorescent protein positive, EGFP⁺)区域, 移植细胞黏附于受损伤的肠道部位。在移植后4周, 组织学检测发现移植物在受体小鼠结肠中形成了隐窝样的结构并包含了结肠隐窝所有终末分化类型的细胞。在个体水平上, 移植后12至14天, 接受肠道类器官移植的小鼠体重重要高于对照组。功能学检测结果表明, 移植物可以维持肠道上皮屏障功能。AVANSINO等^[39]将鼠小肠成体干细胞来源的类器官移植入受体小鼠的空肠中, 发现类器官在移植区域可以长出新的小肠黏膜, 并分化出肠上皮细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞以及潘氏细胞。此外, FUKUDA等^[40]将小鼠小肠成体干细胞来源的类器官移植入结肠上皮损伤的受体小鼠中, 其结果也证明了成体小肠干细胞具备在受体体内重建小肠上皮细胞的能力。SUGIMOTO等^[41]将人结肠类器官移植入免疫缺陷小鼠的去上皮化的结肠中, 观察到相比于周围较小的鼠隐窝, 人结肠类器官在受体小鼠中保持了人隐窝较大的结构特征, 并展现出了相较于小鼠结肠隐窝循环周期较慢的特性。免疫组化的结果显示, 移植物形成的隐窝状结构含有杯状细胞、肠上皮细胞、肠内分泌细胞以及Tuft细胞。在移植后10个月并没有发现移植部位有肿瘤形成, 表明了移植的类器官仍能在受体体内保持长期的基因稳定性, 为类器官移植技术应用于再生医学提供了有力支持。WATSON等^[42]将被支持细胞包绕的人小肠类器官包埋于I型胶原蛋白之中, 并

将它们移植在免疫缺陷受体小鼠的肾囊下, 随后发现移植的人小肠类器官产生了成熟的具有中心腔的类肠结构并具有一定的肠道功能。对移植物进行人类核抗原与小鼠特异性泛内皮细胞抗原染色表明, 移植物中大多数间充质来源的组织如固有层、黏膜肌层、黏膜下层和平滑肌层是人类来源的, 而移植物中的大多数血管是小鼠来源的。SUGIMOTO等^[43]通过上皮置换的方法构建了鼠小肠化的结肠, 随后将其重新放置于肠道部位, 证明了移植物具有一定的营养吸收能力, 且能提高短肠综合征疾病模型小鼠的生存时间, 为自体类器官移植治疗短肠综合征这一方法提供了概念证明。

2.2 视网膜类器官应用于再生医学

哺乳动物的视网膜并没有内在的自我再生能力, 因此视网膜退行性病变最终将会导致患者永久性的视觉丧失。视网膜退行性病变相关治疗的最终目的是让病人恢复部分视觉功能, 提高他们的生活质量。目前, 应用于视网膜光感受器退行性疾病的治疗方法十分有限, 光感受器细胞移植被认为是治疗晚期视网膜退行性病变的一种有发展前景的治疗方法^[44]。视网膜类器官的出现为退行性视网膜病变的移植疗法提供了充足的细胞来源。

哺乳动物的视网膜细胞并不具备再生能力, 因此, 移植的类器官来源的光感受器细胞也应是分化成熟的细胞。GIULIANA团队^[45]将人诱导多能干细胞来源视网膜类器官中未分类视网膜细胞移植入免疫缺陷大鼠的视网膜下间隙, 在移植后8周发现有半数接受移植大鼠的眼睛中长出了新生肿瘤, 但是在仅移植细胞表面抗原CD73⁺的分选后视网膜细胞组的大鼠眼中并未观察到有肿瘤形成。随后他们将CD73⁺的人光感受器细胞移植入视紫红质P23H变异的半合子大鼠模型中, 在移植后第10周的部分实验动物中观察到CD73⁺的人光感受器细胞嵌入宿主大鼠视网膜中, 证明了在免疫抑制的情况下, CD73⁺的人光感受器细胞可以在受体体内存活相当长的一段时间, 但视网膜功能实验显示移植小鼠并没有展现出明显的功能改善。此研究结果提示我们, 应当根据待移植类器官中的细胞状态来决定最适合移植的类器官产物。ZHU等^[46]将人诱导多能干细胞来源的视网膜细胞移植入小鼠视网膜下, 8周后观察到0.15%人视网膜细胞整合进入受体小鼠的视网膜外核层, 这些整合的移植细胞在受体体内表现出了典

型的光感受器细胞形态,展示出恰当的内外节方向,且能够形成位于外网状层的突触后脚,证明了人诱导多能干细胞来源的视网膜细胞有着可以整合进入受体视网膜的能力,实验中并没有观察到移植细胞在宿主体内有任何形成肿瘤的证据。SANTOS-FERREIRA等^[47]以小鼠胚胎干细胞来源的视网膜类器官为光感受器细胞的来源,将富集后的CD73⁺的光感受器细胞移植到受体小鼠视网膜下,随后在光感受器轻度退化的小鼠中观察到部分移植细胞整合进入受体小鼠的视网膜中并显现出了成熟的发育形态,而在光感受器重度退化的小鼠中,移植细胞虽然可以于视网膜下存活,但是并没有展现出成熟的发育形态,这表明了视网膜光感受器细胞的移植效果是与受体体内的移植环境有关的。此外,SINGH等^[48]在视网膜细胞移植实验中发现供体细胞与宿主外核层细胞之间或通过细胞融合机制来进行细胞质成分的相互交换。PEARSON等^[49]发现,视网膜细胞在移植后,经历有丝分裂后的供体细胞与受体细胞之间存在着RNA和蛋白质等细胞内物质的相互交换等现象,这需要我们重新解释光感受器移植后的生物过程。

2.3 肝脏类器官应用于再生医学

肝移植是再生医学领域中的研究热门之一,肝脏再生医学经过数十年的发展,现已有小鼠、大鼠、石斑鱼等动物模型应用于肝再生相关领域的研究^[50]。但是目前,肝移植在临床应用时面临着移植物来源数量有限、费用昂贵、存在移植后排斥反应等问题^[51]。肝脏类器官为肝脏移植提供了新的细胞来源。通过体外大规模的扩增,肝脏类器官有望解决移植物来源受限、数量不足的问题。诱导多能干细胞来源的肝脏类器官模型的建立^[52-53]为我们提供了一种肝脏再生的思路:在未来将病人成体细胞来源的诱导多能干细胞诱导分化形成肝脏类器官然后回植入病人体内,这或许能帮助解决目前临床上所面临的移植后免疫排斥问题。

WANG等^[9]将人胚胎干细胞来源的肝脏类器官以单细胞的形式注入到肝损伤小鼠模型中,研究发现没有进行移植的肝损伤对照组小鼠皆在5周之内死亡,而6只接受了移植的小鼠中有4只存活时间超过了3个月,免疫组织化学结果显示人胚胎干细胞来源的肝脏类器官衍生细胞占据了存活小鼠肝脏实质的20.0%±5.6%,证明了移植后的肝脏类器官细胞具

备再生受损肝组织的能力。HUCH等^[54]将小鼠肝脏lgr5⁺(leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 positive)细胞来源的肝脏类器官以细胞悬液的形式移植入延胡索酰乙酰水解酶突变(Fah^{-/-})的肝损伤小鼠模型中,脾内注射后2至3个月,研究人员在受体小鼠肝脏中发现了Fah⁺的小结节,Fah⁺细胞约占肝实质的0.1%~1.0%,生存实验表明,移植成功的小鼠存活率要高于未移植组和移植失败组的小鼠存活率。PENG等^[55]将肝细胞来源的肝脏类器官以3D克隆体的形式注射到延胡索酰乙酰水解酶突变的肝损伤小鼠模型中,移植后103天的免疫组化结果显示,Fah⁺的3D克隆体在肝脏中占比接近80%,移植的细胞及其后代保留着肝细胞的特性。PENG等^[55]还在实验中发现移植后的同一个时间段,不同的肝脏类器官初始移植数目对应着不同的肝实质中Fah⁺细胞占比。此外,HU等^[10]将人胎儿肝脏类器官以单细胞的形式通过脾注射的方式移植入免疫缺陷的肝损伤小鼠模型中,其结果也证明了肝细胞来源的类器官可以在移植后显著扩增并再生受损的肝脏。

2.4 胰腺类器官应用于再生医学

糖尿病是威胁人类健康的常见代谢性疾病之一,长期的胰岛素注射以及限制饮食极大地降低了病人的生存质量。胰腺器官移植长期面临着各种手术并发症等问题,而胰岛移植又存在着移植物局部缺血和细胞失巢凋亡现象^[56]。细胞疗法被认为是糖尿病治疗的潜在疗法之一,通过向糖尿病患者移植能够正常行使生理功能的胰岛细胞,重建机体胰岛素分泌功能,帮助患者维持血糖稳态,可以减少病人因反复注射胰岛素所带来的痛苦。胰腺类器官的出现促进了胰腺再生疗法的发展。

WANG等^[57]将C蛋白受体阳性细胞来源的胰岛类器官移植入链脲霉素诱导的糖尿病小鼠肾包膜下,移植1周后,小鼠血糖水平即出现明显下降,在移植后4个月仍可观察到受体血糖改善现象,随后研究人员对受体小鼠实行了肾切除术,发现小鼠血糖突然增加,证明了移植的胰岛样类器官可以在受体小鼠体内分泌胰岛素。LEBRETON等^[58]将鼠胰岛细胞与人羊膜上皮细胞混合培养,得到人胰岛-羊膜上皮细胞混合类器官,随后他们将此类器官接种于患糖尿病的免疫缺陷小鼠肾被膜下,发现接种混合类器官的小鼠较单接种人胰岛细胞球的小鼠表现出了更好的血糖控制水平。相关机制研究表明,人羊膜上

皮细胞的引入促进了移植物的血管再生过程以及细胞外基质与黏附分子的产生, 增强了胰岛细胞的功能。

2.5 皮肤类器官应用于再生医学

自体皮肤和皮瓣长期以来应用于加速皮肤伤口愈合, 促进皮肤完整性的恢复^[59]。临床上, 自体皮肤移植在面临个体皮肤损伤面积较大的患者时其应用受到了限制, 而同种异体皮肤移植又存在着免疫排斥反应等问题^[60]。将诱导皮肤类器官应用于皮肤移植为促进病人皮肤恢复提供了新的治疗方案。

KIM等^[61-62]通过将人脐带血单核细胞来源的诱导多能干细胞诱导分化, 成功建立了皮肤类器官模型, 随后他们从小鼠身上取下1 cm×2 cm的皮片并将皮肤类器官移植于皮肤缺失部位, 发现3D类器官移植可以在受体小鼠身上分化形成皮肤样的结构, 但是移植的皮肤类器官并没有长出头发毛囊样结构或腺体。而LEE等^[20]通过诱导人多能干细胞的方法培养出了含有毛囊、皮脂腺且可以长出毛发的皮肤类器官, 随后他们将其移植于小鼠身上, 观察到有55%的移植植物长出了外向生长的头发, 移植物的表皮层在皮肤伤口处与宿主的表皮层整合在一起, 皮肤切口处并没有表现出溃疡, 后续观察也没有发现移植植物在宿主体内呈现肿瘤样生长迹象。

2.6 肾脏类器官应用于再生医学

透析和肾脏移植是目前临床上治疗慢性肾病的主要方法, 但是肾脏透析疗法并不能根治肾脏疾病。长期的透析给患者的生活带来了很大的经济压力以及生活上的不便, 而肾脏移植则面临着供体不足以及移植后的排斥反应等问题。随着肾脏类器官培养体系的建立与发展, 肾脏类器官有望应用于再生医学领域以重建肾脏功能。

肾脏是过滤血液生成尿液的器官, 因此, 对于肾脏类器官移植来讲, 重要的是类器官形成血管化的网络并与受体肾脏血管网络相连。此外, 移植类器官的生长发育程度、大小、移植部位等也是肾脏类器官移植时需要考虑的问题^[63-64]。VAN DEN BERG等^[65-66]将人多能干细胞来源的肾脏类器官移植入小鼠肾包膜下, 发现宿主小鼠的血管内皮细胞参与了移植物的血管化过程, 活体成像表明移植植物与宿主血管网络相连接并且展示出了功能性肾小球灌注。此外, 他们还发现在移植后的肾脏类器官中, 肾小球结构存在着对葡聚糖和白蛋白的大小选择作

用, 证明其可以发挥适当的屏障与滤过功能。NAM等^[67]将诱导多能干细胞来源的肾脏类器官移植到受体小鼠的肾包膜下, 随后发现移植植物中的类肾单元的成熟度介于体外培养的肾脏类器官与宿主肾脏肾单元之间。此外, SHANKAR等^[68]发现, 肾脏类器官可以产生肾素, 提示了在将来应用肾脏类器官修复调节机体内分泌系统的可能。

2.7 其他类器官应用于再生医学

除了前述多种类器官外, 脑类器官、肺类器官、肝外胆管类器官、胸腺类器官、汗腺类器官等也有被报道用于再生医学领域的研究。MANSOUR等^[69]将人脑类器官移植入小鼠脑部, 发现在移植植物中可以形成血管结构, 且移植植物与宿主大脑之间可以形成功能性的突触连接。DONG等^[70]也发现, 移植的人脑类器官可以与受体小鼠大脑之间形成双向突触连接。WANG等^[71]发现, 在小鼠大脑中动脉闭塞后移植脑类器官可以明显减少脑梗死的面积并且提升大脑神经运动功能。在肺类器官方面, WEINER等^[72]以鼠肺泡II型上皮细胞为基础构建了肺类器官, 并以肺类器官作为移植细胞来源进行尝试治疗流行性感模型小鼠, 发现移植细胞有正常生长和发育不良两种命运, 但移植原始II型上皮细胞组有着更好的移植效果。SAMPAZIOTIS等^[73]将人肝外胆管类器官移植到小鼠肾包膜下, 发现移植的类器官可以自发形成胆管样的结构。SAMPAZIOTIS等^[74]发现, 不同部位来源的人胆管上皮类器官在体外培养时有着相似的转录特征, 而在将其用于移植修复小鼠受损胆管时, 其又展现出了恰当的局部特征, 此外, 他们还成功地在人离体肝脏上证明了胆管上皮类器官可以用来再生修复受损的胆管。DIAO等^[75]成功培养出了汗腺类器官并证明了其有再生小鼠背部及脚垫处汗腺损伤部位皮肤表皮层及汗腺的潜能。BORTOLOMAI等^[76]将胸腺上皮细胞种植于三维I型胶原中经培养获得了胸腺类器官, 随后将其移植于无胸腺裸鼠皮下, 发现了移植胸腺类器官的血管化过程, 但是皮下移植的胸腺类器官并未能在体内长期存活。TANAKA等^[77]将鼠胚胎干细胞诱导分化形成唾液腺, 随后将其原位移植于唾液腺被摘除的小鼠模型中, 培养发现移植植物在形态与功能方面都不同程度地表现出了唾液腺的特征。总的来说, 多种类型的类器官相继应用于再生医学领域的研究, 极大地推动了再生医学领域的发展。

3 类器官与工程科学技术结合应用于再生医学

3.1 与组织工程技术相结合

不同种类类器官在所包含的细胞类型以及类器官自我组织模式上不尽相同,目前的类器官技术很难复刻具有复杂生理结构的机体组织^[78]。组织工程学的出现为类器官应用于再生医学带来了新的发展前景,其可以应用于类器官培养以及类器官移植两个环节。生物支架可以支持细胞的生长、增殖、分化以及移植物的血管形成,同时也可以提供附着点防止细胞从植入部位脱离^[79]。可供移植的工程学支架应当具备不能引起受体发生炎症反应或免疫排斥反应的特点,同时还要能够支持移植类器官及细胞在宿主体内的生长发育。

ZHANG等^[80]将内皮细胞与微纤维水凝胶作为生物墨水一起进行3D打印,然后将心肌细胞植入到3D内皮支架中,产生了能够同步收缩的心肌类器官。FAN等^[81]通过将胸腺上皮细胞种植于去细胞化的胸腺基质中,培养出胸腺类器官,随后发现在移植胸腺类器官后,受体裸鼠可对同种异体皮肤移植物展现出免疫排斥反应,而在将供体与受体的胸腺上皮细胞混合培养所得的胸腺类器官移植入受体裸鼠中时,则表现出了对皮肤移植物的免疫耐受。SOLTANIAN等^[82]将胰腺类器官种植在3D打印的组织支架上,随后将其移植到小鼠的腹腔空洞中,发现与仅移植胰腺祖细胞相比,在此方法的类器官移植物中有着更为丰富的血管,胰岛素阳性细胞所占比例也较高。FINKBEINER等^[83]将多能干细胞来源的人小肠类器官接种于人工聚乙醇酸/聚L乳酸(polyglycolic/poly L lactic acid, PGA/PLLA)人工支架上,随后将其接种于免疫缺陷小鼠模型中,在移植后12周取出支架发现移植支架上存在着绒毛及隐窝样结构域。MERAN等^[84]将成纤维细胞与患者来源的空肠类器官相继接种于人源的生物支架上,成功构建了人空肠黏膜移植,并随后证明了移植物存在一定的吸收消化功能。SAMPAZIOTIS等^[73]将人肝外胆管类器官种植于生物可降解支架上,随后成功地取代小鼠部分胆管,重建的胆管上皮有着完整性和稳定性,且人工胆管并未出现胆汁阻塞等现象。WILLEMSE等^[85]发现,相比于肝内来源的胆管类器官,肝外胆管来源和胆汁来源的胆管类器官能够更好地将去细胞化的人肝外胆管支架再细胞化。TYSOE

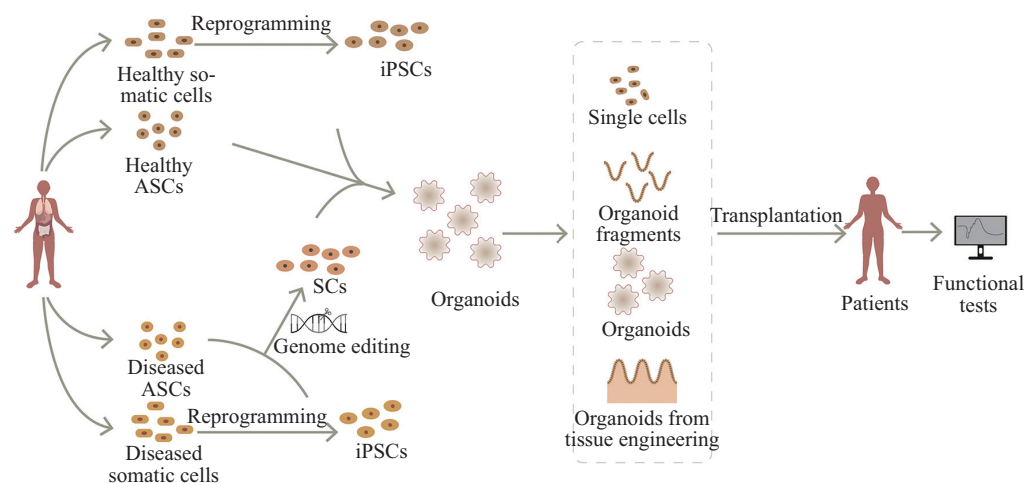
等^[86]以聚乙醇酸为支架,也通过胆管细胞类器官构建出了生物工程来源的胆管组织。总体来说,类器官与组织工程的结合将会极大地扩展以类器官为基础的再生移植物的组织形式与获取方式,为类器官应用于再生医学领域提供了更加灵活多变的形式。

3.2 与基因工程技术相结合

除了将组织工程科学技术与类器官技术相结合应用于再生医学领域外,基因工程科学技术或也可被应用在类器官移植领域去治疗遗传性疾病。我们可以首先从病人体内分离出含有致病基因的成体干细胞或通过体细胞诱导形成多能干细胞,通过基因工程技术如CRISPR/CAS9技术等去纠正异常的基因位点,经过质量控制筛选出适合移植的细胞,随后以类器官技术进行扩增来获得足够数量的细胞进行移植,从而达到治疗疾病的目的。SCHWANK等^[87]从两个囊性纤维化病人中分离出肠道成体干细胞并培养成肠道类器官,随后通过CRISPR/CAS9技术纠正了错误基因位点并通过后续实验证明了基因编辑的有效性。ZABULICA等^[88]将鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症患者来源的诱导多能干细胞通过基因编辑技术进行基因修正,随后在分化培养的类器官细胞中分析到了尿素产量的变化,为临床上尿素循环障碍患者的治疗打下了基础。将基因工程技术与前述的类器官移植技术相结合,或许为未来单基因遗传病病人的治疗提供一个新思路。图4概述了目前类器官应用于再生医学领域的方法。

4 类器官应用于再生医学所面临的挑战

类器官模型应用于再生医学领域的道路上仍充满着诸多问题与挑战。在进行移植之前,我们需要大量的在体外可以稳定扩张而又不会在移植后细胞发生组织间类型转变的稳定类器官,如何应用相关技术来获得稳定的、足量的移植物来源是类器官应用于再生医学领域必须要考虑的事情^[44-45]。目前首先,类器官并没有一个标准化的培养模式,不同实验室之间的类器官培养体系存在着一定的差异,种植类器官所用的基质胶、基底膜提取物等存在着批次与批次之间的差异^[3],这些都会导致实验结果之间的差异与不稳定。其次,类器官展现出受限的生长潜能和成熟水平,其中一个主要的原因可能是类器官缺乏血管化以及神经化^[89-90]。生物工程支架以及液体微流控、共培养等技术或可以帮助推动类器



用于再生移植的类器官可以来自健康个体或患者。患者来源的疾病细胞经过重新编码和基因编辑后可被诱导分化为健康的类器官。健康类器官可以以各种形式(例如单细胞、类器官碎片、完整的类器官)用于再生移植中,也可以与生物工程学技术结合相结合进行使用。此外,在移植后还应进行效果评估和功能测试。

The organoids used for regenerative transplantation can be derived from healthy individuals or patients. The patient-derived cells can be induced to differentiate into healthy organoids after reprogramming and genetic modification. Healthy organoids can be used in regenerative transplantation in various forms such as single cells, fragments, intact organoids, and can also be combined with engineering techniques. Effect evaluation and functional tests should also be carried out after transplantation.

图4 类器官应用于再生医学示意图

Fig.4 A schematic for applications of organoids in regenerative medicine

官模型的复杂化,使其更加接近体内生理状态。在移植前我们还需要考虑移植物的生物安全性问题。传统类器官的培养依赖于小鼠骨肉瘤来源的基质胶或基底膜提取物,这些生物提取物中存在着携带病原体、移植后可能引起受体产生炎症反应等生物安全隐患,这限制了它们在临床上的应用^[3]。此外,应用于临床的生物支架必须是成分明确并且不含动物来源组分的^[91]。新型生物工程水凝胶等材料的合成或许是未来解决这些问题的方法之一^[4]。CRUZ-ACUÑA等^[92-93]以水凝胶为媒介成功培养出了人小肠类器官,随后进行的移植实验表明水凝胶也可以支持小肠类器官移植,促进组织恢复。

在移植阶段,移植细胞的存活及生长发育情况、能否与受体形成生理性连接并表现出相应的生理功能、移植瘤成瘤性等问题是类器官应用于再生医学领域时所面临的切实问题。YUI等^[38]在结肠类器官移植实验中发现,经过体外培养的供体细胞有着较高的移植成功率,悬于基质胶中的类器官相比简单重悬于PBS中的类器官有着更好的移植效果。PENG等^[55]在肝脏类器官移植实验中发现相比于单细胞悬液,3D克隆体的移植形式更能促进移植肝细胞在受体体内的稳定和存活。LEBRETON等^[58]在胰腺类器官移植过程中发现,引入人羊膜上皮细

胞可以促进移植物的血管再生,改善移植瘤在受体体内的环境条件。FINKBEINER等^[83]发现,相比于种植在猪来源的去细胞化肠道基质上,种植于PGA/PLLA人工支架上的人小肠类器官在移植后更能茁壮成长并发展成为类肠道组织。这些实验表明,类器官移植成功率和移植效果在一定程度上是可以通过优化移植体系来提高的。我们可以通过尝试不同的移植形式和不同的移植方式,将类器官技术与组织工程学技术相结合等方法来寻找最优的移植体系。此外,我们也应注意到类器官的血管化、神经化问题以及宿主的体内移植环境对移植物的影响^[47,94]。FORDHAM等^[95]将胚胎小肠来源的胚胎肠道类器官球移植到结肠损伤部位,发现胚胎肠道类器官球表现出了结肠的表型特征而并非小肠特征。在进行移植实验时,我们还应注意到一些特殊类型的类器官如脑类器官在移植时所面临的伦理问题^[96]。在移植瘤成瘤方面,GIULIANA等^[45]在视网膜移植方面的实验表明,部分类器官移植瘤具备在受体体内成瘤的能力,如何通过基因编辑及细胞分选等技术构建并寻找和筛选出适于移植的目标细胞群体是我们在进行移植前所需要考虑的问题。目前文献报道的关于类器官移植后在受体体内成瘤能力的实验很多都存在观察样本量不够大或者观察时间不够长的缺

表1 类器官应用于再生医学面临的挑战和解决策略
Table 1 Challenges and solutions of organoids in regenerative medicine

挑战 Challenges	解决方法 Solutions
At the organoid preparation stage	
How could we establish a standardized organoid culture model?	• Strengthen international communication and cooperation • Standardize organoid culture methods • Build a mature and stable organoid culture system
How could we reduce the reliance of organoid culture on matrigel or basement membrane extracts from biological sources?	• Materials with clear ingredients (hydrogels, etc.) may be used for organoid culture and transplantation
How could we decrease the limited growth potential and maturity level of organoid models?	• Establish more complex organoid models, such as organoid vascularization, co-cultivation of organoids and nerve cells, etc., so that organoids can reproduce the physiological conditions of living organs more realistically
At the organoid transplantation stage	
How to identify the target population suitable for transplantation, and find the optimal timing and site for transplantation?	• Determine the appropriate transplant timing for transplantation by studying the mechanism of the interaction between the graft and the host environment • Select the appropriate transplant site based on the purpose of treatment
What can we do to help the organoid cells survive in the early stage of transplantation, help the graft grow and develop in the intermediate stage, and help the graft form a physiological connection with the host and reproduce normal physiological functions?	• Study the influence of different organoid statuses on the success rate of transplantation, and then sort out organoids suitable for transplantation and cell populations from organoids • Establish the optimal transplantation system by trying different transplant forms and methods • Combining organoid technology with engineering technology, etc
What can we do to avoid the tumorigenicity of the donor organoids in late stages?	• Screen out suitable transplant populations, expand the sample size for later observation and ensure sufficient observation time • Before obtaining reliable experimental observation results, a cautious attitude should be adopted before clinical application

陷, 不能够形成强有力的实验证据。在将类器官移植技术应用于临床之前, 对于不同类器官来源的移植植物是否具备成瘤能力的问题我们应采取谨慎态度, 后续仍需要大量的实验数据证明其安全性(表1)。

总体来讲, 通过丰富与完善类器官模型, 提高类器官模型的复杂程度, 寻找最优化的移植体系, 研究移植植物与宿主环境之间相互作用的机制, 明确适于进行移植的人群范围以及寻找最优的移植部位, 这些将会有助于我们提高移植的成功率, 促进移植植物在宿主体内再现正常的生理功能, 切实改善与恢复目标组织器官的功能。

5 结语与展望

体外类器官培养技术自建立以来, 经历了迅猛的发展, 表现出了强大的应用价值。多种类器官模型的建立为再生医学提供了新的移植植物来源, 目前已有肠道、肝脏、视网膜、胰腺、皮肤、肾脏等多种类器官模型被应用于再生医学领域。此外, SU-SAIMANICKAM等^[28]建立了多能干细胞功能来源

的角膜类器官模型并发现了角膜类器官有着与成年人角膜组织相似的解剖结构和标志物表达谱, 这为角膜再生治疗开辟了新的领域。XIAO等^[97]成功将人和小鼠成纤维母细胞重新编码形成感觉神经节类器官, 诱导形成的感觉神经元细胞具有电生理特性和钙离子反应特性。在未来, 诱导形成的感觉神经节类器官或可作为重要的细胞来源广泛应用于损伤或退化感觉神经元的替代疗法。VARZIDEH等^[98]开发出了可以自发跳动的心脏类器官, 并且发现在体内移植后, 类器官中的心肌细胞可以展现出更高的成熟度。多种多样的类器官模型的建立为再生移植时移植植物的选取提供了新的选择。虽然类器官在再生医学方面的应用仍面临着诸多挑战, 但是随着类器官模型的发展与完善、移植相关机制的研究和技术的成熟, 我们相信在未来, 类器官将以更广泛多样的方式普遍应用于再生医学领域。细胞与组织移植、类器官移植、器官移植将共同构成再生移植的基础, 并与器官支持疗法等一起推动再生医学领域的发展与进步。

致谢——

感谢同实验室的饶欣欣、唐培源同学在文章写作过程中所提出的宝贵意见。

参考文献 (References)

- [1] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-5.
- [2] TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 952-5.
- [3] SCHUTGENS F, CLEVERS H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 211-34.
- [4] LI Y, TANG P, CAI S, et al. Organoid based personalized medicine: from bench to bedside [J]. *Cell Regen*, 2020, 9(1): 21.
- [5] COSSU G, BIRCHALL M, BROWN T, et al. Lancet commission: stem cells and regenerative medicine [J]. *Lancet*, 2018, 391(10123): 883-910.
- [6] BARTFELD S, BAYRAM T, VAN DE WETERING M, et al. *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 126-36.e6.
- [7] TRISNO S L, PHILO K E D, MCCracken K W, et al. Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate Sox2 functions during esophageal specification [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 501-15.e7.
- [8] BAILEY D D, ZHANG Y, VAN SOLDT B J, et al. Use of hPSC-derived 3D organoids and mouse genetics to define the roles of YAP in the development of the esophagus [J]. *Development*, 2019, 146(23): dev178855.
- [9] WANG S, WANG X, TAN Z, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury [J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1009-26.
- [10] HU H, GEHART H, ARTEGANI B, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids [J]. *Cell*, 2018, 175(6): 1591-606.e19.
- [11] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 324-38.
- [12] MOLNAR R, MADACSY T, VARGA A, et al. Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(1): 84-97.
- [13] LANCASTER M A, RENNER M, MARTIN C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [14] CAMP J G, BADSHA F, FLORIO M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(51): 15672-7.
- [15] CHEN Y W, HUANG S X, DE CARVALHO A, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(5): 542-9.
- [16] KARTHAUS W R, IAQUINTA P J, DROST J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 163-75.
- [17] DROST J, KARTHAUS W R, GAO D, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(2): 347-58.
- [18] MOLLICA P A, BOOTH-CREECH E N, REID J A, et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels [J]. *Acta Biomater*, 2019, 95: 201-13.
- [19] ROSENBLUTH J M, SCHACKMANN R C J, GRAY G K, et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1711.
- [20] LEE J, RABBANI C C, GAO H, et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2020, 582(7812): 399-404.
- [21] SCHUTGENS F, ROOKMAAKER M B, MARGARITIS T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 303-13.
- [22] DRAKHLIS L, BISWANATH S, FARR C M, et al. Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, doi: 10.1038/s41587-021-00815-9.
- [23] RICHARDS D J, COYLE R C, TAN Y, et al. Inspiration from heart development: biomimetic development of functional human cardiac organoids [J]. *Biomaterials*, 2017, 142: 112-23.
- [24] GUO Q, CHEN S, RAO X, et al. Inhibition of SIRT1 promotes taste bud stem cell survival and mitigates radiation-induced oral mucositis in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4789-99.
- [25] REN W, LEWANDOWSKI B C, WATSON J, et al. Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells *ex vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(46): 16401-6.
- [26] NANDURI L S Y, BAANSTRA M, FABER H, et al. Purification and *ex vivo* expansion of fully functional salivary gland stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2014, 3(6): 957-64.
- [27] NAGLE P W, HOSPER N A, BARAZZUOL L, et al. Lack of DNA damage response at low radiation doses in adult stem cells contributes to organ dysfunction [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24): 6583-93.
- [28] SUSAIMANICKAM P J, MADDILETI S, PULIMAMIDI V K, et al. Generating minicorneal organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2017, 144(13): 2338-51.
- [29] YAO Y, XU X, YANG L, et al. Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 17-26.e6.
- [30] VERNON G. Alexis Carrel: 'father of transplant surgery' and supporter of eugenics [J]. *Br J Gen Pract*, 2019, 69(684): 352.
- [31] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [32] CUI H, NOWICKI M, FISHER J P, et al. 3D bioprinting for organ regeneration [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(1): 10.
- [33] HUH D, MATTHEWS B D, MAMMOTO A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-8.
- [34] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineer-

- ing using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [35] ORLANDO G, WOOD K J, STRATTA R J, et al. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future [J]. *Transplantation*, 2011, 91(12): 1310-7.
- [36] BERTHIAUME F, MAGUIRE T J, YARMUSH M L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges [J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011, 2: 403-30.
- [37] WANG Z, WANG S N, XU T Y, et al. Organoid technology for brain and therapeutics research [J]. *Neurosci Ther*, 2017, 23(10): 771-8.
- [38] YUI S, NAKAMURA T, SATO T, et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5⁺ stem cell [J]. *Nat Med*, 2012, 18(4): 618-23.
- [39] AVANSINO J R, CHEN D C, HOAGLAND V D, et al. Orthotopic transplantation of intestinal mucosal organoids in rodents [J]. *Surgery*, 2006, 140(3): 423-34.
- [40] FUKUDA M, MIZUTANI T, MOCHIZUKI W, et al. Small intestinal stem cell identity is maintained with functional paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(16): 1752-7.
- [41] SUGIMOTO S, OHTA Y, FUJII M, et al. Reconstruction of the human colon epithelium *in vivo* [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 171-6, e5.
- [42] WATSON C L, MAHE M M, MUNERA J, et al. An *in vivo* model of human small intestine using pluripotent stem cells [J]. *Nat Med*, 2014, 20(11): 1310-4.
- [43] SUGIMOTO S, KOBAYASHI E, FUJII M, et al. An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome [J]. *Nature*, 2021, 592(7852): 99-104.
- [44] GASPARINI S J, LLONCH S, BORSCH O, et al. Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: current state and future perspectives [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2019, 69: 1-37.
- [45] GAGLIARDI G, BEN M'BAREK K, CHAFFIOL A, et al. Characterization and transplantation of CD73-positive photoreceptors isolated from human iPSC-derived retinal organoids [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 11(3): 665-80.
- [46] ZHU J, REYNOLDS J, GARCIA T, et al. Generation of transplantable retinal photoreceptors from a current good manufacturing practice-manufactured human induced pluripotent stem cell line [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2): 210-9.
- [47] SANTOS-FERREIRA T, VOLKNER M, BORSCH O, et al. Stem cell-derived photoreceptor transplants differentially integrate into mouse models of cone-rod dystrophy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7): 3509-20.
- [48] SINGH M S, BALMER J, BARNARD A R, et al. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13537.
- [49] PEARSON R A, GONZALEZ-CORDERO A, WEST E L, et al. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13029.
- [50] FORBES S J, NEWSOME P N. Liver regeneration-mechanisms and models to clinical application [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(8): 473-85.
- [51] CHISTIakov D A. Liver regenerative medicine: advances and challenges [J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 196(4): 291-312.
- [52] RASHIDI H, LUU N T, ALWAHSH S M, et al. 3D human liver tissue from pluripotent stem cells displays stable phenotype *in vitro* and supports compromised liver function *in vivo* [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(10): 3117-29.
- [53] OLGASI C, CUCCI A, FOLLENZI A. iPSC-derived liver organoids: a journey from drug screening, to disease modeling, arriving to regenerative medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6215.
- [54] HUCH M, DORRELL C, BOJ S F, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration [J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 247-50.
- [55] PENG W C, LOGAN C Y, FISH M, et al. Inflammatory cytokine TNF α promotes the long-term expansion of primary hepatocytes in 3D culture [J]. *Cell*, 2018, 175(6): 1607-19, e15.
- [56] WASSMER C H, LEBRETON F, BELLOFATTO K, et al. Generation of insulin-secreting organoids: a step toward engineering and transplanting the bioartificial pancreas [J]. *Transpl Int*, 2020, 33(12): 1577-88.
- [57] WANG D, WANG J, BAI L, et al. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident procr⁺ progenitors [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1198-211, e19.
- [58] LEBRETON F, LAVALLARD V, BELLOFATTO K, et al. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4491.
- [59] HALLOCK G G, MORRIS S F. Skin grafts and local flaps [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2011, 127(1): 5e-22e.
- [60] RINKINEN J, SELLEY R, AGARWAL S, et al. Skin allograft and vascularized composite allograft: potential for long-term efficacy in the context of lymphatic modulation [J]. *J Burn Care Res*, 2014, 35(5): 355-61.
- [61] KIM Y, PARK N, RIM Y A, et al. Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 217.
- [62] KIM Y, JU J H. Generation of 3D skin organoid from cord blood-derived induced pluripotent stem cells [J]. *J Vis Exp*, 2019, 146: e59297.
- [63] NAGANUMA H, NISHINAKAMURA R. From organoids to transplantable artificial kidneys [J]. *Transpl Int*, 2019, 32(6): 563-70.
- [64] KIM Y K, NAM S A, YANG C W. Applications of kidney organoids derived from human pluripotent stem cells [J]. *Korean J Intern Med*, 2018, 33(4): 649-59.
- [65] VAN DEN BERG C W, RITSMA L, AVRAMUT M C, et al. Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney organoids induces neo-vasculogenesis and significant glomerular and tubular maturation *in vivo* [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 10(3): 751-65.
- [66] VAN DEN BERG C W, KOUDIJS A, RITSMA L, et al. *In vivo* assessment of size-selective glomerular sieving in transplanted human induced pluripotent stem cell-derived kidney organoids [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(5): 921-9.
- [67] NAM S A, SEO E, KIM J W, et al. Correction to: graft immaturity and safety concerns in transplanted human kidney organoids [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(1): 180.
- [68] SHANKAR A S, DU Z, MORA H T, et al. Human kidney organoids produce functional renin [J]. *Kidney Int*, 2021, 99(1): 134-47.

- [69] MANSOUR A A, GONCALVES J T, BLOYD C W, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(5): 432-41.
- [70] DONG X, XU S B, CHEN X, et al. Human cerebral organoids establish subcortical projections in the mouse brain after transplantation [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, doi: 10.1038/s41380-020-00910-4.
- [71] WANG S N, WANG Z, XU T Y, et al. Cerebral organoids repair ischemic stroke brain injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(5): 983-1000.
- [72] WEINER A I, JACKSON S R, ZHAO G, et al. Mesenchyme-free expansion and transplantation of adult alveolar progenitor cells: steps toward cell-based regenerative therapies [J]. *NPJ Regen Med*, 2019, 4: 17.
- [73] SAMPAZIOTIS F, JUSTIN A W, TYSOE O C, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids [J]. *Nat Med*, 2017, 23(8): 954-63.
- [74] SAMPAZIOTIS F, MURARO D, TYSOE O C, et al. Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver [J]. *Science*, 2021, 371(6531): 839-46.
- [75] DIAO J, LIU J, WANG S, et al. Sweat gland organoids contribute to cutaneous wound healing and sweat gland regeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 238.
- [76] BORTOLOMAI I, SANDRI M, DRAGHICI E, et al. Gene modification and three-dimensional scaffolds as novel tools to allow the use of postnatal thymic epithelial cells for thymus regeneration approaches [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(10): 1107-22.
- [77] TANAKA J, OGAWA M, HOJO H, et al. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4216.
- [78] MCMURTREY R J. Multi-compartmental biomaterial scaffolds for patterning neural tissue organoids in models of neurodevelopment and tissue regeneration [J]. *J Tissue Eng*, 2016, 7: 2041731416671926.
- [79] RAHMANI S, BREYNER N M, SU H M, et al. Intestinal organoids: a new paradigm for engineering intestinal epithelium *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2019, 194: 195-214.
- [80] ZHANG Y S, ARNERI A, BERSINI S, et al. Bioprinting 3D microfibrillar scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip [J]. *Biomaterials*, 2016, 110: 45-59.
- [81] FAN Y, TAJIMA A, GOH S K, et al. Bioengineering thymus organoids to restore thymic function and induce donor-specific immune tolerance to allografts [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(7): 1262-77.
- [82] SOLTANIAN A, GHEZELAYAGH Z, MAZIDI Z, et al. Generation of functional human pancreatic organoids by transplants of embryonic stem cell derivatives in a 3D-printed tissue trapper [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9564-76.
- [83] FINKBEINER S R, FREEMAN J J, WIECK M M, et al. Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids [J]. *Biol Open*, 2015, 4(11): 1462-72.
- [84] MERAN L, MASSIE I, CAMPINOTI S, et al. Engineering transplantable jejunal mucosal grafts using patient-derived organoids from children with intestinal failure [J]. *Nat Med*, 2020, 26(10): 1593-601.
- [85] WILLEMSE J, ROOS F J M, VOOGT I J, et al. Scaffolds obtained from decellularized human extrahepatic bile ducts support organoids to establish functional biliary tissue in a dish [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(2): 836-51.
- [86] TYSOE O C, JUSTIN A W, BREVINI T, et al. Isolation and propagation of primary human cholangiocyte organoids for the generation of bioengineered biliary tissue [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(6): 1884-925.
- [87] SCHWANK G, KOO B K, SASSELLI V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 653-8.
- [88] ZABULICA M, JAKOBSSON T, RAVAIOLI F, et al. Gene editing correction of a urea cycle defect in organoid stem cell derived hepatocyte-like cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1217.
- [89] TAKATA N, EIRAKU M. Stem cells and genome editing: approaches to tissue regeneration and regenerative medicine [J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(2): 165-78.
- [90] DANIEL E, CLEAVER O. Vascularizing organogenesis: lessons from developmental biology and implications for regenerative medicine [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 132: 177-220.
- [91] MADL C M, HEILSHORN S C, BLAU H M. Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics [J]. *Nature*, 2018, 557(7705): 335-42.
- [92] CRUZ-ACUÑA R, QUIROS M, FARKAS A E, et al. Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(11): 1326-35.
- [93] CRUZ-ACURÑA R, QUIROS M, HUANG S, et al. PEG-4MAL hydrogels for human organoid generation, culture, and *in vivo* delivery [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(9): 2102-19.
- [94] HSIA G S P, ESPOSITO J, DA ROCHA L A, et al. Clinical application of human induced pluripotent stem cell-derived organoids as an alternative to organ transplantation [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 6632160.
- [95] FORDHAM R P, YUI S, HANNAN N R, et al. Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 734-44.
- [96] CHEN H I, WOLF J A, BLUE R, et al. Transplantation of human brain organoids: revisiting the science and ethics of brain chimeras [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(4): 462-72.
- [97] XIAO D, DENG Q, GUO Y, et al. Generation of self-organized sensory ganglion organoids and retinal ganglion cells from fibroblasts [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(22): eaaz5858.
- [98] VARZIDEH F, PAHLAVAN S, ANSARI H, et al. Human cardiomyocytes undergo enhanced maturation in embryonic stem cell-derived organoid transplants [J]. *Biomaterials*, 2019, 192: 537-50.