



王红阳教授,女,肿瘤学、分子生物学专家,主任医师。中国工程院院士,发展中国家科学院院士,教育部长江特聘教授,博导。现任国家肝癌科学中心主任、海军军医大学东方肝胆外科医院国际合作生物信号转导研究中心主任,兼任中国女科技工作者协会会长、中国抗癌协会副理事长,中国医师协会临床精准医学专业委员会主委。长期从事肿瘤的基础与临床研究,在对肿瘤的炎-癌转化、信号网络调控、肝癌早诊与诊断试剂研发等领域有重要建树。在国际有影响的主流期刊*Science Translational Medicine*、*Cancer Cell*和*Nature Cell Biology*等上发表论文200余篇;近五年申报发明专利30项,已获授权14项(国际专利2项),主持研发的Glypican-3肝癌诊断试剂(是我国第一个具有完全自主知识产权且获批的肝癌诊断试剂盒)获国家食品药品监督管理总局(CFDA)批复临床应用。先后主持国家和省部级重大、重点科技攻关项目十余项。以第一完成人获首届国家科技进步奖创新团队奖、国家自然科学二等奖、上海市自然科学一等奖、上海医学科技一等奖等9项,首届全国创新争先奖章等荣誉。



陈磊教授,海军军医大学(原第二军医大学)东方肝胆外科医院/国家肝癌科学中心细胞信号转导研究室主任,研究员,博导。教育部青年长江学者,国家自然科学基金委优秀青年科学基金获得者。中国抗癌协会青年理事,中国医师协会临床精准医疗专业委员会常务委员,上海市遗传学会理事。本科毕业于复旦大学生命科学院,研究生就读于第二军医大学,师从中国工程院院士王红阳教授。长期从事肝癌发病机理和个体化分型诊疗的基础转化研究,通过整合前瞻人群队列和前沿技术,开展肝癌个体化分型关键分子筛选、鉴定和功能研究,揭示了肝癌复杂的发病机理,建立了我国肝癌高危人群分层筛查方案。

肝脏类器官研究进展与应用

王溢贤[#] 朱妍静[#] 王红阳^{*} 陈磊^{*}

(第二军医大学东方肝胆外科医院,细胞信号转导实验室,上海 200438)

收稿日期: 2021-04-23 接受日期: 2021-05-06

国家自然科学基金(批准号: 81830054)和上海市教委科研创新计划项目(批准号: 201901070007E00065)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com; Tel: 021-81875364, E-mail: chenlei@smmu.edu.cn

Received: April 23, 2021

Accepted: May 6, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81830054) and the Foundation of Shanghai Municipal Education Commission (Grant No.201901070007E00065)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-21-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com; Tel: +86-21-81875364, E-mail: chenlei@smmu.edu.cn

摘要 肝脏是人体重要的代谢器官,也是疾病高发器官。近年来,肝脏疾病发病率逐年上升,原发性肝癌已成为世界范围内癌症相关死亡的第二大病因。因此,深入了解肝脏生理机能,开发肝脏生理代谢及相关疾病致病机理研究的实验平台,寻找肝脏体外再生的新策略和方法,有望为肝脏疾病的发病机制研究、早期诊断和综合治疗提供新思路。该文主要围绕肝脏类器官的建立策略、主要应用和技术瓶颈等方面介绍肝脏类器官的最新研究进展,探讨其在解决肝脏研究领域若干重要科学问题的应用潜力。

关键词 肝脏; 类器官; 3D培养; 干细胞

Advances and Applications of Liver Organoids

WANG Yixian[#], ZHU Yanjing[#], WANG Hongyang^{*}, CHEN Lei^{*}

(International Co-Operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute,
Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract Liver is an important organ mediating various metabolic functions and also has high incidence of diseases. In recent years, the morbidity of liver diseases has been increasing gradually. Especially, primary hepatocellular carcinoma has become the second leading cause of cancer-related death worldwide. Thus, understanding the physiological functions of liver, developing practical experimental platform for liver physiological metabolism and disease progression researches, as well as establishing new strategies and methods for disease intervention *in vitro* can provide new ideas for the pathogenesis, early diagnosis and comprehensive treatment of liver diseases. This review discusses the recent progress of establishment, applications and technical bottlenecks for liver organoids and their potential advances for exploring the underlying mechanism in liver diseases.

Keywords liver; organoids; 3D-culture; stem cells

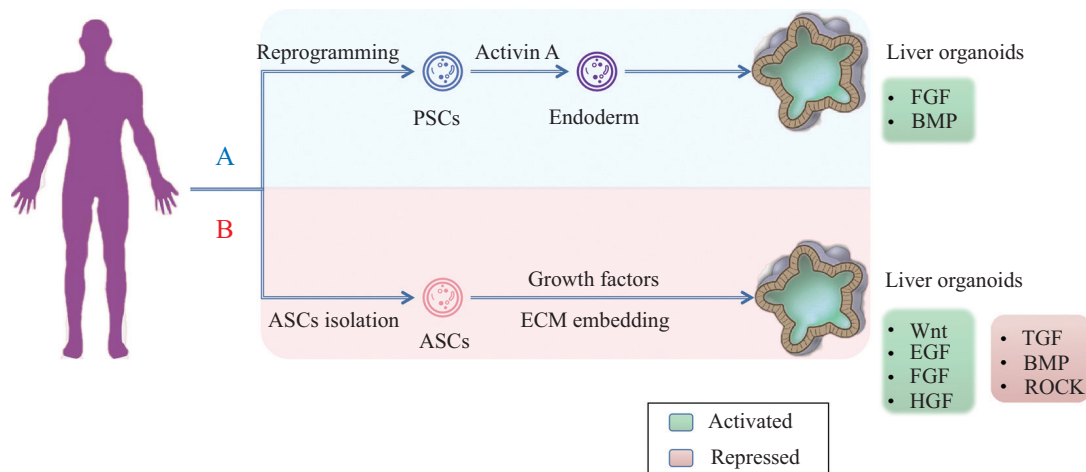
类器官是由干细胞在体外经细胞转分化和空间限制性生长分化后自组织而成的微观三维(three-dimensional, 3D)结构^[1-2]。因其能够重现组织器官发生过程,保持相应器官的关键组织结构、生理功能及病理状态,在基础和临床研究等方面具有广阔的应用前景。目前,类器官已用于器官发育^[3]、遗传疾病^[4-5]、癌症^[6-7]、宿主-病原体相互作用^[8-10]、肿瘤微环境及免疫治疗^[11-12]等研究领域,2017年*Nature Methods*更是将类器官技术评为生命科学领域年度技术^[13]。

肝脏是人体最大的腺体,由多种类型细胞构成,包括上皮细胞(肝细胞和胆管细胞)、Kupffer细胞、单核细胞、肝星状细胞、窦状内皮细胞、自然杀伤细胞和肝树突状细胞等^[14],担负着人体许多重要的功能。具体来说,肝脏可生成胆汁,参与糖、蛋白质、脂类和维生素等多种物质代谢,调控人体解毒、吞噬、防御以及造血等生理过程。近年来,随着人们生活压力的增加,各类肝脏疾病的发病率呈逐年上升趋势。

虽然肝脏在体内具有较强的再生能力^[15],但当其受到过度或持续损伤干扰如慢性病毒感染、脂肪性肝炎、长期药物肝损伤等时,它的再生修复能力也会遭到破坏,因此深入了解肝脏疾病的发病机理,构建高效准确的研究模型,寻找更加有效的治疗方法迫在眉睫。新兴的类器官培养技术让肝脏领域的研究人员看到了新的希望。自肝脏类器官建立以来,许多团队不断突破技术瓶颈,完善培养方法,致力于相关技术的临床转化和应用。我国相关团队在肝脏类器官培养体系的优化完善、肝病人肝类器官多组学信息库构建方面也取得了快速发展,并在此基础上开展了类器官在肝细胞移植、肝脏慢性炎症恶性转化分子机制、药物肝毒性评价、靶向药物疗效筛选以及患者序贯治疗疗效评估等方面的系列研究,对推动我国精准医疗的发展具有重大现实意义。

1 肝脏类器官建立途径

类器官可由多能干细胞(pluripotent stem cells,



A: 多能干细胞(PSCs)衍生的类器官建立于PSCs定向分化之后。这需要首先形成特定的胚层(内胚层、中胚层或外胚层), 再与必需的生长因子和信号因子共培养以诱导分化和成熟。B: 建成立体干细胞(ASCs)衍生的类器官则首先需要分离目标器官的干细胞系, 再将其嵌入到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中, 在特定的生长因子刺激下扩增繁殖。ASCs衍生的类器官来源于上皮, 其培养体系需要添加间充质或免疫组分。信号分子对于诱导细胞分化和建立细胞生态环境至关重要。BMP: 骨形态发生蛋白; EGF: 表皮生长因子; FGF: 成纤维细胞生长因子; HGF: 肝细胞生长因子; ROCK: Rho相关蛋白激酶; TGF: 转化生长因子。

A: PSCs (pluripotent stem cells)-derived organoids are established following directed differentiation of PSCs, which requires a first step that involves germ-layer specification (endoderm, mesoderm or ectoderm), followed by induction and maturation, via culturing with specific growth and signaling factors. B: ASCs (adult stem cells)-derived organoid cultures require isolation of the tissue-specific stem cell population, which can then be embedded into an ECM (extracellular matrix) with defined, tissue-specific combinations of growth factors to allow propagation. ASC-derived organoids, as shown here, are of epithelial origin and lack a mesenchymal or immune component unless it is added separately. Signaling components that are important for guided differentiation and niche function are shown. BMP: bone morphogenetic protein; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; ROCK: Rho-associated protein kinase; TGF: transforming growth factor.

图1 人源PSCs衍生和ASCs衍生的类器官建立方法(根据参考文献[16]修改)

Fig.1 Process for the establishment of human PSC-derived and ASC-derived liver organoids (modified from reference [16])

PSCs)或成体干细胞(adult stem cells, ASCs)模拟人体器官发育过程而产生。以多能干细胞为起点建立类器官需要首先形成特定的胚层(内胚层、中胚层或外胚层), 再与必需的生长因子和细胞因子共培养以诱导细胞定向分化和成熟; 而建成立体干细胞衍生的类器官则首先需要分离目标器官的干细胞系, 再将其嵌入到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中, 在特定的生长因子刺激下实现扩增繁殖(图1)^[16]。

肝脏是异质性非常高的器官, 从肝门静脉区域(portal vein, PV)到肝中央静脉区域(central vein, CV)存在不同的细胞类群^[17-18], 其中许多细胞类群, 例如: 肝门静脉区域的Sox9弱阳性hybrid肝细胞^[19]、Lgr5⁺(leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 positive)肝细胞^[20]和肝中央静脉区域的Axin2⁺肝细胞^[21]等, 对肝脏的稳态维持和损伤修复亦具有重要作用; 另外, 在某些损伤情况下肝门静脉区域的肝细胞也可经重编程成为肝干细胞样细胞(hepatocyte-derived liver progenitor-like cells, Hep-LPCs), 参与损伤修复^[22-23], 这些细胞都有潜力用于

构建不同细胞起源的肝脏类器官。

1.1 诱导性多能干细胞来源的类器官

2006年山中伸弥团队^[24]发现, 只须利用逆转录病毒将四个与干细胞特性相关的转录因子Oct3/4、Sox2、c-Myc以及Klf4转入小鼠的成纤维细胞中, 即可诱导它们去分化成多能干细胞, 也就是诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 它们在形态、基因、蛋白表达、表观修饰、细胞倍增和分化能力等方面都与胚胎干细胞相似。iPSCs来源十分广泛, 又具有早期胚胎干细胞的发育能力, 在体外培养时可通过建立合适的体系, 如添加生长因子、设计不同生长基质等, 模拟体内发育过程, 因此, 理论上可分化为任何成体细胞或组织器官类型。基于这些优势, iPSCs成为了类器官的重要细胞来源。2013年SHAN等^[25]通过高通量筛选出两类可以诱导iPSCs形成肝样细胞的小分子, 一类可以用于促进体外人原代肝细胞功能性增殖; 另一类可以增强肝细胞的功能, 有利于诱导多能干细胞源性的肝细胞向更成熟的表型分化。这些小分子的使用

有助于解决肝细胞来源问题。同年, TAKEBE等^[26]首次在体外重现3D血管性和功能性肝芽(iPSC derived liver buds, iPSC-LBs)的形成过程。他们首先将iPSCs诱导形成的内胚层细胞与基质细胞群共培养, 待其形成肝芽后移植入免疫缺陷小鼠中, 之后的48 h内iPSC-LBs中的血管可与宿主血管相连并且发挥功能。免疫染色和基因表达分析显示, 体外诱导形成的肝芽与体内肝芽具有相似性, 其内部的功能性血管可刺激iPSC-LBs向成熟肝组织发育。随后, 该团队建立了一个规模化的类器官培养平台, 该平台能够高效生产同质化的小型肝芽^[27]。2019年, 该团队再次取得重大突破, 他们利用iPSCs建立出具有连续性和动态性的肝-胆-胰类器官^[28]。TAKEBE等^[26]首先通过人类多能干细胞的3D培养方式建立起具有区域特异性的内胚层与中胚层的肠道“球状体”结构, 再将两个“球状体”相邻地嵌入基质胶中促进球体融合, 随后融合界面出现肝-胆-胰原基。器官原基经长期培养后可再现发育早期的形态发生事件, 包括内陷、形成分支和建立连接, 最终形成迷你的肝-胆-胰类器官, 其内部胰腺(尤其是外分泌谱系)与胆管之间建立起功能联系。该研究解决了类器官边界系统形成的技术难题, 为研究早期器官发育过程中复杂的相互作用提供了可能性。2020年6月, 匹兹堡大学的团队重编程人羊膜细胞和胚胎成纤维细胞以获得诱导多能干细胞系, 之后在生长适宜的环境中将iPSCs分化成不同的肝细胞系, 最终制备出功能完备的人工微型肝脏, 将其移植到大鼠中可存活4天^[29]。该研究是实验室培养人工替代器官领域的一大进步, 将为肝病治疗带来新的曙光。

1.2 胚胎干细胞来源的类器官

1981年剑桥大学的EVANS和KAUFMAN^[30]首次成功地从小鼠囊胚中获得干细胞系并实现体外培养, 很快他们就认识到这些细胞具有自我复制和多向分化的巨大潜能, 但是在之后的很长时间内, 在获取灵长类动物的胚胎干细胞研究中一直未能取得突破性进展^[31]。直到1998年, THOMSON教授^[32]才从捐赠的人类胚胎中建立首个人类胚胎干细胞系, 从此该研究领域进入一个新的时代。胚胎干细胞有许多应用潜能, 除了将其分化成特定类型的成熟细胞外, 还可以将其在体外诱导为类器官系统。2019年清华大学长庚医院WANG团队^[33]利用新型培养基(无血清, 无饲养层)构建出人类ESCs衍生的可扩

展肝类器官(human ESC-derived, expandable hepatic organoids, hEHOs)。该类器官可以稳定地维持双向潜能肝干细胞的表型特征, 能分化为功能性肝细胞或胆管细胞, 同时可以在体外扩增20代, 以满足工业或临床上大规模使用细胞的需求。来自hEHOs的细胞移植入FRG(*Fah*^{-/-}/*Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-})小鼠的损伤肝脏后表现出强大的再生能力, 并且在体内可向成熟的肝细胞分化。研究者将类器官植入免疫缺陷小鼠的附睾脂肪垫后发现, 它们既不会产生非肝谱系, 也不会形成畸胎瘤; 最后他们又把人类胎儿肝间充质细胞(human fetal liver mesenchymal cells, hFLMCs)整合到hEHOs中开发衍生模型, 该模型经乙醇处理后可以模拟与酒精性肝病相关的病理生理变化。

1.3 成体干细胞来源的类器官

成体干细胞作为建立类器官的另一条重要途径, 在培养过程中具有一定的优势。与iPSCs途径相比, ASCs可以直接从目标器官中获取, 因此该途径不需要经历细胞重编程阶段即可分化为成熟细胞。但该途径也存在一些问题, 比如: 不同组织的ASCs具有不同的分子标记, 鉴定成体干细胞或寻找准确且高效的分子标志费时费力, 因此发现普适性分子标记物就显得十分必要。2007年, CLEVERS等^[34]研究发现, 肠Wnt靶基因之一*Lgr5*(也被称为*Gpr49*)可用来鉴定小肠和结肠干细胞, 并且认为*Lgr5*是成体干细胞的一个普遍标记物。随后研究发现, 含有Wnt激动剂RSPO1的3D培养系统可支持单个*Lgr5*⁺干细胞长期克隆扩增成可移植的类器官(芽胞)^[3,35-36]。小鼠和人类的成年肝脏中也含有可以产生类器官的*Lgr5*⁺细胞。2013年, GROMPE团队^[20]发现, *Lgr5*的表达不仅可用于标记肝脏中干细胞的生成, 还可以确定一种在肝损伤时变得活跃的干细胞。他们将损伤小鼠肝脏中单个*Lgr5*⁺细胞在RSPO1培养基中培养成类器官, 并将其移植到*Fah*^{-/-}小鼠后可产生功能性肝细胞。

除了*Lgr5*⁺细胞外, 还有其他类型的细胞可充当肝干细胞。2014年, TANIMIZU等^[37]在3,5-二乙酯基-1,4-二氢三甲吡啶(3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, DDC)损伤的肝脏中发现具有成熟肝细胞形态的Sox9⁺EpCAM⁻(Sry HMG box protein 9-positive; epithelial adhesion molecule-negative)细胞在体外既可转化为胆管样细胞, 又能转化为功能性肝细胞。无独有偶, 2017年OCHIYA团队^[38]利用ROCK

抑制剂Y-27632、TGF β 抑制剂A-83-01和GSK3抑制剂CHIR99021成功地将小鼠的肝细胞去分化为双能肝前体细胞。去分化后的细胞不仅能再分化为成熟肝细胞和胆管上皮细胞,并且能在慢性损伤的肝脏中重新繁殖。这些2D肝实质细胞扩增实验表明成熟肝细胞可在慢性肝损伤时重新转变为可增殖的肝前体细胞。2018年CLEVERS实验室^[39]建立了肝细胞源性类器官培养系统(hepatocyte organoids, Hep-Orgs),探讨了成熟的小鼠肝细胞和人肝细胞的3D扩增能力。研究人员在实验中发现,类器官来源于单个肝细胞,并且能够保留肝脏的关键形态、功能和基因表达特征,其转录谱类似于肝部分切除(partial hepatectomy, PHx)后增殖的肝细胞转录谱,他们将其移植入肝脏受损的小鼠中出现细胞扩增现象,这模拟了肝损伤引起的典型增殖反应。同一时期,PENG等^[40]发现,在3D培养系统中,损伤诱导的炎症细胞因子TNF α 可以促进小鼠肝细胞的扩张,并使其能够连续传代和长期培养6个月以上。该研究将体外培养的肝细胞移植入*Fah*^{-/-}小鼠的受损肝脏中,其在体内可再生肝组织,由此推测,组织修复信号也可用来促进其他难以培养的细胞的扩增。

1.4 肝癌类器官

肿瘤异质性是指在同一肿瘤组织内部或同一患者的不同肿瘤组织之间细胞具有不同的遗传或表型修饰^[41],这种特性是导致癌症治疗失败的关键因素。肝癌在发生机制、组织形态、肿瘤微环境以及分子层面均表现出高度异质性^[42],因此迫切需要开发出能稳定维持肿瘤细胞体内特征的肝癌研究模型,以用于肝癌的个体化精准诊疗研究。原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)、肝细胞癌-肝内胆管细胞癌混合型(combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, CHC)三种亚型。2015年,BROUTIER等^[43]利用患者肿瘤切除组织生成了三种原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)的类器官模型。该模型较好地保留了原发肿瘤的组织学结构、基因表达和基因组特征,并且在相同培养基条件下长期传代仍可保留不同肿瘤组织结构和亚型。异种移植研究表明,PLC类器官的致瘤潜能、组织学特征和转移特性在体内均可以得到很好地保存。此外,该研究团队还将PLC类器官作为生物标记物鉴定和药物筛选模型,并用其确定

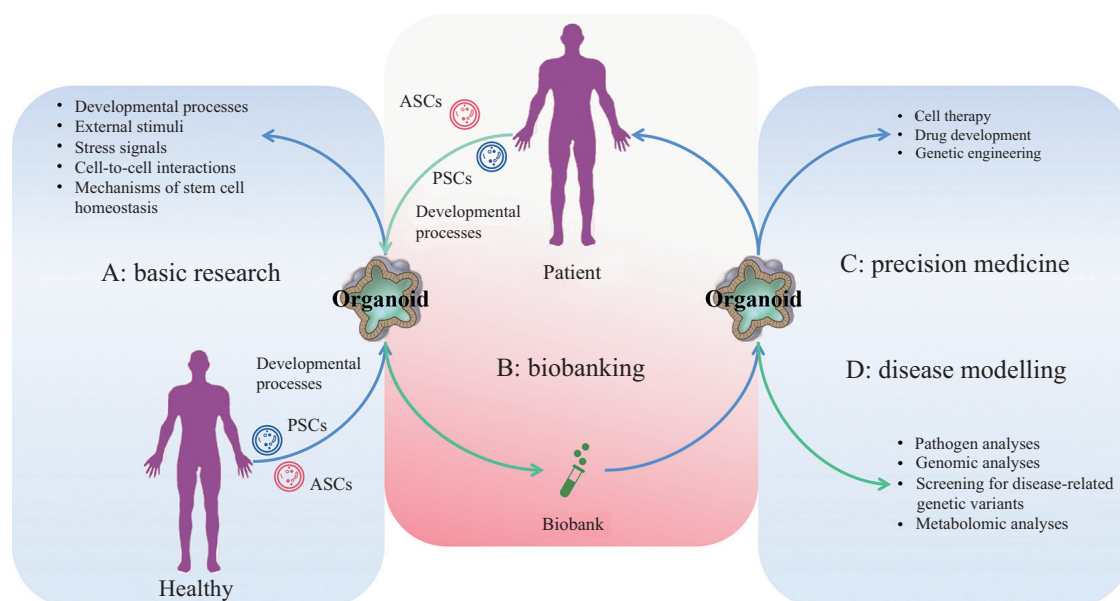
了ERK抑制剂SCH772984作为潜在的原发性肝癌治疗药物。2018年另一研究团队在肝癌组织穿刺活检材料中成功构建了类器官^[44]。与2017年的研究相比,该研究扩大了肝癌类器官建立的来源。这是因为手术切除是少数肝癌早期或非肝硬化患者的治疗选择,这些患者通常未接受全身治疗,而活检材料则可取材于接受全身治疗的中晚期肿瘤患者,因此活检材料衍生的类器官有助于研究者建立一个反映HCC全谱的动态生物样本库,这种生物样本库可以包括各种临床信息,如治疗反应、耐药性发展和生存预后等数据,从而更好地帮助医生确定个性化治疗方案。

2 肝脏类器官的应用

类器官技术具有以下显著的优势^[16]。(1) 人源性:人类类器官代表人类生理系统,而不是“类人”或“类似”系统;(2) 高效性:成体干细胞衍生或多能干细胞衍生的类器官建立速度快,难度相对较低;(3) 稳定性:在应用于大规模基因组筛查和药物筛选的过程中,类器官各方面性能较稳定;(4) 个体化:研究者可从个体组织或细胞建立类器官,有助于实现精准诊疗。这些优势使类器官自诞生以来就得到了广泛应用(图2)^[16]。

2.1 医药研究

药物筛选是指从天然产物或者人工合成的化合物中筛选出具有生物活性的新药或先导化合物,是新药研发过程中的关键步骤。随着基因组学、蛋白质组学、代谢组学、组合化学等学科的发展,药物分子库不断扩大,药物作用靶点也越来越多,这使得药物发现的范围逐渐扩大,药物筛选的工作量急剧增加^[45]。3D培养的类器官具有更稳定的基因组,更接近生理细胞的行为,并且更适合于生物转染和高通量筛选,目前已经成为一种理想的药物筛选模型。值得注意的是,它的应用范围不只局限于研发阶段的药物,还可应用于临床前药物,如:评价临床药物的疗效和安全性、进行多种肿瘤药物和放疗剂量的筛查等。此外,通过对患者来源的类器官进行分析,研究者可揭示导致耐药性的表观遗传或遗传学变化的原因,为患者个性化治疗提供数据支撑和指导。2019年,LI等^[46]利用肝癌类器官进行癌症药物筛选。研究者从胆管癌手术标本的不同区域获取材料,建立了27个肝癌类器官细胞株,之后使



类器官可用于基础研究(A), 帮助理解人体发育过程、对外部刺激和环境压力的应激反应、细胞间相互作用和干细胞内稳态机制; 生物库(B), 病人获得的样本可以用来建立衍生的类器官, 该类器官还可作为未来研究的资源; 疾病模型(C), 利用各种实验技术, 包括组学分析和药物筛选, 了解传染病、遗传性疾病和癌症等疾病的发病机制; 精准医学(D), 患者衍生的类器官可用于预测药物反应, 并可作为再生医学与基因工程结合研究的资源。

Organoids can be used for basic research (A), including studies of human biology aiming to understand developmental processes, responses to external stimuli and stress signals, cell-to-cell interactions and mechanisms of stem cell homeostasis; biobanking (B), whereby samples obtained from patients can be used to generate patient-derived organoids and stored as a resource for future research; disease modeling (C), to understand the mechanisms of human diseases such as infectious diseases, inheritable genetic disorders and cancer using various laboratory techniques, including omics and drug-screening analyses; and precision medicine (D), in which patient-derived organoids can be used to predict response to drugs and as resources for regenerative medicine coupled with genetic engineering.

图2 人体类器官的应用前景(根据参考文献[16]修改)

Fig.2 Potential applications of human organoids (modified from reference [16])

用129种抗肿瘤药物进行筛查, 结果表明, 在129种抗癌药物中大多数药物仅对少数类器官细胞株有效, 只有一小部分药物表现出广泛的有效性, 这一小部分药物对于绝大多数类器官均具有中等及以上的杀伤活性。该研究也证明了利用癌症类器官进行药物检测是一种有效的药物发现途径。

肝脏类器官还可作为良好的药物肝毒性体外预测模型。药物性肝损伤(drug induced liver injury, DILI)是急性肝损伤中最为常见的病因之一, 也是药物临床试验失败和上市后撤回的首要原因^[47]。近年来, 已有研究团队看到肝脏类器官的潜力, 将其应用于评估药物代谢参数及毒性的研究领域。2013年, KOSTADINOVA等^[48]建立了3D肝脏共培养系统, 该系统包含肝实质细胞和非实质细胞, 其内部形成了胆管样结构, 能产生白蛋白、纤维蛋白原、转铁蛋白和尿素, 可维持肝细胞表型和肝功能3个月以上, 更重要的是, 它还具有参与药物代谢的细胞色素P450系统, 具备对炎症刺激作出反应的能力。研究

证明, 结构更复杂且含有更多细胞种类的类器官系统可以增加药物毒性模拟的准确性和精确度, 也能支持药物的多种不良反应检测以及长期重复药物处理。

2.2 疾病模型

类器官已成为研究传染病、遗传性疾病和癌症的常用实验平台。

2.2.1 传染病模型 在研究传染病发病机制时, 人源类器官模型比动物模型更可取, 因为病原体通常具有特定的物种或组织倾向性, 不同物种的发病率和易感部位有所不同^[16]。2019冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)是由严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染引起的新型肺炎, 该病传染性和致病性高, 目前已在全球范围内传播, 其主要症状是发热和咳嗽, 然而有一部分患者表现出多器官损伤和功能障碍^[49-51], 肝损伤也是COVID-19患者报告的一种共存症状。一项流行病学研究表明,

在148名COVID-19患者中有55名(37.2%)出现肝功能异常,主要肝功能参数高于正常范围,包括丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)或总胆红素(TBIL)^[52]。不同组织来源的类器官可以用来确定易受SARS-CoV-2感染的部位,在推进研究和制定诊疗计划方面发挥着一定的作用。已有研究小组发现, SARS-CoV-2可以感染肝导管类器官,并且病毒能在其中进行大量复制传播^[53]。该研究也表明, COVID-19患者的肝损伤可能是由病毒感染引起的胆管细胞受损和随后的胆汁酸积累造成的。

2.2.2 癌症研究 类器官在增进我们对人类癌症的了解方面也发挥着重要作用。目前,肿瘤研究模型主要包括人类肿瘤细胞系、小鼠肿瘤模型以及人源肿瘤异种移植模型等。这些模型各具特色,也都有所缺陷,例如:部分肿瘤细胞系难以培养,小鼠模型中难以避免鼠源肿瘤基质代替人源肿瘤基质,异种移植实验周期长等。近年来,类器官技术以其培养体系简单易操作、时间和金钱成本较低等优势得到广大研究人员青睐,多种癌组织在体外被培养成类器官。实验表明,肿瘤类器官无论是在离体状态下,还是在异种移植后的体内环境中都可保留原发肿瘤组织病理学特征^[54],这说明类器官移植可用于更复杂的体内环境中验证药物反应。此外,类器官技术也能够体外模拟组织癌变过程。2019年惠利健团队^[55]通过重编程人肝细胞(human induced hepatocytes, hiHeps)建立起具有肝脏结构和功能的类器官,又将其用于模拟致癌基因对肝组织结构和功能的影响研究,例如:向hiHeps类器官中引入HCC相关的致癌基因*c-Myc*,随后类器官中出现线粒体和内质网过多的相互作用,改变了原有的线粒体裂变和有氧呼吸,促进了HCC的发生,所以他们推测, *c-MYC*可能是预防性治疗的靶点之一。实验还发现,联合抑制Notch和JAK-STAT可以阻止RAS诱导的肝细胞向肝内胆管癌细胞系转化。最近有研究通过结合单细胞转录组测序技术分析不同药物敏感性肝癌类器官样本,发现了一类具有广谱耐药能力的异质性肝癌细胞,它们具有代谢优势特性,其中GAPDH阳性细胞亚群与NEAT1阳性细胞亚群通过受体-配体相互作用,诱导后者细胞内CD44/JAK-STAT信号通路活化从而促进肿瘤耐药^[56]。

2.2.3 遗传疾病 类器官还可用于研究和模拟器

官特异性的单基因遗传病。常染色体隐性遗传病沃尔曼(Wolman)病是由溶酶体中酸性脂肪酶(LAL)失活而引起的,其患者的肝细胞有大量的脂质积聚,并伴随致命的脂肪性肝炎和纤维化,该病只有一种非常昂贵的保守治疗策略。为探索新的治疗方案,日本东京医科大学的OUCHI等^[57]利用Wolman病人的iPSCs构建了3个纤维化程度严重的类器官模型。此前有研究团队提出,奥贝胆酸(OCA)可以通过刺激回肠内产生FGF19来缓解沃尔曼症状^[58-60],所以OUCHI等在类器官培养系统中加入FGF19。加入7天后,非酒精性脂肪肝的肝细胞损伤标志活性氧(eactive oxygen species, ROS)生成显著减少,并且类器官的纤维化程度降低。该研究证实了FGF19和OCA在Wolman病治疗中潜在的价值,为研发新药提供思路。

2.3 再生医学

肝脏移植是治疗各种终末期肝病的唯一方法,然而该方法常常面临供体短缺的问题,这促使人们寻找体外再生器官。3D生物打印技术是将活细胞与生物材料、DNA等活性分子作为基本制造单元,将多种成分在计算机辅助下打印在特定部位并形成3D结构,其具有组成较为复杂的多细胞结构能力,已应用于类器官的体外构建,未来有可能用于制造替代组织^[61]。2020年,毛一雷、孙伟、黄鹏羽合作团队^[62]成功利用3D打印技术制备出3D打印肝脏类器官(3D bioprinted hepatorganoids, 3DP-HOs)。该团队首先确定以HepaRG细胞为材料,并选用5%明胶和1%海藻酸盐为生物墨水进行打印,之后诱导类器官中HepaRG细胞向肝细胞分化并逐步成熟,体外分化7天后检测肝功能。研究人员将其移植到免疫缺陷的I型酪氨酸血症肝衰竭模型小鼠体内,利用小鼠存活时间、肝损伤程度、人肝功能标志物及人特异性异哇肌代谢物的产生等指标评价3DP-HOs在体内的肝功能,在移植后的第4周,小鼠ALT、TBIL、直接胆红素、谷氨酰转氨酶和ALP水平显著降低,这表明肝损伤情况得到缓解;移植小鼠血清中酪氨酸等相关氨基酸水平也显著下降,说明3DP-HO对I型酪氨酸血症小鼠的酪氨酸代谢缺陷有明显治疗效果,同时小鼠也获得了人类特有的药物代谢活性。移植的3DP-HOs可形成功能性血管系统,进一步增强了3DP-HOs物质转运功能和肝功能,小鼠存活率得到显著提高。

3 技术瓶颈与展望

自CLEVERS发表第一篇文章以来, 类器官技术迅猛发展, 在各个领域得到广泛应用。但是该技术尚未成熟, 仍面临许多亟需突破的技术瓶颈。

首先, 类器官的建立程序和质量把控尚未在全球范围内标准化, 不同实验室之间的实验重复度较低。这是因为类器官的发育需要适时地激活形态发生信号通路, 以诱导细胞命运和促使不同类型的细胞分离, 进而共同完成自组织过程。一般来说, 上述程序是通过在规定时间内添加外源诱导分子来实现的。这些诱导分子和细胞分泌的可溶性因子在培养系统中扩散, 在类器官细胞的局部微环境中形成生化梯度, 这些梯度由于其自发性而不易被控制, 更无法完全模拟出体内器官发生过程中的梯度分布^[63], 因此, 控制类器官培养系统中施加的生化 and 生物物理条件, 例如: 细胞聚集体的初始细胞密度、几何形状和大小、细胞-ECM相互作用、使用微流控装置创造复杂的生物分子梯度等, 都将有利于实现工程化的自组织过程, 提高类器官建立实验的重现性^[64]。

其次, 血管化是类器官技术面临的另一重大难题。随着类器官体积的增加, 被动扩散逐渐无法满足其对养分和氧气获取的同时去除代谢产物的需求, 所以缺氧及代谢废物累积将使细胞死亡, 最终导致组织坏死。同时, 体外类器官发育过程无法重现体内器官发展过程中复杂又动态的微环境, 也无法满足器官发育的要求, 因此目前培养类器官无论是形态大小还是生理功能都无法替代真实的组织器官。不过已有许多新的技术用来解决上述限制, 例如: 干细胞和发育生物学领域的专家联合物理科学家和工程师们研发出的“类器官芯片”(organoids-on-a-chip)。广义上来说, 类器官芯片是以微流控芯片技术为核心, 旨在体外模拟人类器官单位功能的微型细胞培养装置。该技术不仅可以利用微液流装置产生机械力来促进内皮细胞扩张进而生成3D灌注血管, 而且可以为类器官系统中不同的细胞和组织之间相互作用创造更可控和更有利的环境。2018年, JIN等^[65]开发了一个3D-iHep(3D-induced hepatic)类器官芯片培养系统, 该系统使用脱细胞肝外基质(liver extracellular matrix, LEM)水凝胶和微流控装置来重现体内肝脏中细胞-细胞、细胞-基质相互作用的3D微环境。在动态的细胞外基质微环境下培养的3D血管化肝类器官显著提高了细胞间相互作

用、代谢活性和肝脏生理功能。

尽管类器官技术还面临诸多挑战, 但是仍凭借其显著的优势成为发育生物学、疾病病理学、细胞生物学、肿瘤精准医学研究领域的强大实验平台, 弥补了2D培养方法和动物模型系统的不足。今后该技术应注重与基因编辑技术、3D打印技术、微流体系统等其他先进技术结合, 进而打破技术瓶颈; 通过与经典的动物模型、非模型生物和体外培养等研究方式相结合, 也有望进一步提高研究的准确性。

参考文献 (References)

- [1] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-97.
- [2] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [3] 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.
- [4] DEKKERS J F, WIEGERINCK C L, DE JONGE H R, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids [J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 939-45.
- [5] HUCH M, GEHART H, VAN BOXTEL R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 299-312.
- [6] 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.
- [7] HUBERT C G, RIVERA M, SPANGLER L C, 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): 2465-77.
- [8] BARTFELD S, BAYRAM T, MARC V D W, 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.
- [9] CASTELLANOS-GONZALEZ A, CABADA M M, NICHOLS J, et al. Human primary intestinal epithelial cells as an improved *in vitro* model for cryptosporidium parvum infection [J]. *Infect Immun*, 2013, 81(6): 1996-2001.
- [10] ZOMER-VAN OMMEN D D, PUKIN A V, FU O, et al. Functional characterization of cholera toxin inhibitors using human intestinal organoids [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(14): 6968-72.
- [11] NEAL J T, LI X, ZHU J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-88, e16.
- [12] DIJKSTRA K K, CATTANEO C M, 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): 1586-98, e12.
- [13] Method of the year 2017: organoids [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(1): 1.
- [14] TAUB R. Liver regeneration: from myth to mechanism [J]. *Nat*

- Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(10): 836-47.
- [15] DUNCAN A W, DORRELL C, GROMPE M. Stem cells and liver regeneration [J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 466-81.
- [16] KIM J, KOO B K, KNOBLICH J A. Human organoids: model systems for human biology and medicine [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(10): 571-84.
- [17] HALPERN K B, SHENHAV R, MATCOVITCH-NATAN O, et al. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver [J]. Nature, 2017, 542(7641): 352-6.
- [18] AIZARANI N, SAVIANO A, SAGAR, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors [J]. Nature, 2019, 572(7768): 199-204.
- [19] FONT-BURGADA J, SHALAPOUR S, RAMASWAMY S, et al. Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer [J]. Cell, 2015, 162(4): 766-79.
- [20] 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.
- [21] WANG B, ZHAO L, FISH M, et al. Self-renewing diploid Axin2⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver [J]. Nature, 2015, 524(7564): 180-5.
- [22] TARLOW B D, PELZ C, NAUGLER W E, et al. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(5): 605-18.
- [23] LI W, YANG L, HE Q, et al. A homeostatic Arid1a-dependent permissive chromatin state licenses hepatocyte responsiveness to liver-injury-associated YAP signaling [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(1): 54-68, e5.
- [24] 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.
- [25] SHAN J, SCHWARTZ R E, ROSS N T, et al. Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation [J]. Nat Chem Biol, 2013, 9(8): 514-20.
- [26] TAKEBE T, SEKINE K, ENOMURA M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. Nature, 2013, 499(7459): 481-4.
- [27] TAKEBE T, SEKINE K, KIMURA M, et al. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells [J]. Cell Rep, 2017, 21(10): 2661-70.
- [28] KOIKE H, IWASAWA K, OUCHI R, et al. Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut-midgut boundary [J]. Nature, 2019, 574(7776): 112-6.
- [29] TAKEISHI K, HORTET A C D, WANG Y, et al. Assembly and function of a bioengineered human liver for transplantation generated solely from induced pluripotent stem cells [J]. Cell Rep, 2020, 31(9): 107711.
- [30] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-6.
- [31] CYRANOSKI D. How human embryonic stem cells sparked a revolution [J]. Nature, 2018, 555(7697): 428-30.
- [32] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 2019, 282(5391): 1145-7.
- [33] 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.
- [34] BARKER N, VAN ES J H, KUIPERS J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 [J]. Nature, 2007, 449(7165): 1003-7.
- [35] BARKER N, HUCH M, KUJALA P, et al. Lgr5⁺ stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro* [J]. Cell Stem Cell, 2010, 6(1): 25-36.
- [36] 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.
- [37] TANIMIZU N, NISHIKAWA Y, ICHINOHE N, et al. Sry HMG box protein 9-positive (Sox9⁺) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM⁻) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration [J]. J Biol Chem, 2014, 289(11): 7589-98.
- [38] KATSUDA T, KAWAMATA M, HAGIWARA K, et al. Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity [J]. Cell Stem Cell, 2017, 20(1): 41-55.
- [39] HU H, GEHART H, ARTEGIANI B, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids [J]. Cell, 2018, 175(6): 1591-606, e19.
- [40] 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.
- [41] LOSIC B, CRAIG A J, VILLACORTA-MARTIN C, et al. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 291.
- [42] LI L, WANG H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy [J]. Cancer Lett, 2016, 379(2): 191-7.
- [43] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. Nat Med, 2017, 23(12): 1424-35.
- [44] NUCIFORO S, FOFANA I, MATTER M S, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies [J]. Cell Rep, 2018, 24(5): 1363-76.
- [45] 梁伯萧, 潘建章, 方群. 基于微流控技术的细胞水平高通量药物筛选系统的研究进展[J]. 色谱 (LIANG Y X, PAN J Z, FANG Q. Research advances of high-throughput cell-based drug screening system based on microfluidic technique [J]. Chin J Chrom, 2021, 39(6): 567-77.
- [46] LI L, KNUTSDOTTIR H, HUI K, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity [J]. JCI Insight, 2019, 4(2): e121490.
- [47] 李瑞红, 柳娟, 孙旭尔, 等. 药物肝毒性评价体外细胞模型的相关研究进展[J]. 生命科学仪器 (LI R H, LIU J, SUN X E, et al. Advance of *in vitro* cell model for drug hepatotoxicity evaluation [J]. Life Science Instruments, 2020, 18(4): 41-52.
- [48] KOSTADINOVA R, BOESS F, APPLGATE D, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 268(1): 1-16.
- [49] CHEN N, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneu-

- monia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507-13.
- [50] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [51] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-33.
- [52] FAN Z, CHEN L, LI J, et al. Clinical features of COVID-19-related liver functional abnormality [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(7): 1561-6.
- [53] ZHAO B, NI C, GAO R, et al. Recapitulation of SARS-CoV-2 infection and cholangiocyte damage with human liver ductal organoids [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(10): 771-5.
- [54] FUJII M, SHIMOKAWA M, DATE S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 827-38.
- [55] SUN L, WANG Y, CEN J, et al. Modelling liver cancer initiation with organoids derived from directly reprogrammed human hepatocytes [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 1015-26.
- [56] ZHAO Y, LI Z X, ZHU Y J, et al. Single cell transcriptome analysis uncovers intra-tumoral heterogeneity and underlying mechanisms for drug resistance in hepatobiliary tumor organoids [J]. *Adv Sci*, 2021, doi: 10.1002/advs.202003897.
- [57] OUCHI R, TOGO S, KIMURA M, et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(2): 374-84.e6.
- [58] ATTIA Y M, TAWFIQ R A, ALI A A, et al. The FXR agonist, obeticholic acid, suppresses HCC proliferation & metastasis: role of IL-6/STAT3 signalling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12502.
- [59] DASH A, FIGLER R A, BLACKMAN B R, et al. Pharmacotoxicology of clinically-relevant concentrations of obeticholic acid in an organotypic human hepatocyte system [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 39: 93-103.
- [60] NEUSCHWANDER-TETRI B A, LOOMBA R, SANYAL A J, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9972): 956-65.
- [61] DALY A C, PRENDERGAST M E, HUGHES A J, et al. Bioprinting for the biologist [J]. *Cell*, 2021, 184(1): 18-32.
- [62] YANG H, SUN L, PANG Y, et al. Three-dimensional bioprinted hepatorganoids prolong survival of mice with liver failure [J]. *Gut*, 2020, 70(3): 567-74.
- [63] PARK S E, GEORGESCU A, HUH D H. Organoids-on-a-chip [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 960-5.
- [64] GARRETA E, KAMM R D, LOPES S M C D S, et al. Rethinking organoid technology through bioengineering [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 145-55.
- [65] JIN Y, KIM J, LEE J S, et al. Vascularized liver organoids generated using induced hepatic tissue and dynamic liver-specific microenvironment as a drug testing platform [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28(37): 1801954.