

肺类器官的培养及应用研究

王祥龙 田雨闪 陈欢 侯宏卫 胡清源*

(国家烟草质量监督检验中心, 烟草生物学效应重点实验室, 郑州 450001)

摘要 肺类器官主要是由干细胞或特异性祖细胞通过3D培养形成的一种能够更加真实地在体外条件下模拟肺的结构和功能的组织类似物, 与人体肺组织具有较高的组织源性。随着肺类器官技术的发展, 其培养方案林立, 但缺乏统一的标准。不过目前已经在疾病研究、药物筛选以及毒理评价等多个领域开展了肺类器官的相关研究。该文主要综述了肺类器官的培养技术及相关应用, 以期肺类器官的发展提供一定参考。

关键词 肺类器官; 肺类器官的培养; 肺类器官的应用

Cultures and Applications of Lung Organoids

WANG Xianglong, TIAN Yushan, CHEN Huan, HOU Hongwei, HU Qingyuan*

(Key Laboratory of Tobacco Biological Effects, China National Tobacco Quality Supervision and Test Center, Zhengzhou 450001, China)

Abstract Lung organoids are mainly formed by stem cells or specific progenitor cells through 3D culture, which can simulate the structure and functions of lung *in vitro*, and have high tissue origin with human lung tissue. With the development of lung organoids, there are many culture methods, but there is no unified standard. However, studies on lung organoids have been carried out in many fields such as disease research, drug screening and toxicological evaluation. This paper mainly reviews the cultures and applications of lung organoids, in order to provide a certain reference for the development of lung organoids.

Keywords lung organoids; lung organoids cultures; lung organoids applications

类器官是通过诱导目标物分化而形成的自组织3D体外微器官模型。它能够在体外条件下更加真实地模拟人类器官的复杂结构及功能, 可用于开展对人生长发育过程和生理性疾病等多方面问题的研究。国际类器官鼻祖CLEVERS等^[1]于2009年通过小鼠肠道成体干细胞成功培育出具有肠道结构的小肠类器官。LANCASTER等^[2]于2014年系统性地提出了类器官的概念, 通过对干细胞或祖细胞进行体外诱导, 促进其进行与体内细胞相似的定向分化, 并自发形成与人体器官具有高度同源性的多细胞类型

组织类似物。同年肺类器官也被成功地培养出来。肺类器官可以通过肺内多种细胞获得, 能够在体外条件下实现稳定的培养。与2D培养的细胞相比, 3D培养的肺类器官与人肺组织保持高度的相似性, 包含肺的多种细胞类型, 能够表现出细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用, 更能模拟人类真实的肺部结构及功能。肺类器官作为一种新的体外研究模型, 能够在体外条件下实现对于机体发育过程、组织内稳态和复杂生理病理状况的评价。这一优势使得肺类器官受到越来越多的关注。因此, 本研究拟

收稿日期: 2022-02-14

接受日期: 2022-05-05

国家烟草质量监督检验中心青年人才托举工程项目(批准号: 552021CR0030)、环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金(批准号: KF2021-17)和中国烟草总公司科技重大专项(批准号: 110202101018(XX-04))资助的课题

*通讯作者。Tel: 0371-67672601, E-mail: huqy1965@163.com

Received: February 14, 2022

Accepted: May 5, 2022

This work was supported by the Young Elite Scientists Sponsorship Program of National Tobacco Quality Supervision and Inspection Center (Grant No.552021CR0030), the Open Fund of State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology (Grant No.KF2021-17) and the Major Science and Technology Special Project of China National Tobacco Corporation (Grant No.110202101018(XX-04))

*Corresponding author. Tel: +86-371-67672601, E-mail: huqy1965@163.com

对肺类器官的培养及应用进行综述, 期望为肺类器官的开发和应用提供参考。

1 肺类器官的诱导

成人肺由气管、支气管、肺泡等组成, 主要包含 Club 细胞、杯状细胞、纤毛细胞、基底细胞和神经内分泌细胞^[3]。肺泡则是由 I 型肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial type 1, AT1)、II 型肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial type 2, AT2) 组成的。通过查阅文献发现, 目前肺类器官根据来源主要分为三种: 成熟肺上皮干细胞来源的肺类器官、人类多能干细胞 (human pluripotent stem cells, hPSCs) 来源的肺类器官和肺癌类器官。成熟肺上皮干细胞可直接进行体外培养, 诱导生成肺类器官。hPSCs 来源的肺类器官: 一般采用 hPSCs 诱导生成前部前肠球体, 再使其分化形成特定胚层^[3], 然后利用生长因子及细胞因子调控相关的信号通路 (目前主要是 FGF 和 HH) 使特定胚层向肺类器官进行特定分化和成熟^[4]。肺癌类器官: 主要通过将患者组织样本里的肺癌干细胞移植到特定的细胞外基质 (如基质胶) 中, 添加生长因子使其增殖分化, 从而诱导生成肺癌类器官^[5]。

1.1 成熟肺上皮干细胞来源的肺类器官

成熟肺上皮干细胞包括基底细胞、气道分泌细胞和 II 型肺泡细胞^[6]。基底细胞一般来源于人气管和大气道或小鼠支气管, 也存在于人的鼻腔上皮中, 因此基底细胞也可作为类器官培养的一个细胞来源。气道分泌细胞主要包含 Club 细胞和杯状细胞两种, Club 细胞主要分布在终末细支气管上皮中, 主要作用是保护支气管、促进肺部解毒等^[7]; AT2 是由远端肺内胚层转分化形成的, 其主要功能是产生肺表面活性物质防止肺泡塌陷, 还可调节肺泡水分, 并兼有分化为 AT1 的能力^[8-9]。2009 年, ROCK 等^[10]首先利用蛋白酶 XIV 从人支气管中分离出上皮细胞, 然后将上皮细胞接种在含有支气管上皮培养基的 I/III 型胶原包被的培养皿中, 培养 24 h 后用神经生长因子受体 (nerve growth factor receptor, NGFR) 和 ITGA6 (anti-integrin alpha 6) 抗体通过流式细胞荧光分选技术对人肺基底细胞进行分选, 之后将单个细胞接种在 1:1 的气液界面培养基中, 气液界面培养基每隔一天进行换液。ITGA6⁺NGFR⁺的基底细胞能在培养第 10 天形成支气管球, 第 20 天后支气管球进行单腔扩张, 25 天内腔子细胞和纤毛细胞即可被观察到。

2016 年 HILD 等^[11]描述了一种利用人支气管上皮细胞诱导支气管球类器官的方案。在冰上解冻基质胶, 将基质胶 (25%, 分化培养基) 接种至 384 孔板中, 离心后放入 CO₂ 培养箱中培养 4 h 使基质胶固定。在预热 (37 °C) 的分化培养基中加入基质胶和细胞使基质胶浓度变为 5%, 然后将人支气管上皮细胞按照 3×10⁴ 个/mL 的密度接种于 384 孔板并离心, 将预加水的加湿板置于 384 孔板上, 并放回培养箱继续培养 48 h, 然后用分化培养基制备 5% 的基质胶进行培养, 第 8 天继续重复上一步。通过观察发现, 上皮细胞在 7~10 天开始形成管腔, 8 天开始形成支气管球, 10~11 天跳动的纤毛形成, 14 天支气管球显示黏液纤毛分化。通过对细胞特异性标志物进行检测发现, 基底细胞标志物 (P63 和 ITGA6) 在整个培养期间都有表达, 杯状细胞标志物 (MUC5AC、MUC5B 和 FOXA3) 在第 5 天开始表达, 纤毛细胞标志物 (FOXJ1 和 DNAI2) 在第 7 天开始表达。

成熟肺上皮干细胞尽管在样品来源方面具有一定的局限性, 但是其体外增殖能力较强, 可通过体外增殖分化成不同类型的细胞, 且该类型肺类器官能够在体外条件下模拟气道分泌细胞或纤毛细胞的结构和功能, 在气道类疾病研究方面具有显著的优势。然而, 气道分泌细胞具有混杂的细胞种类及超强的去分化或转分化能力, 这使得很难对气道分泌细胞衍生的类器官进行分类。因此, 需要更多的细胞类型标志物或改进的培养条件来区分不同气道分泌细胞来源的类器官。

1.2 人类多能干细胞来源的肺类器官

2015 年, BRIANA 等^[12]通过诱导 hPSCs 体外培养人肺类器官 (human lung organoids, HLOs), 研究人员首先使用 Activin A 处理人类胚胎干细胞 3 天诱导内胚层生成, 然后依次使用含 N-2、B27 诱导剂、Noggin、TGFβ 小分子抑制剂、SB431542 的 DEME/F12 培养基处理内胚层 4 天以生成前部前肠球体, 或者在生成内胚层后, 在含有 Noggin、SB431542、FGF4 和 CHIR99021 的前肠培养基中孵育内胚层 4~6 天生成前肠球体和肺类器官。在培养过程中, Noggin/SB 显著诱导了前部前肠球体基因 *NKX2.1* 和 *PAX8* 的表达。*NKX2.1* 基因主要表达于肺组织并与维持肺部发育及其功能有关^[13]。通过对近端细胞类型特征标志物如 P63、FOXJ1 等表征发现, 培养超过 2 个月的 HLOs 具有与近端气道相似的上皮结构; 对

远端上皮标志物SOX9、ID2和NMYC表征显示,所有远端标志物均存在于HLOs中,这表示HLOs还具有不成熟的肺泡状气道结构^[12]。

2017年,CHEN等^[14]对hPSCs进行异种移植和基质3D培养,最终获得了具有分支气道和早期肺泡组织的肺芽类器官。具体步骤是首先将hPSCs接种在含有小鼠胚胎成纤维细胞的基质胶上,培养24 h后,使用成形培养基诱导12~16 h生成胚状体,然后使用内胚层诱导培养基诱导36~40 h形成内胚层。该过程中可通过观测生物标志物CXCRR4和c-KIT的表达来测定内胚层的诱导率;通过RNA-seq证实EPCAM⁺细胞中内胚层/肺基因(*FOXA2*、*SOX2*、*NKX2.1*)强烈富集。第25天,SHH在萌出的上皮组织顶端表达最显著,可利用原位杂交技术对SHH(SHH早期表达于整个内胚层,但在分支形态发生过程中仅表达于分支顶端)在内胚层中的表达情况进行评估。由于诱导生成的3D组织含有多种肺部细胞类型,且其空间结构形似体内发育中的肺芽,因此被称为“肺芽类器官”。同年NIKOLIĆ等^[15]利用人类胚胎肺上皮尖端祖细胞诱导生成肺芽类器官,结果发现了人类和小鼠的肺尖部是类似的,并确定了肺芽类器官的培养方法。研究人员对人上皮尖端祖细胞分化的早期阶段进行了大范围表征,揭示了包括*SOX2*和*pro-SFTPC*在内的关键标记基因在小鼠和人类中的表达差异。在肺类器官生长培养基中依次加入不同的生长因子(包括EGF、FGF7、FGF10、NOG、RSPO1、CHIR99021和SB431542),可使人类上皮尖端祖细胞以100%的集落形成率形成类器官,尖端在12 h内形成球体,6~8天呈球形扩张,然后形成分支;培养至第14天时,肺类器官可以形成具有类似于顶端上皮的管腔状结构的组织类似物。经过多次传代后类器官仍保留了*SOX2*和*SOX9*的表达,并且表达了肺特异性转录因子*NKX2.1*和尖端特异性标记蛋白,可通过这一特征对类器官进行特征鉴别。2019年,JACOB等^[16]将hPSCs定向分化为具有自我更新能力的AT2,并且AT2能够分化为上皮球体稳定培养一年,且不需要间充质滋养细胞。该研究团队主要使用了一种改良和简化的内胚层分化方法,即使用内胚层定向分化试剂盒将hPSCs分化为终末内胚层,通过监测*FOXA2*和*SOX17*的表达来确定内胚层诱导效率,然后通过*NKX2-1*⁺肺祖细胞以及*SFTPC*⁺肺泡球的诱导分化,最终形成具有AT2关键功能的肺

泡球。该肺泡球具有表面活性剂的合成和分泌功能并能产生先天免疫反应,不足的是其不包含AT2的关键分化后代AT1。

2019年,MILLER等^[17]通过使用Activin A诱导hPSCs生成内胚层,分别添加SB431542、Noggin、Chir99021、Smo激动剂和FGF4可诱导生成前肠球体。在此基础上,FGF7、Chir99021和ATRT的诱导使前肠球体定向分化成为芽尖类器官,培养周期约为22天;而1% FBS和高浓度FGF10处理则会诱导其定向分化成包含肺间充质和肺泡细胞的气道样结构,即人肺近端类器官,这一过程培养时间较长,大约需要55天。芽尖前体类器官具有高度增殖的多潜能细胞群、体外多向分化潜能和体内植入潜能,因此可通过SOX2⁺、SOX9⁺、ID2⁺和NKX2.1⁺细胞的高度富集和增殖表征芽尖前体类器官的生成。培育的肺类器官能维持100天左右,但是每2~3周需要将其重新植入到新的基质胶中。HAN等^[18]在无血清分化培养基中诱导hPSCs生成肺祖细胞,然后肺祖细胞通过定向分化形成内胚层,最后生成肺类器官。成功分化出肺类器官后,可通过qRT-PCR和RNA-seq分析评估类器官中AT2细胞标志物的表达,流式细胞术分析pro-SP-C⁺细胞,单细胞转录图谱鉴定人肺AT2细胞标志物。通过上述特征的鉴别分析进一步证实了该肺类器官的AT2样细胞与成人肺AT2细胞高度相似。

hPSCs的获得相对于成熟肺上皮干细胞更加容易。由于hPSCs具有分化为人类体细胞的潜能,所以其生成的类器官能广泛用于多种病理和生理方面的研究。此外,还可以通过CRISPR/Cas9基因编辑等技术对hPSCs进行处理,以实现定向改造类器官的目的。然而,hPSCs生成类器官模型也具有一定局限性,前期需要制定复杂的定向分化方案。hPSCs诱导生成的3D类器官相比于2D细胞模型对病毒感染更加敏感,并且能重现一些在动物模型上不能重现的遗传疾病。虽然此类细胞衍生的类器官具有一定优势,但仍存在表观遗传异常和潜在肿瘤生成等问题。

1.3 肺癌类器官

在呼吸系统疾病研究中,体外实验是其中不可缺少的重要组成部分。肺癌类器官可由患者组织分离出来的肿瘤细胞生成。KIM等^[19]通过五种癌症组织亚型建立肺癌类器官,先将手术切除的肺癌组织分离成单个细胞或细胞簇,接着将其嵌入到基质胶

中, 采用无Wnt3a和Noggin的培养基进行培养, 大约4周即可获得不同肺癌亚型的类器官。通过苏木精/伊红染色以及免疫组化分析发现, 五种肺癌亚型的类器官分别保留了肺腺癌标记物napsin-A、鳞状细胞癌等特征标记物, 以及癌组织的组织学特征。通过基因靶向测序、SNP基因分型以及突变一致性分析等证明了肺癌组织保留了癌症组织的遗传特征。

此外, SACHS等^[20]首先通过手术从小细胞肺癌患者中收集支气管肺泡切除组织或灌洗液, 通过机械和酶分离得到单个细胞, 并将其嵌入2型基质胶提取物中, 利用分化试剂进行定向诱导, 在几天内即获得了3D类器官, 成功率高达94%。然后对早期和晚期传代的气道类器官(airway organoids, AOs)进行RNA测序, 结果显示, 数十个气道细胞类型特异性基因都保留了各自的表达模式; 通过qPCR对AOs的气道上皮组成进行验证, 发现其表达了肺标志物NKX2.1和几种气道特异性标志物, 但是几乎没有表达肺间充质基因HOXA5或肺泡转录本。最后, 通过分析原发肿瘤组织和对相应的肿瘤AOs全基因组进行测序发现, 癌症相关基因(包括ALK、EMR1、MDN1等)的错配修复和致癌突变基本一致。这表明, 肺癌类器官能保留人体肿瘤组织病理学和癌症基因突变特性, 即与人体肿瘤组织高度相似。

肺癌类器官主要被用于肿瘤疾病的研究中。它能够保留肿瘤细胞的多种表型特征, 与其他肿瘤类型的体外研究相比较具有显著的优势。目前培养的肺癌类器官基本能覆盖95%以上的肺癌患者。虽然覆盖范围广, 但是仍有一些罕见的肺癌亚型类器官等待开发。另外, 癌症类器官模型的建立仍然存在一定限制, 包括缺乏基质细胞和免疫细胞在内的癌症微环境等。未来该技术可能仍然需要不断的完善。

2 肺类器官的应用

肺类器官作为一种新的体外评价载体, 它不仅在许多生物学和病理学特征方面与源器官高度相似, 并拥有遗传稳定性, 还进一步弥补了体外细胞研究和整体动物研究与人体实际研究的差距, 是体外细胞实验和动物实验之间的桥梁^[21]。随着大家对实验伦理问题的重视和关注, 肺类器官能更好地实现实验动物的“3R”原则, 并规避人体实验的伦理问题, 是替代动物模型和体外模型的最佳选择。目前肺类器官已经成功地应用于疾病研究、药物筛选、毒理研究等领域^[22]。

2.1 疾病研究

当前已经利用肺类器官对多种肺部相关疾病开展了研究。在肺部疾病中, SARS-CoV-2引起的肺部感染是目前被全球广泛关注的一类疾病。SALA-HUDEEN等^[23]利用人AT2或KRT5⁺基底细胞的诱导转分化构建了肺远端类器官, 并利用单细胞分析技术明确了基底细胞功能的异质性, 建立了一种简便的人远端体外肺类器官模型。这为SARS-CoV-2提供了良好的体外模型, 研究人员同时构建了具有顶端向外极性的远端类器官, 并且其暴露的表面能表达ACE2, 他们通过SARS-CoV-2的侵染实验还确定了棒状细胞是该病毒的攻击目标之一。肺类器官, 特别是肺泡II型细胞, 表达ACE2, 对SARS-CoV-2具有易感性^[24]。TIWARI等^[25]利用培养的肺类器官来研究病毒如何与各种器官系统相互作用。通过实验发现肺类器官能够在细胞膜上表达ACE2和TMPRSS2, 而它们能够与SARS-CoV-2的刺突蛋白结合, 继而引起感染。重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)是一种用于基因传递、成熟可靠的病毒载体, 但尚未确定其对入肺实质有效的血清型。MEYER-BERG等^[26]通过肺芽类器官(lung bud organoid, LBO)筛选对人肺有效的rAAV血清型。LBO表面活性蛋白B和C的阳性染色证实了肺的特性, 并显示这些表面活性蛋白适合转导肺泡II型细胞。这一结果表明, LBO能作为肺基因治疗的新模型, 并证明了LBO作为肺实质病毒感染模型与SARS-CoV-2研究的相关性。通过这一研究进一步发现了天然存在的rAAV2和rAAV6血清型以及合成的rAAV6变体对人肺的亲合性。这对于推进SARS-CoV-2的研究具有重要的作用。

hPSCs或成体干细胞诱导的肺类器官可以在体外条件下模拟包括哮喘、囊性纤维化、病毒感染在内的多种肺部疾病^[6]。ZHOU等^[27]培养了成体干细胞来源的AOs。该研究通过分离纯化获得H7N9/Ah和H7N2病毒, 并将它们用于进行AOs的感染研究。结果表明, 两者在患者源性AOs中的感染和复制的高效率均重现了病毒在人类中的传染性。在肿瘤疾病研究中, 骨肉瘤是一种常见的原发性骨恶性肿瘤, 具有高复发、易转移的特点。目前, 患者对抗癌治疗的反应能够通过患者源性类器官(patient-derived organoids, PDOs)得到预测结果, 但PDOs诱导时间长、效率低, 阻碍了基于PDOs的药物敏感性检测在临床中的应

用。2020年, HE等^[28]首次报道了肺转移性骨肉瘤组织的类器官培养系统。该研究团队通过活检组织建立了人肺转移性骨肉瘤类器官(osteosarcoma organoids, OSOs), 该诱导过程分化周期短, 培养的OSOs能够维持并连续增殖至少6个月。患者来源的OSOs保留了骨肉瘤(osteosarcoma, OS)细胞形态, 并且能表达OS标志物Vimentin和Sox9。这给探索OS细胞对免疫治疗的反应、骨肉瘤的生成以及抗骨肉瘤药物的研发提供了条件。肺癌作为一种高死亡率的疾病, 亟需一种体外模型进行相关研究。研究人员通过诱导小鼠和人多能干细胞源性肺上皮细胞建立了体外类器官, 以模拟早期肺腺癌。通过实验发现, 表达致癌KRAS的AT2细胞中成熟谱系识别的基因的表达水平减少。这表明了揭示致癌KRAS表达的早期后果方面, 类器官具有实用性^[29]。随着肺类器官技术的发展, 其在研究肺再生和肺纤维化等肺部疾病方面都得到了良好的应用^[7]。这进一步推动了肺相关疾病研究的深入。

2.2 药物筛选

早期的类器官模型需要大量的起始细胞, 不适于高通量筛选, 且经常会呈现出较低的体外活力^[30]。随着多能干、祖细胞分离技术的发展, 目前研究人员能够研发出重复性高、寿命长的类器官。肺类器官拥有模拟人类肺部的生理条件, 且具有与人体器官相似的细胞组成和功能结构。因此肺类器官为药物筛选提供了更加便捷的筛选平台。HAN等^[18]利用培养好的类器官模拟COVID-19肺部感染中的炎症变化, 通过RNA-seq证实了病毒感染, 随后对几种抑制SARS-CoV-2的药物进行了高通量筛选, 并确定了包括伊马替尼在内的几种抑制剂。这表明, 经过SARS-CoV-2感染的hPSC-LOs可作为高通量筛选模型, 为新冠肺炎候选治疗药物的快速、高效筛选提供了可能的途径。

HU等^[31]采用了一种机械样本处理方法, 即从活检肿瘤组织中生成肺癌类器官(lung cancer organoids, LCOs)。研究中通过自制芯片对LCOs进行了为期6天的药敏实验, 以评估LCOs对多种抗癌药物的反应, 结果表明自制芯片的检测比观测基因突变更能反映肿瘤耐药性并且具有能够预测患者治疗反应的潜力。在SARS-CoV-2的药物筛选中, HAN等^[24]利用hPSC来源的类器官进行抗SARS-CoV-2的药物筛选, 通过荧光素酶活性分析实验发现, 伊马替尼、霉酚酸和奎纳克林二盐酸盐能够降低病毒的荧光素

酶活性和感染率。进一步的体内药物抗病毒感染活性实验证明, 这三种药物均能阻止病毒对AT2细胞的感染。LIU等^[32]建立了一种基于超疏水微孔阵列芯片的LCOs, 并进行了药敏测试。结果表明, 利用LCOs开展药物筛选, 不会损害类器官的活力或改变药物的反应。这些技术将有助于抗癌药物的开发和筛选。

2.3 毒理评价

大多数毒理研究都是使用动物或细胞模型进行的, 其中实验动物可能会因为种属差异引入较大的误差, 常用的体外细胞系可能存在生理等差异, 而人群实验又会面临巨大的伦理问题。肺类器官在体现人组织源性的基础上, 能够真实地模拟人肺组织的结构和功能, 在毒理研究中具有显著的优势。2017年, YAMAMOTO等^[33]开发了一种高效的能诱导肺泡类器官长期扩增的方法, 并利用该模型研究了胺碘酮和GNE7915两种药物在伤口愈合、细胞因子分泌和IL-6产生和发育相关基因表达中的变化。通过实验发现, 胺碘酮较GNE7915诱导了更严重的肺损伤表型。该研究体现了肺泡类器官适用于概括AT2细胞特异性表型的药物的毒理学研究。

类器官与微流控细胞芯片的结合也是一种新趋势, 它不仅拥有器官特定功能, 能够模拟器官的生长发育过程, 还能精准调控发育过程中的信号分子, 做到了实时检测。ZHANG等^[34]设计了一种3D人肺芯片模型, 并应用该芯片模型评估纳米毒性, 研究纳米颗粒暴露引起的细胞反应。通过对不同类型的纳米颗粒进行测试, 证明了3D人肺芯片模型可作为毒理评价可靠的实验平台。未来类器官与微流控芯片的结合为研究有毒污染物、环境污染以及化学污染物的影响提供了一个高效的体外模型。CHOI等^[35]在氧化应激和病毒感染的条件下, 研究聚六亚甲基双胍盐酸盐(polyhexamethylene guanidine phosphate, PHMG-p)对人肺组织模型的影响。其中人肺组织模型包括2D上皮细胞和3D胚胎干细胞衍生出来的肺类器官。研究人员通过评估应激颗粒(stress granule, SG)的形成来研究PHMG-p的影响。在氧化应激和呼吸道合胞病毒感染下, 类器官暴露于PHMG-p导致真核细胞起始因子2 α (eukaryotic translation initiator factor 2 α , eIF2 α)磷酸化增加, 进而诱导SG的形成。通过对DNA双链标志物 γ -H2AX、纤维化标志物 α -SMA的mRNA和蛋白表达水平进行检测发现,

γ -H2AX、 α -SMA的mRNA和蛋白表达量大幅度增加。这说明, PHMG-p会诱导纤维化基因表达使得细胞发生严重的DNA损伤而死亡, 在应激条件下, PHMG-p可诱导严重的肺毒性。未来随着该技术的发展, 肺类器官在环境污染物毒理、化学物质毒理和药物毒理等领域都有良好的应用前景。

3 结语

肺类器官技术作为人体实验的体外代替方法, 在保证组织源性稳定的同时, 还能够模拟多种细胞之间的复杂作用, 是肺部疾病研究、药物高通量筛选、毒性分析的良好工具, 此外还能够满足实验的伦理要求。随着技术的发展, 其在个性化医疗、再生医学领域也显示出了良好的应用前景, 未来可与CRISPR基因编辑技术相结合, 进一步定向地研究疾病相关的生理病理特征。同时, 利用从患者身上提取的细胞可诱导hPSCs和成体干细胞源性肺类器官, 这给个性化医疗提供了可能。随着类器官技术的发展, 其在再生医学方面也有广泛前景。但是要真正做到器官移植就必须保证培育出的类器官的安全性以及稳定性, 要避免类器官发展成肿瘤或坏死组织, 还需开发出可靠有效的移植手段, 安全地将器官样细胞运送到目标部位。

在类器官发展过程中, 尽管对小鼠远端肺干细胞和祖细胞已经有了深入的研究, 但还需要识别更多的特征标志物用于干细胞和祖细胞的分离和纯化, 这对于了解人肺细胞的异质性及肺类器官的成熟定向分化方案的建立和优化十分重要。由于类器官模型尚处于发展阶段, 只能模拟器官的部分功能, 并不能完全替代传统模型。当前肺类器官分化所需的关键的肺上皮成分细胞类型仍不完善, 未来如何真实地在体外重现人类肺部结构和功能, 是其发展的主要挑战。随着技术的发展, 肺类器官将会在更多的领域开展应用, 推动人类生命健康的长足发展。

参考文献 (References)

- [1] SATO T, VRIES R G, SNIPPET 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] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [3] 杨天立, 王向东, 白楠, 等. 肺类器官——研究人类肺部发育和疾病的新途径[J]. 解放军医学院学报(YANG T L, WANG X D, BAI N, et al. Lung organoids: a new way to study human lung development and diseases [J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*), 2021, 42(6): 658-64.
- [4] 王溢贤, 朱妍静, 王红阳, 等. 肝脏类器官研究进展与应用[J]. 中国细胞生物学学报(WANG Y X, ZHU Y J, WANG H Y, et al. Advances and applications of liver organoids [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(6): 1132-41.
- [5] VAN D V J, CLEVERS H. Airway organoids as models of human disease [J]. *J Intern Med*, 2021, 289(5): 604-13.
- [6] LU T, CAO Y, ZHAO P, et al. Organoid: a powerful tool to study lung regeneration and disease [J]. *Cell Regen*, 2021, 10(1): 1-10.
- [7] BAN Y, MARKOWITZ G J, ZOU Y, et al. Radiation-activated secretory proteins of *Scgblal*⁺ club cells increase the efficacy of immune checkpoint blockade in lung cancer [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(9): 919-31.
- [8] 李平. 肺泡II型上皮细胞的新功能——防御肺损伤和调节肺泡免疫[J]. 国外医学情报(LI P. New functions of alveolar type II epithelial cells: defend lung injury and adjust alveolar immunity [J]. *Foreign Medical Information*), 1996(22): 8-9.
- [9] ZEPP J A, MORLEY M P, LOEBEL C, et al. Genomic, epigenomic, and biophysical cues controlling the emergence of the lung alveolus [J]. *Science*, 2021, 371(6534): eabc3172.
- [10] ROCK J R, ONAITIS M W, RAWLINS E L, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12771-5.
- [11] HILD M, JAFFE A B. Production of 3-D airway organoids from primary human airway basal cells and their use in high-throughput screening [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2016, 37(1): IE. 9.1-IE. 15.
- [12] DYE B R, HILL D R, FERGUSON M A H, et al. *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids [J]. *eLife*, 2015, 4: e05098.
- [13] 杨莉, 应可净. NKX2-1与肺组织疾病的关系及研究进展[J]. 国际呼吸杂志(YANG L, YING K J. Research progress on relationship of NKX2-1 with disease [J]. *International Journal of Respiration*), 2010(10): 606-9.
- [14] CHEN Y W, HUANG S X, DE CARVALHO A L R T, 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.
- [15] NIKOLIĆ M Z, CARITG O, JENG Q, et al. Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded *in vitro* as long-term self-renewing organoids [J]. *eLife*, 2017, 6: e26575.
- [16] JACOB A, VEDAIE M, ROBERTS D A, et al. Derivation of self-renewing lung alveolar epithelial type II cells from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(12): 3303-32.
- [17] MILLER A J, DYEB R, FERRER-TORRES D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells *in vitro* [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(2): 518-40.
- [18] HAN Y, DUAN X, YANG L, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids [J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 270-5.
- [19] KIM M, MUN H, SUNG C O, et al. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1-15.
- [20] SACHS N, PAPASPYROPOULOS A, ZOMER-VAN O D D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease

- modeling [J]. *EMBO J*, 2019, 38(4): e100300.
- [21] 李娟娟, 张君涛, 赵英博, 等. 类器官的研究进展及应用前景 [J]. *中国畜牧兽医* (LI J J, ZHANG J T, ZHAO Y B, et al. Research progress and application prospect of organoids [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2021, 48(6): 1985-94.
- [22] HEIDARI-KHOEI H, ESDANDIARI F, HAJARI M A, et al. Organoid technology in female reproductive biomedicine [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 1-19.
- [23] SALAHUDEEN A A, CHOI S S, RUSTAGI A, et al. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids [J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 670-5.
- [24] HAN Y, YANG L, DUAN X, et al. Identification of candidate COVID-19 therapeutics using hPSC-derived lung organoids [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.05.05.079095.
- [25] TIWARI S K, WANG S, SMITH D, et al. Revealing tissue-specific SARS-CoV-2 infection and host responses using human stem cell-derived lung and cerebral organoids [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16(3): 437-45.
- [26] MEYER-BERG H, YANG L Z, DE LUCAS M P, et al. Identification of AAV serotypes for lung gene therapy in human embryonic stem cell-derived lung organoids [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 1-6.
- [27] ZHOU J, LI C, SACHS N, et al. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(26): 6822-7.
- [28] HE A, HUANG Y, CHENG W, et al. Organoid culture system for patient-derived lung metastatic osteosarcoma [J]. *Med Oncol*, 2020, 37(11): 1-9.
- [29] DOST A F M, MOYE A L, VEDAIE M, et al. Organoids model transcriptional hallmarks of oncogenic KRAS activation in lung epithelial progenitor cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 663-78, e8.
- [30] FRIEDENSTEIN A J, CHAILAKHYAN R K, GERASIMOV U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers [J]. *Cell Prolif*, 1987, 20(3): 263-72.
- [31] HU Y, SUI X, SONG F, et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1-14.
- [32] LIU Q, ZHAO T, WANG X, et al. *In situ* vitrification of lung cancer organoids on a microwell array [J]. *Micromachines*, 2021, 12(6): 624.
- [33] YAMAMOTO Y, GOTOH S, KOROGI Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(11): 1097-106.
- [34] ZHANG M, XU C, JIANG L, et al. A 3D human lung-on-a-chip model for nanotoxicity testing [J]. *Toxicol Res*, 2018, 7(6): 1048-60.
- [35] CHOI S, CHOI S, CHOI Y, et al. Polyhexamethylene guanidine phosphate increases stress granule formation in human 3D lung organoids under respiratory syncytial virus infection [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 229: 113094.