

肝脏类器官的构建及应用研究

毕国贇 张海燕*

(首都医科大学基础医学院, 细胞生物学系, 北京 100069)

摘要 类器官作为一种新的“模式生物”, 由于其组成、结构和功能与体内器官非常接近, 可为探究人体发育、疾病发生机制及筛选高通量药物等提供一个全新的工具。最近的研究表明, 干细胞或肝实质细胞在特定细胞外基质及多种信号分子的协同作用下, 可形成“肝脏类器官”。考虑到肝脏疾病诊治的迫切需要, 人们亟待深入了解肝脏类器官的形成机制及其应用潜力。该文综述了近几年肝脏类器官的研究现状, 对于体外快速、高效地建立结构和功能完善的肝脏类器官以及将其应用于肝脏疾病的研究与治疗具有重要意义。

关键词 肝脏; 类器官; 再生医学; 细胞分化

Study on the Formation Mechanism and Application of Liver Organoids

BI Guoyun, ZHANG Haiyan*

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Organoids, as a new “model organism”, can provide a new tool for the study of human development, disease occurrence and the screening of high-throughput drug due to their composition, structure and function are very similar to those of internal organs. Recent studies have shown that stem cells and liver parenchymal cells can form “liver organoids” under the synergistic action of specific extracellular matrix and various signaling molecules. Considering the urgent need of diagnosis and treatment of liver diseases, it is necessary to deeply understand the formation mechanism and application potential of liver organoids. This paper summarizes the current status of liver organoids research, which is of great significance for the rapid and efficient establishment of liver organoids with perfect structure and function *in vitro* and the study and treatment of liver diseases.

Keywords liver; organoids; regenerative medicine; cell differentiation

肝脏是人体重要的代谢调控中心, 参与糖类、脂肪以及氨基酸的合成和分解; 作为解毒中心, 其能够降解多种药物和乙醇等分子; 肝脏通过合成并分泌胆盐和胆汁酸等执行外分泌功能。但肝脏可同时受到多种原因包括病毒感染、过量饮酒、炎症、代谢性因素、遗传变异和自身免疫改变, 以及恶性肿瘤等的损害。肝脏疾病的发病率及致死率正逐年上升, 全世界每年约有200万人死于肝衰竭^[1-2]。

迄今为止, 研究肝脏疾病主要依赖于细胞系和动物模型。由于传统二维(two dimensional, 2D)细胞培养体系的局限性, 体外培养的肝实质细胞通常缺乏某些肝脏特异性的基因及特定的生物功能, 如细胞色素P450的维持^[3]、细胞间特定的连接^[4]等, 尤其是缺乏不同类型细胞间、细胞与细胞外基质间的相互作用^[5], 因此, 不能很好地重现肝脏细胞的异质性及复杂的结构特征^[6-7]。用于肝脏疾病研究的动物模

收稿日期: 2022-03-28 接受日期: 2022-05-05

国家自然科学基金(批准号: 81770616)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-83950409, E-mail: culture@ccmu.edu.cn

Received: March 28, 2022

Accepted: May 5, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770616)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83950409, E-mail: culture@ccmu.edu.cn

型优于2D培养的细胞,其优点包括具有功能性的脉管系统、基质和免疫成分,但动物模型的局限性在于其不同的生理、药物代谢特征以及对遗传基因变异所致疾病的不同表型^[8]。

最近的研究表明,干细胞或肝实质细胞在特定三维(three dimensional, 3D)细胞外基质及多种信号分子的协同作用下,可形成“肝脏类器官”。这些细胞通过细胞分化,在限定的空间中进行自我组织(self-organization),该过程类似于体内的肝脏器官发育^[9]。类器官在体外培养中可以长期稳定维持其结构与功能,即使经过多次传代之后,也能维持相应器官在体内的某些特征,并且没有明显的遗传或生理变化^[10]。本文综述了近几年有关肝脏类器官形成及其应用的研究,旨在为体外构建肝脏类器官以及肝脏疾病的治疗提供重要的依据。

1 肝脏的组成

在胚胎发育过程中,囊胚细胞经过迁移、转变从而形成原肠胚,原肠胚包含三个细胞层:内胚层、中胚层和外胚层,其中肝脏来自于内胚层细胞。肝脏中肝实质细胞占肝脏细胞总数的60%、体积的80%以上,是肝脏结构和功能的主体,但是肝脏功能的执行还需要各类细胞和结构相互作用而协同实现。肝脏中除了肝实质细胞、内皮细胞和胆管细胞外,还有包被肝脏的间皮细胞、毛细血管周围能够调节血流的肝星状细胞、特化的巨噬细胞(Küpferr cell)、门静脉周围的间充质细胞和大量的血细胞^[11]。

2 类器官的概述

在机体内,细胞处于复杂的微环境中,并受到

多种细胞内外信号(包括化学信号、物理机械信号等)的调控。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是这些信号相互作用,建立、维持和调节细胞表型和功能的关键。细胞在3D环境中的培养相比于其在2D环境中的培养,优点有细胞间的相互作用更类似于体内的组织器官等(表1)。在3D空间中细胞-细胞或细胞-细胞外基质间可以产生多维度的相互作用,而在2D单层培养中,相互作用仅限于细胞间单维度的联系。3D培养技术建立的微环境,具有复杂的生理、生化和生物力学的特征,可以影响细胞存活、细胞增殖、细胞形态、细胞迁移和机械反应等多个方面。因此,相比于2D培养,3D培养的细胞在结构和功能上与体内组织器官更相似,在疾病治疗应用方面是很有希望的新模型工具。

类器官(organoids)通常是指一系列3D培养系统,这些系统在不同程度上类似于器官。LAN-CASTER等^[14]提出一个更明确的类器官定义,其内容主要是类器官需要满足三个基本要求:第一,一个类器官必须包含一个以上的器官细胞类型;第二,它必须拥有该器官的一些特定功能;第三,类器官中的细胞应该具有与相应器官类似的空间组织。考虑到目前大多数肝脏类器官是由单个细胞谱系组成的,HUCH等^[15]提出的概念对类器官的定义似乎更准确,HUCH将类器官定义为体外的3D细胞群,并认为来源于组织的干细胞/祖细胞或多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)能够自我更新和自我组织,形成可以重现原始器官结构与功能的3D细胞体系(图1)。

目前,肠道、肾脏、大脑和视网膜等的类器官的形成可来源于多能干细胞。对类器官的研究表

表1 二维培养与三维培养的比较
Table 1 Comparison of 2D culture and 3D culture

特征 Characteristic	细胞培养 Cell culture	
	二维培养 2D culture	三维培养 3D culture
Culture method	Culture plates or dishes	Extracellular matrix
Cell source	Cell lines or primary cells	Stem cells, progenitor cells or induced pluripotent stem cells
Morphology	Two-dimensional monolayer	Three dimensional structure
Experimental cycle	Short	Long
Heterogeneity	Low or no	High
In vitro function	Only cellular features	Similar to an organ
Drug screening	Suitable for large-scale drug screening	Suitable for personalized drug screening

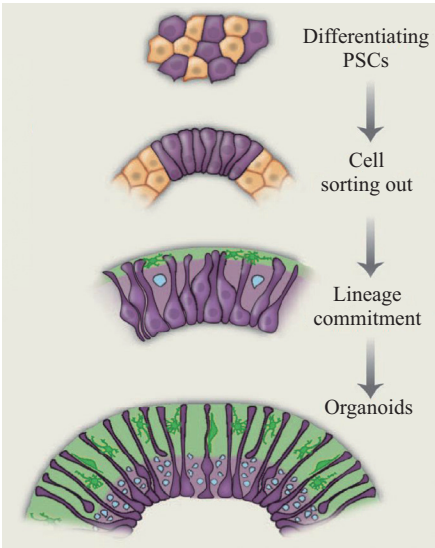


图1 类器官定义(根据参考文献[14]修改)
Fig.1 Defining organoids (modified from the reference [14])

表2 体外多种类器官的现状
Table 2 Current state of various organoids *in vitro*

		类器官现状 Current state of organoids	
胚层 Germ layer	类器官种类 Organoids type	细胞来源 Cell source	参考文献 References
Endoderm	Thyroid gland	mESCs	[16]
	Lung	mESCs and hPSCs	[17]
	Pancreas	mESCs and hESCs	[18]
	Liver	mESCs and hPSCs	[19-20]
Mesoderm	Heart	mESCs and hESCs	[21]
	Bone	mESCs and hESCs	[22]
	Kidney	Mouse and human PSCs	[23-25]
Ectoderm	Retina	Mouse and human PSCs	[26]
	Brain	Mouse and human PSCs	[27-28]
	Skin	mESCs	[29-30]

mESCs: 小鼠胚胎干细胞; hESCs: 人胚胎干细胞。
mESCs: mouse embryonic stem cells; hESCs: human embryonic stem cells.

明, 如果将多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)诱导分化成器官祖细胞, 那么原则上就可以产生相应的类器官^[14](表2)。

3 肝脏类器官的形成和构建

由于肝脏结构的复杂性, 在体外很难形成有功能的小叶结构。最重要的是, 体外原代肝细胞 (primary hepatocyte, PHS)的培养和扩增一直是该领域的难题^[31]。最近几年, 随着干细胞技术的发展, 在体外培养和扩增功能性肝细胞和胆管细胞才成为可能。

随着细胞生物技术的发展, 出现了由单一细胞产生的类器官以及由不同类型细胞组装成的类器官的研究成果(表3)。

3.1 单一细胞类型肝脏类器官

肝细胞和胆管细胞是肝脏中两种主要的功能细胞。近年来, 单一细胞类型肝脏类器官的研究主要集中在用肝实质细胞或胆管细胞生成类器官的方法上。肝细胞类器官表现为有组织结构的肝实质细胞的聚集, 并伴随着肝实质极性的增强和肝脏功能的改善。胆管细胞类器官常呈囊状中空结构, 表现

表3 肝脏类器官的研究进展
Table 3 Recent advances of liver organoids

种类 Species	肝脏类器官现状 Current state of liver organoids			
	分类 Category	来源 Identity	细胞外基质 Extracellular matrix	参考文献 References
Simple organoids	Hepatocellular organoids	Mouse and human hepatocytes	Matrigel	[32]
		hiPSCs	Ultra-low adherent plates	[33]
Complex organoids	Cholangiocyte organoids	hiPSCs	Matrigel	[34]
	Hepatobiliary organs	Human EpCAM ⁺ cholangiocytes	Matrigel	[35]
		Mouse Lgr5 ⁺ hepatoblasts	Matrigel	[36]
		Human PSCs-hepatocytes/cholangiocytes	Matrigel	[30,37]
	Vascularized liver organoids	Human PSCs-endoderm cells, PSC-endothelial cells/HUVECs, MSCs	Ultra-low adherent plates/Matrigel	[38]

hiPSCs: 人诱导多能干细胞; HUVECs: 人脐静脉内皮细胞; MSCs: 间充质干细胞。
hiPSCs: human induced pluripotent stem cells; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; MSCs: mesenchymal stem cells.

为空泡状。在这里, 我们将描述这些类器官的生成方法以及结构和功能特征。

3.1.1 肝实质细胞类器官 在生理或病理条件下, 从肝脏分离的原代细胞均具有形成类器官的能力。从小鼠分离的原代肝实质细胞在 WNT 激动剂(如 R-spondin1)、转化生长因子β抑制剂(如 A-83-01)和损伤诱导的炎症细胞因子 TNFα 的作用下, 能够在体外形成类器官^[39]。重要的是, 在 WNT 激动剂的作用下, 小鼠肝细胞类器官可以在体外扩增 2~3 个月, 并且诱导胆管细胞标志物(如 CK19、CK7)和肝脏祖细胞标志物(如 Tbx3、Sox9)的表达。除了小鼠肝实质细胞外, 从人胎儿或成人肝中分离的肝实质细胞同样也具有形成类器官的能力, 并且类器官在体外可以长期保持肝脏的结构和功能^[32]。总体而言, 小鼠或者人肝实质细胞类器官重现了活体肝部分切除后肝实质细胞增殖的部分特征。

通过激活肝脏转录因子可以使多能干细胞或成纤维细胞分化为肝实质样细胞(hepatocyte like cells)^[40], 而肝实质样细胞可以在超低黏附平板中自组织形成具有肝实质细胞功能的类器官^[41]。在这类细胞形成的类器官中, 肝实质细胞呈多角形及胆小管结构, 表明肝实质细胞具有良好的极性结构特征。更重要的是, 肝实质细胞类器官还表现出白蛋白分泌、糖原储存、药物代谢和脂质运输等成熟肝

实质细胞的功能^[33]。

3.1.2 胆管细胞类器官 在体外, 通过重编程诱导多能干细胞产生功能性胆管细胞已成为可能, 科研人员根据胚胎发育学研究成果, 添加特定的细胞因子(如 B27、FGF10、activin-A)进行逐步分化, 建立了几种方法将多能干细胞诱导分化为胆管样细胞^[34,42-43]。当多能干细胞分化为聚集的胆管样细胞时, 它们呈管状或中空囊状。重要的是, 胆管样细胞具有极性, 可表达相应标志物(如 CK19、CFTR、AQP1), 并且存在初级纤毛。初级纤毛是控制胆管细胞功能的基本结构^[34,44-45]。

3.2 复杂肝脏类器官

3.2.1 肝胆类器官 肝脏功能的执行需要各类细胞, 肝脏中除了肝实质细胞、内皮细胞和胆管细胞外, 还有间皮细胞、肝星状细胞和库弗细胞等。HUCH 等^[35]报道了小鼠 Lgr5⁺ 肝实质细胞或损伤诱导的 Lgr5⁺ 肝细胞在体外可以扩增为双潜能肝脏类器官, 并具有向功能性肝实质细胞和胆管细胞分化的能力。此外, 从未受损的小鼠肝脏中分离出来的胆管组织碎片也可以用同样的培养方法进行 3D 培养。随后, HUCH 等^[36]对培养方案进行了微小改动, 发现从人肝脏中分离的原代人 EpCAM⁺ 细胞同样可以形成具有双潜能的肝脏类器官, 且该类器官表现出典型的管状结构。随着干细胞技术的发展, 将由多能

干细胞分化产生的肝实质细胞和胆管细胞共培养也可以形成肝脏类器官,它重现了体内肝脏器官发生的几个关键过程。肝实质细胞紧密聚集在类器官内,胆管细胞呈囊状结构。虽然这两种细胞在体外都呈现出与体内肝实质细胞和胆管细胞相似的结构,但它们没有按照体内的肝脏结构进行有组织的分区,也没有完整的功能^[30,37]。

3.2.2 血管化肝类器官 由内皮细胞组成的血管是将营养和氧气输送到细胞的基础,所以由多种类型细胞组成的肝脏类器官形成血管或胆道系统是有必要的。将人脐静脉内皮细胞来源的内皮细胞、间充质干细胞和多能干细胞来源的肝内胚层细胞在超低黏附平板中共同培养,可形成血管化的肝脏类器官。将肝脏类器官进行体内移植后,肝芽与宿主血管相连,血管变得通畅,呈现出与成人肝脏血管相似的结构^[38]。然而,组织学分析显示,肝芽中不同类型的细胞并未显示出明显的组织化结构。总而言之,为了构建复杂的肝脏器官,需要加强细胞间的相互作用和完善肝脏的结构。

4 肝脏类器官的应用

与传统的细胞培养技术相比,类器官培养拥有巨大的优势。这些小型化的器官类似物可以实现长期稳定的扩增,并模拟3D组织结构和功能。因此,它们有巨大的潜力成为基础医学和临床研究(包括疾病模型的建立、肝脏发育学的研究、药物的筛选、

基因的治疗和器官芯片的研发等)的平台(图2)。

4.1 疾病模型

4.1.1 酒精性肝病 酒精性肝病(alcohol-related liver disease, ALD)是由于过量饮酒引起的一种高度流行的慢性肝病。这种疾病首先发展为酒精性脂肪性肝炎,然后是肝纤维化,最后是肝硬化,更加严重的是在少数患者中进展为肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[46]。患者在最严重的情况下可能需要肝移植。最近, WANG等^[45]研究出一种能重现ALD病理生理学典型特征的体外类器官模型。将由胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)衍生的肝脏类器官与胎肝间充质细胞共培养,并用100 mmol/L乙醇处理7天,结果显示,与未处理的对照组相比,乙醇处理的类器官表现出酒精性肝损伤的特征,如CYP2E1和CYP3A4活性增强、氧化应激、细胞外基质沉积和细胞凋亡等^[45]。

4.1.2 非酒精性脂肪性肝病 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)会导致一系列不同程度的实质性肝损害,通常发生在代谢综合征患者身上。NAFLD的发生从肝脏脂肪变性开始,其进一步发展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),最后可能发展为肝硬化^[47],甚至肝癌。非酒精性脂肪肝的全球患病率逐年上升,目前研究非酒精性脂肪肝的体外模型基于原代人肝细胞(primary human hepatocytes, PHHs)和肝癌细胞系,但相关的缺点限制了它们用于个性化研究。

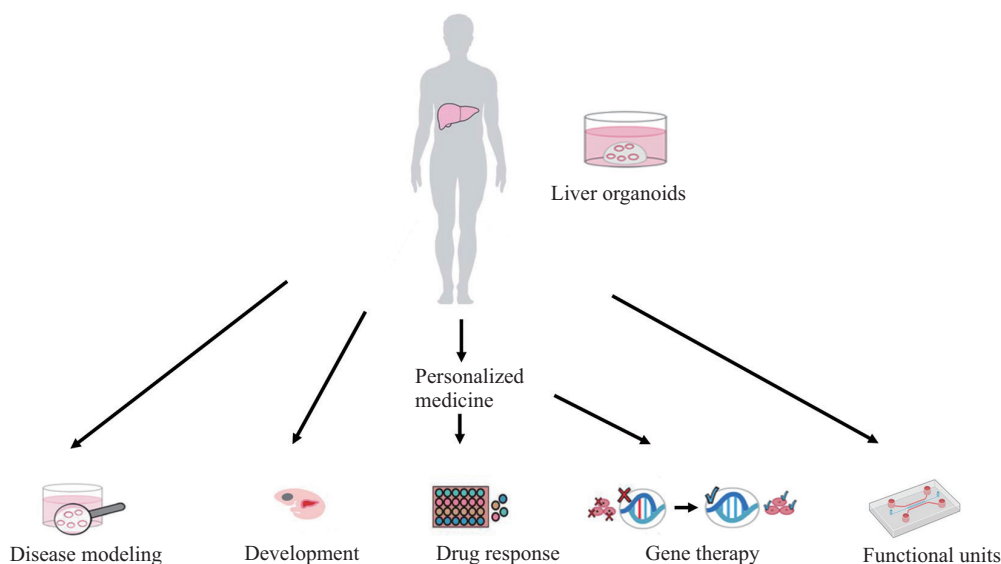


图2 肝脏类器官的应用

Fig.2 Applications of liver organoids

OUCHI等^[48]使用诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)衍生的肝脏类器官模型在体外重现了脂肪变性和脂肪性肝炎的关键特征。一项后续研究使用猫肝类器官筛选减少脂质积累的药物, 并确定了两个有希望的候选药物, 还需要再进行下一步的临床评估^[49]。总之, 考虑到NAFLD和NASH的发展涉及多种细胞类型和多个阶段, 研究这种疾病的理想模型应该基于复杂的多细胞的肝脏类器官。

4.1.3 原发性肝癌 肝癌是全球第六大常见癌症和第四大恶性肿瘤^[50]。较晚的诊断和肿瘤的异质性导致肝癌患者的高死亡率^[51]。利用具有潜在致癌基因的肝实质细胞或胆管细胞类器官进行基因工程实验, 为肝癌发生机制的研究提供了一个易于操作和可行的模型。

SUN等^[33]将人肝细胞癌中的重要癌基因*c-Myc*导入到由肝实质细胞衍生的类器官中后, 观察到线粒体和内质网膜的功能紊乱, 这似乎是肝癌发生过程中未被观察到的致癌现象。此外, 通过追踪RAS诱导的肝实质细胞类器官癌变的过程发现, 肝实质细胞逐渐表达胆管细胞标志物, 如CK7、CK19、SOX9和SPPI, 并开始拥有微绒毛的胞腔, 肝实质细胞拥有微绒毛是肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)的一种标志性超微结构。SUN等^[33]的报道是关于人类肝细胞转化为ICC细胞的第一个文献, 该研究表明, 肝实质细胞可能是ICC的起源细胞。研究人员也已经在肝实质细胞或胆管细胞类器官中对其他常见的癌症基因进行了分析(表4)。

4.2 肝脏发育学研究

胚胎肝脏发育和成年肝脏再生依赖于多种信

号通路的协调相互作用。然而, 这些信号通路如何执行功能尚不清楚。PSCs来源的肝脏类器官是研究肝脏发育过程的有效模型。由PSCs分化而来的肝细胞类器官, 包括肝细胞类器官、胆管细胞类器官和肝胆类器官, 经历了逐步的分化, 在一定程度上重现了体内肝脏的发育情况。利用肝脏类器官的优势进行研究发现, 来自间充质细胞或内皮细胞的旁分泌信号促进了PSCs的肝脏类器官的成熟, 且这个有效的模型重现了肝脏发育过程中基质细胞和上皮细胞之间的相互作用^[55-56]。

4.3 药物筛选

由于肝脏类器官具有疾病建模的能力, 因此肝脏类器官可作为药物筛选和毒理学测试的平台。研究人员使用肿瘤类器官, 能够识别肿瘤对不同疗法的敏感性^[54], 该结果证明肝脏类器官可为患者提供个性化治疗。沿着这些思路, 肝脏类器官的一个新兴应用是创建生物库, 作为筛查平台, 来确定肝脏疾病药物的疗效。此外, 还可以用健康的肝实质细胞建立生物库, 作为预测药物性肝损伤的平台。虽然人原代肝细胞目前是药物代谢和毒性测试的“金标准”, 但原代肝细胞在体外长期培养是困难的。利用肝脏类器官对药物进行筛选, 代表着制药业在寻求新疗法方面迈出了前进的一步。

4.4 基因治疗

靶向基因治疗在动物或体外细胞培养模型中已取得了巨大成功。在不久的将来, 可能会有更多研究人员致力于将现代基因组编辑工具与体外类器官技术相结合, 通过修复患者来源的类器官中的遗传缺陷来获得健康的类器官。如果移植物被受体组

表4 肝癌类器官模型				
Table 4 Modeling liver cancer with organoids				
疾病类型	疾病模型			
	Disease models			
Type of diseases	疾病名称	疾病特征	肝脏类器官细胞来源	参考文献
	Name of disease	Features of diseases	Contents of liver organoids	Reference
Liver cancer	HCC	PDOs	Tumor cells	[52]
		HCC with <i>c-Myc</i> mutation	Reprogrammed hepatocytes	[33]
	CC	PDOs	Tumor cells	[52]
		ICC with RAS mutation	Reprogrammed hepatocytes	[33]
		CC with BAP1 mutation	Primary cholangiocytes	[53]
	CHC	PDOs	Tumor cells	[54]

PDOs: 病人细胞来源的类器官生物库; CC: 胆管癌; CHC: 混合型肝细胞胆管细胞癌。
PDOs : biobanks of patient-derived organoids; CC: cholangiocarcinoma; CHC: combined hepatocellular cholangiocarcinoma.

织接受而没有任何免疫排斥反应,那么这些技术有望被用来治疗患有危及生命或其他不治之症的患者。例如, GUAN等^[30]通过CRISPR-Cas9技术对Alagille综合征患者细胞来源的类器官中的基因进行编辑,将一个致病突变基因修正成了野生型,并在体外成功模拟了该疾病的表型的恢复。我们有理由相信,当基因组编辑技术在安全性和有效性方面完全适用于临床实践时,类器官技术也将成为此类疗法的可行方案。

4.5 生物工程类器官模型

为了提高体外细胞的寿命和功能,研究界现在正在使用多种生物工程工具(例如高通量微阵列、芯片技术^[58]、微流体、仿生支架和生物打印等^[59])来控制细胞微环境。JIN等^[60]开发了一种来源于诱导肝实质细胞(induced hepatocytes, iHeps)的血管化3D肝类器官模型。他们通过基于微流体的细胞培养设备,将iHeps与内皮细胞在去细胞的3D肝细胞外基质水凝胶中进行共培养,来形成3D肝类器官。该设备中的培养基具有连续的动态性,通过利用该设备,基于iHeps的3D肝脏类器官能与不同的类器官组成多样系统,并具有标准化高通量药物筛选的可行性。Micro-scale技术可以通过精确控制关键的物理化学因素,如流体流动、生化信号等,模拟体内的微环境^[61-63]。最近, WANG等^[64]提出了一种简单而又稳定的方法,该方法促进了原位分化、长期3D培养以及在可灌流的微柱芯片系统中形成功能性肝类器官。肝类器官中的细胞具有生长良好、异质性高和向肝实质细胞和胆管细胞分化的特征。在灌流培养系统下肝类器官表现出较高的细胞活力,并且表达肝细胞成熟的特异性基因。此外,与静态培养相比,它们表现出更强的肝脏特有功能,包括白蛋白和尿素的产生。

5 类器官研究尚未解决的问题

尽管在过去几年中,关于类器官的文献数量激增,但类器官技术仍然是一种不完善的细胞培养系统,需要应对各种挑战和限制。目前,某些类器官,特别是视网膜、脑和肝的类器官,面临许多局限性,包括其形成和生长成熟所需时间长、类器官细胞的组成单一、类器官形状以及大小重复性差和类器官实验成本高等。类器官培养的另外一个限制是缺乏有利于营养交换的血管,以及缺乏与其他细胞类型

如免疫细胞和神经细胞的相互作用。此外,当前的类器官培养未能重现身体不同系统之间的复杂网络,这是研究不同器官之间协调作用的限制因素。类器官培养物缺少可靠的方法来控制大小、形状和存活率。目前所用于形成类器官的基质凝胶,主要是来自于EHS小鼠肉瘤的基底膜基质,这是形成人类可移植器官的主要实际障碍。类器官培养系统很难模拟体内生长因子浓度梯度,这是某些类器官生长的潜在限制。为了应对这些挑战并克服这些限制,需要构建合适的支架,并且需要完善培养基的成分等。

6 展望

类器官是目前较易获得的3D培养物之一,利用干细胞及其分化的细胞通过细胞自我组织特性,可在体外建立类似于人体器官的模型。这些快速发展的模型在基础医学和临床研究中具有广泛的应用,例如分析干细胞的特征,以及在接近生理状态的条件下进行药物筛选和疾病建模等。在过去的十年里,肝脏类器官已经被证明是肝脏疾病建模中有效的工具,并且正在成为一个越来越可行的选择。

参考文献 (References)

- [1] ASRANI S K, DEVARBHAVI H, EATON J, et al. Burden of liver diseases in the world [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 151-71.
- [2] ZHOU W C, ZHANG Q B, QIAO L. Pathogenesis of liver cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23): 7312-24.
- [3] KOSTADINOVA R, BOESS F, APPELEGATE 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.
- [4] MELI L, JORDAN E T, CLARK D S, et al. Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 9087-96.
- [5] BAXTER M, WITHEY S, HARRISON S, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(3): 581-9.
- [6] DUVAL K, GROVER H, HAN L H, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture [J]. *Physiology*, 2017, 32(4): 266-77.
- [7] ROWE R G, DALEY G Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(7): 377-88.
- [8] MARIOTTI V, STRAZZABOSCO M, FABRIS L, et al. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(4 Pt B): 1254-61.
- [9] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease [J]. *Nat Cell Biol*,

- 2016, 18(3): 246-54.
- [10] AKBARI S, SEVINC G G, ERSOY N, et al. Robust, Long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 13(4): 627-41.
- [11] PRIOR N, INACIO P, HUCH M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications [J]. *Gut*, 2019, 68(12): 2228-37.
- [12] 景思佳, 郑慧琳, 张蕾. 肝脏类器官的研究进展[J]. *中国生物医学工程学报*(JING S J, ZHENG H L, ZHANG L. Advance in the development of liver organoids [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*), 2021, 40(2): 237-46.
- [13] BAKER B M, CHEN C S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 13): 3015-24.
- [14] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [15] HUCH M, KOO B K. Modeling mouse and human development using organoid cultures [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3113-25.
- [16] ANTONICA F, KASPRZYK D F, OPITZ R, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 66-71.
- [17] LEE J H, BHANG D H, BEEDE A, et al. Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis [J]. *Cell*, 2014, 156(3): 440-55.
- [18] GREGGIO C, DE FRANCESCHI F, FIGUEIREDO-LARSEN M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro* [J]. *Development*, 2013, 140(21): 4452-62.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] STEVENS K R, KREUTZIGER K L, DUPRAS S K, et al. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(39): 16568-73.
- [22] KALE S, BIERMANN S, EDWARDS C, et al. Three-dimensional cellular development is essential for *ex vivo* formation of human bone [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(9): 954-8.
- [23] XIA Y, NIVET E, SANCHO-MARTINEZ I, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1507-15.
- [24] TAGUCHI A, KAKU Y, OHMORI T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1): 53-67.
- [25] TAKASATO M, ER P, BECROFT M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 118-26.
- [26] NAKANO T, ANDO S, TAKATA N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-85.
- [27] LANCASTER M, RENNER M, MARTIN C, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9.
- [28] KADOSHIMA T, SAKAGUCHI H, NAKANO T, et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(50): 20284-9.
- [29] CORAUX C, HILMI C, ROULEAU M, et al. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 849-53.
- [30] GUAN Y, XU D, GARFIN P, et al. Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(17): e94954.
- [31] BHATIA S, UNDERHILL G, ZARET K, et al. Cell and tissue engineering for liver disease [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(245): 245sr2.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] SAMPAZIOTIS F, DE BRITO M, MADRIGAL P, et al. Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(8): 845-52.
- [35] PRIOR N, HINDLEY C, ROST F, et al. Lgr5 stem and progenitor cells reside at the apex of a heterogeneous embryonic hepatoblast pool [J]. *Development*, 2019, 146(12): dev174557.
- [36] 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.
- [37] WU F, WU D, REN Y, et al. Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1145-58.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] HUANG P, HE Z, JI S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors [J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 386-9.
- [41] YAMAMOTO J, UDONO M, MIURA S, et al. Cell aggregation culture induces functional differentiation of induced hepatocyte-like cells through activation of Hippo signaling [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(1): 183-98.
- [42] SONG Z, CAI J, LIU Y, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Res*, 2009, 19(11): 1233-42.
- [43] SZKOLNICKA D, FARNWORTH S, LUCENDO-VILLARIN B, et al. Deriving functional hepatocytes from pluripotent stem cells [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2014, 30: 1G.5.1-12.
- [44] OGAWA M, OGAWA S, BEAR C, et al. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(8): 853-61.
- [45] WANG S, WANG X, TAN Z, et al. Human ESC-derived expand-

- able hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury [J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1009-26.
- [46] SEITZ H, BATALLER R, CORTEZ-PINTO H, et al. Alcoholic liver disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [47] FRIEDMAN S, NEUSCHWANDER-TETRI B, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-22.
- [48] 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.
- [49] HAAKER M, KRUITWAGEN H, VAANDRAGER A, et al. Identification of potential drugs for treatment of hepatic lipidosis in cats using an *in vitro* feline liver organoid system [J]. *J Vet Intern Med*, 2020, 34(1): 132-8.
- [50] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [51] MARQUARDT J, ANDERSEN J, THORGEIRSSON S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(11): 653-67.
- [52] NUCIFORO S, FOFANA I, MATTER M, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1363-76.
- [53] ARTEGANI B, VAN VOORTHUIJSEN L, LINDEBOOM R, et al. Probing the tumor suppressor function of BAP1 in CRISPR-engineered human liver organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 927-43.e6.
- [54] BROUTIER L, MASTROGIOVANNI G, VERSTEGEN M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1424-35.
- [55] ASAI A, AIHARA E, WATSON C, et al. Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2017, 144(6): 1056-64.
- [56] CAMP J, SEKINE K, GERBER T, et al. Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency [J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 533-8.
- [57] KAPLOWITZ N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(6): 489-99.
- [58] BHISE N S, MANOHARAN V, MASSA S, et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(1): 014101.
- [59] ZHANG Y S, YUE K, ALEMAN J, et al. 3D bioprinting for tissue and organ fabrication [J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45(1): 148-63.
- [60] 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.
- [61] HUH D, MATTHEWS B D, MAMMOTO A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-8.
- [62] SCHEPERS A, LI C, CHHABRA A, et al. Engineering a perfusable 3D human liver platform from iPS cells [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(14): 2644-53.
- [63] CHUNG M, AHN J, SON K, et al. Biomimetic model of tumor microenvironment on microfluidic platform [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, doi: 10.1002/adhm.201700196.
- [64] WANG Y, WANG H, DENG P, et al. *In situ* differentiation and generation of functional liver organoids from human iPSCs in a 3D perfusable chip system [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(23): 3606-16.