

类器官在感染性疾病建模中的应用

邓文昌 谢晓瑞 程全 申少磊 刘莉*

(中国医药工业研究总院药理评价研究中心上海市生物物质成药性公共服务平台, 上海 200437)

摘要 感染性疾病一直以来对个人健康和社会安定都有极大影响, 然而, 传统的动物及二维(2D)细胞模型难以在病原体建模及药物评价中获得较为可靠的结果。类器官是由干细胞发育而来的高度模仿生物体结构和功能的多细胞体系, 在感染性疾病建模方面表现出巨大潜力。该文重点介绍了类器官在病毒、细菌以及原生生物三大领域作为感染模型的广泛应用, 此外, 还讨论了当前类器官构建感染模型的不足之处并对其未来发展作了展望。

关键词 类器官; 感染; 干细胞; 病毒; 细菌; 原生生物; 免疫

Use of Organoids in Infectious Disease Modeling

DENG Wenchang, XIE Xiaorui, CHENG Quan, SHEN Shaolei, LIU Li*

(Shanghai Biomass Pharmaceutical Product Evaluation Professional Public Service Platform, Center for Pharmacological Evaluation and Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

Abstract Infectious diseases always had a great impact on personal health and social stability. However, traditional animal and 2D (two-dimensional) cell models are difficult to obtain reliable results in pathogens modeling and drug evaluation. Organoids are multicellular systems that develop from stem cells and highly mimic the structure and function of living organisms. It has shown great potential in modeling of infectious diseases. This paper highlights the wide application of organoids as infection models in three major fields: viruses, bacteria and protists. In addition, it also discusses the shortcomings of current organoids infection models and looks forward to their future development.

Keywords organoid; infection; stem cell; virus; bacteria; protists; immune

传染病以及可能伴随它的恐慌与各种经济及社会风险交相呼应, 给医疗系统带来极大压力, 对社会发展带来许多不稳定因素, 特别是近年来的新型冠状病毒 SARS-CoV-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)大流行更是对全球造成了极大的影响, 同时也对感染类疾病的机制研究及药物筛选提出了更高的要求。

20世纪50年代海拉(HeLa)细胞模型建立以来, 大量细胞系不断涌现并被用作感染研究的体外模型。但是一方面由于细胞永生化的特点, 在大量传代以后细胞的基因型可能已经发生改变进而影响了

实验的准确性; 另一方面细胞污染较为严重, 据统计, 全世界使用的细胞系中有15%~20%被错误识别或被其他类型的细胞污染。原代细胞可以克服细胞系的部分缺陷, 它由酶解等方式直接从活体组织中获取并在体外培养, 可以较好地代表组织的表型并且基因较为稳定, 但是原代细胞的分离费时费力且体外培养条件要求高且难以进行大量扩增, 应用同样受限。对于动物模型而言, 物种之间存在的差异性导致很多动物实验的结果无法直接应用到人, 因此, 人们也在不断探寻新的能充分反映人体组织微环境的感染模型。

近年来随着类器官技术的不断成熟, 类器官作为感染模型的应用直线上升。类器官是指利用成体干细胞或多能干细胞进行体外三维(three-dimen-

收稿日期: 2023-09-04

接受日期: 2023-12-08

*通信作者。Tel: 15921628956, E-mail: liulisipi@foxmail.com

Received: September 4, 2023

Accepted: December 8, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-15921628956, E-mail: liulisipi@foxmail.com

表1 类器官在传染病建模中的应用

Table 1 Use of organoid for infection modelling

微生物类型 Microorganism type	类器官类型 Organoid type	研究内容 Research contents	参考文献 Reference
SARS-CoV-2	Lung	SARS-CoV-2 tropism and host-pathogen biology	[2]
SARS-CoV-2	Intestinal	Screening of SARS-CoV-2 therapeutic drugs using intestinal organoids	[7]
SARS-CoV-2	Intestinal	Study on the replication kinetics of intestinal organoids infected by different viruses	[8]
SARS-CoV-2	Brain	Effects of SARS-CoV-2 infection on the nervous system	[10]
ZIKV	Brain	The mechanism of microcephaly caused by ZIKV infection	[13]
RV	Intestinal	Screening of anti-RV infection drugs	[19]
NV	Intestinal	The impact of <i>FUT2</i> gene on NV replication in the body	[21]
HBV	liver	Organoid response to HBV infection	[24]
<i>H. pylori</i>	Stomach	CagA-ASPP2 complex promotes <i>H. pylori</i> colonization in organoids	[25]
<i>M. tuberculosis</i>	Airway	Early human response to <i>M. tuberculosis</i> infection	[28]
<i>M. aureus</i>	Skin	Sensitivity of skin organoids to <i>M. aureus</i> infection	[29]
<i>S. enteritidis</i>	Intestinal	Interaction of <i>S. enteritidis</i> with intestinal organoids	[30]
<i>S. enteritidis</i>	Intestinal	Protective effect of epithelial cells on <i>S. enteritidis</i> during infection	[31]
<i>T. gondii</i>	Intestinal	Establishment of <i>T. gondii</i> infection model and drug screening	[32]
<i>Crypto</i>	Intestinal	<i>Crypto</i> life cycle and interactions in intestinal organoids	[33]

sional, 3D)培养而形成的具有一定空间结构的组织类似物。尽管不是真正意义上的人体器官,但它从多个方面模拟了原生器官,如从细胞组成、结构、细胞外基质的特定特征和生理特性方面进行模拟。相比2D细胞模型,干细胞发育而来的三维细胞团,更好地模拟了组织的发育过程以及多细胞组成,也可以更好地重现机体与病原体之间的相互作用;相比于体内模型,类器官由人源干细胞发育而来则解决了病原体感染在不同种属之间的差异难题,除此之外,类器官在成本、建模成功率、及高通量分析等方面也有显著优势。因此,本文重点介绍类器官在感染建模方面的大量应用(表1),同时也对目前类器官感染建模应用的不足以及未来发展作了论述。

1 病毒

1.1 严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)

2019年,由SARS-CoV-2引发的传染病,是人类历史上致死人数最多的疾病之一。该病毒主要感染肺部、肠道、脑部等多个重要器官,大多数患者会出现低烧、肺部不适,有的患者还伴有神经系统和胃肠道系统的不适。

1.1.1 肺类器官 2021年TINDLE等^[1]创建了具有近端呼吸道和远端肺泡上皮的成体肺类器官,这些

类器官不仅可以在3D培养中稳定扩增,还可以用作混合细胞单层来模拟感染期间病毒与宿主的免疫反应。TIWARI等^[2]观察到在SARS-CoV-2感染肺类器官过程中宿主因子如神经纤毛蛋白-1(neuropilin 1, NRP1)、组织蛋白酶L1(cathepsin L 1, CTSL1)、激肽释放酶相关肽酶13(kallikrein-related peptidase 13, KLK13)等均有表达,在应对感染过程中,类器官中大多数先天免疫、细胞因子、炎性小体的关键基因均出现明显上调,这也与患者感染病毒后产生细胞因子风暴导致严重肺部损伤的结果一致。此外,肺类器官也被大量用于SARS-CoV-2感染后治疗药物的筛选。HAN等^[3]使用SARS-CoV-2感染的肺类器官对FDA批准的药物进行了高通量筛选,并确定了潜在的临床候选药物包括伊马替尼、盐酸阿那卡因等。PEI等^[4]利用人肺类器官发现了一种可以有效抑制SARS-CoV-2复制的中和抗体。

1.1.2 肠类器官 新冠暴发之后,有些患者也伴随着恶心、呕吐和腹泻等胃肠道症状。目前建立的人肠道类器官通常由肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞、转运扩增细胞和干细胞等多种细胞组成,是体外研究肠道病理生理的常用模型^[5]。KRUGER等^[6]利用肠道类器官发现SARS-CoV-2可以感染除杯状细胞以外的其他所有细胞类型并使其超微结构发生改变进而扰乱其完整性,这可能是新冠患者

出现腹泻等胃肠道症状的原因。STANIFER等^[7]首次全面分析了人结肠类器官被 SARS-CoV-2 侵入后的生命周期, 他们观察到类器官不仅支持 SARS-CoV-2 的感染、复制以及病毒颗粒的产生而且可以激起自身强大的免疫反应, 其中 III 型干扰素介导的免疫反应可以有效地控制病毒的进入和复制。ZHAO 等^[8]发现, SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 在感染肠道类器官过程中表现出了不同的病毒-宿主动力学, 其中 SARS-CoV 感染后复制迅速但引发的细胞反应小而 SARS-CoV-2 复制缓慢却引发了更强的宿主反应, 这可能是不同病原体拥有不同致病性的原因。

1.1.3 脑类器官 新冠患者常伴随着神经系统的不适, 研究人员已经在部分患者大脑中检测到了 SARS-CoV-2 病毒。RAMANI 等^[9-10]利用诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 建立的脑类器官, 发现 SARS-CoV-2 感染具有神经嗜性, 尤其在脉络丛上皮细胞中大量定植和复制; 另外他们也发现 SARS-CoV-2 病毒很容易靶向人脑类器官中的神经元, 人脑类器官的皮质部分在被侵袭后会出现明显的微管相关蛋白分布改变、微管相关蛋白过度磷酸化以及明显的神经元死亡等现象, 不过对于观察到的微管相关蛋白的异常变化还需要进一步的探究去加以解释。

1.2 寨卡病毒(ZIKa virus, ZIKV)

ZIKV 是一种蚊媒病毒, 2015 年由南美迅速扩散, ZIKV 一般经由母亲传染给孩子, 新生儿感染此病毒可能会导致小头畸形。2016 年 GARCEZ 团队^[11]用脑类器官初步模拟了前三个月大脑的发育情况, 并发现 ZIKV 会明显降低脑类器官的生长能力; CUGOLA 等^[12]研究表明, 脑类器官的 ZIKV 感染会导致增殖区的减少和皮质层的破坏; 此外 DANG 等^[13]研究发现在 ZIKV 感染脑类器官后, Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 的表达显著上调, 进而激活 TLR3 介导的先天免疫反应导致参与神经发生、凋亡和分化的基因网络的失调。研究者在抑制 TLR3 后发现 ZIKV 感染类器官后介导的免疫效应明显减弱; 脑类器官也可作为筛选 ZIKV 感染药物的有效工具, LI 等^[14]发现亚甲基蓝 (methylene blue, MB) 可以显著抑制病毒蛋白酶 NS3 及其辅助因子 NS2B 之间的相互作用, 进而抑制病毒的生长, 保护脑类器官的皮质不受病毒的侵害; ZHOU 等^[15]利用

干细胞建立的前脑类器官进行药物筛选, 发现候选药物小星蒜碱氢溴酸盐 (hippeastrine hydrobromide, HH) 可逆转 ZIKV 感染脑类器官导致的人类胎儿样前脑生长分化缺陷。

1.3 轮状病毒(rotavirus, RV)

RV 是引起婴幼儿腹泻的最常见原因, 其主要感染小肠上壁的肠内分泌细胞进而产生肠毒素, 肠毒素会导致肠胃炎进而引发严重的腹泻。FINKBEINER 等^[16]利用 RV 感染人肠道类器官, 结果显示人肠道类器官支持 90% 以上临床常见 RV 定殖及复制, 研究也发现 RV 不仅在类器官的上皮细胞定殖, 而且在间充质细胞群中同样出现; SAXENA 等^[17]在 RV 感染的肠类器官上观察到外形肿胀和液体分泌等类似腹泻的生理反应, 这为 RV 的机制研究提供了更多细节; 肠道类器官同样可以用于抗病毒药物疗效的个性化评估, YIN 等^[18]利用肠道类器官证实了干扰素和利巴韦林对 RV 感染有明显抑制作用; CHEN 等^[19]利用肠类器官感染模型从广谱的抗病毒药物库中筛选, 发现吉西他滨在抑制 RV 复制上有明显的效果。

1.4 诺如病毒(norovirus, NV)

NV 是一类急性肠胃炎的病毒, 传播途径主要有感染性食物中毒和传染性肠胃炎, 患者主要症状为腹痛、腹泻和呕吐等。2016 年 ETTAYEBI 等^[20]利用肠类器官模拟了肠道环境, 并验证了 NV 在肠类器官上的存活和大量扩增, 该研究还指出胆汁是模拟肠道环境的关键物质, 对 NV 的大量复制至关重要; HAGA 等^[21]利用 CRISPR/Cas9 技术, 创建了岩藻糖基转移酶 2 (fucosyltransferase 2, FUT2) 敲除的肠道类器官, FUT2 基因主要表达与 NV 易感性相关的酶, 结果显示基因敲除后 GI.1、GII.4 以及 GII.17 基因型的 NV, 其复制水平均降低, 该研究利用类器官感染模型借助基因敲除技术证明了 FUT2 表达对类器官中 NV 的复制是必要的。

1.5 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)

病毒性肝炎是由病毒感染引起的炎症性肝病, 主要有五种类型, 其中 HBV 和 HCV 最为常见, 两者都主要通过体液传播。由于 HBV、HCV 表现出狭窄的物种趋向性并且仅强烈感染人类和高等灵长类动物, 因此缺乏合适的动物模型, 这也阻碍了抗病毒药物的研发及临床测试, 人肝脏类器官感染模型的建立则大大降低了种属差异带来的难题。BAKTASH

等^[22]利用单粒子成像技术揭示了HCV在进入人肝癌类器官的过程中发生的顺序事件,即HCV先与早期受体结合募集于基底膜处,后以肌动蛋白依赖的方式聚集在连接处,最后在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)协助下内化进入宿主细胞;MEYERS等^[23]研究表明,HCV可在人肝脏类器官内存活并大量复制,并在几个月内使类器官保持轻微感染状态;NIE等^[24]在HBV感染人肝脏类器官的过程中发现了肝功能障碍相关的病理现象,包括肝脏早期衰竭标志物的大量释放以及肝脏超微结构的改变等。

2 细菌

2.1 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)

*H. pylori*是革兰氏阴性螺旋状的细菌,通常在胃中被发现,其可以穿透胃的黏液内壁,进而导致胃炎甚至胃及十二指肠溃疡。BUTI等^[25]利用胃类器官研究发现,细胞毒素相关基因A蛋白(cytotoxin-associated gene A, CagA)及p53-2细胞凋亡刺激蛋白(apoptosis-stimulating protein of p53-2, ASPP2)的相互作用可以破坏胃类器官中上皮细胞的极性,进而促进幽门螺杆菌的定殖,甚至对癌症的形成有推动作用;BARTFELD等^[26]利用人胃类器官分析了*H. pylori*感染后上皮细胞的主要反应,结果显示上皮细胞出现核因子活化B细胞κ轻链增强子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB)通路的大量激活及白细胞介素-8(interleukin 8, IL-8)的表达量增加等;BERTAUX-SKEIRIK等^[27]利用建立的人胃类器官发现了一种可以抑制*H. pylori*在胃类器官上定殖的跨膜受体CD44。

2.2 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*)

*M. tuberculosis*是引起结核病的病原体,该细菌可以感染全身器官,肺部感染最为常见,虽然结核病近年来发病率逐渐下降,但是如果未及时治疗,其死亡威胁依然巨大。近期FONSECA等^[28]利用气道类器官(airway organoids, AOs)揭示了*M. tuberculosis*感染人体的早期事件,实验发现*M. tuberculosis*感染类器官时并不直接与类器官上皮细胞接触,这可能与AOs内的黏液纤毛系统的作用有关,其次当被*M. tuberculosis*感染时类器官会通过调节自身细胞因子、抗菌肽以及黏蛋白等物质的表达量进一步对感染作

出反应。

2.3 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *M. aureus*)

*M. aureus*是一种革兰氏阳性球菌,其在显微镜下排列成葡萄串状,常见感染部位为皮肤表面和上呼吸道黏膜。近期,分化良好且能够反应表皮层复杂结构的皮肤类器官已经不断被应用到皮肤感染的研究中。近期,我们课题组^[29]构建了*M. aureus* USA300皮肤类器官的感染模型,实验结果显示皮肤类器官不仅支持USA300的定殖和侵袭,同时也会导致被感染的类器官出现上皮鳞状细胞的肿胀和坏死,更甚者会出现凋亡和自噬。此外我们还利用皮肤类器官的感染模型进行了药物筛选的探究,最终显示万古霉素以浓度依赖的方式恢复细胞的活力并且抑制USA300的进一步增殖。

2.4 肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*, *S. enteritidis*)

*S. enteritidis*是一种革兰氏阴性杆菌,为一种肠道致病菌,常因为误食不洁食物引起,感染者常会出现严重的腹泻。FORBESTER等^[30]通过显微注射技术将沙门菌注入肠类器官腔中,发现编码促炎因子的基因出现了显著上调,而肠道干细胞标志物Lgr5和Bmi1的表达出现了显著下调;LEES等^[31]在感染肠道类器官前用白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22)进行预处理,可以发现类器官腔内沙门菌存活的数量明显减少,且可逆转类器官的部分损害作用,这也展现了该模型在药物筛选方面的巨大潜力。

3 原生生物

3.1 弓形虫(*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*)

*T. gondii*寄生于细胞内并随血液循环到达心脏、大脑等部位,导致免疫力低下引发各种疾病。当*T. gondii*通过口腔进入体内传播时,其最先在小肠上皮部位与宿主进行接触。LUU等^[32]建立肠道类器官后,通过肠道上皮片培养,微量显微注射和肠类器官碎片化三种方式来打破肠类器官封闭肠腔的限制,使得*T. gondii*可以直接与肠道上皮接触,以便更好地模拟在体*T. gondii*对类器官的感染过程。该团队还证明了高剂量的阿托伐他汀可以降低*T. gondii*在肠道类器官上的复制水平。

3.2 隐孢子虫(*Cryptosporidium*, *Crypto*)

*Crypto*为顶复门的寄生虫,其可感染包括人类

在内的许多脊椎动物, 造成隐孢子虫病, 该病主要症状为腹泻与咳嗽。HEO等^[33]通过显微注射技术将 *Crypto* 注射到肠类器官后, 利用 qPCR 定量检测了孢子虫的扩增数量, 利用透射电子显微镜观察到了 *Crypto* 体外发育周期的不同阶段, 例如: 侵入孢子体, 释放裂殖子、合子和卵囊等, 同时在将分离的孢子体注射进肠类器官中观察到了卵囊的产生, 进而证明了 *Crypto* 可以在类器官中存活并完成整个生命周期。

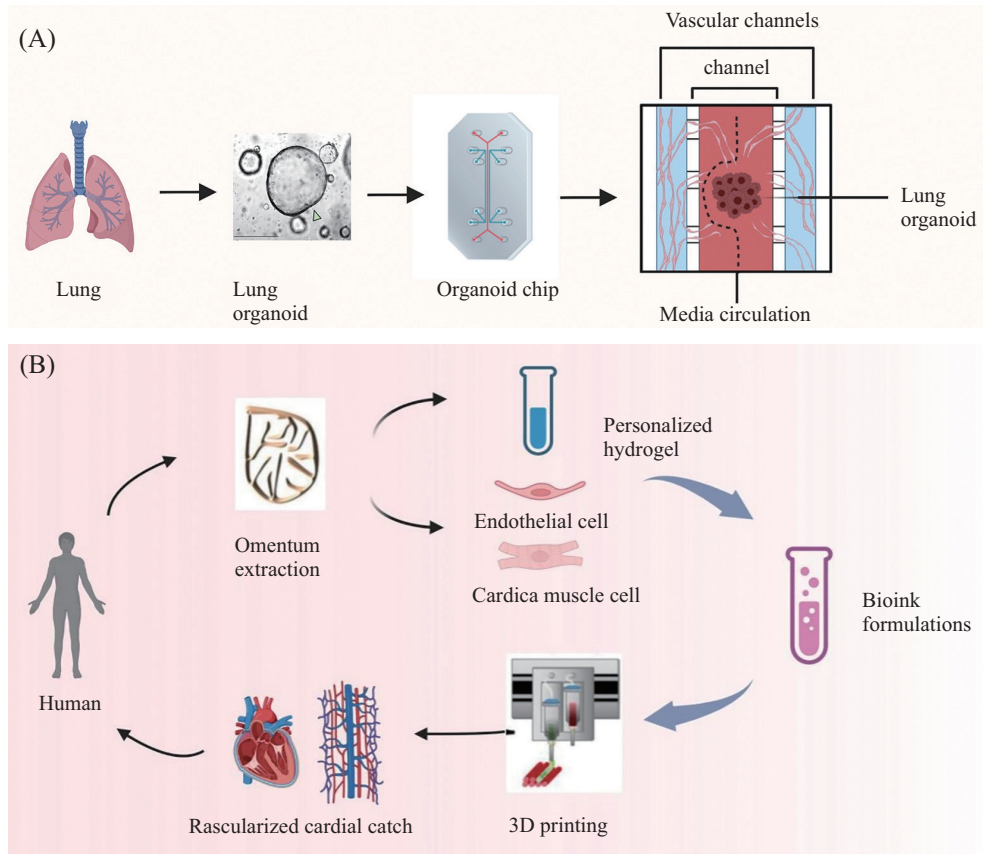
4 类器官感染模型的不足与展望

类器官保持了原代组织的复杂性且可以快速准确地获取微生物与宿主相互作用的信息, 极大地推动了感染领域的发展。不过基于类器官技术平台构建的感染模型仍存在很多挑战。

4.1 缺乏血管系统

3D模型难以形成复杂的血管网络, 这也就导致

类器官难以获得持续的营养供应并进行废物排泄。目前类器官中血管形成的方法主要分体外和体内两大类^[34]。其中体外策略主要包括: 构建类器官微流控芯片; 3D生物打印类脉管结构; 类器官与内皮细胞共培养等。类器官芯片主要指可以在体外模拟器官功能单元的微型细胞培养装置^[35], SHIRURE等^[36]构建了一个微流控芯片以模拟肿瘤微环境中毛细血管末端的物质传输, 该芯片具有可模仿微血管灌注的中心室以及用于装载肿瘤类器官的相邻室, 以此来实现营养物质或药物通过血管网络向肿瘤样本的输送, 在实验过程中, 乳腺肿瘤类器官可以在该芯片中存活数周并产生新生血管, 同时该芯片可动态观察细胞增殖情况, 并对血管生成、细胞迁移以及肿瘤细胞内渗等肿瘤进展标志物进行检测(图1A)。随着3D打印技术的不断成熟, NOOR等^[37]利用从患者身上分离的网膜组织及原代细胞形成个性化的生物墨水, 3D打印出了厚实的、血管化的、可灌注的心



A: 微流控芯片构建的肿瘤类器官培养体系; B: 利用人源网膜组织结合3D打印技术重建具有血管系统的人体组织。

A: tumor organoid culture system constructed by microfluidic chip; B: human omental tissue combined with 3D printing technology was used to reconstruct human tissue with vascular system.

图1 类器官芯片及3D打印技术构建血管通道

Fig.1 Organoid chip and 3D printing technology to construct vascular channels

脏补片,这些心脏补片完全符合患者的免疫、生化及解剖学特征(图1B)。此外将类器官移植到体内也是类器官血管化的有效途径之一,CATHELIJNE实验室^[34]将人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)发育而来的肾脏类器官移植到小鼠的肾包膜下,他们观察到宿主来源的血管网络侵入到了类器官中的肾小球结构,并自主连接到了类器官中的神经丛,移植后类器官的肾小球和肾小管以及血管结构也都发育得更加成熟。

4.2 缺乏免疫细胞

传染病模型中往往涉及各类免疫反应。研究表明目前的类器官培养模式不能长期维持免疫细胞的存活。针对类器官缺乏免疫组分的问题,研究人员已经开始建立类器官和免疫细胞的多种共培养模型。

4.2.1 中性粒细胞 中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)又称中性多形核白细胞,是被募集至损伤、炎症部位最迅速的免疫细胞,在免疫系统中扮演重要角色。其以一种“自杀性”的方式吞噬清除病原体以抵抗或延缓感染。LAWRENCE团队^[38]在非伤寒沙门氏菌感染的人肠道类器官中加入PMNs后,类器官免疫相关基因:白介素相关受体基因、Toll样受体基因等;细胞因子:CSF-3、IL-6、IL-8;以及趋化因子: CXCL-2、CCL-2等转录水平均出现显著提高。DOLAT等^[39]将PMNs与沙眼衣原体感染后的子宫内膜类器官共培养,在体外模拟了机体的初级免疫应答过程。结果显示类器官促进了IL-6、IL-8以及CXCL3等趋化因子的表达,进而驱使了大量PMNs向细菌定殖部位主动迁移。同时发现衣原体也可以通过分泌蛋白酶样激活因子(chlamydia protease-like activity factor, CPAF)靶向切割PMNs的表面受体FPR2(formyl peptide receptor 2)进而抑制PMNs的募集,以实现免疫逃逸。

4.2.2 巨噬细胞 巨噬细胞(macrophage)是白细胞的一种,其具有强大的识别、吞噬、清除细菌及外来异物的功能。巨噬细胞也通过招募其他免疫细胞来帮助机体启动特异的防御机制。IAKOBACH-VILI等^[40]将结核分枝杆菌感染的人气道类器官与单核细胞来源的巨噬细胞共培养,利用活细胞实时成像观察到巨噬细胞不断向类器官移动并在类器官的基底边缘部分对细菌进行捕获;VAZQUEZ团队^[41]将组织常驻巨噬细胞整合到小鼠肺支气管肺泡类器

官后,发现类器官上皮细胞生物标志物: Fosb、Fos,促炎因子: IL-4等均出现了明显下调;细胞成熟相关基因 *Neat1*、*Cyp2f2*则出现了明显上调。这些数据表明巨噬细胞可以与类器官的上皮细胞相互作用以驱动其分化,同时也可以下调类器官炎症相关基因的表达。

4.3 可重现性

类器官模型系统的可重现性有待提高。类器官的生长需要细胞外基质(extracellular matrix, ECM)以获得必要的结构支持和生化信号,但ECM的制备例如matrigel通常是通过动物来源的基质细胞获得的,这就意味着它们的成分并不明确,不同批次间难免存在差异,甚至存在残留的炎症蛋白等不明成分。为了减少这些不可控因素,目前化学合成水凝胶、多肽和重组蛋白基质以及无支架类器官培养方法都已经不断被开发出来^[42]。除此之外,干细胞长时间体外培养过程中发生的遗传畸变和衰老问题也会降低类器官培养的可重现性^[43],目前主要通过添加不同细胞因子以构建一个更加稳定的外部生存环境进而提高类器官的可重现性。

类器官不仅保持了原始组织的结构特征,能够重现入侵病原体与宿主的相互作用,而且类器官来源于人源干细胞,极大地缩小了因种属和个体差异带来的实验误差。当然,类器官感染性疾病模型还处于初步发展阶段,在血管化、免疫组分及可重现性等方面仍存在一些不足,但近年来随着类器官芯片、3D打印、类器官与免疫细胞共培养等多种技术的不断突破,类器官技术在轮状病毒、冠状病毒、流感病毒等多种病原体机制研究及药物筛选方面蓬勃发展。未来,类器官模型将和2D模型、动物模型协同推动感染性疾病的更深入探究。

参考文献 (References)

- [1] TINDLE C, FULLER M, FONSECA A, et al. Adult stem cell-derived complete lung organoid models emulate lung disease in COVID-19 [J]. eLife, 2020, 10: e66417.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] PEI R, FENG J, ZHANG Y, et al. Host metabolism dysregulation and cell tropism identification in human airway and alveolar

- organoids upon SARS-CoV-2 infection [J]. *Pro Cell*, 2021, 12(9): 717-33.
- [5] 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.
- [6] KRÜGER J, GROB R, CONZELMANN C, et al. Drug inhibition of SARS-CoV-2 replication in human pluripotent stem cell-derived intestinal organoids [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11(4): 935-48.
- [7] STANIFER M L, KEE C, CORTESE M, et al. Critical role of type III interferon in controlling SARS-CoV-2 infection in human intestinal epithelial cells [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(1): 107863.
- [8] ZHAO X, LI C, LIU X, et al. Human intestinal organoids recapitulate enteric infections of enterovirus and coronavirus [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16(3): 493-504.
- [9] RAMANI A, PRANTY A I, GOPALAKRISHNAN J. Neurotropic effects of SARS-CoV-2 modeled by the human brain organoids [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16(3): 373-81.
- [10] RAMANI A, MÜLLER L, OSTERMANN P N, et al. SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids [J]. *EMBO J*, 2020, 39(20): e106230.
- [11] WOODS C G, BOND J, ENARD W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 76(5): 717-28.
- [12] CUGOLA F R, FERNANDES I R, RUSSO F B, et al. The Brazilian zika virus strain causes birth defects in experimental models [J]. *Nature*, 2016, 534(7606): 267-71.
- [13] DANG J, TIWARI S K, LICHINCHI G, et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3 [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2): 258-65.
- [14] LI Z, LANG Y, SAKAMURU S, et al. Methylene blue is a potent and broad-spectrum inhibitor against zika virus *in vitro* and *in vivo* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 2404-16.
- [15] ZHOU T, TAN L, CEDERQUIST G Y, et al. High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(2): 274-83.
- [16] FINKBEINER S R, ZENG X L, UTAMA B, et al. Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses [J]. *MBio*, 2012, 3(4): e00159-12.
- [17] SAXENA K, BLUTT S E, ETTAYEBI K, et al. Human intestinal enteroids: a new model to study human rotavirus infection, host restriction, and pathophysiology [J]. *J Virol*, 2016, 90(1): 43-56.
- [18] YIN Y, BIJVELDS M, DANG W, et al. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids [J]. *Antiviral Res*, 2015, 123: 120-31.
- [19] CHEN S, WANG Y, LI P, et al. Drug screening identifies gemcitabine inhibiting rotavirus through alteration of pyrimidine nucleotide synthesis pathway [J]. *Antiviral Res*, 2020, 180: 104823.
- [20] ETTAYEBI K, CRAWFORD S E, MURAKAMI K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids [J]. *Science*, 2016, 353(6306): 1387-93.
- [21] HAGA K, ETTAYEBI K, TENGE V R, et al. Genetic manipulation of human intestinal enteroids demonstrates the necessity of a functional fucosyltransferase 2 gene for secretor-dependent human norovirus infection [J]. *mBio*, 2020, 11(2): e00251-20.
- [22] BAKTASH Y, MADHAV A, COLLIER K E, et al. Single particle imaging of polarized hepatoma organoids upon hepatitis c virus infection reveals an ordered and sequential entry process [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(3): 382-94.e5.
- [23] MEYERS A N L, ASHUACH T, LYONS D E, et al. Hepatitis c virus infects and perturbs liver stem cells [J]. *mBio*, 2023, 14(6): e0131823.
- [24] NIE Y Z, ZHENG Y W, MIYAKAWA K, et al. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells [J]. *EBioMedicine*, 2018, 35: 114-23.
- [25] BUTI L, RUIZ-PUIG C, SANGBERG D, et al. CagA-ASP2 complex mediates loss of cell polarity and favors *H. pylori* colonization of human gastric organoids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(5): 2645-55.
- [26] 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.
- [27] BERTAUX-SKEIRIK N, FENG R, SCHUMACHER M A, et al. CD44 plays a functional role in helicobacter pylori-induced epithelial cell proliferation [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2): 1-25.
- [28] FONSECA K L, RODRIGUES P N S, OLSSON I A S, et al. Experimental study of tuberculosis: from animal models to complex cell systems and organoids [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(8): 1-13.
- [29] XIE X, TONG X, LI Z, et al. Use of mouse primary epidermal organoids for USA300 infection modeling and drug screening [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 15.
- [30] FORBESTER J L, GOULDING D, VALLIER L, et al. Interaction of salmonella enterica serovar typhimurium with intestinal organoids derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(7): 2926-34.
- [31] LEES E A, FORBESTER J L, FORREST S, et al. Using human induced pluripotent stem cell-derived intestinal organoids to study and modify epithelial cell protection against salmonella and other pathogens [J]. *J Vis Exp*, 2019, doi: 10.3791/59478.
- [32] LUU L, JOHNSTON L J, DERRICOTT H, et al. An open-format enteroid culture system for interrogation of interactions between toxoplasma gondii and the intestinal epithelium [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 300.
- [33] HEO I, DUTTA D, SCHAEFER D A, et al. Modelling cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(7): 814-23.
- [34] 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.
- [35] PARK S E, GEORGESCU A, HUH D. Organoids-on-a-chip [J]. *Science*, 2019, 965: 960-5.
- [36] SHIRURE V S, BI Y, CURTIS M B, et al. Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(23): 3687-702.
- [37] NOOR N, SHAPIRA A, EDRI , et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(11): 1900344.
- [38] RIORDAN M O. Neutrophils prime unique transcriptional re-

- sponses in intestinal organoids during infection with nontyphoidal *Salmonella enterica* serovars [M]. London: the company of biologists, 2021.
- [39] DOLAT L, VALDIVIA R H. An endometrial organoid model of interactions between chlamydia and epithelial and immune cells [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(5): jcs252403.
- [40] IAKOBACHVILI N, LEON-ICAZA S A, KNOOPS K, et al. Mycobacteria-host interactions in human bronchiolar airway organoids [J]. *Mol Microbiol*, 2022, 117(3): 682-92.
- [41] VAZQUEZ-ARMENDARIZ A I, HEINER M, EL AGHA E, et al. Multilineage murine stem cells generate complex organoids to model distal lung development and disease [J]. *EMBO J*, 2020, 39(21): 1-21.
- [42] POUDEL H, SANFORD K, SZWEDO P K, et al. Synthetic matrices for intestinal organoid culture: Implications for better performance [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(1): 38-47.
- [43] STEM E, AGING C, XIE X, et al. Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(1): 127-38.