



何桂卫, 深圳湾实验室特聘研究员。2018年获得德国埃尔朗根-纽伦堡大学博士学位, 博士后师从荷兰皇家科学院Hubrecht研究所类器官技术创始人CLEVERS教授, 2023年加入深圳湾实验室建立课题组, 致力于开发新一代类器官技术并将其应用于疾病研究, 特别关注消化系统癌症、感染和罕见病。迄今为止在*Cell Stem Cell*、*Gut*、*J Exp Med*等杂志上发表研究论文十余篇。

肠道类器官的发展及其在疾病研究中的应用

阳芬芳 孟亚君 庞开心 刘博昕 黎丰源 何桂卫*

(深圳湾实验室, 传染病研究所, 深圳 518132)

摘要 肠道兼具消化吸收与黏膜免疫双重关键功能, 其功能障碍可导致结直肠癌(colorectal cancer, CRC)、感染性疾病及炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)等重大疾病。传统的二维(two-dimensional, 2D)细胞培养难以模拟人肠道复杂结构与生理病理过程。肠道类器官技术通过三维(three-dimensional, 3D)培养原代肠道细胞或多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC), 构建出了在结构、功能和细胞类型方面高度模拟肠道上皮的微型器官, 同时保持了传统细胞培养的操作灵活性。自2009年首个小鼠模型问世以来, 该技术已实现人源类器官构建、培养体系优化, 并与微流控芯片等技术整合, 发展为疾病建模与药物研发的重要平台。但是, 当前肠道类器官仍面临细胞类型与功能完整性不足、体外微环境模拟局限性、多谱系共培养困难等问题。未来, 有望通过结合材料科学和生物工程等跨学科技术来实现突破。随着技术进步, 肠道类器官将在疾病机制解析、个性化医疗及再生医学领域发挥核心作用, 为肠道健康研究提供创新策略。

关键词 肠道类器官; 三维培养; 疾病建模; 微流控芯片; 结直肠癌

Advancement of Intestinal Organoids and Their Applications in Disease Research

YANG Fenfang, MENG Yajun, PANG Kaixin, LIU Boxin, LI Fengyuan, HE Guiwei*

(Institute of Infectious Diseases, Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518132, China)

Abstract The intestine serves dual critical functions in digestion/absorption and mucosal immunity, with its dysfunction implicated in major diseases including CRC (colorectal cancer), infectious diseases, and IBD (inflammatory bowel disease). Traditional 2D (two-dimensional) cell cultures often fail to accurately recapitulate

收稿日期: 2025-06-14 接受日期: 2025-07-18

深圳湾实验室资助的课题

*通信作者。Tel: 0755-86967710, E-mail: hegwszbl.ac.cn

Received: June 14, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the Shenzhen Bay Laboratory

*Corresponding author. Tel: +86-755-86967710, E-mail: hegwszbl.ac.cn

the complex architecture and dynamic physiological and pathological processes of the human intestine. Intestinal organoid technology employs 3D (three-dimensional) culture of primary intestinal cells or PSCs (pluripotent stem cells) to generate miniature organs that highly recapitulate the structure, function, and cell types of the intestinal epithelium, while maintaining the operational flexibility of traditional cell culture. Since the first mouse model was established in 2009, this technology has enabled the establishment of human-derived organoids, optimized culture systems, and integration with techniques such as microfluidic chips, evolving into a vital platform for disease modeling and drug development. However, current intestinal organoids still face challenges including insufficient cell type and functional completeness, limitations in simulating the *in vivo* microenvironment, and difficulties in establishing multi-lineage co-culture platforms. In the future, breakthroughs may be achieved by integrating interdisciplinary technologies such as materials science and bioengineering. With technological advancements, intestinal organoids are expected to play a central role in disease mechanism elucidation, personalized medicine, and regenerative medicine, providing innovative strategies for research into intestinal health.

Keywords intestinal organoids; three-dimensional culture; disease modeling; microfluidic chips; colorectal cancer

肠道是人体最重要的消化器官及关键的免疫场所之一, 不仅主导营养物质的消化与吸收, 还具有免疫防御、屏障功能以及维持微生物群稳态等核心生理功能^[1]。肠道疾病的复杂性(涵盖感染、遗传及免疫等多重因素)仍是深入探究其发病机制及开发有效疗法的重大挑战。传统的二维细胞培养模型因缺乏肠道固有的三维结构及多细胞协同互作网络, 难以模拟肠道的生理与病理过程; 动物模型虽能提供整体水平的生物学信息, 但常受限于物种差异、实验周期冗长及伦理争议等因素^[2]。因此, 亟需发展一种能够高度模拟肠道复杂结构功能、具备良好操作性与高保真度的新型体外模型系统。

肠道类器官(intestinal organoids)的兴起为解决这一难题提供了突破性策略。作为类器官技术的代表性模型, 肠道类器官通过体外三维培养肠道组织来源的细胞[包括肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)^[3]、分化的细胞^[4]或肿瘤细胞^[5]]或者多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)^[6], 形成具有隐窝-绒毛(crypt-villus)结构、包含肠上皮所有细胞类型的微型组织^[7]。该技术的核心优势在于其不仅保留了肠道的组织特异性生理功能, 同时也兼具基因编辑和高通量筛选的灵活性^[2]。自2009年CLEVERS团队^[3]首次利用小鼠肠道干细胞成功构建成体干细胞(adult stem cell, ASC)来源的类器官模型以来, 该领域发展迅速: 从人源肠道类器官的建立^[8], 到PSCs来源的类器官的建立^[6], 再到基础培养体系的优化[例如, 改进Wnt信号通路激活剂和表皮生长因子(epi-

dermal growth factor, EGF)等关键因子的组合]^[9], 以及类器官与微流控芯片^[10]、共培养系统^[11-12]等技术的整合。如今, 肠道类器官已成为疾病建模、药物研发和精准医学领域不可或缺的平台。

近年来, 肠道类器官在感染性疾病(如诺如病毒^[13]、艰难梭菌感染^[14])、遗传性疾病(如囊性纤维化^[15]、家族性腺瘤性息肉病^[16]、结直肠癌^[5])以及炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)^[17]等研究中展现出独特价值。例如, 通过患者来源的类器官(patient-derived organoids, PDOs)^[18]可直接观察疾病表型, 结合CRISPR/Cas9技术可精准构建基因突变模型^[19], 而类器官与肠道微生物共培养体系则揭示了宿主-菌群互作的分子机制^[20]。然而, 类器官技术仍面临诸多挑战: 细胞类型与功能完整性不足、体外微环境模拟局限性、多谱系共培养困难、培养标准化不足等问题, 这限制了其临床转化潜力^[21]。

本文旨在梳理肠道类器官技术的发展脉络, 重点探讨其在疾病模拟和研究中的应用进展, 并分析当前技术瓶颈与未来方向。通过整合类器官培养、基因编辑、疾病建模等领域的研究成果, 本文希望为肠道疾病研究提供新的视角, 并推动类器官技术在生物医学中的规范化应用与跨学科融合。

1 肠道概述

1.1 肠道结构与干细胞生态位

人体的肠道是一个复杂的器官, 由大约7米的

小肠和2米的大肠组成^[22]。肠道上皮是覆盖在肠道内壁的单层细胞结构,是肠道执行关键功能的核心界面^[23]。

小肠是最主要的消化和吸收器官,从近端到远端段分为十二指肠、空肠和回肠,其上皮的基本功能单元是独特的绒毛-隐窝结构(图1)^[24]。小肠和结肠的干细胞主要有两种:一种是特异性表达亮氨酸重复序列G蛋白偶联受体5(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5, LGR5)的隐窝基底柱状细胞(crypt base columnar cells, CBCs)^[25],它们位于隐窝底部1~4号细胞位置,与潘氏细胞(Paneth cells)间隔排列,具有高度增殖活性,可在数天内更新整个肠道上皮组织^[23];另一种是表达Bmi1(Bmi1 polycomb ring finger oncogene)的+4标记保留细胞(+4 label-retaining cells, +4 LRCs),主要定位于隐窝底部

第4细胞位置(即“+4”位置),通常位于最末端的潘氏细胞之上,在稳态条件下处于相对静止状态,作为潘氏细胞的前体细胞,经数周时间分化为成熟的潘氏细胞;值得注意的是,在肠道损伤应激状态下,+4 LRCs可被激活并转化为LGR5⁺ CBCs细胞参与组织修复^[26]。

LGR5⁺ CBCs细胞通过分裂增殖产生过渡扩增细胞(transit-amplifying cells, TA cells),这些细胞自隐窝底部向顶部迁移,在增殖的同时逐渐分化形成小肠上皮的七种主要功能细胞类型^[23,27],根据其主要功能可分为两大类:吸收型细胞(absorptive cells)^[23,28],主要负责摄取肠腔内容物,包括负责抗原采样并将其转运至派尔集合淋巴结免疫细胞的微折叠细胞(microfold cells, M cells)、主要功能为离子(如HCO₃⁻和Cl⁻)转运的Bestrophin-4细胞(BEST4⁺ cells)^[27]以及作为主要吸收细胞

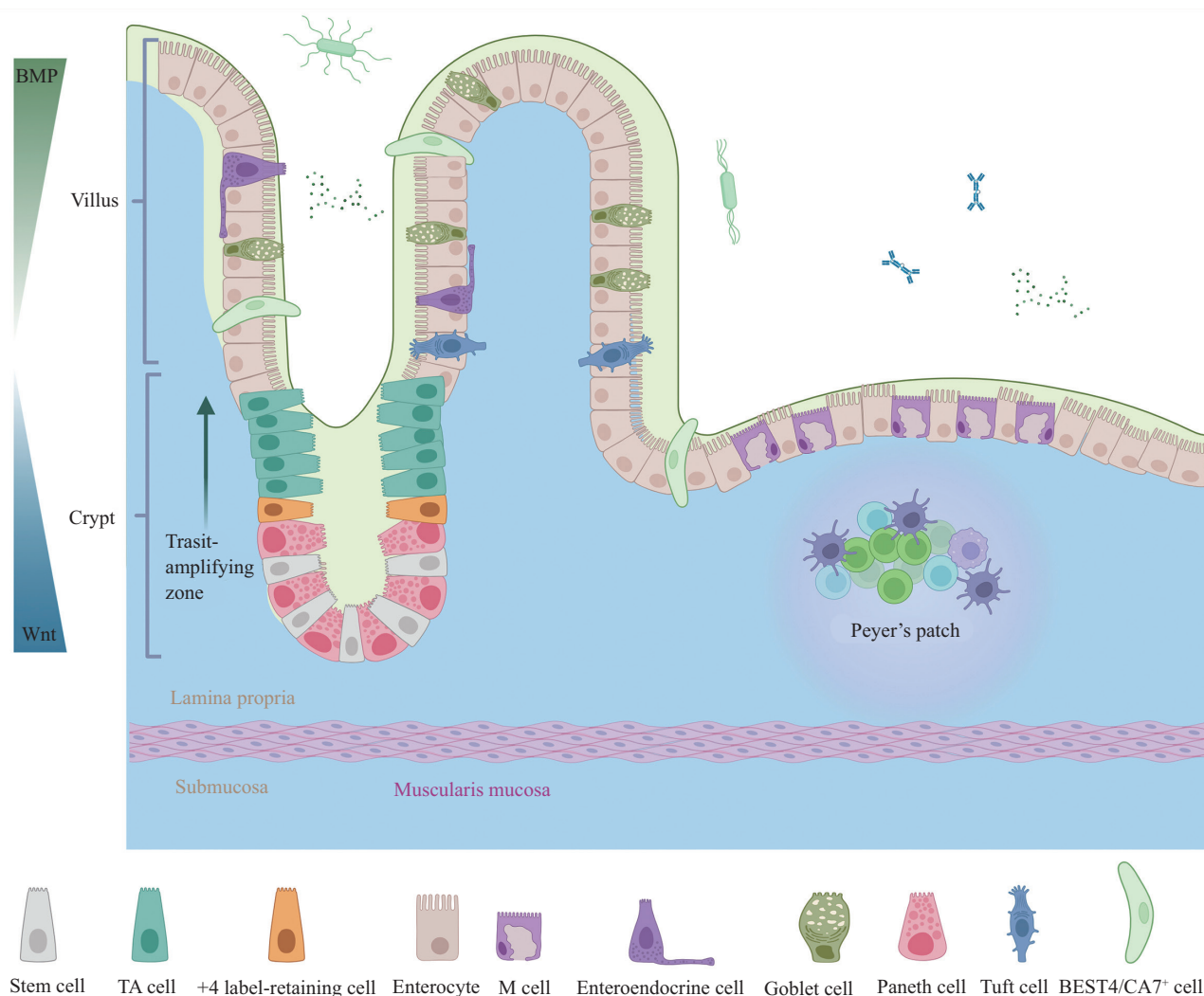


图1 小肠的结构和细胞类型(该图在BioRender.com上绘制)

Fig.1 The schematic of small intestinal structure and cell types (this figure was created in BioRender.com)

负责营养物质和水分吸收的肠上皮细胞(enterocytes, ECs); 分泌型细胞(secretory cells)^[23], 主要负责向肠腔分泌物质, 包括分泌抗菌产物(如溶菌酶、防御素等)并为肠道干细胞提供重要生态位因子的潘氏细胞、分泌黏液形成保护性屏障的杯状细胞(goblet cells)、分泌多种激素并在代谢信号转导中发挥关键作用的肠内分泌细胞(enteroendocrine cells, EECs)以及能够感知微生物代谢产物(如琥珀酸)或寄生虫感染并分泌警报素白细胞介素-25(interleukin-25, IL-25)的簇细胞(tuft cells)^[4]。

大肠依据其解剖位置可分为升结肠区、横结肠区、降结肠区和乙状结肠区四个区域。作为机体吸收水分和电解质的主要场所, 每个结肠区域均包含大量功能各异的细胞。在细胞类型组成上, 结肠与小肠存在一定差异: 结肠黏膜缺乏小肠特有的绒毛结构和潘氏细胞, 但其他大多数上皮细胞类型(如杯状细胞、肠内分泌细胞、簇细胞等)则与小肠相似。其中, 结肠上皮细胞(colonocytes)在功能上类似于小肠上皮细胞, 主要负责水分的吸收。值得注意的是, 结肠隐窝底部存在一类独特的深部分泌细胞(deep secretory cells, DSCs), 其表达标志物再生胰岛衍生4(regenerating islet derived protein 4, REG4), 并嵌入于LGR5⁺ CBCs之间, 研究表明, DSCs在功能上与潘氏细胞具有部分相似性, 例如能够分泌EGF并表达Notch信号通路配体, 从而参与调控隐窝微环境。然而, 与能分泌关键Wnt配体(如Wnt3a)以维持干细胞生态位的小肠潘氏细胞不同, DSCs本身并不产生Wnt配体; 结肠上皮所需的Wnt信号主要来源于其下方的间质细胞^[23]。

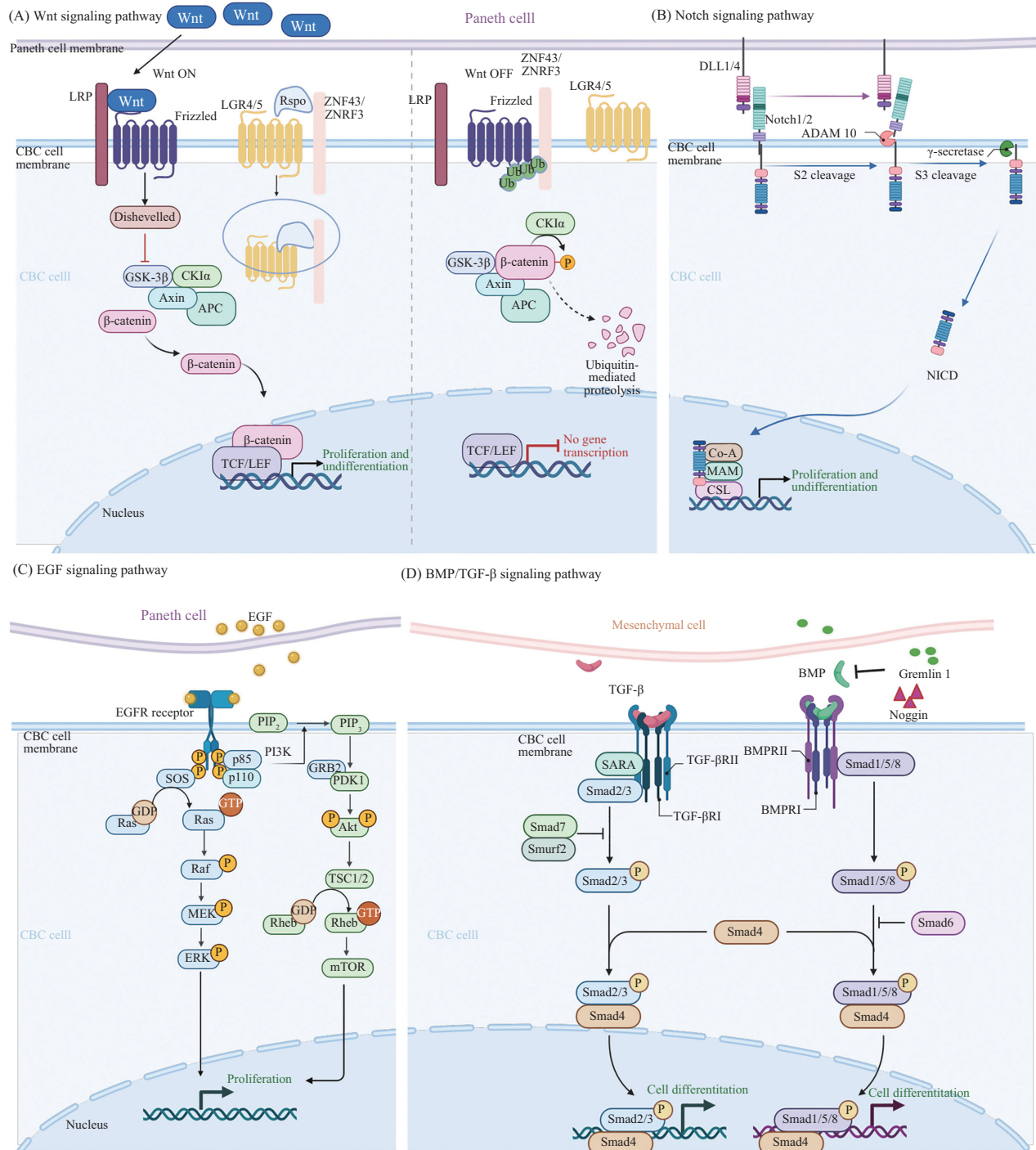
1.2 肠隐窝的关键信号通路

科学家们利用基因编辑小鼠模型深入解析了调控肠道隐窝稳态的关键微环境信号网络, 主要包括Wnt、Notch、EGF和骨形态发生蛋白/转化生长因子- β (bone morphogenetic proteins/transforming growth factor- β , BMP/TGF- β)信号通路。这些通路协同作用, 精密调控肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)的自我更新、增殖、分化及谱系命运决定^[29](图2)。

1.2.1 Wnt信号通路 作为调控细胞自我更新、增殖和组织稳态的关键通路, Wnt信号的激活驱动了肠道干细胞及TA细胞的增殖。在经典Wnt通路中, Wnt配体与细胞膜上的Frizzled受体及LRP5/LRP6共受体结合, 抑制由结肠腺瘤样息肉(adenomatous

polyposis coli, APC)、Axin等蛋白组成的复合物介导的 β -catenin泛素化降解, β -catenin因此得以在细胞质中积累并转位入核, 在核内与TCF/LEF转录因子家族结合形成激活复合物, 进而上调*c-Myc*、*Cyclin D1*和*MMP-7*等靶基因的表达, 实现其促增殖等生物学效应^[30]。在小鼠肠道微环境中, 潘氏细胞是Wnt信号配体(尤其是Wnt3a)的主要来源, 它们向邻近的肠隐窝干细胞提供关键的Wnt3a信号。此外, 周间充质细胞(pericryptal mesenchymal cells)及间质细胞(stromal cells)等亦能分泌Wnt配体。这些来源共同作用, 在隐窝-绒毛轴上形成了Wnt信号的梯度分布: 隐窝基底区域信号最强, 向绒毛顶端方向逐渐减弱, 从而精确调控肠道干细胞的自我更新。与小鼠不同的是, 人肠道潘氏细胞并不表达和分泌Wnt3a^[31]。R-脊椎蛋白(R-spondin 1~4)是一类主要由肠上皮成纤维细胞分泌的可溶性蛋白, 其包含Furin-like结构域和TSP1结构域, 通过与LGR4/5/6受体及跨膜E3泛素连接酶RNF43/ZNRF3形成三元复合物, 促进RNF43/ZNRF3的内吞和降解^[32]。RNF43/ZNRF3通常通过泛素化Frizzled受体促进其降解来抑制Wnt信号通路。因此, R-spondin通过解除这种抑制作用, 有效增强细胞对Wnt配体的敏感性及其下游信号转导。

1.2.2 Notch信号通路 除Wnt信号通路外, Notch信号通路的活性同样是维持肠道干细胞状态的关键决定因素。研究表明, Notch信号在肠道隐窝区域呈现一个梯度分布, 其活性从隐窝顶部向底部逐渐增强, 这一空间模式对于调控肠道干细胞生态位内的细胞命运分配具有至关重要的意义^[33]。在哺乳动物中, 经典的Notch信号通路由四个Notch受体(Notch1~4)和五个Notch配体(Jagged 1、Jagged 2、DLL1、DLL3、DLL4)构成^[34]。该通路的激活严格依赖于两个相邻细胞间的直接膜接触: 一个细胞表达Notch配体(如DLL1或DLL4), 而另一个细胞则表达Notch受体(如Notch1或Notch2), Notch配体与受体结合后会触发Notch信号的活化。被激活后, 受体复合物经历两次连续的蛋白水解切割: 首先在受体胞外域发生蛋白酶切割, 随后在细胞膜内侧, 由 γ -分泌酶(γ -secretase)复合物进行关键的第二次切割。这一过程释放Notch胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)。NICD随后易位至细胞核内, 与DNA结合蛋白CSL形成复合物。该复合物进而招募共激



A: Wnt信号通路; B: Notch信号通路; C: EGF信号通路; D: BMP/TGF- β 信号通路。

A: Wnt signaling pathway; B: Notch signaling pathway; C: EGF signaling pathway; D: BMP/TGF- β signaling pathway.

图2 肠隐窝的主要信号通路(该图在BioRender.com上绘制)

Fig.2 Main signalling pathways in the intestinal crypt (this figure was created in BioRender.com)

活因子,启动下游靶基因的转录。其中,碱性环螺旋-环-螺旋转录因子HES1(hairy and enhancer of split 1)是Notch信号的关键下游效应分子,其表达上调能够抑制细胞分化,从而有助于维持肠道干细胞库的稳定,并确保肠道上皮中吸收型细胞与分泌型细胞比

例的稳态平衡^[35]。在肠道微环境中,潘氏细胞特异性地表达Notch配体DLL4和DLL1,这些配体能够有效地激活邻近的CBC细胞上表达的跨膜受体Notch1和Notch2^[36]。这一配体-受体相互作用对于维持肠道干细胞的自我更新至关重要。实验证据表明,若

在隐窝中使用 γ -分泌酶抑制剂阻断Notch信号级联反应, 将导致干细胞增殖能力受损及功能丧失, 同时伴随着分泌谱系细胞(如杯状细胞和潘氏细胞)群体显著扩增, 这进一步证实了Notch信号在精细调控肠道细胞谱系命运中的核心作用^[37]。

1.2.3 EGF信号通路 EGF信号通路是维持肠道上皮稳态的关键调节因子, 尤其在促进隐窝区肠道干细胞和TA细胞的增殖、存活及损伤修复中发挥核心作用。该通路通过激活下游磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(P13K/Akt)和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)等关键信号级联, 加快细胞周期进程并抑制凋亡^[38]。在肠道隐窝微环境中, EGF家族配体[如双调蛋白(amphiregulin, AREG)、EGF]主要由潘氏细胞和隐窝周围间充质细胞分泌, 为LGR5⁺肠道干细胞提供持续的促增殖信号, 是其活性维持及体外类器官生长不可或缺的因子; 同时, EGF信号在TA细胞区高度活跃, 通过激活MAPK/ERK通路强烈驱动TA细胞的快速增殖, 为上皮持续更新提供细胞来源。此外, 肠道黏膜在受到损伤(如辐射、化疗或炎症)后, 隐窝及间质细胞中AREG等配体表达显著上调, 通过结合EGFR激活PI3K/Akt通路促进细胞存活并加速隐窝再生, 成为上皮屏障修复的关键介质。值得注意的是, EGF通路还可通过激活MAPK增强TCF/LEF转录因子的活性, 从而与Wnt信号协同放大下游促增殖基因(如*c-Myc*)的表达, 共同维持肠道干细胞的自我更新能力。

1.2.4 BMP/TGF- β 信号通路 BMP/TGF- β 信号通路在肠道干细胞生态位中扮演关键的负调控角色: 它拮抗促增殖信号, 抑制干细胞自我更新, 并驱动其向分化状态转变。与在隐窝底部活跃的Wnt通路形成鲜明对比, BMP信号在肠道绒毛区域的浓度显著更高, 由此形成了从隐窝基底部向绒毛顶端递增的活性梯度。这一梯度是促使离开隐窝的祖细胞进行终末分化、实现肠上皮细胞成熟与功能特化的关键机制。BMP属于TGF- β 超家族(包含BMP2/4、TGF- β 、Activins、Inhibins、GDFs等成员), 其中BMP2和BMP4作为主要功能配体, 主要由隐窝-绒毛间的间充质细胞(mesenchymal cells)分泌^[39]。在信号转导层面, BMPs首先与骨形态发生蛋白II型受体(type II BMP receptor, BMPRII)结合, 引发受体复合物的构象变化, 进而催化并磷酸化骨形态发生蛋白I型受体(type I BMP receptor, BMPRI)。活化的

BMPRI随后识别并磷酸化下游的R-Smads蛋白(主要包括Smad1、Smad5和Smad8)。磷酸化的R-Smads与Co-Smad/Smad4形成异源寡聚体复合物, 该复合物随后转位至细胞核内, 通过与特定基因启动子区域的DNA结合蛋白相互作用, 直接调控靶基因的表达模式^[40]。值得注意的是, 该通路受到Noggin和Gremlin 1等内源性拮抗剂的调控, 这些拮抗剂主要在隐窝基底部间充质细胞中表达, 通过竞争性结合BMP配体阻断信号转导——体外类器官实验证实添加它们可模拟隐窝底部低BMP环境; 此外, Noggin还能通过减弱PTEN对 β -catenin的抑制, 协同Wnt通路以维持干细胞活性^[39,41]。

2 肠道类器官的发展历程

2.1 成体干细胞来源的肠道类器官

肠道类器官的建立依赖于对肠道干细胞的深入研究。如图3所示, CLEVERS团队^[3]于2009年从原代成体组织中首次成功建立了小鼠肠道干细胞的长期培养体系, 这个里程碑式的研究标志着3D类器官培养系统的诞生。这个开创性研究证明小鼠肠道中的LGR5⁺干细胞具有自我更新和多谱系分化潜能, 证明了组织特异性干细胞具有发育成对应组织类器官的潜能。将单个LGR5⁺干细胞包埋在基质胶里面, 在体外三维培养体系中, 通过添加Wnt3a、EGF、R-spondin1等生长因子来模拟体内隐窝干细胞生态位(niche), 成功维持了LGR5⁺干细胞的增殖与分化并形成了包含隐窝-绒毛结构的类器官^[3]。在含有肠道隐窝生态位必需的生长因子的扩增培养基(expansion culture medium)中, 可以培养出富含LGR5⁺干细胞和TA细胞的类器官, 将培养基换成特定的分化培养基(differentiation culture medium)一周后, 可以培养出包含多种细胞类型的类器官, 准确地模拟了肠道细胞类型的多样性^[31,42]。

2011年, CLEVERS团队^[8]进一步将鼠源的类器官培养体系应用于人, 成功建立首个人源肠道干细胞来源的肠道类器官, 证实其与小鼠模型的相似性(如干细胞标志物表达、细胞谱系分化能力)。此后, CLEVERS团队对培养方案进行了优化, 成功培养出更加成熟的肠道类器官, 这些类器官包含多种细胞类型, 包括潘氏细胞^[31]、杯状细胞、肠内分泌细胞、簇细胞以及BEST4/CA7⁺细胞^[42]等, 准确地模拟了肠道细胞类型的多样性。

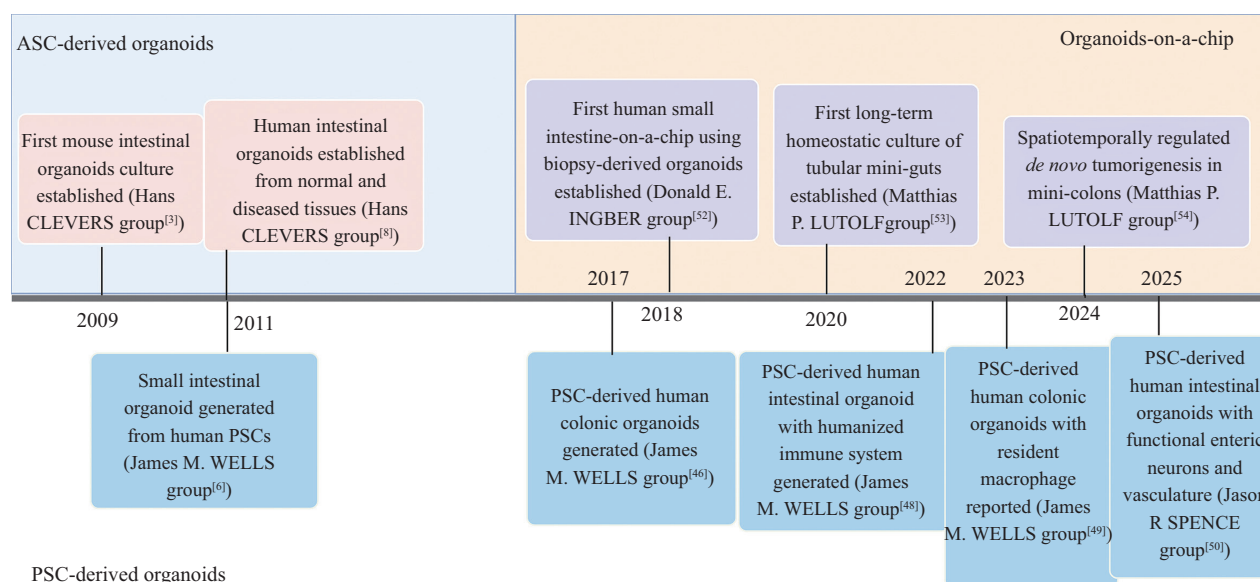


图3 肠道类器官发展的关键时间线(该图在BioRender.com上绘制)

Fig.3 The key timeline of the development of intestinal organoids (this figure was created in BioRender.com)

为了更全面地模拟肠道微环境,科研人员开始尝试将免疫细胞、成纤维细胞和神经细胞等多种细胞类型于肠道上皮细胞共培养。比如,2018年,VOEST团队^[43]将肠道上皮类器官与免疫细胞共培养,以构建免疫微环境或进行免疫疗法测试;2021年,IMAI团队^[44]将CRC类器官和成纤维细胞共培养来评估肿瘤细胞与肿瘤组织中肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)之间的相互作用;2022年,DENG团队^[45]将肠道类器官与神经细胞共培养以研究旁分泌信号转导效应。

2.2 多能干细胞来源的肠道类器官

多能干细胞包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),具有分化为三个胚层(即外胚层、中胚层和内胚层)的能力。通过模拟胚胎肠道发育,可以逐步将PSCs分化为肠道组织^[7]。

2011年,WELLS团队^[6]通过模拟胚胎肠道发育,将PSCs定向诱导分化为人类肠道类器官(human intestinal organoids, HIOs),首次实现了全流程体外肠道类器官生成,奠定了PSCs来源的肠道类器官技术基础。通过略微修改,2017年WELLS团队^[46]和CHEN团队^[47]分别报道了PSCs衍生的人结肠类器官(human colonic organoids, HCOs)。这两种PSCs衍生的肠道类器官具有来自多个组织谱系的细胞,包括内胚层来源的上皮细胞和中胚层来源的间充质细胞,但缺乏复杂的组织和一些对肠道功能至关重要的重

要细胞类型,例如神经元、内皮细胞和有组织的平滑肌细胞,也没有血管组成。

成人消化道内驻留着种类繁多的髓系和淋巴系免疫细胞,这些细胞在维持肠道稳态和应对疾病中扮演着核心角色。众多消化道疾病,尤其是IBD的发生发展,均与免疫系统的异常激活和失调密切相关。然而,传统由人类多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)分化而来的肠道类器官模型存在一个关键局限:缺乏组织驻留的免疫细胞成分。针对这一局限,HELMRATH和WELLS团队^[48]在2022年将来源于多能干细胞的HIOs移植到具有人源化免疫系统的小鼠的肾囊中,成功建立了具有功能性人体免疫组织的下一代HIOs体内模型,为建立免疫化类器官模型提供了一种新方法。2023年,WELLS团队^[49]取得了突破性进展,他们通过优化高密度培养条件并精确调控关键信号通路,首次在HCOs中成功重建了包含功能性免疫细胞的微环境,在体外重现了从造血内皮(hemogenic endothelium, HE)到功能性组织驻留巨噬细胞(macrophages)的完整分化过程,实现了类器官-免疫共培养。这项技术不仅实现了肠类器官与组织驻留免疫细胞的协同发育,更重要的是,它被确立为研究炎症性疾病以及探索组织驻留免疫细胞发育机制的有效模型,为基础研究提供了强大的新工具。

2025年,美国密歇根大学SPENCE团队^[50]在构建结构完整的肠道微结构类器官模型方面取得突破

性进展。该团队首次成功实现了PSC来源的HIOs中多种细胞成分的协同分化,包括上皮细胞、间质细胞、功能性肠神经元、内皮细胞以及有序排列的平滑肌层。由此构建的HIOs模型在三维结构和细胞组成上均高度模拟了天然人类肠道组织的特征,显著提升了类器官模拟体内微环境的仿生能力。该研究团队通过关键生长因子EREG的定向调控,在体外实现了上述多细胞谱系的同步发育,突破了传统HIOs缺乏神经和血管系统的技术瓶颈。在移植实验中,该类器官被植入免疫缺陷型NSG小鼠肾包膜下后,展现出显著的体内成熟能力:(1) 移植HIOs沿隐窝-绒毛轴完成组织重构,细胞多样性指数提升,形成更加成熟、复杂的人体模型;(2) 移植HIOs形成具备自主收缩功能的神经-肌肉网络,可以检测到自发性、节律性收缩,类似于真实肠道的蠕动运动;(3) 移植HIOs可以在微流控系统中建立灌流血管通路,具备真实的“输血”能力。值得注意的是,该模型首次实现了类器官与宿主循环系统的动态交互,移植HIOs的血管内皮细胞与小鼠宿主血管系统实现功能性吻合。这个功能增强的HIOs模型系统意味着类器官技术向功能性“微型器官”跨越了一大步,为多种疾病比如肠道动力障碍、神经源性和肌源性功能障碍(例如,先天性巨结肠、肠闭锁和狭窄)、药物诱导的运动障碍,以及其他涉及多个组织谱系的复杂肠道病理生理学提供了更加接近真实情况的实验模型。

2.3 肠道类器官芯片

类器官芯片(organoids-on-a-chip)是类器官技术与工程学方法交叉融合形成的重要前沿研究方向。相较于传统的基质胶包埋培养,微流控芯片技术能够实现对生长因子的精准浓度控制,促进类器官发育并形成开放的管腔结构,从而更准确地模拟体内组织微环境的动态特征^[51]。

2018年,INGBER团队^[52]通过整合活检组织衍生小肠类器官与微流控芯片技术,构建了全球首个双通道原代小肠芯片(intestine chip)。该芯片采用回肠活检细胞构建三维类器官,通过双通道系统模拟肠道生理环境:上皮通道模拟肠上皮屏障及蠕动样机械应变;血管通道维持氧气梯度,支持宿主-微生物互作及药物响应研究。

2020年9月瑞士洛桑理工学院的LUTOLF团队^[53]将小肠干细胞与模拟肠道形态的水凝胶支架结合,诱导这些细胞形成具有小肠绒毛结构和隐

窝结构的功能性肠上皮类器官,简称为迷你小肠(mini-guts)。mini-guts能更好地模拟小肠的形状、大小和功能,存在传统类器官中罕见或不存在的细胞类型,在经历辐照损伤后,mini-guts也展现出显著的再生能力,能够维持其增殖和自我更新潜能。当mini-guts与外部抽水系统连接时,可进行灌洗,以去除内部死细胞,从而将组织的寿命延长至数周。由于管腔内部就是模拟肠腔接触食物的一面,模拟的肠腔可以被微生物定植。mini-guts可以作为一个模型研究肠道-病原微生物互作机制,团队利用该模型明确了mini-guts的再生能力及作为小隐孢子虫等寄生虫感染模型的潜力,为疾病建模开辟了新的前景。2024年,LUTOLF团队^[54]进一步拓展了这种肠道类器官芯片在肿瘤研究中的应用,其通过整合微加工、光遗传学和组织工程方法,在体外开发了一种能够模拟肿瘤发生的迷你结肠(mini-colons)。这个mini-colons显示出丰富的瘤内和瘤间多样性,并有效再现了CRC在体内表现出的关键病理生理学特征。利用该项系统,研究者们可在单细胞分辨率水平,直接通过光控制,实现对肿瘤生成的长达数周的追踪,为生物体外的癌症起始研究铺平了道路。2025年,LUTOLF团队^[55]将健康的人类结肠细胞和来自患者活检组织的CRC细胞接种于该装置,制备了一种具有拓扑生物学复杂性、患者特异性的结直肠癌迷你类器官(CRC mini-colons)。这个器官芯片的模型变化整体不大,但是里面包括了肿瘤细胞、CAF、肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)以及健康的组织,可以更好地对CRC及其肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)进行建模。这种特异性的mini-colons克服了传统类器官的许多局限性,能够长期模拟肿瘤微环境的复杂性,为药物筛选、个体化治疗和肿瘤微环境研究提供了一个强大的新工具。

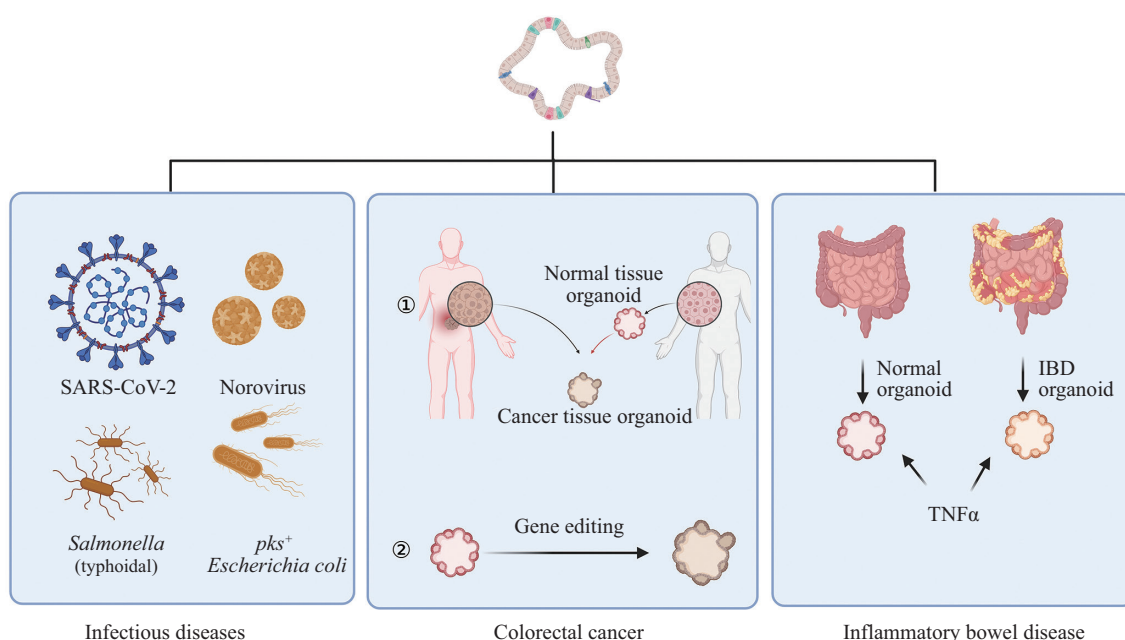
3 肠道类器官在疾病研究中的应用

如图4所示,肠道类器官模型在多种疾病研究中展现出独特价值,其应用已广泛涵盖感染性疾病、结直肠癌及炎症性肠病等多个领域。

3.1 感染性疾病

特定病毒在宿主体内通常表现出细胞嗜性,即倾向于感染特定的细胞类型。例如,诺如病毒(noro-

Applications of intestinal organoids in disease research



①从患者肠道肿瘤组织中分离并培养而成的的肿瘤类器官; ②通过基因编辑技术引入特定的肿瘤相关突变形成的肿瘤类器官。
① Tumor organoids derived from the isolation and culture of patient-derived intestinal tumor tissues; ② Tumor organoids generated by introducing specific tumor-associated mutations using gene editing techniques.

图4 肠道类器官在疾病研究中的应用示意图(该图在BioRender.com上绘制)

Fig.4 Schematic diagram illustrating the application of intestinal organoids in disease research (this figure was created in BioRender.com)

virus)^[13]主要靶向肠道上皮细胞和肠内分泌细胞; 轮状病毒(rotavirus)^[56]主要靶向肠道上皮细胞。肠道类器官作为一种体外三维培养模型, 其细胞组成包含了这些病毒的潜在靶细胞。此外, 该类器官能够维持肠道上皮的关键特征, 包括细胞极性、完整的屏障功能以及相关病毒受体的表达模式。这些特性为在体外研究病毒识别、结合及入侵宿主细胞的分子机制提供了可能性。作为高度模拟肠道上皮生理结构与功能的体外系统, 肠道类器官已被证明是研究病毒感染、细菌感染及其宿主相互作用机制的有力工具。

人诺如病毒(human noroviruses, HuNoVs)是全球病毒性胃肠炎的主要原因之一, 然而自1968年发现诺如病毒以来, 长期以来缺乏理想的体外培养系统^[57]。2016年, ESTES团队^[13]首次利用人肠道类器官(human intestinal enteroid, HIE)实现了HuNoVs的稳定体外培养。这项研究的重要发现包括: 通过将多种HuNoVs毒株接种至HIE单层细胞后24小时内, 病毒基因组拷贝数显著增加, 表明病毒在HIE中成功复制; 胆汁酸作为肠道微环境的关键组分, 对特定

HuNoVs毒株的感染与复制至关重要; 同时, 宿主细胞表达的组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)是病毒感染的先决条件, 其表达模式也影响病毒的宿主范围和复制效率; 此外, HuNoVs的感染性可通过辐照、热处理及特异性抗体介导的血清中和作用等多种方法有效消除。该培养系统重现了人肠道上皮, 使得以前无法培养的病原体的人体宿主-病原体研究成为可能, 并为评估预防、治疗HuNoVs感染的方法提供了平台, 推动了对其生物学、免疫学和发病机制的研究。

肠道类器官不仅被广泛用于病毒感染机制研究, 也已成为探索微生物与肠上皮细胞间相互作用的重要工具。一个典型的应用实例是研究合成大肠杆菌素(colibactin)的 pks^+ 大肠杆菌菌株与宿主细胞互作及其引发的遗传损伤。 pks^+ 大肠杆菌菌株能够合成一种名为Colibactin的基因毒物质, 这种物质可在宿主细胞内诱导DNA损伤, 从而促进基因突变。研究显示, 在长达五个月的肠道类器官与 pks^+ 大肠杆菌的共培养实验中, 宿主细胞的突变积累速率增加, 且其出现了与CRC相关的特定突变特征, 这表明 pks^+ 大

肠杆菌菌株与结直肠癌的发生存在直接关联^[58-59]。此外, 肠道类器官体外模型也被用于研究其他微生物(如隐孢子虫^[60]、沙门氏菌^[61]、艰难梭菌^[62]等)与肠上皮的相互作用, 以深入理解其与肠道上皮的合作机制。

3.2 结直肠癌

结直肠癌是全球范围内常见的恶性肿瘤之一, 其治疗面临肿瘤异质性、耐药性和复发率高等挑战。传统的体外研究模型, 如二维细胞培养和动物模型, 虽然在一定程度上为CRC的研究提供了帮助, 但它们存在一定的局限性, 例如缺乏肿瘤的三维结构、细胞间的相互作用以及肿瘤微环境的模拟。CRC是调节成体干细胞生长的基因连续突变积累的结果, 其发展过程体现了从正常细胞到浸润性、转移性癌细胞的逐步转变, 这一过程被称为腺瘤-癌序列(adenoma-carcinoma sequence)。在这个过程中, 一系列的基因突变累积导致细胞恶性转化, 其中最著名的是Vogelgram模型, 它描述了从良性腺瘤到侵袭性腺癌的逐步遗传变化^[63]。CRC病例主要分为两大遗传不稳定类别; 85%的散发性CRC显示染色体不稳定性(chromosomal instability, CIN), 而15%的CRC超突变并显示微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)。CIN的CRC携带*APC*、*TP53*、*KRAS*和*Smad4*和*PIK3CA*等常见驱动基因突变的组合^[64-65]。MSI是指由于DNA错配修复(mismatch repair, MMR)系统功能缺陷导致微卫星区域的DNA序列长度发生改变的现象。MSI-H(MSI-high)的肿瘤具有高度突变的特性, MSI-H CRC的常见驱动基因突变与CIN肿瘤有所不同, 常见的MSI-H相关突变包括*ACVR2A*、*TGFBR2*、*AXIN1*、*AXIN2*、*BMPR2*和*BRAF*等在CIN肿瘤中很少见到^[65-67]。MSI是由体细胞突变导致MMR基因(例如*MLH1*、*MSH2*、*MSH3*、*MSH6*和*PMS2*)失活引起的, 具有遗传性种系突变(即Lynch综合征)的人患癌症的风险增加^[68]。在构建结直肠癌类器官模型中, 研究人员主要采用两种策略: 一是利用源自患者肿瘤组织的类器官再现并研究病人已形成肿瘤的病理生理特征; 二是通过对健康供体来源的肠道类器官进行CRISPR/Cas9等基因组编辑技术改造, 模拟驱动CRC发生的关键基因突变, 从而在体外逐步重现肿瘤发生过程, 剖析癌变的早期机制。

2015年, CLEVERS团队^[5]开创性地建立了首个

源自CRC患者的活体类器官生物库。该研究成功从连续的20例CRC患者中培养出肿瘤类器官, 并为其中大多数患者建立了相应的正常组织类器官。研究证实, 患者来源的肿瘤类器官能够保留原发肿瘤的多种关键特征, 包括基因组变异、突变谱系及分子亚型分类。基于此平台, 研究者还进行了高通量药物敏感性测试。此外, 科学家们将CRC类器官作为癌症的转录模型。研究人员通过深入探究癌症关键标志性特征(如细胞可塑性、休眠、化疗耐药及侵袭性)的分子机制, 揭示了异常RNA剪接以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的组成改变与动态重塑在驱动疾病进展和复发中的重要作用; 这些发现为开发新型治疗策略提供了潜在的靶点^[69-71]。利用患者来源的CRC类器官, 研究者得以探究EGFR、MAPK及Wnt等核心信号通路失调的功能影响, 并据此筛选出针对这些通路的新小分子或双特异性抗体等候选药物^[72-75]。

科研人员进一步利用CRISPR/Cas9技术对正常肠道类器官进行体外基因编辑, 构建了模拟CIN型CRC发展的多阶段癌变模型, 旨在解析CIN型CRC发生与演变的驱动基因作用机制。同样在2015年, CLEVERS团队^[16]在人源肠道类器官中证实, 引入AKPS四重突变(即*APC*、*KRAS*、*TP53*和*Smad4*基因突变)可诱导类器官呈现高度侵袭性表型, 此发现提示仅通过四个致癌性突变便足以使正常肠道细胞演变为侵袭性肿瘤细胞。然而, SATO等^[19]的研究表明, 尽管通过CRISPR/Cas9技术构建的生物工程肿瘤类器官具有特定表型, 但其转移潜能显著低于PDOs, 这表明形成更具侵袭性的肿瘤可能需要除AKPS四重突变之外的额外遗传或表观遗传驱动因素。关键差异可能源于(1) 肿瘤异质性缺失: 基因编辑类器官通常来源于单一克隆, 具有遗传同质性, 缺乏PDOs中存在的、在体内肿瘤进化过程中经自然选择产生的、具有促转移潜能的亚克隆多样性^[5]; (2) TME缺失: 基因编辑类器官模型多为纯上皮细胞培养, 缺少PDOs中常存在的基质/免疫细胞及其赋予的促侵袭信号或细胞“印记”^[76]; (3) 基因编辑类器官起始于正常细胞, 其表观遗传景观难以完全模拟PDOs中肿瘤特异性、长期进化形成的调控网络^[77]。因此, 该发现强调了侵袭转移是遗传突变、表观遗传重塑及TME互作共同驱动的复杂过程。仅靠核心驱动突变足以构建恶性类器官, 但要精准模拟高转移行为, 需整合更

全面的驱动因素和生理性微环境^[78]。这提示未来需采用更复杂的策略,如多基因编辑、共培养、类器官芯片等来开发转移模型。2024年,CLEVERS团队^[79]从单个*MLH1*基因敲除的MMR缺陷人结肠类器官出发,通过在培养体系中移除关键生态位因子(如Wnt、R-spondin 1、EGF和Noggin)或添加小分子p53抑制剂Nutlin-3施加选择性压力,从*MLH1*缺陷的类器官中成功筛选获得了自发致癌突变的类器官。该方法模拟了MSI-H型CRC的自然突变累积过程,不仅有助于阐明其独特的突变谱系及肿瘤发生发展路径,亦可能为未来肿瘤治疗策略的制定提供新的分子靶点与干预思路。尤为重要的是,该研究通过这种选择性压力诱导,在单细胞分辨率下追踪了从单一MMR基因*MLH1*缺陷的干细胞起始,逐步累积获得*APC/KRAS/Smad4/TP53*等关键驱动突变,最终演化为具有完全恶性表型的类器官的全过程。这种对MSI-H CRC恶性转化“全链条”的体外动态观察,为理解该亚型肿瘤的发生机制提供了独特且强大的平台。

CRC中,MSI-H型肿瘤因高肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)及免疫浸润性微环境(富含CD8⁺ T细胞),对PD-1/PD-L1抑制剂显著响应;而CIN型因免疫抑制微环境[调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)和髓系来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)增多、低TMB及抗原呈递缺陷]对免疫检查点抑制剂耐药^[80-81]。此后的研究中,科学家用PDOs通过重建肿瘤特异性免疫微环境,为解析该差异提供了关键模型:MSI-H型类器官共培养实验证实,PD-1阻断能够显著激活T细胞介导的杀伤作用(响应率>80%),精准预测临床疗效;CIN型类器官揭示免疫抑制细胞介导的耐药机制,并用于开发联合策略以逆转耐药^[43,76]。类器官模型已成为推动CRC精准免疫治疗的核心平台,为克服CIN型耐药提供了转化路径。

3.3 炎症性肠病

IBD包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC),是一类慢性、复发性炎症性疾病^[82]。UC主要累及大肠,表现为弥漫性黏膜炎症;而CD可累及胃肠道的任何部位,但以末端回肠多见,其特征为不连续的炎症性病变^[83]。IBD的发病机制涉及遗传易感性、肠道微生物群失调、免疫失衡和肠道屏障功能障碍的复杂相互作用,其确切病因

尚未完全阐明。值得注意的是,相当一部分的IBD患者对现有药物治疗无应答^[84]。传统的二维细胞培养模型和动物模型在模拟IBD病理特征方面存在局限性,难以充分阐释环境因素、宿主遗传背景、肠道细胞功能及邻近微生物群之间复杂的相互作用如何共同驱动IBD表型的发生和发展^[85]。类器官技术的兴起为IBD研究提供了更贴近人类生理状态的体外模型。患者来源的类器官能够在早期初次传代中高度保留原始组织的遗传变异,并重现CD和UC的基因组、转录组和分泌组特征^[86-87]。因此,该类器官已被广泛应用于探究IBD的遗传相关发病机制^[17]。

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF α)被认为是CD发病过程中介导组织损伤的主要效应因子。研究通过比较CD患者与健康对照者来源的肠道类器官在TNF α 刺激下的反应(涵盖细胞活力、基因表达谱及再生能力等指标),揭示了TNF α 的多重生物学作用——诱导细胞死亡、改变干细胞亚群组成、调控基因表达及破坏肠道屏障功能等。这些效应共同导致肠道损伤及修复障碍,在CD的发病机制中发挥关键角色^[88]。

肠纤维化是IBD的常见并发症,其确切发生机制尚未完全明确。2024年,有研究利用PDOs成功构建了稳定的IBD纤维化模型^[89]。通过联合应用TNF α 和TGF- β 1刺激,该研究在PDOs中成功诱导出了纤维化反应,并利用多种分子生物学和形态学方法验证了模型的有效性。该研究不仅证明了PDOs在模拟肠道纤维化方面的潜力,还揭示了CD来源PDOs在纤维化过程中的独特基因表达特征,为深入探究IBD纤维化机制提供了新方向。

IBD类器官不仅用于疾病机制研究,也是药物测试的有力工具。在结肠类器官模型中验证有效的IBD治疗药物,有助于提高其后续临床转化的成功率,为后续的临床转化提供更有力的支持^[90-92]。在精准医学领域,源自IBD患者ISCs或iPSCs的结肠类器官主要用于药物敏感性测试^[91]。此外,患者来源结肠类器官在IBD治疗中展现出应用前景,例如通过移植健康类器官修复受损肠上皮,或利用基因治疗手段调控异常的信号通路^[93-94]。

4 挑战与展望

近些年来,肠道类器官作为一种快速发展的体外三维培养系统,因其能够高度模拟肠道组织的结

构和功能, 为研究提供了接近生理状态的模型, 已在疾病建模、药物筛选等多个领域展现出显著潜力。然而, 目前该类器官模型尚未广泛应用于临床诊断或治疗决策, 主要在于技术本身仍面临一系列关键挑战。

具体而言, 肠道类器官技术当前的主要瓶颈体现在以下几个方面。第一, 模型简化与功能性限制: ASC来源类器官主要由上皮细胞组成, 缺乏功能性免疫细胞、神经细胞及脉管系统(如血管内皮细胞)等关键组分, 并且其干细胞/分化细胞比例、分泌型/吸收型细胞平衡常偏离生理状态^[95]; 而PSC衍生类器官虽可整合包括神经元、平滑肌在内的多谱系细胞, 但这些细胞的空间排布及功能协同性仍低于体内水平, 并且其上皮细胞等谱系的成熟度通常也低于ASC来源的类器官; 此外, PSC类器官在体外同样难以完全模拟肠道的免疫微环境, 目前开发的有组织驻留免疫细胞的肠道类器官拥有的免疫细胞类型过于单一^[49-50]。第二, 肠道功能依赖于上皮-间质-免疫-神经-微生物群的动态互作, 现有培养技术仍存在一些问题: 动物来源的基质胶不仅生化成分固定、批次差异大, 无法动态模拟体内ECM的时空重塑(如纤维化中的胶原沉积), 其异种成分也限制了类器官在临床应用中的潜力; 流体力学缺失, 传统静态培养缺乏肠腔流体剪切力、蠕动机械应力, 影响黏液层形成、细胞极性和药物吸收评估; 微生物群互作瓶颈, 长期共培养中微生物过度生长导致类器官溶解, 且厌氧菌(如脆弱拟杆菌)的体外维持难度大, 限制了类器官-微生物的互作研究的深入开展。第三, 共培养技术瓶颈: 不同细胞类型(如肠道上皮细胞、免疫细胞、血管内皮细胞、神经元、成纤维细胞)或者微生物在增殖速率、生长因子需求、基质依赖性和氧张力偏好等方面存在显著差异, 导致在类器官体系中实现稳定、可控的多细胞共培养面临巨大困难, 这严重限制了其对体内复杂细胞组成的模拟^[2,96]。面对这些挑战, 将类器官技术与材料科学、微流控技术和生物工程等前沿领域相融合, 被视为突破当前局限的关键途径。这种多学科交叉融合有望克服上述障碍, 显著提升类器官模型的仿真度和应用价值, 从而推动其向更成熟的方向发展。

此外, 肠道类器官的临床转化也面临诸多挑战, 尤其在技术成熟度、伦理规范等维度存在瓶颈。在技术层面, CRC类器官在药敏测试中的临床吻合率

较高(>80%), 显示出其在癌症治疗中的潜在价值; 然而, 对于IBD等复杂疾病的类器官, 其预测效力尚显不足, 且在移植应用中受到血管化不足和免疫排斥等技术难题的限制^[93,97]。伦理层面, 移植CRISPR基因编辑类器官的脱靶效应很可能会增加致癌风险, 并且肠道类器官包含患者全基因组、微生物组数据, 商业机构二次利用的知情同意边界模糊。国家应该设立监管, 建立类器官生成质量标准, 强制基因编辑脱靶监测, 并且探索“患者-企业-监管机构”三方数据共享协议框架, 使用区块链平台构建动态知情同意管理系统, 规范类器官的使用伦理, 加快类器官的临床转化。

总之, 肠道类器官的发展前景广阔, 未来有望成为推动肠道疾病研究和临床转化的重要平台。随着技术的不断进步, 肠道类器官将在多个领域发挥更大的作用, 为深入理解肠道疾病机制、开发新型疗法提供强大工具。

参考文献 (References)

- [1] PETERSON L W, ARTIS D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 141-53.
- [2] 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.
- [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] HUANG L, BERNINK J H, GILADI A, et al. Tuft cells act as regenerative stem cells in the human intestine [J]. *Nature*, 2024, 634(8035): 929-35.
- [5] VAN DE WETERING M, FRANCIES H E, FRANCIS J M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients [J]. *Cell*, 2015, 161(4): 933-45.
- [6] SPENCE J R, MAYHEW C N, RANKIN S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro* [J]. *Nature*, 2011, 470(7332): 105-9.
- [7] SUGIHARA H Y, OKAMOTO R, MIZUTANI T. Intestinal organoids: the path towards clinical application [J]. *Eur J Cell Biol*, 2025, 104(1): 151474.
- [8] SATO T, STANGE D E, FERRANTE M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762-72.
- [9] FUJII M, MATANO M, TOSHIMITSU K, et al. Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 787-93.e6.
- [10] BEAURIVAGE C, KANAPECKAITE A, LOOMANS C, et al. Development of a human primary gut-on-a-chip to model inflam-

- matory processes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21475.
- [11] MORIKAWA R, NEMOTO Y, YONEMOTO Y, et al. Intraepithelial lymphocytes suppress intestinal tumor growth by cell-to-cell contact via CD103/E-Cadherin signal [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11(5): 1483-503.
 - [12] POLAK R, ZHANG E T, KUO C J. Cancer organoids 2.0: modelling the complexity of the tumour immune microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24(8): 523-39.
 - [13] 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.
 - [14] LESLIE J L, HUANG S, OPP J S, et al. Persistence and toxin production by *Clostridium difficile* within human intestinal organoids result in disruption of epithelial paracellular barrier function [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(1): 138-45.
 - [15] DEKKERS J F, BERKERS G, KRUISSELBRINK E, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(344): 344ra84.
 - [16] DROST J, VAN JAARSVELD R H, PONSIOEN B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells [J]. *Nature*, 2015, 521(7550): 43-7.
 - [17] SARVESTANI S K, SIGNS S, HU B, et al. Induced organoids derived from patients with ulcerative colitis recapitulate colitic reactivity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 262.
 - [18] 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.
 - [19] MATANO M, DATE S, SHIMOKAWA M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256-62.
 - [20] HOU Q, JIA J, LIN J, et al. *Bacillus subtilis* programs the differentiation of intestinal secretory lineages to inhibit *Salmonella* infection [J]. *Cell Rep*, 2022, 40(13): 111416.
 - [21] ROSSI G, MANFRIN A, LUTOLF M P. Progress and potential in organoid research [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(11): 671-87.
 - [22] HICKEY J W, BECKER W R, NEVINS S A, et al. Organization of the human intestine at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2023, 619(7970): 572-84.
 - [23] BEUMER J, CLEVERS H. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(1): 39-53.
 - [24] BARKER N, VAN DE WETERING M, CLEVERS H. The intestinal stem cell [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(14): 1856-64.
 - [25] 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.
 - [26] BUCZACKI S J, ZECCHINI H I, NICHOLSON A M, et al. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing *Lgr5* [J]. *Nature*, 2013, 495(7439): 65-9.
 - [27] MALONGA T, VIALANEIX N, BEAUMONT M. BEST4⁺ cells in the intestinal epithelium [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2024, 326(5): C1345-C52.
 - [28] CLEVERS H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 274-84.
 - [29] GEHART H, CLEVERS H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(1): 19-34.
 - [30] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/beta-Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-99.
 - [31] HE G W, LIN L, DEMARTINO J, et al. Optimized human intestinal organoid model reveals interleukin-22-dependency of paneth cell formation [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(12): 1718-20.
 - [32] KABIRI Z, GREICIUS G, MADAN B, et al. Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts [J]. *Development*, 2014, 141(11): 2206-15.
 - [33] PELLEGRINET L, RODILLA V, LIU Z, et al. Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(4): 1230-40, e1-7.
 - [34] DOU Y, PIZARRO T, ZHOU L. Organoids as a model system for studying Notch signaling in intestinal epithelial homeostasis and intestinal cancer [J]. *Am J Pathol*, 2022, 192(10): 1347-57.
 - [35] SANCHO R, CREMONA C A, BEHRENS A. Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(5): 571-81.
 - [36] SATO T, VAN ES J H, SNIPPERT H J, et al. Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 415-8.
 - [37] VAN ES J H, VAN GIJN M E, RICCIO O, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 959-63.
 - [38] RAYEGO-MATEOS S, RODRIGUES-DIEZ R, MORGADO-PASCUAL J L, et al. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its ligands in kidney inflammation and damage [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 8739473.
 - [39] BEUMER J, PUSCHHOF J, YENGEF F Y, et al. BMP gradient along the intestinal villus axis controls zonated enterocyte and goblet cell states [J]. *Cell Rep*, 2022, 38(9): 110438.
 - [40] QI Z, LI Y, ZHAO B, et al. BMP restricts stemness of intestinal *Lgr5*⁺ stem cells by directly suppressing their signature genes [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 13824.
 - [41] URBISCHEK M, RANNIKMAE H, FOETS T, et al. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6193.
 - [42] WANG D, SPOELSTRA W K, LIN L, et al. Interferon-responsive intestinal BEST4/CA7⁺ cells are targets of bacterial diarrheal toxins [J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(4): 598-612, e5.
 - [43] 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.
 - [44] NARUSE M, OCHIAI M, SEKINE S, et al. Re-expression of REG family and DUOXs genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 2077.
 - [45] LEI C, SUN R, XU G, et al. Enteric VIP-producing neurons maintain gut microbiota homeostasis through regulating epithelium fucosylation [J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(10): 1417-34, e8.
 - [46] MUNERA J O, SUNDARAM N, RANKIN S A, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells into colonic organoids via

- transient activation of BMP signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(1): 51-64, e6.
- [47] CRESPO M, VILAR E, TSAI S Y, et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing [J]. *Nat Med*, 2017, 23(7): 878-84.
- [48] BOUFFI C, WIKENHEISER-BROKAMP K A, CHATURVEDI P, et al. *In vivo* development of immune tissue in human intestinal organoids transplanted into humanized mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(6): 824-31.
- [49] MUNERA J O, KECHELE D O, BOUFFI C, et al. Development of functional resident macrophages in human pluripotent stem cell-derived colonic organoids and human fetal colon [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(11): 1434-51, e9.
- [50] CHILDS C J, POLING H M, CHEN K, et al. Coordinated differentiation of human intestinal organoids with functional enteric neurons and vasculature [J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(4): 640-51, e9.
- [51] OZKAN A, LOGRANDE N T, FEITOR J F, et al. Intestinal organ chips for disease modelling and personalized medicine [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2024, 21(11): 751-73.
- [52] KASENDRA M, TOVAGLIERI A, SONTHEIMER-PHELPS A, et al. Development of a primary human small intestine-on-a-chip using biopsy-derived organoids [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2871.
- [53] NIKOLAEV M, MITROFANOVA O, BROGUIERE N, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis [J]. *Nature*, 2020, 585(7826): 574-8.
- [54] LORENZO-MARTIN L F, HUBSCHER T, BOWLER A D, et al. Spatiotemporally resolved colorectal oncogenesis in mini-colons *ex vivo* [J]. *Nature*, 2024, 629(8011): 450-7.
- [55] LORENZO-MARTIN L F, BROGUIERE N, LANGER J, et al. Patient-derived mini-colons enable long-term modeling of tumor-microenvironment complexity [J]. *Nat Biotechnol*, 2025, 43(5): 727-36.
- [56] 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.
- [57] LIN S C, QU L, ETTAYEBI K, et al. Human norovirus exhibits strain-specific sensitivity to host interferon pathways in human intestinal enteroids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(38): 23782-93.
- [58] PLEGUEZUELOS-MANZANO C, PUSCHHOF J, ROSENDAHL HUBER A, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks⁺ *E. coli* [J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 269-73.
- [59] ROSENDAHL HUBER A, PLEGUEZUELOS-MANZANO C, PUSCHHOF J, et al. Improved detection of colibactin-induced mutations by genotoxic *E. coli* in organoids and colorectal cancer [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(3): 487-96, e6.
- [60] 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.
- [61] ZHANG Y G, WU S, XIA Y, et al. Salmonella-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host-bacterial interactions [J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(9): e12147.
- [62] SAAVEDRA P H V, HUANG L, GHAZAVI F, et al. Apoptosis of intestinal epithelial cells restricts *Clostridium difficile* infection in a model of pseudomembranous colitis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4846.
- [63] FEARON E R, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis [J]. *Cell*, 1990, 61(5): 759-67.
- [64] KIM S C, PARK J W, SEO H Y, et al. Multifocal organoid capturing of colon cancer reveals pervasive intratumoral heterogeneous drug responses [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(5): e2103360.
- [65] CANCER GENOME ATLAS N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407): 330-7.
- [66] CORTES-CIRIANO I, LEE S, PARK W Y, et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15180.
- [67] ZAIDI S H, HARRISON T A, PHIPPS A I, et al. Landscape of somatic single nucleotide variants and indels in colorectal cancer and impact on survival [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3644.
- [68] HENDRIKS Y M, DE JONG A E, MORREAU H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians [J]. *CA Cancer J Clin*, 2006, 56(4): 213-25.
- [69] DANG H, HARRYVAN T J, LIAO C Y, et al. Cancer-associated fibroblasts are key determinants of cancer cell invasion in the earliest stage of colorectal cancer [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 16(1): 107-31.
- [70] HALL A E, POHL S O, CAMMARERI P, et al. RNA splicing is a key mediator of tumour cell plasticity and a therapeutic vulnerability in colorectal cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2791.
- [71] OHTA Y, FUJII M, TAKAHASHI S, et al. Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells [J]. *Nature*, 2022, 608(7924): 784-94.
- [72] BERGIN C J, ZOUGGAR A, MENDES DA SILVA A, et al. The dopamine transporter antagonist vanoxerine inhibits G9a and suppresses cancer stem cell functions in colon tumors [J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(3): 463-80.
- [73] HERPERS B, EPPINK B, JAMES M I, et al. Functional patient-derived organoid screenings identify MCLA-158 as a therapeutic EGFR × LGR5 bispecific antibody with efficacy in epithelial tumors [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(4): 418-36.
- [74] PONSIOEN B, POST J B, BUISSANT DES AMORIE J R, et al. Quantifying single-cell ERK dynamics in colorectal cancer organoids reveals EGFR as an amplifier of oncogenic MAPK pathway signalling [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(4): 377-90.
- [75] TRAN T Q, HANSE E A, HABOWSKI A N, et al. alpha-Ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer [J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(3): 345-58.
- [76] NEAL J T, LI X, ZHU J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-88, e16.
- [77] TOSHIMITSU K, TAKANO A, FUJII M, et al. Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(6): 605-14.
- [78] FUMAGALLI A, DROST J, SUIJKERBUIJK S J, et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(12): E2357-E64.
- [79] MIZUTANI T, BORETTO M, LIM S, et al. Recapitulating the adenoma-carcinoma sequence by selection of four spontaneous oncogenic mutations in mismatch-repair-deficient human colon

- organoids [J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(12): 1852-67.
- [80] ASAOKA Y, IJICHI H, KOIKE K. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(20): 1979.
- [81] LE D T, DURHAM J N, SMITH K N, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade [J]. *Science*, 2017, 357(6349): 409-13.
- [82] LIU J Z, VAN SOMMEREN S, HUANG H, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(9): 979-86.
- [83] XAVIER R J, PODOLSKY D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 427-34.
- [84] ORDAS I, ECKMANN L, TALAMINI M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-19.
- [85] HOWELL K J, KRAICZY J, NAYAK K M, et al. DNA methylation and transcription patterns in intestinal epithelial cells from pediatric patients with inflammatory bowel diseases differentiate disease subtypes and associate with outcome [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(3): 585-98.
- [86] D'ALDEBERT E, QUARANTA M, SEBERT M, et al. Characterization of human colon organoids from inflammatory bowel disease patients [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 363.
- [87] NIKLINSKA-SCHIRTZ B J, VENKATESWARAN S, ANBAZHAGAN M, et al. Ileal derived organoids from Crohn's disease patients show unique transcriptomic and secretomic signatures [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(4): 1267-80.
- [88] LEE C, AN M, JOUNG J G, et al. TNF α induces LGR5⁺ stem cell dysfunction in patients with Crohn's disease [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(3): 789-808.
- [89] LAUDADIO I, CARISSIMI C, SCAFA N, et al. Characterization of patient-derived intestinal organoids for modelling fibrosis in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Res*, 2024, 73(8): 1359-70.
- [90] BAKER E J, BECK N A, BERG E L, et al. Advancing nonclinical innovation and safety in pharmaceutical testing [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(2): 624-8.
- [91] MOCHEL J P, JERGENS A E, KINGSBURY D, et al. Intestinal stem cells to advance drug development, precision, and regenerative medicine: a paradigm shift in translational research [J]. *AAPS J*, 2017, 20(1): 17.
- [92] KOPPER J J, IENNARELLA-SERVANTEZ C, JERGENS A E, et al. Harnessing the biology of canine intestinal organoids to heighten understanding of inflammatory bowel disease pathogenesis and accelerate drug discovery: a one health approach [J]. *Front Toxicol*, 2021, 3: 773953.
- [93] YOO J H, DONOWITZ M. Intestinal enteroids/organoids: a novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(30): 4125-47.
- [94] TIAN C M, YANG M F, XU H M, et al. Stem cell-derived intestinal organoids: a novel modality for IBD [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 255.
- [95] SERRA D, MAYR U, BONI A, et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development [J]. *Nature*, 2019, 569(7754): 66-72.
- [96] WANG Q, GUO F, ZHANG Q, et al. Organoids in gastrointestinal diseases: from bench to clinic [J]. *MedComm*, 2024, 5(7): e574.
- [97] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. *Science*, 2018, 359(6378): 920-6.