

肝脏类器官及其在人嗜肝病毒感染性肝病研究中的应用

陈善梅¹ 张文婕¹ 汪旻¹ 袁利利¹ 郑威² 俞晓平¹ 伍义行^{1*}

(¹浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 中国计量大学生命科学学院药理学/药物评价与细胞计量研究所, 杭州 310018; ²杭州师范大学药学院, 杭州 311121)

摘要 类器官是模拟人体器官结构和功能特征的三维细胞簇, 由于其组成、结构和功能与体内器官接近, 常被视为一种新的“模式生物”, 用于疾病发生机制及药物评价等研究。由干细胞或肝实质细胞在特定细胞外基质及多种信号分子协同作用下形成的肝类器官, 具有人体肝脏作为代谢调控和解毒中心的类似功能。肝类器官常用于研究药物性肝损伤、急/慢性肝炎、脂肪肝以及肝癌等, 但也可用于研究病毒感染性肝病和其他嗜肝性病毒感染引起的肝损伤。鉴于二维细胞感染模型和动物模型的局限性, 类器官被认为是模拟病毒-细胞互作以及宿主细胞免疫反应的理想模型。因此, 该文综述了肝脏类器官及其在嗜肝病毒感染性肝病研究中的应用的进展, 重点聚焦了乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒和新型冠状病毒; 分析了嗜肝病毒的共性特点、肝细胞极性与病毒易感性的关系以及肝类器官病毒感染模型面临的挑战, 以期为人嗜肝病毒感染防治提供参考。

关键词 肝脏类器官; 嗜肝病毒; 病毒易感性; 细胞极性; 病毒模型

Liver Organoid and Its Application in the Study of Liver Diseases Caused by Human Hepatotropic Virus Infection

CHEN Shanmei¹, ZHANG Wenjie¹, WANG Yang¹, YUAN Lili¹, ZHENG Wei², YU Xiaoping¹, WU Yihang^{1*}

(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Institute of Drug Evaluation and Cellular Metrology/Department of Pharmacy, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; ²School of Pharmacy, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

Abstract Organoids are three-dimensional cell clusters that mimic the structure and function of the organs *in vivo*. Due to its composition, structure and function are very close to the organs in the body, it is often seen as a new “model organism” and is used to study the mechanism of disease pathogenesis, drug evaluation and other studies. Liver organoids that formed by stem cells or hepatocytes under the synergy of the specific extracellular matrix and a variety of signaling molecules have similar functions to the human liver as the center of metabolic regulation and detoxification. Liver organoids are commonly used to study drug-induced liver injury, acute/chronic hepatitis, fatty liver disease and liver cancer etc. However, it can also be used to study viral liver disease and the liver injury caused by other hepatotropic virus infections. Given the limitations of two-dimensional cell infection models and animal models, organoids are considered to be an ideal model for mimicking host cell-virus interactions and host

收稿日期: 2025-02-27

接受日期: 2025-04-01

浙江省自然科学基金联合基金重点项目(批准号: LHZSZ24C200001)和国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0108403)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-87676323, E-mail: yihangwu@126.com

Received: February 27, 2025

Accepted: April 1, 2025

This work was supported by the Key Project of the Joint Funds of the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LHZSZ24C200001) and the National Key R&D Program of China (Grant No.2018YFA0108403)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87676323, E-mail: yihangwu@126.com

cell immune responses. Therefore, this article reviews the progress of liver organoids employed in the study of liver diseases caused by hepatotropic virus infection, focusing on hepatitis B virus, hepatitis C virus, hepatitis E virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. In order to provide references for the prevention and treatment of hepatotropic virus infection, this review analyzed common characteristics of hepatotropic virus, the relationship between hepatocyte polarity and viral susceptibility, as well as the challenges in the establishment of liver organoid model induced by hepatotropic virus infection.

Keywords liver organoid; hepatotropic virus; viral susceptibility; cell polarity; virus model

肝脏是人体重要的代谢调控和解毒中心,该系统常受到病毒感染、药物/毒物、饮酒、代谢及自身免疫等多种因素的攻击造成肝功能损害。近年来,肝脏疾病的发病率及致死率居高不下,尤其是由病毒感染导致的慢性肝炎以及其进一步发展形成的肝硬化和肝癌,严重危害人类健康^[1-2]。WHO发布的《2024年全球肝炎报告》显示,全球由病毒性肝炎(乙型和丙型肝炎)造成的死亡人数2022年增长到了130万人,平均每天约3 500人。虽然在抗乙肝疫苗和抗丙肝药物研发方面取得了成功,但肝脏疾病尤其是病毒性肝炎仍是全球重大公共卫生挑战,病毒性肝炎已成为全球第二大致死性传染病。

感染人肝脏的主要病毒包括(1)嗜肝DNA病毒:如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV);(2)嗜肝RNA病毒:如甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV);(3)其他嗜肝病毒:如丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)、戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)、庚型肝炎病毒(hepatitis G virus, HGV)以及巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)、EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)和新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)等。临床上常见的嗜肝病毒为HAV、HBV、HCV、HEV等四种病毒,其中HAV、HEV主要通过粪-口传播,多为摄入被病毒污染的食物而感染发病,一般呈急性过程,经治疗后可痊愈,也可持续感染。HBV、HCV通过血液、母婴及性传播,临床上多呈慢性化过程,可发展成肝硬化以及肝癌。此外,HDV是与HBV共存而不单独存在的一种特殊类型。CMV和EBV感染临床表现和转归与个体免疫状态密切相关,多表现为隐性感染,大部分感染者无明显症状。SARS-CoV-2为暴发流行的新病毒,其感染导致的肝损伤及肝功能障碍备受关注。

病毒通过感染宿主细胞并借助宿主细胞提供的原料、能量和酶等物质,以自我复制方式进行增

殖,同时病毒为了在宿主细胞中扩增而不断感染新的细胞,常表现出逃避免疫反应和控制细胞自噬等能力^[3]。长期以来有关病毒感染的研究往往通过永生化细胞系、原代细胞等二维(2D)培养体系以及动物模型来实现,但这些模型常存在易感性低、稳定性差、复制率低、结果相关性不强等局限性。类器官是由多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)或原代细胞体外分化衍生形成的三维(3D)结构,由器官特异性细胞组成,可再现肝脏等器官的结构和功能^[4-5]。类器官解决了2D单层培养和缺乏体内微环境的问题,提供了更接近生理环境的体外系统,可用于研究细胞与病毒间的相互作用以及宿主细胞的免疫反应等问题^[5]。基于3D培养技术的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs)展示了非凡的自组装能力,由此形成的类器官具有与原始器官类似的结构和功能,因此可通过类器官模拟疾病发生的病理过程和预测药物反应,尤其是患者来源的类器官更具优越性^[6]。为了深入阐明病毒感染的致病过程,以提高对病毒性疾病的防治能力,迫切需要从多维度、多层次解析病毒感染的发生机制以及研制安全有效的疫苗和药物,而类器官模型为此提供了新的选择。

鉴于目前有关肝脏类器官用于HAV、HDV、HGV、CMV和EBV感染的研究鲜有报道,因此,本文重点聚焦肝脏类器官在HBV、HCV、HEV和SARS-CoV-2等嗜肝病毒感染性肝病研究中应用的进展,分析肝类器官感染模型面临的挑战,旨在为嗜肝病毒感染防治提供参考。

1 肝脏类器官的来源及构建

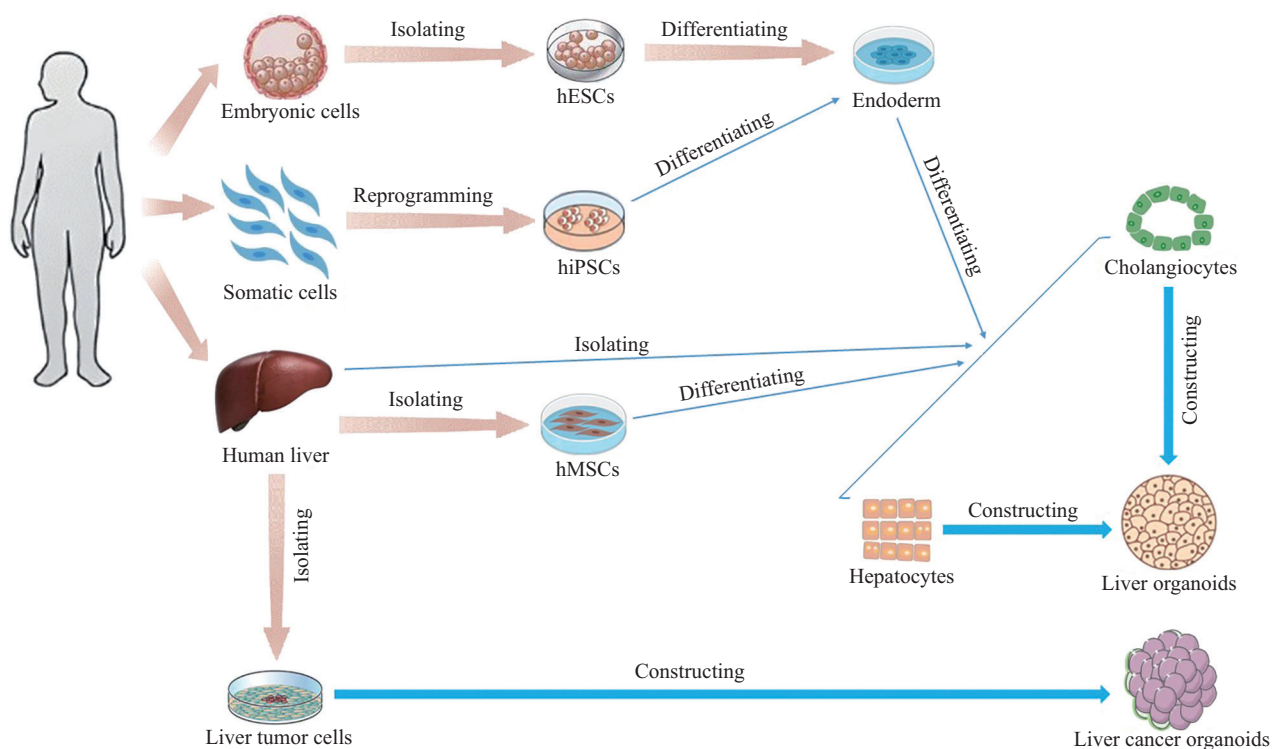
在胚胎发育过程中,首先由受精卵经卵裂依次形成桑葚胚和囊胚,然后囊胚进一步发育形成原肠胚,原肠胚具有三个胚层(内胚层、中胚层、外胚层),其中肝脏来自内胚层。肝脏主要由肝实质细胞和非

实质细胞组成,肝实质细胞包括肝细胞和胆管细胞,是肝脏结构和功能的主体。肝脏功能的维持不仅需要肝实质细胞,还需要肝实质细胞与其他各类细胞之间的相互作用,除以上两种实质细胞外,还包括:肝窦内皮细胞(hepatic sinusoidal endothelial cells, LSECs)、肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)、Kupffer细胞(Kupffer cells, KCs)和间充质细胞等多种非实质细胞^[2]。人体细胞处于一个复杂的微环境中,肝脏内细胞在各种细胞因子、信号通路的调控下才能发挥肝脏各种特定功能。在2D培养环境下,肝细胞通常缺乏某些肝脏特异性基因和特定生物学功能,如细胞色素P450的维持、细胞间特定的连接等,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,无法重现肝脏细胞的异质性以及复杂的结构特征^[7-8]。由于肝脏结构的复杂性,在体外难以构建出与之接近的器官结构。近年来随着干细胞技术的发展,在3D环境下构建肝脏类器官成为可能。类器官的实质是在体外产生的3D多细胞组织,一般由PSCs或ASCs分化而来^[9]。类器官在体外可长期稳定维持其结构与功能,即使多次传代

后也无明显遗传变化^[10]。若采用PSCs分化构建肝脏类器官,则需要先形成内胚层,然后与必需生长因子和细胞因子共培养诱导细胞定向分化和成熟;而源于ASCs或原代细胞衍生的类器官,则需先分离来自组织的种子细胞,再将其加入细胞外基质中,在特定生长因子刺激下实现扩增^[11]。因此,肝脏类器官的构建主要有两种方式:(1)由ESC或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)先分化为内胚层,然后在细胞因子作用下分化为肝细胞或胆管细胞,再自组装为类器官;(2)从肝组织中分离ASCs或功能性细胞/肝癌细胞,在细胞因子联合作用下自组装为类器官(图1)。

1.1 源于PSCs的肝类器官

PSCs是指可无限增殖且可分化为三个胚层的细胞,目前广泛应用的两种PSCs为ESC和iPSCs^[12]。1987年EVANS和KAUFMAN^[13]建立了第一个小鼠干细胞系,发现小鼠囊胚细胞具有自我复制和多向分化的潜能。1998年THOMSON等^[14]从捐赠的人类胚胎中建立了第一个人类胚胎干细胞系。2006年,TAKAHASHI等^[15]将四种转录因子(Oct3/4、Sox2、



hESCs: 人胚胎干细胞; hiPSCs: 人诱导型多能干细胞; hMSCs: 人间充质干细胞。

hESCs: human embryonic stem cells; hiPSCs: human induced pluripotent stem cells; hMSCs: human mesenchymal stem cells.

图1 肝脏类器官的来源及构建

Fig.1 Establishment and sources of liver organoids

c-Myc和Klf4)转入小鼠成纤维细胞中,使这种完全分化的成熟细胞重编程为iPSCs。iPSCs在形态、基因表达、分化能力等方面都与ESCs相似,因此理论上iPSCs可分化为任何成体细胞或组织器官类型。2013年TAKEBE等^[16]首次在体外重现了3D血管化和iPSCs来源的功能性肝芽(iPSC-derived liver buds, iPSC-LBs)的形成过程,他们首先将iPSCs定向诱导分化形成内胚层,然后将内胚层细胞与人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)共培养,待其形成肝芽后移植到免疫缺陷小鼠中,移植后48 h内iPSC-LBs中的血管可与宿主血管相连并发挥功能,而且体外诱导形成的肝芽与体内肝芽相似,其内部的功能性血管可刺激iPSC-LBs向成熟肝组织发育。2017年该团队又建立了一个规模化的类器官培养平台,该平台能够高效生产同质化的小型肝芽^[16]。2019年,WANG等^[17]采用无血清、无饲养层培养方法构建了ESCs衍生的肝脏类器官(ESC-derived expandable hepatic organoids, EHOs),该类器官表现出双潜能特征,能分化为功能性肝细胞或胆管细胞,同时还可在体外扩增20代,以满足工业或临床大规模使用细胞的需求;而且来自EHOs的细胞移植入FRG小鼠的损伤肝脏后,具有再繁殖能力,并能在体内分化为成熟的肝细胞^[17]。

2021年,GUO等^[18]将源自两名患者皮肤成纤维细胞的iPSCs经CRISPR/Cas9基因编辑后,进而将分化衍生的肝细胞类器官和肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, HLCs)作为研究肝脏病理学的细胞模型,首次用于遗传性肝病研究。OUCHI等^[19]利用健康和患者来源的PSCs(ESCs和iPSCs),开发了一种可复制且能衍生多种细胞类型(肝细胞、HSCs和KCs)的肝脏类器官构建方法,该类器官的组成细胞与体内衍生组织相似,而且经游离脂肪酸处理诱导后,该类器官连续出现了脂肪性肝炎的关键特征包括脂肪变性、炎症和纤维化表型,该方法为研究肝脏炎症及纤维化提供了新手段。

1.2 源于成体(干)细胞的肝类器官

成体(干)细胞在这里包括肝实质细胞(肝细胞和胆管细胞)和ASCs。ASCs是组织中未分化的特定细胞,能够自我更新并特定分化形成该类组织的细胞,包括具有多向分化潜能的MSCs。肝脏类器官构建还可分为单一细胞类型和多细胞类型。单一细胞

类型肝类器官目前主要集中在肝细胞和胆管细胞类器官方面。(1)肝细胞类器官:表现为有组织结构的肝实质细胞的聚集,并伴随着肝细胞极性的增强和肝功能的改善,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功能^[20]。从人胎儿或成人肝中分离的肝实质细胞具有形成类器官的能力,并且形成的类器官在体外可长期保持部分肝脏结构和功能^[21]。通过激活肝转录因子可使干细胞分化为肝实质样细胞,而肝实质样细胞可自组装形成具有肝细胞功能的类器官^[22]。(2)胆管细胞类器官:从人体肝脏分离的胆管细胞或体外通过添加特定因子将干细胞诱导分化产生的胆管样细胞,可自组装形成胆管细胞类器官,其常呈管状或中空囊状结构^[23]。由于肝细胞来自内胚层,而胆管上皮细胞来自中胚层,故需通过引入成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、激活素A等,将诱导至内胚层的细胞进一步诱导至中胚层,进而使其分化成为胆管类器官^[24]。胆管样细胞具有极性可表达细胞角质蛋白19(cytokeratin 19, CK19)、囊性纤维化转运调节因子(cystic fibrosis transport regulator, CFTR)和水通道蛋白-1(aquaporin-1, AQP1)等标志物,并存在初级纤毛^[25]。

相对于PSCs,ASCs可直接从组织获取,不需要重编程过程即可分化衍生为类器官。2007年,BARKER等^[26]发现肠Wnt靶基因之一*Lgr5*(leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5, 也被称为*Gpr49*)可用来鉴定小肠和结肠干细胞,并且认为*Lgr5*是ASCs的共性标记物。2013年,HUCH等^[27]发现*Lgr5-LacZ*在健康成人肝脏中不表达,但*Lgr5-LacZ*阳性细胞在肝损伤时出现在胆管附近,将损伤小鼠肝脏中单个*Lgr5*⁺细胞进行培养可形成类器官,并将其移植到富马酰乙酰乙酸水解酶(fumaracetate hydrolase, FAH)突变的小鼠中可产生功能性肝细胞,这表明*Lgr5*表达不仅可用于标记肝脏中干细胞生成,还可用来确定在肝损伤时变得活跃的干细胞。2021年SAMPAZIOTIS等^[28]分离来自不同区域的胆管细胞包括肝内胆管(intrahepatic bile duct, IHD)、胆总管(common bile duct, CBD)和胆囊(gall bladder, GB)来源的胆管细胞,将其诱导分化为类器官,再将胆总管衍生的胆管类器官移植到免疫功能低下小鼠胆囊中,发现来自保留区域(如胆囊)的胆管细胞可用于细胞治疗和肝内胆管修复,证明

表1 肝脏类器官不同构建方法的优点/缺点

Table 1 Advantages/disadvantages of the different construction methods of liver organoids

优点/缺点	多能干细胞来源肝类器官	成体干细胞来源肝类器官	原代肝细胞来源肝类器官
Advantages/disadvantages	PSC-derived liver organoids	ASC-derived liver organoids	PHC-derived liver organoids
Advantages	A variety of hepatocyte types can be generated	The differentiation path is simple and the time-consuming is short	The function is close to those of natural hepatocytes
	It has a wide range of sources and can multiply indefinitely	The cost is low and the technology is relatively mature	The differentiation process is simple and time-consuming
Disadvantages	The differentiation process is complex and time-consuming	The source is limited and the proliferative capacity is weak	The source is limited and the proliferative capacity is poor
	The cost is high and the technical difficulty is high	Fewer types of hepatic cells are generated	The cost is high and the technical difficulty is high

胆管类器官可修复胆道上皮。

肝脏功能的执行需要多种类型细胞(除了肝实质细胞和胆管细胞外,还有LSECs、HSCs和KCs等)的协同作用,故多细胞类型肝类器官更接近肝脏器官的真实情况。HUCH等^[29]发现从人肝脏中分离的原代EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)⁺细胞可形成具有双潜能的肝脏类器官,具有向功能性肝实质细胞和胆管细胞分化的能力,而且该类器官表现出典型的管状结构。此外,将由干细胞分化而来的肝实质细胞和胆管细胞共培养也可形成肝脏类器官,该类器官重现了体内肝脏发生的关键过程,其肝实质细胞紧密聚集,胆管细胞呈囊状结构^[24]。除了胆道系统外,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的血管化也是非常必要的。将“HUVECs来源的内皮细胞”、MSCs和“PSCs来源的肝内胚层细胞”共培养,可形成血管化的肝脏类器官,并且经体内移植后,肝脏类器官呈现出与成人肝脏血管相似的结构,但仍不具备完整肝脏的结构和功能^[16]。这说明还需提高细胞间尤其是肝细胞与非实质细胞的互动并完善肝脏结构(表1)。

2 肝类器官在嗜肝病毒研究中的应用

2.1 乙肝病毒感染肝类器官模型

HBV感染目前仍是全球面临的严重公共卫生问题,据统计全球约有20亿HBV感染的病毒携带者,其中约3亿人为HBV感染的慢性患者,且每年因感染HBV死亡的人数达100万人^[30]。而我国仍有HBV携带者约8 600万例,其中慢性乙肝患者约2 000万例,一般人群HBsAg(hepatitis B surface antigen)流行率约为6.1%^[31]。从20世纪60年代发现HBV感染以来,

在乙肝治疗史上第一个里程碑是IFN-α(interferon-alpha)的应用,后来以拉米夫定为代表的系列核苷类似物也作出了重要贡献,但慢性乙肝的治疗远未达到清除病毒的目标,其致病机制尤其是向肝癌进展的机制至今亦未被完全阐明^[32]。HBV具有狭窄的宿主范围和组织嗜性,主要感染肝细胞,归属于嗜肝DNA病毒科^[33]。HBV通过与细胞膜上的受体钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide, NTCP)结合后进入肝细胞,在细胞核内HBV rcDNA(relaxes circular DNA)转变成HBV cccDNA(covalently closed circular DNA),以cccDNA为模板进行病毒复制^[34]。HBV主要侵袭肝脏器官,引发急性肝病、慢性肝炎、肝硬化以及肝细胞癌等疾病^[35]。由于HBV体外难以感染肝细胞,导致多年来一直缺乏稳定的HBV感染模型。类器官在长期保存、体外增殖、模拟病毒与宿主细胞间互动等方面具有优势,可以构建病毒感染模型以开展病毒入侵机制及抗病毒评价等研究^[36]。因此,探讨肝脏类器官在HBV感染研究中的应用非常必要。

LIM等^[37]采用从肝活检和肝切除样本中分离的细胞衍生的肝内胆管细胞类器官(intrahepatic cholangiocyte organoids, ICOs),探索了HBV复制动力学和免疫应答的供体间差异,结果显示来自不同供体肝组织的ICOs均可成功感染来自HepAD38细胞的重组HBV(基因型D)或来自患者血清的HBV(基因型B和C),而且能够产生HBV pgRNA(pregenomic RNA)、HBV cccDNA以及HBsAg、HBeAg(hepatitis B e antigen)和HBcAg(hepatitis B core antigen); ICOs在分化期间经历了代谢和结构重塑,尽管对IFN-α和病毒模拟物(polyI:C)有强烈的干扰素诱导基因(interferon-stimulated gene, ISG)反应,但ICOs中HBV感染并未上调ISG

表达, 结果证明ICOs支持HBV感染和复制, 且病毒动力学和细胞反应具有供体依赖性变化, 可用于HBV复制机制研究和个性化抗病毒药物研发。研究表明: 来自健康供体的肝脏类器官用HepG2.2.15细胞分泌的HBV感染, 同时以热灭活HBV感染类器官作为对照, 从感染后第4天开始在类器官培养上清液中检测到了HBV DNA, 但不能从热灭活病毒感染的细胞中检测到HBV DNA, 这表明HBV在类器官中复制成功^[27,29]。NTCP作为肝细胞表面表达的HBV感染受体, 与HBV入侵肝细胞和病毒感染效率密切相关, 而与维持在扩增培养基中的类器官相比, 在分化培养基中维持的类器官能更有效地感染HBV并产生更高的病毒滴度, 这可能与NTCP受体表达水平较高有关^[38]。通过比较肝类器官和过表达NTCP的类器官培养液中HBV DNA和HBsAg水平, 发现单独表达NTCP不足以提高维持在扩增培养基中肝类器官的HBV感染率。原代肝细胞来源的肝类器官经重组HBV或患者血清HBV攻击后, 产生了HBV cccDNA、HBeAg、HBV RNA以及传染性病毒粒子^[39]。KULSUPTRAKUL等^[40]采用肝切除样本来源的肝脏类器官模型, 证明两种病毒感染必需的RNA聚合酶(PAPD5和PAPD7)的小分子抑制剂RG7834能降低HBV和HAV感染率。DE CRIGNIS等^[39]采用原代肝细胞来源的HBV感染肝脏类器官模型, 验证了泰诺福韦(tenofovir)和非阿尿苷(fialuridine)的抗病毒作用, 这两种药物抑制了HBV DNA产生, 但不改变细胞内HBV RNA水平。上述研究表明: 原代肝类器官感染模型适于抗HBV药物活性筛选和早期毒性评价。

除了从肝组织或原代肝细胞分化衍生的类器官外, 还可利用PSCs来源的肝脏类器官构建HBV感染模型。研究表明将iPSCs分化形成的内胚层细胞、MSCs和HUVECs在3D系统中共培养, 基于细胞间相互作用可逐渐分化形成功能性肝脏类器官^[16]。肝脏类器官不仅比2D培养的原代肝细胞而且比iPSCs来源的HLCs更易感染HBV, 且可长时间产生具有传染性的病毒粒子。研究还发现HBV感染可引起iPSC来源的肝脏类器官的功能障碍, 如下调肝脏特异基因表达、诱导早期急性肝衰竭标志物表达以及引起肝脏超微结构改变等^[41]。此外, 采用肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)类器官-自体免疫细胞共培养系统和基于患者来源的类器官异种移植平台, 研究发现HBV感染诱导的免疫反应使感

染HBV的ICC患者和未感染HBV的ICC患者预后表现明显不同^[42]。显然, 肝脏类器官为HBV感染机制研究和抗HBV药物临床前评价提供了新的手段^[43]。

2.2 丙肝病毒感染肝类器官模型

HCV是黄病毒科(Flaviviridae)的一种嗜肝性正链单链RNA病毒^[44]。20世纪70年代, 从输血相关性肝炎病例中发现一种未知病毒, 当时其被称为非甲型/非乙型肝炎病毒, 1989年该传染性病原体被命名为HCV^[45]。HCV感染可引起急性和慢性肝炎, 慢性肝炎可进展为肝硬化和肝癌^[46]。据统计2020年全球约有5 700万慢性HCV感染者, 每年约有150万HCV新感染者, 每年约有30万人因HCV感染相关疾病而死亡, 感染率较高的国家包括中国、俄罗斯和美国等^[47]。HCV大多通过伤口接触或未经筛查的血液和血液制品输注以及注射毒品传染, 少数通过垂直传播和性传播方式感染^[44,48]。HCV结构相对简单, 整个HCV RNA基因组只包含一个开放阅读框, 编码约含3 000个氨基酸的多聚蛋白^[49]。虽然丙型肝炎是第一个可治愈的病毒性疾病, 但目前尚无有效疫苗可用。HCV感染仍是全球面临的公共卫生问题, WHO提出了2030年消除HCV感染威胁的目标^[50]。HCV在易感性方面与HBV相似, 只有人和黑猩猩可成为HCV的自然宿主^[51]。后来发现树鼯(*Tupaia belangeri*)以及转基因小鼠也能感染HCV^[52]。人肝癌细胞系HuH7对HCV敏感, 被广泛用于HCV感染研究^[53]。人原代肝细胞也能感染HCV, 但因来源稀少不能大量用于HCV研究^[54]。而iPSCs衍生的HLCs和脂肪组织MSCs来源的HLCs解决了肝细胞来源的伦理和数量问题^[55-56]。

相对于肝细胞或HLCs, 肝脏类器官更适用于构建HCV感染模型。利用来自3名HCV感染者(不同HCV基因型)的手术切除肝脏样本作为供体分化衍生的肝脏类器官, 同时来自3名未感染HCV的供体肝脏(存在肝细胞癌变)分化产生的肝脏类器官作为对照, 发现带有病毒的类器官可在数月内维持低度感染, 而不带病毒的类器官可以被HCV感染^[57-58]。另有研究将HuH7细胞分化形成肝癌类器官, 然后用HCV感染肝癌类器官48 h, 再与2D培养的感染HCV的肝癌细胞进行对比分析, 发现两者感染HCV后病毒复制无显著性差异, 表明肝癌类器官可用于感染HCV相关研究^[59-60]。利用肝癌类器官揭示了HCV进入细胞的肌动蛋白依赖性机制: HCV感染肝细胞

早期的进入因子清道夫受体B1(scavenger receptor-B1, SR-B1)、CD81和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)位于基底外侧膜,以肌动蛋白依赖性方式在紧密连接处积累;HCV与封闭蛋白1(claudin-1)、闭合蛋白(occludin)在紧密连接处结合,并通过依赖EGFR的经网格蛋白介导的内吞作用内化,这证明HCV使用多个因子协同作用侵入宿主细胞^[59]。此外,ISG作为IFN诱导的抗病毒效应因子,能在肝脏类器官中表达,而ISG表达水平降低伴随着HCV和HEV复制的增加,相反,诱导ISG表达则抑制病毒复制^[61]。

肝脏类器官与传统2D培养的细胞在极性上有显著区别,研究表明采用极化的细胞系统来研究HCV感染和动力学变化比非极化系统更合适,尤其是研究HCV与细胞的相互作用^[62]。由于肝实质细胞是高度极化的,HCV感染需要被运输到极化肝细胞的不同亚细胞结构域,尤其是病毒入侵细胞的过程,取决于肝细胞的复杂极性,极化细胞和类器官在形态和生理学上类似于体内肝细胞,更适于HCV感染研究^[63]。虽然HCV对肝癌细胞是敏感的,但体外癌细胞模型通常显示免疫和增殖反应失调。NATARAJAN等^[64]采用微流控芯片开发了一个CD8⁺ T细胞和ASCs衍生的肝脏类器官系统,将嵌入细胞外基质中的3D肝类器官与在悬浮液中和HLA(human leukocyte antigen)匹配的原代T细胞共培养,结果表明该共培养系统可用于研究HCV的适应性免疫反应。LEE等^[65]提出了一种新的多细胞肝类器官模型,即源自相同供者的PSCs分化而来的巨噬细胞和肝类器官的共培养系统,共培养中巨噬细胞向KCs发展,采用这个多细胞类型肝类器官系统研究发现:HCV感染通过促进宿主脂肪生成导致肝类器官中的脂质积累;用脂肪酸长期处理肝类器官促进了HCV复制并促进了炎症和纤维化;采用这个含KCs的肝类器官模型评价处于临床III期的抗NASH(non-alcoholic steatohepatitis)药物与临床试验结果保持一致。总之,这个系统模拟了宿主细胞-病毒之间的互作和细胞间的通信,为研究HCV患者的NAFLD(non-alcoholic fatty liver disease)进展提供了新的选择。

2.3 戊肝病毒感染肝类器官模型

除了HBV和HCV之外,HEV引起的肝炎也受到关注。HEV是一种单链RNA嗜肝病毒,是急性肝炎最常见的病原体。对于免疫力低下人群(包括孕

妇、患有基础疾病的患者等),感染HEV会导致严重疾病^[66]。据统计全球每年约有2 000万新发HEV感染病例,其中超过300万发展成急性肝炎病例和7万与HEV感染相关的死亡病例。在发展中国家HEV感染率明显高于发达国家,其患病率高的主要原因包括种族、社会经济条件、饮食习惯、环境卫生等因素^[67]。HEV感染结果相差较大,从无症状携带者、自限性急性感染到暴发性肝炎和持续性感染,往往与个体免疫功能状态有关。HEV感染常对孕妇造成严重急性肝炎,而对免疫功能低下者造成慢性感染。研究还发现高达30%的HEV感染者出现神经系统症状(神经痛性肌萎缩和肌痛),HEV感染的神经系统表现是一种罕见且仍被低估的病症,无论男女及年龄的人感染HEV均可引发神经系统症状^[68]。急性HEV感染导致的肝炎通常不需要抗病毒治疗,若出现严重病情或预先存在肝损伤的情况下,则可考虑采用广谱抗病毒药利巴韦林治疗,而目前尚无抗HEV的特异性药物^[69]。有关HEV感染导致的神经痛性肌萎缩目前发病机制尚不清楚,也没有特异性疗法,而据临床报道服用可的松和静注免疫球蛋白有改善作用^[70]。

HEV的体外培养主要依赖于特定的细胞系,如肝癌细胞系(HuH7、PLC/PRF/5)和原代肝细胞,这些细胞系能够支持HEV复制,但复制效率低、病毒产量有限,限制了HEV相关研究。研究证明来自胎儿和成人肝脏的具有胆管细胞或肝细胞表型的肝脏类器官支持HEV复制,而感染性HEV颗粒接种表明:人肝源性类器官支持HEV感染的整个生命周期;若将类器官引入到Transwell系统中形成极化单层,则可观察到HEV颗粒主要在肝细胞顶端分泌;同时,研究还显示了病毒复制触发的强烈宿主细胞反应^[71]。在培养的细胞系和原代来源的肝脏类器官中,发现HEV RNA基因组有效诱导了IFN的产生及抗病毒反应,而HEV感染在体外和患者中引发了IFN相关抗病毒反应,这些发现为理解HEV-宿主细胞的相互作用和HEV的致病机制提供了新的认识^[72]。虽然已有HEV感染细胞模型报道,但目前这些模型对HEV感染效率仍然很低,妨碍了有关HEV感染和复制分子机制以及病毒-宿主互作的深入研究,针对不同来源的肝脏类器官构建程序的优化,将加速HEV感染的致病机制和抗HEV药物研发的进程^[73]。

HEV感染也可引起严重的并发症和高死亡率,

尤其是在孕妇、器官移植受者、肝病患者或免疫抑制患者中。然而,目前仍缺乏治疗慢性HEV感染的特异性疗法。为了探索类器官模型在抗HEV药物评价中的应用,采用肝脏类器官模型进行抗HEV药物筛选,结果发现布喹那(brequinar)和高三尖杉酯碱(homoharringtonine)能有效抑制HEV复制,它们对携带G1634R突变的利巴韦林耐药变异病毒株也有效^[71]。同时,利用肝源性类器官进行药物筛选,还发现氯硝柳胺(niclosamide)具有抗HEV作用且其是通过抑制NF- κ B(nuclear factor kappa-B)信号通路来抑制HEV复制的^[74]。通过采用不同供体来源的肝脏类器官模型进行筛选,发现两种新型小分子维多氟拉迪莫(vidofludimus calcium)和吡唑霉素(pyrazofurin)具有显著的抗HEV作用,而且这两种小分子均能高效抑制野生型HEV毒株和经利巴韦林治疗失败的相关HEV毒株(Y1320H、G1634R)^[75]。总之,肝源性类器官成功重现了HEV感染和复制,有助于研究HEV感染的致病机制尤其是阐明病毒-宿主的互作机制并促进了抗HEV新药研发。

2.4 新冠病毒感染肝类器官模型

SARS-CoV-2感染疫情自2019年底暴发以来,已造成全球性大流行和极其严重的危害。SARS-CoV-2感染者多以呼吸道症状为主要临床表现,重症患者可发生呼吸困难和(或)低氧血症,亦可快速进展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),并伴有多器官衰竭甚至死亡^[76]。SARS-CoV-2除引起肺脏发生病理改变外,亦可导致肝脏、心脏、肾脏、大脑等多脏器官发生病理改变,其中肝损伤尤为常见,可有不同程度的肝功能异常,病情严重者可出现肝衰竭^[77]。在一项涉及1 935例COVID-19(corona virus disease 2019)住院患者的回顾性研究中发现,53.2%的患者出现转氨酶异常,20.5%的患者出现肝损伤,而且COVID-19危重患者肝损伤更为常见^[78]。此外,感染SARS-CoV-2会加重慢性肝病(病毒性肝炎、肝硬化和肝癌)患者的肝脏损害,使患者重病率和死亡率明显增加^[79]。通过对SARS-CoV-2感染死亡患者的肝样本进行病理研究显示,肝脏中出现中度微泡性脂肪变性及轻度小叶和门静脉活动性炎症,提示SARS-CoV-2感染可引起肝脏损伤,进而引起肝功能异常^[80]。老年COVID-19患者发生肝损伤的

风险更高,男性肝损伤发生率(63.4%)远高于女性(36.6%),重型与危重型患者肝损伤比轻症患者更常见^[81]。COVID-19患者肝血管内皮细胞中存在大量SARS-CoV-2,提示SARS-CoV-2对人肝脏有趋向性和直接细胞毒性^[82]。目前认为SARS-CoV-2的主要受体是血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2),故人体被SARS-CoV-2攻击的主要部位即为ACE2含量丰富的组织^[83]。ACE2在胆管细胞中表达水平最高,与II型肺泡上皮细胞相当,其次为LSECs和肝细胞^[84]。这提示SARS-CoV-2可直接感染胆管细胞等使其产生损伤进而引发肝损伤^[85]。简言之,SARS-CoV-2可侵入肝脏细胞并在其中大量复制,对肝脏具有趋向性和直接细胞毒性作用。

建立病毒感染的肝脏类器官模型,探讨SARS-CoV-2感染及致病机制以及评价抗病毒治疗药物具有重要价值。2020年YANG等^[86]采用人PSCs衍生的细胞和类器官研究SARS-CoV-2,发现PSCs衍生的胰腺内分泌细胞、肝细胞和胆管细胞类器官对SARS-CoV-2易感。同年,ZHAO等^[87]证明长期培养的肝导管类器官在培养中保留了人类特异性ACE2⁺/TMPRSS2(transmembrane protease serine 2)⁺胆管细胞群,而对两个供体来源的肝导管类器官接种SARS-CoV-2并感染1 h,最后重新包埋在基质胶中并维持培养,结果显示SARS-CoV-2可以感染肝导管类器官,并且病毒能在其中大量复制。该研究也表明:COVID-19患者的肝损伤可能是由SARS-CoV-2感染引起的胆管细胞受损和随后的胆汁酸积累造成的。虽然多种动物被用于建立COVID-19模型,包括非人灵长类动物(恒河猴、食蟹猴、非洲绿猴、狒狒和普通绒猴)、转基因小鼠、表达ACE2基因的Ad5或AAV载体致敏的野生型小鼠以及叙利亚仓鼠、雪貂等模型,并在疫情期间为研究SARS-CoV-2感染、传播和免疫等发挥了作用,但在病毒易感性和疾病特征相关性方面都非常有限。鉴于动物模型的局限性,类器官被认为是模拟细胞-病毒互作和宿主细胞免疫反应的理想模型。

3 总结与展望

类器官是来源于组织的干细胞/祖细胞/功能细胞以及iPSCs经自我更新和组装,形成的可重现

人体器官结构与功能的3D细胞体系^[88]。由于类器官的组成、结构和功能与体内器官接近,常被视为一种新的“模式生物”,用于疾病发生机制及药物评价等研究^[89]。鉴于传统病毒感染细胞模型的局限性,类器官被认为是模拟细胞-病毒互作以及宿主细胞免疫反应的理想模型而备受关注^[90]。肝脏类器官可以模拟肝脏的结构和功能,不仅可用于研究药物性肝损伤、急/慢性肝炎、脂肪肝、肝纤维化以及肝癌等肝脏疾病,也可用于研究嗜肝性病毒(如HBV、HCV、HEV及SARS-CoV-2等)感染性肝病。近年来还报道了采用类器官模拟其他病毒感染,尤其是针对寨卡病毒、流感病毒、诺如病毒、艾滋病毒、疱疹病毒、乳头瘤病毒等感染的相关研究^[91-93]。嗜肝性病毒天然具有狭窄的宿主和组织嗜性,对稳健实验模型的开发提出了挑战。虽然某些肿瘤细胞系或经基因修饰的肿瘤细胞系对相关病毒感染具有敏感性,如HCV对人肝癌细胞系HuH7敏感;HBV对过表达NTCP受体的肝癌细胞系HepG2易感,但研究表明相对于正常细胞系,肝癌细胞系中包括先天性免疫在内的多条信号通路缺失,这对病毒感染研究造成了不利影响^[94]。肝脏是嗜肝病毒的共性靶器官,肝脏类器官模型为推动嗜肝性病毒感染研究向前发展提供了独特的机会(表2)。

肝细胞具有复杂的极性,即在其形态、结构和功能上存在不对称性或具有明显的方向性,这种不对称性使得细胞能够在特定方向上执行特定的功能,肝细胞极性的建立和维持对肝细胞的生理功能至关重要^[95]。肝细胞的复杂极性主要体现在形态、膜结构、功能和分子分布等多个层面。在形态极性上,

肝细胞呈多边形,通常有多个面,分别与不同结构接触;在细胞膜极性上,肝细胞膜分为面对肝窦的基底外侧膜和面对胆管的顶侧膜,基底面面向肝窦负责与血液进行物质交换,侧面与相邻肝细胞形成紧密连接防止物质泄漏,顶面面向胆小管参与胆汁分泌。肝细胞的极性特点使其能够高效地进行物质转运和代谢,维持肝脏的正常功能。肝脏类器官作为3D培养体系与传统的2D培养体系在细胞极性方面存在显著差异,主要体现在细胞形态、细胞间相互作用、微环境以及功能表达等方面,其中一个关键区别是明显分化的顶端和基底外侧表面的发育^[62]。肝细胞极性的丧失会影响营养物质和代谢废物的转运,同时肝细胞极性破坏还会影响胆小管的形成和胆汁的分泌,导致胆汁淤积和肝功能异常。肝脏类器官能更好地模拟体内肝细胞的极性特点,而肝细胞的复杂极性又是影响病毒入侵的重要因素,研究表明采用极化的细胞系统研究病毒感染比非极化系统更合适,尤其是研究病毒入侵机制以及病毒与宿主细胞的相互作用^[63]。

肝细胞的极性维持与病毒的易感性之间存在密切关系,尤其是对于嗜肝病毒(如HBV、HCV、HEV等)的感染和复制过程。肝细胞的极性决定了病毒受体在细胞膜上的分布,如HBV感染主要通过肝细胞的基底外侧膜进行,而基底外侧膜是肝细胞极性的的重要组成部分。在体外实验中原代肝细胞(具有完整极性)的HBV感染效率显著高于未完全极化的HepaRG细胞,这表明肝细胞的极性是病毒高效感染和复制的关键因素。SCHULZE等^[96]采用多药耐药蛋白MRP2(multidrug resistance protein 2)对HBV感染与肝细胞极性的关系进行研究,而MRP2主要在

表2 肝脏类器官和其他肝细胞模型的比较			
Table 2 Comparison of liver organoids and other hepatocyte models			
特性 Characteristic	肝脏类器官模型 Liver organoid model	原代肝细胞模型 Primary hepatocyte model	肝癌细胞模型 Liver cancer cell model
Culture environment	Three-dimensional	Two-dimensional	Two-dimensional
Cell type	Multiple cell types	Single cell type	Single cell type
Incubation cycle	Long-term culture	Short-term culture	Long-term culture
Functional integrity	Relatively complete	Short-term functionality	Limited function
Individualized modeling	Suitable for personalization	Reflects individual characteristics	Not applicable
Technical difficulty	High	Simpler; limited sources	Simple
Cell polarity	Full polarity function	Limited polarity function	Limited polarity function
Consistency	Possible variations	Considerable variation	Good consistency

肝细胞顶侧膜表达, 结果发现HBV感染肝细胞主要通过肝细胞的基底外侧膜入侵, 说明HBV感染依赖于肝细胞的极性, HBV只有在分化良好的肝细胞中才能有效复制, 即肝细胞极化是HBV入侵复制的必需条件, 这有助于我们了解HBV自然感染细胞的过程。然而, 病毒感染尤其是嗜肝性病毒感染又会破坏肝细胞极性, 导致肝功能异常和病理变化, 从而形成恶性循环。肝细胞极性的破坏是病毒性肝炎发病机制的重要组成部分, 病毒感染不仅直接损伤肝细胞, 还通过破坏细胞极性加重肝脏损伤。理解肝细胞极性与病毒感染的关系, 不仅有助于揭示病毒性肝炎及其慢性化进展的发生机制, 还为嗜肝性病毒感染的治疗提供了新的策略。

肝脏类器官发展至今, 已广泛应用于各种肝脏疾病的研究, 可在接近生理状态条件下进行疾病建模、疾病发生机制及药物评价等研究, 但仍面临一些挑战, 主要表现在: (1) 肝组织中除了肝细胞和胆管细胞外, 还存在大量非实质细胞, 而目前肝脏类器官大多缺乏非实质细胞, 尤其是免疫细胞和基质细胞, 而非实质细胞是模拟疾病进展的关键; (2) 肝脏类器官形成和成熟所需的时间长、类器官的形状以及大小重复性较差; (3) 缺乏肝脏类器官构建和评价的标准, 导致基于肝脏类器官的相关研究结果常存在较大差异。显然, 肝脏类器官在结构和功能的模拟上仍面临诸多挑战, 与人体肝脏还有很大差距, 仍需要不断改进和完善。另外, 相对于肝脏组织来源的类器官, iPSCs来源的类器官因其近乎无限的自我更新能力而具有更大优势。

综上所述, 长期、原发性支持HBV感染和复制的体外模型的缺乏, 严重阻碍了HBV临床前研究和抗HBV新药的研发。虽然HCV感染可通过抗病毒治疗成功控制, 但进展为慢性肝病状态仍很常见, 目前没有可靠的体外模型来研究HCV与宿主细胞之间的相互作用及慢性化分子机制。尽管HEV能感染某些特定细胞系, 但这些细胞模型中HEV感染效率很低, 阻碍了对HEV感染和复制机制以及HEV与宿主之间互作的深入研究。由于SARS-CoV-2对人极强的传染性, 体外操作困难, 至今也没有可靠的肝细胞感染病毒模型可用, 严重阻碍了对其感染引起肝损伤机制的研究。因此, 肝脏类器官构建的优化和标准化, 将极大推动嗜肝性病毒感染机制研究及抗病毒药物的研发。

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] TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1147-51.
- [3] LOZACH P Y. Cell biology of viral infections [J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2431.
- [4] TANG X Y, WU S, WANG D, et al. Human organoids in basic research and clinical applications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 168.
- [5] IAKOBACHVILI N, PETERS P J. Humans in a modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture dish: the potential of organoids in modeling immunity and infectious diseases [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2402.
- [6] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-97.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] YI S A, ZHANG Y, RATHNAM C, et al. Bioengineering approaches for the advanced organoid research [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(45): e2007949.
- [10] AKBARI S, SEVINÇ 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] 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.
- [12] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 523-31.
- [13] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6.
- [14] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [15] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [16] 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.
- [17] WANG S Y, WANG X, TAN Z L, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury [J]. *Cell Res*, 2019, 29(12): 1009-26.
- [18] GUO J Y, DUAN L F, HE X Y, et al. A combined model of human iPSC-derived liver organoids and hepatocytes reveals ferroptosis in DGUOK mutant mtDNA depletion syndrome [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(10): 2004680.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] WU F 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] SAMPAZIOTIS F, MURARO D, TYSOE O C, et al. Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver [J]. *Science*, 2021, 371(6531): 839-46.
- [29] 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.
- [30] DOWNS L O, KABAGAMBE K, WILLIAMS S, et al. Peer support for people living with hepatitis B virus: a foundation for treatment expansion [J]. *J Viral Hepat*, 2024, 31(8): 490-9.
- [31] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2022年版)[J]. 中华传染病杂志(CHINESE SOCIETY OF HEPATOLOGY, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION, CHINESE SOCIETY OF INFECTIOUS DISEASES, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Guidelines for the prevention and treatment of chronic hepatitis B (2022 version) [J]. *Chin J Infect Dis*, 2023, 41(1): 3-28.
- [32] ZHUANG A Q, CHEN Y, CHEN S M, et al. Current status and challenges in anti-hepatitis B virus agents based on inactivation/inhibition or elimination of hepatitis B virus covalently closed circular DNA [J]. *Viruses*, 2023, 15(12): 2315.
- [33] RAJORIYA N, COMBET C, ZOULIM F, et al. How viral genetic variants and genotypes influence disease and treatment outcome of chronic hepatitis B. Time for an individualised approach [J]? *J Hepatol*, 2017, 67(6): 1281-97.
- [34] HERRSCHER C, ROINGEARD P, BLANCHARD E. Hepatitis B virus entry into cells [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1486.
- [35] NGUYEN M H, WONG G, GANE E, et al. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2020, 33(2): e00046-19.
- [36] HOSSAIN T, ROMAL S, MAHMOUDI T. Production of recombinant hepatitis B virus (HBV) and detection of HBV in infected human liver organoids [J]. *Bio Protoc*, 2022, 12(8): e4392.
- [37] LIM C K, ROMEO O, TRAN B M, et al. Assessment of hepatitis B virus infection and interhost cellular responses using intrahepatic cholangiocyte organoids [J]. *J Med Virol*, 2023, 95(11): e29232.
- [38] YAN H, ZHONG G, XU G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. *eLife*, 2012, 1: e00049.
- [39] DE CRIGNIS E, HOSSAIN T, ROMAL S, et al. Application of human liver organoids as a patient-derived primary model for HBV infection and related hepatocellular carcinoma [J]. *eLife*, 2021, 10: e60747.
- [40] KULSUPTRAKUL J, WANG R, MEYERS N L, et al. A genome-wide CRISPR screen identifies UFMylation and TRAMP-like complexes as host factors required for hepatitis A virus infection [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(11): 108859.
- [41] 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.
- [42] LI Z, GAO Q, WU Y, et al. HBV infection effects prognosis and activates the immune response in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hepatol Commun*, 2024, 8(1): e0360.
- [43] ROMAL S, HOSSAIN T, MAHMOUDI T. Generation, maintenance and HBV infection of human liver organoids [J]. *Bio Protoc*, 2022, 12(6): e4358.
- [44] MARTINELLO M, SOLOMON S S, TERRAULT N A, et al. Hepatitis C [J]. *Lancet*, 2023, 402(10407): 1085-96.
- [45] CHOO Q L, KUO G, WEINER A J, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [J]. *Science*, 1989, 244(4902): 359-62.
- [46] FREEMAN A J, DORE G J, LAW M G, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection [J]. *Hepatology*, 2001, 34(4 Pt 1): 809-16.
- [47] POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS. Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(5): 396-415.
- [48] ADES A E, GORDON F, SCOTT K, et al. Overall vertical transmission of hepatitis C virus, transmission net of clearance, and timing of transmission [J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 76(5): 905-12.
- [49] CHOO Q L, RICHMAN K H, HAN J H, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(6): 2451-5.
- [50] MANNS M P, MAASOUMY B. Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(8): 533-50.
- [51] KNIGHT A. The beginning of the end for chimpanzee experiments [J]? *Philos Ethics Humanit Med*, 2008, 3: 16.
- [52] BERGGREN K A, SUZUKI S, PLOSS A. Animal models used in hepatitis C virus research [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3869.
- [53] RAMIREZ S, LI Y P, JENSEN S B, et al. Highly efficient infectious cell culture of three hepatitis C virus genotype 2b strains and sensitivity to lead protease, nonstructural protein 5A, and polymerase inhibitors [J]. *Hepatology*, 2014, 59(2): 395-407.
- [54] PODEVIN P, CARPENTIER A, PÈNE V, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult

- hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(4): 1355-64.
- [55] ROELANDT P, OBEID S, PAESHUYSE J, et al. Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(2): 246-51.
- [56] CHOI J E, HUR W, KIM J H, et al. MicroRNA-27a modulates HCV infection in differentiated hepatocyte-like cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e91958.
- [57] BROUTIER L, ANDERSSON-ROLF A, HINDLEY C J, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1724-43.
- [58] MEYERS N L, ASHUACH T, LYONS D E, et al. Hepatitis C virus infects and perturbs liver stem cells [J]. *mBio*, 2023, 14(6): e0131823.
- [59] 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.
- [60] MOLINA-JIMENEZ F, BENEDICTO I, DAO THI V L, et al. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle [J]. *Virol*, 2012, 425(1): 31-9.
- [61] WANG W, YIN Y, XU L, et al. Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(476): eaah4248.
- [62] COLLETT S, TORRESI J, SILVEIRA L E, et al. Investigating virus-host cell interactions: comparative binding forces between hepatitis C virus-like particles and host cell receptors in 2D and 3D cell culture models [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 592: 371-84.
- [63] SO C W, RANDALL G. Three-dimensional cell culture systems for studying hepatitis C virus [J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 211.
- [64] NATARAJAN V, SIMONEAU C R, ERICKSON A L, et al. Modelling T-cell immunity against hepatitis C virus with liver organoids in a microfluidic coculture system [J]. *Open Biol*, 2022, 12(3): 210320.
- [65] LEE J, GIL D, PARK H, et al. A multicellular liver organoid model for investigating hepatitis C virus infection and nonalcoholic fatty liver disease progression [J]. *Hepatology*, 2024, 80(1): 186-201.
- [66] AZIZ A B, ØVERBØ J, DUDMAN S, et al. Hepatitis E virus (HEV) synopsis: general aspects and focus on bangladesh [J]. *Viruses*, 2022, 15(1): 63.
- [67] HAKIM M S, WANG W, BRAMER W M, et al. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review [J]. *Liver Int*, 2017, 37(1): 19-31.
- [68] WIESENFARTH M, STAMMINGER T, ZIZER E, et al. Neurological manifestation of HEV infection: still a rare disease entity [J]? *J Neurol*, 2024, 271(1): 386-94.
- [69] EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL clinical practice guidelines on hepatitis E virus infection [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(6): 1256-71.
- [70] RIPELLINO P, PASI E, MELLI G, et al. Neurologic complications of acute hepatitis E virus infection [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2019, 7(1): e643.
- [71] LI P, LI Y, WANG Y, et al. Recapitulating hepatitis E virus-host interactions and facilitating antiviral drug discovery in human liver-derived organoids [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(3): eabj5908.
- [72] WANG W, WANG Y, QU C, et al. The RNA genome of hepatitis E virus robustly triggers an antiviral interferon response [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2096-112.
- [73] XIANG K, ZHUANG H. Liver organoid potential application for hepatitis E virus infection [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1417: 133-9.
- [74] LI Y, LI P, HE Q, et al. Niclosamide inhibits hepatitis E virus through suppression of NF-kappaB signalling [J]. *Antiviral Res*, 2022, 197: 105228.
- [75] GUO H, LIU D, LIU K, et al. Drug repurposing screen identifies vidofludimus calcium and pyrazofurin as novel chemical entities for the development of hepatitis E interventions [J]. *Virol Sin*, 2024, 39(1): 123-33.
- [76] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [77] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. China novel coronavirus investigating and research team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-33.
- [78] SIDDIQUI M A, SURESH S, SIMMER S, et al. Increased morbidity and mortality in COVID-19 patients with liver injury [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(6): 2577-83.
- [79] AL-ALY Z, XIE Y, BOWE B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19 [J]. *Nature*, 2021, 594(7862): 259-64.
- [80] XU Z, SHI L, WANG Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): 420-2.
- [81] YADAV D K, SINGH A, ZHANG Q, et al. Involvement of liver in COVID-19: systematic review and meta-analysis [J]. *Gut*, 2021, 70(4): 807-9.
- [82] SONZOGNI A, PREVITALI G, SEGHEZZI M, et al. Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations [J]. *Liver Int*, 2020, 40(9): 2110-6.
- [83] YAN R, ZHANG Y, LI Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 [J]. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-8.
- [84] PIROLA C J, SOOKOIAN S. SARS-CoV-2 virus and liver expression of host receptors: putative mechanisms of liver involvement in COVID-19 [J]. *Liver Int*, 2020, 40(8): 2038-40.
- [85] 关贵文, 高林, 王建文, 等. 新型冠状病毒感染肺炎患者肝酶异常的机制探究[J]. *中华肝脏病杂志*(GUAN G W, GAO L, WANG J W, et al. Exploring the mechanism of liver enzyme abnormalities in patients with novel coronavirus-infected pneumonia [J]. *Chin J Hepatol*), 2020, 28(2): 100-6.
- [86] YANG L, HAN Y, NILSSON-PAYANT B E, et al. A human pluripotent stem cell-based platform to study SARS-CoV-2 tropism and model virus infection in human cells and organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(1): 125-36, e7.
- [87] ZHAO B, NI C, GAO R, et al. Recapitulation of SARS-CoV-2 infection and cholangiocyte damage with human liver ductal organoids [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(10): 771-5.
- [88] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish:

- modeling development and disease using organoid technologies [J]. Science, 2014, 345(6194): 1247125.
- [89] BROOKS A, LIANG X, ZHANG Y, et al. Liver organoid as a 3D *in vitro* model for drug validation and toxicity assessment [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105608.
- [90] BLUTT S E, ESTES M K. Organoid models for infectious disease [J]. Annu Rev Med, 2022, 73: 167-82.
- [91] ETTAYEBI K, CRAWFORD S E, MURAKAMI K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids [J]. Science, 2016, 353: 1387-93.
- [92] GARCEZ P P, LOIOLA E C, MADEIRO DA COSTA R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids [J]. Science, 2016, 352(6287): 816-8.
- [93] 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.
- [94] KANEKO S, KAKINUMA S, ASAHINA Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell lines as a new model for host interaction with hepatitis B virus [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29358.
- [95] 毛元鹏, 魏红山. 肝细胞极性调控[J]. 临床肝胆病杂志(MAO Y P, WEI H S. Regulation of hepatocyte polarity [J]. J Clin Hepatol), 2022, 38(11): 2654-8.
- [96] SCHULZE A, MILLS K, WEISS T S, et al. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus [J]. Hepatology, 2012, 55(2): 373-83.