

# 人源类器官研究历程及发展趋势

何康信<sup>1,2</sup>, 张景语<sup>1</sup>, 钱菁菁<sup>2</sup>, 李兰娟<sup>1,2\*</sup>

1. 浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室, 国家感染性疾病临床医学研究中心, 国家传染病医学中心, 感染性疾病诊治协同创新中心, 杭州 310003

2. 济南微生态生物医学山东省实验室, 济南 250117

**摘要** 类器官是干细胞在体外培养出的一种3D细胞培养物(类器官模型), 拥有与来源器官(组织)高度相似的组织学特征和生理功能。概述了类器官技术的发展历程、类器官的不同种类、来源及表型。以肿瘤药物开发的临床前模型为例, 对比了肿瘤细胞系、条件重编程、类器官模型及荷瘤模型(PDX)这4种模型, 得出类器官模型是较为优秀的一种体外模型, 可用于感染性疾病和慢性非感染性疾病的模型研究。总结了类器官技术未来发展的4方面影响因素: 需求和挑战的驱动、技术和知识的驱动、资源和要素的驱动、伦理和法规的约束。

**关键词** 类器官模型; 类器官技术; 类器官生物样本库

类器官模型是能够很好地模拟疾病和生理状态的模型, 类器官技术是转化医学优秀的研发工具。类器官研究可以包含3个范畴: (1) 类器官本身生长发育分化过程机制的研究; (2) 以类器官模型为工具进行疾病和生理机制的研究; (3) 以类器官技术为工具进行药物开发、药物敏感性预测、再生医学等应用的研究。

“类器官”指的是在体外特定的三维(3D)环境中生长的细胞发育形成微小的细胞簇或微组织, 这些细胞可以自组织并分化为功能性细胞类型, 高度重现体内器官(因此也被称为“微小器官”)的结构

和功能。类器官可以从胚胎干细胞(ESCs)、诱导多能干细胞(iPSCs)或组织干细胞(SSCs)中获得, 其过程类似于胚胎发育、组织伤愈或组织更新<sup>[1]</sup>。类器官内的自组织通过空间受限的细胞谱系命运和细胞分类发生, 这需要激活由细胞内部组分或外部环境(如细胞外基质(ECM)和培养基)介导的各种信号通路。SSC衍生的类器官直接从成人组织中产生, 或者从单个SSC或含有SSC的组织单元中产生。这一点得到了培养基中生长因子混合物的支持, 这些生长因子在正常组织内稳态下重现了信号控制。除了正常组织外, SSC衍生的类器官还可

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-06-15

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQZOH100002); 济南微生态生物医学省实验室科研项目

作者简介: 何康信, 博士研究生, 研究方向为类器官的转化医学, 电子信箱: hekangxin@zju.edu.cn; 李兰娟(通信作者), 中国工程院院士, 教授, 研究方向为传染病学, 电子信箱: ljl@zju.edu.cn

引用格式: 何康信, 张景语, 钱菁菁, 等. 人源类器官研究历程及发展趋势[J]. 科技导报, 2022, 40(12): 13-27; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2022.12.002

以从患者特定的组织中建立,用于疾病建模和精确医学。ESC/iPSC 衍生的类器官涉及使用各种生长因子或抑制剂的逐步分化方案,这些生长因子(或抑制剂)可以模拟原肠胚形成和器官发生期间的发育信号。ESCs 和 iPSCs 的多能性使得其可以发育为含有所有 3 个胚层的类器官。这对于早期胚胎发育的研究尤其有用,因为胚胎组织非常难以获取。本研究讨论 3D 类器官培养的历史和发展,并提供涵盖整个系统的类器官研究的最新进展,评估 3D 类器官技术与其他传统模型的优缺点,探索类器官技术在生物医学中的各种应用、前景和挑战。

## 1 类器官的研究历程

### 1.1 类器官研究的发端

2008 年,当 Eiraku 等<sup>[2]</sup>使用 3D 培养法将 ESC 诱导培养成为大脑皮层组织时,类器官研究开始从 2D 转向 3D。2009 年,Hans Clever 团队<sup>[3]</sup>的一项研究指出,利用特定的细胞因子组合(WENR)培养基,Lgr5<sup>+</sup>的成年肠道干细胞可以在基质凝胶中(小鼠骨肉瘤来源的细胞外基质)形成 3D 肠道类器官,在缺乏间充质细胞龛位的情况下进行自组织、增殖扩增并分化为隐窝绒毛结构,这个过程高度重现了体内的肠上皮更新的过程。这是第一份关于建立

源自单个 SSC 的 3D 类器官培养的报道,为其他系统中的许多后续类器官工程奠定了基础。包括使用 SSC 或 iPSC 的中胚层(例如胃、肝、胰腺、肺、肾)和神经外胚层(脑和视网膜)(图 1、表 1)。

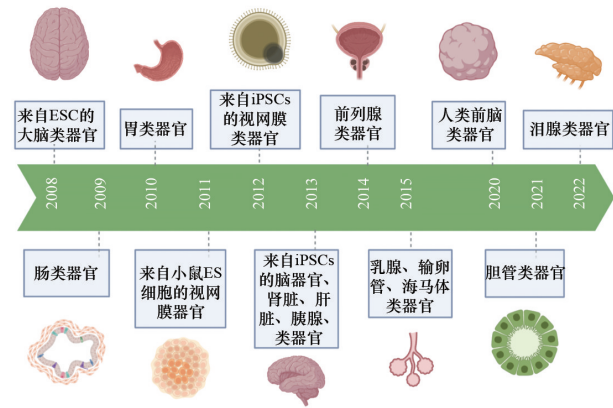


图1 类器官发展历程

自此,通过模拟各种组织发育或修复的机制,国内外陆续报道了基于上述方法开发的不同组织来源的 SSC 或者 iPSC 来源的类器官的培养方法,并对培养过程中的机理进行了表征,对类器官在疾病模拟和临床应用做了很有价值的探索。2013 年,类器官技术被《Science》评为年度十大技术;2015 年,类器官技术被《MIT 科技评论》评为十大科技突破之一;2018 年,类器官技术被《Nature Meth-

表1 类器官的种类、来源和表型

类器官种类	物种	类型	来源细胞特征	类器官表型	文献
食道类器官	人类	iPSC	背侧 AFG 细胞球	有增殖的基底祖细胞和分化的复层鳞状上皮	[6]
胃类器官	人类	iPSC	前肠	原始胃腺、胃窦黏液细胞以及多种胃内分泌细胞	[7]
小肠类器官	人类	SSC	Lgr5 <sup>+</sup> cell	肠上皮、隐窝结构、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞等	[8]
结直肠类器官	人类	SSC	Lgr5 <sup>+</sup> cell	肠上皮、隐窝结构、杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞等	[9]
子宫内膜类器官	人类	SSC	SOX9 <sup>+</sup> 细胞	当暴露于妊娠信号时,可形成早期妊娠的特征	[10]
汗腺类器官	大鼠	SSC	双能 SGO 衍生细胞	表达汗腺特异性标记物:CK18、CK19、AQP5、 $\alpha$ ATP	[11]
唾液腺类器官	小鼠	ESC	SOX9 <sup>+</sup> 和 FOXC1 <sup>+</sup> 细胞	显示出成熟唾液腺的特征,具备唾液分泌功能	[12]

表1 类器官的种类、来源和表型(续)

类器官种类	物种	类型	来源细胞特征	类器官表型	文献
泪腺类器官	人类	iPSC	自组织2D眼样器官	三维泪腺样组织器官,可生成泪膜蛋白	[13]
肝胆胰类器官	小鼠	SSC	Lgr5 <sup>+</sup> 细胞	含有胆管细胞和肝实质细胞	[14]
胆管类器官	人类	SSC	胆管双能祖细胞	胆管祖细胞的单层囊状上皮或胆管状	[15]
肝类器官	人类	iPSC/SSC	原代肝细胞	保留关键的形态学、功能和基因表达特征。植入小鼠后可增殖	[16]
胰腺类器官	小鼠	ESC	胚性胰腺祖细胞	外分泌和内分泌功能	[17]
胰岛类器官	小鼠	SSC	Procr <sup>+</sup> 胰岛祖细胞	$\beta$ 细胞为主,可分泌胰岛素。移植后逆转糖尿病	[18]
端脑/前脑	小鼠/人类	ESC/iPSC	ESC	可分化为DARPP32+中等大小的神经元	[19]
大脑类器官	人类	iPSC	悬浮类胚体(EBs)	多个脑区(视网膜、背侧皮质、腹侧前脑、脉络丛和海马)	[20]
中脑类器官	人类	iPSC	悬浮类胚体(EBs)	包含多层的功能性多巴胺能神经元和产生神经黑色素的神经元	[21]
海马体类器官	人类	ESC	背内侧端脑组织	功能性海马神经元,包含功能性海马颗粒和锥体样神经元	[22]
小脑类器官	人类	ESC	ESC	极化神经管样结构,具有浦肯野细胞	[23]
视网膜类器官	小鼠	ESC	胚胎干细胞聚集体	视杯结构,多层细胞,包含视杆细胞和视锥细胞	[24]
视网膜类器官	人类	iPSC	悬浮类胚体(EBs)	功能性视锥细胞,锥体光感受器表现出内在光反应	[25]
肾类器官	人类	iPSC	输尿管肾祖细胞	三维输尿管芽结构,包含与内皮细胞和肾间质包围的肾单位	[26]
肾小管类器官	人类	SSC	肾组织或尿道上皮	近端和远端肾单位段	[27]
乳腺类器官	人类	SSC	人乳腺上皮	包含被肌上皮细胞包围的极化分泌上皮	[28]
前列腺类器官	人类/小鼠	SSC	前列腺上皮	包含管腔细胞和基底细胞	[29]
甲状腺类器官	人类/小鼠	SSC	甲状腺滤泡细胞	具有完整的甲状腺激素生成机制	[30]
心脏类器官	人类	iPSC	悬浮类胚体(EBs)	形成复杂的内腔和血管系统,呈现稳健的跳动	[31]
心血管类器官	人类	ESC	悬浮类胚体(EBs)	心肌细胞分化和内皮细胞分化	[32]
气泡/气道混合类器官	人类	SSC	AT2,气道基底细胞	AT1,AT2;气道的假复层上皮(包含杯状细胞、纤毛细胞等)	[33]
肺泡类器官	人类	SSC	AT2	表达ACE2,可被SARS-CoV-2感染	[34]
气道类器官	人类	SSC	基底细胞	基底细胞、多纤毛细胞、黏液细胞和club细胞	[20]
卵巢/输卵管类器官	人类	SSC	人输卵管,文献未提及	还从含有纤毛细胞和分泌细胞	[35]
垂体类器官	人类	ESC	悬浮类胚体(EBs)	可以分泌垂体激素	[36]
内耳类器官	人类	ESC	悬浮类胚体(EBs)	功能性内耳感觉上皮细胞、立体纤毛和基诺细胞	[37]
扁桃体类器官	人类	SSC	扁桃体原代细胞	抗原特异性抗体的产生、浆细胞分化	[38]
胸腺类器官	人类	SSC	MS5-hDLL1细胞	常规人类T细胞的高效和可重复的体外分化和阳性选择	[39]
舌类器官	人类	SSC	Bmi1 <sup>+</sup> 干细胞	复层鳞状上皮细胞层和角质层	[40]
味蕾类器官	小鼠	SSC	Lgr5 <sup>+</sup> 细胞	含有干/祖细胞的多层上皮和内层的味觉细胞	[41]
睾丸类器官	人类	SSC	睾丸细胞	生殖细胞、支持细胞、间质细胞和管周肌样细胞组成	[42]
胎盘类器官	人类	SSC	滋养层细胞	结构组织与绒毛胎盘非常相似	[43]

ods》评为2017年度方法<sup>[4]</sup>;2019年,类器官模型被《The New England Journal of Medicine》评述为优良临床前疾病模型<sup>[5]</sup>。

## 1.2 类器官模型的转化医学

### 1.2.1 类器官模型对人类疾病的模拟

类器官模型对这些疾病的模拟具有较大优势。很多人类疾病(尤其是感染性疾病)具有明显的种(属)特异性,而啮齿类动物模型乃至灵长类模型均不能很好地模拟这些疾病;此外,疾病的发生发展依赖于组织器官内多组分细胞的相互作用,而传统的细胞模型无法模拟完整的不同细胞间的相互作用;再者,一些组学工具(如转录组测序)对大块组织的测序(如 bulk RNAseq)通常混杂了太多杂细胞的噪声,研究者期盼更单纯地研究实质细胞。类器官模型对疾病的模拟,按照来源可以分为3类:病灶组织来源的类器官、成体干细胞来源的类器官、iPSC/ESC来源的类器官。与动物模型相比,类器官平台由于缺乏血管系统、免疫细胞和器官间的交流,仍有一定的局限性。在现阶段,疫苗和药物开发仍需要动物模型。未来,这些类器官平台将用于模拟更复杂的器官,模拟器官内相互作用,并探索致病机制。

病灶组织来源的类器官用于模拟疾病,例如肿

瘤类器官、慢性非感染性疾病(如胆道闭锁、炎症性肠病(IBD)、脂肪肝、肺纤维化、肠道囊性纤维化、巴雷特食管等<sup>[44-49]</sup>。通常来说,可以更好地重现病灶组织本身在取材当时的个体化的发病机理,细胞分化更彻底,仿真度较好。来源于患者的肿瘤类器官模型是近期受人瞩目的一个应用领域,将来源于患者癌灶的类器官用抗肿瘤药物处理,以实现对患者药物响应的预测并最终指导患者用药。此外,基于肿瘤类器官的模型也可以用于开发抗肿瘤药物的临床前研究模型(表2、表3),如免疫治疗开发、过继细胞疗法<sup>[50]</sup>。中国工程院院士王红阳等<sup>[51]</sup>最新研究建立了基于肝胆肿瘤类器官的肿瘤新抗原活性的筛选体系,通过类器官杀伤实验证实了这些多肽可刺激CD8细胞产生显著抗肿瘤效应。iPSC来源的类器官可以用于模拟更多的疾病,但是疾病造模仍需额外的刺激或引入基因突变。

在遗传性疾病的研究领域,尤其是利用慢病毒表达系统和CRISPR/Cas9等分子技术可以在类器官内操纵基因,这使疾病建模和靶向基因治疗成为可能。此类模型具有比SSC/病灶来源类器官更复杂的多胚层结构,允许更多种类细胞更多层次组织之间的互相作用的研究。但它往往具有更幼稚的分化程度,生理功能较低,且通过额外的刺激或引

表2 肿瘤药物研发的临床前模型(修改自文献[52])

特征	肿瘤细胞系	条件重编程	PDO	PDX
建模成功率	低	高	高	中等
维持培养的难易度	容易	中等	中等	较难
资源消耗	低消耗	低消耗	中等消耗	高消耗
增殖潜力	高	高	中等	低
3D生长	少数情况下可以	少数情况下可以	可以	可以
重现表型	不可以	不可以	可以	可以
重现基因型	少数情况下可以	可以	可以	可以
重现肿瘤的突变谱	可以	可以	可以	可以
易于基因编辑	易于编辑	不适用(NA)	易于编辑	不能编辑
对应的正常组织	不能培养	可以培养	可以培养	不能培养
肿瘤-基质相互作用	无	无	无	少数情况下可以
与免于细胞相互作用	无	无	少数情况下可以(ALI-PDO)	无
癌症基因编辑	不能编辑	不适用(NA)	可以编辑	不能编辑
低通量药物筛选	可以	可以	可以	少数情况下可以
高通量药物筛选	可以	可以	可以,通量不很高	不可以
生物样本库	不可以	可以	可以	不可以

表3 肿瘤类器官种类及表型

肿瘤类器官种类	例数	类器官表型	文献
直肠癌类器官	65	阿尔新蓝阳性和MUC-2阳性杯状细胞、CK20和CDX2阳性肠细胞、E-钙粘蛋白(上皮标志物)的强烈表达和 $\beta$ -连环蛋白染色的细胞质/核模式	[53]
卵巢癌类器官	56	圆形、囊性表型;含PAX8+分泌细胞和乙酰化- $\alpha$ -tubulin+的纤毛细胞的标记物	[54]
肝细胞癌、胆管癌	8	从实心/致密结构(HCC和CHC)到形状更不规则的囊样结构(CC)	[55]
结直肠癌	96	保留了关键的组织病理学特征;在关键驱动突变方面表现出高度的一致性	[56]
转移性胆管癌	110	与来源组织存在显著的形态相似性;在预测患者对药物反应方面具有100%的敏感性、93%特异性、88%阳性预测值和100%阴性预测值	[57]
口咽和食道的鳞癌	25	通过重现原始肿瘤的组织病理学进行传代;与低分化SCC相容,具有高核质比的非典型细胞;部分患者表现出肿瘤抑制基因p53蛋白的上调	[58]
胃癌类器官	46	形态多样:球形巢状,中央管腔内衬多层细胞;筛状腺体形态,细胞形成不同大小的多个管腔;或单个上皮层组成的大球体	[59]
肝细胞癌	38	在形态上表现为致密的球状体,没有内腔,但偶尔会形成假腺体;在体外概括了原发肿瘤的组织学特征;长期保持其起源肿瘤的基因组特征	[60]
前列腺癌类器官	7	包含SPOP突变、PTEN缺失、TMPRSS2-ERG间质缺失;概括了CRPC的表型多样性,包括AR依赖性腺癌、AR阴性腺癌、神经内分泌癌和鳞状细胞分化	[61]
乳腺癌	95	正常的类器官始终显示出囊性表型,但通过明场显微镜观察到,单个类器官间的形态差异大	[62]
膀胱癌类器官	16	其组织病理学特征显示出很强的一致性;在连续传代过程中从未观察到良性组织的存在;SCBO-11亲代肿瘤和类器官系表现出鳞状细胞癌的特征	[63]
腺泡细胞癌/胆管癌/导管内乳头状粘液性肿瘤	30	肿瘤类器官的形态从囊性(具有透明或充满的管腔)到致密结构;具有细胞异型性的肿瘤组织之间的形态相似,包括细胞核的异常位置	[64]
胰腺癌类器官	66	胰腺癌PDO表现出混合形态,由中空上皮衬里的囊性结构组成,管腔不同程度的填充	[65]

入基因突变并不能完整地重现疾病的整个机制。

在感染性疾病研究领域(如研究宿主-微生物相互作用),iPSC和ESC来源的类器官较多地用于模拟多层次靶细胞,而SSC来源的类器官则可以用于研究易感性等个体化相关的研究。微生物(细菌、寄生虫和病毒)与宿主上皮之间复杂的相互作用,已经来自大脑、胃和肠的类器官进行了研究。特别是在感染性疾病研究中,常规培养的类器官顶侧无法暴露于微生物,因此,显微注射、类器官翻转、2D培养的类器官这3种手段被开发出来用于微生物-宿主上皮顶侧的直接互相作用的模拟<sup>[66-68]</sup>。iPSC和SSC来源的类器官均可来自不同遗传背景的个体,这为探索遗传变异对疾病进展(包括病毒感染)的影响提供了一个有用的模型。一方面,基于CRISPR的基因编辑方法可以高效敲除单个基因/位点或敲除单个变体,为生成等基因iPSCs/类器

官提供了高通量平台。鉴定出的基因/位点/变异可以使用基因编辑工具开发的等基因类器官模型进一步验证。

在过去的2年多时间,将类器官应用于新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疾病建模取得了重要进展。新型冠状病毒SARS-CoV-2可能感染多种器官的细胞,如呼吸道上皮、肺泡上皮、肠上皮中枢神经系统、肾脏、肝胆胰系统、睾丸、血管内皮、视网膜等<sup>[69]</sup>。这些来自不同供体的iPSC/类器官也可用于研究个体对抗病毒药物的反应,这将有助于开发COVID-19患者的个性化治疗。来自健康或COVID-19患者的多种组织和类器官可以为不同年龄、性别或种族人群的病毒易感性提供可靠的分子评估,并为当前和未来的大流行提供个性化治疗策略。

### 1.2.2 再生医学:类器官 vs 异种移植

类器官作为再生医学(自体移植)珍贵的种子细胞也受到关注,它的自组织形态和更成熟的分化程度提供了更好的可移植性,也是患者自体的 iP-SC 更好的保存形式。运用肠道类器官喷洒在肠壁修复小肠肠上皮,成功恢复了短肠综合征大鼠的部分消化吸收功能,挽救了其肠道衰竭<sup>[70]</sup>。肠道类器官也用于 IBD 患者的肠黏膜修复,Watanabe 等<sup>[71]</sup>描述了如何将上皮类器官原位移植到受体小鼠的结肠中,作者通过肛门将结肠类器官注入损伤的结肠,注入的类器官随后附着在受伤区域并重建供体来源的上皮。Sampaziotis 等<sup>[72]</sup>通过类器官肝细胞移植治疗胆道闭锁或缺血性狭窄,报道了一种从肝外胆管树中分离和繁殖人胆管细胞的新方法,其形式为肝外类胆管细胞(胆管类器官),用于再生医学应用。由此产生的胆管类器官在转录组学特征和功能特性方面与原代胆管细胞非常相似,当种植在可生物降解的支架上时,胆管类器官形成保留胆道特征的组织样结构,在移植到小鼠损伤模型后,由此产生的生物工程组织可以重建胆囊壁并修复胆管上皮,且没有胆汁淤积或管腔堵塞的迹象。同样是解决再生医学中供体不足的另一种技术路线——异种移植虽然这两年也作为同样引人注目的学术前沿,但目前仍受复杂的排异反应及异种感染性疾病的困扰,2022 年初移植猪心脏的美国受试虽然挺过了最初的急性排异期,但是仍死于潜伏的猪巨细胞病毒感染导致的器官衰竭<sup>[73]</sup>。

### 1.3 类器官模型的工程化

当前,类器官培养法仅依赖于其自身的发育和自组织,不能实现多组织、多器官之间的互作,如无法完全模拟免疫微环境、血管生成不足、自组织形成的类器官很小、缺乏精确的空间顺序、结构和大小随机化、无法迅速形成细胞间的互相支持(如旁分泌),以及共存系统<sup>[74]</sup>,而单纯的共培养则只能实现细胞组分的远程通信(内分泌)<sup>[75]</sup>。

#### 1.3.1 类器官 3D 生物打印

过去几年,通过 3D 生物打印实现了比单纯培养法更高仿真度的类器官模型,它允许打印的细胞之间迅速通过旁分泌等方式形成互相支持,实现自

组织尚难以形成的特定的复杂结构(如血管网络、肾小管、肠腔等),甚至可以允许可移植的宏观组织块受体动物体内定植和存活。Rawal 等<sup>[76]</sup>综述了类器官 3D 打印的一些研究历程。他们撰文指出,生物打印可以应用与 PSC 或 SSC 的实际器官相似的特定空间结构设计,以便能够以高精度和高通量快速打印类器官的特定结构。因此,它们可以更好更快地自组织形成类器官。此外,干细胞悬浮液可以自组织成毫米级结构,其仅包含中等复杂度,并且可以通过使用产生的几何形状来指导类器官的形成,进一步印刷成更复杂的组织和器官<sup>[74]</sup>。此外,3D 打印和数值模拟的快速发展,促进了 3D 细胞培养模型的设计、制造和结果转换,也可以作为促进类器官和器官芯片系统的发展和传播的新工具。除了典型的 3D 打印外,其他的组织制造方式还有气流辅助、声波操纵等等。广义的以原代细胞或者单细胞为种子细胞的 3D 打印,不在此文赘述。

1) 3D 打印的肠道:类器官生物 3D 打印可以实现厘米级的肠道组织的模拟,Brassard 等<sup>[77]</sup>通过使用肠类器官作为构建块并控制几何结构和细胞密度,类器官可以直接沉积到细胞外基质中,这些组织包含自组织特征,如腔道、分支脉管系统和管状肠上皮,以及体内类似的隐窝和绒毛结构域。支持细胞被沉积以在空间和时间上调节形态发生,不同的上皮细胞被依次打印以模拟胃肠道中存在的器官边界。Caberry 等<sup>[78]</sup>通过 3D 生物打印实现了肠道类器官的大小和形状的精确控制,打印的结构以高保真度转移至 Matrigel,形成与肠上皮和肠类器官中常见的隐窝绒毛结构相关的形状。

2) 膀胱组装体(asmbloids)的 3D 打印:通过用基质成分重组组织干细胞来构建多层膀胱“组装体”。这些组装体在单细胞转录组水平上的细胞组成和基因表达表现出成人膀胱的特征,并再现了损伤再生反应的体内组织动力学<sup>[79]</sup>。这些组装体包括组织基质的 4 个主要成分:基质成纤维细胞(肿瘤组装体中的癌症相关成纤维细胞)、内皮细胞、免疫细胞和肌肉层,并提供了通过与相关基质相互作用表观遗传控制肿瘤可塑性的机制见解。

3) 肾单元的 3D 打印:Melissa 团队报道了利用

挤压生物打印技术进行大批量快速制备肾脏类器官的应用——通过生物打印提供了对细胞数量、组织直径和细胞活力的高质量控制,获得了形态、细胞类型及基因表达水平与先前报道的人工培养类肾脏器官相当的3D打印肾脏类器官<sup>[80]</sup>。

4) 肿瘤类器官的3D打印:肿瘤类器官的3D打印通常有2个需求驱动:高通量并减少人力,以及对间质细胞和细胞外间质的模拟。清华大学马少华课题组<sup>[81]</sup>报告了一个自动化的类器官平台,它可以操纵基质凝胶球体并满足高通量肿瘤药物敏感性检测的需求——通过对单分散基质凝胶液滴进行模板化,然后使用同步微流控液滴打印机将其依次输送到井中来实现的。每个液滴封装一定数量的细胞(例如1500个细胞),从统计学上代表肿瘤切片中的异质细胞群。类器官通过显示类似的基因表达谱和组织学特征作为细胞衍生的健康和癌变器官,以及药物反应的患者依赖性差异来验证。为了在可复制和可伸缩的系统中模拟脑肿瘤微环境,汤恣等<sup>[82]</sup>开发了一种快速3D生物打印方法来构建临床相关的仿生组织模型。

5) 复杂血管网络的3D打印:类器官培养本缺乏血管化,这对它们的持续生长以及理解血管系统在命运规范和形态发生中的作用构成了重大挑战。通过血管网络的3D打印重建,实现了宏观尺度的二尖瓣、肝组织和肺泡血管网的3D打印,并实现了初步的功能<sup>[83]</sup>。其中3D打印的预血管化肝水凝胶尺寸达到了16 mm×10 mm×4 mm,并在移植回动物体内后,成功诱导了宿主血管对3D打印类器官的生长和血供,肝脏类器官进一步表现出成熟肝脏的表型。

6) 肝脏类器官的3D打印:Kaur等<sup>[84]</sup>使用肝细胞悬浮液和4%海藻酸钠溶液的混合物作为生物墨水(细胞密度: $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ),然后在培养皿中印刷和包衣,收集印刷结构,并逐层制备肝组织以构建肝类器官。3D打印的肝脏类器官形成簇状,并显示出积聚肝糖原和转运吲哚绿和乙酰化低密度脂蛋白的能力;此后,该移植体在受体动物体内自发形成了一个血管网络系统。

8) 脑类器官的3D打印:研究人员印制了PCL

支架以培养脑样器官,并将其设计成具有良好扩散条件的结构,用于工程化扁平脑类器官(EFBO)。EFBO以高度简化的方式制造。此外,这是第1例报道的体外培养的具有回旋的神经元组织(neuronal tissue)<sup>[85]</sup>。

### 1.3.2 类器官芯片——聚合物微流控芯片以及液滴微流控

常见的类器官聚合物芯片相关的综述在本专刊的“类器官芯片在体外疾病模型中的应用研究”中详细探讨,在此不赘述。值得一提的是液滴微流控而非多聚物的微流控可以用于高通量大批量的类器官生产。Liu等<sup>[86]</sup>开发了一种液滴微流控系统,用于可控制备混合水凝胶胶囊,该系统允许大规模3D培养和形成功能和均匀的胰岛类器官,该系统具有良好的可扩展性、易操作性和稳定性,为推进类器官研究和翻译应用提供了一个强大的平台。

### 1.3.3 调控的培养方法以诱导更高仿真的类器官

在微流控芯片或3D打印之外,利用更精妙的培养基配方或培养方法,也可以部分地实现间质细胞-类器官互作或自组织血管网络。如ALI-PDO的培养方法可以较大程度地保留肿瘤病灶组织中的微环境(免疫细胞+成纤维细胞+细胞外基质+血管内皮)<sup>[87]</sup>或肠黏膜的免疫细胞<sup>[88]</sup>,并实现长期培养和共存。北京大学席建忠团队<sup>[89]</sup>报告了一种含免疫微环境的患者源性肿瘤样细胞簇(PTC)的模型,PTCs技术允许在获得肿瘤样本后2周内完成个性化药物测试。尽管ALI-PDO和PTC均能实现间质细胞与肿瘤类器官的共培养以及互相作用,不过这两种技术均无法实现类器官的增殖。

成年血管内皮细胞与非血管细胞之间的相互作用造模一直无法用器官芯片或3D生物打印实现——因为器官芯片系统和低容量微流控设备中使用的人工半透性生物材料所施加的物理限制,以及缺乏适应性的血管内皮。

血管网络可以通过单纯的培养方法,对内皮细胞的刺激或遗传学操纵实现血管网络与类器官的结合。Wörsdörfer等<sup>[90]</sup>报道了中胚层前体细胞融合建立包括血管网络在内的复杂类器官模型,其中血

管网络显示出含壁细胞的层次结构,并包括内皮细胞-细胞连接、基底膜以及管腔小窝和微泡。血管网络具有高度的可塑性,可伴随着类器官生长而扩张,并抵抗血管生成化合物和促血管生成条件(如缺氧)作出反应,并且移植后的肿瘤类器官内的血管与宿主血管相连。

Wimmer等<sup>[91]</sup>报道了从多能干细胞中开发出的自组织三维人体血管类器官(96微孔板的3D血管类器官)。这些人体血管类器官包含内皮细胞和周细胞,它们自组装成被基膜包裹的毛细血管网络。移植到小鼠体内的人类血管类器官形成一个稳定的灌注血管树,包括动脉、小动脉和小静脉。血管类器官在体外暴露于高血糖和炎性细胞因子可诱导血管基底膜增厚。人体血管在小鼠体内暴露于糖尿病环境中,也可以模拟糖尿病患者的微血管变化。此文证实了从人类干细胞中提取的类器官忠实地再现了人类血管的结构和功能。这些1~2 mm的血管类器官形成了3D毛细血管网络,由与周细胞紧密相关的管腔形成内皮细胞组成,电子显微镜证实内皮细胞之间形成管腔、基底膜和典型的紧密连接。

Palikuqi等<sup>[92]</sup>的工作表明,在无血清三维基质中培养的成熟人内皮细胞中,胚胎限制性ETS变体转录因子2(embryonic-restricted ETS variant transcription factor 2, ETV2)的短暂再激活将这些内皮细胞“重置”为适应性强的血管生成细胞,可以自组织形成可灌注和可塑性血管丛——R-VECs。作者测试了R-VECs使胰岛血管化,使去细胞大鼠肠道血管化,并使健康或癌变的人结肠类器官树状化,发现均可以使3种类器官实现生理/病理功能。这种器官-血管网模型将允许进行代谢、免疫学和理化研究和筛选,以破译器官型内皮细胞和实质细胞之间的互相作用,以确定内皮细胞异质性的决定因素。R-VECs具有持久的小管生成能力、可扩展性、血流动力学血液灌流性、几何延展性、介质相容性和细胞适应性,能够为正常类器官和肿瘤类器官形成有功能的血管网络,将为生理、代谢和免疫学研究以及药物筛选奠定基础。

## 2 类器官研究的发展趋势

类器官研究未来的发展受到3个要素的驱动:需求和挑战的驱动、技术和知识的驱动、资源和要素的驱动,并受到伦理和法规的约束。

### 2.1 需求和挑战的驱动

类器官研究主要受临床应用和转化医学领域的应用对类器官的需求及其相关挑战来驱动。具体的细分领域大概有:疾病机理的研究、新药研发、再生医学、肿瘤类器官药敏测试等。尤其是在疾病机理的研究/新药研发的过程中,由于实验动物的长期结构性短缺以及动物福利运动影响,动物模型的使用将越来越受到限制,而使用类器官模型来替代动物模型将是趋势。各项需求和挑战均引领了相关新的技术、仪器、装置和试剂的开发。

1) 高通量、高内涵、原位检测、高仿真度等需求驱使相关仪器和装置的开发和推广。

常规培养类器官尚存一些不足和挑战:(1)与人体组织相比缺乏成熟度、功能也较不完善;(2)可操作性不佳:如营养和代谢产物的运输依赖于扩散,类器官极性难以操纵;(3)不可控的随机性(异质性)——形成效率、形态和功能方面也存在较大随机差异;(4)读出困难——代谢产物、分泌肽或电势的原位监测受到与类器官形成相关的变量的检测很难,水凝胶穹顶(dome)阻碍了原位检测的传感器的部署;检测中,类器官的位置和起始大小的随机性也很难进行归一化(normalization)<sup>[93]</sup>。

此外,越来越多的类器官相关研发活动,尤其是类器官再生医学、疾病机理研究、新药研发等活动,也会驱动类器官生物样本(活)库相关技术和仪器的研发,如全自动的类器官培养和冻存仪器。由于类器官中多种细胞类型的不均匀分布和脉管系统的改变,体内肿瘤微环境(tumour microenvironment, TME)中的可溶性因子浓度、氧浓度分布和pH值在空间上也是不均匀的。传统的即浸入式培养法无法准确地再现异质性及其对癌症表型的影响,因此,时空控制肿瘤类器官培养基的技术和平台应成为未来研究的重点<sup>[94]</sup>。

类器官的自动成像和分析是非常重要的,高内涵成像分析系统对于捕获3D生物检测分析的复杂性特征尤其有用——高内涵分析工具能够查找和表征多个对象/类器官,无论它们是2D格式(单个平面或最大投影图像)还是3D格式。可以描述类器官的直径、体积、形状、特异性标记物或其他对象之间的距离。此外,可以确定和测定每个类器官中的单个细胞、细胞核或细胞器。可以对活细胞和死细胞或有特异性标记物的细胞进行计数,同时还能确定各个对象的体积及它们之间的距离。可以计算每个类器官的参数,或计算每个孔的平均参数。

基于上述这些需求和挑战,急需开发适配类器官培养、工程化、检测的仪器和装置,如3D打印仪器、高内涵检测仪器、微流控芯片的研发可能会有较大需求和突破。

2) 个体化肿瘤类器官药物敏感性检测衍生的试剂盒的开发。

个体化肿瘤类器官药物敏感性检测是眼下最受关注,最可能进行临床转化的细分领域。而大部分癌种类器官的造模和传代的成功率不够高,或者生长增殖不够旺盛不足以进行传统的细胞活力测试,又或复孔间差异较大等。技术层面的关键环节在于:(1) 标本采集流程需要尽可能确保组织标本新鲜活力足;(2) 标准化的培养基、试剂耗材和自动化流程;(3) 确保测试尤其是数据读出的可靠性和可重复性。

目前培养基为核心的试剂耗材是类器官成功造模并进行药物测试的基石,虽然最近的研究成功地确定了肿瘤类器官培养所需培养基的基本成分,但它们主要集中于少数相互关联的途径(例如,Wnt/R-spondin、表皮生长因子、转化生长因子 $\beta$ 、骨形态发生蛋白)。将患者类器官样本分为具有特定培养基配方要求的子类别(病理分型或者突变类型)进行培养可能是有益的策略<sup>[50]</sup>,由此应考虑在取材部位的细胞外基质内表征患者特异性可溶性因子信号作为培养基优化的策略。此外,癌症类器官研究中患者匹配的自体血清的收集和表征已开

始深入了解可能直接影响类器官表型的可溶性细胞因子,同时也可作为动物源性血清的潜在替代品。来自晚期癌症的类器官通常比来自正常上皮的类器官生长缓慢,可能导致来自污染的正常上皮类器官生长速度超过肿瘤类器官——这一发现很可能是由于肿瘤类器官中有丝分裂失败和随后细胞死亡的比率更高,未来的研究将为这一违反直觉的观察提供更多的见解<sup>[50]</sup>。

由于类器官的生长发育对组织特异性的细胞外基质具有偏好,对类器官培养的成功率和表型的追求可能会催生脱细胞支架技术的发展以及器官特异性ECM水凝胶产品的开发。肿瘤类器官对药物的反应往往还取决于的细胞外基质、间质细胞、血管内皮细胞,然而共同培养这些细胞缺乏相应的共培养方法<sup>[94]</sup>。

上述的这些需求或挑战均可能催生相应的仪器和配套试剂耗材的研发,例如个体化的标准化的培养基,更可靠的药敏测试方法(如基于多时点图像识别的类器官活性的自动判读)等。目前许多展示类器官培养工程基质的研究依赖于动物源性材料中的初始类器官衍生,这将导致细胞选择和表型的偏差。为了全面了解基质性质如何影响癌症类器官行为,必须将患者样本直接封装到合成基质中进行类器官衍生。这些类器官样品还必须有效传代、扩增和表征,这需要可扩展和按需的合成基质分离和细胞纯化方法。最后,随着3D癌症类器官培养用合成基质的应用日益广泛,其在高通量分析中的应用,如化疗筛选,将推动对具有可伸缩基质交联策略的成本效益和生物活性材料的需求。对标准化和可重复性的类器官的培养催生完全人工合成的ECM水凝胶。

3) 试剂耗材的国产化。

类器官相关的研发活动对试剂耗材的需求进一步催生了试剂耗材的国产化:进口试剂耗材普遍较昂贵且货期过久,极大地限制了国内类器官相关研发活动的开展,尤其是基质胶(国产化、组织器官特异化)、关键的细胞因子、培养基、冻存剂等。这些领域均有可能产生技术突破,破解国外的技术,

绕过专利壁垒。

## 2.2 技术和知识的驱动

1) 各种表征技术和检测手段丰富了人们对类器官的理解。

对类器官生长发育过程中的各项生理活动中的微环境、细胞和亚细胞层面的表征手段的技术(如单细胞测序、时空组学、空间转录组、高内涵显微镜、人工智能图像识别、牵引力显微镜等)的进步将极大地帮助人们了解类器官生长发育过程中的相关机理、见解和知识<sup>[95]</sup>。在细胞水平上监测和量化类器官生长的原位检测技术蓬勃涌现,如细胞条形码<sup>[96]</sup>和基于机器学习的图像分析<sup>[97]</sup>,将直接补充肿瘤类器官建模方面的这些进展。健康和癌症干细胞生态位之间的差异的理解,有助于解析培养基配方可能偏向的克隆选择和肿瘤类器官各亚型的扩增。深度机器学习算法 DeepNEU 被用于结合脑类器官来研究异染性脑白质营养不良(metachromatic leukodystrophy, MLD)病机制和潜在治疗方案有关的因素<sup>[98]</sup>和用于新冠病毒治病机理的研究<sup>[99]</sup>。

除了可溶性因子的存在和浓度外,肿瘤类器官培养基配方的其他一些重要理化性质在肿瘤类器官培养中尚未得到充分的研究。例如,已知生长因子信号具有高度的信号通路上下游的依赖性,因此将受到多个因素的影响,包括配体/抑制剂/激动剂的存在、周围 pH 值和 ECM 的组成/结构。此外,体外肿瘤类器官培养基中不同氧合水平的影响尚未得到广泛探讨,尽管低氧条件对调节体内癌细胞表型至关重要。必要的培养基成分,以维持培养中的非肿瘤细胞并支持异型细胞相互作用。对正常健康类器官进行基因编辑诱导癌变的实施可能会提供更容易的癌症进展建模方法<sup>[94]</sup>。

2) 微加工技术促进原位检测或更高仿真度的建模。

微加工技术的进步(如 3D 生物打印、微流控芯片等)将极大地拓展人们对类器官生长进行操纵的手段,也帮助完善类器官培养的标准化。例如,这些技术将能够精确研究初始细胞簇大小如何改变类器官形成效率和癌症亚群的选择。微物理系统

提供了一种有希望的方法来创建组织复杂性增加的类器官/肿瘤芯片模型,包括成熟脉管系统的整合。迄今为止,已经设计了几种微流控设备来模拟癌症与血管网络的相互作用,为肿瘤细胞内渗、外渗、药物输送和肿瘤生长提供了独特的评估<sup>[100-101]</sup>。这些专门为肿瘤类器官设计的微流控设备的进一步开发对于准确再现患者特定肿瘤的细胞和解剖变异性至关重要<sup>[94]</sup>。除了基于微流控的方法外,新兴的微制造技术(如双光子图案)已经证明了活性生长因子的四维时空表达<sup>[102]</sup>。

## 2.3 资源和要素的驱动

随着患者来源的类器官应用得越来越多,以大型三甲医院为核心建立的类器官生物样本库将成为高价值的研究模型,尤其是肿瘤类器官生物样本库的建设为广泛的癌症表型提供了独特的见解。基于类器官生物样本库的科研活动将会是转化医学的重要组成部分。

## 2.4 伦理和法规的约束

类器官领域相关的法规有《生物安全法》《人类遗传资源管理条例》,CDE 和药械审评中心的技术指导原则等<sup>[103]</sup>。

# 3 结论

作为一个新兴的研究领域,类器官技术和类器官研究目前正处于百花齐放的阶段——世界各地的研究团队在各自感兴趣的细分领域对类器官技术进行了很有价值的探索。类器官模型目前作为动物模型的一个很好的补充,受到了学术界的肯定,然而类器官技术想要真正替代动物模型或者替代临床研究,仍需要假以时日。类器官需要在以下方面实现突破的点有:试剂耗材的国产替代、培养过程的标准化、相关专用仪器的开发、更高仿真度的类器官工程化、类器官样本库的共享机制的建设等。在这个阶段,作为体外诊断产品的肿瘤类器官药物敏感性试剂盒的开发、依据类器官进行的临床试验分层等有价值的尝试将会引领整个类器官研究领域更好的发展。

## 参考文献 (References)

- [1] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies[J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [2] Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from escs and its active manipulation by extrinsic signals[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 519-532.
- [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): 262-265.
- [4] Method of the year 2017: Organoids[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(1): 1-1.
- [5] Li M, Izpisua Belmonte J C. Organoids—preclinical models of human disease[J]. *New England Journal of Medicine*, 2019, 380(6): 569-579.
- [6] Trisno S L, Philo K E D, McCracken K W, et al. Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate sox2 functions during esophageal specification[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 501-515.e507.
- [7] Mccracken K W, Catá E M, Crawford C M, et al. Modeling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 400-404.
- [8] Tsai Y H, Czerwinski M, Wu A, et al. A method for cryogenic preservation of human biopsy specimens and subsequent organoid culture[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 6(2): 218-222.e217.
- [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): 787-793.e786.
- [10] Turco M Y, Gardner L, Hughes J, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(5): 568-577.
- [11] Diao J M, Liu J, Wang S Y, et al. Sweat gland organoids contribute to cutaneous wound healing and sweat gland regeneration[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(3): 238.
- [12] Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, et al. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4216.
- [13] Hayashi R, Okubo T, Kudo Y, et al. Generation of 3D lacrimal gland organoids from human pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2022, 605(7908): 126-131.
- [14] Huch M, Dorrell C, Boj S F, et al. *In vitro* expansion of single lgr5<sup>+</sup> liver stem cells induced by wnt-driven regeneration[J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 247-250.
- [15] 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.
- [16] Hu H L, Gehart H, Artegiani B, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids[J]. *Cell*, 2018, 175(6): 1591-1606.e1519.
- [17] Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*[J]. *Development*, 2013, 140(21): 4452-4462.
- [18] Wang D, Wang J, Bai L, et al. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident procr<sup>+</sup> progenitors[J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1198-1211. e1119.
- [19] Danjo T, Eiraku M, Muguruma K, et al. Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatorial treatment with extrinsic signals[J]. *Journal of Neuroscience*, 2011, 31(5): 1919-1933.
- [20] Lancaster M A, Renner M, Martin C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-379.
- [21] Jo J, Xiao Y, Sun A X, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2): 248-257.
- [22] Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue[J]. *Nature Communication*, 2015, 6: 8896.
- [23] Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(4): 537-550.
- [24] Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human escs[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-785.
- [25] Saha A, Capowski E, Fernandez Zepeda M A, et al. Cone photoreceptors in human stem cell-derived retinal organoids demonstrate intrinsic light responses that mimic those of primate fovea[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(3): 460-471.e463.

- [26] Takasato M, Er P X, Chiu H S, et al. Kidney organoids from human ips cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 564–568.
- [27] Schutgens F, Rookmaaker M B, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 303–313.
- [28] Jamieson P R, Dekkers J F, Rios A C, et al. Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics[J]. *Development*, 2017, 144(6): 1065–1071.
- [29] Karthaus W R, Iaquina P J, Drost J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 163–175.
- [30] Van Der Vaart J, Bosmans L, Sijbesma S F, et al. Adult mouse and human organoids derived from thyroid follicular cells and modeling of graves' hyperthyroidism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(51): e2117017118.
- [31] Lewis-Israeli Y R, Wasserman A H, Gabalski M A, et al. Self-assembling human heart organoids for the modeling of cardiac development and congenital heart disease[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 5142.
- [32] Shkumatov A, Baek K, Kong H. Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94764.
- [33] Salahudeen A A, Choi S S, Rustagi A, et al. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids[J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 670–675.
- [34] Katsura H, Sontake V, Tata A, et al. Human lung stem cell-based alveolospheres provide insights into SARS-CoV-2-mediated interferon responses and pneumocyte dysfunction[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(6): 890–904. e898.
- [35] Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, et al. The notch and wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids[J]. *Nature Communication*, 2015, 6: 8989.
- [36] Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, et al. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture[J]. *Nature*, 2011, 480(7375): 57–62.
- [37] Koehler K R, Mikosz A M, Molosh A I, et al. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture[J]. *Nature*, 2013, 500(7461): 217–221.
- [38] Wagar L E, Salahudeen A, Constantz C M, et al. Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(1): 125–135.
- [39] Seet C S, He C, Bethune M T, et al. Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(5): 521–530.
- [40] Hisha H, Tanaka T, Kanno S, et al. Establishment of a novel lingual organoid culture system: Generation of organoids having mature keratinized epithelium from adult epithelial stem cells[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 3224.
- [41] Aihara E, Mahe M M, Schumacher M A, et al. Characterization of stem/progenitor cell cycle using murine circumvallate papilla taste bud organoid[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 17185.
- [42] Sakib S, Uchida A, Valenzuela-Leon P, et al. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture [J]. *Biology of Reproduction*, 2019, 100(6): 1648–1660.
- [43] Sheridan M A, Fernando R C, Gardner L, et al. Establishment and differentiation of long-term trophoblast organoid cultures from the human placenta[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(10): 3441–3463.
- [44] Poletti M, Arnauts K, Ferrante M, et al. Organoid-based models to study the role of host-microbiota interactions in IBD[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2020, 15(7): 1222–1235.
- [45] Strikoudis A, Cieślak A, Loffredo L, et al. Modeling of fibrotic lung disease using 3D organoids derived from human pluripotent stem cells[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(12): 3709–3723.e3705.
- [46] Ouchi R E, Togo S, Kimura M, et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 30(2): 374–384. e376.
- [47] 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): 1762–1772.
- [48] Dekkers J F, Wiegerinck C L, de Jonge H R, et al. A functional cfr assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(7): 939–945.
- [49] Amarachintha S P, Mourya R, Ayabe H, et al. Biliary organoids uncover delayed epithelial development and barrier function in biliary atresia[J]. *Hepatology*, 2022, 75(1): 89–103.
- [50] Yuki K, Cheng N, Nakano M, et al. Organoid models of

- tumor immunology[J]. *Trends in Immunology*, 2020, 41(8): 652–664.
- [51] Wang W, Yuan T, Ma L, et al. Hepatobiliary tumor organoids reveal hla class i neoantigen landscape and anti-tumoral activity of neoantigen peptide enhanced with immune checkpoint inhibitors[J]. *Advanced Science*, 2022, e2105810.
- [52] Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(7): 407–418.
- [53] Ganesh K, Wu C, O' Rourke K P, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(10): 1607–1614.
- [54] Kopper O, de Witte C J, Löhmußaar K, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and inter-patient heterogeneity[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 838–849.
- [55] Broutier L, Mastrogianni G, Verstegen M M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(12): 1424–1435.
- [56] Yao Y, Xu X Y, Yang L F, et al. Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 17–26.e6.
- [57] Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers[J]. *Science*, 2018, 359(6378): 920–926.
- [58] Kijima T, Nakagawa H, Shimonosono M, et al. Three-dimensional organoids reveal therapy resistance of esophageal and oropharyngeal squamous cell carcinoma cells [J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 7(1): 73–91.
- [59] Yan H H N, Siu H C, Law S, et al. A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 882–897.e811.
- [60] Nuciforo S, Fofana I, Matter M S, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(5): 1363–1376.
- [61] Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 176–187.
- [62] Sachs N, de Ligt J, Kopper O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity [J]. *Cell*, 2018, 172(1–2): 373–386.e310.
- [63] Lee S H, Hu W H, Matulay J T, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 515–528.e517.
- [64] Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(52): 26580–26590.
- [65] Tiriac H, Belleau P, Engle D D, et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer[J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8(9): 1112–1129.
- [66] Williamson I A, Arnold J W, Samsa L A, et al. A high-throughput organoid microinjection platform to study gastrointestinal microbiota and luminal physiology[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 6(3): 301–319.
- [67] Co J Y, Margalef-Català M, Li X, et al. Controlling epithelial polarity: A human enteroid model for host-pathogen interactions[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(9): 2509–2520.e2504.
- [68] Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, et al. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract[J]. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N J)*, 2014, 239(9): 1124–1134.
- [69] Han Y L, Yang L L, Lacko L A, et al. Human organoid models to study SARS-CoV-2 infection[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(4): 418–428.
- [70] Sugimoto S, Kobayashi E, Fujii M, et al. An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome[J]. *Nature*, 2021, 592(7852): 99–104.
- [71] Watanabe S, Kobayashi S, Ogasawara N, et al. Transplantation of intestinal organoids into a mouse model of colitis[J]. *Nature Protocols*, 2022, 17(3): 649–671.
- [72] Sampaziotis F, Justin A W, Tysoe O C, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(8): 954–963.
- [73] Caplan A, Parent B. Ethics and the emerging use of pig organs for xenotransplantation[J]. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2022, doi: 10.1016/j.healun.2022.06.008.
- [74] Ren Y, Yang X, Ma Z J, et al. Developments and opportunities for 3d bioprinted organoids[J]. *International Jour-*

- nal of Bioprinting, 2021, 7(3): 18–36.
- [75] Zheng F Y, Xiao Y, Liu H, et al. Organ-on-a-chip: Patient-specific organoid and organ-on-a-chip: 3D cell-culture meets 3D printing and numerical simulation[J]. *Advanced Biology*, 2021, 5(6): e2000024.
- [76] Rawal P, Tripathi D M, Ramakrishna S, et al. Prospects for 3D bioprinting of organoids[J]. *Bio-Design and Manufacturing*, 2021, 4(3): 627–640.
- [77] Brassard J A, Nikolaev M, Hübscher T, et al. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting[J]. *Nature Materials*, 2021, 20(1): 22–29.
- [78] Carberry B J, Hergert J E, Yavitt F M, et al. 3D printing of sacrificial thioester elastomers using digital light processing for templating 3D organoid structures in soft biomatrices[J]. *Biofabrication*, 2021, doi: 10.1088/1758-10.1088/5090/ac1c98.
- [79] Kim E, Choi S, Kang B, et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer[J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 664–669.
- [80] Lawlor K T, Vanslambrouck J M, Higgins J W, et al. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation[J]. *Nature Materials*, 2021, 20(2): 260–271.
- [81] Jiang S W, Zhao H R, Zhang W J, et al. An automated organoid platform with inter-organoid homogeneity and inter-patient heterogeneity[J]. *Cell Reports Medicine*, 2020, 1(9): 100161.
- [82] Tang M, Xie Q, Gimple R C, et al. Three-dimensional bioprinted glioblastoma microenvironments model cellular dependencies and immune interactions[J]. *Cell Research*, 2020, 30(10): 833–853.
- [83] Grigoryan B, Paulsen S J, Corbett D C, et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels[J]. *Science*, 2019, 364(6439): 458–464.
- [84] Kaur S, Tripathi D M, Ghosh S. Three-dimensional bioprinted hepatorganoids in liver failure[J]. *Gut*, 2021, 70(5): 998–999.
- [85] Groll J, Boland T, Blunk T, et al. Biofabrication: Reappraising the definition of an evolving field[J]. *Biofabrication*, 2016, 8(1): 013001.
- [86] Liu H T, Wang Y Q, Wang H, et al. A droplet microfluidic system to fabricate hybrid capsules enabling stem cell organoid engineering[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(11): 1903739.
- [87] Neal J T, Li X N, Zhu J J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972–1988.e1916.
- [88] Ootani A, Li X, Sangiorgi E, et al. Sustained *in vitro* intestinal epithelial culture within a wnt-dependent stem cell niche[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(6): 701–706.
- [89] Yin S Y, Xi R B, Wu A W, et al. Patient-derived tumor-like cell clusters for drug testing in cancer therapy[J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(549): eaaz1723
- [90] Wörsdörfer P, Dalda N, Kern A, et al. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 15663.
- [91] Wimmer R A, Leopoldi A, Aichinger M, et al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy[J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 505–510.
- [92] Palikuqi B, Nguyen D-H T, Li G, et al. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis[J]. *Nature*, 2020, 585(7825): 426–432.
- [93] Hofer M, Lutolf M P. Engineering organoids[J]. *Nature Reviews Materials*, 2021, 6(5): 402–420.
- [94] LeSavage B L, Suhar R A, Brogiere N, et al. Next-generation cancer organoids[J]. *Nature Materials*, 2022, 21(2): 143–159.
- [95] Bayir E, Sendemir A, Missirlis Y F. Mechanobiology of cells and cell systems, such as organoids[J]. *Biophysical Reviews*, 2019, 11(5): 721–728.
- [96] Umkehrer C, Holstein F, Formenti L, et al. Isolating live cell clones from barcoded populations using crispra-inducible reporters[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(2): 174–178.
- [97] Kassis T, Hernandez-Gordillo V, Langer R, et al. Orgaquant: Human intestinal organoid localization and quantification using deep convolutional neural networks[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12479.
- [98] Esmail S, Danter W R. Artificially induced pluripotent stem cell-derived whole-brain organoid for modelling the pathophysiology of metachromatic leukodystrophy and drug repurposing[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(4): 440.
- [99] Esmail S, Danter W R. Lung organoid simulations for modelling and predicting the effect of mutations on SARS-CoV-2 infectivity[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1701–1712.
- [100] Haase K, offeddu G S, Gillrie M R, et al. Endothelial regulation of drug transport in a 3D vascularized tumor

- model[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(48): 2002444.
- [101] Chen M B, Whisler J A, Fröse J, et al. On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(5): 865–880.
- [102] Broguiere N, Lüchtfeld I, Trachsel L, et al. Morphogenesis guided by 3D patterning of growth factors in biological matrices[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(25): e1908299.
- [103] 罗会宇, 马永康. 人源类器官的应用前景、伦理风险与治理建议[J]. *科技导报*, 2022, 40(8): 6–13.

## History and prospect of organoids research

HE Kangxin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jingyu<sup>1</sup>, QIAN Jingjing<sup>2</sup>, LI Lanjuan<sup>1,2\*</sup>

1. State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, National Medical Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China
2. Jinan Microecological Biomedicine Shandong Laboratory, Jinan 250117, China

**Abstract** The traditional monolayer cell cultures (cell lines) have been widely used, however, such models fail to recapitulate the cellular heterogeneity, the structure, and the functions of the primary tissues. The organoids, which are tiny, self-organized three-dimensional tissue cultures derived from the stem cells, possess the histological features and the physiological functions highly similar to those of the deriving organs. The patient-derived organoid models have excellent characteristics, such as the humanization, the personalization, the good simulation ability, and the self-organization. Recent research advances show that the organoid models have served as a promising tool in three scenarios, namely, the personalized drug response prediction, the new drug development, and the organoid biobank. The organoid technologies refer to a series of organoid model-related technologies that have a wide range of application prospects in various aspects, for instance, the developmental biology, the regenerative medicine, the disease research, the drug development, and the precision medicine, with high social and economic benefits at the same time. Therapeutic products developed based on the organoid techniques can help achieve precision medicine. Currently, the trends of the organoid technology are influenced by a combination of four factors, specifically, the demand and challenge drivers, the technology and knowledge drivers, the resource and factor drivers, and the ethical and regulatory constraints. This paper discusses the research history and the development trends, focusing on the advantages, the limitations, and the potential applications of organoid models and technologies.

**Keywords** organoid model; organoids techniques; organoids biobank ●



(责任编辑 刘志远)