

# 类器官研究技术

## 演变与应用



Essential  
Knowledge  
Briefings

Sponsored by:





# LESS TROUBLESHOOTING. MORE EXPERIMENTING.

使用STEMCELL Technologies优化后的类器官培养基，尽早达成您的科研突破。  
我们提供高品质的类器官培养工具，培训，技术支持和科学资源。

我们的类器官培养基具有如下优势：

- 通过性能测试的质量认证，所有的原材料经过严苛的筛选
- 适用于不同的细胞系和供体样本
- 提供详细的实验流程和技术支持

了解更多，请访问[www.stemcell.com/GrowOrganoids](http://www.stemcell.com/GrowOrganoids)。

封面图：STEMCELL Technologies

版权所有 © Wiley Periodicals, Inc。保留所有权利。未经版权所有人书面许可，本文任何部分都不得以任何形式或通过任何方式进行复制、存储或传播。

# 目录

3 引言

5 历史性里程碑

11 实践应用

24 问题与解决方案

26 未来方向

28 参考文献

30 延伸阅读

## 引言

“我听说过类器官，并且认为类器官可能是适用于我感兴趣的研究领域的完美模型”，慕尼黑工业大学营养生理学实验室首席研究员Tamara Zietek说。在使用类器官之前，Zietek的研究小组使用在体（小鼠）和离体（细胞系）系统进行研究，但是他们也在寻找一种可以结合两者优点的系统。使用原代细胞培养是一种改进方法，但是由于细胞不能传代，所以此系统不能用于长期研究。因此，Zietek使用类器官模型系统进行研究，以便更好地了解肠道营养成分的运输和感知。

近年来，随着对器官生理学、发育和维持的深入了解，我们已经能够制备三维（3D）类器官，类器官是一种培养的3D细胞结构，能够模拟器官功能、组成和发育特征。鉴于身体器官是三维结构，而类器官可以更好地重现在体内的信号传导和形态，所以在器官研究中类器官比二维培养系统更具代表性。因此，科学家已开始使用类器官研究人体正常和病理状况，以及用其去试验人类疾病的潜在疗法。

培养类器官的方法具有组织依赖性，但一些总的原则适用。科学家在细胞外基质中嵌入起始材料，例如来源于多能干细胞（PSCs）的祖细胞或从组织标本中获取的成体干细胞（ASCs）。在含有模拟体内细胞环境必需的营养成分和生长因子的培养基中进行细胞培养。在这些条件下，起始细胞开始扩增，并且自行组织构建可以长时间保持的3D结构（类器官）。对于一些上皮性类器官（例如，肠道类器官），可以通过常规传代无限期地维持培养物（即，将类器官剪成小块并在新培养基中重新种植培养）。

明确类器官的培养条件并非易事。必须满足特定条件才能保持器官驻留的干细胞，并诱导其分化为适当的细胞。类器官制备的这个基

本特性，使得类器官系统成为理解器官发育，以及成人或组织驻留干细胞（终生维持特定组织）生物学的理想选择。类器官还可应用于其他领域，例如细胞生物学、药物开发和疾病研究。类器官的广泛应用可以显著减少动物模型的使用，同时允许对人体细胞进行简单的实验，使得类器官成为有价值的模型系统。因此，类器官模型系统迅速被全球不同实验室采用。

根据使用的起始细胞、组织以及细胞来源于健康或患病组织，可用多种方式对类器官进行分类。迄今为止，已成功使用多种组织制备了类器官，包括脑、乳腺、肠道、肾、肝、肺、视杯、胰腺和前列腺。另外，使用肿瘤组织制备的类器官能够更好的模拟体内肿瘤特征和遗传异质性，而在2D培养物中几乎不可能实现这些功能。

类器官确实是理解干细胞生物学和器官发育的重大飞跃，但是使用联合和/或互补技术甚至可以推动类器官更广泛的应用。因此，联合使用类器官制备和基因编辑技术CRISPR-Cas9等不断发展的技术，可能对彻底研究生物学和医学问题至关重要。

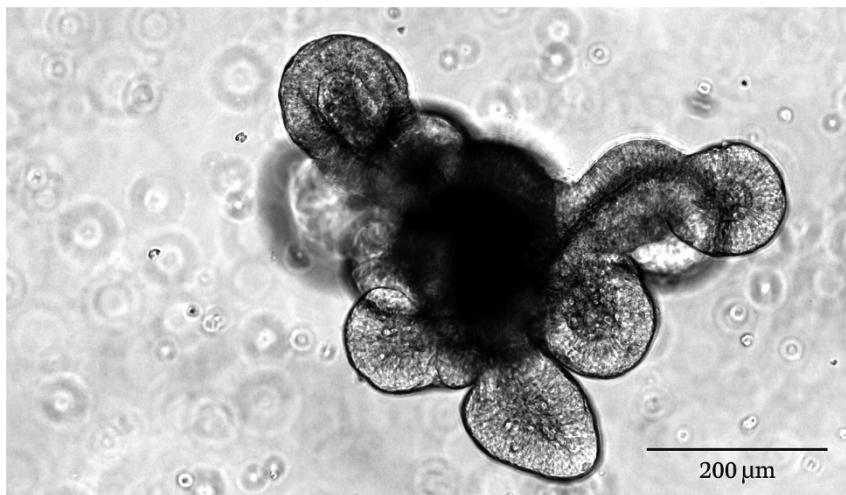


图1 | 小鼠肠道类器官的光学显微镜观察结果

来源：STEMCELL Technologies

## 历史性里程碑

针对类器官的研究和使用类器官进行的研究的主要成就，可以按时间顺序参见下列重点论文：

- Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., et al. (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med.* 15(6):701–706.
  - 为了寻找能够模拟肠道生长和分化的培养系统，斯坦福大学医学院的Calvin Kuo-Maureen Lyles D'Ambrogio教授及其同事开发出一种制备肠道类器官的方法。他们发现，Wnt生长因子拮抗剂能够抑制类器官的生长，而其他处理方法则可用于触发特定类型细胞的分化，例如杯状细胞和肠内分泌细胞。
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nat.* 459(7244):262–265.
  - 肠壁中的新细胞来源于隐窝（绒毛之间的凹陷）。Toshiro Sato（当时在乌得勒支大学医学中心的Hans Clevers实验室工作，现在庆应义塾大学医学院工作）及其同事开发了一种系统可以诱导隐窝细胞产生类器官。特别是科学家开始使用表达Lgr5的隐窝细胞制备这些类器官，而Lgr5能够触发细胞发生循环。
- Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., et al. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141(5):1762–1772.
  - Sato及其同事继续研究使用隐窝来源的干细胞制备肠道类器

官, 开发了使用小鼠结肠和人类小肠与结肠培养出健康和疾病特异性类器官的方法。对这些类器官培养方法进行优化后, Sato的团队报告:“我们开发了一种可用于研究人类胃肠道感染、炎症或肿瘤的技术。”研究人员补充道, 他们没有发现“离体成体干细胞的复制潜力存在固有限制”。

- Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nat.* 470(7332):105–109.
  - Jason Spence (当时在辛辛那提儿童医院医疗中心工作, 现在是密歇根大学医学院内科副教授) 及其同事使用hPSCs开发出了一种“强大而有效的方法, 通过对一系列生长因子进行时序调节来模拟胚胎肠道的发育过程, 诱导hPSCs分化为肠道组织。”这种方法包括内胚层形成和模式确定, 后肠规格和形态发生, 以及用于肠道生长、形态发生和细胞分化的培养系统。Spence的研究小组指出:“由此产生的3D肠道‘类器官’由极化的柱状上皮组成, 后者可以形成绒毛状结构和表达肠道干细胞标志物的隐窝样增殖区”。
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., et al. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(50):20284–20289.
  - 以来源于人胚胎干细胞的皮质神经上皮为研究对象, Taisuke Kadoshima (当时在RIKEN发育生物学中心工作, 目前在Asubio Pharma工作) 及其合作者在神经类器官中研究了新皮质发生。研究人员指出:“自行组织的皮层组织会沿着背侧—腹侧轴线自发形成极性, 并会出现区域特异性滚动性形态发

生,产生半球形结构。”“神经上皮可以自行形成一个多层次结构,包括三个神经元区域(副板、皮质板和Cajal-Retzius细胞区域)和三个祖细胞区域(脑室区、脑室下区和中间区),按照人类妊娠中早期观察到的胎儿皮层从顶端到基底的顺序排列。”基于这些和其他特征,科学家得出结论:“人类新皮层发生包括能够让复杂的新皮质特征出现的内在流程。”

- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nat.* 501(7467):373–379.
  - Madeline Lancaster (当时在奥地利学院分子生物技术研究所工作,目前是医学研究委员会(MRC)分子生物学实验室的首席研究员)及其同事指出:“人类大脑的复杂性导致难以在模型生物体中研究许多脑部疾病,突出了对人类大脑发育的体外模型的需求。”使用健康对照者和小头畸形患者的hPSCs制备了多种脑类器官。除了可以形成类似大脑皮质这样的区域外,这些类器官还可以“重现人类大脑皮质的发育特征,即:具有丰富外部放射状胶质干细胞的特征性祖细胞结构,” Lancaster的团队指出。
- Bagley, J.A., Reumann, D., Bian, S., et al. (2017). Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat. Methods* 15:734–751.
  - 为了制备神经类器官对大脑进行更高级的研究,3D结构需要能够代表一些大脑区域。为了制备这样的神经类器官,Joshua Bagley (奥地利维也纳奥地利科学院分子生物技术研究所Juergen Knoblich实验室的博士后研究员)及其同事利用人诱导PSC (iPSCs) 及其融合细胞,使用小分子模式制备了背侧

和腹侧脑类器官。这些结构能够显示人类胚胎脑中的一些发育过程，包括在大脑腹侧部分发育并迁移到背部区域的产生 $\gamma$ -氨基丁酸（GABA）的中间神经元。研究人员发现，迁移细胞是表达HuC/D的神经元，而表达MAP2则代表成熟神经元。基于其他分子标志物，科学家报道：“我们的结果表明，类器官融合包含了来自主要腹侧前脑亚区的多种中间神经元亚型。”通过制备模仿其他大脑区域的类器官并对其进行融合，可以这种方法研究多种神经元回路。

- Birey, F., Andersen, J., Makinson, C.D., et al. (2017). Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nat.* 545:54–59.
  - 背侧前脑，也被称为大脑皮质，含有释放神经递质谷氨酸的兴奋性神经元。腹侧前脑或皮质下区，包含释放GABA的抑制性神经元。为了研究皮质中神经回路的发育情况，Fikri Birey（斯坦福大学Sergiu Paşa实验室的博士后研究员）及其同事们使用hPSCs制备了人类皮质（背侧）球状体（hCS）和人类皮质下区球状体（hSS）。将两种球体放入试管中，三天内可发生融合。科学家使用绿色荧光蛋白（GFP）发现，细胞从hSS转移到hCS。该团队使用这种模型研究了Timothy综合征（TS），TS表现为皮质神经元迁移缺陷导致的多种神经缺陷，包括自闭症谱系障碍。科学家们使用来自TS患者的细胞制备了hCS和hSS。与来自对照受试者的hCS-hSS结构相比，神经元在来自TS患者的结构中迁移速度更慢。对啮齿类动物模型进行的研究表明，L型钙通道（LTCC）迁移在TS致病过程中发挥了一定作用。Birey的研究小组指出“通过降低LTCC的活性，可以恢复携带TS功能获得突变的中间神经元的迁移缺陷。”目前，可以对患者来源的自闭症模型中的皮质兴奋—抑制平衡进行体外机制研究。这项工作显示，即使在皮

质中,也可以使用类器官探索神经发育的解剖学和分子特征。

- Freedman, B.S., Brooks, C.R., Lam, A.Q., et al. (2015). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat. Commun.* 6:8715.
  - Benjamin Freedman (当时在哈佛大学医学院工作,目前在华盛顿大学医学院工作)及其合作者研究了人多能干细胞(hPSC)来源的肾细胞是否能“重建组织特异性表型。”为了寻找答案,研究人员制备了上胚层期hPSCs的3D培养物,并发现抑制酶一糖原合成酶激酶3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )能够诱导球状体分化成“节段性、肾单位样肾脏类器官,这种类器官含有的细胞群具有近端小管、足细胞和内皮细胞的特征。”此外,科学家还发现,基因调控可用于创建疾病模型。例如,作者报道:“敲除多囊肾病基因PKD1或PKD2可诱导肾脏小管形成囊肿。”
- Takasato, M., Er, P.X., Chiu, H.S., et al. (2015). Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nat.* 526(7574):564–568.
  - 肾脏展示了构建可靠的可复制的类器官所需的细胞类型多样性。“再生肾脏需要诱导20多种不同的细胞类型,这些细胞分别负责分泌、调节pH以及电解质和体液平衡”, Minoru Takasato (当时在昆士兰大学工作,目前在RIKEN生物系统动力学研究中心工作)及其科研团队指出。这些细胞可以构建肾脏的特定部分,例如集合管和肾单位。在这篇论文中, Takasato及其同事介绍了一种能够制备包含这些结构的肾脏类器官的技术。研究人员指出:“在这些类器官中,单个肾单位可分为远端和近端小管、早期Henle环,以及包含足细胞的

肾小球，可阐述足化过程和进行血管形成。”研究人员得出结论，这些肾脏类器官可用于未来的应用，包括肾毒性筛查、疾病建模和治疗细胞的来源。”

## 实践应用

### 类器官类型和培养条件

类器官系统有两种主要类别：从PSCs培养的类器官和从成体干细胞或祖细胞培养的类器官。可以通过诱导PSCs分化成形成所需类器官的谱系特异性祖细胞制备PSC来源的类器官。在模拟目标器官体内发育环境的条件下对这些祖细胞进行培养，最终可以形成类器官。对于脑类器官，通过忽略或添加模式因子，类器官可以自行组织成具有几个不同脑区的类器官（例如，脑类器官），或者可以被引导形成具有特定脑区的类器官（例如，前脑或中脑类器官）。PSC来源的类器官的优点是起始材料易于获取，因为可以使用既往建立的或患者特异性PSC细胞系。这些类器官能够模拟发育中的器官，而不是成体器官。ASC来源的类器官来自于在体内负责维持该器官的组织特异性干细胞或祖细胞。这些祖细胞来源的类器官能够更好地模拟成人组织，具有可以模拟先天性和非先天性疾病状态的优点，包括模拟表观遗传特征和肿瘤特征。

两类类器官都使用细胞外基质内的特定细胞培养基进行培养，这些细胞外基质是支撑3D结构的必需条件。使用的细胞培养基取决于类器官的类型和来源组织，并且通常可以模拟被培养细胞在体内的信号传导环境。对于PSC来源的脑类器官，培养条件模拟发育脑内的信号传导，允许类器官早期阶段存在的神经祖细胞分化并自行组织形成大脑的层状结构。ASC来源的肠道类器官的培养条件可以通过类似的方式模拟肠隐窝基底部的信号传导、干细胞群以及这些干细胞亚群分化形成肠道的细胞补充。

### 成体干细胞来源的类器官

Sato等人（2009）开发了一种从分离的肠隐窝中培养ASC来源的肠道类器官的方法。这种方法开启了器官型3D细胞培养技术的十年创

新。这些肠道类器官培养模型利用了肠道干细胞的生物学,即这些细胞终生在体内分裂活跃,可以补充自身细胞群,并且每5~10天可以完成全部肠道上皮细胞的更新。在类器官培养系统中,包含了能够在体内实现这些补充特性的环境条件。这允许使用相同的细胞在体外构建真正的肠道模型。在内环境稳定的情况下,虽然并非所有组织都带有再生能力相同的ASCs,但是许多器官都含有在特定条件下能够再生组织的细胞群。这使得研究人员能够开发出多种组织的类器官培养条件,包括肝脏、胰腺、前列腺、乳腺和气道。

使用ASCs制备类器官有几个优点。首先,因为培养物来源于表型成体细胞,所得的培养物也倾向于具有成体表型。制备方案也可能比PSC来源类器官的制备方案更简短,因为起始材料已经是组织特异性祖细胞。这些技术相对容易学习和使用,有助于实验室将类器官实验添加到已经建立的实验库中。制备之后,许多ASC来源的类器官培养物可以通过常规传代进行长期维持,并且可以冷冻保存。不过,原始起始材料需要患者活检并获得相关知情同意,这可能会明显限制许多研究人员获取这些材料,尤其是工业实验室。

虽然ASC和PSC来源的类器官的应用范围存在大量重叠,但ASC来源的类器官特别适合某些特殊用途。例如,ASC来源的类器官可用于模拟非遗传性疾病和癌症,而使用PSC来源的系统模拟这两类疾病的难度很大。实际上,使用ASC来源的肿瘤类器官构建患者特异性肿瘤模型,已经获得了越来越多研究者的认可。类器官中的癌症特征、遗传异质性和药物反应特征具有高保真度,可用于精准医学应用。

成体干细胞的来源对于成功制备和使用类器官至关重要。研究人员经常使用小鼠类器官比较体内和体外研究的结果。然而,使用人干细胞制备的类器官具有独特的用途,例如研究患者自身肿瘤的治疗反应(精准医学)或人干细胞的基础生物学。

与任何新兴技术一样,类器官是否是适用于特定用途的模型系统,必须进行验证。例如,Zietek等人(2015)使用野生型小鼠和缺乏特

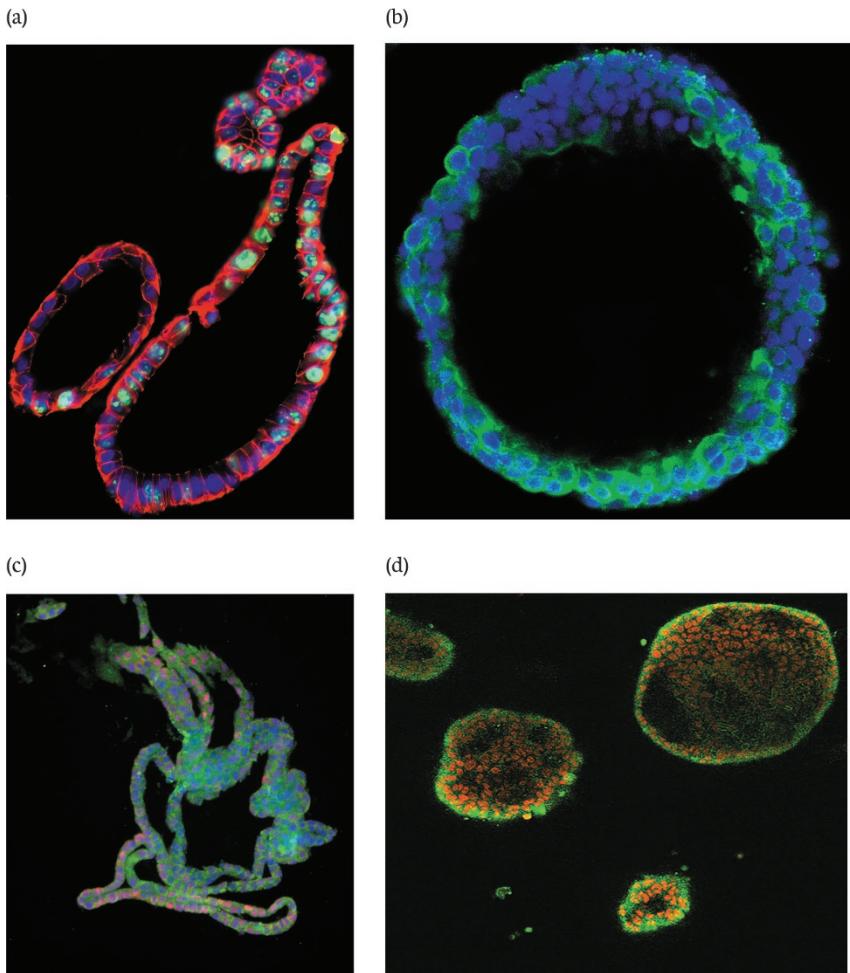


图2 | 成体干细胞来源的类器官：(a) 人结肠类器官；(b) 小鼠前列腺类器官；(c) 腺腺外分泌类器官；和 (d) 肝脏祖细胞类器官

来源：STEMCELL Technologies

定营养转运蛋白的小鼠制备了肠道类器官。结果显示,这种类器官因为保持了小鼠肠道的表型和功能特征,可以作为很好的研究模型。同样,目前正在探索将ASC来源的类器官用于基础、学术研究和药物开发等诸多领域。

### 成体干细胞的病例研究

肠道粘膜表面的上皮细胞每5~7天更新一次。隐窝中的干细胞是这种自我更新的来源,这些干细胞经过刺激可以分化为肠道内的任何细胞类型。为了探索其中的分子机制,Sehgal等人(2018)使用温和细胞离解试剂从小鼠小肠中分离了隐窝,然后使用IntestiCult<sup>TM</sup>类器官生长培养基(小鼠)培养隐窝以制备肠道类器官。科学家已经知道集落刺激因子1(CSF1)在肠道上皮细胞的维持中发挥作用,但具体机制尚不清楚。

CSF1能够驱动单核细胞分化为巨噬细胞。通过巨噬细胞消融和CSF1R阻断研究,科学家发现CSF1依赖性巨噬细胞可以通过帮助肠道上皮Paneth细胞(Paneth细胞能够释放抗菌素抑制隐窝内细菌感染,并防止细菌穿过肠道上皮细胞)分化来“影响肠道上皮细胞分化和内环境稳定”。这项工作得出两个结论:1)使用类器官能够快速评估CSF1在有生理学意义的体外细胞培养模型中的作用;2)深入了解了CSF1R依赖性隐窝相关性巨噬细胞,这些巨噬细胞是“维持小肠肠道干细胞生态位所必需的基础成分”。

另一个示例是使用类器官进行肝脏研究。Broutier等人(2017)报道了使用未治疗的原发性肝癌(PLC)患者的肝脏肿瘤组织制备肿瘤类器官。通过这项技术,研究人员使用三种最常见的PLC亚型制备了类器官:肝细胞癌(HCC)、胆管癌(CC)和HCC/CC(CHC)联合性肿瘤。

几项比较性研究证实,类器官能够模仿原始肿瘤。在组织学上,肿瘤类器官能够保持每种肿瘤亚型的患者特异性和异质性形态特征。

例如, HCC和CHC肿瘤类器官含有致密结构,而CC肿瘤类器官则含有不规则的囊性结构,所有这些特征都不同于健康肝脏类器官中有序的囊状结构。基于全基因组转录组学分析(RNA测序或RNAseq)以及与PLC亚型的已知基因表达模式进行比较,Broutier等人发现:“基

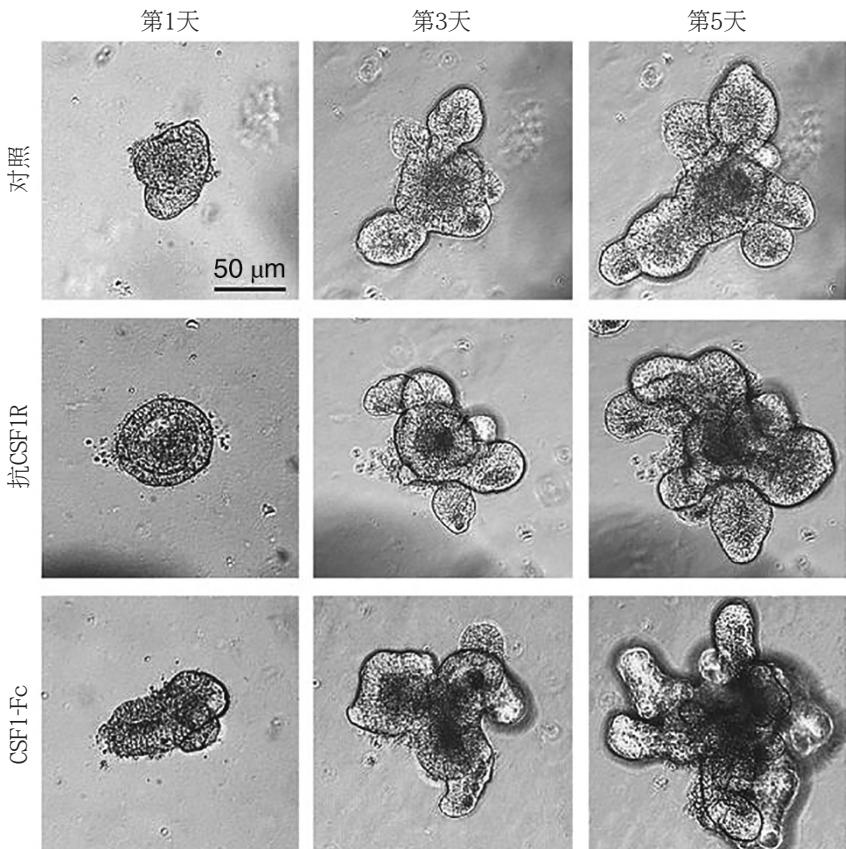


图3 | 没有明显的形态学改变可用于鉴别抗CSF1R或CSF1处理过的小鼠肠道类器官

来源:Sehgal, A., Donaldson, D.S., Pridans, C., et al. (2018). The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem cell niche. *Nature Commun.*, 9:1272. Doi:10.1038/s41467-018-03638-6.

因表达相关性分析显示，每个肿瘤类器官系与其相应的来源组织相关，但与其他亚型无关。”

Broutier等人使用这些类器官寻找可能用于PLC治疗的细胞外信号调节激酶（ERK）途径抑制剂。正如研究人员的总结，这项工作显示“PLC来源的类器官模型具有广泛的生物医学用途，可以帮助深入了解肝癌生物学以及开发针对这种疾病的个体化治疗。”

### 多能干细胞来源的类器官

如上所述，也可以使用PSC制备类器官。起始细胞可以是已建立的PSC细胞系或患者特异性诱导PSCs（iPSCs）。PSCs可分化为身体中任何类型细胞的能力以及无限增殖的能力，使得PSCs成为类器官培养非常方便的起始细胞。

已经开发了PSC来源的类器官培养系统，用于模拟来自所有三个胚层的组织：内胚层、外胚层和中胚层。这些系统能够模仿建模组织的生物学，例如，脑类器官可以模拟发育中的人类大脑的发育过程和组织结构。使用STEMdiff<sup>TM</sup>脑类器官试剂盒可以制备和维持这些类器官。与这些类器官模拟的大脑组织一样，如果它们能够获得合适的营养元素，类器官内的细胞可以维持数周和数月，但不能用于启动新的类器官培养物。这类似于在发育期间含有增殖性祖细胞并且在成年期失去绝大部分产生新神经元能力的在体脑组织。类器官与一些器官（例如，肠道）的上皮成分形成对比，这些上皮成分能够维持活跃的成体干细胞群，可以不断补充器官细胞。PSCs可以诱导分化为这些细胞谱系，并且能够产生带有ASC来源类器官许多生长特性的器官。例如，可以通过使用STEMdiff<sup>TM</sup>肠类器官试剂盒进行常规传代，长期制备和维持PSC来源的肠道类器官。

使用PSCs制备类器官带来许多优点。与获取患者活检组织相比，使用PSCs制备类器官时获取起始材料相对容易。制备的患者特异性iPSCs可用于制备携带特定遗传密码的类器官。以hPSCs作为起始细胞

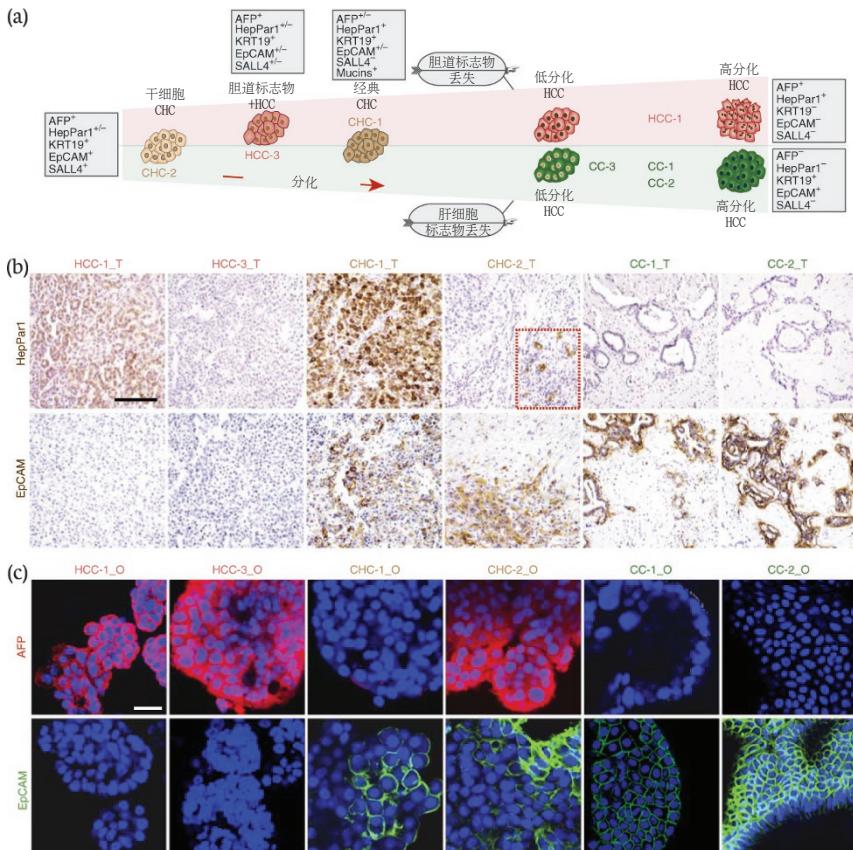


图4 | 人PLC肿瘤类器官在长期培养中可以保持原始组织的表达模式。(a) PLC的HCC和CC亚型通过不同途径发病。(b) 免疫组织化学检测PLC组织亚型的肝细胞/HCC (HepPar1) 和导管/CC (Epcam) 标志物。(比例尺, 125  $\mu$ m; 红色虚线方块表示聚光染色。)(c) 在培养至少3个月的肿瘤类器官上, 免疫荧光分析显示存在HCC标志物AFP (红色) 和导管/CC标志物Epcam (绿色)。(细胞核用Hoechst33342[蓝色]复染; 比例尺, 30  $\mu$ m)

来源: Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M.M.A., et al. (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat. Med.*, 23:1424-1435. doi: 10.1038/nm.4438.

制备的人脑类器官，使得原本使用其他模型系统无法进行的研究变得可能，因为伦理原因严重制约了获取原始神经组织。使用PSCs构建类器官，可在一种培养物中诱导多种谱系共同分化，从而为制备可以模拟实际器官中各种组织的类器官提供了机会。

虽然PSCs制备类器官有许多优点，这种方法也有一些挑战。首先，科学家需要擅长维持PSCs，以确保获得高质量的起始细胞。用于诱导细胞分化为类器官的方案也可能非常冗长，需要使用多个步骤才能模拟发育期体内细胞的发育轨迹。

使用PSCs制备的类器官有许多用途。使用hPSCs作为起始材料的肠道类器官为研究肠道发育阶段提供了机会，例如早期传代的类器官更像胎儿器官。通过基因操作，还可以将PSC来源的类器官应用到其他领域，并且可以通过转染或电穿孔添加DNA对细胞进行基因操作。此外，可以使用CRISPR-Cas9技术编辑类器官系统内的基因。这种方法比制备基因敲除小鼠更快。这些类器官系统也可以与其他技术联合使用。例如，可以在类器官中重新验证使用基因敲除小鼠获得的研究结果，可以在更好地反映生理条件的环境中进行机制探索。

### 多能干细胞的病例研究

来源于PSCs的神经类器官也有许多用途，从研究正常的神经发育和过程到分析脑部疾病。然而，科学家们并不知道神经类器官是否可用于研究神经回路中的轴突发育指导。为此，Giandomenico等人（2019）使用STEMdiff<sup>TM</sup>脑类器官试剂盒培养人胚胎干细胞来制备神经类器官。将成熟的神经类器官与小鼠脊髓组织（包括一些临近的肌肉组织）混合，切成300 μm厚的切片，形成气—液界面的脑类器官（ALI-COs）。使用突触前和突触后标志物可以显示类器官中成熟神经元树突上的突触，并且Giandomenico等人还使用BrainPhys<sup>TM</sup>神经元培养基在神经元中记录了自发性电活动。此外，通过全细胞膜片钳注射正电流可以触发动作电位，证明类器官功能成熟。

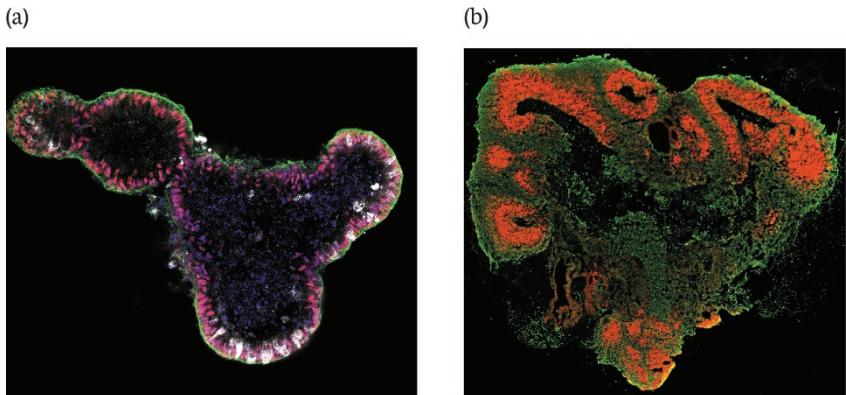


图5 | 多能干细胞来源的类器官：(a) 人肠类器官；(b) 人脑类器官

来源：STEMCELL Technologies

ALI-COs还显示了真实大脑的许多特征。通过对不同细胞类型进行RNAseq并且基于表达水平对结果进行聚类和主成分分析, Giandomenico等人发现：“分子谱显示, 在每个聚类中, 不同细胞类型与预期功能之间存在明确的相关性。”此外, 由于容易对切片培养物进行活体成像, Giandomenico等人还对GFP标记的神经元进行了轴突导向追踪。ALI-COs中的神经元甚至可以驱动脊髓附近肌肉组织发生收缩。有趣的是, 使用药物或破坏轴突束可以抑制收缩。这个模型系统能够帮助对人类神经系统再生能力进行详细的机制研究。

总的来说, 这项工作显示了ALI-CO方法的优势, 包括长期生存能力。ALI-COs能够维持存活长达五个月, 这也是测试过的最长时间。Giandomenico等人还指出：“就我们所知, 这些实验第一次观察到了神经类器官的功能输出。”

随着科学家联合使用多种系统制备更精准的人体器官模型, PSC来源类器官的用途会进一步扩大。在一项研究中, Spence等人(2011)开发了一种制备人肠类器官的方法。这种方法使用人胚胎干细胞和iPSCs作为起始细胞, 后来被授权作为STEMdiff<sup>TM</sup>肠类器官试剂盒的

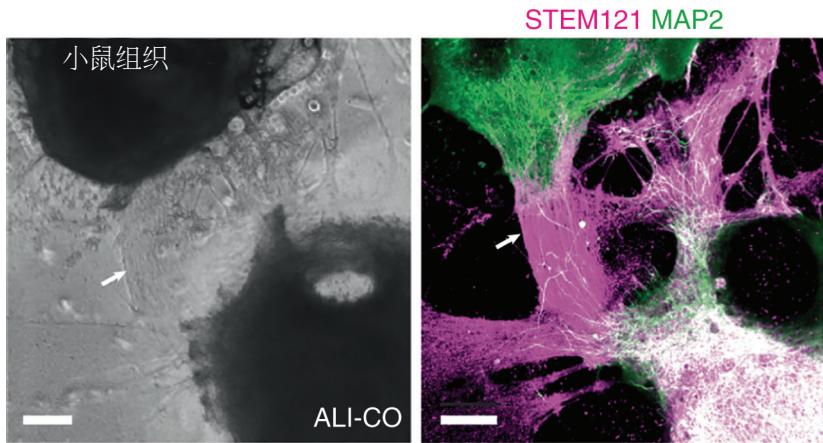


图6 | 明场图像（左），显示轴突轨迹（箭头）以及人ALI-CO和小鼠脊髓及相关组织。人特异性STEM121（粉色）染色（右）显示，这些轨迹起源于ALI-CO；MAP2（绿色）显示小鼠脊髓中的神经元和ALI-CO中的人神经元

来 源：Giandomenico, S.L., Mierau, S.B., Gibbons, G.M., et al. (2019). Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* 22:669-679. doi: 10.1038/s41593-019-0350-2.

基础。Spence等人解释说，这种方法包括“按照时间序列操纵生长因子”，可以诱导内胚层形成、后内胚层模式、后肠规格和形态发生以及“促进肠道生长、形态发生和细胞分化的原肠培养系统。”这是首次证明可以通过一种强大而有效的体外定向分化方法，使用人PSCs制备“与胎儿肠道非常相似”的3D结构和细胞成分。

Workman等人（2017）使用这种技术进一步制备了人肠类器官（HIOs），其中联合使用了来源于人PSCs（hPSCs）的神经嵴细胞。最终成功制备了带有功能性肠道神经系统（ENS）的肠道类器官。ENS可以控制胃肠道的活动性和渗透性。在HIO+ENS类器官中，Workman等人使用RNAseq发现了HIO+ENS与HIO类器官的转录变化。此外，研究人员还发现了ENS细胞的神经元活动、ENS驱动的肌肉收缩和肠样运动。

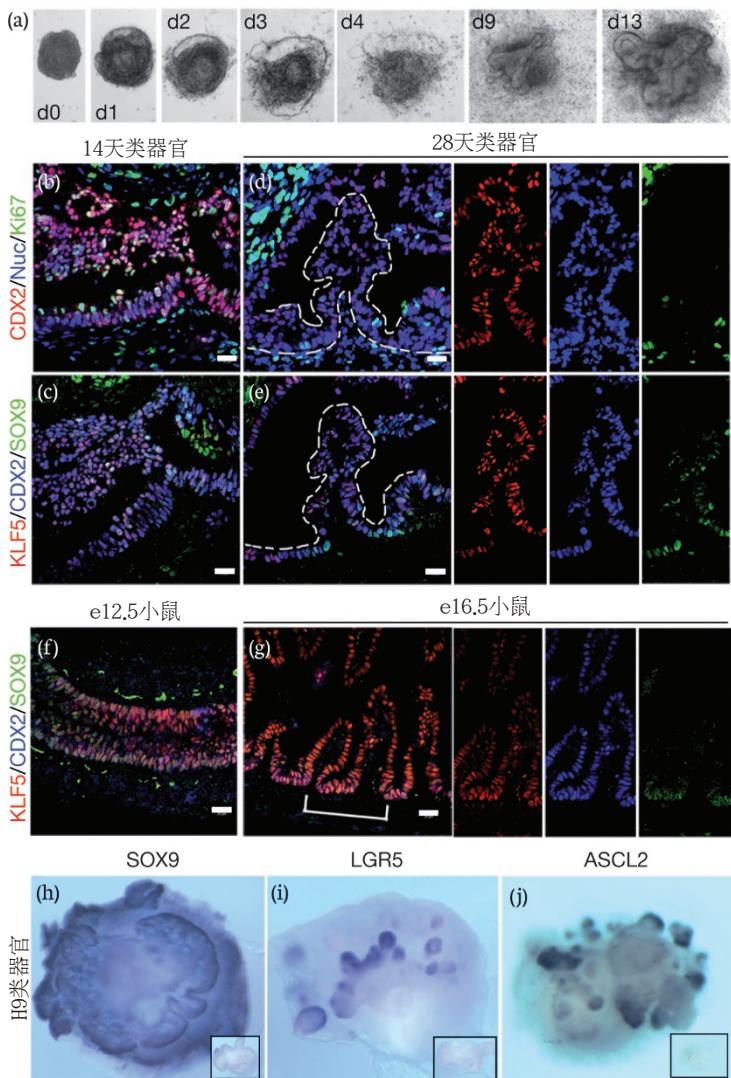


图7 | 人胚胎干细胞和诱导的多能干细胞可用于制备肠道类器官。(a) 在不到两周的时间内,这些干细胞可以形成由间充质环绕的高度复杂的上皮结构。(b–e) 在14和28天后,类器官连续切片上的肠道转录因子(KLF5、CDX2、SOX9)表达和细胞增殖情况与小鼠胎儿肠发育情况类似(f, g)。(h, i, j) 56日龄的整个类器官显示上皮表达Sox9(h)和部分“隐窝样”表达干细胞标志物Lgr5(i)和Asc12(j)。(插图显示每个探针的感应控制)

来源: Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470:105–109. doi: 10.1038/nature09691.

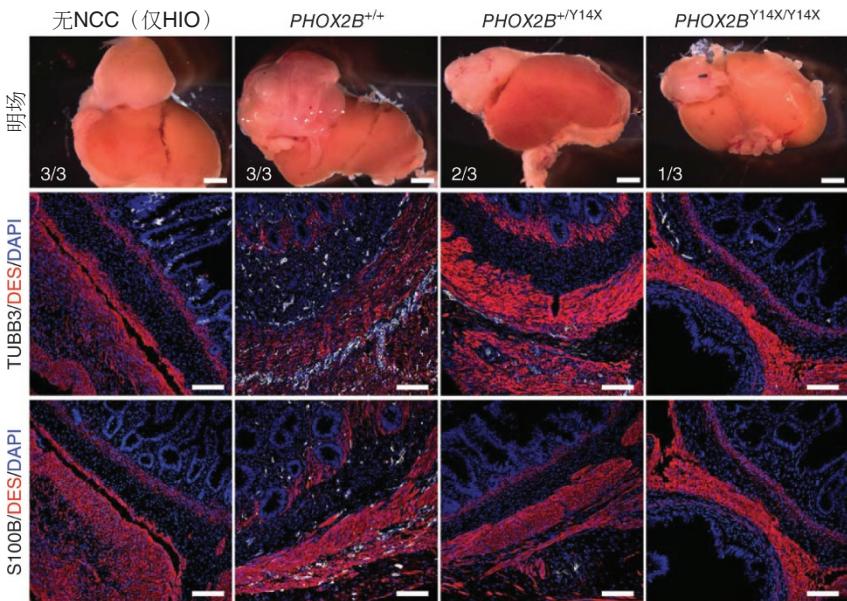


图8 | 使用PHOX2B神经嵴细胞制备的HIOs+ENS。明场图像（上图）显示，移植携带三种PHOX2B突变中一种突变的ENS后7周获取的类器官。（分数表示生长并含有肠道上皮的类器官数量；比例尺, 2 mm。）TUBB3（中图）表示类器官中的神经元发育，S100B（下图）显示神经胶质发育。（比例尺, 100  $\mu$ m）

来源：Workman, M.J., Mahe, M.M., Trisno, S., et al. (2017). Engineered human pluripotent stem cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, 23:49–59. doi: 10.1038/nm.4233.

正如科学家指出的：“ENS发育或功能紊乱较为常见，但是还没有用于研究ENS肠道生物学和疾病的人体模型。”Workman等人探讨了使用HIO+ENS类器官模拟先天性巨结肠的可能性，先天性巨结肠是由ENS发育缺陷导致的先天性便秘。多种基因参与了此病的致病过程，其中一种基因是突变的成对同源框2B（*PHOX2B*），它可导致人类和小鼠肠道神经元完全缺失。Workman等人解释说：“虽然表型明确，但是在人类中还没有发现*PHOX2B*突变致病的分子途径，因此我们使用HIO+ENS作为模型系统来研究这种形式的先天性巨结肠”。

Workman等人制备了携带多种*PHOX2B*突变的hPSCs，并使用这些细胞制备了HIO+ENS类器官。他们得出结论：“这种人PSC来源的肠道模型似乎非常适合对人先天性巨结肠的遗传形式进行机制研究。”

## 问题与解决方案

在使用类器官的研究中，培养条件的标准化是关键难点。有些方法本身就易变，致使难以获得可重复的数据。这种现象通常与使用的培养基有关，因为培养基通常包括非常复杂的成分，准备这些培养基费时费力，并且性能易变化。已公布的培养基成分也存在差异，导致培养条件标准化几乎不太可能。这种不一致性会导致不同实验室之间的协作和可重复性面临挑战。

使用全套商业化培养基可作为实验室资源管理的一个有效措施，还可更轻松地对不同实验、不同用户和不同协作者之间的数据进行比较。例如，为了使用小鼠肠道细胞制备和维持小鼠肠道类器官，可以使用IntestiCult<sup>TM</sup>类器官生长培养基（小鼠）作为无血清培养基的一个选择。这种培养基还可用于制备包含成体肠道上皮中所有预期细胞类型的小鼠肠道类器官。与此类似，IntestiCult<sup>TM</sup>类器官生长培养基（人）可用于制备和维持人肠类器官。STEMCELL Technologies公司还提供了其他产品，可以为培养多种组织（包括肝脏和胰腺）的ASC来源类器官提供支持。

除了不同的培养基成分之外，不同的干细胞分化方案也会导致明显不同的结果，因此，很难或几乎不可能去比较不同实验室使用不同分化方案获得的数据。

支持类器官生长的细胞外基质也可能导致不同的结果。许多研究人员使用不明确的来源于小鼠肿瘤的细胞外基质，而这种基质本身就在各批次之间存在较大差异。为了制定标准化方案并获得一致的结果，应对理想的基质进行界定，或至少做些筛选，以确保与需要的细胞培养条件相容。

类器官的物理特性会导致分析困难。类器官形状（从简单的球体到更复杂的结构）也会影响分析。有时，同一种类器官的形状可能不同。这些特征可能导致难以对特征进行定量分析，尤其是因为类器官

非常厚，常规复式显微镜无法对整个结构进行成像。因此，科学家们考虑将类器官切片后进行分析，或者使用更复杂的深部组织成像技术，但是这些方法仍然不可能提供类器官内部结构的完整图像。不过，通过使用多光子显微镜等手段，例如双光子和三光子成像技术，科学家们可以更深入地研究类器官，并在某些情况下能观察整个结构。

类器官研究面临的一些挑战可通过不同实验室间的协助和对方案进行标准化来解决。对这个领域使用的术语进行标准化，也会对研究有所帮助。例如，一些论文仍然使用“类器官”这个词来描述通常理解的球状体，或者用法不总一致的组织特异性术语（例如：肠道类器官或支气管球）。

提高类器官培养的一致性是关键。如果科学家能更多地制定和使用那些明确定义、一致性的实验方案与材料，就会产生更多可重复和能比较的数据，有更多研究结果能应用于医疗。

## 未来方向

今后类器官带来的益处,不仅在于我们将其应用于哪些领域,还取决于如何使用类器官。一个示例就是单层膜。可以将类器官打碎并用于单层种植培养,从而制备具有细胞异质性和2D培养便捷性的类器官。van der Hee (2018) 发现,使用类器官制备的单层膜能够测量营养成分转运、屏障功能以及与肠道细菌的相互作用。

其他结构性适应,如将类器官整合到器官芯片中。器官芯片是一种包含可用于向内部细胞提供营养的小通道系统的设备。位于波士顿的Emulate公司发现这种系统可用于研究生物学,改善人类健康,以及开发新型个人健康应用。该公司已经开发出了肺癌、肝癌和肠癌芯片。荷兰的MIMETAS公司开发了OrganoPlate<sup>TM</sup>,该公司称其为“微流体3D细胞培养板,可在单个平板上支持多达96个组织模型。”MIMETAS公司使用微流体系统制备了多种模型,包括灌注肠道上皮小管、多种人神经元模型和人肝脏模型以及一种人肾脏模型。通过使用在类器官培养物中生长的细胞填充器官芯片系统,研究人员可以获得更高的生物学相关性和复杂度,这是单用其他任何一种系统都无法实现的。

类器官向前发展的重要一步,就是去认识这种系统的真实效用及其不足,尤其是在临床应用中。例如,Berkers等人 (2019) 使用囊性纤维化(CF)患者的直肠组织制备了类器官。一种名为毛喉素的化合物可导致使用健康直肠组织而非CF患者直肠组织制备的类器官发生肿胀。药物驱动的CFTR活性改善,触发了CF来源类器官发生毛喉素诱导性肿胀(FIS);在患者中也会观察到同样的现象。Berkers等人总结:“在CF患者直肠类器官中对FIS进行的体外药物疗效检测与CFTR调节剂最重要的体内反应指标相关。”虽然这项工作和其他研究分别获得了类似的目标,仍需要更多的合作来观察对患者治疗产生的近期影响。

另一个潜在的临床应用,是通过功能性类器官移植进行细胞治疗。Cortez等人 (2018) 将人肠类器官移植到免疫抑制小鼠的肠系膜中,

之后类器官存活并生长。目前,正在进行多种研究,探索将概念验证研究的结果转化为临床实践的可能性 (Takebe等人, 2018)。

基于新的和一致性更高的方法,类器官的研究将不断拓展。此外,将从其他技术获得的结果和类器官研究结果相结合,还有助于更细致地了解生物系统,开辟疾病治疗的新途径。

## 参考文献

- Berkers, G., van Mourik, P., Vonk, A.M., *et al.* (2019). Rectal organoids enable personalized treatment of cystic fibrosis. *Cell Reports*, 26:1701–1708. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.068.
- Bershteyn, M., Nowakowski, T.J., Pollen, A.A., *et al.* (2017). Human iPSCderived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia. *Cell Stem Cell*, 20(4):435–449. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.007.
- Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Versteegen, M.M.A., *et al.* (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, 23:1424–1435. doi:10.1038/nm.4438.
- Cortez, A.R., Poling, H.M., Brown, N.E., *et al.* (2018). Transplantation of human intestinal organoids into the mouse mesentery: A more physiologic and anatomic engraftment site. *Surgery*, 164(4):643–650. doi: 10.1016/j.surg.2018.04.048.
- Djomehri, S.I., Burman, B., Gonzalez, M.E., *et al.* (2019). A reproducible scaffold-free 3D organoid model to study neoplastic progression in breast cancer. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 13(1):129–143. doi: 10.1007/s12079-018-0498-7.
- Gabriel, E., Ramani, A., Karow, U., *et al.* (2017). Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell*, 20(3):397–406. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.005.
- Giandomenico, S.L., Mierau, S.B., Gibbons, G.M., *et al.* (2019). Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* 22:669–679. doi: 10.1038/s41593-019-0350-2.
- McCracken, K.W., Howell, J.C., Wells, J.M., *et al.* (2011). Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 6(12):1920–1928. doi: 10.1038/nprot.2011.410.
- Miller, A.J., Hill, D.R., Nagy, M.S., *et al.* (2018). *In vitro* induction and *in vivo* engraftment of lung bud tip progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 10(1):101–119. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.012.

- Sehgal, A., Donaldson, D.S., Pridans, C., *et al.* (2018). The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem cell niche. *Nature Communications*, 9:1272. doi:10.1038/s41467-018-03638-6.
- Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., *et al.* (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470:105–109. doi: 10.1038/nature09691.
- Takebe, T., Wells, J.M., Helmrath, M.A., and Zorn, A.M. (2018). Organoid center strategies for accelerating clinical translation. *Cell Stem Cell*, 22(6):806–809. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.008.
- Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., *et al.* (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359(6378):920–926. doi: 10.1126/science.aoa2774.
- Workman, M.J., Mahe, M.M., Trisno, S., *et al.* (2017). Engineered human pluripotent-stem cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, 23:49–59. doi: 10.1038/nm.4233.
- Zietek, T., Rath, E., Haller, H., *et al.* (2015). Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion. *Scientific Reports*, 5:16831. doi: 10.1038/srep16831.

## 延伸阅读

- Aberle, M.R., Burkhart, R.A., Tiriac, H., et al. (2018). Patient-derived organoid models help define personalized management of gastrointestinal cancer. *British Journal of Surgery*, 105(2):e48–e60. doi: 10.1002/bjs.10726.  
*Organoids can be used to screen for safer, more effective cancer drugs.*
- Chen, H.I., Song, H., Ming, G.L. (2019). Applications of human brain organoids to clinical problems. *Developmental Dynamics*, 248(1):53–64. doi: 10.1002/dvdy.24662.  
*Neural organoids offer many possibilities in translational medicine.*
- Ghaemi, R.V., Co, I.L., McFee, M.C., et al. (2019). Brain organoids: A new, transformative investigational tool for neuroscience research. *Advanced Biosystems*. 3(1):1800174. doi.org/10.1002/adbi.201800174. *Neural organoids create new methods of studying brain development and neurodegeneration.*
- Hynds, R.E., Bonfanti, P., Janes, S.M. (2018). Regenerating human epithelia with cultured stem cells: feeder cells, organoids and beyond. *EMBO Molecular Medicine*, 10(2):139–150. doi: 10.15252/emmm.201708213.  
*Describes deriving organoids from various epithelial types and how these methods might be used to create stem cell therapies.*
- Kaushik, G., Ponnusamy, M.P., Batra, S.K. (2018). Concise review: Current status of three-dimensional organoids as preclinical models. *Stem Cells*. 36(9):1329–1340. doi: 10.1002/stem.2852.  
*Discusses the benefits of using organoids in preclinical research.*
- Karzbrun, E., Tshuva, R.Y., Reiner, O. (2018). An on-chip method for long-term growth and real-time imaging of brain organoids. *Current Protocols in Cell Biology*, 81(1):e62. doi: 10.1002/cpcb.62.  
*Brian organoids on micro-fabricated devices allow long-term studies.*
- Majolo, F., Marinowic, D.R., Moura, A.Á., et al. (2019). Use of induced pluripotent stem cells (iPSCs) and cerebral organoids in modeling the congenital infection and neuropathogenesis induced by Zika virus. *Journal of Medical Virology*. 91(4):525–532. doi: 10.1002/jmv.25345.  
*Summarizes studies of using iPSCs and organoids to describe and treat the Zika virus.*
- Miura, S., Suzuki, A. (2018). Brief summary of the current protocols for generating intestinal organoids. *Development, Growth & Differentiation*,

60(6):387–392. doi: 10.1111/dgd.12559.

*Describes the various forms of intestinal organoids and how they can be made and used.*

Mittal, R., Woo, F.W., Castro, C.S., et al. (2019) Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. *Journal of Cellular Physiology*. 234(6):8352–8380. doi: 10.1002/jcp.27729.

*Explores combinations of 3D organoids, microfabrication, and bioprinting to study organs.*

Organoid research: <https://www.stemcell.com/technical-resources/area-of-interest/organoid-research.html>

*A collection of information on various types of organoids.*

Ranjan, V.D., Qiu, L., Tan, E.K., et al. (2018). Modelling Alzheimer's disease: Insights from *in vivo* to *in vitro* three-dimensional culture platforms. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(9):1944–1958. doi:10.1002/term.2728.

*Describes the use of neural organoids and tissue engineering to understand Alzheimer's.*

3D Cell Culture and Analysis: Evolution and Applications.: [https://www.essentialknowledgebriefings.com/downloads/3d\\_cellculture\\_and\\_analysis/](https://www.essentialknowledgebriefings.com/downloads/3d_cellculture_and_analysis/)

*Surveys the history, methods, and applications of 3D cell culture.*

# **WILEY END USER LICENSE AGREEMENT**

Go to [www.wiley.com/go/eula](http://www.wiley.com/go/eula) to access Wiley's ebook EULA.



## CUT UNCERTAINTY OUT OF GENOME EDITING

克服基因组编辑实验中的障碍，为您的科研突破争取更多的时间。我们提供验证过的CRISPR工具和标准流程，科学资源和技术支持，以帮助您更快的解答实验中遇到的问题。Scientists Helping Scientists。

了解更多，请访问[www.stemcell.com/ArciTect](http://www.stemcell.com/ArciTect)。

Front cover image courtesy of Martin Stahl, PhD,  
R&D Scientist at STEMCELL Technologies Inc.



WILEY

Sponsored by:

