



肝脏类器官的研究进展及应用

林丽[†], 雷妙[†], 林佳漫[†], 胡文祥^{*}

生物岛实验室马普组织干细胞与再生医学研究中心, 广州 510530

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: hu_wenxiang@grmh-gdl.cn

收稿日期: 2021-08-03; 接受日期: 2021-11-08; 网络版发表日期: 2022-03-14

摘要 生物医药研究主要依赖动物模型及人源细胞系, 但是这些研究系统往往不能模拟人类个体发育过程、疾病发生机制和药物反应, 因此在向临床转化方面遇到极大的困难. 类器官是能模拟体内器官结构和功能特征的体外3D细胞簇. 本文按照肝脏类器官从简单到复杂的顺序, 讨论了成体干细胞来源和多能干细胞分化的多种肝脏类器官模型, 同时概括了肝脏类器官在疾病建模、药物反应、毒性测试及再生医学等方面的应用.

关键词 类器官, 肝脏, 干细胞, 肝代谢, 再生医学

人源细胞系和动物模型在生物医药中发挥了重要的作用, 但也有非常大的局限性. 传统的2D原代细胞培养不能长期稳定地扩增, 且缺乏细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用, 而这些细胞交流恰恰是建立、维持和调节细胞表型和功能的关键^[1,2]. 另一方面, 动物模型的构建费时费力, 且种属间生理和基因组的差异可能会影响临床结果的评估^[3]. 类器官是来源于具有自我更新和自我组织能力的胚胎干细胞、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)或成体干细胞(adult stem cells, ASCs)的体外3D细胞簇, 能模拟体内器官的结构和功能特征. 类器官可以在体外培养中大量扩增, 并保持遗传稳定性, 很好地反映来源组织的体内特征, 被称为“微型器官”^[4,5]. 相比人源细胞系和动物模型, 类器官再现了原代组织的三维结构, 更接近于体内组织的结构和功能特性. 截至目前, 类器官培养已适用于各种组织, 包括肠道^[6,7]、肝

脏^[8,9]、胰腺^[10,11]、肾脏^[12,13]、前列腺^[14,15]、肺^[16,17]、视网膜^[18,19]和大脑^[20,21], 并被广泛用于疾病建模^[22]、药物筛选^[23]、基因治疗^[24]和再生医学^[25]. 2017年, 类器官技术被评选为*Nature Methods*的年度方法. *Science*杂志将类器官技术被评选为2018年年度突破.

肝脏作为人体最大的代谢及分泌器官, 对维持机体的稳态发挥着重要的作用. 肝脏主要包括肝细胞、胆管细胞、内皮细胞、星状细胞及免疫细胞等. 肝脏类器官的研究始于2001年, Michalopoulos等人^[26]分离出成年大鼠的肝细胞和其他细胞组分, 放在由胶原包被的转瓶中, 加入各种肝细胞必需生长因子形成了类似肝结构特征的组织, 但其存活期很短. 直至2013年, Huch等人^[27]建立了利用分离Lgr5⁺肝细胞构建的类器官, 它在体外可以保持长期扩增和分化成功能性肝细胞样细胞的能力. 本文讨论了模拟各种肝脏细胞类型的肝类器官的构建方式及它们在疾病建模、药物筛选

引用格式: 林丽, 雷妙, 林佳漫, 等. 肝脏类器官的研究进展及应用. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 185–195

Lin L., Lei M., Lin J.M., et al. Advances and applications in liver organoid technology (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 185–195, doi: [10.1360/SSV-2021-0283](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0283)

及再生医学中的应用场景。

1 成体干细胞来源的肝类器官

1.1 Lgr5⁺细胞来源的胆管样细胞类器官

成体干细胞是已分化组织或器官中未分化的细胞, 可以进行自我更新并特化成来源组织或器官的细胞。通过成体干细胞形成的类器官, 能很好地模拟组织器官自我更新或受损后再生的过程。早期研究发现, Lgr5可以作为肠道干细胞甚至是其他成体干细胞的一个普遍标记物。健康小鼠的肝脏中Lgr5表达量很低, 但当肝脏受到化合物或物理损伤时, 在Sox9⁺胆管细胞附近能检测到Lgr5⁺细胞。Huch等人^[27]从受损小鼠肝脏中分离出单个Lgr5⁺胆管细胞, 在含有Wnt激动剂R-spondin的培养基中进行3D培养, 形成的胆管样细胞类器官能维持数月, 且该类器官在体外能被诱导分化为成熟和有功能的肝细胞, 再移植到肝功能衰竭的免疫缺陷小鼠中可产生功能性肝细胞并挽救小鼠的肝衰竭。采取同样的策略, Huch等人^[4]也成功建立了人源的胆管样细胞类器官培养方案, 其可以长期稳定地扩增人源肝干细胞, 并进一步分化为肝实质细胞, 为疾病造模、药物筛选及细胞治疗提供了良好的平台。Lin等人^[28]的研究也证明, CCL4损伤能引起肝脏的纤维化和Lgr5⁺肝干细胞的增殖。分离Lgr5⁺细胞进行3D培养能得到具有内腔结构的类器官, 与Huch等人建立的胆管样细胞类器官形态非常相似, 研究发现肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和R-spondin对于类器官的生长有促进作用。但该研究未对肝受损后Lgr5⁺肝干细胞是否有促进肝脏再生或抑制肝脏纤维化的程度, 以及形成的类器官是否能作为相关疾病的研究模型做进一步讨论。Prior等人^[29]的研究则表明Lgr5⁺细胞具有双能性, 他们分离小鼠胚胎中单个Lgr5⁺细胞后, 分别用肝细胞类器官和胆管细胞类器官两种体系进行培养, 发现单个Lgr5⁺细胞能向胆管细胞和肝细胞方向分化。此外, 除了Lgr5⁺干细胞, 还发现人体导管区域中的EpCAM⁺单细胞可以培养形成肝上皮类器官, 该类器官可在体外分化形成功能性的肝细胞, 并能在移植到小鼠体内后产生肝实质细胞^[4]。虽然这些模型表明胆管前体细胞具有在体外产生肝细胞的能力, 但是大量的体内细胞谱系追踪研究仍暗示着肝脏再生存在其他的细胞来源^[30,31]。

1.2 成体肝实质细胞类器官

肝脏在损伤的状态下具有自我增殖的潜力。之前的研究发现, 在特定的培养条件下可以在2D水平长期稳定地扩增人肝实质细胞^[32], 但是肝细胞的代谢功能等成熟度指标尚不完美。3D培养是提高体外培养细胞成熟度的有效方式, Peng等人^[9]在进行肝脏3D培养过程中加入模拟肝脏损伤后再生的细胞信号, 发现TNF α 可以促进小鼠原代肝细胞的增殖, 且能连续传代并培养6个月以上; 3D培养得到的肝类器官中表达肝细胞特异标志物, 将3D培养的肝类器官移植到免疫缺陷小鼠体内后, 能修复其受损的肝脏。Hu等人^[8]则建立了另外一套新颖的小鼠和人的原代肝细胞类器官培养体系。他们的研究表明, 正常的肝细胞和受损肝脏的肝细胞都可以用来培养小鼠的肝类器官, 形成的类器官具有肝脏的结构特征和功能, 其转录本表达谱与部分肝切除后增殖的肝细胞转录本表达谱相似, 说明该体系得到的类器官可以作为肝脏部分切除的模型, 进行肝脏急性损伤后增殖反应的研究。有意思的是, 他们还发现这些肝类器官在合适的培养条件下可以转分化成为胆管类器官。通过这种体系建立的人源肝类器官也可以有效地整合到移植的小鼠肝脏中, 为肝脏的自体移植提供了潜在的细胞来源。

随着类器官技术的发展, 2018年, Sekiya和Suzuki利用小鼠的皮肤成纤维细胞转分化形成了肝细胞(induced hepatocytes, iHep), 随后进行3D培养, 与2D条件下形成的细胞相比, 3D培养下形成的组织(iHep cell aggregates)中整体基因表达水平更接近于成熟的肝细胞, 可以在体外自组织且具有改善肝细胞的功能, 将其移植到成年小鼠受损的肝脏后, 能起到肝脏重建的作用, 延长肝功能受损小鼠的寿命。他们进而观察到在肝类器官自组织的过程中, Hippo信号的激活是促进肝细胞成熟的关键^[33]。2019年, 在获得hiHeps(human induced hepatocytes)的基础上, 惠利健团队^[34]对该细胞进行3D培养, 成功建立了人类肝脏类器官模型(hiHep organoids), 得到的类器官具有典型的胆管结构、有绒毛的上皮细胞、富含线粒体等肝脏结构特征, 也具有肝脏的功能特征, 如HNF4A, E-cadherin, MRP2等特异蛋白的表达。与2D培养的肝细胞相比, 3D培养得到的类器官更接近于肝脏。但是, 上述各种通过肝实质细胞体外培养或者转分化方法得到的肝实

质细胞类器官只含有一种细胞类型, 并且其代谢基因表达、白蛋白分泌、移植效率等指标和原代的肝实质细胞相比仍有差距, 尚待进一步优化3D培养条件以提升肝实质细胞类器官成熟程度。

1.3 成体肿瘤细胞来源的肝脏肿瘤类器官

肝癌是非常常见的癌症类型, 它的发生是一个从慢性肝炎/肝硬化或结节发育异常发展到肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的多步骤过程, 受慢性乙型肝炎和丙型肝炎病毒感染、过量酒精摄入、非酒精性脂肪肝、糖尿病、肥胖、遗传性色素沉着病等各方面复杂因素的影响^[35]。肝癌的组织学特征多样, 高异质性是肝癌的主要特征。不同类型的肝癌通常在临床特征和致癌机制上有所不同, 导致其对药物的反应不同^[36]。因此, 迫切需要建立合适的肝癌体外模型来研究疾病机理与药物反应。癌细胞系和患者衍生的异种移植(patient-derived xenografts, PDX)模型是目前广泛用于药物筛选和评估药物反应的临床前肿瘤模型。与原生肿瘤相比, 癌细胞系的组织学和遗传特征已发生很大的变化, 且不能反应肿瘤的异质性; 而PDX模型虽然比癌细胞系能更好地模拟原发性肿瘤的生物特征, 但因价格昂贵、培养耗费时间长, 在药物上的应用很有限。

类器官可以复现原发肿瘤的基本特征, 包括组织学复杂性和遗传异质性。与2D培养模型相比, 3D培养模型在基因表达、基因突变维持、转移潜能和药物反应方面更具有优势^[37]。前期的研究已经成功建立了多种人类肝癌类器官, 代表三种主要肝癌类型: 肝细胞癌、胆管癌(cholangiocarcinoma, CC)和联合肝细胞-胆管癌(hepatocellular-cholangiocarcinoma, CHC)。Broutier等人^[23]率先建立了8个肝癌病人的类器官模型, 覆盖三种肝癌类型, 这些类器官可以长期扩增, 并保持癌组织的组织学结构、基因表达谱和遗传突变信息。与正常肝脏组织衍生的类器官相比, 肝癌类器官中癌症相关基因表达水平更高, 且在移植到免疫缺陷小鼠中具有很强的迁移能力。Nuciforo等人^[38]利用针管检测取得的肝组织培养出肿瘤类器官, 其表现出原发组织的组织形态、遗传突变特征及基因表达谱, 也可以在移植到小鼠体内后产生肿瘤。

由于每个癌症病人的遗传突变信息不一, 药物反应呈现个体差异, 病人衍生的癌类器官模型的建立为

精准医疗提供了良好平台。Broutier等人^[23]建立了原发肝癌类器官模型, 并小规模测试了不同个体对药物的敏感性。Li等人^[39]则是建立了27个HCC和CC的肿瘤类器官系统, 这些类器官表现出癌症组织的分子与形态特征, 与原发肝癌组织的基因表达谱和遗传突变特征类似。通过高通量筛选, 他们揭示了药物呈现个体特异性的反应, 并且发现了可以有效抑制肿瘤增殖的药物。此外, 类器官也被用于发现新颖生物标志物的研究, 还可以用来揭示导致原发肝癌预后较差的相关基因等^[23]。

虽然利用原发性癌症肝脏组织分离的细胞建立的类器官可以重现肿瘤的突变和表达谱及迁移能力等, 但无法模拟癌症的发生机制。惠利健团队^[34]利用不同的致癌基因对成纤维细胞转分化得到的类器官进一步诱导, 获得了原发性肝癌(HCC)类器官和肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)类器官, 对HCC和ICC的起源进行了探索, 证明了该方法得到的类器官可以应用于肝癌发生机制的相关研究中。但该研究中得到的肝类器官主要由肝细胞和胆管细胞组成, 缺少其他类型的组成细胞, 使其研究范围受限。总体来说, 成纤维细胞转分化来源的肝癌类器官, 取材相对容易, 能保持相对稳定的基因型及表型, 在模拟癌症的发生中具有其独到的优势。

2 iPSC分化来源的肝脏类器官

iPSCs具有无限扩增及向各个细胞类型分化的多能性。从iPSCs中生成组织特异细胞类型的方案有助于开发研究人类发育和疾病的新型体外模型, 为药物发现和细胞治疗开辟了新的途径。肝脏主要包括肝细胞、胆管细胞、内皮细胞、星状细胞及免疫细胞等, 是遗传和感染性疾病及药物毒副作用的主要靶点^[40]。在过去十年内, 研究者利用优化各种3D培养条件, 建立了iPSCs来源的各种肝脏细胞类型的类器官模型(图1)。

2.1 iPSC来源的肝芽

Takebe等人^[41]首次报道了用iPSC构建肝细胞类器官的方法。iPSC在2D细胞培养环境中逐步分化获得肝祖细胞, 然后与人间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞在基质胶涂层板上共培养, 可以形成类似人肝芽组织

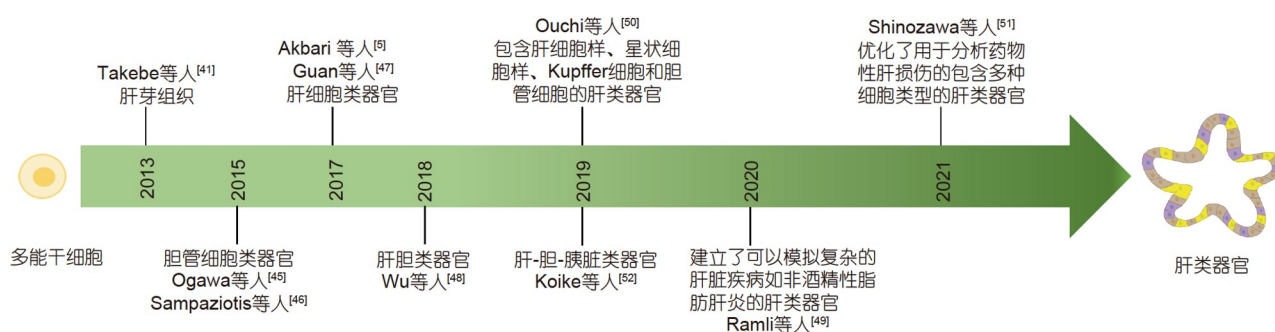


图1 iPSCs分化为肝类器官的发展历程图

Figure 1 The development of iPSC-derived liver organoids

的3D细胞簇。这些肝芽结构在移植至受体小鼠后形成具有肝脏组织的部分组织形态和功能。这表明通过体外重建体内肝脏发育的微环境,可以在体外模拟肝脏发育过程从而建立体外的肝芽培养体系(或类器官),但这一类器官需要移植到动物体内才能进一步发育成熟,产生肝组织结构。同时这种共培养方式在技术操作上相对繁琐,限制了类器官的应用,后续的研究工作通过体外逐步诱导iPSC的分化,在体外产生了含有部分肝组织结构的类器官。

2.2 iPSC来源的胆管样类器官

胆管细胞是胆道系统的重要组成部分。胆管疾病包括遗传疾病如囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)相关胆管病,发育性疾病如Alagille综合征,自身免疫性疾病如原发性胆汁性肝硬化,以及药物和毒素诱发的疾病^[42]。然而,由于原代胆道组织获取及原代胆管细胞体外培养困难及动物疾病模型不完善等技术缺陷,胆管疾病的病理生理学机制方面研究受到很大的限制^[43]。2014年,Dianat等人^[44]首次在3D培养中诱导iPSC生成胆管细胞样细胞,这些细胞表现出与初级胆管细胞相似的结构和功能,如纤毛的形成、对激素刺激的反应和荧光胆盐的转运。Ogawa等人^[45]将iPSC依次诱导分化为内胚层、肝祖细胞、成肝细胞,再将成肝细胞与OP9基质细胞进行3D共培养,获得了胆管细胞类器官。这项技术利用OP9细胞分泌的NOTCH蛋白来模拟JAG1/NOTCH信号,促进胆管细胞的发育和分化。该类器官表达成熟的胆道标志物,丢失肝母细胞和肝细胞标志物,如甲胎蛋白和白蛋白的表达。转运活性实验和Forskolin诱导的囊肿肿胀实验证实了这些胆管细胞的功能。Sampaziotis等人^[46]也利用类似的方法

法将iPSC逐步分化为胆管类器官。综上,这些方法得到的胆管类器官非常好地复制了胆管的基因表达谱、结构及功能,有助于了解胆道发育的生物学机制,以及疾病建模和药物筛选。

2.3 iPSC来源的肝实质细胞类器官

肝实质细胞作为肝脏的主要细胞类型,近来不少研究也成功地建立了iPSCs来源的肝实质细胞类器官模型。最近Akbari等人^[5]开发了高效和快速产生肝类器官的方法,他们将iPSC诱导形成内胚层,再运用流式细胞荧光分选技术获得EpCAM⁺内胚层祖细胞,最后3D培养获得肝细胞类器官。这些肝类器官具有肝细胞类似的基因表达谱,能在移植到小鼠体内后表达人类白蛋白,提示可以通过逐步诱导并纯化EpCAM⁺细胞,提高肝脏类器官建立的效率。上述两种方式分别建立了iPSCs来源的胆管类器官和肝实质细胞类器官,但是在这些类器官模型中细胞类型单一,不能完美地模拟肝脏的结构和功能,因此众多研究集中在优化建立包含多种细胞类型的肝脏类器官方面。

2.4 iPSC来源的包含胆管细胞和肝实质细胞等细胞类型的肝脏类器官

Guan等人^[47]建立了包含胆管结构的肝类器官,他们通过将iPSC诱导分化成内胚层,之后在低浓度(2%)的Matrigel下培养促进前肠内胚层分化为成肝祖细胞,进而在3D培养条件下形成初级肝细胞类器官。但是当其直径达到3 mm时,难以获得足够的营养和氧气,限制了其增殖和再生潜力。为了克服这一问题,他们将初级类器官细胞分离成单细胞,嵌入Matrigel进行重新培养,可以形成结构相对复杂的肝细胞类器官。Wu等

人^[48]则是将iPSC诱导分化为中内胚层细胞,进而分化得到肝细胞和胆管细胞,最后在3D培养条件下得到肝胆类器官.这种肝胆类器官模拟了早期肝脏再生的现象,其中的肝细胞和胆管细胞可以发挥相应的功能,并且可以在移植到小鼠体内后长期生存.Chan课题组^[49]也利用类似的研究方案将多能干细胞分化为包含肝细胞与胆管细胞的类器官系统,并且这些类器官在游离脂肪酸处理后表现出和非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)病人肝脏组织类似的基因表达谱,并且呈现出结构上的改变,如胆管网络衰变和胆管反应等.综上,这些类器官模型已经包含肝实质细胞和胆管细胞,可以大体模拟肝脏的再生及代谢功能等,但仍需改进3D培养方案提高肝胆类器官的复杂度与成熟度.

Ouchi等人^[50]在诱导iPSC分化的前肠细胞形成类器官的过程中,加入了维A酸(retinoic acid, RA),最终获得了包含肝细胞样、星状细胞样和Kupffer细胞的肝类器官.通过单细胞转录组学分析,揭示这种肝类器官具有各细胞类群特异的表达特征,是模拟肝脏疾病和药物反应良好的平台.进一步地,在最新的研究中,他们在加入RA的基础上,再加入成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、糖原合成酶激酶GSK抑制剂CHIR99021和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)抑制剂A83-01,可以更高效地形成功能相对成熟的肝胆类器官^[51].这种肝胆类器官包含多种肝脏细胞类型,并且在培养过程中可以在前肠体阶段进行冻存,提高了类器官培养的操作性.

2.5 iPSC来源的包含多器官结构的肝胆类器官模型

类器官模型也为研究机体发育过程中的细胞间与器官间的交流提供了良好的平台.最近一项研究更是建立了具有多器官的复杂类器官系统,Koike等人^[52]分别诱导iPSC形成前端肠(anterior gut)的球体结构和后端肠(posterior gut)的球体结构,然后在3D培养条件下促使这两种不同的球体融合,形成具有肝-胆-胰脏三种器官的类器官结构.这套体系模拟了早期器官发育的各种事件,包括不同器官的内陷、分支和交流等,

类似于早期观察到的小鼠胚胎体外发育情况,为研究人类中胚层器官早期发育机制提供了非常好的系统.但是这些器官发育相对于成体器官来说还是处于非常早期的阶段,未来需要进一步优化类器官培养方案,并结合组织工程技术,提供肝胆类器官的管道化、血管化及器官复杂性等.

3 肝胆类器官的应用

通过多能干细胞、成体干细胞甚至成纤维细胞转分化得到的肝类器官,很大程度模拟了肝脏的组织形态、基因表达谱及遗传特征,在疾病建模、药物筛选、再生医疗及药物安全性评价层面有广泛的应用前景(图2).

4 疾病建模

肝功能出现异常或损伤引起的疾病有多种类型,包括由单基因突变引起的相关肝病、酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)、非酒精性脂肪性肝病(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)及肝癌等.由于2D培养模型的有限性,具有原发性细胞组织形态、基因型、代谢功能甚至免疫功能的类器官模型被开发出来,用来研究各种肝脏疾病发生的病因及分子机制.

4.1 单基因肝病

肝功能障碍疾病除了部分由于染色体异常或多个基因座突变引起外,相当大一部分是由单个基因的突变引起的,如威尔逊氏症(Wilson disease, WD)、 α -1-抗胰蛋白酶(alpha 1-antitrypsin, A1AT)缺乏症、酸性脂酶缺乏症(Wolman disease)、瓜氨酸血症1型(citrullinemia type I, CTLN1)、囊性纤维化等疾病^[53].

(1) 威尔逊氏症是一种由ATP7B基因突变引起的遗传性代谢障碍疾病^[54].致病基因ATP7B编码一种共转运p型ATP酶,铜转运体ATP酶功能的丧失会导致铜向胆汁的排泄受损.过量游离铜的积累会导致细胞毒性,持续的肝细胞损伤和由此导致的慢性肝炎会使患者容易出现肝硬化和肝癌^[55].目前对于临床表型多样的WD,肝移植是主要的治疗方法,但及时诊断仍然是主要挑战.为了更好地研究WD,研究人员建立了具有类似于人类WD表型的铜储存疾病的COMMD1基因缺

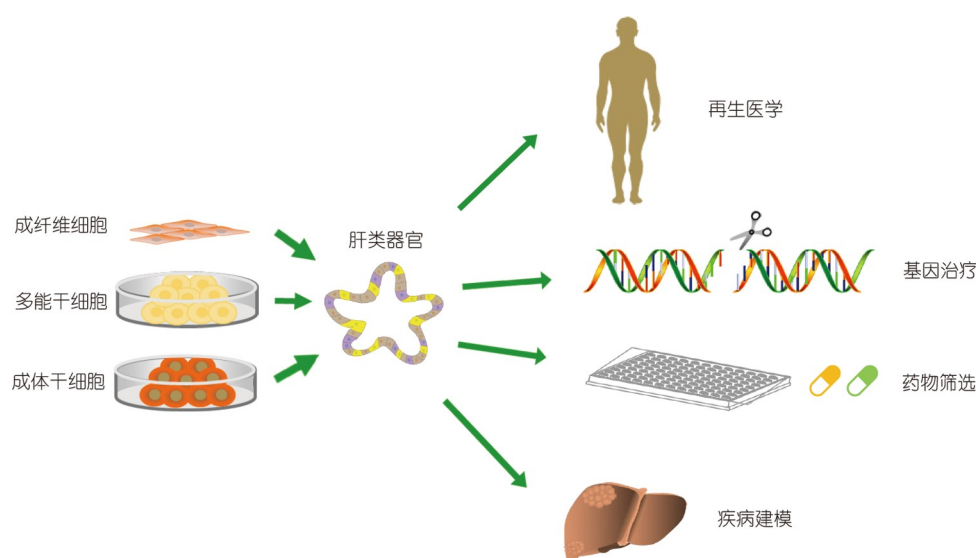


图2 肝脏类器官的应用

Figure 2 Applications of liver organoids

陷型犬肝类器官模型, 这种犬肝类器官具有管腔状的胆管类器官形态, 并且由于*COMMD1*基因缺陷, 类器官内积累大量的铜离子不能分泌出去; 而过表达*COMMD1*基因可以恢复其功能, 为治疗铜储存疾病提供了思路^[56]。另一方面也尝试通过新的碱基编辑(prime editing)技术, 对单源性疾病进行建模, 以有效纠正*ATP7B*突变导致的威尔逊病。在体外生成了*ATP7B* KO类器官后, 发现相比*ATP7B*正常基因型类器官, *ATP7B* KO类器官更容易受到铜诱导的细胞死亡。基因编辑改正*ATP7B*突变后恢复了铜的排泄, 证明碱基编辑在功能上可以恢复威尔逊病(*ATP7B*)患者的肝类器官突变^[57]。

(2) A1AT缺乏症是一种由*SERPINA1*突变引起的A1AT缺乏的病症^[58-60]。血清中的A1AT主要来自肝脏, 在蛋白质错误折叠疾病中, A1AT的缺乏会使蛋白酶功能丧失, 导致靶器官的损伤。由于难以获得人肝组织和维持人肝细胞的原代培养, 研究A1AT不足导致的肝病的研究受到限制。Gómez-Mariano等人^[61]对*SERPINA1*突变纯合子(ZZ), 杂合子(MZ)和正常(MM)基因型A1AT患者的肝活检组织建立了肝类器官模型, 发现在该模型中, 肝类器官高表达肝实质细胞标记基因。携带*SERPINA1*突变的肝类器官在基因表达和蛋白质分泌方面接近患者肝组织。此外, Huch等人^[4]也利用A1AT纯合子突变患者的针检活组织获得肝类器官培养物,

可以成功地在体外复现A1AT缺陷的病理特征, 且在类器官分化后的肝细胞中能清楚地观察到类似于在原始活检中发现的A1AT蛋白聚集物, 揭示A1AT蛋白酶活性功能的降低。这些研究表明, 携带A1AT不同遗传变异的类器官可以模拟疾病的特异性特征。

(3) CTLN1是一种由于*ASS1*基因突变导致精氨酸琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthetase, ASS)缺乏引起的常染色体隐性尿素循环障碍疾病, 以高氨血症导致神经损伤为特征^[62]。对于CTLN1的治疗, 除了应用常规的治疗方法外, 类器官技术也被用于模拟肝病发生、药物筛查和个性化治疗。Akbari等人^[5]将iPSC分化的EpCAM阳性的内皮细胞作为中间体, 可生成长期扩展、不会丧失对成熟肝细胞分化能力的肝类器官培养系统。进而他们构建CTLN1患者特异的iPSCs并分化为肝类器官, 发现CTLN1类器官表现出正常的形态、分化潜能和代谢功能, 但是出现过度的氨积累, 而过表达*ASS1*基因可以逆转这一病症。

(4) 酸性脂酶缺乏症是一种溶酶体酸酯酶缺乏症, 其特征是由于溶酶体酸酯酶(lysosomal acid lipase, LIPA)的功能降低或缺失导致脂质的积累, 进而导致肝肿大和肝功能衰竭。Ouchi等人^[50]使用iPSC建立了含有肝细胞、星状细胞、Kupffer样细胞的肝类器官模型, 发现来自LIPA缺陷的酸性脂酶缺乏症病人iPSC的肝类器官更容易积累脂质, 且纤维化程度更高。而当

用类法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)激动剂处理这些肝类器官后则可以挽救脂肪积累和纤维化的表型. 这项研究表明, 肝类器官是测试药物效果及提供个性化的药物发现的优良系统.

(5) 囊性纤维化是一种由CFTR基因突变引起的常染色体隐性遗传疾病. CFTR作为囊性纤维化跨膜转导调节因子, 其主要功能是调节cAMP依赖的氯离子通道, 介导氯离子流出胆管腔^[63]. CFTR基因的突变影响了其胆管细胞运输ATP和氯离子的能力, 导致胆汁流动性降低, 胆汁流量减少, 进一步导致了肝细胞的损伤、炎症以及纤维化^[64]. Ogawa等人^[45]建立了携带CFTR突变的胆管类器官模型, 可以研究胆管细胞介导物质运输的功能. 他们发现, 携带CFTR突变的胆管类器官表现出氯离子通道功能受损、囊肿形成障碍等囊性纤维化病人的特征. 当用CFTR的激动剂VX-770和cAMP激动剂Forskolin处理后, 可以挽救CFTR突变引起的胆管类器官的表型, 这表明胆管类器官在评价药物作用中的重要价值. 基于此, 一项利用类器官模型的大型研究HIT-CF Europe^[65]正在有序开展, 目标是评价携带各种病人特异囊性纤维化基因突变的类器官对药物的有效性及毒副作用, 为药物的精准治疗提供参考.

4.2 酒精性肝病及非酒精性脂肪性肝病

ALD和NAFLD具有共同的组织学特征, 经历了从脂肪变性、脂肪性肝炎、纤维化, 再到肝硬化几步曲.

ALD的疾病成因与饮酒相关, 过度饮酒会导致慢性肝病, 但在大量饮酒的人中, 只有一小部分人会发展为酒精性肝炎^[66]. 为研究这种疾病的病理特征, Wang等人^[67]利用胚胎多能干细胞分化的肝类器官与胎儿肝间充质细胞共培养, 并用乙醇处理模拟酒精性肝病的发病过程. 研究发现, 与未经处理的对照组相比, 乙醇处理的肝类器官表现出酒精诱导的肝损伤的一些特征, 如CYP家族活性的增加、氧化应激、脂肪变性和纤维化等表征, 这为研究酒精性肝病的发病机理及药物靶点提供了很好的模型.

NAFLD是一种非酒精性原因导致肝脏脂肪积累过多的疾病, 病理特征为肝脏脂肪积累与变性, 但该疾病也包括NASH^[68,69]. NASH是NAFLD的更进一步发展, 以脂肪变性、肝小叶炎症和纤维化为特征^[70,71], 最后发展为肝硬化导致肝癌或肝衰竭. 为了

阐明NAFLD发生与进展的分子机制, Pingitore等人^[72]建立了肝细胞(HepG2)和肝星状细胞(LX-2)组成的多系3D球体, 该体系携带非酒精性脂肪性肝病密切相关PNPLA3 I148M纯合子突变. 当把球状体暴露于游离脂肪酸条件下, 脂肪会在肝球状体内积累, 表现出非酒精性脂肪性肝病的病理特征. 进而他们发现, 应用临床治疗NASH的实验药物liraglutide或elafibranor可以挽救这种脂肪积累. Ouchi等人^[50]使用iPSC建立了含有多种肝脏细胞类型的肝类器官模型, 当处理游离脂肪酸后, 可以重现脂肪性肝炎样病变(包括脂肪变性、炎症和纤维化), 进而通过类器官研究肝代谢疾病的发生机制及药物治疗. 最近, Ramli等人^[49]利用多能干细胞产生包含肝细胞与胆管细胞的类器官系统, 这些类器官在游离脂肪酸处理后表现出和NASH病人肝脏组织类似的基因表达谱, 并且呈现出结构上的改变, 如胆管网络衰变和胆管增生. 总之, 这些肝脏类器官模型有助于了解NAFLD/NASH的发病机制、药物有效性及毒副作用测试. 未来的目标应该是开发可以更紧密地反映NAFLD组织病理学和病理生理学的类器官模型, 深度系统地研究NAFLD的进程及分子机制, 开发NAFLD/NASH有效的治疗靶点.

5 再生医学

目前原位肝移植是治疗肝脏损伤、肝炎、纤维化及肝癌的有效方法之一, 但由于缺乏适合移植的健康组织, 并且需要长期服用免疫抑制剂, 这项技术存在一定的局限性. 通过自体iPSC细胞或者肝组织产生的肝脏类器官模型为肝脏相关疾病的再生医疗提供了可能性. Huch等人^[27]建立的胆管衍生的类器官可以有效移植到FAH1^{-/-}小鼠中并生存, 可以挽救小鼠肝衰竭死亡的风险.

最近, Hu和Peng等人更是改进了肝类器官的培养体系, 可以大大地促进肝类器官移植后的存活率, 并可以分泌更多的白蛋白^[8,9]. 这些工作证明了肝类器官在小鼠体内可以发挥一定的生理功能, 为肝脏移植等再生医学提供了理论依据. Sampaziotis等人^[73]建立的胆管类器官则可以在移植到小鼠体内后修复胆管内皮和重构胆囊. 最令人激动的是, Sampaziotis等人^[74]最近建立不同胆囊区域(IHD, CBD和GB)的类器官模型, 在体

外培养的人类肝脏中移植这些类器官后, 可以明显修复人类肝脏的胆管系统, 为最终的临床应用提供坚实的实验基础.

6 总结与展望

肝类器官可以有效地从多能干细胞、成体干细胞甚至成纤维细胞转分化获得, 很大程度模拟了肝脏的组织形态、基因表达谱及遗传特征, 在疾病建模、药物筛选、安全性评价及细胞治疗层面有广泛的应用前景. 但是当前的肝类器官技术还有非常多的缺陷: (i) 肝脏类器官的发育阶段仍处于非常早期, 相比于成体的肝脏组织, 它们的基因表达谱更接近于胎儿时期的肝脏组织; (ii) 其代谢功能尚不能与原代肝细胞相比, 因此在评价药物有效性、毒性甚至高通量药物筛选时

会有局限性; (iii) 在类器官培养过程中, 类器官的尺寸、形态等方面存在较大的不确定性, 因此对实验的设计及后续结果分析造成较大的挑战; (iv) 现存的肝脏类器官培养体系中所包含细胞类型还是比较少, 缺乏免疫细胞等; (v) 由于缺乏血管化, 肝脏类器官不能生长太大, 同时其内部胆管化程度也较低. 基于上述肝脏类器官培养中碰到的问题, 迫切需要进一步开发出具有完整肝脏细胞谱系、功能相对成熟的类器官模型来研究复杂性肝脏疾病. 结合生物工程技术, 改进3D培养体系, 促进肝类器官的血管化, 可以促使肝类器官的功能进一步成熟. 同时将来建立更大规模的病人肝脏类器官生物样本库也可以为药物筛选、精准医疗提供良好的资源. 最后, 基因编辑如CRISPR/Cas9和Prime editing等工具的发展也为肝脏疾病的自体类器官治疗提供了可能.

参考文献

- 1 Baxter M, Withey S, Harrison S, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol*, 2015, 62: 581–589
- 2 Duval K, Grover H, Han L H, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 2017, 32: 266–277
- 3 Mariotti V, Strazzabosco M, Fabris L, et al. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864: 1254–1261
- 4 Huch M, Gehart H, van Boxtel R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 2015, 160: 299–312
- 5 Akbari S, Sevinç G G, Ersoy N, et al. Robust, long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling. *Stem Cell Rep*, 2019, 13: 627–641
- 6 Yui S, Nakamura T, Sato T, et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat Med*, 2012, 18: 618–623
- 7 Spence J R, Mayhew C N, Rankin S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 2011, 470: 105–109
- 8 Hu H, Gehart H, Artegiani B, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell*, 2018, 175: 1591–1606.e19
- 9 Peng W C, Logan C Y, Fish M, et al. Inflammatory cytokine TNF α promotes the long-term expansion of primary hepatocytes in 3D culture. *Cell*, 2018, 175: 1607–1619.e15
- 10 Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*. *Development*, 2013, 140: 4452–4462
- 11 Boj S F, Hwang C I, Baker L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 2015, 160: 324–338
- 12 Takasato M, Er P X, Chiu H S, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 2015, 526: 564–568
- 13 Schutgens F, Rookmaaker M B, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 303–313
- 14 Karthaus W R, Iaquina P J, Drost J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 2014, 159: 163–175
- 15 Chua C W, Shibata M, Lei M, et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 951–

- 16 Lee J H, Bhang D H, Beede A, et al. Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell*, 2014, 156: 440–455
- 17 Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen D D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J*, 2019, 38
- 18 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 2011, 472: 51–56
- 19 Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 771–785
- 20 Lancaster M A, Renner M, Martin C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501: 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. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 248–257
- 22 Dekkers J F, Wiegerinck C L, de Jonge H R, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*, 2013, 19: 939–945
- 23 Broutier L, Mastrogianni G, Verstegen M M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*, 2017, 23: 1424–1435
- 24 Dijkstra K K, Cattaneo C M, Weeber F, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell*, 2018, 174: 1586–1598.e12
- 25 Finkbeiner S R, Freeman J J, Wieck M M, et al. Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids. *Biol Open*, 2015, 4: 1462–1472
- 26 Michalopoulos G K, Bowen W C, Mulè K, et al. Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1877–1887
- 27 Huch M, Dorrell C, Boj S F, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 2013, 494: 247–250
- 28 Lin Y, Fang Z P, Liu H J, et al. HGF/R-spondin1 rescues liver dysfunction through the induction of Lgr5⁺ liver stem cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 1175
- 29 Prior N, Hindley C J, Rost F, et al. Lgr5⁺ stem/progenitor cells reside at the apex of a heterogeneous embryonic hepatoblast pool. *Development*, 2019, doi: 10.1242/dev.174557
- 30 Wei Y, Wang Y G, Jia Y, et al. Liver homeostasis is maintained by midlobular zone 2 hepatocytes. *Science*, 2021, 371
- 31 He L, Pu W, Liu X, et al. Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair. *Science*, 2021, 371
- 32 Xiang C, Du Y, Meng G, et al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes *in vitro*. *Science*, 2019, 364: 399–402
- 33 Yamamoto J, Udono M, Miura S, et al. Cell aggregation culture induces functional differentiation of induced hepatocyte-like cells through activation of Hippo signaling. *Cell Rep*, 2018, 25: 183–198
- 34 Sun L, Wang Y, Cen J, et al. Modelling liver cancer initiation with organoids derived from directly reprogrammed human hepatocytes. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 1015–1026
- 35 Wong C M, Ng I O L. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 2007, 28: 160–174
- 36 Li L, Wang H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy. *Cancer Lett*, 2016, 379: 191–197
- 37 Yang H, Sun L, Liu M, et al. Patient-derived organoids: a promising model for personalized cancer treatment. *Gastroenterol Report*, 2018, 6: 243–245
- 38 Nuciforo S, Fofana I, Matter M S, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies. *Cell Rep*, 2018, 24: 1363–1376
- 39 Li L, Knutsdottir H, Hui K, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity. *JCI Insight*, 2019, 4
- 40 O'Hara S P, Tabibian J H, Splinter P L, et al. The dynamic biliary epithelia: molecules, pathways, and disease. *J Hepatol*, 2013, 58: 575–582
- 41 Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013, 499: 481–484
- 42 Lazaridis K N, Strazzabosco M, Larusso N F. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology*, 2004, 127: 1565–1577
- 43 Pollheimer M J, Trauner M, Fickert P. Will we ever model PSC?—"It's hard to be a PSC model!". *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, 35:

- 792–804
- 44 Dianat N, Dubois-Pot-Schneider H, Steichen C, et al. Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. [Hepatology](#), 2014, 60: 700–714
- 45 Ogawa M, Ogawa S, Bear C E, et al. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. [Nat Biotechnol](#), 2015, 33: 853–861
- 46 Sampaziotis F, de Brito M C, Geti I, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional cholangiocyte-like cells. [Nat Protoc](#), 2017, 12: 814–827
- 47 Guan Y, Xu D, Garfin P M, et al. Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. [JCI Insight](#), 2017, 2
- 48 Wu F, Wu D, Ren Y, et al. Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. [J Hepatol](#), 2019, 70: 1145–1158
- 49 Ramli M N B, Lim Y S, Koe C T, et al. Human pluripotent stem cell-derived organoids as models of liver disease. [Gastroenterology](#), 2020, 159: 1471–1486.e12
- 50 Ouchi R, Togo S, Kimura M, et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. [Cell Metab](#), 2019, 30: 374–384.e6
- 51 Shinozawa T, Kimura M, Cai Y, et al. High-fidelity drug-induced liver injury screen using human pluripotent stem cell-derived organoids. [Gastroenterology](#), 2021, 160: 831–846.e10
- 52 Koike H, Iwasawa K, Ouchi R, et al. Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut-midgut boundary. [Nature](#), 2019, 574: 112–116
- 53 Fagioli S, Daina E, D’Antiga L, et al. Monogenic diseases that can be cured by liver transplantation. [J Hepatol](#), 2013, 59: 595–612
- 54 Hedera P. Wilson’s disease: a master of disguise. [Parkinsonism Relat Disord](#), 2019, 59: 140–145
- 55 Bandmann O, Weiss K H, Kaler S G. Wilson’s disease and other neurological copper disorders. [Lancet Neurol](#), 2015, 14: 103–113
- 56 Nantasanti S, Spee B, Kruitwagen H S, et al. Disease modeling and gene therapy of copper storage disease in canine hepatic organoids. [Stem Cell Rep](#), 2015, 5: 895–907
- 57 Schene I F, Joore I P, Oka R, et al. Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. [Nat Commun](#), 2020, 11: 5352
- 58 Duvoix A, Roussel B D, Lomas D A. Molecular pathogenesis of alpha-1-antitrypsin deficiency. [Rev des Mal Respir](#), 2014, 31: 992–1002
- 59 Greene C M, Marciniak S J, Teckman J, et al. α 1-Antitrypsin deficiency. [Nat Rev Dis Primers](#), 2016, 2: 16051
- 60 Mornex J F, Chytil-Weir A, Martinet Y, et al. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. [J Clin Invest](#), 1986, 77: 1952–1961
- 61 Gómez-Mariano G, Matamala N, Martínez S, et al. Liver organoids reproduce alpha-1 antitrypsin deficiency-related liver disease. [Hepatol Int](#), 2020, 14: 127–137
- 62 Janwadkar A, Shirole N, Nagral A, et al. Citrullinemia type 1: behavioral improvement with late liver transplantation. [Ind J Pediatr](#), 2019, 86: 639–641
- 63 Fiorotto R, Strazzabosco M. Pathophysiology of cystic fibrosis liver disease: a channelopathy leading to alterations in innate immunity and in microbiota. [Cell Mol Gastroenterol Hepatol](#), 2019, 8: 197–207
- 64 Kamal N, Surana P, Koh C. Liver disease in patients with cystic fibrosis. [Curr Opin Gastroenterol](#), 2018, 34: 146–151
- 65 Aizarani N, Saviano A, Sagar A, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. [Nature](#), 2019, 572: 199–204
- 66 Lamas-Paz A, Hao F, Nelson L J, et al. Alcoholic liver disease: utility of animal models. [World J Gastroenterol](#), 2018, 24: 5063–5075
- 67 Wang S, Wang X, Tan Z, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury. [Cell Res](#), 2019, 29: 1009–1026
- 68 Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)—pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. [Drug Metab Rev](#), 2017, 49: 197–211
- 69 Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. [Lancet Diabetes Endocrinol](#), 2014, 2: 901–910
- 70 Kleiner D E, Makhlof H R. Histology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults and children. [Clin Liver Dis](#), 2016, 20: 293–312
- 71 Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, et al. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. [World J Gastroenterol](#), 2019, 25: 163–177

- 72 Pingitore P, Sasidharan K, Ekstrand M, et al. Human multilineage 3D spheroids as a model of liver steatosis and fibrosis. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1629
- 73 Sampaziotis F, Justin A W, Tysoe O C, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids. *Nat Med*, 2017, 23: 954–963
- 74 Sampaziotis F, Muraro D, Tysoe O C, et al. Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver. *Science*, 2021, 371: 839–846

Advances and applications in liver organoid technology

LIN Li, LEI Miao, LIN JiaMan & HU WenXiang

The Max-Planck Center for Tissue Stem Cell Research and Regenerative Medicine, Bioland Laboratory, Guangzhou 510530, China

Biomedical research highly relies on animal models and human cell lines, but these models poorly recapitulate the human organ development, disease progression and drug response. Thus it is very challenging to translate the basic biomedical research into clinics. Organoids are three-dimensional (3D) mini-organ structures that grow in a 3D matrix and recapitulate the structural and functional aspects of real organs. In this review, we discussed the methods of generating liver organoids from adult stem cells and pluripotent stem cells in the order of complexity of liver organoids, and their applications in disease modeling, drug response, drug toxicity and regenerative medicine.

organoid, liver, stem cell, liver metabolism, regenerative medicine

doi: [10.1360/SSV-2021-0283](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0283)