



肝脏类器官的应用

李春^{1,2}, 章正涛^{1,4}, 董双舒¹, 惠利健^{1,2,3,4,5,6*}

1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所), 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210;

4. 生物化学与细胞生物学研究所苏州研究院, 苏州 215121;

5. 中国科学院大学杭州高等研究院, 生命与健康科学学院, 杭州 310024;

6. 中国科学院干细胞与再生研究所, 北京 100101

* 联系人, E-mail: huilab@sibcb.ac.cn

收稿日期: 2021-05-20; 接受日期: 2021-08-23; 网络版发表日期: 2022-01-07

中国科学院“战略重点研究计划”(批准号: XDA16020201)和国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0802001, 2019YFA0801503)资助

摘要 在中国, 肝病是因病死亡的主要原因之一. 揭示肝脏疾病的发生发展机制, 发现新的治疗靶点, 以及建立医学治疗新方法, 是关乎国计民生的重大课题. 目前对于人类肝脏疾病的研究主要依赖于细胞系与动物模型, 但是二维(two-dimensional, 2D)培养的细胞系缺少组织三维(three-dimensional, 3D)结构, 而物种差异又限制了利用动物模型对人类肝脏疾病的进一步认识. 类器官是一种新的体外培养系统, 利用人类细胞构建的类器官体一方面能模拟体内器官的结构, 另一方面体现了人类组织器官的功能, 从而提供了新的研究模型. 最近, 肝脏类器官体技术也得到建立与发展, 加深了人们对于肝脏疾病的认识, 促进了药物靶点的研究, 并催生了一些治疗方案的开发. 本文将就肝脏类器官的疾病模拟和治疗应用进行综述.

关键词 肝脏类器官, 疾病模型, 药物筛选

肝脏疾病是世界范围内常见且高发的疾病, 其中终末期肝脏疾病, 包括肝癌和肝衰竭等, 病情进展迅速, 预后差且致死率高. 解析肝脏疾病的发生发展机制对预防和治疗肝脏疾病具有重要意义. 近年来, 类器官体培养技术得到快速发展, 已经成为研究人类疾病发生发展和探索治疗手段的重要模型. 肝脏类器官体能模拟肝脏生理或者病理条件下组织器官的结构与功能特征, 极大地丰富了对肝脏疾病的认知, 促进药物靶点的研究以及催生新的治

疗方案. 但由于肝脏功能发挥依赖多种细胞在特定位置相互协调形成复杂的结构, 如何实现肝脏类器官的组织仿真、功能稳定、结构有序以及大尺度构建还面临许多技术瓶颈. 本文将首先介绍肝脏结构与功能以及常见的治疗手段和研究模型, 回顾类器官的发展; 再以多种肝脏疾病为例, 重点阐释肝脏类器官在肝脏疾病模拟以及转化应用中的研究进展; 最后展望肝脏类器官面临的机遇与挑战, 以及今后的发展方向.

引用格式: 李春, 章正涛, 董双舒, 等. 肝脏类器官的应用. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 175–184

Li C, Zhang Z T, Dong S S, et al. Applications of liver organoids (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 175–184, doi: 10.1360/SSV-2021-0098

1 肝脏概述

肝脏作为体内最大的内脏器官, 具有多种复杂的功能, 包括解毒、脂质代谢、胆汁分泌、糖原贮存等^[1]. 其功能的正常发挥依赖于肝脏多种细胞在特定位置相互协调形成复杂的组织结构^[2]. 肝脏主要由实质细胞(肝细胞)和非实质细胞组成, 非实质细胞包括胆管细胞、肝窦内皮细胞、肝星状细胞和免疫细胞以及神经细胞^[3]等. 肝细胞是肝脏内发挥主要功能的细胞, 肝细胞之间形成紧密连接并呈现条索状, 沿着肝血窦从中央静脉向周围的肝门静脉呈放射状排布, 形成肝板样结构. 富含营养以及氧气的血液通过肝门静脉以及肝动脉, 经肝血窦与肝细胞相互作用在肝小叶内形成不同的代谢分区, 最终汇集到中央静脉流出. 肝细胞远离肝血窦面分泌胆汁, 经胆小管汇集到肝门静脉附近的胆管流出, 汇集到总胆管后, 进入肠道, 帮助消化.

肝细胞具有很强的再生能力, 在肝脏组织受损后, 可快速增殖以修复受损的区域^[4]. 此外, 肝脏的其他非实质细胞, 如肝窦内皮细胞、库普弗细胞(Kupffer cell)等也参与了肝脏组织的损伤修复过程. 比如, 70%肝切之后, 肝窦内皮细胞分泌多种因子, 如肝细胞生长因子、Wnt等, 同时调节血管生成素2(angiotensin-2)的表达参与肝脏组织的再生^[5-8]. 而当肝脏受到如四氯化碳、刀豆蛋白A和过量的肝毒性药物等损伤后, 库普弗细胞可以通过分泌多种细胞因子、趋化因子等成分, 募集多种淋巴细胞参与肝脏的损伤修复^[9]. 尽管如此, 在某些慢性损伤的情况下, 会引起肝脏再生能力受损, 比如病毒感染以及遗传性肝病造成的损伤, 不良的生活习惯如嗜酒、吸烟, 以及药物和污染食物摄取等引起的长期肝脏损伤, 可能会引起各类肝脏疾病的发生, 甚至发展为严重肝脏疾病, 包括肝癌以及肝衰竭^[10].

肝病已经成为世界范围内导致死亡的主要病因^[11]. 目前治疗终末期肝脏疾病最有效的方案仍然是肝脏移植, 但是由于供体数量短缺, 仅有很少一部分病人可以得到肝移植^[12-14], 大量患者在等待移植的过程中死亡. 理解肝脏疾病发生发展的机制, 将有助于对肝脏疾病的诊断和预防; 此外, 筛选新的治疗靶点以及开发新的治疗方案, 则有助于延缓肝脏疾病的进程, 为肝脏移植赢得宝贵时间, 甚至于治疗肝脏疾病.

目前对于肝脏疾病的研究主要依靠细胞系及动物

模型. 但是, 细胞系是二维(two-dimensional, 2D)培养, 很难模拟体内组织三维(three-dimensional, 3D)结构^[15]. 动物模型相对于细胞系能提供一定的体内生理环境, 但是动物模型非常复杂, 需要耗费大量的人力、物力和财力; 同时由于种属之间的差异, 动物模型是否能真实反映人类组织功能和疾病状态需要进一步验证^[16]. 类器官作为一种不同于2D细胞系和动物模型的新型实验系统, 能在体外部分模拟组织的3D结构, 同时还兼有细胞系可传代、高通量等优点. 类器官培养技术带来的不仅是细胞水平的改变, 同时还能还原组织器官的结构特征. 例如, 有研究发现, 只有在肝脏类器官中过表达致癌因子RAS, 才能使肝细胞发生为胆管癌, 而无法诱导2D培养细胞形成胆管癌, 从而为肝细胞可以作为起源细胞形成胆管癌提供了直接证据^[17,18]. 又比如, 研究者利用多能干细胞体外分化出肝胆复杂类器官, 同时形成了有功能的胆小管的三维结构, 部分模拟了肝脏的胆汁排泄功能, 为研究肝脏病理结构变化提供了新的研究模型^[19]. 最近, Koike等人^[20]利用多能干细胞形成肝、胆、胰复杂类器官, 为体外研究不同器官的相互作用提供了新思路. 总的来说, 类器官的出现极大拓展了研究者对于复杂生物学问题的理解. 本文将首先对肝脏类器官的发展进行简要回顾, 然后对肝脏类器官在疾病模型、药物筛选和疾病治疗上的应用作出介绍.

2 类器官概述

类器官是指由胚胎干细胞、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)、组织前体细胞或者成体细胞, 在体外自组装形成的能部分模拟体内组织结构与功能的细胞聚合体^[21,22]. 自20世纪人们在早期鸡胚中发现, 消化的肢芽和中肾细胞在体外具有重新自组装成始组织样结构的能力^[23], 直到近几十年, 随着体外干细胞培养技术的进步以及人们对细胞外基质的深入理解, 不同组织器官的类器官培养系统逐步受到重视并被建立优化. 目前, 多种组织或者器官的类器官培养技术已经建立, 包括脑、肾脏、肺、肠等^[24]. 类器官技术的快速发展, 极大拓宽了研究人员的认知, 并已经在研究疾病发生发展机制^[25], 建立新的药物筛选方案^[26]以及治疗策略^[27]等方面发挥了重要作用.

类器官由于能更好地模拟器官的功能和结构, 引

起了人们对于体外构建类器官体的极大兴趣. 近年来, 人们也建立了多种肝脏类器官体的培养方法(表1). 一方面, 研究者利用多能干细胞分化为类肝细胞或类胆管细胞, 并进一步形成肝脏类器官和胆管类器官^[28-32]. 分化的肝脏类器官中肝功能相关的基因表达提高, 同时表达成熟肝细胞表面标志物ASGR1的细胞比例增多^[28]; 而胆管类器官则形成带有初级纤毛的囊状或者分支管状结构, 同时表达多种成熟胆管细胞标志物^[32]. 除了利用多能干细胞体外逐步诱导分化形成类肝细胞外, 在成纤维细胞内过表达肝向分化的关键调控因子也能获得类肝细胞. 利用这种方式获得的类肝细胞形成的肝脏类器官中, 肝细胞功能的发挥得到了显著提升, 同时类器官内的肝细胞也表现出肝脏组织中肝细胞特有的多边形以及卵圆形核结构的特征, 并伴有胆小管结构的生成, 暗示其肝细胞的极性形成^[18].

另一方面得益于细胞培养技术的发展, 分离的原代肝细胞也能实现肝脏类器官的扩增培养. Huch等人^[33,34]在小鼠和人肝脏组织中分离出Lgr5阳性干细胞, 并在体外形成肝脏类器官. 随后, 几个研究团队实现了原代肝细胞在二维条件下扩增培养^[35-40], 扩增的原代肝细胞可以在形成类器官体后重新成熟^[36,39,40], 不仅肝细胞功能得到显著提高, 甚至可以检测出只有成熟肝细胞才具有的双细胞核^[36]. 这些研究使研究者能在体外扩增功能成熟的原代肝细胞, 为肝脏类器官培养技术的进一步发展提供了坚实的细胞来源.

为了更进一步体外再现复杂的肝脏生理功能以及

疾病病理, 人们也尝试构建结构更加复杂的肝脏类器官体来模拟肝脏特有的血管和胆管系统. 利用多能肝细胞分化获得的肝母细胞与成体间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)可获得类“肝芽”(liver buds, LBs)结构^[41,42]. 经过移植手术后, 该结构在小鼠体内形成了可灌通的血管网络, 但是内皮细胞在“肝芽”中并没形成真正的管腔结构, 仅以无序的细胞混合物形式存在. 而利用诱导多能干细胞的定向分化, 可在体外直接获得肝细胞和胆管细胞共同存在的结构, 肝细胞在胆管化肝脏类器官体紧密聚集, 胆管细胞呈囊状结构, 但肝细胞和胆管细胞的排布不具备肝脏的组织结构, 也没有展现肝脏的相关功能^[43,44]. 此外, 人们尝试利用含有支架的器官芯片来协助细胞自组装, 以及利用3D生物打印技术获得复杂类器官体. 通过三维叠加高分子材料预先构建具有血管微结构的支架, 并向其内部灌注HUVEC, HUVEC出芽后与血管周围灌注的肝实质细胞相接触后进行相互作用, 形成具有一定结构和代谢功能的肝脏微结构. 然而, 由于缺乏血管诱导信号, HUVECs迁移后难以形成微血管网络^[45]. 目前构建血管化、胆管化的复杂肝脏类器官体依然是领域内的挑战.

3 肝脏疾病模拟

肝脏类器官体技术作为一种新的研究工具, 加深

表 1 目前肝脏类器官构建的进展

Table 1 Current advances in the construction of liver organoids

分类	类器官构建方式	细胞成分	参考文献
简单类器官	多能干细胞分化	人肝细胞	[28]
		人胆管细胞	[29,32]
	转分化	人肝细胞	[18]
	原代细胞	胚胎/成年人原代肝细胞	[39]
		可增殖的人原代肝细胞	[35,36]
		EpCAM ⁺ 人胆管细胞	[34]
		鼠Lgr5 ⁺ 肝脏细胞	[33]
复杂类器官	血管化肝脏类器官	分化来源的肝母细胞、成体间充质肝细胞和人脐静脉内皮细胞	[41,42]
	胆管化肝脏类器官	分化来源的肝细胞和胆管细胞	[43,44]

了人们对于肝癌、病毒性肝炎、代谢性脂肪肝病等疾病的认识, 促进了药物靶点的研究, 并为发展治疗手段提供了新的思路. 针对不同肝脏疾病模拟以及治疗应用, 大量的实验方法已经建立起来(表2).

3.1 肝癌

原发性肝癌, 主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC), 大多数肝癌在发现时已处于中晚期且预后差, 因此理解肝癌早期发生的分子事件, 对肝癌早期诊断和预防具有重要指导意义. 肝脏类器官体为肝癌早期发生发展的分子机制研究提供了良好的模型. Sun等人^[18]利用成纤维细胞转分化得到的类肝细胞构建了肝脏类器官, 通过基因编辑技术在肝脏类器官体内引入肝癌驱动基因*c-MYC*, 在体外模拟了HCC

形态学变化和分子水平的改变, 同时发现引入*c-MYC*基因导致肝脏类器官中出现了过多的线粒体与内质网的相互作用, 改变了原有线粒体的裂变和有氧呼吸, 促进了HCC的发生. 与二维培养的类肝细胞不同, 转分化得到的肝脏类器官中的细胞富含线粒体结构, 这也有助于对*c-MYC*诱导HCC起始过程中线粒体与内质网相互作用的表型进行观察. 有意思的是, 在该系统内引入胆管癌相关的驱动基因*RAS*, 可以使重编程的肝细胞不经过前体阶段直接转化为胆管癌, 从而首次利用类器官体模型证明了人类胆管癌可以由肝细胞转分化形成^[18]. 另一项研究中, Artegiani等人^[46]在正常胆管类器官体中研究了BAP1的功能, 发现BAP1的功能缺失破坏了胆管类器官体的上皮组织结构 and 细胞极性, 并且BAP1缺失会影响细胞相互作用和细胞骨架相关基因的可及性, 但是单独的BAP1功能缺失不能导致胆管

表 2 肝脏类器官的疾病模拟应用

Table 2 Application of liver organoids as disease models

疾病类型	疾病名称	细胞来源	参考文献
肝癌	肝细胞癌	转分化类肝细胞引入肝癌驱动基因 <i>c-MYC</i>	[18]
		肿瘤组织	[47]
		穿刺样本	[48]
	肝内胆管癌	转分化类肝细胞引入胆管癌驱动基因 <i>RAS</i>	[18]
		原代胆管细胞	[46]
		穿刺样本	[48]
病毒感染	乙肝	肿瘤组织	[47]
		分化来源的肝细胞、脐静脉内皮细胞和间充质干细胞	[52]
	丙肝	增殖的原代肝细胞	[35]
		Huh-7.5肝癌细胞	[53]
脂肪肝病	代谢相关脂肪性肝病	原代肝细胞	[59,60]
		分化来源的肝细胞、胆管细胞、星形细胞以及库普弗细胞	[61]
		分化来源的肝细胞、脐静脉内皮细胞、成纤维细胞、间充质干细胞和巨噬细胞	[62]
		分化来源的肝细胞以及胆管细胞	[19]
	酒精性肝病	分化来源的肝脏细胞以及胚胎间充质干细胞	[63]
遗传性肝病	囊性纤维病	分化来源的胆管细胞	[29,32]
	A1AT缺乏症	病人来源的胆管类器官	[34]
	I型瓜氨酸血症	病人多能干细胞系分化来源的肝脏类器官	[64]
	溶酶体酸性脂肪酶缺乏症	病人多能干细胞系分化来源的肝脏类器官	[61]
	线粒体DNA缺失综合征	病人多能干细胞系分化来源的肝脏类器官	[65]
	Alagille综合征	多能干细胞分化来源的肝胆类器官	[43]

细胞的癌变, 进一步抑癌基因 $TP53$, $PTEN$, $SMAD4$ 和 $NF1$ 功能缺失可以诱导胆管癌形成. 这些研究表明, 结合类器官培养技术和基因编辑技术可以模拟肝癌的发生发展和研究特定基因的功能.

另一方面, 病人肿瘤组织细胞来源的类器官模型(patient derived organoid, PDO)为肝癌研究提供了良好的模型. Broutier等人^[47]首次建立和优化了肝癌PDO培养体系, 建立了7个肝癌PDO, 包括3个ICC, 2个混合型肝癌和2个HCC类器官模型, 建立效率为37.5%. 另一项研究中, Nuciforo等人^[48]利用类似的培养条件从穿刺样品中构建了10个HCC类器官体和3个ICC类器官体, 建立效率为26%. 这两项研究表明, 目前建立的培养方法既可以从手术样本又可以从穿刺样本中建立肝癌PDO. 研究者们证明肝癌PDO可以反映来源肿瘤组织的病理结构特征, 保留肝癌分子标志物表达模式、体内成瘤能力和基因组变异特征, 并且适用于体外药物筛选^[47,48]. 但是目前肝癌PDO建立效率较低, 模型数量较少, 不能很好反映肝癌遗传异质性. 此外, 当前肝癌PDO主要是肿瘤细胞形成的类器官体, 对基质细胞包括血管内皮细胞、免疫细胞和癌症相关的成纤维细胞等成分研究较少, 因此在模拟肿瘤细胞与微环境的相互作用以及微环境对药物响应的影响方面还需进一步深入.

3.2 HBV感染

肝脏是嗜肝病毒的靶向器官. 病毒性肝炎中66%是由乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的慢性肝炎并发症造成的^[49]. 尽管有预防性疫苗, 但是慢性乙肝病毒仍然影响着世界约2.4亿人口^[50]. 虽然已经有研究利用人肿瘤细胞系或人源化的小鼠模型来研究乙肝病毒的感染. 但是, 人肿瘤细胞系难以真实地反映肝细胞的生理功能, 而人源化的小鼠模型系统相对复杂, 并且耗费巨大难以实现高通量的药物筛选^[51]. 因此, 为了开发慢性HBV感染的新治疗策略, 新型HBV感染的模型研究势在必行. 肝脏类器官体为研究慢性HBV感染提供了新的体外模型. Fu等人^[35]利用从人体获得的肝细胞进行大量扩增, 随后通过体外三维培养形成肝脏类器官并进一步诱导成熟. 肝脏类器官中HBV感染的识别受体NTCP的表达水平与原代肝细胞水平类似, 可以被HBV感染, 并表达乙肝表面抗原、e抗原和乙肝病毒cccDNA等^[35]. 另一项独立研究工作中, Nie等

人^[52]利用多能干细胞在体外分化诱导的肝细胞与脐静脉内皮细胞和间充质干细胞共培养形成复杂肝脏类器官体, 其相较于单独的肝脏类器官具有更高水平的NTCP表达, 可以长时间维持乙肝病毒的感染, 同时伴随肝脏类器官功能与结构的变化. 模拟病毒感染宿主肝细胞的模型, 在HCV研究中有类似的工作进展^[53]. 这些新型肝脏类器官体的构建对于病毒性肝炎的深入研究以及药物研发具有重要意义.

3.3 代谢相关脂肪性肝病和其他代谢疾病

在过去的20年里, 由于肥胖、2型糖尿病以及代谢综合症的患病率快速上升, 代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver disease, MAFLD, 之前也被称为非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD))逐步成为世界慢性肝脏疾病的主要发病原因, 据推算, 全球大约25%的成年人可能有MAFLD症状^[54]. MAFLD指一系列的肝脏疾病, 包括单纯的脂肪变性, 如果不加诊断以及后续治疗, 则会出现炎症浸润和肝细胞气球样变, 从而演变为非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 在没有过量饮酒的条件下发展为肝纤维化, 并最终导致终末期肝病甚至肝癌^[55]. 目前并没有针对MAFLD的药物, 由于缺乏相应治疗以及全球肥胖流行率的快速升高, 未来几十年非酒精性脂肪肝病患病率可能会进一步加剧, 这将给全球带来严重的医疗负担^[54].

有研究利用体外2D肝脏肿瘤细胞系模拟MAFLD, 但肿瘤特性以及永生化造成的代谢特征变化, 限制了其在该病中的模拟^[56]. 另一种解决方案则是利用动物模型尽可能模拟人类NASH疾病^[57]. 部分研究者通过改变小鼠的饮食成分来模拟人的MAFLD发病原因, 构建MAFLD小鼠模型. 然而该模型不仅造模时间相对较长, 同时还受到了多种因素包括小鼠品系、性别、喂食成分与喂食操作等因素的影响, 不利于后续的药物以及机制的研究. 也有研究者利用基因操作的方法, 对小鼠特定基因进行敲除或者过表达, 并结合饮食诱导, 构建MAFLD的小鼠模型. 该方法可以缩短造模时间同时具有更显著的疾病表型, 但是由于与人的MAFLD病因不符, 因此难以将模型上的发现应用于理解人的MAFLD. 因此, 基于现有的模型均难以完全模拟MAFLD的表型^[56,58].

利用类器官尝试模拟MAFLD的相关工作也陆续

发表. Kozyra等人^[59]利用人的肝脏类器官培养系统, 通过添加游离脂肪酸、胰岛素以及单糖初步模拟了肝脏的脂肪变性. 类似的研究利用环孢霉素A诱导肝脏类器官的脂质聚集, 初步模拟了脂肪变性^[60]. 为进一步模拟多种细胞相互作用产生MAFLD的复杂表型, Ouchi等人^[61]利用人源多能干细胞在体外诱导分化形成包含类肝细胞、星形细胞、胆管细胞和库普弗细胞的复杂类器官体. 通过在培养的系统内添加游离脂肪酸, 复杂类器官体出现了脂肪变性, 纤维化程度增加以及免疫细胞浸润增多等现象, 模拟了体内脂肪肝炎的主要特征. 有意思的是, 通过添加FGF19蛋白减缓了脂肪肝炎的病理症状, 初步显示了复杂类器官系统在药物筛选方面的潜力. 类似的, Collin de l'Hortet等人^[62]在iPSC诱导分化的肝细胞中下调基因*SIRT1*, 并使其与人的脐静脉内皮细胞、成纤维细胞、间充质干细胞和外周血来源的巨噬细胞形成复杂类器官. 该类器官可以引起肝细胞快速聚集脂滴, 并上调促炎相关信号. Ramli等人^[19]利用人多能干细胞在低贴附板分化诱导出肝-胆复杂类器官, 肝细胞类器官会形成胆小管网络结构, 并且发现肝细胞分泌的胆汁可以通过胆小管排出到胆管类器官, 从而首次利用类器官系统在体外构建了有功能的胆小管三维网络结构, 模拟了正常肝脏的胆汁排泄. 在培养类器官内添加游离脂肪酸, 破坏了胆小管网络的形成, 部分还原了NASH病人的肝脏组织胆小管的三维结构变化. 但是, 在二维培养条件下, 分化得到的类肝细胞无法形成这些肝脏结构, 难以模拟疾病过程中肝脏组织的病理结构变化^[19]. 这些工作表明, 肝脏类器官可以很好地模拟MAFLD不同发病阶段的病理特征, 但是利用iPSC在体外分化形成的类器官或直接由多种细胞组分构成的复杂类器官体是否可以完全模拟MAFLD由单纯脂肪变性直至终末期肝病的发展过程, 仍有待进一步探究.

除了上述提到的继发性肝脏疾病, 也有部分工作利用病人来源的肝细胞或者胆管细胞在体外直接培养形成类器官体, 用于模拟酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)^[63]. 此外, 肝脏类器官体也可以模拟遗传性肝脏代谢疾病, 包括囊性纤维病^[29]、 α -1-抗胰蛋白酶(alpha-1 antitrypsin, A1AT)缺乏症^[34]、I型瓜氨酸血症^[64]、溶酶体酸性脂肪酶缺乏症^[61]、线粒体DNA缺失综合征^[65]和Alagille综合征^[43]. 这些培养形成的类器官均能表现出对应遗传肝脏代谢疾病的特征,

进一步加深了人们对于遗传性肝病的认识.

4 转化应用

4.1 药物筛选

肝脏类器官能较好地模拟肝脏功能和疾病过程, 因此提供了新的药物筛选以及毒性测试平台. PDOs模型能反映来源癌症组织的基因组变异特征, 可以作为临床前体外模型检测病人对不同药物的响应, 帮助筛选有效的治疗药物^[47,48]. Broutier等人^[47]在体外测试了不同PDOs对药物的敏感性, 发现PDOs对ERK抑制剂SCH772984非常敏感, 暗示ERK是肝癌治疗的潜在靶标. 另一方面, 可以构建肝癌类器官体模型平台来反映肝癌病人的遗传异质性, 并整合高通量药物筛选和基因组测序数据, 系统性研究肝癌基因与药物的关联性, 发现潜在的分子标志物和药物作用靶点. 但是目前肝癌类器官体模型数量较少, 不足以反映肝癌病人的遗传异质性, 未来可以进一步构建更多的肝癌类器官体模型, 从而建立肝癌类器官体模型平台.

药物特别是中药的不当使用是导致急性肝脏衰竭(drug induced liver injury, DILI)以及药物研发失败的主要原因. 一直以来, DILI缺乏良好的研究模型. 利用正常的肝细胞形成肝脏类器官体, 可用于预测DILI, 指导后续药物的开发^[66-68]. 肝脏类器官体也是研究中药在不同遗传背景人群中代谢和肝毒性的良好工具, 对于更为合理地使用中药和中药现代化, 可能会有比较重要的价值.

4.2 再生医学

肝脏原位移植目前仍旧是治疗终末期肝脏疾病的唯一有效方式. 然而肝源有限, 极大限制了肝移植的应用. 发展其他可能的替代疗法, 对于临床治疗终末期肝脏疾病具有重要意义. 肝脏类器官体具有可扩增以及功能成熟的特点, 可以克服目前肝源短缺的问题, 作为代替方案治疗肝脏疾病^[69].

Hu等人^[39]利用胚胎来源的肝细胞体外形成类器官体, 将其消化为单细胞后, 移植到肝脏代谢疾病酪氨酸血症的Fah模型小鼠中. 胎肝细胞在小鼠体内定植生长, 并持续表达肝脏特异性标志物, 同时胎肝细胞原本的标志物逐渐消失, 提示其在小鼠体内进一步成熟. Takebe等人^[41]利用人多能干细胞体外诱导分化为肝脏

前体细胞, 并将其与内皮细胞和间充质干细胞混合培养, 形成模拟体内肝脏发育的肝芽结构(iPSC-LBs), 将其移植到小鼠肠系膜可以挽救药物诱发的致命性肝衰竭. 最近, Sampaziotis等人^[70]利用人体内不同位置的胆管细胞分别构建不同位置的胆管类器官体, 将其消化成单细胞后移植到MDA(4,4'-methylenedianiline)诱导的胆管损伤的小鼠体内, 显示出一定的治疗效果. 作者还将其胆管类器官体直接移植到体外常温灌注保存的人类肝脏, 100小时后, 胆管细胞在肝脏器官发生整合, 同时部分修正了肝脏器官的胆汁分泌功能. 这些基于类器官体的移植治疗工作, 为相关的肝脏疾病治疗提供了全新的策略和思路.

5 展望

肝脏类器官体具有部分体内肝脏组织的特点, 未来可被广泛用于肝脏疾病的模拟, 包括病毒性肝炎、胆管疾病、代谢相关疾病以及肝癌等, 为人们深入了解肝脏疾病的发生发展以及寻找潜在的治疗手段提供支持; 另一方面, 通过构建大量的类器官体实现类器官体库的构建, 有利于临床药物的肝毒性评价, 以及个性化医疗的相关工作进展. 类器官技术在疾病模型、药物开发、再生医学和精准医疗领域已取得一定的进展, 但是, 类器官体的组织仿真性、功能稳定性、结构有序性以及尺度大小都存在一定缺陷. 目前的类器官体细胞组成较为简单, 缺乏复杂的细胞外基质架构和物质交换所必需的血管化作用, 缺乏与体内微环境的其他细胞(如免疫细胞、神经细胞)的相互作用, 对于器官生理功能以及疾病病理的模拟都有相当的缺陷. 随着多种测序技术的不断发展, 人们对于发育和再生知识的不断拓展^[71], 最终会有助于体外构建更加复杂

有序类器官体. 比如, 最近已经有关于肝胆胰复杂类器官^[20]和垂体下行神经通路的复杂类器官体^[72]的工作出现.

在获得复杂的类器官体后, 如何实现类器官的可控形成, 从而获得功能和结构均一、有序类器官体, 甚至将其工程化生产是该领域面临的又一挑战. 这需要人们更加深入地了解胚胎时期肝脏器官发育原理和肝组织损伤过程的再生理论, 并基于这些基本理论知识, 设计出具有多层组织复杂性和高阶功能的肝脏类器官. 利用特定细胞形成生长中心产生诱导因子梯度^[73], 或者通过基因编辑手段人为设计细胞与细胞的接触方式^[74], 或者利用微流控系统, 在灌注培养的系统中添加定向的诱导因子梯度等方式精确控制营养物质和细胞的定位, 可能会促进形成特定的有序结构^[75].

类器官的一个可能应用是替代患病或衰老的器官. 然而, 目前肝脏类器官由于营养渗透的限制, 大小普遍在百微米尺度, 远小于正常人类厘米级别的肝脏器官, 其所含有的细胞量远达不到临床需求. 在类器官内构建连续可灌注的血管网络对于制造更大尺度的类器官至关重要. 利用生物支架材料或器官芯片形成有序的血管网络, 同时在血管周围排布肝细胞用于构建毫米尺度的肝脏组织^[45]为构建更大尺度的类器官体提供了思路.

最后, 类器官技术作为一门新兴的实验技术和研究领域, 目前还没有形成标准化的培养流程, 每个平台的技术细节、培养基的选择以及诱导方法并不相同, 这造成了类器官构建的重复性在不同实验室比较差, 也严重阻碍了该领域的进一步发展和应用. 因此, 对于界定类器官培养的标准, 需要相关科学组织、行业学会、临床专家、高校学者和企业共同参与, 形成共识.

致谢 感谢惠利健实验室的张鲁狄博士和张坤博士对于本文提供的帮助和意见.

参考文献

- 1 Nagy P, Thorgerisson S S, Grisham J W. Organizational principles of the liver. In: Arias I M, Alter H J, Boyer J L, et al., eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*, Sixth Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2020. 1–13
- 2 Morales-Navarrete H, Nonaka H, Scholich A, et al. Liquid-crystal organization of liver tissue. *eLife*, 2019, 8: e44860
- 3 Liu K, Yang L, Wang G, et al. Metabolic stress drives sympathetic neuropathy within the liver. *Cell Metab*, 2021, 33: 666–675.e4

- 4 Li W, Li L, Hui L. Cell plasticity in liver regeneration. [Trends Cell Biol](#), 2020, 30: 329–338
- 5 Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. [J Hepatol](#), 2017, 66: 212–227
- 6 Rafii S, Butler J M, Ding B S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. [Nature](#), 2016, 529: 316–325
- 7 Ding B S, Nolan D J, Butler J M, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. [Nature](#), 2010, 468: 310–315
- 8 Hu J, Srivastava K, Wieland M, et al. Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. [Science](#), 2014, 343: 416–419
- 9 Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. [Nat Rev Immunol](#), 2017, 17: 306–321
- 10 Messina A, Luce E, Hussein M, et al. Pluripotent-stem-cell-derived hepatic cells: hepatocytes and organoids for liver therapy and regeneration. [Cells](#), 2020, 9: 420
- 11 Wang F S, Fan J G, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China. [Hepatology](#), 2014, 60: 2099–2108
- 12 Jadlowiec C C, Taner T. Liver transplantation: current status and challenges. [World J Gastroenterol](#), 2016, 22: 4438
- 13 Bodzin A S, Baker T B. Liver transplantation today: where we are now and where we are going. [Liver Transpl](#), 2018, 24: 1470–1475
- 14 Stravitz R T, Lee W M. Acute liver failure. [Lancet](#), 2019, 394: 869–881
- 15 van Staveren W C G, Solis D Y W, Hébrant A, et al. Human cancer cell lines: experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? [Biochim Biophys Acta](#), 2009, 1795: 92–103
- 16 Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel *in vitro* approaches to cancer studies. [J Cell Commun Signal](#), 2011, 5: 239–248
- 17 Dasgupta Q, Black Iii L D. A FRESH SLATE for 3D bioprinting. [Science](#), 2019, 365: 446–447
- 18 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
- 19 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
- 20 Koike H, Iwasawa K, Ouchi R, et al. Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut-midgut boundary. [Nature](#), 2019, 574: 112–116
- 21 Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. [Science](#), 2014, 345: 1247125
- 22 Sun L, Hui L. Progress in human liver organoids. [J Mol Cell Biol](#), 2020, 12: 607–617
- 23 Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. [J Anat](#), 1952, 86: 287–301
- 24 Takebe T, Wells J M. Organoids by design. [Science](#), 2019, 364: 956–959
- 25 Qian X, Song H, Ming G L. Brain organoids: advances, applications and challenges. [Development](#), 2019, 146
- 26 Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. [Cell](#), 2014, 159: 176–187
- 27 Clevers H. Modeling development and disease with organoids. [Cell](#), 2016, 165: 1586–1597
- 28 Ogawa S, Surapisitchat J, Virtanen C, et al. Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. [Development](#), 2013, 140: 3285–3296
- 29 Ogawa M, Ogawa S, Bear C E, et al. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. [Nat Biotechnol](#), 2015, 33: 853–861
- 30 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
- 31 Szkolnicka D, Farnworth S L, Lucendo-Villarin B, et al. Deriving functional hepatocytes from pluripotent stem cells. [Curr Protoc Stem Cell Biol](#), 2014, 30: 1–5
- 32 Sampaziotis F, Cardoso de Brito M, Madrigal P, et al. Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. [Nat Biotechnol](#), 2015, 33: 845–852
- 33 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
- 34 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
- 35 Fu G B, Huang W J, Zeng M, et al. Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the

- study of hepatotropic pathogens. *Cell Res*, 2019, 29: 8–22
- 36 Zhang K, Zhang L, Liu W, et al. *In vitro* expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 806–819.e4
- 37 Kim Y, Kang K, Lee S B, et al. Small molecule-mediated reprogramming of human hepatocytes into bipotent progenitor cells. *J Hepatol*, 2019, 70: 97–107
- 38 Katsuda T, Matsuzaki J, Yamaguchi T, et al. Generation of human hepatic progenitor cells with regenerative and metabolic capacities from primary hepatocytes. *eLife*, 2019, 8: e47313
- 39 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
- 40 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
- 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 Takebe T, Sekine K, Kimura M, et al. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells. *Cell Rep*, 2017, 21: 2661–2670
- 43 Guan Y, Xu D, Garfin P M, et al. Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI Insight*, 2017, 2
- 44 Wu F, Wu D, Ren Y, et al. Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. *J Hepatol*, 2019, 70: 1145–1158
- 45 Zhang B, Montgomery M, Chamberlain M D, et al. Biodegradable scaffold with built-in vasculature for organ-on-a-chip engineering and direct surgical anastomosis. *Nat Mater*, 2016, 15: 669–678
- 46 Artegiani B, van Voorthuisen L, Lindeboom R G H, et al. Probing the tumor suppressor function of BAP1 in CRISPR-engineered human liver organoids. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 927–943.e6
- 47 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
- 48 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
- 49 Seto W K, Lo Y R, Pawlotsky J M, et al. Chronic hepatitis B virus infection. *Lancet*, 2018, 392: 2313–2324
- 50 Allweiss L, Dandri M. Experimental *in vitro* and *in vivo* models for the study of human hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2016, 64: S17–S31
- 51 Gural N, Mancio-Silva L, He J, et al. Engineered livers for infectious diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5: 131–144
- 52 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. *Ebiomedicine*, 2018, 35: 114–123
- 53 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. *Cell Host Microbe*, 2018, 23: 382–394.e5
- 54 Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2019, 69: 2672–2682
- 55 Reimer K C, Wree A, Roderburg C, et al. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic. *Hepatol Int*, 2020, 14: 8–23
- 56 Soret P A, Magusto J, Housset C, et al. *In vitro* and *in vivo* models of non-alcoholic fatty liver disease: a critical appraisal. *J Clin Med*, 2020, 10: 36
- 57 Sanyal A J. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16: 377–386
- 58 Kunst R F, Niemeijer M, van der Laan L J W, et al. From fatty hepatocytes to impaired bile flow: matching model systems for liver biology and disease. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114173
- 59 Kozyra M, Johansson I, Nordling Å, et al. Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. *Sci Rep*, 2018, 8: 14297
- 60 Bell C C, Hendriks D F G, Moro S M L, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep*, 2016, 6: 25187
- 61 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
- 62 Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, et al. Generation of human fatty livers using custom-engineered induced pluripotent stem cells

- with modifiable SIRT1 metabolism. *Cell Metab*, 2019, 30: 385–401.e9
- 63 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
- 64 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
- 65 Guo J, Duan L, He X, et al. A combined model of human iPSC-derived liver organoids and hepatocytes reveals ferroptosis in DGUOK mutant mtDNA depletion syndrome. *Adv Sci*, 2021, 8: 2004680
- 66 Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 489–499
- 67 Koido M, Kawakami E, Fukumura J, et al. Polygenic architecture informs potential vulnerability to drug-induced liver injury. *Nat Med*, 2020, 26: 1541–1548
- 68 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
- 69 Assy N, Adams P C, Myers P, et al. A randomised controlled trial of total immunosuppression withdrawal in stable liver transplant recipients. *Gut*, 2007, 56: 304–306
- 70 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
- 71 Lotto J, Drissler S, Cullum R, et al. Single-cell transcriptomics reveals early emergence of liver parenchymal and non-parenchymal cell lineages. *Cell*, 2020, 183: 702–716.e14
- 72 Andersen J, Revah O, Miura Y, et al. Generation of functional human 3D cortico-motor assembloids. *Cell*, 2020, 183: 1913–1929.e26
- 73 Cederquist G Y, Asciolla J J, Tchieu J, et al. Specification of positional identity in forebrain organoids. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 436–444
- 74 Toda S, Blaich L R, Tang S K Y, et al. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling. *Science*, 2018, 361: 156–162
- 75 Zheng Y, Xue X, Shao Y, et al. Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells. *Nature*, 2019, 573: 421–425

Applications of liver organoids

LI Chun¹, ZHANG ZhengTao^{1,4}, DONG ShuangShu¹ & HUI LiJian^{1,2,3,4,5,6}

1 State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China;

4 Bio-Research Innovation Center, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Suzhou 215121, China;

5 School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China;

6 Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Liver disease is one of the leading causes of death in China. Unveiling the mechanisms of liver diseases, discovering new targets, and establishing new treatments are important issues. The current knowledge of human liver diseases is mainly derived from cell lines and animal models. However, two-dimensional (2D) cultured cells lack the three-dimensional (3D) structural features of the liver, and interspecies differences limit understanding of human cell-specific mechanisms using animal models. Organoids, as a new *in vitro* model, recapitulate the key structural and functional properties of human organs. Recently, liver organoids have been widely applied to understand liver diseases and facilitate the discovery and development of new treatments. Here, we review progresses in disease models and therapeutic applications of liver organoids.

liver organoids, disease modeling, drug screening

doi: [10.1360/SSV-2021-0098](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0098)