

DOI: 10.13376/j.cbls/2022010

文章编号: 1004-0374(2022)01-0091-08

类器官技术在泌尿系统疾病研究中的应用

孟倩^{1,2}, 冯晓莹^{1,2}, 余磊³, 倪文秀², 陈巍^{1*}, 黄卫人^{1*}

(1 深圳市第二人民医院, 医学合成生物学临床应用关键技术国家地方联合工程实验室, 深圳 518036; 2 汕头大学医学院, 汕头 515041; 3 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 深圳 518055)

摘要: 类器官是由干细胞、正常或肿瘤细胞在体外培养获得的, 与人体组织结构和功能相似的一种 3D 细胞模型。近年来, 随着类器官培养技术的不断发展和完善, 泌尿系统相关类器官模型纷纷建立。该文概述了类器官培养技术在泌尿系统相关研究领域中的应用, 包括器官发育及组织修复、肾毒性测试、泌尿系统疾病模型的构建、个性化抗肿瘤药物筛选, 同时讨论了泌尿系统类器官模型应用的局限性, 并对该项技术广阔的应用前景进行展望。

关键词: 类器官; 泌尿系统; 疾病模型; 个性化治疗

中图分类号: Q819; R318.16 **文献标志码:** A

Application of organoid technology in the research of urological system diseases

MENG Qian^{1,2}, FENG Xiao-Ying^{1,2}, YU Lei³, NI Wen-Xiu², CHEN Wei^{1*}, HUANG Wei-Ren^{1*}

(1 State and Local Government Joint Engineering Laboratory of Synthetic Biology Medicine and Clinical Application of Key Technologies, Shenzhen Second Hospital, Shenzhen 518036, China; 2 Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China; 3 Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Organoid is a cellular three-dimensional *in vitro* model derived from stem cells, normal or tumor cells, and is capable of recapitulating the structure and function of native organs. Over the past decade, this rapidly evolving field has seen the establishment of various organoid models of urinary diseases. This review summarizes the application of organoid culture technology in the research field of urinary system, including organ development and tissue repair, drug nephrotoxicity testing, construction of urinary system disease models, and personalized anti-tumor drug screening. The limitations and promising application prospects of urological organoid models are also discussed.

Key words: organoid; urological system; disease modeling; personalized treatment

Hans Clevers 团队将小鼠肠段分离出来的 Lgr5 阳性肠道干细胞进行培养, 通过添加一些生长因子, 包括 R-spondin 1、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和骨形态发生蛋白 (BMP) 抑制剂 (noggin), 最终培养出带有隐窝 - 绒毛的肠道上皮样细胞团块, 并命名为类器官^[1-2]。自此, 类器官便得到广泛关注, 培养技术日渐成熟, 先后被 *Science* 和 *Nature Methods* 评为科技发展十大突破和年度生命科学技术之一^[3]。

类器官具有自我更新、自我组织能力, 并具有来源器官的结构和部分功能。与 2D 细胞相比, 3D 类器官保留了原器官组织结构和生物信息, 已被证

收稿日期: 2021-07-23; 修回日期: 2021-10-09

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0906000); 深圳市基础研究重点项目(JCYJ20200108120016553); 广东省自然科学基金项目(2020A1515010235)

*通信作者: E-mail: jessie_chenwei@163.com (陈巍); pony8980@163.com (黄卫人)

明为目前最接近体内生理环境和临床相似度最高的体外研究模型^[4]。近3年来, PubMed 数据库中类器官相关文献每年呈指数性增长, 目前已累计发表2 000多篇, 包括分子机制研究、疾病模型建立及药物测试等多个研究领域, 可见类器官作为新一代科研模型的巨大应用潜力。

泌尿系统作为人体重要的组成部分, 其相关的类器官模型的建立及应用也备受重视。以诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)为来源的肾脏类器官可在体外重现部分肾脏结构与功能^[5-6], 相关的分化方案不断完善, 相关模型推进了肾脏类器官在器官发育及组织修复^[7]、疾病建模^[8]、肾毒性检测^[9-10]等领域的研究。另外, 随着前列腺和膀胱肿瘤类器官的相继建立^[11-14], 患者来源的肿瘤类器官能够预测临床患者对抗肿瘤药物的反应, 成为理想的新一代肿瘤精准治疗临床前模型^[15]。

1 泌尿系统相关类器官的培养技术

自2009年以来, 肠道类器官培养体系开创了类器官技术探究成体肠干细胞功能的成功范式, 极大地促进了泌尿系统肾脏、前列腺、膀胱等类器官培养体系的发展^[13-14, 16]。在多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)诱导分化为不同类型肾脏细胞的基础上^[17-18], 多种肾脏类器官诱导分化方案也应运而生^[6, 19], 并且分化来源细胞多为多能干细胞(pluripotent stem cell, PSCs), 如人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)、iPSCs等。Little团队根据以往对鼠胚胎干细胞(mESCs)的培养分化经验^[20], 提出了含activin、视黄酸或含CHIR99021的两种分化方案, 发现hESCs在无血清的条件下可同时分化为输尿管芽(ureteric bud, UB)和后肾间充质(metanephric mesenchyme, MM)等肾祖细胞群体^[19], 但随着分化时间的延长, 肾单位祖细胞群体出现自我更新和分化间的失衡。为提高肾祖细胞群体的分化效率, Morizane等^[21]改变CHIR99201的处理时间, 以便诱导中间中胚层(intermediate mesoderm, IM)后部更多地分化为后肾间充质(metanephric mesenchyme, MM): 该方案利用完全化学定义的培养条件, 无需添加任何非纯化因子, 9天内即可获得占细胞总量80%~90%的后肾间充质细胞群体, 提高了肾单位的形成效率。由于胚胎干细胞基因组和表型较为单一, 其研究常涉及到伦理道德问题, 而iPSCs与ESCs同为多能性干细胞, 具有分化成几乎所有种类细胞的能力, 现以iPSCs

分化为肾脏类器官的培养方案居多, 因iPSCs来源的肾脏类器官现多涉及肾脏发育的研究, 相关的分化方案将在应用部分进行介绍。成体干细胞(adult stem cells, ASCs)来源的类器官比PSCs来源的类器官复杂性低, 培养一开始就朝着指定的器官进行分化, 可以在保持基因组稳定的情况下多次传代^[22]。Schutgens等^[23]将皮质肾组织和尿液中所获取的肾成体干细胞(renal adult stem cells, RASCs), 在包含N-acetylcystein、EGF、FGF-10及Rho激酶抑制剂Y-27632等的培养基中分化成人肾上皮样类器官。RASCs来源的肾小管类器官可在体外重现体内3D肾脏上皮结构, 但并不能像PSCs那样重新分化为含完整肾单位的肾类器官。

通过对肠道类器官培养基中所包含的生长因子种类及浓度做出适当的调整, 研究人员陆续报道了各自所在实验室的前列腺及膀胱类器官的构建方法, 最终可获得高度极化的三维上皮类器官^[24-25]。Karthaus等^[26]对肠道干细胞培养所需生长因子进一步筛选和优化, 从40例根治性前列腺切除术患者的正常组织中培养出前列腺正常类器官, 发现剔除FGF10、Noggin或R-spondin不影响传代, 但类器官的生成效率降低, 去除R-spondin或Noggin将导致管腔细胞丧失雄激素受体(androgen receptor, AR)的表达。同年, Gao等^[15]进一步证实这种培养方法确实能够从晚期前列腺癌患者身上高效地培养出前列腺肿瘤类器官, 其能够维持原始肿瘤组织的形态学特征和基因组特征, 并可在体外无限传代及冻存。2019年, Clever实验室修改了最初为结直肠癌类器官设定的培养方案, 成功地从患者手术切除的组织中建立膀胱正常及肿瘤类器官, 在培养过程中观察到来自不同患者的肿瘤类器官形态各异, 但都较好地保留了原始肿瘤的组织病理学特征和肿瘤内部的异质性^[11]。

2 类器官在泌尿系统疾病中的应用

随着泌尿系统相关类器官模型的建立, 类器官在泌尿外科疾病研究中发挥了重要作用(图1)。

2.1 器官发育与组织修复

2.1.1 器官发育

由iPSCs分化而来的类器官具有特定器官结构和部分器官功能^[27]。根据对胚胎肾脏发育过程较为全面的理解, 研究人员已经建立了iPSCs定向分化为肾脏类器官的多种分化方案, 以期获得更接近人体器官的类器官模型(表1)^[28-32]。

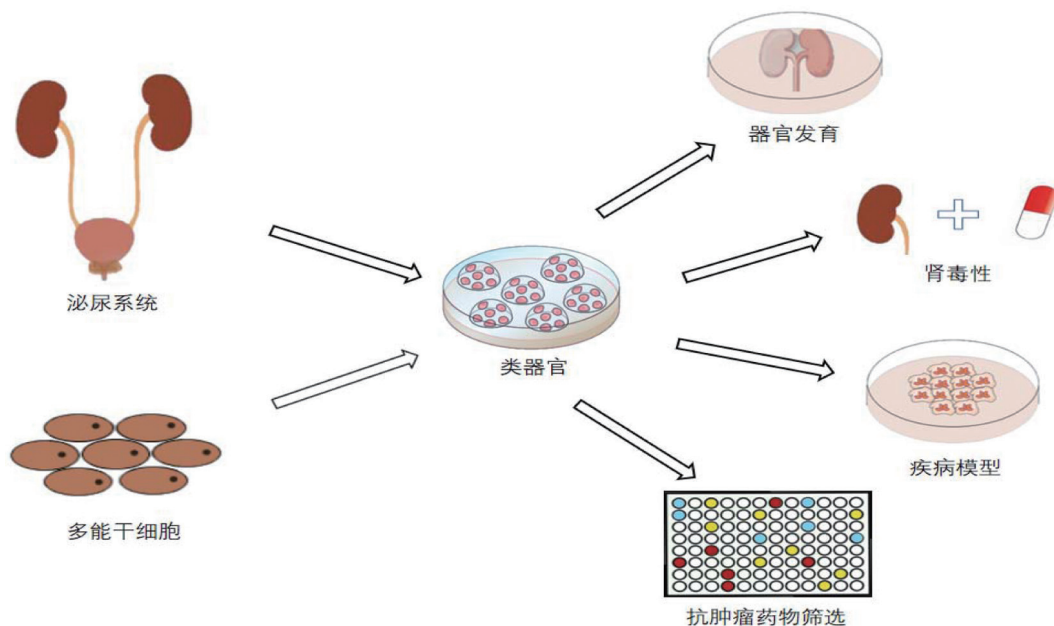


图1 类器官模型在泌尿系统疾病中的应用

Takasato 等^[6]采用 CHIR99021-FGF9 方案对人 iPSCs 进行诱导,并在分化至后肾间充质阶段 (metanephric mesenchyma, MM) 时包被于基质胶中继续培养;MM 可自行分化成包含集合管和节段式肾单位的肾脏类器官,将肾脏类器官的转录谱与人类胎儿肾脏组织相比较,发现其与妊娠早期的人类肾脏相似度最高。然而,该团队诱导的 UB 细胞并没有表现出分支形态,肾元祖细胞 (nephron progenitors, NPs) 诱导及维持能力也未得到证实。Taguchi 和 Nishinakamura^[32]利用不同剂量的 activin A/BMP 对 UB 和 NP 进行选择诱导,将 iUB 和 iNP 与基质细胞 (SN) 共培养于低吸附的 96 孔板中,在 SN 和 iUB 二者的共同支持下, iUB 尖端出现正常的伸长和分叉,随着三种细胞的进一步作用,可最终诱导分化成高度有序的、与肾脏结构极为相似的高序列肾脏类器官。目前,多数培养方案不能满足肾脏各种细胞有规律的形成,包括连续性肾单位的形成及肾小球的血管化^[32-33]。因此,培养出的类器官无论是形态大小还是生理功能都无法做到完全模拟真实的组织器官。Low 等^[34]通过先调节 WNT 信号通路分子 CHIR99021 来控制肾脏近端和远端小管形成的相对比例,再进一步调节肾小球足细胞分泌血管内皮生长因子 A (VEGFA) 水平,可有效地将 hPSCs 分化为血管化的节段式肾脏类器官,并证明血管网络的分化和成熟高度依赖足细胞分泌的 VEGFA 的水平。将培养 4 周后的血管化肾脏类器官移植到免

疫缺陷的小鼠体内后,植入的肾脏类器官在足细胞和壁上皮细胞之间形成了鲍曼囊结构,并可进行初步过滤和重吸收。此外,作为肾脏的重要组成部分之一,连接肾单位的集合管的分化也同样重要。2021 年, Zeng 等^[35]报道了 hPSCs 诱导产生的集合管祖细胞可在体外培养、扩增,并最终分化为成熟的集合管类器官;该类器官拥有与成体肾脏集合管相同的两种主要细胞类群:主细胞 (principal cell, PC) 和闰细胞 (intercalated cell, IC), 这为进一步研究肾脏发育提供了重要的类器官平台。

2.1.2 组织损伤修复

近日,利用 PSCs 分化而来的类器官修复小鼠损伤脏器已有相关报道。Toyohara 等^[7]首次证实了以 iPSCs 来源的部分血管化的肾脏类器官移植到急性肾损伤小鼠后,可显著抑制血尿素氮和血清肌酐水平的升高,减轻肾小管坏死等组织病理学改变,证明肾脏类器官在组织修复和肾脏移植等方面具有巨大的应用潜力。此外, Hepburn 等^[36]证实由重编程获得的 iPSCs 经体外诱导形成的前列腺类器官呈腺泡-管状分支,且其基因表达谱与人前列腺细胞基因表达谱相似,该团队也首次证明 iPSCs 和大鼠的泌尿生殖窦组成的重组体可在小鼠体内分化成人类前列腺组织。以上研究表明, iPSCs 来源的泌尿系统类器官在器官损伤修复方面可能具有良好的应用前景,但目前尚未有将泌尿系统类器官直接运用于人体器官的损伤修复及移植治疗的报道,可能是

表1 多能干细胞(PSCs)构建肾脏类器官的诱导分化方案

方案	来源细胞	培养天数 (总/至NP或UB)	NP或UB分化步骤	NP或UB分化后步骤
Little等 ^[19] , 2014	ESCs	不确定/17或18	d ₀₋₂ : BMP4 (30)+activin A (10); d ₂₋₆ : FGF9 (200); d ₆₋₁₇ : FGF9 (200)+BMP7 (50)+RA (10 ⁻⁸) 或d ₀₋₂ : CHIR99021 (8); d ₂₋₁₂ : FGF9 (200); d ₁₂₋₁₇ : 未添加生长因子	无
Morizane等 ^[21] , 2015	ESCs	28/9	d ₀₋₄ : CHIR99021 (8)+noggin (5); d ₄₋₇ : activin A (10); d ₇₋₉ : FGF9 (10)	d ₉₋₁₁ : FGF9 (10)+CHIR99021 (3); d ₁₁₋₁₄ : FGF9 (10); d ₁₄₋₁₈ : 撤去FGF9 (10)
Taguchi等 ^[32] , 2017	iPSCs	12.5/12.5	d ₀₋₁ : activin A (10)+BMP4 (1); d _{1-2.5} : BMP4 (1)+CHIR99021 (10); d _{2.5-4.5} : RA (0.1)+FGF9 (100)+ LDN193189 (100)+SB431542 (100); d _{4.5-6.25} : RA (0.1)+FGF9 (100)+ CHIR99021 (5)+LDN-193189 (30); d _{8.5-10.5} : Y27632 (10)+RA (0.1)+ CHIR99021 (3)+GDNF (1)+FGF1 (100)+ LDN-193189 (10); d _{10.5-12.5} : Y27632 (10)+ RA (0.1)+GDNF (2)+FGF1 (100)+ CHIR99021 (3)+LDN-193189 (10)	无
Low等 ^[34] , 2019	iPSCs	20/9	d ₀₋₄ : CHIR99021 (10); d ₄₋₇ : 未添加生长因子; d ₇₋₉ : FGF9 (50)+ CHIR99021 (3)	d ₁₀₋₁₃ : FGF9 (50); d ₁₄₋₂₀ : FGF9 (50)+ CHIR99021 (1); d ₂₁₋₂₃ : CHIR99021 (1)
Zeng等 ^[35] , 2021	hiPSCs	21/7	d ₀₋₃ : CHIR99021 (3)+activin A (50) 或 CHIR99021 (4.5)+LDN-193189 (10); d ₃₋₅ : FGF2 (200)+TTNPB (0.1)+ LDN-193189 (30)+A83-01 (0.2); d ₅₋₇ : FGF2 (200)+TTNPB (0.1)+ LDN-193189 (30)	d ₇₋₁₄ : B-27, minus vitamin A (1×)+ 2-Mercaptoethanol (0.1)+MEM NEAA (1×)+KSR (3%)+ITS (1×)+ Vasopressin (1)+Aldosterone (100)

ESCs: 胚胎干细胞; iPSCs: 诱导多能干细胞; NP: 肾元祖细胞; UB: 输尿管芽; Y27632: ATP竞争性ROCK-I和ROCK-II抑制剂($\mu\text{mol/L}$)(试剂名称后括号中的数字为浓度值,下同); BMP4: 骨形态发生蛋白4 (ng/mL); activin A: 激活素A (ng/mL); FGF2: 成纤维生长因子2 (ng/mL); CHIR99021: GSK-3 α/β 抑制剂($\mu\text{mol/L}$); RA: 视黄酸($\mu\text{mol/L}$); FGF9: 成纤维生长因子9 (ng/mL); noggin: 头蛋白(ng/mL); B27及B-27, minus vitamin A: 细胞培养添加剂; LDN-193189: 选择性BMP信号通路抑制剂(nmol/L); SB431542: ATP竞争性ALK5抑制剂($\mu\text{mol/L}$); FGF1: 成纤维生长因子1 (ng/mL); GDNF: 胶质细胞源性神经营养因子(ng/mL); TTNPB: RAR激动剂($\mu\text{mol/L}$); A83-01: TGF- β 抑制剂($\mu\text{mol/L}$); 2-Mercaptoethanol: β -巯基乙醇 (mmol/L); MEM NEAA: MEM非必需氨基酸; KSR: KnockOut Serum Replacement (v/v); ITS: 胰岛素-转铁蛋白-硒培养基补充剂; Aldosterone: 醛固酮(nmol/L); Vasopressin: 加压素(units/mL)。 “d”与下标数值为时间(天)范围。

相关的肾脏及前列腺类器官尚不具备人体器官复杂的生理结构和功能,以及尚未建立出绝对高效和完整的分化方案。

2.2 药物的肾毒性测试

药物肾毒性 (drug-induced nephrotoxicity, DIN) 是临床上不可避免的一种药物不良反应。在临床前试验阶段,通常采用人肾脏细胞系和整体动物作为药物肾毒性评价模型。肾细胞系与人体肾脏相比,其整体的形态和功都发生较大的变化^[37]。而动物和

人类之间的种属差异较大,使最终的药物肾毒性测试结果可信度不高。能够模拟肾脏实质细胞形态与功能的肾脏类器官为药物肾毒性测试提供了更加接近人体生理的研究模型^[38]。

肾小管上皮细胞表达肾毒性药物特定的靶点蛋白(如 ABCB1、ABCG2 和 SLC22 基因家族),这些靶点对某些肾毒性药物(如顺铂、庆大霉素等)有重要的重吸收作用。Morizane 等^[21]利用体外诱导 iPSCs 分化的肾脏类器官的近端和远端小管测试

顺铂和庆大霉素的肾毒性, 分别用 5 mg/mL 的庆大霉素和 5 mmol/L 的顺铂处理 48 h 和 24 h 后, 免疫组化染色显示肾损伤分子 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1) 在近端及远端小管表达高度上调。此外, Kim 等^[39] 利用人 iPSCs 来源的肾脏类器官, 在体外测试了他克莫司的肾毒性。他克莫司处理过的肾脏类器官近端小管细胞中含有大量空泡, 并出现氧化应激行为、线粒体功能障碍及自噬活性增强。

迄今为止, 基于肾脏类器官测评的肾毒性药物数量远远低于临床上常见的肾毒性药物, 并且对于肾单位的不同节段的药物肾毒性的评测更是少之又少^[38, 40]。如要评估肾脏类器官模型在肾毒性筛选及临床前药物测试中是否具有应用价值, 必须建立功能更全面、分化结果更稳定的肾脏类器官, 并对有肾毒性药物以及无肾毒性的药物均进行测试。

2.3 泌尿系统疾病模型的建立

泌尿系统疾病的发生和发展相关研究离不开疾病模型的建立。类器官作为新兴的一种 3D 体外细胞模型, 与体内的来源组织或器官的结构及基因组高度相似, 在疾病模型的构建及发病机制的研究等方面具有巨大优势^[41]。

2.3.1 遗传性肾脏病模型

常染色体显性遗传性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 可在任何年龄段发病, 临床上较为常见, 目前已知 ADPKD 突变基因有两个, 按照发现前后分别命名为 *PKD1* 和 *PKD2*, 这两种基因的其中一种发生突变均可导致多囊肾病的发生^[42]。Cruz 等^[43] 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 hPSCs 中引入 *PKD1* 或 *PKD2* 双等位基因突变, 并在此基础上对 hPSCs 进行诱导、分化。9 周后, *PKD1* 或 *PKD2* 的缺失可使 iPSCs 诱导的肾类器官周围形成较大的、半透明的囊状结构, 成功地建立了 ADPKD 模型。与多囊肾病小鼠模型相比, 基于基因编辑技术和类器官培养技术建立的 ADPKD 类器官模型, 在消除了种属间差异性后, 更有利于对患者的发病机制及药物筛选进行深层次的研究。

2.3.2 药源性肾损伤模型

顺铂所致的急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的主要作用靶点在肾小管上皮细胞。KIM-1 是一种检测早期肾损伤的可靠生物学标记物, 在临床上使用较为广泛。Freedman 等^[8] 利用 iPSCs 诱导的肾脏类器官研究发现, 在肾毒性药物顺铂或庆大霉素的诱导下, 80% 的肾小管管腔表面可检测到

肾损伤分子 KIM-1 的表达; 另外, DNA 损伤标志物 γ H2AX 在莲花四方凝集素 (lotus tetragonolobus lectin, LTL) 阳性的肾小管中同时表达上调, 进一步区分了广泛性的细胞毒性和肾元的特异性损伤, 证明了肾脏类器官作为急性肾脏损伤模型的实用性。

2.3.3 感染性肾脏病模型

肾脏类器官在模拟病原微生物和宿主相互作用上具有天然的优势。BK 病毒 (BK virus, BKV) 是特异性感染肾上皮细胞和肾小管细胞的一种无包膜的环状双链 DNA 病毒^[44]。Schutgens 等^[23] 利用临床患者的 BK 病毒分离物感染肾小管类器官, 感染后的肾小管胞核至少是正常胞核的 2 倍, SV40/大 T 抗原染色显强阳性, 这与临床判断 BK 病毒感染结果相一致。用不同剂量的西多福韦与感染了 BK 病毒的肾小管共培养 7 d, 从起始浓度开始, 病毒拷贝数显著减少, 且呈剂量依赖性, 该研究结果表明 BK 病毒感染的肾小管类器官与临床上感染结果相似, 并允许在体外测试药物治疗效果。血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 侵入宿主细胞的主要靶点, 由于肾脏是 ACE2 受体主要分布位置之一^[45], 这也使得肾脏类器官为新冠病毒感染机制的研究及治疗药物的研发提供了良好的体外模型^[46]。

2.3.4 癌症模型

从正常组织上皮细胞中构建的上皮类器官模型, 可结合基因编辑技术在肿瘤某一特定阶段进行突变建模, 以探究特定基因在癌症中的作用, 解析该基因相关的分子机制进程^[47]。

原发性前列腺癌的特征主要是基底细胞的缺失和管腔细胞的异常增殖, 然而, 其早期的谱系决定分化机制仍不清楚。Li 等^[48] 通过对 806 例前列腺癌患者转录因子 (TFs) 的整合分析发现, ERG 基因与前列腺癌管腔亚型高度相关。将小鼠前列腺分离出的正常管腔细胞进行体外 3D 培养, IHC 结果显示正常前列腺管腔类器官由 Krt8⁺ 内腔细胞层和 Krt5⁺ 外基底细胞层组成。将过表达 ERG 的正常前列腺管腔细胞进行异位移植后, 免疫染色结果呈现出纯 Krt8⁺ 管腔细胞分化趋势, 提示过表达管腔细胞中的 EGR 基因可能抑制了管腔细胞转化为基底细胞。通过分析三维染色质的结构, 该团队发现 ERG 结合并抑制 Trp63 远端增强子的活性和染色质环, 从而沉默其基因表达。Trp63 远端特异性 ERG 结合位点的缺失导致 ERG 介导的基底细胞分化缺失, 证明了 ERG 在前列腺癌起始细胞谱系分化中

起着关键性的作用。Guo 等^[49]对小鼠前列腺正常上皮细胞进行单细胞测序,发现管腔细胞中存在一类前列腺成体干细胞,并命名为 Luminal-C,该类管腔上皮细胞在体外可表现出更强的类器官形成能力,在体内可表现出前列腺上皮管腔再生能力;他们进一步利用条件性基因敲除系统,证明 Luminal-C 细胞可导致前列腺上皮内瘤变(prostatic intraepithelial neoplasia, PIN),为 Luminal-C 可能为前列腺肿瘤祖细胞提供了关键证据。

2.4 个性化抗肿瘤药物筛选

在泌尿系统疾病研究中,肿瘤类器官保留了原发肿瘤关键的遗传和表型特征,从而使它们能够在新药筛选中得到广泛的应用^[50-52](图 1)。Mullenders 等^[11]收集了 53 例膀胱癌患者样本,建立了膀胱肿瘤类器官生物库,发现不同患者来源的膀胱癌类器官系形态学上存在差异,管腔细胞和基底细胞标志物分子不在同一种细胞中表达;此外,还对膀胱肿瘤类器官进行了药物敏感性测试,验证了膀胱肿瘤类器官可预测临床患者的药物反应。Lee 等^[12]建立了从低级别非肌肉浸润性到高级别肌肉浸润性膀胱癌肿瘤类器官系,通过全外显子测序和 DNA 拷贝数分析,证实了类器官生物库与患者组织样本突变谱的高度吻合。利用 40 种临床上常见的化疗药物对膀胱癌肿瘤类器官进行药敏测试,不同患者的类器官对同种药物的反应与它们的突变基因之间显示出部分相关性,其中,SCBO-3.2 类器官系的细胞活性曲线能反映相应患者在治疗失败后的药物反应。

目前,关于前列腺类器官培养方案的研究较少。Drost 等^[53]描述了从人前列腺正常细胞、转移性前列腺癌细胞和循环肿瘤细胞中建立 3D 前列腺类器官培养物的策略,该培养方案是目前唯一一种允许管腔和基底前列腺上皮以及晚期前列腺癌细胞生长的培养方案,通常在 2 周内即可获得成熟的类器官,基于该方案建立的前列腺肿瘤类器官为肿瘤发生发展相关的分子机制研究以及新药的发现奠定了基础。Gao 等^[15]报道了从活检标本和循环肿瘤细胞中建立的 7 例前列腺癌类器官模型,该类器官生物库可概括前列腺癌亚型的分子特征,包括 TMRSS2-ERG 融合、SPOP 突变、SPINK1 过表达和 CHD1 缺失,7 例类器官分别用安鲁米特、依维莫司和 BKM-120 进行药物敏感性实验,其中 1 例带有 AR、PTEN 和 PIK3R1 突变的类器官 MSK-PCa2 对苯扎鲁胺和依维莫司均显示敏感,提示临床上的药物治疗可结合患者不同的突变基因,选择适合的靶向

药物。

以上研究表明,通过类器官培养技术,可为每位肿瘤患者建立属于自己的肿瘤类器官生物库,在此基础上进行多种肿瘤药物的剂量筛选,结合全基因组测序、转录组测序分析,评估不同患者的基因组特征与药敏测试的关联性,建立每位患者的药物敏感性档案,为每位癌症患者的个体化治疗提供临床前的数据支撑和指导。

3 总结与展望

泌尿系统相关类器官模型的建立及发展给泌尿外科领域的研究带来了光明前景。干细胞来源的肾类器官可用于器官发育、组织修复、药物肾毒性测评及疾病模型的构建,为发育生物学、再生医学和药物发现提供了重大机遇,但仍存在许多问题亟待解决^[54-55]: (1) 不同分化方案所培养出的肾脏类器官的结构、功能、成熟度方面存在较大差异,通过控制不同肾元细胞前体细胞占比和分化顺序,对现存的肾类器官分化方案进行完善和优化,可提高成熟肾单元所占比例;(2) 肾类器官中血管网络分化不足,血管系统的缺乏将导致无法在体外模拟肾脏的血液过滤、重吸收和尿液生成等关键功能,也无法实现局部肾组织修复及肾脏移植再生。在精准医疗的时代,肿瘤体外药敏检测是实现患者个体化治疗的重要研究方向^[56]。基于泌尿系统前列腺、膀胱等肿瘤类器官生物库的建立,研究人员已证实现有的泌尿系统肿瘤类器官模型可较为准确地预测患者对临床治疗的反应^[11-13],并为下一步患者耐受的出现以及耐受性背后的机制研究提供了模型储备^[57-58]。笔者认为肿瘤类器官模型应用受限的原因主要有以下几个方面:(1) 无法重现完整的肿瘤微环境;(2) 临床可用的供体组织少且质量难以控制;(3) 为进行高通量药物筛选,需长时间的体外培养和扩增。

随着 3D 生物打印技术的日趋完善,生物打印与类器官培养这两种“朝阳技术”的完美结合,为泌尿系统不同组织来源的类器官所面临的困境及挑战带来了新的机遇^[59-60]。Homan 等^[61]利用 3D 打印芯片技术,诱导形成了一个贯穿肾类器官的连通的血管网络,这为肾类器官血管化的进一步研究提供了参考。针对肿瘤类器官有效模型的构建和应用受限效率与时耗的问题,Shin 教授带领其团队提出了“类组装体”这一新概念^[62],通过人体正常干细胞和肿瘤细胞分别与肿瘤微环境中的各种间质细胞进行重组,构建出与人体膀胱相近的“类组装

体”, 为肿瘤类器官中肿瘤微环境的重塑提供了一种可行的方案, 也为后续肿瘤类器官在侵袭、转移等方面的研究铺平了道路。另外, Hu 等^[63]利用该团队自主研发的微流控芯片, 可在一周内获得肺肿瘤类器官药敏预测结果, 大幅降低样本消耗量和培养时间, 这为泌尿系统肿瘤类器官在短时间内获得患者的药物预测结果提供了技术支持。

截至目前, 从正常或疾病组织中建立起的类器官模型, 在转化医学和临床个性化治疗上都扮演着越来越重要的角色, 我们有理由相信, 这项技术无论是在泌尿系统疾病还是在其他疾病研究领域中都将有更为广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 2007, 449: 1003-7
- [2] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459: 262-5
- [3] Foley KE. Organoids: a better *in vitro* model. *Nat Methods*, 2017, 14: 559-62
- [4] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 2014, 345: 1247125
- [5] Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 53-67
- [6] Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 2015, 526: 564-8
- [7] Toyohara T, Mae S, Sueta S, et al. Cell therapy using human induced pluripotent stem cell-derived renal progenitors ameliorates acute kidney injury in mice. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4: 980-92
- [8] Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun*, 2015, 6: 8715
- [9] Hollywood JA, Przepiorski A, D'Souza RF, et al. Use of human induced pluripotent stem cells and kidney organoids to develop a cysteamine/mTOR inhibition combination therapy for cystinosis. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31: 962-82
- [10] Kumar SV, Er PX, Lawlor KT, et al. Kidney micro-organoids in suspension culture as a scalable source of human pluripotent stem cell-derived kidney cells. *Development*, 2019, 146: dev172361
- [11] Mullenders J, de Jongh E, Brousalı A, et al. Mouse and human urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 4567-74
- [12] Lee SH, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer. *Cell*, 2018, 173: 515-28
- [13] Vasyutin I, Zerihun L, Ivan C, et al. Bladder organoids and spheroids: potential tools for normal and diseased tissue modelling. *Anticancer Res*, 2019, 39: 1105-18
- [14] Chua CW, Shibata M, Lei M, et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 951-61
- [15] Gao D, Sboner A, Iaquina PJ, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 2014, 159: 176-87
- [16] Ohmori T, De S, Tanigawa S, et al. Impaired NEPHRIN localization in kidney organoids derived from nephrotic patient iPS cells. *Sci Rep*, 2021, 11: 3982
- [17] Takasato M, Maier B, Little MH. Recreating kidney progenitors from pluripotent cells. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29: 543-52
- [18] Mae SI, Shono A, Shiota F, et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 2013, 4: 1367
- [19] Takasato M, Er PX, Becroft M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 118-26
- [20] Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, et al. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ β -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, 2008, 135: 2969-79
- [21] Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1193-200
- [22] Calandrini C, Drost J. Generation of human kidney tubuloids from tissue and urine. *J Vis Exp*, 2021, doi: 10.3791/62404
- [23] Schutgens F, Rookmaaker MB, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 303-13
- [24] Joshi A, Roberts MJ, Alinezhad S, et al. Challenges, applications and future directions of precision medicine in prostate cancer -- the role of organoids and patient-derived xenografts. *BJU Int*, 2020, 126: 65-72
- [25] Said N. Establishing and characterization of human and murine bladder cancer organoids. *Transl Androl Urol*, 2019, 8: S310-3
- [26] Karthaus WR, Iaquina PJ, Drost J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 2014, 159: 163-75
- [27] Shankar AS, Du Z, Mora HT, et al. Human kidney organoids produce functional renin. *Kidney Int*, 2021, 99: 134-47
- [28] Yousef Yengej FA, Jansen J, Rookmaaker MB, et al. Kidney organoids and tubuloids. *Cells*, 2020, 9: 1326

- [29] Dziejdz K, Pleniceanu O, Dekel B. Kidney stem cells in development, regeneration and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 57-65
- [30] Wu H, Uchimura K, Donnelly EL, et al. Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 869-81.e8
- [31] Koning M, van den Berg CW, Rabelink TJ. Stem cell-derived kidney organoids: engineering the vasculature. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77: 2257-73
- [32] Taguchi A, Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 730-46.e6
- [33] Ahounova Z, Slabakova E, Bino L, et al. Generation of human iPSCs from human prostate cancer-associated fibroblasts IBPi002-A. *Stem Cell Res*, 2018, 33: 255-9
- [34] Low JH, Li P, Chew EGY, et al. Generation of human PSC-derived kidney organoids with patterned nephron segments and a *de novo* vascular network. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 373-87.e9
- [35] Zeng Z, Huang B, Parvez RK, et al. Generation of patterned kidney organoids that recapitulate the adult kidney collecting duct system from expandable ureteric bud progenitors. *Nat Commun*, 2021, 12: 3641
- [36] Hepburn AC, Curry EL, Moad M, et al. Propagation of human prostate tissue from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9: 734-45
- [37] Troth SP, Simutis F, Friedman GS, et al. Kidney safety assessment: current practices in drug development. *Semin Nephrol*, 2019, 39: 120-31
- [38] Hale LJ, Howden SE, Phipson B, et al. 3D organoid-derived human glomeruli for personalised podocyte disease modelling and drug screening. *Nat Commun*, 2018, 9: 5167
- [39] Kim JW, Nam SA, Seo E, et al. Human kidney organoids model the tacrolimus nephrotoxicity and elucidate the role of autophagy. *Korean J of Intern Med*, 2020, 36: 1420-36
- [40] Guo H, Deng N, Dou L, et al. 3-D human renal tubular organoids generated from urine-derived stem cells for nephrotoxicity screening. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6: 6701-9
- [41] Lo YH, Karlsson K, Kuo CJ. Applications of organoids for cancer biology and precision medicine. *Nat Cancer*, 2020, 1: 761-73
- [42] Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, et al. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 50
- [43] Cruz NM, Song X, Czerniecki SM, et al. Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease. *Nat Mater*, 2017, 16: 1112-9
- [44] Chong S, Antoni M, Macdonald A, et al. BK virus: current understanding of pathogenicity and clinical disease in transplantation. *Rev Med Virol*, 2019, 29: e2044
- [45] Anguiano L, Riera M, Pascual J, et al. Circulating ACE2 in cardiovascular and kidney diseases. *Curr Med Chem*, 2017, 24: 3231-41
- [46] Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell*, 2020, 181: 905-13.e7
- [47] Grassi L, Alfonsi R, Francescangeli F, et al. Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 201
- [48] Li F, Yuan Q, Di W, et al. ERG orchestrates chromatin interactions to drive prostate cell fate reprogramming. *J Clin Invest*, 2020, 130: 5924-41
- [49] Guo W, Li L, He J, et al. Single-cell transcriptomics identifies a distinct luminal progenitor cell type in distal prostate invagination tips. *Nat Genet*, 2020, 52: 908-18
- [50] Puca L, Bareja R, Prandi D, et al. Patient derived organoids to model rare prostate cancer phenotypes. *Nat Commun*, 2018, 9: 2404
- [51] Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc*, 2020, 15: 3380-409
- [52] Kondo J, Inoue M. Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy. *Cells*, 2019, 8: 470
- [53] Drost J, Karthaus WR, Gao D, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc*, 2016, 11: 347-58
- [54] Xu H, Lyu X, Yi M, et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 116
- [55] Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 407-18
- [56] 王楚, 高建军, 华国强. 肠道类器官在精准医学中的应用. *中国科学:生命科学*, 2017, 47: 171-9
- [57] Harada K, Sakamoto N, Ukai S, et al. Establishment of oxaliplatin-resistant gastric cancer organoids: importance of myoferlin in the acquisition of oxaliplatin resistance. *Gastric Cancer*, 2021, 24: 1264-77
- [58] Ukai S, Honma R, Sakamoto N, et al. Molecular biological analysis of 5-FU-resistant gastric cancer organoids; KHDRBS3 contributes to the attainment of features of cancer stem cell. *Oncogene*, 2020, 39: 7265-78
- [59] Lawlor KT, Vanslambrouck JM, Higgins JW, et al. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation. *Nat Mater*, 2021, 20: 260-71
- [60] Garreta E, Kamm RD, Chua de Sousa Lopes SM, et al. Rethinking organoid technology through bioengineering. *Nat Mater*, 2021, 20: 145-55
- [61] Homan KA, Gupta N, Kroll KT, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids *in vitro*. *Nat Methods*, 2019, 16: 255-62
- [62] Kim E, Choi S, Kang B, et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer. *Nature*, 2020, 588: 664-9
- [63] Hu Y, Sui X, Song F, et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week. *Nat Commun*, 2021, 12: 2581