

DOI: 10.13376/j.cblls/2023109

文章编号: 1004-0374(2023)08-0994-10

类器官培养方法及家畜类器官研究进展

张言, 朱春玲, 杨蕊, 张博洋, 陈澜歆, 赵彦森, 王玥琦, 唐博*, 张学明*
(吉林大学动物医学学院, 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春 130062)

摘要: 类器官 (organoid) 是由干细胞在体外培育而成的一种三维 (3D) 细胞培养物, 其中包含多种细胞类型的自组装。类器官是生物医学领域内近年来的热门前沿技术之一, 可用于发育、内稳态、再生、疾病建模和药物研发等领域的相关研究。不同类器官的培养方法存在差异, 因此了解相关进展对成功构建合适的类器官模型非常重要。家畜与人类生活息息相关, 通过构建类器官的方式以其为研究对象, 对人类的饮食安全、医疗保健、精神健康都具有重要意义。本文评述了类器官的培养方式及家畜类器官研究方面的进展, 以便为后期相关研究提供参考。

关键词: 类器官; 干细胞; 3D 培养; 体外模型
中图分类号: Q813.11 **文献标志码:** A

Advances in organoid methodology and livestock organoids

ZHANG Yan, ZHU Chun-Ling, YANG Rui, ZHANG Bo-Yang, CHEN Lan-Xin,
ZHAO Yan-Sen, WANG Yue-Qi, TANG Bo*, ZHANG Xue-Ming*

(Key Laboratory of Animal Embryo Engineering of Jilin Province, College of Veterinary Medicine,
Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Organoid is a three-dimensional (3D) cell culture created from stem cells grown *in vitro*, which contains self-assembly of multiple cell types. It's one of the recent hot frontier technology for studying the development, homeostasis, regeneration, disease modeling, and drug discovery, etc. Since the culture methods of different organoids are different, it is important to understand the relevant progress for construction of suitable organoid models. Domestic animals are closely related to human life, it is of great importance to study them by constructing organoids for human diet safety, health care, and mental health. Here we review the culture methods of multiple organoids and the progress of livestock organoids, aiming to provide references for the future research.

Key words: organoid; stem cell; three-dimensional culture; *in vitro* model

长期以来, 人类干细胞在临床上的开发一直难以实现, 因为无法在体外维持和扩增成体干细胞 (adult stem cells, ASCs) 的同时保留其多谱系分化潜能。近年来, 随着人们对干细胞微环境及一些关键信号分子在干细胞维持和分化中作用的逐渐了解, 新的体外三维 (3D) 培养技术已被建立^[1]。多能干细胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 可依赖其分化潜能产生各种类型的细胞, 而通过 3D 培养, 干细胞可形成类似整个器官的结构, 即类器官 (organoid)^[2]。类器官是一类由 PSCs 或 ASCs 衍生而来的 3D 组织结构, 这种结构不但有自我更新和自组织能力, 还

有功能性和多细胞性。因此, 类器官可在体外再现活体器官或组织的结构和功能, 表现出与其起源组织相似的器官功能及原始遗传和表型特征^[1,3], 还能长期在体外维持结构和基因组的稳定性。与现有

收稿日期: 2023-02-16; 修回日期: 2023-04-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172803, 31872434)

*通信作者: 张学明, E-mail: zhangxuem@jlu.edu.cn,
Tel: 0431-87836187; 唐博, E-mail: tang_bo@jlu.edu.cn, 0431-87835370

的2D和3D细胞培养方式相比,类器官是不同类型细胞在特定环境下自我重组形成的有机体,根据其定义具有3个特征:包含其所模拟器官的至少一种类型的细胞;表现出该器官特有的一些功能;与体内器官本身的组织类似^[2]。

作为体外研究模型,类器官对未来疾病的研究将起重要作用。除了从组织中培养类器官外,还可以从肿瘤中培养出类器官,从而在体外完成相应药物实验。例如通过培养肺癌类器官来预测患者的特异性药物反应^[4],建立乳腺癌类器官模型用于基础、临床和药学研究等^[5]。本文总结评述了类器官培养的方法及家畜类器官研究方面的进展。

1 类器官培养方法

类器官一般分为组织来源类器官和PSCs来源类器官。前者是从组织中制备单细胞悬液,随后立即嵌入细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,在特定生长因子的存在下生长至类器官形成;后者则是将PSCs的2D培养物用生长因子如激活素A(Activin A)等诱导为内胚层,再在3D培养基中使用特定分化信号,最终得到所需的组织类型。

对于不易获得组织样本的器官如脑等,可用PSCs得到类器官。此外,一些类型的类器官只能由PSCs构建,形成的类器官与组织来源类器官相比包含间充质层,建立后不能通过传代延续,且在体外很难达到成体组织阶段,类似胎儿期的组织,具有多能性,能形成更复杂的结构。对于组织来源的类器官,Wnt信号通路的激活是其建立的关键,其培养方案比PSCs衍生类器官简单,倾向于直接复制原始组织,形成成熟类器官较快。

1.1 消化道类器官

肠是消化道的重要器官,也是消化道类器官研究最深入最广泛的器官。肠类器官是通过3D培养方式使肠干细胞增殖分化,产生包括杯状细胞和潘氏细胞在内的几乎所有细胞类型,形成类似肠管结构和功能的组织^[6]。

组织来源的肠类器官出现较早。Toshiro等^[7]最早采用富含层黏连蛋白的基质胶进行肠道类器官的培养。他们先用胰酶消化得到小肠隐窝,经磷酸缓冲液处理后与基质胶混合,固化后加入含有表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)抑制剂(Noggin)等的培养基进行培养,成功建立了肠类器官培养体系。最近,该团队又通过阻断类器官中的EGF受

体(EGF receptor, EGFR)或丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-associated protein kinase, MAPK)通路在体外诱导Lgr5⁺(G蛋白偶联受体,肠干细胞标记)肠上皮干细胞沉默,获得了偏向肠内分泌细胞的类器官^[8]。该培养体系已被用于家畜肠类器官培养。2019年,Derricott等^[9]将牛肠隐窝重悬于70%基质胶、30%含Wnt3a(Wnt信号激活剂)条件培养基混合液,并加入R-spondin(Wnt信号激活剂)、Noggin、EGF、CHIR99021(Wnt信号激活剂、糖原合成激酶GSK-3 β 抑制剂)、Y27632(ROCK抑制剂)、SB202190(转化生长因子TGF- β 受体抑制剂)、A83-01(TGF- β 抑制剂)等,培养出了牛肠隐窝类器官。同年,Töpfer等^[10]在此基础上又添加牛血清白蛋白、半胱氨酸、烟酰胺等获得了牛结肠类器官。2022年,研究者添加上述同种物质培养出了猪小肠类器官^[11]。胃是消化道中结构最复杂的器官,其类器官的培养方式也相应较为复杂。胃类器官主要由胃窦处的Lgr5⁺干细胞生长分化获得。Mccracken等^[12]通过在培养基中添加成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、Y27632、激活素A、BMP等,逐步将胃上皮干细胞诱导成内胚层样组织,随后用视黄酸(retinoic acid, RA)诱导为类器官。该法建立的胃类器官为其他研究人员提供了重要参考。2021年,Smith等^[13]在含胃腺的DMEM/F12培养基中加入生长因子及含有Y27632、LY2157299(TGF- β 受体抑制剂)、SB202190、庆大霉素的培养基,在基质胶中培养出了胃类器官,并在同等条件下获得了肠类器官。随后,Faber等^[14]用以上同等条件培养出了皱胃类器官。

PSCs来源的消化道类器官在家畜中研究较少,大多数都是以人为研究对象。Crespo等^[15]在RPMI培养基中添加CHIR99021及激活素A将人PSCs(hPSCs)分化为内胚层,随后移入补充B27(细胞培养添加剂)的RPMI中并加入CHIR99021和FGF4分化为后肠内胚层,最后在含B27的DEME/F12中培养,加入CHIR99021、LDN193189(BMP I型受体ALK2和ALK3的小分子抑制剂)和EGF,40d后分化为结肠类器官。Xia等^[16]将人iPSCs(induced PSCs)在覆有基质胶的mTeSR1培养基中培养,添加激活素后分化为内胚层,再在含有FGF4和CHIR99021的分化培养液中培养4d,最后在含R-spondin、Noggin和EGF等的培养液中培养30d,获得了肠类器官。Onozato等^[17]将人iPSCs在Y27632中培养,随后转入DMEM/F12并加入CHIR99021、

A83-01、Y-27623、FGF2、EGF、青霉素、环霉素等,获得了萌芽状肠类器官。食管类器官的培养也有广阔应用前景,在小肠类器官培养条件基础上补充人FGF即可实现其培养^[18]。

1.2 肺类器官

肺上皮细胞、肌成纤维细胞、上呼吸道样上皮细胞、间充质细胞等多种细胞经诱导自组织培养可形成肺类器官。肺类器官成功构建的标志是气管样结构的出现^[19]。肺类器官的构建有多种方法,但在家畜中涉及极少,主要是人和小鼠的。

有源自正常组织的肺类器官,如Hild等^[20]利用人支气管上皮细胞诱导支气管球类器官。Hai等^[21]将小鼠肺中分离出的细胞重悬于含有谷氨酰胺、HEPES缓冲液、抗真菌抗生素、N2补充剂(细胞培养添加剂)、B27、N-乙酰半胱氨酸、人EGF的高级DMEM/F12中,以及含有Wnt3a、Noggin和R-spondin的L-WRN(小鼠细胞系)细胞的3%条件培养基,培养出小鼠肺类器官。还有肺癌类器官,如Kim等^[4]将手术切除的肺癌组织分离成单细胞或细胞团簇,随后嵌入基质胶中,用无Wnt3a和Noggin的培养基培养,4周后得到5种肺癌亚型类器官。

还可通过hPSCs体外诱导培养获得人肺类器官。先用激活素A诱导hPSCs形成内胚层,然后在含有Noggin、SB431542、FGF4和CHIR99021的前肠培养基中生成肺类器官^[22]。McCauley等^[23]通过对Wnt信号的调控,以hPSCs为来源得到了气管类器官。

1.3 肾类器官

肾类器官的形成也有多种方法,主要都是以PSCs为来源,在家畜中也涉及较少。Taguchi等^[24]先由胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)产生拟胚体(embryoid body, EB),然后用BMP4和CHIR99021诱导EB形成中胚层,再用激活素A、BMP4、CHIR-99021和RA刺激获得中胚层,以实现向后间介中胚层的分化,最后添加CHIR99021和FGF9产生后肾间充质(metanephric mesenchyme, MM)。人iPSCs来源的MM与小鼠胚胎脊髓共培养可形成含肾单位样结构的肾类器官。Morizane等^[25]将hPSCs分离成单细胞,加入Y27632和FGF2培养,最后分化为肾单位祖细胞(nephron progenitor cells, NPCs),在分化开始的9天内效率达到90%,再用CHIR99021和FGF9处理NPCs诱导肾小囊的形成,随后在2D和3D培养中自组织分化为类器官。Takasato等^[26]发

现FGF-2和FGF-9在肾类器官形成中起重要作用,且CHIR99021更倾向于诱导后中胚层的形成,据此他们修改了现有的分化过程,增加了MM形成的比例和3D培养时间,并主动触发肾单位的形成。此外,有研究将人iPSCs培养在两层基质胶之间,也产生了肾类器官^[27]。为了解决类器官缺乏血管而引起氧气和营养供应不足的问题,Menéndez等^[28]使用新型器官芯片系统培养出了血管化肾类器官。

1.4 脑类器官

脑类器官的体外培养是通过向hPSCs中添加神经发育相关因子而进行的,相关研究近十年才逐渐开始。2013年,Lancaster等^[29]建立了hPSCs来源的3D培养体系,称为脑类器官。他们从拟胚体产生神经外胚层,然后将其进行3D培养并嵌入基质胶液滴中,为更复杂的组织生长提供支架;然后将这些液滴转移到旋转生物反应器中以增强养分吸收。但在脑类器官培养中仍存在许多问题,严重影响其发育。Quadrato等^[30]为了延长生长和发育时间,修改了Lancaster等^[29]的方案,在拟胚体中植入较少PSCs,优化神经诱导,并向最终分化培养基中加入了脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)。使用该方案后类器官不仅不会缺氧,而且程序性细胞死亡可在9个月内保持相对较低的水平。Giandomenico等^[31]应用气液界面技术培养脑类器官,改善了神经元存活和轴突生长。为了解决脑类器官缺乏血管的问题,Sun等^[32]分别诱导血管和脑类器官,然后将两种类器官融合,得到了血管化的脑类器官。

1.5 肝类器官

肝类器官由肝细胞和导管细胞等构成,在组织来源的肝类器官方面,早期人们用胶原酶分离出成年大鼠的肝细胞和其他类型细胞,并将其接种入由胶原包被的转瓶中,加入肝细胞生长因子(hematopoietic growth factor, HGF)进行培养。之后,Huch等^[33]从受损小鼠的肝脏中分离出了Lgr5⁺细胞,在含R-spondin的培养基中进行3D培养,最终构建的类器官可在体外长期扩增并具有分化为功能性肝细胞的能力,将其移植到肝功能衰竭的免疫缺陷小鼠中,可以挽救小鼠的肝衰竭。Lin等^[34]也用分离的Lgr5⁺细胞得到了类器官,并发现HGF和R-spondin能促进肝类器官的生长。Nantasanti等^[35]将胆管组织与基质胶混合培养,待其凝固后加入DMEM/F12、B27、N2、N-乙酰半胱氨酸、胃泌素、EGF、R-spondin、FGF10、烟酰胺、HGF、Noggin、Wnt3a、Y27632、

A83-01 等培养出犬肝类器官。Kruitwagen 等^[36]用类似条件得到猫的肝类器官。

在 PSCs 来源的肝类器官方面, Mun 等^[37]将人 iPSCs 培养在 PSCs 培养基中, 2~3 d 后换成含 B27、胰岛素和激活素 A 的 RPMI 1640 培养基; 6 d 后细胞分化为内胚层, 将培养基替换为添加 B27、bFGF、BMP4 的 RPMI 1640, 在 4% 缺氧条件下培养 4 d, 此时内胚层向肝分化; 再将培养液替换为无 EGF 的肝细胞培养基 - 内皮细胞生长培养基 1:1 混合液, 其中添加胎牛血清、地塞米松、HGF 等缺氧培养 4 d; 再常氧条件下培养 8 d 即可获得肝类器官。Mun 等^[38]用激活素 A 诱导内胚层的形成, 补充 bFGF、BMP4、HGF 等形成肝类器官。

1.6 生殖系统类器官

雌性生殖系统中研究较多的是子宫内膜类器官, 且大多以组织为来源。子宫内膜上皮体外 3D 结构的构建最初是在无血清条件下以单细胞层形式生长在基质胶上的。2017 年, Boretto 等^[39]通过酶解子宫内膜组织释放出腺体片段, 将分离的组织作为 ECM 支架嵌入基质胶, 加入 Wnt3a、R-spondin、EGF、FGF10、Noggin、ITS-G 等因子培养, 子宫内膜碎片自组装成类器官结构。同年, Turco 等^[40]以子宫内膜蜕膜样本优化培养条件, 成功建立了一套类器官培养系统, 并从增殖期、分泌期、绝经期、妊娠期子宫内膜培养出类器官。2019 年, Haider 等^[41]从蜕膜组织中分离细胞, 用含 1% N2、2% B27、1% 谷氨酸的高级 DMEM 清洗两次, 再悬浮在含 40% EGF、R-spondin、Noggin、A83-01、CHIR99021 的培养液中或 60% 的低生长因子基质胶 (growth factor-reduced Matrigel) 中, 最后培养于 24 孔板形成类器官。此外, 将人卵巢表面上皮细胞用基质胶和胎牛血清培养可以建立卵巢类器官^[42]; 从输卵管上皮分离细胞, 在特定条件下培养在基质胶中, 并加入生长因子可建立输卵管类器官^[43]; 加入各种生长因子后也可建立宫颈内源性和外源性类器官^[44]。

在雄性生殖系统中, 睾丸类器官的研究更为深入, 均以组织为来源。睾丸类器官是将睾丸组织分离消化为各种单细胞 (精原细胞、精母细胞、精子细胞、支持细胞、管周肌样细胞、间质细胞等), 然后将其体外培养自我重组后形成的器官模型。科研人员在早期简单睾丸组织碎片培养基础上对培养基进一步优化, 使精子发生能够进一步进行, 这证明了体外培养的睾丸组织碎片能够模拟体内睾丸的功能。此外, 使用磁激活细胞分选仪分离小鼠睾丸

细胞, 共培养于 3D 软琼脂培养系统中也能获得睾丸类器官。将大鼠睾丸管周肌样细胞培养在下层, 再将生殖细胞和支持细胞混合培养在上层, 可建立大鼠血 - 睾屏障模型。此后, 研究者们用 3D 琼脂培养系统^[45]、改良气 - 液界面法^[46]都培养出了睾丸类器官。Alves-Lopes 等^[47]开发了一种 3 层梯度系统 (3-LGS), 将含有细胞的基质胶培养在两层不含细胞的基质胶之间, 培养一段时间后会形成类器官, 并通过该系统培养的睾丸类器官证明了 RA、IL- α (白细胞介素- α)、TNF α (肿瘤坏死因子 α) 和 RA 抑制剂对生殖细胞维持及血 - 睾屏障的作用。随后该团队利用 3-LGS 在 7 d 内生成了完整性腺类器官^[48]。2019 年, Topraggaleh 等^[49]用 ECM 衍生支架为睾丸类器官结构的生成提供了一个有效的平台。2020 年, Edmonds 等^[50]在 4 种培养环境 (有 / 无 ECM 的 2D 系统和有 / 无 ECM 的 3D 系统) 下培养睾丸组织, 发现这些组织仅在 ECM 的 2D 系统和无 ECM 的 3D 系统中形成睾丸类器官; 在无 ECM 的 3D 系统中发现, 睾丸类器官的形成是未成熟体细胞的一种特性, 其自组装表现出长期的激素反应性内分泌功能。2021 年, Cham 等^[51]分离了仔猪睾丸细胞, 随后在气 - 液界面系统中培养出了具有血管结构、管状结构和间质结构的类器官, 其间质结构可释放睾酮。最近, Abu Madighem 等^[52]开发出了一种新型睾丸类器官培养方法, 他们将未成熟小鼠的睾丸细胞接种在甲基纤维素凝胶中, 在微流控芯片中培养。除睾丸类器官外, 有研究从大鼠附睾中分离出基底细胞, 建立了基底细胞和非基底细胞 3D 细胞培养附睾类器官^[53]; 此外, 在含有 R-spondin、Noggin、EGF、RA 和睾酮的培养基中, 用基质胶培养 20~30 d 可以促进成熟前列腺类器官的发育^[54]。

1.7 类器官培养的挑战及解决方案

虽然类器官能很大程度上模拟体内器官的结构和功能, 各种类器官的培养方法详见下表 1, 但仍存在一些问题。其缺陷之一是产生的表型有高度可变性, 这在药物筛选过程中更为明显, 因此可能会掩盖药物治疗的效果。为此, 可对细胞外环境进行严格控制, 使用特定生物材料或仪器使类器官向实验需要的方向生长。其二, 来源于 PSCs 的类器官的成熟度较低, 故将其用作生物学模型较为困难。其原因可能是类器官寿命有限, 或缺乏刺激类器官生长的因素。为解决该问题可使用生物反应器增加其对营养物质的利用, 使类器官充分吸收养分生长,

表1 各种类器官的培养方法

培养载体	类器官种类	来源	培养基	参考文献
基质胶	肠道类器官	组织	EGF、R-spondin、Noggin、DMEM/F12	[7]
			70%基质胶、30%牛培养基及Wnt3a条件培养基混合液、R-spondin、Noggin、EGF、CHIR99021、Y27632、SB202190、A83-01	[9]
			DMEM/F12、BSA、青霉素和链霉素、L-谷氨酰胺、N2、B27、HEPES、Wnt3a、R-spondin 1、Noggin、EGF、A83-01、SB202190、15-胃泌素-1、烟酰胺、N-乙酰半胱氨酸、CHIR99021、Y27623、PGE2、醋酸钠	[10]
	胃类器官	组织	DMEM/F12、N2、B27、L-谷氨酰胺、HEPES、青霉素/链霉素、EGF、RA	[12]
			DMEM/F12、生长因子、Y27632、LY2157299、SB202190、庆大霉素	[13-14]
		PSC	RPMI培养基、CHIR99021、激活素A、B27、FGF4、LDN193189、EGF	[15]
	肺类器官	组织	mTeSR1培养基、激活素A、FGF4、CHIR99021、R-spondin、Noggin、EGF	[16]
			含10%KSR的DMEM/F12、CHIR99021、A83-01、Y27632、FGF2、EGF、GlutaMAX、青霉素、链霉素	[17]
		PSC	谷氨酰胺、HEPES缓冲液、抗真菌抗生素、N2、B27、N-乙酰半胱氨酸、人EGF、DMEM/F12培养基、Wnt3a、Noggin、R-spondin、L-WRN	[21]
	肾类器官	组织	MBM、bFGF、EGF、N2、B27、ROCK 抑制剂、青霉素/链霉素	[4]
			激活素A、RPMI 1640 培养基、DMEM/F12、N2、B27、HEPES、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素、Noggin、SB431542、FGF4、CHIR99021	[22]
		PSC	激活素A、BMP4、CHIR99021、RA、FGF9	[24]
脑类器官	PSC	含Y27632、FGF2、CHIR99021、FGF9的基本培养基	[25]	
		MEF-CM、CHIR99021、FGF9、肝素、APEL基础培养基、RA	[26]	
	PSC	Neurobasal培养基、N2、不含维生素A的B27、 β -巯基乙醇、胰岛素、谷氨酰胺DMEM/F12、KSR、FBS、bFGF、N2、GlutaMAX、MEM-NEAA、肝素、神经诱导培养基、脑分化培养基、BDNF	[30]	
肝类器官	组织	DMEM/F12、N2、B27、N-乙酰半胱氨酸、胃泌素、EGF、RSPO1条件培养基、FGF10、烟酰胺、HGF	[33]	
		DMEM/F12、N2、B27、N-乙酰半胱氨酸、胃泌素、EGF、R-spondin、FGF10、烟酰胺、HGF	[34]	
		DMEM/F12、B27、N2、N-乙酰半胱氨酸、胃泌素、EGF、R-spondin、FGF10、烟酰胺、HGF、Noggin、Wnt3a、Y27632、A83-01	[35]	
	PSC	PSC培养基、RPMI 1640、B27、激活素A、bFGF、BMP4、肝细胞培养基、FBS、地塞米松、HGF	[38]	
		DMEM、N2、B27、HEPES、谷氨酸、EGF、R-spondin、Noggin、A83-01、CHIR99021	[41]	
		MEM培养基、青霉素、链霉素、KSR	[48]	
琼脂	睾丸类器官	组织	RPMI 1640基础培养基、青霉素、链霉素、FBS	[46]
	脑类器官	PSC	DMEM/F12、Neurobasal培养基、N2、B27、 β -巯基乙醇、胰岛素、谷氨酰胺、MEM-NEAA、青-链霉素、CHIR99021	[31]
芯片	肾类器官	PSC	RPMI 1640基础培养基、CHIR99021、FGF9、肝素、激活素A	[28]
	肝类器官	PSC	B27、胰岛素、激活素A、RPMI 1640培养基、bFGF、BMP4、FBS、地塞米松、HGF	[37]
	睾丸类器官	组织	KSR、DMEM、EGF、GDNF、LIF、bFGF	[52]

注：PGE2：前列腺素2；MBM：无血清培养基；MEF-CM：小鼠胚胎成纤维细胞条件培养基；LDN193189；BMPI型受体激酶抑制剂；MEM-NEAA：含非必需氨基酸的最低必需培养基；GlutaMAX：细胞培养添加剂；KSR：敲除血清替代物；GDNF：胶质细胞源性神经营养因子；LIF：白血病抑制因子

并使其培养周期大大延长。其三，类器官中一般无血管，致使氧气和养分供应不足。因此，在类器官

中建立血管组织可加强其对养分和氧气的充分利用，使之更接近体内环境^[28,32]。最重要的是，类器

器官虽与体内器官相似,但与真实器官仍有不同,特别是在各类细胞之间的空间关系和整体功能方面。为了尽可能减少甚至消除这种不同,可使用脱细胞ECM支架进一步模拟细胞在器官中的空间位置。总之,类器官培养方面仍有诸多挑战,新的整合性解决方案还有待提出。

2 家畜类器官研究进展

自类器官技术建立以来,科学家们不仅从小鼠、猴、人等物种的各组织器官中培养出了类器官,还将该技术运用于家畜的相关研究,从牛、猪、羊、马、犬等动物的各个组织中培养出了类器官。

2.1 牛类器官

20世纪80年代,科学家们培养出了牛甲状旁腺类器官,并将其用于研究各种因素对甲状旁腺激素分泌的影响。之后又有研究者利用这一模型研究了胰岛素对其的影响。Ritter等^[55]报道了一种新的培养牛甲状旁腺细胞的系统,此法可保留其对钙的反应性,而单层培养的甲状旁腺细胞则会失去对钙的反应性,说明高级组织结构的培养可以保留部分甲状旁腺的细胞功能。此外,有研究采用青春期前小牛外周和内侧乳腺实质上皮细胞培养出了乳腺类器官^[56]。

近年来,从牛的其他组织细胞衍生的类器官也有报道。Töpfer等^[10]报道了应用于农业生物技术的牛结肠类器官的建立,通过生物打印技术和培养板内冻存技术扩展了结肠类器官培养方法,证实结肠类器官可冻存,且复苏后其生长速度与未冻存的类器官无明显差异,两者的细胞毒敏感性也无明显差异。Crispim等^[57]采用了新的悬浮扩增方案,从牛软骨细胞中快速批量生产了软骨类器官。此法可使大量细胞增殖并保持高活性,能够触发类器官的自组装。形成的类器官由II型胶原、VI型胶原、黏多糖及转录因子Sox9(软骨细胞标记)阳性细胞组成,类似于透明软骨。为了大规模生产软骨组织,他们将这类器官包裹到具有不同黏弹性的海藻酸水凝胶中,基质的黏弹性对类器官软骨的形成有重要影响,类器官会生长并融合在一起,形成新的软骨组织。Faber等^[14]从皱胃组织创建了牛胃上皮类器官,并将其作为体外模型,研究胃肠道线虫感染中的宿主-寄生虫相互作用。他们对来自多种动物的皱胃和回肠组织以及多个传代的类器官进行了RNA-seq,结果表明,在相同条件下培养的皱胃和回肠类器官的转录谱反映了它们的组织来源,且类

器官的转录谱可至少5次连续传代后保持稳定。此外,他们还证实类器官可以成功冻存复苏。最近,Cortez等^[58]从牛睾丸细胞群生成了牛睾丸类器官,该技术可作为评价外源因素对牛精子发生和睾丸发育生理影响的工具。基于前期牛睾丸组织冻存、精原干细胞分离培养等工作,我们正在尝试构建可用于体外精子发生示踪的牛睾丸类器官。

2.2 猪类器官

猪类器官主要涉及甲状腺、肠道、膀胱、胰腺、气道、胆管和肝等。Yang等^[59]建立了微囊化的猪甲状腺细胞类器官用来克服免疫排斥障碍,这是向功能性甲状腺组织工程迈出的重要一步,该系统可作为替代疗法用于甲状腺功能减退研究,以及潜在药物的筛选。此后,猪类器官研究大都集中于肠道,可用来研究营养、营养吸收以及肠-病原微生物的互作。2021年,Hoffmann等^[60]构建了猪空肠类器官,生成了2D上皮单层,获得有种属特异性的肠上皮体外模型,可用于模拟猪肠道的生理和病理特性,其功能活性表现为18d内跨上皮电阻增加、葡萄糖转运和氯化物分泌活跃。同年,Yin等^[61]用仔猪肠类器官研究了铜对肠干细胞活性的影响,发现铜可以促进细胞增殖,提高肠干细胞的活性,改善育肥猪的肠道功能。2022年,Joo等^[11]从猪空肠组织建立了肠类器官,采用不同方法培养出了肠腺基部向外和顶端向外的类器官,并证明猪顶端向外类器官是研究肠道环境的理想模型。Zhang等^[62]培养了猪肠道类器官并在体外长期扩增,其保持了分化为不同类型细胞的潜力,能成功感染猪流行性腹泻病毒和传染性胃肠炎病毒,并支持病毒复制和释放,将其作为猪肠道冠状病毒感染的模型,为研究各种病原体引起的猪肠道感染提供了长期可再生资源。

另外,Melzer等^[63]于2022年建立了猪膀胱类器官,该模型中培养的胰腺前体细胞可向导管和内分泌谱系发育,胰腺导管样类器官能进一步成熟为导管样组织,证明用猪膀胱类器官可以为早期胰腺发育不良和胰腺癌研究提供体外平台,促进胰腺分化和细胞成熟,为早期和晚期癌症发生及药物反应提供环境。Jiang等^[64]建立了来自猪基底上皮细胞的3D和2D气道类器官,猪呼吸道冠状病毒可以感染该类器官并产生明显的干扰素和炎症反应,证明猪气道类器官可以作为该病毒感染的体外模型。Krüger等^[65]从猪ASCs建立了猪胆管细胞类器官,在多次传代中表现出稳定的肝干细胞特征,将其植入脱细胞的猪肝支架后可以分化为肝细胞和胆管细

胞样细胞, 这是在大动物模型中实现全肝组织生物工程的重要一步。因为猪与人在器官大小、生理结构和功能等方面较为相似, 因此该研究有助于人类肝脏疾病的治疗, 使全器官移植成为可能, 为未来缓解器官供体短缺带来了希望。

2.3 羊类器官

相比于牛、猪等家畜, 有关羊类器官研究较少。近几年只有个别研究者构建了羊类器官作为模型进行体外实验。如 Liu 等^[66]培养绵羊胰管类器官, 发现适量铜能促进绵羊胰管类器官的形成和生长, 而铜过量或不足则不利于类器官的自组织和发育; 此外, 他们通过一系列实验证明, 微量元素铜通过激活抗氧化蛋白 1 依赖的 MEK-ERK 通路, 从而促进绵羊胰管类器官的生长。Smith 等^[13]建立了绵羊胃肠道类器官, 这种类器官可在低温保存后复苏, 有利于减少所需组织来源的动物数量, 且绵羊的胃肠道类器官的组织特异性可以通过传代保留, 具有稳定性。上述报道中培养出的胃肠类器官都可以被细菌和寄生虫病原体入侵, 因此可以作为模拟宿主-病原体互作的工具。

2.4 马类器官

马为重要大家畜, 可产肉、产奶、骑乘、竞赛、观赏等。为了提高其生产、运动性能, 治疗相关疾病, 保护野生马种资源, 开展马类器官研究有重要意义。有研究将马肠隐窝 3D 培养, 建立了马的肠类器官, 使马肠的离体研究成为可能, 这为未来马胃肠疾病研究提供了模型^[67]。2020 年, Thompson 等^[68]采用与小鼠和子宫内类器官相似的培养条件, 从家马和野马新鲜/冻存复苏的子宫内类器官培养出了马的子宫内类器官, 表明小鼠、人和马体外形成子宫内类器官的机制是类似的。他们发现来自家养母马的类器官对外源性激素有反应, 但来自普氏野马的类器官对外源性激素无反应。这种体外培养马子宫内类器官的新方法对探究国内外濒危马种的正常生殖生理、病理条件和子宫疾病的潜在治疗方法等都具有重要价值。对于骑乘、竞赛类马匹, 关节类疾病的预防和治疗极为重要。2021 年, Bourdon 等^[69]培养出了马的关节软骨类器官, 以此为模型, 发现 Promerim@30 和 40 两种胶原蛋白有望作为膳食补充剂缓解患马的骨性关节炎并延缓炎症进展。近來有研究者用该模型证明内皮素-1 和缓激肽对骨关节炎的治疗有重要作用, 可以降低骨关节炎的炎症反应^[70]。还有研究者开发出了马输卵管类器官^[71]和乳腺类器官的培养方法^[72], 加深了人们对输卵管

和乳腺结构与功能的理解, 这对于马的生殖繁育研究有重要意义。

2.5 犬类器官

犬既是家畜, 也是人类最忠诚的伴侣动物。为了更好地保护犬、治疗犬的相关疾病, 研究者们在犬类器官方面展开了大量的研究, 其中最广泛深入的是关于肠道类器官的研究。肠干细胞类器官移植后可以在犬体内形成新的黏膜, 这对于促进犬肠类器官移植在临床中应用有实践意义。2019 年, Chandra 等^[73]建立了犬肠道类器官系统, 作为研究犬和人的肠道疾病模型, 可用于毒理学研究、宿主-病原体互作分析及其他转化应用等, 以实现上皮-腔管互作体外研究。2020 年, Ambrosini 等^[74]首次报道了一种优化的方法, 用于从犬结肠类器官中生成完整的犬结肠腺衍生单分子层, 观察显示其结构紧密, 能稳定存在两周, 实现了对上皮-腔管互作的研究。同年, Kramer 等^[75]从犬十二指肠、空肠和结肠组织生成了类器官, 随后在不同培养条件下培养。他们制备的精制培养基能使犬的类器官更接近体内情况, 既能维持干细胞的生长, 又能促进干细胞分化为肠上皮细胞、肠内分泌细胞和杯状细胞。这种精制培养基中培养的犬肠道类器官易处理、可复制、较稳定, 为疾病建模、药物开发、毒性研究和个性化医疗提供了良好体外模型系统。与传统培养基相比, 精制培养基可以更准确地评估遗传和表观遗传对犬肠细胞分化的影响, 使其更接近体内情况。他们指出, 确保犬十二指肠、空肠和结肠的细胞多样性是准确体外建模的基本前提。2022 年, Sahoo 等^[76]研究了脂多糖对炎症性肠病和肠道肥大细胞瘤等胃肠道疾病类器官基因表达和功能的影响, 证明脂多糖在驱动慢性肠道炎症和肠癌变中起重要作用。

在犬的其他类器官研究方面, Nantasanti 等^[35]建立了长期的犬肝类器官, 发现 Wnt 激动剂的使用对犬类器官增殖和分化的抑制具有重要意义, 证明了在常染色体隐性遗传 *COMMD1* 缺陷型犬肝类器官中, 通过慢病毒载体转入 *COMMD1* 基因, 即可恢复其功能, 这可能是未来治疗犬肝脏铜储留等疾病的有效手段。Usui 等从犬尿样中先后生成了前列腺癌类器官^[77]和膀胱癌类器官^[78], 可分别作为研究犬前列腺癌和膀胱癌发病机制和治疗的工具。Wiener 等^[79]构建了犬表皮类器官, 以促进表皮疾病和由表皮屏障受损引起疾病的研究, 是研究犬的表皮结构、功能及其障碍的良好体外模型。在该模

型中,使用分化培养基有助于类器官向正常表皮分化。Jankovic等^[80]从犬滤泡状甲状腺癌制备了类器官,可作为研究碘摄取的体外模型。促甲状腺素受体、碘化钠转运体、碘转运蛋白和甲状腺过氧化物酶是甲状腺滤泡细胞摄取碘所必需的,他们采用免疫组化染色,确证了犬滤泡细胞甲状腺癌衍生类器官和原发肿瘤组织中上述4种分子的表达和分布,为犬甲状腺癌的治疗提供了新的手段。

3 结语和展望

类器官的形成是一个相当复杂的过程,不同动物类器官的培养方法不同,同一动物不同部位类器官的培养也有差异。随着对类器官技术的深入研究,不断有新的培养方法出现,使类器官培养变得更加简便、迅速,同时更接近体内生理状态。为了人与自然和谐发展,动物特别是家畜类器官研究具有广阔应用前景。家畜类器官体外模型的构建,将使人们能够在治疗家畜疾病、节省动物资源、开发新型药物、探究生理机制等方面大展身手,从而节约成本,提高效益。

[参 考 文 献]

- [1] Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 246-54
- [2] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 2014, 345: 1247125
- [3] Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 571-84
- [4] Kim M, Mun H, Sung CO, et al. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun*, 2019, 10: 3991
- [5] Sachs N, Ligt JD, Kopper O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*, 2018, 172: 373-86
- [6] Gao Y, Zhao JL, Gao J, et al. Research and application of intestinal organoids. *Int J Digest Dis*, 2017, 37: 87-91
- [7] Toshiro S, Robert GV, Hugo JS, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459: 262-5
- [8] Basak O, Beumer J, Wiebrands K, et al. Induced quiescence of Lgr5⁺ stem cells in intestinal organoids enables differentiation of hormone-producing enteroendocrine cells. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 177-90
- [9] Derricott H, Luu L, Fong WY, et al. Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell Tissue Res*, 2019, 375: 409-24
- [10] Töpfer E, Pasotti A, Telopoulou A, et al. Bovine colon organoids: from 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening platforms. *Toxicol In Vitro*, 2019, 61: 104606
- [11] Joo SS, Gu BH, Park YJ, et al. Porcine intestinal apical-out organoid model for gut function study. *Animals*, 2022, 12: 372
- [12] Mccracken KW, Cata EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 2014, 516: 400-4
- [13] Smith D, Price DRG, Burrells A, et al. The development of ovine gastric and intestinal organoids for studying ruminant host-pathogen interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 733811
- [14] Faber MN, Smith D, Nisbet AJ, et al. Development of bovine gastric organoids as a novel *in vitro* model to study host-parasite interactions in gastrointestinal nematode infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 904606
- [15] Crespo M, Vilar E, Tsai SY, et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med*, 2017, 23: 878-84
- [16] Xia S, Bozóky Z, Di Paola M, et al. High-throughput functional analysis of CFTR and other apically localized proteins in iPSC-derived human intestinal organoids. *Cells*, 2021, 10: 3419
- [17] Onozato D, Ogawa I, Kida Y, et al. Generation of budding-like intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. *J Pharm Sci*, 2021, 110: 2637-50
- [18] Trisno SL, Philo KE, Mccracken KW, et al. Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate sox2 functions during esophageal specification. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 501-15
- [19] Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells *in vitro*. *Nat Protoc*, 2019, 14: 518-40
- [20] Hild M, Jaffe AB. Production of 3-D airway organoids from primary human airway basal cells and their use in high-throughput screening. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2016, 37: IE.9.1-IE.9.15
- [21] Hai J, Zhang H, Zhou J, et al. Generation of genetically engineered mouse lung organoid models for squamous cell lung cancers allows for the study of combinatorial immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 3431-42
- [22] Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, et al. *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *ELife*, 2015, 4: e05098
- [23] McCauley KB, Hawkins F, Serra M, et al. Efficient derivation of functional human airway epithelium from pluripotent stem cells via temporal regulation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 844-57
- [24] 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
- [25] 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
- [26] Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 2016, 526: 564-8
- [27] 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
- [28] Menéndez AB, Du Z, van den Bosch TPP, et al. Creating a kidney organoid-vasculature interaction model using a novel organ-on-chip system. *Sci Rep*, 2022, 12: 20699
- [29] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501: 373-9
- [30] Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*, 2017, 545: 48-53
- [31] Giandomenico SL, Mierau SB, Gibbons GM, et al. Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat Neurosci*, 2019, 22: 669-79
- [32] Sun XY, Ju XC, Li Y, et al. Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions. *Elife*, 2022, 11: e76707
- [33] Huch M, Dorrell C, Boj SF, et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 2013, 494: 247-50
- [34] Lin Y, Fang ZP, Liu HJ, et al. HGF/R-spondin1 rescues liver dysfunction through the induction of Lgr5⁺ liver stem cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 1175
- [35] Nantasanti S, Spee B, Kruitwagen HS, et al. Disease modeling and gene therapy of copper storage disease in canine hepatic organoids. *Stem Cell Rep*, 2015, 5: 895-907
- [36] Kruitwagen HS, Oosterhoff LA, Vernooij IGWH, et al. Long-term adult feline liver organoid cultures for disease modeling of hepatic steatosis. *Stem Cell Rep*, 2017, 8: 822-30
- [37] Mun SJ, Hong YH, Ahn HS, et al. Long-term expansion of functional human pluripotent stem cell-derived hepatic organoids. *Int J Stem Cells*, 2020, 13: 279-86
- [38] Mun SJ, Ryu JS, Lee MO, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J Hepatol*, 2019, 71: 970-85
- [39] Boretto M, Cox B, Noben M, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development*, 2017, 144: 1775-86
- [40] Turco MY, Gardner L, Hughes J, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 568-77
- [41] Haider S, Gamperl M, Burkard TR, et al. Estrogen signaling drives ciliogenesis in human endometrial organoids. *Endocrinology*, 2019, 160: 2282-97
- [42] Kwong J, Chan FL, Wong KK, et al. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha confers precancerous phenotype in an organoid model of normal human ovarian surface epithelial cells. *Neoplasia*, 2009, 11: 529-41
- [43] Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun*, 2015, 6: 8989
- [44] Löhmußaar K, Oka R, Espejo Valle-Inclan J, et al. Patient-derived organoids model cervical tissue dynamics and viral oncogenesis in cervical cancer. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1380-96
- [45] Abu Elhja M, Lunenfeld E, Schlatt S, et al. Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system. *Asian J Androl*, 2012, 14: 285-93
- [46] Yokonishi T, Sato T, Katagiri K, et al. *In vitro* reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation. *Biol Reprod*, 2001, 89: 415-6
- [47] Alves-Lopes JP, Söder O, Stukenborg JB. Testicular organoid generation by a novel *in vitro* three-layer gradient system. *Biomaterials*, 2017, 130: 76-89
- [48] Stukenborg J, Sder O, Kesson E, et al. Self-organising human gonads generated by a Matrigel-based gradient system. *BMC Biol*, 2021, 19: 1-11
- [49] Topraggaleh TR, Rezazadeh Valojerdi M, Montazeri L, et al. Correction: A testis-derived macroporous 3D scaffold as a platform for the generation of mouse testicular organoids. *Biomater Sci*, 2019, 7: 1422-36
- [50] Edmonds ME, Woodruff TK. Testicular organoid formation is a property of immature somatic cells, which self-assemble and exhibit long-term hormone-responsive endocrine function. *Biofabrication*, 2020, 12: 045002
- [51] Cham TC, Ibtisham F, Fayaz MA, et al. Generation of a highly biomimetic organoid, including vasculature, resembling the native immature testis tissue. *Cells*, 2021, 10: 1696
- [52] Abu Madighem A, Shuchat S, Lunenfeld E, et al. Testis on a chip-a microfluidic three-dimensional culture system for the development of spermatogenesis *in-vitro*. *Biofabrication*, 2022, 14. doi: 10.1088/1758-5090/ac6126
- [53] Pinel L, Cyr DG. Self-renewal and differentiation of rat epididymal basal cells using a novel *in vitro* organoid model. *Biol Reprod*, 2021, 105: 987-1001
- [54] Calderon-Gierszal EL, Prins GS. Directed differentiation of human embryonic stem cells into prostate organoids *in vitro* and its perturbation by low-dose bisphenol A exposure. *PLoS One*, 2015, 10: e0133238
- [55] Ritter CS, Slatopolsky E, Santoro S, et al. Parathyroid cells cultured in collagen matrix retain calcium responsiveness: importance of three-dimensional tissue architecture. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 491-8
- [56] Ellis S, Purup S, Sejrnsen K, et al. Growth and morphogenesis of epithelial cell organoids from peripheral and medial mammary parenchyma of prepubertal heifers. *J Dairy Sci*, 2000, 83: 952-61
- [57] Crispim JF, Ito K. *De novo* neo-hyaline-cartilage from bovine organoids in viscoelastic hydrogels. *Acta Biomater*, 2021, 128: 236-49
- [58] Cortez J, Leiva B, Torres CG, et al. Generation and

- characterization of bovine testicular organoids derived from primary somatic cell populations. *Animals*, 2022, 12: 2283
- [59] Yang Y, Opara EC, Liu Y, et al. Microencapsulation of porcine thyroid cell organoids within a polymer microcapsule construct. *Exp Biol Med*, 2017, 242: 286-96
- [60] Hoffmann P, Schnepel N, Langeheine M, et al. Intestinal organoid-based 2D monolayers mimic physiological and pathophysiological properties of the pig intestine. *PLoS One*, 2021, 16: e0256143
- [61] Yin L, Yang Q, Zhang Y, et al. Dietary copper improves intestinal morphology via modulating intestinal stem cell activity in pigs. *Animals*, 2021, 11: 2513
- [62] Zhang M, Lv L, Cai H, et al. Long-term expansion of porcine intestinal organoids serves as an *in vitro* model for swine enteric coronavirus infection. *Front Microbiol*, 2022, 13: 865336
- [63] Melzer MK, Breunig M, Arnold F, et al. Organoids at the PUB: the porcine urinary bladder serves as a pancreatic niche for advanced cancer modeling. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11: e2102345
- [64] Jiang C, Li L, Xue M, et al. Long-term expanding porcine airway organoids provide insights into the pathogenesis and innate immunity of porcine respiratory coronavirus infection. *J Virol*, 2022, 96: e0073822
- [65] Krüger M, Samsom RA, Oosterhoff LA, et al. High level of polarized engraftment of porcine intrahepatic cholangiocyte organoids in decellularized liver scaffolds. *J Cell Mol Med*, 2022, 26: 4949-58
- [66] Liu M, Yu W, Jin J, et al. Copper promotes sheep pancreatic duct organoid growth by activation of an antioxidant protein 1-dependent MEK-ERK pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318: C806-C816
- [67] Stewart AS, Freund JM, Gonzalez LM. Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Vet J*, 2018, 50: 241-8
- [68] Thompson RE, Johnson AK, Dini P, et al. Hormone-responsive organoids from domestic mare and endangered Przewalski's horse endometrium. *Reproduction*, 2020, 160: 819-31
- [69] Bourdon B, Contentin R, Cassé F, et al. Marine collagen hydrolysates downregulate the synthesis of pro-catabolic and pro-inflammatory markers of osteoarthritis and favor collagen production and metabolic activity in equine articular chondrocyte organoids. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 580
- [70] Cullier A, Cassé F, Manivong S, et al. Functionalized nanogels with endothelin-1 and bradykinin receptor antagonist peptides decrease inflammatory and cartilage degradation markers of osteoarthritis in a horse organoid model of cartilage. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 8949
- [71] Thompson RE, Meyers MA, Veeramachaneni DNR, et al. Equine oviductal organoid generation and cryopreservation. *Methods Protoc*, 2022, 5: 51
- [72] Bartlett AP, Harman RM, Weiss JR, et al. Establishment and characterization of equine mammary organoids using a method translatable to other non-traditional model species. *Development*, 2022, 149: dev200412
- [73] Chandra L, Borcherding DC, Kingsbury D, et al. Derivation of adult canine intestinal organoids for translational research in gastroenterology. *BMC Biol*, 2019, 17: 33
- [74] Ambrosini YM, Park Y, Jergens AE, et al. Recapitulation of the accessible interface of biopsy-derived canine intestinal organoids to study epithelial-luminal interactions. *PLoS One*, 2020, 15: e0231423
- [75] Kramer N, Pratscher B, Meneses AMC, et al. Generation of differentiating and long-living intestinal organoids reflecting the cellular diversity of canine intestine. *Cells*, 2020, 9: 822
- [76] Sahoo DK, Borcherding DC, Chandra L, et al. Differential transcriptomic profiles following stimulation with lipopolysaccharide in intestinal organoids from dogs with inflammatory bowel disease and intestinal mast cell tumor. *Cancers*, 2022, 14: 3525
- [77] Usui T, Sakurai M, Nishikawa S, et al. Establishment of a dog primary prostate cancer organoid using the urine cancer stem cells. *Cancer Sci*, 2017, 108: 2383-92
- [78] Elbadawy M, Usui T, Mori T, et al. Establishment of a novel experimental model for muscle-invasive bladder cancer using a dog bladder cancer organoid culture. *Cancer Sci*, 2019, 110: 2806-21
- [79] Wiener DJ, Studer IC, Brunner MAT, et al. Characterization of canine epidermal organoid cultures by immunohistochemical analysis and quantitative PCR. *Vet Dermatol*, 2021, 32: 179-e44
- [80] Jankovic J, Dettwiler M, Fernández MG, et al. Validation of immunohistochemistry for canine proteins involved in thyroid iodine uptake and their expression in canine follicular cell thyroid carcinomas (FTCs) and FTC-derived organoids. *Vet Pathol*, 2021, 58: 1172-80