

孙珂,王婷,李静颐,等. 血管化类器官的构建思路与技术挑战 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 126–133.

Sun K, Wang T, Li JY, et al. Ideas and technical challenges of vascularized organoid construction [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 126–133.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.017

血管化类器官的构建思路与技术挑战

孙 珂,王 婷,李静颐,李红梅*

(北京中医药大学生命科学院,北京 100029)

【摘要】 类器官因其可在体外最大化模拟人体组织器官的结构和功能,成为近年来新药研发、病理毒理研究和机理探索的优选模型载体。随着再生医学技术的发展和类器官相关研究的逐步深入,缺乏血管化微环境的类器官在培养后期受限于氧气、营养物质的缺失,出现细胞凋亡甚至组织坏死,难以长期维持结构和功能,成为类器官进一步推广应用的关键桎梏。本文围绕上述问题,从血管的形成以及目前血管化类器官的体外构建体系进行综述,凝练血管化类器官培养中存在的核心问题,以期对血管化类器官的研究与应用提供新视角。

【关键词】 血管化类器官;干细胞;内皮细胞;体外维持;功能模拟

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0126-08

Ideas and technical challenges of vascularized organoid construction

SUN Ke, WANG Ting, LI Jingyi, LI Hongmei*

(School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Organoids have become the preferred model for new drug development, pathological and toxicological research, and mechanistic exploration in recent years because of their ability to maximally simulate the structure and function of human tissues and organs *in vitro*. With the development of regenerative medicine technology and the gradual advancement of organoid research, organoids lacking a vascularized microenvironment suffer from apoptosis and even tissue necrosis in the later stage of culture because of the lack of oxygen and nutrients, making it difficult to maintain the structure and function of the organoid in the long term. This has become a major obstacle for further application in the clinic. By focusing on the above issues, this review summarizes the formation of blood vessels and the current construction system of vascularized organoids *in vitro*, and condenses the core problems in the culture of vascularized organoids to provide new perspectives for future research and applications.

【Keywords】 vascularized organoids; stem cells; endothelial cells; *in vitro* maintenance; functional simulation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

类器官是指由干细胞或器官祖细胞诱导分化并经体外 3D 环境培养的细胞簇^[1]。与传统的细胞培养相比,类器官能够自我更新和自组织,包含多种类型的器官特异性细胞,具备主要组织或器官的

三维结构与生理功能,因此在长期扩增的同时也能保持稳定的基因和表型特征^[2-3],在发育生物学、疾病建模、药物研发和再生医学等研究中有广泛的应用前景。然而大部分的类器官缺乏血管网络的

【基金项目】北京市科学技术委员会干细胞与再生医学研究专项(Z191100001519006);国家自然科学基金青年科学基金项目(81903955);中华中医药学会“青年人才托举工程”(2019-QNRC2-C02)。

【作者简介】孙珂(1995—),女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合基础。E-mail:xxxsuke@163.com

【通信作者】李红梅(1989—),女,博士,助理研究员,研究方向:中医再生医学。E-mail:lhme67891029@126.com

支持,严重限制了其形态大小和发育状态^[4],在这样培养条件下构建的类器官无法完全模拟人体内真实的组织器官,而目前仅有少量培养成功的血管化类器官,因此类器官的血管化仍是该领域亟待解决的重要问题之一。以此作为切入点,本文总结了现有的体外构建血管化类器官的技术体系,并系统论述了血管化在类器官中的作用,以期类器官的科学研究和临床应用提供新思路。

1 血管发生与血管生成

血管是由内膜、中膜和外膜三层结构组成,内膜主要由血管内皮细胞构成,外被平滑肌细胞和最外层的成纤维细胞、疏松结缔组织等包围,既维持了结构的稳定性,又能够调节血管的直径以适应血流的变化,是哺乳动物体内最重要和最复杂的器官之一。作为胚胎发育过程中形成的第一个功能性器官,血管形成的多功能运输网络,在组织氧合、新陈代谢和免疫监视等过程中发挥着关键作用,有助于组织器官的发育并促进其再生,以维持生命体的生长和活力^[5]。内皮细胞是构建血管的“基石”,广泛参与到血管网络的生成中,主要包括血管发生和血管生成两个过程。血管发生是血管祖细胞或内皮母细胞经历激活、增殖、迁移、排列、管状形成、分支,聚集形成毛细血管丛的过程。该过程主要活跃在胚胎发生的第一阶段。而血管生成是现有血管形成新的毛细血管的过程,包括血管内皮细胞的激活、增殖、迁移等,在胚胎发育的后期和成年阶段占主导地位,同时伴随多种促血管生成因子、抑血管生成因子、缺氧等的刺激、多种酶的分泌,水解重构基质,最终形成丰富的管腔结构^[4,6-7],确保胚胎的存活和发育。Lammer 等^[8]将胚胎小鼠的内胚层分离,并与不同的组织共培养,结果表明只有主动脉内皮细胞的存在才能够增强胰岛素的产生。Matsumoto 等^[9]的研究显示在新生肝细胞旁有内皮细胞的标志物存在,并且促进了肝窦毛细血管和肝芽的迁移和生长,证实了内皮细胞可促进新生血管和器官的发生,尤其在器官发生早期阶段至关重要。同样,在大脑皮层的发育中,脑部微血管内皮细胞有利于祖细胞分化为神经元,并且能够合成细胞外基质以调节神经元的迁移和血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的建立,参与胚胎和神经干细胞的维持和更新^[10-11]。因此,内皮细胞和新生器官之间的这种紧密联系也表明了其在组织和器官的成

熟和图案化中起着关键性作用。

2 3D 类器官与血管化

与传统的动物模型和 2D 细胞培养相比,自体干细胞分化的 3D 类器官更符合伦理要求,能够反映细胞与细胞、基质间的相互作用关系,可较为精准地模拟出人体复杂的生理病理过程^[12],直至今日,已有诸如小肠、脑、肝、胰岛、肾、视网膜等组织的类器官构建成功,但其研究也主要集中于疾病模型的构建。然而,目前体外开发的类器官由于缺少血液循环,营养和氧气难以到达核心部位,代谢废物持续增加,在培养后期引起广泛的细胞死亡和过早的细胞分化,其发育阶段和功能也类似于胚胎或胎儿器官而不是成人器官,缺少相关的发育信号^[4,13-15],形态大小和成熟度严重影响了类器官的研究与应用。为了克服这一限制,一些研究者将类器官移植到免疫缺陷的小鼠体内,发现移植后的类器官中有宿主来源的血液灌注,并且无论是类器官的大小、成熟度还是存活时间都有了极大的改善^[16-18],可见类器官的血管化可能是解决类器官中氧气和营养分布的关键,类器官中的血管系统能通过旁分泌信号传导促进类器官的成熟,但目前体外血管化类器官构建仍存在不小的技术难度,当下不断涌现的人工构建血管化相关研究(见表 1)为实现类器官内血管生成提供了坚实的前期基础。

2.1 脑类器官的血管化研究

人脑是生物体中结构最复杂、功能最完善的器官之一,是中枢神经系统的主要部分,脊椎动物的中枢神经系统和血管系统发育是同步进行的,发育中的中枢神经系统不产生血管祖细胞,而未血管化的脑类器官在移植宿主的体内无法存活,因此血管化对于营养、氧气的供应及神经元的健康发育尤为重要^[32-33]。目前有许多学者尝试构建血管化的人脑类器官,Pham 等^[34]将同一患者来源的人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)衍生的血管内皮细胞与脑类器官共培养,移植到免疫缺陷小鼠体内的当天,发现在类器官周围有内皮细胞标志物 CD31 的存在,随着脑类器官在体内进一步发育成熟,荧光染色结果显示在类器官周围有连续性内生化血管网络结构的形成,并有新的血管向类器官核心部位渗透,为脑类器官血管化研究提供了产生内源性血管化全脑类器官的新方案。Shi 等^[15]在体外通过将人胚胎干细胞(human

embryonic stem cells, hESCs) 或 hiPSCs 和人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 共培养, 在一定程度上诱导 HUVECs 向脑微血管内皮细胞分化, 并且形成一个发育良好的网状或管状血管系统, 建立的新的血管化脑类器官可在体外长时间培养 (超过 200 d), 移植后的脑类器官中血管网络可和宿主的血管相连接形成新的功

能性血管网络。随着类器官技术的提高和 3D 类血管的构建成功, 除了与内皮细胞的共培养, 3D 类血管与其他组织的类器官共培养也逐渐引起人们的关注。Ahn 等^[19]将 hiPSCs 诱导分化而成的 3D 类血管和脑皮质类器官共培养, 通过 5% 胎牛血清的诱导, 第 13 天形成的脑类器官表面表达 CD31, 有典型的血管样结构和神经样网络存在, 并且表达 BBB

表 1 现有血管化类器官的制备方案对比

Table 1 Comparison of existing solutions for the preparation of vascularised organoids

类器官分类 Organoid classification	现有的血管化制备方案 Existing vascularization preparation schemes	不足 Deficiency	解决方案 Solution
脑 Brain	(1) 与不同来源的内皮细胞共培养 ^[15] (1) Co-culture with endothelial cells of different sources		
	(2) 与 3D 类血管共培养 ^[19] (2) Co-culture with 3D blood vessel organoids		
	(3) 通过内源性因子促进类器官中血管样结构的分化 ^[20] (3) Promoting the differentiation of vascular-like structures in organoids through endogenous factors		
	(4) 在低黏附的条件下, 人脑内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞自组织形成 BBB ^[21] (4) Self-organization of BBB formation by human brain endothelial cells, pericytes and astrocytes under low-adhesion conditions		
心脏 Heart	(1) 将心肌细胞、内皮细胞和心脏成纤维细胞按照一定比例自组织而成 ^[22] (1) Self-organization of cardiomyocytes, endothelial cells and cardiac fibroblasts in certain proportions	(1) 类器官制备缺乏标准化、程序化方案, 可重复性、稳定性低, 只能作为短期研究; (1) Due to the lack of standardized and programmed protocols for organoid preparation, the reproducibility and stability of organoids are low, which can only be used as short-term research;	通过结合新型 3D 生物打印技术, 体外构建外循环系统, 与类器官内部生成的血管实现端口吻合, 通过 AI 自动化装备实现内外循环和代谢的智能化、可视化调控, 有望开发出具有功能性血管网络、发育成熟的血管化类器官。By combining the new 3D bioprinting technology, the external circulation system is constructed <i>in vitro</i> , the ports are anastomosed with the blood vessels generated inside the organoid, and the internal and external circulation and metabolism are intelligently and visually regulated by AI automation equipment, which is expected to develop a vascularised organoid with a functional vascular network and mature development.
	(2) 在细胞外基质和 FGF 信号的诱导下, 自组织而成 ^[23] (2) Self-organization in response to induction of extracellular matrix and FGF signalling	(2) 缺乏动态的灌注过程, 难以充分模拟真实的血管; (2) Because of the lack of dynamic perfusion process, it is difficult to fully simulate the real blood vessels;	
	(3) CSCs 构建球体 ^[24] (3) Sphere construction from CSCs	(3) 不同胚层衍生的 3D 类血管和其他类器官的融合仍有一定难度; (3) It is still difficult to integrate 3D vascular organoids with other organoids;	
	(4) 3D 打印构建血管网络, 与心脏类器官共培养 ^[25] (4) 3D-printed constructed vascular network co-cultured with cardiac organoids	(4) 血管结构的尺寸和密度与体内的血管结构相差过大。 (4) Size and density of blood vessel are too different from that <i>in vivo</i> .	
肝 Liver	(1) 与不同来源的内皮细胞共培养 ^[26] (1) Co-culture with endothelial cells of different sources		
	(2) 微流控技术模拟血管 ^[27] (2) Microfluidics simulation of blood vessels		
肾 Kidney	(1) 调节相关信号传导, 调控内源性因子, 诱导血管化类器官的生成 ^[28] (1) Inducing the production of vascularized organoids by modulating relevant signaling and regulating endogenous factors		
	(2) 细胞外基质包裹的发育中的肾类器官置于可灌注的微流控芯片中 ^[29] (2) Extracellular matrix-encapsulated developing kidney organoids in a perfusable microfluidic chip		
肠 Intesine	培养体系中添加诱导和维持血管的生长因子 ^[30] Addition of growth factors to the culture system to induce and maintain blood vessels		
血管 Blood vessel	iPSCs 诱导分化为血管内皮细胞, 随后在 3D 环境中继续培养 ^[19, 31] iPSCs-induced endothelial cells cultured in 3D environment		

的典型标志物,在体外可维持 50 d。Sun 等^[35]同时将 hESCs 诱导分化为 3D 类血管和脑类器官,并且在 3D 类血管中加入特定神经营养因子,使其具有脑血管的特征,随后将二者共培养,40 d 后发现类器官中形成完整的血管组织,与神经组织紧密连接并形成 BBB 结构。

除了以上方案,部分研究者在不依赖外源性细胞的情况下构建血管化脑类器官。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管发育的关键细胞外因子,可促进 ESCs 向内皮细胞分化并产生管状结构的组织,同时还能够培养神经元的神经突起生长和存活,引导发育中大脑的神经元迁移^[36-37]。Ham 等^[38]在类器官的培养中添加 VEGF,结果表明 VEGF 在不减少胚胎神经元的情况下增强了血管内皮细胞的分化,成功构建出具有开放性血管结构的大脑类器官,测序数据也验证了该结果。人 ETS 变体 2(human ETS variant 2, hETV2)转录因子与人血管内皮细胞的形成高度相关,Cakir 等^[20]设计了一种表达 hETV2 的人类胚胎干细胞,诱导该细胞分化成为带血管蒂的人皮层脑类器官,并表达紧密连接蛋白和营养转运蛋白、跨内皮细胞电阻表达增加等 BBB 的特征。

BBB 主要由连接的内皮细胞与紧密连接蛋白构成,是大脑和血液循环之间的一种高度选择性和动态的亲脂屏障,维持着中枢神经系统的稳态。不少学者也通过培养 BBB 类器官来满足对其的研究。Hatherell 等^[39]通过使用 Trans-well 系统来模拟 BBB,内皮细胞生长在顶膜上,星形胶质细胞加入基底膜形成共培养,然后将周细胞加入培养板中,形成三层培养,同时在培养基中补充人源血清,成功构建 BBB 三维体外模型。Bergmann 等^[21]和张雷^[40]采用类似的培养方案,将人脑内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞在低黏附的调节下共培养,可在 2~3 d 内使其自组装成类似 BBB 的球体,并且可具有紧密连接蛋白、转运蛋白和药物代谢等 BBB 的典型功能。

2.2 心脏类器官的血管化研究

心脏是一个中空的器官,主要由 4 个腔、4 个瓣膜以及 5 根大血管构成,自身的血液供应由两条冠状动脉保证,同时心脏也是多细胞器官,主要包括心肌细胞、心脏成纤维细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞,共同协作以实现功能的正常发挥^[41]。心脏类器官的研究进展缓慢,也与其结构的复杂性相

关。(1)Filippo Buono 等^[22]首次采用三培养的方案,即将不同来源的心肌细胞、人心脏微血管内皮细胞和人心脏成纤维细胞在单细胞悬浮液中按照 3:5:2 的生理细胞比例构建心脏类器官,在培养的第 21 天观察到有紧凑且轮廓分明的球形结构形成,呈现出较为明显的收缩活性,并且可根据人类心脏的不同发育阶段对具体的培养方案进行调整。该方案操作简便,构建的心脏类器官具有高收缩性,但就结构而言,与体内的心脏仍有较大的差异。(2)鉴于成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, Fgf)4 和包含层粘连蛋白的细胞外基质在器官发生和心脏发育中的重要作用, Lee 等^[23]将来自小鼠 ESCs 的拟胚体培养在含有 Fgf4 培养基的凝胶化层粘连蛋白—内毒素复合物包被的室载玻片上,培养 10 d 后可观察到具有多个腔室结构的心脏类器官形成,伴有明显的收缩行为,并表达胚胎心脏的相关基因和结构。(3)Han 等^[24]将不同密度的心脏干细胞(cardiac stem cells, CSCs)播种在超低附着多孔板中,培养 3 d 后,与 CSCs 相比,形成的 CSCs 球体具备更强的分泌功能和心肌细胞分化能力以及更高的心肌细胞相关标志物的表达,将 3D 球体注射到大鼠的缺血心肌中,发现缺血的心肌中有明显的新生血管生成,可促进心肌修复。

2.3 肝类器官的血管化研究

肝是人体最大的实质性脏器,由几种不同胚胎起源的细胞类型组成,包括肝细胞、胆道上皮细胞(胆管细胞)、星状细胞、Kupffer 细胞和肝窦内皮细胞,共同执行营养素和药物代谢、循环血量和免疫系统调控、生长信号通路的内分泌控制、脂质和胆固醇稳态等多重功能来维持机体稳态^[42]。肝类器官的血管化研究大部分是与不同的内皮细胞共培养。2013 年,Takebe 等^[26]在体外将 hiPSCs 诱导形成的肝内胚层细胞与 HUVECs、人骨髓来源的间充质干细胞共培养以自组织形成具有三维球状结构的肝芽,移植到小鼠体内 48 h 后观察到移植的肝芽血管与宿主的血管相互连接,形成的功能性血管网络促进了肝芽的成熟,能够执行分泌蛋白质、储存糖原、药物代谢等肝特异性功能,这也是第一个从多能干细胞中产生功能性人体器官的研究。Pettinato 等^[43]将人脂肪微血管内皮细胞与 hiPSCs 诱导分化的拟胚体按照 1:3 的比例共培养形成的肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, HLCs),与单独 hiPSCs 诱导分化的 HLCs 相比,具备更稳定的肝功

能和更高的肝细胞基因和蛋白,同时 hiPSCs 分化为 HLCs 的能力和效率大大提高,可满足临床大量的需求。肝祖细胞(liver progenitor cells, LPCs)位于胆道上皮内,具有产生肝细胞和胆管细胞的双电位能力,可以长期维持,不会去分化和功能丧失^[44],肝含有高度专业化的肝血窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs),可指导肝发育和再生,Yap 等^[45]改进培养方案,将小鼠 LPCs 与小鼠 LSECs 按照 1:1 的比例共培养,构建的血管化类器官具有肝特有的血管系统,同时包含肝实质细胞和胆管细胞。

2.4 肾类器官的血管化研究

肾通过生成尿液、排泄代谢产物、调节体液及内分泌等功能,维持机体的生理稳态。与其他器官相比,肾是高度血管化的脏器,具有最丰富和最多样化的内皮细胞群体,保障了肾的正常发育和生理功能的正常发挥。在肾发育的早期就有血管祖细胞的存在,因此在肾类器官的培养中有内皮细胞的存在,但缺乏功能性血管网络的形成。鉴于人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)衍生的肾类器官能够自发分泌 VEGF, Low 等^[28]在不使用外源性 VEGFA 的条件下,通过对 WNT 信号传导的动态调节,有效地控制了类器官内近端肾小球与远端肾小管的相对比例,进而调控近端足细胞释放 VEGFA 的水平,诱导 hPSCs 分化为血管化的 3D 类器官,其结果也表明足细胞分泌的 VEGFA 能够将肾发育早期的血管祖细胞催化成为更成熟的内皮细胞,形成常驻的血管网络。

2.5 肠类器官的血管化研究

肠是指从胃幽门至肛门的消化管,哺乳动物的肠包括小肠、大肠和直肠三部分,具有消化、吸收、免疫调节等功能,自 2009 年 Hans Clevers 研究团队首次利用小鼠 LGR5⁺小肠干细胞在体外培养出小肠类器官^[46]以来,肠道类器官模型被广泛应用于肠道相关疾病研究领域,但现有的培养方案并不能完全概括人类天然肠道的复杂性。Holloway 等^[30]在研究中发现 hPSCs 诱导分化的肠道类器官在早期阶段会大量的内源性内皮样细胞,随着时间的推移,其数量反而逐渐减少,为了在长时间内维持并促进内皮细胞的存活,研究者改进现有方案,在培养基中加入表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、VEGF、Fgf2、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)4 等诱导和维持血管的生长因子以诱导 hPSCs 分化形成血管化的小肠类

器官,结果也证实新的培养体系中,内皮细胞也可长期存在。

2.6 3D 类血管与类器官的融合研究

在众多疾病当中,血管的病变会导致组织的缺血缺氧,是其重要并发症之一,同样也能导致患者的死亡。现阶段大部分血管化类器官的构建只是初步分化出一个血管样结构,甚至只是大量 2D 内皮细胞的堆积,尚不能在体内重建完整的血管结构,行使血管的职能,也不能满足循环灌注的需求。基于此,英属哥伦比亚大学 Wimmer 等^[31]先把 iPSCs 诱导分化为血管内皮细胞,随后在 3D 环境中继续培养,使原本没有结构可言的 2D 细胞层形成具有类血管结构的 3D 类血管组织,首次实现了将 iPSCs 成功诱导为 3D 血管。这些类血管包含内皮细胞、周细胞及毛细血管网络,甚至在分子水平上与人类毛细血管相似,并在移植到小鼠体内后发现,这些类血管能够发育成包含毛细血管、静脉和动脉的完整的血管系统,可以充分模拟人类血管的结构与功能,而暴露在疾病环境中时,这些类血管也能够出现与疾病患者的血管相类似的病变特征,这意味着该类血管可模拟正常与病理情况的血管状况,为血管疾病提供了高水平的细胞模型^[31]。

3 基于微流控的血管化类器官技术优化

随着科技的进步和类器官的发展,现有的血管化类器官构建方案的缺陷也逐渐暴露出来,目前血管化的类器官制备方案主要集中于和不同的内皮细胞共培养研究,然而,用于共培养的内皮细胞大部分缺乏与其他体细胞相互作用的能力,难以反映和用于体内内皮细胞与周围细胞的互相作用及相关机制研究;此外,仅凭借单独的内皮细胞,难以形成由多种细胞构成的完整的血管结构,并且缺乏动态的灌注培养,无法模拟体内血流对血管的冲击,反映血流动力学对组织器官的作用。在培养过程中,类器官的形态不等、大小不一,可重复性差,也存在培养成功率较低、成本高昂等问题,给血管化类器官的培养和标准化带来了挑战^[47]。有部分学者在由 iPSCs 诱导分化的心脏类器官中,通过 3D 打印技术将血管网络打印其中,构建出的心脏类器官可实现长时间的灌注,但其收缩力与体内的心脏相比差距过大,还需进一步的技术优化^[25]。

基于此,现有的血管化类器官制备中也有将 3D 类血管与其他类器官共培养,Ahn 等^[19]将 3D 类血

管解离成团块与大脑皮质类器官共培养,发现 3D 类血管产生的血管细胞能够穿透脑类器官,形成神经特异性血管网络,并可长期维持;Sun 等^[35]将 3D 类血管和脑类器官共培养,同样在融合后的组织中发现有类似于 BBB 的结构。但在目前的研究中,3D 类血管仅限于与脑类器官进行共培养,并且尚未进行血液灌注的研究,也难以模拟血管环境,同时所有组织类器官(包括 3D 类血管)的培养过程中,尚未有标准化培养体系,可重复性低;在所有的共培养体系中,从不同胚层衍生的 3D 类血管和其他类器官的融合仍有一定难度,仍需要进一步的探索。而微流控体系能够模拟动态灌流,将微流控技术与 3D 类血管相结合,在有血管结构的基础上,辅以灌注功能,充分模拟真实的血液灌注,为上述问题的解决带来希望。微流控技术是集工程学、生物学、医学等多学科为一体的新型技术,将研究样本通过多重单元技艺集中于整体可控的微米尺寸芯片上,辅以流体的冲刷作用,完成培养和分析全过程,在构建复杂精确的组织器官等领域有着广泛的应用前景^[27]。流体在微流控通道中存在的层流现象,可实现材料、化学环境和细胞在通道中的有序排布。基于微流控技术构建的血管化类器官系统,可满足灌流培养对 endothelial 细胞的作用,促进多种细胞因子的分泌与释放,实现在不同流速下的同时灌流,充分模拟体内的不同类型血管和不同生理、病理条件下血管中的血流关键特征,与实际的器官组织更为接近^[48-49]。

直至今日,已有部分学者进行了类器官与微流控技术相结合的研究:(1)肾类器官中血管的发育在静态培养中受到限制,因此 Homan 等^[29]将被细胞外基质包裹的发育中的肾类器官置于可灌注的微流控芯片上,通过高流体剪切力,逐渐发育成熟,成功构建出具有壁细胞支持的可灌注管腔的肾类器官,与静态对照相比,流动培养的血管化肾类器官具有更多成熟的足细胞和肾小管区室、更高的细胞极性和成体基因表达,强调了流体剪切力是体外肾类器官血管形成的关键因素。(2)为了构建更贴近生理状态的肝模型对中药注射液进行肝毒性评估,朱丽颖等^[27]采用可长期培养并模拟血管内皮剪切力的 HUVECs 来模拟血管,通过微流控技术模拟血液流动的力学微环境,并结合 3D 打印技术构建出的肝微球,成功构建出功能性血管化的人源肝类器官,并且通过该模型为 3 种活血化瘀中药注射剂

提供了更为准确的肝毒性评价,实现药物的高通量筛选和数据处理。(3)杨雅敏等^[49]等基于微流控技术创建出深度为 100 μm 、宽度为 0.079~0.593 mm 的 3D 微血管模型,不仅具备扩张、囊状、曲折、分支不规则、直径不均匀等血管特征,而且将 10% 兔红细胞溶液注入芯片中,结合激光散斑血流成像系统,可观察到溶液的流速分布随着血管的粗细、曲折、密度不同而发生变化,满足多种研究的需求。(4)Ronaldson-Bouchard 等^[50]开发了一种即插即用、只有显微镜载玻片大小的多器官芯片,将成熟的人类心脏、肝、骨骼和皮肤组织通过血管流动和循环免疫细胞相连,在体外再现了相互依赖的器官功能。

4 血管化类器官存在的问题与展望

类器官的血管化一直是再生医学领域研究的热点与难点,尽管近年来已取得巨大的进步,但依然有部分关键问题存在:(1)体外的细胞系如 HUVECs 依然广泛用于血管化研究,HUVECs 易于处理、成本低廉,是血管化建模的首选,但人原代内皮细胞的来源有限,且难以支撑器官的特异性结构,单从制备的角度来说对血管化类器官的机制研究产生了不同程度的限制;(2)虽然可通过微流控等工程技术构建血管化类器官,但在现有的培养方案中,血管结构的尺寸和密度与体内的血管结构相差过大,并且只能作为短期研究,在稳定性和长期性方面仍然缺乏可重复性好的技术方案。基于上述问题,可通过结合新型 3D 生物打印技术,体外构建外循环系统,与类器官内部生成的血管实现端口吻合,通过 AI 自动化装备实现内外循环和代谢的智能化、可视化调控,有望开发出具有功能性血管网络、发育成熟的血管化类器官,助推我国医药研发和产业化进程。

参考文献:

- [1] Simian M, Bissell MJ. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions [J]. J Cell Biol, 2017, 216(1): 31-40.
- [2] 赵冰. 类器官在器官移植领域的应用前景 [J]. 器官移植, 2022, 13(2): 169-175.
- [3] Schutgens F, Clevers H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 211-234.
- [4] Vargas-Valderrama A, Messina A, Mitjavila-Garcia MT, et al. The endothelium, a key actor in organ development and hPSC-

- derived organoid vascularization [J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 67.
- [5] Tuckermann J, Adams RH. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease.
- [6] 孙明明. 妊娠大鼠着床后短暂抑制雌激素对胎盘血管发育的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [7] Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011, 27: 563–584.
- [8] Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels [J]. Science, 2001, 294(5542): 564–567.
- [9] Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, et al. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function [J]. Science, 2001, 294(5542): 559–563.
- [10] Lange C, Turrero Garcia M, Decimo I, et al. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis [J]. EMBO J, 2016, 35(9): 924–941.
- [11] Segarra M, Aburto MR, Cop F, et al. Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system [J]. Science, 2018, 361(6404): eaao2861.
- [12] 苏泽琦, 丁霞. 类器官在中医药研究领域的应用与展望 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 586–589.
- [13] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. Nature, 2013, 501(7467): 373–379.
- [14] Rauth S, Karmakar S, Batra SK. Recent advances in organoid development and applications in disease modeling [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1875(2): 188527.
- [15] Shi Y, Sun L, Wang M, et al. Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development *in vivo* [J]. PLoS Biol, 2020, 18(5): e3000705.
- [16] Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, et al. Erratum: an *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(8): 772.
- [17] van den Berg CW, Ritsma L, Avramut MC, et al. Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney organoids induces neo-vasculogenesis and significant glomerular and tubular maturation *in vivo* [J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(3): 751–765.
- [18] Watson CL, Mahe MM, Múnera J, et al. An *in vivo* model of human small intestine using pluripotent stem cells [J]. Nat Med, 2014, 20(11): 1310–1314.
- [19] Ahn Y, An JH, Yang HJ, et al. Human blood vessel organoids penetrate human cerebral organoids and form a vessel-like system [J]. Cells, 2021, 10(8): 2036.
- [20] Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system [J]. Nat Methods, 2019, 16(11): 1169–1175.
- [21] Bergmann S, Lawler SE, Qu Y, et al. Blood-brain-barrier organoids for investigating the permeability of CNS therapeutics [J]. Nat Protoc, 2018, 13(12): 2827–2843.
- [22] Filippo Buono M, von Boehmer L, Strang J, et al. Human cardiac organoids for modeling genetic cardiomyopathy [J]. Cells, 2020, 9(7): 1733.
- [23] Lee J, Sutani A, Kaneko R, et al. *In vitro* generation of functional murine heart organoids via FGF₄ and extracellular matrix [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4283.
- [24] Han MA, Jeon JH, Shin JY, et al. Intramyocardial delivery of human cardiac stem cell spheroids with enhanced cell engraftment ability and cardiomyogenic potential for myocardial infarct repair [J]. J Control Release, 2021, 336: 499–509.
- [25] Skylar-Scott MA, Uzel SGM, Nam LL, et al. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels [J]. Sci Adv, 2019, 5(9): eaaw2459.
- [26] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. Nature, 2013, 499(7459): 481–484.
- [27] 朱丽颖, 杜宏英, 何宇涵, 等. 基于生物打印 3D 细胞微流控芯片的常用中药注射液肝脏安全性再评价 [J]. 中南药学, 2021, 19(11): 2304–2310.
- [28] 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 [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(3): 373–387.
- [29] Homan KA, Gupta N, Kroll KT, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids *in vitro* [J]. Nat Methods, 2019, 16(3): 255–262.
- [30] Holloway EM, Wu JH, Czerwinski M, et al. Differentiation of human intestinal organoids with endogenous vascular endothelial cells [J]. Dev Cell, 2020, 54(4): 516–528.
- [31] Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger M, et al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy [J]. Nature, 2019, 565(7740): 505–510.
- [32] Paredes I, Himmels P, Ruiz de Almodóvar C. Neurovascular communication during CNS development [J]. Dev Cell, 2018, 45(1): 10–32.
- [33] Bautch VL, James JM. Neurovascular development: the beginning of a beautiful friendship [J]. Cell Adh Migr, 2009, 3(2): 199–204.
- [34] Pham MT, Pollock KM, Rose MD, et al. Generation of human vascularized brain organoids [J]. Neuroreport, 2018, 29(7): 588–593.
- [35] Sun XY, Ju XC, Li Y, et al. Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions [J]. ELife, 2022, 11: e76707.
- [36] Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system [J]. Organogenesis, 2010, 6(2): 107–114.
- [37] Gimond C, Marchetti S, Pagès G. Differentiation of mouse embryonic stem cells into endothelial cells: genetic selection and potential use *in vivo* [J]. Methods Mol Biol, 2006, 330: 303–329.
- [38] Ham O, Jin YB, Kim J, et al. Blood vessel formation in cerebral

- organoids formed from human embryonic stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(1): 84–90.
- [39] Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, et al. Development of a three-dimensional, all-human *in vitro* model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models [J]. *J Neurosci Methods*, 2011, 199(2): 223–229.
- [40] 张雷. 血脑屏障体外微球模型的构建及其在中药神经毒性筛选中的应用 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [41] Doll S, Dreßen M, Geyer PE, et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1469.
- [42] Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(21): R1147–R1151.
- [43] Pettinato G, Lehoux S, Ramanathan R, et al. Generation of fully functional hepatocyte-like organoids from human induced pluripotent stem cells mixed with endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8920.
- [44] Pepe-Mooney BJ, Dill MT, Alemany A, et al. Single-cell analysis of the liver epithelium reveals dynamic heterogeneity and an essential role for YAP in homeostasis and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(1): 23–38.
- [45] Yap KK, Gerrand YW, Dingle AM, et al. Liver sinusoidal endothelial cells promote the differentiation and survival of mouse vascularised hepatobiliary organoids [J]. *Biomaterials*, 2020, 251: 120091.
- [46] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262–265.
- [47] 肖金平, 曹云娣, 李程, 等. 肝脏类器官的研究及应用进展 [J]. *生物技术进展*, 2021, 11(2): 148–154.
- [48] Omori T, Imai Y, Kikuchi K, et al. Hemodynamics in the microcirculation and in microfluidics [J]. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43(1): 238–257.
- [49] 杨雅敏, 李赳韬, 董瑞. 基于微流控血管模型的血流动力学实验教学平台建设 [J]. *实验技术与管理*, 2022, 39(2): 119–123.
- [50] Ronaldson-Bouchard K, Teles D, Yeager K, et al. A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(4): 351–371.

[收稿日期] 2022-06-22

小鼠背侧导水管周围灰质在先天胁迫下逃跑和僵立的不同编码特征

鼠类为了躲避天敌常常表现出逃跑 (flight) 或僵立 (freezing) 的先天防御行为, 该行为的产生与中脑导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG) 有关。目前, 背侧 PAG (dorsal PAG, dPAG) 对这两种防御行为的神经编码机制尚需要进一步研究。

该研究采用模拟天敌迫近的 Looming 和模拟天敌掠过的 sweeping 两种视觉刺激范式诱导 C57BL/6 小鼠先天性防御行为, 并将 4×4 的微电极阵列植入 dPAG 记录小鼠产生两种防御行为的神经信号, 从胞外动作电位 (spike) 和局部场电位 (local field potential, LFP) 中分别提取和分析两种防御行为的神经编码特征。结果表明, dPAG 在 C57 小鼠逃跑和僵立时神经放电模式和编码特征不同; 逃跑行为比僵立行为的时间延迟更短, 逃跑时 dPAG 的 Spike 发放率显著升高, 而僵立行为的则显著下降; 此外, 两种防御行为的 dPAG 神经动作电位放电序列的峰峰间隔 (Inter Spike Interval, ISI) 分布差异主要表现在 2~10 ms 内, 且逃跑行为高于僵立行为。两种防御行为 dPAG 的 LFP 差异主要集中在 theta 频带, 其中逃跑行为 8~10 Hz, 而僵立行为则在 6~8 Hz。同步似然算法构建脑功能网络表明, 逃跑和僵立时 dPAG theta 频带的脑功能网络连接密度显著增强。

综上所述, 该研究揭示了视觉诱导的恐惧情绪在小鼠防御运动行为调制中发挥关键作用。Looming 刺激模拟天敌迫近, 诱发小鼠强烈的恐惧应激产生潜意识快速逃跑行为; 而 Sweeping 刺激模拟天敌掠过, 刺激相对较弱可能诱发僵立行, 揭示了小鼠 dPAG 在先天恐惧范式中诱发逃跑和僵立行为的神经编码机制, 证实了恐惧核团在哺乳动物行为调控中的发挥重要作用。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(6): 491–501; <https://doi.org/10.1002/ame2.12276>)