

肺成体干细胞体外培养模型的研究进展

李童, 杨劲树, 杨卫军

浙江大学 生命科学学院 细胞与发育生物学研究所, 浙江 杭州 310058

李童, 杨劲树, 杨卫军. 肺成体干细胞体外培养模型的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3255-3266.

LI T, YANG JS, YANG WJ. Advances of *in vitro* culture models derived from lung adult stem cells. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3255-3266.

摘 要: 目前, 肺体外培养模型有肺类器官和肺芯片两种主要手段。肺类器官是离体的肺上皮干细胞在体外特定的三维培养环境中生长, 自发形成具有自我更新能力的干细胞簇并成功分化出功能细胞。肺芯片是利用人工活性膜为细胞提供组织分层结构, 模拟微环境和机械力的仿生微流体芯片。由于原有二维培养模式缺乏精确的微结构和功能, 组织体外培养模型作为模拟肺部发育、稳态、损伤和再生机制的研究工具, 为肺部纤维化、癌症等疾病的探索提供了新的手段和可能。本文就肺成体干细胞两种体外培养模型的分类、研发历史、建立方法、实际应用、优缺点等方面进行综述, 期望为器官移植和再生、药物筛选等应用提供参考。

关键词: 肺; 类器官; 器官芯片; 自我更新; 分化

Advances of *in vitro* culture models derived from lung adult stem cells

LI Tong, YANG Jinshu, YANG Weijun

Institute of Cell and Developmental Biology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: Due to the lack of precise microstructure and functions of the two-dimensional culture model, the *in vitro* culture models of lung organoids and lung-on-chips, as two main research tools to mimic lung development, homeostasis, injury, and regeneration, allow further exploration of pulmonary fibrosis, lung cancer, and other diseases. Lung organoid refers to isolated lung epithelial stem cells

Received: January 11, 2022; **Accepted:** March 22, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900603)

Corresponding author: YANG Weijun. E-mail: w_jyang@zju.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900603)

growing in a three-dimensional environment *in vitro* to form mini-clusters of cells that self-renew, self-reorganize, and differentiate into functional cell types. Based on the microfluidic chip technology, lung-on-chips use porous flexible membrane made of poly to provide tissue-layered structures for cells and simulate microenvironment and mechanical forces. We reviewed the classification, research and development history, establishment methods, practical applications, advantages and disadvantages of two main *in vitro* culture models derived from lung adult stem cells, hoping to provide a reference for organ transplantation and regeneration and drug screening.

Keywords: lung; organoid; organ-on-chip; self-renewing; differentiation

肺是哺乳动物最重要的呼吸器官, 具有发育周期较长, 患病后易留下后遗症等特性。随着现代城市环境恶化、遗传病高发、流行病传播, 尤其是当下新型冠状病毒肺炎的肆虐几乎令世界停摆, 呼吸系统疾病越来越影响人们的寿命和生活质量。早期对肺疾病的探索主要来源于动物模型和临床研究, 因成本高昂和道德限制, 亟需开发更有效的原位模拟工具, 加速对肺部的认知和疾病的探索。类器官和器官芯片作为当下最主流的两种体外组织培养方法, 为肺相关科学研究提供了新的可能。本文回顾了近年来对肺类器官和肺芯片的探索、构建和应用, 总结了其发展历程和研究现状, 并对其未来发展进行了展望。

1 呼吸系统和肺部体外培养模型概述

哺乳动物的呼吸系统主要由两个部分组成: 负责气体运输的气道和进行气体交换的肺泡。气道 (airway) 分为气管 (trachea) 和支气管 (bronchi), 共同构成树状分枝结构, 终末细支气管 (terminal bronchioles) 与数百万个肺泡 (alveoli) 相连, 肺泡上遍布大量毛细血管, 能够促进外界环境与血液之间的气体交换^[1]。正常情况下, 肺部是一个细胞更新周期较长、相对较稳定的器官, 但如果呼吸过程中不可避免地吸入有毒气体和致病微生物时, 肺上皮细

胞能够迅速应答损伤, 及时调动干细胞和功能细胞进行修复^[2]。

一直以来, 体外细胞培养是模拟生物发育和研究疾病机制的关键工具, 然而早期二维培养缺乏良好的组织结构, 科学家对改进培养模型有着迫切的需求。类器官 (organoid) 是指细胞在体外悬浮培养条件下, 自发形成具有自我更新能力以及相关功能的细胞团^[3]。肺类器官 (lung organoid) 则是对肺上皮干细胞进行 3D (two-dimensional) 培养, 模拟气管和肺泡结构^[4]。目前常用的 3D 培养基是基质胶 (matrigel), 提取自 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤细胞分泌的细胞外基质, 主要由层粘连蛋白、IV型胶原蛋白组成, 提供类似胞外环境的结构支撑和信号因子^[5]。现有的类器官技术侧重于研究器官发育、稳态和疾病状态下细胞-细胞和细胞-胞外基质的相互作用, 因此在精准医学、再生医学、药物研究等领域具有广泛的应用前景。

然而, 类器官在展现组织-组织相互作用、组织微环境方面的不足, 常常令研究陷入困境, 通过器官芯片 (organ-on-chip) 成功构建针对人体的仿生模型, 在一定程度上弥补了这一缺陷。器官芯片结合显微机械加工技术和细胞生物学技术, 将人体细胞体外接种在连续的微通道上, 微通道通过微阀和微泵改变流速和形

状来模拟人体复杂的生理过程,同时利用聚二甲基硅氧烷多孔柔性膜 (polydimethylsiloxane, PDMS) 产生周期性的机械应力,以此构建组织或相关系统的仿生微流体 3D 细胞芯片^[6]。而肺芯片 (lung-on-chip) 则在 PDMS 膜上接种肺部上皮细胞、血管内皮细胞、肌肉细胞和间质细胞等精准重构肺部功能和微环境特征,利用微通道的外力调控满足对机械力、组织-组织界面和液体流动等现象的模拟,甚至可以展现对病原体和炎症因子的反应,有效地模拟正常和疾病下肺的生理状态,能够弥补类器官在微环境和空间结构上的缺陷,为研究肺部生理功能和建立肺疾病模型提供了不同的实验思路 and 方案^[7-9]。

2 肺成体上皮干细胞类器官

肺内不同上皮干细胞各司其职:(1) 基底

细胞 (basal cells, BCs) 作为主要的干细胞能够补充分泌细胞 (secretory cells, SECs) 和纤毛细胞 (ciliated cells, CCs)^[10]; (2) 分泌细胞的功能是产生黏蛋白和抗菌肽,同时也能够分化成纤毛细胞^[2]; (3) II 肺泡细胞 (alveolar type 2 cell, AT2 cell) 是肺泡上皮中仅有的干细胞,能够分化成 I 型肺泡上皮细胞 (alveolar type 1 cell, AT1 cell)^[11]。现有主要肺类器官均来源于上述干细胞的体外培养 (图 1)。

2.1 基底细胞 (BCs) 来源

基底细胞主要分布于气管近端假复层,约占上皮细胞数量的 30%^[13],与其他上皮细胞、神经元、基底膜和炎症细胞等共同构成上皮-间充质营养单位^[14]。同时,BCs 作为一类具有自我更新和分化能力的干细胞,在苯、二氧化硫、2,3-丁二酮等诱导损伤时能够增殖分化成分泌细胞和纤毛细胞^[15-16]。在分子水平上,BCs

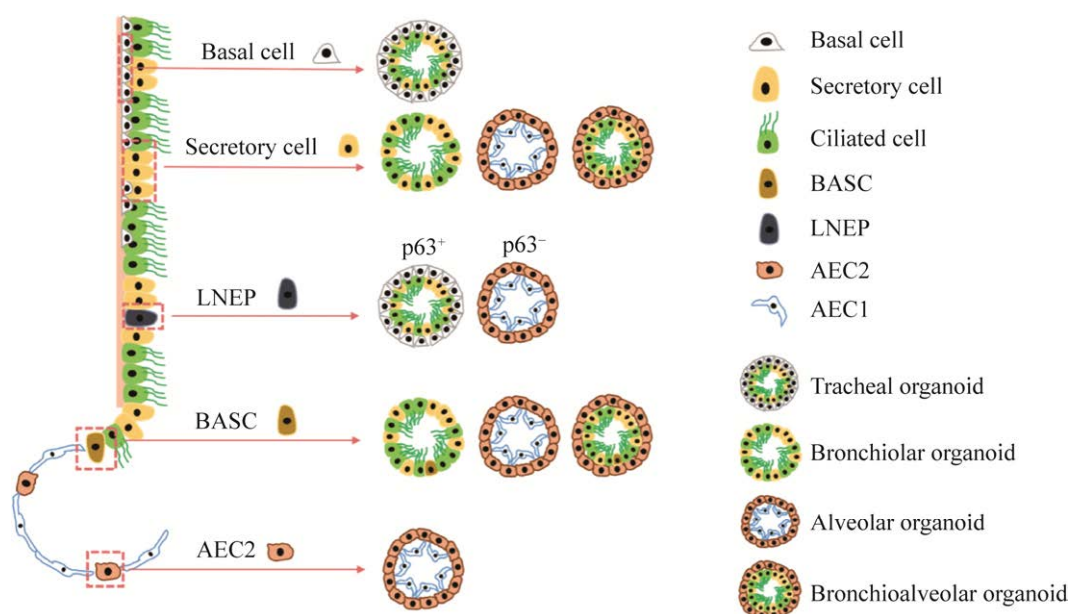


图 1 肺部上皮干细胞类器官示意图^[12]

Figure 1 Schematic of epithelial stem cell-derived organoids. Airway basal cells form tracheal organoids or bronchiolar organoids when cultured^[12]. In distal airways, secretory cells and BASCs generate three distinct colony types^[28,42]. p63⁺ LNEPs form bronchiolar organoids, while p63⁻ LNEPs form alveolar organoids. AEC2s form alveolar organoids^[45-46,48].

特征性表达角蛋白 K5 (cytokeratin 5, K5)、p63 蛋白、神经生长因子受体 (nerve growth factor receptor, NGFR)、整联蛋白 $\alpha 6$ ($\alpha 6$ integrin, Itga6) 等^[17]。

2009 年, 杜克大学医学中心 Brigid Hogan 实验室利用流式细胞术分选小鼠 BCs, 在不贴壁的情况下, 把 BCs 接种在插入式细胞培养器 (transwell inserts) 或多孔盘 (multiwells) 内, 成功构建小鼠 BCs 气管类器官^[18]。目前大多数类器官培养基都将 MTEC/plus (mouse tracheal epithelial cells basic media/plus) 作为基础。MTEC/plus 培养基是 1:1 的比例混合 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 培养基和 Ham's F-12 培养基, 再加入胰岛素、转铁蛋白、霍乱毒素、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、牛垂体提取物、胎牛血清和视黄酸^[19]。早期 Rock 等将 KRT5-GFP⁺ 细胞接种在 1:1 混合 MTEC/plus 和基质胶的插入式培养器上腔, 7 d 后会发育成可见管腔的“气管球” (tracheospheres), 9 d 后分化成假复层上皮, 其外侧为 K14⁺/p63⁺ BCs, 内侧为 K8⁺ 管腔细胞, 随后 K8⁺ 细胞逐渐分化成纤毛细胞^[6]。多个研究^[20-22]发现, 混合不同浓度培养基和基质胶进行培养, BCs 同样具备生成类器官的能力。例如, 利用插入式细胞培养器, 上腔覆盖 5 μ L 100% 基质胶, 细胞接种于含有 70% 低生长因子基质胶的 MTEC/plus 中; 下腔加入含有特定因子的 MTEC/plus, 7 d 后替换为 MTEC/SF (mouse tracheal epithelial cells basic media/serum-free)^[20], 这一培养方法还能够探索特定因子对类器官形成的影响。但是, 高浓度基质胶会降低培养基流动性, 抑制接种细胞的活动和接触。所以 Tata 等将 BCs 与 SECs 按照不同比例混入含有 2% 基质胶的 MTEC/plus, 接种在底部已凝固的基质胶上^[21], 既避免贴壁抑制, 又能够判断两类

细胞之间的相互作用。除了小鼠模型, 基质胶的使用同样适用于人肺细胞, Danahay 等将人 BCs 重悬于混有 5% 低生长因子基质胶的 HBE (human bronchial epithelial) 细胞分化培养基, 在板底预涂 25% 基质胶后, 每孔加入 20 μ L 重悬液孵育, 也成功培育出类器官^[22]。这些研究表明, 基质胶混合不同浓度的特定培养基, 能够作为类器官发育的有效支撑介质和营养成分, 从而为细胞的离体培养模拟体内环境。

通过以上培养方法建立的肺类器官不但可以用于研究干细胞分化的调控机制, 还能构建疾病模型。Rock 等在另一项研究中, 加入 γ -分泌酶抑制剂 dibenzazepine (DBZ), 孵育 7 d 发现形成的类器官仅包含 BCs 而无法形成管腔结构, 验证了 Notch 信号通路对 BCs 分化起重要作用^[23]。而白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 能够通过调控 STAT3 信号通路促进 BCs 分化成 CCs, 同时抑制 SECs 生成^[20]。Tata 证实同时接种 BCs 与 SECs 具备成球能力且不会相互抑制分化^[21]。有研究将冷冻保存的人支气管上皮细胞培育成具有 BCs、CCs、SECs 和杯状细胞 (goblet cells) 的支气管类器官 (human bronchial organoids, hBO), 发现可以很好地用于新型冠状病毒感染模型。经实验发现 BCs 高表达血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 和跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2), 两者为 SARS-CoV-2 主要作用受体, 经实验使用 TMPRSS2 抑制剂 Camostat 能够有效降低感染后的 hBO 实验组病毒数量, 可作为潜在新型冠状病毒治疗药物^[24]。

2.2 分泌细胞 (SECs) 来源

SECs 是一类立方体柱状、非纤毛的多功能细胞, 分为棒状细胞 (club cells) 和杯状细胞^[25]。当肺部吸入有害气体时, 分泌细胞参与

了呋喃、臭氧、萘及其衍生物、一氧化氮等化合物的生物转化,在保护和修复气道中起重要作用^[26-27]。在分子水平上,SECs 特异性表达 Scgb1a1 (secretoglobin1a1) 和 CYP2F2 (cytochrome P450 2F2)^[10]。

初期,为了验证上皮细胞在体外形成克隆的潜力,McQualter 直接分选出 EpCAM⁺上皮细胞与 EpCAM⁺Sca-1⁺间充质细胞混合培养在 50%浓度的基质胶中,因为 SECs 与 BCs 的分化潜能存在一定差异,所以在 DMEM/F-12 的基础上补充了 L-谷氨酰胺、碳酸氢钠、双抗、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠,更有利于 EpCAM⁺上皮细胞形成类器官。同时,研究还发现成纤维生长因子和肝细胞生长因子可以取代间充质细胞,同时研究发现,成纤维细胞生长因子 10 (fibroblast growth factor10, Fgf10) 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, Hgf) 作为已知参与肺发育的细胞因子,可以取代间充质细胞,促进 EpCAM⁺上皮细胞体外增殖分化^[28],为 SECs 体外形成类器官提供了更多培养选择。

在证实了 SECs 的体外形成类器官能力后,为了进一步针对性探究 SECs 与邻近间充质细胞的相互作用,将 Scgb1a1⁺细胞分别与 Lgr6⁺、Lgr5⁺细胞进行共培养,14 d 后获得 3 种类器官:第一种是管腔状支气管类器官 (bronchiolar organoid),由 SECs 和 CCs 构成;第二种是肺泡类器官 (alveolar organoid),包含内层的 I 型肺泡细胞 (AT1 cell) 和外层的 II 型肺泡细胞 (AT2 cell);第三种是肺泡-支气管类器官 (bronchioalveolar organoid),内侧为 SECs,外侧为 AT2 cell^[29]。以上结果表明,Lgr6⁺细胞能够为 BCs 维持干性提供生态位;而分布在气管远端的 Lgr5⁺间充质细胞也具备相似的能力,但更有利于诱导 SECs 分化成肺泡类器官,说

明具有区域特异性的间充质细胞能够定向诱导 SECs,影响 SECs 在形成类器官过程中的干性。

2.3 II 型肺泡细胞 (AT2 cell) 来源

在胚胎期,胎儿通过呼吸运动吸入羊水产生机械力,结合局部生长因子和蛋白协同控制肺泡上皮祖细胞的分化^[30]。肺泡包含两类上皮细胞:一类是 I 型肺泡细胞 (type I cells, AEC1s),约占肺泡面积的 95%,AT1 cell 行使气体交换的功能^[31];第二类为 II 型肺泡细胞,维持肺泡稳态和损伤修复^[32],AT2 cell 特有的细胞器是板层小体,能够产生表面活性蛋白 (pulmonary surfactant proteins),降低表面张力、防止肺泡塌陷^[33]。

由于常用气管类器官培养基无法将小鼠 AT2 cell 单独培养成球,而 PDGFR α ⁺脂肪成纤维细胞在肺泡化过程中起关键作用,所以选择两者进行共培养。当 AT2 cell 与 PDGFR α ⁺细胞以 1:20 的比例混合,孵育于盛有 50%基质胶的插入细胞培养器,仅 4-6 d 就形成球状克隆,14 d 可见外层为 AT2 cell、内层为 AT1 cell 的肺泡球^[34],说明小鼠 AT2 cell 的体外增殖分化需要其他细胞的协助。为了实现无成纤维细胞类器官的培养,进一步验证相互作用机制中的具体调控因子,有研究通过大量测序、qPCR 和相关因子添加培养,验证了 Fgf7/10, Wnt 和 Bmp/Tgf- β 等信号对 AT2 cell-成纤维细胞的相互作用起重要影响,说明使用成纤维细胞的衍生配体和信号抑制剂代替成纤维细胞,能够诱导 AT2 cell 生成无成纤维细胞类器官^[35]。此外,人 II 型肺泡细胞 (human alveolar type 2 cell, hAT2 cell) 与小鼠 AT2 cell 的可塑性不同。在 hAT2 cell 培养过程中添加胚胎肺发育生长相关因子,如 CHIR99021、R-spondin 1、Fgf7、Fgf10、EGF、NOGGIN 和 SB431542,27 d 成功得到肺泡类器官^[36];将 hAT2 cell 与成

体肺间质细胞共培养, 球体在第 7 天出现从肺泡到基底细胞的过渡态细胞类群 (alveolar-basal intermediate cell, ABI), 14 d 发育成基本由 $K5^+$ 细胞构成的类器官^[37]。相较于小鼠 AT2 cell 仅能在体外形成气管类器官而言, hAT2 cell 还能够发育成气管类器官和肺泡类器官, 说明 hAT2 cell 在体外具有更高的分化潜能。

肺泡类器官的应用弥补了肺泡发育机制研究和疾病模型的空缺。为了研究肺上皮细胞与 $PDGFR\alpha^+$ 细胞的相互作用机制, Kazushige 将两类细胞分别接种在培养器上下腔中进行间接共培养, 并未见到类器官生成, 说明成纤维细胞直接作用于上皮细胞^[38]。随后, Yoshihiko 发现在成球培养过程中存在一种从 AT2 cell 向 AT1 cell 转变的过渡型细胞状态 (pre-alveolar type 1 transitional cell state, PATS), 并在小鼠体内得到验证。PATS 也出现在人的损伤肺中, 通过对新型冠状病毒患者肺部上皮单细胞测序分析, 发现该状态细胞在纤维化过程中被诱导增加, 可能为基底样细胞祖细胞, 还表达干扰素抵御病毒^[39,49]。为了继续探究其他间质细胞对 AT2 cell 再生和分化的影响, Joo-Hyeon 将 AT2 cell 与内皮细胞共培养, 也得到肺泡球^[41]。此外, 近年来新型冠状病毒的肆虐, 推动了人源肺泡类器官的发展。Calvin 实验室创造了极性向外的肺类器官, 结合单细胞分析, 打破了目标细胞无法与传染源直接接触的困境。利用单个 hAT2 cell 或 $K5^+$ BCs 培育成 hAT2 cell 在内侧, 棒状细胞和 CCs 暴露在外表面的类器官, 促进这些细胞与 SARS-CoV-2 的直接作用, 证实 hAT2 cell 和棒状细胞为新型冠状病毒的靶向细胞^[42-43]。为了进一步构建更真实的人源性模型, 有研究将近、远端上皮细胞混合培育出含有 AT1 cell、AT2 cell、SECs、CCs、BCs 和棒状细胞的成人肺类器官 (adult lung organoids,

ALOs), 再消化成单细胞接种于插入式培养器上腔, 形成单层类器官。通过与现有模型比较发现, ALOs 更接近新型冠状病毒患者的转录组, 因此有望构建更理想的体外感染模型^[44]。

2.4 其他类型细胞来源

有研究表明气道中存在少量其他类群的干细胞, 然而目前对这些细胞的研究还不是很透彻, 不同命名类群之间可能存在重叠的亚群或尚未找到特定标志物进行标示。尽管这些干细胞数量较少, 但具有更高的增殖分化潜能, 尤其是在损伤后能够迅速应答, 同时往气道和肺泡增殖分化, 帮助机体在最短时间内恢复稳态。

其中, 以 BASCs (bronchioalveolar stem cells) 最受瞩目。BASCs 共表达 *Scgb1a1* 和 *Sftpc*, 在稳态下进行自我更新; 在蔡和博莱霉素诱导损伤后, 分别向气道和肺泡细胞分化^[45]。Joo-Hyeon 等将 BASCs 与内皮细胞共培养, 成功培育出 3 种类器官——支气管类器官、肺泡类器官和支气管-肺泡类器官^[41], 说明除了周边间质细胞会对干细胞有定向诱导作用, 细胞本身的特性也会对其体外分化有影响。此外, 笔者实验室在气管中发现一类 $Setd4^+$ 静息细胞, 在损伤情况下被激活并具备增殖分化能力, 有望在体外实现激活并发育成肺类器官 (未发表)。

远端气管中还存在棒状细胞样谱系阴性上皮祖细胞 (lineage-negative epithelial progenitors, LNEPs) 或者远端气管干细胞 (distal airway stem cells, DASCs), 尽管名称不同, 但主要包含了 $p63^+$ 和 $p63^-$ 两大类^[46-47]。Andrew 在平衡 SABM 基础培养基上接种 LNEPs, 并加入活性炭处理胎牛血清和角质细胞生长因子, 培育出来的类器官受到 H1N1 病毒 (influenza A hemagglutinin1 neuraminidase1 virus, influenza A H1N1 virus) 感染的小鼠支气管肺泡灌洗液刺激, 能够诱导

产生 $K5^{+}$ 基底样细胞, 但难以分化成肺泡细胞, 解释了流感患者肺部不可逆纤维化的原因^[48]。其中, $p63^{+}$ 祖细胞中存在 $H2K1^{high}$ 分泌细胞样的亚群, 该亚群无论有无间充质细胞共培养, 都可以在 3D 培养基中发育成支气管球, 而针对性添加生长因子的无间充质培养更有利于 $H2K1^{high}$ 祖细胞成球^[49]。

综上所述, 肺类器官是一种精准的研究工具, 能够在体外模拟器官结构和变化。现有肺类器官培养方法主要分为两种: 一种是将细胞悬浮于 50% 基质胶中, 培育在插入式细胞培养器上腔^[19], 另一种是把低浓度基质胶细胞悬浮液接种在高浓度基质胶上, 随后细胞会紧贴或沉降入底层培养基中生长^[20-21] (图 2)。人肺类器官的成功培育为肺部疾病研究提供了更真实更高效的工具, 不仅有助于针对性探索细胞分化时细胞命运的决定机制, 更有助于调查疾病

不可逆损伤的关键原因。但类器官的使用仍然存在一定的缺陷: (1) 培养成本过高; (2) 无法模拟肺不同区域的复杂结构和细胞相互作用, 特别是高度血管化结构和肺泡区; (3) 基质胶影响药物浓度, 且难以实现均匀给药或针对细胞层给药; (4) 缺乏液体流动和机械应力。

3 肺部器官芯片研究进展

肺部器官芯片根据肺部结构主要分为肺泡芯片和气道芯片。肺泡芯片主要展现肺泡上皮细胞与大量毛细血管相互交织的空间结构, 能够反映呼吸作用时肺泡收缩扩张的机械运动。而气道芯片则模拟多层次多结构的黏膜功能性单位, 以建立屏障功能。相较于肺类器官, 肺芯片技术既能实现接种细胞的增殖和分化, 又能满足仿生组织中层次结构的重现, 是对肺类器官技术的一种补充和拓展 (图 3)。

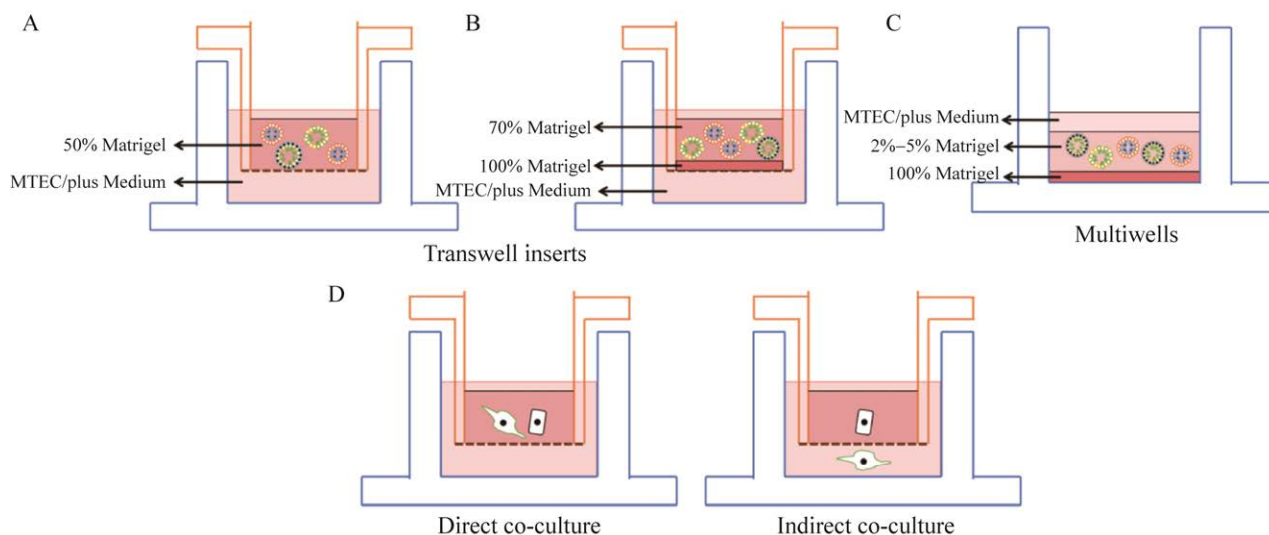
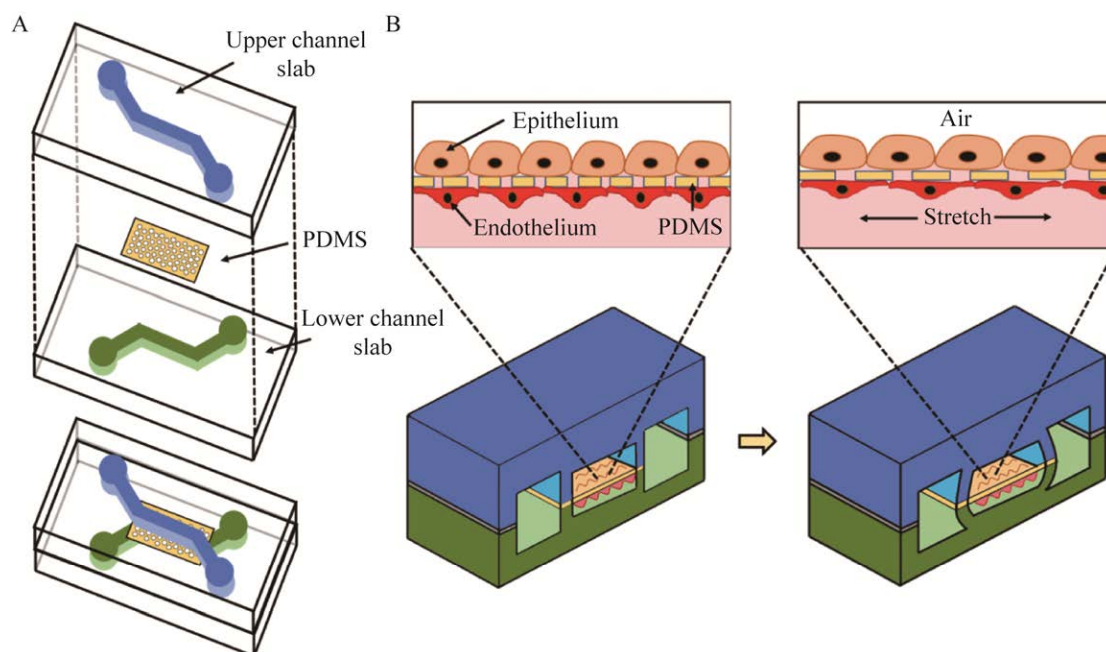


图 2 肺部上皮细胞类器官培养方法

Figure 2 Methods for organoid culture of lung epithelial cells. (A) Sorted cells were suspended in 50% Matrigel and pipetted into Transwell inserts^[18,33]. (B) Cell suspension were mixed at 3:7 ratio with Matrigel, and seeded in inserts coated with 100% Matrigel^[19]. (C) Sorted cells were suspended in 2%–5% Matrigel and plated on multiwells coated with 20%–25% Matrigel^[20]. (D) Experimental scheme of direct and indirect co-culture of epithelial and non-epithelial cells^[34].

图3 肺芯片示意图^[49-51]Figure 3 Schematic of lung-on-chip^[49-51].

3.1 肺泡芯片 (lung alveolus-on-chip)

肺泡芯片是由覆盖细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) (如纤连蛋白或胶原蛋白) 的聚二甲基硅氧烷多孔柔性膜构成, 膜的两侧分别接种人肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞, 培养形成单层结构。肺泡芯片从肺泡上皮细胞侧通入空气, 创造气液界面, 从而精准地模拟肺泡单位的空间结构。此外, 肺泡芯片存在左右侧腔室, 当侧腔室处于真空状态, 会使与上下腔室衔接的薄壁变形, 导致 PDMS 膜和组织层拉伸, 复制了呼吸引起的肺泡-毛细血管界面的机械运动^[50]。早期的肺泡芯片主要用于研究固体机械力 (肺部上皮细胞周期性的拉伸) 和流体机械应力 (液体表面张力), 重现肺泡细胞在空气-血液屏障间的独特压力条件^[51], 通过气压调控对整个结构施加生理相关的机械力, 能够分析这些力量对肺功能的影响, 还能够研究肺泡与免疫细胞和病原体的相互作用、肺泡上皮和内皮屏障功能等。

随后, 为了实现肺泡芯片系统在肺部疾病方向的应用, 许多学者对其进行改进并成功构建新型体外疾病模型。Huh 等利用肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 不仅从毛细血管到肺泡室诱导出由中性粒细胞募集的整个炎症过程, 还通过吸入二氧化硅纳米颗粒模拟肺泡机械损伤, 成功复制了传统细胞培养模型无法实现的仿生微流体系统^[7]。该芯片同样适用于模拟 IL-2 引起的药物毒性肺水肿, 还发现了潜在治疗药物血管生成素-1 和 GSK2193874^[52]。肺血栓作为致死率较高的肺部疾病, 仍然缺乏有效的体外血栓形成模型和药物评估手段, 为此 Jain 等成功利用原代人肺泡芯片重现体内反应, 揭示了脂多糖通过激活肺泡上皮细胞间接刺激血栓的形成, 并证实蛋白酶激活受体-1 拮抗剂对内皮细胞活化和血栓形成具有抑制作用, 为人类肺血栓形成的病理学研究和药物开发提供了新途径^[53]。此外, Marcel 充分利用 PDMS 膜的弹性, 构造出具备

正负压效果的肺泡芯片,表明生理周期性的机械拉伸不利于肺泡上皮损伤愈合,这可能与特发性肺纤维化异常修复有关,揭示了慢性肺病难以治愈的原因之一^[54]。

3.2 气道芯片 (airways-on-chip)

气道芯片的雏形是利用两层 PDMS 膜形成中空的培养基通道,为双侧细胞的附着和生长提供支持,同时该微气道可以模拟液态栓塞形成和破裂时产生的压力波对小气道上皮细胞的严重损伤^[55]。但是,由于气管黏膜作为重要的生理和病理反应的核心,仅依靠简单的双侧细胞结构是不足以模拟关键的功能性营养单位。为此 Sellgren 等通过双层 PDMS 膜将模型分为上层气管上皮细胞腔室、中层成纤维细胞间质室和底层微血管内皮细胞腔室,并且使用原代细胞代替无限细胞系,以更接近体内微系统机制^[56]。

这种双膜集成微流控装置,在实现各类细胞间隔和空间排布的同时,也不影响细胞间的相互作用,已经成功地应用于多种呼吸系统疾病的研究。对于哮喘这类涉及肌肉层介导的支气管收缩和扩张的呼吸道疾病,气道芯片可以模拟患者发病时的肌肉状况,证明了 HA1077 靶向抑制 RhoA 介导的收缩能有效缓解由 IL-13 引起的过度刺激^[57],给靶向药物的筛选提供了新型工具。由于多数疾病患者之间存在较大异质性,为了分析正常人和慢性阻塞性肺病患者之间对吸烟引起损伤的反应差异,对健康人和患者的气道细胞分别取样并构建小气道芯片,随后连接到能够吸入香烟烟雾的仪器上,体外成功观察到两者在分子、细胞和组织水平上的不同反应^[58-59]。肺黏液栓塞常见于肺部感染患者, Song 等在气道芯片上增加水凝胶通道,模仿黏液栓塞,证实流动黏液栓带来的机械应力会引起细胞蛋白骨架受损和炎症反应,进一步导致气管上皮细胞急性损伤。成功建立非小细胞肺癌的人源

体外原位模型,是肿瘤研究的重要突破^[60]。在上皮细胞组织层接种癌症细胞,下层利用微血管内皮细胞模拟肿瘤的丰富血运,重现肿瘤特异性生长、休眠、侵袭过程,以及酪氨酸激酶抑制剂治疗的微环境,发现该抑制剂主要作用于 EGFR 信号通路介导的 MET 蛋白激酶,可能有助于解释癌症患者的高耐药性^[61]。除了以上典型肺部疾病,新型冠状病毒肺炎的横行迫使科学家们加速研发抗病毒药物,而药物筛选就成了最关键的一步。人支气管气道上皮和肺动脉内皮细胞构成的微流控芯片可以评估病毒感染、病毒依赖性和细胞炎症反应,研究表明阿莫地喹对 SARS-CoV-2 具有显著的预防和治疗作用^[62],为快速药物评估提供了高效的新型手段。

肺芯片通过对 PDMS 膜的灵活运用,实现了多层次细胞结构尽可能还原人体气道的形态和肺泡单位的收缩和舒张功能,保证了功能或病理生理学不同的细胞时空相互作用,精准把控气液界面的实验变量,实现更精密复杂的综合器官水平,提供动态应力和微流体等微工程特性,克服传统体外模型的局限性,避免了过度依赖复杂且具有伦理学争议的动物模型。但是肺芯片也存在需要解决的问题:(1)难以实现组织器官修复;(2)需要平衡芯片的生物复杂性和易用性;(3)限制于平面状态的细胞层次结构,尤其是只能局部体现气管或者肺泡组织,尚缺乏同时展现肺部整体的模型。

4 展望

尽管小鼠肺部上皮细胞的研究已经越来越清晰,但与人肺之间存在显著差异。将体外模拟器官研究转移到人类上迫在眉睫,这对理解器官功能和疾病至关重要。因此,建立人源性模型是必要的。如今,类器官的研究已经逐步应用于人肺部疾病建模,成功通过人多能干细

胞和肺成体干细胞建立类器官模拟慢性阻塞性肺疾病、哮喘、囊性纤维化、特发性肺纤维化以及各类流感、新型冠状病毒肺炎等慢性疾病和传染病^[63-65]。致病途径既可以通过直接药物作用或微生物感染正常类器官，也可以通过获取病变活检组织或灌洗液进行类器官培养。而具有机械活性的肺芯片仿生微系统在类器官的基础上满足了气液两相的气道模型，有望提供更全面的预测模型，并在疾病建模、药物测试和安全应用方面提供比动物和临床研究成本更低的替代手段。

针对上述应用，期望从以下两个方面深化肺体外模型特别是人源模型的发展：(1) 两类模型结合基因芯片，多手段交叉运用。例如，肺癌作为发病率和死亡率极高的恶性肿瘤，且患者异质性较大，这一直是癌症医学难以获得突破的主要原因。而肺癌类器官和芯片不仅代表和浓缩了精准个体组织学和病理学特征以及药物敏感性^[66]，最重要是遗传学上保留了主要突变和基因拷贝数变异^[67]，针对个体进行癌症基因筛查和药敏测试，有效降低患者试药次数和提高生存几率。(2) 肺类器官和肺芯片作为肺部模型或工具已经成功应用于多种致病机制和药物筛选的体外研究，然而，如何在体内进行损伤修复的实际应用还有待开发。例如，已有大量研究利用两者开展新型冠状病毒肺炎的病理研究和治疗探索，由于部分重症新型冠状病毒肺炎患者会出现肺部纤维化等严重损伤症状，如果未来能探索并改进个体来源的类器官和肺芯片，进一步通过移植等手段帮助肺部进行结构和功能再生，则为肺部病变提供了新的治愈可能。

REFERENCES

- [1] Tata PR, Rajagopal J. Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development*, 2017, 144(5): 755-766.
- [2] Wang YX, Tang N. The diversity of adult lung epithelial stem cells and their niche in homeostasis and regeneration. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(12): 2045-2059.
- [3] Corró C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-C165.
- [4] Aros CJ, Pantoja CJ, Gomperts BN. Wnt signaling in lung development, regeneration, and disease progression. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 601.
- [5] Ferretti R, Baldassarre A, Billy E, et al. Tumor cell invasion into Matrigel: optimized protocol for RNA extraction. *BioTechniques*, 2021, 70(6): 327-335.
- [6] Wu QR, Liu JF, Wang XH, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomed Eng Online*, 2020, 19(1): 9.
- [7] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-1668.
- [8] Nawroth JC, Barrile R, Conegliano D, et al. Stem cell-based Lung-on-Chips: the best of both worlds? *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 140: 12-32.
- [9] Shrestha J, Razavi Bazaz S, Aboulkheyr Es H, et al. Lung-on-a-chip: the future of respiratory disease models and pharmacological studies. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, 40(2): 213-230.
- [10] 陈镜龙. 肺上皮干细胞研究进展. *国际儿科学杂志*, 2020, 47(4): 239-243.
Chen JL. Advances in lung epithelial stem cells. *Int J Pediatr*, 2020, 47(4): 239-243 (in Chinese).
- [11] Jacob A, Vedaie M, Roberts DA, et al. Derivation of self-renewing lung alveolar epithelial type II cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2019, 14(12): 3303-3332.
- [12] Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, et al. Basal cells as stem cells of the mouse *Trachea* and human airway epithelium. *PNAS*, 2009, 106(31): 12771-12775.
- [13] Van Der Velden JL, Wagner DE, Lahue KG, et al. TGF- β 1-induced deposition of provisional extracellular matrix by tracheal basal cells promotes epithelial-to-mesenchymal transition in a c-Jun NH2-terminal kinase-1-dependent manner. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(6): L984-L997.
- [14] Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, et al. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res*, 2001, 27(5): 401-415.
- [15] Morrissey EE. Basal cells in lung development and

- repair. *Dev Cell*, 2018, 44(6): 653-654.
- [16] McGraw MD, Kim SY, Reed C, et al. Airway basal cell injury after acute diacetyl (2,3-butanedione) vapor exposure. *Toxicol Lett*, 2020, 325: 25-33.
- [17] Bilodeau C, Shojaie S, Goltsis O, et al. TP63 basal cells are indispensable during endoderm differentiation into proximal airway cells on acellular lung scaffolds. *NPJ Regen Med*, 2021, 6(1): 12.
- [18] Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, et al. Basal cells as stem cells of the mouse *Trachea* and human airway epithelium. *PNAS*, 2009, 106(31): 12771-12775.
- [19] You YJ, Richer EJ, Huang T, et al. Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(6): L1315-L1321.
- [20] Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, et al. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *PNAS*, 2014, 111(35): E3641-E3649.
- [21] Tata PR, Mou HM, Pardo-Saganta A, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells *in vivo*. *Nature*, 2013, 503(7475): 218-223.
- [22] Danahay H, Pessotti AD, Coote J, et al. Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell *Metaplasia* in the lung. *Cell Rep*, 2015, 10(2): 239-252.
- [23] Rock JR, Gao X, Xue Y, et al. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 639-648.
- [24] Suzuki T, Ito Y, Sakai Y, et al. Generation of human bronchial organoids for SARS-CoV-2 research. *bioRxiv*, 2020.
- [25] Reynolds SD, Malkinson AM. *Clara* cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1): 1-4.
- [26] Rokicki W, Rokicki M, Wojtacha J, et al. The role and importance of club cells (*Clara* cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*, 2016, 13(1): 26-30.
- [27] Guha A, Deshpande A, Jain A, et al. Uroplakin 3a+ cells are a distinctive population of epithelial progenitors that contribute to airway maintenance and post-injury repair. *Cell Rep*, 2017, 19(2): 246-254.
- [28] McQualter JL, Yuen KR, Williams B, et al. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *PNAS*, 2010, 107(4): 1414-1419.
- [29] Lee JH, Tammela T, Hofree M, et al. Anatomically and functionally distinct lung mesenchymal populations marked by *Lgr5* and *Lgr6*. *Cell*, 2017, 170(6): 1149-1163.e12.
- [30] Li J, Wang Z, Chu QQ, et al. The strength of mechanical forces determines the differentiation of alveolar epithelial cells. *Dev Cell*, 2018, 44(3): 297-312.e5.
- [31] Wang YJ, Tang Z, Huang HW, et al. Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate. *PNAS*, 2018, 115(10): 2407-2412.
- [32] Chen Q, Liu YR. Heterogeneous groups of alveolar type II cells in lung homeostasis and repair. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(6): C991-C996.
- [33] Nabhan AN, Brownfield DG, Harbury PB, et al. Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science*, 2018, 359(6380): 1118-1123.
- [34] Barkauskas CE, Cronic MJ, Rackley CR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3025-3036.
- [35] Shiraishi K, Shichino S, Ueha S, et al. Mesenchymal-epithelial interactome analysis reveals essential factors required for fibroblast-free alveolosphere formation. *iScience*, 2019, 11: 318-333.
- [36] Youk J, Kim T, Evans KV, et al. Three-dimensional human alveolar stem cell culture models reveal infection response to SARS-CoV-2. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(6): 905-919.e10.
- [37] Kathiriyia JJ, Wang CQ, Zhou MQ, et al. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5⁺ basal cells. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 10-23.
- [38] Kobayashi Y, Tata A, Konkimalla A, et al. Persistence of a regeneration-associated, transitional alveolar epithelial cell state in pulmonary fibrosis. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(8): 934-946.
- [39] Delorey TM, Ziegler CGK, Heimberg G, et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature*, 2021, 595(7865): 107-113.
- [40] Verheyden JM, Sun X. A transitional stem cell state in the lung. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1025-1026.
- [41] Co JY, Margalef-Català M, Li XN, et al. Controlling epithelial polarity: a human enteroid model for host-pathogen interactions. *Cell Rep*, 2019, 26(9): 2509-2520.e4.
- [42] Salahudeen AA, Choi SS, Rustagi A, et al. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids. *Nature*, 2020, 588(7839): 670-675.
- [43] Lee JH, Bhang DH, Beede A, et al. Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via

- a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell*, 2014, 156(3): 440-455.
- [44] Tindle C, Fuller M, Fonseca A, et al. Adult stem cell-derived complete lung organoid models emulate lung disease in COVID-19. *eLife*, 2021, 10: e66417.
- [45] Liu QZ, Liu K, Cui GZ, et al. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nat Genet*, 2019, 51(4): 728-738.
- [46] Zuo W, Zhang T, Wu DZ, et al. p63⁺Krt5⁺ distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature*, 2015, 517(7536): 616-620.
- [47] Zacharias WJ, Frank DB, Zepp JA, et al. Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor. *Nature*, 2018, 555(7695): 251-255.
- [48] Vaughan AE, Brumwell AN, Xi Y, et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury. *Nature*, 2015, 517(7536): 621-625.
- [49] Kathiriyai JJ, Brumwell AN, Jackson JR, et al. Distinct airway epithelial stem cells hide among club cells but mobilize to promote alveolar regeneration. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3): 346-358.e4.
- [50] Huh D, Kim HJ, Fraser JP, et al. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2135-2157.
- [51] Douville NJ, Zamankhan P, Tung YC, et al. Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model. *Lab Chip*, 2011, 11(4): 609-619.
- [52] Huh D, Leslie DC, Matthews BD, et al. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med*, 2012, 4(159): 159ra147.
- [53] Jain A, Barrile R, Van Der Meer AD, et al. Primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103(2): 332-340.
- [54] Felder M, Trueeb B, Stucki AO, et al. Impaired wound healing of alveolar lung epithelial cells in a breathing lung-on-a-chip. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 3.
- [55] Huh D, Fujioka H, Tung YC, et al. Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems. *PNAS*, 2007, 104(48): 18886-18891.
- [56] Sellgren KL, Butala EJ, Gilmour BP, et al. A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells. *Lab Chip*, 2014, 14(17): 3349-3358.
- [57] Nesmith AP, Agarwal A, McCain ML, et al. Human airway musculature on a chip: an *in vitro* model of allergic asthmatic bronchoconstriction and bronchodilation. *Lab Chip*, 2014, 14(20): 3925-3936.
- [58] Benam KH, Novak R, Nawroth J, et al. Matched-comparative modeling of normal and diseased human airway responses using a microengineered breathing lung chip. *Cell Syst*, 2016, 3(5): 456-466.e4.
- [59] 魏昕钰, 李明斌, 张灵倩, 等. 用于代谢气体分析的化学改性微流控肺泡芯片. *传感器与微系统*, 2021, 40(6): 20-23.
- Wei XY, Li MX, Zhang LQ, et al. Chemical modified alveolus-on-a-chip microfluidic device for metabolites gas analysis. *Transducer Microsyst Technol*, 2021, 40(6): 20-23 (in Chinese).
- [60] Song JW, Paek J, Park KT, et al. A bioinspired microfluidic model of liquid plug-induced mechanical airway injury. *Biomicrofluidics*, 2018, 12(4): 042211.
- [61] Hassell BA, Goyal G, Lee E, et al. Human organ chip models recapitulate orthotopic lung cancer growth, therapeutic responses, and tumor dormancy *in vitro*. *Cell Rep*, 2017, 21(2): 508-516.
- [62] Si LL, Bai HQ, Rodas M, et al. Human organs-on-chips as tools for repurposing approved drugs as potential influenza and COVID19 therapeutics in viral pandemics. *bioRxiv*, 2020.
- [63] Chen YW, Huang SX, De Carvalho ALRT, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(5): 542-549.
- [64] Strunz M, Simon LM, Ansari M, et al. Alveolar regeneration through a Krt8⁺ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3559.
- [65] Basil MC, Katzen J, Engler AE, et al. The cellular and physiological basis for lung repair and regeneration: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 482-502.
- [66] Shi RS, Radulovich N, Ng C, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(5): 1162-1174.
- [67] Dost AFM, Moye AL, Vedaie M, et al. Organoids model transcriptional hallmarks of oncogenic KRAS activation in lung epithelial progenitor cells. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 663-678.e8.

(本文责编 陈宏宇)