doi:10.11659/jjssx.09E024026

·综 述·

急性呼吸窘迫综合征肺类器官模型的研究进展

尚亚丽[1,2],孔 辉[1],李航宇[2] (1.南京医科大学第一附属医院/江苏省人民医院呼吸与危重症科,江苏 南京 210009;2.东南大学医学院附属南京同仁医院急诊医学科,江苏 南京 211111)

[摘 要] 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是一种常见的危及人类健康的呼吸危重症,其发病机制复杂,为相应的药物开发及治疗方法的探索带来了极大困难。肺类器官技术相较二维细胞培养及实验动物模型能更真实模拟人类肺部微环境,缩短研究周期,在近年来针对肺部疾病的研究中得到了快速发展,并且在ARDS的相关研究中取得了许多成果。本文系统性综述了肺类器官在ARDS研究中的应用,分析其目前的局限性和未来主要的应用方向。

[关键词] 急性呼吸窘迫综合征;肺损伤;呼吸衰竭;肺类器官;干细胞
[中图分类号] R563 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-09-05

Research progress of lung organoids model for acute respiratory distress syndrome

SHANG Ya-li[1,2], KONG Hui[1], LI Hang-yu[2] (1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University/Jiangsu Province Hospital, Nanjing Jiangsu 210009, China; 2. Department of Emergency Medicine, Nanjing Tongren Hospital, School of Medicine of Southeast University, Nanjing Jiangsu 211111, China)

Abstract: Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a common but critical respiratory disease that threatens human health. Its pathogenesis is complex, which brings great difficulties to the development of corresponding drugs and the exploration of treatment methods. Compared with two-dimensional cell culture and animal experiment models, lung organoid technology can realistically simulate the microenvironment of human lung and shorten the research period, which has been rapidly developed in the research of lung diseases in recent years, and obtains many achievements in the related researches of ARDS. This article systematically reviews the application of lung organoids in the study of ARDS and analyzes its current limitations and main application directions in the future.

Keywords: acute respiratory distress syndrome; lung injury; respiratory failure; lung organoids; stem cell

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)是由各种致病因素导致肺部甚至全身炎症反应过度激活的临床综合征,以肺内皮屏障完整性破坏、肺泡清除率下降和弥漫性肺损伤为主要病理特征。该病的发病率、并发症风险及治疗成本较高,是重症监护病房中最常见且严重的临床病症之一[1-2]。ARDS发病机制复杂,涉及多因素、多环节的交互作用。肺类器官作为微型体外模型,较二维的细胞培养具有更高的组织复杂性和异质性,能更真实模拟人类肺部生理环境;同时,其避免了动物实验伦理争议,且研究周期更短,在器官再生、精准医疗以及药物研发等领域展现出显著优势。本文将系统梳理肺类器官在ARDS研究中的最新进展,深入探讨其现存局限性,并对未来应用进行分析,以期为未来肺类器官的应用提供参考。

1 肺类器官细胞来源

类器官是特定器官相关的干细胞在体外三维微环境中增殖分化形成的组织样结构和特定器官的简化版[3]。肺类器官由含有肺干细胞或多能干细胞的原代组织培育而成,具有自我更新和组装的能力,可包含多种细胞类型[4]。肺最大体积维持依赖于肺泡,这是一种由上皮细胞构成的复杂囊状结构,其周围环绕着毛细血管。Molnar等[5]研究证实,成纤维细胞、肺泡上皮细胞、内皮细胞和平滑肌细胞对维持正常肺功能和提供机械支持起着关键作用。

作为微型体外器官模型,肺类器官能够自我增殖并分化成多种功能细胞,高度模拟人体肺的结构和功能特征。目前,用于构建肺类器官的细胞主要包括:人体多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)分化形成的上皮细胞、患者来源的成体干细胞(adult stem cells,ASCs)和商业化的细胞系。同时,这些细胞还会搭配内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等其他细胞类型,更完整地模拟肺组织结构和功能[4]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81870054);江苏省自然科学基金(BK20231585)

[通信作者] 孔 辉,E-mail:konghui@njmu.edu.cn

鉴于患者来源的ASCs获取困难,hPSCs和商业化的细胞系常作为备选细胞,在疾病建模、药物测试和机制研究领域发挥重要作用。hPSCs虽能提供近乎无限的人体细胞来源,但其细胞特性更接近胎儿细胞,而非成体细胞。Huang等[6]通过有序使用针对骨形态发生蛋白、转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)和Wnt信号通路的抑制剂,调控小鼠前肠内胚层的分化,从而实现对hPSCs衍生的肺祖细胞发育过程的精确调控;此外,这些hPSCs衍生的肺祖细胞能在体内外分化成多种肺细胞和气道细胞,验证了hPSCs分化系统的有效性。商业化的细胞系虽然易于获得,但是由于其永生化,可能影响生物模型的生理功能,因此具有一定的局限性。

从肺组织中获得的ASCs具有自我更新能力,能够在一段时间内维持细胞数量稳定,这使其成为构建肺类器官的理想细胞来源。ASCs是存在于肺组织分化细胞中的未完全分化的细胞群,ASCs的多功能性使其能够构建完整且高度复杂的肺类器官,可模拟肺不同区域的结构特征。目前,研究者已成功开发出包含近端和远端肺上皮细胞的ASCs来源肺类器官,如肺泡Ⅰ型上皮细胞(alveolar type Ⅰ cells,AT1)、肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type Ⅱ cells,AT2)、基底细胞、纤毛细胞、杯状细胞和杆状细胞等,并用于2019新型冠状病毒(coronavirus disease 2019,COVID-19)感染机制模型研究[7-9]。然而,其分化潜能仅限于肺组织中存在的细胞谱系。

虽然单一的AT2群体难以完整复刻肺局部微环境,但其能够重现远端肺组织的发育进程,且仅上皮细胞形成的3D球体可在体外维持长达1年,在研究宿主-病原体相互作用和病毒靶向细胞的过程方面具有显著优势[10]。Kanagaki等[11]在基于AT2构建的肺泡类器官中发现了一群表面活性蛋白C细胞,通过单细胞转录组分析发现,这些细胞与原代AT1具有相似的分子特征,且经典Wnt信号通路的抑制可促进AT1的分化。

肺间充质细胞直接参与损伤修复过程中的上皮修复,同时可分化为肺上皮细胞,如杆状细胞、纤毛细胞和杯状细胞。此外,肺间充质细胞可提供拉伸力,分泌细胞外基质(extracellular matrix,ECM)蛋白,其通过上皮间充质相互作用形成的壁龛对维持AT2的分化潜能具有重要作用[12]。弥漫性肺泡损伤是ARDS的一个主要病理特征,因此有研究者利用ASCs建立了具有类似肺泡细胞类型和结构的肺泡类器官模型,并将成纤维细胞与AT2共培养以诱导肺泡类器官中AT2的稳定维持[13]。另外,还有研究通过将胎儿肺成纤维细胞嵌入ECM水凝胶中来构建肺泡类器官,证实了成纤维细胞有利于肺泡类器官的扩张和AT2干性的改善[14]。

肺类器官的血管化对促进类器官的发育和成熟至关重要,内皮细胞可为功能性肺类器官发育提供其所必需的细胞微环境。因此,越来越多的研究尝试将内皮细胞掺入肺类器官中。一项研究将肺泡上皮细胞、肺成纤维细胞和内皮细胞结合产生的肺类器官,命名为人荧光肺类器官,其具有由肺上皮细胞组成的空腔样管腔和分支及可灌注的血管系[15]。另一项研究还发现,共培养支气管上皮细胞、肺成纤维细胞和肺微血管内皮细胞,可以形成具有血管结构的肺类器官[16]。这些成果为肺类器官的功能化构建与应用研究提供了重要的理论依据和技术支撑。

2 肺类器官构建

类器官的结构设计决定其对真实生理病理过程的模拟能力。涉及一种或两种细胞类型的单层培养,已成为高通量药物筛选和机制研究的理想模型。由于肺泡免疫细胞复杂的作用机制以及肺细胞的极性,单层培养系统难以模拟复杂的炎症反应,也无法解释细胞扩散、迁移及相互通讯等原始细胞生物学行为,限制了其在模拟肺部真实生理病理环境中的应用。

COVID-19肺类器官的构建在分析疾病进展和病理机制方面具有显著优势。利用胚胎干细胞和hPSCs,可以通过模拟胎儿肺发育过程的方式生成肺类器官。hPSCs衍生的类器官是通过各种方法将2D细胞转化为3D团簇而形成的,其可通过以下2种方法实现。一种是将未分化的hPSCs分离成拟胚体或部分分化的hPSCs形成聚集体,并进一步分化为特定的胚层,以模拟早期胚胎发育过程中的原肠胚形成过程。另一种是在分化过程中诱导细胞自发聚集成前肠内胚层,如自我构建能够模仿具有完备分化能力的胎儿肺发育过程,使hPSCs能够转化为腹侧-前肠球状体,这些球状体随后可以分化为肺类器官或芽尖祖细胞类器官[17]。

从肺组织活检中获得的ASCs可被解离成单个细胞,并通过细胞分选分离,选择所需的细胞类型。如2021年研究者从肺癌患者深部肺活检组织中分离出ASCs,并使用一种包含表达Wnt3、R-spondin和Noggin的L-WRN细胞的条件培养基,辅以重组生长因子,对分离的ASCs进行培养,成功构建出了肺类器官模型,该模型具有完整的近端和远端气道上皮,随后通过用

严重急性呼吸综合征病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)感染该肺类器官单层,成功建立COVID-19体外肺模型[9]。

肺类器官,尤其是来源于hPSCs的肺类器官,往往表现出比实际器官更低的细胞分化、成熟和功能水平,为了有效发挥呼吸系统的功能,肺类器官还需要搭配周围支持细胞。因此,有研究通过将hPSCs与内皮细胞、间充质细胞和免疫细胞等不同细胞类型共培养获得肺类器官[18]。目前肺类器官的共培养策略主要包括两种:一种是将完全分化的龛细胞与肺上皮细胞共同培养为单个类器官,另一种是将龛细胞与预先形成的肺类器官共培养。

3 肺类器官培养平台

肺类器官的生长和成熟需要复杂且贴近生理条件的培养方法。类器官研究领域的学者已经认识到传统培养系统的局限性,尝试改进类器官培养环境和平台,如鉴定培养基成分,以更精准地模拟类器官生长和发育所需的体内条件。此外,水凝胶和支架等生物材料及气-液界面(air-liquid interface,ALI)系统、微流控芯片等先进培养系统的介入改善了培养环境,可重现天然肺组织及其微环境的复杂性和结构。这些技术革新为研究器官形成、疾病发生发展机制、药物筛选及个性化医疗开发提供了关键研究工具和技术支撑。

3D类器官需借助支持性支架来维持其复杂的结构。从小鼠Engelbreth-Holm-Swarm肉瘤中提取的基质胶被认为是类器官培养的经典材料,但不同批次间的成分与性能差异大,具有潜在安全风险,不利于临床转化,且无法模拟组织特异性微环境。因此,研究者一直在探索用于类器官培养的替代材料[19]。近年来,3D水凝胶技术的突破为类器官培养提供了新方向,天然来源的胶原蛋白、纤维蛋白、海藻酸钠等水凝胶,以及合成聚合物材料已逐步应用于类器官构建,展现出良好的应用潜力[20-22]。

ALI系统有效地模拟了肺部的生理和空间特性,在肺部研究中广泛使用。人体肺部上皮的顶端表面暴露于空气中,而基部表面与黏膜下层接触。ALI系统正是基于这一特性设计,将细胞的基底侧浸没于培养基中,顶端与空气接触,该培养模式尤其适用于肺上皮细胞的培养[23]。ALI系统培养的人气道上皮细胞可以分化为假复层上皮,并存在紧密连接、纤毛和黏液,该培养体系增强了肺上皮的完整性,并促进表面活性物质的分泌,使其成为在肺生物学背景下研究宿主-病原体相互作用的最佳平台[24]。而超过一半的ARDS患者是由严重的感染或肺炎引起[1-2],因此ALI系统为ARDS的研究提供了重要的工具模型。

微流控芯片通过精准模拟血管网络、ALI、机械应变和流体流动等生理微环境,为类器官培养创造高度仿生的微环境。采用微流控技术的肺类器官培养系统有利于肺类器官与培养基、药物或各种因素的连续灌注无缝结合,有效复制流体诱导的剪切应力,并在体内模拟肺的生理功能[25]。Zhu等[26]通过一个由聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)微孔膜分隔的双室模拟肺泡与血管之间的生理状态,可模拟由呼吸引起的机械活动。基于这种芯片系统的类器官模型可揭示ARDS病理机制的关键环节,同时双室中免疫细胞的参与可高度模拟ARDS中肺损伤和修复的关键过程。Zamprogno等[27]开发了一种不同类型的基于肺芯片的类器官,能够通过真空泵驱动膜拉伸的动态运动来模拟人的呼吸运动。该研究还优化了类器官中的基底膜,并在肺芯片系统中测试了一种基于胶原蛋白和弹性蛋白的可拉伸生物可降解膜,这种新型膜的柔韧性和生物相容性优于PDMS微孔膜,为更高级和更接近体内环境的ARDS肺类器官的开发提供了可能性。

4 肺类器官在ARDS中的应用

随着类器官技术的迅速发展,人类对ARDS也有了更加深入的了解。SARS-CoV-2是一种高度可传播和致病性的冠状病毒,是引起COVID-19全球大流行的病原体,其中10%~20%的感染者会进展为危及生命的ARDS[28],严重威胁人类健康。Lamers等[29]和Leibel等[30]通过构建3D肺类器官培养系统,模拟患者的支气管-肺泡结构,证实AT2对SARS-CoV-2易感而非气道上皮细胞,解释了负责换气功能的肺泡区域发生病理改变引起ARDS的机制。Salahudeen等[31]通过构建人远端肺类器官长期培养模型,鉴定出SCGB1A1^{+}细胞群为SARS-CoV-2感染靶细胞。除了可模拟病毒感染致ARDS进程外,肺类器官在探究ARDS相关调控基因以及肺组织损伤和修复方面也具有显著优势。Song等[32]在小鼠体内验证了G蛋白调控信号蛋白6(regulator of G protein signaling 6,RGS6)敲除可加重内毒素诱导的小鼠肺损伤,并通过类器官实验发现RGS6敲除可使AT2干性及自我修复能力受损,类器官形成速度减慢、数量减少以及新结构发育受损,而过表达RGS6可抑制巨噬细胞活性氧及促炎因子产生,减少上皮细胞凋亡,证实了RGS6在ARDS治疗中的潜力。Liberti等[33]在小鼠ARDS模型中发现,转录因

子klf5可抑制AT2增殖及调控AT2分化为AT1,并通过体外类器官实验进一步揭示了转录因子klf5可降低AT2对炎症信号的敏感性并驱动AT2分化为AT1。上述研究均表明,肺类器官可作为ARDS的机制研究和治疗靶点筛选的有效工具。

5 总结与展望

ARDS的发病和进展涉及多个复杂的生物事件,主要集中在内皮和上皮损伤、炎症途径,以及通气策略不当导致的病情恶化。ARDS肺类器官模型作为一种新兴的研究工具,在模拟ARDS的病理生理过程方面展现出巨大潜力。同时,不同来源和不同类型的细胞以及培养平台也为肺类器官在ARDS中的应用提供了更多的可能性。来源于干细胞的多种细胞类型在细胞数量、基因编辑和细胞类型丰度方面具有明显优势,使得模拟ARDS体内复杂生物学过程和寻找治疗靶点成为可能。

目前ARDS类器官研究仍面临一些技术挑战:类器官模型的成熟度有限,通常只能形成类似于胎儿组织而非成人组织,缺乏体内重要的生理过程及血管、淋巴管或神经功能;现有的ARDS动物模型和细胞模型在模拟ARDS的肺部炎症微环境、临床表现、预后、疗效方面与真实ARDS患者存在差异,限制了其应用;类器官模型还存在建模成本高、技术尚未成熟以及自动化技术待完善的问题;在类器官芯片中,精准控制流体条件和生化因子的浓度梯度以模拟体内器官的生理微环境颇具难度;选择何种细胞来源和优化培养条件以维持类器官的稳健生长和功能,亦需要进一步的研究。

对于目前ARDS肺类器官模型存在的问题,可考虑通过利用3D生物打印和生物反应器技术来提高类器官的成熟度和功能模拟能力;利用单细胞转录组学、代谢组学、蛋白组学等多组学技术平台,结合人工智能技术,筛选出相应的肺内细胞免疫指标,帮助构建炎症与免疫精准检测平台;开发新的动物模型和细胞共培养系统,以更真实地模拟ARDS的病理生理过程;优化类器官芯片的设计,提高其在药物筛选和疾病模型研究中的应用价值。尽管存在挑战,随着技术的不断进步和创新,肺类器官技术会有更好的发展,有望为ARDS的防治带来突破性进展。

[参考文献]

[1] 李中士,兰 超,张文华,等. Alb、PCT及NT-proBNP检测与重症肺炎致ARDS患者病情的相关性及预后评估效能[J]. 西南医科大学学报,2023,46(6):509-512. doi:10.3969/j.issn.2096-3351.2023.06.010.

[2] Wick KD, Ware LB, Matthay MA. Acute respiratory distress syndrome [J]. BMJ, 2024, 387: e076612. doi: 10.1136/bmj-2023-076612.

[3] Takebe T, Wells JM. Organoids by design [J]. Science, 2019, 364 (6444): 956-959. doi: 10.1126/science.aaw7567.

[4] Joo H, Min S, Cho SW. Advanced lung organoids for respiratory system and pulmonary disease modeling [J]. J Tissue Eng, 2024, 15: 20417314241232502. doi: 10.1177/20417314241232502.

[5] Molnar TF, Pongracz JE. Tissue engineering and biotechnology in general thoracic surgery [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 37(6): 1402-1410. doi: 10.1016/j.ejcts.2009.12.037.

[6] Huang SXL, Islam MN, O'Neill J, et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(1): 84-91. doi: 10.1038/nbt.2754.

[7] Sun T, Huang Z, Zhang H, et al. TAZ is required for lung alveolar epithelial cell differentiation after injury [J]. JCI Insight, 2019, 5(14): e128674. doi: 10.1172/jci.insight.128674.

[8] Choi J, Park JE, Tsagkogeorga G, et al. Inflammatory signals induce AT2 cell-derived damage-associated transient progenitors that mediate alveolar regeneration [J]. Cell Stem Cell, 2020, 27(3): 366-382. e7. doi: 10.1016/j.stem.2020.06.020.

[9] Tindle C, Fuller M, Fonseca A, et al. Adult stem cell-derived complete lung organoid models emulate lung disease in COVID-19 [J]. Elife, 2021, 10: e66417. doi: 10.7554/eLife.66417.

[10] Jacob A, Vedaie M, Roberts DA, et al. Derivation of self-renewing lung alveolar epithelial type Ⅱ cells from human pluripotent stem cells [J]. Nat Protoc, 2019, 14 (12): 3303-3332. doi: 10.1038/s41596-019-0220-0.

[11] Kanagaki S, Ikeo S, Suezawa T, et al. Directed induction of alveolar type Ⅰ cells derived from pluripotent stem cells via Wnt signaling inhibition [J]. Stem Cells, 2021, 39 (2): 156-169. doi: 10.1002/stem.3302.

[12] 于 同. 间充质干细胞条件培养基通过KGF缓解急性肺损伤及其机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2024.

[13] Leeman KT, Pessina P, Lee JH, et al. Mesenchymal stem cells increase alveolar differentiation in lung progenitor organoid cultures [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6479. doi: 10.1038/s41598-019-42819-1.

[14] Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids [J]. Nat Methods, 2017, 14(11): 1097-1106. doi: 10.1038/nmeth.4448.

[15] Valdoz JC, Franks NA, Cribbs CG, et al. Soluble ECM promotes organotypic formation in lung alveolar model [J]. Biomaterials, 2022, 283: 121464. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121464.

[16] Tan Q, Choi KM, Sicard D, et al. Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling [J]. Biomaterials, 2017, 113: 118-132. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.046.

[17] Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro [J]. Nat Protoc, 2019, 14 (2): 518-540. doi: 10.1038/s41596-018-0104-8.

[18] Purev E, Bahmed K, Kosmider B. Alveolar organoids in lung disease modeling [J]. Biomolecules, 2024, 14(1): 115. doi: 10.3390/biom14010115.

[19] Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel [J]. Nat Rev Mater, 2020, 5(7): 539-551. doi: 10.1038/s41578-020-0199-8.