

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200817001

刘薇, 梅玺丽, 陈雨萌, 等. 3D类器官模型的研究进展及其在化学品毒理学评价中的应用展望[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 32-42

Liu W, Mei X L, Chen Y M, et al. Progress in 3D organoid models and application perspectives in toxicity test of chemicals [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 32-42 (in Chinese)

3D类器官模型的研究进展及其在化学品毒理学评价中的应用展望

刘薇^{1,*}, 梅玺丽¹, 陈雨萌¹, 向哲源¹, 高泽欣¹, 邢立国², 赵慧敏¹, 刘猛¹, 陈景文¹

1. 大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程重点实验室, 大连 116024

2. 中化集团沈阳化工研究院有限公司, 沈阳 110027

收稿日期: 2020-08-17 录用日期: 2021-03-22

摘要: 化学品毒理学评价主要采用2D细胞培养体系和动物实验模型, 但2种模型均存在一定的局限性。2D细胞培养常用特定细胞系, 与体内多细胞组织及其生理功能差异较大。动物实验耗时、昂贵, 并受伦理学限制, 且存在种属差异问题。3D类器官模型可模拟组织器官的复杂结构和功能, 产生细胞间和细胞-基质相互作用, 与体内生理反应更为相似, 因此能更准确地反映毒性效应和机理。类器官模型在化学品毒理学评价领域具有良好的应用前景, 将显著提升毒理学基础研究能力以及对化学品风险评价和管理的支撑作用, 但相关研究尚处于起步阶段。本文从类器官的生理学特性、构建方法及组织类型等方面, 重点讨论了类器官模型在化学品毒理学研究中的适用性, 并提出了存在的挑战和对策。

关键词: 类器官; 毒理学替代法; 体外模型; 高通量测试

文章编号: 1673-5897(2021)4-032-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Progress in 3D Organoid Models and Application Perspectives in Toxicity Test of Chemicals

Liu Wei^{1,*}, Mei Xili¹, Chen Yumeng¹, Xiang Zheyuan¹, Gao Zexin¹, Xing Ligu², Zhao Huimin¹, Liu Meng¹, Chen Jingwen¹

1. Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education, School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

2. Shenyang Research Institute of Chemical Industry of SINOCEM Group, Shenyang 110027, China

Received 17 August 2020 accepted 22 March 2021

Abstract: Toxicity assessment of chemicals predominantly adopted either 2D cell culture or animal models whereas both models have intrinsic flaws. 2D cell culture systems are usually derived from a specific set of cell lines, differing from the tissue function encountered *in vivo* containing multiple cell types. Animal models are limited by the cost and time, associated ethical concerns and xenogeneity. 3D organoids achieve a greater level of structural and

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFE0110700); 国家自然科学基金资助项目(21661142001, 21777020); 中央高校基本科研业务费(DUT20LAB102, DUT20LK19)

第一作者: 刘薇(1980—), 女, 博士, 教授, 研究方向为持久性有机污染物毒性效应和机理以及干细胞毒理学模型原理和应用, E-mail: liu_wei@dlut.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: liu_wei@dlut.edu.cn

functional complexity more closely analogous to *in vivo* physiology, showing cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, and thus enabling a more accurate reflection of the toxic effects and mechanisms. With promising perspectives, the progresses in organoid toxicology would significantly promote the fundamental toxicology research, and support the chemicals risk assessment and regulation as well. However, organoid-based toxicological research of chemicals is still in its infancy. In this review, we discussed recent developments and trends in organoid model concerning the physiological features, development systems and methods, and tissue-specific types, focusing on its feasibility in toxicological researches of chemicals, and the challenges and strategies are also proposed.

Keywords: organoid; toxicology alternatives; *in vitro* model; high-throughput test

工业革命以来,人类合成了化肥、农药、药物和各种工业化学品,至今美国化学文摘社(Chemical Abstracts Service, CAS)注册的化学物质有1.5亿种以上(每天约增加15 000种),人类在市场上使用的化学品在35万种以上^[1]。根据2019年3月联合国环境署(United Nations Environment Programme, UNEP)发布的全球化学品展望II(Global Chemicals Outlook II)^[2],欧盟区域2016年使用的3.45亿t化学品中,62%对人体健康有害。因此,合成化学品是生态与人体健康的重要风险源,是人类社会可持续发展面临的重大挑战。

预防和控制化学品对人体健康的风险,需要化学品的毒性数据,以填补关于化学品危害性的信息空白。然而,传统的毒性测试方法往往需要消耗大量的测试动物,成本高,耗时长,存在动物实验伦理问题。而且,动物实验结果外推至人类具有极大的不确定性。新时代的环境毒理学,倡导从以往主要是描述性的科学向更具预测性、主要基于人源细胞和组织的体外高通量测试的科学转变;倡导通过对毒性通路(toxicity pathway, TP)和有害结局路径(adverse outcome pathway, AOP)的机理认识并构建计算毒理学模型来进行化学品的风险评价和预测,进而减少实验测试动物的数目、测试成本和时间。因此,发展基于人源细胞和组织的体外高通量毒性测试方法体系,是新时代环境毒理学的前沿方向^[3-5]。

人源细胞和组织用于毒理学测试,先后经历了2D单层细胞培养、细胞球模型和类器官模型(表1)。2D细胞培养和细胞球模型常用单一的特定细胞系,与体内多细胞组织及其生理功能差异较大。所谓类器官(organoid),指的是由诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)或成体干细胞(adult stem cells, ASCs)在体外自组织并经历一定程度的细胞分化形成的3D结构,具备体内组织器官的部分典型功能,

具有较为稳定的表型和遗传学特性^[6-7]。3D类器官模型可模拟组织器官的复杂空间形态,突破了细胞间单纯的物理接触和联系,表现出细胞间和细胞-基质相互作用,与体内组织器官具有更相似的生理反应。类器官模型与2D单层细胞模型或细胞球模型相比,能更好地用于模拟器官组织的发育过程及生理病理状态,因而能更好地反映体内毒性效应(表1)。关于类器官模型的基础研究以及在再生医学领域的应用进展,已有相关综述^[6-13]。目前类器官模型在化学品毒理学评价领域的应用仅处于起步阶段^[14],本文从类器官的生理学特性、构建方法及组织类型等方面,重点综述了类器官模型对化学品暴露的毒性响应特征,及其在化学品毒理学评价中的优势和可行性,并提出了存在的问题和对策,以期基于类器官模型的化学品毒理学研究提供参考。

1 类器官的特性(Organoid features)

类器官由多种细胞自组织形成,在细胞类型、结构和功能等方面模拟体内相应组织器官。作为实验室培养的器官微缩模型,类器官应用于体外环境中特定靶器官毒理学的研究,具有以下几方面优势。

(1)细胞形态呈3D模式。与传统细胞培养中贴壁生长的2D细胞形态不同,在类器官模型中,细胞在3D空间中生长,形态学特征和生理特性与体内更相似。例如,3D毛囊乳头细胞球相较于单层培养的毛囊乳头细胞,其细胞分泌因子能够改善毛囊微环境,促进毛囊中 β -catenin和CD133的表达,这2种蛋白与毛囊干细胞功能和毛囊再生密切相关^[15]。呼吸道上皮细胞在3D培养条件下表达上皮细胞标志物PCK、CK5和ZO-1,而且形成纤毛样突起,但在2D条件下培养并无以上特征^[16]。

(2)能够反映细胞间相互作用和细胞-基质相互作用。类器官模型包含多种细胞类型,突破了传统2D模型中简单的细胞间物理接触,形成了更加紧密的细胞间生物通信和信号网络,细胞间相互影响、反

馈及协作发育。细胞间相互作用和细胞-基质相互作用支持细胞微环境稳态的建立,有助于形成和维持具有特定结构和功能的微型组织器官。类器官模型可显著促进针对细胞相互作用过程的毒理学研究,例如对细胞粘附、迁移、分化和愈合等细胞功能的损伤作用^[17]。

(3)具有良好的生理功能。例如,皮肤类器官比单层培养的角化细胞、成纤维化细胞具有更好的抗氧化应激能力^[18-19],与人体表皮脂质成分高度相似,具有较为完善的屏障功能。Lancaster等^[20]构建的脑类器官模型,不仅符合哺乳动物的基本神经发育机理,还具备了一定的人类大脑发育特征,并且作者利用该脑类器官模型成功构建了在小鼠体内很难模拟的小头畸形障碍疾病模型,有效解决了该疾病实验研究的难题。相对于单层细胞培养,3D培养条件下的生殖细胞中自噬体数量明显降低,缓解了细胞在体外培养中产生的应激反应^[21]。

2 类器官模型的构建方法 (Organoid development methods)

根据使用的支架材料和培养设备等,常用类器官构建方法主要包括4类:悬浮培养、凝胶支架培

养、旋转生物反应器和气液界面培养(图1)。此外,生物打印技术和器官芯片技术是类器官模型构建的新兴方法。

2.1 悬浮培养

使用低附着力表面的培养瓶/微孔板、磁悬浮器件或者采用悬滴法,细胞可在液体培养基中悬浮生长并形成类器官。悬浮法不使用支架材料,细胞自发团聚,避免了其他因素的干扰。悬滴法中细胞悬滴所含细胞数相同,球体大小一致,无需借助额外装置,自发实现细胞成球,局限性主要在于不适于大规模培养^[22]。磁悬浮方法将具有生物相容性的磁性纳米颗粒引入细胞,将磁性驱动组件盖在培养板顶部,细胞在磁力作用下悬浮到空气-液体界面,并集中在磁铁下,形成3D结构。Tseng等^[23]利用磁悬浮法实现了4种细胞共培养,包括成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞和平滑肌细胞,形成了细支气管3D模型。

2.2 凝胶支架

水凝胶由交联的多聚链或复杂蛋白分子组成的网络构成,其高含水量和高孔隙性使得氧、营养物质和废物的运输更为便利,为细胞提供附着、分化和增殖的场所,因而可以作为高效的3D细胞培养基质^[24]。水凝胶包括天然来源和人工合成材料,其中

表1 不同体外细胞模型的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of various *in vitro* cell models

	单层细胞模型 Monolayer cell model	细胞球模型 Cell sphere model	类器官模型 Organoid model
优点 Advantage	1. 操作简单 Simple operation 2. 获得结果快 Get results quickly 3. 重复性强 Easy to replicate	1. 保持细胞的基础结构 Maintain basic cellular structure 2. 细胞-胞外基质相互作用 Cell-to-extracellular matrix interactions 3. 细胞功能较充分且稳定 Complete and stable cell function 4. 与体内实验结果差异小 Reduced difference with <i>in vivo</i> results	1. 与来源组织具有相似的结构和功能 Similar with <i>in vivo</i> structure and function 2. 由多种细胞组成 Consist of multiple types of cells 3. 细胞间生物通信和信号网络更加紧密 Closer intercellular biological communication and signal networks 4. 具有稳定的表型和遗传特性 Stable phenotypic and genetic characteristics
缺点 Disadvantage	1. 缺乏细胞-胞外基质的相互作用 Lack of cell-to-extracellular matrix interactions 2. 细胞功能不完全 Incomplete cell function 3. 细胞类型单一 Single cell type 4. 与体内实验结果差异大 Differ from <i>in vivo</i> results	1. 培养时间长,成功率低 Long culture time and low yield 2. 得出实验结果的过程较慢 Get results slowly 3. 不能体外自组织 Inability to self-organize <i>in vitro</i>	1. 培养困难 Cultural difficulties 2. 缺乏标准方法 Lack of standard protocol 3. 表型不成熟 Phenotypic immaturity 4. 模型血管化困难 Difficulty in vascularization

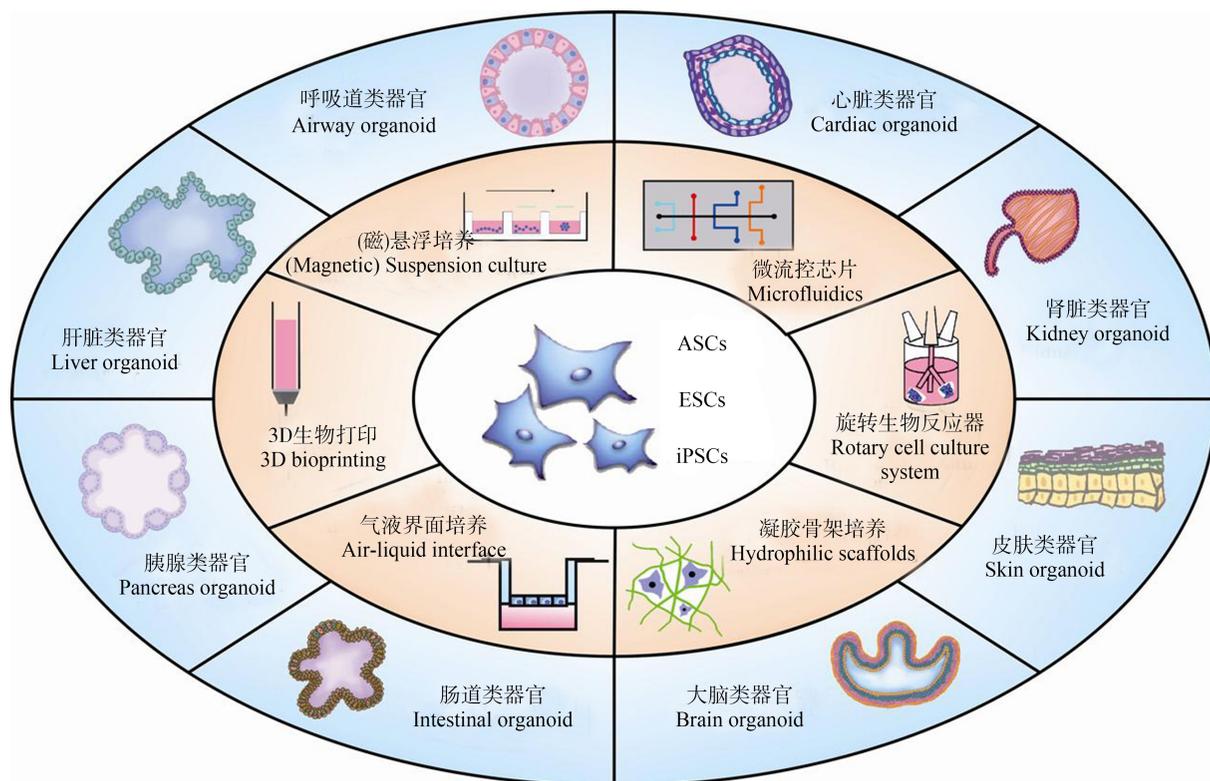


图1 类器官的构建方法和组织类型

注:ASCs表示成体干细胞,ESCs表示胚胎干细胞,iPSCs表示诱导多能干细胞。

Fig. 1 Methods for organoid development and tissue-specific types

Note: ASCs stand for adult stem cells; ESCs stand for embryonic stem cells; iPSCs stand for induced pluripotent stem cells.

Matrigel是一种细胞体外培养最常用的天然基质胶,是从富含胞外基质蛋白的EHS小鼠肿瘤中分离得到的,其组分与体内大多数活细胞的胞外基质相似^[25]。Matrigel在4℃时为液体,当浓度 $>4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在24~37℃时凝胶化^[26]。Matrigel主要成分为层粘连蛋白、IV型胶原、巢蛋白和硫酸肝素糖蛋白等,具有结构支持和信号转导的作用。其中层粘连蛋白含量最为丰富,是主要的凝胶因子。Matrigel还包含FGF、EGF、TGF- β 、IGF和PDGF等生长因子,通过改变生长因子的组成和浓度,可调控特定类型的细胞增殖和分化。Matrigel的局限性主要在于组分不完全明确,存在一定的产品批次差异^[11]。

2.3 旋转生物反应器

旋转生物反应器解决了类器官构建的主要难题之一,即细胞的营养和氧气供给。例如,与静态悬浮培养相比,旋转生物反应器中的神经节细胞和S型视锥细胞的分化能力增强,促进和改善了视网膜类器官构建中的细胞增殖和分化^[27]。在旋转生物反应器中建立的小头畸形障碍的大脑类器官模型,尽管6~7个月后尺寸有所皱缩,但可维持活性长达15

个月^[20]。保持适宜的转速对使用旋转生物反应器培养类器官至关重要,搅拌速度过慢会使细胞球沉降,速度过快则会损坏细胞。此外,该方法不适用于培养粘附性低或对剪切力敏感的细胞^[28]。

2.4 气液界面法

气液界面(air-liquid interface, ALI)培养是指细胞的顶层暴露于空气中,底层与液体培养基接触,而不是完全浸入培养基中。ALI培养主要用于构建呼吸道和皮肤模型,还用于肾和脑类器官^[12, 29-30],有利于呼吸道纤毛细胞和皮肤表皮细胞等细胞的定向分化和增殖。ALI法有利于氧传输,提高了培养体系内的氧浓度,ALI培养体系中的氧梯度相比于浸没培养体系降低了1.5倍^[31]。因此,ALI法改善了细胞氧合作用,进而促进类器官的自组织,有助于其维持更长时间。例如,ALI培养体系中的大脑类器官可以维持更长时间,从而促使模型进一步成熟^[29]。ALI培养在操作上存在一定的难度,此外在半透膜上培养类器官模型难以进行分离和高通量毒性测试^[31]。

2.5 器官芯片技术

传统的类器官培养需在特定时间点向培养基中加入外源因子,外源因子和细胞分泌的可溶性因子在干细胞的局部微环境中自发扩散,不容易控制,无法精确模拟体内器官发育关键因子的梯度分布。器官芯片技术在体外模拟机械力刺激、特定信号通路和化学梯度等复杂条件的组织器官生理微环境,从而精确地调控细胞行为,减少类器官构建的变异性^[32]。微流控芯片技术能促进内分泌细胞分化和胰岛类器官成熟,Tao等^[33]采用人诱导多能干细胞在多层可灌注芯片上动态灌注培养出了胰岛类器官,相比于静态培养形成的胰岛类器官,对于葡萄糖的刺激更敏感,且胞浆中 Ca^{2+} 通量更高。此外,可通过器官芯片技术模拟灌注血管,Shirure等^[34]构建的肿瘤类器官芯片器件由3个相互连接的隔室组成,可支持内皮细胞自组装形成血管,是解决3D细胞培养中血管形成难题的重要策略之一。Wang等^[35]提出了一种在微流控芯片细胞灌注式培养系统中构建肝类器官的方法,通过对微阵列的尺寸进行优化,调控类器官大小与均一性。由于微流控芯片技术是按照预先确定的方式设计和构建的,对细胞的大小、形状和相对排列的控制存在一定的局限性^[32]。

2.6 3D生物打印

3D生物打印将生物材料和活细胞在指定的逐层堆叠的组织中同步定位,与传统的组织构造方法相比,采用3D生物打印法构建类器官具有精确、可重复及尺寸可控性强的优势^[36],能够精确地定位活细胞、蛋白质、DNA、药物、生长因子和其他生物活性物质的时空分布,以控制生物组织的形成。大部分的3D组织模型缺乏组织界面,如血管内皮组织与周围结缔组织和实质细胞之间的界面,而组织界面对器官功能至关重要^[37]。King等^[38]利用3D生物打印平台开发了近端人肾小管模型,由肾成纤维细胞、内皮细胞和原代人肾小管近端内皮细胞形成了组织界面,该模型暴露于顺铂后,组织活性呈剂量依赖性降低,且通过组织病理学观察到上皮细胞数量也呈剂量依赖性降低,通过抑制阳离子摄取转运蛋白OCT2可保护其免受这种损伤。Nguyen等^[39]报道,通过生物打印的人类肝脏组织在培养4周时仍能维持ATP、白蛋白水平以及细胞色素P450酶活性,且对肝毒性药物曲氟沙星和结构类似的左氧氟沙星表现出不同的毒性反应,表明该肝组织模型能够区分结构高度相似的药物毒性。3D生物打印的

局限性主要在于打印过程中细胞存活率降低,影响类器官活性,此外生物打印的类器官数量较为有限^[40]。

3 类器官的组织类型 (Tissue-specific organoid types)

根据模拟组织器官的类型,类器官模型主要包括皮肤、肝、肾、肺、脑、心脏和生殖类器官等。此外,也有研究报道成功构建了肠、乳腺、前列腺、胰腺和视网膜等类器官模型^[10,41]。

3.1 皮肤类器官

欧盟提出从2009年3月开始禁止动物试验用于化妆品安全性评价^[42],极大地促进了3D皮肤组织模型的发展。其中较早投入使用的模型有EpiskinTM模型和Epikutis[®]3D表皮模型。EpiskinTM模型将分离的人表皮细胞接种在特定的生物材料上培养,形成具有3D结构的人表皮模型,已经被广泛应用于皮肤腐蚀性体外试验^[43]。张光甫等^[44]依据EpiDerm的构建原理采用人皮肤成纤维细胞与鼠尾胶原混合培养模拟真皮层,在真皮层上接种人角质化细胞,经气液培养形成表皮层,构建人皮肤模型,并利用该模型对10种杀菌类农药的皮肤腐蚀性和刺激性进行检测,腐蚀性检测结果与动物评价测试结果的一致率为100%,刺激性结果的一致率达到80%,表明重组人皮肤模型在农药皮肤毒性评价中具有良好的应用前景。Liu等^[45]构建的由上皮细胞、成纤维细胞和内皮细胞组成的无支架双膜皮肤模型,与成纤维细胞和内皮细胞的共培养以及单一培养相比,3种细胞之间的相互作用上调了血管化相关的生长因子VEGF、bFGF和PDGF的表达,形成了更丰富的血管。

3.2 肝脏类器官

肝脏是人体最重要的解毒器官,也是很多外源化学物毒性作用的靶器官,构建肝细胞体外3D模型可以对化学物的毒性进行更有效的检测。2013年,Takebe等^[46]将肝细胞、人脐静脉内皮细胞和人间充质干细胞共培养,模拟肝脏发育早期的细胞谱系,并通过内皮细胞和间充质干细胞的相互作用,产生了类似人肝芽组织的3D聚合物,移植入小鼠体内后具有良好的血管生成功能,该研究被Science评为2013年的十大突破之一。不足之处是这些体外培养的肝芽组织缺乏胆管结构。2017年,Vyas等^[47]利用肝细胞胞外基质支架,使人胎儿肝祖细胞自组织形成了肝类器官,提升了对肝胆器官形成过程的模拟效果,同步形成了分化的肝细胞和胆管结构。

Shinozawa 等^[48]利用多能干细胞构建了具有胆汁转运功能的肝脏类器官,含有具有胆管样结构的极化未成熟肝细胞,建立了胆汁酸的单向转运途径,通过测试存活率、胆汁淤积和线粒体毒性,对238种市售药物的肝毒性具有较高的预测能力(敏感性:88.7%,特异性:88.9%),并将其转化为适用于384微孔板的高速实时成像分析平台。

3.3 肾脏类器官

原代肾上皮细胞在分离后20 min内即丧失细胞特征,在单层培养条件下几周内即完全去分化,因此肾毒性评估通常使用永生化细胞系。但永生化细胞系往往不具备诱发毒性的基本分子结构,例如摄取化学物的小分子转运体和部分毒性靶标受体,并且存在药物外排能力低等局限^[49-50]。在肾小球类器官模型中,可诱导表达裂隙隔膜、肾脏滤过功能和肾小球发育相关基因,而且在阿霉素作用48 h后,MAFB-BFP2强度呈剂量依赖性下降^[51]。Astashkina等^[52]报道,庆大霉素等4种肾毒性药物作用于肾小管类器官,药物扩散较好,而且能够诱发和体内毒性相似的效应,包括尿N-乙酰- β 氨基葡萄糖苷酶和 γ -谷氨酰转移酶升高、炎症因子升高、肾毒性蛋白和基因标志物升高等,而永生化细胞HEK293和LLC-PK1则无相关毒性反应。此外,在单层培养的肾小管细胞中,细胞色素P450活性迅速丧失,而在3D培养中可持续表达。

3.4 肺类器官

肺癌的发病率和死亡率占恶性肿瘤的首位,2018年全球癌症统计报告显示,185个国家地区的肺癌发病率在36种癌症中占11.6%,有176.64万人因肺癌死亡,约占癌症死亡总人数的18.4%^[53],室内外环境空气污染是呼吸道疾病的主要诱因之一。人体气道上皮是吸入空气污染物的主要毒性靶区,且人呼吸道上皮基底细胞中表达CYP450代谢酶,基于该细胞的肺类器官成为体外吸入毒理学研究的理想模型^[17]。气管结构的出现是肺类器官构建成功的重要标志^[10]。Desai等^[54]构建的肺3D模型,可在培养基中维持100 d以上,并形成组织良好的近端气道上皮结构,包括基底细胞和纤毛细胞以及少量club细胞。Treutlein等^[55]建立的3D肺类器官可以表达远端肺上皮细胞的标记物Sftpc/Sox9和Hopx/Sox9。Yamamoto等^[56]诱导人多能干干细胞培育出肺泡类器官,经GNE7915和胺碘酮处理后II型肺泡上皮细胞的板层小体明显增大,与体内毒性反应一致。

最近,Takayama^[57]利用支气管类器官,发现SARS-CoV-2病毒的主要靶标是呼吸道上皮基底细胞,并导致I型干扰素信号升高。EpiAirwayTM是一个商品化的肺3D组织模型^[58],具有良好的均一性和重复性,由正常人气管/支气管上皮细胞培养形成高度分化的假复层上皮组织模型,包含基底细胞、杯状细胞和纤毛细胞,其黏液纤毛表型与人类呼吸道上皮组织非常相似^[59]。EpiAirwayTM测试预测强吸入毒性化学物质与动物测试结果相当,预测中/低毒性呼吸道刺激物的毒性效应优于动物测试^[60]。Chang等^[17]比较了不同多环芳烃类化合物对EpiAirwayTM模型转录组学特征的影响,指出可利用该方法识别多环芳烃类化合物的致癌机理。Hild和Jaffe^[61]利用Matrigel支架建立了一种不依赖ALI培养的高通量类支气管模型培养方法,使用384孔细胞培养板即可,在该培养体系中人呼吸道上皮基底细胞可分化为杯状细胞和纤毛细胞。Liu等^[62]进一步考察了该方法的性能,发现在一定的初始细胞接种数量和细胞代际范围内,细胞群落形成效率和支气管模型尺寸变异性较小,具有良好的稳定性。

3.5 脑类器官

人脑的复杂性极高,很难采用动物模型研究人类大脑功能,因此迫切需要建立人脑发育体外模型^[20]。脑类器官模型的转录组和表观遗传组学特征和胎儿大脑相似,有利于研究致畸物对中枢神经系统发育的毒性作用和机理。利用单细胞测序比较胎儿大脑和脑类器官皮层细胞组成和谱系关系,发现超过80%的皮层疾病或进化相关的差异表达基因在脑类器官中表达模式相似^[63]。2013年,Lancaster等^[20]培养出与9~10周胚胎大脑类似的“类大脑”,该模型可以形成分离的但相互依存的不同脑区,如大脑皮层和脑膜等,极少一部分会分化成海马体,该脑类器官表现出人大脑皮层发育的重要特征,即特征性前体区域组织,其中含有大量的放射状胶质干细胞。2015年,Kirwan等^[64]构建了人大脑皮层神经网络,能够模拟体内皮质网络的发育和功能,可用于人类前神经网络生理学机制的研究。乙醇作用于脑类器官造成祖细胞过早分化、神经突生长抑制及细胞死亡,且转录组学分析发现一系列新的毒性靶基因和信号转导通路,包括GSX2、RSPO2和Hippo信号通路^[65]。尼古丁损害脑类器官的皮层发育,造成神经元分化和迁移异常^[66]。类前脑经双酚A暴露,对神经祖细胞增殖和脑区厚度产生剂量依赖性

的抑制作用^[67]。

3.6 心脏类器官

心脏是外源化学物毒性的重要靶器官之一^[4]。Takeda 等^[68]将 3D 人工心脏组织用于药物心脏毒性体外测试,阿霉素诱导细胞释放乳酸脱氢酶、抑制细胞活力,毒性响应较灵敏,且 hERG 型钾通道阻滞剂 E-4031 和异丙肾上腺素呈剂量依赖的方式诱导钙瞬变和细胞收缩力发生显著变化。Lemme 等^[69]用诱导多能干细胞形成的心肌细胞建立右心房工程心脏组织,与人的肌肉比较,该模型心房的表征指标的 mRNA 表达水平和蛋白质浓度更高、收缩更快、收缩力更小、动作电位持续时间更短,能够较为准确地模拟体内心脏生理特征。Lu 等^[70]报道 3D 培养能够促进心肌细胞的成熟和收缩,1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钾通道阻断剂 E4031 显著降低了 3D 心脏类器官的收缩速度,当浓度增加到 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时收缩完全停止,而 2D 培养的单层心肌细胞在 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时收缩停止,2D 心脏类器官表现出更强的耐药性。

3.7 生殖类器官

目前只有少数研究报道了由睾丸细胞构建睾丸类器官。Sakib 等^[21]建立了猪、小鼠、猕猴和人的 3D 睾丸类器官,该模型由生殖细胞、支持细胞、睾丸间质细胞和管周肌样细胞组成,形成了明显的生精上皮和由基底膜分隔的间质室。当这些睾丸类器官暴露于邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯后,生殖细胞自噬的水平呈剂量依赖性升高。Pendergraft 等^[71]用成熟的生殖细胞和永生化的 Sertoli-Leydig 细胞在悬滴培养系统中培育出人睾丸器类官,并可产生睾酮,4 种潜在的促性腺激素化疗药物使该类器官细胞活性明显下降,凋亡细胞数量显著增加,且半数效应浓度值明显高于相应的 2D 模型。

4 类器官毒理学研究的挑战与对策 (Challenges and strategies of organoid-based toxicology research)

目前类器官模型在化学品皮肤毒性测试方面取得了相对突出的进展,部分模型已在国内外毒理学替代法研究机构通过验证形成了标准方法,但在其他靶器官毒理学研究中的应用极为有限。对于化学品的毒理学评价,类器官模型有利于模拟化学品在体内的动态分布过程,能够更准确地预测和评估化学品的毒性效应和机理,将显著促进化学品健康风险防控。此外,由于干细胞在增殖和分化条件下对外源化学物质的敏感性不同,基于类器官形成过程

的毒理学研究,有利于评价化学品的发育毒性、识别化学品的敏感时间窗口和分子靶标。利用类器官模型进行化学品的毒理学评价,需要满足可获得高产量类器官模型、可测量毒性终点和高通量测试体系等方面的需求^[6],以下几方面策略有利于推动类器官毒理学的发展。

4.1 改进类器官构建方法体系及其标准化

类器官模型构建方法的改进及其标准化是类器官毒理学研究的根本任务。尽管类器官在模拟体内器官形态和功能上相比 2D 细胞模型有了极大的提升,但和体内组织器官的成熟度和复杂性仍有较大差距。在类器官的培养过程中,随着细胞的大小和体积的增加,简单扩散过程使得为核心部分细胞提供的氧气和营养不足,核心部分细胞代谢废物排出也受到限制。类器官通常缺乏基底、组织驻留免疫细胞和血管,限制了类器官的发育和成熟^[7]。此外,类器官变化迅速,在不同培养阶段所需培养条件不同。优化细胞组合类型、培养基组成以及结合微流控技术等有望改善类器官模型的功能。类器官的尺寸和细胞组成变异性较大,构建方法标准化有助于改善毒理学评价结果的重现性和准确性。

为满足化学品毒理学评价的巨大需求,高产量构建方法是类器官毒理学的基本要求。基于微孔板的类器官模型构建方法,与现有的自动化操作和测试仪器相适应,是实现高产量的便捷、有效的方法^[62]。此外,Liu 等^[72]建立了一种基于液滴微流控系统的杂合水凝胶微囊制备体系,该系统支持大规模的类器官培养。实现类器官冻存且复苏后仍能够保持形态功能的方法体系,也将有效促进其推广和应用。延长类器官的生命周期,可促进通过体外试验预测长期暴露的毒性效应。

4.2 受试物的暴露途径、剂量和毒代动力学特征

体外毒理学模型有利于研究毒性机理和确定相对毒性潜能,在此基础上,进一步提升体外暴露途径的体内相关性,确定体外暴露浓度的体内相关性,将极大地推动类器官毒理学模型的发展和应用。由于类器官模型中的细胞呈 3D 生长和组织模式,且构建体系采用的特殊材料和器件,给类器官毒理学模型的化学品暴露带来难题。建立与环境暴露相似的暴露途径,有助于提升类器官毒理学研究结果的相关性。通过类器官及其细胞组分中受试化学物的定量分析,有助于确定靶细胞内暴露剂量,建立更精准的剂量-效应关系。结合生理毒代动力学模型,借助

系统生物学和计算毒理学技术,可经体外浓度估测经口浓度,有助于推动基于体外毒理学模型的化学品健康风险评价^[42]。

4.3 多层次毒性终点、表征方法和高通量测试体系

建立环境健康效应相关的、灵敏的毒性效应终点以及高通量的定量定性检测方法,是类器官毒理学研究的核心任务。建立基于形态学、组织/细胞功能、生物化学和基因调控等由宏观到微观的多层次毒性效应终点和测定方法^[73-74],有利于深入评估化学品的毒性效应和机理。由于在类器官培养中使用了骨架材料、Transwell 培养板或其他器件和材料,用于单层细胞培养的毒理学表征方法,需经改进后应用于 3D 类器官模型,避免基质等材料的干扰^[10,75]。利用毒理组学技术(包括转录组学、蛋白质组学和代谢组学等)有助于全面筛查敏感分子靶标、预测有害效应及阐明毒性作用模式。近年来发展迅速的单细胞测序方法^[76],尤其适合于对类器官中不同类型的细胞进行转录组学分析,对于揭示细胞特异性的毒性机制、细胞间相互作用和细胞-基质间相互作用等毒理学问题具有重要意义。基于细胞培养微孔板的类器官构建体系有利于实现毒性高通量评估,可同时进行多种化学品毒性测试,该法仅需少量受试化学品,适合于价格昂贵或处于研发阶段的新化学品。

类器官模型不仅适用于毒性效应和机制的基础研究,还将显著促进化学品的健康风险评价和管理。基于类器官模型的毒理学研究结果在化学品健康风险评价中具有以下几方面重要作用。(1)危害鉴定:利用类器官毒性测试筛选潜在的靶器官毒物,为更深入的毒性评价建立优先测试化学品清单,提高化学品毒性测试效率、减少动物实验。可结合类器官毒理学评价结果和其他方面的研究结果,利用证据权重法(weight-of-evidence)进行化学品危害鉴定。(2)识别毒性作用模式(mode of action, MOA)和 AOP:类器官毒理学研究有利于识别化学品在分子、细胞和组织水平的毒性效应,进而有助于阐明化学品的毒性作用机理、MOA 和 AOP,为化学品风险评价和管理提供重要依据。(3)剂量-效应关系评定:利用体外体内外推法(*in vitro* to *in vivo* extrapolation, IVIVE)^[77],结合计算毒理学模型,可根据类器官毒理学研究结果估测在动物/人体内产生毒性效应所需的化学品剂量。(4)风险表征:风险表征是化学品风险评价的最后步骤,需综合分析危害鉴定、暴露评价

和剂量-效应关系的结果,判断发生某种危害的可能性,类器官毒理学研究结果为风险表征提供实验依据。此外,类器官毒理学研究结果有助于建立基于靶器官毒性和 MOA 的更精准的不确定性系数,提高风险评价的科学性和准确性。

类器官毒理学的发展,将显著提升毒理学基础研究能力以及对化学品风险评价和管理的支撑作用。目前国内外类器官毒理学的研究均处于起步阶段,尚有较多关键的科学和技术问题有待攻克。我国少量研究机构在类器官模型的组织工程构建方面已取得了较为突出的进展,但在化学品毒理学评价领域的研究极为有限。化学品毒理学评价急需建立高产量、高通量、灵敏的类器官毒理学模型,研究其对化学品暴露的毒性响应特征和机理,需要细胞和组织工程、毒理学体外/体内实验研究和计算毒理学等多学科交叉合作,同时急需相关领域专业人才培养。

参考文献 (References):

- [1] Wang Z Y, Walker G W, Muir D C G, et al. Toward a global understanding of chemical pollution: A first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(5): 2575-2584
- [2] United Nations Environment Programme. Global chemicals outlook II—From legacies to innovative solutions: Implementing the 2030 agenda for sustainable development [R]. Nairobi: United Nations Environment Programme, 2019
- [3] Barroso J, Ahn I Y, Caldeira C, et al. International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods [M]// Eskes C, Whelan M. *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*. Springer International Publishing, 2016: 343-386
- [4] Gibb S. Toxicity testing in the 21st Century: A vision and a strategy [J]. *Reproductive Toxicology*, 2008, 25(1): 136-138
- [5] Fry R C, Bangma J, Szilagyi J, et al. Developing novel *in vitro* methods for the risk assessment of developmental and placental toxicants in the environment [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 378: 114635
- [6] O'Connell L, Winter D C. Organoids: Past learning and future directions [J]. *Stem Cells and Development*, 2020, 29(5): 281-289
- [7] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125

- [8] Corrò C, Novellademunt L, Li V S W. A brief history of organoids [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2020, 319(1): C151-C165
- [9] Clevers H C. Organoids: Avatars for personalized medicine [J]. *The Keio Journal of Medicine*, 2019, 68(4): 95
- [10] 李甜瑞, 赵瑞波, 张权, 等. 类器官及其应用的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2019, 46(8): 737-750
Li T R, Zhao R B, Zhang Q, et al. Progress in the research of organoids and applications [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2019, 46(8): 737-750 (in Chinese)
- [11] Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro* [J]. *Journal of Anatomy*, 2015, 227(6): 746-756
- [12] Rossi G, Manfrin A, Lutolf M P. Progress and potential in organoid research [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(11): 671-687
- [13] Ashok A, Choudhury D, Fang Y, et al. Towards manufacturing of human organoids [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107460
- [14] 刘昕彦, 邵瑞, 贺爽, 等. 类器官和立体细胞模型在中药心脏毒性评价中的应用前景[J]. *药学学报*, 2019, 54(11): 1888-1894
Liu X Y, Shao R, He S, et al. Application prospect of organoids and 3D-cell models in evaluation of cardiotoxicity of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(11): 1888-1894 (in Chinese)
- [15] Hu S Q, Li Z H, Lutz H, et al. Dermal exosomes containing miR-218-5p promote hair regeneration by regulating β -catenin signaling [J]. *Science Advances*, 2020, 6(30): eaba1685
- [16] Chen Y X, Xie G C, Pan D, et al. Three-dimensional culture of human airway epithelium in matrigel for evaluation of human rhinovirus C and bocavirus infections [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2018, 31(2): 136-145
- [17] Chang Y, Siddens L K, Heine L K, et al. Comparative mechanisms of PAH toxicity by benzo[a]pyrene and dibenzo[def,p]chrysene in primary human bronchial epithelial cells cultured at air-liquid interface [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 379: 114644
- [18] Astashkina A, Mann B, Grainger D W. A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2012, 134(1): 82-106
- [19] Sun T, Jackson S, Haycock J W, et al. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 122(3): 372-381
- [20] Lancaster M A, Renner M, Martin C A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-379
- [21] Sakib S, Voigt A, Goldsmith T, et al. Three-dimensional testicular organoids as novel *in vitro* models of testicular biology and toxicology [J]. *Environmental Epigenetics*, 2019, 5(3): dvz011
- [22] 邓俊豪, 李苗, 张里程, 等. 三维悬滴法培养间充质干细胞在组织损伤修复中的应用及优势[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(7): 1101-1106
Deng J H, Li M, Zhang L C, et al. Three-dimensional hanging-drop culture of mesenchymal stem cells in the treatment of tissue injury [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2020, 24(7): 1101-1106 (in Chinese)
- [23] Tseng H, Gage J A, Raphael R M, et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation [J]. *Tissue Engineering Part C, Methods*, 2013, 19(9): 665-675
- [24] Murphy A R, Laslett A, O'Brien C M, et al. Scaffolds for 3D *in vitro* culture of neural lineage cells [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 54: 1-20
- [25] Benton G, Kleinman H K, George J, et al. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) *in vitro* and *in vivo* with cancer cells [J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 128(8): 1751-1757
- [26] Benton G, Arnaoutova I, George J, et al. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 79-80: 3-18
- [27] DiStefano T, Chen H Y, Panebianco C, et al. Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(1): 300-313
- [28] Achilli T M, Meyer J, Morgan J R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2012, 12(10): 1347-1360
- [29] Giandomenico S L, Mierau S B, Gibbons G M, et al. Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output [J]. *Nature Neuroscience*, 2019, 22(4): 669-679
- [30] Fatimah S S, Chua K, Tan G C, et al. Organotypic culture of human amnion cells in air-liquid interface as a potential substitute for skin regeneration [J]. *Cytherapy*, 2013, 15(8): 1030-1041
- [31] Chandrasekaran A, Kouthouridis S, Lee W, et al. Magnetic microboats for floating, stiffness tunable, air-liquid in-

- terface epithelial cultures [J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(17): 2786-2798
- [32] Park S E, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 960-965
- [33] Tao T T, Wang Y Q, Chen W W, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform [J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(6): 948-958
- [34] Shirure V S, Bi Y, Curtis M B, et al. Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(23): 3687-3702
- [35] Wang Y Q, Wang H, Deng P W, et al. *In situ* differentiation and generation of functional liver organoids from human iPSCs in a 3D perfusable chip system [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(23): 3606-3616
- [36] Peng W J, Datta P, Ayan B, et al. 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 57: 26-46
- [37] Pati F, Gantelius J, Svahn H A. 3D bioprinting of tissue/organ models [J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 55(15): 4650-4665
- [38] King S M, Higgins J W, Nino C R, et al. 3D proximal tubule tissues recapitulate key aspects of renal physiology to enable nephrotoxicity testing [J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 123
- [39] Nguyen D G, Funk J, Robbins J B, et al. Bioprinted 3D primary liver tissues allow assessment of organ-level response to clinical drug induced toxicity *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158674
- [40] Ma X Y, Liu J, Zhu W, et al. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and *in vitro* disease modeling [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 132: 235-251
- [41] Strange D P, Zarandi N P, Trivedi G, et al. Human testicular organoid system as a novel tool to study Zika virus pathogenesis [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 82
- [42] Zink D, Chuah J K C, Ying J Y. Assessing toxicity with human cell-based *in vitro* methods [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2020, 26(6): 570-582
- [43] Alépée N, Grandidier M H, Cotovio J. Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431 [J]. *Toxicology in Vitro*, 2014, 28(2): 131-145
- [44] 张光甫, 刘薇, 邢立国, 等. 利用人皮肤模型评价杀菌类农药的腐蚀/刺激性[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(3): 578-584
- Zhang G F, Liu W, Xing L G, et al. Using human skin model to evaluate skin corrosion/irritation of fungicide [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(3): 578-584 (in Chinese)
- [45] Liu Y, Luo H L, Wang X W, et al. *In vitro* construction of scaffold-free bilayered tissue-engineered skin containing capillary networks [J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 561410
- [46] 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
- [47] Vyas D, Baptista P M, Brovold M, et al. Self-assembled liver organoids recapitulate hepatobiliary organogenesis *in vitro* [J]. *Hepatology*, 2018, 67(2): 750-761
- [48] Shinozawa T, Kimura M, Cai Y Q, et al. High-fidelity drug-induced liver injury screen using human pluripotent stem cell-derived organoids [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(3): 831-846
- [49] Romero-Guevara R, Ioannides A, Xinaris C. Kidney organoids as disease models: Strengths, weaknesses and perspectives [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 563981
- [50] Freedman B S, Brooks C R, Lam A Q, et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8715
- [51] Hale L J, Howden S E, Phipson B, et al. 3D organoid-derived human glomeruli for personalised podocyte disease modelling and drug screening [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1-17
- [52] Astashkina A I, Mann B K, Prestwich G D, et al. Comparing predictive drug nephrotoxicity biomarkers in kidney 3-D primary organoid culture and immortalized cell lines [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4712-4721
- [53] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394-424
- [54] Desai T J, Brownfield D G, Krasnow M A. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer [J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 190-194
- [55] Treutlein B, Brownfield D G, Wu A R, et al. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 371-375
- [56] Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPSC cells

- in organoids [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(11): 1097-1106
- [57] Takayama K. *In vitro* and animal models for SARS-CoV-2 research [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2020, 41(8): 513-517
- [58] Kidd D, Woodhams A, Daunt A, et al. Use of a 3-D human *in vitro* airway model (EpiAirway[®]-FT) to investigate clinically relevant endpoints for pulmonary disorders: Proof of concept [J]. *Toxicology Letters*, 2018, 295: S123
- [59] Balharry D, Sexton K, BéruBé K A. An *in vitro* approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: Nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane [J]. *Toxicology*, 2008, 244(1): 66-76
- [60] Riss T, Kupcho K, Shultz J, et al. Measuring apoptosis in real-time by linking luciferase fragments to annexin V [J]. *Toxicology Letters*, 2016, 258: S56
- [61] Hild M, Jaffe A B. Production of 3-D airway organoids from primary human airway basal cells and their use in high-throughput screening [J]. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 2016, 37: IE.9.1-IE.9.15
- [62] Liu W, Mei X L, Crews A, et al. An *in vitro* bronchosphere model to assess respiratory toxicity [C]. the Society of Toxicology. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim: the Society of Toxicology, 2020: 79
- [63] Camp J G, Badsha F, Florio M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development [J]. *PNAS*, 2015, 112(51): 15672-15677
- [64] Kirwan P, Turner-Bridger B, Peter M, et al. Development and function of human cerebral cortex neural networks from pluripotent stem cells *in vitro* [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3178-3187
- [65] Amin N D, Paşca S P. Building models of brain disorders with three-dimensional organoids [J]. *Neuron*, 2018, 100(2): 389-405
- [66] Wang Y Q, Wang L, Zhu Y J, et al. Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(6): 851-860
- [67] Qian X Y, Nguyen H N, Song M M, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1238-1254
- [68] Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Development of *in vitro* drug-induced cardiotoxicity assay by using three-dimensional cardiac tissues derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Tissue Engineering Part C, Methods*, 2018, 24(1): 56-67
- [69] Lemme M, Ulmer B M, Lemoine M D, et al. Atrial-like engineered heart tissue: An *in vitro* model of the human atrium [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(6): 1378-1390
- [70] Lu H F, Leong M F, Lim T C, et al. Engineering a functional three-dimensional human cardiac tissue model for drug toxicity screening [J]. *Biofabrication*, 2017, 9(2): 025011
- [71] Pendergraft S S, Sadri-Ardekani H, Atala A, et al. Three-dimensional testicular organoid: A novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity *in vitro* [J]. *Biology of Reproduction*, 2017, 96(3): 720-732
- [72] Liu H T, Wang Y Q, Cui K L, et al. Advances in hydrogels in organoids and organs-on-a-chip [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(50): e1902042
- [73] Tan Q, Choi K M, Sicard D, et al. Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling [J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 118-132
- [74] Dye B R, Hill D R, Ferguson M A, et al. *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids [J]. *Elife*, 2015, 4(4): 1-25
- [75] Hatherell K, Couraud P O, Romero I A, 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]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2011, 199(2): 223-229
- [76] Aizarani N, Saviano A, Sagar, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors [J]. *Nature*, 2019, 572(7768): 199-204
- [77] Bell S M, Chang X Q, Wambaugh J F, et al. *In vitro* to *in vivo* extrapolation for high throughput prioritization and decision making [J]. *Toxicology in Vitro*, 2018, 47: 213-227

