

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-106

类器官技术与合成生物学协同研究进展

陈子苓, 向阳飞

(上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210)

摘要: 类器官由成体干细胞或多能干细胞在体外分化而来, 可以在细胞类型、空间结构及生理功能上实现对体内组织器官的模拟。类器官的构建及技术完善, 推动了发育生物学、遗传学、病理毒理学等发展。合成生物学是一门多学科交叉的新兴学科, 以工程学思想为指导, 旨在通过工程化、模块化的方法设计、改造、构建生物元件、系统、功能等。近年来类器官构建的优化方案体现了与合成生物学契合的研究理念, 而合成生物学的发展及相关方法的产生也为类器官技术的发展起到了推动作用。本文将概述类器官和合成生物学的发展历程与面临的挑战, 探讨类器官优化过程中合成生物学策略的体现与新兴的合成生物学工具对于类器官在时空命运调控、结构自组织及功能形成等方面的优化作用, 简述基于类器官模型的研究对于合成生物学发展的促进作用。总的来说, 本文旨在阐述合成生物学与类器官构建及优化之间相辅相成、互相促进的关系, 并进一步探讨合成生物学与类器官在未来结合应用的潜力。

关键词: 类器官; 合成生物学; 细胞命运决定; 器官芯片; CRISPR

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Integrated development of organoid technology and synthetic biology

CHEN Ziling, XIANG Yangfei

(School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China)

Abstract: Organoids, derived from adult or pluripotent stem cells through in vitro differentiation, can recapitulate the cellular diversity, spatial organization, and physiological functions of in vivo organs or tissues. The development of organoids has facilitated progress in developmental biology, genetics, pathology, and others. As an emerging interdisciplinary field guided by engineering principles, synthetic biology aims to design, modify, and construct biological components and systems with some specifically designed functions through engineering and modular approaches. The in vitro construction of organoids currently faces challenges, including high cost, significant heterogeneity, and low throughput, which become more prominent when building complex organoid models. As a burgeoning field in recent years, synthetic biology has excellent potential to expand its applications and research

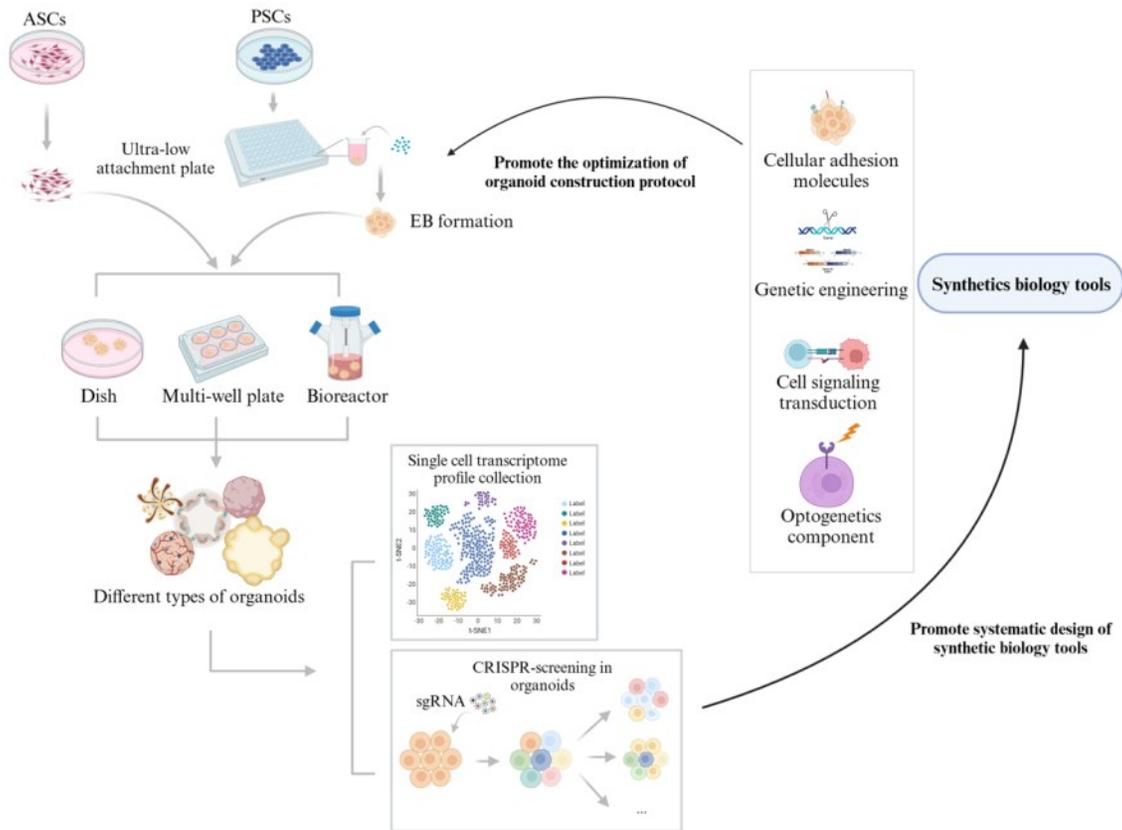
收稿日期: 2023-12-09 修回日期: 2024-02-23

基金项目: 科技部重点研发项目 (2021YFF1200800); 国家自然科学基金委项目 (32170836); 中央引导地方项目 (YDZX20233100001002)。

引用本文: 陈子苓, 向阳飞. 类器官技术与合成生物学协同研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-106

Citation: CHEN Ziling, XIANG Yangfei. Integrated development of organoid technology and synthetic biology [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-106

directions. The optimization strategy of organoid construction has become intricately intertwined with the principles of synthetic biology in recent years. Simultaneously, the advancement of synthetic biology and its associated methodologies has propelled the progression of organoid technology. This review provides an overview of the historical development and current challenges of organoids and synthetic biology while exploring the disparities and interconnections between these fields regarding research concepts and methods. Specifically, we will provide an overview of current design strategies for optimizing organoids and explore the fundamental applications of synthetic biology strategies in this context. Furthermore, we will examine the emerging role of synthetic biology tools in enhancing spatiotemporal fate regulation, structural self-organization, and functional capabilities of organoids. Lastly, we will discuss how derivative research based on organoid platforms contributes to advancing synthetic biology investigations. Overall, this review aims to elucidate the profoundly synergistic and mutually beneficial relationship between the rapidly evolving field of synthetic biology and organoid technology. By delving deep into the interconnectedness of these two disciplines, our objective is to facilitate further exploration of their potential integration in future research endeavors. Additionally, we seek to unravel feasible application scenarios that can harness the combined power of these two fields to bring about potential advancements in biomedical and life science.



Keywords: Organoid; Synthetic biology; Organs-on-chip; Cell fate determination; CRISPR

类器官 (organoids) 作为近年来生命科学研究的重要技术突破之一, 在实现多能干细胞^[1-3] (pluripotent stem cells, PSCs) 或成体干细胞^[4-5]

(adult stem cells, ASCs) 在体外分化出具有特定功能的细胞类型的同时, 也能够建立三维 (three-dimensional, 3D) 空间组织, 从而重现体内器官

的结构与功能^[6-8]。类器官弥补了二维 (two-dimensional, 2D) 细胞培养在表现体内组织结构复杂性上的不足, 拥有与体内对应器官相似的细胞构成^[9-10]、组织结构特征^[11-12], 能呈现较为复杂的生理功能^[13-14], 是体外模拟发育及疾病发生发展的重要工具^[15-16]。类器官模型的建立, 使得在体外还原对应组织器官的细胞类型、基因表达、组织结构、生理功能及多种生物学过程成为可能^[17]。

合成生物学 (synthetic biology) 是系统生物学与基因技术、工程科学、合成化学、计算机科学等众多学科交叉融合所催生的新兴学科, 以基因组^[18]和生化分子合成为基础, 综合生物化学、生物物理和生物信息等技术, 通过工程化、模块化的方法, 旨在设计、改造、重建生物分子、生物元件和生物分化过程, 从而构建具有生命活性的生物元件、系统以及人造细胞或生物体^[19]。

随着类器官技术的不断发展和对复杂类器官构建的需求日益增加, 现有类器官构建方法的单一性、高可变性等缺陷逐渐显露, 需要拓展新的思路来实现类器官培养的优化。而合成生物学系统化、模块化、高通量的基本理念恰好契合类器官构建与改良的需求。本文将简要概述类器官的发展历程, 聚焦当下前沿的类器官构建体系中合成生物学思路的体现, 以及类器官技术发展对合成生物学的潜在推动作用, 阐述类器官与合成生物学之间相辅相成、相互促进的关系, 并展望二者融合碰撞所能产生的多种可能性。

1 类器官及合成生物学发展概述

1.1 类器官技术的起源及发展

类器官是基于多能干细胞或成体干细胞建立的体外3D培养物, 具有人体相应器官或组织的结构和功能特征。虽然“Organoid”一词直到1946年才首次出现在文献报道中^[20], 但对于类器官的研究, 最早可以追溯到20世纪初。1907年, 有研究表明解离的海绵细胞在合适的条件下可以自组织成细胞团, 并分化出新的个体^[21]。随着研究的不断深入, 对细胞自组织的研究逐渐从无脊椎动物扩展到两栖动物^[22]、禽类^[23]乃至哺乳动物。2008年, Eiraku

等^[24]使用3D聚集培养方法将胚胎干细胞分化为大脑皮层类似组织。2009年, Sato等^[25]的研究表明, 特定条件下的成人肠干细胞可以在基质中形成3D的小肠类器官, 在没有间充质的情况下可以自组织并分化出小肠微绒毛结构。这一具有里程碑意义的研究为之后许多类器官相关研究奠定了基础, 在此之后, 针对不同胚层发育, 包括胃^[26]、肾脏^[27]、肝脏^[28-30]、胰腺^[31]、肺^[32]、大脑^[33-34]和视网膜^[35]等, 研究人员陆续建立了对应的类器官培养方案 (图1A)。

1.2 类器官模型的优势与局限性

近年来, 越来越多的类器官模型已经得到了成功构建, 尤其是对于单一谱系来源的正常组织类器官或是病理性类器官模型^[36-37], 目前已经有了相对成熟稳定的培养方案, 这些研究为人体组织器官发育、功能、疾病的研究提供了重要资源^[38], 同时对再生医学和基因治疗领域的发展也具有相当有力的推动作用^[6]。

相比于传统的2D细胞培养和动物模型, 类器官可以提供更加接近人体内组织结构的3D微环境, 重现体内组织器官的细胞类型组成与功能。在疾病模型的构建中, 使用患者自来源的细胞培养类器官, 可以实现药物在特定个体中的疗效评估。此外, 患者自体来源的类器官, 也许能为患者提供可降低免疫排斥反应的适合移植的组织^[39], 在损伤的再生修复以及器官移植领域有着广阔的前景。

尽管类器官目前已经可以在一定程度上模拟体内组织的细胞组成、结构与功能, 但距离实现对体内真实复杂的生理结构精确、稳定地模拟, 仍然有很长的一段路要走^[40]。此外, 体外分化所培养类器官在发育过程中往往存在明显的异质性, 个体类器官之间的重复性较低^[41], 生成类器官的时间成本及资源成本均十分高昂, 因此如何提升类器官开发的精确性、稳定性以及分化效率是目前类器官研究面临的一大关键挑战。与此同时, 单一谱系来源的简单类器官已经无法满足日益增长的以类器官作为工具研究或重现体内多谱系、多组织类型甚至是多系统之间的发育、组装

乃至互作的需求，因此更复杂、更综合的类器官系统的构建成为了当下类器官技术的研究难点^[42]。想要攻克上述挑战，建立起具有较低可变性、较高分化效率、较稳定的可控性且拥有复杂稳定结构的类器官培养方案，则要求研究人员能够实现对类器官培养体系，包括细胞命运及细胞外微环境精准地、工程化地时空调控。这一需求与合成生物学的研究理念与研究目的高度一致。

当下，类器官培养体系的设计已经开始逐步展现出系统化、工程化的特点^[43-44]，一定程度上与合成生物学的研究理念产生了契合，而合成生物学领域的发展与越来越多的合成生物学工具的开发，也为更复杂、更精准的类器官构建提供了全新的角度与思路。此外，伴随着类器官技术的发展，以类器官作为平台所开展的许多研究，如类器官转录组图谱的构建^[10, 45]、CRISPR 筛选^[46-48]等，也可以推动与指导合成生物学的发展。

1.3 合成生物学的起源

分子生物学相关技术的发展，使得研究人员可以在体外对细胞或生物体的基因进行操控，促进了合成生物学的发展。2000年，Collins团队^[49]受噬菌体λ开关和蓝藻昼夜节律振荡器的启发，设计合成了双稳态基因网络开关；同年，Elowitz和Leibler等^[50]基于负反馈调控机制实现了基因振荡网络的设计；2002年，Wimmer团队^[51]通过化学合成病毒基因组获得了具有感染性的脊髓灰质炎病毒，这也是首个人工合成的生命体；2010年，

Venter团队^[52-53]设计、合成和组装了1.08 Mb的支原体基因组（JCVI-syn1.0），并将其移植到山羊支原体受体细胞中，产生了仅由合成染色体控制的新支原体细胞；2014年，Romesberg团队^[54]设计合成了一个非天然碱基配对，并将它们整合到大肠杆菌基因组（图1B）。这些研究表明，对生物系统进行精准的设计与调控，将进一步加深对于生命系统的理解，拓展生命系统的可能性。

1.4 类器官与合成生物学的区别与联系

类器官与合成生物学均为生命科学近年来兴起的新兴发展学科，在生物医学研究中也逐渐展现出了广阔的发展前景。二者有所联系又互不相同。从研究目的上看，类器官构建目标是通过调控干细胞在3D培养条件下分化与自组装，尽可能地在体外还原体内组织或器官的真实细胞类型、细胞组成、形态结构、发育过程以及功能^[55]。而合成生物学则是在现有系统的基础上重新进行设计和改造使之增加新的功能，或重新构建全新的生物元件与系统^[56-57]。前者强调体内真实组织的还原与重现，后者注重的是生物系统的重建与改造。

从研究方案上来看，传统类器官的构建通过模拟体内正常生长分化过程的外源信号线索以及相应的基因表达模式，利用干细胞自我更新与分化的能力，实现类器官模型的体外构建^[58]。而合成生物学则是依托于对天然生物元件及其相互作用的理解，重新设计、修改、重构生物元件和系统^[59]。

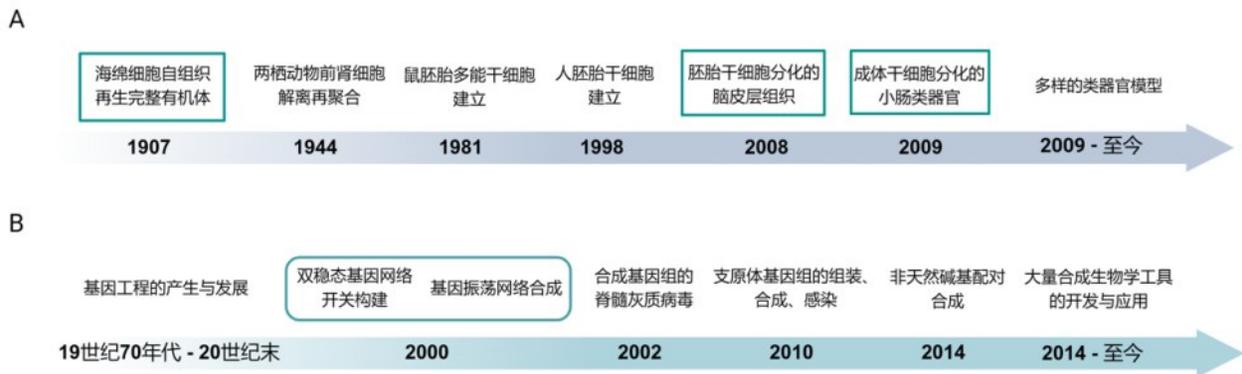


图1 类器官（A）及合成生物学（B）研究的重要时间节点

Fig. 1 Representative progress in organoid technology (A) and synthetic biology (B)

类器官与合成生物学两大研究方向并没有明晰的界限，前者可以帮助合成生物学家更好地了解天然生物系统中存在的分子机制以及相互作用的原理，后者可以在构建类器官过程中实现对部分复杂功能的精准调控。尽管目前合成生物学在类器官中的应用还处在尝试阶段，但已展现出其明确的优势。探索合成生物学与类器官的区别与联系，并进一步阐述类器官构建过程中合成生物学的策略体现以及合成生物学工具在类器官中的应用，可以明确两个研究方向相辅相成的关系，突破现有的研究瓶颈，推动两个方向的发展与创新。

2 类器官构建中的合成生物学策略的体现

合成生物学研究与应用可体现为两种形式：一是“自上而下”的方法，通过对现有的、天然

存在的生物系统进行重新设计和改造，修改已存在的生物系统，使之增添新的功能；二是“自下而上”的方法，通过设计和构建新的生物元件、组件和系统，创造自然界中尚不存在的人工生命系统^[19]。

本节将以经典的类器官构建案例以及类器官模型的应用，来阐述类器官构建及优化方案（图2），以及合成生物学基础路线及研究方法在类器官研究中的基本体现，进一步说明合成生物学与类器官在研究思路与研究方案方面的区别与联系。

2.1 类器官构建中微流控技术的应用

在体内，胚胎发育过程中组织或器官的发育受到严格的时空动态调控。通常来说，类器官的形态发生过程也会受到外部微环境因素的控制，干细胞在特定的时间点暴露于特定的外源性形态发生因子或生长因子时，往往存在相应的发育信号通路的激活，从而触发特定类型细胞的分化与

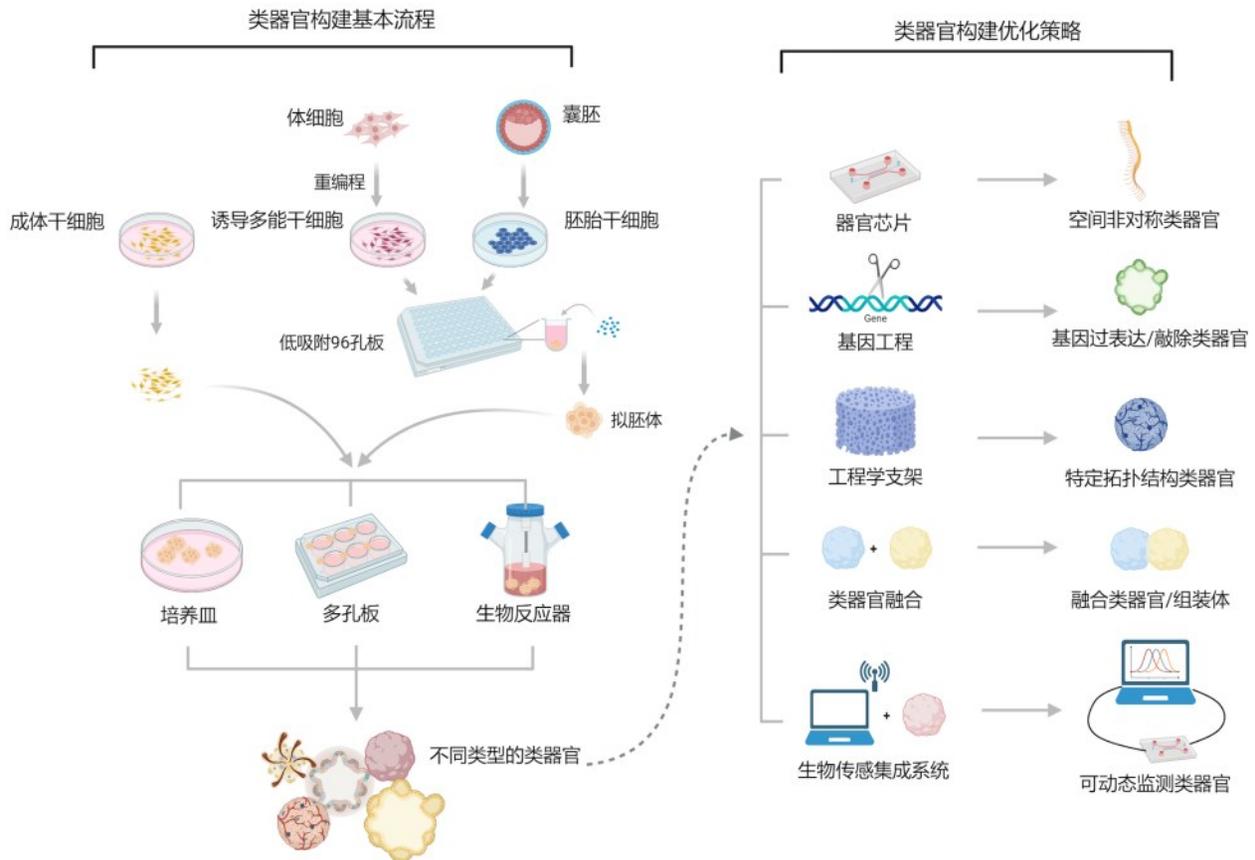


图2 类器官构建与优化策略

Fig. 2 Strategies for constructing and optimizing organoid models

自组织。通过对生理微环境因素的精确时空控制,改变类器官培养体系中外源因子的组合模式和剂量,是构建不同类器官模型的基本思路。

早期的细胞2D分化研究是3D类器官构建的基础,结合3D培养的几种方法,包括嵌入细胞外基质(ECM)^[60-61]和悬浮培养^[34, 61-62]等,可使体外模型的构建由2D转变为3D,从而更好地还原组织器官的结构与功能。目前,类器官最常见的设计思路是通过体内不同组织器官发育过程的理解,借鉴内源性发育调控与稳态维持的基本原理,在体外模拟细胞组成与调控信号,调控干细胞的增殖与分化,从而建立对应特定组织或器官的3D模型。

2009年,荷兰科学家Hans Clevers等人在体外成功地利用小鼠Lgr5⁺肠道干细胞构建了小肠类器官^[25],该研究建立的小肠类器官在很大程度上重现了体内小肠组织的细胞类型与3D结构,并能够基本准确地模拟小肠上皮的生理情况。该研究极大地推动了类器官技术的发展,它证明了通过体内分化条件的模拟,可成功实现细胞的体外分化调控,为其他组织或器官的体外3D培养提供了可靠的实验性依据。此后,研究人员实现了不同类型3D培养,建立了多种人类正常和病理性类器官,如前文提到的脑、结肠、胃、和肝脏类器官等。

尽管目前针对体内多种组织与器官已经有了对应的分化方案与类器官模型,但目前仅通过向培养基中添加诱导因子来控制特定信号通路的激活或抑制,从而实现类器官诱导分化的传统构建思路也面临明显的局限性。对类器官的构建而言,在分化的不同时间点添加不同的诱导因子可实现对干细胞命运决定的时间调控,但空间上非对称的信号调控,例如体轴发生过程中形态发生因子的梯度协同作用则难以模拟^[63]。此外,常规的类器官培养策略也难以模拟体内微环境中物理因素(如机械应力等)对于组织器官发育的影响。在类器官的应用层面,将类器官模型应用于药物筛选或疗效验证的研究中时,通常需要繁琐的人工操作与较长的培养时间。不仅如此,样品个体、批次之间在组织结构、细胞组成等方面存在较大的异质性,这也将影响实验的可重复性。此外,分

析通量低也是目前类器官研究中亟待解决的困难。

针对以上问题,微流控技术被引入了类器官培养中。器官芯片可以控制流体流动,结合细胞与细胞相互作用、基质特性以及生物化学和生物力学等调控,在时间尺度上实现对细胞命运调控的同时,引入空间等多种变量,可更准确地在体外模拟内源组织的分化环境,也使得组织器官之间的相互作用及复杂功能得以更好地实现。2016年,Christopher J. Demers等^[64]开发了一种微流控装置,可以在类器官培养中产生形态发生因子梯度,模拟生理状态下的形态梯度来分化产生神经管模拟物。Rifes等^[65]利用微流控装置中的Wnt梯度生成了一种具有喙尾组织特征的神经组织,并将其用于模拟早期人类神经管的发育。在成功实现了类器官构建过程中空间上的信号调控的同时,也有研究致力于探索组织器官形成过程中物理因素对类器官生长发育及功能的影响。例如,通过人胃类器官的管腔流可以有节律地向类器官引入可控强度的拉伸和收缩,模拟体内胃功能,用于人体胃生理学研究、疾病建模和药物筛选^[66]。

除此之外,还有更多研究致力于在微流控装置中整合类器官生长所需的物理或生化因素。2016年,Morizane团队^[67]通过设计3D打印的微流控芯片,在类器官培养过程中引入了可控的流体剪切力,在体外成功构建了肾类器官。相比于静态培养,该肾类器官极大地扩展了内源性内皮祖细胞池,生成了由壁细胞包围的可灌注管腔的血管网络,且具有更成熟的足细胞和肾小管。2018年,秦建华团队^[68]构建了一种包含微柱阵列结构的可灌注微流控装置,该装置可实现人多能干干细胞向肝类器官分化的诱导。此种方法下产生的肝类器官具有更高的细胞活力与成熟度,且肝特异性功能显著增强。2019年,一种可灌注的胰岛类器官微流控芯片被建立,该芯片具有多层结构,可以在单一设备中实现可控的类胚体形成、原位胰岛分化及胰岛类器官的形成与长期培养。该可灌注芯片培养分化的胰岛类器官与静态培养的胰岛类器官相比,具有更完整的结构、更高的细胞活性以及更强的胞间连接^[69]。

除细胞的时空命运调控与物理因素的模拟外,微流控技术结合不同器官芯片的开发,也为类器

官的构建提供了高通量、高均一性、自动化、工程化的可能性。比如,通过微流控液滴技术,可将含有细胞的基质胶剪切成均一化的微球,研究人员利用该平台成功培养了小鼠肝、肺、肾等正常组织的类器官,以及癌症病人肺、肾、胃、直肠等多种肿瘤类器官。对样品进行鉴定后证实了分化产生的样品在形态与尺度上的均一性,且具有与源组织/肿瘤高度一致的细胞类型组成、组织病理学特性与基因表达特征,这些类器官在抗肿瘤药物敏感性筛选实验中也证明具有较高的准确性^[16]。

上述研究表明,类器官模型的构建正在经历不断地优化。相较于早期简单类器官的构建,为了更好地模拟体内复杂的生理过程,工程化、模块化的复杂类器官构建仍有较大的发展需求。结合器官微流控技术,类器官的体外构建已经开始走向了高通量、工程化的阶段,细胞命运的体外时空精确调控得以实现,改进了类器官构建过程中异质性、低效率的缺陷。

2.2 基因工程在类器官中的应用

细胞增殖分化产生不同组织、器官的过程不仅受外源的信号调控,也与内源性的基因表达程序高度相关。此外,许多疾病,尤其是肿瘤的产生过程,也普遍存在遗传物质的改变与恶性突变的积累。伴随着分子生物学相关技术的快速发展,尤其是基因编辑技术的发展,对基因进行靶向操纵的效率与准确性不断提高,越来越多的研究开始针对类器官进行遗传改造,从而探究人体器官发育调控机制,或解析肿瘤发生发展机制。

比如,Wnt信号通路是正常发育和肿瘤形成过程中的重要通路,而腺瘤性息肉病相关蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)失活是Wnt信号通路中的重要事件。Liu等^[70]利用CRISPR的方法构建了APC敲除(APC^{KO})的类器官,成功复现了人体中Wnt通路异常激活情况下的肿瘤表型。除了直接改变Wnt信号通路的基因,也可以通过编辑其他基因以实现Wnt通路的调控。采用CRISPR介导的基因编辑,Sato等^[71]在肿瘤类器官中发现了细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A(Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, CDKN2A)

和肿瘤抑制蛋白p53(Tumor Protein P53, TP53)的突变能够抵抗Wnt异常激活而引起的细胞凋亡,揭示了肿瘤生成过程中的环境适应过程。

除了模拟体内存在的基因表达模式来重现体内分化或疾病产生外,对于体内环境中不存在但具有高度研究意义的基因,也可以通过基因编辑的方式整合进干细胞基因组中,并通过类器官模拟、跟踪发育过程,拓宽对组织器官发育的理解。2021年,Alysson R. Muotri等^[72]使用基因编辑技术将古人类中剪接调控因子神经肿瘤腹侧抗原1(Neuro-oncological ventral antigen 1, NOVA1)突变型等位基因引入人类诱导多能性细胞,然后通过构建皮质类器官模拟脑发育,揭示了该突变点在神经发育过程中的关键作用。研究发现,NOVA1突变体的表达会导致突触蛋白相互作用网络蛋白的变化、影响谷氨酸能信号、引发神经元连接的差异以及神经元电生理的异质性。该工作提出了NOVA1基因变异在现代人类背景下改变皮质发育的假设,为人类脑进化机制提供了线索。

2020年,Hans Clevers团队^[73]开发了一种名为CRISPR-HOT(CRISPR-Cas9-mediated homology-independent organoid transgenesis)的工具,利用非同源依赖的CRISPR技术,可快速高效地对人源类器官进行基因敲入,并针对人源类器官中的特定基因进行荧光标记和可视化。这一技术为荧光敲入类器官引入了新方法,为研究组织器官中实时动态的细胞过程提供了高效的工具。此外,Jürgen Knoblich等^[74]以脑类器官为研究主体,建立了CRISPR-LIGHT技术,实现了在脑类器官中进行数百个基因的并行筛查,并将该方法应用于小头畸形(Microcephaly)研究中,确定了一系列与小头畸形相关的基因。

总之,类器官中的基因编辑使研究人员能够聚焦特定细胞类型、基因或信号调控通路,在类器官中重现正常或异常发育过程,揭示疾病分子机制;同时,也可开发更多行之有效的类器官分析工具。通过基因编辑,不仅可以在体外实现类器官的疾病模型构建,也可以引入原系统中不存在的基因表达模式,在现有的基础上改造、重建新的生物元件及系统,本质上与合成生物学中自上而下的设计思路有着高度相似性。

2 3组织工程材料与类器官构建

在类器官构建过程中,除去外源性生化因素与物理因素对细胞命运的时空调控,以及内源性基因表达对分化方向的影响外,类器官的拓扑结构也是影响类器官分化结果的重要因素之一。一方面,目前用于在3D基质模型中培养类器官的方法,可能会导致组织随机发育,类器官体积较大时,类器官内部细胞与外界环境的物质交换受到限制,难以从外界获取充足的氧气与营养物质,代谢废物也难以得到有效排除。因此,类器官内部细胞易出现氧化应激、细胞死亡,限制了分化组织的大小与健康程度。体外培养的类器官一般也难以形成类似体内的血管网络,无法克服上述障碍。另一方面,仅仅依赖自组织产生的类器官往往只具有较为单一的组织结构,在重现体内真实复杂的结构组成时具有一定的局限性。

为了解决上述问题,组织工程材料的添加或工程化支架的应用为类器官构建提供了一些新的思路。目前常用于类器官培养支架的材料包括重组蜘蛛丝蛋白、脱细胞的胞外基质或3D打印的生物材料等。其中一部分作为支架材料直接添加进类器官培养中(如蜘蛛丝蛋白等),为类器官形成与生长提供细胞附着生长的结构支持;另一部分则与类器官芯制备技术相结合,为类器官提供具有特定的衬底拓扑结构或内部结构的支架,从而进一步实现特定微环境的构建与稳态维持。

2019年,Bortolomai等^[75]将3DI型胶原支架与3% 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(Butanediol Di Glycidyl Ethe, BDDGE)交联,再接种经过基因修饰的胸腺上皮细胞。胸腺类器官交联支架的一侧为排列整齐的多孔结构,类似于胸腺髓质;另一侧为孔隙较少但更坚硬的纤维结构,类似于胸腺皮质。该胶原支架在高效完成物质交换的同时保证了良好的细胞透性和支架定植能力。2020年,Lutolf研究团队^[5]开发了一种可以渗透气体、营养物质和大分子的支架,可以诱导肠干细胞形成管状上皮,在结构上,该管状上皮具有可进入的内腔以及与体内相似的隐窝和绒毛状组织形态;在功能上,该管状上皮组织是可灌注的,从而可以连续去除管腔表面的死细胞,延长人工组织的培

养时长。该模型保留了肠道的关键生理特征,并具有显著的再生能力。而在2021年,通过3D打印技术结合生物材料,研究人员提出了一种工程方法,解决了脑类器官的核心区域易坏死、细胞分化诱导因子(如小分子或蛋白等)扩散受限等问题。在该研究中,通过使用聚己内酯支架对脑类器官进行培养,产生了经过改造的扁平化脑类器官,它具有良好的扩散条件,能更好地为其组织提供氧气和营养,从而防止坏死组织核心的形成,有助于类器官在体外长期培养的维持^[76]。

上述研究主要为类器官的体外培养提供了特定的结构支撑及为氧气、营养物质的扩散提供条件,除此之外,工程学支架的可调性质(包括生化成分与物理性质等)也可为类器官的体外培养提供精细可控条件。比如,不同的胞外基质刚度可以影响间充质细胞的分化方向,如较硬的基质(>30 kPa)促进成骨分化,而较软的基质(<10 kPa)促进成脂分化^[77]。2022年,研究人员制备了一种基于脱细胞的牛和人子宫内层衍生的水凝胶支架材料,体外构建了鼠和人的子宫内层类器官。该研究中,作者探究了不同的洗涤剂对水凝胶进行处理,以及将水凝胶与不同组分交联对于类器官分化的影响,证明了不同的组分、不同的工程化支架处理方式可影响类器官的细胞排列、结构乃至功能。

综上,工程化的支架材料为类器官的构建提供了复杂的拓扑结构,有效促进了组织细胞与外界环境的物质交换,减少了类器官培养过程中细胞的氧化应激与机械损伤,一定程度上促进了类器官的分化成熟以及结构、功能上的稳定,有利于类器官的长期培养。不仅如此,工程化支架材料的可调性质,甚至可以在一定程度上直接影响类器官的分化方向和结构形成。此外,部分工程化地支架结构引入了非天然的附着材料,在体外为特定组织结构提供了相应的支撑作用,以模拟体内的胞外微环境。结合3D打印技术及生物墨水,可使支架本身在结构、材料、力学特性以及稳定性上均符合工程学中程序化、模式化的特点。

2.4 融合类器官构建

体内真实的生理过程往往涉及到多细胞类型、

多组织、多系统的相互连接与相互作用，这使得在单一类器官构建之外，也需要在体外培养出具有更丰富的细胞类型、更完整的谱系来源、更复杂的互作结构的类器官。类器官融合培养即是针对该问题的探索。

2017年，研究人员在体外构建了人多能干细胞衍生而来的内侧神经节隆起（Medial ganglionic eminence, MGE）与皮质特异性的类器官，它们分别重现了体内MGE与皮质的发育过程。钙成像结果显示，培养的人内侧神经节隆起类器官（hMGEOs）和人皮质类器官（hCOs）中产生了生理功能性神经元和神经网络，这也提示着二者的功能成熟。将hMGEOs与hCOs进行融合，研究人员发现中间神经元可向皮质侧迁移，这一发现重现了体内中间神经元由MGE向皮质区切向迁移的过程^[78]。

融合类器官研究还体现在皮质-运动环路的体外构建中。2020年，Pasca团队^[79]体外构建了类似于大脑皮质或脊髓/后脑的类器官，并与骨骼肌球体进行组装，生成了皮质-运动组装体。结合病毒追踪、钙成像及膜片钳技术，研究人员对该组装体进行了功能验证，发现皮质神经元存在向脊髓的投射，脊髓源性的神经元与骨骼肌相连，对组装体皮质端进行刺激可以诱发骨骼肌的强烈收缩。

以上研究都证实了不同的类器官可以实现体外组装，从而建立类似于体内不同脑区、组织谱系之间的相互作用。这在体外构建更复杂的类器官模型提供了依据，为理解发育和疾病的复杂过程提供了新思路与新方法。融合类器官相较于传统的单一类器官，更接近于在体外进行人为的“系统”的构建。这一过程往往涉及到不同种类类器官的分别分化、共培养与组装，最终目的是在体外重现体内各组织分化、迁移与相互作用及形成完整功能结构的整体的过程。在构建融合类器官的过程中，研究人员将原本复杂的多组织共发育问题拆分为为了更清晰的多种简单类器官的分化、组装问题，这与合成生物学中精确化、模块化的策略相契合，通过这样的方式，复杂的结构网络被拆分为简化的模块，大大减少了系统构建过程中的随机性。

2.5 类器官构建与生物传感集成

在类器官的构建过程中，对类器官状态的实时监控可以帮助研究人员更及时地观测类器官的发育状态，并根据实时反馈的结果进行及时的方案优化与调整。该过程需要将类器官构建技术与生物传感系统进行有效结合。2017年，Parker等^[80]通过多材料3D打印构建了一种心脏组织类器官芯片，该芯片整合了6种不同的功能性油墨，将生物传感器导入培养系统中后，可以实现对层状心脏组织自组装过程的动态观测。同年，研究人员将多功能的传感器嵌入器官芯片，设计了一套完全集成的模块化物理、生化和光学传感平台，利用此平台，研究者在体外构建了人类肝脏和心脏类器官模型并进行了药物筛选^[81]。类器官构建与生物传感系统的整合，可使得类器官的分化过程，以及分化过程中的即时状态可以被完整地记录、分析、处理，帮助研究人员系统地给予反馈，该策略可更好地推动类器官培养向着模块化、稳定化的方向发展。

综上，研究人员在类器官构建的优化上已经进行了多方面的尝试，类器官的构建在传统模式的基础上，逐渐开始产生了高通量、低可变性、高精确性等需求。因此，类器官的优化不仅需要结构上更接近体内真实状态，也需要数字化、自动化、程序化、系统性的构建方案来实现对类器官诱导分化的精准调控、即时反馈与稳定分化。在这一过程中，类器官构建思路逐渐与合成生物学的研究思路产生了碰撞，其中，目前大多数优化方案都受到了合成生物学“自上而下”的研究思路启发，通过对现有天然的生物材料、元件及系统进行人为的改造与优化，来实现高效、准确、稳定的类器官构建。而合成生物学“自下而上”的研究思路提出了人工生物系统的设计与构建，为类器官的优化提供了更大胆、更多元、更开放的研究思路与方向，或许将在未来推动类器官研究步入新的阶段。

3 合成生物学在类器官中的应用

类器官的逐步发展和不断创新的研究路线一

一定程度上体现了合成生物学中系统性、模块化的思想与理念，而合成生物学的研究思路与不断开发完善的工具也为更复杂的类器官系统构建提供了新的思路与灵感。

3.1 设计-构建-测试-学习研究循环

合成生物学相关研究以“设计-构建-测试-学习-再构建 (Design-Build-Test-Learn, DBTL)”的研究循环作为核心路线 (图3A)^[82]。合成生物学一直在尝试将工程原理引入生命科学，并推动生物元件的标准化和表征，以实现复杂生物元件、生物系统的可复制和可扩展构建。自动化、标准化与工程化地设计或改造生物元件，是合成生物学的初衷，而其中涉及到的工程学思路与生命科学相结合的新模式，也为类器官构建方案的设计与优化提供了指导。

其中，设计步骤依赖于充分表征的生物部件和计算机辅助方法。设计内容包括各类控制基因转录、翻译的各类手段，基因表达的各类调控方法，以及各类翻译后修饰手段的选择与组合。构建步骤，各类先进的核酸工具酶试剂盒、各种核酸修饰技术以及各类组合式文库数据简化重组载体的构建过程，该步骤中可以实现组分到元件再到组件的逐步构建，直至组合成完整的具有功能的生物系统。测试步骤主要依赖于微流控芯片及高通量筛选，监测系统输出，如荧光蛋白标记；用于化合物检测的液相色谱-质谱 (LC-MS) 分析技术等，测试所构建的生物元件是否稳定、可重复且具有相应的功能。在学习步骤中，采用各种计算机建模方法进行深度学习、并对设计及构建过程进行仿真和优化^[3]。

这一研究循环在类器官的构建过程中也有一定的体现，在新的类器官构建方案的开发早期，研究人员需要明确所需构建的类器官模型的体内发育过程，包括发育的中间状态及分化各阶段的分子机制；基于明确的生物过程，研究人员需要设计合适的类器官体外培养条件，实现具有特定细胞类型及特定结构的类器官体外分化诱导；在得到初步的模型后，需要对样品进行形态学观察、免疫荧光染色、单细胞测序等验证类器官的细胞

组成、形态结构以及与体内组织的相似性；基于验证的结果，研究人员需要进一步优化培养条件直至获得最优、最稳定的培养方案。在类器官构建方案的开发中，这一循环往往需要面对漫长的时间和繁复的人工操作，而合成生物学结合计算机辅助及深度学习，可以大大提高测试与学习的进程，指导类器官模型构建步入工程化、高效化的阶段。

3.2 合成生物学工具

近年来，多种合成生物学工具被应用于生命科学研究中，这些工具的开发与完善，在类器官的研究中也展现了广阔的发展前景 (图3B)。本小节将聚焦于现有及新兴的合成生物学工具的原理及其在类器官构建与优化过程中的应用与发展潜力。

3.2.1 光遗传学工具

利用光遗传学原理，可以设计基于光控开关的调控系统^[83]。由于光照控制的灵活性，可使刺激具有较高的空间和时间精度，因此光遗传方法比传统的药物操作具有明显优势。目前，光遗传学工具已在类器官的构建中已有了广泛的应用。Repina等^[84]利用光遗传学技术，在胚胎干细胞中激活 Wnt/ β -catenin 信号通路，诱导了细胞的分化、迁移与分选。研究人员也可利用光遗传技术在神经类器官中局部激活 SHH 信号。结合高分辨率空间转录组学和单细胞分析技术，研究人员发现这种局部诱导足以生成具备空间组织模式的类器官，并提出将光遗传学扰动与空间转录组学结合起来，重新编程并研究类器官中的不同细胞的命运和组织模式的策略^[85]。

3.2.2 工程化的细胞近/远程通信调控

在发育过程中，细胞间相互交流与细胞的分化及形态发生相关，而可扩散的形态发生因子及其梯度差异可以诱导特定细胞类型以不同空间顺序分化，这些信号及其受体共同构成了细胞近/远程通信网络。利用合成生物学，在体外构建短程或远程的信号转导，可以实现类器官构建过程中所需的细胞-细胞、细胞-基质之间互作以及形态因子在浓度、梯度上的精确、可控的调控。

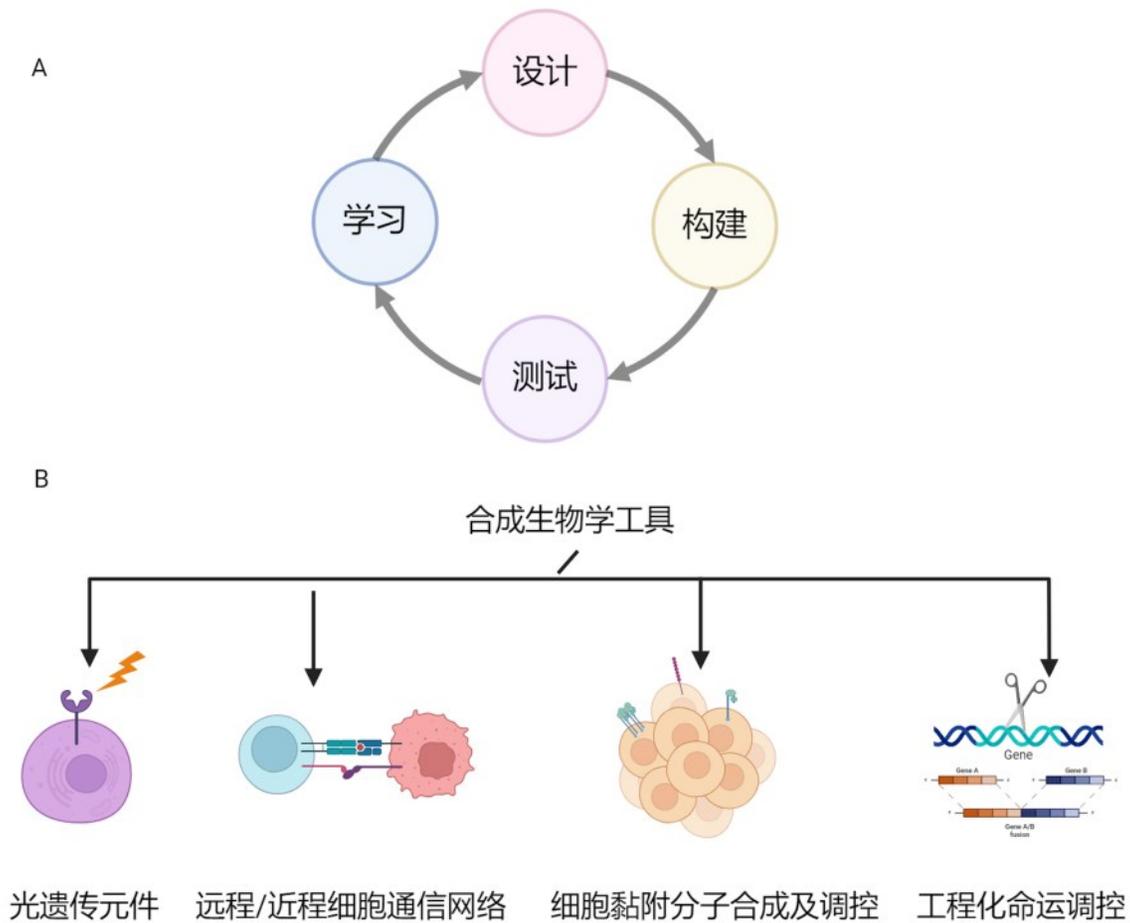


图3 合成生物学研究路线 (A) 与常见的合成生物学工具 (B)
Fig. 3 Roadmap of synthetic biology (A) and common synthetic biology tools (B).

细胞表面受体作为通信网络中不可或缺的一环,使细胞能够检测、处理和响应胞外微环境的信息。近年来,合成生物学家基于天然受体的物理部件与概念进行了合成受体的设计,使得细胞与细胞、细胞与胞外环境间信号的感知-响应过程可以被用户定制^[86]。其中,在天然系统中,Notch信号传导通路是决定细胞命运的重要通路之一,相邻细胞通过Notch受体传递信号可以调节细胞的分化、增殖和凋亡^[87]。基于Notch信号通路,合成生物学家合成了SynNotch系统,在该系统中,表达SynNotch受体的细胞识别呈递用户定义抗原的发送细胞,通过释放经工程改造的转录因子,诱导定制的转录调控^[88]。该合成的SynNorch系统,可以应用于类器官构建过程中,一方面作为细胞-细胞作用的报告基因在3D组织中监测细胞互作,另一方面可以定制特定的转录调控模式,诱导特

定的形态发生因子及受体产生。目前,已经有研究通过体外构建带有SynNotch的小鼠多能干细胞系,在2D的细胞培养及3D的小鼠嵌合胚胎培养中,成功识别了细胞与细胞的相互作用,并通过SynNotch激活神经元分化因子Neurogenin 1,当这些受体细胞与发送细胞接触时,两者之间形成的边界成功诱导了神经元分化^[89]。

在SynNotch系统的基础上,Lim团队^[90]构建了可以识别GFP并进行反应的工程化受体,并将编码这些受体的基因插入细胞,这些细胞与SynNotch系统结合后,构成了可识别扩散的信号分子的系统。基于该系统,可以在类器官构建过程中,实现用户定义的细胞的远程信号传导,识别可扩散的形态发生因子及相应的浓度梯度并进行响应,使得细胞转录调控及非对称性的形态发生在更为可控的条件下进行。

3.2.3 工程化细胞黏附分子

差异黏附假说认为,发育过程中液态组织的扩散和细胞的分离现象源于组织表面张力,而组织表面张力源于细胞间粘附性的差异^[91]。细胞间黏附性的差异源于内源性的黏附分子表达水平与钙粘蛋白类型的差异,这将最终影响细胞的形态发生以及细胞的自组装。目前,合成生物学工具已经实现了对细胞进行设计或重构,从而影响其内源性黏附分子的水平 and 类型,以实现对于类器官培养过程中3D结构的自组装过程的间接调控。

2023年, Lim团队^[92]通过将正交的细胞外相互作用与天然黏附分子(如钙黏蛋白和整合素)的细胞内结构域相结合,生成了多种合成的细胞黏附分子(synCAMs)。由此产生的分子产生了与天然相互作用相似的粘附特性的定制细胞-细胞相互作用。synCAMs胞内结构域的确主导了界面形态和力学,而不同的同型或异型胞外相互作用结构域独立地确定了细胞间的连接。这种合成的正交黏附分子工具能够合理地程序化组装独特的多细胞结构,以及实现自然组织的系统性重塑。基于此工具,类器官构建过程中复杂且相对随机的细胞自组装过程能够得到程序化地定义,充分降低类器官构建的异质性,也为类器官构建过程中细胞类型及细胞互作的确定提供了有效的保障。

3.2.4 合成基因与工程化细胞命运调控

细胞增殖、凋亡、迁移、分化是干细胞向更稳定、具有更细化功能、更庞大的细胞群体过渡的基本过程,在发育过程中,控制细胞群体的大小(包括细胞数量和细胞类型比例)对于组织器官的形成及稳定尤为重要^[93]。2022年,研究人员在哺乳动物细胞中设计并合成了一种系统,该系统可以在哺乳动物细胞中实现生长素的产生与对生长素的响应,并将其与控制细胞增殖与凋亡的基因相联系,从而实现细胞种群密度的调控^[94]。该方案的实现使得细胞在体外培养过程中的数量及不同类型细胞比例能够处于自发的、设计好的程序控制下,这在类器官构建过程中十分必要。

对于细胞分化过程的发生,经典表述认为细胞的基因功能以及它们形成的复杂调控网络在时空上控制了基因的表达量,从而编程了细胞命运决定(fate determination)的过程。2023年,有研

究通过定量实验和数理模型,通过基因拨动开关,探索细胞生长速率对经典人工合成基因线路-互抑制回路-的双稳态性的影响,发现了不同基因的表达量对生长速率呈现不平衡、不同步的响应,进而重塑细胞命运决定景观^[94]。基于不同的合成生物学基因线路,可以在体外实现对不同基因的表达调控,这使得针对类器官的细胞命运决定筛选有了相应的工具支持,当需要对细胞命运进行程序化调控时,不同基因线路的排列组合可以使得细胞命运至于工程化控制之下。总之,合成生物学能支持工程化的命运控制,在类器官中精确调控细胞的增殖、分化、凋亡等与细胞命运决定高度相关的事件,将复杂的组织生成过程拆分成更小的模块,从而实现精准调控。

与传统的类器官构建的模式相比,合成生物学工具可以以更可控的方式,从细胞命运决定、细胞通信、细胞自组织、细胞基因表达等多个方面对类器官的建立进行调控,从而形成与人体组织器官更相似的类器官模型。合成生物学工具也为理解器官组织形态、信号传导、以及更好地设计类器官培养方案等提供了新方法。

4 类器官对合成生物学的推动

自21世纪初至今,合成生物学已经经历了二十余年高速发展的阶段,新兴的合成生物学工具的产生与相关合成生物学方法的构建使得合成生物学的应用方向越来越广泛,包括细胞治疗、药物生产、生物材料合成等。但当下合成生物学的发展也面临着一定的挑战。伴随着类器官技术的不断发展,以类器官作为平台,目前已建立了多种系统性工具,以用于实现对组织器官发育、疾病发生发展、不同组织类型的细胞多样性、以及遗传信息变化等方面的分析。类器官在实现体内组织器官的细胞类型与结构重现的同时,具有与在体组织相比更易获得的优势,这使得依托类器官可进行高通量的筛选。系统性研究方法的应用,可以使得研究人员对发育或疾病发生进程有更全面精确的理解,也对合成生物学研究中系统性、模块化、高精确性地设计生物学元件提供了基础。本节将阐述合成生物学发展过程中面临的挑战与

困难，并探讨类器官及其衍生技术的发展对合成生物学研究的促进与推动作用。

4.1 合成生物学发展面临的挑战

当下，合成生物学仍然面临诸多挑战。比如，合成生物学的设计过程需要对天然生物元件及其相互作用，包括信号通路的激活、转导以及下游相应的过程有着全面且系统的把握，除此之外还需要大规模数据库的支撑。但目前真实的生物体中，仍然有大量的生物元件其功能、结构、以及互作模式尚未明确，且存在体内样本取样难，数量少的问题。同时，合成生物学工具在改造现有系统之外，还涉及到定制和动态合成基因组，这一过程高度依赖从组学实验中获得的全细胞模拟与深度学习，这对数据库有了更高的需求。此外，合成生物学工具需要大规模的平台进行学习测试，这需要高通量、可控制的载体作为基础。因此，类器官模型作为可以在体外高效模拟体内微环境的工具，可以提高合成生物学工具测试、学习、重构过程的效率及准确性。基于类器官模型衍生的组学研究及高通量的筛选，也可以使得合成生物学家能更好地把握天然生物系统中的分子机制与相应的生物学过程。

4.2 类器官转录图谱

如何评估类器官的质量，是类器官构建中的基本问题之一。除了理解类器官的体外分化效率、异质性外，类器官与体内组织器官的相似度如何是类器官质量控制的关键内容。相对于传统的形态观察、切片染色方法，高通量的单细胞测序技术可以实现对单个细胞进行遗传物质的分析。从细胞类型和基因表达模式上对类器官与体内组织进行更精准的比较分析，可更直观地研判二者的一致性。同时，研究人员也可以根据二者细胞类型和基因表达差异来对类器官构建方法进行改进。2015年，Treutlein等^[95]将单细胞测序技术与类器官构建结合，对脑类器官与胎儿新皮质的细胞组成以及祖细胞至神经元之间的谱系关系进行了分析比较，发现在他们所培养的脑类器官中，皮质细胞通过与胎儿组织高度相似的基因表达程序组

织成大脑皮质样区域。这为在脑类器官培养中研究人类皮质发育的遗传特征提供了理论依据。

类似的工具还应用于验证类器官的不同发育阶段与体内组织器官不同发育阶段的一致性上。2022年9月，Paola Arlotta团队^[96]对培养23天到6个月共八个不同发育阶段的皮质类器官进行了转录组、表观组和空间转录组等多个水平的单细胞测序，通过对结果进行分析，作者揭示了皮质类器官发育过程中的细胞多样性以及其与脑发育的一致性，且这种一致性不受代谢状态的影响。这也证实了人脑类器官在研究人脑发育和细胞命运决定中的重要作用。基于不同发育时间点的类器官转录组数据，也让研究人员更好地理解器官发育过程中的细胞类型发生与基因表达调控变化。

2023年，Pasca实验室^[97]为了更系统地理解形态发生素在神经系统发育以及神经类器官体外分化培养过程中发挥的作用，建立了人类神经细胞命运规范的形态发生图谱，为类器官体外诱导分化培养的条件选择提供了一定的指导。同年，Zhisong He等^[98]整合了现有的26个方案的36个单细胞转录组数据，收集到了一个超过170万细胞的完整的人类神经类器官细胞图谱，该图谱有助于评估神经类器官的保真度，表征受干扰和患病状态，并促进未来分化方案的制定。

随着越来越完善的单细胞测序方法和越来越多的类器官单细胞转录组数据的产生，人们可以系统地认识特定类器官或类细胞群体在发育过程中的调控，理解同一类型类器官不同分化方案产生的样本之间的异同。因此，这些探索有助于全面理解器官发育、疾病发生，为以后系统性、程序化的类器官培养体系的设计提供理论基础。利用类器官样本与体内组织相比更易获得的优势，尤其如脑组织等可及性低的体内组织，基于类器官的转录图谱的构建，合成生物学者也可以便利地研究组织器官发育、不同信号通路、以及疾病发生发展过程中相关的基因功能，从而更好地设计生物元件、系统以及相关的合成生物学工具。

4.3 类器官CRISPR筛选

CRISPR筛选是认识基因功能的有力工具。随

着体外高通量培养类器官方法的完善,以类器官为平台的CRISPR筛选在研究器官发育、疾病发生、组织再生等方面都展现出了显著优势。

2022年,基于6个转录因子的可诱导表达,研究人员建立了一个高效的小胶质细胞样细胞分化方案。研究人员在该系统中建立了可诱导的CRISPR干扰和激活,并针对“可靶向基因组”进行了三次筛选。这些筛选的结果揭示了控制小胶质细胞存活、活化和吞噬功能的基因,从而有助于实现对小胶质细胞的功能表征和治疗靶向。在此之前的研究中,Pasca团队建立了皮质类器官与类似皮质下结构的类器官,将二者融合培养建立了类器官组装体,模拟了前脑中间神经元的切向迁移过程。2023年,基于该组装体模型,研究人员以425个孤独症障碍谱系以及其他神经发育障碍疾病的相关基因作为候选进行了CRISPR筛选,发现了13个影响中间神经元分化的基因,以及33个影响中间神经元迁移的基因^[99]。

目前,结合类器官的CRISPR筛选填补了体内部分组织细胞难以获取的局限性,使得一些可及性较差的组织的发育过程能在体外得到重现,同时针对疾病模型或相应药物靶点进行筛选,也为许多药物的开发提供了与体内组织高度一致的临床前模型,有助于疾病发生发展机制与疾病相关药物靶点的探索。这些实践也有助于合成生物学研究者更好地了解疾病模型,把握与疾病发生发展以及药物作用相关的机制,促进合成生物学工具在临床上的研发与应用。

5 总结与展望

本文概述了类器官及合成生物学的发展过程,并探讨了传统类器官构建及优化过程中体现的合成生物学策略,以及合成生物学工具在类器官优化及类器官功能扩充中的作用。在类器官与合成生物学协同发展中,值得关注的代表性方向包括利用类器官模型促进生物元件设计。比如,类器官衍生的组学图谱构建以及高通量CRISPR筛选,可为合成生物学的设计与构建提供更便利、全面、完善的数据基础,使得合成生物学家能够更快、更容易地把握相应的生物学过程,探索可合成的

生物元件。又如,合成生物学面临的一个重大挑战是设计细胞的分化和特化,以便在合成多细胞系统中进行有效和富有成果的分工。到目前为止,合成生物学主要集中在通过单一任务设计的种群中的每个细胞上。而类器官与合成生物学的结合有望在未来实现具有特定功能的合成器官的体外构建,能够在体外精确地、可调控的构建特定的组织与器官并实现相应的功能。

对类器官模型的体外构建而言,目前也存在一定的技术限制,比如包括繁琐的人工操作、较高的个体间与批次间差异、部分类型的类器官需要较长的培养时间等。尤其是针对结构或谱系组成复杂的类器官的构建,该过程高度依赖于对培养环境以及细胞命运的精准调控。如何在类器官构建中借力合成生物学原理与技术,是值得关注的方向。以目前常用的动物来源的基质胶使用为例,该材料存在批次间差异,且无法完全还原体内正常组织的结构,因此成为类器官优化构建的瓶颈之一。结合合成生物学相关元件目前已经可以实现基因的可编程性调控,但在胞外环境的重构方面仍需要进一步地优化和探索。比如,具有DNA编码特性的材料已经有了一定的研究,可基于此在体外高效生产工程化的生物材料,或许在未来为类器官构建时的胞外环境需求提供潜在解决方案。

总之,在过去十多年,作为体内组织器官在体外的3D微缩模型,类器官技术已得到广泛应用。将类器官技术与合成生物学相结合,可以弥补构建类器官过程中存在的一些限制。基于类器官模型的多种合成生物学技术或原理的整合,也为合成生物学在体外精准操控生物元件的合成与重构等方面提供了有效的实践平台。在发展的过程中,类器官与合成生物学两者相辅相成,其协同发展将有望为今后研究人体器官、组织提供更优的生理相关模型,也有望进一步促进合成生物学工具的开发与实践。

参 考 文 献

- [1] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(10): 2329-2340.

- [2] XIANG Y F, CAKIR B, PARK I H. Generation of regionally specified human brain organoids resembling thalamus development[J]. STAR Protocols, 2020, 1(1): 100001.
- [3] WANG J Y, NIELSEN J, LIU Z H. Synthetic biology advanced natural product discovery[J]. Metabolites, 2021, 11(11): 785.
- [4] 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[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3255-3266.
- LI T, YANG J S, YANG W J. Advances of *in vitro* culture models derived from lung adult stem cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3255-3266.
- [5] NIKOLAEV M, MITROFANOVA O, BROGUIERE N, et al. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis[J]. Nature, 2020, 585(7826): 574-578.
- [6] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. Cell, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [7] LI M, IZPISUA BELMONTE J C. Organoids - preclinical models of human disease[J]. The New England Journal of Medicine, 2019, 380(6): 569-579.
- [8] LANCASTER M A. Brain organoids: a new frontier of human neuroscience research[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2021, 111: 1-3.
- [9] MEIER A B, ZAWADA D, DE ANGELIS M T, et al. Epicardial single-cell genomics uncovers principles of human epicardium biology in heart development and disease[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(12): 1787-1800.
- [10] UZQUIANO A, KEDAIGLE A J, PIGONI M, et al. Proper acquisition of cell class identity in organoids allows definition of fate specification programs of the human cerebral cortex[J]. Cell, 2022, 185(20): 3770-3788.e27.
- [11] BOUFFI C, WIKENHEISER-BROKAMP K A, CHATURVEDI P, et al. *In vivo* development of immune tissue in human intestinal organoids transplanted into humanized mice[J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(6): 824-831.
- [12] GABRIEL E, ALBANNA W, PASQUINI G, et al. Human brain organoids assemble functionally integrated bilateral optic vesicles[J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(10): 1740-1757.e8.
- [13] SCHMIDT C, DEYETT A, ILMER T, et al. Multi-chamber cardioids unravel human heart development and cardiac defects [J]. Cell, 2023, 186(25): 5587-5605.e27.
- [14] FAUSTINO MARTINS J M, FISCHER C, URZI A, et al. Self-organizing 3D human trunk neuromuscular organoids[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(2): 172-186.e6.
- [15] PELLEGRINI L, LANCASTER M A. Modeling neurodegeneration with mutant-tau organoids[J]. Cell, 2021, 184(17): 4377-4379.
- [16] JIANG S W, ZHAO H R, ZHANG W J, et al. An automated organoid platform with inter-organoid homogeneity and inter-patient heterogeneity[J]. Cell Reports Medicine, 2020, 1(9): 100161.
- [17] CORRÒ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2020, 319(1): C151-C165.
- [18] BIJUKUMAR G, SOMVANSHI P R. Reverse engineering in biotechnology: the role of genetic engineering in synthetic biology[J]. Methods in Molecular Biology, 2024, 2719: 307-324.
- [19] CAMERON D E, BASHOR C J, COLLINS J J. A brief history of synthetic biology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(5): 381-390.
- [20] SMITH E, COCHRANE W J. Cystic organoid teratoma; report of a case[J]. Canadian Medical Association Journal, 1946, 55(2): 151.
- [21] WILSON H V. A new method by which sponges may be artificially reared[J]. Science, 1907, 25(649): 912-915.
- [22] TUNG T C, KÜ S H. Experimental studies on the development of the pronephric duct in anuran embryos[J]. Journal of Anatomy, 1944, 78(Pt 1-2): 52-57.
- [23] WEISS P, TAYLOR A C. Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1960, 46(9): 1177-1185.
- [24] EIRAKU M, WATANABE K, MATSUO-TAKASAKI M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(5): 519-532.
- [25] SATO T, VRIES R G, SNIPPETT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-265.
- [26] KIM T H, SHIVDASANI R A. Stomach development, stem cells and disease[J]. Development, 2016, 143(4): 554-565.
- [27] BROUTIER L, ANDERSSON-ROLF A, HINDLEY C J, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9): 1724-1743.
- [28] HUCH M, GEHART H, VAN BOXTEL R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver[J]. Cell, 2015, 160(1-2): 299-312.
- [29] NARAYANAN S, SURETTE F A, HAHN Y S. The immune landscape in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Immune Network, 2016, 16(3): 147-158.
- [30] 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.
- [31] MORIZANE R, BONVENTRE J V. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells[J]. Nature Protocols, 2017, 12(1): 195-207.
- [32] CHEN Y W, HUANG S X, DE CARVALHO A L R T, et al. A

- three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(5): 542-549.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] ASSAWACHANANONT J, MANDAI M, OKAMOTO S, et al. Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5): 662-674.
- [36] KIM M, MUN H, SUNG C O, et al. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3991.
- [37] QU M L, XIONG L, LYU Y L, et al. Establishment of intestinal organoid cultures modeling injury-associated epithelial regeneration[J]. *Cell Research*, 2021, 31(3): 259-271.
- [38] LU X X, YANG J J, XIANG Y F. Modeling human neurodevelopmental diseases with brain organoids[J]. *Cell Regeneration*, 2022, 11(1): 1.
- [39] TANG X Y, WU S S, WANG D, et al. Human organoids in basic research and clinical applications[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 168.
- [40] CAKIR B, XIANG Y F, TANAKA Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1169-1175.
- [41] ZHAO Z X, CHEN X Y, DOWBAJ A M, et al. Organoids[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, 2: 94.
- [42] TAO T T, DENG P W, WANG Y Q, et al. Microengineered multi-organoid system from hiPSCs to recapitulate human liver-islet axis in normal and type 2 diabetes[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(5): e2103495.
- [43] ZHANG W J, LI J W, ZHOU J Q, et al. Translational organoid technology - the convergence of chemical, mechanical, and computational biology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(9): 1121-1135.
- [44] PARK S E, GEORGESCU A, HUH D. Organoids-on-a-chip[J]. *Science*, 2019, 364(6444): 960-965.
- [45] JI S Y, FENG L, FU Z L, et al. Pharmaco-proteogenomic characterization of liver cancer organoids for precision oncology[J]. *Science Translational Medicine*, 2023, 15(706): eadg3358.
- [46] LIN L, DEMARTINO J, WANG D S, et al. Unbiased transcription factor CRISPR screen identifies ZNF800 as master repressor of enteroendocrine differentiation[J]. *Science*, 2023, 382(6669): 451-458.
- [47] HENDRIKS D, BROUWERS J F, HAMER K, et al. Engineered human hepatocyte organoids enable CRISPR-based target discovery and drug screening for steatosis[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(11): 1567-1581.
- [48] HANSEN S L, LARSEN H L, PIKKUPEURA L M, et al. An organoid-based CRISPR-Cas9 screen for regulators of intestinal epithelial maturation and cell fate[J]. *Science Advances*, 2023, 9(28): eadg4055.
- [49] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [50] ELOWITZ M B, LEIBLER S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 335-338.
- [51] MUELLER S, CAO X M, WELKER R, et al. Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(10): 7897-7904.
- [52] GIBSON D G, GLASS J I, LARTIGUE C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome [J]. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56.
- [53] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [54] LI L J, DEGARDIN M, LAVERGNE T, et al. Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(3): 826-829.
- [55] SHI Y C, WU Q, WANG X Q. Modeling brain development and diseases with human cerebral organoids[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2021, 66: 103-115.
- [56] MENG F K, ELLIS T. The second decade of synthetic biology: 2010-2020[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5174.
- [57] ANDREWS L B, NIELSEN A A K, VOIGT C A. Cellular checkpoint control using programmable sequential logic[J]. *Science*, 2018, 361(6408): eaap8987.
- [58] MIURA Y, LI M Y, BIREY F, et al. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12): 1421-1430.
- [59] TODA S, BLAUCH L R, TANG S K Y, et al. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling[J]. *Science*, 2018, 361(6398): 156-162.
- [60] MCCracken K W, CATÁ E M, CRAWFORD C M, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 400-404.
- [61] EIRAKU M, TAKATA N, ISHIBASHI H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 51-56.

- [62] CRUZ N M, SONG X W, CZERNIECKI S M, et al. Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease[J]. *Nature Materials*, 2017, 16(11): 1112-1119.
- [63] CEDERQUIST G Y, ASCIOLLA J J, TCHIEU J, et al. Specification of positional identity in forebrain organoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 436-444.
- [64] DEMERS C J, SOUNDARARAJAN P, CHENNAMPALLY P, et al. Development-on-chip: *in vitro* neural tube patterning with a microfluidic device[J]. *Development*, 2016, 143(11): 1884-1892.
- [65] RIFES P, ISAKSSON M, RATHORE G S, et al. Modeling neural tube development by differentiation of human embryonic stem cells in a microfluidic WNT gradient[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(11): 1265-1273.
- [66] LEE K K, MCCAULEY H A, BRODA T R, et al. Human stomach-on-a-chip with luminal flow and peristaltic-like motility[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(20): 3079-3085.
- [67] HOMAN K A, GUPTA N, KROLL K T, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids *in vitro*[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(3): 255-262.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] LIU X, CHENG Y L, ABRAHAM J M, et al. Modeling Wnt signaling by CRISPR-Cas9 genome editing recapitulates neoplasia in human Barrett epithelial organoids[J]. *Cancer Letters*, 2018, 436: 109-118.
- [71] ZHAO H, CHENG Y L, KALRA A, et al. Generation and multiomic profiling of a *TP53/CDKN2A* double-knockout gastroesophageal junction organoid model[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(673): eabq6146.
- [72] TRUJILLO C A, RICE E S, SCHAEFER N K, et al. Reintroduction of the archaic variant of *NOVA1* in cortical organoids alters neurodevelopment[J]. *Science*, 2021, 371(6530): eaax2537.
- [73] ARTEGIANI B, HENDRIKS D, BEUMER J, et al. Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(3): 321-331.
- [74] ESK C, LINDENHOFER D, HAENDELER S, et al. A human tissue screen identifies a regulator of ER secretion as a brain-size determinant[J]. *Science*, 2020, 370(6519): 935-941.
- [75] BORTOLOMAI I, SANDRI M, DRAGHICI E, et al. Gene modification and three-dimensional scaffolds as novel tools to allow the use of postnatal thymic epithelial cells for *Thymus* regeneration approaches[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2019, 8(10): 1107-1122.
- [76] ROTHENBÜCHER T S P, GÜRBÜZ H, PEREIRA M P, et al. Next generation human brain models: engineered flat brain organoids featuring gyrification[J]. *Biofabrication*, 2021, 13(1): 011001.
- [77] CHEN S S, CHEN X, GENG Z, et al. The horizon of bone organoid: a perspective on construction and application[J]. *Bioactive Materials*, 2022, 18: 15-25.
- [78] XIANG Y F, TANAKA Y, PATTERSON B, et al. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(3): 383-398.e7.
- [79] ANDERSEN J, REVAH O, MIURA Y, et al. Generation of functional human 3D cortico-motor assembloids[J]. *Cell*, 2020, 183(7): 1913-1929.e26.
- [80] LIND J U, BUSBEE T A, VALENTINE A D, et al. Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing[J]. *Nature Materials*, 2017, 16(3): 303-308.
- [81] ZHANG Y S, ALEMAN J, SHIN S R, et al. Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual *in situ* monitoring of organoid behaviors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(12): E2293-E2302.
- [82] STEPHENSON A, LASTRA L, NGUYEN B, et al. Physical laboratory automation in synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(11): 3156-3169.
- [83] CHIA N, LEE S Y, TONG Y J. Optogenetic tools for microbial synthetic biology[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 59: 107953.
- [84] REPINA N A, JOHNSON H J, BAO X P, et al. Optogenetic control of Wnt signaling models cell-intrinsic embryonic patterning using 2D human pluripotent stem cell culture[J]. *Development*, 2023, 150(14): dev201386.
- [85] LEGNINI I, EMMENEGGER L, ZAPPULO A, et al. Spatiotemporal, optogenetic control of gene expression in organoids[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(10): 1544-1552.
- [86] MANHAS J, EDELSTEIN H I, LEONARD J N, et al. The evolution of synthetic receptor systems[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(3): 244-255.
- [87] WANG H F, ZANG C Z, LIU X S, et al. The role of Notch receptors in transcriptional regulation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 230(5): 982-988.
- [88] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic Notch receptors[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 780-791.
- [89] MALAGUTI M, PORTERO MIGUELES R, ANNOH J, et al.

- SyNPL: synthetic Notch pluripotent cell lines to monitor and manipulate cell interactions *in vitro* and *in vivo*[J]. *Development*, 2022, 149(12): dev200226.
- [90] TODA S, MCKEITHAN W L, HAKKINEN T J, et al. Engineering synthetic morphogen systems that can program multicellular patterning[J]. *Science*, 2020, 370(6514): 327-331.
- [91] FOTY R A, STEINBERG M S. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation[J]. *Developmental Biology*, 2005, 278(1): 255-263.
- [92] STEVENS A J, HARRIS A R, GERDTS J, et al. Programming multicellular assembly with synthetic cell adhesion molecules [J]. *Nature*, 2023, 614(7946): 144-152.
- [93] TRENTESAUX C, YAMADA T, KLEIN O D, et al. Harnessing synthetic biology to engineer organoids and tissues [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(1): 10-19.
- [94] ZHU J W, CHU P, FU X F. Unbalanced response to growth variations reshapes the cell fate decision landscape[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(9): 1097-1104.
- [95] CAMP J G, BADSHA F, FLORIO M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(51): 15672-15677.
- [96] PAULSEN B, VELASCO S, KEDAIGLE A J, et al. Autism genes converge on asynchronous development of shared neuron classes[J]. *Nature*, 2022, 602(7896): 268-273.
- [97] AMIN N D, KELLEY K W, HAO J, et al. Generating human neural diversity with a multiplexed morphogen screen in organoids[EB/OL]. *bioRxiv*, 2023: 2023.05.31.541819[2023-12-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.05.31.541819v1>.
- [98] HE Z S, DONY L, Fleck J S, et al. An integrated transcriptomic cell atlas of human neural organoids[EB/OL]. *bioRxiv*, 2023: 2023.10.05.561097[2023-12-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.10.05.561097v1>.
- [99] MENG X L, YAO D, IMAIZUMI K, et al. Assembloid CRISPR screens reveal impact of disease genes in human neurodevelopment[J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 359-366.



通讯作者: 向阳飞(1983—),男,博士,研究员。研究方向为干细胞与神经生物学。

E-mail: xiangyf@shanghaitech.edu.cn



第一作者: 陈子苓(2000—),女,硕士研究生。研究方向为神经类器官。

E-mail: chenzl2022@shanghaitech.edu.cn