

·技术与应用·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2023.02.0117

# 体外功能性肺组织模型构建、调控及在肺纤维化和 COVID-19 中的应用

梁雨桐<sup>1,2</sup>, 薛子阳<sup>1,2</sup>, 惠涛涛<sup>1,2</sup>, 郑东梅<sup>1,2</sup>, 王琳<sup>1,2\*</sup>

(1. 西安外事学院 a. 医学院; b. 生命科学应用研究院, 中国陕西 西安 710077; 2. 精准抗衰健康产品研发与转化陕西省高校工程研究中心, 中国陕西 西安 710077)

**摘要:** 肺纤维化是很多肺部疾病发生发展过程中出现的病理现象。近年出现的 2019 冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)引发的呼吸系统综合征也会出现弥漫性肺泡损伤, 并诱发肺纤维化。因此, 开展肺纤维化和 COVID-19 体外模型构建与调控研究在肺部疾病治疗和药物筛选方面意义重大。目前, 现有研究已建立了多种体外肺组织二维、三维细胞培养模型, 本文将全面概述这些模型的构建方法, 并结合这些模型在肺纤维化及 COVID-19 中的应用研究, 对体外肺组织模型在药物传递、高通量药物筛选及发病机制研究等生物医学领域中的应用前景进行综述, 为其进一步研究提供参考。

**关键词:** 体外模型构建; 调控; 肺纤维化; 2019 冠状病毒病(COVID-19); 肺组织

中图分类号: Q81, R563.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)02-0152-07

## Construction and Regulation of *in vitro* Functional Lung Tissue Models and Their Application in Pulmonary Fibrosis and COVID-19

LIANG Yutong<sup>1,2</sup>, XUE Ziyang<sup>1,2</sup>, XI Taotao<sup>1,2</sup>, ZHENG Dongmei<sup>1,2</sup>, WANG Lin<sup>1,2\*</sup>

(1. a. College of Medicine; b. Life Science Applied Research Institute, Xi'an International University, Xi'an 710077, Shaanxi, China; 2. Engineering Research Center of Personalized Anti-aging Health Product Development and Transformation, Universities of Shaanxi Province, Xi'an 710077, Shaanxi, China)

**Abstract:** Pulmonary fibrosis is a pathological phenomenon that occurs during the development of many lung diseases. Diffuse alveolar damage can appear in the respiratory syndrome caused by coronavirus disease 2019 (COVID-19) in recent years, inducing pulmonary fibrosis. In order to cure these lung diseases and screen out drugs, it is of great significance to study the construction and regulation of *in vitro* lung tissue models. At present, a variety of two-dimensional and three-dimensional lung cell culture models have been established. This article gives an overview of the construction methods of these models and their application in pulmonary fibrosis and COVID-19, and also describes the application prospects of the models in biomedical fields, such as drug delivery, high-throughput drug screening, and pathogenesis research, so as to provide new insights for related studies in the future.

**Key words:** *in vitro* model construction; regulation; pulmonary fibrosis; coronavirus disease 2019 (COVID-19); lung tissue

(Life Science Research, 2024, 28(2): 152-158)

收稿日期: 2023-02-01; 修回日期: 2023-04-24; 网络首发日期: 2023-06-25

基金项目: 陕西高校青年创新团队项目; 秦创原“科学家+工程师”队伍建设项目(2024QCY-KXJ069); 陕西省“千人计划”青年项目; 陕西省重点研发计划一般项目-社会发展领域(2023-YBSF-039)

作者简介: 梁雨桐(1994—), 女, 陕西西安人, 硕士, 讲师; \*通信作者: 王琳(1980—), 女, 山西运城人, 博士, 西安外事学院医学院教授, 主要从事肿瘤组织模型构建和病理机理研究, E-mail: wanglin0527@126.com。

肺纤维化是一类许多肺部疾病都会出现的病理改变且严重影响人体呼吸功能。其特征为肺成纤维细胞增殖、大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)聚集并伴炎症损伤及组织结构破坏。在肺纤维化的机制及治疗方式研究方面,构建相比体内更易操作的肺组织的体外模型非常重要。近年出现的2019冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)也是诱发肺纤维化的重要因素之一。本文将阐述适用于体外疾病研究的肺组织模型,以期促进肺纤维化及 COVID-19 的进一步研究。

早期体外肺组织研究常采用二维细胞培养模型和动物模型,但这两种方法均存在一定的局限性。其中,二维细胞培养不能复制病理生理组织的纤维化状态,且无法真实模拟在体纤维化的微环境。虽然动物肺损伤模型可以重现复杂人类疾病的某些方面,有助于人们了解肺部发育和疾病<sup>[1]</sup>,但是其周期长、价格高,并且动物和人类的肺生理学之间存在许多差异,例如:小鼠肺发育迅速,直到出生后才开始形成肺泡,而人类肺在开始肺泡化之前会经历许多额外的分支,这导致许多在临床前研究中疗效良好的药物在临床试验中并不能发挥稳定的功能。与上述两种方法相比,三维培养环境不仅可实现细胞-细胞和细胞-基质相互作用,还可开展细胞迁移、趋化性、牵引和整合素黏附等研究,提高人们对人类肺生理学的理解。所以,体外三维肺组织模型构建可以部分弥补二维细胞培养和动物模型的不足,更加真实再现体内细胞生长微环境<sup>[2]</sup>。此外,体外三维肺组织模型还可以模拟肺组织细胞微环境中的机械力、基质刚度、牵张力等力学因素,更好地模拟间质组织纤维化的关键特征,提高人们对其生物力学及力学生物学的理解<sup>[3]</sup>。因此,在体外构建具有可靠肺组织特性的三维细胞培养系统,有助于提高人们对肺部疾病的理解和治疗手段,并为大规模药物筛选、细胞-细胞相互作用的分子水平分析,以及通过个性化药物研究或治疗肺部疾病提供强大的技术平台。

## 1 体外细胞模型构建方法

### 1.1 体外二维细胞培养模型构建方法

目前,体外二维细胞培养模型是将细胞分离后培养在含有特定成分的特质容器中,可用于评估细胞对可溶性生长因子和 ECM 的反应,是开

展体外肺组织研究的一个标准平台,也是研究疾病机理、高通量筛选药物的一个简单可靠平台。二维细胞培养模型针对不同损伤类型有多种模拟方式,以实现药物筛选、机制研究等目的。例如:Bobba 等<sup>[4]</sup>通过离体灌洗从肺组织中分离出肺泡巨噬细胞后,将其在空气-液体界面处振荡施压培养 16 h,从而获得模拟体外肺组织气压伤的体外模型。

### 1.2 体外三维肺组织模型构建方法

#### 1.2.1 三维球体自组装法

三维球体自组装法多被用于研究三维细胞-细胞和细胞-基质相互作用,具有通量高、较易实现等特点<sup>[5]</sup>。肺细胞三维球体是指将人肺细胞或肺干细胞群利用低黏附板、悬滴等方法以聚集形式培养,在体外形成用于癌症研究的多细胞球体。通常,人们根据培养方法以及球体生物学的差异对三维球体进行分类<sup>[6]</sup>。在球体培养过程中,小的细胞聚集生长,可与原始微环境中的细胞相互作用<sup>[7]</sup>。研究表明,将球体培养的优点与新的微环境制造方法相结合,适用于细胞的高通量筛选<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.2 类器官法

肺类器官是一种三维细胞与水凝胶的复合物。在体外培养中,肺类器官可用于模拟人体器官发育和各种病理的环境,为个性化预测药物反应研究提供了新思路<sup>[9]</sup>。此外,在类器官培养过程中,人们可以通过基因编辑等手法构建一种多功能模型,以便遗传性、恶性和感染性肺部疾病的体外研究。研究表明,依托支气管肺泡灌洗可以建立长期扩张的人气道类器官<sup>[10]</sup>。

与三维球体相比,类器官通常能更好地复制组织和组织的形状。根据细胞来源,类器官可以分为两种不同的类型:一种是诱导性多能干细胞衍生的类器官;另一种是由成体干细胞衍生的类器官。Strikoudis 等<sup>[11]</sup>发现,人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)衍生的三维肺类器官是一种非常有价值的肺纤维化模型。基于发育范式,hPSC 在体内和体外可分化为基底、杯状、Clara、纤毛、I 型和 II 型肺泡上皮细胞。在类器官模型体外调控方面,2022 年 Valdoz 等<sup>[12]</sup>发现,通过增加 ECM 来改变模型的机械力有助于在体外培养肺类器官,且能更好地模拟肺组织中的细胞-细胞相互作用。

#### 1.2.3 三维生物打印法

三维生物打印法,即在细胞打印过程中,精

准控制细胞-凝胶液滴的打印位置,并通过多层打印构建多细胞/凝胶体系的三维模型的一种技术。与传统的组织工程技术相比,三维生物打印的优势主要有:1)可同时对“多细胞/材料”的二维或三维体系进行构建,并且可保证体系内的生物活性;2)经计算机控制在时间和空间两维度实施精准打印;3)具有三维的细胞培养环境。三维生物打印凭借其高通量、精确调控多种类型细胞的结构和位置而具有显著的技术优势。有研究利用三维生物打印技术获得了肺组织模型,并将其移植到肺切除术后犬的胸腔内,结果表明,移植犬具有较低的并发症发病率和死亡率,且三维打印的肺组织在移植犬体内无额外副作用,具有良好的相容性和耐受性<sup>[13]</sup>。在模型调控方面,Lewis等<sup>[14]</sup>发现,利用光可降解的微球作为模板形成的模型肺泡可以创建生理相关的囊肿结构。由此可见,三维生物打印法在精准构建器官模型、高通量筛选药物等方面具有更广泛的应用价值。

#### 1.2.4 微流控生物反应器和器官芯片法

虽然三维生物打印法具有巨大的应用前景,但是其在流体流动和机械刺激方面仍有很大的局限性。现阶段,将细胞、类器官或三维生物打印组织与器官芯片技术相结合,进而把间质流体流动、机械应变和静水压力整合到模型中成为研究的热点。Stucki等<sup>[15]</sup>开发了一种呼吸肺芯片模型,此模型由原代人肺泡细胞和原代肺内皮细胞组成,具有被动的介质流动交换机制和循环机制,能够复制出独特的肺泡微环境特征,如呼吸运动、空气-血液屏障和空气-液体等。这种可呼吸的肺芯片与患者原代I型肺泡细胞、II型肺泡细胞和肺内皮细胞相结合,有可能成为肺研究、药物发现和精准医疗的宝贵工具。

在肺组织模型的力学调控方面,目前人们已经开发出多种不同的力学加载设备及力学刺激方式用于生物力学研究。相关研究表明,牵张力可以有效促进细胞活性和功能,不同牵张力对细胞增殖有不同的影响<sup>[16]</sup>。Huh等<sup>[17]</sup>报道了一种重构人肺组织的肺泡-毛细血管界面的微流控系统,对此系统施加循环的机械应变可刺激氧化硅纳米粒子转运到上皮和内皮的微血管通道中。目前,微流控体外模型是研究肺组织机械变化的重要手段。

#### 1.2.5 脱细胞组织基质法(支架法)

脱细胞组织基质是目前应用较多的三维培养体系,旨在通过物理、化学和生物等方法从动物或

人的组织器官中去除引起免疫排斥的细胞,保留原组织结构和成分。由于其具有与原组织器官相似的结构和成分,在组织工程和生物医学的应用领域受到广泛关注。在模型的体外调控方面,有研究以脱细胞组织基质为研究平台发现,肺组织所处ECM成分及其三维空间结构等微环境的改变影响了肺纤维化疾病的进程<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.6 精密切割人/动物组织切片法

未经脱细胞的正常或病变组织切片被称为精密切割组织切片或离体组织。精密切割人/动物肺组织切片保留了类似于体内天然条件的肺组织结构、ECM蛋白质组成和硬度,并且具有活的细胞。用低熔点琼脂糖填充外科手术切除的人或动物肺组织,经精密切割成300~1000 μm厚的切片后进行体外培养,存活率测定结果显示,在第7天研究人员仍可记录到支气管上皮细胞的纤毛搏动,说明肺组织的精密切割切片在1周内仍具有细胞活性<sup>[19]</sup>。目前,精密切割组织切片的使用正在从基质-细胞相互作用的机理研究扩展到药物发现;而且,由于其可保存ECM作为结构支持和储存可溶性因子的优势,被认为是用于转化研究的较先进技术。

## 2 体外模型在肺纤维化研究中的应用

肺纤维化是一种慢性不可逆的肺间质组织异质性病变,会阻碍正常的肺生理功能(如呼吸),导致器官功能障碍、气体交换中断,并最终使患者因呼吸衰竭而死亡。肺纤维化诱因广泛,其中,ECM弹性增加与成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化,可引起纤维化组织内的生物力学微环境发生显著变化。目前,临床对于特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)的治疗仅限于两种美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的药物:吡非尼酮和尼达尼布。针对肺纤维化的药物研究,如果在动物实验与人体临床试验前进行肺体外模型检测,可进一步节约药物研发成本。

### 2.1 二维细胞培养模型在肺纤维化研究中的应用

在肺纤维化研究中,二维细胞培养模型应用广泛。例如,Cahill等<sup>[20]</sup>在研究新蛋白质对肺细胞的影响过程中采用了二维细胞培养的方式。此外,有研究表明,基于体外二维细胞培养模型可以开展抗生素对肺细胞的表型、增殖、细胞因子分泌等方面影响的研究<sup>[21]</sup>。Xu等<sup>[22]</sup>基于体外二维细

胞培养模型开发了一种筛选抗纤维化药物的高通量体外分析方法。该方法形成的结节类似于 IPF 的成纤维细胞病灶,在体外高通量药物筛选试验中研究人员可以通过结节计数证明抗纤维化剂的可行性。但是,二维细胞培养模型无法模拟肺组织的三维特性,也不具备细胞基底极性及正常人肺内细胞的细胞-基质相互作用。此外,由于培养容器的基质硬度,二维细胞培养模型在评估细胞力学的研究方面也存在局限。

## 2.2 三维模型在肺纤维化研究中的应用

三维肺组织模型能够模拟人类肺的结构、功能以及细胞和基质的相互作用,因此不仅可用于体外药物测试,在新药靶点的识别和新药机制的探索中也有应用潜力。I 型胶原是 IPF 病灶内的主要 ECM 成分,因此,由 I 型胶原制备的水凝胶多用于构建体外肺纤维化三维培养系统。动物 I 型胶原可以在中性 pH 下产生新生纤维,在聚合过程中成纤维细胞通过整合素黏连封装、附着和收缩胶原水凝胶网络<sup>[23]</sup>。Arora 等<sup>[24]</sup>研究发现,原纤维化细胞因子转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 介导的成纤维细胞胶原收缩、胶原凝胶顺应性的程度与人  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白的表达水平成正比。此外,经调整 I 型胶原水凝胶与人肺组织的力学特性可以相匹配,而且 I 型胶原水凝胶可提供长期稳定的 ECM,克服了其他天然水凝胶的局限性<sup>[25]</sup>。

目前,肺类器官在大量肺发育的促纤维化信号研究中应用广泛<sup>[26]</sup>。另外,在 IPF 疾病研究中,由于类器官和球体培养物都含有上皮细胞,所以可以用来模拟上皮损伤。研究表明,这两种系统都可以进行长期培养(>3 个月)及慢性药物测试<sup>[27]</sup>。肺细胞三维球体和类器官是自组装成类似于人类肺的结构,与二者不同,脱细胞肺组织模型模拟了天然肺 ECM 的组成、结构和硬度,是体外肺纤维化研究的重要模型。人类 IPF 供体的脱细胞肺组织模型可以用于对病理 ECM 和基质硬度诱导的前纤维化表型进行研究。Booth 等<sup>[28]</sup>使用脱细胞 IPF 人类肺作为体外研究模型,通过 Western-blot、放射免疫沉淀和免疫组织化学证实,该模型保留了一定数量的弹性蛋白、糖胺聚糖和胶原;而且,与正常人类肺基质(~2 kPa)相比,IPF 人类肺基质在脱细胞后保留了更高的病理基质刚度(~16 kPa)。

精密切割肺组织切片比其他三维体外肺组织模型更好地复制了肺结构的细胞-细胞和细胞-

基质相互作用。但是,由于培养时间极短(<1 周),其无法作为慢性、长期药物测试平台。相关报道指出,从正常肺组织中创建的离体肺组织切片(pre-cision-cut lung slice, PCLS)可用于研究成纤维细胞激活过程、生长因子和炎性细胞因子导致的促纤维化途径及 IPF 中基质沉积增加等;从 IPF 肺组织中创建的 PCLS 可用于研究成纤维细胞病灶的形成和 ECM 积累<sup>[29]</sup>。

## 3 体外模型在 COVID-19 研究中的应用

大多数 COVID-19 患者在病毒感染后 25 周出现纤维蛋白沉积和炎症细胞及成纤维细胞的浸润,12 个月后,肺纤维化随着胶原沉积和间质中成纤维细胞的增殖进一步加剧;相关尸检结果显示,纤维化在一定水平上与 COVID-19 的严重程度和持续时间正相关<sup>[30]</sup>。这些发现均表明,COVID-19 会诱发包括肺纤维化在内的肺部异常。然而,由于临床相关模型的有限可用性,其分子机制知之甚少。目前,可用于 COVID-19 分子机制研究的体外模型包括:永生化细胞系或原代细胞的二维细胞培养模型;源自肺、肺泡、支气管和其他器官的三维培养模型。

### 3.1 二维细胞培养模型在 COVID-19 研究中的应用

永生细胞的单层培养已被广泛用于分离新型冠状病毒。例如,VeroE6/TMPRSS2 细胞被用于分离呼吸道标本中的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)<sup>[31]</sup>。Vero 细胞系源自非洲绿猴肾,是疫苗生产领域应用最广泛的细胞系,并且一直是全球常见的 SARS-CoV-2 的分离细胞系之一。已知 Vero 细胞表达高水平的血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2),在使用 SARS-CoV-2 感染细胞 3 d 后,研究人员观察到细胞变圆并产生病变效应<sup>[32]</sup>。此外,A549 细胞是一种表达 ACE2 的人肺泡基底上皮癌细胞系,也被证明可以作为 COVID-19 体外研究的细胞模型<sup>[33]</sup>。Caco-2 细胞是一种结直肠癌细胞,被用于分离中国武汉及德国法兰克福 COVID-19 患者的 SARS-CoV-2。实验表明,Caco-2 细胞对 SARS-CoV-1、SARS-CoV-2、中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 感染敏感,有细胞因子和趋化因子产生,并且 SARS-CoV-2 感染只会导致低促炎反应或

没有促炎反应<sup>[34]</sup>。基于此, Bojkova 等<sup>[35]</sup>使用 Caco-2 细胞建立了检测可能的 COVID-19 治疗靶点的细胞模型。蛋白质组学分析表明, Caco-2 细胞可以在病毒复制过程中改变它们的新陈代谢。

尽管原代细胞有更真实模拟病毒-宿主相互作用的优势, 但永生细胞单层培养模型使用更方便、耗时更少, 并且绕过了与使用动物和人体组织相关的伦理问题。单层培养的永生细胞对于检测潜在的抗 SARS-CoV-2 药物至关重要。

### 3.2 三维模型在 COVID-19 研究中的应用

尽管动物模型在模拟 SARS-CoV-2 感染方面取得了突破性的进展, 但由于小鼠模型不能充分模拟人类感染的病理生理学特征, 不能预测人类免疫反应的因子, 而灵长类动物相关设备数量稀少、成本高昂。因此, 大多数与 COVID-19 相关的研究仅限于体外二维细胞培养系。不过, 二维细胞培养系因缺乏组织结构, 在模拟疾病发病机制方面受到诸多限制<sup>[36]</sup>。与之不同, 三维人体组织样模型不仅可以更加真实模拟感染过程以了解疾病发病机制, 还可以测试潜在药物在阻断感染方面的功效、作用机制和毒性。

#### 3.2.1 类器官

hPSC 衍生的肺和结肠类器官均支持 SARS-CoV-2 复制, 且可用于评估伊马替尼、霉酚酸和奎纳克林二盐酸盐的抗 SARS-CoV-2 效果。研究表明, 在受感染的 hPSC 衍生肺类器官中, 与 COVID-19 患者结果相似的一些细胞因子和趋化因子上调<sup>[37]</sup>。除肺类器官、结肠类器官外, 人脑类器官<sup>[38]</sup>、肝脏类器官<sup>[39]</sup>、眼类器官<sup>[40]</sup>等多种类器官都在 COVID-19 的研究中发挥着重要作用。

#### 3.2.2 器官芯片

目前, COVID-19 研究面临的最大挑战是需要推测患者感染病毒的病程。现阶段, 肺、咽喉、气道、肾脏等三维体外模型在临床上主要发挥 3 个关键作用: 1) 用于研究感染的机械变化、宿主-病原体相互作用和感染过程; 2) 充当新药研发的高性能筛选平台; 3) 开展体外疾病组织模型的生物标志物分析。在 COVID-19 的研究中, 器官芯片作为一种常用的体外模型有助于更进一步了解 COVID-19 的行为方式。有研究开发出一种肺组织芯片模型<sup>[7]</sup>, 其可以模拟天然组织的环境、结构和功能。而且, 该研究表明, 可以通过使用软光刻技术创建天然人肺组织中的肺泡-毛细血管单元来制作体外芯片模型。该模型的单元由 3 层隔室

组成: 上层为人肺泡上皮细胞, 暴露在空气中的肺泡上皮细胞会进行分化, 形成微工程肺泡-毛细血管单元; 下层为肺微血管内皮细胞; 上下层之间由 10  $\mu\text{m}$  厚度的二甲基硅氧烷弹性微孔膜隔开, 以模拟肺泡-毛细血管界面。此芯片模型通过微通道连续灌注促进细胞生长。Thacker 等<sup>[41]</sup>通过共培养原代人肺泡上皮细胞建立了具备顶端-基底极性血管化的肺芯片感染模型。该模型具备一些临床感染特征, 例如: 低病毒复制率导致的持续感染、白细胞介素-6 分泌导致的核因子- $\kappa\text{B}$  炎症反应以及内皮层屏障受损。此外, Si 等<sup>[42]</sup>设计了一种由高度分化的人类支气管气道上皮和肺内皮细胞构成的微流体支气管气道芯片, 其可以模拟病毒感染、细胞因子产生和免疫细胞募集等过程, 该系统不仅可以用作 COVID-19 的机理研究模型, 还可以用作流感等病毒的研究模型, 且考虑到病毒的潜伏期问题, 相比于人体来说, 器官芯片有助于在病毒进入器官后监测病毒感染的早期反应。虽然这种肺芯片为器官水平生理功能的研究提供了新的平台, 但是其无法模拟肺组织呼吸道的微结构和不同组织之间复杂的相互作用。因此, 对于体外器官芯片人们还需要进一步的研究。

#### 3.2.3 三维生物打印模型

缺乏复杂的器官结构是类器官模型在病毒感染研究中的障碍之一。三维生物打印利用先进的分层打印技术, 使用载有生物墨水的组织特异性细胞重建人体器官结构, 可以解决上述问题。由三维生物打印技术生成的有机模拟系统还原了最真实的生理环境, 可以更好地保持顶端与基底外侧的细胞极性, 在用作人类病毒感染研究的体外平台方面具有巨大优势。三维生物打印的肺组织结构是由多种细胞类型和多层复杂结构组成的, 具有传统方法无法创造的空气-组织界面, 更适用于呼吸道感染的研究。前期研究发现, 使用载有特定细胞类型的丝素蛋白-明胶生物墨水可以制造各种正常或患病的体外组织模型<sup>[43]</sup>; 而且, 这种体外模型具备天然组织和 ECM 超微结构, 有助于深入了解病毒感染的机制。研究显示, 三维生物打印的人体上气道可以诱导嵌入细胞分化, 并且可结合不同的细胞类型来模拟气道组织层, 如基底细胞、纤毛细胞和杯状细胞<sup>[44]</sup>。另有研究报告, 将人肺泡细胞 A549 与 Matrigel、藻酸盐和明胶组成的生物墨水混合后, 通过三维生物打印获得了模拟甲型流感病毒感染的肺组织结构, 这类模

型可以观察到更接近自然的肺部感染和各类免疫反应的发生<sup>[45]</sup>。然而,三维生物打印仍然存在机械应力的控制、营养和生长因子的供应及持续释放、细胞相容性材料的选择等问题。尽管如此,在体外通过三维生物打印的方式构建针对肺及肺泡的 COVID-19 感染模型可为 COVID-19 的进一步治疗研究提供实验基础。

#### 4 展望

目前,肺部疾病发生发展的机制探索、肺部疾病治疗方法和新药的开发研究,均离不开有效的体外功能性细胞培养模型。参与调控肺部疾病过程的因素多种多样,传统的二维细胞培养系统并不满足现阶段需求,因此,多种三维肺组织模型构建方法应运而生。这些三维组织模型更好地模拟了空间细胞组织、细胞-细胞和细胞-基质相互作用以及组织特异性生理功能,但是它们在复制生理疾病的进展和模拟药物作用等方面也仍存在一些问题,如免疫成分限制和机械力限制等。四维(four-dimensional, 4D)生物打印是一种将时间与三维生物打印相结合的新技术<sup>[46]</sup>。与三维生物打印产生的静态物体相比,4D 生物打印模型在响应外部各种刺激(如温度、光、水等)的同时,会随着时间改变三维生物打印模型的结构或功能<sup>[47]</sup>。今后,在组织工程、药物传递、适于移植和器官再生的功能器官构建等生物医学领域,4D 生物打印技术与肺纤维化模型结合,将会有巨大的应用前景。

#### 参考文献(References):

- MORRISEY E E, HOGAN B L M. PREPARING for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development[J]. *Developmental Cell*, 2010, 18(1): 8-23.
- VARONE F, MONTEMURRO G, MACAGNO F, *et al.* Investigational drugs for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2017, 26(9): 1019-1031.
- 史亮, 陈良安. 肺组织再生研究进展[J]. *创伤与急危重病医学* (SHI Liang, CHEN Liang'an. *Advances in lung tissue regeneration*[J]. *Trauma and Critical Care Medicine*), 2017, 5(1): 58-61.
- BOBBA C M, FEI Q Q, SHUKLA V, *et al.* Nanoparticle delivery of microRNA-146a regulates mechanotransduction in lung macrophages and mitigates injury during mechanical ventilation[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 289.
- LIN R Z, CHANG H Y. RECENT advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research[J]. *Biotechnology Journal*, 2008, 3(9/10): 1172-1184.
- WEISWALD L B, BELLET D, DANGLES-MARIE V. Spherical cancer models in tumor biology[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(1): 1-15.
- FENNEMA E, RIVRON N, ROUWKEMA J, *et al.* Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(2): 108-115.
- SUROLIA R, LI F J, WANG Z, *et al.* 3D pulmospheres serve as a personalized and predictive multicellular model for assessment of antifibrotic drugs[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(2): e91377.
- CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597.
- SACHS N, PAPASPYROPOULOS A, ZOMER-VAN OMMEN D D, *et al.* Long-term expanding human airway organoids for disease modeling[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(4): e100300.
- STRIKOUKIS A, CIEŚLAK A, LOFFREDO L, *et al.* Modeling of fibrotic lung disease using 3D organoids derived from human pluripotent stem cells[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(12): 3709-3723.e5.
- VALDOZ J C, FRANKS N A, CRIBBS C G, *et al.* Soluble ECM promotes organotypic formation in lung alveolar model[J]. *Biomaterials*, 2022, 283: 121464.
- LI X J, CAI H, CUI X H, *et al.* Prevention of late postpneumectomy complications using a 3D printed lung in dog models[J]. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014, 46(5): e67-e73.
- LEWIS K J R, TIBBITT M W, ZHAO Y, *et al.* *In vitro* model alveoli from photodegradable microsphere templates[J]. *Biomaterials Science*, 2015, 3(6): 821-832.
- STUCKI J D, HOBI N, GALIMOV A, *et al.* Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 14359.
- GUDIPATY S A, LINDBLOM J, LOFTUS P D, *et al.* Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1[J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 118-121.
- HUH D, MATTHEWS B D, MAMMOTO A, *et al.* Reconstituting organ-level lung functions on a chip[J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-1668.
- 陈婵. 3D 肺纤维化去细胞支架对肺泡 II 型上皮细胞间质转化的作用及机制研究[D]. 苏州: 苏州大学(CHEN Chan. *The Effect of 3D Acellular Scaffold of Pulmonary Fibrosis on the Epithelial-Mesenchymal Transition and the Possible Mechanism*[D]. Suzhou: Soochow University), 2017.
- ALSAFADI H N, UHL F E, PINEDA R H, *et al.* Applications and approaches for three-dimensional precision-cut lung slices. Disease modeling and drug discovery[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2020, 62(6): 681-691.
- CAHILL E F, KENNELLY H, CARTY F, *et al.* Hepatocyte growth factor is required for mesenchymal stromal cell protection against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2016, 5(10): 1307-1318.
- GON Y, HASHIMOTO S, NAKAYAMA T, *et al.* *N*-Acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin-induced interleukin-8 secretion by bronchial epithelial cells[J]. *Respirology*, 2000, 5(4): 309-313.
- XU Q H, NORMAN J T, SHRIVASTAV S, *et al.* *In vitro* models of TGF- $\beta$ -induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents[J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2007, 293(2): F631-F640.
- SHI R, ZHANG Z, ZHU A K, *et al.* Targeting type I collagen for cancer treatment[J]. *International Journal of Cancer*, 2022, 151(5): 665-683.
- ARORA P D, NARANI N, MCCULLOCH C A. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts[J]. *American Journal of Pathology*, 1999, 154(3): 871-882.
- SUNDARAKRISHNAN A, CHEN Y, BLACK L D, *et al.* Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 129: 78-94.

- [26] SUEZAWA T, KANAGAKI S, MORIGUCHI K, *et al.* Disease modeling of pulmonary fibrosis using human pluripotent stem cell-derived alveolar organoids[J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(12): 2973–2987.
- [27] WILKINSON D C, ALVA-ORNELAS J A, SUCRE J M S, *et al.* Development of a three-dimensional bioengineering technology to generate lung tissue for personalized disease modeling[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, 6(2): 622–633.
- [28] BOOTH A J, HADLEY R, CORNETT A M, *et al.* Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for *in vitro* investigation[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2012, 186(9): 866–876.
- [29] TATLER A L, BARNES J, HABGOOD A, *et al.* Caffeine inhibits TGF $\beta$  activation in epithelial cells, interrupts fibroblast responses to TGF $\beta$ , and reduces established fibrosis in *ex vivo* precisioncut lung slices[J]. *Thorax*, 2016, 71(6): 565–567.
- [30] MAJUMDER J, MINKO T. Recent developments on therapeutic and diagnostic approaches for COVID-19[J]. *The AAPS Journal*, 2021, 23: 14.
- [31] YAMADA S, FUKUSHI S, KINOSHITA H, *et al.* Assessment of SARS-CoV-2 infectivity of upper respiratory specimens from COVID-19 patients by virus isolation using VeroE6/TMPRSS2 cells[J]. *BMJ Open Respiratory Research*, 2021, 8(1): e000830.
- [32] PARK W B, KWON N J, CHOI S J, *et al.* Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea[J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2020, 35(7): e84.
- [33] DANILOSKI Z, JORDAN T X, WESSELS H H, *et al.* Identification of required host factors for SARS-CoV-2 infection in human cells[J]. *Cell*, 2021, 184(1): 92–105.e16.
- [34] HUI K P Y, CHEUNG M C, PERERA R A P M, *et al.* Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in *ex-vivo* and *in-vitro* cultures[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2020, 8(7): 687–695.
- [35] BOJKOVA D, KLANN K, KOCH B, *et al.* Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets[J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 469–472.
- [36] MILLS M, ESTES M K. Physiologically relevant human tissue models for infectious diseases[J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(9): 1540–1552.
- [37] HAN Y L, DUAN X H, YANG L L, *et al.* Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids[J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 270–275.
- [38] COLOMBO D, FALASCA L, MARCHIONI L, *et al.* Neuropathology and inflammatory cell characterization in 10 autopsied COVID-19 brains[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2262.
- [39] YANG L L, HAN Y L, NILSSON-PAYANT B E, *et al.* A human pluripotent stem cell-based platform to study SARS-CoV-2 tropism and model virus infection in human cells and organoids[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(1): 125–136.e7.
- [40] MAKOVOZ B, MØLLER R, ERIKSEN A Z, *et al.* SARS-CoV-2 infection of ocular cells from human adult donor eyes and hESC-derived eye organoids[J]. SSRN, 2020: 3650574 [2023-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32742243/>. DOI: 10.2139/ssrn.3650574.
- [41] THACKER V V, SHARMA K, DHAR N, *et al.* Rapid endotheliitis and vascular damage characterize SARS-CoV-2 infection in a human lung-on-chip model[J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(6): e52744.
- [42] SI L L, BAI H Q, RODAS M, *et al.* A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(8): 815–829.
- [43] GALLIGER Z, VOGT C D, PANOSKALTSIS-MORTARI A. 3D bioprinting for lungs and hollow organs[J]. *Translational Research*, 2019, 211: 19–34.
- [44] JONSDOTTIR H R, DIJKMAN R. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 24.
- [45] BERG J, HILLER T, KISSNER M S, *et al.* Optimization of cell-laden bioinks for 3D bioprinting and efficient infection with influenza A virus[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13877.
- [46] GAO B, YANG Q Z, ZHAO X, *et al.* 4D bioprinting for biomedical applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(9): 746–756.
- [47] 关键, 贾燕飞, 张葆鑫, 等. 4D 生物打印在组织工程的应用[J]. *中国组织工程研究*(GUAN Jian, JIA Yanfei, ZHANG Baoxin, *et al.* Application of 4D bioprinting in tissue engineering[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2022, 26(3): 446–455.