

肾脏类器官培养优化及其初步应用效果研究

石文莹^{1,2}, 许利嘉³, 芮宏亮⁴, 张森², 周训蓉^{1,5*}

¹贵州医科大学/贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州贵阳 550004; ²中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; ³中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; ⁴首都医科大学附属北京中医医院肾病科, 北京 100010; ⁵贵州中医药大学第二附属医院药学部, 贵州贵阳 550002

[中图分类号] R91 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2025.0928

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 石文莹, 许利嘉, 芮宏亮, 等. 肾脏类器官培养优化及其初步应用效果研究[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(12): 1577-1585.

[收稿日期] 2025-03-02 [录用日期] 2025-04-29 [上线日期] 2025-09-28

[摘要] **目的** 构建肾脏类器官及各类急、慢性肾损伤模型。**方法** 通过CHIR99021-成纤维细胞生长因子(FGF)激活途径诱导人源胚胎干细胞进行肾脏类器官形成实验。以20、30及50 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激肾脏类器官, 构建顺铂诱导急性肾小管损伤的肾脏类器官模型, 并采用30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂持续刺激12、24、48 h以观察其损伤的变化趋势, 采用实时荧光定量反转录PCR(RT-qPCR)和免疫组织化学(IHC)检测肾损伤指标及炎症因子的表达情况。采用含5、25 mmol/L葡萄糖培养基(隔天更换)及含葡萄糖25 mmol/L培养基(持续不更换)培养6 d分别构建肾脏类器官高糖诱导纤维化血糖波动模型及持续高糖模型, 通过Western blotting、RT-qPCR及IHC方法检测肾脏纤维化指标胶原蛋白III(Col III)、转化生长因子- β (TGF- β)及纤连蛋白的表达水平。**结果** 类器官在第8天初步形成管状结构, 且在第14天具有最佳形态, 可用于后续研究。近端肾小管[莲藕凝集素(LTL)]、远端肾小管[钙黏蛋白1(CDH1)]、连接小管[尿调节素(UMOD)]的特异性标志物染色及HE染色证实肾脏类器官形成。肾损伤分子1(KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及趋化因子配体2(CCL2)在顺铂刺激后的表达水平明显升高, 提示急性肾损伤发生, 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激引起的肾损伤类器官最佳, 且NGAL及KIM-1的表达随刺激时间延长而增加。两种肾脏类器官高糖模型中纤连蛋白、Col III及TGF- β 表达明显增加, 但模拟血糖波动模型优于持续高糖模型。**结论** 使用优化后的培养流程可以高效构建肾脏类器官, 并可用于各类急慢性肾损伤模型的构建。

[关键词] 肾脏; 类器官; 诱导性多能干细胞; 顺铂肾损伤; 糖尿病肾病

Optimization of kidney organoid culture and its preliminary application effects

Shi Wen-Ying^{1,2}, Xu Li-Jia³, Rui Hong-Liang⁴, Zhang Sen², Zhou Xun-Rong^{1,5*}

¹Guizhou Medical University/Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug Research and Development, Guiyang, Guizhou 550004, China

²Institute of Materia Medica, ³Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College/Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

⁴Department of Nephrology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China

⁵Department of Pharmacy, the Second Hospital Affiliated to Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China

*Corresponding author, E-mail: zhou168822@163.com

This work was supported by the Major Collaborative Innovation Project of Beijing (2022-I2M-1-014)

[Abstract] **Objective** To construct kidney organoids and establish various models of acute and chronic kidney injury. **Methods** Kidney organoid differentiation was induced from human embryonic stem cells (hESCs) via the CHIR99021-fibroblast growth factor (FGF) activation pathway. Cisplatin-induced acute renal tubular injury models were established by treating kidney

[基金项目] 北京市重大协同创新项目(2022-I2M-1-014)

[作者简介] 石文莹, 硕士研究生, 主要从事肾脏药理学方面的研究

[通信作者] 周训蓉, E-mail: zhou168822@163.com

organoids with cisplatin at concentrations of 20, 30, and 50 $\mu\text{mol/L}$. The temporal progression of injury was investigated following stimulation with 30 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin for 12, 24, and 48 h. The expression levels of renal injury markers and inflammatory factors were assessed using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunohistochemistry (IHC). Additionally, a high-glucose-induced fibrosis model with blood glucose fluctuation and a sustained high-glucose model were developed using two approaches: alternating culture media containing 5 mmol/L and 25 mmol/L glucose every other day, and continuous exposure to 25 mmol/L glucose for 6 d. Renal fibrosis markers, collagen III (Col III), transforming growth factor- β (TGF- β), and fibronectin, were evaluated by Western blotting, RT-qPCR, and IHC. **Results** Tubular structures began forming in the organoids by day 8, reaching optimal morphology by day 14, suitable for subsequent research. Immunostaining for specific markers, proximal tubules (*Lotus tetragonolobus* lectin, LTL), distal tubules (cadherin 1, CDH1), and connecting tubules (uromodulin, UMOD), along with hematoxylin and eosin (HE) staining confirmed successful kidney organoid formation. Following cisplatin stimulation, renal injury markers [kidney injury molecule-1 (KIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)] and inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)] were significantly upregulated, indicating the onset of acute kidney injury. The 30 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin treatment induced the most suitable injury model, with NGAL and KIM-1 expression increasing over stimulation time. In both high-glucose models, fibronectin, Col III, and TGF- β were markedly elevated, but the glucose fluctuation model was superior to the sustained high-glucose model. **Conclusion** The optimized culture protocol enables efficient generation of kidney organoids, which can be utilized to establish various acute and chronic kidney injury models.

[Key words] kidney; organoid; induced pluripotent stem cells; cisplatin-induced kidney injury; diabetic nephropathy

肾脏承担着生成尿液、维持水电解质平衡等多项重要的生理功能。人体的多种疾病均可引起肾脏的急、慢性损伤,最终导致终末期肾病^[1]。目前全球慢性肾脏病患者数达 6.975 亿^[2],影响全球 7%~12% 的人口^[3-4]。但肾脏高度复杂的组织特点及肾脏疾病病因的多样性,限制了以细胞系为主的体外药物筛选模型的构建^[5],因此亟需一种能够在体外模拟体内肾脏病理、生理特征的方法,而肾脏类器官的出现可填补这一空白^[6]。干细胞技术已经被广泛用于各类具有特定功能的体细胞分化,继而可诱导疾病模型,用于研究疾病发生机制及开发潜在的治疗方法^[7-8]。类器官具有器官的三维立体结构及功能。它们可来源于胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 或诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)^[9]。类器官培养技术飞速发展,但目前肾脏类器官的培养仍存在尚未完全解决的问题,且肾脏结构复杂,是高度血管化的器官,现有类器官缺乏功能性血管网络,导致营养物质及氧气渗透受限,影响类器官的成熟及长期存活^[10-11]。肾脏包含多种细胞类型,现有类器官难以完全重复其多样性及空间排列,因此难以模拟真实的器官生理活动^[12-13]。本研究建立了一种简单、廉价且高效的培养方式,从人源 iPSC 分化诱导出肾脏类器官,并进行生物标志物的鉴定;继而利用此优化流程得到的肾脏类器官,构建顺铂诱导的急性肾损伤模型及高糖诱导的糖尿病肾病模型,评价其是否可模拟人体真实的肾脏损伤病理特征。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、试剂及仪器 iPSC 的商业细胞系

CA1002008(北京 Cellapy 公司), mTeSR 培养基(加拿大 StemCell 生物科技公司), DMEM 基础培养基(北京利维宁生物科技有限公司), EDTA、杜氏磷酸缓冲盐溶液 (DPBS)、血清替代物 (knockout serum replacement, KOSR)(美国 Thermo Fisher 公司), 非必需氨基酸、HEPES 缓冲液、GlutaMAX、胎牛血清(美国 Gibco 公司), 聚乙醇醇、人多潜能干细胞铺底工作液(北京贝赛生物技术有限公司), 99% 顺铂(上海陶素生化科技有限公司), RNA 快速提取试剂盒(上海奕杉生物技术有限公司), EasyScript® All-in-one 第一链 cDNA 合成试剂盒、Hieff qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)试剂盒(北京全式金生物技术公司), OCT 胶、4% 多聚甲醛(英国索莱宝生物技术有限公司), 鼠二抗 Alexa Fluor 647(A21235)、兔二抗 Alexa Fluor 647(A31573)、莲藕凝集素 (LTL) 抗体 (L32480, 美国 Thermo Fisher 公司); 尿调节素 (UMOD) 抗体 (SC-271622, 玻利维亚 Santa Cruze 公司); 钙黏蛋白 1(CDH1) 抗体 (A22850, 武汉爱博泰克生物技术有限公司); 胶原蛋白 III (Col III) 抗体 (ab7778)、转化生长因子- β (TGF- β) 抗体 (ab215715)、 β -actin (ab8226)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体 (ab125075) 及纤连蛋白抗体 (ab2413, 英国 Abcam 公司); 肾损伤分子 1 (KIM-1) 抗体 (14971S, 美国 Cell Signaling 公司)。蔡司 LSM710 共聚焦显微镜(德国 Oberkochen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 iPSC 置于 T25 瓶中培养于 mTeSR 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,每天更换培养基。当细胞生长至 80% 以上时,消化

传代, 进行后续实验。将胚状体置于阶段I完全培养基(S1M)及阶段II完全培养基(S2M)中, 于37℃、5% CO₂培养箱中培养。S1M: 在Essential 6(E6)培养基中加入8 μmol/L CHIR99021及3.3 μmol/L Y27632; S2M: 81% DMEM、15% KOSR、1%非必需氨基酸、1% HEPES缓冲液、1% L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、1%聚乙烯醇、1%青霉素-链霉素。

1.2.2 肾脏类器官培养方案 肾脏类器官的具体培养流程为14 d, 共分为3个阶段: (1)第1天, 配置S1M。待T25瓶中的iPSC生长至60%~90%后, 用DPBS洗涤2次, 加入人iPSC消化液, 37℃孵育6 min进行消化, 细胞消化至3~5个为一团为宜。(2)将消化好的细胞悬液置于15 ml离心管中离心, 向超低黏附6孔板中加入S1M, 2 ml/孔; 离心后的细胞使用S1M重悬, 细胞计数, 每孔加入3×10⁴个细胞/ml。或向超低黏附96孔板中加入100 μl/孔的S1M, 每孔加入9×10³个细胞/100 μl。第2天(胚状体将在48 h内形成), 制备E6培养基+8 μmol/L CHIR99021(S2M), 6孔板中吸出1 ml培养基, 加入1 ml S2M; 96孔板中加入100 μl/孔S2M。(3)第3天, 进行阶段II培养基的配置, KOSR/DMEM介质的试剂成本较低。将超低黏附6孔板中的细胞转移至15 ml离心管中离心, 用S2M重悬后, 将细胞悬液加入低黏附6孔板中, 2 ml/孔; 用枪头轻轻吸取96孔板中的上清, 每孔加入200 μl S2M。第5天, 从6孔板顶部轻轻吸出培养基1 ml, 补充1 ml新鲜的S2M培养基; 从96孔板顶部轻轻吸出培养基100 μl, 补充100 μl新鲜的S2M培养基。第7天重复第5天的操作, 并将孔板置于摇床上。此后隔天换一半的培养基, 培养至第14天, 具体流程见附图1(<https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0347.2025.0928FJ>)。

1.2.3 免疫荧光染色实验检测LTL、CDH1、UMOD的表达 参考文献[14], 以LTL作为近端肾小管标志物, UMOD作为远端小管标志物, CDH1作为连接小管标志物, 对构成肾脏类器官的3种细胞进行标记。

将已经处理好的类器官在低黏附孔板中用PBS洗5 min×2次; 4%多聚甲醛溶液室温固定30 min; PBS洗5 min×2次; 用30%的蔗糖(PBS配置)在4℃培育过夜; 将类器官嵌入OCT胶中, 制成冷冻切块; 将冷冻切块切成4 μm切片; 切片用PBS洗5 min×3次; 用封闭缓冲液(0.2% Triton X-100及10% FBS在PBS中)常温孵育2 h; 将切片与抗体稀释缓冲液(PBS+10% FBS)中的一抗[LTL(1:500)、CDH1(1:200)、UMOD(1:200)]在4℃下孵育过夜; 在PBS中清洗5 min×3次, 然后用Alexa-Fluor 647二抗及PBS中的稀释液在室温孵育1 h。用PBS清洗5 min×3次; 细胞核用4',6-脒基-2-苯基吲哚(DAPI)反染色10 min; 使用

蔡司LSM710共聚焦显微镜获得图像。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色 迅速取出新鲜组织并固定在新鲜制备的4%多聚甲醛缓冲液中, 包埋在石蜡中。切片厚度为5 μm, HE染色后, 置于光学显微镜下观察切片并用S610全景扫描仪(日本东京松光子学株式会社)扫描图片, 最后用NDP Viewer 2图像分析软件(日本东京滨松光子学公司)导出图片。

1.2.5 实时荧光定量反转录PCR(RT-qPCR)检测肾脏类器官中KIM-1、NGAL、TNF-α、IL-10、IL-1β、CCL2、Col III、TGF-β mRNA表达水平 用RNA提取试剂盒提取总RNA样本, 用cDNA合成试剂盒生成cDNA模板。反应体系体积为20 μl, RT-qPCR反应条件: 95℃预变性5 min; 95℃变性15 s, 60℃退火15 s, 72℃延伸45 s, 共40个循环。以β-actin为内参照, PCR引物由睿博兴科生物技术有限公司合成。引物序列见表1。实验重复3次。

表1 RT-qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

基因	引物序列(5'-3')
KIM-1	正向: TGTCTGGACCAATGGAACCC 反向: GGCAACAATATACGCCACTGT
NGAL	正向: GACAACCAATTCAGGGGAAG 反向: GCATACATCTTTTTCGGGGTCT
TNF-α	正向: CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG 反向: GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
IL-10	正向: TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA 反向: TCAGACAAGGCTTGCCAACCCA
CCL2	正向: TTAAGGCATCACAGTCCGAG 反向: TGAATGTGAAGTTGACCCGT
IL-1β	正向: AGCTACGAATCTCCGACCAC 反向: CGTTATCCCATGTGTGGAAGAA
Col III	正向: GGACTACCTGGAACAAAAGGG 反向: GCCAAGTATCTCACCTGGATCA
TGF-β	正向: CAATTCCTGGCGATACCTCAG 反向: GCACAACCTCCGGTGACATCAA
β-actin	正向: AGAGTACGAGCTGCCTGAC 反向: AGCACTGTGTTGGCGTACAG

RT-qPCR. 实时荧光定量PCR; KIM-1. 肾损伤分子1; NGAL. 中性粒细胞明胶酶相关脂钙蛋白; TNF-α. 肿瘤坏死因子-α; CCL2. 趋化因子配体2; IL-1β. 白细胞介素-1β; Col III. 胶原蛋白III; TGF-β. 转化生长因子-β

1.2.6 免疫组织化学检测NGAL、KIM-1、Col III、纤连蛋白的表达水平 石蜡切片脱蜡、水化后进行抗原修复暴露抗原决定簇, 然后封闭内源性过氧化物酶及非特异性蛋白, 孵育一抗[NGAL(1:100)、KIM-1(1:100)、Col III(1:100)、纤连蛋白(1:100)], 加入反应增强液, 二抗孵育, DAB显色, 苏木精复染后, 脱水封片, 在显微镜下观察, 用S610全景扫描仪采集图像, 用NDP Viewer 2图像分析软件导出图

片并进行定量分析。

1.2.7 Western blotting 检测 Col III、TGF- β 的表达水平 收集处理好的类器官，每孔加入 80 μ l 蛋白裂解液(含有一定比例的蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂)，冰上静置 30 min，4 $^{\circ}$ C，以 13 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，即为所得蛋白，同时进行蛋白定量。使用酶标仪检测各孔的吸光度值，计算蛋白浓度。每组取 30 μ g 总蛋白进行电泳，将电泳分离得到的蛋白转移至 PVDF 膜上，然后用含有 5% 脱脂奶粉的 Tris 盐缓冲液(TBST)封闭 1 h，Col III、TGF- β 、 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。使用 TBST 清洗膜 3 次后，用二抗孵育 1 h，洗膜后显影曝光。

1.2.8 顺铂诱导急性肾小管损伤的肾脏类器官模型构建 类器官培养至第 12 天时，给予顺铂刺激，分别设置 20、30、50 μ mol/L 共 3 个剂量，培养至第 14 天，分为对照组(0 μ mol/L)、20 μ mol/L、30 μ mol/L 及 50 μ mol/L 共 4 组。提取类器官总 RNA，采用 RT-qPCR 检测肾脏损伤标志物 KIM-1、NGAL 及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、CCL2 mRNA 表达水平。同时采用免疫组化检测类器官中 KIM 及 NGAL 蛋白表达水平。同时将培养至第 14 天的肾脏类器官采用所选取的最佳顺铂浓度持续作用 12、24、48 h 以观察其损伤的变化趋势。

1.2.9 高糖诱导肾脏类器官纤维化模型的构建 构建两种高糖的类器官模型。分为正常血糖组(对照组)、模型 1 组、模型 2 组共 3 组，在类器官培养至第

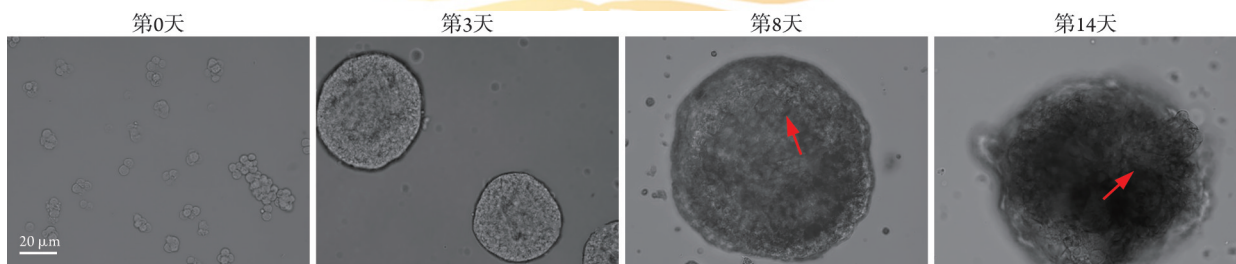
16 天时，将 S2M 更换为高糖的 S2M(葡萄糖含量 25 mmol/L)，模型 1 分别以 5 mmol/L 及 25 mmol/L 葡萄糖培养基交替培养，隔天更换以模拟血糖波动，共持续 6 d；模型 2 使用含 25 mmol/L 葡萄糖的 S2M 培养基持续培养 6 d。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。所有数据均为计量资料，采用 Shapiro-Wilk 检测整体分布，方差分析检测其方差齐性，数据均呈正态分布且符合方差齐性，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾脏类器官培养方法的优化 在第 0 天 iPSC 转移至低黏附 6 孔板时，每孔 3.0×10^4 个细胞可获得最佳培养效果，且在对 iPSC 消化时生成 3~5 个细胞团为最佳效果。在 E6 培养基中加入 Wnt 信号通路激活剂 CHIR99021 及 Y27632，将 iPSC 诱导分化为胚状体。第 1~3 天细胞迅速增殖汇合。从第 3 天开始，更换 S2M 培养基以诱导胚状体形成肾小管，胚状体具有“金色”及光滑的球形外观；第 8 天，单个胚状体中的小管形成变得明显，并在显微镜下可见，随后几天数量增加，到第 14 天时达到最佳形态(图 1)。与胎儿肾脏相比，第 14 天的类器官组织与毛细血管环晚期肾单位最为相似。

2.2 肾脏类器官细胞类型鉴定 免疫荧光染色结果



红色箭头示管状结构

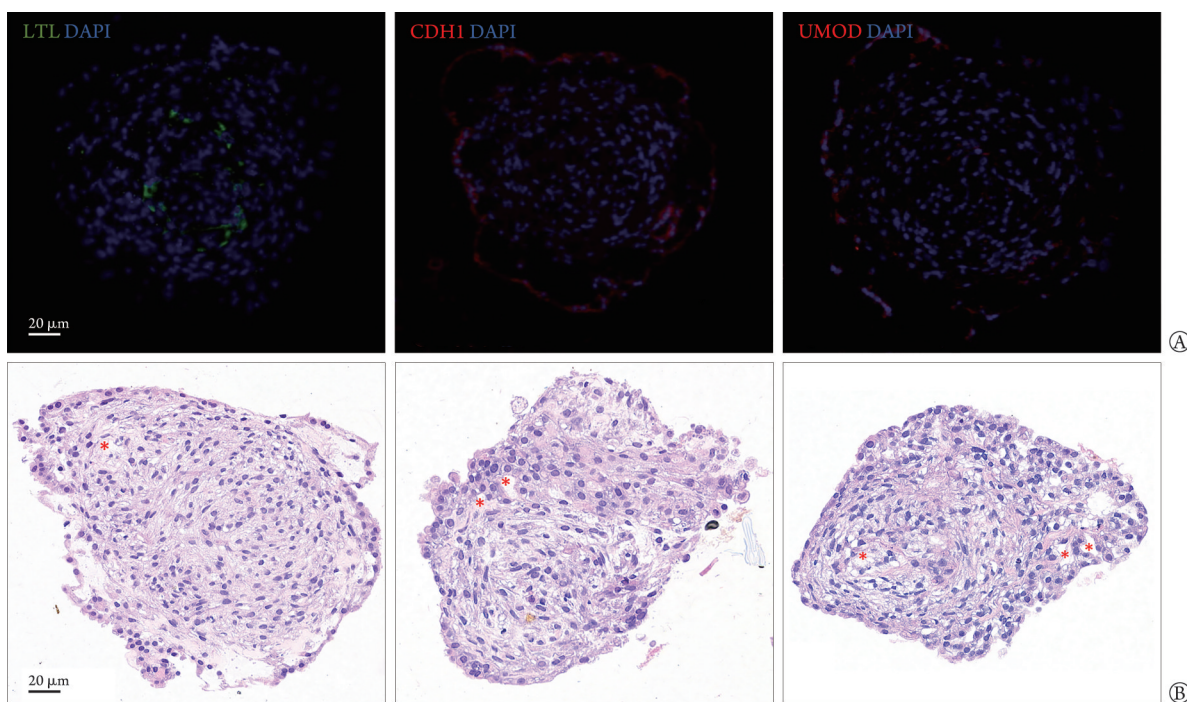
图 1 肾脏类器官分化第 0、3、8 及 14 天的形态学图像

Fig.1 Morphological images of kidney organoid differentiation on day 0, 3, 8, and 14

显示，3 种肾脏不同细胞的特异性标志物在本研究分化的肾脏类器官中均有表达(图 2A)。HE 染色结果显示，在类器官中出现了与人体肾单位中肾小管结构非常类似的组织形态结果，加之肾小管细胞的标志物特异性着色，可判断出该方法诱导得到的肾脏类器官具有肾小管细胞的部分特征(图 2B)。

2.3 顺铂诱导急性肾小管损伤的肾脏类器官模型构建 采用不同浓度顺铂处理肾脏类器官 48 h 后，RT-qPCR 检测结果显示，与对照组比较，20 μ mol/L 顺铂处理后变化不明显，而 30、50 μ mol/L 顺铂组

KIM-1、NGAL 及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、CCL2 mRNA 表达水平均明显升高(P 均<0.05)，且 30 μ mol/L 顺铂组 KIM-1 及 TNF- α mRNA 明显高于 50 μ mol/L 顺铂组(P<0.05)，而 30 μ mol/L 顺铂组与 50 μ mol/L 顺铂组间 NGAL、IL-1 β 、CCL2 mRNA 差异无统计学意义(P>0.05，图 3A)。在形态学方面：20 μ mol/L 顺铂刺激的肾脏类器官无明显改变；30 μ mol/L 顺铂刺激的肾脏类器官中部分细胞碎片，但形态无明显变化；50 μ mol/L 顺铂刺激的肾脏类器官形态出现明显变化，且类器官周围的细胞碎片明显增多(图 3B)。免



LTL. 莲藕凝集素; CDH1. 钙黏蛋白1; UMOD. 尿调节素; A. 类器官的免疫荧光染色结果; B. HE 染色结果

图2 培养第14天时肾脏类器官的鉴定

Fig.2 Identification of kidney organoids on the 14th day of cultivation

疫组织化学染色结果显示,与对照组比较,30、50 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激后,NGAL及KIM-1蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$),提示符合急性肾小管损伤的特征(图3C)。以上结果显示30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激可以得到较好的实验结果,因此后续以30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激诱导不同时间(12、24、48 h),免疫组织化学染色结果显示,肾脏类器官中NGAL及KIM-1蛋白表达水平随顺铂刺激时间延长而升高($P < 0.05$,图4)。

2.4 高糖诱导肾脏类器官纤维化模型构建 Western blotting 检测结果显示,与正常血糖组(对照组)比较,模型1组及模型2组的Col III及TGF- β 蛋白及mRNA表达水平均升高,且模型1组Col III mRNA表达水平高于模型2组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图5A、B)。免疫组织化学染色结果显示,与对照组比较,模型1组及模型2组的Col III及纤连蛋白表达水平明显升高,且模型1组高于模型2组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图5C)。

3 讨论

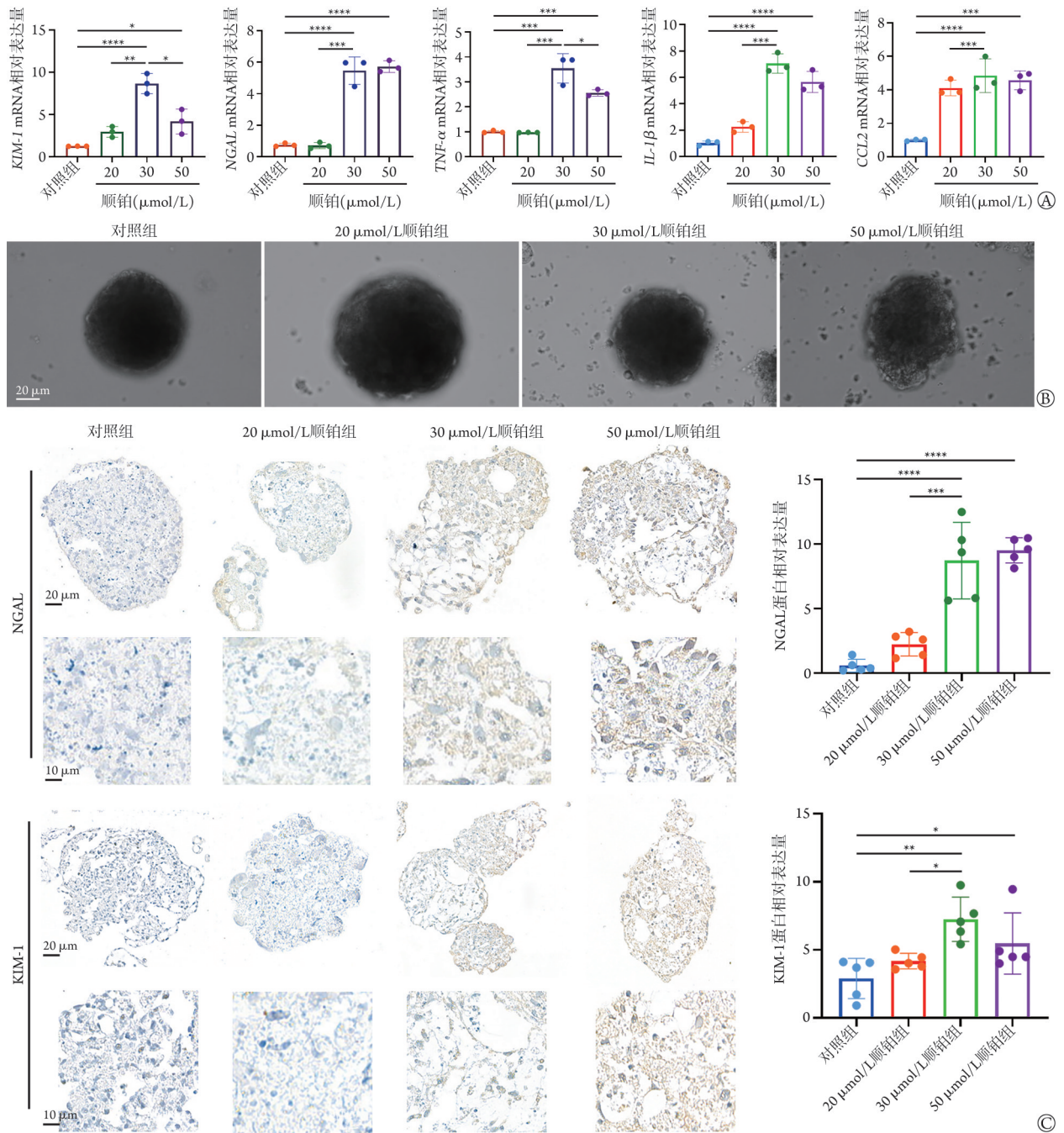
肾脏是一个复杂的器官,由多种上皮细胞、基质细胞,以及独特的血管系统组成。肾脏来源于中胚层,更确切的说来自于中胚层的输尿管芽及后中胚层来源的肾间充质前体组织^[5]。间充质交换互惠信号以诱导、维持及完成肾脏的生成^[15]。

目前,文献报道肾脏类器官的培养方法很

多^[14,16-19],肾脏类器官诱导过程中的主要信号通路包括骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)-成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)及CHIR99021-FGF两种途径。该方法标准化程度高,但细胞因子依赖进口,因此,本研究尝试采用小分子化合物代替昂贵的细胞因子,以降低成本。既往类器官的研究大多在基质凝胶中培养,采用Matrigel或胶原凝胶作为支架^[16-17],且需加入大量的细胞因子如激活素A、骨形态发生蛋白等^[14,18-19]。目前,国际创新团队已研究出使用合成水凝胶(如PEG-based)替代Matrigel,可提高可控性及可重复性^[20]。

CHIR99021是糖原合酶激酶3 β (GSK-3 β)抑制剂,FGF为成纤维细胞生长因子,CHIR99021-FGF信号通路在iPSCs向肾脏类器官分化过程中协同调控关键发育阶段,所以本研究主要通过CHIR99021-FGF途径诱导iPSCs的分化。高浓度的CHIR99021可能模拟诱导肾单位祖细胞分化成后中胚层的Wnt信号,FGF(如FGF2/FGF9)主要在肾间充质和输尿管芽的相互作用中发挥作用^[21-23]。

本研究采用KOSR作为FGF9的替代品以诱导分化肾脏类器官,将基质胶转变为更易培养细胞的培养基,同时摒弃了旋转培养,仅通过使用超低黏附的6孔板将人类iPSCs大量分化为肾脏类器官,显著降低了时间及物质成本。在实验过程中由于肾脏类



KIM-1. 肾损伤分子1; NGAL. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; TNF- α . 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; CCL2. 趋化因子配体2; A. 不同浓度顺铂刺激肾脏类器官中KIM-1、NGAL及炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、CCL2的mRNA表达水平比较($n=3$); B. 不同浓度顺铂刺激类器官例图(倒置显微镜); C. 不同浓度顺铂刺激肾脏类器官中NGAL、KIM-1蛋白的免疫组化结果及定量分析($n=5$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

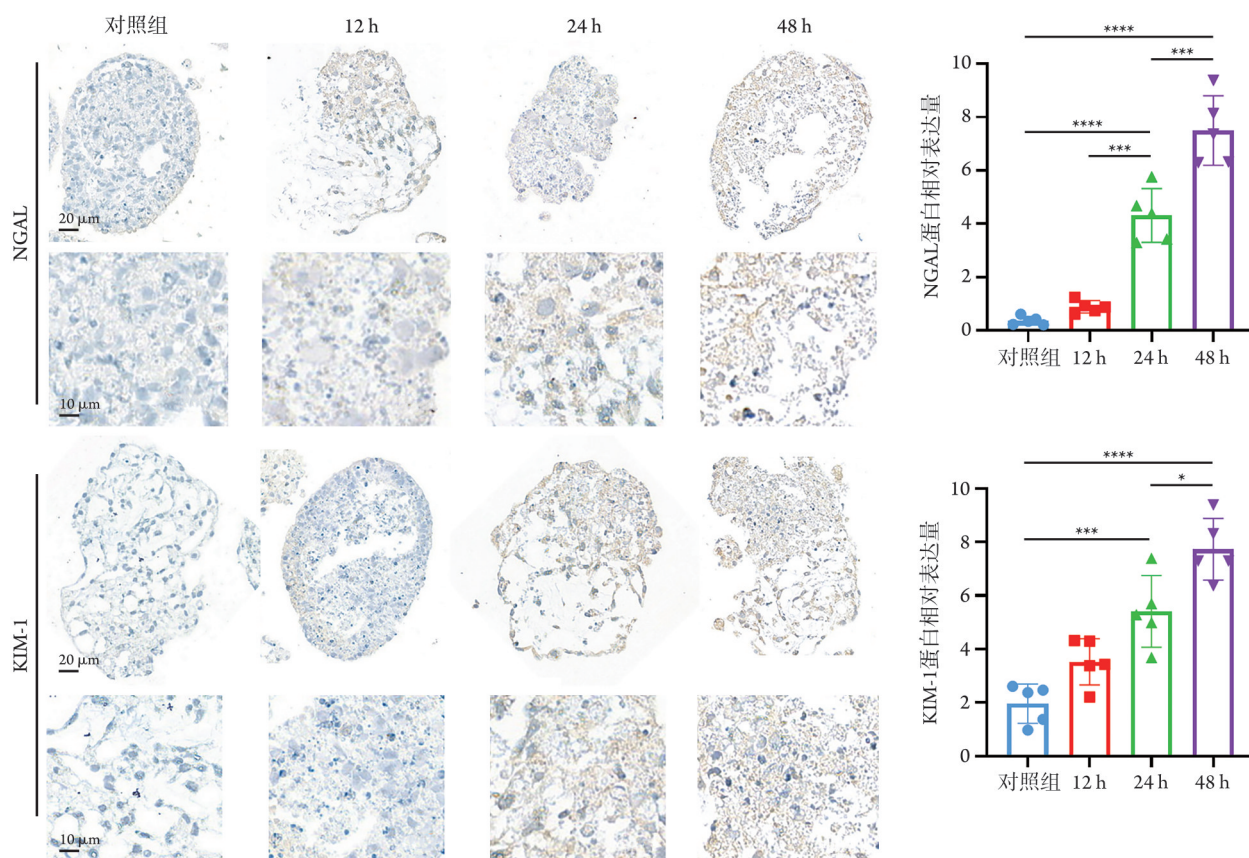
图3 不同浓度顺铂诱导急性肾小管损伤的肾脏类器官模型构建

Fig.3 Construction of kidney organoid models induced by different concentrations of cisplatin for acute tubular injury research

器官的体积逐渐增大,导致营养摄入不足,可能出现空泡化等现象,为解决此问题,本研究第6天时将培养板放置于摇床上,使得类器官充分与S2M培养基接触,有效地解决了类器官因营养不足引起的空泡化问题,确保了肾脏类器官的形成。在第14天肾脏类器官成熟后,对肾脏相关标志物的免疫荧光染色结果显示,近端、远端肾小管标志物及连接小

管标志物均有表达,且HE染色结果显示肾脏类器官分化出了类似于真实肾脏中肾小管的组织结构。

药物肾毒性是导致临床急性肾损伤发生的重要原因之一,顺铂是一种用于治疗多种肿瘤的化疗药物,但可呈剂量依赖性损伤近端肾小管^[24]。顺铂肾损伤动物模型广泛用于肾脏保护药物的筛选,但需耗费大量动物,实验周期较长。本研究利用培养得



KIM-1. 肾损伤分子1; NGAL. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图4 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激不同时间肾脏类器官中NGAL、KIM-1蛋白免疫组织化学结果及定量分析($n=5$)

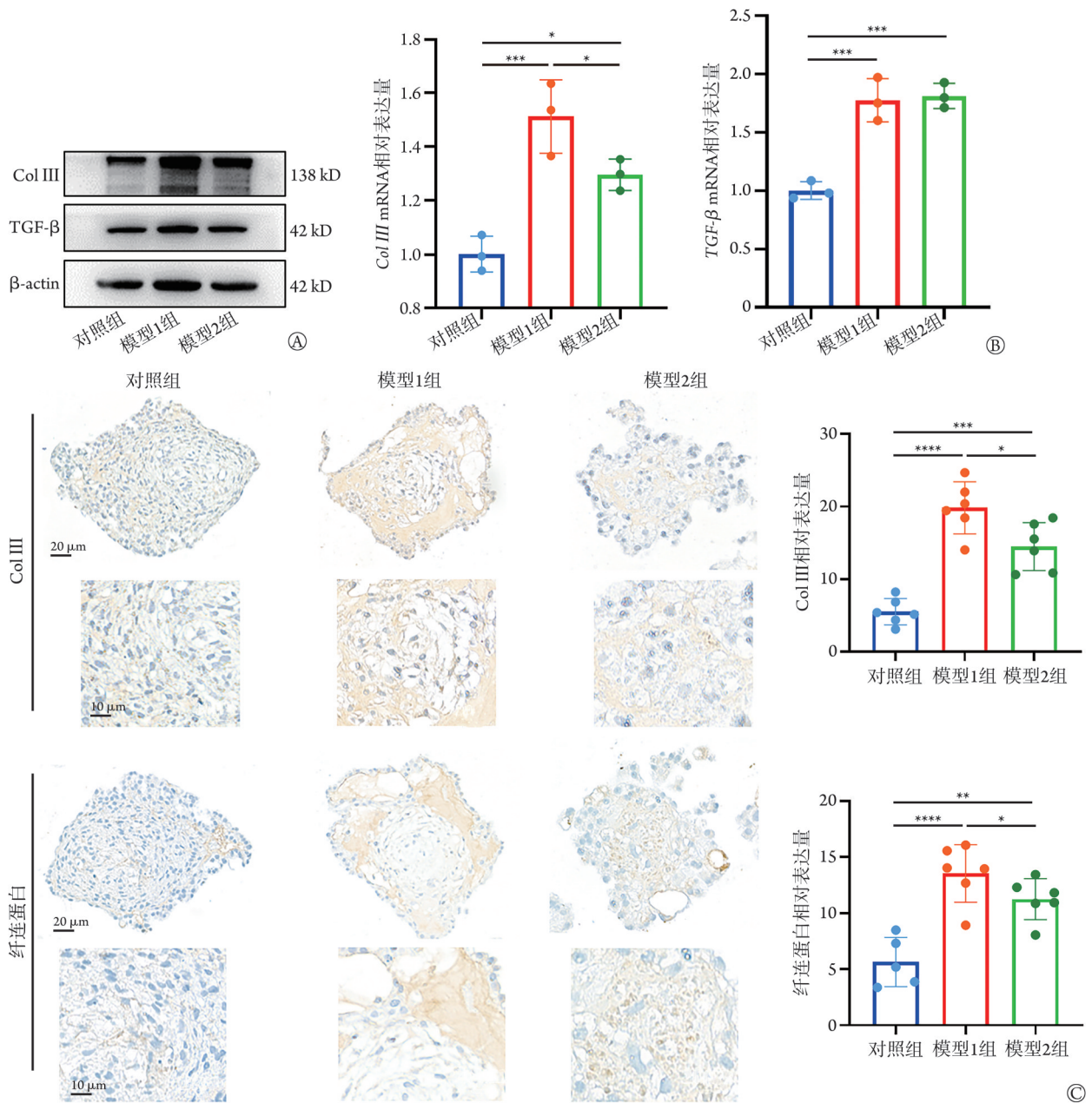
Fig.4 Immunohistochemical results and quantitative analysis of NGAL and KIM-1 proteins in kidney organoids stimulated by 30 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin at different times ($n=5$)

到的类器官构建类器官急性肾损伤模型发现, 经 30 $\mu\text{mol/L}$ 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激后, 细胞碎片增多且形态出现明显变化, 结合肾脏损伤指标 NGAL、KIM-1 及相关炎症因子, 30 $\mu\text{mol/L}$ 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂刺激可引起肾脏类器官损伤, 这与顺铂引起的体内肾损伤结果^[24]一致。但由于 50 $\mu\text{mol/L}$ 可引起肾脏类器官出现明显的组织破碎, 因此最终选择 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激用于后续实验。本研究对 30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂刺激 12、24、48 h 的损伤指标变化趋势进行分析, 结果显示, 随着刺激时间的延长, NGAL 及 KIM-1 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高。顺铂刺激后类器官受损且形状改变, 可能是由于造模后的类器官细胞活力降低导致类器官不能维持密度均匀的球体形状, 部分崩解所致。

糖尿病肾病患者占慢性肾脏病总发病人数的 40% 左右^[2], 糖尿病肾病可导致肾脏纤维化, 尤其是肾间质纤维化, 因此, 构建高糖诱导的肾脏类器官纤维化模型有助于研究糖尿病肾病发生的分子机制并进行有效的药物筛选。本研究利用肾脏类器官构建了高糖促纤维化模型, 并比较了血糖波动模型及持续恒定高糖模型的促纤维化效果, 结果显示, 在

纤维化指标的蛋白和 mRNA 水平方面, 血糖波动模型明显优于持续恒定高糖模型, 血糖波动刺激更适用于构建高糖肾脏类器官模型。其中 Col III 被认为是肾间质发生纤维化的主要细胞外基质, 而纤连蛋白及 Col III 是肾小球发生纤维化后主要沉积的纤维化蛋白。本研究检测了这三类主要参与肾脏纤维化的胞外基质蛋白, 结果证实, 血糖波动培养在 6 d 内即可促进肾脏类器官发生类似于糖尿病肾病晚期呈现的肾脏纤维化的病理特征。

虽然肾脏类器官培养技术在逐步发展, 在疾病建模、药物筛选中展现出巨大潜力, 且前期研究已经诱导出初步具有肾脏功能的肾脏类器官^[11], 应用前景广阔, 但 iPSC 类器官仍面临一系列挑战: 如器官成熟度不足、缺乏功能性血管系统等^[20,25], 从而难以维持稳定的功能^[26-29]。此外, 相比真正的肾脏组织, 肾脏类器官还存在诸多缺失环节, 包括免疫细胞、血清生长因子及内分泌信号的缺失, 以及类器官的“血管化”^[30]如何实现等。内皮细胞共培养为肾脏类器官血管化提供了可行路径, 通过模拟肾脏器官发育过程中内皮细胞及肾实质细胞的相互作用, 可能构建具有功能性血管网络的类器官。共培



Col III, 胶原蛋白III; TGF-β, 转化生长因子-β; A. Western blotting 检测三组肾脏类器官中Col III及TGF-β蛋白表达; B. 三组肾脏类器官中Col III、TGF-β mRNA 表达水平比较($n=3$); C. 免疫组织化学染色检测三组Col III、纤连蛋白表达水平及定量分析($n=5$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图5 肾脏类器官构建糖尿病肾病模型

Fig.5 Establish of diabetic nephropathy model using kidney organoids

养可选择人脐静脉内皮细胞(HUVECs)或肾微血管内皮细胞(HRGECs)^[11], 可尝试在肾脏类器官形成早期(3~5 d)加入内皮细胞混合培养, 并依赖细胞自组装形成血管, 促进血管网络的整合; 或者通过Transwell小室或微流控芯片分割两类细胞^[31], 通过分泌血管内皮生长因子(VEGF)等进行相互作用^[30]。血管化的关键因子VEGF及血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)^[32-33]可促进内皮细胞迁移及管腔形成。目前, 国外先进实验室可通过基因编辑强制内皮分化形成功能性血管^[25,34]。

综上所述, 本研究建立了一种简单、廉价且高效的培养方式, 从人源iPSC分化诱导出肾脏类器官; 利用此优化流程得到了肾脏类器官, 并成功构建顺铂诱导的急性肾损伤模型及高糖诱导的糖尿病肾病模型。随着血管化策略、多器官整合及工程技术的进步, 该肾脏类器官未来有望突破当前的瓶颈, 成为个性化医疗、药物筛选及肾脏修复的核心工具^[35]。总之, 肾脏类器官培养技术仍需不断完善, 其终极目标是可“移植”入体内治疗终末期肾病^[36]。

【参考文献】

- [1] Naganuma H, Nishinakamura R. From organoids to transplantable artificial kidneys[J]. *Transpl Int*, 2019, 32(6): 563-570.
- [2] Zhou M, Wang H, Zeng X, *et al.* Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [3] Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, *et al.* Global prevalence of chronic kidney disease - a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158765.
- [4] Favero C, Giordano L, Mihaila SM, *et al.* Postbiotics and kidney disease[J]. *Toxins (Basel)*, 2022, 14(9): 623.
- [5] Yousef Yengej FA, Jansen J, Rookmaaker MB, *et al.* Kidney organoids and tubuloids[J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1326.
- [6] Clevers H. Modeling development and disease with organoids[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [7] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247-1252.
- [8] 胡佳, 张海霞, 苏婉露, 等. 间充质干细胞对2型糖尿病小鼠糖尿病肾病进展的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(4): 383-393.
- [9] Nishinakamura R. Human kidney organoids: progress and remaining challenges[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(10): 613-624.
- [10] Takasato M, Er PX, Chiu HS, *et al.* Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 564-568.
- [11] Homan KA, Gupta N, Kroll KT, *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids *in vitro*[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(3): 255-262.
- [12] Morizane R, Bonventre JV. Kidney organoids: a translational journey[J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(3): 246-263.
- [13] Musah S, Bhattacharya R, Himmelfarb J. Kidney disease modeling with organoids and organs-on-chips[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2024, 26(1): 383-414.
- [14] Przepiorski A, Sander V, Tran T, *et al.* A simple bioreactor-based method to generate kidney organoids from pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(2): 470-484.
- [15] Gupta N, Matsumoto T, Hiratsuka K, *et al.* Modeling injury and repair in kidney organoids reveals that homologous recombination governs tubular intrinsic repair[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(634): eabj4772.
- [16] Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, *et al.* Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture[J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 560-564.
- [17] Cruz-Acuña R, Quirós M, Farkas AE, *et al.* Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(11): 1326-1335.
- [18] Sander V, Przepiorski A, Crunk AE, *et al.* Protocol for large-scale production of kidney organoids from human pluripotent stem cells[J]. *STAR Protoc*, 2020, 1(3): 100150.
- [19] Gupta N, Morizane R. Kidney development to kidney organoids and back again[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 127: 68-76.
- [20] Lawlor KT, Vanslambrouck JM, Higgins JW, *et al.* Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation[J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 260-271.
- [21] Barak H, Huh SH, Chen S, *et al.* FGF9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors in mice and man[J]. *Dev Cell*, 2012, 22(6): 1191-1207.
- [22] Czerniecki SM, Cruz NM, Harder JL, *et al.* High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 929-940.e4.
- [23] Glass NR, Takasako M, Er PX, *et al.* Multivariate patterning of human pluripotent cells under perfusion reveals critical roles of induced paracrine factors in kidney organoid development[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(2): eaaw2746.
- [24] Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, *et al.* Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(11): 1193-1200.
- [25] Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, *et al.* Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8715.
- [26] Wu HJ, Uchimura K, Donnelly EL, *et al.* Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 869-881.e8.
- [27] Combes AN, Zappia L, Er PX, *et al.* Single-cell analysis reveals congruence between kidney organoids and human fetal kidney[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 3.
- [28] Hale LJ, Howden SE, Phipson B, *et al.* 3D organoid-derived human glomeruli for personalised podocyte disease modelling and drug screening[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5167.
- [29] Yoshimura Y, Taguchi A, Tanigawa S, *et al.* Manipulation of nephron-patterning signals enables selective induction of podocytes from human pluripotent stem cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(2): 304-321.
- [30] van den Berg CW, Ritsma L, Avramut MC, *et al.* Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney organoids induces neovascularization and significant glomerular and tubular maturation *in vivo*[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 751-765.
- [31] Gijzen L, Marescotti D, Raineri E, *et al.* An intestine-on-a-chip model of plug-and-play modularity to study inflammatory processes[J]. *SLAS Technol*, 2020, 25(6): 585-597.
- [32] Bantounas I, Ranjzad P, Tengku F, *et al.* Generation of functioning nephrons by implanting human pluripotent stem cell-derived kidney progenitors[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 766-779.
- [33] Garreta E, Kamm RD, Chuva de Sousa Lopes SM, *et al.* Rethinking organoid technology through bioengineering[J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 145-155.
- [34] Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger M, *et al.* Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy[J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 505-510.
- [35] Huch M, Knoblich JA, Lutolf MP, *et al.* The hope and the hype of organoid research[J]. *Development*, 2017, 144(6): 938-941.
- [36] Trush O, Takasato M. Kidney organoid research: current status and applications[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2022, 75: 101944.

(责任编辑: 张小利)