



皮肤类器官的构建、功能及其应用研究进展*

王 敏^{1,2)} 张临风^{1,2)} 徐鹤然^{1,2)} 张晓娜^{1,2)} 化璟琳^{1,2)} 张甜甜²⁾ 赵风年^{1,2)} 朱姿英^{3)**}

(¹⁾ 北京工商大学化学与材料工程学院, 北京 100048; (²⁾ 北京工商大学-唐颐新型材料安全与评价创新研究中心, 北京 102401;

(³⁾ 中国人民解放军总医院创新医学部, 北京 100853)

摘要 皮肤类器官作为一种新型的类器官模型, 不仅能高度模拟皮肤组织的生理结构和功能, 更好地在不同体外环境下还原较真实的皮肤生态, 还可以应用于皮肤发育研究、皮肤疾病病理研究及药物筛选等领域。在干细胞研究中, 皮肤类器官模型可以在特殊的生境下对具有特定功能的皮肤细胞及其附属物进行重建和改造, 以弥补现有体外皮肤模型在结构、功能等方面的不足。基于此, 皮肤类器官将会在皮肤再生、组织修复、药物筛选及医学美容等方面扮演越来越重要的角色。本文详述了皮肤类器官构建中所参与的细胞来源及近年来的应用, 并对未来皮肤类器官的发展与优化做出了展望。

关键词 皮肤类器官, 多能干细胞, 皮肤再生, 药物筛选

中图分类号 Q813.1, R318

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0407

类器官 (organoid) 是通过多能干细胞 (pluripotent stem cell) 或胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC), 分化为多个具有特异性器官的细胞类型, 与对应的器官拥有类似的空间组织, 并能够再现对应器官的部分功能, 与体内器官显示出最大的相似性, 从而提供一个高度生理相关的系统, 也作为一种更有效的体外研究模型用于癌症、心脑血管疾病等热门领域的研究^[1]。2009年, Sato等^[2]利用体外培养的单个Lgr5干细胞, 成功获得包含小肠潘氏细胞 (paneth cells)、杯状细胞 (goblet cells)、肠上皮细胞 (enterocytes) 的肠道类器官, 建立了类器官培养系统。Huang等^[3]基于此方法建立小肠类器官模型, 发现单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 通过影响Hes1、Math1和Sox9的表达, 从而干扰小肠干细胞 (intestinal stem cells) 的分化, 表明小肠类器官是研究肠上皮-病原体互作的最适试验模型。随着类器官技术的不断发展, 科研人员从不同组织中分离出了不同类型细胞, 培养出了胃、肝脏、肺、乳腺、前列腺等类器官^[4-8]。这些类器官均具有其特异性、基因表达特征、特殊的空间结构和原始组织功能以用于体外模拟疾病发生和新药测试^[9]。

近20年来, 体外模型一直是皮肤医学领域的重要研究工具。最初的体外皮肤表皮模型系统仅由分化的表皮组成; 结构稍微复杂的全层皮肤模型, 由角质形成细胞接种于起支架作用的含有成纤维细胞的胶原或纤维蛋白基质上构建; 还可以利用成纤维细胞在体外能自身分泌细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的特点, 生成完全由人体组件组成的3D皮肤模型。与传统皮肤全层模型相比, 基于干细胞培养技术的皮肤类器官, 与体内发育过程相似, 能够基于细胞类别自我组织和定向分化, 并且可以产生皮肤模型无法比拟的皮肤附属物, 如毛囊、皮脂腺等。近年发展起来的微流控技术和3D生物打印技术的应用, 也可为皮肤疾病研究提供更加有前景的工具。本文对皮肤类器官及其附属物的构建过程, 以及皮肤类器官应用在皮肤疾病研究治疗中的相关进展进行了介绍和论述 (图1)。

* 北京工商大学青年教师科研启动基金 (QNJJ2022-27) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15120008806, E-mail: zhuziying1985@163.com

收稿日期: 2021-12-29, 接受日期: 2022-03-05

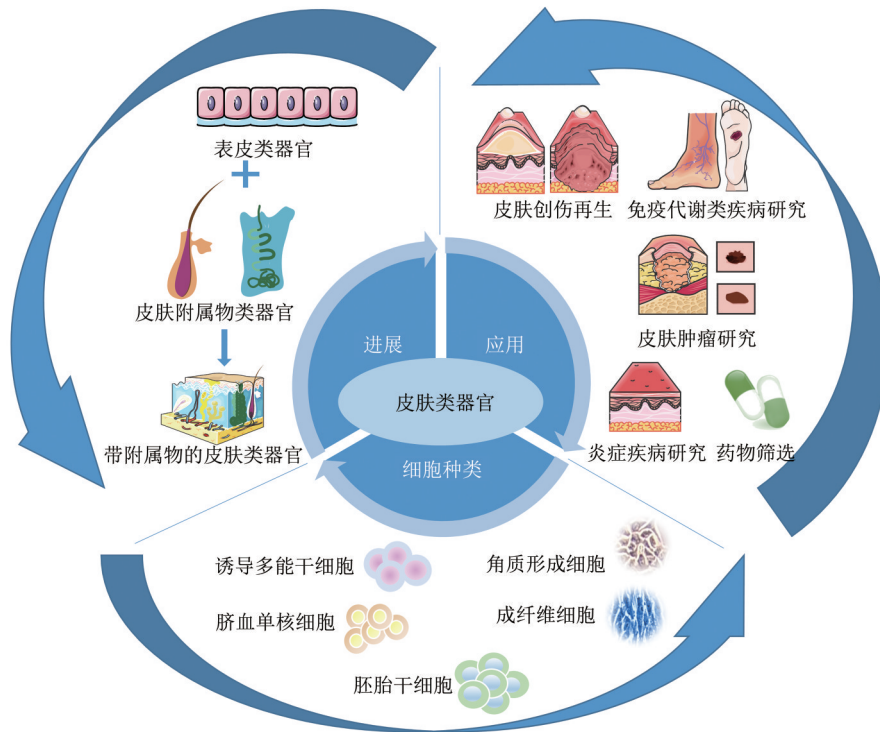


Fig. 1 Source and application of skin organoid cells

图1 皮肤类器官细胞来源及应用

1 皮肤类器官

现有的体外皮肤研究模型多以体外培养的2D皮肤细胞、3D皮肤细胞模型为主，层间相互作用与真实生理状态还存在较大差距。利用如人脐血干细胞、多能干细胞经过分化而成的三维皮肤类器官进行体外环境模拟培养，可以改善现有2D、3D模型培养，细胞类型单一、缺乏细胞与ECM间相互

作用、无法在体外自组织分化的局限性，缩小了与体内多细胞组织及其生理功能的差异性^[10-12]。例如，对于给定剂量的过氧化氢或硝酸银，皮肤类器官比单层培养的角质形成细胞、成纤维细胞具有明显的抵抗力，且具有更好的抗氧化应激能力^[13]，但同时，皮肤类器官也存在一定的局限，如生长周期和一致性尚无统一标准等（表1）^[11, 13-24]。近年来，随着动物替代试验在欧美等国的推行，体外构

Table 1 Advantages and limitations of various skin cell models

表1 不同皮肤细胞模型优势及局限性

	2D皮肤细胞模型	3D皮肤细胞模型	3D皮肤类器官
优势	方法简单易操作；实验周期短 ^[15] ；重复性高；成本较低；较易控制生长条件 ^[13]	多种细胞共培养 ^[11] ；模仿体内细胞间信息交流 ^[16] ；三维生长 ^[17] ；稳定性高；药物敏感性高 ^[19]	体外自组织分化 ^[14] ；观察细胞反应和细胞稳态；细胞间信号传递；接近体内生理情况 ^[18] ；应激能力更强；可以直观模拟药效 ^[20]
局限性	培养种类单一；生理环境不均匀 ^[11] ；细胞环境复杂 ^[22] ；与体内生理情况差异大，目前尚难具代表性 ^[16]	培养条件严格，繁琐 ^[21] ；对操作技术要求高；层间相互作用与真实生理状态还存在很大差距 ^[23]	尚无统一检测标准 ^[21] ；实验生长周期不一 ^[18] ；成品一致性差 ^[24] ；不同批次基质胶之间存在差异 ^[14]

建的皮肤类器官开始用于在体外最大程度模拟人体皮肤环境, 对皮肤疾病的进行更直观有效的研究治疗, 以及广泛应用于体外研究皮肤疾病的病理生理学和系统修复损伤。

2 皮肤及其附属物类器官的构建

长久以来应用于科学研究的动物实验, 存在如实验周期长、个体差异性大、造模难度大、种间差异大等诸多局限^[25-26]。同时, 在动物试验中出现严重毒性的药物不会继续进行人体试验, 因此部分对人体安全有效的药物, 可能在筛选过程中被遗漏^[27-28]。体外培养皮肤细胞模型或类器官具有多重优点, 逐渐被用于皮肤疾病研究及药物测试。通过体外培养的各类皮肤细胞、组织和类器官, 结合计算机模拟预测毒性等新的体外替代检测方法, 对药物前期预实验进行完善和补充, 并作为动物实验

之前的预筛选, 更高通量大规模地进行筛选, 有较好的一致性。所以, 构建具备一定结构和功能的类器官可以在特定条件下被用于实现大规模、高通量的实验模式, 以此对传统的动物实验进行补充和完善^[29-30]。

2.1 细胞来源

构建皮肤类器官的细胞有多种来源, 包括来源于人脐带血的脐血单个核细胞、全能干细胞类的胚胎干细胞、分化功能强大的多能干细胞和诱导多能干细胞, 以及来源成体干细胞的角质形成细胞和成纤维细胞等(图2)。与普通细胞不同, 在实验室和临床研究中使用胚胎干细胞时, 还应严格遵守关于《中华人民共和国生物安全法(草案)》的说明、《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》、《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》等相关法规和科研伦理准则^[31-33]。

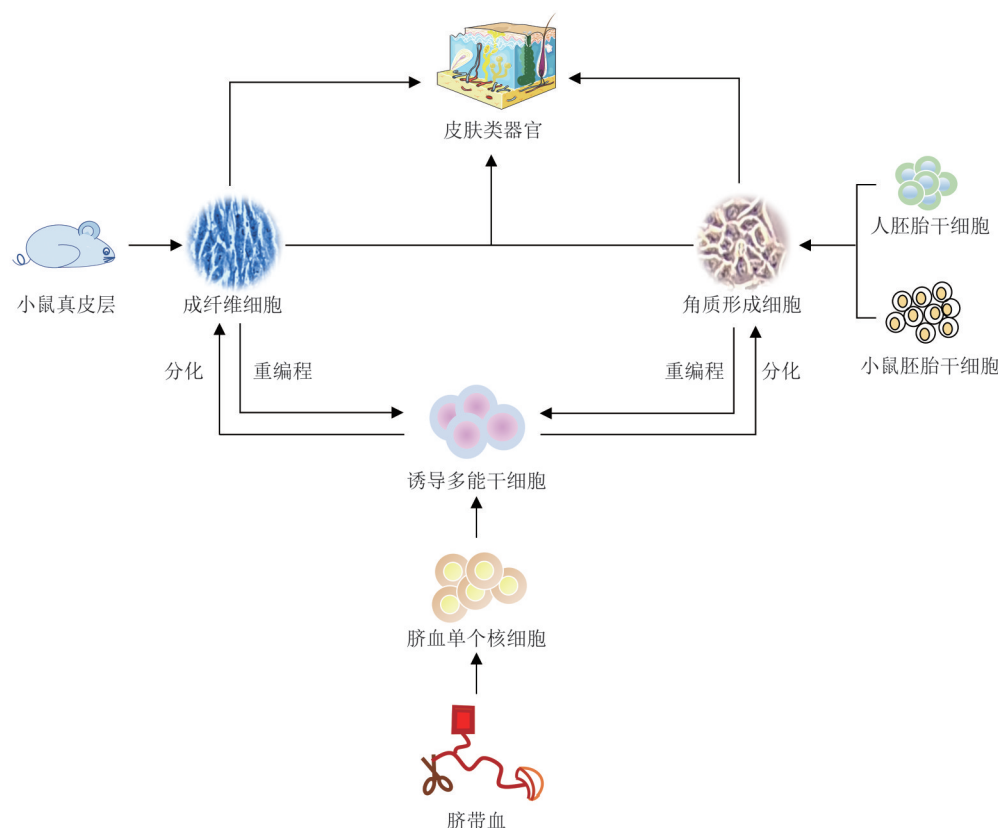


Fig. 2 The main cell source for the establishment of skin organoids

图2 构建皮肤类器官的主要细胞来源

2.1.1 脐血干细胞 (umbilical cord blood stem cell, UCBC)

因脐带血相对容易收集, 可提供较原始的免疫

细胞, 同时较易获得造血干/祖细胞 (hematopoietic stem and progenitor cells), 还可兼具非造血细胞存在的这些特性而适用于细胞治疗。同

时, 脐带血也是造血干细胞 (hematopoietic stem cells)、骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells) 和内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell) 等多项具有治疗潜力的细胞来源^[34]。脐血干细胞包括造血干细胞和脐血间充质干细胞 (cord blood mesenchymal stem cells), 以及内皮祖细胞等亚成分, 其中间充质干细胞在皮肤领域的研究较多。人脐血间充质干细胞具有多种参与抗炎作用的生长因子和细胞因子, 并且对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) /干扰素- γ (IFN- γ) 刺激的人永生化角质形成细胞具有抗炎作用, 其机制可能与激活的B细胞系分泌的免疫球蛋白抑制有关。Kim等^[35]用人脐血间充质干细胞处理轻度特应性皮炎患者的损伤处4周后, 发现皮肤水分值增加同时经皮失水率降低, 皮肤屏障功能加强。Kim等^[36-37]发现人脐带血单个核细胞 (cord blood mononuclear cells, CBMC) 来源的诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 具有较高的多能性、正常核型和分化为3个胚层的能力, 其分化而成的角质形成细胞和成纤维细胞具有与原代细胞系相似的特征。未来, 脐血干细胞可以进一步用于构建皮肤类器官, 并且在疾病治疗中将具有广泛的应用前景。

2.1.2 诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC)

iPSC作为多能干细胞的一种, 具有无限自我更新和增殖的特性, 并能分化为外胚层、中胚层、内胚层等3个胚层的成熟细胞类型^[38]。iPSC利用OCT4、SOX2、KLF4和c-Myc6等重编程因子从体细胞中产生, 克服了ESC的伦理和免疫学问题^[39-40]。除脐血干细胞来源iPSC外, 还可以来源于血细胞、角质形成细胞、成纤维细胞等。另一方面, iPSC又具有分化为各类细胞的能力, 如角质形成细胞、成纤维细胞、皮肤来源的前体细胞。同时, 皮肤细胞因为容易获得而在重新编程系统中使用最广泛, 如最常用的成纤维细胞, 也可作为皮肤类器官的主要细胞来源之一。

Jamwal等^[41]用pCXLE-HUL、pCXLE-HSK、pCXLE-hOCT3/4对取流产20周胎儿的成纤维细胞进行核转染, 经iPSC培养液中培养后, 获得非整合型iPSC系。但这种方法下成纤维细胞的重新编程成功率较低, 约为0.01%~0.5%, 整个过程大约需要3~5周^[42]。相比之下, 角质形成细胞由于其较高的基础表达水平而具有较高的重新编程效率,

在2~3周内即可达到适宜传代大小, 较之成纤维细胞提高了100倍 (约为1%~2%)^[43]。Yang等^[44]在培养皿中富集角质形成细胞, 用编码了转录因子的慢病毒转染后, 获得单个表皮细胞, 并生成了iPSC。通过成纤维细胞和角质形成细胞重新编程而得到iPSC, 为皮肤细胞获取提供了新思路。

Sah等^[45]向单个iPSC中添加分化因子、维甲酸 (RA) 和骨形态发生蛋白4 (BMP-4), 4周内高效生成了大量均匀分化的角质形成细胞, 且分化过程细胞死亡较少。Kim等^[37]以CMC-hiPSC-011细胞株为研究对象, 在分化培养基中形成成纤维细胞。Sugiyama-Nakagiri等^[46]将成纤维细胞产生的人iPSC细胞系与表皮角质形成细胞共培养, 可以诱导毛囊角质化。通过诱导iPSC分化, 促进人皮肤及其附属物的再生, 这也为皮肤和附属物相关疾病的研究及新药开发提供有效的工具。

2.1.3 角质形成细胞 (keratinocyte)

人的表皮是一个分隔开的相对独立的多层结构, 能够起到防止外来病原体和减少水分流失的作用, 并通过角质形成细胞的死亡和分化来维持皮肤器官的动态平衡, 从而使人类免受外部环境因素的影响^[47]。最近的研究表明, 将iPSCs产生分化的角质形成细胞, 接种到加入胶原基质并完成凝胶化的每层成纤维细胞上, 获得的皮肤类器官可以在体外模拟皮肤表皮层的结构和功能^[48]。

自从小鼠ESC中成功获得角质形成细胞以来, 许多研究小组已经分别从小鼠ESC、人ESC、小鼠iPSC和人iPSC中获得了相应角质形成细胞^[49-52]。Vatanserver等^[53]从小鼠ESC中分离出类胚体, 在添加用于阻断神经通路的BMP-4的基底膜基质上培养10d后, 结合透射电镜观察鉴定出分化而成的角质形成细胞。Ibrahim等^[54]使用全反式维甲酸、L-抗坏血酸、BMP-4和表皮生长因子将人iPSC分化为角质形成细胞。除此之外, 多能干细胞也可以用于分化出角质形成细胞。Zhong等^[55]通过抑制人多能干细胞转化生长因子 β 而启动外胚层谱系分化, 证明90%以上的细胞可以分化成为TP63期II角质形成细胞。Yan等^[56]实验表明小鼠iPSC来源的角质形成细胞通过提高上皮化率和减少瘢痕形成来缩短愈合时间, 由此获得的角质形成细胞可以应用于治疗受损皮肤。同时, 利用角质形成细胞构建起人皮肤表皮类器官, 未来为皮肤创面愈合提供了一种新的治疗思路与方向。

2.1.4 成纤维细胞 (fibrocyte)

位于皮肤表皮层之下更厚的真皮层, 主要“工作”细胞是成纤维细胞, 即一类纺锤形的间充质细胞, 由大量成纤维细胞生成的ECM组成, 同时还具有不同的结构, 如血管、神经、汗腺和淋巴管等, 在皮肤结构和功能中起着重要作用^[57]。Kim等^[37]将分化的成纤维细胞中和I型胶原再悬浮, 将悬液加入Transwell®平板, 在分化培养基中孵育5~7 d后接种角质形成细胞, 生成3D皮肤类器官。但是, 由成纤维细胞重新编程的诱导多能干细胞, 成功率较低, 由此构建皮肤类器官的研究目前还较少, 且应用大多集中在伤口愈合治疗方面。成纤维细胞合成结构蛋白, 如胶原蛋白 (collagen) 和弹性蛋白 (elastin), 并将其整合到大多数间充质组织ECM中去, ECM通过填充伤口部位形成瘢痕, 在伤口愈合中起着至关重要的作用^[23]。同时, 真皮成纤维细胞前体细胞分化为各种类型的细胞, 在伤口愈合中执行毛囊启动和瘢痕形成的特定功能^[58]。Yan等^[56]将C57BL/6小鼠真皮层切片, 通过胎牛血清和DMEM培养获得成纤维细胞。未来可以通过成纤维细胞构建皮肤真皮类器官, 用于深入探讨前体细胞分化机制以及ECM作用路径, 开发成纤维细胞导向的无瘢痕愈合疗法。

2.2 皮肤类器官的构建

皮肤的表皮层产生毛发和腺体, 以角质形成细胞为主要细胞类型, 它有助于体温调节和屏障形成; 皮肤真皮层囊括了血管和神经等其他结构, 以真皮成纤维细胞为主要驻留细胞, 其产生ECM, 并有助于毛囊的启动和循环。因此, 根据皮肤生理结构特点, 利用不同来源细胞, 经定向培养或诱导分化, 构建体外模拟皮肤组织系统的皮肤及其附属物类器官模型, 有助于了解发育和体内平衡过程中不同细胞类型和分子信号通路的复杂相互作用。在皮肤的胚胎发育中, Wnt、BMP、FGF等信号通路起着至关重要的作用, 其中Wnt信号已成为控制皮肤模式的主要途径, 并且控制分化的皮肤细胞功能^[59]。例如, 早年研究发现的成年小鼠皮肤创伤后依赖Wnt通路的毛囊再生^[60]。然而, 这些通路如何调节胚胎发育过程中表皮分层的遗传网络相互作用仍尚未明确^[61]。

科研人员先后建立了人类、小鼠和犬类表皮类器官, 但真皮目前仍侧重于附属物类器官的构建。Wang等^[62]将分选的ITGA6高基底细胞包埋在Matrigel®基质胶中, 覆盖培养基以培养和扩增细

胞, 最终获得人类原代表皮类器官, 可用于模拟由红色毛癣菌引起的皮肤癣菌感染模型。Boonekamp等^[63]取8~18周龄小鼠背部皮肤中分离出表皮角质形成细胞, 经培养得到用于长期扩增和分化的小鼠表皮类器官, 作为体外研究表皮稳态的工具。Wiener等^[64]取滤泡间表皮细胞接种于基底膜提取物中, 在不同培养基条件下培养犬表皮类器官, 将其作为研究表皮结构和功能障碍的体外模型。

皮肤类器官是体外保持细胞结构特征、细胞间关系以及细胞外基质的原代培养物。皮肤表皮来自外胚层, 真皮则有不同的胚胎起源, 而无论真皮起源如何, 所有类型的皮肤都需要上皮 (表皮) 和间充质 (真皮) 细胞的相互作用才能最终发育并形成附属器^[65-67]。在目前已建立有人类和小鼠的皮肤类器官中, Kim等^[36]发现CBMC-iPSC衍生的角质形成细胞和成纤维细胞具有与原代细胞系相似的特征。他们通过悬滴法生成均匀可控的胚胎体, 将其附着在IV型胶原涂层培养皿上成功分化出角质形成细胞和成纤维细胞, 并将成纤维细胞连续传代至I型胶原包被板上, 使其产生具有迁移和黏附功能的ECM, 在高钙培养基的气液界面培养体系下诱导CBMC-IPSC来源的皮肤类器官分层, 并将其移植入小鼠, 建立人源化小鼠模型。这项研究表明, 人iPSC衍生的皮肤类器官很可能是一种全新的, 而且可以替代体内和体外做皮肤研究的工具。不仅如此, Lee等^[68]从小鼠多能干细胞中定向分化出表皮和真皮细胞, 通过逐步调节转化TGF- β 和FGF信号通路, 共同诱导球形细胞聚集体内的颅骨上皮细胞 (cranial epithelial cells) 和神经嵴细胞 (cranial epithelial cells), 经过4~5个月孵育, 获得了带有皮肤附属物小鼠皮肤类器官, 未来有望用于烧伤或受伤患者的附属物皮肤的重建。

2.3 皮肤附属物类器官

人类的皮肤系统由皮肤及其附属物组成, 除皮肤表皮层和真皮层外, 它们还产生一些具有功能的附属物, 例如毛囊、皮脂腺、汗腺和指甲。目前已经成功构建的三维皮肤附属物类器官如毛囊、皮脂腺和汗腺等, 可以用于科学研究和临床治疗。

毛囊 (hair follicles) 结构复杂, 横贯上皮和真皮两层, 上皮成分包括内根鞘 (inner-root sheath)、外根鞘 (outer-root sheath) 和毛干 (hair shaft), 真皮成分包括毛乳头 (dermal papilla) 和结缔组织鞘 (connective tissue sheath)^[69]。Weber等^[70]利用体外液滴法, 将新生儿包皮角质形成细

胞与头皮真皮细胞结合,在真皮聚集处表皮细胞突起形成发夹状结构,构建了首例体外分化的毛囊类器官,但真皮细胞尚未在培养中实现扩增。同时,液滴法不适合大规模生成用于筛选分析研究和临床应用的类器官。Su等^[71]优化了这一研究成果,他们使用胎儿头皮真皮祖细胞和成人包皮表皮干细胞的简单悬浮液,可以在24 h内形成大量毛囊类器官。毛乳头位于毛囊底部毛球内,是一种由上皮基质细胞和上皮干细胞包裹的真皮凝集物^[72]。Gupta等^[73]由丝胶蛋白水凝胶包封的毛乳头细胞球体、毛囊角化细胞和干细胞,构建了体外三维多细胞类器官模型。由此可以深入探讨毛囊形态发生的潜在机制以及毛发生长中更加复杂的分子信号传递。

皮脂腺(sebaceous gland)是皮肤表皮内的一个全分泌附属物,也是毛皮脂腺单位的重要组成部分,在皮肤内环境稳定中起着核心作用^[74]。Feldman等^[75]从小鼠中分离的单个Blimp1细胞具有在体外产生皮脂腺类器官的潜力。同时,新构建

的皮脂腺类器官在研究痤疮致病机理中起重要作用,这有助于寻找痤疮治疗的新途径,并且可用于药物筛选以及研究皮脂腺稳态、功能和病理研究。

汗腺(sweat glands)在体内具有多重生理功能,如分泌汗液、排泄废物、维持体温等作用,与其他皮肤成分一样起源于表皮祖细胞,其在全层损伤后的再生能力有限,尤其严重烧伤后汗腺结构和功能的修复与再生是临床治疗面临的巨大挑战。Diao等^[76]利用酶消化法将成年小鼠爪垫真皮中汗腺上皮细胞嵌入基质胶中而建立了小鼠汗腺类器官,并且移植在受伤部位后,可参与汗腺再生,能够有效整合到组织中并使皮肤再生。这项研究成果为今后汗腺重建提供了一种新的策略,即可以在深度受伤的皮肤伤口中再生功能性汗腺样结构,并促进伤口愈合。

目前已有多种人、小鼠及犬类等来源的皮肤附属物类器官在实验室构建完成,并进行了相关病理机制和药物测试应用研究(表2)。

Table 2 Established skin organoids and its function and application

表2 已建立皮肤类器官功能及应用

类别	功能	应用
表皮	人 模拟人体皮肤微生物感染	抗菌药物测试,感染潜在机制研究 ^[62]
	小鼠 小鼠表皮干细胞长期体外分化系统	研究表皮动态平衡和疾病 ^[63]
	犬 与毛囊间表皮具有相同结构,且以相似比例表达关键标志蛋白	研究表皮疾病和表皮屏障受损引起的疾病 ^[64]
真皮及附属物	毛囊 显示毛囊结构特征、细胞-细胞相互作用以及与活体毛囊相似的低氧环境	分析毛囊形态发生的潜在机制以及控制评估新药分子功效 ^[73]
	皮脂腺 模拟体内皮脂腺表达谱系和稳态动力学	研究痤疮早期发病机制,确定潜在治疗靶点 ^[75]
	汗腺 保持显著的干细胞特征,显示出分化能力,可以分化为汗腺细胞或表皮细胞	再生过程中促进愈合和汗腺修复治疗研究 ^[76]

3 皮肤类器官的应用

随着类器官的广泛研究与应用,皮肤类器官的应用从构建实验室研究模型向伤后愈合、皮肤癌症、免疫代谢疾病和炎症疾病治疗及药物测试领域不断扩展。

3.1 皮肤创伤再生

在近10年中,干细胞在皮肤创面愈合和组织再生中的作用逐渐成为研究热点^[77]。临床上认为伤口愈合包括止血、炎症、增殖和重建4个连续且程序化的重叠阶段^[78]。该过程的一个标志是表皮完整性的恢复或上皮再生,任何直径超过4 cm的全层皮肤损失,均需要植皮治疗^[79]。人工皮肤在植皮方面应用最广,有非细胞材料、自体、同种异

体、异种或人工合成多种途径获得,而且已有多种商业化人工皮肤应用于治疗。但仍存在一些局限性,如血管生成减少、机械完整性差、无法整合、瘢痕和免疫排斥^[80]。除一些暂时替代性人工皮肤外,大部分人工皮肤无法产生深层真皮等问题未来可以通过构建皮肤类器官解决。Lee等^[18]发现移植后的皮肤类器官会整合到裸鼠皮肤中,表皮层定向形成毛囊。Takagi等^[17]将附有毛囊和皮脂腺的3D人体皮肤类器官移植到裸鼠体内,皮肤类器官功能完全正常,与表皮、立毛肌和神经纤维等宿主组织正确连接,且不会发生肿瘤。

在临床治疗中,实施的大面积创面愈合移植,不仅可能出现异体排异反应,而且会形成大面积瘢痕。Tang等^[81]利用人工皮肤联合负压封闭引流技

术 (vacuum sealing drainage, VSD), 治疗 18 例由交通事故引起的大面积皮肤缺损, 术后 14 d 伤口缝线全部拆除, 如遇感染时, 大面积皮肤缺损则很难闭合。Lei 等^[82] 将 VSD 结合皮肤拉伸装置治疗感染创面, 通过在伤口边缘反复进行间歇性和有控制的拉伸, 可以在不影响血液供应或拉伸皮肤质量的情况下获得健康的皮肤。VSD 在修复皮肤软组织缺损方面发挥了前所未有的作用, 它的三期治疗实行自体皮肤移植, 针对大面积烧伤、皮肤缺损广泛应用。未来针对大面积皮肤伤口, 自体皮肤数量不能满足移植需求时, 可以将自体多能干细胞诱导分化出的皮肤类器官与 VSD 技术相结合, 有望避免排异反应, 加速创面愈合, 应用于治疗大面积皮肤损伤。

3.2 皮肤肿瘤

经典的肿瘤癌症模型, 多以癌细胞体外培养及动物模型实现。有研究表明, 皮肤类器官可含有每种主要皮肤癌 (基底细胞癌 (basal cell carcinoma)、鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma)、黑色素瘤和默克尔细胞癌 (Merkel cell carcinoma)) 的前体细胞, 并能及时监测细胞生长和分化, 因此, 皮肤类器官模型在疾病建模应用中有巨大潜力。

皮肤鳞状细胞癌是白种人最常见的恶性肿瘤之一, 由表皮角质形成细胞的增殖分化失衡所引起, 主要入侵真皮和表皮交界处的基底膜。Commandeur 等^[83] 建立了含有皮肤鳞状癌细胞的人体外皮肤三维模型, 用于治疗皮肤鳞状细胞癌的药物筛选。黑素细胞是人类皮肤正常细胞, 一旦恶性转化成黑色素瘤 (melanoma), 将会导致一种高度侵袭性的癌症, 且转移潜力大大增加。Kim 等^[84] 从海洋微生物天然产物中分离得到(-)-4-羟基沙他酸, 将其抗色素作用在以悬滴法建立的人工黑色素瘤球体皮肤模型中, 可以降低黑素合成量。默克尔细胞癌是一种主要发生在皮肤真皮层的侵袭性恶性肿瘤, 具有神经内分泌特征。Loke 等^[85] 将多瘤病毒阳性的默克尔细胞嵌入角质形成细胞和成纤维细胞等效物之间的胶原蛋白中, 导致真皮等效物内出现默克尔细胞癌样病变。这种 3D 组织培养系统提供了一个新的体外平台, 未来有望以皮肤类器官进行研究, 用于研究病毒抗原在肿瘤发生中的作用, 确定参与该过程的其他因素, 以及筛选潜在的皮肤癌症治疗策略。

3.3 免疫及代谢类疾病

在免疫代谢方面, 调节性 T 细胞 (Tregs) 治疗自身免疫性疾病, 包括 I 型糖尿病、类风湿性关节炎等, 同时还可用于非免疫性疾病治疗, 如 2 型糖尿病、阿尔茨海默病等^[86-88]。以 Treg 为基础的治疗可以减少毒副作用, 并最终诱导免疫耐受, 而不会出现与恶性肿瘤和感染相关的免疫抑制^[89]。Landman 等^[90] 向人源化小鼠皮肤炎症模型中注射 Treg, 发现角质形成细胞的 IFN- γ 、IL-17A 和抗菌肽 hBD2 表达减少, 表皮标志物表达正常化, 抑制表皮增厚。针对特殊伤口愈合, 最近也出现了新的模型。代谢性疾病糖尿病的主要并发症之一便是伤口愈合受损, 而对糖尿病人伤口愈合潜在机制缺乏研究。León 等^[91] 开发了一种糖尿病诱导的延迟人源化伤口愈合模型, 与糖尿病患者的皮肤转录组图谱非常接近。未来有望应用皮肤类器官构建相关模型, 再现此类皮肤修复缺陷的主要组织学特征, 剖析在这种临床前模型中糖尿病伤口修复损害的早期分子机制, 为糖尿病治疗带去新希望。

3.4 炎症疾病

皮肤作为一个可以用原代细胞模拟的器官, 可以有效展示人类皮肤的多层结构和基因表达模式, 这为利用相关的原代细胞在复杂的疾病模式下有针对性地研究目标分子机制提供了可能。特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD), 又称特应性湿疹 (atopic eczema), 是一种慢性炎症性皮肤病, 以剧烈瘙痒和反复湿疹为特征^[92]。Elias 等^[93] 使用来自健康个体的成纤维细胞, 通过 siRNA 介导的基因敲除技术建立皮肤类器官模型, 发现微丝蛋白 (filaggrin) 缺乏可能是特应性皮炎的诱因。Sriram 等^[94] 利用纤维蛋白真皮基质和无血清培养条件, 在 IL-4 等细胞因子培养下, 诱导建立了特应性皮炎样皮肤模型。Kitisin 等^[95] 以皮肤念珠菌建立体外感染模型, 高通量筛选出针对多种抗真菌耐药病原体的药物, 有助于未来更有效的靶向治疗。iPSC 来源的角质形成细胞在再生医学中也具有巨大的潜力, 可作为一种快速组织替代治疗皮肤病的无限细胞源, 如角质形成细胞可以通过分泌 IL-1 β 、TNF- α 和基质金属蛋白酶, 协同触发或加剧抗球虫感染的免疫应答。Ishibashi 等^[96] 研究已经证明, 在球形分枝杆菌感染期间, 人类角质形成细胞产生 IL-5 的增加在皮肤炎症和过敏反应中担任重要角色。如果构建相应皮肤类器官模型, 或能更好地研究及治疗炎症性疾病。

3.5 药物筛选

临床试验前和疾病治疗中的药物研发与筛选,需要更高通量、大规模、快速且低成本的药物筛选最优模型。而传统的皮肤疾病研究主要基于2D和3D皮肤细胞模型,这些模型缺乏伤口微环境和异质性,不能真实反映疾病的发生发展机制、药物反应等。Wang等^[97]利用聚乳酸-羟基乙酸多孔微球共载人肝癌细胞(human hepatocellular carcinoma cells, HepG2)和人脐静脉内皮细胞(human hepatocellular carcinoma cells, HUVECs)的3D内皮化肝肿瘤组织模型,与传统的2D培养相比,模型能显著延长药物分子进入内部的内化时间,且药物对不同位置细胞的可得性不同,在肿瘤药物筛选中具有重要作用。与体内细胞相比,2D培养的细胞形态扁平且信号通路差异,影响了其对药物的真实反应^[98]。当细胞形成3D细胞簇或球体时,有时会出现多细胞耐药性^[99]。类器官模型则可以最大程度还原体内生理特征,降低异质性,在药物开发早期阶段应用,可以在动物实验前实现高效低成本的筛选大批量的候选药物^[100]。因此,皮肤类器官作为模型和方法,针对个体症状建立精准的药物筛选系统靶向治疗,同时也使不合适的药物在更早的阶段被发现,未来在实验室阶段和临床研究前的皮肤疾病研究治疗领域有广泛应用前景。

4 讨论与展望

现有类器官种类较多,但皮肤类器官的研究相对较少。以全球发病最多的非黑色素瘤皮肤癌为例,国内发病率位列第6^[101],恶性黑素瘤发病率虽较低,但黑素瘤发病率正在快速增长,相关研究和论文数量远低于小肠、肝脏等器官,亟待研究并建立皮肤类器官以用于科学研究和皮肤病临床治疗^[102]。

无论是最早研究的肠类器官,还是最新研究展示的皮肤类器官,都遵循自然发育程序,由于干细胞定向分化,而构建起与体内对应物相似的结构功能。但是,类器官在研究和应用中大都存在以下两个重要问题:一是类器官培养缺乏一致性,目前无法达到标准化生产;二是现有类器官附属物种类不全,无法真实模拟脂质代谢、血液循环等体内生理情况。

类器官培养缺乏一致性,可能与细胞的来源、形态大小和培养条件难以实现严格控制有关。针对前述多种细胞来源所制备的皮肤类器官,需要统一

特定的细胞来源。在培养过程中使用的培养基、生长因子等试剂耗材同样需要做统一规格。类器官中常用的三维水凝胶同样需要标准化。Gjorevski等^[24]利用ECM力学的局部图案化和拓扑结构的水凝胶支架来构建初始大小和形状可控的类器官,通过从外部控制小肠干细胞的自组织过程,实现及时预测和影响其发育过程,并有利于确定上皮模式形成的潜在机制。皮肤类器官的一致性可以参考以上条件做出相应改进,如统一类器官三维培养所使用的凝胶,继而控制细胞培养初始形态。促进多能干细胞的扩增,可以使用完全重组的ECM蛋白、表面植有促进细胞黏附的多肽和合成聚合物涂层^[103-105]。Lee等^[65]在从小鼠肉瘤细胞中提取的凝胶状蛋白质混合物Matrigel®基质胶中培养的多能干干细胞衍生的皮肤类器官模型显示,在小鼠体内30 d内可产生皮脂腺、脂肪细胞和毛囊。但动物源性基质存在批次间差异和高成本的限制,无法轻松定制以获得特定器官的独特类器官生态位。于是,研究人员将目光投向了可以提供化学基质的生物工程材料——由纳米材料注入的复合水凝胶^[106]。具有一致性高的可重复性复合水凝胶有望提高类器官培养的效率和一致性。

类器官培养过程中的生长情况应及时监测,是否达到应用要求也需在生长后期制定相应的标准及检测方法。近年发展起来的器官芯片(organ-on-a-chip, OOC)技术和微流控芯片(lab-on-a-chip, LOC)可以对结构和功能清晰的人体器官进行设计,模拟器官和器官系统活动、生物力学及生理代谢反应,精确控制细胞及微环境,实现在特定环境中研究特定器官的人体生理学。应用含有微型细胞培养设备的皮肤芯片技术,可以见证细胞360°的扩散、迁移、增殖、分化以及相互作用,同时模拟皮肤多种生理代谢功能,如脂质代谢、代谢产物分析、皮肤渗透性等,并可建立相应的体外皮肤刺激评估模型^[107-108]。器官芯片与类器官技术有效结合,可以实现体外重建人体器官的最终目标。目前,研究人员也正在积极探索结合这两种技术的可能性和最佳方法。

缺乏定植于皮肤类器官的附属物,也无法实现在体外模拟真实的皮肤系统。毛囊可以由干细胞培养成皮肤类器官后生成,也可在直接类器官生长前期加入毛囊角化细胞、毛乳头细胞和干细胞共同培养,皮脂腺和汗腺则需各自生成单个类器官。皮肤血管支持血液及代谢循环,目前已有应用于脑、肾

类器官的模型, 但尚未出现在皮肤类器官模型中^[109-110]。然而, 血管生成在伤口愈合中尤为重要, 基于水凝胶血管化构建的类器官模型, 将血管生成相关因子直接加入水凝胶基质中, 以此调节生物信号的传递, 加速血管形成, 未来有望构建血管化的皮肤类器官^[111]。通过产生黑色素以防止紫外线对人体皮肤细胞产生损伤的黑素细胞也已在实验室建立了相应的黑素瘤类器官模型, 可以高通量测试单药和组合治疗策略的功效, 之后有望应用于皮肤类器官中^[112]。未来还可以尝试将不同类型的免疫细胞引入类器官以构建具有免疫能力的皮肤模型, 这将有助于研究表皮细胞与免疫细胞之间的复杂串扰, 更好地了解皮肤组织对由皮肤微生物等有害因素引发感染的免疫反应机制。

现阶段, 实验室体外培养的2D/3D细胞模型、类器官以及动物实验在药物研发领域被作为必要的评价流程。通过较易控制个体一致性的2D/3D细胞模型或类器官的验证和大规模筛选, 可以获得大量前期数据, 为后期动物实验的开展提供支撑, 并节约成本、缩短实验周期。然而, 无论是普通细胞模型还是类器官技术, 仍存在众多局限性, 相关研究仍然不能满足实际应用要求, 未来还需要能够大规模稳定生产的技术和方法。相信在不远的将来, 皮肤类器官所涵盖的细胞和组织种类将越来越丰富, 具备免疫反应、代谢、血液循环等体内功能, 可以在体外环境下实现更接近真实状态的皮肤生理生态系统。

参 考 文 献

- [1] Hu J L, Todhunter M E, LaBarge M A, *et al.* Opportunities for organoids as new models of aging. *J Cell Biol*, 2018, **217**(1): 39-50
- [2] Sato T, Vries R G, Snippert H J, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, **459**(7244): 262-265
- [3] Huang J, Zhou C, Zhou G H, *et al.* Effect of *Listeria monocytogenes* on intestinal stem cells in the co-culture model of small intestinal organoids. *Microb Pathog*, 2021, **153**: 104776
- [4] Barker N, Huch M, Kujala P, *et al.* Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell*, 2010, **6**(1): 25-36
- [5] Huch M, Dorrell C, Boj S F, *et al.* *In vitro* expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 2013, **494**(7436): 247-250
- [6] Rock J R, Onaitis M W, Rawlins E L, *et al.* Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(31): 12771-12775
- [7] Linnemann J R, Miura H, Meixner L K, *et al.* Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development (Cambridge and England)*, 2015, **142**(18): 3239-3251
- [8] Karthaus W R, Iaquinta P J, Drost J, *et al.* Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 2014, **159**(1): 163-175
- [9] Xia X Y, Li F, He J, *et al.* Organoid technology in cancer precision medicine. *Cancer Lett*, 2019, **457**: 20-27
- [10] Antoni D, Burckel H, Josset E, *et al.* Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(3): 5517-5527
- [11] Souza A G, Silva I B B, Campos-Fernandez E, *et al.* Comparative assay of 2D and 3D cell culture models: proliferation, gene expression and anticancer drug response. *Curr Pharm Des*, 2018, **24**(15): 1689-1694
- [12] Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep*, 2015, **33**(4): 1837-1843
- [13] 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 Biotechnol*, 2006, **122**(3): 372-381
- [14] Blondel D, Lutolf M P. Bioinspired hydrogels for 3D organoid culture. *Chimia (Aarau)*, 2019, **73**(1): 81-85
- [15] Kieninger J, Weltin A, Flamm H, *et al.* Microsensor systems for cell metabolism - from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip*, 2018, **18**(9): 1274-1291
- [16] Nugraha B, Buono M F, von Boehmer L, *et al.* Human cardiac organoids for disease modeling. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, **105**(1): 79-85
- [17] Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, *et al.* Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model. *Sci Adv*, 2016, **2**(4): e1500887
- [18] Lee J, Koehler K R. Skin organoids: a new human model for developmental and translational research. *Exp Dermatol*, 2021, **30**(4): 613-620
- [19] Eglén R M, Reisine T. Human iPS cell-derived patient tissues and 3D cell culture part 2: spheroids, organoids, and disease modeling. *SLAS Technol*, 2019, **24**(1): 18-27
- [20] Nie J, Hashino E. Organoid technologies meet genome engineering. *EMBO Rep*, 2017, **18**(3): 367-376
- [21] Lin A, Sved Skottvoll F, Rayner S, *et al.* 3D cell culture models and organ-on-a-chip: meet separation science and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2020, **41**(1-2): 56-64
- [22] Smith A, Watkins T, Theocharidis G, *et al.* A novel three-dimensional skin disease model to assess macrophage function in diabetes. *Tissue Eng Part C Methods*, 2021, **27**(2): 49-58
- [23] Watt F M, Fujiwara H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, **3**(4): a005124
- [24] Gjorevski N, Nikolaev M, Brown T E, *et al.* Tissue geometry drives deterministic organoid patterning. *Science*, 2022, **375**(6576): eaaw9021

- [25] Bailey J, Balls M. Recent efforts to elucidate the scientific validity of animal-based drug tests by the pharmaceutical industry, protesting lobby groups, and animal welfare organisations. *BMC Med Ethics*, 2019, **20**(1): 16
- [26] Balls M, Bailey J, Combes R D. How viable are alternatives to animal testing in determining the toxicities of therapeutic drugs?. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2019, **15**(12): 985-987
- [27] Bailey J, Thew M, Balls M. Predicting human drug toxicity and safety *via* animal tests: can any one species predict drug toxicity in any other, and do monkeys help?. *Altern Lab Anim*, 2015, **43**(6): 393-403
- [28] Bailey J, Thew M, Balls M. An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. *Altern Lab Anim*, 2014, **42**(3): 181-199
- [29] Meigs L, Smirnova L, Rovida C, *et al.* Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics. *ALTEX*, 2018, **35**(3): 275-305
- [30] Gong P, Zhang C, Chen M. Editorial: deep learning for toxicity and disease prediction. *Front Genet*, 2020, **11**: 175
- [31] 中华人民共和国全国人民代表大会. 关于《中华人民共和国生物安全法(草案)》的说明[EB/OL]. 北京: 中华人民共和国全国人民代表大会 [2020-11-08]. <http://www.npc.gov.cn/npc/c30834/202010/a2d515b5158c4216b9e1d83038b5c820.shtml>
The National People's Congress of the People's Republic of China. The statement about *The Biosecurity Law of the People's Republic of China(draft)* [EB/OL]. Beijing: The National People's Congress of the People's Republic of China[2020-11-08]. <http://www.npc.gov.cn/npc/c30834/202010/a2d515b5158c4216b9e1d83038b5c820.shtml>
- [32] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 涉及人的生物医学研究伦理审查办法[EB/OL]. 北京: 中华人民共和国卫生和计划生育委员会 [2016-12-01]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5227817.htm
The National Health Commission of the People's Republic of China. Ethical review of biomedical research involving humans [EB/OL]. Beijing: The National Health Commission of the People's Republic of China[2016-12-01]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5227817.htm
- [33] 中华人民共和国科学技术部及中华人民共和国卫生部. 人胚胎干细胞研究伦理指导原则[EB/OL]. 北京: 中华人民共和国科学技术部及中华人民共和国卫生部[2003-12-24]. https://www.nsf.gov.cn/nsfc/cen/pfzl/pufanew/20110801_13.htm
The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China and The National Health Commission of the People's Republic of China. Ethical guidelines for human embryonic stem cell research[EB/OL]. Beijing: The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China and The National Health Commission of the People's Republic of China[2003-12-24]. https://www.nsf.gov.cn/nsfc/cen/pfzl/pufanew/20110801_13.htm
- [34] Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, *et al.* Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, **17**(6): 691-699
- [35] Kim Y J, Ahn H J, Lee S H, *et al.* Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response. *Biomed Pharmacother*, 2020, **131**: 110789
- [36] Kim Y, Ju J H. Generation of 3D skin organoid from cord blood-derived induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp*, 2019(146): e59297
- [37] Kim Y, Park N, Rim Y A, *et al.* Establishment of a complex skin structure *via* layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2018, **9**(1): 217
- [38] Yilmaz A, Braverman-Gross C, Bialer-Tsypin A, *et al.* Mapping gene circuits essential for germ layer differentiation *via* loss-of-function screens in haploid human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2020, **27**(4): 679-691
- [39] Dejosez M, Zwaka T P. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**: 737-265
- [40] Scheiner Z S, Talib S, Feigal E G. The potential for immunogenicity of autologous induced pluripotent stem cell-derived therapies. *J Biol Chem*, 2014, **289**(8): 4571-4577
- [41] Jamwal V S, Vishnu V V, Domreddy A, *et al.* Generation of iPSC from fetal fibroblast cells obtained from an abortus with type-I tri-allelic variants. *Stem Cell Res*, 2020, **48**: 101963
- [42] Fidan K, Ebrahimi A, Çağlayan Ö H, *et al.* Transgene-free disease-specific iPSC generation from fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol Biol*, 2016, **1353**: 215-231
- [43] Khazaei M, Ahuja C S, Fehlings M G. Induced pluripotent stem cells for traumatic spinal cord injury. *Front Cell Dev Biol*, 2017, **4**: 152
- [44] Yang Y H, Zhang R Z, Cheng S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human epidermal keratinocytes. *Cell Reprogram*, 2018, **20**(6): 356-364
- [45] Sah S K, Kanaujia J K, Chen I P, *et al.* Generation of keratinocytes from human induced pluripotent stem cells under defined culture conditions. *Cell Reprogram*, 2021, **23**(1): 1-13
- [46] Sugiyama-Nakagiri Y, Fujimura T, Moriwaki S. Induction of skin-derived precursor cells from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2016, **11**(12): e0168451
- [47] Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(4): 328-340
- [48] Aguiar C, Therrien J, Lemire P, *et al.* Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Equine Vet J*, 2016, **48**(3): 338-345
- [49] Bilousova G, Chen J, Roop D R. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage. *J Invest Dermatol*, 2011, **131**(4): 857-864
- [50] Huang H J, Gao Q S, Tao B F, *et al.* Long-term culture of keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, **44**(7): 193-203
- [51] Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic

- stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(26): 15625-15630
- [52] Kogut I, Roop D R, Bilousova G. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. Methods Mol Biol, 2014, **1195**: 1-12
- [53] Vatansever H S, Uluer E T, Aydede H, *et al.* Analysis of transferred keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells on experimental surgical skin wounds of mouse. Acta Histochem, 2013, **115**(1): 32-41
- [54] Ibrahim M R, Medhat W, El-Fakahany H, *et al.* Deriving keratinocyte progenitor cells and keratinocytes from human-induced pluripotent stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2020, **54**(1): e119
- [55] Zhong H, Ren Z, Wang X Y, *et al.* Staged keratinocyte differentiation from human embryonic stem cells by defined signal transduction modulators. Int J Biol Sci, 2020, **16**(8): 1450-1462
- [56] Yan Y, Jiang J, Zhang M, *et al.* Effect of iPSCs-derived keratinocytes on healing of full-thickness skin wounds in mice. Exp Cell Res, 2019, **385**(1): 111627
- [57] Solé-Boldo L, Raddatz G, Schütz S, *et al.* Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. Commun Biol, 2020, **3**(1): 188
- [58] Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018, **7**(2): e307
- [59] Lim X, Nusse R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, **5**(2): a008029
- [60] Ito M, Yang Z, Andl T, *et al.* Wnt-dependent *de novo* hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. Nature, 2007, **447**(7142): 316-320
- [61] Zhu X J, Liu Y, Dai Z M, *et al.* BMP-FGF signaling axis mediates Wnt-induced epidermal stratification in developing mammalian skin. PLoS Genet, 2014, **10**(10): e1004687
- [62] Wang X, Wang S Y, Guo B L, *et al.* Human primary epidermal organoids enable modeling of dermatophyte infections. Cell Death Dis, 2021, **12**(1): 35
- [63] Boonekamp K E, Kretzschmar K, Wiener D J, *et al.* Long-term expansion and differentiation of adult murine epidermal stem cells in 3D organoid cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(29): 14630-14638
- [64] Wiener D J, Studer I C, Brunner M A T, *et al.* Characterization of canine epidermal organoid cultures by immunohistochemical analysis and quantitative PCR. Vet Dermatol, 2021, **32**(2): 179-e44
- [65] Lee J, Böske R, Tang P C, *et al.* Hair follicle development in mouse pluripotent stem cell-derived skin organoids. Cell Rep, 2018, **22**(1): 242-254
- [66] Asakawa K, Toyoshima K E, Ishibashi N, *et al.* Hair organ regeneration *via* the bioengineered hair follicular unit transplantation. Sci Rep, 2012, **2**: 424
- [67] Fernandes K J, McKenzie I A, Mill P, *et al.* A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. Nat Cell Biol, 2004, **6**(11): 1082-1093
- [68] Lee J, Rabbani C C, Gao H, *et al.* Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells. Nature, 2020, **582**(7812): 399-404
- [69] Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. N Engl J Med, 1999, **341**(7): 491-497
- [70] Weber E L, Woolley T E, Yeh C Y, *et al.* Self-organizing hair peg-like structures from dissociated skin progenitor cells: new insights for human hair follicle organoid engineering and Turing patterning in an asymmetric morphogenetic field. Exp Dermatol, 2019, **28**(4): 355-366
- [71] Su Y Q, Wen J, Zhu J R, *et al.* Pre-aggregation of scalp progenitor dermal and epidermal stem cells activates the WNT pathway and promotes hair follicle formation in *in vitro* and *in vivo* systems. Stem Cell Res Ther, 2019, **10**(1): 403
- [72] Driskell R R, Clavel C, Rendl M, *et al.* Hair follicle dermal papilla cells at a glance. J Cell Sci, 2011, **124**(Pt 8): 1179-1182
- [73] Gupta A C, Chawla S, Hegde A, *et al.* Establishment of an *in vitro* organoid model of dermal papilla of human hair follicle. J Cell Physiol, 2018, **233**(11): 9015-9030
- [74] Niemann C, Horsley V. Development and homeostasis of the sebaceous gland. Semin Cell Dev Biol, 2012, **23**(8): 928-936
- [75] Feldman A, Mukha D, Maor I I, *et al.* Blimp1+ cells generate functional mouse sebaceous gland organoids *in vitro*. Nat Commun, 2019, **10**(1): 2348
- [76] Diao J M, Liu J, Wang S Y, *et al.* Sweat gland organoids contribute to cutaneous wound healing and sweat gland regeneration. Cell Death Dis, 2019, **10**(3): 238
- [77] Blanpain C. Stem cells: skin regeneration and repair. Nature, 2010, **464**(7289): 686-687
- [78] Sorg H, Tilkorn D J, Hager S, *et al.* Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. Eur Surg Res, 2017, **58**(1-2): 81-94
- [79] Herndon D N, Barrow R E, Rutan R L, *et al.* A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. Ann Surg, 1989, **209**(5): 547-553
- [80] MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. Nature, 2007, **445**(7130): 874-880
- [81] Tang J, Guo W C, Yu L, *et al.* Clinical efficacy of artificial skin combined with vacuum sealing drainage in treating large-area skin defects. Chin J Traumatol, 2010, **13**(5): 289-292
- [82] Lei Y, Liu L, Du S H, *et al.* The use of a skin-stretching device combined with vacuum sealing drainage for closure of a large skin defect: a case report. J Med Case Rep, 2018, **12**(1): 264
- [83] Commandeur S, van Drongelen V, de Gruijl F R, *et al.* Epidermal growth factor receptor activation and inhibition in 3D *in vitro* models of normal skin and human cutaneous squamous cell carcinoma. Cancer Sci, 2012, **103**(12): 2120-2126
- [84] Kim K, Leutou A S, Jeong H, *et al.* Anti-pigmentary effect of (-)-4-hydroxysattabacin from the marine-derived bacterium *Bacillus sp.* Mar Drugs, 2017, **15**(5): 138
- [85] Loke A S W, Longley B J, Lambert P F, *et al.* A novel *in vitro* culture model system to study merkel cell polyomavirus-associated MCC using three-dimensional organotypic raft equivalents of human

- skin. *Viruses*, 2021, **13**(1): 138
- [86] Bettini M, Bettini M L. Function, failure, and the future potential of Tregs in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2021, **70**(6): 1211-1219
- [87] El-Banna H S, Gado S E. Vitamin D: does it help Tregs in active rheumatoid arthritis patients. *Expert Rev Clin Immunol*, 2020, **16**(8): 847-853
- [88] Baek H, Park S Y, Ku S J, *et al.* Bee venom phospholipase A2 induces regulatory T cell populations by suppressing apoptotic signaling pathway. *Toxins (Basel)*, 2020, **12**(3): 198
- [89] Eggenhuizen P J, Ng B H, Ooi J D. Treg enhancing therapies to treat autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(19): 7015
- [90] Landman S, de Oliveira V L, Peppelman M, *et al.* Successful regulatory T cell-based therapy relies on inhibition of T cell effector function and enrichment of FOXP3+ cells in a humanized mouse model of skin inflammation. *J Immunol Res*, 2020, **2020**: 7680131
- [91] León C, García-García F, Llamas S, *et al.* Transcriptomic analysis of a diabetic skin-humanized mouse model dissects molecular pathways underlying the delayed wound healing response. *Genes (Basel)*, 2020, **12**(1): 47
- [92] Silverberg J I, Thyssen J P, Paller A S, *et al.* What's in a name? Atopic dermatitis or atopic eczema, but not eczema alone. *Allergy*, 2017, **72**(12): 2026-2030
- [93] Elias M S, Wright S C, Nicholson W V, *et al.* Functional and proteomic analysis of a full thickness filaggrin-deficient skin organoid model. *Wellcome Open Res*, 2019, **4**: 134
- [94] Sriram G, Bigliardi P L, Bigliardi-Qi M. Full-thickness human skin equivalent models of atopic dermatitis. *Methods Mol Biol*, 2019, **1879**: 367-383
- [95] Kitisin T, Muangkaew W, Ampawong S, *et al.* Utilization of an *in vitro* biofabricated 3D skin as a pathological model of cutaneous candidiasis. *New Microbiol*, 2020, **43**(4): 171-179
- [96] Ishibashi Y, Sugita T, Nishikawa A. Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, **48**(3): 400-409
- [97] Wang Y, Kankala R K, Zhang J, *et al.* Modeling endothelialized hepatic tumor microtissues for drug screening. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, **7**(21): 2002002
- [98] Weaver V M, Lelièvre S, Lakins J N, *et al.* Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, 2002, **2**(3): 205-216
- [99] Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, **36**(2-3): 193-207
- [100] Kondo J, Inoue M. Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy. *Cells*, 2019, **8**(5): 470
- [101] Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol*, 2019, **5**(12): 1749-1768
- [102] 高天文, 郭伟楠. 中国黑素瘤研究进展与新治疗策略. *中华皮肤科杂志*, 2021, **54**(1): 27-32
- Gao T W, Guo W N. *Chinese Journal of Dermatology*, 2021, **54**(1): 27-32
- [103] Villa-Diaz L G, Nandivada H, Ding J, *et al.* Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(6): 581-583
- [104] Melkounian Z, Weber J L, Weber D M, *et al.* Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(6): 606-610
- [105] Rodin S, Domogatskaya A, Ström S, *et al.* Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(6): 611-615
- [106] Zhao Z, Vizetto-Duarte C, Moay Z K, *et al.* Composite hydrogels in three-dimensional *in vitro* models. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, **8**: 611
- [107] Park S E, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip. *Science*, 2019, **364**(6444): 960-965
- [108] van den Broek L J, Bergers L J C, Reijnders C M A, *et al.* Progress and future perspectives in skin-on-chip development with emphasis on the use of different cell types and technical challenges. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, **13**(3): 418-429
- [109] Pham M T, Pollock K M, Rose M D, *et al.* Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport*, 2018, **29**(7): 588-593
- [110] Munro D A D, Davies J A. Vascularizing the kidney in the embryo and organoid: questioning assumptions about renal vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 2018, **29**(6): 1593-1595
- [111] Wang Y, Kankala R K, Ou C, *et al.* Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening. *Bioact Mater*, 2021, **9**: 198-220
- [112] Rebecca V W, Somasundaram R, Herlyn M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2858

Research Progress in Establishment, Function and Application of Skin Organoids*

WANG Min^{1,2)}, ZHANG Lin-Feng^{1,2)}, XU He-Ran^{1,2)}, ZHANG Xiao-Na^{1,2)}, HUA Jing-Lin^{1,2)},
ZHANG Tian-Tian²⁾, ZHAO Feng-Nian^{1,2)}, ZHU Zi-Ying^{3)**}

¹⁾College of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

²⁾Tangyi Bioengineering Raw Materials Cosmetics Safety and Efficacy Evaluation Technology Joint Innovation Center, Beijing Technology and Business University, Beijing 102401, China;

³⁾Division of Innovative Medical Research, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract As a new type of organoid model, skin organoids can reconstruct and modify different types of cells and appendages with specific functions such as umbilical cord blood stem cells, induced pluripotent stem cells, keratinocytes and fibroblasts, as well as sebaceous glands, sweat gland and hair follicles under special habitats, which can not only highly simulate the physiological structure and function of skin tissues, but also better restoring more realistic skin ecology under different *in vitro* environments. It can also be used in the fields of skin wound regeneration, skin tumor, immune and metabolic diseases, treatment of inflammatory diseases and drug screening. Meanwhile, skin organoids can not only make up for the deficiencies of existing *in vitro* skin models in terms of structure and function, but also enable high-throughput screening of drugs or raw materials, reducing the time and economic costs in the later stages of drug screening. However, due to the limitations of current technology, the types and functions of organoids cannot be fully realized to realistically simulate the physiological conditions in the body such as lipid metabolism and blood circulation. Moreover, issues such as consistency and standardization of mass-produced organoids need to be addressed, such as source cells, structure and function, which require the establishment of appropriate standards based on practical applications. Based on this, this paper details the cell sources involved in skin organoids construction and their applications in recent years and several skin appendages like organs that have been constructed and provides an outlook on the future development and optimization of skin organoids.

Key words skin organoid, pluripotent stem cells, skin regeneration, drug screening

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0407

* This work was supported by a grant from Research Foundation for Young Teachers of Beijing Technology and Business University (QNJJ2022-27).

** Corresponding author.

Tel: 86-15120008806, E-mail: zhuziying1985@163.com

Received: December 29, 2021 Accepted: March 5, 2022