

小鼠气道类器官炎症模型的构建

王沁心¹, 王晨萱^{2,3}, 孙登龙^{2,3}, 樊启贵^{2,3}, 詹 扬^{2,3}, 李颖萌^{2,3}, 李诒光^{2,3}, 李 琮^{1,2}, 刘旭海^{1,3*}

1. 江西中医药大学 药学院, 南昌 江西 330004

2. 经典名方现代中药创制全国重点实验室, 南昌 江西 330004

3. 江中药业股份有限公司, 南昌 江西 330096

摘要: **目的** 构建气管组织来源的气道类器官(AO), 探究脂多糖(LPS)刺激后对该 AO 细胞存活及炎症因子表达的影响。**方法** 游离小鼠气道组织, 在体外经机械分离和胶原酶消化为单细胞, Matrigel 重悬后在 3D 环境下培养, 待其自发形成具有空腔样囊状结构, 通过叉头框蛋白 J1 (FoxJ1)、Muc5AC、P63、CC10 免疫荧光染色鉴定该囊状结构的细胞组成。待稳定传代至第 5 代后, 加入 0 (对照组)、1、5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 刺激, 通过活(钙黄绿素)、死(碘化丙啶)染色检测细胞的存活情况, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 mRNA 表达。**结果** 原代上皮细胞经 3D 培养后, 自发形成囊状空腔样结构, 并随着培养时间的延长, 可见球形结构逐步增大, 表面凸起较多新的细胞团。免疫荧光染色发现该 AO 包含纤毛细胞(FoxJ1⁺)、杯状细胞(Muc5AC⁺)、基底细胞(P63⁺)、棒状细胞(CC10⁺)。LPS 刺激后, 与对照组比较, 活死染色显示 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 诱导细胞死亡, 并显著上调 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达 ($P<0.05$ 、0.01)。**结论** 成功构建小鼠气管组织来源 AO 炎症模型, 可用于评估气道上皮细胞与炎症间的相互作用。

关键词: 气管; 气道类器官; 3D 培养; 气道炎症; 脂多糖; 慢性呼吸道疾病

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)01-0093-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.009

Construction of an inflammatory model of mouse airway organoids

WANG Qinxin¹, WANG Chenxuan^{2,3}, SUN Denglong^{2,3}, FAN Qigui^{2,3}, ZHAN Yang^{2,3}, LI Yingmeng^{2,3}, LI Yiguang^{2,3}, LI Qiong^{1,2}, LIU Xuhai^{1,3}

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. State Key Laboratory for the Modernization of Classical and Famous Prescriptions of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Research and Development Department, Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330096, China

Abstract: Objective To construct tracheal organoids derived from tracheal tissues and investigate the effects of lipopolysaccharide (LPS) stimulation on cell survival and the expression of inflammatory cytokines in these organoids. **Methods** Mouse tracheal tissues were isolated, mechanically dissociated, and digested with collagenase to obtain single cells. These cells were resuspended in Matrigel and cultured in a 3D environment, allowing them to spontaneously form cyst-like structures with lumens. The cellular composition of these structures was identified through FoxJ1, Muc5AC, P63, and CC10 immunofluorescence staining. After stable passage to the fifth generation, LPS of 0 (control group), 1, 5, 10, and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were added. Cell survival was assessed by live (calcein)-dead (PI) staining, and the expression of related inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by qRT-PCR to evaluate the impact of LPS on the function of the organoid cells. **Results** Primary epithelial cells spontaneously formed cyst-like structures with lumens after 3D culture. Over time, these spherical structures enlarged and displayed multiple new cell clusters on the surface. Immunofluorescence staining revealed that the organoids contained ciliated cells (FoxJ1⁺), goblet cells (Muc5AC⁺), club cells (P63⁺), and basal cells (CC10⁺). Following LPS stimulation, compared to control group, live-

收稿日期: 2024-09-18

基金项目: 江西省技术创新引导类计划项目 (S2023KJHZH0014)

作者简介: 王沁心 (1999—), 硕士研究生。E-mail: wqx_lesliya@163.com

*通信作者: 刘旭海, 博士, 主任药师, 主要从事中药制剂研究。E-mail: lxh@crjz.com

dead staining showed that high concentrations of LPS induced cell death and upregulated the expression of *IL-1 β* , *IL-6*, and *TNF- α* significantly ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** A mouse tracheal organoid inflammatory model was successfully constructed that can be used to evaluate the interactions between airway epithelial cells and inflammation.

Key words: trachea; airway organoid; 3D culture; airway inflammation; lipopolysaccharide; chronic respiratory diseases

慢性呼吸道疾病(CRD),如哮喘、过敏性鼻炎、咽炎、气管炎、慢性阻塞性肺炎,是全球范围内最常见的非传染性疾病之一^[1]。因其高发病率和高死亡率的特点,CRD已然成为一个巨大且不断增长的公共卫生负担^[2]。虽然不同呼吸道疾病的触发因素和病理机制略有不同,但均表现为上皮损伤或功能障碍及组织炎症状态^[3-4]。因此研究气道炎症与上皮细胞功能的关系,对于理解CRD的病理生理学,及开发有效的治疗方法至关重要。传统的体内模型和2D细胞培养在模拟气道的复杂结构和细胞相互作用方面存在局限性^[5]。随着干细胞生物学和3D培养技术的发展,已经实现了脑、肝、肠、胰腺等多种组织类器官的体外培养^[6-8]。这一技术的突破为在更具生理相关性的环境中模拟CRD,研究炎症基础机制提供了强有力的工具。

类器官是从干细胞衍生的三维结构,能够自我组装成微型化的器官,并保留关键的结构和功能特征^[9]。先前的研究已经探索了数种哺乳动物气道类器官(AO)的构建方法,包括从鼻腔活检样本中分离脱落的上皮细胞^[10]、利用iPS定向诱导分化^[11]、从肺组织中分离上皮细胞构建AO^[12]等。但从气管组织分离上皮细胞构建AO鲜有报道。考虑到气道远端和近端在细胞谱系上仍存在差异,需要更为精密的离体类器官模型用于疾病建模和药物研究。为此,本研究通过分离小鼠气管组织上皮细胞,通过3D培养构建AO,并利用脂多糖(LPS)刺激。旨在建立用于评价气道上皮细胞与炎症变化的类器官模型,为CRD新药开发提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

5只SPF级健康雄性C57/6J小鼠,6~8周龄,体质量18~23g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2022-0011。小鼠饲养在(22.0 $\pm$ 1.0) $^{\circ}$ C、相对湿度45%~55%、12h明暗循环的标准环境中,可自由摄食饮水。适应性饲养3d后进行实验,本实验经江中药业股份有限公司实验动物伦理委员会审核批准(伦理号:20231207)。

1.2 主要试剂

Advanced DMEM/F12(货号12634-010)、0.5 mol $\cdot$ L⁻¹ EDTA(货号15575020)、1 mol $\cdot$ L⁻¹ 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES,货号15630-106)、N₂ supplement(货号17502-048)、B27 supplement(货号17504-044)、L-谷氨酰胺(货号35050-061)、TryLE Express(货号12604-021), Thermo公司; Matrigel(货号356231)、Cell recovery solution(货号354253), Corning公司; 重组小鼠表皮生长因子(EGF)蛋白(货号2028-EG-200)、重组小鼠Noggin蛋白(货号6997-NG/CF)、重组小鼠R-spondin1蛋白(货号7150-RS/CF), R&D公司; RNAeasy动物RNA抽提试剂盒(货号R0026)、BeyoFast SYBR Green qPCR Mix(货号D7260), 碧云天公司; 叉头框蛋白J1(FoxJ1)单克隆抗体(货号14-9965-82)、CC10单克隆抗体(货号PA5-102469)、Muc5AC单克隆抗体(货号MA5-12178), Invitrogen公司; P63单克隆抗体(货号ab124762), Abcam公司; Pen/Strep(Gibco公司,货号15140-122); Y27632(Selleck公司,货号S6390); LPS(货号L2880)、N-乙酰半胱氨酸(货号A9165-25G)、胶原酶(货号C9407), Sigma公司。

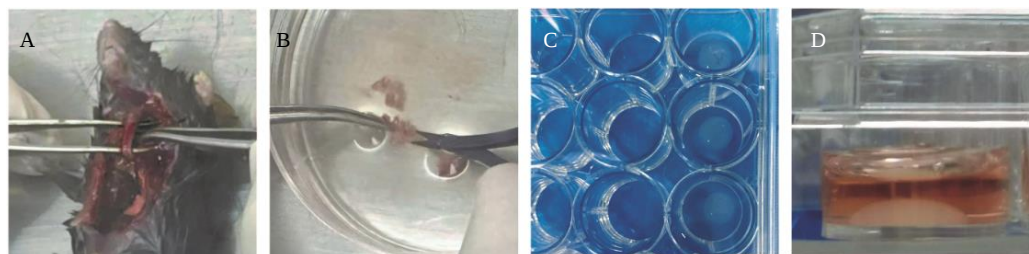
1.3 主要仪器

HFsafe-1200LC生物安全柜(Heal Force公司); DMILLED倒置显微镜(Leica公司); MCO-170MUVHL-PC三气培养箱(PHCbi公司); CFX Connect Qrt-PCR仪(BIO-RAD公司); CytoFLEX流式细胞仪(Beckman Coulter公司)。

2 方法

2.1 小鼠气管组织单细胞悬液制备

小鼠经二氧化碳麻醉后脱颈处死,用75%酒精浸泡消毒。然后转移至生物安全柜中,沿颈中侧剪开皮肤,打开颈部肌层,剥离气管组织周围的血管和肌肉组织,游离气管组织(图1-A);自喉部下方至支气管处剪断,转移至皿中,将气管组织用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗至无其他组织残留后切碎(图1-B)。用含1 $\times$ L-谷氨酰胺、10 mmol $\cdot$ L⁻¹ HEPES、



A-游离气管组织; B-组织碎块; C-Matrigel 重悬后的液滴状态; D-Matrigel 穹顶浸没在 AO 完全培养基。

A-free tracheal tissue; B-organizational fragments; C-after suspension by Matrigel; D-Matrigel dome immersed in AO complete culture medium.

图 1 分离气管组织上皮细胞

Fig. 1 Isolate epithelial cells from tracheal tissue

双抗的 Advance DMEM/F12 洗涤 5 次,用 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶原酶在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化 2 h,期间不断吹打混匀。消化结束后,经 $70\text{ }\mu\text{m}$ 滤器滤过后, $400\times g$ 离心 3 min,并计数。

2.2 AO 的培养

将得到的气管组织单细胞悬液用 $50\text{ }\mu\text{L}$ Matrigel 重悬后,接种至 24 孔板,保持 Matrigel 液滴状形态(图 1-C), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 待 Matrigel 凝固后补充 $500\text{ }\mu\text{L}$ AO 完全培养基,使 Matrigel 穹顶完全浸没在培养基中(图 1-D),并加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Y27632。每 2 天更换 1 次培养基,每 7~9 天传代 1 次。该培养体系只能维持上皮细胞的增殖分化,气管组织中的其他基质细胞和软骨细胞则在长时间的离体培养中逐渐凋亡。经梯度离心后,得到较为纯净的 AO。

2.3 AO 的传代

当 AO 培养 7~9 d 或中央出现黑色团块时,即可进行传代处理,每孔按 1:3 的比例进行传代。吸弃孔板中的废培养基,每孔加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ Cell recovery solution 溶液后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $300\times g$ 离心 5 min 后,吸弃上清。加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 基础培养基反复吹打 AO,将其吹散。经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $300\times g$ 离心 5 min 后,吸弃上清。加入一定比例的 Matrigel,与 AO 充分混匀后,接种至 24 孔板中,每孔 $50\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液。培养板于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 20 min,待 Matrigel 凝固后,补加 $500\text{ }\mu\text{L}$ 完全培养基后放入培养箱继续培养。

2.4 AO 的冻存与复苏

选取传代后培养 4~5 d 的 AO 进行冻存保种。经 Cell recovery solution 溶液除胶后,直接用 1 mL 冻存液(80% Advanced DMEM/F12+ 10% FBS+ 10% DMSO)重悬 AO,加入至 1 mL 冻存管中。经

程序降温冻存盒于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 1 d 后,转入液氮中长期保存。复苏 AO 时,将冻存管从液氮中取出后,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热,待溶解后,转移至 EP 管中,室温下 $300\times g$ 离心 5 min。按照 AO 培养步骤完成 AO 接种。

2.5 AO 的免疫荧光染色

利用免疫荧光染色对 AO 进行鉴定,以确定 AO 中所包含的细胞类型。将 AO 收集到 EP 管中,通过 Cell recovery solution 溶液除胶后,加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 4% 多聚甲醛(PFA)固定 20 min。PBS 清洗后,加入 0.1% Triton-100 孵育 20 min,进行破膜。经 PBS 清洗后, 5% BSA 孵育 1 h,进行封闭。然后按一定比例稀释一抗后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 0.1% Triton-100 清洗后,加入二抗,室温孵育 2 h。DAPI 孵育 10 min 后,进行激光共聚焦扫描拍照。

2.6 LPS 干预

通过 LPS 干预,进行 AO 炎症模型的构建。将传代的 AO 接种在 24 孔板中,培养 4 d 后,在完全培养基中加入 0(对照组)、1、5、10、 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS,培养箱中孵育 24 h。

2.7 AO 活死染色

AO 经 LPS 刺激 24 h 后,经 Cell recovery solution 溶液除胶,收集 AO,加入碘化丙啶(PI, $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和钙黄绿素($2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次后,加入抗荧光淬灭剂重悬 AO 后滴片。采用激光共聚焦成像。

2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

AO 经 LPS 刺激 24 h 后,通过 RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒提取 RNA,采用 BeyoFast SYBR Green qPCR Mix 进行 qRT-PCR,检测炎症因子白细胞介素(IL)- 1β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达 mRNA 水平。所有引物信息见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (3'→5')
<i>GAPDH</i>	ATCCTGCACCACCAACTGCT	GGGCCATCCACAGTCTTCTG
<i>IL-1β</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>IL-6</i>	CCAAGAGGTGAGTGCTTCCC	CTGTTGTTTCAGACTCTCTCCCT
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG

2.9 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式展现, 经正态检验后, 组间差异采用单因素方差分析。对于正态分布的数据, 采用 Dunnett's post hoc 检验。对于非正态分布, 采用 Kruskal-wallis 分析。所有统计图采用 Graph Pad 8 生成。

3 结果

3.1 建立小鼠 AO 培养系统

如图 2 所示, 原代上皮细胞在 3D 培养环境下, 自接种起 1 d 内, 开始自发形成边缘清晰的囊状球形结构, 球形内部存在小的空腔。连续培养至第 4

天, 可见球形结构逐步增大, 因存在细胞增殖, 球形结构表面凸起较多新的细胞团。培养至第 5 天, 可见球形结构进一步扩大, 空腔体积逐步增大, 管壁较前一天增厚。培养至第 6 天, 可发现空腔中央的细胞开始凋亡脱落, 而呈现黑褐色。当连续培养至第 11 天时, 可见 AO 体积进一步增大, 管壁与内部空腔分界清晰, 空腔内部脱落的死细胞在纤毛摆动下做圆周运动 (附录视频 1)。传代后, AO 在第 1 天即可自发展成球, 培养至第 2~3 天时, 可见具有空腔样的球状结构。此时的 AO 可用于后续的炎症模型构建。

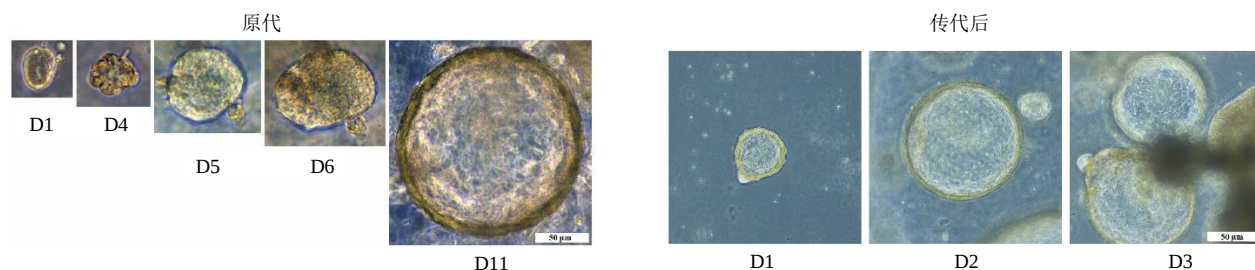


图 2 AO 明场代表图

Fig. 2 AO bright field representative image

3.2 小鼠 AO 的鉴定

气道上皮细胞主要由 4 种类型细胞构成, 分别是纤毛细胞 ($ACCTUB^+$ 或 $FoxJ1^+$)、杯状细胞 ($Muc5AC^+$)、基底细胞 ($P63^+$)、棒状细胞 ($CC10^+$) [13]。为了进一步验证构建的 AO 是否涵盖这 4 种主要细胞类型, 进行了免疫荧光染色。结果发现, AO 中包含有纤毛细胞 (图 3-A)、杯状细胞 (图 3-B)、基底细胞 (图 3-C)、棒状细胞 (图 3-D)。纤毛的摆动在气道的生物学和病理学中起着重要的作用, 纤毛细胞在气道上皮细胞中可以占到 50%~80%, 然而, 免疫荧光染色显示这一细胞数量不足, 这表明在支持多系分化和复制方面需要进一步的改进。

3.3 LPS 干预对 AO 细胞存活的影响

AO 经 1、5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 刺激 24 h

后, 通过钙黄绿素和 PI 标记 AO 中的活、死细胞。如图 4 所示, 对照组几乎没有细胞死亡, 随着质量浓度的增加, 10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 均明显引起了 AO 中细胞死亡 (红色)。结果表明 LPS 刺激引起了 AO 的上皮损伤。

3.4 LPS 干预对 AO 炎症因子表达的影响

不同质量浓度 LPS 刺激 AO 24 h 后, 检测 AO 中炎症因子的 mRNA 表达变化。与对照组比较, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 刺激可显著上调炎症因子 *IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* mRNA 的表达水平, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 刺激可显著上调 *TNF-α* mRNA 的表达水平 (图 5)。结果表明 LPS 刺激激活了 AO 的炎症响应。

4 讨论

本研究描述了 1 种构建气管组织来源 AO 的方法。通过制备气管组织单细胞悬液, 并经 3D 培养,

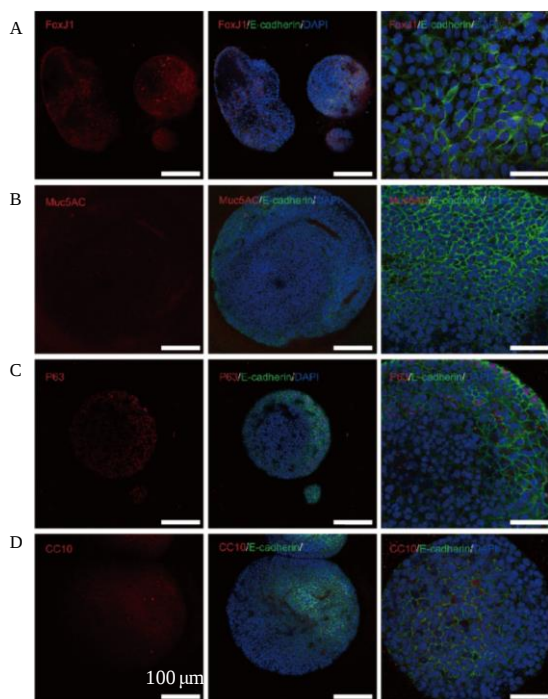


图 3 AO FoxJ1 (A)、Muc5AC (B)、P63 (C)、CC10 (D) 免疫荧光染色代表图

Fig. 3 AO FoxJ1(A), Muc5AC(B), P63(C), and CC10 (D) immunofluorescence staining representative image

形成具有一定生理功能的 AO。气管组织中除了上皮细胞外,还存在大量的基质细胞和软骨细胞。但只有上皮细胞能够自发形成较大质量的囊状结构,其余细胞在第一代培养过程中逐渐凋亡,经梯度离心得到更为纯净的 AO,从而避免了杂细胞对 AO 培养系统的影响。

该 AO 在培养过程中表现出自发形成边缘清晰的囊状结构,随培养时间的延长,结构逐步增大,内部空腔增厚,细胞开始凋亡脱落。随着传代次数的增加,该 AO 的特性持续不变。这与文献报道的相一致^[13-14],表明气管组织来源的 AO 建立成功。通过免疫荧光染色验证了所构建的 AO 中包含纤毛细胞、杯状细胞、基底细胞和棒状细胞,这一发现表明 AO 能够代表气道上皮的多种主要细胞类型^[15]。这进一步证实了气管来源的 AO 在模拟真实气道组织方面的有效性。肺组织及肺泡灌洗液来源的 AO 在一定程度上更接近于肺泡组织,这有助于肺泡上皮的再生、纤维化和感染方向的研究^[16]。而气道来源的 AO 更多地保留了纤毛运动和黏液分泌功能,这对于气道感染和气道重塑的研究更具价值^[17-18]。已有多篇文献报道,利用诱导多能干细胞(iPS)定向

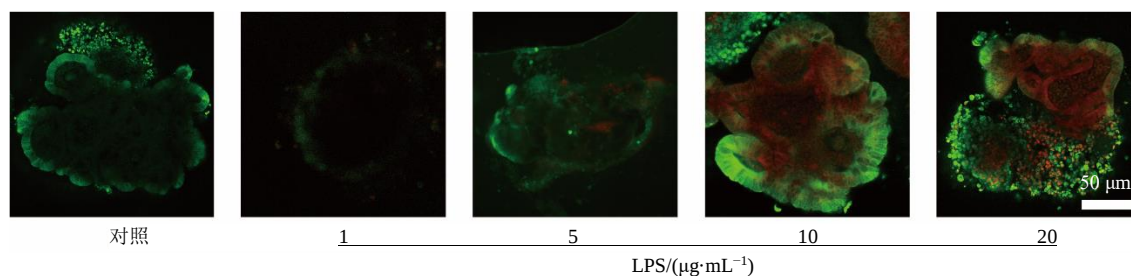


图 4 AO 活(绿色,钙黄绿素)、死(红色,PI)细胞染色代表图

Fig. 4 AO live (green, calcein)/dead (red, PI) staining representative image

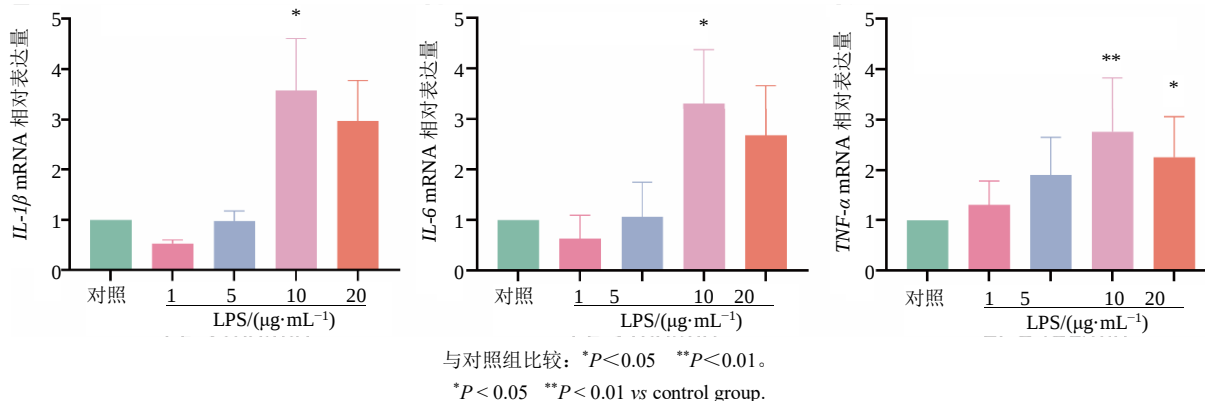


图 5 LPS 刺激对 AO 炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 5 Effect of LPS stimulation on AO inflammatory cytokine expression ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分化构建 AO, 但 AO 的成熟度仍然是一个主要问题。从细胞功能和基因表达谱来讲, iPS 来源的 AO 相当于胎儿时期的表型。而组织驻留的成体干细胞可以根据其自我更新能力分化为多个细胞系, 并能在体外长期培养过程中保持原宿主的基因表达谱, 很好地克服了 iPS 分化带来的技术挑战。可惜的是肺来源的干细胞常受限于取材, 并且肺来源的 AO 在细胞组成与功能上并不能很好地反映气道的生理变化。虽然可以从鼻腔中后部获得脱落的上皮细胞, 但上呼吸道和下呼吸道的基因表达谱存在差异。本研究构建的气管来源的 AO 则弥补了鼻组织来源 AO 的不足, 可以更精密地模拟下呼吸道近端的生理特性。总之, 为体外研究 CRD 提供了一个新的解决方案。

炎症是 CRD 发展的关键驱动因素之一。这些疾病的共同特征是气道的长期炎症和结构重塑^[19-20]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁上的一类内毒素, 可激活上皮细胞和免疫细胞, 分泌多种细胞因子和趋化因子, 介导一系列炎症反应^[21]。由于 LPS 的热稳定性和广泛的毒性作用, 被用于炎症相关研究。在本实验中, AO 经不同质量浓度 LPS 刺激 24 h 后, 发现高浓度的 LPS (10 、 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 显著引起 AO 中细胞的死亡, 表明 LPS 刺激能够导致 AO 的上皮损伤, 同时检测到炎症因子 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *TNF- α* 的 mRNA 表达显著上调, 表明 LPS 能够激活 AO 的炎症响应。这证明了 AO 模型在研究炎症响应方面的有效性, 为进一步研究气道炎症的机制提供了可靠的模型。

在气管组织中, 纤毛运动和黏液分泌是最为重要的 2 类生理活动, 而这依赖于足够多的纤毛细胞和杯状细胞。在本研究构建的 AO 中, 纤毛细胞和杯状细胞的数量稍显不足, 这提示在支持多系分化和复制方面需要进一步改进, 以提高该模型的生理相关性和应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rabe K F, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(6): 532-555.
- [2] Ferkol T, Schraufnagel D. The global burden of respiratory disease [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, 11(3): 404-406.
- [3] Mettelman R C, Allen E K, Thomas P G. Mucosal immune responses to infection and vaccination in the respiratory tract [J]. *Immunity*, 2022, 55(5): 749-780.
- [4] Samitas K, Carter A, Kariyawasam H H, et al. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited [J]. *Allergy*, 2018, 73(5): 993-1002.
- [5] Wang H, Ning X F, Zhao F, et al. Human organoids-on-chips for biomedical research and applications [J]. *Theranostics*, 2024, 14(2): 788-818.
- [6] Hattori N. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Mov Disord*, 2014, 29(2): 185.
- [7] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125.
- [8] Takebe T, Zhang R R, Koike H, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(2): 396-409.
- [9] Paschini M, Kim C F. An airway organoid is forever [J]. *EMBO J*, 2019, 38(4): e101526.
- [10] Brewington J J, Filbrandt E T, LaRosa F J 3rd, et al. Detection of CFTR function and modulation in primary human nasal cell spheroids [J]. *J Cyst Fibros*, 2018, 17(1): 26-33.
- [11] 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]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(5): 542-549.
- [12] Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen D D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling [J]. *EMBO J*, 2019, 38(4): e100300.
- [13] Zhou J, Li C, Sachs N, et al. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(26): 6822-6827.
- [14] Eenjes E, van Riet S, Kroon A A, et al. Disease modeling following organoid-based expansion of airway epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(4): L775-L786.
- [15] Louie S M, Moye A L, Wong I G, et al. Progenitor potential of lung epithelial organoid cells in a transplantation model [J]. *Cell Rep*, 2022, 39(2): 110662.
- [16] Matkovic Leko I, Schneider R T, Thimraj T A, et al. A distal lung organoid model to study interstitial lung disease, viral infection and human lung development [J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(7): 2283-2312.

- [17] Gamage A M, Tan K S, Chan W O Y, et al. Infection of human Nasal Epithelial Cells with SARS-CoV-2 and a 382-nt deletion isolate lacking ORF8 reveals similar viral kinetics and host transcriptional profiles [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(12): e1009130.
- [18] Rajan A, Weaver A M, Aloisio G M, et al. The human nose organoid respiratory virus model: An Ex vivo human challenge model to study respiratory syncytial virus (RSV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pathogenesis and evaluate therapeutics [J]. mBio, 2021, 13(1): e0351121.
- [19] Lu Z, van Eeckhoutte H P, Liu G, et al. Necroptosis signaling promotes inflammation, airway remodeling, and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2021, 204(6): 667-681.
- [20] Sun Z X, Ji N F, Ma Q Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition in asthma airway remodeling is regulated by the IL-33/CD146 axis [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1598.
- [21] Wang Y, Wan R J, Peng W, et al. Quercetin alleviates ferroptosis accompanied by reducing M1 macrophage polarization during neutrophilic airway inflammation [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 938: 175407.

[责任编辑 兰新新]