



水凝胶材料在类器官研究中的应用进展

覃馨园^{1,2}, 刘海涛¹, 甘忠桥^{1,2}, 秦建华^{1,2,3*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 北京干细胞与再生医学研究院, 北京 100101

*通讯作者, E-mail: jhqin@dicp.ac.cn

收稿日期: 2023-07-06; 接受日期: 2023-09-04; 网络版发表日期: 2024-01-08

国家重点研发计划(编号: 2022YFA1104700)和国家自然科学基金(编号: 31971373, 32171406)资助项目

摘要 类器官指通过干细胞自组织在体外三维(3D)培养条件下分化形成的功能性细胞组织复合体, 能够反映人体来源组织或器官的部分关键结构和功能特征, 是一种极具前景的体外模型体系。目前, 多数类器官的形成和培养都依赖复杂的动物来源细胞外基质(如Matrigel), 该类基质的肿瘤源性和批次差异性影响了类器官培养的重现性, 难以满足生物医学研究的需求。相比之下, 各种天然和合成水凝胶成分明确, 具有高度可调的物理和化学特性, 已广泛用于各种细胞的3D培养。本文概述了类器官的形成与培养现状, 重点介绍了各种已用于类器官研究的水凝胶材料及其设计与工程化策略, 讨论了功能化水凝胶材料在类器官基础研究和转化应用方面的潜力, 并对其未来的发展趋势与面临挑战进行了展望。

关键词 水凝胶, 类器官, 生物材料, 干细胞, 再生医学

1 引言

类器官(organoids)是近年来发展起来的一种新兴体外模型, 因其能部分再现体内对应器官的关键功能和结构特征, 引起了研究者的广泛关注, 并已在组织器官发育、疾病模拟、药物筛选和再生医学等领域显示出重要的应用前景^[1]。类器官一词最早出现在20世纪70年代的报道中, 当时其主要描述了细胞解离并重新自组织的过程。2009年, Clevers等^[2]将Lgr5⁺小肠干细胞进行3D培养, 成功实现了成体干细胞(ASCs)来源肠类器官的体外构建, 开拓了类器官研究新领域。此后, 类器官主要指通过干细胞(如胚胎干细胞(ESCs)、

诱导多能干细胞(iPSCs)等)自组织方式, 在体外3D培养条件下分化形成的功能性细胞组织复合体^[3]。与传统的2D细胞培养相比, 3D培养的类器官能提供更接近于体内的生理反应和微环境。与传统的动物模型相比, 人源干细胞衍生的类器官能够更好地模拟和反映人类特有的生理功能^[4]。近年来, 随着类器官技术的不断发展, 其定义逐渐拓展到通过组织活检得到的3D肿瘤细胞球等。

研究者可通过相继添加特定生长因子来诱导产生不同种类的类器官。大多数类器官研究中使用的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是Matrigel, 这是一种从小鼠肉瘤中提取的水凝胶材料, 其成分不确定

引用格式: Qin X, Liu H, Gan Z, Qin J. Application of hydrogel materials for organoids. *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 182–195, doi: 10.1360/SSC-2023-0129

性、批次差异性以及动物源性限制了所产生类器官在生物医学领域的应用^[5]. 针对上述问题, 人们开始发展各种可作为Matrigel替代品的成分明确、性能可调的天然和合成水凝胶材料, 并将其用于引导细胞的生存、生长、组装和分化. 首先研究的是复杂的重组脱细胞ECM (dECM), 它能够有效地支持细胞生长和分化. 随后, 研究者探索了I型胶原蛋白、明胶、纤维蛋白等天然单一生物聚合物组分的ECM. 这些蛋白类物质是天然ECM的衍生成分, 包含细胞黏附和重塑位点, 能较好地与所培养的各类器官产生细胞-基质间相互作用. 在过去10年中, 研究者开始尝试将一系列理化性能可调的合成水凝胶材料用于类器官的形成和培养, 实现了ECM力学性能的精准调控. 总之, 与现有的Matrigel相比, 成分明确的水凝胶在类器官培养方面表现出重现性好、安全性高和理化性能可调等显著优势^[6].

随着类器官领域的快速发展, 近几年也有一些类器官培养或水凝胶应用的相关综述发表, 如Ma等^[7]及Kaur等^[8]都对不同种类水凝胶的特性及应用进行了综述, 但其中并未提及水凝胶的工程化方法. Huang等^[9]详细介绍了多种类器官及其在疾病建模中的应用, 但未对类器官的形成方式及详细原理进行解释. 此外, 还有一些综述主要是具体介绍某一类器官的发展及应用^[10,11]. 因此, 我们有必要对水凝胶材料在类器官研究中的应用进展进行详细的综述. 本综述重点关注水凝胶材料作为细胞引导性支架在类器官研究方面的进展. 本文首先概述了现有类器官的形成方式和培养体系, 而后着重介绍了一些用于类器官的天然和合成水凝胶材料及其工程化方法, 并综述了基于这些水凝胶构建的类器官在疾病建模、药物研究和再生医学等领域的应用. 最后, 对水凝胶材料在类器官研究中未来的发展趋势和面临的挑战给予了展望.

2 类器官形成及其培养面临的局限

2.1 类器官形成方式

类器官技术的出现得益于干细胞技术及发育生物学研究的发展, 也建立在经典发育生物学和细胞分离与重新聚集实验的基础上. 一般认为, 类器官的形成及培养包含4个关键要素: 干细胞、干细胞生长和谱

系分化所需的调控因子、细胞外基质成分以及提供营养环境的细胞培养基. 现有类器官体系, 多源于多能干细胞(PSCs)或对应器官的祖细胞, 这些细胞在经历自我更新、空间特异的细胞谱系分化和自组织后可形成种类丰富的类器官^[12]. 其中, PSCs具有很强的分化能力, 适用于人体发育和疾病建模研究, 也有望用于细胞替代疗法.

类器官形成中很关键的一步是组织形态发生, 体内细胞运动的检测揭示了组织形态发生过程中细胞分离到离散域的机制. 例如, 在果蝇翼盘中, 细胞通过相互抑制作用建立了前后边界. 分离和重新聚集组织能够观察到细胞在体外的相对形态发生运动, 相关研究结果表明, 细胞在“细胞分选”过程中具有重组和分离的能力, 从而可形成与体内组织基本相同的结构^[13]. 器官自组装的理论基础是具有相似黏附特性的细胞的分离, 即Steinberg的差异黏附假说. 差异黏附是由细胞表面黏附蛋白介导的, 例如, 在脊椎动物神经和表皮外胚层的分离中, 其差异上皮、神经和钙黏蛋白表达介导细胞的分类.

另一种可影响组织形态发生的机制是空间限制引起的祖细胞命运决定. 例如, 脊椎动物的视网膜形成过程: 神经上皮细胞形成一个复杂谱系, 在时间和空间上都受到限制, 由此产生了视网膜的各个层. 这种分层取决于适当的干细胞分裂方向、对称分裂和非对称分裂的相互作用以及分化子细胞迁移到组织内指定的位置等. 另外, 调节自组织的分类和命运规范的结合在畸胎瘤中特别明显, 畸胎瘤由生殖系的PSCs发育而来, 其中含有多种组织器官, 如表皮、神经组织、肠道、骨骼、眼睛和四肢等. 这些组织从PSCs开始所经历的自发育及自组织过程的发生可能源于细胞分离和命运规范的再现^[14].

通常, 类器官的构建是PSCs在3D培养条件下聚集形成拟胚体(embryoid body, EB), 并经诱导分化产生三个不同胚层(外胚层、中胚层和内胚层), 最终形成对应特定组织的过程. 并非所有的类器官发生都与最初的EB阶段有关, 但它们都涉及外源性组织模式, 并最终重新聚集形成3D自组装组织. 由此产生的组织结构是高度异质的, 这使得产生单细胞类型的类器官变得困难, 但这也确保了类器官具有更近生理的多细胞类型和复杂结构, 从而使其可在全器官尺度上模拟体内发育和疾病发生等^[15].

2.2 类器官培养及其局限

目前, 类器官的培养方式主要包括包埋法、悬浮培养法和气液界面培养法等。如上文所述, 细胞外基质成分是类器官培养过程中的关键要素之一。例如, 2009年肠类器官系统, 就是将单个Lgr5⁺干细胞嵌入到肿瘤来源的基底膜提取物(BME)中, 并补充模拟肠干细胞生态位的生长因子后所建立的。此后, 研究者根据靶器官的不同, 优化出针对不同组织器官的实验方案, 并已成功构建了大脑、肝脏、肺、视网膜等各种类器官。虽然类器官的培养和应用发展迅速, 但其培养仍然依赖于3D支架BME, 这种水凝胶由ECM蛋白、蛋白多糖和从恩格尔布雷思-赫尔姆群(EHS)小鼠肉瘤中分泌的生长因子所组成的异质混合物, 其商品化提取物为Matrigel^[16]。异种成分、肿瘤源性和严重的批次间差异极大地限制了在这种基质中生长的类器官在再生医学和高通量筛选等面向临床领域中的应用^[17]。此外, 这些多组分细胞基质成分复杂, 难以进行物理和生化特性的精确调节。例如, Matrigel中存在大量与基质相关的促血管生成生长因子(VEGF、TGF- β 、PDGF 和 FGF2), 有助于筛选促血管生成和抗血管生成化合物, 但其无法增强的机械强度, 使得在其中集成血管形成所需的剪切力等物理因素十分困难; 另外, 受Matrigel批次差异影响, 研究者也难以得到稳定的药物筛选结果^[18]。BME类基质的这些不足, 促使人们不断寻找化学组分明确、机械性能可调的类器官培养支架材料。

体内的ECM是复杂的、组织有序的三维网络支架, 在调节细胞行为和组织再生中起着至关重要的作用。虽然ECM的组成和微观结构因器官而异, 但其主要成分包括纤维蛋白、糖蛋白、蛋白多糖和糖胺聚糖等, 为人体不同组织的细胞提供结构和功能支持。深入研究细胞与基质微环境的相互作用, 有助于设计合适的生物材料, 并将其用于指导细胞迁移、增殖、分化和免疫调节等过程。细胞和生物活性ECM之间的动态互动通过激活信号级联和进一步调节细胞行为来调控组织的正常活动^[19]。ECM的动态变化包括其组分的不断生产、降解和重塑, ECM成分的动态平衡对于维持细胞外环境稳态至关重要, 现有的研究也已证实ECM在细胞生长、分化和疾病进展中起决定性作用。为更好地模拟ECM的动态性质, 可在类器官构建过程中,

将干细胞、生物信号分子和ECM集成到同一体系中, 以再现体内的细胞增殖、迁移和自组织等行为。此外, 在体外引入基质重建干细胞生态位时, 应考虑生化和力学因素。类器官的形成依赖于3D基质中细胞聚集的自发形态发生, 包括细胞膨胀、分化及类器官形成和生长在内的自主动态过程往往受到外部微环境的影响^[20]。然而, 由于传统ECM微环境无法精确调控, 体外自发的类器官形态发生难以控制。因此, 设计可替代的水凝胶系统对模拟细胞生态位和调节许多细胞行为, 如增殖, 细胞形态发生、迁移和分化十分重要。

在材料选择与设计方面, 用于类器官培养的水凝胶应尽量满足以下特性: 较好的生物相容性、适宜的降解速率、可修饰的表面性能、较好的细胞黏附性、可加工性、一定的孔隙率和机械性能等。一般来说, 天然ECM的刚度取决于其来源, 其杨氏模量从大脑的0.1 kPa到骨骼的10 MPa不等。通过增加水凝胶的分子量和交联密度, 增加超分子相互作用量, 可以增强水凝胶的刚度, 以满足不同类型类器官的需要。此外, 通过改变分子量和结构以及预聚物的交联密度, 可以显著改变水凝胶的黏弹性、刚度和应力松弛等关键力学特性, 从而为某些类器官培养构建定制的或动态的基质。单一的多糖类水凝胶或合成水凝胶缺乏足够的细胞黏附因子, 难以单独支持类器官培养。为解决这一问题, 可以在水凝胶表面修饰氧基、羧基、羟基等基团来改变水凝胶的亲疏水性质及表面黏附性质。此外, 通过化学/酶交联等方法将信号蛋白(如整合素结合小分子或生物活性肽)结合到水凝胶中, 也能够显著提高材料的细胞黏附性。更为通用的方法是将多种水凝胶混合使用来提高水凝胶基质的生物及理化性质, 如在细胞黏附性较差的材料中掺入明胶等具有大量细胞黏附位点的材料。

在生物学方面, 用于类器官培养的水凝胶应是非免疫原性的, 且需要具有预期的生物活性、营养有效性、生长因子的可及性及较低的生物毒性。由于其独特的三维网络结构和易于调控的功能特性, 水凝胶是最有希望在类器官培养中取代传统基质凝胶的候选材料之一^[21]。开发可修饰的水凝胶系统, 以优化培养条件和模拟体内干细胞生态位的微环境, 有利于增加类器官的功能性并促进其转化应用^[22]。在过去的几年里, 一些天然和合成基质的替代品激增, 基于细胞和分子生物学基本原理的合成聚合物化学、三维分子模式技

术和仿生合理设计方法的重大突破,也促进了复杂水凝胶体系设计与合成的进展^[23]。

3 用于类器官培养的水凝胶种类

3.1 天然水凝胶

与EHS类基质相比,基于天然蛋白质或多糖的单一生物聚合物组分具有更加确定的组成和结构。为降低基质复杂性并提高实验的重现性,研究者开始从这些单组分生物聚合物,如I型胶原蛋白、明胶、透明质酸、海藻酸、纤维蛋白,或其混合物中提取天然水凝胶来培养各种类器官^[24,25]。每种类型的水凝胶具有不同的特性,本文主要介绍海藻酸钠、壳聚糖及透明质酸三种多糖类天然水凝胶材料以及I型胶原蛋白和明胶两种蛋白质类天然水凝胶材料。

3.1.1 海藻酸钠

海藻酸盐是一种从褐藻和某些转基因细菌中提取的多糖,具有生物相容性高、免疫原性低的特点,其与二价阳离子(如 Ca^{2+} 、 Ba^{2+})的凝胶反应温和、快速,可用于多种类器官的形成与培养^[26]。海藻酸钠的非共价水凝胶结构也在一定程度上确保了其中培养类器官在增殖和细胞自组织过程中的自由性^[27~29]。由于海藻酸钠具有相对的生物惰性,包埋在海藻酸钠中的细胞不能分化为有序结构或形成典型的类器官。为了克服这一缺点,可以通过化学添加黏合剂和水解位点来实现海藻酸钠的功能化。Fang等^[30]采用液滴微流控装置生成了无黏附海藻酸钠微珠,并进行乳腺肿瘤类器官的培养(图1a)。他们发现,海藻酸钠微珠内的肿瘤碎片形成了两种类型的类器官:管腔型和固体型。流式细胞术分析也表明,生成的类器官具有与肿瘤相似的细胞区室。这种基于海藻酸钠的乳腺肿瘤类器官的高通量培养为临床前药物靶点验证和个性化医疗提供了参考。

3.1.2 壳聚糖

壳聚糖是多糖甲壳素去乙酰化而得到的一种线性多糖,具有很好的生物相容性及生物降解性。与天然ECM组分糖胺聚糖类似,壳聚糖也能作为人工ECM的组成成分并在细胞分化中起关键作用^[31]。近年来,我们开发了一种液滴微流体系统,用于海藻酸钠-壳聚糖混合水凝胶胶囊的可控制造,通过封装来自hiPSCs的

胰腺内分泌细胞,实现了胶囊生产、3D培养和人类胰岛类器官的连续自组织形成(图1b)。所制备的这种微囊具有良好的生物相容性、稳定性和渗透性,生成的胰岛类器官含有高表达胰腺激素特异性基因和蛋白的胰岛特异性 α 和 β 样细胞。此外,它们表现出敏感的葡萄糖刺激胰岛素分泌功能,该系统具有可扩展性、易于操作和稳定性,为推进人类类器官研究和转化应用提供可能^[32]。

3.1.3 透明质酸

透明质酸(HA)具有良好的生物降解性以及调节血管通透性的功能,在细胞附着、增殖中发挥重要的生理作用^[33,34]。在人体中,透明质酸由肿瘤和基质细胞产生,与疾病进展有关。Baker等^[35]设计了一种新的交联HA水凝胶,以3D方式培养乳腺癌细胞。与Matrigel相比,在HA中培养的乳腺癌细胞对Rac抑制剂(EHT-1864)和PI3K抑制剂(AZD6482)的响应更迅速。这项研究证明了基于HA的水凝胶作为原代、患者来源细胞和细胞系体外类器官培养平台的优越性。此外,Clark等^[36]基于HA的浸入式生物打印方法实现了更一致的胶质瘤和肺腺癌脑转移类器官生成,他们利用细胞系优化了这种方法的打印参数,并进行了p53激活剂及替莫唑胺的药物筛选(图1c)。这种基于HA的生物打印方法有望实现用于药物筛选的肿瘤类器官自动化生成。

3.1.4 I型胶原蛋白

I型胶原蛋白是体内细胞外基质常见的组成成分,具有支持细胞分裂、迁移和分化等多种作用。I型胶原蛋白具有良好的生物相容性和生物降解性,通过用I型胶原蛋白替代Matrigel进行类器官培养,可以在适合临床应用的水平上培养类器官^[37]。例如,Jee等^[38]用I型胶原蛋白、哈姆氏F12营养混合物和碳酸氢盐制成了胶原基质,实现了鼠小肠源性类器官、小鼠结肠类器官、胃源性类器官和人结肠源性类器官的培养。而后他们发现在胶原基质中生长的小鼠结肠类器官与在Matrigel中生长的类器官具有非常相似的形态学和增殖率。此外,他们将胶原基质培养的小鼠结肠类器官移植到EDTA-结肠炎小鼠模型中,发现没有引起小鼠的过度免疫激活,表明I型胶原蛋白培养的类器官具有较好的生物安全性和可靠性。

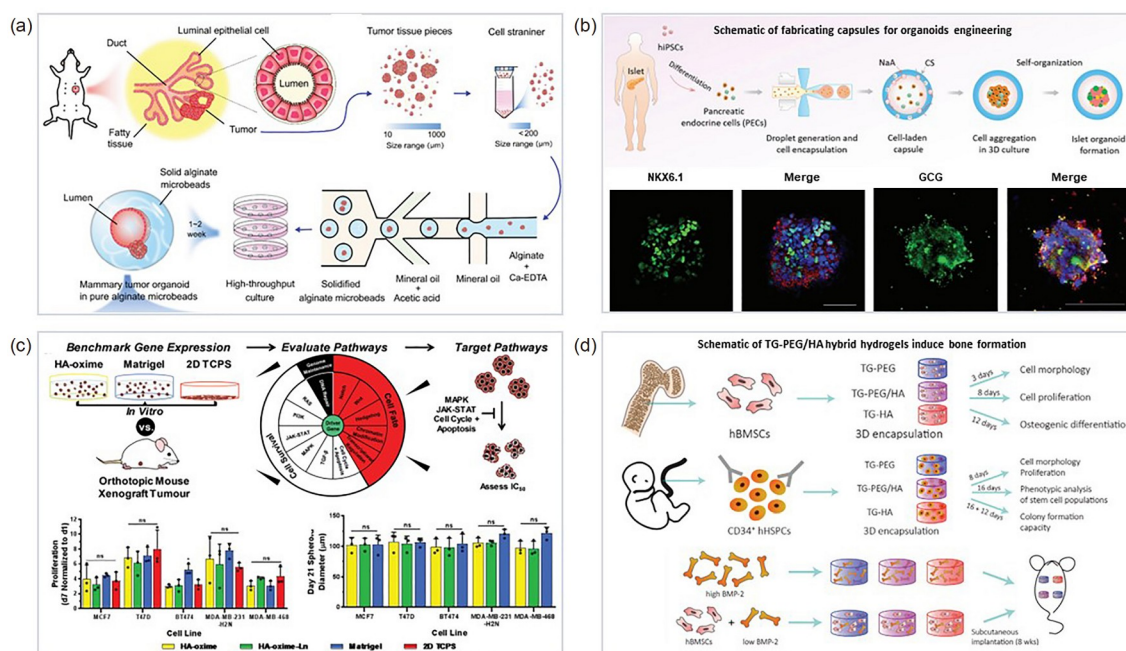


图 1 天然/合成水凝胶材料用于类器官的研究。(a) 海藻酸钠用于乳腺肿瘤类器官培养示意图。将肿瘤组织切块过滤后用液滴包封, 培养1~2周后乳腺肿瘤类器官形成管腔结构^[30]; (b) 海藻酸钠/壳聚糖水凝胶微囊用于胰岛类器官培养示意图和胰岛类器官的分化及功能鉴定^[32]; (c) HA-胍水凝胶中乳腺癌细胞体外培养示意图, 统计图为细胞在不同基质中培养21天后的肿瘤球直径^[36]; (d) 基于PEG/HA复合水凝胶的骨髓类器官培养示意图^[47] (网络版彩图)

Figure 1 Natural/synthetic hydrogel materials for organoid research. (a) Schematic diagram of sodium alginate for organoid culture of breast tumors. Lumen structures were formed after the tumor tissue was cut and filtered and encapsulated with droplets for 1–2 weeks after culture ^[30]. (b) Sodium alginate/chitosan hydrogel microcapsules for islet organoids culture and functional identification of differentiation ^[32]. (c) *In vitro* culture diagram of breast cancer cells in ha-oxime hydrogel. The statistical graph shows the tumor ball diameter after 21 days of cell culture in different substrates ^[36]. (d) Bone marrow organoid culture based on PEG/HA composite hydrogel ^[47] (color online).

3.1.5 明胶

明胶是一种由胶原部分水解得到的产物, 具有较低的免疫原性及较好的生物相容性。明胶富含基质金属蛋白酶(MMP)靶序列和RGD序列, 有利于类器官培养中的细胞黏附^[39]。近年来, 以GelMA为代表的明胶衍生物成为了更为适用的细胞3D培养基质, 我们基于GelMA材料开发了一种生成核-壳凝胶的液滴微流控系统, 并证实包埋在核中的肝细胞能够存活15天。这种微凝胶能够用于肝细胞和血管内皮细胞的共培养, 表明核-壳凝胶适合异质细胞培养, 在微组织的构建、类器官的产生和刺激反应材料的制造等各个领域都有潜力^[40]。此外, 3D打印的GelMA水凝胶具有很高的结构保真度。Breideband等^[41]开发了一种基于光立体光刻设备的设备, 基于不同浓度的GelMA和聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)的混合物来模拟患者源性胆管癌类器官的细胞外微环境, 实现了胆管癌类器官的高效3D打

印生成。对不同GelMA/PEGDA的全面表征表明, 生物打印肿瘤类器官的机械特性可以精确地微调以模拟特定的肿瘤微环境。

3.2 合成水凝胶

天然蛋白和多糖类材料很难根据不同组织器官需求来定制其理化特性, 如力学性能和降解性等。因而, 许多研究者也将目光转向合成聚合物水凝胶材料的研究^[42,43]。使用合成水凝胶可以更好地控制材料的物理性质、化学成分和整体结构, 使其具有接近天然ECM中结构蛋白的纤维和多孔状结构以及力学特性, 并能够防止非特异性蛋白黏附以减少免疫和炎症反应^[44,45]。在过去的几十年里, 以聚乙二醇和聚丙烯酰胺衍生物为代表的合成水凝胶发展迅速。本节主要介绍聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚异氰多肽等多种合成水凝胶材料。

3.2.1 聚乙二醇

聚乙二醇(PEG)是由环氧乙烷与水或乙二醇逐步加成聚合而成的高聚物。相较于其他合成聚合物材料, PEG价格低廉、无刺激性、亲水性好并具有生物惰性, 是天然ECM良好的替代材料^[46]。例如, Vallmajó-Martin等^[47]基于PEG性能可调和HA高生物活性的优势合成了一种复合水凝胶(图1d), 并以这种水凝胶作为ECM实现了全功能骨髓类器官的培养。这种水凝胶在异种移植模型中形成人源性骨髓类器官方面优于目前使用的天然生物材料, 在材料处理、结构完整性和减少体内巨噬细胞浸润方面都具有很好的特性。此外, PEG易功能化以结合信号分子及生物配体、易于被酯键和不饱和键等活性基团修饰, 修饰的PEG配体可以满足不同基质设计的需要, 适用于定制化类器官的培养^[48-51]。Rezakhani等^[5]通过对PEG-多肽水凝胶的传统交联策略进行改进, 提高了凝胶在低固含量下的物理化学性能。这种PEG-多肽水凝胶能够作为小鼠和人类肠道类器官的支架, 其中小鼠肠道类器官的集落形成和隐窝形成的效率接近于Matrigel, 促进了不依赖Matrigel的类器官的转化应用。

3.2.2 聚丙烯酰胺

聚丙烯酰胺(PAAm)是一种生物相容性较好的合成聚合物, 具有亲水性、多孔性和低毒性等特点, 在组织工程中广泛应用。PAAm水凝胶的另一个显著优势是其理化及生化特性易于调节, 适用于研究基质刚度和化学因素对细胞行为的影响^[52]。Garreta等^[53]通过制备柔软PAAm水凝胶的方法, 在体外对卵绒毛膜尿囊膜微环境的刚度进行了模拟。这些生物材料促进了肾小泡和肾元结构的高效生成, 与在较硬条件下生成的肾脏类器官相比, 由软水凝胶生成的肾脏类器官表现出更好的分化特征, 为未来对肾脏发育和疾病的研究提供了可能。

3.2.3 聚异氰多肽

聚异氰多肽(PIC)是一种具有热可逆凝胶作用的生物惰性合成水凝胶材料, 在进行生物打印时无需酶或光诱导交联。此外, 还可以用各种所需分子和生物活性表位来修饰PIC主链, 以实现特定的目标。然而, PIC的生物惰性较强, 无法单独实现类器官的培养。基

于PIC的这些特性, Ye等^[54]通过将PIC与层黏连蛋白111混合实现了人肝脏类器官的培养, 并进一步实现了悬浮培养中人肝类器官的大规模扩增。不同于Ye等的水凝胶混合操作, Schaafsma等^[55]基于RGD修饰的PIC水凝胶实现了唾液腺干细胞来源的唾液腺类器官形成, 但其自我更新潜力仅保留了4代。这表明在使用PIC水凝胶作为类器官3D培养基质时, 不同的PIC基质特性对每种细胞类型的行为有不同的影响, 因此需要进一步优化水凝胶组成及培养条件。

3.2.4 其他合成水凝胶

合成水凝胶材料的优点之一是它们能够表现出刺激响应行为(即压力敏感性、磁敏感性、温度敏感性和光敏感性等)。聚乙烯醇(PVA)就是一种典型的温度敏感水凝胶, Ma等^[56]通过海藻酸钠和钙离子之间的离子交联制备了用于3D神经祖细胞培养的PVA-海藻酸钠复合水凝胶。结果表明, 随着PVA比例的增加, 复合水凝胶的孔径和溶胀率增加, 弹性模量降低。此外, 在水凝胶中掺入鹿茸多肽后, 神经祖细胞可分化为含有神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的神经细胞球。另一种聚合物聚乙二醇酸(PGA), 因其具有良好的亲水性及生物相容性, 也被用于培养类器官。Tysoe等^[57]能够将胆管细胞类器官接种在PGA支架上4周, 生成具有胆道特征的生物工程组织。胆管类器官中的细胞对应于成熟的功能性胆管细胞, 这与目前可用的繁殖成体干细胞的替代类器官系统完全不同。

由于不同水凝胶的特性不同, 在培养不同类型的细胞或类器官时需要根据样品的需求来定制不同的水凝胶基质。除了先前所提到的细胞黏附性外, 不同类器官对培养基的硬度需求也不同。例如, 在肠类器官培养中, ECM硬度是驱动肠隐窝形成的关键因素, 隐窝的形成、大小在很大程度上取决于基质软化程度^[58]。在MSC细胞培养中, 骨分化则依赖于基质的硬度, 较软的水凝胶无法诱导形成骨类器官, 因此在骨类器官的培养中常常加入PEGDA等较硬的材料。此外, 有研究表明, 癌细胞(A549细胞)的耐药性也取决于水凝胶的硬度^[59]。因此, 根据所需培养的类器官种类及不同的培养目的, 研究者应该选择性地使用不同理化性质的水凝胶基质。

4 水凝胶材料工程化策略

水凝胶通常具有良好的生物相容性, 可作为天然ECM的替代物, 并用于细胞培养(表1)。然而, 要在体外形成具有体内组织器官相似结构的类器官, 需要先控制各种类型细胞的组装过程与最终形态^[6,60]。最近, 一些先进的微加工技术已被应用于控制水凝胶的3D微观结构, 并相应地调整细胞-材料的相互作用和细胞行为, 从而引导形成具有一定空间结构的类器官模型^[61,62]。本节主要介绍用于类器官研究的水凝胶材料设计方法, 包括微流控、图案化和3D生物打印。

4.1 微流控

微流体学是广泛的、多学科交叉的研究领域, 其重点是小体积流体流动的设计系统。在组织工程中, 微流控设备已被应用于制备各种形状的微凝胶(如微纤维或微球)、器官芯片和梯度水凝胶。微流控合成的微凝胶是较好的类器官高通量形成与培养体系。在此, 我们总结了一些将微流控设备与水凝胶材料结合, 用于类器官工程中研究的实例。

微凝胶因其具有柔韧性、优越的胶体稳定性以及可共价修饰的大比表面积, 而被认为是显微组织工程中有前景的支架材料。然而, 实心微凝胶材料由于空间结构不明确和保护能力不足而在类器官形成与培养

方面受到一定的限制。我们通过液滴微流控系统一步生成了核壳型GelMA微凝胶, 其中微凝胶的大小和壳厚可通过简单地调节各相流体流速来控制。以此得到的微凝胶具有良好的生物相容性, 在其中培养的肝细胞可在15天内保持较高活力(图2a)。这种核-壳结构微凝胶非常适合异质细胞培养, 已成功用于肝细胞和血管内皮细胞的空间分区共培养, 其在类器官的形成和长期培养中有很大的应用潜力^[63]。

器官芯片一般指一种在体外构建的、可模拟人体器官关键结构与功能特征的体外模型, 可进行部分的动物替代实验, 从而使实验条件更接近体内并缩短实验周期^[64]。最近, Cherne等^[65]开发了一种肠道类器官流动芯片, 构建了一个复杂的微生理免疫细胞-上皮细胞共培养模型, 以研究人胃中树突状细胞(DC)-上皮细胞的相互作用(图2b)。而后, 他们通过人工ECM材料评估了DC的趋化性, 发现基于多糖的合成水凝胶能够显著增加通过基质实现的DC趋化性, 并支持类器官的存活和生长。这一研究将免疫细胞成功整合到胃类器官芯片中, 增加了类器官芯片的生理相关性和适用性, 拓宽了对单核吞噬细胞的免疫监视及其在胃炎症和疾病中作用的研究。

梯度水凝胶一般指具有一种或多种物质浓度梯度的水凝胶。Hancock等^[66]报道了一种简单的技术, 可在光交联水凝胶中生成超过厘米长度范围的浓度梯度,

表 1 用于类器官培养的水凝胶
Table 1 Hydrogel for organoid culture

水凝胶种类	特性	应用	参考文献
海藻酸钠	快速非共价交联、理化性质可调、可化学修饰改性、允许类器官的延展和形态发生	乳腺癌、胰岛、肾类器官培养	[26~30]
壳聚糖	多样的交联方式、可化学修饰改性、较好的生物降解性、细胞黏附性	肝、胰岛类器官培养	[31,32]
透明质酸	较好的生物降解性、可化学修饰改性、调节血管通透性	乳腺癌、脑胶质瘤、肺癌脑转移类器官培养	[35,36]
I型胶原蛋白	生物降解性、包含MMP和RGD等靶序列	小肠、结肠、胃、上皮样肉瘤类器官培养; 肉瘤发病机制研究	[37,38]
明胶	高生物活性、低免疫原性、可化学修饰改性、包含MMP和RGD等靶序列	细胞共培养、胆管癌类器官培养	[40,41]
聚乙二醇	一定的生物降解性、分子大小精确可控、机械性能好、易化学修饰改性	骨髓、肝、肠、子宫内膜、肺类器官培养; 气道疾病模型	[5,46~51]
聚丙烯酰胺	机械性能好、多孔性微观结构、易化学修饰改性	肾类器官培养	[52,53]
聚异氰多肽	热可逆、生物惰性	肝脏、唾液腺类器官培养	[54,55]
聚乙醇醇	富羟基、生物相容性好、亲水性好、具有温敏性	神经祖细胞分化细胞球	[56]
聚乙二醇酸	高生物相容性、生物降解性	胆管细胞类器官培养	[57]

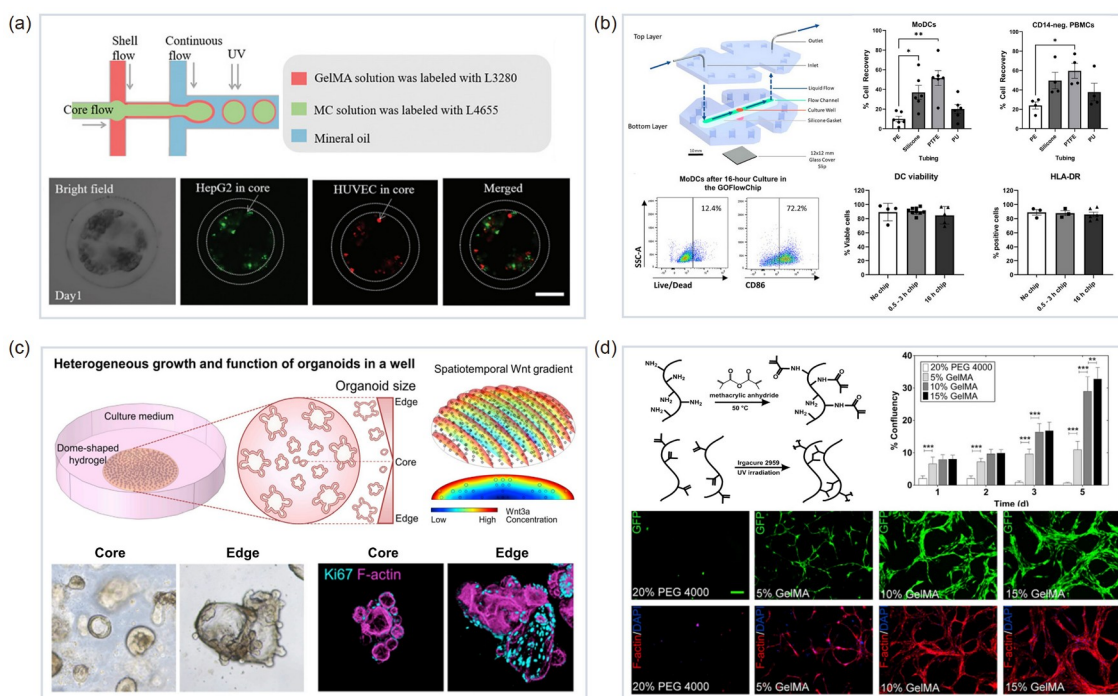


图 2 梯度/图案化水凝胶材料用于类器官的研究. (a) 核壳微凝胶的生成示意图及HepG2细胞与HUVEC细胞在微凝胶中共培养后的共聚焦图像^[63]; (b) 肠道类器官流动芯片示意图及细胞回收率、细胞活力、细胞关键标志物的表征^[65]; (c) 肠道类器官在ECM内呈现异质生长和功能, 其中Wnt3a的不稳定性及其扩散限制导致Wnt3a的时空梯度^[68]; (d) 适用于微尺度类器官培养的图案化水凝胶构建, 下图表征了细胞在GelMA表面的黏附性能^[71] (网络版彩图)

Figure 2 Gradient/pattern-based hydrogels for organoids. (a) Schematic diagram of core-shell microgel generation and confocal images of HepG2 cells and HUVEC cells after co-culture in microgels ^[63]. (b) Schematic diagram of intestinal organoid flow chip and characterization of cell recovery, cell viability and key cell markers ^[65]. (c) Intestinal organoids show heterogeneous growth and function in ECM, in which Wnt3a instability and its diffusion limitation lead to a temporal and spatial gradient of Wnt3a ^[68]. (d) Patterning hydrogel construction suitable for microscale organoid culture. The following figure characterized the adhesion properties of cells on the surface of GelMA ^[71] (color online).

通过控制水凝胶沿光交联水凝胶条带的浓度梯度来实现细胞扩散梯度。随后, Piraino等^[67]进一步发展了该技术, 通过顺序重复这一过程, 一层一层地生成具有多个梯度层的GelMA水凝胶。最近, Shin等^[68]研究了形态发生素(Wnt3a)梯度对常规类器官培养物的影响, 该培养物在生长、形态、细胞分化和上皮细胞功能方面产生了类器官的内部异质性(图2c)。通过操纵不同培养环境中 Wnt3a 的定量分布, 研究者发现了Wnt3a的时空梯度如何诱导人类肠道类器官的异质生长、分化和功能。

此外, 微流体设备提供了在特定微环境下研究细胞-生物材料相互作用的可能性, 设备内的连续流动可以为细胞提供与原生组织中相似的动态条件, 而水凝胶可作为ECM用于封装细胞。总之, 水凝胶与微流控技术结合有利于构建具有多种细胞类型和体内理化特

性的类器官体外模型, 并推动类器官的生长和功能机制研究进程。

4.2 图案化

类器官内部的图案化是生物技术中最艰巨的挑战之一, 而本文中的图案化技术主要指构建类器官培养的2D水凝胶图案化基底, 如软光刻技术等^[69,70]。软光刻通常用于生产PDMS复制品, 并以该复制品作为模板, 产生对应的水凝胶微结构。由于其具有灵活性强、可重复性好及兼容性强的特点, 基于软光刻方法的图案化水凝胶制备成为一种较为流行的选择。部分水凝胶属于光交联材料, 利用光刻技术可将该类水凝胶简便地制备成各类阵列式细胞培养基质。这一过程中, 需引入局部透光的掩膜, 光照射穿过掩膜的透明区域, 并诱导下面的光聚合水凝胶溶液发生化学交联,

产生带有掩模图案的水凝胶。例如, Nichol等^[71]利用该方法制备了方形的GelMA微凝胶, 并将3T3成纤维细胞包被在这些微凝胶中进行培养, 结果发现这些细胞表现出较高的活力(75%~92%); 且相比于大块的GelMA水凝胶, 微凝胶中的成纤维细胞形态更长, 也更接近该细胞在体内的形态(图2d)。此外, 若事先将PEG涂覆在GelMA微凝胶黏附的基底上, 可实现人脐静脉内皮细胞(HUVECs)选择性地与含有成纤维细胞的GelMA微凝胶结合。在此基础上, 研究者还证明了在3T3细胞负载的GelMA水凝胶中可形成微通道, 通过该微通道HUVECs可以被灌注进去, 形成共培养的微血管网络结构。因此, 特定图案化的水凝胶能够更好地模拟体内环境, 促进细胞的生长和微血管网络的生成, 这有助于形成更稳定、功能更完备的类器官。

4.3 3D生物打印

3D打印技术促进了载有细胞的水凝胶的复杂制造和安全的多尺度细胞图案化。生物打印旨在精确分配细胞、水凝胶或细胞负载的材料, 以制备空间可控的3D结构, 并模拟原生组织的生理形貌。通过精心设计生物相容性材料和交联方法, 优化生物打印参数, 组装的细胞负载结构物能够为细胞增殖和分化提供近生理的环境, 以适应类器官的生成和培养需求。此外, 3D打印技术的进步能够增加细胞形成类器官的复杂性^[72]。Takano等^[73]将3D打印与立方体装置结合开发了一个3D培养平台, 可以设计并制备不同的生物水凝胶。他们通过3D打印的水溶性模具的成型工艺, 展示了立方体装置中胶原蛋白水凝胶中通道的形成, 并在胶原蛋白凝胶中螺旋形通道的内壁上接种HUVEC以模拟血管结构。这种方法同时允许精确控制水凝胶中的细胞定位以进行类器官形态发生, 以及大型类器官的多向成像。此外, 生物打印能够对材料和细胞进行高精度的加工, 以生成3D空间可控分布。如果能达到保存细胞活力和功能的目标, 生物打印就能够成功打印类器官并模拟对应组织的结构与部分功能, 以在体外直接制造适合移植的成熟人工组织。

5 水凝胶培养类器官的应用现状

基于干细胞的类器官可以从单细胞开始, 经长期培养形成3D的类器官模型, 并在很大程度上再现原生

器官的多细胞成分、复杂结构和组织特异功能^[74]。这些优点使类器官成为生物医学研究中极具吸引力的器官样模型, 有望最终弥合传统动物模型和单层培养细胞之间的差距^[7,75]。此外, 水凝胶在一定程度上也对类器官的长期存活、功能维持、血管化和形态发生起到促进作用。基于此, 本节主要介绍基于水凝胶ECM培养类器官在疾病建模、药物研究和再生医学领域的应用^[76]。

5.1 疾病建模

近年来, 类器官培养技术的迅速发展使得类器官在成分和功能上与其来源组织更加接近^[77,78]。作为体外细胞培养的人工ECM, 水凝胶材料可以提供与疾病状态类似的细胞微环境^[79,80]。目前, 研究人员已经开发了新型水凝胶系统, 以模拟肿瘤缺氧微环境来研究肿瘤生长过程, 并使抗癌药物筛选和机制研究成为可能。例如, Shen等^[81]开发了基于丙烯酸透明质酸水凝胶材料的3D培养体系, 研究了基质机械强度和氧浓度对肿瘤细胞HT-1080生长及肿瘤中血管新生的影响(图3a)。另外, 在纤维化或癌症等病变部位, 其组织的机械硬度会大大增加, 而复合生物材料可以通过调节细胞外基质的力学特性来模拟这些体内微环境, 从而进一步调节类器官的生理状态。组织硬度改变也是胰腺癌的一个标志, Below等^[82]基于完全合成的水凝胶ECM实现了来自基因工程小鼠模型和人类患者的正常和胰腺癌类器官生长, 揭示了层黏连蛋白-整合素 $\alpha3/\alpha6$ 信号在胰腺类器官的建立和存活中的功能和作用。他们通过调整水凝胶的性质在培养中再现了组织硬度的改变并建立了病理重塑的肿瘤微环境, 因此这种模型适用于体外胰腺癌的研究。

5.2 药物研究

在水凝胶ECM中, 细胞的3D生长方式接近体内模式, 在这种环境中培养的类器官能更好地再现体内真实的药物反应。Gunasekara等^[83]创建了一个平面阵列的结肠体, 展示了在水凝胶支持物表面开发阵列式菌落培养系统(图3b), 这个系统能够在4 h内测定2248个类菌落并进行化合物筛选。这种排列的菌落培养物有望用于涉及药物筛选、细菌产品和初级肠道组织膳食代谢物的应用。此外, 由于类器官模型能够再现体内肿瘤的异质性, 基于类器官的体外癌症模型正迅速发展。

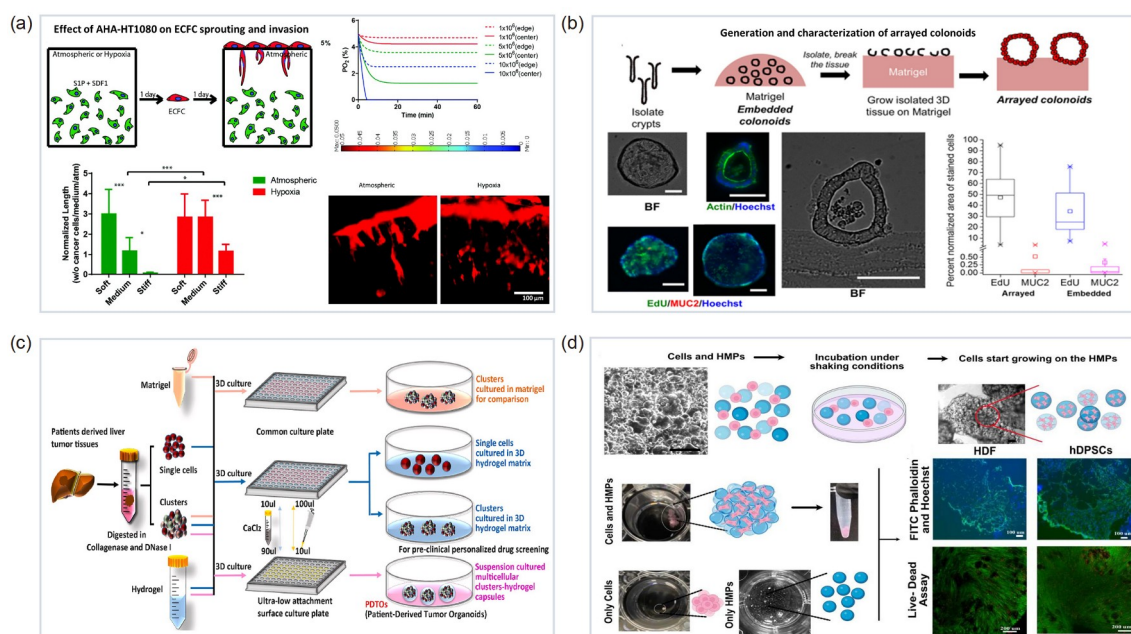


图 3 基于水凝胶材料的类器官应用研究. (a) HT-1080 肿瘤类器官微环境构建及血管化, 图中对不同刚度和氧含量条件下细胞发芽长度进行了量化^[81]; (b) 用于药物筛选的平面阵列结肠体的构建示意图, 结肠体的明场及冷冻切片图片^[83]; (c) 肝脏肿瘤类器官的培养方法, 包括在 Matrigel 中培养的多细胞团(橙色), 在分散水凝胶中培养的肿瘤单细胞和多细胞团(蓝色), 以及在水凝胶胶囊中培养的多细胞团(紫色)^[86]; (d) 自组装细胞-水凝胶微球生物相容性测试: 培养 2 周后形成了易于处理的组织样聚集体^[88] (网络版彩图)

Figure 3 Organoid applications based on hydrogels. (a) HT-1080 tumor organoid microenvironment construction and vascularization. Herein, cell germination length was quantified under different stiffness and oxygen tension conditions^[81]. (b) Schematic diagram of the construction of the planar array colonic body for drug screening, bright field and frozen section pictures of the colonic body^[83]. (c) Methods of culture of liver tumor organoids, including multicellular clusters grown in Matrigel (orange), tumor single cell and multicellular clusters grown in dispersed hydrogels (blue), and multicellular clusters grown in hydrogel capsules (purple)^[86]. (d) Biocompatibility testing of self-assembled cells-hydrogel microspheres: easy-to-handle tissue-like aggregates were formed after 2 weeks of culture^[88] (color online).

在癌症药物筛选方面, 类器官能够提供深度基因测序、提高药物靶点确定的可能性, 因而适于作为新药开发、筛选以及药理机制研究的体外模型^[84].

此外, 可通过建立肿瘤类器官模型以确定药物作用靶点, 进行药敏性筛查等^[85]. 水凝胶材料具有进行生化、机械和降解相关特征的定制化研究的独特优势, 从而以可重复的方式实现类器官的生成、扩增和分化, 以实现高通量的药物筛选. Dong 等^[86]利用藻酸盐-明胶水凝胶胶囊包裹患者来源的肝脏肿瘤多细胞簇(图 3c), 实现了肝脏肿瘤微环境的模拟及患者来源肿瘤类器官的培养. 而后他们基于这种肿瘤类器官对卡巴他赛、奥沙利铂、索拉非尼等药物进行了测试, 结果证明药物的敏感性因人而异, 并通过磁共振成像和生化试验验证了肿瘤类器官对奥沙利铂的敏感性. 因此, 这种方法有望实现经济、准确和高通量的药物筛选及个性化治疗.

5.3 再生医学

目前, 商业化的 ECM 大都是动物来源的基质, 但研究者对于 ECM 来源及成分的合理性尚未达成共识^[87]. 水凝胶因其具有可注射性, 能够模拟天然 ECM 并实现有效的细胞和药物传递, 在组织修复和再生方面具有应用潜力. Bektas 等^[88]基于 GelMA 衍生的水凝胶微粒实现了牙类器官的生成和培养. 他们通过将人牙髓干细胞和猪牙上皮细胞植入到水凝胶微粒获得了牙类器官, 其中细胞在整个孵育期间能够保持其活力和形态(图 3d). 这些牙类器官中存在极化分化的牙细胞, 表明其具有形成牙类器官结构的潜力, 可用于牙齿再生.

为了提高合成水凝胶的生物相容性和生物活性, 也可在其中引入一定比例的 ECM 相关蛋白, 如纤维蛋白、胶原蛋白等, 这有利于细胞的增殖、迁移和分化.

最近, Shulimzon等^[89]开发了一种基于明胶-海藻酸盐可注射水凝胶平台的肺治疗方法, 水凝胶支架表现出肺结构重塑和呼吸组织再生双重治疗目标所需的物理和力学性能。而后他们对其在人成纤维细胞和小鼠间充质细胞上的生物相容性进行了分析, 发现注入支架的细胞在7天内表现出至少70%的活力。通过导管向肺区域注射水凝胶可以同时将细胞与水凝胶混合, 此外, 微创注射手术有望减少患者的不适、感染风险、疤痕形成、治疗费用和住院时间。这种合成基质可以通过支气管镜进行肺结构重建, 并作为细胞或类器官植入的3D支架进行肺再生。

6 总结与展望

本文总结了水凝胶的特点、类型及其作为人工ECM来培养类器官研究的实例, 现有的水凝胶材料已在化学组分的确定性、机械性能的稳定性和微观形貌的可调性等方面取得了进步, 并由此推动了类器官研究的发展。而后, 我们介绍了水凝胶材料在培养类器官方面的研究进展, 类器官技术的快速发展促进了肠、脑、胰岛、肝和血管等多种组织器官模型的体外构建, 这些模型有助于更好地研究基础生物学和发育生物学、遗传疾病和治疗等方面的问题。天然或人工合成的水凝胶材料是高度多样化、多功能的, 合理选择和组合这些材料, 可针对不同类器官的培养设计不

同的基质, 更好地模拟类器官的微环境、重现类器官的功能。在确定水凝胶材料种类后, 利用一些设计方法, 如微流控、图案化和3D生物打印, 可以解决类器官生产中缺乏精确结构调控、组织尺寸小和自动化程度低等问题。

目前, 水凝胶材料能够高度模拟体内干细胞生态位的微环境, 但仍存在一些不足。例如, 纯天然来源的水凝胶具有较好的生物相容性和生物活性, 但其机械性能和可加工性有限; 全人工合成的水凝胶具有较好的机械性能和可塑性, 但其复杂性较低、生物功能性有限。将两者的优势进行整合, 对水凝胶材料进行化学修饰和改性, 有望创建更为完善的类器官培养体系, 更好地模拟类器官培养的复杂体系。理想的水凝胶基质材料应同时具有较大范围的机械性能可调性、稳定的细胞互作能力和适宜的可重塑性。同时, 在侵蚀速率、黏弹性和降解敏感性方面水凝胶材料需模拟天然ECM的动态特性。近年来, 研究者开始将刺激响应组件, 如温度、pH值和光响应组件引入3D聚合物链网络, 以更好地模拟组织器官的动态微环境。随着类器官复杂性和功能性的增加, 其内部多级3D结构的再现及其转化应用也是研究者未来关注的重点。可以预见, 随着生物材料及其相关技术的发展以及材料、生命科学、医学等多学科领域的进一步交叉, 类器官研究将在疾病建模、药物研究和再生医学等生物医学领域展现更广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Wang S, Gao D, Chen Y. *Nat Rev Urol*, 2017, 14: 401–414
- 2 Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, van Es JH, van den Brink S, van Houdt WJ, Pronk A, van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. *Gastroenterology*, 2011, 141: 1762–1772
- 3 Schepers A, Li C, Chhabra A, Seney BT, Bhatia S. *Lab Chip*, 2016, 16: 2644–2653
- 4 Takebe T, Wells JM. *Science*, 2019, 364: 956–959
- 5 Rezakhani S, Gjorevski N, Lutolf MP. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 2000761
- 6 Kratochvil MJ, Seymour AJ, Li TL, Paşca SP, Kuo CJ, Heilshorn SC. *Nat Rev Mater*, 2019, 4: 606–622
- 7 Ma P, Chen Y, Lai X, Zheng J, Ye E, Loh XJ, Zhao Y, Parikh BH, Su X, You M, Wu Y, Li Z. *Macromol Biosci*, 2021, 21: 2100191
- 8 Kaur S, Kaur I, Rawal P, Tripathi DM, Vasudevan A. *Cancer Lett*, 2021, 504: 58–66
- 9 Huang Y, Huang Z, Tang Z, Chen Y, Huang M, Liu H, Huang W, Ye Q, Jia B. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 740574
- 10 Lokai T, Albin B, Qubbaj K, Tiwari AP, Adhikari P, Yang IH. *Exp Neurol*, 2023, 367: 114461
- 11 Poudel H, Sanford K, Szwedko PK, Pathak R, Ghosh A. *ACS Omega*, 2022, 7: 38–47
- 12 Kim J, Koo BK, Knoblich JA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 571–584
- 13 McCauley HA, Wells JM. *Development*, 2017, 144: 958–962
- 14 Lancaster MA, Knoblich JA. *Science*, 2014, 345: 1247125

- 15 Hof L, Moreth T, Koch M, Liebisch T, Kurtz M, Tarnick J, Lissek SM, Versteegen MMA, van der Laan LJW, Huch M, Matthäus F, Stelzer EHK, Pampaloni F. *BMC Biol*, 2021, 19: 37
- 16 Kozłowski MT, Crook CJ, Ku HT. *Commun Biol*, 2021, 4: 1387
- 17 Hernandez-Gordillo V, Kassir T, Lampejo A, Choi GH, Gamboa ME, Gnecco JS, Brown A, Breault DT, Carrier R, Griffith LG. *Biomaterials*, 2020, 254: 120125
- 18 Hofer M, Lutolf MP. *Nat Rev Mater*, 2021, 6: 402–420
- 19 Garreta E, Kamm RD, Chuva de Sousa Lopes SM, Lancaster MA, Weiss R, Trepas X, Hyun I, Montserrat N. *Nat Mater*, 2021, 20: 145–155
- 20 LeSavage BL, Suhar RA, Broguiere N, Lutolf MP, Heilshorn SC. *Nat Mater*, 2022, 21: 143–159
- 21 Klotz BJ, Oosterhoff LA, Utomo L, Lim KS, Vallmajo-Martin Q, Clevers H, Woodfield TBF, Rosenberg AJWP, Malda J, Ehrbar M, Spee B, Gawlitta D. *Adv Healthcare Mater*, 2019, 8: 1900979
- 22 Yi SA, Zhang Y, Rathnam C, Pongkulapa T, Lee K. *Adv Mater*, 2021, 33: e2007949
- 23 Cruz-Acuña R, Quirós M, Huang S, Siuda D, Spence JR, Nusrat A, García AJ. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2102–2119
- 24 Gan Z, Qin X, Liu H, Liu J, Qin J. *Bioactive Mater*, 2023, 28: 386–401
- 25 Wu S, Wu X, Wang X, Su J. *J Mater Sci Tech*, 2023, 136: 21–31
- 26 Capeling MM, Czerwinski M, Huang S, Tsai YH, Wu A, Nagy MS, Juliar B, Sundaram N, Song Y, Han WM, Takayama S, Alsberg E, Garcia AJ, Helmrath M, Putnam AJ, Spence JR. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 381–394
- 27 Luo Z, Zhang S, Pan J, Shi R, Liu H, Lyu Y, Han X, Li Y, Yang Y, Xu Z, Sui Y, Luo E, Zhang Y, Wei S. *Biomaterials*, 2018, 163: 25–42
- 28 Patel SN, Ishahak M, Chaimov D, Velraj A, LaShoto D, Hagan DW, Buchwald P, Phelps EA, Agarwal A, Stabler CL. *Sci Adv*, 2021, 7: eaba5515
- 29 Geuens T, Ruiter FAA, Schumacher A, Morgan FLC, Rademakers T, Wiersma LE, van den Berg CW, Rabelink TJ, Baker MB, LaPointe VLS. *Biomaterials*, 2021, 275: 120976
- 30 Fang G, Lu H, Rodriguez de la Fuente L, Law AMK, Lin G, Jin D, Gallego-Ortega D. *Adv Sci*, 2021, 8: 2102418
- 31 Liu H, Wang Y, Wang H, Zhao M, Tao T, Zhang X, Qin J. *Adv Sci*, 2020, 7: 1903739
- 32 Wang Y, Liu H, Zhang M, Wang H, Chen W, Qin J. *Biomater Sci*, 2020, 8: 5476–5488
- 33 Bejoy J, Wang Z, Bijonowski B, Yang M, Ma T, Sang QX, Li Y. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 4354–4366
- 34 Loebel C, Weiner AI, Eiken MK, Katzen JB, Morley MP, Bala V, Cardenas-Diaz FL, Davidson MD, Shiraishi K, Basil MC, Ferguson LT, Spence JR, Ochs M, Beers MF, Morrissey EE, Vaughan AE, Burdick JA. *Adv Mater*, 2022, 34: e2202992
- 35 Baker AEG, Bahlmann LC, Tam RY, Liu JC, Ganesh AN, Mitrousis N, Marcellus R, Spears M, Bartlett JMS, Cescon DW, Bader GD, Shoichet MS. *Adv Mater*, 2019, 31: 1901166
- 36 Clark CC, Yoo KM, Sivakumar H, Strumpf K, Laxton AW, Tatter SB, Strowd RE, Skardal A. *Biomed Mater*, 2023, 18: 015014
- 37 Wakamatsu T, Ogawa H, Yoshida K, Matsuoka Y, Shizuma K, Imura Y, Tamiya H, Nakai S, Yagi T, Nagata S, Yui Y, Sasagawa S, Takenaka S. *Front Oncol*, 2022, 12: 893592
- 38 Jee JH, Lee DH, Ko J, Hahn S, Jeong SY, Kim HK, Park E, Choi SY, Jeong S, Lee JW, Cho HJ, Kwon MS, Yoo J. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 1–15
- 39 Liang L, Cui R, Zhong S, Wang Z, He Z, Duan H, Guo X, Lu J, Hu H, Li C, Yu C, Yu Y, Guo C, Mou Y. *Biomater Sci*, 2022, 10: 4902–4914
- 40 Wang H, Liu H, Liu H, Su W, Chen W, Qin J. *Adv Mater Technol*, 2019, 4: 1800632
- 41 Breideband L, Wächtershäuser KN, Hafa L, Wieland K, Frangakis AS, Stelzer EHK, Pampaloni F. *Adv Mater Technol*, 2022, 7: 2200029
- 42 Magno V, Meinhardt A, Werner C. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 2000097
- 43 Aisenbrey EA, Murphy WL. *Nat Rev Mater*, 2020, 5: 539–551
- 44 Bergenheim F, Fregni G, Buchanan CF, Riis LB, Heulot M, Touati J, Seidelin JB, Rizzi SC, Nielsen OH. *Biomaterials*, 2020, 262: 120248
- 45 Kim BS, Park IK, Hoshiba T, Jiang HL, Choi YJ, Akaike T, Cho CS. *Prog Polym Sci*, 2011, 36: 238–268
- 46 (a) Drumheller, P. D; (b) Drumheller PD, Hubbell JA. *J Biomed Mater Res B Appl BioMater*, 1995, 29: 207–215
- 47 Vallmajo-Martin Q, Broguiere N, Millan C, Zenobi-Wong M, Ehrbar M. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 1910282
- 48 Hayashi S, Sasaki Y, Kubo H, Sawada S, Kinoshita N, Marukawa E, Harada H, Akiyoshi K. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4: 7848–7855
- 49 Ng SS, Saeb-Parsy K, Blackford SJI, Segal JM, Serra MP, Horcas-Lopez M, No DY, Mastoridis S, Jassem W, Frank CW, Cho NJ, Nakauchi H, Glenn JS, Rashid ST. *Biomaterials*, 2018, 182: 299–311
- 50 Dye BR, Youngblood RL, Oakes RS, Kasputis T, Clough DW, Spence JR, Shea LD. *Biomaterials*, 2020, 234: 119757

- 51 Wilson R L, Swaminathan G, Ettayebi K, Bomidi C, Zeng X, Blutt SE, Estes MK, Grande-Allen KJ. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2021, 27: 12–23
- 52 Shkumatov A, Baek K, Kong H. *PLoS ONE*, 2014, 9: e94764
- 53 Garreta E, Prado P, Tarantino C, Oria R, Fanlo L, Martí E, Zalvidea D, Trepas X, Roca-Cusachs P, Gavalda-Navarro A, Cozzuto L, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC, Hurtado del Pozo C, Montserrat N. *Nat Mater*, 2019, 18: 397–405
- 54 Ye S, Boeter JWB, Mihajlovic M, van Steenbeek FG, van Wolferen ME, Oosterhoff LA, Marsee A, Caiazzo M, van der Laan LJW, Penning LC, Vermonden T, Spee B, Schneeberger K. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 2000893
- 55 Schaafsma P, Kracht L, Baanstra M, Jellema-de Bruin AL, Coppes RP. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1100541
- 56 Ma S, Cong Z, Chen H, Wen H, Cao L, Liu C, Yang F, Liao Y. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 167: 106003
- 57 Tysoe OC, Justin AW, Brevini T, Chen SE, Mahbubani KT, Frank AK, Zedira H, Melum E, Saeb-Parsy K, Markaki AE, Vallier L, Sampaziotis F. *Nat Protoc*, 2019, 14: 1884–1925
- 58 Ranga A, Girgin M, Meinhardt A, Eberle D, Caiazzo M, Tanaka EM, Lutolf MP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E6831–E6839
- 59 Pedron S, Becka E, Harley BA. *Adv Mater*, 2015, 27: 1567–1572
- 60 Heo JH, Kang D, Seo SJ, Jin Y. *Int J Stem Cell*, 2022, 15: 60–69
- 61 Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. *Biomaterials*, 2015, 73: 254–271
- 62 Brusatin G, Panciera T, Gandin A, Citron A, Piccolo S. *Nat Mater*, 2018, 17: 1063–1075
- 63 Wang H, Liu H, He F, Chen W, Zhang X, Zhao M, Wang L, Qin J. *Adv Mater Technol*, 2020, 5: 2000045
- 64 Park SE, Georgescu A, Huh D. *Science*, 2019, 364: 960–965
- 65 Cherne MD, Sidar B, Sebrell TA, Sanchez HS, Heaton K, Kassama FJ, Roe MM, Gentry AB, Chang CB, Walk ST, Jutila M, Wilking JN, Bimczok D. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 707891
- 66 Hancock MJ, Piraino F, Camci-Unal G, Rasponi M, Khademhosseini A. *Biomaterials*, 2011, 32: 6493–6504
- 67 Piraino F, Camci-Unal G, Hancock MJ, Rasponi M, Khademhosseini A. *Lab Chip*, 2012, 12: 659–661
- 68 Shin W, Wu A, Min S, Shin YC, Fleming RYD, Eckhardt SG, Kim HJ. *iScience*, 2020, 23: 101372
- 69 Fu CY, Lin CY, Chu WC, Chang HY. *Tissue Eng Part C-Methods*, 2011, 17: 871–877
- 70 Shin HS, Kook YM, Hong HJ, Kim YM, Koh WG, Lim JY. *Acta Biomater*, 2016, 45: 121–132
- 71 Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. *Biomaterials*, 2010, 31: 5536–5544
- 72 Carberry BJ, Hergert JE, Yavitt FM, Hernandez JJ, Speckl KF, Bowman CN, McLeod RR, Anseth KS. *Biofabrication*, 2021, 13: 044104
- 73 Takano A, Koh Y, Hagiwara M. *Micromachines*, 2022, 13: 156
- 74 Hirota A, AlMusawi S, Nateri AS, Ordóñez-Morán P, Imajo M. *Acta Biomater*, 2021, 132: 272–287
- 75 Balion Z, Cèpla V, Svirskienė N, Svirskis G, Druceikaitė K, Inokaitis H, Rusteikaitė J, Masilionis I, Stankevičienė G, Jelinskas T, Ulčinas A, Samanta A, Valiokas R, Jekabsone A. *Biomolecules*, 2020, 10: 754
- 76 Lou YR, Leung AW. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 132–149
- 77 Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, Mooney DJ, Shenoy VB. *Nature*, 2020, 584: 535–546
- 78 Hoang P, Ma Z. *Acta Biomater*, 2021, 132: 23–36
- 79 Chen KG, Park K, Spence JR. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 822–833
- 80 Di Lullo E, Kriegstein AR. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18: 573–584
- 81 Shen YI, Abaci HE, Krupski Y, Weng LC, Burdick JA, Gerecht S. *Biomater Sci*, 2014, 2: 655–665
- 82 Below CR, Kelly J, Brown A, Humphries JD, Hutton C, Xu J, Lee BY, Cintas C, Zhang X, Hernandez-Gordillo V, Stockdale L, Goldsworthy MA, Geraghty J, Foster L, O'Reilly DA, Schredding B, Askari J, Burns J, Hodson N, Smith DL, Lally C, Ashton G, Knight D, Mironov A, Banyard A, Eble JA, Morton JP, Humphries MJ, Griffith LG, Jørgensen C. *Nat Mater*, 2022, 21: 110–119
- 83 Gunasekara DB, DiSalvo M, Wang Y, Nguyen DL, Reed MI, Speer J, Sims CE, Magness ST, Allbritton NL. *Anal Chem*, 2018, 90: 1941–1950
- 84 Rowe RG, Daley GQ. *Nat Rev Genet*, 2019, 20: 377–388
- 85 Russell J, Grkovski M, O'Donoghue IJ, Kalidindi TM, Pillarsetty N, Burnazi EM, Kulick A, Bahr A, Chang Q, LeKaye HC, de Stanchina E, Yu KH, Humm JL. *J Nucl Med*, 2021, 62: 195–200
- 86 Dong H, Li Z, Bian S, Song G, Song W, Zhang M, Xie H, Zheng S, Yang X, Li T, Song P. *Bioactive Mater*, 2022, 18: 164–177
- 87 Madl CM, Heilshorn SC, Blau HM. *Nature*, 2018, 557: 335–342

- 88 Bektas CK, Zhang W, Mao Y, Wu X, Kohn J, Yelick PC. *Bioengineering*, 2022, 9: 215
89 Shulimon T R, Giladi S, Zilberman M. *IMAJ*, 2020, 22: 736-740

Application of hydrogel materials for organoids

Xinyuan Qin^{1,2}, Haitao Liu¹, Zhongqiao Gan^{1,2}, Jianhua Qin^{1,2,3*}

¹ Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Beijing Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

*Corresponding author (email: [jqin@dicp.ac.cn](mailto:jhqin@dicp.ac.cn))

Abstract: Organoids are functional tissue complexes derived from stem cell by self-organization under *in vitro* three-dimensional (3D) culture conditions, which can reflect some of the key structural and functional features of the tissue/organ *in vivo*. However, the formation and culture of most organoids rely heavily on complex extracellular matrices, such as Matrigel, and the tumor-origin and batch variability of these matrices seriously reduce the reproducibility of organoids culture and the safety in subsequent regenerative medicine applications. In addition, due to the lack of adjustability of physical and chemical properties, the above-mentioned matrices are difficult to meet the needs of personalized and customized biomedical research. On the contrary, the hydrogel with single and clear composition has the characteristics of accurate and adjustable biochemical and biophysical properties, which is promising to address the disadvantages of existing organoid matrix, and further realize the construction of more near-physiological organoid models and facilitate their translational application. In this review, we first introduce the existing systems of organoid formation and culture, as well as common hydrogel materials used in organoids research. Then, we introduce the engineering method of hydrogel materials and its representative application in organoids research. Finally, we discuss the potential and future challenges of functional hydrogels in organoid research and translational applications, to provide reference for the utilization of such hydrogels in organoid construction, culture and in-depth research.

Keywords: hydrogel, organoid, biomaterial, stem cells, regenerative medicine

doi: [10.1360/SSC-2023-0129](https://doi.org/10.1360/SSC-2023-0129)