



王常勇, 研究员, 博士生导师, 军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所所长, 全军干细胞与再生医学重点实验室副主任, 国家杰出青年基金获得者。在干细胞与组织工程研究领域, 建立了系统完善的重要生命器官仿生构建核心关键技术群, 先后成功在体外再造了具有一定再生修复能力的心肌、肾脏、肺脏等组织/类器官, 研究成果相继发表在 *Circulation*、*ACS Nano* 等国际知名期刊上。同时, 建立了多元、多因素调控干细胞可控分化新技术与新方法, 相关成果获北京市科技进步一等奖、国家科技进步二等奖各1项。作为项目负责人承担国家、军队各类项目20余项, 获经费6 000余万元; 发表SCI论文93篇, 其中, 以通讯/共同通讯作者发表SCI论文61篇, 总IF>278; 获发明专利12项, 实用新型专利1项; 软著4项; 主编专著1部, 参编专著7部。

重要生命器官组织工程研究

周瑾 刘伟 朱惠敏 殷琦 王常勇*

(军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850)

摘要 组织、器官的丧失或功能障碍是人类健康所面临的主要危害之一, 也是引起人类疾病和死亡的最主要原因。如何从根本上解决组织、器官缺损或功能障碍, 也已成为科学界特别是生命科学领域所要积极探索的国际性前沿课题。组织工程的最终目的是工程化生产可以用于替代人体不可逆损伤的、功能退化的组织和器官, 使更多的患者得到及时治疗, 为根本解决人体重要生命器官的疾病带来新的途径, 从而提高人类的健康水平和生活质量。经过研究人员20余年的不懈努力, 组织工程研究领域取得了长足的进步。其中, 重要生命器官的组织工程研究目前已经成为组织工程研究领域的热点和焦点, 并且针对心脏、肝脏、肾脏、胰腺等重要生命器官的组织工程研究正在不断取得突破。该文从干细胞定向可控分化、功能化支架材料仿生制备、重要生命器官体外构建与应用以及基于快速成型和微制造技术的器官精准设计与制造等方面, 综述了国内外重要生命器官组织工程研究最新进展及相关的产业化情况, 希望为重要生命器官组织工程研究和产业化开发提供一定的参考。

关键词 组织工程; 干细胞; 生物材料; 3D打印; 生命器官

Tissue Engineering of Vital Organs

Zhou Jin, Liu Wei, Zhu Huimin, Yin Qi, Wang Changyong*

(Institute of Military Cognition and Brain Science, Academy of Military Medical Research, Beijing 100850, China)

Abstract Tissue and organ loss or dysfunction is one of the major hazards threatening human health, and also the most important cause of human disease and death. How to fundamentally solve tissue and organ defects or dysfunction has become an international frontier subject to be actively explored by the scientific community, es-

*通讯作者。Tel: 010-66931377, E-mail: wcy2000_te@yahoo.com

*Corresponding author. Tel: +86-10-66931377, E-mail: wcy2000_te@yahoo.com

网络出版时间: 2019-05-09 17:42:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1742.016.html>

pecially in the field of life science. The ultimate goal of tissue engineering is that engineered products can be used to replace the tissues/organs with irreversible damage and function degradation, which enables more patients to receive timely treatment and fundamentally addresses vital organ diseases to improve the health level and quality of life of human beings. After more than 20 years of unremitting efforts, tissue engineering research has made great progress. Tissue engineering research on important vital organs has become a new focus in the field of tissue engineering. Breakthroughs have been made in tissue engineering of the heart, liver, kidney, pancreas and other vital organs. This article reviewed the latest progress and the relevant industrialization situation of important vital organ tissue engineering researches at home and abroad, including directional control stem cell differentiation, functional bionic scaffold materials preparation, important organ *in vitro* building and application, and organ precise design and manufacture based on rapid prototyping and micro manufacturing technology, etc. This article could provide certain reference for important vital organ tissue engineering research and industrialization development.

Keywords tissues engineering; stem cells; biomaterials; 3D printing; vital organ

重要生命器官坏死或功能衰竭严重威胁人类健康。据统计,我国心血管病患者接近2.3亿,每年有300万人死于心血管病,居各种死因的首位^[1];肝脏病患者约7 900万,终末期肝衰患者达800万^[2-3]。针对终末期重要生命器官衰竭患者,器官移植是最根本有效的治疗方法。但存在供体器官短缺、免疫排斥反应等问题。组织工程以构建工程化组织/类器官修复受损组织为目的,搭建了从基础研究到临床应用的桥梁,被认为是最具前景的替代治疗新方法。目前,研究人员已成功在体外构建出具有一定在体结构与功能的组织/类器官,并在高性能可降解仿生材料研制、细胞定向分化与谱系重编程、工程化组织仿生构建与大动物移植修复、器官3D打印(three-dimensional)与微纳加工等方面取得了一系列关键技术突破。未来,干细胞生物学、材料科学、仿生学和先进生物制造等领域不断涌现的新技术与新成果,将推动重要生命器官组织工程研究进一步朝着仿生制造与临床应用快速发展,为中晚期疾病的替代治疗提供全新的策略。与此同时,细胞参与的组织构建研究同样在非治疗性领域发挥了不可或缺的作用。研究人员利用干细胞构建出3D微型脑组织,可在体外再现大脑的早期发育过程,并可模拟小脑畸形疾病的发生发展过程^[4];利用细胞体外构建的微型肾组织获得了多囊肾疾病的研究模型^[5];体外构建的肝芽移植入体内后显示出复杂有序的结构及成熟的肝脏功能^[6]。以微型脑、微型肾和肝芽为代表的迷你器官(mini-organ)显示出有序的组织结构,再现了器官的早期发育过程,模拟了部分疾病的发生发展规律,被证明是具有广阔应用前景的人类发

育和疾病模型模拟手段,并被*Science*评为2013年度十大科技进展之一。这些代表性成果均展示了细胞的组织工程对发育生物学研究以及器官损伤修复治疗的重大意义。

近年来,干细胞、生物材料、3D生物制造等领域的快速发展,进一步推动了重要生命器官组织工程的快速发展。本文将从干细胞的可控定向分化与细胞转分化、功能化支架材料的仿生制备、重要生命器官的体外构建与应用、基于快速成型和微制造技术的器官精准设计与制造这四个方面,介绍重要生命器官组织工程前沿研究与进展。

1 干细胞的可控定向分化与细胞转分化

功能性细胞是组织器官发挥特定效应的源泉,通过深入研究种子细胞多组织协同发育和整合的内在规律、多种生长因子及诱导因素对干细胞分化的协同作用机理,科学家建立了种子细胞的规模化扩增和诱导分化成熟体系,进而为器官的构建提供功能化的细胞保障。筛选合适的干细胞来源并模拟细胞体内生长和功能发挥的微环境条件,是建立干细胞来源类器官的关键因素。

目前,国内外选用多种细胞来源作为组织工程研究的种子细胞,包括全能性干细胞、多能性干细胞以及各类组织来源的定向能性干细胞。研究表明,在各种理化因素作用下,多种干细胞可以定向分化为心肌细胞、多巴胺能神经元、肝细胞等多种类型功能细胞。Tan等^[7]研究人员利用GSK3信号通路抑制剂CHIR99021及Wnt-C59可实现人诱导多能性干细胞(human induced pluripotent stem cells,

hiPSCs)向心肌细胞的高效分化, 分化效率可达90%以上。2013年, Zhang团队^[8]通过添加SHH及成纤维细胞生长因子8(fibroblast growth factors 8, FGF8)实现了iPSCs向神经祖细胞的分化。在干细胞向肝细胞的分化研究方面, 2010年, Duncan团队^[9]尝试在培养人来源的ESCs的不同阶段分别添加激活素A(activin A)、骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP-4)、成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factors 2, FGF2)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)以及抑瘤素(oncostatin M, OSM), 培养近20天实现了ESCs向肝细胞分化。2017年, Hay团队^[10]在activin A、Wnt 3a、HGF、OSM小分子化合物的作用下实现了hiPSCs向肝细胞的定向分化, 免疫染色显示, 持续培养18天近90%的肝细胞表达肝细胞核因子4 α 。Du等^[11]研究人员利用BMP2和BMP7诱导人胚胎干细胞分化为肾脏近端肾小管样细胞并表达水通道蛋白-1(squaporin-1, AQP1)。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)已经在临床研究中有应用, 虽然MSCs分化效率较低, 但旁分泌作用效果十分显著。相比之下, 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)尽管容易分化为多种器官组织来源的细胞, 但同种异体来源的细胞移植会引起免疫排斥反应, 并存在致瘤性危险。因此, 如何获得安全可靠、足够数量 and 高质量(具有分化功能)的种子细胞始终是组织工程研究的最大挑战之一。

随着生命科学的发展, 人们陆续发现了多种改变细胞命运的方法。其中, 将一种类型的终末分化细胞不经过多能性细胞阶段转变成其他类型的功能细胞或是祖细胞, 这种方法被称为转分化, 也称谱系重编程(lineage reprogramming)。2010年, Ieda等^[12]报道了通过引进3个心脏发育核心转录因子Gata4、Mef2c和Tbx5(GMT)可在体外成功地诱导成纤维细胞出现心肌样细胞。2006年Graf课题组^[13]利用Notch信号传导部分抑制CEBPalpha可实现pre-T细胞转分化为成熟巨噬细胞表型; 相反地, 在相同的培养条件下添加转录因子PU.1可将其转化为髓样树突细胞。2010年, Wernig^[14]从19个候选基因库中筛选确定了3种因子Ascl1、Brn2(也称为Pou3f2)和Myt1l的转录因子组合, 在体外快速有效地将小鼠胚胎和出生后成纤维细胞转化为功能性神经元, 这些诱导的神经元表达多种神经元特异性蛋白质, 并产生动作电位形成功能性突触。2011年, 惠利健课

题组^[15]通过转导Gata4、Hnf1 α 、Foxa3以及p19(Arf)使小鼠尾尖成纤维细胞直接转分化为诱导型肝细胞样细胞(induced hepatocyte, iHep), 其表达肝脏基因并具有正常肝细胞功能。同年, Suzuki团队^[16]通过筛选12种候选因子, 发现2种转录因子的3种特定组合, 包括Hnf4 α 联合Foxa1、Foxa2或Foxa3, 均可以将小鼠胚胎和成体成纤维细胞转分化为iHep, 该细胞具有多种肝细胞特征, 并在移植后可重建受损的肝组织。2014年, 惠利健团队^[14]实现了用Foxa3、Hnf4 α 、Hnf1 α 将人类成纤维细胞转分化为功能肝细胞。同年, 邓宏魁课题组^[17]通过转染转录因子Hnf1 α 、Hnf4 α 和Hnf6以及成熟因子ATF5、PROX1和CEBPalpha, 实现了成纤维细胞向iHeps的转分化。2016年, Kaminski等^[18]研究人员通过转染4种转录因子(Emx2、Hnf1 β 、Hnf4 α 和Pax8)可诱导小鼠和人成纤维细胞转化为诱导型肾小管上皮细胞(induced renal tubular epithelial cells, iREC)。

近年来, 一些小分子化合物也被报道可以提高细胞转分化的诱导效率, 或是替代外源因子, 或是直接实现细胞的转分化。2016年, *Science*杂志报道, 仅利用9种小分子化合物便可实现人成纤维细胞重编程为心肌细胞^[19]。2015年, 我国科学家邓宏魁研究团队^[20]利用4种小分子化合物直接诱导小鼠成纤维细胞重编程获得能够激发出完整的动作电位功能神经元。2015年, 裴刚课题组^[21]在利用小分子化合物VCR(valproic acid、CHIR99021、Repsox)的基础上, 进一步添加SP600125(JNK inhibitor)、GO6983(PKC inhibitor)和Y-27632(ROCK inhibitor)实现将人包皮成纤维细胞转分化为神经元样细胞。2016年, 王韞芳等^[22]研究人员利用8种小分子化合物将人胃的上皮细胞转化为人多能内胚层祖细胞并进一步用于分化为功能性肝细胞。目前, 科学家已经成功实现了基于转录因子或小分子化合物介导的方法定向谱系重编程获得心肌细胞、神经元、肝细胞等, 进一步优化将无外源基因整合的功能性细胞高效诱导, 最终实现基于干细胞的个体化治疗是该领域研究的趋势。

2 功能化支架材料的仿生制备

支架材料研究是内脏器官组织工程研究的重要组成部分, 在重要生命器官体外构建方面发挥了重要作用。目前用于组织工程的支架材料主要包括

两大类:天然细胞外基质材料和可降解的合成多聚物材料。由于良好的生物相容性,天然细胞外基质材料受到研究人员的广泛青睐。这类材料可为细胞生长、发育与组织形成提供与在体细胞外基质组成类似的结构和成分,促进体外细胞发育与组织形成。目前,在组织工程研究中应用较为广泛的天然细胞外基质材料包括胶原、基底膜基质胶(matrigel)、层黏连蛋白、纤维结合蛋白、脱细胞基质等。与此同时,电纺技术和分子自组装技术制备的多聚物材料支架如聚乳酸(poly(lactic acid, PLA)、聚乙醇酸(poly(glycolic acid, PGA)、聚己内酯(polycaprolactone, PCL)、海藻酸纤维、聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactico-glycolic acid), PLGA]等大量出现,因其具有较好的生物相容性并且易进行功能化修饰而广泛用于体外的工程化组织构建。

鉴于内脏器官复杂的生理结构与功能,开展有针对性的生物材料复杂性与仿生化研究,尤其是针对细胞外基质自组装仿生材料的研究已经成为目前研究的重点之一。以天然器官组织化学组成和多级微结构为启示,从分子、微纳米和宏观结构三个方面对细胞微环境进行模拟和对组织器官进行仿生制造。综合国内外研究现状,生物材料复杂性与仿生化研究主要集中在以下几个方面:生物材料表面化学研究、组织工程支架仿生化研究、仿生化细胞片层研究、生物材料生物相容性和生物适应性研究等。2017年, Wu等^[23]采用干湿法静电纺丝技术,模拟天然心肌组织的交错排列网状结构,制备了具有取向结构的导电纳米纤维束,其在引导细胞取向生长与重塑方面发挥重要作用。2015年, Lozano等^[24]研究人员使用多肽修饰的结冷胶基质包裹皮层神经元,神经细胞在该结构中生长良好,在基质的支持下形成神经网络。同年, Deegan等^[25]研究人员通过交联剂来调节透明质酸(hyaluronic acid, HA)水凝胶的硬度,通过补充正常肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)来提供HA基质内的生物活性分子可以改善细胞附着,并可较长时间维持其肝细胞表型。Lih等^[26]研制了不同ECM浓度修饰的仿生PLGA支架(PLGA/ECM)用于肾组织构建,结果发现,肾源性细胞外基质和含有10% ECM的PLGA的肾支架可一定程度上修复和重建部分肾切除小鼠体内的肾小球和血管。此外,开展具有细胞特异黏附能力和含有智能靶向基团的组织工程支架材料的结构设计与合成以及

材料和支架力学性能评价研究,也是主要研究方向之一。2017年,研究人员制备了重组的工程化丝素蛋白序列肌动蛋白解聚因子4(actin-depolymerizing factor 4, ADF4),可用于多类细胞黏附和生长的水凝胶、微球、无纺支架、多孔支架等多种形式的组织工程用材料/支架的制备中^[27]。近年来,国际上对细胞外基质来源的自组装仿生材料给予了越来越多的关注,因此对细胞外基质复杂化组成的认知将有利于提高生物材料的仿生化程度,这包括采用表面修饰方法抑制非特异蛋白质吸附、将生物活性片段精确固定在生物材料内部实现基因片段递送等。在模拟正常组织器官生理结构与功能的同时,研究人员也从损伤器官的恶劣微环境出发,在分子水平上对支架材料进行修饰,提高了材料的主动微环境调控能力,这也是心肌仿生制造的主体趋势之一^[28-29]。器官损伤部分会产生大量的氧自由基,并伴随着炎症因子的产生和聚集,致使移植的干细胞或者工程化组织在心肌梗区的存活能力有限。提高支架材料的微环境调控能力是解决该问题的首要途径。目前报道可将具体抗氧化/抗炎性能的纳米颗粒、多肽通过物理包埋或者化学修饰的方法引入到支架材料中,提高支架材料对细胞及工程化组织在坏死微环境下的氧化应激损伤的保护作用^[28]。军事医学研究院组织工程研究中心^[29]在国际上率先研制了系列心肌梗微环境调控型支架材料,将具有抗氧化能力的谷胱甘肽接枝到壳聚糖大分子上,提高了其应对氧自由基微环境的能力。2017年,该团队^[30]又进一步研制了兼具抗氧化和导电性能的富勒醇/海藻酸水凝胶,明确了富勒醇含量对心肌梗微环境的调控作用,并以此为载体携带棕色脂肪干细胞用于心肌梗治疗(图1)。Weaver等^[31]将氧化铈引入到水凝胶中以提高其抗氧化活性,降低细胞氧化应激损伤。Wu等^[32]研究人员研发了具有缓慢释放肝素结合生长因子能力的肝素化脱细胞猪肝支架,且与天然脱细胞支架相比,肝素化的支架可有效诱导血管生成。2016年, Orr团队^[33]在大孔藻酸盐支架上结合了TGF- β ,可有效调控受损组织局部微环境,降低肾损伤移植修复时的免疫排斥反应。但总体而言,设计与研制针对调控梗死炎症及纤维化微环境等方面支架材料的相关报道还比较少,仍是今后研究的重点。未来趋势主要是基于组织极其复杂的微环境因素,研制具有组织特异性、合适的微环境调控能力、适宜的力学行为

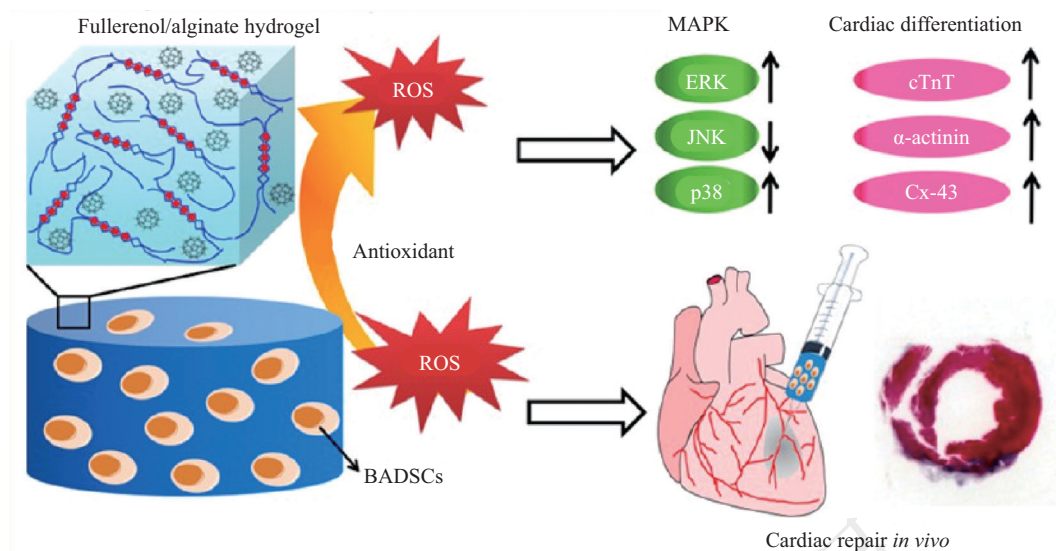


图1 富勒烯醇/藻酸盐水凝胶材料调控心梗微环境(根据参考文献[30]修改)

Fig.1 Fullerenol/alginate hydrogel material regulates myocardial infarction microenvironment (modified from reference [30])

和可降解特性的多元仿生的功能性生物材料。

伴随组织工程的发展,通过对细胞外基质和类细胞外基质的宏观塑形和微结构调控,制备仿生化组织工程支架的研究得到飞速发展。与此同时,与宏观塑形和微结构调控“TOP-DOWN”的方式不同,超分子仿生组装研究采用“BOTTOM-UP”的方式,从生物分子出发,在微观上组装和制备仿生材料。大量的研究显示,包括蛋白质、聚肽、两性功能分子及生物缔合功能微球均可通过自发组装过程获得包括细胞外基质在内的多种仿生结构。与“TOP-DOWN”的三维多孔支架宏观塑形和细胞打印技术相比,通过过程仿生的“BOTTOM UP”自发组装过程获得的组装体具有更为完善的仿生结构和更好地调控细胞生长、迁移、增殖分化和信息传递的功能,该方法是细胞外基质仿生材料发展最具潜力的方向之一。

3 重要生命器官的体外构建与应用

重要生命器官组织构建旨在将具有特定组织形成能力的种子细胞与支架材料复合,构建工程化组织或类器官。所构建的工程化组织/类器官可通过类似于创可贴的方式或者可注射的方式移植到受损组织区域,发挥替代、修复和再生受损组织的作用。目前国际上已经成功构建多种基于生物相容性支架材料的工程化心肌组织、肝脏组织、脑样组织等,并不断优化工程化组织体外构建方式,揭示装配机理。

其中,在工程化心肌组织构建与应用方面,2002年, Zimmerman等^[34]用液态胶原与心肌细胞复合,体外再造了能够自主收缩的心肌环。2006年,军事医学研究院组织工程研究中心^[35]首次利用胶原/matrigel细胞外基质水凝胶复合ESC来源的心肌细胞,构建了具有收缩一致性的心肌组织条带(图2)。在此基础上,为了更好地模拟心肌的电生理特性,该团队进一步利用导电纳米材料为支架构建了具有电传导特性的工程化心肌组织^[36]。2016年, Richards等^[37]在工程化心肌组织构建时引入硅纳米线,有效提高了基于iPSCs来源心肌细胞的工程化心肌组织中细胞间连接的形成,提高其机械收缩能力,调控工程化组织的跳动的规律。Montgomery等^[38]研究人员采用了一种柔性的、可记忆的图案化支架材料,携带心肌类细胞进行心梗修复研究,可有效保护细胞在注射过程中有效保护细胞免受损伤,减少创伤,并有效覆盖损伤部分,提高心梗治疗效果。综上所述,工程化的心肌组织在心梗治疗方面已展现出巨大的应用前景,且目前已有部分产品进入到临床试验研究阶段。如2015年, ClinicalTrial报道,利用人胚胎干细胞分化来源的心肌细胞结合到纤维蛋白支架载体中,制备成心肌补片^[39],将其移植到严重心衰的68岁病人心脏受损部位(心脏NYHA三级),术后无异常。3个月后,病人的症状改善(NYHA一级),未出现并发症,如心律不齐、肿瘤形成、免疫抑制相关的副作用等^[39]。

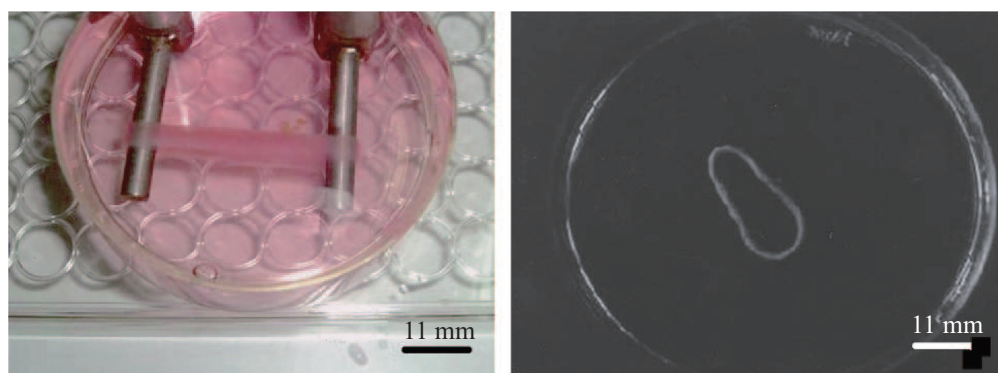


图2 工程化心肌组织大体形态(根据参考文献[35]修改)

Fig.2 Macroscopy of ECT (modified from reference [35])

在脑样组织构建与应用方面,近年来已有多篇报道通过使用水凝胶作为支架材料构建类脑组织。2014年,美国Tufts大学Kaplan教授^[40]首次报道了蚕丝支架蛋白参与构建的类似脑皮层组织的三维复杂模型,并且可以产生生化 and 电生理应答,并在实验室中保持功能达数月。考虑到水凝胶易降解性限制了该模型培养时间和组织功能的实现,研究人员进一步结合神经组织电生理特性,将碳纳米管和石墨烯等导电纳米材料用于脑样组织构建。这类材料不仅具有很好的电传导特性,更可在分子水平上被裁剪,其支架形态可在孔隙度、构架和生物功能方面充分地模拟细胞外基质组分的特点。2015年, Bosi等^[41]研究人员发现相比于单纯聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 多孔支架,多壁碳纳米管-PDMS多孔支架可以显著激发神经与突触活动,为三维神经网络提供更好的生长支架,是良好的组织培养模型。2016年, Guo等^[42]研究人员制备出一种还原型氧化石墨烯-脱细胞基质混合支架材料,相比于单纯脱细胞基质支架材料,该混合支架材料能够促进MSCs向神经元的分化和功能表达。2017年,哈佛大学Quadrato等^[43]研究人员使用hiPSCs细胞培养并构建出迷你3D大脑类器官,利用单细胞转录组学技术量化了类器官内区域复杂性和细胞的多样性。进一步, Jin等^[44]研究人员利用matrigel携带ESC来源的神经元前体细胞(neuronal precursor cells, NPCs),将细胞-材料复合体注射到脑梗后形成的空腔,结果显示,细胞-材料复合体能够改善实验动物的感觉、运动与认知功能,提高脑中风后的损伤修复效果。Chen等^[45]通过硬膜下移植纤维蛋白胶携带的iPSCs来修复局部大鼠大脑缺血损伤,结果表

明,纤维蛋白胶携带的iPSCs能够减少大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠的脑梗面积、改善其神经功能、减轻炎症反应等。

在工程化肝脏及肾脏组织的构建与应用方面, Lee等^[46]在2009年研制了一种反向的胶状晶体支架,将肝细胞系HepG2细胞培养在支架小孔中,发现细胞聚集成肝组织球状体,并且能够发挥肝细胞功能,证实这种支架材料同样可以用于其他相关的细胞类型。2018年, Ruoss团队^[47]制备了胶原冷冻干燥并进一步交联1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC]形成的多孔胶原支架,同时接种肝细胞,发现支架中的肝细胞的代谢活性保持恒定,并且证实10天内细胞不会丧失功能。Sasaki等^[48]研究人员通过将人原代肝细胞,人脐静脉内皮细胞和正常人真皮成纤维细胞逐层(layer-by-layer)加载到已经涂覆有纤连蛋白和明胶(两种细胞外基质蛋白)的纳米薄膜上来构建同质的、致密的及血管良好的类肝组织,该细胞包被技术未来将适用于生产用于再生医学的血管化功能性肝组织培养。此外,在工程化肝脏组织体内移植修复方面, Stevens等^[49]研究人员研发了一种基于PEG-二丙烯酸酰胺(PEG-diacrylamide, PEGDAAm)的水凝胶系统,该系统适用于体外和植入后的肝细胞培养。基于PEGDAAm构建的肝组织在植入裸鼠的腹腔后,可存活超过3周。2014年, Xia等^[50]用ihPSCs分化生成了肾芽祖细胞样细胞,与小鼠胚胎肾细胞培养18天后,可观察到肾脏功能单元结构。2018年, Jansen等^[51]利用生物功能化中空纤维和 β -半乳糖聚糖材料开发了功能性肾小管,构建的肾小管可有效结合尿毒症分泌的毒素并实现对

白蛋白的重吸收。

值得一提的是, 2008年, 哈佛大学医学院的研究人员^[52]利用全器官脱细胞技术, 在体外构建了具有泵血功能的人工心脏。2013年, Lu等^[53]研究人员进一步将诱导型多能干细胞来源的心肌祖细胞再细胞化到心脏全器官脱细胞基质内, 种子细胞可以在体外迁移、增殖并分化为心肌细胞、平滑肌细胞以及血管内皮细胞, 从而形成再细胞化的心脏构建物。20天灌流培养后, 工程化心脏可以自发搏动和具有较好的机械性能。2016年, Sanchez等^[11]研究人员以人类的供体心脏进行全器官脱细胞, 成功制备心脏全器官脱细胞支架, 研究人员针对人类供体心脏对脱细胞技术进一步改良, 并详细评价脱细胞基质性能、脉管的保留情况以及心室完整性、心肌灌流循环性能和压力容积等。相继, 研究人员获得了脑、肝脏、肾脏等的全器官脱细胞支架并进行了全器官构建研究^[54]。2015年, De Waele等^[55]研究人员对小鼠脑组织进行脱细胞处理获得3D无细胞的脑, 并在3D无细胞脑上接种神经干细胞, 在表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和人成纤维细胞生长因子-2(human fibroblast growth factor-2, hFGF-2)的刺激下能一直保持神经干细胞的表型, 并可进一步用于神经疾病的移植治疗。同年, Zhu等^[56]研究人员利用颈动脉灌流方法获取脱细胞小脑组织支架, 这种支架能够保存神经保护蛋白和生长因子, 神经干细胞在这种支架上能够分化成神经元、星型胶质细胞。同时移植到皮下及颅内, 脱细胞小脑支架表现出良好的生物相容性及潜在的治疗效果。在肝的全器官脱细胞支架研制及再细胞化方面, Ye等^[57]研究人员依次使用1%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和1% Triton X-100的组合可行、简单、快速地使大鼠肝脏去细胞化并获得不存在残留细胞而保留了整合血管网络和三维结构的肝脏全器官脱细胞支架。Masson染色表明, 细胞外蛋白质保存良好, 扫描电子显微镜显示保留的脱细胞基质结构^[57]。2016年, Du等^[11]研究人员通过灌注1% SDS溶液3小时, 去离子水灌注15分钟, 1%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X)灌注16小时的方法获得保存大量的天然微结构和细胞外基质的脱细胞肾支架, 并在灌流的同时进一步接种hiPSCs衍生的PAX2阳性肾祖细胞和内皮细胞进行再细胞化。综上所述, 全器官脱细胞支架保留了器官组织原有的空间结构、超微构象以

及细胞外特异性基质组分等, 是组织器官构建的理想材料^[58-59], 科学家并进一步将过去的薄片组织再造推向了全器官水平, 这是组织工程研究领域的里程碑研究。

综合国内外最新进展, 目前我们在重要生命器官组织构建与移植修复方面已经取得一批关键技术突破, 构建水平和工程化组织质量均有大幅提高。未来, 重要生命器官组织工程研究的重点仍将集中在仿生构建与天然器官组织和结构类似的工程化组织, 探索并明确仿生工程化组织体外发育和成熟规律以及相关机制, 进一步阐明工程化组织对损伤微环境的调控与治疗作用, 以期推动重要生命器官组织工程的临床转化与应用。

4 基于快速成型和微制造技术的器官精准设计与制造

近年来, 随着信息科学、制造科学与生命科学交叉与融合, 越来越多的先进制造技术被应用于组织工程研究, 使计算机辅助组织工程研究(computer aided tissue engineering research, CATE)日益受到研究人员的青睐, 包括计算机辅助设计、图像处理、自由成型。CATE技术已用于构建包括皮肤、软骨和骨乃至肝和血管等器官的组织工程构建。相关研究还处于初步发展阶段, 但具有很大的发展潜力。

快速成型制造和微制造技术等制造技术为支架的可控化设计与制造提供了工程基础, 这也成为国内外的研究热点。快速成型技术(rapid prototyping and manufacturing)是近年形成的新型制造技术, 其最大的优势是直接由个性化的设计数字驱动形成三维结构体, 不受形状复杂程度限制的制造方法。应用该技术是实现三维支架制造的有效手段。先进的制造技术为内脏器官血管化问题提供了解决方案。以美国哈佛大学的Vacanti等^[60]和麻省理工学院的Langer等^[61]为首的组织工程学先驱最早将先进制造技术引进组织工程研究中。日本东京大学的Fuji小组^[62]紧随其后, 进一步联合MEM技术和光敏生物材料, 得到二维管径为100 μm 左右的微血管网, 为培养在其周围的最小边长为50 μm 的小室中的肝细胞集落提供营养和氧气支持。在器官制造的血管网构建方面, 将源于数字化模型的层面数据转换为物理结构的通道, 利用分子组装、微滴组装和细胞组装等一系列新技术、新方法形成的器官胚体, 体现了信

息技术的作用和受控组装的新模式,是一条可以探索的新途径。

3D打印技术的发展为精确模拟天然心肌的组成和结构提供了新的途径,近年来得到越来越多的关注。科研人员研制了一系列可用于3D打印的“生物墨水”,通过模型重建和3D打印构建了一批具有特殊结构的工程化心肌组织。2011年, Gaebel等^[63]以人脐静脉内皮细胞和人MSC为种子细胞,以聚酯氨基甲酸酯脲为墨水,制备成心肌补片,体内研究结果显示,该补片能够有效改善心功能。2017年, Gao等^[64]利用多光子激发的3D结构光固化技术生成亚微米分辨率的天然细胞外基质支架,然后在支架中接种心肌细胞、平滑肌细胞、iPSCs源内皮细胞,以构建工程化心肌组织。该工程化组织不仅具有高保真度、高分辨率,且可以显著改善缺血性心肌损伤。2016年, Gu等^[65]研究人员,使用海藻酸、羧甲基-壳聚糖、琼脂糖复合生物墨水结合人神经干细胞构建神经组织。其中,分化的神经元能够形成突触联系、重塑神经网络、自发放电等,该3D组织为研究神经发育和神经相关疾病研究提供了模型。同年,浙江大学郑树森院士课题组^[66]3D打印出水凝胶支架,并将支架结合肝细胞细胞系HL-7702(L02)移植进裸鼠。用3D支架携带L02细胞治疗的小鼠具有更长的存活时间,说明3D骨架具有重建肝组织和部分肝功能的潜力,并且可以用于肝组织的重建。2016年, Homan研究团队^[67]利用3D打印技术打印出了嵌入细胞外基质组分的人肾近端小管,培养的原代RPTEC细胞表现出上皮细胞形态和肾小管功能特性。

近年来,微流控芯片技术已经用于血管、大脑、肝、肾等多种器官的组织培养,在心脏组织器官模拟方面,除了简单脉管系统的模拟,基于微流控芯片的心脏体外模型构建技术的开发也已实现了模拟心肌细胞的相关电生理特性,重现了心肌细胞生理及病理状态。2017年,研究人员在基于纤维连接蛋白的微接触印刷线上培养新生大鼠心室肌细胞,设计模拟体内心肌的层状结构,结果显示,这种体外构建的仿心肌生物芯片无论在心脏基因表达、肌节结构、收缩能力和对 β -肾上腺素反应的能力方面均表现出接近成年大鼠心肌的参数^[68]。同年, Brzozka研究组^[69]制备了一种具有3种不同几何形状的PDMS/玻璃微流体系统,在该系统中接种大鼠心肌细胞系-H9C2,发现静态条件不会增强微系统中H9C2细

胞的生长,相反地,灌注条件对细胞的分裂、形态和排列有显著影响。该系统可有助于我们深入了解心脏组织的发育过程并用于心脏疾病的药物研发。微流体系统在微尺度和二维水平解决组织工程模型中不会形成血管、营养和废物扩散渠道不一等问题。2015年, Yang等^[70]研究人员利用微流体系统进行人神经干细胞的培养,通过控制因子的扩散进一步调控神经干细胞向神经元及星型胶质细胞分化。同年,研究人员在PEG水凝胶形成的微流体系统中同时培养神经祖细胞、小胶质细胞、内皮细胞等,构建出更加复杂的仿脑芯片,该模型可以用来评估化学物质的器官毒性,准确率达90%^[71]。此外,微流控技术在肝脏及肾脏相关研究方面也受到了高度关注。2013年, Choucha-Snouber及其同事^[72]设计了一种肝脏生物芯片来研究其对抗癌药物氟他胺的代谢反应。该芯片由纤连蛋白包被PDMS制成,将HepG2/C3a细胞接种于系统中。该生物芯片具有模拟组织生理特性的优势。2017年, Monga等^[73]研究人员研发了一种模拟肝脏腺泡微生理系统的微流控平台,该微流控系统在接种了20%人肝细胞和星状细胞以及连续灌流下可存活至少28天。该系统可作为研究肝脏腺泡的生理学和病理学研究模型以及用于后续药物筛选。2018年, Musah等^[74]研究人员将人ESC和iPSCs来源的肾小球足细胞接种在微流控芯片上,构建肾小球芯片器官,该培养装置有效地模拟了肾小球毛细血管壁的结构和功能。

5 展望

由于重要生命器官组织结构异常复杂、生理功能多样,因此对其进行工程化构建存在诸多技术挑战。管腔系统的重建(大血管及微血管腔道的构建)、真正的功能发挥(如肝脏合成凝血因子、肾脏的浓缩稀释功能及多核心肌细胞协同电活动等)、体内外的长期存活等方面都远非理想。足够数量的功能细胞、组织特异性细胞外基质仿生材料及二者相结合的仿生构建始终是制约重要生命器官工程化构建的三个重要因素。如何进一步提高干细胞可控分化的功能性与稳定性;如何赋予支架对在体微环境更好的相容性与正向调控作用;如何促进工程化组织/类器官形成微血管网等微网络系统;如何赋予反应器系统更为优良的模拟体内微环境的能力是未来重要生命器官组织工程研究亟需进一步解决的重大科

学问题。只有在精细模拟所构建重要器官的多级微结构及其组成的微环境, 制备足量并且功能完善的种子细胞, 在体外生物反应器中实现种子细胞与仿生支架微环境的装配并长期培养, 才能构建具有一定功能的工程化肝脏、心脏以及肾脏组织或类器官, 进而为体内移植应用奠定坚实的理论与技术基础。未来, 以仿生学为指导, 多学科交叉融合将推动重要生命器官组织工程研究关键技术的不断突破。相关技术与相应产品将极大推进组织工程策略在治疗终末期肝病、心肌梗死以及急性肾损伤等中的转化应用。这样可以显著提高我国组织工程研究源头创新和集成创新能力, 并推动我国生命科学、材料科学、制造科学等的深入发展。

参考文献 (References)

- China Cardiovascular Disease Reporting Group. China Cardiovascular Disease Report 2016 summary. *Journal of Chinese Circulation* 2017; 32(6).
- You H. Current status of hepatitis B cirrhosis in China. *Compilation of the 16th National Conference on Viral Hepatitis and Liver Diseases of the Chinese Medical Association*. 2013.
- Zhang GM, Liao N, Zheng W, Sun XJ, Yin ZD, Wang FZ. Incidence by age and region of hepatitis B reported in China from 2005 to 2016. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2016; 50(9): 815-9.
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013; 501 (7467): 373-9.
- Huang J, Zhou S, Niu X, Hu B, Li Q, Zhang F, *et al.* Generation of special autosomal dominant polycystic kidney disease iPSCs with the capability of functional kidney-like cell differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 196.
- Shinozawa T, Yoshikawa HY, Takebe T. Reverse engineering liver buds through self-driven condensation and organization towards medical application. *Dev Biol* 2016; 420(2): 221-9.
- Tan X, Dai Q, Guo T, Xu J, Dai Q. Efficient generation of transgene- and feeder-free induced pluripotent stem cells from human dental mesenchymal stem cells and their chemically defined differentiation into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495(4): 2490-7.
- Emborg ME, Liu Y, Xi J, Zhang X, Yin Y, Lu J, *et al.* Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain. *Cell Rep* 2013; 3(3): 646-50.
- Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51(1): 297-305.
- Wang Y, Alhaque S, Cameron K, Meseguer-Ripolles J, Lucendo-Villarin B, Rashidi H, *et al.* Defined and scalable generation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *J Vis Exp* 2017; doi: 10.3791/55355.
- Du C, Narayanan K, Leong MF, Ibrahim MS, Chua YP, Khoo VM, *et al.* Functional kidney bioengineering with pluripotent stem-cell-derived renal progenitor cells and decellularized kidney scaffolds. *Adv Health Mater* 2016; 5(16): 2080-91.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- Laïosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 2006; 25(5): 731-44.
- Huang P, Zhang L, Gao Y, He Z, Yao D, Wu Z, *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and ex-pandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 370-84.
- Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 390-3.
- Du Y, Wang J, Jia J, Song N, Xiang C, Xu J, *et al.* Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 394-403.
- Kaminski MM, Tosic J, Kresbach C, Engel H, Klockenbusch J, Muller AL, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into renal tubular epithelial cells by defined transcription factors. *Nat Cell Biol* 2016; 18 (12): 1269-80.
- Cao N, Huang Y, Zheng J, Spencer CI, Zhang Y, Fu JD, *et al.* Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* 2016; 352(6290): 1216-20.
- Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, *et al.* Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 195-203.
- Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, *et al.* Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 204-12.
- Wang Y, Qin J, Wang S, Zhang W, Duan J, Zhang J, *et al.* Conversion of human gastric epithelial cells to multipotent endodermal progenitors using defined small molecules. *Cell Stem Cell* 2016; 19(4): 449-61.
- Wu Y, Wang L, Guo B, Ma PX. Interwoven aligned conductive nanofiber Yarn/hydrogel composite scaffolds for engineered 3D cardiac anisotropy. *ACS Nano* 2017; 11(6): 5646-59.
- Lozano R, Stevens L, Thompson BC, Gilmore KJ, Gorkin R, 3rd, Stewart EM, *et al.* 3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates. *Biomaterials* 2015; 67: 264-73.
- Deegan DB, Zimmerman C, Skardal A, Atala A, Shupe TD. Stiffness of hyaluronic acid gels containing liver extracellular matrix supports human hepatocyte function and alters cell morphology. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015; 55: 87-103.
- Lih E, Park KW, Chun SY, Kim H, Kwon TG, Joung YK, *et al.* Biomimetic porous PLGA scaffolds incorporating decellularized extracellular matrix for kidney tissue regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016; 8(33): 21145-54.
- Malay AD, Arakawa K, Numata K. Analysis of repetitive amino

- acid motifs reveals the essential features of spider dragline silk proteins. *PLoS One* 2017; 12 (8): e0183397.
- 28 Shu Y, Hao T, Yao F, Qian Y, Wang Y, Yang B, *et al.* RoY peptide-modified chitosan-based hydrogel to improve angiogenesis and cardiac repair under hypoxia. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7(12): 6505-17.
 - 29 Li J, Shu Y, Hao T, Wang Y, Qian Y, Duan C, *et al.* A chitosan-glutathione based injectable hydrogel for suppression of oxidative stress damage in cardiomyocytes. *Biomaterials* 2013; 34(36): 9071-81.
 - 30 Hao T, Li J, Yao F, Dong D, Wang Y, Yang B, *et al.* Injectable fullerene/alginic acid hydrogel for suppression of oxidative stress damage in brown adipose-derived stem cells and cardiac repair. *ACS Nano* 2017; 11(6): 5474-88.
 - 31 Weaver JD, Stabler CL. Antioxidant cerium oxide nanoparticle hydrogels for cellular encapsulation. *Acta Biomater* 2015; 16: 136-44.
 - 32 Wu Q, Li Y, Wang Y, Li L, Jiang X, Tang J, *et al.* The effect of heparinized decellularized scaffolds on angiogenic capability. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104(12): 3021-30.
 - 33 Orr S, Strominger I, Eremenko E, Vinogradov E, Ruvinov E, Monsonego A, *et al.* TGF-beta affinity-bound to a macroporous alginate scaffold generates local and peripheral immunotolerant responses and improves allocell transplantation. *Acta Biomater* 2016; 45: 196-209.
 - 34 Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, *et al.* Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002; 90(2): 223-30.
 - 35 Guo XM, Zhao YS, Chang HX, Wang CY, E LL, Zhang XA, *et al.* Creation of engineered cardiac tissue *in vitro* from mouse embryonic stem cells. *Circulation* 2006; 113 (18): 2229-37.
 - 36 Zhou J, Chen J, Sun H, Qiu X, Mou Y, Liu Z, *et al.* Engineering the heart: evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function. *Sci Rep* 2014; 4: 3733.
 - 37 Richards DJ, Tan Y, Coyle R, Li Y, Xu R, Yeung N, *et al.* Nanowires and electrical stimulation synergistically improve functions of hiPSC cardiac spheroids. *Nano Lett* 2016; 16(7): 4670-8.
 - 38 Montgomery M, Ahadian S, Davenport Huyer L, Lo Rito M, Civitarese RA, Vanderlaan RD, *et al.* Flexible shape-memory scaffold for minimally invasive delivery of functional tissues. *Nat Mater* 2017; 16(10): 1038-46.
 - 39 Menasche P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015; 36(30): 2011-7.
 - 40 Tang-Schomer MD, White JD, Tien LW, Schmitt LI, Valentin TM, Graziano DJ, *et al.* Bioengineered functional brain-like cortical tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(38): 13811-6.
 - 41 Bosi S, Rauti R, Laishram J, Turco A, Lonardoni D, Nieuws T, *et al.* From 2D to 3D: novel nanostructured scaffolds to investigate signalling in reconstructed neuronal networks. *Sci Rep* 2015; 5: 9562.
 - 42 Guo W, Wang S, Yu X, Qiu J, Li J, Tang W, *et al.* Construction of a 3D rGO-collagen hybrid scaffold for enhancement of the neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Nanoscale* 2016; 8(4): 1897-904.
 - 43 Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, Sherwood JL, Min Yang S, Berger DR, *et al.* Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* 2017; 545(7652): 48-53.
 - 44 Jin K, Mao X, Xie L, Galvan V, Lai B, Wang Y, *et al.* Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30(3): 534-44.
 - 45 Chen SJ, Chang CM, Tsai SK, Chang YL, Chou SJ, Huang SS, *et al.* Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem Cells Dev* 2010; 19(11): 1757-67.
 - 46 Lee J, Cuddihy MJ, Cater GM, Kotov NA. Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds. *Biomaterials* 2009; 30(27): 4687-94.
 - 47 Ruoss M, Haussling V, Schugner F, Olde Damink LHH, Lee SML, Ge L, *et al.* A standardized collagen-based scaffold improves human hepatocyte shipment and allows metabolic studies over 10 days. *Bioengineering* 2018; 5(4): pii: E86.
 - 48 Sasaki K, Akagi T, Asaoka T, Eguchi H, Fukuda Y, Iwagami Y, *et al.* Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. *Biomaterials* 2017; 133: 263-74.
 - 49 Stevens KR, Miller JS, Blakely BL, Chen CS, Bhatia SN. Degradable hydrogels derived from PEG-diacrylamide for hepatic tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(10): 3331-8.
 - 50 Xia Y, Sancho-Martinez I, Nivet E, Rodriguez Esteban C, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC. The generation of kidney organoids by differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud progenitor-like cells. *Nat Protoc* 2014; 9(11): 2693-704.
 - 51 Jansen J, Fedecostante M, Wilmer MJ, Peters JG, Kreuser UM, van den Broek PH, *et al.* Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins. *Sci Rep* 2016; 6: 26715.
 - 52 Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008; 14(2): 213-21.
 - 53 Lu TY, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama G, *et al.* Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun* 2013; 4: 2307.
 - 54 Sanchez PL, Fernandez-Santos ME, Costanza S, Climent AM, Moscoso I, Gonzalez-Nicolas MA, *et al.* Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. *Biomaterials* 2015; 61: 279-89.
 - 55 De Waele J, Reekmans K, Daans J, Goossens H, Berneman Z, Ponsaerts P. 3D culture of murine neural stem cells on decellularized mouse brain sections. *Biomaterials* 2015; 41: 122-31.
 - 56 Zhu T, Tang Q, Shen Y, Tang H, Chen L, Zhu J. An acellular cerebellar biological scaffold: Preparation, characterization, biocompatibility and effects on neural stem cells. *Brain Res Bull* 2015; 113: 48-57.
 - 57 Ye JS, Stoltz JF, de Isla N, Liu Y, Yin YF, Zhang L. An approach to preparing decellularized whole liver organ scaffold in rat. *Biomed Mater Eng* 2015; 25(1 Suppl): 159-66.
 - 58 Sabetkish S, Kajbafzadeh AM, Sabetkish N, Khorramirouz

- R, Akbarzadeh A, Seyedian SL, *et al.* Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(4): 1498-508.
- 59 Lee H, Han W, Kim H, Ha DH, Jang J, Kim BS, *et al.* Development of liver decellularized extracellular matrix bioink for three-dimensional cell printing-based liver tissue engineering. *Biomacromolecules* 2017; 18(4): 1229-37.
- 60 Borenstein JT, Weinberg EJ, Orrick BK, Sundback C, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP. Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. *Tissue Eng* 2007; 13 (8): 1837-44.
- 61 Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8): 2480-7.
- 62 Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Microfluidic PDMS (poly-dimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Bio-technol Prog* 2004; 20(3): 750-5.
- 63 Gaebel R, Ma N, Liu J, Guan J, Koch L, Klopsch C, *et al.* Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials* 2011; 32(35): 9218-30.
- 64 Gao L, Kupfer ME, Jung JP, Yang L, Zhang P, Da Sie Y, *et al.* Myocardial tissue engineering with cells derived from human-induced pluripotent stem cells and a native-like, high-resolution, 3-dimensionally printed scaffold. *Circ Res* 2017; 120(8): 1318-25.
- 65 Gu Q, Tomaskovic-Crook E, Lozano R, Chen Y, Kapsa RM, Zhou Q, *et al.* Functional 3D neural mini-tissues from printed gel-based bioink and human neural stem cells. *Adv Healthc Mater* 2016; 5(12): 1429-38.
- 66 Zhong C, Xie HY, Zhou L, Xu X, Zheng SS. Human hepatocytes loaded in 3D bioprinting generate mini-liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2016; 15(5): 512-18.
- 67 Homan KA, Kolesky DB, Skylar-Scott MA, Herrmann J, Obuobi H, Moisan A, *et al.* Bioprinting of 3D convoluted renal proximal tubules on perfusable chips. *Sci Rep* 2016; 6: 34845.
- 68 Sheehy SP, Grosberg A, Qin P, Behm DJ, Ferrier JP, Eagleson MA, *et al.* Toward improved myocardial maturity in an organ-on-chip platform with immature cardiac myocytes. *Exp Biol Med* 2017; 242(17): 1643-56.
- 69 Kobuszewska A, Tomecka E, Zukowski K, Jastrzebska E, Chudy M, Dybko A, *et al.* Heart-on-a-chip: an investigation of the influence of static and perfusion conditions on cardiac (H9C2) cell proliferation, morphology, and alignment. *SLAS Technol* 2017; 22(5): 536-46.
- 70 Yang K, Park HJ, Han S, Lee J, Ko E, Kim J, *et al.* Recapitulation of *in vivo*-like paracrine signals of human mesenchymal stem cells for functional neuronal differentiation of human neural stem cells in a 3D microfluidic system. *Biomaterials* 2015; 63: 177-88.
- 71 Schwartz MP, Hou Z, Propson NE, Zhang J, Engstrom CJ, Santos Costa V, *et al.* Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(40): 12516-21.
- 72 Choucha Snouber L, Bunesco A, Naudot M, Legallais C, Brochot C, Dumas ME, *et al.* Metabolomics-on-a-chip of hepatotoxicity induced by anticancer drug flutamide and Its active metabolite hydroxyflutamide using HepG2/C3a microfluidic biochips. *Toxicol Sci* 2013; 132(1): 8-20.
- 73 Soto-Gutierrez A, Gough A, Verneti LA, Taylor DL, Monga SP. Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: the potential of microphysiology systems. *Exp Biol Med* 2017; 242(16): 1605-16.
- 74 Musah S, Dimitrakakis N, Camacho DM, Church GM, Ingber DE. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into mature kidney podocytes and establishment of a glomerulus chip. *Nat Protoc* 2018; 13(7): 1662-85.