



王彬, 粤港澳大湾区精准医学研究院类器官与再生医学研究中心青年研究员、国际华人骨科学会会员、国际干细胞研究协会会员、香港中文大学医学院客座副教授。曾于香港中文大学获得医学博士学位及从事博士后研究员工作。主要研究方向为类器官工程化研究, 以及干细胞在再生医学和骨外科医学中的转化应用。参与发表SCI论文40余篇, H-index=24(google scholar), 总引用次数2 000余次。主持或参与广州市“才源广进计划”创新创业团队项目(人才项目)等, 担任多个国际知名杂志青年编委以及审稿人。



林鑫华博士, 现任复旦大学生命科学学院教授、粤港澳大湾区精准医学研究院(广州)执行院长, 中国遗传学会类器官分会会长。林鑫华实验室结合类器官技术与在体模型, 专注于组织器官的稳态维持、修复再生和干细胞调控的作用机制研究。研究论文在*Nature*、*Cell*等期刊上发表, 相关成果被编入美国大学教科书。入选生物学和生物医药领域高被引华人科学家、全球前2%顶尖科学家榜单。

细胞外基质材料在肿瘤类器官应用中的发展与创新

吴昊^{1, 2#} 付旭正^{2#} 马晴^{1, 2} 程婉婷² 詹美玲² 孟庆航¹ 林鑫华^{1, 2*} 王彬^{1*}

(¹粤港澳大湾区精准医学研究院(广州), 广州 511458;

²复杂性状的遗传调控全国重点实验室, 复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要 肿瘤微环境是由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、肿瘤相关成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞等组成的动态复杂体系, 其异质性与动态演变显著影响肿瘤的增殖、侵袭、转移及治疗抵抗。肿瘤类器官作为新兴的临床前模型, 是研究肿瘤细胞及其与微环境互作的重要平台。该文系统综述肿瘤微环境的组成及其与肿瘤的互作机制, 重点聚焦新型肿瘤类器官ECM材料的开发现状, 及其在肿瘤类器官高通量药物测试系统中的应用, 最后总结当前肿瘤类器官ECM开发的技术瓶颈, 展望工程化类器官对ECM材料的智能化、标准化需求及多学科交叉融合的发展方向。

关键词 肿瘤类器官; 肿瘤微环境; 细胞外基质材料

收稿日期: 2025-06-15

接受日期: 2025-07-18

国家重点研发计划(批准号: 2022YFA0806200)、国家自然科学基金(批准号: 32192400、32350710191)和广州市科技计划(批准号: 2024D03J0014)资助的课题。

[#]共同第一作者

^{*}通信作者。Tel: 021-31246580, E-mail: xlin@fudan.edu.cn; Tel: 020-66333080, E-mail: wangbin@ipm-gba.org.cn

Received: June 15, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2022YFA0806200), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32192400, 32350710191) and the Science and Technology Projects in Guangzhou (Grant No.2024D03J0014)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-21-31246580, E-mail: xlin@fudan.edu.cn; Tel: +86-20-66333080, E-mail: wangbin@ipm-gba.org.cn

Development and Innovation of Extracellular Matrix Materials in Tumor Organoid Applications

WU Hao^{1,2#}, FU Xuzheng^{2#}, MA Qing^{1,2}, CHENG Wanting², ZHAN Meiling²,

MENG Qinghang¹, LIN Xinhua^{1,2*}, WANG Bin^{1*}

(¹Greater Bay Area Institute of Precision Medicine (Guangzhou), Guangzhou 511458, China; ²State Key Laboratory of Genetics and Development of Complex Phenotype, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract The TME (tumor microenvironment) is a dynamic and complex system composed of ECM (extracellular matrix), cancer-associated fibroblasts, immune cells, endothelial cells, etc. Its heterogeneity and dynamic evolution significantly influence tumor proliferation, invasion, metastasis, and therapeutic resistance. As an emerging preclinical model, tumor organoids serve as a vital platform for studying tumor cells and their interactions with the microenvironment. This review systematically summarizes the composition of the TME and its interaction mechanisms with tumor cells, focusing on the current development status of novel tumor organoid matrix materials and their applications in high-throughput testing systems for tumor organoids. Finally, it outlines the technical bottlenecks in current tumor organoid matrix materials development, and prospects the intelligent and standardization requirements of engineered organoids for matrix materials, as well as the development direction of multidisciplinary integration.

Keywords tumor organoids; tumor microenvironment; extracellular matrix material

1899年, PAGET^[1]提出的“种子和土壤”的假说,揭示了肿瘤细胞发育与其微环境之间的密切关系。研究肿瘤与肿瘤微环境的互作对开发有效的抗癌疗法至关重要。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是一个复杂的生态系统,由肿瘤相关成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞、各种其他细胞以及ECM成分组成^[2]。肿瘤细胞因本身具有不稳定性和异质性,其作为治疗靶点的应用常受限制;相比之下TME信号和协同细胞具有相对稳定性,使得TME成为更好的成药靶点。TME的组成虽然在不同器官和患者中具有多样性,但调控TME内细胞组分、生物学过程及信号通路间相互作用的策略在理论上可推广至多种癌症类型的治疗中。

早期TME相关研究多聚焦于微环境细胞与血管生成。1986年, DVORAK^[3]提出“肿瘤是永不愈合的伤口”,首次强调肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)通过分泌ECM和生长因子[如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)]促进肿瘤生长。1990年, FOLKMAN团队^[4]发现了血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在肿瘤血管生成中的作用,奠定了抗血管治疗的基础。而自2000年以来,针对免疫细胞的研究逐渐兴起,2004年, CD8⁺ T细胞浸润被证实与黑色素

瘤患者生存率呈正相关^[5], 调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)和髓系来源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)的免疫抑制功能也先后被揭示^[6-7]。2010年, BISWAS等^[8]提出肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的M1/M2极化模型, M2型巨噬细胞通过分泌IL-10促进肿瘤的免疫逃逸。研究发现脂肪细胞通过释放脂肪酸为卵巢癌转移提供能量^[9]。而周围神经的调节能力也被证明与肿瘤的侵袭能力有关^[10]。近年来,对TME的研究热点开始转向多细胞相互作用网络与代谢重编程调控。

在过去的几十年里,临床前肿瘤模型,如细胞系或患者来源的异种移植物,是肿瘤机制研究和新药测试的重要平台。然而,肿瘤细胞系缺乏ECM成分等TME重要组分,无法模拟体内真实环境。患者来源的异种移植物(patient-derived tumor xenografts, PDX)则依赖免疫缺陷鼠,昂贵耗时,且大规模使用涉及动物伦理问题。更重要的是, PDX可能会出现小鼠特异性的肿瘤进化^[11], 导致其无法真实反映肿瘤特性。近年来,肿瘤类器官作为一种成本相对低廉且具代表性的模型,能在体外模拟肿瘤异质性及肿瘤细胞与TME的相互作用,已逐渐展现其替代传统前临床肿瘤模型的潜力^[12-13]。

在肿瘤类器官模型中,水凝胶作为模拟ECM的主要材料,通过提供三维支架以支持肿瘤类器官和其他类型细胞增殖、分化和发挥生理功能。水凝胶是一类由亲水性聚合物构成的三维网络状材料,能够响应物理或化学刺激(如温度、pH 值、离子强度、光信号等),发生显著的体积相变或凝胶-溶胶相转变^[4]。这类材料可通过分子设计调控多重物理、化学参数,包括刚度、孔隙密度、组分构成、渗透性能及降解特性等,上述参数影响细胞黏附、增殖、分化及信号转导等多种细胞行为。基于上述原因,水凝胶已经成为肿瘤类器官工程化构建中模拟肿瘤微环境的核心材料。

构建肿瘤类器官需兼顾肿瘤细胞与微环境的互作以及ECM材料的设计。本综述将系统阐述肿瘤微环境组成以及其与肿瘤细胞的互作机制,总结在肿瘤类器官培养以及复杂类器官体系搭建中开发新型ECM材料的研究进展,并探讨未来工程化类器官

对ECM材料需求及发展方向。

1 肿瘤微环境

肿瘤微环境涵盖了肿瘤细胞所处的整个局部环境,各组分发挥着独特的功能,形成动态平衡的微环境(图1)。深入了解肿瘤微环境的组成、结构和功能,以及肿瘤细胞与微环境之间的相互作用机制,有助于我们从根本上理解肿瘤的发生、发展和转移过程。据此设计相应的ECM材料构建工程化肿瘤类器官模型,可为研究肿瘤生物学和开发新的肿瘤诊断与治疗策略提供平台。

近年来,肿瘤免疫疗法的快速进展使得对肿瘤免疫微环境(tumor immune microenvironment, TIME)的研究成为焦点。TIME的组成因肿瘤类型而异,但基本都包括免疫细胞、基质细胞(stromal cells)、血管和ECM四个组分。除免疫细胞外,其他基质细胞主要由肿瘤相关成纤维细胞、内皮细胞等组成^[15]。

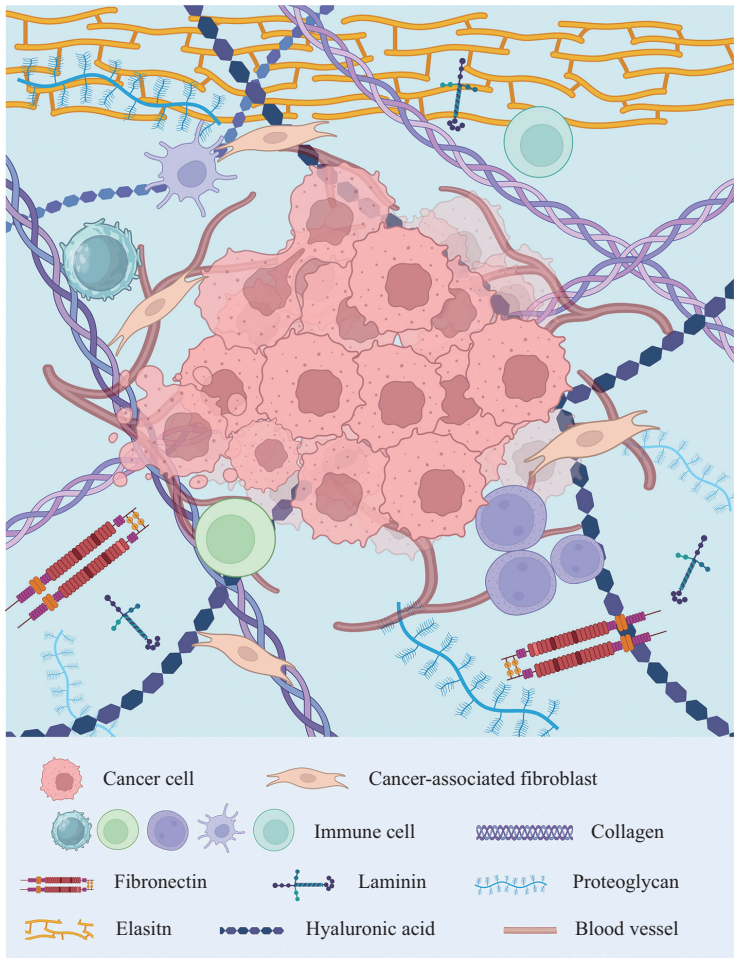


图1 肿瘤微环境组成成分
Fig.1 Components of the tumor microenvironment

1.1 肿瘤相关成纤维细胞

CAFs是TME中含量最丰富的细胞类型之一,它们主要来源于正常成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、脂肪细胞、周细胞和间充质干细胞等^[16]。在肿瘤细胞中分泌的细胞因子、生长因子以及TME中的其他信号刺激下,这些细胞被激活并转化为CAFs。CAFs具有高度的异质性,根据其表型和功能的不同,可以分为多种亚群,不同亚群的CAFs在TME中发挥着不同的作用^[17]。CAFs可以通过分泌ECM成分,如胶原蛋白、ECM交联酶赖氨酰氧化酶(lipoxygenases, LOXs)与ECM降解酶基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)^[18],重塑肿瘤ECM结构,为肿瘤生长或迁移提供支持。CAFs还会分泌细胞因子、趋化因子和生长因子,起到对肿瘤发生形成的调节作用,如NF- κ B通路的促炎因子IL-6促进肿瘤生长^[19],肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)促进肿瘤耐药^[20], VEGF促进血管生成^[21], TGF- β 抑制免疫反应^[22]。

1.2 免疫细胞

TME中的免疫细胞种类繁多,包括T细胞、B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞、树突状细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞等^[23]。免疫细胞在TME中扮演着至关重要的角色,它们对肿瘤的发生、发展和转移具有双重作用:一方面,免疫细胞可以识别和杀伤肿瘤细胞,发挥抗肿瘤免疫反应;另一方面,在TME的影响下,免疫细胞(如Tregs)的功能可能被抑制或转化,反而促进肿瘤的生长^[24]。

1.3 肿瘤相关内皮细胞

肿瘤相关内皮细胞(tumor-associated endothelial cells, TECs)是TME的重要组成部分。相较于正常内皮细胞,肿瘤相关内皮细胞形态不规则,由异质性细胞群组成,适应异常机械环境,且抵抗失巢凋亡(anoikis)^[2]。TECs在形态上的不规则结构利于液体与肿瘤细胞进入周围组织,从而促进肿瘤转移^[25]。TECs中Notch1信号转导的持续激活诱导VCAM1表达、中性粒细胞募集,从而促进肿瘤细胞黏附、内渗和转移。在卵巢癌小鼠模型中VCAM1和Notch1受体阻断抗体治疗可抑制Notch驱动的转移^[26]。TECs还通过表达程序性死亡配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)和程序性死亡配体2(programmed cell death ligand 2, PD-L2)来抑制T细胞发挥功能,影响肿瘤免疫^[27]。在肿瘤血管形成过程中,

TECs通过分泌细胞因子、细胞间黏附等多种机制,影响周细胞、血管平滑肌细胞等,驱动血管生成^[28]。

1.4 ECM成分

ECM由胶原蛋白(collagen)、纤连蛋白(fibronectin)、弹性蛋白(elastin)、层粘连蛋白(laminin)、透明质酸(hyaluronic acid)、蛋白聚糖(proteoglycan)等组成。ECM不仅为细胞提供物理支架,还在促进肿瘤细胞播散中发挥关键作用。实体瘤含有大量的ECM沉积,TME中的许多细胞都会分泌ECM成分,而CAFs是其主要来源。大量的胶原蛋白沉积,加上成纤维细胞的高浸润率,会导致纤维组织增生,这与患者预后不良密切相关。

胶原作为ECM中含量最为丰富的蛋白质,包含28种不同类型。胶原分子的共同特征是具有由三条富含甘氨酸与脯氨酸的多肽链缠绕形成的三股螺旋结构^[29]。胶原纤维在赖氨酰氧化酶的作用下交联,使得肿瘤ECM的硬度与拉伸强度提升,这种变化与肿瘤的不良预后密切相关^[18,30]。胶原交联增加导致ECM刚度升高,激活YAP/TAZ信号通路,驱动肿瘤恶性转化^[31]。胶原片段(如endostatin)被发现可抑制T细胞活性^[32]和M2巨噬细胞的极化^[33]。此外,在许多癌症中,胶原蛋白的高表达与肿瘤发展和低总体生存率相关^[34]。

纤连蛋白是一种大型的多结构域糖蛋白,具有可溶的血浆型和不溶的细胞型两种形式。纤连蛋白由两条相似的肽链通过二硫键连接而成,每个单体分子量为230~270 kDa,包含三种类型的重复单元,能够特异性结合细胞表面受体以及胶原、蛋白聚糖等ECM成分^[35]。HYNES^[36]阐明纤连蛋白介导肿瘤细胞黏附与迁移。与正常组织相比,纤连蛋白在肿瘤组织中普遍过表达,与多种癌症发展相关^[37]。

弹性蛋白是弹性纤维的关键组成成分之一,赋予组织弹性和回缩能力,其基本组成部分是可溶性单体蛋白原弹性蛋白^[38]。在正常组织中,弹性蛋白维持组织的弹性特性,而在肿瘤组织中,弹性蛋白的表达和分布发生改变。ECM弹性纤维增生(定义为弹性纤维的密集聚集)是一种在肿瘤组织ECM中可见的病理性ECM改变,由CHEATLE等^[39]首次在乳腺癌中发现,随后在肺癌、甲状腺癌、宫颈癌、胃癌和前列腺癌中也有报道。

层粘连蛋白是由 α 、 β 、 γ 三条链通过二硫键连接形成的异源三聚体十字形糖蛋白,是基底膜的重

要组成部分^[40]。目前已在脊椎动物中发现5种 α 链、3种 β 链、3种 γ 链,研究最广泛的层粘连蛋白111由 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 和 $\gamma 1$ 组成并由此得名^[41]。层粘连蛋白的表达是组织特异性的,且可以通过与细胞表面受体和细胞质信号通路相互作用影响肿瘤进展^[42]。例如,层粘连蛋白332已被证明在鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)中高表达,并通过与细胞表面受体(整合素、Syndecans)相互作用激活PI3K信号通路促进肿瘤细胞的侵袭与存活^[43]。

透明质酸是由重复的D-葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖二糖单位组成的高分子非硫酸化多糖,具有高度亲水性,能够结合大量水分子,赋予组织保水与抵抗物理压力的能力^[44]。低分子量透明质酸(low molecular weight hyaluronic acid, LMW-HA)能促进肿瘤细胞黏附和迁移^[45],以及通过CD44受体促进浸润免疫细胞凋亡以抑制肿瘤免疫^[46]。

蛋白聚糖是由核心蛋白与一条或多条糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)共价连接形成的复合物。Versican,一种硫酸软骨素蛋白聚糖,被证明通过TLR2激活巨噬细胞向M2型极化,促进免疫抑制^[47]。Glypican蛋白的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)侧链可通过结合生长因子(如FGF、VEGF)调控肿瘤血管生成^[48]。

1.5 肿瘤ECM机械性质

肿瘤ECM的硬度及机械特性是TME的重要特征,与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。肿瘤组织的硬度通常显著高于正常组织,这主要归因于ECM成分的沉积和重塑。胶原蛋白、纤连蛋白等大分子物质的过度沉积,以及MMPs对ECM降解失衡,共同导致肿瘤ECM硬度增加^[49-50]。肿瘤ECM硬化对肿瘤细胞的生物学行为产生多方面影响,包括增殖、侵袭、诱导血管生成、耐药等。

高硬度的ECM能够激活细胞内的机械转导通路促进肿瘤细胞增殖,其中一条重要途径是Hippo通路。当ECM硬度增加时,激活的整合素连接激酶(integrin linked kinase, ILK)-整合素信号转导会增强肌球蛋白磷酸靶酶亚基I(myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)的磷酸化并抑制其活性,从而导致Merlin、MST1/2、LATS1/2的信号级联反应,并诱导YAP/TAZ入核促进细胞增殖基因的转录从而促进肿瘤增殖^[50]。高硬度ECM还能通过增加细胞内RHO产生的细胞骨架压力以促进黏着斑组装与生长

因子依赖性ERK激活。此外,ECM刚度促进整合素聚集,导致黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的激活,进而激活MAP/ERK激酶(MAP2K)-ERK通路,并导致肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移^[51]。硬化的肿瘤ECM可通过促进内皮细胞迁移,诱导血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)的表达(该受体支持内皮细胞的生长和存活)^[52],进而促进血管生成。此外,其还通过上调MMPs的活性促进血管增生与新血管分支形成^[53]。

ECM硬化会阻碍药物有效摄取或向肿瘤内区域递送。NETTI等^[54]的研究表明,在对药物渗透抵抗的肿瘤中施用胶原酶后,IgG向肿瘤区域的扩散速率增加。ECM硬化还可通过诱导YAP激活,促进ABCB1表达上调,引发药物外排导致肿瘤耐药^[55]。ECM硬度诱导的PD-L2可作为xCT介导的铁死亡的抑制因子,从而促进肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者对索拉非尼耐药^[56]。

2 用于肿瘤类器官培养的ECM材料

传统肿瘤类器官培养依赖于异质性强且可调控性差的Matrigel,导致其难以精准模拟TME中ECM的生物与物理信号,限制了对肿瘤-ECM互作机制的深入探究。新型ECM材料的研发为肿瘤类器官培养提供了可完全定义的生化微环境与生物物理特性的技术手段,通过模拟天然肿瘤ECM的物理与生化特征,为系统性解析肿瘤-ECM互作机制开辟了标准化研究路径。

2.1 基质胶

源自EHS小鼠肿瘤基底膜提取物的基质胶是目前培养类器官最常用的水凝胶^[57]。基质胶主要由以下四种ECM蛋白组成:层粘连蛋白(~60%)、IV型胶原蛋白(~30%)、巢蛋白(~8%)以及硫酸乙酰肝素糖蛋白(2%~3%),其中巢蛋白作为交联剂,使层粘连蛋白与IV型胶原蛋白交联形成水凝胶,凝胶温度在22~37 °C^[14]。此外,基质胶还含有肿瘤衍生的生长因子,例如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、TGF- β ^[58],以及MMPs^[59]等蛋白。这种多组分协同的特性,使其支持多种类器官的起始、扩展与形态发生。目前,基质胶已广泛应用于乳腺癌^[60]、结直肠癌^[61]、胰腺癌^[62]、非小细胞肺癌^[63]等多种肿瘤类器官的构建。

然而,基质胶存在诸多缺点。首先,基质胶成分

复杂, 包含超过 14 000 种独特的多肽以及超过 1 800 种独特的蛋白质, 且不同批次之间的基质胶蛋白成分差异大, 相似性仅达 53%^[64], 这不可避免地影响实验结果的可重复性。其次, 基质胶不具备生化成分与机械性质的可调节性。大多数肿瘤的 ECM 相较于正常组织显著硬化, 例如正常肺组织的弹性模量为 0.5~5.0 kPa, 肺癌组织的弹性模量为 20~30 kPa^[65], 基质胶弹性模量则约为 0.1 kPa, 无法还原肿瘤 ECM 的异质性。再者, 较高的成本还限制基质胶在高通量药物筛选的应用。基质胶的成分复杂、批次间差异大以及缺乏可调性等缺点不利于构建标准化的工程肿瘤类器官。

2.2 脱细胞外基质

脱细胞外基质 (decellularized extracellular matrix, dECM) 材料是指使用脱细胞技术从人或其他动物的组织中去除免疫原性细胞成分, 保留 ECM 成分而形成的生物材料。目前, 脱细胞技术主要采用物理法 (超声波、超高压、反复冻融)、化学法 (Triton X-100、十二烷基磺酸钠、过氧乙酸)、酶处理法等对组织进行脱细胞, 已获得多种组织的 dECM, 包括心脏、肺、肾、肝、软骨、小肠黏膜等^[66]。dECM 可通过酶消化增溶, 制备成水凝胶, 用于肿瘤类器官培养。VAN TIENDEREN 等^[67]制备的人肝癌组织 dECM 支架完整保留了原组织成分及机械性质的空间异质性, 可有效支持肿瘤细胞系及患者来源类器官的体外培养。

肿瘤 dECM 直接取材于肿瘤组织, 高度保留了原组织 ECM 的生化组成, 成为了模拟肿瘤特异性微环境、支撑肿瘤类器官生长的理想材料。研究证实, 这类 dECM 能够模拟肿瘤组织的关键特征。与正常组织相比, 源自患者结直肠癌肿瘤腹膜的 dECM 支架硬度更高, 且更能促进结直肠癌腹膜转移类器官的生长与三维结构形成^[68]。在胆管癌 dECM 中培养的胆管癌类器官的转录组更接近体内患者配对胆管癌组织的转录组^[69]。

尽管制备成水凝胶的 dECM 能够在一定程度上保留肿瘤 ECM 的生化组成以及物理性质, 但其丢失了组织结构。此外, 患者肿瘤组织来源的 dECM 受限于癌症间的异质性带来的批次间差异, 以及有限的来源, 难以用于大规模的体外培养与分析。相较之下, 其他动物组织来源的 dECM 同样可以支持肿瘤类器官的构建。例如, 研究人员在牛子宫内膜 dECM

来源的水凝胶中培养的子宫内膜癌类器官中检测到 RhoA 信号, 而在 Matrigel 中未检测到, 表明该水凝胶在模拟子宫内膜微环境的表现上优于 Matrigel^[70]。来源于小鼠的乳腺脂肪垫 dECM 水凝胶可用于模拟体内正常组织微环境及其对辐射损伤的反应, 以评估辐射对肿瘤细胞的影响^[71]。源自动物组织的 dECM 水凝胶可极大降低成本, 有可能在标准化中的类器官构建中发挥作用。

2.3 合成材料

合成水凝胶是通过化学合成方法制备的高分子材料, 相比天然水凝胶, 具有成分明确、批次稳定性高、免疫原性低等优点。合成水凝胶的精准设计使其能在不同尺度模拟肿瘤组织的异质性, 有助于我们更深入地了解肿瘤 ECM 环境在肿瘤发生发展中起到的作用。基于以上原因, 合成材料水凝胶在类器官研究领域的关注度日益提升。

2.3.1 模块化构建 水凝胶的模块化构建是指设计具有特定单元的模块, 并利用物理或化学手段将这些模块精准组装成水凝胶。水凝胶的骨架模块为水凝胶提供基本网络框架, 决定其力学性质和溶胀性, 经典材料包括聚乙二醇 (polyethyleneglycol, PEG)、聚丙烯酰胺 (polyacrylamide, PAM)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 等^[72]; 交联模块通过各类交联剂实现骨架模块的连接; 功能化模块则赋予水凝胶生物学功能, 如为细胞提供黏附位点、与细胞表面受体特异性结合等。

模块化构建的水凝胶能精细化地设计生化、物理特性, 模拟肿瘤微环境。2018 年, CRUZ-ACUNA^[73]等提出利用四臂聚乙二醇-马来酰胺 (PEG-4MAL) 大分子作为骨架模块、GPQ-W 作为交联剂、RGD 多肽 (由精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸这三种氨基酸组成) 作为功能模块, 组成模块化水凝胶的构建方案, 用于人源类器官培养。相似方案已用于多种肿瘤类器官的培养, 包括乳腺癌^[74]、前列腺癌^[75]、淋巴瘤^[76]、胰腺癌^[77]等。有研究将重组细菌胶原样蛋白 (collagen-like protein, CLP) 与降冰片烯功能化透明质酸 (norbornene functionalized hyaluronic acid, NorHA) 进行硫醇-烯配对, 并引入 RGD 位点, 可制备类似天然肿瘤 ECM 的应变硬化行为的水凝胶^[78]。该材料表现出良好的生物相容性, 并被证实能够调控 MCF7 和 MD-MBA-231 乳腺癌细胞的黏附、增殖和侵袭特性。

2.3.2 动态微环境模拟 肿瘤微环境并非静态, 其组织结构与组成会随癌症进展呈现动态演变^[30]。这种局部异质性的肿瘤微环境被证实与疾病进展及治疗抵抗密切相关, 因此在构建体外肿瘤模型时需考虑其动态特征。在水凝胶模块化基础上, 设计能感受外界环境或内部状态并作出响应的水凝胶材料已成为类器官材料研究的热点领域。

使用可降解的水凝胶系统是模拟肿瘤动态微环境变化的一种方式。不可降解水凝胶通常会产生机械限制。而通过引入可降解序列, 如将可被MMPs裂解的多肽掺入水凝胶中, 可以使其被细胞降解^[79]。这种细胞介导的水凝胶网络降解和重塑可以扩大水凝胶孔径, 进而调控细胞的迁移与生长。此外, 通过引入外部信号(如光、温度、pH、酶)主动改变水凝胶的生化物理特性, 可使得ECM环境能按研究需求主动变化, 有助于我们更好地了解肿瘤微环境如何影响肿瘤的发生发展。WILEY等^[80]开发出一种基于凝血酶降解与光交联的可连续软化和硬化的水凝胶, 可在杨氏模量1.5~6.0 kPa内调节ECM的硬度。将T47D细胞包埋于该水凝胶中进行培养; 在培养周期内, 分别于第1天、第3天和第7天对水凝胶进行软化处理, 随后将其继续培养至第15天, 检测细胞增殖情况。结果在第1天软化的水凝胶中培养的T47D细胞比在第3天或第7天软化的水凝胶中增殖率更低, 表明细胞增殖存在对ECM软化时间的依赖。KHINE等^[81]通过整合可逆硼酸酯键合和二硫环开环聚合, 制备了具有模拟肿瘤快速弛豫(接近天然胰腺肿瘤组织, 远快于大多数化学交联与弹性水凝胶)和可逆可调弹性模量的合成聚合物水凝胶, 具有快速弛豫特性的ECM诱导癌细胞的间充质表型, 动态ECM硬化则限制了肿瘤球体生长。

总的来说, 不同ECM材料具备独特的特性(图2), 根据研究目标合理选取ECM材料, 是构建兼具生物学真实性与实验可控性的肿瘤类器官模型的关键。

3 复合材料用于复杂体类器官体系构建

3.1 生物杂化水凝胶

提取类材料与合成类材料都各有优缺点。为满足未来的规模化、标准化类器官构建需求, 杂化水凝胶的概念可被借鉴。在分子化学领域, 杂化是指通过复合多种不同高分子产生新的结构, 从而产生原先

高分子不具备的或者更强的物理化学特性。因此合成材料与天然材料成分的偶联可被称为生物杂化水凝胶。这类水凝胶可能规避纯天然及合成水凝胶的缺陷, 同时融合两者优势, 最终形成高性能体系, 为肿瘤类器官构建提供更精准且标准化的设计^[82]。PRINCE等^[83]利用纤维素纳米晶体与明胶反应制备了一种刚度可控的水凝胶, 该水凝胶支持乳腺癌类器官建立, 且稳定性强, 在96 $\mu\text{m/s}$ 的培养基流动下体积相对减小仅14%, 远小于BME的60%, 更适用于微流体芯片类器官平台。SHOU等^[84]设计了一种磁响应水凝胶, 使用合成甲基丙烯酸缩水甘油酯(glycidyl methacrylate, GMA)分子与天然材料中两种主要成分明胶/透明质酸光交联形成水凝胶, 该水凝胶可在外部磁体的作用下以不同的变化率无限且可逆地多次硬化与软化, 使其硬度可在500(无磁力)至2 700 Pa(1.0 T磁力作用下)间调节, 分别模拟正常和恶性乳腺组织。ECM磁硬化可诱导肿瘤球状体上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及缺氧微环境的形成, 同时降低药物敏感性与肿瘤杀伤效应。当对相同球体群体进行ECM软化处理时, EMT进程终止, 且切换到间充质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)表型。SHAH等^[85]通过使用明胶-海藻酸盐杂化水凝胶珠, 首次构建不同硬度、pH以及液体流动环境的3D体外模型用于模拟乳腺癌肿瘤微环境, 并揭示硬度与酸性pH在乳腺癌干细胞的动力学中起关键作用。BAKER等^[86]则合成了基于透明质酸的MMPs可裂解交联的水凝胶, 该水凝胶支持患者来源乳腺癌细胞类器官的体外生长与药物响应, 同时在体内促进人源肿瘤异种移植形成, 且干扰免疫细胞响应或巨噬细胞极化, 为传统基质胶提供了更具生理相关性的替代方案。总的来说, 天然聚合物能为肿瘤提供良好的生物相容性与活性成分, 而合成聚合物则作为骨架能够赋予水凝胶可调节性, 两者互补从而更好地模拟肿瘤微环境。

3.2 新材料用于共培养体系构建

肿瘤微环境除ECM外, 还包含有CAFs、内皮细胞、免疫细胞等多种细胞成分。要在体内更真实地模拟肿瘤微环境, 反映肿瘤生物学的真实特性, 需要将基质细胞与肿瘤类器官共培养。新型ECM材料的开发为构建更优的肿瘤-肿瘤基质细胞共培养系统提供了重要支撑。

肿瘤类器官-肿瘤基质细胞共培养构建有助于

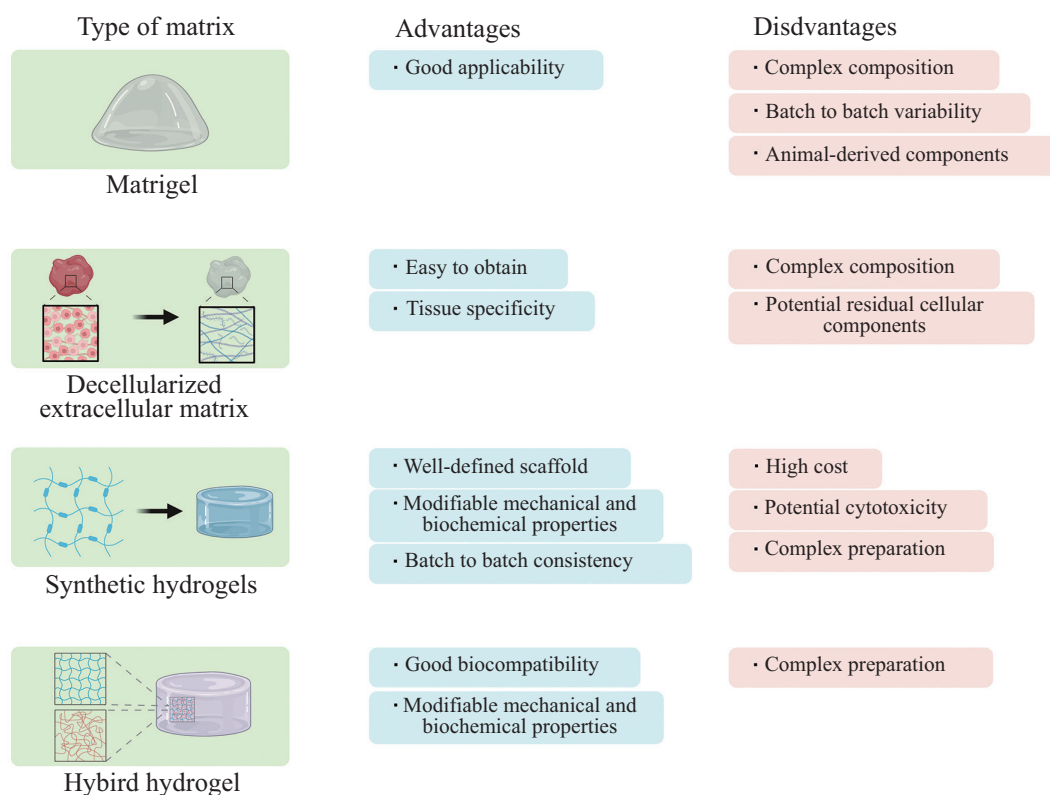


图2 不同ECM材料的优缺点

Fig.2 Advantages and disadvantages of different ECM materials

研究不同条件下基质细胞如何影响肿瘤发生发展。NGUYEN等^[87]设计了基于明胶-降冰片烯(norbornene-functionalized gelatin, GeINB)的水凝胶,并可通过增加水凝胶的弹性模量(~2 kPa增加至~6 kPa),证明了在硬化的环境中,CAFs促进了胰腺癌细胞球的扩散并刺激了I型胶原蛋白的产生。XU等^[88]利用海藻酸盐冷冻水凝胶构建乳腺癌细胞-MDSCs共培养模型显著增强了乳腺癌类器官的生长与侵袭性表型。YANAGISAWA等^[89]使用具有胶原微纤维的纤维蛋白凝胶中的血管类器官培养物建立了一个简单且可重复的血管浸润模型,可用于观察和评估结浸润性肿瘤的细胞动力学和组织学位置关系。LIM等^[90]通过使用带有丙烯酸酯化肽的硫酸化透明质酸水凝胶系统,通过肝细胞癌类器官-内皮细胞共培养,表明内皮细胞通过上调肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号相关基因的表达,募集免疫细胞诱导肝细胞癌产生炎症微环境。

此外,肿瘤类器官-肿瘤基质细胞共培养系统也为药物测试提供了更优秀的平台。HERMIDA团队^[91]以RGDS黏附肽、透明质酸和I型胶原蛋白修饰的海藻酸盐作为原材料,利用3D打印构建支持胶质

母细胞瘤干细胞(glioblastoma stem cells, GSCs)、胶质瘤相关基质细胞(glioma associated stromal cells, GASCs)和小胶质细胞共培养的ECM环境,上述共培养模型适用于临床药敏检测及TME研究。LUO等^[92]研究利用透明质酸-明胶水凝胶构建结直肠癌患者来源类器官与CAFs的共培养模型,在无外源性生长因子条件下,CAFs可维持结直肠癌类器官增殖并恢复其在单独培养中缺失但在患者组织中存在的特异性生物学通路,并证明该模型适用于评估标准护理药物。KUEHLBACH等^[93]建立了一种基于葡聚糖水凝胶的3D器官型体外模型,其中包含微肿瘤球体、巨噬细胞、中性粒细胞、成纤维细胞和内皮细胞,该模型可作为针对肿瘤及血管区室的新型抗癌疗法的理想测试平台。

这些研究表明,新材料构建的共培养体系能有效支持各种共培养体系共建,为探究肿瘤细胞与相关细胞间的相互作用及药物研发提供了更可靠的模型。此外,肿瘤微环境还受到多种其他因素的调控。例如,VAES等^[94]通过结直肠癌类器官与肠道神经系统(enteric nervous system, ENS)的间接共培养,证明ENS通过*Ndr4*基因的丢失参与结直肠癌发病,揭示

神经分泌在肿瘤进展中的作用。设计新材料用于模拟多种复杂环境如神经分泌、炎症等将是肿瘤类器官模型构建的重要方向。

4 ECM材料在高通量测试系统中的应用

工程化肿瘤类器官凭借对TME的高度还原,在药物敏感性和有效性测试中与真实体内环境更为贴近,增强了药物验证与开发的可靠性。近年来,已经可在高通量系统上模拟TME。一项研究在超疏水微孔阵列芯片(SMAR芯片)上开发出一种基于肺癌类器官进行药物敏感性测试的方法^[103]。ZHENG等^[104]成功构建CAF_s-患者来源的类器官-外周血单核细胞(CAF-PDO-PBMC)共培养微工程芯片类器官来模拟TME进行高通量药物筛选。CAF和MSC都显著促进了肝细胞癌类器官生长并将培养时间缩短至1~2周。此外,该模型在预测患者对抗PD-L1药物的反应中相较于传统肿瘤类器官更加精确。

在高通量测试场景下,ECM材料面临更高性能要求,其理化性质需同时兼顾类器官培养适宜性与高通量操作兼容性。dECM材料虽然在批次差异上难以满足标准化的要求,但因其培养效果好,且成本相对较低,在高通量领域的应用是相对广泛的。有研究开发一种基于人皮肤成纤维细胞dECM的方法来模拟甲状腺癌细胞外基质,并评估与全氟烷基化学物质(perfluoroalkyl carboxylates, PFAC)暴露相关的健康风险。这种以生物材料为核心的方法能够真实地模拟长期低剂量的PFAC暴露情况,从而对其致癌潜力有了关键的认识^[96]。支架脱细胞方法是一种制备相对简单且容易规模化的技术路径。NAYAK等^[97]通过对聚己内酯(polycaprolactone, PCL)聚合物支架上培养的CAF_s进行脱细胞处理,构建了一种生化与力学仿生的三维培养平台,以用于原代乳腺癌细胞培养。在该模型中,不同患者来源的乳腺癌类肿瘤对阿霉素、米托蒽酮两种化疗药物的响应在患者样本间呈现显著异质性。

天然材料与合成材料结合传统高通量设备在类器官药物筛选系统中的开发也日渐广泛。JU等^[98]利用3D生物打印技术,以GelMA水凝胶构建了具有生理相关性的胃癌模型。研究通过对比原发性胃癌细胞构建的模型与患者来源异种移植模型的基因表达谱及药物反应,验证了该模型的临床相关性。一项研究展示了一种浸没式打印技术,用于在96孔板

中生物打印组织类器官,以提高3D药物筛选的通量。透明质酸和胶原蛋白组成的生物墨水被生物打印到黏性明胶浴中,这可以阻止生物墨水与孔壁相互作用,并提供支撑以保持球形。该方法已通过几种癌细胞系进行了验证,然后应用于患者来源的GBM和肉瘤生物样本进行药物筛选^[99]。

生物材料的化学修饰方法也被引入该类系统。利用微流控液滴技术实现了海藻酸微珠中小鼠乳腺癌类器官的高通量制备。用阿霉素和拉春库林A处理乳腺肿瘤类器官,以评估其作为药物筛选平台的应用^[100]。在高通量筛选系统中,标准化、完全定义的基质ECM材料是未来的发展方向。有研究利用甲基丙烯酸化透明质酸(hyaluronic acid Methacryloyl, HAMA)、海藻酸钠(sodium alginate, SA)、甲基丙烯酰胺多巴胺(methacrylamide dopamine, DMA)和c-RGDFC设计了一种易于获取、化学成分明确、生物相容性良好的双网络水凝胶,用于肝癌类器官培养。体外药效实验表明,HepG2细胞系来源的肝癌类器官相较于2D培养物具有更高的半数抑制浓度(IC₅₀)值,表明其具有更强的耐药性^[101]。另有研究使用整合素特异性胶原水凝胶调节细胞黏附受体,可通过Src/PI3K/YAP信号通路调控炎症驱动的血管生成,筛选出一种新型的整合素 $\alpha v \beta 3$ 和细胞因子受体TGF- β -R1双重阻断剂。该阻断剂可通过同时靶向巨噬细胞相关免疫抑制、内皮细胞-巨噬细胞相互作用以及改变的ECM来抑制GBM的新生血管形成^[105]。

新设备的开发可大大提高肿瘤类器官药物测试的效率,甚至改变传统的筛选思路。“平板上的肿瘤类器官”(ToP)装置是一种创新的开放表面微流体平台,能够在复杂的ECM包埋肿瘤类器官上,以单一和二元治疗设置筛选替莫唑胺和铁螯合剂等化疗药物,以评估它们对GBM和胰腺导管癌模型活力及凋亡的毒性^[106]。另一个团队开发了一种自动化的类器官点样器并将其集成到高通量柱上类器官(high-TOP)药物筛选平台。该系统可与多种ECM兼容,包括BME提取物、基质胶、胶原蛋白和水凝胶。该团队还展示了high-TOP辅助体外药物实验的案例以及卵巢癌患者临床化疗反应相关临床可行性的概念验证案例^[107]。WASSON等^[108]开发了一种能用于检测结直肠癌肝转移患者来源的类器官对化疗药物浓度梯度变化响应的多孔可灌注生物反应器。此外,

还有研究通过高通量系统反向筛选水凝胶配方,利用四臂聚乙二醇丙烯酸酯和不同甲基丙烯酸化程度的GelMA制备的微孔阵列,用于控制细胞-ECM相互作用和调节刚度,以此创建一个平台,用于研究不同水凝胶组成和刚度对肿瘤形成的影响^[102]。

5 总结与展望

肿瘤类器官领域最有潜力发展方向将是标准化和规模化的构建,同时进一步模拟体内的真实环境。表1总结了本文中用于模拟肿瘤TME的ECM材料。目前,用于模拟TME的ECM材料在模拟肿瘤类器官-ECM互作中取得显著突破,为个性化定制的工程化肿瘤类器官模型确立坚实的基础。

当前,ECM材料在肿瘤类器官研究领域的应用仍面临诸多瓶颈。与成分复杂的基质胶相比,ECM材料缺少组织ECM所具备的部分生物活性成分^[110]。单一RGD、IKVAV、GFOGER等配体虽然有利于精准调控理化性质,但会导致ECM材料中的类器官克隆形成率低于基质胶,且在模拟复杂细胞外基质信号网络时存在一定局限性,提示研究者需在ECM材料的可控性与生物学功能模拟间寻找平衡点。含天然成分的ECM材料如dECM则面临成分复杂性的挑战,其组成成分的复杂性可能导致实验体系的批次间差异^[111-112]。

标准化的ECM材料在肿瘤类器官模型构建,特别在药物筛选测试与药物敏感性测试中至关重要,为实验结果的可靠性提供保障。然而,当前针对肿瘤类器官培养用ECM材料的制备与质量控制尚未形成统一的标准规范。在此背景下,药品生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)所涵盖的质量体系、生产过程控制、风险评估等核心原则,为ECM材料的标准化制备提供了极具价值的参考框架,有望推动材料从实验室制备向规模化、规范化生产转化,进而助力肿瘤类器官的标准化发展。

类器官技术为体外模拟TME的复杂性提供了全新可能。当前模型已涵盖ECM、CAFs、免疫细胞和内皮细胞等关键组分,但神经细胞、脂肪细胞及微生物群落的整合仍然处于空白研究阶段,有待进一步发展。这需要生物信息技术(单细胞多组学)的生物材料技术(高通量化学合成)的辅助。

从细胞生物学角度出发,如何能开发出模拟TME的ECM材料是肿瘤类器官模型构建的关键。基

质组(matrisome)是指ECM及其相关分子的完整集合,不仅包括了传统意义上的ECM结构蛋白,还涵盖了与ECM相互作用的各类调节因子和附属分子^[113]。基质组概念的提出为理解ECM如何调控细胞行为和组织稳态提供了更全面的观点,也为类器官培养新材料的研发提供了更具整体性的研究视角。未来类器官培养新材料的发展,可能实现从单纯模仿ECM特性,向深入模拟基质组中各组分间及组分与类器官间相互作用的方向演进。

ECM材料的开发为肿瘤类器官工程化提供了关键技术支撑,其通过模拟天然微环境的生化组成与机械特性,有力地推动了肿瘤-微环境互作机制的深入解析,并在药物筛选中凸显优势。从材料学与工程学的交叉视角来看,肿瘤类器官模型构建的核心挑战在于:如何系统化地设计适配性ECM材料以满足模型构建需求。机器学习与人工智能(artificial intelligence, AI)为加速ECM凝胶的设计创新与开发进程提供了全新视角和可行方案。机器学习算法可通过分析大量数据,实现合成ECM凝胶的成分优化、空间结构解析、细胞培养条件微调、活性诱导因子识别及外部刺激效应评估^[114],从而推动类器官构建向高效化、高质量化发展。表2展示了机器学习在生物材料开发中的应用^[109]。很显然,在未来针对肿瘤类器官培养的ECM材料设计中,AI可用于预测不同细胞类型与基质组的相互作用,提高复杂类器官构建的效率,降低规模化、标准化系统的开发成本。

综上所述,未来需深化材料科学、工程学、计算科学与肿瘤生物学等学科的跨学科融合,着力开发标准化、智能化的类器官模型,构建高度仿生的体内肿瘤微环境体系,以此为肿瘤精准医学研究及临床转化筑牢根基。

参考文献 (References)

- [1] PAGET S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889 [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2): 98-101.
- [2] WU T, DAI Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61-8.
- [3] DVORAK H F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing [J]. *N Engl J Med*, 1986, 315(26): 1650-9.
- [4] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent [J]? *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(1): 4-6.
- [5] LENGAGNE R, LE GAL F A, GARCETTE M, et al. Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of

表1 细胞外基质材料在肿瘤类器官中的应用

Table 1 Application of extracellular matrix materials in tumor organoids

主体材料 Main material	功能 Function	细胞种类 Cell type	参考文献 References
Colorectal dECM	Modeling TME	Colorectal cancer organoids	[68,95]
Cholangiocarcinoma dECM	Modeling TME	Cholangiocarcinoma organoids	[69]
Bovine endometrial dECM	Modeling uterine ECM	Endometrial cancer organoids	[70]
PEG-4MAL	Supporting the growth of tumor organoids	Breast cancer/prostate cancer/pancreatic cancer/lymphoma organoids	[74-77]
CLP/NorHA	Supporting tumor cell adhesion, proliferation, and invasion	MCF7/MD-MBA-231 breast cancer cell lines	[78]
Norbornene-functionalized PEG	Modulating material stiffness through photochemical reactions	T47D breast cancer cell line	[80]
Polyethylene glycol-tetrathioctic acid (PEG-4LA)	Modulating material stiffness/simulating the rapid relaxation	Pa03C pancreatic cancer cell line	[81]
Nanofiber/gelatin	Modulating material stiffness	Breast cancer organoids	[83]
GMA/gelatin/hyaluronic acid	Modulating material stiffness through magnetic force	MCF7 breast cancer cell line	[84]
Alginate/gelatin	Modeling TME	MCF7/MD-MBA-231 breast cancer cell lines	[85]
Hyaluronic acid	Modeling TME	MCF-10A/A549/L428 tumor cell lines and patient-derived breast cancer organoids	[86]
GelNB	Modulating material stiffness	CAFs/COLO-357 pancreatic cancer cell line co-culture	[87]
Alginate	Modulating material pore size and porosity	Human monocyte THP-1/MCF-7 breast cancer cell line co-culture	[88]
Fibrin	To construct vascularized tumor models	KM12-SM/HCT116 colorectal cancer cell lines and NHDFs (normal human dermal fibroblasts)/HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) co-culture	[89]
Hyaluronic acid	Co-culture	Huh7 hepatocellular carcinoma cell line/patient-derived hepatocellular carcinoma organoids and HUVECs co-culture	[90]
Alginate/hyaluronic acid/type I collagen	Co-culture	GSCs/GASCs/microglia co-culture	[91]
Hyaluronic acid/gelatin	Co-culture	Colorectal cancer organoids	[92]
Dextran	Co-culture	CAFs/immune cells/HUVECs/H838 lung cancer cell line co-culture	[93]
Human dermal fibroblast dECM	To construct thyroid cancer organoid models	Thyroid cancer organoids derived from SNU790 cell line	[96]
CAFs dECM	Drug sensitivity testing	Patient-derived breast cancer cells	[97]
GelMA	3D bioprinting/drug sensitivity testing	HGC27 gastric cancer cell line/patient-derived gastric cancer cells	[98]
Hyaluronic acid/collagen	3D bioprinting/high-throughput drug screening	HepG2 cell line/patient-derived GBM organoids	[99]
Alginate	High-throughput drug screening	Mouse breast cancer organoids	[100]
HAMA/SA/DMA	Drug sensitivity testing	Liver cancer organoids derived from HepG2 cell line	[101]
4ARM-PEG-DA/GelMA	Modulating material stiffness	HCC1806 breast cancer cell line	[102]

表2 机器学习在生物材料开发中的应用(根据参考文献[109]改编)

Table 2 Applications of machine learning in biomaterial development (adapted from reference [109])

输入参数 Input parameters	输入属性 Input property	输出目标属性 Output target property	输出检测 Output assay	实验次数 No. of experiments	关键结果 Key results
Peptides prepared via ugi reaction of 31 monomers	Chemistry	Formation ability of peptide hydrogels	Hydrogel formation	2 304	Peptide hydrogels; identify top 20 descriptors that determine formation of peptide hydrogels
Polyacrylate from 22 acrylate monomers	Secondary-ion mass ToF-SIMS spectra or 23 molecular descriptors	Cell adhesion behaviors	Colony-formation frequency	496	Adhesion behaviors of human embryoid body cell on polymers; identify the effects of structure units on cell adhesion behaviors
SAMs (self-assembled monolayers)	10 structure descriptors	Protein adsorption	Fibrinogen adsorption	Two datasets: 72 from single lab and 133 from multilab	Fibrinogen adsorption behaviors on polymers; identify the effects of terminal groups on cell adhesion behaviors
Polymath (acrylate) and polymath (acrylamide)	Molecular descriptors	Foreign body response	A composite dependent variable	144 homopolymer for screening and 400 copolymers for machine learning	Foreign body response to polymers; identify the effects of structure units on foreign body response
Polymerization of different acrylates with different amines	Chemistry	Gene delivery to cells	Cell transfection experiments	12 000	Optimized nanoparticles; identify properties that lead to high transfection

- tumor-specific CD8⁺ T cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1496-501.
- [6] BARNETT B, KRYCZEK I, CHENG P, et al. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2005, 54(6): 369-77.
- [7] BENNETT J A, RAO V S, MITCHELL M S. Systemic bacillus Calmette-Guérin (BCG) activates natural suppressor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(10): 5142-4.
- [8] BISWAS S K, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10): 889-96.
- [9] WEN Y A, XING X, HARRIS J W, et al. Adipocytes activate mitochondrial fatty acid oxidation and autophagy to promote tumor growth in colon cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(2): e2593.
- [10] CHEN S H, ZHANG B Y, ZHOU B, et al. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(1): 1-21.
- [11] BEN-DAVID U, HA G, TSENG Y Y, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(11): 1567-75.
- [12] REN X, CHEN W, YANG Q, et al. Patient-derived cancer organoids for drug screening: basic technology and clinical application [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37(8): 1446-54.
- [13] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 407-18.
- [14] KAUR S, KAUR I, RAWAL P, et al. Non-matrigel scaffolds for organoid cultures [J]. *Cancer Lett*, 2021, 504: 58-66.
- [15] ANDERSON N M, SIMON M C. The tumor microenvironment [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(16): R921-5.

- [16] ZHANG H, YUE X, CHEN Z, et al. Define cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the tumor microenvironment: new opportunities in cancer immunotherapy and advances in clinical trials [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 159.
- [17] LAVIE D, BEN-SHMUEL A, EREZ N, et al. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(7): 793-807.
- [18] LIU T, ZHOU L, LI D, et al. Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 60.
- [19] EREZ N, GLANZ S, RAZ Y, et al. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(3): 397-402.
- [20] STRAUSSMAN R, MORIKAWA T, SHEE K, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion [J]. *Nature*, 2012, 487(7408): 500-4.
- [21] ZHANG Z, ZHANG Q, WANG Y. CAF-mediated tumor vascularization: from mechanistic insights to targeted therapies [J]. *Cell Signal*, 2025, 132: 111827.
- [22] KANODA R, NAKAJIMA S, OKAYAMA H, et al. Downregulation of cGAS/STING expression in tumor cells by cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 19234.
- [23] DE VISSER K E, JOYCE J A. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 374-403.
- [24] PENA-ROMERO A C, ORENES-PINERO E. Dual effect of immune cells within tumour microenvironment: pro- and anti-

- tumour effects and their triggers [J]. *Cancers*, 2022, 14(7): 1681.
- [25] DUDLEY A C. Tumor endothelial cells [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(3): a006536.
- [26] WIELAND E, RODRIGUEZ-VITA J, LIEBLER S S, et al. Endothelial Notch1 activity facilitates metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 355-67.
- [27] RODIG N, RYAN T, ALLEN J A, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T cell activation and cytotoxicity [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(11): 3117-26.
- [28] LEONE P, MALERBA E, SUSCA N, et al. Endothelial cells in tumor microenvironment: insights and perspectives [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1367875.
- [29] KADLER K E, BALDOCK C, BELLA J, et al. Collagens at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 12): 1955-8.
- [30] WINKLER J, ABISOYE-OGUNNIYAN A, METCALF K J, et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5120.
- [31] NG M R, BRUGGE J S. A stiff blow from the stroma: collagen crosslinking drives tumor progression [J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(6): 455-7.
- [32] RøMER A M A, THORSETH M L, MADSEN D H. Immune modulatory properties of collagen in cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 791453.
- [33] FOGUER K, BRAGA M D E S, PERON J P, et al. Endostatin gene therapy inhibits intratumoral macrophage M2 polarization [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 79: 102-11.
- [34] ZHANG Q, AN Z Y, JIANG W, et al. Collagen code in tumor microenvironment: functions, molecular mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115390.
- [35] DALTON C J, LEMMON C A. Fibronectin: molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2443.
- [36] HYNES R O. Fibronectins [J]. *Sci Am*, 1986, 254(6): 42-51.
- [37] WANG J, LI R, LI M, et al. Fibronectin and colorectal cancer: signaling pathways and clinical implications [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(4): 313-20.
- [38] KIELTY C M, SHERRATT M J, SHUTTLEWORTH C A. Elastic fibres [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 14): 2817-28.
- [39] WANG Y, SONG E C, RESNICK M B. Elastin in the tumor microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1272: 1-16.
- [40] DURBEEJ M. Laminins [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 339(1): 259-68.
- [41] AUMAILLEY M, BRUCKNER-TUDERMAN L, CARTER W G, et al. A simplified laminin nomenclature [J]. *Matrix Biol*, 2005, 24(5): 326-32.
- [42] QIN Y, RODIN S, SIMONSON O E, et al. Laminins and cancer stem cells: partners in crime [J]? *Semin Cancer Biol*, 2017, 45: 3-12.
- [43] MARINKOVICH M P. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(5): 370-80.
- [44] IACONISI G N, LUNETTI P, GALLO N, et al. Hyaluronic acid: a powerful biomolecule with wide-ranging applications: a comprehensive review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10296.
- [45] TOFUKU K, YOKOUCHI M, MURAYAMA T, et al. HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 175-83.
- [46] YANG T, WITHAM T F, VILLA L, et al. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2583-91.
- [47] PAPPAS A G, MAGKOUTA S, PATERAS I S, et al. Versican modulates tumor-associated macrophage properties to stimulate mesothelioma growth [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(2): e1537427.
- [48] LI N, GAO W, ZHANG Y F, et al. Glypicans as cancer therapeutic targets [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(11): 741-54.
- [49] NAJAFI M, FARHOOD B, MORTEZAEI K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2782-90.
- [50] HUANG J, ZHANG L, WAN D, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 153.
- [51] PROVENZANO P P, KEELY P J. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression [J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 3(4): 347-50.
- [52] PICKUP M W, MOUW J K, WEAVER V M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(12): 1243-53.
- [53] BORDELEAU F, MASON B N, LOLLIS E M, et al. Matrix stiffening promotes a tumor vasculature phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(3): 492-7.
- [54] NETTI P A, BERK D A, SWARTZ M A, et al. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(9): 2497-503.
- [55] QIN X, LÜ X, LI P, et al. Matrix stiffness modulates ILK-mediated YAP activation to control the drug resistance of breast cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(3): 165625.
- [56] WANG S, YUAN X, YANG Z, et al. Matrix stiffness-dependent PD-L2 deficiency improves SMYD3/xCT-mediated ferroptosis and the efficacy of anti-PD-1 in HCC [J]. *J Adv Res*, 2024, 73: 265-82.
- [57] AISENBREY E A, MURPHY W L. Synthetic alternatives to matrigel [J]. *Nat Rev Mater*, 2020, 5(7): 539-51.
- [58] TALBOT N C, CAPERNA T J. Proteome array identification of bioactive soluble proteins/peptides in matrigel: relevance to stem cell responses [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(5): 873-83.
- [59] GILLETTE K M, FORBES K, SEHGAL I. Detection of matrix metalloproteinases (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase-2, urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 within matrigel and growth factor-reduced matrigel basement membrane [J]. *Tumori*, 2003, 89(4): 421-5.
- [60] DEKKERS J F, VAN VLIET E J, SACHS N, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(4): 1936-65.
- [61] FUJII M, SHIMOKAWA M, DATE S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 827-38.
- [62] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2015,

- 160(1/2): 324-38.
- [63] SHI R, RADULOVICH N, NG C, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(5): 1162-74.
- [64] HUGHES C S, POSTOVIT L M, LAJOIE G A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture [J]. *Proteomics*, 2010, 10(9): 1886-90.
- [65] MIYAZAWA A, ITO S, ASANO S, et al. Regulation of PD-L1 expression by matrix stiffness in lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3): 2344-9.
- [66] ZHU L, YUHAN J, YU H, et al. Decellularized extracellular matrix for remodeling bioengineering organoid's microenvironment [J]. *Small*, 2023, 19(25): e2207752.
- [67] VAN TIENDEREN G S, CONBOY J, MUNTZ I, et al. Tumor decellularization reveals proteomic and mechanical characteristics of the extracellular matrix of primary liver cancer [J]. *Biomater Adv*, 2023, 146: 213289.
- [68] VARINELLI L, GUAGLIO M, BRICH S, et al. Decellularized extracellular matrix as scaffold for cancer organoid cultures of colorectal peritoneal metastases [J]. *J Mol Cell Biol*, 2023, 14(11): mjac064.
- [69] VAN TIENDEREN G S, ROSMARK O, LIESHOUT R, et al. Extracellular matrix drives tumor organoids toward desmoplastic matrix deposition and mesenchymal transition [J]. *Acta Biomater*, 2023, 158: 115-31.
- [70] JAMALUDDIN M F B, GHOSH A, INGLE A, et al. Bovine and human endometrium-derived hydrogels support organoid culture from healthy and cancerous tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(44): e2208040119.
- [71] ALVES S M, ZHU T, SHOSTAK A, et al. Studying normal tissue radiation effects using extracellular matrix hydrogels [J]. *J Vis Exp*, 2019(149): 10.3791/59304.
- [72] MA P, CHEN Y, LAI X, et al. The translational application of hydrogel for organoid technology: challenges and future perspectives [J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(10): e2100191.
- [73] CRUZ-ACUNA R, QUIROS M, HUANG S, et al. PEG-4MAL hydrogels for human organoid generation, culture, and *in vivo* delivery [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(9): 2102-19.
- [74] BECK J N, SINGH A, ROTHENBERG A R, et al. The independent roles of mechanical, structural and adhesion characteristics of 3D hydrogels on the regulation of cancer invasion and dissemination [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(37): 9486-95.
- [75] MOSQUERA M J, KIM S, BAREJA R, et al. Extracellular matrix in synthetic hydrogel-based prostate cancer organoids regulate therapeutic response to EZH2 and DRD2 inhibitors [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(2): e2100096.
- [76] TIAN Y F, AHN H, SCHNEIDER R S, et al. Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells [J]. *Biomaterials*, 2015, 73: 110-9.
- [77] BELOW C R, KELLY J, BROWN A, et al. A microenvironment-inspired synthetic three-dimensional model for pancreatic ductal adenocarcinoma organoids [J]. *Nat Mater*, 2022, 21(1): 110-9.
- [78] NEMEC S, GANDA S, AL TAIEF K, et al. A tunable tumor microenvironment through recombinant bacterial collagen-hyaluronic acid hydrogels [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5(10): 4581-8.
- [79] BURDICK J A, MURPHY W L. Moving from static to dynamic complexity in hydrogel design [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1269.
- [80] WILEY K L, SUTHERLAND B P, OGUNNAIKE B A, et al. Rational design of hydrogel networks with dynamic mechanical properties to mimic matrix remodeling [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(7): e2101947.
- [81] KHINE Y Y, NGUYEN H, AFOLABI F, et al. Fast-relaxing hydrogels with reversibly tunable mechanics for dynamic cancer cell culture [J]. *Biomater Adv*, 2024, 159: 213829.
- [82] CASTELLOTE-BORRELL M, MERLINA F, RODRIGUEZ A R, et al. Biohybrid hydrogels for tumoroid culture [J]. *Adv Biol*, 2023, 7(12): e2300118.
- [83] PRINCE E, CRUICKSHANK J, BA-ALAWI W, et al. Biomimetic hydrogel supports initiation and growth of patient-derived breast tumor organoids [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1466.
- [84] SHOU Y, TEO X Y, LI X, et al. Dynamic magneto-softening of 3D hydrogel reverses malignant transformation of cancer cells and enhances drug efficacy [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(3): 2851-67.
- [85] SHAH L, LATIF A, WILLIAMS K J, et al. Role of stiffness and physico-chemical properties of tumour microenvironment on breast cancer cell stemness [J]. *Acta Biomater*, 2022, 152: 273-89.
- [86] BAKER A E G, BAHLMANN L C, XUE C, et al. Chemically and mechanically defined hyaluronan hydrogels emulate the extracellular matrix for unbiased *in vivo* and *in vitro* organoid formation and drug testing in cancer [J]. *Materials Today*, 2022, 56: 96-113.
- [87] NGUYEN H D, LIN C C. Viscoelastic stiffening of gelatin hydrogels for dynamic culture of pancreatic cancer spheroids [J]. *Acta Biomater*, 2024, 177: 203-15.
- [88] XU N Y, LI J, WANG M L, et al. Fabrication of a coculture organoid model in the biomimetic matrix of alginate to investigate breast cancer progression in a TAMs-leading immune microenvironment [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(9): 11275-88.
- [89] YANAGISAWA K, KONNO M, LIU H, et al. A four-dimensional organoid system to visualize cancer cell vascular invasion [J]. *Biology*, 2020, 9(11): 361.
- [90] LIM J T C, KWANG L G, HO N C W, et al. Hepatocellular carcinoma organoid co-cultures mimic angiocrine crosstalk to generate inflammatory tumor microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2022, 284: 121527.
- [91] HERMIDA M A, KUMAR J D, SCHWARZ D, et al. Three dimensional *in vitro* models of cancer: bioprinting multilineage glioblastoma models [J]. *Adv Biol Regul*, 2020, 75: 100658.
- [92] LUO X, FONG E L S, ZHU C, et al. Hydrogel-based colorectal cancer organoid co-culture models [J]. *Acta Biomater*, 2021, 132: 461-72.
- [93] KUEHLBACH C, HENSLER S, MUELLER M M. Recapitulating the angiogenic switch in a hydrogel-based 3D *in vitro* tumor-stroma model [J]. *Bioengineering*, 2021, 8(11): 186.
- [94] VAES N, SCHONKEREN S L, RADEMAKERS G, et al. Loss of enteric neuronal Ndr4 promotes colorectal cancer via increased release of Nid1 and Fbln2 [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(6): e51913.
- [95] NAM Y, CHA E, KWAK S M, et al. Harnessing decellularized extracellular matrix for enhanced fidelity in colorectal cancer organoid and cell-derived xenograft models [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2024, 34(8): 1711-7.
- [96] YOO M H, KIM Y, LEE B S. Thyroid cancer risk associated with

- perfluoroalkyl carboxylate exposure: assessment using a human dermal fibroblast-derived extracellular matrix-based thyroid cancer organoid [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 479: 135771.
- [97] NAYAK B, BALACHANDER G M, MANJUNATH S, et al. Tissue mimetic 3D scaffold for breast tumor-derived organoid culture toward personalized chemotherapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 180: 334-43.
- [98] JU M, JIN Z, YU X, et al. Gastric cancer models developed via gelma 3D bioprinting accurately mimic cancer hallmarks, tumor microenvironment features, and drug responses [J]. *Small*, 2025, 21(8): e2409321.
- [99] MALONEY E, CLARK C, SIVAKUMAR H, et al. Immersion bioprinting of tumor organoids in multi-well plates for increasing chemotherapy screening throughput [J]. *Micromachines*, 2020, 11(2): 208.
- [100] FANG G, LU H, RODRIGUEZ DE LA FUENTE L, et al. Mammary tumor organoid culture in non-adhesive alginate for luminal mechanics and high-throughput drug screening [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(21): e2102418.
- [101] ZHAO Y, GONG J, LIU H, et al. A chemically defined, mechanically tunable, and bioactive hyaluronic acid/alginate double-network hydrogel for liver cancer organoid construction [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282(Pt 2): 136707.
- [102] CASEY J, YUE X, NGUYEN T D, et al. 3D hydrogel-based microwell arrays as a tumor microenvironment model to study breast cancer growth [J]. *Biomed Mater*, 2017, 12(2): 025009.
- [103] LIU Q, ZHAO T, WANG X, et al. *In situ* vitrification of lung cancer organoids on a microwell array [J]. *Micromachines*, 2021, 12(6): 624.
- [104] ZOU Z, LIN Z, WU C, et al. Micro-engineered organoid-on-a-chip based on mesenchymal stromal cells to predict immunotherapy responses of HCC patients [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(27): e2302640.
- [105] CUI X, MORALES R T T, QIAN W, et al. Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2018, 161: 164-78.
- [106] SEYFOORI A, LIU K, CARUNCHO H J, et al. Tumoroid-on-a-plate (ToP): physiologically relevant cancer model generation and therapeutic screening [J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(1): e2402060.
- [107] JUN H R, KANG H J, JU S H, et al. High-throughput organoid-on-pillar (high-TOP) array system for three-dimensional *ex vivo* drug testing [J]. *Biomaterials*, 2023, 296: 122087.
- [108] WASSON E M, HE W, AHLQUIST J, et al. A perfused multi-well bioreactor platform to assess tumor organoid response to a chemotherapeutic gradient [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1193430.
- [109] SUWARDI A, WANG F, XUE K, et al. Machine learning-driven biomaterials evolution [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(1): e2102703.
- [110] CRUZ-ACUNA R, QUIROS M, FARKAS A E, et al. Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(11): 1326-35.
- [111] GIOBBE G G, CROWLEY C, LUNI C, et al. Extracellular matrix hydrogel derived from decellularized tissues enables endodermal organoid culture [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5658.
- [112] KOZLOWSKI M T, CROOK C J, KU H T. Towards organoid culture without Matrigel [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1387.
- [113] HYNES R O, NABA A. Overview of the matrisome: an inventory of extracellular matrix constituents and functions [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(1): a004903.
- [114] BAI L, WU Y, LI G, et al. AI-enabled organoids: construction, analysis, and application [J]. *Bioact Mater*, 2024, 31: 525-48.