



顾奇, 博士生导师, 中国科学院动物研究所研究员, 中国科学院大学前沿交叉科学学院生物中心主任、生物医学工程教研室副主任, 北京干细胞与再生医学研究院双聘研究员。致力于干细胞特异材料及3D打印平台开发并结合多技术体系再造复杂组织器官功能系统。主持多项科研项目, 主要是中国科学院A类先导“器官重建与制造”中生物墨水和打印装置方向负责人, 科技部前沿生物技术重点专项负责人, 科技部战略性国际科技创新合作重点专项负责人, 中国科学院院装备项目负责人等。获基金委优青资助, 当选2022年中国干细胞学会卓越青年研究员, 获2023年澳中科学研发杰出校友奖, 2025年被选为英国皇家化学会会士(FRSC)等。担任*Bioact Mater*、*Biofabrication*、*BMEMat*、*Cell Proliferat*等杂志编委, 以及中国机械工程学会生物制造分会、中国生物材料学会先进制造分会等学会(常务)委员。

<http://www.gulab.info/>

生物3D打印复杂类器官

张隽^{1, 2, 3} 顾奇^{1, 2, 3, 4*}

(¹中国科学院动物研究所, 器官再生与智造全国重点实验室, 人类器官生理病理模拟装置(HOPE), 北京 100101;

²北京干细胞与再生医学研究院, 北京 100101; ³东北农业大学生命科学学院, 黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 哈尔滨 150038; ⁴中国科学院大学, 北京 101408)

摘要 类器官(organoids)作为干细胞自组装形成的三维(3D)微组织模型, 被认为是未来生物医药领域的前沿工具。现有类器官仍面临结构简单、功能成熟度不足、异质性高等问题。生物3D打印技术能够实现细胞及生物材料的特定空间位置排布, 为复杂类器官构建提供了可能。该文综述了生物3D打印类器官的技术发展, 聚焦了打印策略创新、智能生物墨水设计, 并结合发育生物学提出了微环境的精确构建策略。最后, 展望了类器官生物3D打印技术在组织工程领域的广阔应用前景。

关键词 类器官; 生物3D打印; 生物墨水; 组织工程

3D Bioprinting of Complex Organoids

ZHANG Juan^{1, 2, 3}, GU Qi^{1, 2, 3, 4*}

(¹Human Organ Physiopathology Emulation System, State Key Laboratory of Organ Regeneration and Reconstruction, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²Beijing Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing 100101, China; ³Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150038, China;

⁴University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

收稿日期: 2025-07-13 接受日期: 2025-08-27

国家重点研发计划(批准号: 2025YFC3408800)、中国科学院动物研究所建制化攻关项目(批准号: 2023IOZ0101)和中国科学院青年基础科研项目(批准号: YSBR-012)资助的课题

*通信作者。Tel: 010-64804551, E-mail: qgu@ioz.ac.cn

Received: July 13, 2025 Accepted: August 27, 2025

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2025YFC3408800), the Initiative Scientific Research Program of Institute of Zoology (Grant No.2023IOZ0101) and the CAS Project for Young Scientists in Basic Research (Grant No.YSBR-012)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64804551, E-mail: qgu@ioz.ac.cn

Abstract Organoids, 3D (three-dimensional) microtissue models formed through the self-organization of stem cells, are regarded as a frontier tool in biomedical research. However, current organoids still face limitations such as restricted structural complexity, insufficient functional maturity, and high heterogeneity. Bioprinting technologies enable precise spatial arrangement of cells and biomaterials, offering new strategies for constructing complex organoids. This review summarizes recent advances in organoid bioprinting, with a focus on innovations in printing strategies and the design of intelligent bioinks, and further proposes approaches for precise microenvironment construction based on developmental biology. Finally, the potential applications and future directions of bioprinted organoids in tissue engineering and related fields are discussed.

Keywords organoids; 3D bioprinting; bioinks; tissue engineering

目前,全球数十万人在等待如肾脏、心脏和肝脏等关键器官的捐赠,以挽救生命。然而,器官供给严重不足,亟需新的解决方案。生物3D打印被认为能够突破传统器官来源限制,体外构建定制化功能器官,为再生医学开辟新途径。然而目前生物3D打印仍处于发展阶段,尚未能构建出具有稳定生理功能的复杂器官。生物3D打印和3D打印原理相似,能够通过计算机控制成形路线,体外构建出仿生器官的结构;但目前大尺寸器官打印仍面临显著挑战,主要包括所需细胞量极大以及内部精细结构(如血管化、神经化)难以实现等问题。生物墨水的开发应用、血管神经网络的构建以及功能化的实现是生物3D打印最重要的3个部分^[1]。类器官是在体外利用干细胞或器官特异性祖细胞,通过3D培养技术诱导其自组织形成的微型、简化但保留关键生理结构和功能的器官模型。然而,类器官在自组织过程中通常表现出较高的自发性和不可控性,导致其内部功能单元的空间分布与功能整合缺乏可预测性与精确度,难以实现按需定向发育。采用生物3D打印技术,以类器官作为标准化构建单元进行空间有序组装,能够实现大尺寸组织结构与生理功能的精确控制。该策略不仅有助于建立更可靠的药物筛选与疾病模型,也将显著推进功能性器官的体外构建研究。

类器官生物3D打印技术旨在将类器官自组织所形成的细胞尺寸图案化能力,与生物打印所提供的大尺寸几何构建能力相结合,从而在维持内部精细结构的前提下,实现可重复、标准化的大尺寸组织构建。基于此,本文系统综述类器官生物3D打印的关键技术路径、生物墨水设计策略,以促进具有复杂结构与生理功能的类器官模型的制备。最后,本文还将总结该领域当前存在的主要技术挑战,并展望其未来发展方向。

1 类器官生物3D打印技术

类器官生物3D打印技术是一种融合类器官技术与生物3D打印的创新性生物制造策略。该技术以类器官作为生物构建单元,并采用高精度生物打印工艺(如挤出式、光固化及拾取式打印等)实现其在3D空间中的可控排布与组装,从而构建出兼具复杂结构、功能成熟度及生理相关性的大尺寸组织模型。该技术的核心在于结合“自上而下”(top-down)的打印制造策略,实现对宏观几何结构的精确控制,并利用“自下而上”(bottom-up)的类器官自组织能力,促进细胞间相互作用及微环境的功能化重建,最终在形态仿真的基础上进一步实现功能成熟(即从“形似”到“神似”)。类器官生物3D打印不仅显著提升了体外构建组织的尺度与复杂性,也为器官再生医学、疾病建模及药物筛选等领域提供了更具生理功能的研究平台。

从技术分类角度来看,生物3D打印可依据材料沉积与固化机制分为四类:挤出式打印、液滴式打印、光固化打印及激光辅助打印。其核心目标在于实现结构的高精度成型(“形似”),关键性能参数包括打印分辨率、机械强度与细胞存活率。而类器官生物3D打印则在传统生物打印分类基础上,进一步拓展出适用于类器官操作的拾取式打印等策略^[2-3]。该类技术的核心目标是在结构仿真的基础上推动组织功能成熟(“神似”),其主要评价指标包括细胞自组织能力、微环境模拟度及功能性指标(如血管化、神经化等)。因此,类器官生物3D打印可视为生物制造与自组织工程原理的结合:类器官依赖生物打印实现可控的初始结构构建,而生物打印则通过引入类器官单元获得内在自组织潜能,从而实现对复杂生物功能的模拟,推动体外组织模型向真实器官生理状态迈进。

1.1 挤出式生物打印

挤出式生物打印是一种基于机械挤压原理的生物制造技术,通过压力驱动将生物墨水从喷嘴连续挤出,并沿预设数字路径进行沉积,逐层组装为3D结构。该技术可用于多种类器官的构建,既能够以单细胞为单元进行打印,也可以直接操作预形成的类器官聚集体。在单细胞打印模式下,细胞密度可达到 $10^8/\text{mL}$,高细胞密度是促进类器官自组织、成熟及功能化的重要条件。在类器官单元打印中,主要分为直接打印和嵌入式打印两种策略^[4]。直接打印将类器官悬浮于生物墨水中,于空气中直接完成沉积,适用于连续、规模化生产;而嵌入式打印则将类器官沉积于一种支撑浴(通常为屈服应力水凝胶)内部,该介质可提供物理支撑并限制结构塌陷,从而实现复杂3D结构的构建。此外,嵌入式打印还可拓展至多材料打印策略,例如以类器官团块作为支撑浴,并使用牺牲材料打印内部通道结构,以模拟血管网络并促进营养物质传输与代谢废物排除^[4-5]。尽管挤出式打印具有设备简单、材料适应性广和结构灵活度高等优势,但其过程中产生的剪切力可能损伤细胞活性,仍是该技术面临的主要挑战。通过优化喷嘴、打印参数(如压力与速度)以及集成温控与无菌环境维持系统,可显著减轻机械应力对细胞的影响,从而提高打印后细胞存活率与类器官功能。

1.2 拾取式生物打印

拾取式生物打印能够对预形成的类器官或细胞球状体进行高精度空间操纵,实现对位置与排列方式的精确控制,从而支持组织结构的个性化构建。该技术尤其适用于模拟多器官相互作用及复杂生理功能,例如构建集成多种类器官的复合模型或人体器官芯片系统,为药物筛选与疾病机制研究提供高度仿生的体外模型。早期拾取式打印是以Kenzan为代表,属于一种无支架生物制造技术;其核心机制是利用微针阵列固定细胞球状体,引导其在3D空间中自组装并融合为复杂组织结构。尽管该技术可实现较高的空间排布精度,但其穿刺操作、微针滞留及后续拔除步骤可能会引起机械损伤、局部细胞坏死及微结构破坏。此类损伤机制不同于挤出式打印中的剪切应力作用,主要来源于物理穿刺与细胞膜结构的直接介入,因此需通过优化微针形貌(如尖端锐度、表面改性)、操控策略及培养过程中的力学微环境以减轻其不利效应^[6]。

1.3 液滴式生物打印

液滴式生物打印是一种基于离散单元沉积的生物制造技术,其通过将含有细胞或生物材料的溶液形成微米级液滴,并借助高精度控制系统驱动液滴喷射与定位,逐层堆叠形成三维结构;该技术主要包括喷墨式打印、声学驱动打印及微阀控制打印等实现方式。该技术凭借其在微观尺度上对细胞和材料空间分布的高分辨操控能力,展现出较高的成型灵活性与对复杂结构的良好控制能力,适用于构建具有精细内部微结构或异质细胞排列的类器官模型^[7]。该技术尤其适用于模拟高度有序的生理系统,例如在神经类器官的构件中,液滴式打印能够精确排布不同类型的神经细胞与支持细胞,仿生模拟大脑皮层结构或神经网络拓扑,为研究神经发育与疾病机制提供高度模拟生理环境的体外模型^[8]。

1.4 光固化生物打印

光固化生物打印的核心原理是利用特定波长光(通常为紫外光或蓝光)对液态光敏生物材料进行区域选择性照射,引发光聚合反应,使材料发生液-固相转变,从而实现逐层累加成型。该技术体系通常由盛装液态光敏树脂的料槽与精准调控的光源系统组成,主要涵盖立体光刻(stereolithography, SLA)、数字光处理(digital light processing, DLP)及新兴的体积打印等技术^[9-10]。

1.4.1 立体光刻 立体光刻是指利用紫外线或其他特定波长光源逐层扫描并选择性固化光敏生物材料,从而构建三维结构。该技术具备较高的打印分辨率与广泛的材料适应性,能够实现对复杂结构的精确控制,适用于制造具有精细微观特征的高精度类器官支架或模型^[11-12]。在硬组织类器官(如骨骼、牙齿)的构建中,立体光刻技术能够提供高度匹配的几何结构和力学支撑环境,展现出重要的应用潜力。

1.4.2 数字光处理 数字光处理技术同样基于光固化原理逐层构建3D结构,但其利用数字微镜装置对光场进行图案化调控,可实现整层图像的同步曝光,从而显著提升打印效率,尤其适用于具有复杂结构的快速成型。该技术能够通过调控光强与曝光时间,在一定程度上控制生物材料的交联密度和细胞的空间分布;其非接触式的加工特性避免了机械应力损伤,有助于维持较高的细胞存活率,因此在骨、关节等硬组织类器官的构建中表现出良好适用性^[13-14]。

例如,苏佳灿教授团队^[15]采用数字光处理技术成功制备了具有仿生微结构的骨类器官,实现了骨组织微结构的精细复制,打印精度可达50 μm 。

1.4.3 体积式生物打印 体积式生物打印技术是一种新兴的增材制造技术,其通过从多个角度对容纳光敏生物墨水的旋转容器进行动态光场投影,使光敏材料在三维空间内一次性整体固化成型,从而实现复杂类器官结构的快速制备与高细胞活性构建。该技术摒弃了传统的逐层堆积方式,显著缩短了打印时间,并能够实现传统方法难以制造的复杂内部拓扑结构(如悬空、迂曲通道等)^[16]。体积式生物打印特别适用于构建具有高度仿生血管网络及精细微结构的类器官模型,例如心脏类器官与肝类器官,可更真实地模拟体内组织的复杂生理微环境^[17]。在光固化生物打印技术体系中,立体光刻(SLA)和数字光处理(DLP)是实现体积打印所依赖的具体技术。

1.5 磁辅助生物打印

磁辅助生物打印是一种利用外部磁场对磁性复合生物墨水进行空间操纵的生物制造技术。该技术通过在生物墨水中掺入磁性纳米颗粒,借助磁场作用力实现细胞和材料的远程、非接触式精准定位与成型。该非接触特性有效避免了传统打印中因喷嘴剪切或物理穿刺所引起的细胞机械损伤,同时磁场还可进一步调控细胞行为,增强细胞间相互作用与组织形成能力^[18]。该技术尤其适用于构建高度有序的一类器官模型,例如需定向排列的神经类器官与肌肉类器官。研究表明,磁化金纳米颗粒可作为促组织组装的人造调控因子,显著促进复杂脑类器官中神经网络的结构成熟^[19]。

1.6 抽吸辅助生物打印

抽吸辅助生物打印是一种通过负压调控实现生物材料精确沉积的技术。其在打印过程中利用抽吸作用在喷嘴处形成并稳定控制生物墨水的液滴或细丝形态,从而实现细胞和高灵敏生物材料的高分辨率成型。该技术可在较低喷射压力下完成打印,显著减少细胞所受的机械应力及材料的结构变形,适用于脆弱细胞类型的打印和复杂三维结构的构建^[20]。在类器官制造中,抽吸辅助生物打印特别适用于构建多细胞类型共存、细胞外基质组成复杂的类器官模型,其温和的打印条件能够更好地维持细胞活性、功能表达及细胞间相互作用,为高度仿生的体外组织模型提供可靠制备手段^[21]。

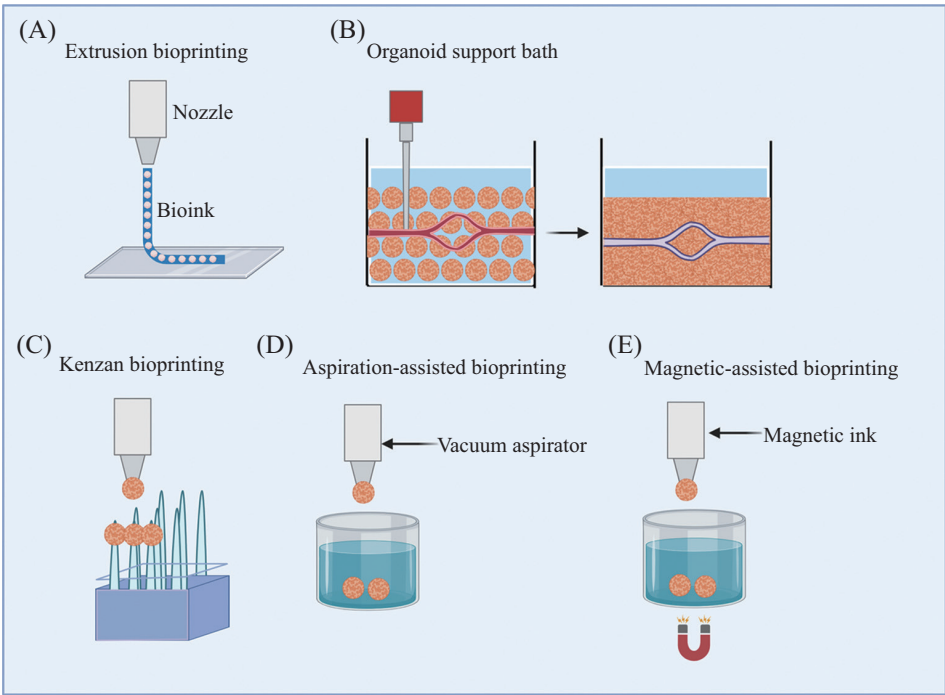
1.7 激光辅助式生物打印

激光辅助式生物打印是一种基于激光能量引导的高精度、非接触式生物制造技术。该技术通过激光脉冲作用于生物墨水供体层,诱导产生瞬时压力,从而将包含细胞与生物材料的微液滴精准转移到目标基底,实现复杂组织结构的无损构建^[22]。其核心优势在于无喷嘴打印机制,彻底避免了因喷嘴孔径限制导致的堵塞问题,以及挤出或喷墨过程中高剪切力对细胞造成的损伤。该技术特别适用于要求极高细胞活性与空间精度的应用场景,例如,可用于精准打印内皮细胞以构建仿生微血管网络,或逐层沉积角质形成细胞与成纤维细胞,形成结构高度仿生的皮肤类器官模型^[23]。

总体而言,现有类器官生物打印技术呈现互补协同的发展态势:挤出式打印通用性强,支持高细胞密度打印和复杂支撑浴嵌入式成型,但仍需应对剪切力引起的细胞损伤问题;拾取式打印(如Kenzan技术)能高精度操纵预组装类器官单元,但其穿刺操作可能带来机械损伤与结构完整性挑战;液滴式打印(喷墨、声学等)具备出色的打印分辨率,尤其适用于神经组织等精细微结构的构建;光固化技术(SLA、DLP、体积式)在打印精度与速度方面优势显著,其中体积式打印更可实现复杂血管网络等结构的整体一次成型;磁辅助与抽吸辅助打印以非接触、低损伤的方式实现了对细胞的高效操控;激光辅助打印凭借无喷嘴、高精度的特性,在微血管网络和多层次皮肤类器官构建中展现出重要潜力(图1和表1)。这些技术各具特色,共同推动复杂类器官在结构仿生性功能成熟度方面的发展。

2 生物墨水

类器官生物3D打印所使用的生物墨水是一种由活细胞、生物活性分子与生物相容性材料共同构成的功能性复合打印体系。作为类器官构建过程中的关键组成部分,生物墨水的理化性质及生物学特性直接影响打印后细胞的存活状态、空间分布以及最终类器官的结构成熟与功能表达^[27]。目前大多数生物墨水以水凝胶为主要基质,这类具有3D网络结构的亲水性高分子材料可高度模拟天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的力学与化学微环境,为大量活细胞(通常达百万至千万级别)以及各类调控细胞行为(如黏附、增殖、定向分化)的生物活性因



A: 挤出式生物打印; B: 类器官支撑浴; C: Kenzan生物打印; D: 抽吸辅助生物打印; E: 磁辅助生物打印。
A: extrusion bioprinting; B: organoid support bath; C: Kenzan bioprinting; D: aspiration-assisted bioprinting; E: magnetic-assisted bioprinting.
图1 类器官生物3D打印常用技术(通过bioRender.com绘制)

Fig.1 Common 3D bioprinting techniques of organoids (created with bioRender.com)

表1 类器官生物3D打印技术比较(根据参考文献[24-26]修改)					
Table 1 Comparison of 3D bioprinting technologies for organoids (modified from references [24-26])					
技术类型 Technological types	打印精度 Printing resolution	细胞存活率 Cell viability	打印速度 Printing speed	典型生物墨水 Typical bioinks	典型应用 Typical applications
Extrusion bioprinting	100-500 μm	70%-90%	Slow	Collagen, gelatin, alginate, matrigel	Intestinal organoids, tumor models
Vat photopolymerization bioprinting	25-100 μm	75%-95%	Medium high	GelMA, PEGDA, HAMA	Vascularized organ-on-a-chip, cerebral cortex models
Volume bioprinting	<100 μm	≥95%	Ultra high	Visible light-crosslinkable hydrogels	High-throughput tumor organoids, personalized drug screening models
Pick-and-place bioprinting	Single cell-200 μm	80%-95%	Very slow	Pre-formed cell spheroids, organoid modules	Organ-on-a-chip Multi-tissue interaction models
Droplet-based bioprinting	20-100 μm	85%-95%	Medium high	Low-viscosity hydrogels	Neural organoids, fine structures
Magnetic-assisted bioprinting	50-200 μm	>95%	Slow (assembly speed)	Bioinks blended with magnetic nanoparticles	Neural/muscle organoids (aligned structures)
Laser-assisted bioprinting	10-50 μm	>95%	Slow	Various viscosity bioinks, high cell density bioinks	Vascular networks, skin models, cancer models

子提供载体和支持。根据构建目标的复杂度差异，生物墨水可仅负载单一细胞类型，也可复合多种细胞以模拟体内真实组织的异质性与相互作用，从而实现更接近生理状态的功能化类器官的构建。因此，在类器官生物打印中，生物墨水的合理设计必须综合考虑目标组织的生物学特性与所选用打印工艺的适配性^[28]。下文将基于组成成分，从活细胞墨水和生物材料墨水两个维度对生物墨水作系统阐述。

2.1 活细胞

在生物3D打印中,作为构建单元的生物材料经历了从简单到复杂的渐进发展,主要可分为三个层次:单细胞、细胞团簇和类器官。单细胞打印能够精确沉积一种或多种类型的细胞,通过可控组装形成多细胞结构;细胞团簇打印则进一步提升了初始细胞密度,有利于细胞间相互作用的建立;类器官打印涵盖了三种构建策略:使用可自组织成类器官的单细胞、直接打印预生成的单个类器官以及将多个类器官打印并融合为更大尺度的结构(图2)。值得注意的是,单个类器官在尺度和细胞组成复杂性上与细胞团簇有相似之处,但其已具备更显著的极化、腔室化等类器官特异性结构特征^[24]。

2.1.1 单细胞 类器官生物3D打印中常用的单细胞类型主要包括以下三类。第一类是成体干细胞(adult stem cells, ASCs),这类细胞位于已分化组织中,具有自我更新及定向分化为特定谱系的能力,适用于研究组织稳态、再生过程及成人疾病机制。例如, LGR5⁺肠道干细胞可用于构建具有绒毛-隐窝结构的肠道类器官^[29]。第二类是多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs),涵盖胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),因其具有分化为三胚层所有细胞类型的潜能,被广泛用于模拟胚胎发育或构建复杂多细胞类器官。然而,目前多能干细胞定向分化的效率与纯度仍是技术挑战之一^[30]。第三类为原代细胞,即直接从健康或疾病组织中分离获得的细胞,该类细胞有助于建立个性化疾病模型,例如患者来源的肿瘤类器官,在精准医疗和药物筛选领域显示出重要应用价值。需特别指出的是,在以单细胞为起点的类器官打印中,通常要求较高的细胞打印密度(推荐达到 $10^8/\text{mL}$),以促进细胞间近距离相互作用,从而有效启动自组装并支持类器官的形成与成熟^[31]。

2.1.2 单个类器官 在打印单个类器官时,需要根据研究目标谨慎选择类器官的发育阶段作为打印单元,既是使用处于形成初期的类器官雏形,还是已具备特定功能的成熟类器官。这一选择对后续类器官的存活、融合及功能表达至关重要。同时,为满足打印工艺要求,必须保证所用类器官在形态、尺寸及力学性质上具备较高的一致性。尤其是在采用挤压式打印等高密度沉积策略时,需精确调整打印参

数以适应类器官的刚度、表面张力等物理特征,避免因机械挤压导致结构损伤或功能丧失^[32]。为规避打印过程中对单个类器官的物理损伤,另一种策略是先将大量类器官单元离心聚集并预培养形成更大尺度的类器官组装体,再进行打印操作。该类操作常需配合使用牺牲材料作为临时支撑浴,通过打印形成内部通道网络,从而保障营养物质的有效传输与代谢废物的排出。

2.1.3 融合类器官 融合类器官是指将两个或更多类器官在三维空间中进行可控组装与集成,以形成结构更复杂、功能更完备的复合类器官体系。该类器官构建策略对打印过程中的多项参数有较高要求,例如需精确控制各类器官单元的细胞数量、空间排布方向以及接触界面形态,从而促进类器官间的有效融合与功能整合。为实现这一目标,常将微流控技术与3D打印相结合,利用微流控芯片精准操控类器官的相对位置与微环境,再通过打印实现稳定三维构建,从而生成具有多组织相互作用特征的复杂类器官模型。典型应用实例如将神经类器官与内皮类器官融合,以研究神经-血管耦合机制^[33];或将肿瘤类器官与正常组织类器官共构建,用于模拟肿瘤侵袭及微环境互作等病理过程。该类融合模型为研究多组织界面生物学、器官间通信及疾病机制提供了高度仿生的体外平台。

2.2 生物材料

在类器官生物3D打印中,生物材料不仅为细胞提供物理支撑,更积极参与调控细胞行为,其设计需协同考虑打印适用性与生物学功能(表2)。最初的生物材料主要是基于天然生物材料,如海藻酸盐、胶原蛋白、明胶、透明质酸和壳聚糖等。海藻酸盐具有较强的化学交联能力,可为细胞提供稳定的三维生长环境,常与明胶复合用于挤出打印^[34]。胶原蛋白作为细胞外基质的主要成分,能够有效促进细胞黏附、增殖和分化,但其机械强度较低,通常需与海藻酸盐或透明质酸混合使用以提高打印性能^[35]。明胶是胶原蛋白部分水解后得到的热可逆大分子水凝胶,其交联强度可随溶液浓度调节^[36]。

为进一步改善材料性能,一系列化学改性天然材料被开发出来。例如,甲基丙烯酰化明胶(GelMA)通过引入光敏基团实现光控交联,其力学性能可通过材料浓度和光照条件精确调控^[37-38]。透明质酸广泛用于软骨和皮肤组织工程,经降冰片烯功能化

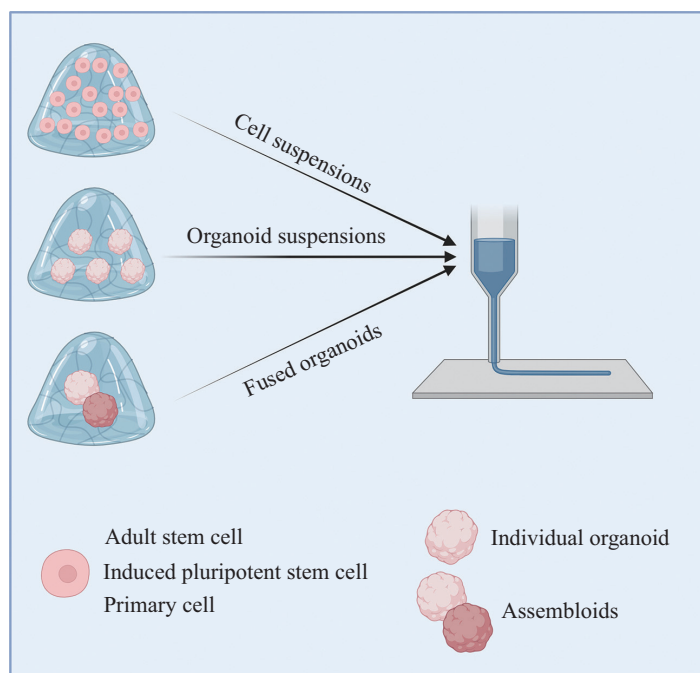


图2 生物3D打印类器官的活体材料(通过bioRender.com绘制)

Fig.2 Living materials for 3D bioprinting of organoids (created with bioRender.com)

(NorHA)后可显著提高机械强度^[39]。壳聚糖是甲壳素脱乙酰化产物, 具有较强力学性能, 但其溶解性和凝胶化能力较差^[40]。Matrigel虽广泛用于器官培养, 但由于其成分不明确、批次差异性大, 实验可重复性常受限制^[41]。

在天然材料基础上发展出的合成生物材料, 如聚己内酯、聚乙二醇及其衍生物(如PEGDA)、普朗尼克等, 因其可定制的物理化学性质也被广泛应用于生物3D打印^[3,9]。天然与合成材料的复合策略可有效整合两类材料的优势, 例如GelMA与PEGDA复合水凝胶既保留了良好的生物相容性与细胞黏附性, 也显著增强了力学稳定性和打印成型能力, 适用于多种类器官的构建^[2]。

此外, 天然水凝胶与无机材料的复合在硬组织类器官打印中表现出重要价值。例如海藻酸盐/羟基磷灰石复合水凝胶可模拟骨组织微环境, 不仅提供矿物成分和力学支撑, 也促进成骨细胞定向分化^[15]。多种天然水凝胶的复合(如明胶-透明质酸体系)则可综合优化生物活性与流变特性, 为皮肤、软骨等类器官提供高度仿生的生长微环境。

当前生物墨水设计日益注重功能仿生与智能调控。例如, 上海大学团队开发的骨仿生墨水由GelMA、甲基丙烯酰化海藻酸钠和纳米羟基磷灰石

复合而成, 不仅模拟了类骨基质的力学特性, 还具备了自矿化能力和成骨诱导活性, 引入RGD肽后可进一步促进细胞存活与自组织^[15]。通过模拟天然ECM的生化与力学特性指导类器官发育, 上海大学团队开发的骨仿生墨水由甲基丙烯酰化明胶、甲基丙烯酰化海藻酸钠和纳米羟基磷灰石复合而成, 既能提供类骨基质的力学支撑, 又具备自我矿化能力和成骨分化诱导活性, 引入RGD肽等黏附配体可显著提升细胞存活与自组织能力^[15]。Pluronic F127温敏衍生物在低温下保持液体状态便于打印, 在生理温度下迅速凝胶化以固定结构; 而酶敏感多肽交联的墨水则支持细胞介导的基质重塑, 有利于类器官成熟^[42]。通过整合微球/纳米载体可实现生长因子的时序控释, 从而精准调控类器官分化: 例如负载肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的海藻酸盐梯度水凝胶可引导肝脏类器官极性化生长^[43-45]; BMP缓释系统则显著加速骨类器官矿化进程^[46]。

3 微环境的高精度构建

类器官的功能成熟高度依赖于对其仿生微环境的精准模拟。生物3D打印技术为实现这一目标提供了前所未有的空间操纵与微环境构建能力。以下将分别从打印的图案化设计以及神经/血管网络

表2 生物材料分类及性能比较(根据参考文献[2,15,34-38,44-48]修改)

Table 2 Classification and performance comparison of biomaterials (modified from references [2,15,34-38,44-48])

材料类型 Material types	代表材料 Representative materials	生物相容性 Biocompatibility	机械性能 Mechanical property	降解性 Degradability	打印适应性 Printing adaptability	主要优势 Main advantages	局限性 Limitations	典型应用 Typical applications
Natural polymers	Collagen	★★★★★	Low strength and high flexibility	Enzymatic (tunable)	Moderate (requires cross-linking)	Optimal cytocompatibility, biomimetic ECM	Poor mechanical stability, high shrinkage	Epithelial/vascular organoids
	Alginate	★★★★☆	Moderate strength	Ionically cross-linked (controllable)	Excellent (low-temp gelation)	Rapid gelation, low cost	Poor cell adhesion	Islet/liver organoid encapsulation
	GelMA	★★★★★	Adjustable (light crosslinking)	Enzymatic	Excellent (photo-crosslinking)	High-resolution printing, High biomimicry	Potential UV damage to cells	Cardiac/tumor organoids
Synthetic polymers	PEGDA (polyethylene glycol, diacrylate)	★★★★☆	Adjustable (crosslinking degree control)	Non-degradable, slow-degrading	Excellent (photo-curing)	Chemically inert, low immunogenicity	Lack of bioactive sites	Organ-on-a-chip structures
	PCL (polycaprolactone)	★★★★☆	High strength and high flexibility	Slow degradation (>1 year)	Moderate (melt printing)	Long-term mechanical support	Hydrophobic, Requires surface modification for cell adhesion	Bone/cartilage organoid scaffolds
Inorganic materials	HA (hydroxyapatite)	★★★★☆	High strength and high brittleness	Very slow degradation	Difficult (requires composite)	Osteoinductive, biomimetic mineralization	Difficult to print alone, brittle fracture	Mineralized layers for bone organoids
	BGs (bioactive glasses)	★★★★☆	High brittleness	Controlled ion release	Requires polymer composite	Promote angiogenesis, antibacterial property	Complex processing	Bone/dental pulp organoid interfaces

★: 具有生物相容性; ☆: 不具有生物相容性。
★: biocompatible; ☆: not biocompatible.

的构建两个方面进行阐述(表3)。

3.1 类器官生物3D打印的图案化设计

类器官生物3D打印的图案化设计需遵循生物模拟、发育引导、功能适配、技术可行及系统优化等核心原则,以实现对类器官结构与功能的精准调控。

在生物模拟方面,应参照目标器官的自然解剖结构进行图案构建。例如,为模拟肝脏的代谢与解毒功能,可依据肝小叶六边形单元结构设计多细胞图案,在每个单元中按生理比例分布肝细胞、内皮细胞等,以重建肝脏基本功能单元^[49-50]。此外,需还原细胞间的天然相互作用模式,如在肠道类器官中精确排布潘氏细胞、杯状细胞与肠上皮细胞,促进

细胞间通信功能协同^[51]。

在发育引导方面,图案设计应契合细胞的分化路径和发育时序。以神经类器官为例,早期图案需为神经干细胞增殖与初步分化提供相对均质的环境;随发育推进,应逐步引入复杂结构梯度与区域化信号,引导神经元迁移、突触形成及胶质细胞分化^[52-53]。科研人员通过空间控释信号分子(如将BMP、Wnt等形态发生素定向分布于特定区域)可进一步指导组织分区和细胞命运转变。例如,将成骨生长因子集中在骨组织发育的关键区域引导间充质干细胞向成骨细胞分化^[54]。

在功能适配方面,需直接服务于目标功能。例如,为构建具有滤过与重吸收功能的肾脏类器官,应

表3 类器官生物3D打印关键微环境要素及构建策略(根据参考文献[24-25,47-48]修改)
Table 3 Key microenvironment elements and construction strategies for 3D printing of organoids
(modified from references [24-25,47-48])

微环境要素 Microenvironmental factors	生物学作用 Biological effects	构建技术 Building technologies	代表性进展 Representative progresses
Vascular network	Nutrition/oxygen delivery, metabolic waste removal	Sacrificial writing, magnetic control assembly, and endothelial cell printing	A perfusable cardiac tissue
Nerve innervation	Sensory/motor function regulation	Printed together with the neural spheres; Electroactive bioinks	Construction of the neural-muscular junction
Extracellular matrix	Structural support, mechanical signal transmission	ECM biomimetic ink, dynamic hydrogel	Bone organoid mineralized matrix
Biochemical gradient	Spatial regulation of cell differentiation/polarization	Microsphere sustained-release, multi-nozzle gradient printing	Polarization of liver organoids
Mechanical stress	Promote the maturation of the organization	Bioreactor, dynamic compression device	Mechanical adaptability of cartilage organoids

设计包含肾小球样滤过单元与肾小管样结构的仿生图案^[55]; 对于心脏类器官, 则需模拟心肌纤维的各向异性排列, 通过提高心肌细胞密度与定向排布以增强收缩同步性与力学性能^[56-57]。

在技术实现方面, 图案设计需结合打印工艺与材料特性。液滴式打印适用于低细胞密度、中等复杂度的图案; 挤出式打印可实现高细胞密度及更复杂的多材料结构^[58]; 光固化技术支持高精度、高分辨率的结构打印案, 而温敏水凝胶则便于构建动态响应性图案^[59]。

在优化与评估方面, 需建立多尺度、多指标的迭代优化流程: 通过类器官形态、存活率、基因/蛋白表达及功能输出(如代谢、电生理、分泌活性)评估生物学效果; 同时从制造角度评价图案的稳定性、打印重复性与结构保真度, 形成“设计-打印-评估-再设计”的闭环优化体系^[58]。

3.2 神经血管网络构建

在类器官构建中, 实现神经化与血管化的协同是模拟体内器官发育的关键。这需要通过多策略集成, 在图案化设计基础上进一步引入细胞互作、材料引导、遗传调控及工程手段, 以建立功能性的神经-血管网络。其主要策略可总结如下。

3.2.1 细胞共培养策略 选择合适的细胞类型是构建神经-血管类器官的基础。多能干细胞(包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞)因其具有多向分化潜能, 常被用于同时诱导产生神经细胞与血管内皮细胞。通过优化分化方案, 可在同一体系中获得两类细胞并进行共培养。另一种策略是将预分化的神经

细胞(如神经干细胞)与内皮细胞按特定比例混合培养。研究表明, 神经干细胞与内皮细胞以适当比例共培养时, 可自发形成结构与功能耦合的神经-血管单元^[60-61]。

3.2.2 生物材料与支架设计 生物材料不仅作为支撑结构, 更主动参与细胞行为引导。需开发具有适宜力学性能、生化特性的专用生物墨水, 例如基于明胶甲基丙烯酰(GelMA)的水凝胶可同时支持神经细胞与内皮细胞的生长, 并可通过3D打印精确控制其空间分布, 引导神经纤维与血管网络的同步生成^[61]。支架内部通常设计有微孔、通道等微观结构, 促进两类细胞迁移、接触与功能整合, 从而形成三维互连的网络系统^[62]。

3.2.3 基因编辑与信号通路调控 通过遗传操纵手段(如CRISPR-Cas9)对细胞进行定向改造, 可增强其特定功能。例如, 通过基因敲除或过表达促进神经轴突生长、突触形成, 或增强内皮细胞成管能力^[63]。对多能干细胞进行遗传修饰, 还可提高其向神经或内皮细胞分化的效率。在信号调控层面, 靶向关键发育通路(如Notch、Wnt、BMP等)的小分子化合物或生物因子可被用于协调神经与血管生成的时空同步性^[64-65]。

3.2.4 微流控技术与生物打印融合 微流控芯片可提供高精度的流体控制与微环境模拟, 通过设计微通道、腔室结构, 能够更好地支持神经-血管网络的营养维持、物质交换及信号转导^[66-67]。在打印工艺层面, 可结合牺牲打印技术生成中空通道网络, 再植入内皮细胞形成血管腔; 或借助磁控组装等方式,

实现对神经球和血管类器官的空间有序排布,从而构建层级化的多组织集成系统^[25]。

4 类器官生物3D打印的研究进展

生物3D打印技术与类器官模型的深度融合,正推动着包括骨、肝、心脏、肠、脑以及肿瘤在内的多种疾病研究模型的快速发展。

4.1 骨类器官

在骨类器官领域,生物3D打印技术的应用正不断推动模型构建从结构仿生迈向功能重现。苏佳灿教授团队^[15]采用数字光处理(DLP)打印技术,结合仿生骨基质生物墨水,成功制备出具有多孔结构的骨类器官,实现了骨组织微结构的高度仿生复制。欧阳宏伟教授团队^[68]利用数字光处理(DLP)打印技术高效制备出负载骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)的GelMA水凝胶微球,促使细胞在微球内聚集凝结;经软骨诱导培养基培养3周后,成功构建出模拟发育过程中软骨内成骨过程的骨痂类器官(osteo-callus organoids),并实现了4周内的快速原位骨再生。另有研究通过将人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)共打印,形成具有高分辨率及明确空间结构的异质微球体,使类器官同时具备成骨与血管生成的双重功能^[69-70]。吴成铁研究团队^[71]开发了基于硅酸钙(calcium silicate, CS)纳米线与甲基丙烯酸酐化明胶(GelMA)的复合生物墨水,用于包裹骨髓间充质干细胞(BMSCs)与施万细胞(schwann cells, SCs),并通过打印精确控制细胞分布,在诱导成骨的同时有效促进了神经发生(图3A)。

当前,3D打印支持的骨类器官研究已不再局限于形态模仿,更是进入了功能化构建的新阶段,尤其在血管化与神经化骨类器官开发中取得了显著突破。然而,该领域仍面临一系列关键挑战包括:如何实现长效稳定的血管神经网络整合、进一步优化生物墨水的生物学与力学性能、解决细胞来源限制与免疫兼容性问题、推动标准化与规模化制备工艺发展以及最终完成临床转化应用。克服这些瓶颈,将为实现大段骨缺损修复及生物性假体构建等重大临床目标奠定基础。

4.2 肝类器官

在肝脏类器官研究领域,生物3D打印技术的

应用显著促进了体外肝模型从简单细胞聚集体向高度结构化和功能化的“微型肝脏”发展。例如,采用包含脱细胞细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)的肝细胞球体构建打印的肝模型,不仅展现出高细胞活力,还可持续分泌白蛋白与尿素,体现了良好的肝脏合成与代谢功能^[72]。GRIX等^[73]利用立体光刻技术,以HepaRG细胞和人肝星状细胞(human-hepatic stellate cells, hu-HSCs)为材料,成功打印出具备肝脏典型特征的类器官结构。JIN团队^[74]则通过多材料挤出打印技术构建了仿生肝小叶阵列,该结构整合了肝细胞、内皮细胞及可灌注管腔等多种细胞与功能单元,实现了异质多细胞空间的精确排布(图3B)。值得注意的是,清华大学庞媛团队^[75]采用以肝类器官团簇(而非单细胞)为构建单元的打印策略,更好地维持了细胞间原有的相互作用与微组织完整性,从而显著提升了类器官的白蛋白分泌与尿素合成功能;在肝衰竭小鼠模型中显著提高存活率,并实现与宿主血管连接。

总体而言,3D打印技术推动了肝类器官在复杂结构仿生、长期功能维持及体内移植整合等方面的研究进展。然而,要实现其全临床临床应用,仍需要进一步解决长期功能性保持、完全血管网络与胆管系统的构建以及标准化、可重复的大规模生产等关键挑战。

4.3 心脏类器官

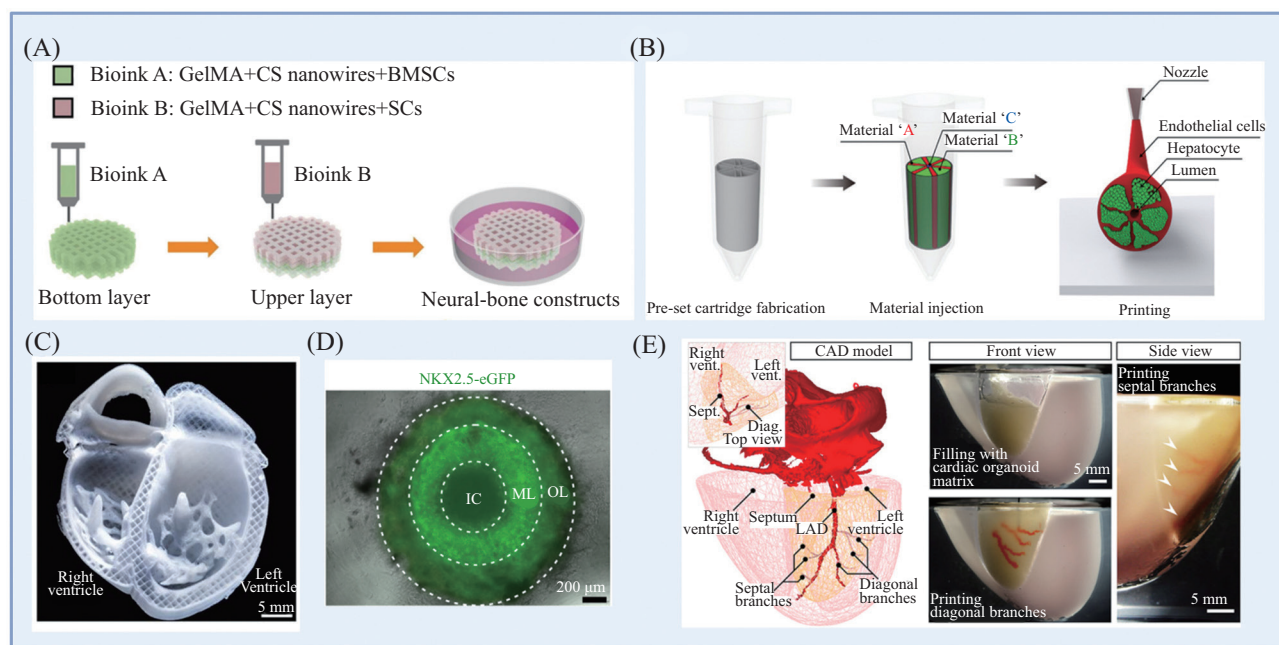
在心脏类器官研究领域,3D打印技术为构建具有复杂几何结构与血管网络的心脏模型提供了强大工具。然而,大尺寸心脏类器官仍面临中心区域坏死风险,而微流控技术与3D打印的结合有望提升其营养输送与功能成熟度。德国汉诺威医学院的ZWEIGERDT研究团队^[76]将人类多能干细胞(hPSCs)聚集体嵌入基质胶中,并通过双相Wnt信号调控实现定向心脏分化,成功生成复杂且高度结构化的心脏形成类器官(heart-forming organoid, HFO)(图3D)。该类器官包含心肌层、内膜样细胞及前肠内胚层等结构,可模拟早期心脏与前肠的协同发育过程。2019年,以色列科学家利用患者来源细胞成功打印出世界上首颗细胞化心脏,其结构涵盖细胞、血管、心室和心房,尺寸虽仅与兔心相仿,却首次实现了心脏宏观与微观结构的整合仿生;然而该心脏仅具备局部细胞收缩能力,尚无法实现协调搏动与泵血功能^[77]。卡内基梅隆大学的FEINBERG教授研

究团队^[5]采用自由可嵌入的悬浮水凝胶(freeform reversible embedding of suspended hydrogels, FRESHs)打印技术,以胶原蛋白为生物墨水,实现了从毛细血管至完整心脏的多尺度精细打印,为后续填充类器官单元、实现功能性重建提供了结构基础(图3C)。LEWIS研究团队^[26]开发的SWIFT(sacrificial writing into functional tissue)技术,可在高密度心脏类器官构建块活体基质中打印牺牲明胶墨水通道,去除牺牲明胶墨水后形成可灌注的血管网络,显著提升类器官的存活与整合能力(图3E)。

总体而言,3D打印技术在心脏类器官的复杂结构仿生、血管化构建及个性化建模方面取得了显著进展。然而,当前打印的心脏类器官仍存在收缩力较弱、细胞电生理同步性差、无法有效泵血等瓶颈。诱导其进一步成熟并长期维持稳定功能仍是关键挑战,而细胞存活率提升、功能性血管网络构建以及与宿主组织的整合效率提升,则是实现大尺寸心脏类器官实际应用的核心难题。

4.4 肠类器官

在肠道类器官研究领域,3D打印技术的引入显著推动了模型从自发形成向精准构建的跨越,实现了更大尺寸、更复杂结构和更完备功能的类肠组织生成。BRASSARD研究团队^[78]提出了一种称为生物打印辅助组织(bioprinting-assisted tissue emergence, BATE)的新概念,该技术以具有类器官形成能力的干细胞作为构建单元,将其直接打印到可支持自组织的细胞外基质中。通过精确控制打印的几何形状和细胞密度,成功生成厘米尺度的肠道组织,这些组织不仅自发形成管腔、分支血管及肠样上皮结构,还呈现出高度仿生的隐窝-绒毛空间结构域(图4A)。为引导小肠类器官的形态发生,ELVASSORE研究团队^[79]设计了一个复杂的超类器官3D结构来模拟原始小肠发育,利用LGR5-EGFP-DTR小鼠小肠类器官(mouse small intestinal organoids, mSIOs),构建了具有多个隐窝状区域的诱导性几何支架,可有效引导类器官形成与发育中肠道相似的隐窝-绒



A: 用无机纳米材料作为生物墨水的生物活性成分可以同时加速新骨的形成和神经纤维的向内生长^[71]; B: 高度血管化多尺度肝小叶的生物打印^[74]; C: 胶原蛋白的生物3D打印胶原蛋白重建人类心脏组件^[5]; D: 在matrigel中嵌入人类多能干细胞聚集体,然后通过双相Wnt信号调控实现定向心脏分化,成功生成复杂且高度结构化的心脏形成类器官(HFOs)^[76]; E: 可灌注的心脏组织^[26]。

A: calcium silicate nanowires-containing multicellular bioinks for 3D bioprinting of neural-bone constructs^[71]; B: bioprinting of multiscaled hepatic lobules within a highly vascularized construct^[74]; C: 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart^[5]; D: generating complex, highly structured, three-dimensional HFOs (heart-forming organoids) by embedding human pluripotent stem cell aggregates in matrigel followed by directed cardiac differentiation via biphasic Wnt pathway modulation with small molecules^[76]; E: a perfusable cardiac tissue^[26]。

图3 生物3D打印骨、肝和心脏类器官(根据参考文献[5,26,71,74,76]修改)

Fig.3 3D bioprinting of bone, liver and heart organoids (modified from references [5,26,71,74,76])

毛复杂形态(图4B)。此外,研究通过挤出式生物打印结合碳纳米管增强型水凝胶精准构建了隐窝-绒毛结构,将黏蛋白MUC2表达量显著提升,其表达量达3倍,并通过低剪切力微流控技术实现了细胞存活率>90%的长期培养,为炎症性肠病研究和药物吸收评估提供了高仿生平台^[80]。

3D打印技术极大地推动了肠类器官在结构可控性、功能表达及长期培养稳定性方面的进步。然而,要构建真正完整的体外肠道模拟系统,仍需在复现微环境复杂性、实现功能血管化、提升全面功能成熟度以及解决规模化问题等方面实现进一步突破。

4.5 脑类器官

脑类器官主要分为两种类型:一类是全脑类器官,仅依赖内源性信号自发形成多脑区(前脑、中脑、后脑),但结构存在异质性;另一类是区域特异性类器官,如端脑类器官(背侧皮质+腹侧神经节)和皮质球(human cerebral cortical spheroids, hCSs, 纯皮质组织),通过添加外源因子(如TGF β /Wnt抑制剂)定向诱导特定脑区发育;结合生物3D打印可以将区域特异性类器官精确定位构建结构明确的全脑类器官^[81]。在技术支撑方面,麻省理工学院的研究团队开发了一种低成本的3D打印微流控芯片,用于支持脑室空腔的形成和实时监测^[82];该芯片能够模拟大脑类器官的生长环境,并允许科学家在显微镜下实时观察脑组织的发育。哈佛大学的研究团队则采用血管化诱导分化VID(vascularized induced differentiation)支架技术有效抑制了类器官核心坏死,并借助正交诱导分化(orthogonally induced differentiation, OID)策略实现对血管化皮质类器官的快速编程,通过在预编程的人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)中强制过表达特定转录因子,在不依赖于培养基成分的条件下将hiPSCs同步分化为神经细胞与血管内皮细胞,成功构建出具有功能化血管网络的脑皮质类器官^[60](图4E)。

3D打印技术将脑类器官研究从培育随机结构的细胞团,推向了能够精准构建特定脑区并初步实现血管化的新阶段。然而,要真正模拟人类大脑的复杂结构和高级功能,未来仍需在仿生设计(如整合多种神经细胞与环路)、功能成熟诱导(如血脑屏障、电活动)和跨学科伦理治理等方面取得根本性突破。

4.6 肿瘤类器官

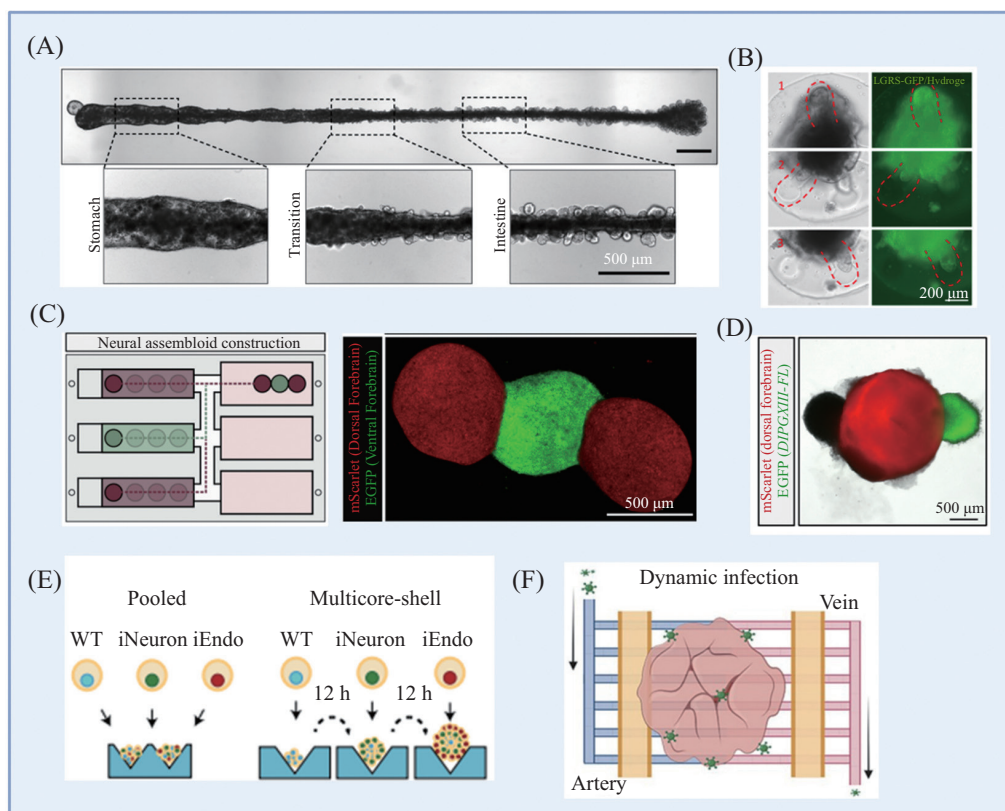
在肿瘤类器官构建中,生物3D打印通过精准排布不同细胞类型与调控生物墨水成分,能够有效模拟肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的关键特征。在乳腺癌、肺癌和胃癌等模型中,3D打印的肿瘤类器官为研究肿瘤细胞与正常基质之间的相互作用、药物反应机制及个性化治疗策略提供了重要平台。KANG团队^[83]开发了一种嵌入式生物打印策略,将患者来源结直肠癌类器官与模拟肿瘤硬度(≈ 7.5 kPa)的海藻酸盐浴结合,形成尺寸均一的结直肠癌类器官阵列。赵冰研究团队^[84]采用面投影微立体光刻技术(精度2 μ m)制造含微血管网络的类器官芯片,支持肺癌、子宫内膜癌及肾脏类器官厘米级培养(>30天),突破了传统类器官营养渗透瓶颈(图4F)。HEILSHORN团队^[85]则开发了空间图案化器官转移(spatially patterned organoid transfer, SPOT)平台,可以将不同类型的器官样体精确组装,构建用于研究神经发育和癌症侵袭等的复杂多组织模型(图4C和图4D)。

生物3D打印技术将肿瘤类器官从简单的细胞团构建成能模拟TME、支持高通量分析、可研究转移和药物代谢的复杂系统,极大地推动了癌症研究和个性化医疗。然而,要成为完美的疾病模型,仍需在构建完全仿生的微环境、实现功能血管化、克服肿瘤异质性以及平衡复杂度与标准化方面取得突破。

5 挑战、前景及总结

类器官技术虽能模拟器官部分功能,但在结构复杂性、功能成熟度及长期稳定性方面仍面临多重挑战,其发展受限于生物墨水性能、打印技术、标准化流程及伦理规范。现有墨水在生物相容性、机械强度(如提供结构支撑)和功能引导(如促进血管生成)方面尚未理想,难以模拟天然细胞外基质的复杂性。高精度打印需牺牲细胞存活率(因剪切力),而保证活性则可能降低结构精度,影响类器官仿生性。不同材料的流变学特性及固化条件差异大,导致打印过程难以协调;且缺乏标准化流程,造成批间差异大,阻碍临床转化。类器官缺乏体内微环境关键要素(如血管、神经、免疫系统相互作用),导致功能不完整(如肝代谢、肾排泄功能难以长期维持)^[86]。

除开技术方面的挑战外,伦理与监管方面也存



A: 插图分别为胃部分、过渡区和肠道部分^[78]; B: 代表性的明场图像和荧光图像显示, 在打印后培养6天的过程中, mSIO芽体在原始小肠设计的不同Z层级处侵入多个隐窝^[79]; C: 左边是SPOT的潜在自动化方案示意图, 右边是一个表达eGFP的前脑腹侧神经器官体与两个表达mScarlet的前脑背侧神经器官体融合后的代表性荧光图像^[85]; D: 这是一个由三个部分组成的组装体的代表性BF(荧光原位杂交)和IF(免疫荧光)图像, 在这个组装体中, 两个不同的DIPG组织体[分别来自肿瘤起源部位—脑桥(DIPGXIII-P)或肿瘤转移至的脑区—额叶(DIPGXIII-FL)]融合到了一个背侧前脑神经组织体上^[85]; E: 正交诱导干细胞分化用于构建具有神经干细胞、内皮细胞和神经元组成的分层区域的图案化神经组织^[60]; F: 腺病毒相关病毒通过流体流动被重新输送到厘米级肿瘤组织中^[84]。

A: the illustrations respectively represent the stomach part, the transition zone and the intestinal part^[78]; B: representative bright field and fluorescence images showing mSIO buds invading multiple crypts at different Z-levels of the primordial small intestine design after 6 days of culture post-printing^[79]; C: schematic of the potential automation of SPOT (left), representative fluorescence image of an eGFP-expressing ventral forebrain neural organoid fused to two mScarlet-expressing dorsal forebrain neural organoids^[85] (right); D: representative BF and IF images of a three-part assembloid in which two distinct DIPG organoids, derived from either the pons, which is the tumor origination site (DIPGXIII-P), or the frontal lobe, a brain region into which the tumor metastasized (DIPGXIII-FL), are fused to a dorsal forebrain neural organoid^[85]; E: orthogonally induced differentiation of stem cells generated patterned neural tissues with layered regions composed of neural stem cells, endothelium and neurons^[60]; F: adeno-associated virus is recirculated into a centimeterscale tumoroid by fluid flow^[84]。

图4 生物3D打印肠、脑和肿瘤类器官(根据参考文献[60,78-79,84-85]修改)

Fig.4 3D bioprinting of intestines, brains and tumor organoids (modified from references [60,78-79,84-85])

在着一定的挑战^[87]。一是细胞来源与知情同意, 胚胎/多能干细胞来源需符合伦理规范, 且供体需明确知晓类器官可能用途(研究、商业、治疗), 传统匿名化模式难以适用。二是遗传隐私风险, 类器官携带供体唯一遗传信息, 存在泄露滥用风险, 可能导致歧视或伦理冲突。三是潜在意识与生殖伦理问题, 脑类器官等功能复杂模型可能引发意识争议; 若涉及生殖细胞, 则需警惕遗传秩序冲击。四是跨学科监管困境, 类器官技术涵盖生物、医学、工程等领域, 需建立多维度伦理框架而非单一标准。

未来应该多学科融合突破生物3D打印类器官的瓶颈。一是智能生物墨水的开发, 应整合纳米材料、响应性水凝胶(温度敏感/pH敏感), 实现力学性能动态调节与血管生成定向诱导。二是搭建多技术融合平台, 应结合器官芯片与微流控, 构建灌注式血管网络, 模拟营养/药物输送及器官间相互作用; 应用AI与机器学习来优化打印参数(如精度-存活率平衡)、预测类器官生长行为, 并加速个性化疾病模型设计。三是自动化与标准化系统的构建, 应开发全封闭自动化培养与打印平台, 减少人为操作差异, 提

升批次一致性。四是伦理治理, 需要建立跨学科伦理委员会, 制定类器官来源、使用边界及隐私保护国际准则, 尤其针对脑类器官等敏感领域。

尽管当前类器官生物3D打印在标准化、功能成熟度及规模化制备等方面仍面临挑战, 但随着智能响应型生物墨水、多模态技术融合平台以及自动化培养与检测系统的快速发展, 该领域有望在未来20年实现重大突破。从构建高度仿生的个体化疾病模型推动精准医疗, 到最终实现可移植人工器官的终极愿景, 这一融合工程学、生物学与医学的跨学科领域将持续为人类健康带来进步。

参考文献 (References)

- [1] SANTONI S, GUGLIANDOLO S G, SPONCHIONI M, et al. 3D bioprinting: current status and trends: a guide to the literature and industrial practice [J]. *Bio-Des Manuf*, 2022, 5(1): 14-42.
- [2] HU Y, ZHU T, CUI H T, et al. Integrating 3D bioprinting and organoids to better recapitulate the complexity of cellular micro-environments for tissue engineering [J]. *Adv Healthcare Mater*, 2025, 14(3): 2403762.
- [3] FANG Y C, GUO Y Z, LIU T K, et al. Advances in 3D bioprinting [J]. *Chin J Mech Eng: Addit Manuf Front*, 2022, 1(1): 100011.
- [4] BOULARAOUI S, HUSSEIN G A, KHAN K A, et al. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability [J]. *Bioprinting*, 2020, 20(24): e00093.
- [5] LEE A, HUDSON A R, SHIWARSKI D J, et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart [J]. *Sci*, 2019, 365(6452): 482-7.
- [6] MOLDOVAN N I, HIBINO N, NAKAYAMA K. Principles of the kenzan method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23(3): 237-44.
- [7] WEYGANT J, ENTEZARI A, KOCH F, et al. Droplet 3D cryo-bioprinting for fabrication of free-standing and volumetric structures [J]. *Aggregate*, 2024, doi: 10.1002/agt2.599.
- [8] XU H Q, ZHANG S K, SONG K D, et al. Droplet-based 3D bioprinting for drug delivery and screening [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2025, doi: 10.1016/j.addr.2024.115486.
- [9] SUN W, STARLY B, DALY A C, et al. The bioprinting roadmap [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(2): 022002.
- [10] NG W L, LEE J M, ZHOU M M, et al. Vat polymerization-based bioprinting-process, materials, applications and regulatory challenges [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(2): 022001.
- [11] MAHDAVI S S, ABDEKHODAIE M J, KUMAR H, et al. Stereolithography 3D bioprinting method for fabrication of human corneal stroma equivalent [J]. *Ann Biomed Eng*, 2020, 48(7): 1955-70.
- [12] HUANG J G. A review of stereolithography: processes and systems [J]. *Processes*, 2020, 8(9): 1138.
- [13] WANG H, XIA Y, ZHANG Z X, et al. 3D gradient printing based on digital light processing [J]. *J Mater Chem B* 2023, 11(37): 8883-96.
- [14] CAPRIOLI M, ROPPOLO I, CHIAPPONE A, et al. 3D-printed self-healing hydrogels via digital light processing [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1234567890.
- [15] WANG J, WU Y, LI G F, et al. Engineering large-scale self-mineralizing bone organoids with bone matrix-inspired hydroxy-apatite hybrid bioinks [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(30): 2309875.
- [16] BERNAL P N, FLORCZAK S, INACKER S, et al. The road ahead in materials and technologies for volumetric 3D printing [J]. *Nat Rev Mater*, 2025, doi: <https://www.nature.com/articles/s41578-025-00785-3>.
- [17] LAU T T, HO L W, WANG D A. Hepatogenesis of murine induced pluripotent stem cells in 3D micro-cavitary hydrogel system for liver regeneration [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(28): 6659-69.
- [18] PARDO A, BAKHT S M, GOMEZ-FLORIT M, et al. Magneticaly-assisted 3D bioprinting of anisotropic tissue-mimetic constructs [J]. *Adv Funct Mater*, 2022, doi: 10.1002/adfm.202208940.
- [19] KIM H W, LEE Y J, KWON Y E, et al. Efficient generation of brain organoids using magnetized gold nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 21240.
- [20] AYAN B, HEO D N, ZHANG Z F, et al. Aspiration-assisted bioprinting for precise positioning of biologics [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(10): eaaw5111.
- [21] KIM M H, BANERJEE D, CELIK N, et al. Aspiration-assisted freeform bioprinting of mesenchymal stem cell spheroids within alginate microgels [J]. *Biofabrication*, 2022, doi: 10.1088/1758-5090/ac4dd8.
- [22] HAKOBYAN D, MÉDINA C, DUSSERRE N, et al. Laser-assisted 3D bioprinting of exocrine pancreas spheroid models for cancer initiation study [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(3): 035001.
- [23] SORKIO A, KOCH L, KOIVUSALO L, et al. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks [J]. *Biomaterials*, 2018, 171: 57-71.
- [24] HUANG M S, CHRISTAKOPOULOS F, ROTH J G, et al. Organoid bioprinting: from cells to functional tissues [J]. *Nat Rev Bioeng*, 2025, 3: 126-42.
- [25] ZHANG D Y, HUERTE-LÓPEZ C, HEILSHORN S C. Organoid bioprinting to pattern the matrix microenvironment [J]. *Curr Opin Biomed Eng*, 2025, doi: 10.1016/j.cobme.2025.100607.
- [26] SKYLAR-SCOTT M A, UZEL S G M, NAM L L, et al. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(9): eaaw2459.
- [27] HÖLZL K, LIN S, TYTGAT L, et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(3): 032002.
- [28] GROLL J, BURDICK J A, CHO D W, et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks [J]. *Biofabrication*, 2019, 11(1): 013001.
- [29] LI Y W, CHEN M R, HU J L, et al. Volumetric compression induces intracellular crowding to control intestinal organoid growth via Wnt/ β -Catenin signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(1): 170-2.
- [30] LI Q, QI G Y, LIU X M, et al. Universal peptide hydrogel for scalable physiological formation and bioprinting of 3D spheroids from human induced pluripotent stem cells [J]. *Adv Funct Mater*,

- 2021, doi: 10.1002/adfm.202104046.
- [31] XIE F H, SUN L J, PANG Y, et al. Three-dimensional bio-printing of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine-ScienceDirect [J]. *Biomaterials*, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120416.
 - [32] GREVSKIJO N, SACHS N, MANFRIN A, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture [J]. *Nat*, 2016, 539: 60.
 - [33] MANSOUR A F, GONALVES J T, BLOYD C W, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(5): 432-41.
 - [34] SHAMS E, BARZAD M S, MOHAMADNIA S, et al. A review on alginate-based bioinks, combination with other natural biomaterials and characteristics [J]. *J Biomater Appl*, 2022, 37: 355-72.
 - [35] MARQUES C F, DIOGO G S, PINA S, et al. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019, 30(3): 32.
 - [36] DJAGNY K B, WANG Z, XU S Y. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2001, 41(6): 481-92.
 - [37] O'CONNELL C D, ZHANG B B, ONOFRILLO C, et al. Tailoring the mechanical properties of gelatin methacryloyl hydrogels through manipulation of the photocrosslinking conditions [J]. *Soft Matter*, 2018, 14(11): 2142-51.
 - [38] JAHANMARD F, KHODAEI A, FLAPPER J, et al. Osteoimmunomodulatory GelMA/liposome coatings to promote bone regeneration of orthopedic implants [J]. *J Control Release*, 2023, 358: 667-80.
 - [39] GRAMLICH W M, KIM I L, BURDICK J A. Synthesis and orthogonal photopatterning of hyaluronic acid hydrogels with thiol-norbornene chemistry [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 9803-11.
 - [40] CROISIER F, JÉRÔME C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering [J]. *Eur Polym J*, 2013, 49(4): 780-92.
 - [41] BENTON G, ARNAOUTOVA I, GEORGE J, et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2014, 79: 3-18.
 - [42] CHUNG H J, GO D H, BAE J W, et al. Synthesis and characterization of pluronic grafted chitosan copolymer as a novel injectable biomaterial [J]. *Curr Appl Phys*, 2005, 5(5): 485-8.
 - [43] AFTING C, WALTHER T, DROZDOWSKI O M, et al. DNA microbeads for spatio-temporally controlled morphogen release within organoids [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(12): 1849-57.
 - [44] KUSE Y, MATSUMOTO S, TSUZUKI S, et al. Placenta-derived factors contribute to human iPSC-liver organoid growth [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 2493.
 - [45] GAO C, YANG Y, ZHANG Y, et al. HGF gene delivering alginate/galactosylated chitosan sponge scaffold for three-dimensional coculture of hepatocytes/3T3 cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(3): 451-8.
 - [46] REYES R, RODRIGUEZ J A, ORBE J, et al. Combined sustained release of BMP2 and MMP10 accelerates bone formation and mineralization of calvaria critical size defect in mice [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 750-6.
 - [47] MA W P, LU H X, XIAO Y, et al. Advancing organoid development with 3D bioprinting [J]. *Organoid Research*, 2025, 1(1): 025040004.
 - [48] ZHANG Y, LI G F, WANG J, et al. Small joint organoids 3D bioprinting: construction strategy and application [J]. *Small*, 2024, 20(8): 2302506.
 - [49] PARADISO A, VOLPI M, RINOLDI C, et al. *In vitro* functional models for human liver diseases and drug screening: beyond animal testing [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(9): 2988-3015.
 - [50] PINTO S C D, CHERKAOUI J, GHOSH D, et al. A virtual scalable model of the hepatic lobule for acetaminophen hepatotoxicity prediction [J]. *NPJ Digit Med*, 2024, 7(1): 340.
 - [51] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. *Nat*, 2009, 459(7244): 262-5.
 - [52] HE Z, DONY L, FLECK J S, et al. An integrated transcriptomic cell atlas of human neural organoids [J]. *Nat*, 2024, 635(8039): 690-8.
 - [53] CAPORALE N, CASTALDI D, RIGOLI M T, et al. Multiplexing cortical brain organoids for the longitudinal dissection of developmental traits at single-cell resolution [J]. *Nat Methods*, 2025, 22(2): 358-70.
 - [54] RAHMAN M S, AKHTAR N, JAMIL H M, et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation [J]. *Bone Res*, 2015, 3(1): 1-20.
 - [55] SHI M, CROUSE B, SUNDARAM N, et al. Integrating collecting systems in human kidney organoids through fusion of distal nephron to ureteric bud [J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(7): 1055-70.e8.
 - [56] JODDAR B, NATIVIDAD-DIAZ S L, PADILLA A E, et al. Engineering approaches for cardiac organoid formation and their characterization [J]. *Transl Res*, 2022, 250: 46-67.
 - [57] LYU Q, GONG S, LEES J G, et al. A soft and ultrasensitive force sensing diaphragm for probing cardiac organoids instantaneously and wirelessly [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7259.
 - [58] GU Z M, FU J Z, LIN H, et al. Development of 3D bioprinting: from printing methods to biomedical applications [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15(5): 529-57.
 - [59] ZHANG P, WANG H X, WANG P, et al. Lightweight 3D bioprinting with point by point photocuring [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(5): 1402-12.
 - [60] SKYLAR-SCOTT M A, HUANG J Y, LU A, et al. Orthogonally induced differentiation of stem cells for the programmatic patterning of vascularized organoids and bioprinted tissues [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(4): 449-62.
 - [61] CHILDS C J, POLING H M, CHEN K, et al. Coordinated differentiation of human intestinal organoids with functional enteric neurons and vasculature [J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(4): 640-51.
 - [62] ZHANG B Y, MONTGOMERY M, CHAMBERLAIN M D, et al. Biodegradable scaffold with built-in vasculature for organ-on-a-chip engineering and direct surgical anastomosis [J]. *Nat Mater*, 2016, 15(6): 669-78.
 - [63] ATRI D S, LEE-KIM V S, VELLARIKKAL S K, et al. CRISPR-Cas9 genome editing of primary human vascular cells *in vitro* [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(11): e291.
 - [64] MENET R, LECORDIER S, ELALI A. Wnt pathway: an emerging player in vascular and traumatic mediated brain injuries [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 565667.
 - [65] MULLIGAN K A, CHEYETTE B N R. Wnt signaling in vertebrate neural development and function [J]. *J Neuroimmune Pharm*, 2012, 7: 774-87.

- [66] LIU J, WEI W J, WANG Y C, et al. A neurovascular unit-on-a-chip: culture and differentiation of human neural stem cells in a three-dimensional microfluidic environment [J]. *Neural Regener Res*, 2022, 17(10): 2260-6.
- [67] WINKELMAN M A, KOPPES A N, KOPPES R A, et al. Bioengineering the neurovascular niche to study the interaction of neural stem cells and endothelial cells [J]. *APL Bioeng*, 2021, 5(1): 011507.
- [68] XIE C, LIANG R J, YE J C, et al. High-efficient engineering of osteo-callus organoids for rapid bone regeneration within one month [J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121741.
- [69] LIU X, ZHAO N, LIANG H F, et al. Bone tissue engineering scaffolds with HUVECs/hBMSCs cocultured on 3D-printed composite bioactive ceramic scaffolds promoted osteogenesis/angiogenesis [J]. *J Orthop Transl*, 2022, 37: 152-62.
- [70] WANG D D, GUO Y R, HENG B C, et al. Cell membrane vesicles derived from hBMSCs and hUVECs enhance bone regeneration [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 23.
- [71] ZHANG H J, QIN C, ZHANG M, et al. Calcium silicate nanowires-containing multicellular bioinks for 3D bioprinting of neural bone constructs [J]. *Nano Today*, 2022, 46: 101584.
- [72] KIM M K, JEONG W, JEON S, et al. 3D bioprinting of dECM-incorporated hepatocyte spheroid for simultaneous promotion of cell-cell and-ECM interactions [J]. *Front Bioeng Biote*, 2023, 11: 1305023.
- [73] GRIX T, RUPPELT A, THOMAS A, et al. Bioprinting perfusion-enabled liver equivalents for advanced organ-on-a-chip applications [J]. *Genes*, 2018, 9(4): 176.
- [74] KANG D, HONG G, AN S, et al. Bioprinting of multiscaled hepatic lobules within a highly vascularized construct [J]. *Small*, 2020, 16(13): 1905505.
- [75] LI G Y, HE J Y, SHI J H, et al. Bioprinting functional hepatocyte organoids derived from human chemically induced pluripotent stem cells to treat liver failure [J]. *Gut*, 2025, 74(7): 1150-64.
- [76] DRAKHLIS L, BISWANATH S, FARR C M, et al. Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6): 737-46.
- [77] NOOR N, SHAPIRA A, EDRI R, et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(11): 1900344.
- [78] BRASSARDJ A, NIKOLAEV M, HÜBSCHER T, et al. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(1): 22-9.
- [79] URCIUOLO A, GIOBBE G G, DONG Y X, et al. Hydrogel-in-hydrogel live bioprinting for guidance and control of organoids and organotypic cultures [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3128.
- [80] CHEN Y, WANG Y. Innovations in intestinal organoid technology featuring an open apical surface [J]. *Eur J Cell Biol*, 2025, 104(2): 151476.
- [81] CORONEL R, GONZÁLEZ-SASTRE R, MATEOS-MARTINEZ P, et al. Human cerebral organoids: complex, versatile, and human-relevant models of neural development and brain diseases [J]. *Neural Regener Res*, 2025, 21(3): 837-54.
- [82] KHAN I, PRABHAKAR A, DELEPINE C, et al. A low-cost 3D printed microfluidic bioreactor and imaging chamber for live-organoid imaging [J]. *Biomicrofluidics*, 2021, 15(2): 024105.
- [83] HAN J, JEONG H J, CHOI J, et al. Bioprinted patient-derived organoid arrays capture intrinsic and extrinsic tumor features for advanced personalized medicine [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(20): 2407871.
- [84] GONG X F, YANG C, PENG J C, et al. Vascularized organoid-on-a-chip for centimeter-scale organoid cultivation [J]. *Bio-Des Manuf*, 2025, 8(3): 410-22.
- [85] ROTH J G, BRUNEL L G, HUANG M S, et al. Spatially controlled construction of assembloids using bioprinting [J]. *Nat Commun*, 14(1): 4346.
- [86] MACIEL B R, GRIMM A, OELSCHLAEGGER C, et al. Targeted micro-heterogeneity in bioinks allows for 3D printing of complex constructs with improved resolution and cell viability [J]. *Biofabrication*, 2023, 15(4): 045013.
- [87] 陈倩文, 赵思琪, 彭耀进. 类器官: 技术创新与伦理争议[J]. 合成生物学(CHEN Q W, ZHAO S Q, PENG Y J. Organoids: technological innovation and ethical controversies [J]. *Synthetic Biology Journal*), 2024, 5(4): 898-907.