



水凝胶半透膜中的细胞自组织化行为

解玉冰*

纽约州立大学奥尔巴尼分校, 纳米技术科学与工程学院, 奥尔巴尼, 纽约州 12203, 美国

*通讯作者, E-mail: yxie@albany.edu

收稿日期: 2024-07-02; 接受日期: 2024-09-02; 网络版发表日期: 2024-11-05

摘要 自组织化是细胞的固有属性, 细胞通过集体、自主、动态的排列, 形成具有一定功能的复杂的组织和器官结构. 充分了解细胞的自组织化行为对于重现多细胞生物的发育过程、构建组织和器官的结构和功能至关重要. 本文综述了具有代表性和开创性的细胞自组织化研究. 首先是自组织化研究的历史回顾, 接着概述了水凝胶模拟细胞微环境. 然后以器官发生和肿瘤发生为例, 分别展示用于正常和肿瘤类器官培养, 着重于水凝胶用于细胞自组织化的研究. 最后讨论了水凝胶对于进一步理解和调控细胞自组织化的应用前景.

关键词 细胞自组织化, 水凝胶, 微环境, 类器官, 器官发生, 肿瘤发生

1 引言

自组织化(self-organization)是多组分系统模式形成的核心原则, 通过各组成部分的集体相互作用, 涌现出在时间和空间上整体有序的系统. 这一概念在化学、物理学、生态学、细胞生物学、社会生物学中得到了广泛的应用. 它与自组装(self-assembly)的区别在于: 自组装是由各组分的物理结合(physical association), 达成静态的平衡结构(static, equilibrium structure); 自组织化通过各组分的物理相互作用(physical interaction), 产生动态的稳态结构(dynamic, steady-state structure), 通常发生在非平衡或耗散系统中^[1], 例如胚胎发生(embryogenesis)、器官发生(organgensis)、肿瘤发生(tumorigenesis). 细胞遵循自组织化原则, 通过生物大分子间、细胞-微环境、细胞-细胞等相互作用^[2], 确定其结构和功能.

水凝胶由于其生物相容性、多样性、易修饰性、

容易操作、相对透明且易于显微镜观察, 被广泛用于细胞培养、三维(3D)打印、柔性电子材料与电子皮肤、干细胞扩增与分化、细胞治疗、组织工程与再生医学^[3]. 水凝胶可以为细胞自组织化提供可控的微环境, 包括几何形状、尺寸和形貌、生物化学组成、机械性能, 以及生物分子信号. 随着干细胞、类器官、微工程、生物打印等技术的巨大进步, 水凝胶不仅可以为细胞提供体外无约束自组织化的微环境, 而且能够通过微图案化、微成型、立体光刻、生物打印等技术, 提供一个定向自组织化的微环境^[4]. 总之, 水凝胶用于细胞自组织化研究具有广阔的前景.

2 细胞自组织化行为

2.1 细胞自组织化概述

自组织化的概念是在18世纪90年代由德国哲学家

引用格式: Xie Y. Cellular self-organization in hydrogels. *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 2232–2252, doi: [10.1360/SSC-2024-0155](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0155)

康德(Kant)首次提出的, 康德将生命定义为一个自组织化、自我复制的过程(图1), 该定义暗示自组织化与功能之间存在一个环路^[5]. 直到20世纪50年代, 随着物理和化学系统自组织化的数学模拟研究进展, 图灵(Turning)开创了将计算机模拟用于理论生物学的研究, 运用反应-扩散方程, 提出了胚胎发生完全是一个自组织化过程的变革性想法^[6].

现代科学家采用了更为简单的定义: 自组织化是基于主体集体行为的动态过程, 其个体特性无法阐释最终动态模式的性能. 该定义允许科学家将自组织化过程与功能的涌现分开研究^[5].

自20世纪70年代, 科学家开始探索细胞形态发生, 包括细胞内的主要组织者——微管自组装和自组织化^[7-9]. 微管蛋白分子迁移, 形成微小振荡, 从而通过对称性破缺原理(symmetry breaking)实现微管自组织化^[10-12]. 振荡器的形成是生命系统自组织化的一个重要方面. 反应-扩散过程会出现化学振荡^[6], 真核生物的细胞周期是基于时间和空间的反应-扩散过程^[5], 通过自振荡涌现(emergence of spontaneous oscillations)导致周期性时间模式的自组织化^[13], 最终导致功能的涌现. 细胞水平的自组织化研究表明了自组织和功能性的环路互调作用^[14]. 此外, 通过自发对称性破缺原理, 细胞极化可以在没有任何信号提示的情况下发生^[15]. 自组织具有一定的鲁棒性(robustness)^[16]. 细胞自组织化系统中复杂的相互作用, 可以用非线性动力学来描述, 包括混沌研究, 揭示了导致各种疾病的事件, 包括癌症^[17].

2.2 干细胞和类器官推进自组织化研究进展

小鼠体内和体外胚胎发育研究表明, 基底膜蛋白为多能外胚层细胞创造了一个驱动胚胎干细胞自组织化形态发生的微环境^[18]. 随着多能干细胞的研究进展, 多能干细胞衍生的类器官, 可以用于体外再现器官发育的重要特征^[19]. 自从Sato等人^[20]显示小肠类器官可以由单个干细胞自组织化构建, 类器官3D培养陆续被用于视网膜^[21]、大脑^[22,23]、消化道^[24,25]、皮肤^[26]、心脏^[27]等组织、器官的自组织化研究. 同时肿瘤类器官3D培养用于研究癌细胞的自组织化和肿瘤发生^[28,29]. 类器官培养通常需要用到基质胶(Matrigel), 但是传统的基质胶是由小鼠肿瘤中提取的, 成分不固定且不同批次间存在差异. 所以能够替代基质胶的水凝胶^[30,31], 更有潜力用于3D培养、干细胞分化、类器官形成和自组织化研究.

器官发生需要协调和平衡多种细胞相互作用, 以创造集体细胞行为, 逐步塑造发育中的组织. 各个局部相互协调, 形成整个的器官形状. 另外细胞收缩力驱动力的细胞聚集会触发其邻近细胞中 β -连环蛋白(β -catenin)的机械敏感性, 通过机械和分子信号的整合促使器官形成^[32]. 心脏作为第一个发育的器官, 最先被用于揭示发育中细胞群落的空间组织化. 利用单细胞RNA测序(scRNA-seq)与高分辨率多重抗误差荧光原位杂交(MERFISH)相结合, Farah等人^[33]构建了发育中的人类心脏的综合细胞图谱, 使用体内遗传小鼠模型和体外人类多能干细胞系统来探究这些群落内的细胞-细胞相互作用, 揭示了在心室壁形态发生过程中协

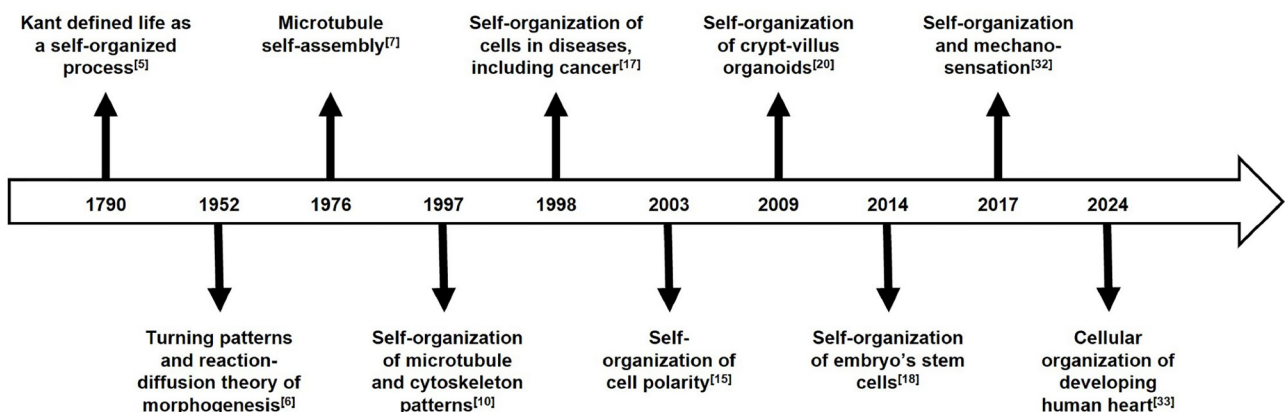


图1 细胞自组织化的关键性研究
Figure 1 Key events of cellular self-organization.

调心脏细胞亚群空间组织的多细胞信号传导途径。

3 水凝胶与细胞微环境

3.1 水凝胶结构与特性

水凝胶通过亲水性聚合物链的交联构成高度多孔、互连的3D网络结构,与水接触时会溶胀,可以将大量水分子保留在聚合物网络中。水凝胶含有与细胞相近的含水量(~70%),甚至更高(90%以上)。水凝胶可以通过化学(共价键交联)、物理(离子交联、静电相互作用、氢键、疏水相互作用、聚合物链物理缠结等)或生物学(多肽自组装、DNA 碱基配对)交联。水凝胶按材料来源可分为三大类:天然水凝胶、合成水凝胶、生物合成水凝胶。常用的天然水凝胶包括多糖类[如海藻酸盐(alginate)、壳聚糖(chitosan)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、纤维素(cellulose)],以及蛋白质类[如胶原(collagen)、明胶(gelatin)、弹性蛋白(elastin)、层粘连蛋白(laminin)、纤维蛋白(fibrin)、丝素蛋白(silk fibroin)、基底膜提取物(BME,如基质胶, Cultrex 或EHS基质)]。常用的合成水凝胶包括聚乙二醇(分子

量小于 $20,000 \text{ g mol}^{-1}$ 的PEG和大于 $20,000 \text{ g mol}^{-1}$ 的PEO)、聚乙烯醇(PVA)、聚丙烯酰胺(PAAm)、聚异氰多肽(PIC)、聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)、聚甲基丙烯酸-2-羟乙酯(pHEMA)、聚丙烯酸(PAA)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚磷腈(PPZ)等。生物合成水凝胶包括多肽水凝胶^[34]和DNA水凝胶^[35,36]。

无论天然还是合成水凝胶,大多可以根据需要,被铸造成任何形状、尺寸和形式^[37]。如图2所示,水凝胶拥有多样化的宏观和微观结构。例如块状或平板(静电纺丝或多肽自组装纳米纤维、多孔支架)、球形水凝胶(微球、微胶珠、微胶囊)、半球形。此外,海藻酸盐可以用于制备长管形水凝胶(如空心微管、微纤维、微丝、微丝带)^[38]。其中,微胶珠和微纤维具有固体凝胶核心;微胶囊和微管具有半透膜封装的液态核心。海藻酸盐微胶囊可以通过用带正电的聚电解质涂覆微胶珠、然后使用螯合剂(例如柠檬酸钠)将其内部液化来形成,也被称为球形液化微囊膜。海藻酸盐微管可以通过类似的方法(聚电解质涂覆微纤维、螯合剂将其内部液化)或者多同轴微流控技术制备长管形液化微囊膜。近年来,随着具有高韧性、机械强度和自愈能力超

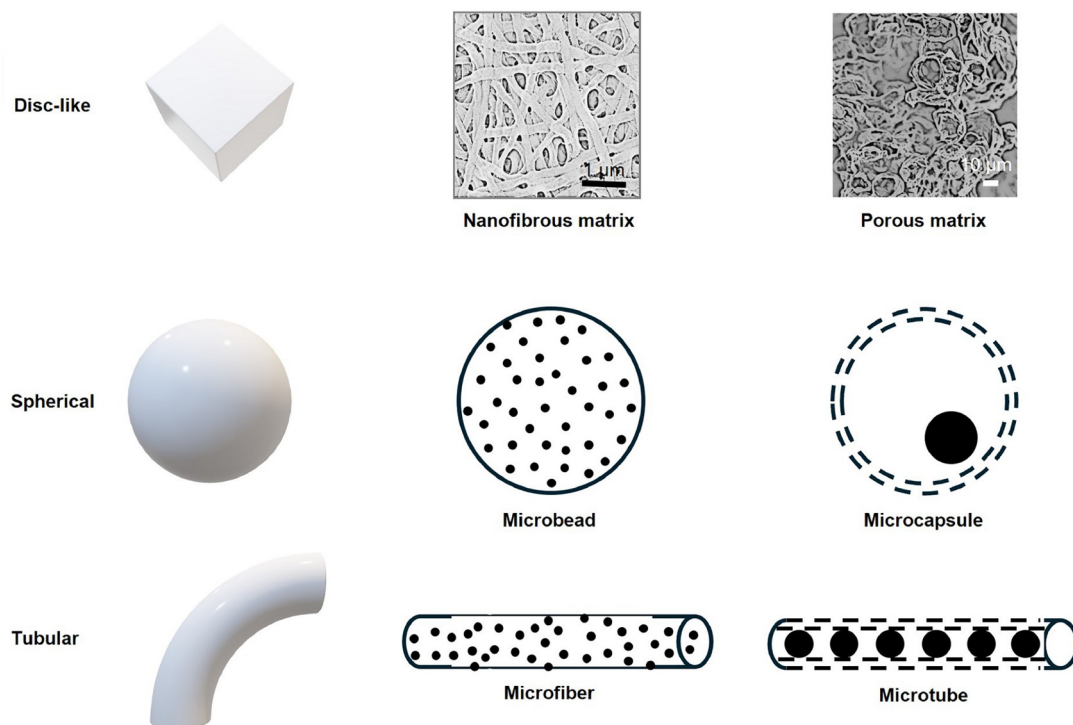


图2 (网络版彩图)具有不同形状和结构的代表性水凝胶

Figure 2 (Color online) Representative hydrogels with different shapes and structures.

分子材料, 以及3D和4D打印的研发, 形状变形和形状记忆等智能水凝胶得以构建^[39-41].

水凝胶的物理和生物化学特性包括微观结构^[42]、孔隙大小、孔隙率、膨胀率^[43]、机械性能(弹性和粘弹性)^[44]、光学特性^[45]、生物粘附性、生物活性、生物相容性和生物降解性^[46]. 这些特性可以通过水凝胶材料的来源、化学结构、分子量、浓度、交联剂或交联方法、制备参数、物理添加或化学改性得以调控. 天然水凝胶由于可以模拟细胞外基质(ECM)的糖胺聚糖(GAG)或细胞外基质蛋白质等组分, 并且具有跟细胞和组织细胞外基质相近的机械弹性, 被广泛用于细胞培养, 包括干细胞和类器官3D培养. 但是常规的天然水凝胶, 一般而言机械强度较弱, 这些动物、植物和微生物来源的水凝胶常常存在批次间的差异. 合成水凝胶成分相对固定, 通过优化和改性可以增强水凝胶的强度, 并且易于控制水凝胶的物理化学性质. 合成水凝胶以及某些天然水凝胶(如海藻酸盐)通常缺乏生物活性识别位点, 通过化学改性、细胞外基质蛋白质涂层、生物大分子偶联形成多肽、酶^[47]、DNA或适配体(aptamer)共轭物^[48], 可以获得适合细胞粘附、干细胞扩繁或分化、类器官培养、或者刺激响应型水凝胶. 此外, 天然和合成高分子材料结合各自的优点, 被用于杂化水凝胶的制备.

水凝胶的研究日新月异, 出现了具有优异机械性能的水凝胶. 例如: (1)由亲水性和热响应性聚合物合成的可注射“无溶胀”水凝胶, 其中两种独立发生的效应(膨胀和收缩)彼此相抵^[49]; (2)利用多种交联机制, 通常涉及两种聚合物链的物理缠结和化学键合, 形成互穿双网络(DN)水凝胶, 具有良好的机械性能、自粘合或自愈性; (3)通过纳米材料杂化、微晶交联或多种组分混合, 可以制备坚韧且高拉伸性水凝胶; (4)基于纳米材料杂化、静电相互作用、或滑环交联的自愈水凝胶, 在结构损坏后表现出出色的自发修复能力; (5)结构色水凝胶^[50]; (6)3D或4D可打印水凝胶^[3].

如图2所示, 水凝胶可以制成平板(如纳米纤维、多孔支架)、球形(如微胶珠、球形液化微囊膜)或长管形(如微纤维、微管或长管形液化微囊膜). 黑点代表活细胞. 细胞通常在具有固态凝胶核心的微胶珠或微纤维中形成许多均匀分布的微小细胞团; 在具有半透膜的微胶囊中会自组织形成一个大细胞团(尺寸比微胶囊直径小得多); 在具有半透膜的微管中可以自组织

形成大小均匀的细胞团(尺寸由微管直径和细胞接种密度决定).

通过将生长因子和/或小分子固定到主链聚合物上, 或者通过设计聚合物以促进与细胞和细胞外生物分子的相互作用, 可以得到具有生物活性的水凝胶. 水凝胶通过水解、蛋白水解、解缠结或环境触发, 可以实现生物降解. 通过将光降解^[51]、水解或蛋白水解位点引入聚合物网络的主链中, 或者通过细胞介导的水凝胶降解策略, 可以设计得到具有可控生物降解性水凝胶^[37].

3.2 水凝胶模拟细胞微环境

细胞微环境包括细胞外基质、分泌因子、邻近细胞, 其中细胞外基质为细胞提供了几何地形、机械和生化线索, 并且可以调控细胞的生死^[52]和干细胞的生长、分化与功能^[53]. 水凝胶是一类非常重要的细胞培养系统, 其机械弹性与人体软组织细胞外基质相近并且可调. 细胞外基质水凝胶不仅模拟体内微环境的机械特性、而且模拟细胞基质的生化特性. 如胶原、明胶、弹性蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白、基质胶、Cultrex等水凝胶可以用于模拟体内细胞微环境的细胞外基质蛋白质成分; 透明质酸水凝胶可以用于模拟体内细胞微环境的细胞外基质糖胺聚糖成分. 这些水凝胶为细胞附着提供粘附位点, 通过细胞-生物材料相互作用调节细胞增殖、分化和功能. 如果细胞外基质水凝胶通过静电纺丝或多肽自组装制备成纳米纤维平板, 或者通过相分离和冷冻干燥制备成多孔支架, 这些纤维化和多孔的微观结构更进一步为细胞提供了模拟细胞外基质几何地貌的微环境.

虽然PEG水凝胶和海藻酸盐水凝胶缺少粘附位点, 但是可以为细胞提供模拟细胞外基质机械性能的微环境, 尤其是该水凝胶可以分离机械弹性和粘弹性对于细胞的影响, 适用于研究微环境的机械性能如何独立调控细胞自组织化. 其中海藻酸盐水凝胶可以形成微胶珠或细长微纤维, 模拟细胞外基质凝胶状固态微环境, 细胞可以与凝胶基质相互作用, 分泌自身的细胞外基质和生长因子到凝胶基质中, 从而达到生长因子在水凝胶中的局部富集, 并形成一定的浓度梯度, 细胞通常在微胶珠或微纤维中均匀分布, 形成许多的微小细胞团(图2, microbead and microfiber). 此外, 海藻酸盐微胶珠经过聚电解质涂覆、螯合液化, 形成具

有半透膜包封液态微环境的微胶囊, 球形液化微囊膜为细胞自组织化提供了一个局部受控(球形半透膜)、自由迁移的微环境, 细胞微囊化的最初, 一个个细胞均匀地分布在微胶囊的液态环境中, 通过细胞-细胞相互作用, 细胞在具有半透膜的微胶囊中会自组织形成一个大细胞团, 其尺寸比微胶囊直径小得多(图2, microcapsule). 细胞在长管形液化微囊膜中, 可以自组织形成多个大小均匀的细胞团, 其尺寸由微管直径和细胞接种密度决定(图2, microtube). 由此可见, 水凝胶的形状和固态、液态微环境对细胞自组织化具有重要影响.

点击化学具有快速、正交、高产、生物相容性的优势, 可以在细胞存在的情况下, 直接进行生物共轭/偶联, 形成水凝胶或化学修饰^[54], 可以独立定制细胞培养微环境的生物力学和生化特性^[55], 进行正交动态调控^[56].

甲基丙烯酰化透明质酸水凝胶被加工成不同几何形状(例如圆柱体、棱柱、立方体和长方体), 用于研究3D细胞微环境的几何线索如何影响间充质干细胞(MSC)的分化和功能. 研究发现肌动蛋白丝、粘着斑、细胞核形状、Yes相关蛋白(YAP)/具有PDZ结合基序的转录共激活因子(TAZ)定位、细胞收缩性、组蛋白脱乙酰酶3的核积累以及间充质干细胞细胞分化的谱系选择都对细胞体积和形状敏感^[57]. 降冰片烯修饰透明质酸(NorHA)多纤维水凝胶, 具有纤维密度相关的应变响应和自修复等特性, 间充质干细胞在低纤维密度水凝胶内局部收缩, 产生宏观体积变化, 导致细胞密度和模量增加, 从而模拟天然细胞外基质由于细胞收缩而具有程序化的结构变化^[58].

分泌因子为细胞提供了生物学线索, 分泌因子(比如生长因子、细胞因子、趋化因子)对于干细胞培养类器官形成至关重要. 通过将生长因子或小分子固定到主链聚合物上, 可以形成模拟细胞微环境的生物活性水凝胶.

邻近细胞为细胞的生长与分化、组织和类器官的形成与功能提供了重要的支持. 例如, 间充质干细胞可以为细胞生长提供基质支持、以及一个抗炎、抗纤维化、促再生的微环境. 内皮细胞可以为细胞提供一个成血管(vascularization)微环境, 神经细胞可以为细胞提供一个利于神经发生、神经支配(innervation)的微环境. 免疫细胞可以为细胞提供一个免疫微环境. 水凝

胶由于其良好的生物相容性和易操作性, 可以将目标细胞跟间充质干细胞、内皮细胞、神经细胞或免疫细胞, 在水凝胶中共培养, 用于研究细胞的自组织化, 干细胞生长与分化, 以及类器官的构建、分化、成熟与功能.

4 器官发生与水凝胶内的细胞自组织化

4.1 细胞浓缩形成器官芽

早期器官发生的关键一步是通过细胞浓缩过程出现“器官芽”(organ bud). 例如, 3D肝芽通过内皮细胞与间充质细胞之间的相互作用在体内形成^[59]、体外共培养重现^[60]. 此外, 与基质细胞相关的旁分泌激活成纤维细胞生长因子(FGF)和骨形态发生蛋白(BMP)信号途径, 对于形成3D肝芽同样是必要的^[61]. 研究表明细胞浓缩不是基于活跃的细胞迁移, 而是基于细胞收缩, 肝细胞与内皮细胞(如人脐静脉内皮细胞(HUVEC))和间充质干细胞在基质胶上体外共培养, 形成一个有凝聚力的多细胞单元, 随后器官芽的半径呈指数收敛至 $\sim 2\text{ mm}$ ^[62].

器官芽的圆度从细胞培养开始单调下降(~ 10 小时达到最小值 ~ 0.5), 这是由于应力纤维和细胞-细胞连接区域的形成逐渐增加促进细胞凝聚的驱动力. 随后由于细胞与细胞外环境的粘附强度增高, 使得圆度增加, 最终在培养 ~ 20 小时达到恒定值(~ 0.85)^[62].

4.2 内皮细胞与间充质细胞相互作用促进自组织化

内皮细胞与间充质细胞对于自组织形成血管化、功能化、成熟的3D结构至关重要. 间充质干细胞的存在触动并引发细胞浓缩. 具体说来, 间充质干细胞通过肌动球蛋白细胞骨架轴产生牵引力, 在细胞集体的定向剧烈移动发挥重要作用^[62].

粘附细胞主动探测其环境的机械特性, 利用所得信息来定位和定向. 线性弹性理论模拟细胞微环境, 发现细胞在最大有效刚度的方向上加强细胞-基质接触和细胞骨架^[63]. 通过代理人基模型(agent-based model)模拟弹性基质上的内皮细胞收缩, 表明基质变形介导的细胞之间的机械相互作用可以将细胞聚集并排列成分支网络, 内皮细胞网络的形成取决于基底刚度, 长程机械相互作用为多细胞自组织提供了最佳和通用的

策略,与仅通过局部细胞相互作用相比,可以更强、更有效地形成空间跨越网络^[64]。

进一步调控细胞微环境的软硬度,可以最大化自凝聚^[62]。例如,间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞在具有不同机械弹性模量($E \approx 0.1 \sim 100$ kPa)的基质胶涂层PAAm水凝胶上共培养,细胞仅在具有中等硬度($E \approx 10 \sim 20$ kPa)的水凝胶上呈现集体定向移动,并且细胞自组织成毫米大小的凝聚体。而在较软或较硬的水凝胶上只形成较小的细胞簇($\leq 100 \mu\text{m}$)。该结果表明,细胞-水凝胶和细胞-细胞相互作用之间的竞争,在细胞浓缩的初始引发阶段,可能影响器官芽的形成。细胞快速汇聚,随后通过自组织进行空间重排,形成内皮样网络,引发组装血管化的器官芽^[62]。

血流动力学刺激对于肝芽的成熟至关重要^[61]。内皮细胞不仅形成血管用来输送营养和氧气,而且还建立了指导性血管生态位,通过旁分泌营养原的产生,来刺激肝脏器官发生和再生^[65]。3D血管化组织的形成对于异位移植后肝芽的成功植入和成熟至关重要^[62]。自凝聚方法从小鼠肝细胞与人脐静脉内皮细胞和间充质干细胞共培养,扩展到了肠、肺、心脏、肾、脑细胞/组织,甚至肝癌细胞,通过动态的集体细胞浓缩形成器官芽。器官芽移植小鼠体内后迅速血管化,血管化器官芽通过体内自组织产生了功能化胰腺和肾组织^[62]。

4.3 水凝胶微囊膜内的细胞-细胞相互作用以及器官发生

由于细胞浓缩和作为一个集体的细胞间相互作用,在器官发生中发挥重要作用,水凝胶微囊膜为细胞自组织化提供了独特的液态微环境,有利于诱导器官发生。微囊化过程简单直接,细胞密度可控(低至单个细胞/微胶囊、高至 10^8 细胞/1 mL微胶囊),细胞可以是同一种、或者多种类型,这些细胞悬浮在微胶囊中,分泌自己的细胞外基质以及细胞因子,从而相互吸引、汇聚、浓缩成细胞聚集体。同时细胞分泌的生长因子和外泌体富集在微囊膜,并形成一定的浓度梯度,结合细胞本身的自组织潜力,从而展现进一步的形态发生、器官发生。

球形液化微囊膜(海藻酸盐/聚赖氨酸/海藻酸盐/壳聚糖电解质复合膜),被用于模拟自我调节的成骨微环境,将脂肪干细胞和内皮细胞以及I型胶原蛋白功能

化的聚乳酸(PLLA)微粒封装在球形液化微囊膜中共培养,即使在没有地塞米松和抗坏血酸等分化因子的情况下,也会增强成骨作用^[66]。

带有细胞外基质内涂层的长管形液化微囊膜,被用于引导内皮细胞和平滑肌细胞自组织,快速自发形成功能性类血管。细胞在1天内自组织成两层结构:内皮细胞大多排列在管腔内表面,平滑肌细胞组成面向藻酸膜的外层,并表现出功能性血管的特性:静止状态,可灌注性,以及应对血管收缩剂的收缩性反应^[67]。内皮细胞在海藻酸盐-壳聚糖(alginate-chitosan)电解质水凝胶纤维内生长,24小时内就形成内皮血管网络,为其它细胞的组织构建,提供了一种有效的预血管化微环境^[68]。

4.4 水凝胶内干细胞自组织化和类器官构建

类器官是源自干细胞或祖细胞的细胞聚集体,经过细胞生长、分化和成熟,形成具有功能的微型器官。类器官被用作器官替代品,为研究发育生物学、遗传性疾病、细胞治疗、组织工程和再生医学提供了一个强有力的平台。类器官培养不仅可以构建功能性微器官,而且能够用于观察微肠、视杯、大脑、皮肤、心脏细胞的自组织化(表1)。

大部分类器官都是在基质胶中进行培养^[20~24,69,71],基质胶可以提供细胞外基质微环境,诱导空腔发生和组织形态发生^[72]。可是基质胶是由小鼠肉瘤细胞的分泌物制备而成,成分极其复杂,其不确定性,以及批次之间的差异,不利于阐释微环境因子对类器官发育的影响;其机械性能参差不齐,难以实现对类器官发生的精准调控;其动物、肿瘤来源,不利于类器官用于治疗研究和人体临床移植^[31]。为了应对这些挑战,非基质水凝胶(Matrigel-free hydrogels)吸引越来越多的关注^[30,31]。例如天然水凝胶海藻酸盐^[73,74]、壳聚糖^[75,76]、透明质酸^[76,77]、胶原^[78]、明胶^[79]、纤维蛋白^[80]、丝素蛋白^[81],以及合成水凝胶PEG^[82~86]、PIC^[87,88]、PAAm^[89],用于类器官培养的研发。更多的例子详见综述文章^[90,91]。

PEG被用于成分完全确定的、适于类器官培养的水凝胶研发。利用涂有I型胶原蛋白的PEG多孔支架,重现发育过程中肝祖细胞所感知的细胞外生态位的机械特性,模拟肝芽形成,所获得肝脏类器官在形态、基因表达、蛋白质分泌、药物代谢和病毒感染方面更接

表 1 类器官用于细胞自组织化的研究

Table 1 Self-organization of cells in organoids

类器官	主要研究方法	自组织化过程
微肠类器官	基质胶培养、微阵列基因分析、显微成像	肠隐窝绒毛可以在缺少非上皮细胞生态位的情况下,由单个干细胞自组织化构建:在小肠隐窝的底部,存在大约六个细胞周期的Lgr5(+)干细胞,在长期培养条件下(基质胶+生长因子EGF、R-spondin 1、Noggin),单个隐窝经历多个隐窝裂变事件.与此同时进一步的细胞扩繁产生了类器官,包括40多个由所有分化细胞类型构建的隐窝结构域,围绕中央管腔,内衬绒毛样上皮.此外单一分选的Lgr5(+)干细胞也可以启动构建这些隐窝绒毛类器官,并且Lgr5(+)干细胞层次结构在类器官中得以保持 ^[20]
微肠类器官	基质胶/胶原蛋白微型器件、显微成像	空间限制的水凝胶支架,促进肠干细胞自组织形成管腔结构的功能性肠上皮,出现类似于体内的隐窝和绒毛样结构域的空间排列 ^[69]
肠类器官	基质胶96孔板培养、单细胞定量基因组、成像方法	单细胞在均匀的促生长环境中,通过如下突发的自组织过程,形成复杂的多细胞不对称结构:转录调节因子YAP1的瞬时激活驱动再生过程,对称球体突现YAP1的细胞间变异,启动激活Notch和DLL1,并驱动对称性破坏事件,导致第一个潘氏细胞的形成.这个过程中,第一个对称性破坏事件至关重要,对称球体中只有一小部分相同的细胞分化为潘氏细胞,形成干细胞微环境并导致腺窝和绒毛等不对称结构生成 ^[24]
视杯类器官	超低粘附96孔板培养/干细胞聚集体3D培养、多光子成像和消融	小鼠胚胎干细胞聚集体在3D培养中自主形成视网膜原基视杯结构的动态过程:胚胎干细胞来源的视网膜上皮自发形成半球形上皮囊泡,这些囊泡沿着其近端-远端轴图案化,近端部分分化为机械刚性的色素上皮,而柔性远端部分逐渐向内折叠形成类似于胚胎视杯的形状,表现出互动的细胞核迁移并产生分层的神经视网膜组织.体外3D培养表明视杯形态发生取决于内在的自组织化程序,涉及针对局部上皮特性的逐步和特定域的调节 ^[21]
大脑类器官模拟人类大脑发育和小头畸形	基质胶液滴3D培养、实时共聚焦激光显微成像	基质胶3D培养在8~10天呈现具有神经特征的大脑类器官,在15~20天形成大的、连续的、表达神经特异性N-钙粘蛋白的神经上皮,围在充满液体的空腔周围.在2个月时形成大型(直径达4毫米)、复杂的异质组织,包括类似大脑皮层、脉络丛、视网膜和脑膜等区域.大脑类器官进一步用于模拟小头畸形的某些方面:患者组织来源的祖细胞区以早期祖细胞为代价,表现不成熟神经分化,放射状胶质祖细胞的创始群体未能在患者组织中适当扩张,从而导致整体大脑变小 ^[22]
大脑类器官	基质胶填充微流控芯片、CRISPR基因组编辑、转录组、原位成像	模拟大脑折叠的物理过程:经过数周的原位成像,观察到表面皱纹的出现.在临界细胞密度和最大细胞核应变条件下现涌现卷积,这表明机械不稳定性.当弹性材料受到挤压时,由于机械不稳定性,表面皱纹会自发出现.确认了导致差异生长的两种相反的力量:类器官核心的细胞骨架收缩力和类器官周围的依赖于细胞周期的细胞核扩张力.起皱波长与脑组织的厚度呈线性比例关系,与平衡的弯曲和拉伸能量一致.光滑脑类器官显示出卷积减少、比例改变和弹性模量降低 ^[23]
大脑类器官	聚(乳酸-乙醇酸)(PLGA)纤维微丝、电穿孔、实时成像、RNA测序	PLGA纤维微丝作为浮动支架产生细长的胚状体,显示出增强的神经外胚层形成和改善的皮质发育.基底膜的重建导致特征性皮质组织结构,包括极化皮质板和径向单元的形成.相比于球形类器官,微丝工程脑类器官增加了表面积,导致可重复的神经诱导,产生细长的神经上皮,模拟大脑皮层独特的径向组织,实现可靠的前脑组织结构.而球形类器官显示出杂乱的放射状神经胶质过程,在组织内的不同位置处具有终止端足,基因表达与尾部区域(特别是丘脑和小脑)的相关性更高 ^[70]
皮肤类器官	Transwell气液界面培养、单细胞RNA测序和延时实时成像	具有形态发生能力的多个球状单元(CMU),在由分子传感器、调制器和执行器组成的形态发生模块的调控下,通过如下自组织合并过程变形为在同一平面的皮肤:增加真皮的硬度作为初始驱动力激活表皮囊肿中的Yap1(传感器),Yap1的激活阈值由表皮囊肿中的Notch信号(调制器)调节.激活的Yap1诱导基底细胞中的Wnt10a/MMPs(表皮执行器)降解基底膜,从而促进细胞的流动性,表皮细胞得以从球状单元中凸起,真皮细胞表达的Rock(真皮执行器)在两个球状单元之间产生刚性力桥,并通过激活层层粘连蛋白和β1-integrin加速组织混合 ^[26]
原始心脏(primitive heart)类器官	超低粘附96孔板培养、单细胞RNA测序、拉曼、共聚焦显微成像	通过模仿子宫内胚的各个方面(例如添加代谢和激素因子),利用自组织驱动的发育诱导策略,创建具有更高生理和解剖学相关性的类器官:再现心脏发育的几个方面,包括心房、心室、心外膜器官形成,以及视黄酸介导的心管前后模式,模仿原始心脏在心血管后阶段的发育过程.心脏类器官发育过程中经过药物处理,可以创建与临床相关的先天性心脏病模型 ^[27]

近成人组织, 并且在植入免疫缺陷小鼠的肝脏后可以整合、血管化、并发挥功能^[82]. 除了细胞外基质蛋白, 多肽也用于修饰PEG水凝胶. PEG-GFOGER($\alpha 2 \beta 1$ integrin整合素结合肽)合成水凝胶支持人肠类器官和子宫内膜类器官生长和分化, 表达细胞特异性和顶端基底极性标记物^[83]. PEG-RGD (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽)合成水凝胶支持高度可重复的人肠类器官生长和扩增, 并能作为可注射载体, 推动人肠类器官的体内分化和成熟, 促进植入受伤的肠粘膜从而改善结肠伤口修复^[84]. 除了RGD修饰, 水凝胶的机械性能对于维持类器官活性至关重要. 机械动态PEG-alginate水凝胶, 在RGD和laminin 111存在的情况下, 初始阶段适合人肠类器官生长和扩增, 随机械性能的动力学调节, 允许分化和肠道类器官形成^[85]. 类似地, PEG-HA杂化水凝胶, 结合了PEG和透明质酸各自的理想属性, 通过调控可以获得最优物理和生物特性, 促进骨髓类器官的形成、维持、扩增、分化^[86]. 研发成分完全确定的天然、合成和杂化水凝胶可以替代基质胶, 用于干细胞衍生类器官的培养, 与先进的显微镜成像和各种组学相结合, 例如基因组学, 蛋白质组学, 转录组学, 表观基因组学, 代谢组学等, 用于研究细胞自组织化(图3).

5 癌细胞自组织化以及在水凝胶中肿瘤球和类器官的形成

5.1 癌细胞固有的自组织化行为

癌症调节因子根据来源可以分为三大类: 肿瘤细胞固有因子、微环境因子、生物体水平调节因子^[92].

癌细胞具有自组织和重建3D肿瘤组织的固有能力, 这种生物学特性被称为肿瘤组织平衡态, 特指肿瘤细胞通过其自主的自组织化, 促进本征组织形态生成^[93]. 肿瘤细胞经上皮-间充质转化(EMT)获得迁移特性, 离开原发灶、到达转移灶, 经间充质-上皮转化(MET), 在转移灶重建类似于原发肿瘤的转移瘤. 尽管转移灶的微环境与原发灶不同, 转移瘤的生长保留了原发器官的形态特征. 这意味着肿瘤组织平衡态在发挥作用: 癌细胞在上皮和间充质自由转换的同时, 还保留着如何恢复原发器官组织形态的记忆^[94].

综合组学分析33种癌症近一万个肿瘤样本, 显示主要按特定组织病理学的肿瘤分组^[95]. 组织形态可能

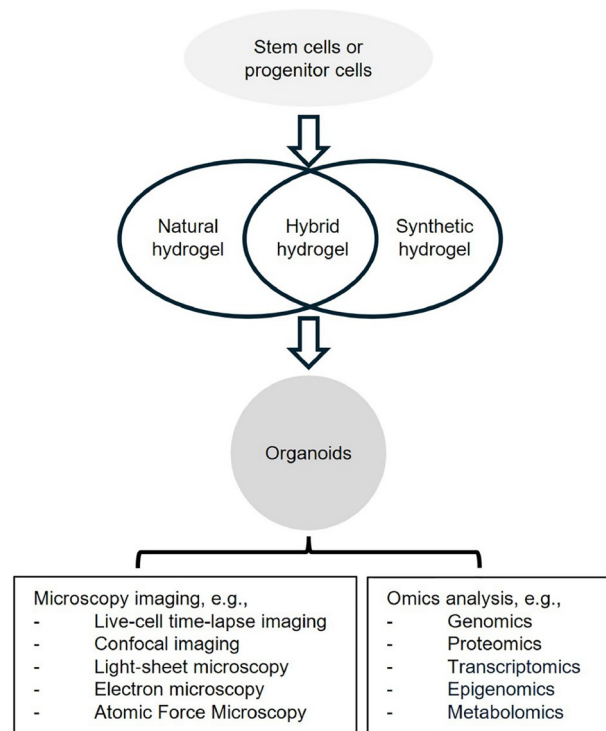


图3 基于水凝胶的类器官用于细胞自组织化研究示意图
Figure 3 Schematics of using hydrogel-based organoids for future cellular organization studies.

是通过癌细胞中多种分子变化的整合, 调控微环境因子, 而表现出来的涌现特性^[94].

5.2 组织-微环境因子调控肿瘤发生、扩散和转移

5.2.1 细胞外液粘度升高促进癌症转移

细胞外液粘度(extracellular fluid viscosity)是新兴的微环境调节因子之一, 对细胞迁移和癌症扩散有重要影响. 全血的生理粘度为4~6 cP ($1 \text{ cP} = 10^{-3} \text{ Pa s}$), 在病理异常时可超过8 cP. 利用高分子材料, 例如海藻酸盐、粘蛋白(mucin)、PEG或者PEO、葡聚糖(dextran)、甲基纤维素(MC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 可以产生远远超过生理粘度的细胞外液($\geq 40 \text{ cP}$), 细胞可以利用膜皱褶(membrane ruffling)来感知细胞外液粘度的变化并触发适应性反应^[96]. 在高粘度的环境中, 整合素(integrin)依赖性细胞扩散速率增强, 并引起肌动蛋白细胞骨架重新排列, 从而导致细胞面积变大、细胞核变平以及参与机械转导的蛋白质(YAP和 β -catenin)进入细胞核^[97], 造成癌细胞和正常细胞在2D表面上的迁移加快. 这是由于粘度的升高造成机械负荷的

增加, 细胞感知细胞外液粘度升高, 细胞骨架与离子通道和转运蛋白合作, 介导高粘度下的加速迁移. 预先暴露于高粘度的乳腺癌细胞通过Hippo通路的转录控制获得TRPV4依赖性机械记忆, 体外观察到的细胞加速迁移在体内实验得到了证实, 可见细胞暴露于高粘度的记忆会促进癌症转移^[98].

5.2.2 成纤维细胞调控肿瘤发生、扩散和转移

成纤维细胞在肿瘤发生、扩散和转移中发挥着重要作用. 癌症相关的成纤维细胞可以通过多种方式影响癌细胞迁移: 具有包封功能的成纤维细胞可以分泌胶原, 用于包封注入小鼠体内的致癌物, 从而防止肿瘤恶化; 更多时候成纤维细胞通过重组细胞外基质、分泌可溶性因子、与癌细胞建立直接的物理接触, 来调节癌细胞的迁移. 迁移成纤维细胞可以在基质上沉积一层管状结构网络膜, 以 $\beta 5$ -integrin依赖的方式稳定地锚定在基质上, 代表了成纤维细胞迁移路径的空间记忆. 癌细胞通过使用网格蛋白包被的结构挤压、内吞、特异性地粘附在管状网络膜上, 读取并覆盖成纤维细胞移路径, 并沿着该路径迁移. 这是一种基于地形的细胞-细胞间通讯系统, 成纤维细胞用它来引导癌细胞迁移^[99]. 管状结构网络膜中的一些小管合并, 会形成一个大的囊泡, 被称作迁移体. 迁移体不稳定, 在形成后不久就会破裂并释放其信号分子, 或者被周围细胞内吞. 虽然成纤维细胞可以形成迁移体, 但是尚不清楚迁移体是否为癌细胞的迁移指引方向. 有研究表明迁移体可以提供特定的生化信息来协调器官形态发生^[100,101].

5.2.3 上皮细胞与肿瘤发生

上皮细胞是大约90%癌症的来源. 上皮细胞形成细胞间粘附, 表现出顶端/基底极性, 并将其有丝分裂纺锤体定向在上皮层的平面上. 这些本征属性的缺陷会导致组织化的瓦解, 引起癌变. 上皮组织通过干细胞进行自我更新, 在某些情况下干细胞有可能引起癌症. 极性蛋白是上皮组织的主要调节因子, 与Hippo等信号通路密切相关, 协同调节细胞增殖和凋亡, 从而控制器官的大小^[102]. 3D离体培养系统可以重现上皮器官形态发生, 为研究正常发育和肿瘤发生的起始事件提供了一种强有力的方法.

5.3 水凝胶中肿瘤球和类器官的形成

5.3.1 癌细胞自组织化与多细胞肿瘤球

癌细胞通过不受控制的增殖生长形成肿瘤. 肿瘤从结构上看是多层、异质的细胞聚集体. 这些细胞层限制物质扩散进出肿瘤而产生生理梯度. 肿瘤的外层细胞更容易获得营养、生长因子和氧气, 肿瘤核心的细胞对这些营养的获取受到限制, 同时细胞代谢废物在肿瘤中心积聚、形成有毒的环境, 因而肿瘤增殖细胞位于表面、静止状态的细胞位于中间、凋亡/坏死细胞位于肿瘤核心.

多细胞肿瘤球可以重现体内肿瘤的结构、生长动力学、以及肿瘤细胞和微环境的相互作用^[103]. 原代肿瘤细胞或者癌细胞系单独、或者与成纤维细胞、血管内皮细胞、或者免疫细胞一起, 利用悬滴法、非粘附表面培养、旋转细胞培养、离心、磁悬浮法, 或者基于支架的3D培养技术可以形成多细胞肿瘤球.

癌细胞自组织化形成多细胞肿瘤球包括三个关键步骤: (1)分散的细胞最初被拉近, 通过integrin-ECM形成松散的细胞团块, 细胞间接触上调钙粘蛋白表达; (2)钙粘蛋白在细胞膜表达和积累; (3)由于同质钙粘蛋白-钙粘蛋白结合, 细胞被压紧实形成紧凑的多细胞肿瘤球^[104]. 多细胞肿瘤球比2D培养能更好地模拟肿瘤结构和微环境, 提供了模拟体内肿瘤结构、生理病理学、基因表达、药物反应的体外模型^[105].

5.3.2 水凝胶中的多细胞肿瘤球形成

如图4所示, 水凝胶是一类非常重要的支架材料, 已经用于癌细胞自组织化、多细胞肿瘤球培养^[106], 包括基质胶^[107]、胶原^[108,109]、纤维蛋白^[109,110]、透明质酸^[111,112]、壳聚糖^[113]、海藻酸盐^[114-116]等天然水凝胶, 以及PEG^[117]、PNIPAAm^[118]等合成水凝胶(表2). 基质胶最早的应用是添加到培养基中, 诱导难以生成肿瘤球的癌细胞自组织, 形成致密的肿瘤球^[107]. 由于基质胶来源于肿瘤基质提取物, 除了用于多细胞肿瘤球培养, 基质胶和I型胶原蛋白广泛用于体外肿瘤转移模型进行3D细胞侵入性检测, 或者用于从肿瘤球中分离癌症干细胞^[119]. 将I型胶原蛋白添加到基质胶会使得肿瘤球中的乳腺癌细胞更具侵入性. 另外胶原蛋白作为肿瘤细胞外基质的主要成分之一, 被单独或者与其他水凝胶材料一起用于多细胞肿瘤球培养.

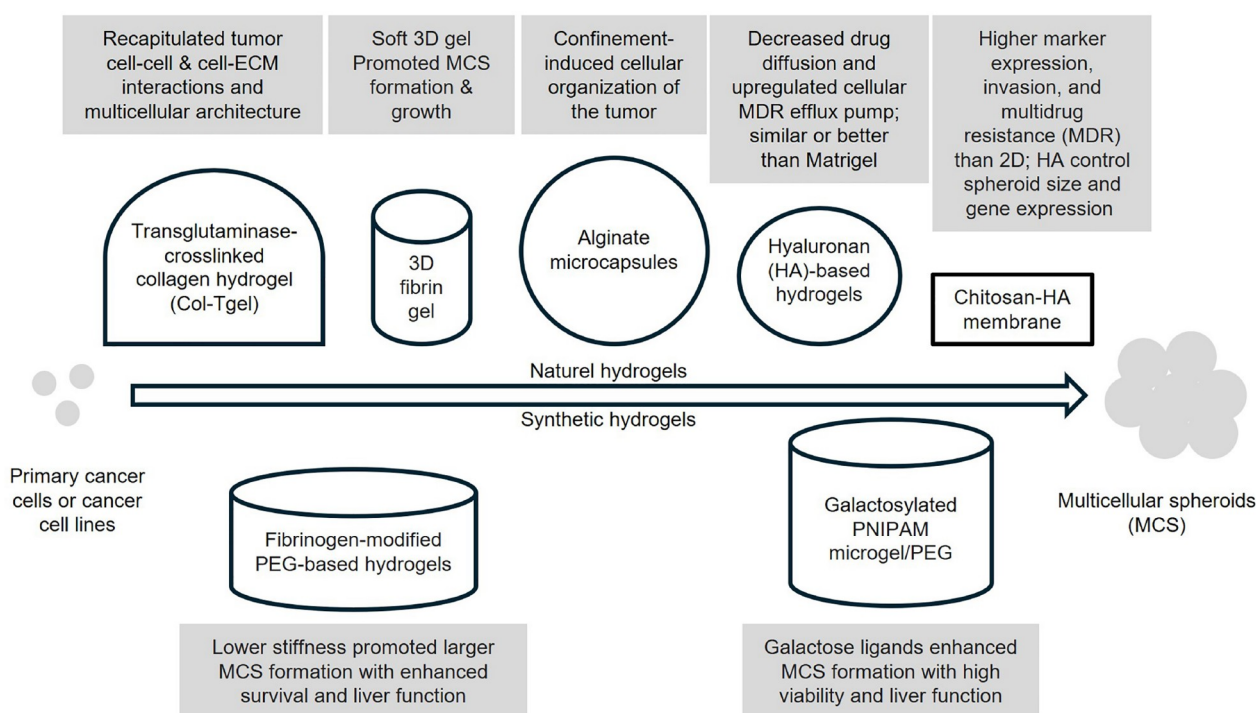


图 4 水凝胶用于多细胞肿瘤球代表性研究示意图

Figure 4 Schematics of representative hydrogels for multicellular spheroids (MCS).

由于基质胶存在批次间差异、成分不确定、不容易控制其物理性能,人们研发了弹性刚度可控的水凝胶,利用细胞外基质蛋白或多肽修饰水凝胶,用于多细胞肿瘤球培养。比如,利用点击化学和生物正交化学策略,由脲交联独立控制透明质酸水凝胶的机械性能、同时由Diels–Alder反应在同一聚合物主链共轭多肽独立控制其生化性能。人乳腺癌上皮细胞在该透明质酸水凝胶中培养,不仅生成类似于基质胶培养的肿瘤球,而且产生比基质胶培养更强的耐药性、更好的药物反应^[111,112]。人非小细胞肺癌细胞在透明质酸接枝的壳聚糖-透明质酸膜上形成3D肿瘤球,与2D培养的细胞相比,表达更高水平的干细胞样特性、上皮-间充质转化标记物、浸润性和多药耐药性基因^[113]。

Fang等人^[108]利用基于胶原蛋白的圆顶水凝胶,观察到多个多细胞肿瘤球的形成、及乏氧的肿瘤微环境。最初接种时,细胞均匀分布在整个圆顶凝胶中。培养48小时后,形成2~3个细胞组成的聚集体。通过细胞增殖和组装形成初始细胞簇,4天后,细胞簇扩增至10~20个细胞的聚集体。6天后,大量表面光滑、形状

从圆形到椭圆形、10~100个增殖细胞组成的肿瘤球围绕在凝胶圆顶的外周。越靠近圆顶中心,肿瘤球越小,肿瘤细胞进入静止状态或形成坏死中心。培养第一天水凝胶和培养基之间的氧气水平没有差异,随着培养时间的增加,水凝胶中的氧水平低于周围培养基,并且随着培养时间的延长而显著下降。在活跃增殖的癌细胞周围观察到乏氧环境,这一特征可以用于模拟体内观察到的无血管和乏氧肿瘤微环境。

Alessandri等人^[114]利用海藻酸盐微胶囊半透膜研究了弹性约束下,单个多细胞肿瘤球发生发展机制。未包封自由生长的肿瘤球初始呈指数增长(平均倍增时间17小时),随后是幂律体积增加($V \propto t^3$)。这两个阶段之间的过渡,受营养物质扩散渗透到肿瘤球的调控,因此也受肿瘤球尺寸的调控。当肿瘤球半径超过200 μm 的扩散极限,肿瘤球呈现异质性(黑色的坏死核心被薄薄的活细胞外围层所包围);当半径在200~350 μm 之间,肿瘤球显示出纯表面生长状态(半径膨胀速度32 $\mu\text{m d}^{-1}$)。微胶囊半透膜包封的癌细胞长满之前,其体积增加率与自由生长的肿瘤球没有差别。当细胞长满之后,肿瘤球的尺寸看起来趋于平稳,实际上受微

表 2 物理改性或化学修饰水凝胶用于多细胞肿瘤球的代表性研究

Table 2 Representative multicellular tumor spheroids in hydrogels with physical or chemical modification

水凝胶	物理或化学修饰	癌细胞	多细胞肿瘤球研究结果
胶原蛋白(collagen)	转谷氨酰胺酶交联明胶凝胶(Col-Tgel), 通过改变明胶浓度调控水凝胶的弹性刚度	人乳腺癌MDA-MB-231、骨肉瘤Saos-2、结直肠癌HCT116、前列腺癌C4-2B、口腔鳞癌SCC-71细胞系	圆顶凝胶(Col-Tgel dome)形成异质肿瘤球, 重现体内乏氧微环境、肿瘤耐药性, 可用于肿瘤异种移植的载体 ^[108]
纤维蛋白(fibrin)	通过改变纤维蛋白浓度调控水凝胶的弹性刚度(1, 4, 8 mg mL ⁻¹ 纤维蛋白依次对应于90, 420, 1050 Pa的弹性模量)	细胞系: 小鼠黑色素瘤B16-F1、淋巴瘤EL4、肝癌H22、肥大细胞瘤P815; 人卵巢癌A2780、肝癌HepG2; 来自乳腺癌患者和白血病患者肿瘤病人的原代肿瘤细胞	较软的凝胶内有更多的增殖细胞, 导致较多、较大的细胞集落(colonies)。癌细胞在最佳刚度90 Pa的3D纤维蛋白水凝胶中培养, 生长成肿瘤球。肿瘤球中的细胞表达干细胞标记物、具有自我更新能力、并且获得肿瘤生成能力。只有10个这样的细胞, 就能在小鼠的肺部存活并形成肿瘤。该纤维蛋白水凝胶刚度调节癌细胞牵引力(traction), 但不调节致瘤细胞的刚度(stiffness) ^[110]
纤维蛋白/胶原蛋白(fibrin-collagen)	添加转谷氨酰胺酶、抗纤维蛋白溶解剂氨甲环酸和抑肽酶以提高机械稳定性	3D打印内皮细胞(GFP-HUVEC)和/或基质细胞(成纤维细胞和间充质干细胞)、肿瘤球体(人皮肤鳞状细胞癌DiD-A431)	3D水凝胶基质促进多细胞肿瘤球体与内皮细胞相互作用, 促进血管网络的生长、增强共培养肿瘤球体的生长。自组装的毛细血管网络浸润到肿瘤块中, 与生物打印的内皮形成功能连接, 允许红细胞灌注, 以及癌细胞从最初的肿瘤细胞团自发迁移到循环中。在该生物反应器中培养源自癌症患者的样品, 能够捕获人类恶性肿瘤的表型异质性, 并保留与亲本肿瘤相同的特征(结缔组织形成、血管生成和转移倾向) ^[109]
透明质酸(hyaluronan, HA)	利用脒交联控制水凝胶的机械性能(0.60~9.69 kPa)、利用Diels-Alder点击化学在同一透明质酸聚合物主链共轭多肽以控制水凝胶生化特性; 将快反应的透明质酸-醛、慢反应的透明质酸-酮与聚乙二醇-羟胺结合, 通过脒点击化学合成脒交联透明质酸水凝胶(oxime-HA)	人乳腺癌上皮细胞系T47D和MCF-7, 或者T47D、BT474、MDA-MB-468和MDAMB-231-H2N	双功能透明质酸水凝胶(弹性模量约0.6 kPa + 层粘连蛋白 $\alpha 1$ 模拟IKVAV多肽)支持类似于基质胶培养的肿瘤球形成, 表现出下降的药物渗透, 重现肿瘤多药耐药蛋白MDR1的表达 ^[111] ; Oxime-HA水凝胶支持乳腺癌细胞形成肿瘤球、保持与异种移植肿瘤相近的基因表达谱、做出比基质胶培养更好的药物反应 ^[112]
壳聚糖/透明质酸平板膜(chitosan-HA membrane)	利用碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)交联壳聚糖膜上进行三种剂量的透明质酸接枝	人非小细胞肺癌A549、H1299细胞系	chitosan-HA membrane上形成的肿瘤球, 与2D培养相比, 膜上培养的肿瘤球体中的细胞, 表达更高水平的干细胞样特性和上皮-间质转化标记物, 表现出增强的侵袭活性和多药耐药性。透明质酸接枝密度影响肿瘤球体大小和基因表达 ^[113]
海藻酸钙半透膜微胶囊(alginate microcapsules)	通过操作参数控制微胶囊直径(200~300 μm)和膜厚度(5~35 μm)	小鼠结肠癌WT CT26细胞系	癌细胞在有弹性的、空心的微胶囊半透膜内生长成多细胞肿瘤球, 随着肿瘤球体的增长微胶囊膜内的压力增加并累积到稳态值, 这些限制条件增加了细胞密度并影响肿瘤球的细胞自组织化。肿瘤球长满细胞后, 出现坏死核心, 外围细胞层由有增殖能力的并持续移动的组织组成 ^[114]
聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)	光聚合PEGDA和PEGDA-纤维蛋白原共轭物(PEGDA-fibrinogen); 通过改变PEGDA浓度调控水凝胶的弹性刚度(0.1~6 kPa)	人肝癌Huh7.5细胞系	在三周内形成了50~200 μm 肿瘤球。刚度较低的水凝胶支持更大肿瘤球的形成, 更高的细胞增殖、白蛋白分泌和CYP450表达。与PEGDA相比, 纤维蛋白原改性PEGDA水凝胶支持更大的肿瘤球形成和更强的功能 ^[117]
聚(N-异丙基丙烯酸酯)/聚乙二醇(PNIPAAm-PEG)	利用碳二亚胺交联(EDC)进行半乳糖配体修饰	人肝癌HepG2细胞系	半乳糖基化PNIPAAm-PEG水凝胶, 促进更加致密的多细胞肿瘤球形成, 表现出更高水平的白蛋白分泌和尿素合成肝功能。利用其温度响应的性能, 可以通过冷却到室温得以液化水凝胶, 从而收获多细胞肿瘤球 ^[118]

囊膜弹性约束的肿瘤球未达到一个固定尺寸, 癌细继续以非常缓慢的速度增长[生长速度(几个微米/天)相比于未包封自由生长的肿瘤球, 降低了一个数量级]. 当肿瘤球在较薄的微囊膜中培养时, 胶囊变形增加, 半径最大扩张约40%, 薄胶囊在8~12天内破裂, 释放后的肿瘤球恢复与自由球体相当的生长速度. 当肿瘤球在较厚的微囊膜中培养时, 在半径350 μm 大胶囊中, 在细胞长满之前, 由于营养物扩散的限制而产生的深色核心就变得可见; 在半径100 μm 小胶囊中, 随着细胞长满, 强吸光核心在肿瘤球汇合、最终覆盖了胶囊的主要部分, 留下了周围一圈儿细胞薄层, 这是由于微囊膜弹性约束引起了细胞分裂和死亡率的变化造成的. 微囊膜内的压力在细胞长满后的24小时内迅速增加, 在阈值压力(2.2 kPa)下, 压力增量急剧下降并达到稳态值. 一旦肿瘤球被有效压缩, 就会增加坏死事件的发生. 微囊膜内长满后的肿瘤球, 其坏死核心由细胞外物质混合物粘合而成, 外围细胞层由有增殖能力的和高度迁移能力的细胞组成. 而未包封自由生长的肿瘤球保持癌细胞间的粘着性, 有增殖能力的癌细胞均匀分布在肿瘤球中. 微胶囊半透膜的压缩应力对减缓肿瘤进化有益影响, 但可能引发癌细胞浸润和转移潜力.

5.3.3 水凝胶中的肿瘤类器官形成

随着干细胞和类器官培养的研究进展, 各种肿瘤类器官被用于重现体内肿瘤的组织形态学^[28,29]. 如表3所示, 大部分肿瘤类器官是利用在基质胶中培养来自癌症患者的肿瘤(和邻近的正常组织标本)建立的, 包括前列腺^[120]、胰腺^[121]、结直肠^[122]、胃肠^[123]、肺^[124]、乳腺^[125]肿瘤类器官等等. Cultrex用于建立来自癌症患者的乳腺肿瘤^[126]或卵巢肿瘤^[127]类器官.

Fang等人^[128]利用海藻酸盐微胶珠, 建立了高通量小鼠乳腺肿瘤类器官, 自组织形成管腔状和实心的类器官结构, 类器官的管腔压力随着管腔的增长而增加, 培养两周后可达到2 kPa, 药物反应与类器官的管腔大小和压力有关. Chaudhuri等人^[129]利用基质胶-海藻酸盐(Matrigel-alginate)互穿水凝胶, 表明细胞外基质硬度和成分共同调控乳腺上皮恶变表型的诱发. 除了微胶珠和微胶囊半透膜^[130], 海藻酸盐还可以形成微纤维和微管水凝胶^[38,131], 将之用于肿瘤类器官培养, 具有易于操纵^[132,133], 非常高的长径比和表面积适用于高密

度细胞培养^[134], 可以重现直接或间接的细胞间相互作用^[74,135,136], 有望为研究癌细胞自组织化、肿瘤发生、转移提供更好的替代平台.

此外, 纤维素-明胶(cellulose-gelatin)纳米纤维水凝胶、胶原凝胶分别用于乳腺肿瘤类器官培养, 重现肿瘤异质性^[137], 乳腺肿瘤前导细胞对肿瘤集体迁移和扩散发挥指导作用^[138,139]. 虽然前导细胞是异质的, 角蛋白-14/钙粘蛋白-3阳性(K14+/Cdh3+)的前导细胞足以导致集体迁移^[138,139].

通过对神经胶质瘤的综合空间分析和超低粘附平板脑肿瘤类器官培养, Greenwald等人^[140]发现了三种空间组织模式: (1)神经胶质瘤由小的局部环境组成, 每个环境通常富含一种主要的细胞状态, 表明空间位置在调节细胞状态中起着核心作用; (2)特定的状态对在多个尺度上呈现状态-状态关联; (3)这些成对的相互作用共同定义了一个五层的全局架构: 最内层乏氧生态位、乏氧相邻层、血管生成免疫中枢、恶性神经发育状态、最外层正常脑实质. 为肿瘤中细胞状态的组织化提供了一个概念框架, 该框架强调乏氧作为一种长程肿瘤组织的组织者, 乏氧会驱动细胞层, 似乎成为肿瘤自组织化的核心驱动力.

综上所述, 细胞外基质水凝胶可以为肿瘤类器官的形成提供模拟肿瘤细胞外基质的微环境, 尤其是小鼠肿瘤基底膜提取物(基质胶或Cultrex), 富含各种细胞外基质蛋白质和生长因子, 对于肿瘤类器官培养具有优势. 其它天然水凝胶(如海藻酸盐、透明质酸、纤维素)或合成水凝胶(如PEG、PNIPAAm)可以提供机械弹性和粘弹性可调可控的3D微环境, 添加基质胶、Cultrex、以及其它细胞外基质蛋白质, 可以促进肿瘤类器官的形成(图5). 利用水凝胶进一步揭示和调控癌细胞自组织化, 将了解肿瘤发生、大规模高通量构建肿瘤类器官提供见解. 肿瘤类器官的高通量培养将为临床前药物靶点验证和个性化医疗提供非常有前途的工具. 不仅可以作为更广泛的癌症研究的临床前模型, 而且还可以为晚期疾病患者提供预测性药物筛选个性化、治疗建议.

6 总结与展望

自组织化原则对于细胞组织形态发生与功能、器官发生和肿瘤发生等生物学过程具有重要的指导意

表 3 水凝胶用于肿瘤类器官的代表性研究

Table 3 Representative tumor organoids in hydrogels

水凝胶	癌细胞	类器官研究结果
基质胶(Matrigel)	前列腺癌转移样本; 来自去势抵抗性前列腺癌循环肿瘤细胞(circulating tumor cells)	建立了7个前列腺癌类器官系, 这些类器官重现了前列腺癌亚型的分子多样性、具有侵袭性前列腺癌的拷贝数改变、癌症晚期的DNA修复和染色质修饰途径突变、肿瘤抑制通路的缺失. 人前列腺癌类器官系在体外和体内再现原位组织学, 可遗传操作, 作为药物反应模型 ^[120]
基质胶凝胶包埋(embedded)	小鼠正常胰管、胰腺肿瘤和转移瘤; 患者来源的胰腺癌组织和邻近的正常胰腺组织	胰腺类器官可以重现小鼠和人胰腺上皮内瘤变、胰腺导管腺癌发生发展. 对小鼠胰腺类器官的RNA测序和蛋白质组学分析揭示了疾病进展过程中基因和途径的改变 ^[121]
基质胶凝胶包埋(embedded)	结直肠癌患者来源的正常隐窝(crypts)和肿瘤上皮组织	通过培养来自20名结直肠癌患者的上皮组织, 建立了正常结直肠和肿瘤类器官库. 类器官与原始肿瘤非常相似、代表了主要的结直肠癌分子亚型. 该肿瘤类器官适合高通量药物筛选、检测基因-药物关联 ^[122]
基质胶凝胶	来自参加前瞻性I/II期临床试验的转移性胃肠癌患者的组织活检(biopsies)	70%的活检可以长出胃肠肿瘤类器官, 这些类器官的表型和基因型与最初来源的患者活检组织高度相似, 可以有效预测患者对靶向药物或化疗的反应(100%敏感性、93%特异性、88%阳性预测值和100%阴性预测值) ^[123]
圆顶形基质胶(Matrigel domes)	早期非小细胞肺癌患者手术切除的原发肿瘤(30个); 先前建立的患者来源的异种移植肿瘤(35个)	建立了非小细胞肺癌类器官, 这些类器官重现了患者和异种移植肿瘤的组织学特征, 并且保留了致癌性, 包括恶性肿瘤的细胞学特征、异种移植肿瘤的形成、突变和畸变拷贝数的保留、以及与亲本肿瘤组织相近的基因表达谱. 这些类器官还保留了亲本肿瘤对靶向治疗药物的敏感性 ^[124]
基质胶凝胶	来自参加III期临床试验乳腺癌患者的肿瘤和邻近的正常组织标本	建立了99个乳腺癌类器官系(75%成功率), 包括广泛的乳腺癌治疗状态、疾病阶段和分子亚型. 这些类器官重现了亲本肿瘤的组织病理学和遗传特征, 很好地保留了原发肿瘤对于治疗的反应, 可以作为实时平台来指导晚期乳腺癌的临床药物治疗 ^[125]
基底膜提取物Cultrex凝胶滴	患者来源的乳腺癌组织	建立了100多个原发、转移乳腺癌类器官系. 这些类器官重现了原发肿瘤的组织学和基因组特征、体现了肿瘤异质性, 可以进行基因编辑, 用于药物筛选、体内药物反应检测 ^[126]
基底膜提取物Cultrex凝胶滴	患者来源的卵巢癌组织	通过培养来自32名患者的组织, 建立了56个卵巢癌类器官系, 涵盖卵巢癌的所有主要亚型. 这些类器官重现了相关病变的组织学和基因组特征、体现了肿瘤异质性; 可以进行基因改造; 可用于药物筛选, 并捕获不同肿瘤亚型对铂类化疗药物的反应(包括耐药性); 可以用于异种移植, 从而实现体内药物敏感性检测 ^[127]
海藻酸盐微胶珠(alginate microbeads)	小鼠乳腺肿瘤组织	利用非粘附性海藻酸盐微胶珠, 建立了高通量小鼠乳腺肿瘤类器官, 自组织形成管腔状和实心的类器官结构, 类器官的管腔压力随着管腔的增长而增加, 培养两周后可达到2 kPa. 药物反应与类器官的管腔大小和压力有关 ^[128]
纤维素纳米晶-明胶纳米纤维水凝胶(EKGel)	患者来源的各种类型的原代乳腺癌细胞	在EKGel中生长的患者来源的肿瘤类器官, 具有组织病理学特征、生物标记物基因表达和药物反应异质性, 与亲本肿瘤和在Cultrex上生长的肿瘤类器官相似 ^[137]
胶原凝胶(collagen)	小鼠PyMT原发性乳腺肿瘤类器官, 异种移植转移性肿瘤, 4T1肿瘤球	在集体迁移过程中, 前导细胞是异质的, 角蛋白-14/钙粘蛋白-3阳性(K14+/Cdh3+)的前导细胞足以导致集体迁移. K14+前导细胞利用微环境中的化学和机械线索实现极化并到达集体迁移肿瘤的前沿. 在细胞迁移的前沿, Cdh3通过局部控制前导细胞突起动力学产生层粘连蛋白、维持整合素活性和功能. Cdh3依赖性前导细胞保持突起的稳定性, 通过产生高的突起力克服前沿的细胞外基质阻力 ^[138,139]
超低粘附6孔板培养	切除的患者胶质母细胞肿瘤组织	综合空间组学分析揭示了胶质母细胞瘤的多层组织模式: (1)细胞往往被处于相同状态的其他细胞包围(特定状态细胞簇), 形成个体状态高度富集的局部环境; (2)许多状态对在结构化区域的多个尺度上(点内、相邻点内和小组织区域内)一致关联(状态-状态关联); (3)结构化区域中状态之间的关联并集成五层的高阶组织, 使得每层中的状态仅与同一层或相邻层相关联(状态层). 其中四层与组织学特征基本一致, 并允许添加乏氧相关状态层, 乏氧似乎是该肿瘤自组织化的核心驱动力, 每一层都可以通过其与乏氧的关系来解释. 胶质母细胞瘤类器官的乏氧研究证实了这一点 ^[140]

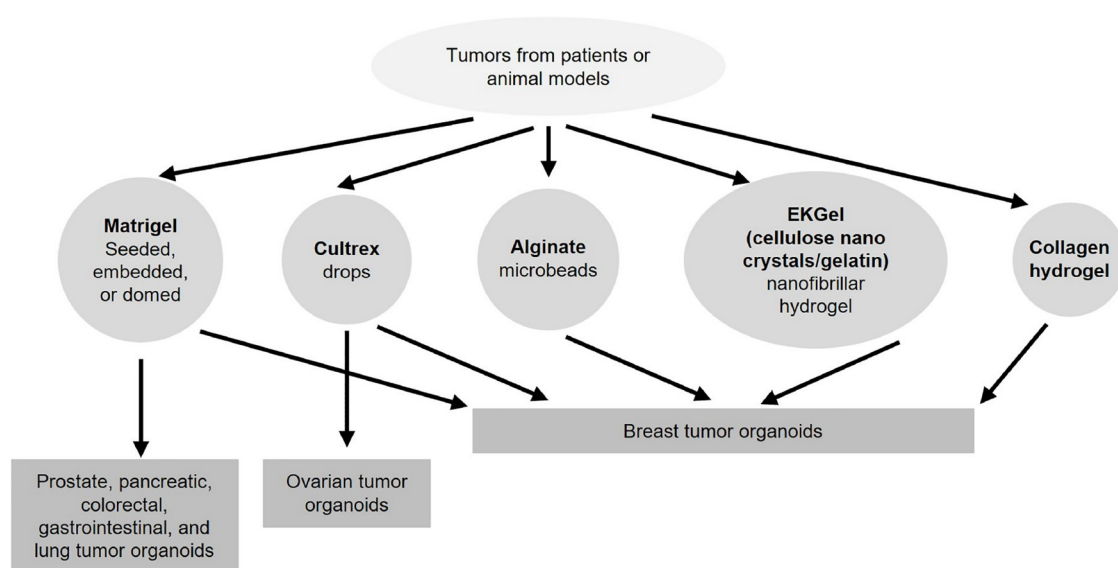


图 5 水凝胶用于细胞自组织化形成肿瘤类器官示意图

Figure 5 Representative hydrogels used for cellular organization to form tumor organoids.

义. 随着多学科的交叉, 分子生物学和细胞生物学先进技术手段的出现(如单细胞RNA测序、空间转录组学、蛋白质组学、实时显微成像、人类多能干细胞技术、类器官培养), 近年来, 人们对于细胞自组织化的认识逐渐地深入, 从最初发现细胞骨架微管自组织化机制, 发展到揭示人类心脏的综合细胞图谱, 以及脑肿瘤的多层组织模式. 然而还有很多空白需要填补, 对于细胞自组织化机理缺乏充分的理解.

水凝胶被广泛用于3D培养、干细胞扩增分化、组织工程和细胞治疗, 目前开始用于类器官培养, 成为研究细胞自组织化的理想体外模型系统. 现有的水凝胶用于细胞自组织化研究, 有各自的优势和不足(表4). 缺少粘附位点的海藻酸盐和PEG水凝胶适合于研究细胞如何利用其自组织潜力, 在物理、机械性能可调可控的3D微环境中进行自组织化; 细胞外基质水凝胶可以为细胞自组织化提供模拟细胞外基质的微环境. 海藻酸盐或PEG结合细胞外基质蛋白质形成杂化水凝胶可以克服各自的不足. 虽然基质胶广泛用于类器官培养, 但是这些类器官仅适用于体外模型或肿瘤模型, 不适合用于细胞疗法、组织再生的体内植入. 需要研发更多具有确定成分的合成、天然和杂化水凝胶, 例如具有良好仿生性能的PIC水凝胶, 有望取代基质胶用于类器官培养细胞自组织化研究.

随着先进水凝胶、以及3D和4D生物打印的技术创新, 可以设计研制适于细胞自组织化研究的高性能水凝胶, 例如可实现刚度、韧性和细胞相容性仿生组合的可控可逆自修复水凝胶^[146], 模拟细胞外基质粘弹性的动态应力松弛合成水凝胶^[147], 可编程CRISPR响应智能水凝胶^[148], 可用于蛋白质输送、细胞捕获、分子生物传感的适配体功能化水凝胶^[149], 具有自愈性、热响应性、以及可控降解性的DNA交联水凝胶^[150], 微成型加工含有多个微图案化细胞分区的水凝胶^[151], 模拟干细胞培养中信号中心、建立动态的空间定向的浓度梯度的微流控技术^[152,153], 重现宏观组织自组织化的类器官生物打印^[154]. 这些水凝胶培养系统可以用于重现体内细胞微环境, 调节和控制多细胞相互作用, 提供从单细胞到工程化组织再到类器官的多尺度、具有动态的时间和空间调节功能功能自组织化体外研究平台. 同时用于验证体内研究结果, 可以推动发育生物学以及癌症生物学的发展. 随着对细胞和细胞自组织化从分子、遗传、细胞、组织框架层面的深入理解^[154~164], 以及人工智能与机器学习广泛应用^[165~167], 可以利用智能水凝胶进一步动态引导细胞自组织化行为, 为类器官细胞治疗、组织工程、再生医学以及人工生命^[168]提供指导和促进作用. 智能水凝胶用于细胞自组织化研究具有广阔的应用前景.

表 4 常见水凝胶用于细胞自组织化研究的优点和缺点

Table 4 Pros and cons of current hydrogels for cellular organization studies

水凝胶		优点	缺点	建议
天然水凝胶	海藻酸盐 [38,59-61,73,74,85,114-116,128-136]	具有温和的凝胶条件;易于制备多样化宏观和微观结构(如微胶珠、球形液化微囊膜、微纤维、微管膜、多孔支架、纳米纤维、薄膜);低成本;理化和机械性能可控	缺乏生物识别位点;长期稳定性差	利用球形液化微囊或微管膜研究3D微环境中各种细胞间相互作用,以及细胞自组织化行为;适用于研究粘弹性对自组织化的影响;利用杂化水凝胶改善机械强度,添加粘附位点
	胶原 [78,108,109,137-139]	模拟细胞外基质微环境;促进细胞粘附,改善细胞与细胞外基质之间的细胞铺展和力信号传递	降解速度快;机械强度低;诱导干细胞分化的能力有限	与其它高分子材料交联、利用杂化水凝胶改善机械强度
	纤维蛋白 [80,109,110]	模拟细胞外基质微环境;具有促进血管生成和组织再生、增强愈合的生物活性	降解速度快;长期稳定性差	加入增强材料或进行修饰,以提高机械强度
	透明质酸 [57,58,111,112]	模拟细胞外基质多糖成分,为细胞提供抗压强度、润滑和水合作用;调节细胞粘附和运动	纯透明质酸无法通过3D生物打印形成特定的水凝胶	利用其可化学交联修饰的优势,合成适用于细胞自组织化研究的复合或杂化水凝胶
	基质胶 [30,31]	富含各种细胞外基质蛋白质和生长因子;模拟细胞外基质微环境	小鼠肿瘤提取物;成分不固定;批次间差异	适用于多细胞肿瘤球、肿瘤类器官培养、癌细胞自组织化研究
	丝素蛋白 [81,141]	多样化宏观和微观结构(凝胶、多孔支架、纳米纤维、薄膜);机械强度远高于其它天然水凝胶;可高压灭菌	可用于化学修饰的氨基酸侧链基团总含量有限	由于其相对高的刚度,适用于骨、软骨和韧带等细胞的自组织化研究
合成水凝胶	聚丙烯酰胺 [53,62,89,142]	易于调节的生物机械特性,为细胞提供一个刚度可调控的微环境	缺乏生物活性,需要胶原或基质胶涂层;单体具有一定的毒性,需要化学交联或光聚合,不适合原位细胞封装	适用于研究生物机械特性对于细胞自组织化的影响
	聚乙二醇 [82-86,117,118]	成分完全确定;具有可塑性;机械弹性和粘弹性可控;易于与其它凝胶材料结合形成杂化水凝胶	水凝胶的长期稳定性差;缺少粘附位点;需要光诱导或化学交联,不适合原位细胞封装	利用杂化水凝胶改善机械稳定性,添加粘附位点;开发适合原位细胞封装的凝胶交联,促进细胞自组织化研究
	聚异氰多肽 [87,88,143]	成分完全确定;具有良好的仿生性和可调节性;热可逆凝胶化(无需酶或光诱导交联,低温可释放细胞);为细胞提供一个主动生物力学适配的微环境	生物惰性材料;用于类器官培养时,需要粘附肽RGD缀合或添加层粘连蛋白	利用生物肽修饰,开发具有替代基质胶潜力的水凝胶;通过链长或侧链修饰调控性能;3D打印和微加工制备具有宏观和微观结构水凝胶,促进细胞自组织化
	聚(N-异丙基丙烯酸酰胺) [118,144,145]	具有温敏性;有望作为传感器来监测细胞自组织过程	溶胀状态下聚合物密度低,水凝胶力学性能差;温度响应速率慢	利用杂化水凝胶改善力学性能;开发双重响应智能水凝胶,如pH/温度、磁/温度、光驱动反馈控制

致谢 衷心感谢袁权先生和马小军研究员引领本人进入微囊膜用于细胞自组织化的研究领域.

参考文献

1 Misteli T. *J Cell Biol*, 2001, 155: 181-186
2 Wedlich-Söldner R, Betz T. *Phil Trans R Soc B*, 2018, 373: 20170103
3 Zhang YS, Khademhosseini A. *Science*, 2017, 356: eaaf3627

- 4 Laurent J, Blin G, Chatelain F, Vanneaux V, Fuchs A, Larghero J, Théry M. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 939–956
- 5 Karsenti E. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 255–262
- 6 Turing AM. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1952, 237: 37–72
- 7 Raff EC, Brothers AJ, Raff RA. *Nature*, 1976, 260: 615–617
- 8 Kirschner M. *Cell*, 1986, 45: 329–342
- 9 Tabony J, Job D. *Nature*, 1990, 346: 448–451
- 10 Ndlec FJ, Surrey T, Maggs AC, Leibler S. *Nature*, 1997, 389: 305–308
- 11 Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. *Cell*, 1999, 96: 79–88
- 12 Surrey T, Nédélec F, Leibler S, Karsenti E. *Science*, 2001, 292: 1167–1171
- 13 Kruse K, Jülicher F. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17: 20–26
- 14 Janson ME, Loughlin R, Loïdiche I, Fu C, Brunner D, Nédélec FJ, Tran PT. *Cell*, 2007, 128: 357–368
- 15 Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR. *Cell*, 2003, 114: 201–214
- 16 Goodwin BC, Kauffman S, Murray JD. *J Theor Biol*, 1993, 163: 135–144
- 17 Coffey DS. *Nat Med*, 1998, 4: 882–885
- 18 Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. *Cell*, 2014, 156: 1032–1044
- 19 Clevers H. *Cell*, 2016, 165: 1586–1597
- 20 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. *Nature*, 2009, 459: 262–265
- 21 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. *Nature*, 2011, 472: 51–56
- 22 Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. *Nature*, 2013, 501: 373–379
- 23 Karzbrun E, Kshirsagar A, Cohen SR, Hanna JH, Reiner O. *Nat Phys*, 2018, 14: 515–522
- 24 Serra D, Mayr U, Boni A, Lukonin I, Rempfler M, Challet Meylan L, Stadler MB, Strnad P, Papasaikas P, Vischi D, Waldt A, Roma G, Liberali P. *Nature*, 2019, 569: 66–72
- 25 Sato T, Clevers H. *Science*, 2013, 340: 1190–1194
- 26 Lei M, Harn HIC, Li Q, Jiang J, Wu W, Zhou W, Jiang TX, Wang M, Zhang J, Lai YC, Juan WT, Widelitz RB, Yang L, Gu ZZ, Chuong CM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2221982120
- 27 Volmert B, Kiselev A, Juhong A, Wang F, Riggs A, Kostina A, O'Hern C, Muniyandi P, Wasserman A, Huang A, Lewis-Israeli Y, Panda V, Bhattacharya S, Lauver A, Park S, Qiu Z, Zhou C, Aguirre A. *Nat Commun*, 2023, 14: 8245
- 28 Tuveson D, Clevers H. *Science*, 2019, 364: 952–955
- 29 Drost J, Clevers H. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 407–418
- 30 Aisenbrey EA, Murphy WL. *Nat Rev Mater*, 2020, 5: 539–551
- 31 Kozlowski MT, Crook CJ, Ku HT. *Commun Biol*, 2021, 4: 1387
- 32 Shyer AE, Rodrigues AR, Schroeder GG, Kassianidou E, Kumar S, Harland RM. *Science*, 2017, 357: 811–815
- 33 Farah EN, Hu RK, Kern C, Zhang Q, Lu TY, Ma Q, Tran S, Zhang B, Carlin D, Monell A, Blair AP, Wang Z, Eschbach J, Li B, Destici E, Ren B, Evans SM, Chen S, Zhu Q, Chi NC. *Nature*, 2024, 627: 854–864
- 34 Mitrovic J, Richey G, Kim S, Guler MO. *Langmuir*, 2023, 39: 11935–11945
- 35 Um SH, Lee JB, Park N, Kwon SY, Umbach CC, Luo D. *Nat Mater*, 2006, 5: 797–801
- 36 Li F, Tang J, Geng J, Luo D, Yang D. *Prog Polym Sci*, 2019, 98: 101163
- 37 Seliktar D. *Science*, 2012, 336: 1124–1128
- 38 Xie Y, Kollampally SCR, Jorgensen M, Zhang X. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247: 2103–2118
- 39 Matsuda T, Kawakami R, Namba R, Nakajima T, Gong JP. *Science*, 2019, 363: 504–508
- 40 Wu B, Lu H, Le X, Lu W, Zhang J, Théato P, Chen T. *Chem Sci*, 2021, 12: 6472–6487
- 41 Ni C, Chen D, Yin Y, Wen X, Chen X, Yang C, Chen G, Sun Z, Wen J, Jiao Y, Wang C, Wang N, Kong X, Deng S, Shen Y, Xiao R, Jin X, Li J, Kong X, Zhao Q, Xie T. *Nature*, 2023, 622: 748–753

- 42 Martinez-Garcia FD, Fischer T, Hayn A, Mierke CT, Burgess JK, Harmsen MC. *Gels*, 2022, 8: 535
- 43 Foudazi R, Zowada R, Manas-Zloczower I, Fekke DL. *Langmuir*, 2023, 39: 2092–2111
- 44 Lin X, Zhao X, Xu C, Wang L, Xia Y. *J Polym Sci*, 2022, 60: 2525–2542
- 45 Ko B, Jeon N, Kim J, Kang H, Seong J, Yun S, Badloe T, Rho J. *Microsyst Nanoeng*, 2024, 10: 1
- 46 Fan M, Tan H, Jin Z. *Cogent Eng*, 2020, 7: 1736407
- 47 Shadish JA, Benuska GM, DeForest CA. *Nat Mater*, 2019, 18: 1005–1014
- 48 Zhao N, Coyne J, Abune L, Shi P, Lian XL, Zhang G, Wang Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 24599–24610
- 49 Kamata H, Akagi Y, Kayasuga-Kariya Y, Chung U, Sakai T. *Science*, 2014, 343: 873–875
- 50 Fu F, Chen Z, Zhao Z, Wang H, Shang L, Gu Z, Zhao Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 5900–5905
- 51 Kloxin AM, Kasko AM, Salinas CN, Anseth KS. *Science*, 2009, 324: 59–63
- 52 Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. *Science*, 1997, 276: 1425–1428
- 53 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. *Cell*, 2006, 126: 677–689
- 54 Azagarsamy MA, Anseth KS. *ACS Macro Lett*, 2013, 2: 5–9
- 55 Deforest CA, Polizzotti BD, Anseth KS. *Nat Mater*, 2009, 8: 659–664
- 56 DeForest CA, Anseth KS. *Nat Chem*, 2011, 3: 925–931
- 57 Bao M, Xie J, Piruska A, Huck WTS. *Nat Commun*, 2017, 8: 1962
- 58 Davidson MD, Prendergast ME, Ban E, Xu KL, Mickel G, Mensah P, Dhand A, Janmey PA, Shenoy VB, Burdick JA. *Sci Adv*, 2021, 7: eabi8157
- 59 Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. *Science*, 2001, 294: 559–563
- 60 Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H. *Transplant Proc*, 2012, 44: 1018–1020
- 61 Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. *Nature*, 2013, 499: 481–484
- 62 Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa HY, Taniguchi H. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 556–565
- 63 Bischofs IB, Schwarz US. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9274–9279
- 64 Noerr PS, Zamora Alvarado JE, Golnaraghi F, McCloskey KE, Gopinathan A, Dasbiswas K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2301555120
- 65 Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S. *Nature*, 2010, 468: 310–315
- 66 Correia CR, Pirraco RP, Cerqueira MT, Marques AP, Reis RL, Mano JF. *Sci Rep*, 2016, 6: 21883
- 67 Andrique L, Recher G, Alessandri K, Pujol N, Feyeux M, Bon P, Cognet L, Nassoy P, Bikfalvi A. *Sci Adv*, 2019, 5: eaau6562
- 68 Leong MF, Toh JKC, Du C, Narayanan K, Lu HF, Lim TC, Wan ACA, Ying JY. *Nat Commun*, 2013, 4: 2353
- 69 Nikolaev M, Mitrofanova O, Broguiere N, Geraldo S, Dutta D, Tabata Y, Elci B, Brandenburg N, Kolotuev I, Gjorevski N, Clevers H, Lutolf MP. *Nature*, 2020, 585: 574–578
- 70 Lancaster MA, Corsini NS, Wolfinger S, Gustafson EH, Phillips AW, Burkard TR, Otani T, Livesey FJ, Knoblich JA. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 659–666
- 71 Urciuolo A, Giobbe GG, Dong Y, Michielin F, Brandolino L, Magnussen M, Gagliano O, Selmin G, Scattolini V, Raffa P, Caccin P, Shibuya S, Scaglioni D, Wang X, Qu J, Nikolic M, Montagner M, Galea GL, Clevers H, Giomo M, De Coppi P, Elvassore N. *Nat Commun*, 2023, 14: 3128
- 72 Cesare E, Urciuolo A, Stuart HT, Torchio E, Gesualdo A, Laterza C, Gagliano O, Martewicz S, Cui M, Manfredi A, Di Filippo L, Sabatelli P, Squarzone S, Zorzan I, Betto RM, Martello G, Cacchiarelli D, Luni C, Elvassore N. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 1703–1717.e7
- 73 Nerger BA, Sinha S, Lee NN, Cheriyan M, Bertsch P, Johnson CP, Mahadevan L, Bonventre JV, Mooney DJ. *Adv Mater*, 2024, 36: e2308325
- 74 Jorgensen M, Ramesh P, Toro M, Evans E, Moskwa N, Zhang X, Sharfstein ST, Larsen M, Xie Y. *Bioengineering*, 2022, 9: 38
- 75 Elçin M, Dixit V, Gitnic G. *Artif Organs*, 1998, 22: 837–846
- 76 Lindborg BA, Brekke JH, Vegoe AL, Ulrich CB, Haider KT, Subramaniam S, Venhuizen SL, Eide CR, Orchard PJ, Chen W, Wang Q, Pelaez F, Scott CM, Kokkoli E, Keirstead SA, Dutton JR, Tolar J, O'Brien TD. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5: 970–979
- 77 Loebel C, Weiner AI, Eiken MK, Katzen JB, Morley MP, Bala V, Cardenas-Diaz FL, Davidson MD, Shiraishi K, Basil MC, Ferguson LT, Spence JR, Ochs M, Beers MF, Morrissey EE, Vaughan AE, Burdick JA. *Adv Mater*, 2022, 34: e2202992

- 78 Buchmann B, Engelbrecht LK, Fernandez P, Hutterer FP, Raich MK, Scheel CH, Bausch AR. *Nat Commun*, 2021, 12: 2759
- 79 Bernal PN, Bouwmeester M, Madrid-Wolff J, Falandt M, Florczak S, Rodriguez NG, Li Y, Gröbner G, Samsom RA, van Wolferen M, van der Laan LJW, Delrot P, Loterie D, Malda J, Moser C, Spee B, Levato R. *Adv Mater*, 2022, 34: e2110054
- 80 Broguiere N, Isenmann L, Hirt C, Ringel T, Placzek S, Cavalli E, Ringnald F, Villiger L, Züllig R, Lehmann R, Rogler G, Heim MH, Schüler J, Zenobi-Wong M, Schwank G. *Adv Mater*, 2018, 30: e1801621
- 81 Gupta AK, Coburn JM, Davis-Knowlton J, Kimmerling E, Kaplan DL, Oxburgh L. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13: 812–822
- 82 Ng SS, Saeb-Parsy K, Blackford SJI, Segal JM, Serra MP, Horcas-Lopez M, No DY, Mastoridis S, Jassem W, Frank CW, Cho NJ, Nakauchi H, Glenn JS, Rashid ST. *Biomaterials*, 2018, 182: 299–311
- 83 Hernandez-Gordillo V, Kassis T, Lampejo A, Choi GH, Gamboa ME, Gnecco JS, Brown A, Breault DT, Carrier R, Griffith LG. *Biomaterials*, 2020, 254: 120125
- 84 Cruz-Acuña R, Quirós M, Farkas AE, Dedhia PH, Huang S, Siuda D, García-Hernández V, Miller AJ, Spence JR, Nusrat A, García AJ. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 1326–1335
- 85 Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, Giger S, Bragina ME, Ordóñez-Morán P, Clevers H, Lutolf MP. *Nature*, 2016, 539: 560–564
- 86 Vallmajo-Martin Q, Broguiere N, Millan C, Zenobi-Wong M, Ehrbar M. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 1910282
- 87 Ye S, Boeter JWB, Mihajlovic M, van Steenbeek FG, van Wolferen ME, Oosterhoff LA, Marsee A, Caiazzo M, van der Laan LJW, Penning LC, Vermonden T, Spee B, Schneeberger K. *Adv Funct Mater*, 2020, 30: 2000893
- 88 Zhang Y, Tang C, Span PN, Rowan AE, Aalders TW, Schalken JA, Adema GJ, Kouwer PHJ, Zegers MMP, Ansems M. *Adv Sci*, 2020, 7: 2001797
- 89 Garreta E, Prado P, Tarantino C, Oria R, Fanlo L, Martí E, Zalvidea D, Trepas X, Roca-Cusachs P, Gavalda-Navarro A, Cozzuto L, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC, Hurtado del Pozo C, Montserrat N. *Nat Mater*, 2019, 18: 397–405
- 90 Gan Z, Qin X, Liu H, Liu J, Qin J. *Bioactive Mater*, 2023, 28: 386–401
- 91 Liu H, Wang Y, Cui K, Guo Y, Zhang X, Qin J. *Adv Mater*, 2019, 31: e1902042
- 92 Beeghly GF, Shimpi AA, Riter RN, Fischbach C. *Nat Rev Bioeng*, 2023, 1: 712–730
- 93 Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, Nostro C, Wang R, Muthuswamy LB, Crawford HC, Arrowsmith C, Kaloger SE, Renouf DJ, Connor AA, Cleary S, Schaeffer DF, Roehrl M, Tsao MS, Gallinger S, Keller G, Muthuswamy SK. *Nat Med*, 2015, 21: 1364–1371
- 94 Muthuswamy SK. *Cancer Cell*, 2021, 39: 443–446
- 95 Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, Shen R, Taylor AM, Cherniack AD, Thorsson V, Akbani R, Bowlby R, Wong CK, Wiznerowicz M, Sanchez-Vega F, Robertson AG, Schneider BG, Lawrence MS, Nushmeh H, Malta TM, Stuart JM, Benz CC, Laird PW. *Cell*, 2018, 173: 291–304.e6
- 96 Pittman M, Iu E, Li K, Wang M, Chen J, Taneja N, Jo MH, Park S, Jung WH, Liang L, Barman I, Ha T, Gaitanaros S, Liu J, Burnette D, Plotnikov S, Chen Y. *Nat Phys*, 2022, 18: 1112–1121
- 97 Gonzalez-Molina J, Zhang X, Borghesan M, Mendonça da Silva J, Awan M, Fuller B, Gavara N, Selden C. *Biomaterials*, 2018, 177: 113–124
- 98 Bera K, Kiepas A, Godet I, Li Y, Mehta P, Ifemembi B, Paul CD, Sen A, Serra SA, Stoletov K, Tao J, Shatkin G, Lee SJ, Zhang Y, Boen A, Mistriotis P, Gilkes DM, Lewis JD, Fan CM, Feinberg AP, Valverde MA, Sun SX, Konstantopoulos K. *Nature*, 2022, 611: 365–373
- 99 Baschieri F, Illand A, Barbazan J, Zajac O, Henon C, Loew D, Dingli F, Vignjevic DM, Lévêque-Fort S, Montagnac G. *Sci Adv*, 2023, 9: eade2120
- 100 Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, Chen L, Yan X, Du Y, Yu L. *Cell Res*, 2015, 25: 24–38
- 101 Jiang D, Jiang Z, Lu D, Wang X, Liang H, Zhang J, Meng Y, Li Y, Wu D, Huang Y, Chen Y, Deng H, Wu Q, Xiong J, Meng A, Yu L. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 966–977
- 102 McCaffrey LM, Macara IG. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 727–735
- 103 Sutherland RM. *Science*, 1988, 240: 177–184
- 104 Cui X, Hartanto Y, Zhang H. *J R Soc Interface*, 2017, 14: 20160877
- 105 Zhang L, Liao W, Chen S, Chen Y, Cheng P, Lu X, Ma Y. *Front Oncol*, 2023, 13: 1146477
- 106 Li Y, Kumacheva E. *Sci Adv*, 2018, 4: eaas8998
- 107 Ivascu A, Kubbies M. *SLAS Discov*, 2006, 11: 922–932
- 108 Fang JY, Tan SJ, Yang Z, Tayag C, Han B, Burns JS. *PLoS ONE*, 2014, 9: e105616

- 109 De Lorenzi F, Hansen N, Theek B, Daware R, Motta A, Breuel S, Nasehi R, Baumeister J, Schöneberg J, Stojanović N, von Stillfried S, Vogt M, Müller-Newen G, Maurer J, Sofias AM, Lammers T, Fischer H, Kiessling F. *Adv Mater*, 2024, 36: e2303196
- 110 Liu J, Tan Y, Zhang H, Zhang Y, Xu P, Chen J, Poh YC, Tang K, Wang N, Huang B. *Nat Mater*, 2012, 11: 734–741
- 111 Baker AEG, Tam RY, Shoichet MS. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 4373–4384
- 112 Baker AEG, Bahlmann LC, Tam RY, Liu JC, Ganesh AN, Mitrousis N, Marcellus R, Spears M, Bartlett JMS, Cescon DW, Bader GD, Shoichet MS. *Adv Mater*, 2019, 31: e1901166
- 113 Huang YJ, Hsu S. *Biomaterials*, 2014, 35: 10070–10079
- 114 Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kießling TR, Fetler L, Rico F, Scheuring S, Lamaze C, Simon A, Geraldo S, Vignjević D, Doméjean H, Rolland L, Funfak A, Bibette J, Bremond N, Nassoy P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 14843–14848
- 115 Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang X, Zhang Y, Ma X. *Biotechnol Prog*, 2005, 21: 1289–1296
- 116 Wang Q, Li S, Xie Y, Yu W, Xiong Y, Ma X, Yuan Q. *Hepatol Res*, 2006, 35: 96–103
- 117 Lee BH, Kim MH, Lee JH, Seliktar D, Cho NJ, Tan LP, Zhu D. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0118123
- 118 Wu Y, Zhao Z, Guan Y, Zhang Y. *Acta BioMater*, 2014, 10: 1965–1974
- 119 Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinkski J. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 79–80: 3–18
- 120 Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquina PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera JM, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Solomon SB, Eastham JA, Chi P, Carver B, Rubin MA, Scher HI, Clevers H, Sawyers CL, Chen Y. *Cell*, 2014, 159: 176–187
- 121 Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvise M, Tiriac H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FHM, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RGJ, Clevers H, Tuveson DA. *Cell*, 2015, 160: 324–338
- 122 van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L, McLaren-Douglas A, Blokker J, Jaksani S, Bartfeld S, Volckman R, van Sluis P, Li VSW, Seepo S, Sekhar Pedamallu C, Cibulskis K, Carter SL, McKenna A, Lawrence MS, Lichtenstein L, Stewart C, Koster J, Versteeg R, van Oudenaarden A, Saez-Rodriguez J, Vries RGJ, Getz G, Wessels L, Stratton MR, McDermott U, Meyerson M, Garnett MJ, Clevers H. *Cell*, 2015, 161: 933–945
- 123 Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, Lampis A, Eason K, Huntingford I, Burke R, Rata M, Koh DM, Tunariu N, Collins D, Hulkki-Wilson S, Ragulan C, Spiteri I, Moorcraft SY, Chau I, Rao S, Watkins D, Fotiadis N, Bali M, Darvish-Damavandi M, Lote H, Eltahir Z, Smyth EC, Begum R, Clarke PA, Hahne JC, Dowsett M, de Bono J, Workman P, Sadanandam A, Fassan M, Sansom OJ, Eccles S, Starling N, Braconi C, Sottoriva A, Robinson SP, Cunningham D, Valeri N. *Science*, 2018, 359: 920–926
- 124 Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, Martins-Filho SN, Raghavan V, Li Q, Mer AS, Rosen JC, Li M, Wang YH, Tamblyn L, Pham NA, Haibe-Kains B, Liu G, Moghal N, Tsao MS. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 1162–1174
- 125 Chen P, Zhang X, Ding R, Yang L, Lyu X, Zeng J, Lei JH, Wang L, Bi J, Shao N, Shu D, Wu B, Wu J, Yang Z, Wang H, Wang B, Xiong K, Lu Y, Fu S, Choi TK, Lon NW, Zhang A, Tang D, Quan Y, Meng Y, Miao K, Sun H, Zhao M, Bao J, Zhang L, Xu X, Shi Y, Lin Y, Deng C. *Adv Sci*, 2021, 8: e2101176
- 126 Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, Balgobind AV, Wind K, Gracanin A, Begthel H, Korving J, van Boxtel R, Duarte AA, Lelieveld D, van Hoeck A, Ernst RF, Blokzijl F, Nijman IJ, Hoogstraal M, van de Ven M, Egan DA, Zinzalla V, Moll J, Boj SF, Voest EE, Wessels L, van Diest PJ, Rottenberg S, Vries RGJ, Cuppen E, Clevers H. *Cell*, 2018, 172: 373–386.e10
- 127 Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclán JE, Hami N, Kester L, Balgobind AV, Korving J, Proost N, Begthel H, van Wijk LM, Revilla SA, Theeuwssen R, van de Ven M, van Roosmalen MJ, Ponsioen B, Ho VWH, Neel BG, Bosse T, Gaarenstroom KN, Vrieling H, Vreeswijk MPG, van Diest PJ, Witteveen PO, Jonges T, Bos JL, van Oudenaarden A, Zweemer RP, Snippert HJG, Kloosterman WP, Clevers H. *Nat Med*, 2019, 25: 838–849
- 128 Fang G, Lu H, Rodriguez de la Fuente L, Law AMK, Lin G, Jin D, Gallego-Ortega D. *Adv Sci*, 2021, 8: e2102418
- 129 Chaudhuri O, Koshy ST, Branco da Cunha C, Shin JW, Verbeke CS, Allison KH, Mooney DJ. *Nat Mater*, 2014, 13: 970–978
- 130 Wang W, Liu X, Xie Y, Zhang H, Yu W, Xiong Y, Xie W, Ma X. *J Mater Chem*, 2006, 16: 3252–3267

- 131 Onoe H, Okitsu T, Itou A, Kato-Negishi M, Gojo R, Kiriya D, Sato K, Miura S, Iwanaga S, Kuribayashi-Shigetomi K, Matsunaga YT, Shimoyama Y, Takeuchi S. *Nat Mater*, 2013, 12: 584–590
- 132 Raof NA, Padgen MR, Gracias AR, Bergkvist M, Xie Y. *Biomaterials*, 2011, 32: 4498–4505
- 133 Kollampally SCR, Zhang X, Moskwa N, Nelson DA, Sharfstein ST, Larsen M, Xie Y. *Bioengineering*, 2024, 11: 375
- 134 Li Q, Lin H, Rauch J, Deleyrolle LP, Reynolds BA, Viljoen HJ, Zhang C, Zhang C, Gu L, Van Wyk E, Lei Y. *Sci Rep*, 2018, 8: 3531
- 135 Mooney B, Abdul-Raof N, Tian YI, Xie Y. *ACS BioMater Sci Eng*, 2017, 3: 1769–1779
- 136 Raof NA, Raja WK, Castracane J, Xie Y. *Biomaterials*, 2011, 32: 4130–4139
- 137 Prince E, Cruickshank J, Ba-Alawi W, Hodgson K, Haight J, Tobin C, Wakeman A, Avoulov A, Topolskaia V, Elliott MJ, McGuigan AP, Berman HK, Haibe-Kains B, Cescon DW, Kumacheva E. *Nat Commun*, 2022, 13: 1466
- 138 Hwang PY, Brenot A, King AC, Longmore GD, George SC. *Cancer Res*, 2019, 79: 1899–1912
- 139 Hwang PY, Mathur J, Cao Y, Almeida J, Ye J, Morikis V, Cornish D, Clarke M, Stewart SA, Pathak A, Longmore GD. *Dev Cell*, 2023, 58: 34–50.e9
- 140 Greenwald AC, Darnell NG, Hoefflin R, Simkin D, Mount CW, Gonzalez Castro LN, Harnik Y, Dumont S, Hirsch D, Nomura M, Talpir T, Kedmi M, Goliand I, Medici G, Laffy J, Li B, Mangena V, Keren-Shaul H, Weller M, Addadi Y, Neidert MC, Suvà ML, Tirosh I. *Cell*, 2024, 187: 2485–2501.e26
- 141 Vepari C, Kaplan DL. *Prog Polym Sci*, 2007, 32: 991–1007
- 142 Discher DE, Janmey P, Wang Y. *Science*, 2005, 310: 1139–1143
- 143 Yuan H, Liu K, Córdor M, Barrasa-Fano J, Louis B, Vandaele J, de Almeida P, Coucke Q, Chen W, Oosterwijk E, Xing C, Van Oosterwyck H, Kouwer PHJ, Rocha S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2216934120
- 144 Zhang H, Zeng H, Eklund A, Guo H, Priimagi A, Ikkala O. *Nat Nanotechnol*, 2022, 17: 1303–1310
- 145 McCune JA, Mommer S, Parkins CC, Scherman OA. *Adv Mater*, 2020, 32: e1906890
- 146 Darkes-Burkey C, Liu X, Slyker L, Mulderrig J, Pan W, Giannelis EP, Shepherd RF, Bonassar LJ, Bouklas N. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2116675119
- 147 Chrisnandy A, Blondel D, Rezakhani S, Broguiere N, Lutolf MP. *Nat Mater*, 2022, 21: 479–487
- 148 English MA, Soenksen LR, Gayet RV, de Puig H, Angenent-Mari NM, Mao AS, Nguyen PQ, Collins JJ. *Science*, 2019, 365: 780–785
- 149 Abune L, Davis B, Wang Y. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13: e1731
- 150 Peng YH, Hsiao SK, Gupta K, Ruland A, Auernhammer GK, Maitz MF, Boye S, Lattner J, Gerri C, Honigsmann A, Werner C, Krieg E. *Nat Nanotechnol*, 2023, 18: 1463–1473
- 151 Stevens KR, Ungrin MD, Schwartz RE, Ng S, Carvalho B, Christine KS, Chaturvedi RR, Li CY, Zandstra PW, Chen CS, Bhatia SN. *Nat Commun*, 2013, 4: 1847
- 152 Manfrin A, Tabata Y, Paquet ER, Vuaridel AR, Rivest FR, Naef F, Lutolf MP. *Nat Methods*, 2019, 16: 640–648
- 153 Gjorevski N, Nikolaev M, Brown TE, Mitrofanova O, Brandenburg N, DelRio FW, Yavitt FM, Liberali P, Anseth KS, Lutolf MP. *Science*, 2022, 375: eaaw9021
- 154 Brassard JA, Nikolaev M, Hübscher T, Hofer M, Lutolf MP. *Nat Mater*, 2021, 20: 22–29
- 155 Gut G, Herrmann MD, Pelkmans L. *Science*, 2018, 361: eaar7042
- 156 Fang R, Xia C, Close JL, Zhang M, He J, Huang Z, Halpern AR, Long B, Miller JA, Lein ES, Zhuang X. *Science*, 2022, 377: 56–62
- 157 Beck M, Covino R, Hänel I, Müller-McNicoll M. *Cell*, 2024, 187: 545–562
- 158 Cho NH, Cheveralls KC, Brunner AD, Kim K, Michaelis AC, Raghavan P, Kobayashi H, Savy L, Li JY, Canaj H, Kim JYS, Stewart EM, Gnann C, McCarthy F, Cabrera JP, Brunetti RM, Chhun BB, Dingle G, Hein MY, Huang B, Mehta SB, Weissman JS, Gómez-Sjöberg R, Itzhak DN, Royer LA, Mann M, Leonetti MD. *Science*, 2022, 375: eabi6983
- 159 Michnick SW, Levy ED. *Science*, 2022, 375: 1093–1094
- 160 Lim WA. *Science*, 2022, 378: 848–852
- 161 Xin T, Greco V, Myung P. *Cell*, 2016, 164: 1212–1225
- 162 Sasai Y. *Nature*, 2013, 493: 318–326
- 163 Gartner ZJ, Hu JL. *Nat Mater*, 2021, 20: 2–3
- 164 Yang S, Palmquist KH, Nathan L, Pfeifer CR, Schultheiss PJ, Sharma A, Kam LC, Miller PW, Shyer AE, Rodrigues AR. *Science*, 2023, 382:

eadg5579

- 165 Libby ARG, Briers D, Haghighi I, Joy DA, Conklin BR, Belta C, McDevitt TC. *Cell Syst*, 2019, 9: 483–495.e10
- 166 Sun H, Fu X, Abraham S, Jin S, Murphy RF, Peng H. *Bioinformatics*, 2022, 38: 5299–5306
- 167 Zheng X, Betjes MA, Ender P, Goos YJ, Huelsz-Prince G, Clevers H, van Zon JS, Tans SJ. *Sci Adv*, 2023, 9: eadd6480
- 168 Gershenson C, Trianni V, Werfel J, Sayama H. *Artif Life*, 2020, 26: 391–408

Cellular self-organization in hydrogels

Yubing Xie^{*}

College of Nanotechnology, Science, and Engineering, University at Albany, State University of New York, Albany, NY 12203, USA

**Corresponding author (email: yxie@albany.edu)*

Abstract: Self-organization is an intrinsic property of cells, by which cells collectively, autonomously, and dynamically arrange themselves to form the complex structures of tissues and organs that possess certain function. Understanding cellular self-organization is crucial for recapitulating the development of multicellular organisms and engineering form and function. In this article, representative and pioneering studies on cellular self-organization have been reviewed. First, a historical review of self-organization has been provided, followed by hydrogels to mimic cellular microenvironments. Next, organogenesis and tumorigenesis have been used as examples to show how hydrogels could improve normal and tumor organoid culture and advance the understanding of cellular self-organization. At last, perspectives on hydrogels for further understanding and directing cellular self-organization has been discussed.

Keywords: self-organization, hydrogel, microenvironment, organoids, organogenesis, tumorigenesis

doi: [10.1360/SSC-2024-0155](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0155)