

血管化类器官的研究进展*

孙云雷¹ 赵振营² 综述 曹月娟³ 审校

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300000; 2. 天津市人民医院药学部, 天津 300000;

3. 天津市人民医院心脏内科, 天津 300000)

【摘要】 类器官指的是利用细胞培养技术在体外培育的具有人体器官结构和功能的组织类似物, 类器官在疾病建模、药物筛选、器官移植的研究中发挥着重要作用。血管是人体器官组织氧气和营养物质的供应管道, 无血管网络的类器官不仅存活时间短, 而且无法更真实地模拟人体器官, 因此如何使培育的类器官具有血管网络系统, 即培育出血管化的类器官, 已经成为类器官研究领域的热点话题。本文将系统地回顾总结类器官的发展历史、应用前景, 以及脑、心脏、肾脏、肝脏等类器官血管化的研究进展, 为血管化类器官的研究提供一定的参考。

【关键词】 类器官; 三维培养; 血管化; 干细胞; 内皮细胞

【中图分类号】 R318 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 10. 027

Progress in the study for vascularization of organoids

SUN Yunlei¹, ZHAO Zhengying² checking CAO Yuejuan³ reviewing

(1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300000, China;

2. Department of Pharmacy, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300000, China;

3. Department of Cardiology, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300000, China)

【Abstract】 Organoids refer to tissue analogs with the structure and function of human organs grown in vitro by cell culture technology. Organoids play an important role in disease modeling, drug screening, and organ transplantation research. Blood vessels are the supply channels of oxygen and nutrients for human organs and tissues. Organoids without a vascular network not only have a short survival time, but also cannot more realistically simulate human organs. Therefore, how to make the cultivated organoids have a vascular network system, that is, to cultivate vascularized organoids have become a hot topic in the field of organoid research. This article will systematically review and summarize the development history and application prospects of organoids, as well as the research progress of vascularization of brain, heart, kidney, liver and other organoids, so as to provide reference for the research of vascularized organoids.

【Key words】 Organoids; 3D culture; Vascularization; Stem cells; Endothelial cells

类器官是指利用成体干细胞或多功能干细胞进行体外三维培养而形成的具有一定空间结构的组织类似物, 尽管类器官并不是真正意义上的人体器官, 但是能在结构和功能上模拟真实器官, 并且能够长期稳定传代, 因此也被称为微型器官^[1-2]。类器官发展的历史可以追溯到 20 世纪 70 年代, Howard 等^[3]发现原代人类角质形成细胞和 3T3 成纤维细胞共培养形成类似于人类表皮的层状鳞状上皮集落, 其中基底层细胞增殖, 而上层发生了角质化。但是该研究与传统的细胞培养相似, 细胞

的生长是在二维层面, 并未从三维层面深究细胞与组织、器官的内在联系^[4]。2007 年, Hans 团队^[5]通过谱系示踪实验发现了小肠和结肠中的 Lgr5⁺ 干细胞; 到了 2009 年, Sato 等^[6]开发了一种 3D 培养物来重建肠道干细胞的体外环境的方法, 通过这种方法, 获得了微型肠道类器官, 每个类器官都源自肠上皮的片段, 甚至是单个 Lgr5⁺ 干细胞。肠道类器官的产生在类器官的发展史上具有里程碑级的意义。得益于基础医学和 3D 培养技术的发展, 科学家们先后培养出了脑、心脏、肾脏、肝脏、胆囊、胰腺等相应的类器官。现如今, 类器官广泛地应用于疾病建模、药物毒性检测、肿瘤建模与抗癌药物研发、基因和细胞疗法等领域^[7-10]。

类器官研究为生物学的发展做出了重大贡献, 但是类器官仍存在局限性。缺乏功能性的血管系统、神经系统与免疫系统是类器官的缺点, 这些缺点使类器官无法更真实地模拟体内

基金项目: 天津市“131”创新型人才培养工程项目(2016)

通讯作者: 曹月娟, 医学博士, 主任医师, E-mail: drcyj@aliyun.com

引用本文: 孙云雷, 赵振营, 曹月娟. 血管化类器官的研究进展[J].

西部医学, 2024, 36(10):1551-1555. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511.

2024. 10. 027

器官^[10]。人体器官组织的正常运转离不开血管的生理功能,血管是氧气和营养物质的供应管道,所有生长在氧气扩散极限之外的生物体都严重依赖血管系统才能生存^[11]。类器官所使用的胚胎细胞大部分是由内胚层或者外胚层诱导来的,而促进血管新生的内皮细胞是由中胚层分化来的,因此大部分类器官自身并不能产生新的血管系统,缺乏血管系统的类器官在生长发育受限的同时对培养物也有着更高的要求。药物通过全身动静脉、心脏和肺,在血流中通过“对流”运输至微血管,再通过组织间液中的分子扩散进入细胞中发挥作用^[12]。血管化的类器官相比较于单纯的类器官在临床药物实验中能更真实地模拟人体器官,具有更高的参考价值。

血管化是类器官研究中的一大难题,具有血管系统功能的类器官无论是在类器官培养成功率、人体模拟的真实性还是临床药物实验的可靠性中都占有极大的优势。在后续的文章内容将汇总各种常见类器官血管化最新的研究进展,为类器官的研究提供一定的参考价值。

1 血管化脑类器官

脑类器官由外胚层发育而来,缺乏血管系统的脑类器官在体外因缺乏氧气和营养物质存活数月就会死去^[13],越来越多证据证明血管系统能够调节大脑神经分化、迁移和回路形成^[14]。同时,缺乏血管系统的脑类器官不会形成血脑屏障,降低了脑类器官药物实验的参考性。根据国内外脑类器官的研究进展可将脑类器官血管化分为以下 4 类:①脑类器官与内皮细胞共培养。Pham 等^[15]将同一患者的多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)诱导分化为血管内皮细胞(Endothelial cells, Ecs)和脑类器官,在类器官培养至 34 d 时,重新将类器官放置含有 2.5×10^6 个 ECs 细胞的基质胶中,在第 54 天,获得了血管化的脑类器官,并成功移植到免疫缺陷的小鼠脑内。②体内植入培养。Mansour^[16]团队将人胚胎干细胞诱导分化成脑类器官后,移植入免疫缺陷的小鼠大脑中,通过体内双光子成像显示移植物中的功能性神经网络和血管发育良好,成功培育了血管化的脑类器官。③通过过表达血管生成调控因子诱导脑类器官血管化。CakirB 团队^[17]发现过表达的转录因子 hETV2(血管内皮细胞发育过程重要的转录因子)能够有效地将人类胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, hESCs)诱导分化为内皮细胞,该团队将表达 hETV2 的 hESCs 与正常 hESCs 按照不同比例混合,使用 3D 培养技术获得脑类器官,通过灌注异硫氰酸荧光素-葡聚糖、移植小鼠体内的核磁共振等证实了该方法能够成功建立形成类似血脑屏障结构的血管化脑类器。④脑类器官与血管类器官共培养。罗振革研究团队^[18]在培养的血管类器官加入神经营养因子,使其具有脑血管的特征;同时将胚胎干细胞诱导成脑类器官,最后在其分别发育至血管前体细胞和神经前体细胞阶段时将两部分融合,培育至 40 d 左右,血管结构已经包裹整个类器官模型,形成完整的血管系统,并且与神经组织紧密连接,罗振革团队通过将血管类器官与脑类器官共培养的方式成功获得了血管化脑类器官。

2 血管化肾类器官

肾脏是间介中胚层(Intermediatesoderm, IM)通过 IM

来源的后肾间质(Metanephric mesenchyme, MM)和成形的输尿管芽(Ureteric bud, UB)相互作用分化而成^[19]。肾脏类器官来自含有基质隔室和血管内皮细胞的中胚层,从理论上来说,相比较于来源于外胚层和内胚层的类器官,肾脏类器官可以自身形成血管网络,但是事实并非如此。虽然肾脏类器官能够自身分化出血管结构,但是其生长受到限制,受此影响,肾脏类器官的肾小管上皮基因检测反映了肾组织发育的不成熟^[20-21]。目前肾脏类器官的血管化主要有以下几个方面:①自体植入培养。在嵌合小鼠和胚胎肾移植手术的研究中发现,肾脏的血管主要来源于血管新生和血管形成这两种形式^[22-23],血管新生指的是胚胎的肾间充质自身存在着的血管前体细胞,能够通过分化、迁移等产生肾脏血管;血管形成指的是胚胎发育的过程中,来自外部的血管通过出芽等方式生长至肾脏内部,并与肾内的血管祖细胞共同形成肾脏血管系统^[24]。在此为基础上, Van 等^[25]成功地将肾脏类器官移植到小鼠肾被膜下,并在 2 周之后成功检测到肾类器官中的血管内皮细胞。随着肾脏类器官自体植入培养技术的发展,研究人员对这种体外培养获得血管化类器官的方法进行了优化。比如 Kumar 等^[26]将不同时段分化的前体细胞进行混合后继续培养,并开发了聚集培养方法以增强间充质到上皮的过渡,随后他们将其进行了自体移植培养,相比普通诱导培养的类器官,混合培养后的类器官表现出更为广泛的血管化,并具有更多的肾单位结构。②调控类器官体外培养环境促进其血管化。Kim 团队^[27]发现肾脏脱细胞外基质含有细胞外基质蛋白,例如胶原蛋白 IV,层粘连蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及其亚型,能够提供类似于正常肾脏的微环境,因此该团队使用肾脏脱细胞外基质水凝胶在体外成功培育了肾脏类器官,通过单细胞 RNA 序列分析表明,该方法提供的微环境促进了肾类器官的血管化和成熟。有研究发现血管发育中血管壁剪切力具有重要的调控作用^[28], Homan 等^[29]在此理论基础上使用 3D 打印毫流控芯片模拟正常肾脏流体剪切应力环境,通过该方法培养的肾脏类器官有类似血管网络的形成,并且发现血管内皮生长因子的表达也显著上调。③生物材料技术。Singh^[30]等制备含有肾近端小管上皮细胞和人脐静脉内皮细胞的生物墨水,进行了 3D 微流体血管化肾小管芯片组织的打印,将其移植入小鼠肾被膜下后也出现了血管结构,此外,该团队发现血管化的肾近端小管移植能够减少肾小管间质纤维化与肾小管损伤,为未来类器官移植提供了参考价值。

3 血管化心脏类器官

心脏类器官由于其发育过程和结构功能的复杂性,研究起步时间较晚。心脏是血管与心肌细胞比例最高的器官之一,这是心脏高代谢需求的表现^[31]。因此心脏类器官的培养是否能够成功很大一部分取决于血管化的程度。早在 2014 年, Pagliari S^[32]团队将人间充质干细胞接种到明胶支架上以提供互连的血管样结构,再把支架与人心肌细胞祖细胞共培养,最终获得了人类血管化的 3D 心脏组织,但该实验仅限于体外,未在体内进行测试。2020 年, Kupfer^[33]团队优化了天然细胞外基质蛋白的光交联配方,并使用这种生物墨水三维打印人诱导的多能干细胞增殖到足够的密度后,他们分化了细胞,获得

了人体腔室肌肉泵,人体腔室肌肉泵表现出连续的动作电位传播,对药物和电刺激有反应,同时连接的腔室具有泵血功能,并能够复刻压力/体积关系。虽然体外的生物材料与 3D 打印技术在很大程度上帮助了心脏类器官血管化的发展,但是受限于心脏复杂的生理结构功能,心脏类器官自身血管化的技术尚未能取得突破。直到 2021 年,Drakhlis^[34]的研究团队在基质胶中嵌入人多能干细胞聚集体,然后通过小分子的双相 WNT 通路调节进行定向心脏分化,从而生成复杂的,高度结构化的三维心脏形成类器官(Heart forming organoids, HFO),HFO 由心内膜样细胞排列的心肌层和隔膜样血管围绕而成;同时还含有在空间结构和分子结构上不同的前、后壁内胚层组织和血管网络。

4 血管化肝类器官

肝脏中肝实质细胞占细胞总数的一半以上,是肝脏结构与功能的主体,但是肝脏中除了肝实质细胞、内皮细胞和胆管细胞外,还有包被肝脏的间皮细胞、肝星状细胞、巨噬细胞、间充质细胞和大量的血细胞^[35]。血管化的肝脏类器官能够更好地协同各细胞发育生长,更加接近人体肝脏的发育过程与生理功能。血管化肝类器官的培养方法如下:①肝内胚层细胞与内皮细胞共培养。Takebe 等^[36]将肝内胚层细胞与人脐静脉内皮细胞、间充质干细胞共培养,待其形成三维球状组织的肝芽,移植入免疫缺陷的小鼠中,最后免疫荧光检测显示移植的肝类器官组织血管与宿主血管相互连接形成了复杂的血管网络,实现了肝类器官的血管化。②通过脱细胞支架构建血管网络。Bapitista 等^[37]使用灌注洗涤剂去除肝脏组织的细胞成分,同时保留了完整的血管网络,将人脐静脉内皮细胞与人胎肝细胞接种到脱细胞支架中,利用肝脏内部血管网络实现肝脏类器官的血管化。在此基础上,Hussein^[38]等认为脱细胞器官的血管网络中缺乏完整的内皮层会导致血液凝固,此外,血流引起的剪切应力可能会影响重新接种的实质细胞。他们创新性地使用肝素-明胶混合物作为抗血栓涂层试剂,诱导内皮细胞附着和迁移在脱细胞肝内的血管壁表面上,最终通过对比发现肝素-明胶处理能够增强内皮细胞附着,改善体外和体内血管通畅性和肝细胞功能。③基因过表达上调类器官中的血管生成因子。Velazquez 等^[39]通过基因调控网络综合分析与工程指导的方式发现过表达 *PROX1* 基因能够提高肝脏类器官血管生成因子的含量,促进肝脏类器官血管化,并且将过表达 *PROX1* 基因的肝脏类器官移植入免疫缺陷小鼠体内,通过物种特异性标记显示人和小鼠血管发生了整合。

5 血管化肠道类器官

据临床研究发现,肠道的缺血、充血及再灌注损伤均能导致不同程度的肠道疾病,比如肠道缺血导致肠道坏死;肠充血和再灌注损伤会增加肠道通透性,并导致肠屏障受损,肠道稳态受到影响,甚至引起全身炎症反应^[40]。肠道类器官虽然是最早培育出的人类器官,但是血管化肠道类器官的研究依然较少。2014 年,Watson 等^[41]诱导多功能干细胞分化成肠道类器官,并移植入免疫缺陷小鼠体内,通过 mMECA-32 染色发现小鼠宿主脉管系统向内生长的现象,由此获得了更加成熟的肠道类器官。Kasendra^[42]开发了小肠芯片类器官,并将原代人肠

微血管内皮细胞接种在芯片装置的“微血管”通道中,发现使用该方法培育的肠芯片成功率更高,同时血管内皮-钙粘蛋白的免疫荧光染色也证明了肠芯片与微血管内皮连接良好。Holloway^[43]团队通过单细胞 RNA 测序技术发现肠道类器官分化早期存在的内皮细胞群,该细胞群在培养中随着时间的推移而下降,因此该团队通过优化培养基的方法扩展并维持了肠道类器官中的内皮细胞的含量,最终获得了血管化的肠道类器官。

6 血管类器官

血管系统在人体生命活动中扮演重要角色,同时血管系统在心脑血管疾病、糖尿病等疾病中起着关键作用。在 2019 年,Wimmer 团队^[44]将人类多功能干细胞诱导分化成血管类器官,并将其移植入免疫缺陷小鼠体内,最后发现移植的血管类器官成功地连接了小鼠血管循环,但该方法获得的血管类器官缺乏特异性实质细胞,限制了它们在更广泛的疾病建模和再生医学中的实用性。Dailamy 研究团队^[45]则是通过将基因重编程与化学定向类器官分化相结合来构建血管化的人体组织,该团队通过血管类器官中的转录因子过表达创建了神经血管和肌血管类器官,并将类器官的神经和血管功能维持了 45 d。此外,促血管生成因子在类器官的血管化中同样扮演着重要角色。在胚胎发育早期,血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在血管生成部位表达较多,表明 VEGF 在胚胎期的血管生成发挥着重要作用;同时现代生理药理学发现 VEGF 是血管生成和淋巴管生成的诱导剂,是内皮细胞的高度特异性丝裂原,其信号转导涉及与酪氨酸激酶受体结合,并最终导致内皮细胞增殖、迁移和新血管形成^[46-47]。抑制 VEGF 生成是抗血管新生的治疗手法之一,比如抑制 VEGF 能够抑制肿瘤血管新生,在抗肿瘤治疗中发挥着重要作用;抗 VEGF 药物在治疗视网膜新生血管性疾病和脉络膜新生血管性疾病中取得了不错疗效^[48-49]。同样的,一定程度上促进 VEGF 生成有助于血管的生成。在此基础上,Abe 等^[50]通过间质血流实验发现当间质流量大小 >8 mmH 时,人脐静脉内皮细胞中 VEGF 表达较强,能够明显促进体外三维微血管网络的形成;Yaral 等^[51]使用含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸可溶性整合素结合肽的 3D 培养模型培养含有人脐静脉内皮细胞的类器官,发现类器官中的 VEGF、VE-钙粘蛋白等表达较强,并促进了类器官的血管化。

7 生物材料技术与血管化类器官

3D 打印技术自问世以来就受到了医学领域的青睐,现如今生物 3D 打印技术以活细胞为基本原材料,载细胞的打印材料为生物墨水,在病损组织的修复、器官移植等领域中发挥着重要作用^[52]。使用生物 3D 打印技术血管化类器官主要分为两种方法:①将人脐静脉内皮细胞与促血管生成因子纳入打印材料。Inglis 等^[53]使用含有内皮细胞与 VEGF 因子的 3D 打印材料,成功使胎儿早期骨骼细胞血管化;Sarker 团队^[54]将 VEGF 掺入生物墨水中,成功地促进了宿主体内血管与类器官的结合。②直接打印血管支架。3D 打印技术现如今已经成功构建了无支架管状组织,并且该组织能够成功在大鼠体内重构、内皮化^[55-56],现工程心脏贴片技术、细胞支架、无细胞支架技术已经开始在心血管领域发挥重要作用^[57]。器官芯片是指

利用生物打印技术构建的仿生组织微结构,其包含了细胞成分、细胞外微结构和营养物质循环系统^[58]。利用器官芯片中的微流控技术为类器官提供血液等营养物质也是类器官血管化的方法之一,Newman 等^[59]通过将 3D 打印技术与器官芯片技术结合,成功地构建了血管化的脑类器官。

8 小结与展望

通过上述各种常见类器官血管化的研究发现,类器官血管化的思路可以分为以下 4 类:①体内植入。将体外培养获得的无血管细胞的类器官移植入免疫缺陷的宿主(如小鼠、猪等)体内,利用宿主天然血管侵入类器官并形成血管网络,从而获得血管化的类器官。②提高血管生成调控因子含量。通过基因编辑方法提高血管生成因子含量或者改变流体剪切力、间质流量等培养条件促使类器官表达 VEGF 等血管生成因子。③将类器官与内皮细胞或者血管类器官共培养的方法获得血管化类器官。④器官芯片技术与分子材料技术。即利用器官芯片形成微血管进行灌注或者直接使用 3D 打印技术构建血管支架使类器官具有血管功能。

类器官在疾病建模、药物筛选、器官移植的研究中发挥着重要作用,是现在基础研究的热点。人体复杂的结构和内部环境对于类器官的拟真水平有着较高的要求,现阶段类器官血管化技术尚未完全成熟,类器官的神经化和免疫化也是科研人员面临的难题。相信在未来随着细胞技术和生物材料技术的发展,类器官技术会取得实质性的突破,能够在结构和功能上更加真实地模拟人体器官,为人类健康事业做出贡献。

【参考文献】

- [1] LI M, IZPISUA BELMONTE J C. Organoids - Preclinical Models of Human Disease[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(6): 569-579.
- [2] 周永杰,石毓君.类器官研究进展及展望[J].*中国普外基础与临床杂志*,2022,29(6): 716-718.
- [3] RHEINWALD J G, GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells[J]. *Cell*, 1975,6(3): 331-343.
- [4] ROSSI G, MANFRIN A, LUTOLF M P. Progress and potential in organoid research[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(11): 671-687.
- [5] BARKER N, VAN ES J H, KUIPERS J, *et al*. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5* [J]. *Nature*, 2007,449(7165):1003-1007.
- [6] 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]. *Nature*, 2009,459(7244):262-265.
- [7] KARZBRUN E, KSHIRSAGAR A, COHEN S R, *et al*. Human Brain Organoids on a Chip Reveal the Physics of Folding [J]. *Nat Phys*, 2018,14(5):515-522.
- [8] SCHWANK G, KOO B K, SASSELLI V, *et al*. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients[J]. *Cell Stem Cell*, 2013,13(6): 653-658.
- [9] ARTEGIANI B, HENDRIKS D, BEUMER J, *et al*. Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing[J]. *Nat Cell Biol*, 2020,22(3):321-331.
- [10] ANDREWS M G, KRIEGSTEIN A R. Challenges of Organoid Research[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2022,45:23-39.
- [11] EELEN G, TREPS L, LI X, *et al*. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated[J]. *Circ Res*, 2020,127(2):310-329.
- [12] DEWHIRST M W, SECOMB T W. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(12):738-750.
- [13] CHEN H I, WOLF J A, BLUE R, *et al*. Transplantation of Human Brain Organoids: Revisiting the Science and Ethics of Brain Chimeras[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(4): 462-472.
- [14] MATSUI T K, TSURU Y, HASEGAWA K, *et al*. Vascularization of human brain organoids[J]. *Stem Cells*, 2021,39(8): 1017-1024.
- [15] PHAM M T, POLLOCK K M, ROSE M D, *et al*. Generation of human vascularized brain organoids[J]. *Neuroreport*, 2018, 29(7):588-593.
- [16] MANSOUR A A, GONÇALVES J T, BLOYD C W, *et al*. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids[J]. *Nat Biotechnol*, 2018,36(5):432-441.
- [17] CAKIR B, XIANG Y, TANAKA Y, *et al*. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system[J]. *Nat Methods*, 2019,16(11):1169-1175.
- [18] SUN X Y, JU X C, LI Y, *et al*. Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions[J]. *Elife*, 2022,11:e76707.
- [19] LITTLE M H, MCMAHON A P. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(5):a008300.
- [20] TAKASATO M, ER P X, CHIU H S, *et al*. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 564-568.
- [21] WU H, UCHIMURA K, DONNELLY E L, *et al*. Comparative Analysis and Refinement of Human PSC-Derived Kidney Organoid Differentiation with Single-Cell Transcriptomics [J]. *Cell Stem Cell*, 2018,23(6):869-881. e8.
- [22] GATTONE V H 2ND, GOLDDOWITZ D. The renal glomerulus and vasculature in 'aggregation' chimeric mice [J]. *Nephron*, 2002,90(3):267-272.
- [23] MOHAMED T, SEQUEIRA-LOPEZ M L S. Development of the renal vasculature[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 91: 132-146.
- [24] 丁坤,管勇,孔峰,等.肾脏类器官血管化的研究进展[J].*老年医学研究*,2022, 3(2):31-35.
- [25] VAN DEN BERG C W, RITSMA L, AVRAMUT M C, *et al*. Renal Subcapsular Transplantation of PSC-Derived Kidney Organoids Induces Neo-vasculogenesis and Significant Glomerular and Tubular Maturation In Vivo[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 751-765.
- [26] KUMAR GUPTA A, SARKAR P, WERTHEIM J A, *et al*.

- Asynchronous mixing of kidney progenitor cells potentiates nephrogenesis in organoids[J]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 231.
- [27] KIM J W, NAM S A, YI J, *et al.* Kidney Decellularized Extracellular Matrix Enhanced the Vascularization and Maturation of Human Kidney Organoids[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(15): e2103526.
- [28] HYMAN A J, TUMOVA S, BEECH D J. Piezo1 Channels in Vascular Development and the Sensing of Shear Stress[J]. *Curr Top Membr*, 2017, 79: 37-57.
- [29] HOMAN K A, GUPTA N, KROLL K T, *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(3): 255-262.
- [30] SINGH N K, HAN W, NAM S A, *et al.* Three-dimensional cell-printing of advanced renal tubular tissue analogue[J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119734.
- [31] POST M J, RAHIMI N, CAOLO V. Update on vascularization in tissue engineering[J]. *Regen Med*, 2013, 8(6): 759-770.
- [32] PAGLIARI S, TIRELLA A, AHLUWALIA A, *et al.* A multistep procedure to prepare pre-vascularized cardiac tissue constructs using adult stem cells, dynamic cell cultures, and porous scaffolds[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 210.
- [33] KUPFER M E, LIN W H, RAVIKUMAR V, *et al.* In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid [J]. *Circ Res*, 2020, 127(2): 207-224.
- [34] 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): 737-746.
- [35] PRIOR N, INACIO P, HUCH M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications[J]. *Gut*, 2019, 68(12): 2228-2237.
- [36] TAKEBE T, SEKINE K, ENOMURA M, *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-484.
- [37] BAPTISTA P M, SIDDIQUI M M, LOZIER G, *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid[J]. *Hepatology*, 2011, 53(2): 604-617.
- [38] HUSSEIN K H, PARK K M, KANG K S, *et al.* Heparin-gelatin mixture improves vascular reconstruction efficiency and hepatic function in bioengineered livers[J]. *Acta Biomater*, 2016, 38: 82-93.
- [39] VELAZQUEZ J J, LEGRAW R, MOGHADAM F, *et al.* Gene Regulatory Network Analysis and Engineering Directs Development and Vascularization of Multilineage Human Liver Organoids[J]. *Cell Syst*, 2021, 12(1): 41-55. e11.
- [40] CHEN Y, PU W, MASWIKITI E P, *et al.* Intestinal congestion and reperfusion injury: damage caused to the intestinal tract and distal organs[J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(9): BSR20211560.
- [41] WATSON C L, MAHE M M, MÚNERA J, *et al.* An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells[J]. *Nat Med*, 2014, 20(11): 1310-1314.
- [42] KASENDRA M, TOVAGLIERI A, SONTHEIMER-PHELPS A, *et al.* Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2871.
- [43] HOLLOWAY E M, WU J H, CZERWINSKI M, *et al.* Differentiation of Human Intestinal Organoids with Endogenous Vascular Endothelial Cells[J]. *Dev Cell*, 2020, 54(4): 516-528. e7.
- [44] WIMMER R A, LEOPOLDI A, AICHINGER M, *et al.* Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(11): 3082-3100.
- [45] DAILAMY A, PAREKH U, KATREKAR D, *et al.* Programmatic introduction of parenchymal cell types into blood vessel organoids[J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(10): 2432-2441.
- [46] WEINSTEIN B M. What guides early embryonic blood vessel formation? [J]. *Dev Dyn*, 1999, 215(1): 2-11.
- [47] HOEBEN A, LANDUYT B, HIGHLEY M S, *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(4): 549-580.
- [48] SIVEEN K S, PRABHU K, KRISHNANKUTTY R, *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(4): 339-351.
- [49] 冯宇梁, 李杰, 刘巾男, 等. 视网膜脉络膜新生血管性疾病机制及治疗研究进展[J]. *西部医学*, 2016, 28(09): 1328-1333.
- [50] ABE Y, WATANABE M, CHUNG S, *et al.* Balance of interstitial flow magnitude and vascular endothelial growth factor concentration modulates three-dimensional microvascular network formation[J]. *APL Bioeng*, 2019, 3(3): 036102.
- [51] YARALI Z B, ONAK G, KARAMAN O. Effect of Integrin Binding Peptide on Vascularization of Scaffold-Free Microtissue Spheroids[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2020, 17(5): 595-605.
- [52] 饶玮祎, 杨长明, 李竞航, 等. 生物 3D 打印技术及组织工程应用研究进展[J]. *电加工与模具*, 2023, 372(1): 1-8.
- [53] INGLIS S, CHRISTENSEN D, WILSON D I, *et al.* Human endothelial and foetal femur-derived stem cell co-cultures modulate osteogenesis and angiogenesis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 13.
- [54] SARKER M D, NAGHIEH S, SHARMA N K, *et al.* Bioprinting of Vascularized Tissue Scaffolds: Influence of Biopolymer, Cells, Growth Factors, and Gene Delivery[J]. *J Healthc Eng*, 2019, 2019: 9156921.
- [55] ITOH M, NAKAYAMA K, NOGUCHI R, *et al.* Correction: Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145971.
- [56] ARAI K, MURATA D, VERISSIMO A R, *et al.* Correction: Fabrication of scaffold-free tubular cardiac constructs using a Bio-3D printer[J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0243244.
- [57] DOMENECH M, POLO-CORRALES L, RAMIREZ-VICK J E, *et al.* Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration: Acellular Versus Cellular Scaffolds? [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016, 22(6): 438-458.
- [58] MIRI A K, MOSTAFAVI E, KHORSANDI D, *et al.* Bioprinters for organs-on-chips[J]. *Biofabrication*, 2019, 11(4): 042002.
- [59] NEWMAN FRISCH A, DEBBI L, SHUHMAHER M, *et al.* Advances in vascularization and innervation of constructs for neural tissue engineering[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, 73: 188-197.