



# 基于水凝胶的“自下而上”组织工程技术研究进展

刘灏<sup>①②</sup>, 黄国友<sup>①②\*</sup>, 李昱辉<sup>①②</sup>, 张晓慧<sup>①②</sup>, 卢天健<sup>②</sup>, 徐峰<sup>①②\*</sup>

① 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物信息工程教育部重点实验室, 西安 710049;

② 西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 西安 710049

\* 联系人, E-mail: wgyhuang@mail.xjtu.edu.cn; fengxu@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-05-22; 接受日期: 2014-09-29

国家自然科学基金(批准号: 11372243, 11120101002)、中国博士后基金(批准号: 2013M540742)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20130201120071)、陕西省自然科学基金基础研究计划(批准号: 2014JQ1004)和中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 8143051)资助  
doi: 10.1360/N052014-00164

**摘要** 随着微纳生物制造技术和新型生物材料(如新型水凝胶)的发展, 基于模块化组装的“自下而上”组织工程技术引起了广泛的关注, 在复杂微结构和血管化组织/器官构建方面显示了广阔的发展前景. 本文介绍了“自下而上”组织工程技术的基本原理及模块单元的制备和组装方法, 综述和讨论了“自下而上”组织工程技术在体外重构三维组织/器官方面取得的最新研究进展, 并对其在生物医学领域的发展前景进行了展望.

**关键词**

水凝胶  
模块化组装  
“自下而上”组织工程  
细胞打印

供体器官短缺是临床上一个亟待解决的问题, “组织工程”概念的提出和组织工程技术的发展为解决这一问题提供了一种最有潜力的解决方案. 自20世纪80年代提出以来, 组织工程技术飞速发展, 研究者们利用该技术已成功实现了工程化皮肤<sup>[1]</sup>、膀胱<sup>[2]</sup>和软骨<sup>[3]</sup>等较为简单结构的体外重构. 然而, 采用传统的“自上而下(top-down)”组织工程方法构建大尺寸复杂组织/器官仍存在两个瓶颈, 即微结构控制和血管化问题, 这严重制约了组织工程的发展<sup>[4]</sup>.

随着微纳生物制造技术和生物材料(如水凝胶)的发展, 一种新的“自下而上(bottom-up)”的组织工程技术应运而生<sup>[4]</sup>. 正如小叶之于肝、肾单位之于肾(图1), 很多人体组织/器官都由大量重复的功能单元构成. 有鉴于此, “自下而上”组织工程方法通过重复性功能单元模拟结构(即模块单元, 如载细胞微凝胶)的可控制备和组装, 构建具有特定微结构的三维功能化组织, 在大尺寸复杂组织/器官(如心脏<sup>[5]</sup>、肝<sup>[6]</sup>)构

建方面显示了极大的发展潜力和应用前景.

本文对“自下而上”组织工程技术中模块单元的制备和组装方法进行了综述和讨论, 对其在生物医学领域的发展前景进行了展望.

## 1 在体重复性功能单元

生物体内的多数重要组织/器官都是由大量重复的功能单元, 如肝小叶、肾单位、肌纤维和胰岛等组成(图1).

肝小叶是组成肝脏的基本功能单元, 是肝脏内许多形态相似、功能相同的基本单位. 肝小叶通常呈六角棱柱状, 成人肝脏中约有50万~100万个肝小叶. 每个肝小叶中央有一条中央静脉, 以此为中轴, 肝板、胆小管中央静脉、肝血窦及窦周间隙共同构成肝小叶的复杂立体构型. 在功能实现上, 肝血窦腔内表面的库普弗细胞具有吞噬功能, 能够清除血液中的

引用格式: 刘灏, 黄国友, 李昱辉, 等. 基于水凝胶的“自下而上”组织工程技术研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 256-270

Liu H, Huang G Y, Li Y H, et al. Advances in hydrogel-based bottom-up tissue engineering. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 256-270, doi: 10.1360/N052014-00164

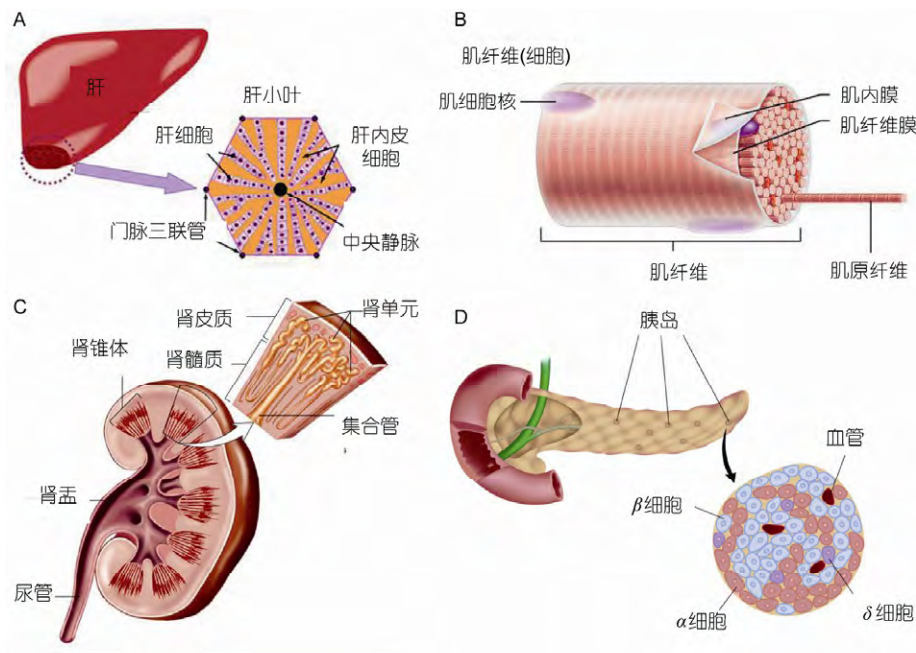


图1 由大量重复功能单元组成的器官/组织

A: 肝/肝小叶<sup>[7]</sup>; B: 肌肉组织/肌纤维<sup>[8]</sup>; C: 肾/肾单元<sup>[9]</sup>; D: 胰脏/胰岛<sup>[10]</sup>

外来抗原;而相邻肝细胞之间的胆小管可将胆汁汇集至小叶间的胆管内。

肾单位是构成肾脏的基本结构和功能单位。肾脏中包含一百多万个肾单位,每个肾单位由肾小体和肾小管组成,其中肾小体又包括肾小球和肾小囊。作为肾脏的基本功能单元,肾单位的主要作用是生成尿液,即经滤过作用调节血液中的水和溶质浓度,并对机体有用的物质(如水、钠盐、钾盐、葡萄糖)进行重吸收,同时将剩下的代谢废物以尿液的形式分泌并最终排出体外。除此以外,肾单位还兼具调节血压,维持体内酸碱平衡的功能,对生物体内环境稳态的维持具有重要意义。

肌纤维是骨骼肌的基本组成单元,呈现细而长的形态,是一单个的多核肌细胞。肌纤维相互聚拢形成肌束,肌束外包裹一层结缔组织膜,称为肌束膜。不同于结缔组织中的纤维,肌纤维内含有肌原纤维,具有收缩运动的功能,为机体运动和呼吸、消化和代谢等生理功能的实现提供动力。

胰岛是胰脏的基本功能单元,是胰脏内分泌腺中大量散布在腺泡之间的岛状细胞团结构。成人体

内的胰岛数量约100~200万个。胰岛的功能通过胰岛细胞实现,根据形态学特征可将胰岛细胞分为 $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 细胞、 $\gamma$ 细胞、 $\delta$ 细胞和 $\epsilon$ 细胞。其中,胰岛 $\beta$ 细胞可分泌胰岛素,调节血糖代谢,对体内正常血糖水平的维持起到重要作用。

## 2 模块单元的制备

“自下而上”组织工程技术的首要任务是构建功能性的模块单元。模块单元通常由微尺度的载细胞水凝胶(如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)<sup>[6,11]</sup>、胶原<sup>[12]</sup>、聚乙二醇二丙烯酸酯(polyethylene glycol diacrylate, PEG-DA)<sup>[13-15]</sup>、明胶-甲基丙烯酸酐(gelatin methacrylate, GelMA)<sup>[16]</sup>、琼脂糖<sup>[17,18]</sup>)构成,这与水凝胶的高含水量、生物相容性和可降解性以及便于加工成形等特性有关。作为三维细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的模拟物,水凝胶常被用于包裹细胞,构建细胞所需的微环境<sup>[19]</sup>。目前,制备载细胞微凝胶模块单元的常用方法有微孔板法<sup>[17,18]</sup>、光图形化法<sup>[20]</sup>和微流道法<sup>[21,22]</sup>(图2)。表1总结了这3种模块单元制备方法的优缺点。

表 1 不同模块单元制备方法比较

制备方法	优点	缺点	水凝胶材料
微孔板法	适用范围广, 操作简单	模块单元结构可控性不足, 脱模过程可能破坏模块单元	琼脂糖 <sup>[17,18]</sup>
光图形化法	模块单元结构可控性较好, 与多层组装工艺结合, 易于实现三维组织构建	只适用于光敏感材料, 光交联过程可能对细胞活性、功能表达产生影响	PEG-DA <sup>[13,20,23]</sup>
微流道法	可制备不同形状、尺寸的模块单元, 可调控模块单元位置, 利于实时组装	对材料快速成型性能具有一定要求	胶原、琼脂糖 <sup>[21,22,24]</sup>

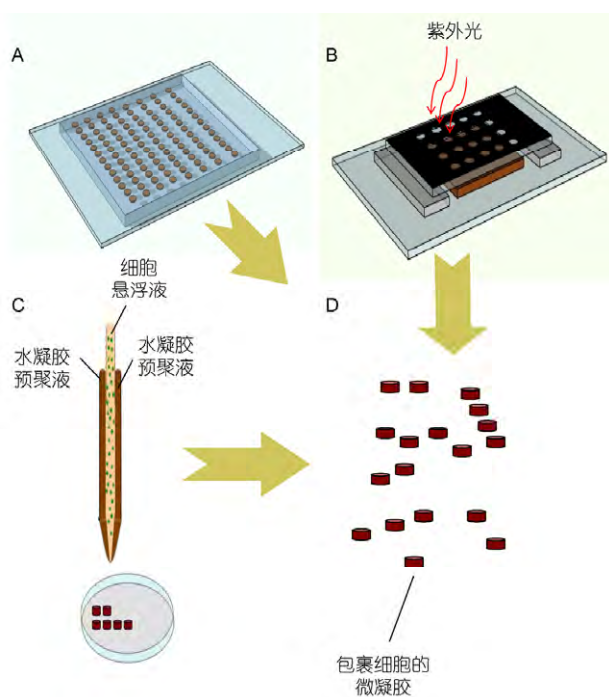


图 2 模块化单元制备方法示意图(网络版彩图)

A: 微孔板法; B: 光图形化法; C: 微流道法; D: 模块单元

## 2.1 微孔板法

微孔板法是指以微孔板作为模具, 通过翻模的方式直接构建模块单元的方法, 构建的模块单元可以是细胞球、微凝胶或载细胞的微凝胶. 采用该方法所形成模块单元的形状一般由微孔的结构和性质决定, 从最简单的球状<sup>[18]</sup>到棒状、圆环状<sup>[17]</sup>, 模块结构逐步趋于复杂, 却也能更好的贴合组织内部的实际构型. 其中, Dean 等人<sup>[17]</sup>通过微孔板法, 将相连的圆环状细胞团制成蜂巢状结构, 在制备具有特定形状模块化组织方面显示了很大的研究前景. McGuigan 等人<sup>[25]</sup>将悬浮有细胞的胶原溶液置于具有微孔结构的聚乙烯管道空腔中, 使之发生交联, 形成用于三维肝组织重构的圆柱状模块单元. 另外, Lef-

ink 等人<sup>[26]</sup>利用该方法, 制备了包裹细胞的环氧树脂微团, 可作为一种新型的支架元素来克服水凝胶承载能力不足和细胞分布不均的缺陷.

微孔板法适用范围广, 操作简单. 不过, 该方法受模板限制, 模块单元结构可控性不是很好, 并且脱模过程可能对模块单元造成破坏.

## 2.2 光图形化法

光图形化法是另一种制备模块单元的常用方法, 其主要过程如下: 将细胞悬浮液与光可聚合的水凝胶预聚物溶液混合, 然后将紫外光通过光掩膜投射到混合液的特定位置上, 使暴露于紫外光下的水凝胶预聚物交联<sup>[20]</sup>; 将未发生交联的水凝胶预聚物洗除后, 即形成与光掩膜图案一致的水凝胶模块. 利用此方法可获得大量具有特殊形状和尺寸的模块单元. 光图形化法最初源自于半导体加工制造工艺, 但目前已被广泛应用于组织工程, 尤其是三维组织构建方面的研究<sup>[6,16,27~29]</sup>. 利用该方法, Tsang 等人<sup>[6]</sup>将从 1~2 个月大的雌性小鼠 (*Mus musculus*) 中分离出的肝细胞包裹于 PEG-DA 凝胶中, 构建了能通过对流实现营养物质传递的特殊支架结构. 实验研究证明, 在这一高包裹密度的三维肝组织中, 细胞展现出了较高的活性和较好的功能表达水平. Liu 等人<sup>[13]</sup>则深入探究了紫外光照射下包裹细胞的 PEG-DA 水凝胶发生光交联的过程, 指出延长紫外照射时间可以得到更加吻合光掩膜尺寸的微凝胶结构, 从而提高图形分辨率; 另外, 实验还发现所使用的光引发剂(苯乙酮)对细胞有毒性, 且在紫外交联后产生的毒性愈发显著. 为简化操作步骤, Yoshida 等人<sup>[30]</sup>提出一种无须光掩膜的光图形化方式, 即利用光学显微镜物镜聚焦紫外光, 投射于充满水凝胶预聚溶液的微通道中, 通过移动载物台制得具有特殊形状、特定排列形式的微凝胶颗粒. 该方法主要是基于光学实验室常见的显微镜来实现光交联, 不仅操作简单, 且能对制

备的微凝胶进行精确定位,可应用于药物释放微芯片的制造。

光图形化法的突出优势在于:(i)通过改变照射条件<sup>[23]</sup>或光掩膜上的图案<sup>[31]</sup>,即可对模块单元的结构和物理性能进行调控;(ii)光图形化法可与多层组装工艺结合,易于实现三维大组织的构建。最近,为了方便地对模块单元结构进行控制,有研究者基于光致电动学(optically-induced electrokinetics, OEK)原理,提出了一种无需紫外光照射的光图形化新方法<sup>[32]</sup>。在该项研究中,由LCD投影仪产生的具有特殊图案的光经OEK芯片照射到PEG-DA上,在外加交流电场的的作用下,最终形成具有特殊几何形状的微凝胶结构。相比于传统的基于紫外光交联的光图形化法,此方法更为便捷,可极大提高特定结构模块单元的制备速度<sup>[32]</sup>。

但是,光图形化法也存在一定局限性,如只适用于光敏感的材料,光交联过程可能对细胞造成一定的损伤。此外,由于光的衍射作用,利用光掩膜形成的微凝胶对图案的还原精度也有一定的限制。

### 2.3 微流道法

微流道法是一种通过微管或微流道以挤出成形的的方式制备模块单元(如微凝胶或载细胞的微凝胶)的方法。产生模块单元的方式主要有液相乳化、压电喷射和机械喷射等方式。微流道法可实现对模块单元尺寸的精确控制,在最佳实验条件下,其多分散度可以控制在3%以下。在液相乳化技术中,微凝胶尺

寸的一致性主要由微流体乳化过程决定。在一种乳化机制中,两种不相溶液体的共流可形成单分散的乳化液滴<sup>[21]</sup>,而改变液体的流速即可实现对液滴尺寸的控制<sup>[22]</sup>。为了实现最小的表面自由能,乳化液滴通常聚集为球状。综合考虑流体动力学变量和热力学因素,目前已可制备一些复杂的多相结构(如胶囊状、两面状(Janus)<sup>[33]</sup>)液滴。在一项磁力引导的血管组织工程研究中,研究者们利用双面状微凝胶结构将细胞和磁性纳米颗粒分别包埋于不同的区域,实现了对模块单元的磁力操控,同时避免了磁性纳米颗粒对细胞造成影响<sup>[34]</sup>。

基于压电喷射和机械喷射方式,可以高效地制备具有不同尺寸分布和成分的模块单元。区别于其他单点作业的模块单元制备方法,上述方法的最大优势在于可实现对模块单元空间位置的精确调控<sup>[24]</sup>,为模块单元的实时组装提供了便利。在过去10年中,基于这些方法的生物打印技术得到了快速发展和广泛关注。后文将对此进行详细介绍。

## 3 模块单元的组装

在“自下而上”的组织工程技术中,模块单元的组装是决定能否形成功能性组织结构的关键环节。在保证构建的工程化组织具有稳定的力学性能以及与自体组织相互兼容的前提下,如何维持模块单元的微结构及细胞活性是实现这一过程的主要挑战。表2总结了不同模块单元组装方法的优缺点。该领域

表2 不同模块单元组装方法比较

组装方法	优点	缺点	水凝胶材料
模具约束法	适用范围广,操作简单	形成组织结构可调控性不足	胶原 <sup>[12]</sup>
引导轨道法	高度准确,零误差组装	无法形成复杂三维结构,低通量	PEG-DA <sup>[35]</sup>
界面自组装	简单易行	结构可控性不足,空间分辨率低	PEG <sup>[27,28]</sup>
磁力辅助组装	操作简单,控制精确	磁性纳米颗粒的使用可能会影响细胞行为,磁场衰减影响三维结构构建	PEG <sup>[36,37]</sup> 、胶原 <sup>[38]</sup>
声激励组装	快速,保证细胞高度活性	声波衰减影响三维结构形成,难以形成复杂三维结构	PEG <sup>[11]</sup>
静电作用力组装	方便多层、大型结构组装	仅适用于带电荷水凝胶,对细胞可能存在影响	聚甲基丙烯酸氧乙基三甲氯化铵(poly[2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride, PMETAC)、聚2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸钠(poly(2-acrylamido-2-methyl-propane sulfonic acid sodium salt), PNaAMPS) <sup>[39]</sup>
多步光图形化	可构建复杂三维结构工程化组织	光引发剂存在细胞毒性,操作不便,时间长	PEG <sup>[26,40]</sup>
DNA辅助组装	准确可靠,多路复用	难以形成复杂三维结构	琼脂糖、PEG、PEG-DA <sup>[41]</sup>
细胞打印	高空间分辨率,精确控制细胞分布	适用材料有限,打印过程可能影响细胞活性	胶原 <sup>[42]</sup>

目前面临的问题主要有: (i) 制备具有仿生力学性质的材料; (ii) 组装模块单元构建具有可控微结构的复杂组织; (iii) 形成功能化血管网络. 以下将主要介绍不同模块单元组装方法的原理、优势、局限性, 及其在组织工程领域的研究进展和应用前景.

### 3.1 模具约束法

模具约束法是指将制备好的模块单元混合于具有特殊几何构型的模具中, 使之相互融合从而形成与模具形状、尺寸相匹配的工程化组织. 在这一方法中, 所形成组织的几何结构由模具决定, 故仅需改变模具的几何特征便可实现对最终形成的工程化组织的形态控制. 随着计算机辅助设计的引入, 组织几何构型的设计早已突破了简单形状的限制, 可通过计算机软件设计实现较为复杂的、与实际组织形态更相符的结构<sup>[33]</sup>.

为了解决构建血管化组织这一难题, McGuigan 等人<sup>[12]</sup>首先在包裹 HepG2 细胞的短棒状胶原模块单元表面铺设一层人脐静脉血管内皮细胞, 以抑制血栓的形成; 然后利用填充的方式, 将模块单元装填入圆柱形容器中, 最终形成能实现血液灌流的血管网络结构(图 3A). 这些血管网络相互交错, 血液在其中流动, 可为包裹于胶原中的细胞提供营养和氧气供应, 以维持其活性及正常功能表达(图 3B). 此外, 采用类似方法, 将包裹有间充质干细胞的环氧树脂 SU-8 微团进行组装, 可形成宏观尺寸(毫米级别)的工程化组织, 其作为细胞载体的可行性已得到验证<sup>[26]</sup>(图 3C~E). 然而, 由于利用模具约束法制备的组织结构完全由模具的形状和尺寸所决定, 其结构可控性较差, 难以对组织内部微结构实现准确控制.

### 3.2 引导轨道法

流控自组装技术被广泛应用于电子设备制造领域, 因其柔性制造的特点而备受推崇<sup>[43]</sup>. 将该项技术引入“自下而上”的组织工程领域, 对模块单元进行组装, 从而出现了引导轨道法. 在该方法中, 整个组装过程都在微流体通道内完成: 组装前, 将制备好的模块单元悬浮于通道内液体中; 随着液体的流动, 这些模块单元沿微流道被运送至装配点, 实现组装.

Chung 等人<sup>[35]</sup>在聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)微流体通道的顶端打出凹槽形成轨道, 采用光流控无掩膜光蚀刻(optofluidic maskless

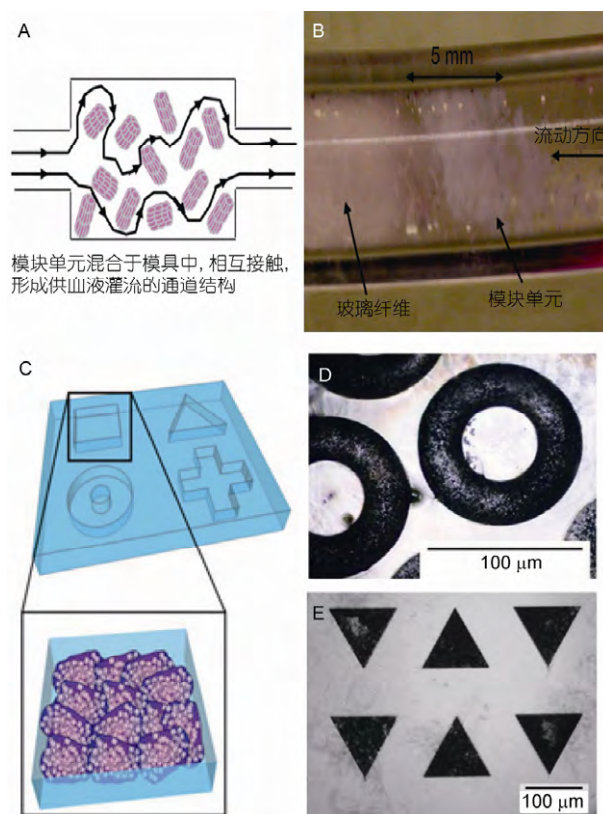


图 3 模具约束法(网络版彩图)

A, B: 利用模具约束法构建血管化组织结构(原理示意图(A)和结果图(B)<sup>[12]</sup>; C~E: 利用环氧树脂 SU-8 微团代替水凝胶作为细胞载体进行模具约束组装的原理示意图(C)及形成的圆环状(D)和三角形(E)组织结构<sup>[26]</sup>

lithography)技术, 制备出吻合通道内部结构的模块单元(图 4A, B), 在通道内流场的作用下, 这些模块单元沿轨道流动至轨道末端进行组装(图 4C). 此外, 还引入了微锁存器(microlatch)的结构, 以增强组装结构的稳定性. 传统的自组装技术多是符合自然概率论的热力学驱动过程, 与之相比, 借助流体自组装技术的引导轨道法准确性更高, 几乎可实现零误差装配. 另外, 应用该方法, 将引导轨道贯穿于两种不同液体之间, 可成功克服其间的强表面张力, 实现模块单元的跨液体运输, 从而实现异质自组装.

采用引导轨道法, 可实现复杂一维条状、二维平面结构微组织(至少由 50 个模块单元组成)的低误差构建<sup>[35]</sup>(图 4D~I), 但将其用于三维结构的构建却面临挑战. 目前, 虽然采用轴向平移和旋转的方法可实现一些简单三维形态结构的构建<sup>[34]</sup>, 但仍然无法满足组织工程对复杂三维结构的需求.

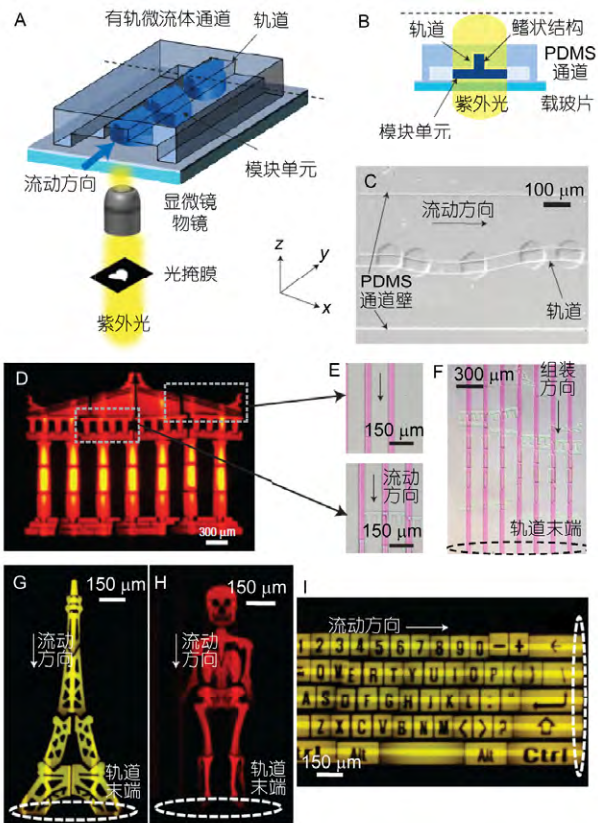


图4 引导轨道法(网络版彩图)

A, B: 有轨微流体通道示意图(A)和截面图(B); C: 模块单元沿轨道定向移动; D~I: 利用引导轨道法形成的复杂结构: 雅典卫城帕特农神庙(D)及其组装过程(F)、巴黎埃菲尔铁塔(G)、人体骨架(H)和键盘(I), 其中每一微结构在对应轨道上的组装独立进行(E)<sup>[35]</sup>

### 3.3 界面自组装

界面自组装是指模块单元在两种不同介质界面处受表面张力的驱动作用下发生聚集, 进而形成有序的二维或三维结构. 为了提高组装结构的稳定性, 在组装完成后可进行一次光交联, 使模块单元直接形成化学连接<sup>[27]</sup>. 目前, 界面自组装方法可区分为液-液界面自组装<sup>[27]</sup>、液-气界面自组装<sup>[31]</sup>两大类, 其中又以液-液界面自组装为主.

在基于油-水两相的液-液自组装系统中, 疏水作用是自组装的最主要推动力: 在热动力趋势的作用下, 模块单元发生聚集, 最终组装成具有最小表面自由能的结构. 模块单元的形状可能会受到如搅拌速度、搅拌时间、模块单元长宽比等实验参数的影响. 利用液-液界面的表面张力作用, Du 等人<sup>[27]</sup>将包裹细胞的水凝胶颗粒置于疏水的培养液(矿物油)中进行

搅拌, 组装成具有可控三维结构的工程化组织; 并通过二次光交联反应, 对包裹不同类型细胞的微凝胶颗粒进行组装, 实现了多细胞组织的构建(图 5). 研究表明, 从诸如球状、棒状、分枝状等简单结构到锁钥形状等较复杂构型, 均可通过该方法实现<sup>[27]</sup>. 采用传统的组织工程技术构建复杂组织, 繁杂且耗时, 界面自组装方法的出现让研究者们看到了解决这一问题的广阔前景<sup>[27]</sup>.

在液-气界面自组装中, 模块单元悬浮在高密度溶液表面, 并在液-气界面张力的作用下发生聚集, 形成宏观尺寸的三维组织<sup>[31]</sup>. 但是, 在液-液界面自组装和液-气界面自组装过程中, 所形成的组织形状由异质间的界面决定, 且数量十分有限. 为了解决这一问题, 有研究者提出微砖块组装的概念, 将模块单元与预聚体溶液混合并散布在弹性材料 PDMS 表面, 在预聚体溶液毛细力的作用下, 紧密贴附在 PDMS 模板表面, 形成一层“凝胶墙”<sup>[28]</sup>. 利用该方法组装微凝胶, 最终形成的三维组织的形貌完全由 PDMS 模板决定, 故可通过改变模板的形状得到具有特定构型的工程化组织.

界面自组装的优势在于简单易行, 不需要复杂的装配和操作过程. 但是, 在组装过程中, 可能会出现一些随机的不可控结构<sup>[27]</sup>.

### 3.4 磁力辅助组装

磁力辅助组装是指利用模块单元在非均匀磁场作用下的磁响应特性, 借助磁场作用力驱动模块单元进行组装. 在模块单元中加入磁性纳米粒子以赋予其磁响应特性, 即可利用磁场对模块单元进行操作. 目前使用较多的磁性纳米粒子有磁性四氧化三铁纳米颗粒( $Fe_3O_4$ )和阳离子脂质体, 其中  $Fe_3O_4$  纳米粒子已获美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于生物医学领域. 磁性纳米颗粒可直接标记在细胞膜表面或进入细胞内, 在外加磁场的驱动下, 标记的细胞发生定向聚集形成细胞层, 逐层累加即可形成三维结构<sup>[44,45]</sup>. 另外, Xu 等人<sup>[37]</sup>提出将磁性纳米颗粒标记的细胞包裹于微凝胶中, 经磁场作用组装微凝胶, 进而形成具有宏观尺度的工程化组织. 研究发现, 通过控制磁场的空间分布, 可实现微凝胶的多行组装和阵列组装, 而三维结构的构建也可通过多层组装的方式实现(图 6).

有别于上述将永磁体置于组装平台下方使细胞

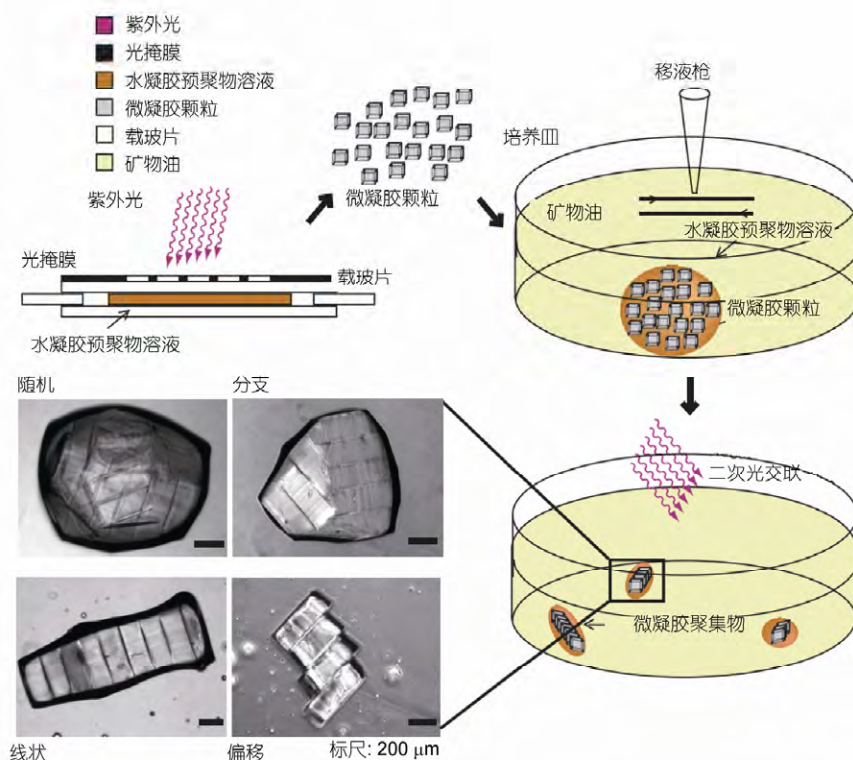


图5 界面自组装(网络版彩图)

将由光图形化法制成的微凝胶颗粒置于盛有矿物油的培养皿中,并前后搅拌,再暴露在紫外照射下,经二次光交联作用,最终得到随机、分支、线状、偏移等四种凝胶团结构<sup>[27]</sup>

或凝胶聚集于培养基底部的磁力自组装技术<sup>[37]</sup>, 研究者们提出了一种新的方法,即磁悬挂(magnetic levitation)法.该方法将永磁体悬挂于培养液上方,在磁场作用下,磁性颗粒标记的细胞或凝胶悬浮在培养液面上并发生聚集,形成细胞团.移动磁铁或改变磁铁的几何尺寸,可影响磁场的空间梯度分布,从而改变聚集的细胞或凝胶团块的三维结构<sup>[46-48]</sup>.

工业合成的磁性纳米颗粒能与细胞产生直接、长期的相互作用,影响细胞活性、表型和功能,同时也会发生凝聚<sup>[49]</sup>.针对这些问题,有研究者利用双面状结构的胶原,将细胞和铁磁性纳米颗粒包埋于两分离的区域,可减少铁磁性纳米颗粒对细胞活性的影响<sup>[50]</sup>.也有研究指出,磁性铁蛋白(生物磁性纳米颗粒)对细胞活性影响很小,有望取代工业合成的 $Fe_3O_4$ 纳米颗粒<sup>[51]</sup>.此外,利用PEG凝胶具有弱顺磁性的原理,不添加任何的磁性纳米颗粒,对包裹细胞的PEG凝胶进行了组装,可形成多种三维结构<sup>[36]</sup>.针对这一新的磁力组装方法,有必要进一步开展深

入研究.

为了克服现存方法不能实现软硬物质共同组装、并根据需求进行重构的弊端,Tasoglu等人<sup>[52]</sup>提出了一种基于磁场作用的三维异质装配方法,整个装配过程通过置于微流体环境中的磁性微机器人实现:在磁场的遥控作用下,该微机器人将不同材质的模块单元进行组装,形成具有特殊可调控形貌、化学特性的二维或三维异质结构.实验研究证明,这是一种分辨率可达几十微米的高精度模块单元组装方式,同时兼具优秀的重构性,为三维结构的动态调控带来极大方便.目前,这一方法在“自下而上”组织工程领域的应用已得到证实.

综上所述,基于磁力的模块单元组装方法具有操作简单、控制精确的特点.适宜的磁场强度对细胞的增殖、代谢等行为不会产生明显的影响.但是,过强磁场的使用有可能影响细胞的活性和正常功能<sup>[53]</sup>,而所能形成三维结构的层数也受到磁场衰减和磁性纳米颗粒浓度的限制.

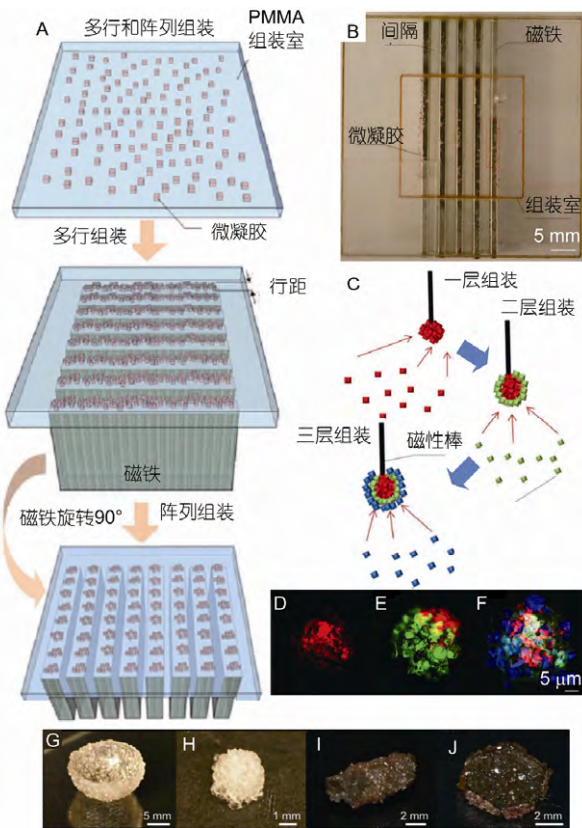


图6 磁力辅助组装

A, B: 利用磁力进行平面组装的原理示意图(A)和结果图(B); C~J: 利用磁力进行三维体组装的原理示意图(C), 所形成多层结构的各层荧光图像(D~F)和其他三维结构如穹顶(G)、球状(H)、管状(I)和六边形(J)<sup>[37]</sup>

### 3.5 声激励组装

各种声学技术已被广泛应用于医学成像领域. 最近, Xu 等人<sup>[11]</sup>首次将声激励引入“自下而上”组织工程, 用于模块单元的组装: 在该方法中, 组装室(如培养皿)被置于一压电换能器上部, 换能器在脉冲发生器的激励下发生形变、振动, 从而产生声波; 在声波的作用下, 散布于组装室中的模块单元开始移动, 相互聚集, 形成致密的凝胶团(图 7A). 应用该技术, 不仅可实现多种形状(如方形、Z形、锯齿形、锁钥形等)模块单元的单层组装(图 7B), 还可通过逐层组装的方法构建三维多层结构(图 7C), 而且在组装过程中细胞能够保持很高的活性(>90%).

快速是声激励组装的最大特点, 对简单几何形状(如方形)水凝胶的组装, 通常仅需几秒钟的时间便可完成. 值得一提的是, 声波的频率、幅度均由脉冲

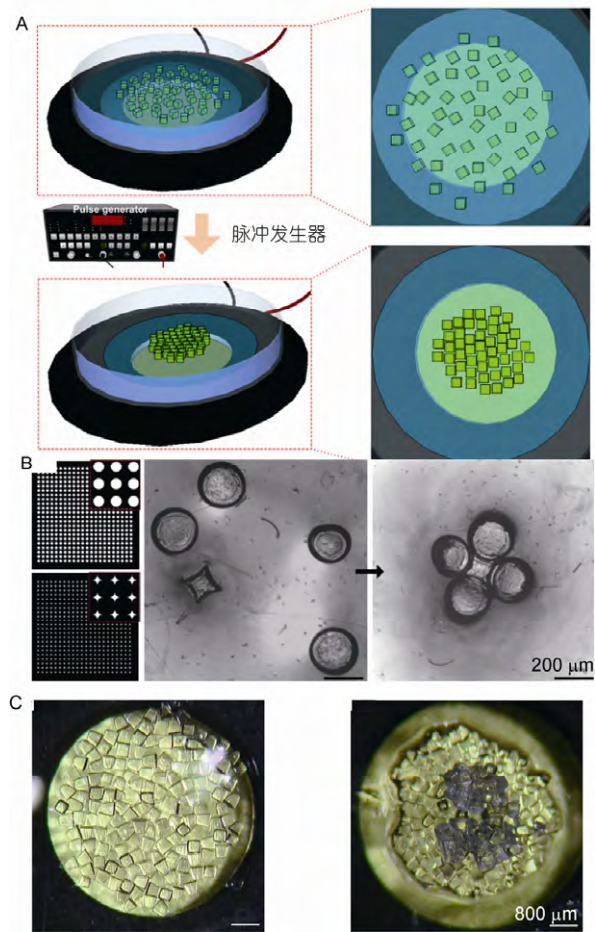


图7 声激励组装

A: 声激励组装过程示意图; B: 经声激励组装所形成的二维锁钥结构; C: 经声激励组装所形成的三维球状结构<sup>[11]</sup>

发生器调控, 这无疑大大降低了实验操作的复杂程度. 此外, 相较于其他模块单元组装方法, 声波激励是一种非侵入式的组装方法, 可保证较高的细胞活性. 但是, 利用声激励法组装形成的凝胶聚集体不稳定, 通常需利用再次光交联进行加固. 当构建多层结构时, 声波还会沿凝胶厚度方向衰减, 故最终可形成的组织形状和层数具有一定的局限性.

### 3.6 静电作用力组装

静电作用是一种常见的自然现象, 是电荷在空间中产生电磁场而相互产生力的作用, 包括静电引力和静电斥力. 目前, 静电作用在微米颗粒自组装方面已经有很多成功的应用<sup>[54]</sup>. 而且, 带电荷的水凝胶会展现出不凡的生物效应. 在一项研究中, Chen 等



人<sup>[55]</sup>证实带有负电荷的聚 2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸钠(PNaAMPS)水凝胶可促进内皮细胞的贴附、增殖并提高其与血小板的相容性。

另外, 徐峰课题组<sup>[39]</sup>最近利用带电荷水凝胶之间的静电作用, 成功组装出了具有二维、三维结构的工程化组织. 在这一研究中, 首先将 PEG 前聚体溶液和甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵(METAC)或 2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸钠(NaAMPS)混合均匀, 然后利用光图形化技术, 制备得到特定形状的两种带电荷微凝胶模块单元: 带正电荷的聚甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵(PMETAC)和带负电荷的 PNaAMPS (图 8A). 在组装过程中, 带有相反电荷的 PMETAC 和 PNaAMPS 相互吸引, 有序地聚集形成紧密的二维结构, 如方形棋盘结构(图 8B)和锁钥形结构(图 8C).

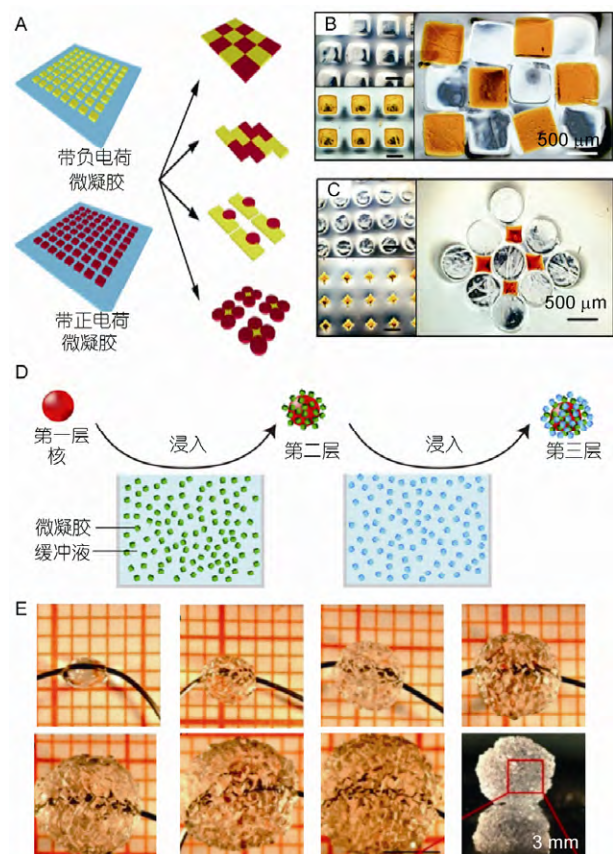


图 8 静电作用力组装(网络版彩图)

A~C: 利用静电作用力对带电荷微凝胶进行二维组装的原理示意图(A)及对方形(B)、锁钥形(C)微凝胶进行组装的结果图, 其中橙色微凝胶带有正电荷、透明微凝胶带有负电荷; D, E: 利用静电作用力对带电荷微凝胶进行多层三维组装的原理示意图(D)及所形成的 7 层球状结构(E)<sup>[39]</sup>

通过反复将凝胶团浸入带有相反电荷微凝胶的溶液中, 形成三维多层结构, 如多层球装结构(图 8D~E).

分子之间存在范德华力, 这一相互作用可能会对组装过程产生不可控的影响. 但理论分析指出, 微凝胶颗粒之间的静电作用力即使在两微凝胶颗粒没有完全接触情况下仍可维持整个结构的稳定, 远大于范德华力, 因此这一弱相互作用对于组装过程产生的影响微乎其微. 另外, 在这一组装过程中, 作为驱动力的静电作用由两相邻的带相反电荷的水凝胶提供, 对于三维多层结构来说, 这一驱动力便是相邻两层水凝胶间的相互吸引. 因此, 静电作用并不会像磁力组装和声波组装中的磁场、声波一样逐层衰减, 从而可用于实现更多层、更大尺寸组织结构的组装. 当然, 静电作用组装也存在着局限性, 如可用的材料选择范围较小, 且电荷对细胞本身可能会有影响.

### 3.7 多步光图形化

多步光图形化技术由光图形化法发展而来. 在“自下而上”组织工程中, 首先经光交联作用形成二维水凝胶结构, 然后改变光掩膜的位置或采用不同的光掩膜, 通过相同的光交联过程, 可在之前形成的结构之上产生第二层水凝胶结构, 如此反复, 层层组装, 便可形成具有特殊几何结构的三维工程化组织<sup>[6]</sup>(图 9). 基于该技术, 可采用 PEG 水凝胶实现肝组织的体外重构<sup>[6]</sup>. 在另一项研究中, Chan 等人<sup>[14]</sup>比较了“自上而下”和“自下而上”两种光图形化组装方法, 并提出了应用该方式进行多细胞组织构建的可能性.

对于光图形化组装, 不同三维结构的构建可通过光掩膜的设计来实现, 因此可以完成复杂三维结构工程化组织的构建. 另外, 通过在不同的层面使用不同种类的细胞和水凝胶, 实现多细胞组织构建和细胞的共培养. 但同时, 光图形化法也存在适用材料范围有限、操作不便以及时间长等弊端.

### 3.8 DNA 辅助组装法

DNA(脱氧核糖核酸)是一种双链结构分子, 两条脱氧核苷酸单链按碱基互补配对原则, 对应的碱基腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)以双键形式连接, 胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)以三键形式连接, 形成高度精确的双螺旋结构. 从 DNA 分子的这一组装方式得到启发, 研究者利用 DNA 单链作为粘合剂, 控制蛋白质<sup>[56]</sup>、

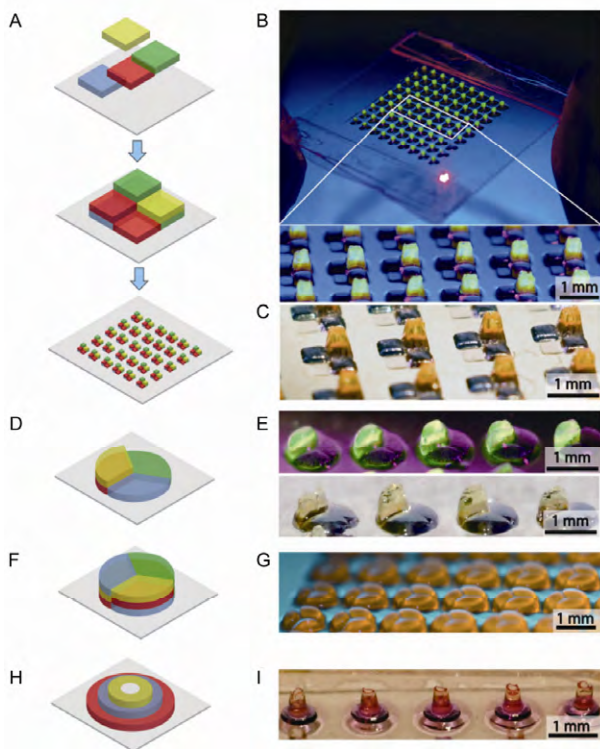


图9 多步光图形化法(网络版彩图)

A~C: 通过多步光图形化法进行三维方形结构组装的原理示意图(A)及其所形成阵列的结果图(B, C); D~G: 通过多步光图形化法进行三维径向圆结构组装的原理示意图(D, F)及相应结果图(E, G); H, I: 通过多步光图形化法进行三维同心圆结构组装的原理示意图(H)及结果图(I)<sup>[40]</sup>

无机纳米颗粒<sup>[57]</sup>、碳纳米管<sup>[58]</sup>等分子的自组装。后来,这种引入 DNA 辅助的组装方式也应用到组织工程领域,实现多细胞组织的构建<sup>[59]</sup>。

DNA 辅助组装方法由 Qi 等人<sup>[41]</sup>首先提出,在这一组装过程中,包裹细胞的水凝胶被不同的 DNA 单链标记,根据碱基互补配对原则,两两特异相连,在对应碱基之间氢键的作用下形成水凝胶的二聚物(图 10A~C)。为了形成更复杂的结构, Qi 等人<sup>[41]</sup>分别用 4 条不同的 DNA 单链来装饰立方体水凝胶单元的 4 个面,使之可以在 4 个不同的方向实现特异连接,并得到了链状(图 10D)和网状(图 10E)的组装结构。DNA 黏连的强度可以通过调整凝胶表面 DNA 的密度和长度来改变,其中 DNA 长链可以利用一个短的 DNA 引物通过滚环扩增技术得到,从而达到优化组装过程的目的<sup>[42]</sup>。

DNA 辅助组装利用碱基互补配对原则,拥有高

度准确可靠的优点。另外,得益于在 DNA 的标记下水凝胶是两两特异相连,二聚物的组成是一并行过程,因此它还是一种多路复用的组装方法。但是,上述研究工作虽然初步证明了 DNA 辅助组装在“自下而上”组织工程领域应用的可能性,其在构建三维复杂组织结构方面的潜力仍然有待进一步探索。

### 3.9 细胞打印

细胞打印技术是一种基于快速成型技术的以层层叠加方式构建三维功能组织/器官的生物制造技术。自 2003 年首次被提出以来<sup>[60]</sup>,细胞打印技术已在组织工程领域得到了广泛关注,先后有喷墨打印<sup>[60]</sup>、喷射打印<sup>[61]</sup>、激光打印<sup>[62]</sup>以及声控打印<sup>[63]</sup>等细胞打印技术涌现,详细介绍可以参考文献<sup>[64]</sup>。

在典型的细胞打印(如压力辅助打印)过程中,包含细胞与水凝胶预聚体的混合液在计算机的控制下,通过喷头以液滴的形式喷出,在接收基底表面快速交联和固化,并借助三维移动平台,通过按需逐点打印和层层叠加的方式,达到精确构建三维复杂结构的目的(图 11)。目前已有研究者应用该方法打印液滴,构建可模拟特殊组织功能的液滴网络。这一功能化液滴网络不但可以像肌肉一样自发收缩、舒张,还可为实现神经组织传导电信号的功能,显示了细胞打印的广阔应用前景<sup>[65]</sup>。此外,为了最大程度的还原活体内的组织结构,核磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)、计算机断层扫描(computed tomography, CT)等医学成像技术也会被应用到这一过程中,用来获取人体内真实组织的图像,再根据这些信息,利用计算机辅助设计软件来设计需要打印的组织结构<sup>[66]</sup>。

近年来,组织工程技术快速发展,取得不少瞩目的成就,不过,血管化三维组织的构建仍面临巨大挑战。细胞打印技术的逐渐成熟使解决这一难题成为可能。为证实利用细胞打印构建三维血管化组织的可行性,有研究者通过喷墨打印技术用内皮细胞团和平滑肌细胞团成功组装了简单三维血管化结构<sup>[66]</sup>。在另一项研究中,研究者通过打印组成血管树的三种基本单元:实心血管微组织、单腔血管微组织和特征微血管微组织,形成血管网络,实现三维血管化组织的构建<sup>[42]</sup>。

细胞打印技术中模块单元的制备和组装过程几乎同时进行,显著提高了效率。并且,通过计算机辅

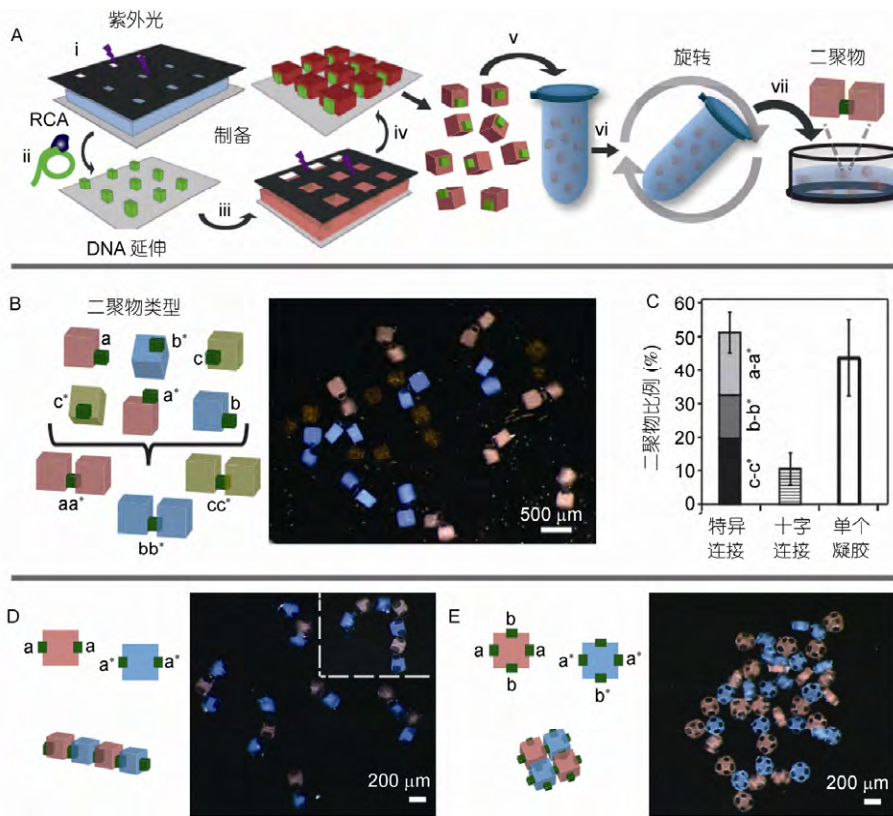


图 10 DNA 辅助组装(网络版彩图)

A: DNA 标记微凝胶的制备流程及组装形成二聚物的过程; B: 由互补的 DNA 单链标记的方形微凝胶两两相连, 形成二聚物; C: 对所形成二聚物类型的量化分析; D: 通过 DNA 辅助组装形成的长链状结构; E: 通过 DNA 辅助组装形成的网状结构<sup>[41]</sup>

助设计和制造, 有望实现任意复杂组织结构的精确构建。但是, 目前这一技术也有一些困难需要克服, 比如: 目前适用于细胞打印的生物材料还比较有限, 且有些水凝胶材料(如明胶)具有一定黏性, 在打印过程中, 容易引起打印喷头堵塞, 给操作带来不便; 另外, 细胞打印过程产生的剪切力等可能会对某些细胞的活性和功能带来不利影响。

#### 4 总结与展望

“自下而上”组织工程技术迅速发展, 已经成为组织工程领域一个热点研究方向, 被认为是解决复杂组织/器官构建最有潜力的方案。尽管如此, 目前很多“自下而上”组装方法还只是一些初步的探索性的研究, 为了实现大范围推广和临床应用, 仍然有许多问题需要解决。

(i) “自下而上”组织工程技术的基本要素之一

是模块单元, 模块单元的特性直接影响到组织的结构和功能。虽然目前的方法已经可以制备一些特定形状和成分的模块单元, 但这种模块单元与人体中功能性单元的结构和功能仍有很大差距; (ii) 人体中组织/器官不是功能性单元简单的重复堆积, 单元与单元之间的连接和耦合作用对系统组织/器官的生物-力-电行为具有重要影响, 因此需要对模块单元的组装过程进行更为精确的调控; (iii) 血管化问题是组织工程发展的一个瓶颈问题, 也是“自下而上”组织工程技术发展所必须解决的一个挑战性问題, 目前的方法虽能实现一定结构仿生血管网络的构建, 但与真实血管网络的结构和功能仍相差甚远; (iv) 化学刺激和力学刺激等对组织/器官的形成和功能化具有重要影响, 因此, 如何设计生物反应器, 对模块单元以及三维组装结构进行可控的化学和力学调控也是一个需要深入研究的问题; (v) 模块单元组装仍面临着所形成结构不稳定的难题, 通常, 在正常的

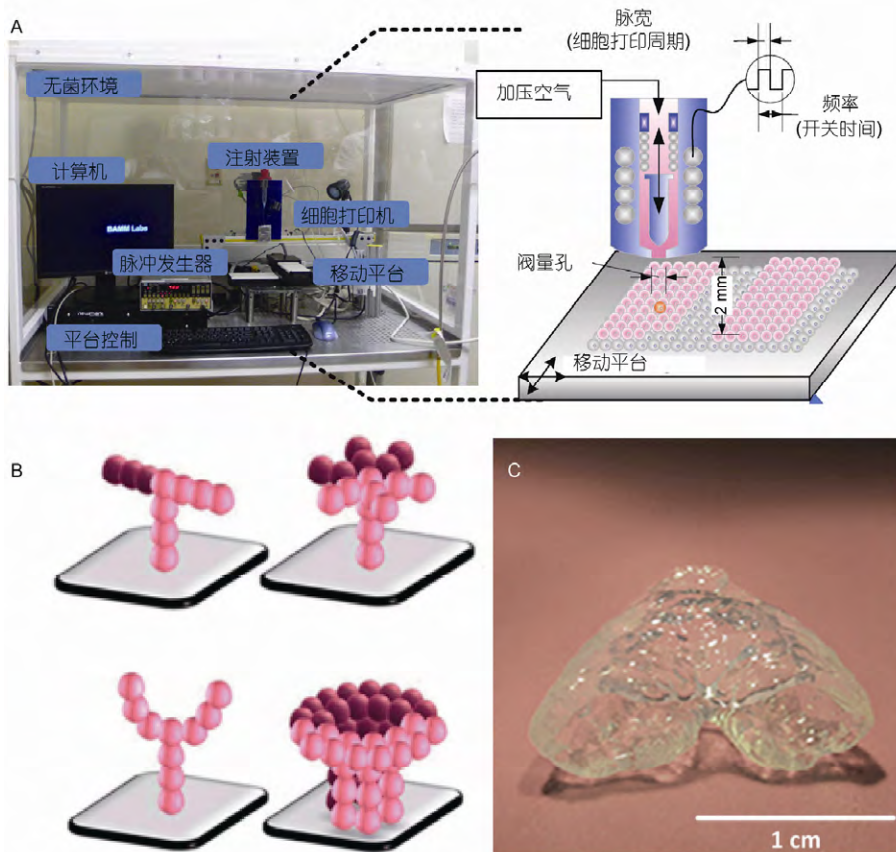


图 11 细胞打印(网络版彩图)

A: 细胞打印原理示意图<sup>[67]</sup>; B: 经细胞打印形成的三维结构示意图; C: 通过细胞打印所形成的三维血管分支结构<sup>[68]</sup>

微凝胶组装过程之后, 还需进行一步交联反应对所形成结构进行加固, 目前虽然通过 DNA 辅助组装已能得到较稳定的结构, 但却难以形成复杂的三维结构, 因此更多更优的解决方案仍有待提出; (vi) 与传统组织工程技术一样, “自下而上”组织工程技术的最终目标是要实现组织/器官移植, 而这种工程化的组织/器官在移植到体内后与在体环境的相容性、力学性能匹配能力以及血管网络的连通性等都需要

解决.

随着微纳生物制造技术的发展和新型生物材料的出现, “自下而上”组织工程技术定会推动组织工程和再生医学的发展, 朝着可移植组织/器官的目标迈进, 形成一场影响深远的医学革命. 与此同时, “自下而上”组织工程技术在基于体外模型的病理生理机理以及药物筛选研究中也将会得到极大的发展和应用.

### 参考文献

- 1 Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997, 276: 75–81
- 2 Oberpenning F, Meng J, Yoo J J, et al. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 149–155
- 3 Hillsley M V, Frangos J A. Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 43: 573–581
- 4 Nichol J W, Khademhosseini A. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter*, 2009, 5: 1312–1319

- 5 Naito H, Melnychenko I, Didié M, et al. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*, 2006, 114: 172–178
- 6 Liu Tsang V, Chen A A, Cho L M, et al. Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB J*, 2007, 21: 790–801
- 7 <http://memsliu.pme.nthu.edu.tw/MSCL%20Projects/Liver%20cell%20patterning.htm>
- 8 <http://www.studyblue.com/notes/note/n/pre-ap-biology-study-guide-2012-13-mrsedward/deck/9722162>
- 9 <http://smabio113-2010.blogspot.com>
- 10 <http://www.interactive-biology.com/3906/dont-forget-about-the-endocrine-system-the-key-players-in-maintaining-body-homeostasis/>
- 11 Xu F, Finley T D, Turkaydin M, et al. The assembly of cell-encapsulating microscale hydrogels using acoustic waves. *Biomaterials*, 2011, 32: 7847–7855
- 12 McGuigan A P, Sefton M V. Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11461–11466
- 13 Liu V A, Bhatia S N. Three-dimensional photopatterning of hydrogels containing living cells. *Biomed Microdevices*, 2002, 4: 257–266
- 14 Chan V, Zorlutuna P, Jeong J H, et al. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip*, 2010, 10: 2062–2070
- 15 Liu B, Liu Y, Lewis A K, et al. Modularly assembled porous cell-laden hydrogels. *Biomaterials*, 2010, 31: 4918–4925
- 16 Ramón-Azcón J, Ahadian S, Obregón R, et al. Gelatin methacrylate as a promising hydrogel for 3D microscale organization and proliferation of dielectrophoretically patterned cells. *Lab Chip*, 2012, 12: 2959–2969
- 17 Dean D M, Napolitano A P, Youssef J, et al. Rods, tori, and honeycombs: the directed self-assembly of microtissues with prescribed microscale geometries. *FASEB J*, 2007, 21: 4005–4012
- 18 Fayol D, Frasca G, Le Visage C, et al. Use of magnetic forces to promote stem cell aggregation during differentiation, and cartilage tissue modeling. *Adv Mater*, 2013, 25: 2611–2616
- 19 Khademhosseini A, Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 2007, 28: 5087–5092
- 20 Revzin A, Russell R J, Yadavalli V K, et al. Fabrication of poly (ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir*, 2001, 17: 5440–5447
- 21 Christopher G F, Anna S L. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *J Phys D Appl Phys*, 2007, 40: R319
- 22 Sun W, Starly B, Nam J, et al. Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering. *Comput Aided Design*, 2005, 37: 1097–1114
- 23 Liu J, Gao D, Li H-F, et al. Controlled photopolymerization of hydrogel microstructures inside microchannels for bioassays. *Lab Chip*, 2009, 9: 1301–1305
- 24 Eydelnant I A, Li B B, Wheeler A R. Microgels on-demand. *Nat Commun*, 2014, 5: 3355
- 25 McGuigan A P, Sefton M V. Design and fabrication of sub-mm-sized modules containing encapsulated cells for modular tissue engineering. *Tissue Eng*, 2007, 13: 1069–1078
- 26 Leferink A, Schipper D, Arts E, et al. Engineered micro-objects as scaffolding elements in cellular building blocks for bottom-up tissue engineering approaches. *Adv Mater*, 2014, 26: 2592–2599
- 27 Du Y, Lo E, Ali S, et al. Directed assembly of cell-laden microgels for fabrication of 3D tissue constructs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 9522–9527
- 28 Fernandez J G, Khademhosseini A. Micro-masonry: construction of 3D structures by microscale self-assembly. *Adv Mater*, 2010, 22: 2538–2541
- 29 Soman P, Chung P H, Zhang A P, et al. Digital microfabrication of user-defined 3D microstructures in cell-laden hydrogels. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 3038–3047
- 30 Yoshida R, Omata K, Yamaura K, et al. Maskless microfabrication of thermosensitive gels using a microscope and application to a controlled release microchip. *Lab Chip*, 2006, 6: 1384–1386
- 31 Zamanian B, Masaeli M, Nichol J W, et al. Interface-directed self-assembly of cell-laden microgels. *Small*, 2010, 6: 937–944
- 32 Liu N, Liang W, Liu L, et al. Extracellular-controlled breast cancer cell formation and growth using non-UV patterned hydrogels via optically-induced electrokinetics. *Lab Chip*, 2014, 14: 1367–1376
- 33 Hollister S J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*, 2005, 4: 518–524
- 34 Chung S E, Jung Y, Kwon S. Three-dimensional fluidic self-assembly by axis translation of two-dimensionally fabricated microcomponents in railed microfluidics. *Small*, 2011, 7: 796–803
- 35 Chung S E, Park W, Shin S, et al. Guided and fluidic self-assembly of microstructures using railed microfluidic channels. *Nat Mater*, 2008, 7: 581–587

- 36 Tasoglu S, Kavaz D, Gurkan U A, et al. Paramagnetic levitational assembly of hydrogels. *Adv Mater*, 2013, 25: 1137–1143
- 37 Xu F, Wu C A M, Rengarajan V, et al. Three-dimensional magnetic assembly of microscale hydrogels. *Adv Mater*, 2011, 23: 4254–4260
- 38 Tseng H, Gage J A, Raphael R, et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole co-culture model using magnetic levitation. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19: 665–675
- 39 Han Y L, Yang Y, Liu S, et al. Directed self-assembly of microscale hydrogels by electrostatic interaction. *Biofabrication*, 2013, 5: 035004
- 40 Gurkan U A, Fan Y, Xu F, et al. Simple precision creation of digitally specified, spatially heterogeneous, engineered tissue architectures. *Adv Mater*, 2013, 25: 1192–1198
- 41 Qi H, Ghodousi M, Du Y, et al. DNA-directed self-assembly of shape-controlled hydrogels. *Nat Commun*, 2013, 4: 2275
- 42 Mironov V, Visconti R P, Kasyanov V, et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 2009, 30: 2164–2174
- 43 Yeh H J J, Smith J S. Fluidic self-assembly for the integration of GaAs light-emitting diodes on Si substrates. *IEEE Photonics Technol Lett*, 1994, 6: 706–708
- 44 Akiyama H, Ito A, Kawabe Y, et al. Fabrication of complex three-dimensional tissue architectures using a magnetic force-based cell patterning technique. *Biomed Microdevices*, 2009, 11: 713–721
- 45 Okochi M, Takano S, Isaji Y, et al. Three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning for analysis of invasive capacity of BALB/3T3/v-src. *Lab Chip*, 2009, 9: 3378–3384
- 46 Tseng H, Balaoing L R, Grigoryan B, et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. *Acta Biomater*, 2014, 10: 173–182
- 47 Kim J A, Choi J-H, Kim M, et al. High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*, 2013, 34: 8555–8563
- 48 Souza G R, Molina J R, Raphael R M, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 291–296
- 49 Rose S, PrevotEAU A, Elzière P, et al. Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. *Nature*, 2014, 505: 382–385
- 50 Dobson J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 139–143
- 51 Mattix B, Olsen T R, Gu Y, et al. Biological magnetic cellular spheroids as building blocks for tissue engineering. *Acta Biomater*, 2014, 10: 623–629
- 52 Tasoglu S, Diller E, Guven S, et al. Untethered micro-robotic coding of three-dimensional material composition. *Nat Commun*, 2014, 5: 3124
- 53 Wang Z, Yang P, Xu H, et al. Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis. *Bioelectromagnetics*, 2009, 30: 446–453
- 54 Kalsin A M, Fialkowski M, Paszewski M, et al. Electrostatic self-assembly of binary nanoparticle crystals with a diamond-like lattice. *Science*, 2006, 312: 420–424
- 55 Chen Y M, Tanaka M, Gong J P, et al. Platelet adhesion to human umbilical vein endothelial cells cultured on anionic hydrogel scaffolds. *Biomaterials*, 2007, 28: 1752–1760
- 56 Yan H, Park S H, Finkelstein G, et al. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science*, 2003, 301: 1882–1884
- 57 Macfarlane R J, Lee B, Jones M R, et al. Nanoparticle superlattice engineering with DNA. *Science*, 2011, 334: 204–208
- 58 Maune H T, Han S-P, Barish R D, et al. Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 61–66
- 59 Li C Y, Wood D K, Hsu C M, et al. DNA-templated assembly of droplet-derived PEG microtissues. *Lab Chip*, 2011, 11: 2967–2975
- 60 Wilson W C, Boland T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003, 272: 491–496
- 61 Abeyewickreme A, Kwok A, McEwan J R, et al. Bio-electrospraying embryonic stem cells: interrogating cellular viability and pluripotency. *Integr Biol*, 2009, 1: 260–266
- 62 Koch L, Deiwick A, Schlie S, et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1855–1863
- 63 Demirci U, Montesano G. Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets. *Lab Chip*, 2007, 7: 1139–1145
- 64 周丽宏, 陈自强, 黄国友, 等. 细胞打印技术及应用. *中国生物工程杂志*, 2010, 30: 95–104
- 65 Durmus N G, Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting: functional droplet networks. *Nat Mater*, 2013, 12: 478–479
- 66 Mironov V, Boland T, Trusk T, et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 157–161
- 67 Moon S, Hasan S K, Song Y S, et al. Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue Eng Part C Methods*, 2009, 16: 157–166

68 Duarte Campos D F, Blaeser A, Weber M, et al. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication*, 2013, 5: 015003

## Advances in Hydrogel-based Bottom-Up Tissue Engineering

LIU Hao<sup>1,2</sup>, HUANG GuoYou<sup>1,2</sup>, LI YuHui<sup>1,2</sup>, ZHANG XiaoHui<sup>1,2</sup>, LU TianJian<sup>2</sup> & XU Feng<sup>1,2</sup>

*1 The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;*

*2 Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC), Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China*

With the development of micro-/nano- bioengineering technology and novel biomaterials (*e.g.*, functional hydrogels), bottom-up tissue engineering, which aims to fabricate functional tissue constructs from assembling small units, has attracted increasing interest. Bottom-up approaches hold great potential for fabricating complex and vascularized tissue constructs for tissue engineering and regenerative medicine applications. In this review, we first illustrate the fundamental principles of bottom-up tissue engineering and then introduce different approaches for creating and assembling modular units, respectively. The advantages and disadvantages of these bottom-up tissue engineering technologies are also discussed. Finally, conclusions and future perspectives are given.

**hydrogel, modular assembly, bottom-up tissue engineering, cell printing**

doi: 10.1360/N052014-00164