

丝素蛋白增强的肽自组装水凝胶的制备及其在肿瘤类器官构建中的应用

刘欣怡¹, 李洁龄¹, 王安河¹, 李琦¹, 白硕^{1,2*}

(1.中国科学院过程工程研究所生物药制备与递送全国重点实验室,北京 100190; 2.中国科学院大学化学工程学院,北京 100049)

摘要:癌症是威胁人类健康的重大疾病,传统肿瘤研究模型如细胞系、动物模型等存在显著局限性,开发新型研究模型成为迫切需求。肿瘤类器官技术可精准模拟肿瘤特征,但依赖成分复杂的 Matrigel 基质胶,模型稳定性和可重复性差。肽自组装水凝胶因生物相容性好、组分明确、可模拟天然胞外基质微结构等优势,成为 Matrigel 理想的替代材料。但其机械性能和生物稳定性较弱,难以满足类器官长期培养的需求。本工作创新性地 将丝素蛋白引入肽自组装水凝胶体系以优化其性能,从而满足类器官培养对基质性能的要求;丝素蛋白掺杂可增强短肽分子间相互作用,提升水凝胶力学强度和生物稳定性,且不破坏其仿生的纳米纤维微结构。以该水凝胶培养胶质瘤类器官,一周内即可形成百微米级的类器官,并且类器官内细胞存活率高达 90%。本研究为解决传统肿瘤类器官培养的基质材料问题提供了新方案,有望提升肿瘤类器官培养质量和稳定性,为肿瘤研究和精准医疗提供更可靠模型。

关键词:肽自组装;丝素蛋白;复合水凝胶;肿瘤类器官;力学性能

中图分类号:O648 **文献标志码:**A

引用格式:刘欣怡,李洁龄,王安河,等.丝素蛋白增强的肽自组装水凝胶的制备及其在肿瘤类器官构建中的应用[J].山东大学学报(理学版),2025,60(10):117-126.

Preparation of silk fibroin enhanced peptide self-assembled hydrogel and its application in the construction of tumor organoids

LIU Xinyi¹, LI Jieling¹, WANG Anhe¹, LI Qi¹, BAI Shuo^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Biopharmaceutical Preparation and Delivery, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cancer is a major disease threatening human health. Traditional tumor research models such as cell lines and animal models have significant limitations, making the development of new research models an urgent need. Tumor organoid technology can accurately simulate tumor characteristics, but it relies on Matrigel with complex components, resulting in poor stability and reproducibility of the model. Peptide self-assembled hydrogels have become ideal alternatives to Matrigel due to their advantages such as good biocompatibility, clear components, and the ability to mimic the microstructures of natural extracellular matrices. However, their mechanical properties and biological stability are weak, making it difficult to meet the long-term culture requirements of organoids. This work innovatively introduced silk fibroin into the peptide self-assembled hydrogel system to optimize its performance and meet the matrix property requirements for organoid culture. Silk fibroin doping could enhance the interactions between short peptide molecules, improve the mechanical strength and biological stability of the hydrogel, and did not damage its biomimetic nanofibrous microstructure. Using this hydrogel to culture glioma organoids could form hundred-micron-level organoids within one week, and the cell viability within the organoids was as high as 90%. This study provided a new solution to the matrix material problem in traditional tumor organoid culture, was expected to improve the quality and stability of tumor organoid culture, and provided a more reliable model for tumor research and precision medicine.

Key words: peptide self-assembly; silk fibroin; composite hydrogel; tumor organoid; mechanical properties

收稿日期:2025-05-27; 网络出版时间:2025-10-09 16:15:13

基金项目:国家自然科学基金资助项目(22277121, 22072155, 22307117, 22407126); 中国科学院先导项目(XDB 0520300); 国家重点研发计划项目(2023YFC3904601); 生物药制备与递送全国重点实验室开放基金项目(2023KF-06); 生物药制备与递送全国重点实验室部署项目(2024-FX-B-06)

第一作者:刘欣怡(1999—),女,硕士研究生,研究方向为凝胶生物材料. E-mail:13720613057@163.com

* 通信作者:白硕(1981—),男,研究员,博士,研究方向为凝胶生物材料. E-mail:baishuo@ipe.ac.cn

0 引言

癌症作为全球范围内严重威胁人类健康的重大疾病,具有较高的发病率和死亡率,给家庭和社会带来了沉重的经济负担。随着人口老龄化的加剧以及生活方式的改变,癌症的发病趋势仍在持续上升,这使得对癌症的深入研究和有效治疗显得尤为迫切^[1-2]。传统的癌症研究模型,如细胞系和动物模型,在肿瘤研究中发挥了重要作用,但也存在诸多局限性。细胞系在体外长期培养过程中,会逐渐丢失亲代肿瘤的关键分子特征和异质性,无法准确模拟肿瘤在体内的真实生物学行为^[3-4];动物模型则由于种属差异,难以完全重现人类肿瘤的发生发展过程,且存在实验周期长、成本高、通量低等问题^[5-8]。因此,开发一种能够更真实、准确地模拟人类肿瘤特征的新型研究模型,成为癌症研究领域的关键需求。

肿瘤类器官技术的出现,为癌症研究带来了新的契机。肿瘤类器官是通过体外三维培养技术,由肿瘤患者的原代细胞在体外培养形成的具有三维结构的细胞聚集体,其在组织病理特征、分子特征、药物敏感度等方面均与源肿瘤具有高度一致性,能够在体外精准模拟肿瘤的生长、侵袭和转移等过程,为肿瘤研究提供了一个强大工具^[9-12]。Bian 等^[13]建立一种名为新生物脑类器官(neoCOR)的三维体外模型,并以该模型重现了脑肿瘤的发生,证明了 neoCORs 适用于研究肿瘤生物学方面的如侵袭性等特性,并可用于评估特定 DNA 异常背景下的药物效果。Soker 团队^[14]使用包括嵌入胶原蛋白 I(Coll)中的肝星状细胞(HSCs)和结直肠癌细胞(HCT-116)球体的肿瘤类器官模型来确定细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构、癌细胞恶性程度和化疗耐药性之间的关系,他们发现密集的 ECM 结构可以抑制肿瘤细胞的生长,逆转它们的间质表型,保持干细胞群体,并降低了化疗反应。尽管以肿瘤类器官为模型进行肿瘤研究已经取得了巨大的进展,但其仍存在局限性。肿瘤类器官的培养需要合适的培养基质来提供物理支撑和生物学信号,以维持其正常的生长和分化。当前肿瘤类器官培养中最常使用的培养基质是 Matrigel,该基质胶主要成分是 I 型胶原蛋白,而这些动物来源的基质胶成分复杂,在质控上很难把控,除此以外还有免疫外来病原体的潜在危险,不利于均一、稳定的肿瘤类器官的体外构建^[15-17]。寻找成分明确、性质稳定且无免疫源性的替代基质胶是构建稳定肿瘤类器官的重要攻关方向之一。

生物内源的肽自组装水凝胶因其具有良好生物相容性、低免疫原性,组分明确、批次稳定的特点;且降解产物为氨基酸,不会引起组织炎症反应,被认为是生物医药领域的明星材料^[18-20]。肽自组装水凝胶在生物医药领域备受关注的另一个重要特征是其所具有的纳米纤维微结构。肽自组装水凝胶是由纳米纤维通过氢键等相互作用力交联形成的网络结构。因此,肽自组装水凝胶除了在组分上与天然 ECM 接近外,还能在微结构上模拟天然 ECM 的纤维网络微结构,为细胞的增殖、生长提供更仿生的微环境,有利于肿瘤类器官更真实地构建。近年来,肽自组装水凝胶在生物医药领域已展现出巨大的应用前景。Xu 等^[21]设计了一种整合有抗菌肽、RADA16 和骨髓间充质干细胞外泌体的水凝胶,该水凝胶能够抑制金黄色葡萄球菌的生长,加速骨髓间充质干细胞的增殖和迁移,从而促进感染性骨缺损的修复。Yang 等^[22]设计了一种超分子肽水凝胶表位疫苗,作为抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)的制备介质和储存库,通过免疫与 CAR-T 细胞联合治疗提高肿瘤抗原的扩散和靶向效率,在实体瘤中具有优越的治疗效果。本课题组设计并制备了具有原位可注射性能的肽自组装水凝胶,以其作为细胞三维扩增的载体,可实现细胞的快速大量扩增^[23]。尤其地,肽自组装水凝胶在肿瘤类器官构建方面优势显著,其应用潜力正不断释放。本课题组已经以肽自组装水凝胶作为肿瘤类器官体外培养的基质胶,成功实现了接近毫米级别的肝癌类器官和肌肉类器官的构建^[24-26]。然而,单一的肽自组装水凝胶因其是在弱的氢键、疏水相互作用、 π - π 堆积等作用下实现交联的,机械性能和生物稳定性等往往较弱,难以维持稳定的三维微环境来满足肿瘤类器官数周甚至数月的长期培养需求,严重制约了其在肿瘤生物学研究和药物筛选等领域的应用及其发展。

丝素蛋白(silk fibroin, SF)作为一种来源广泛、生物相容性优异且具有独特力学性能的天然高分子材料,在生物医药领域展出巨大的应用潜力^[27-30]。Wang 等^[31]报道了由丝素蛋白和自组装肽 NapFFSVYGLR 组成的用于组织工程的新型生物活性水凝胶,该水凝胶具有良好的稳定性和诱导内皮细胞粘附、生长和迁移的高能力,可用于血管再生和伤口愈合。Kim 等^[32]开发甲基丙烯酸改性的丝素蛋白生物墨水,该生物墨水具有出色的结构稳定性和可靠的生物相容性,可构建高度复杂的器官结构,包括心脏、血管、大脑、气管和耳朵等。

为了克服短肽自组装水凝胶力学性能和生物稳定性弱等问题,我们提出将丝素蛋白引入肽自组装水凝胶体系中,通过二者的协同作用,增强肽自组装水凝胶的力学性能,为肿瘤类器官的体外培养创造更为稳定且仿生的基质胶(图 1)。以短肽分子 9-芴甲氧羰基保护的亮氨酸-亮氨酸二肽(Fmoc-LL)自组装形成的水凝胶作为研究对象,前期研究发现该肽在生理条件下自组装形成的水凝胶具有良好的自修复性能,有利于后续对细胞的三维包裹。向溶解在细胞培养基 DMEM 中的 Fmoc-LL 溶液中按一定比例加入丝素蛋白溶液,(Fmoc-LL 与丝素蛋白最终的质量比为 4:1),静置数小时即可得到肽/丝素蛋白复合水凝胶。实验结果表明,丝素蛋白的掺杂不但不会影响肽自组装水凝胶的纳米纤维微结构,还可通过为肽分子组装提供大骨架分子模板,增强短肽分子间的氢键、亲疏水作用力等相互作用力,从而提高水凝胶的力学强度和生物稳定性,同时细胞毒性实验还证明该水凝胶具有优异的生物兼容性。我们将该水凝胶作为胶质瘤类器官的体外培养基质,借助 3D 生物打印技术把胶质瘤细胞种植到水凝胶内部,此技术能够确保细胞在水凝胶内均匀分散。培养一周后,获得了尺寸接近九百微米的胶质瘤类器官,而且类器官内细胞存活率超过 90%,这证实了我们所设计的水凝胶作为肿瘤类器官培养基质的可行性。以肽自组装水凝胶作为类器官培养的基质胶,该水凝胶具有组分明确、免疫源性低等优势,可实现批次稳定;丝素蛋白的引入不但增强了水凝胶的机械和生物稳定性,还保留了肽自组装水凝胶的纳米纤维三维网络结构,该结构可模拟天然胞外基质的微结构,为细胞的扩增提供仿生的三维微环境,有利于更真实的肿瘤类器官的构建。本工作研究成果有助于解决传统培养基质材料存在的环境模拟不足、机械性能限制等问题,提高培养肿瘤类器官的质量和稳定性,从而更准确地模拟肿瘤的生物行为,为肿瘤的发病机制研究、药物筛选和个性化治疗提供更可靠的实验模型。

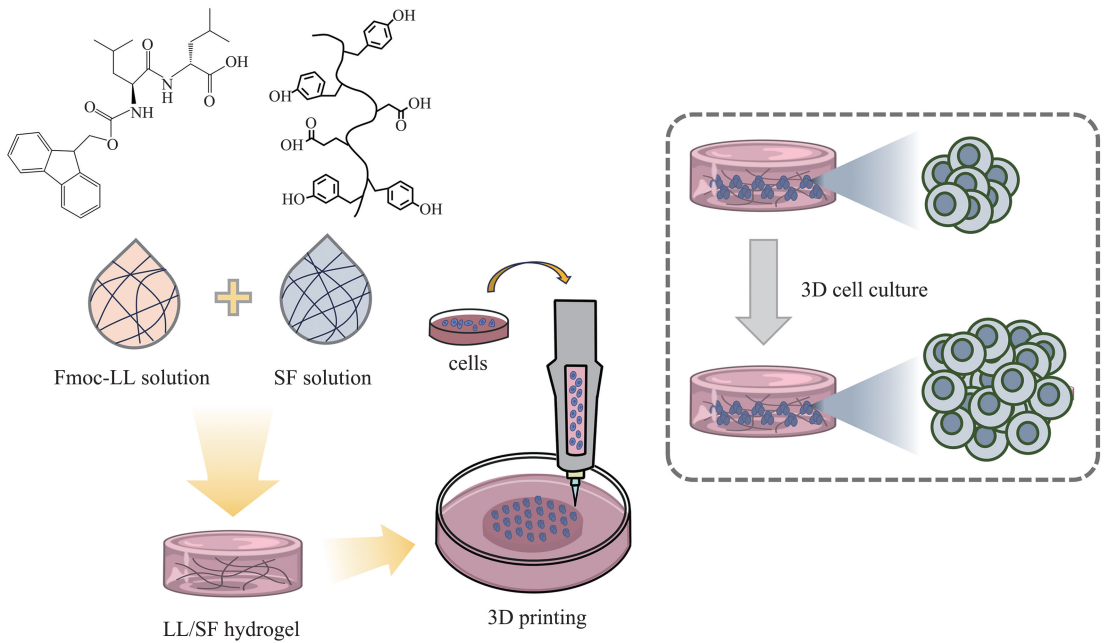


图 1 肽/丝素蛋白复合水凝胶的制备与胶质瘤类器官体外构建应用示意图

Fig.1 Schematic diagram of the preparation of peptide/silk fibroin composite hydrogel and its application and in vitro construction of glioma organoids

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

可溶性丝素蛋白购自苏州丝美特生物技术有限公司,9-芴甲氧羰基保护的亮氨酸-亮氨酸二肽(Fmoc-LL)($\geq 98.0\%$)购自上海吉尔生化有限公司,杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素(P/S)和磷酸盐缓冲液(PBS)购自赛默飞世尔科技有限公司,1% HEPES 缓冲液、1% L-谷氨酰胺、细胞活性与细胞毒性检测试剂盒和细胞计数(CCK-8)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,鼠源脑

胶质瘤细胞系 GL261 细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

1.2 实验方法

1.2.1 SF 溶液的制备

称取 50 mg 的可溶性丝素蛋白于 1 mL 超纯水中,轻微摇晃混匀后至完全溶解,可得到 SF 溶液。

1.2.2 Fmoc-LL 溶液的制备

将称取的 2.33 mg Fmoc-LL 粉末加入 1 mL DMEM 培养基中并超声 2 min,直至样品均匀溶解,得到 Fmoc-LL 溶液。

1.2.3 LL/SF 水凝胶的制备

向上述所制备的 Fmoc-LL 溶液中加入一定量的 SF 溶液,随后用移液枪快速吹吸均匀并放于室温下静置,数秒后即可得到 LL/SF 水凝胶。Fmoc-LL 与 SF 质量比为 4:1。

1.2.4 水凝胶形貌表征

宏观形貌:采用相机拍照记录不同的水凝胶样品。

扫描电子显微镜(SEM)表征:首先将水凝胶置于液氮中快速冷冻,随后转移至冷冻干燥机中进行干燥。使用导电胶将干燥后的水凝胶固定于样品台表面,并在 40 mA 电流条件下进行 60 s 的镀金处理。之后在加速电压为 5 kV,电流 10 μ A 条件下的扫描电子显微镜(SU8020, Hitachi)观察形貌。

原子力显微镜(AFM)表征:用干净牙签取少量水凝胶样品均匀涂抹在硅片表面,经真空干燥 12 h 后,通过原子力显微镜(Dimension FastScan Bio, Bruker)观察样品,扫描范围 5 μ m \times 5 μ m。获取的图像通过 NanoScope Analysis 软件进行形貌分析。

1.2.5 水凝胶光谱表征

圆二色(CD)光谱表征:使用圆二色光谱仪(Chirascan V100, Applied Photophysics)进行测试。将水凝胶样品稀释到 0.5 mg/mL 后,用移液枪吸取 10 μ L 样品于 1 mm 厚的样品槽中,且保证无气泡产生,采集波长范围 190~260 nm。所获得 CD 光谱是 3 次测量的平均值,并且均扣除了去离子水的光谱信息。

衰减全反射—傅里叶变换红外(ATR-FTIR)光谱表征:冻干后的水凝胶样品用红外光谱(ALPHA II, Bruker)进行结构表征,红外光谱仪的分辨率为 4 cm^{-1} 。用红外光谱仪扣除背景后进行样品的红外分析,扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} 。之后将各个样品的光谱结果用 Peakfit 软件对酰胺 I 带(1 600~1 700 cm^{-1})进行去卷积分析:1 615~1 640 cm^{-1} 、1 641~1 660 cm^{-1} 和 1 660~1 670 cm^{-1} 的峰分别归属于 β -折叠、无规卷曲与 α -螺旋和 β -转角,从而得到不同水凝胶的二级结构含量。

1.2.6 水凝胶流变力学表征

使用流变仪(MCR302, AntonPaar)对水凝胶的流变力学性能进行表征。用模具制备与 12 mm 的平板转子大小一致的样品,将样品放在工作台的中央,温度设置为 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒定。

振幅扫描测试条件:频率恒定为 1 Hz,剪切应变范围 0.01%~100%;

恢复性能测试条件:在振荡模式下固定频率为 1 Hz,设置初始测量段剪切应变为 0.1%,时间 30 s,之后进行 3 个循环的交替应变 100%(60 s)和 0.1%(60 s)的时间扫描,评估水凝胶的可恢复性能。

1.2.7 水凝胶稳定性测试

在培养皿中制备等量的纯 Fmoc-LL 水凝胶和掺杂丝素蛋白的 LL/SF 水凝胶,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液中培养数天,期间每 12 h 更换一次新鲜 PBS 缓冲液。然后去除 PBS 缓冲液,记录剩余水凝胶的照片图像,评估水凝胶的形态变化情况,从而分析其生物稳定性。

1.2.8 肿瘤细胞培养

本工作以胶质瘤 GL261 细胞作为代表细胞。将 GL261 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、1% HEPES 和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中进行培养。

1.2.9 细胞毒性与细胞增殖

采用 CCK-8 法对水凝胶的细胞毒性与增殖进行研究,检测样品对细胞活力及增殖性能的影响。将凝胶样品浸入无菌 PBS 溶液中浸泡 3 d,每半天换一次液。将 GL261 细胞接种于 96 孔板中,细胞浓度为 5×10^5 cells/mL。待细胞贴壁后,每孔加 10 μ L 凝胶样品。分别在第 1、3 和 5 d,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂和 100 μ L DMEM 完全培养基。在培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h 后用酶标仪(Varioskan LUX, Thermo Fisher

Scientific)测试其在 450 nm 处的吸光度。每组试验重复 3 次,细胞活力的计算公式:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组吸光度} - \text{空白组吸光度}) / (\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度}) \times 100。$$

通过活/死细胞染色评估细胞活性:染色前用 PBS 洗涤样品 3 次去除培养基残留,随后用 PBS 溶液配制的 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 钙黄绿素 (Calcein-AM) 和 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 标记活细胞和死细胞,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱中孵育 20 min。染色完成后,再次用 PBS 洗涤 3 次以去除未结合的染料。置于激光共聚焦显微镜 (SP8 STED 3X, Leica) 下观察细胞。其中,活细胞会被标记成绿色,死细胞会被标记成红色。最后使用 Image J 软件定量分析细胞状态。

1.2.10 水凝胶用于胶质瘤类器官的体外构建

本工作利用 3D 生物打印技术将 GL261 细胞种植在肽/丝素蛋白复合水凝胶内进行 3D 培养以实现胶质瘤类器官的体外构建。细胞植入前,将水凝胶在 DMEM 完全培养基中浸泡约 1 h,在无菌环境下用液滴式 3D 打印机 (CellJet, Thermo Fisher Scientific) 将 20 μL 密度为 10^6 cells/mL 的 GL261 细胞悬浮液打印到水凝胶中。打印参数:喷嘴直径为 190 μm ,液滴体积为 200 nL,液滴间隔为 0.9 mm。然后加入适量的培养基以浸没水凝胶支架,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 体积分数的 CO_2 的细胞培养箱中培养。定期测量细胞球的生长和形态。每 2 d 更换一次培养基。并通过活/死细胞染色实验对细胞活性进行测试。

2 结果与讨论

2.1 水凝胶形貌表征

纯 Fmoc-LL 在 DMEM 环境下可通过自组装形成水凝胶,但该凝胶化过程比较缓慢,往往需要数天时间才能完成。但当向 Fmoc-LL 的 DMEM 溶液中加入少量的丝素蛋白溶液后,混合体系的凝胶化过程可在数小时内完成。利用扫描电镜对这两种水凝胶进行形貌表征后发现(图 2(b)、(e)),纯 Fmoc-LL 自组装形成的水凝胶是由仿生的纳米纤维结构构成;掺杂丝素蛋白后得到的复合水凝胶同样呈现出纳米纤维网络结构,说明丝素蛋白的掺杂不会改变水凝胶的微观结构。原子力显微镜也进一步证实(图 2(c)、(f)),无论有无丝素蛋白的掺杂,所得到的自组装水凝胶均为纳米纤维网络结构。这种纳米纤维结构可模拟天然 ECM 中的胶原纤维网络,为细胞提供仿生的微环境,可促进细胞的存活与增殖,并有利于更真实的肿瘤类器官的体外构建。

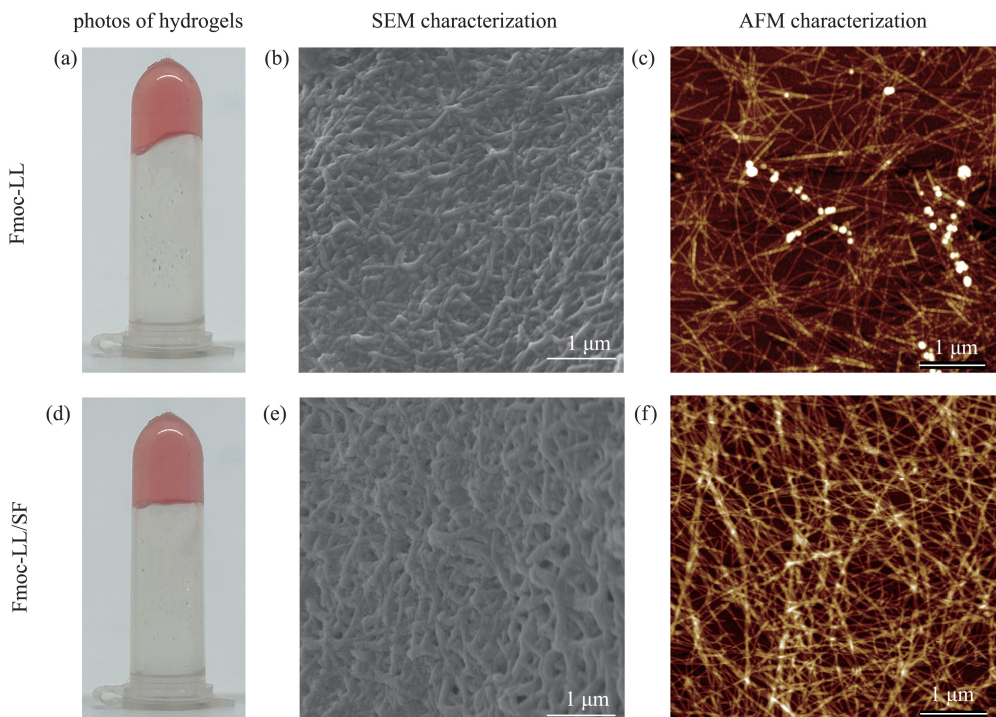


图 2 水凝胶照片与形貌表征

Fig.2 Photos and morphological characterization of hydrogels

2.2 水凝胶光谱表征

为深入探究丝素蛋白诱导短肽 Fmoc-LL 实现快速组装并凝胶化的机制,我们对所制备的水凝胶开展了圆二色光谱和红外光谱的表征与分析。通过圆二色光谱(CD)对 Fmoc-LL、LL/SF 及 SF 水凝胶在水介质中的构象特性进行了表征(图 3(a))。结果显示,Fmoc-LL 自组装水凝胶在 203 nm 处呈现明显的负峰,同时在 218 nm 处出现正峰,这一特征与反平行 β -折叠结构相符,表明 Fmoc-LL 分子通过自组装形成了以 β -折叠为主的纳米纤维结构。相比之下,SF 在 194 nm 处表现出单一的负峰,这是无规卷曲结构的特征。LL/SF 复合水凝胶的光谱在 191、212 和 224 nm 处出现负峰,并在 195 nm 处伴随正峰,表明其同时存在 β -折叠与 α -螺旋结构,表明 SF 的引入可能通过分子间相互作用部分稳定了 LL 的 β -折叠网络,但未完全改变其主导结构。

傅里叶变换红外光谱(FTIR)进一步揭示了 SF 水凝胶在 Fmoc-LL 引入后的结构变化(图 3(b))。Fmoc-LL 水凝胶在 1625 cm^{-1} 和 1516 cm^{-1} 处的吸收峰与 β -折叠构象有关。加入 SF 后,LL/SF 混合水凝胶在 1637 cm^{-1} 和 1535 cm^{-1} 处仍存在类似吸收峰,说明 SF 的引入未显著破坏 Fmoc-LL 的 β -折叠框架。SF 在 1648 cm^{-1} 和 1514 cm^{-1} 处有明显的吸收峰,这与 SF 的无规卷曲构象相关,与 CD 结果一致。通过对红外光谱酰胺 I 带($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)的二级结构定量分析显示(图 3(c)),复合凝胶中 β -折叠含量较纯 Fmoc-LL 水凝胶有所增加,表明 SF 的掺杂使体系的结构更有序。

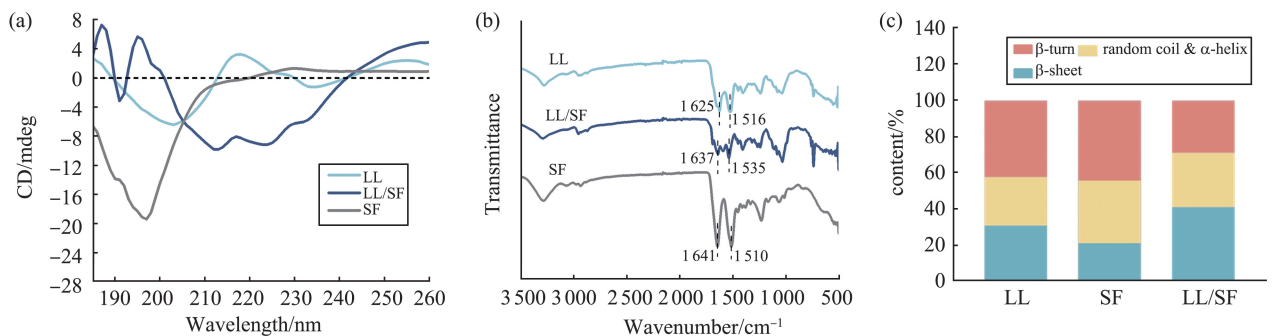


图3 水凝胶的光谱表征:(a)圆二色光谱;(b)红外光谱;(c)二级结构统计

Fig.3 Spectral characterization of the hydrogel: (a) circular dichroism spectrum; (b) infrared spectrum; (c) secondary structure statistics

2.3 水凝胶力学性能表征

尽管纯 Fmoc-LL 能够自组装形成水凝胶,但其力学强度欠佳,弹性模量处于百帕级别,与肿瘤类器官培养对培养基质胶力学性能的要求相差甚远。通过引入丝素蛋白进行复合后,水凝胶的弹性模量提升至千帕,这一显著的性能改善证实,丝素蛋白与 Fmoc-LL 分子间的协同作用能够有效增强水凝胶的力学性能(图 4(a))。循环应变扫描实验表明,在高应变条件下,两种水凝胶均会发生屈服,储能模量和损耗模量显著下降,而在低应变条件下停止剪切后,模量能够迅速恢复(图 4(b)、(c))。这一现象展示了水凝胶从以弹性为主向以粘性为主的转变能力,同时证明了两种水凝胶的快速自愈特性。在本工作中,通过生物 3D 打印的方式将细胞均匀的种植在水凝胶内,以实现均一化肿瘤类器官制备,水凝胶的这种快速愈合特性有助于其对种植细胞的快速包裹,从而有效减少细胞流失,保障类器官构建中细胞的初始数量和分布稳定性。

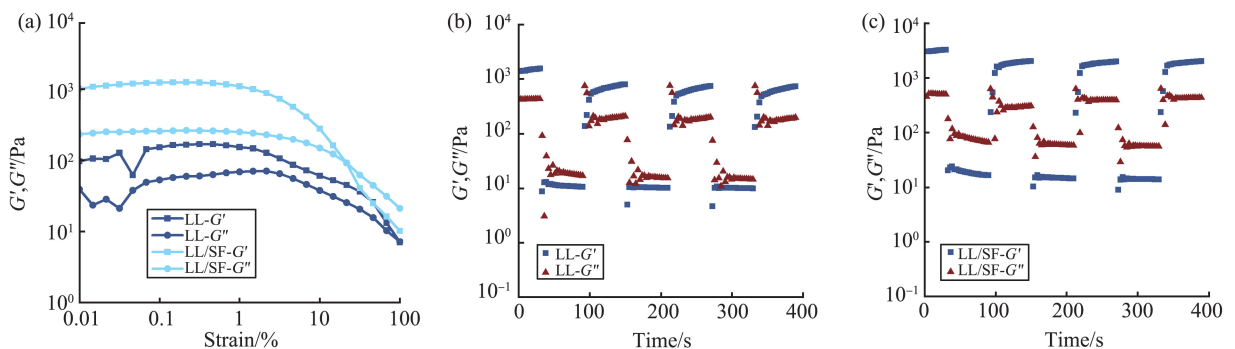


图4 水凝胶的力学性能表征:(a)振幅扫描;(b)LL水凝胶恢复性能表征;(c)LL/SF水凝胶恢复性能表征

Fig.4 Mechanical property characterization of the hydrogel: (a) amplitude scanning curves; (b) recoverable property of LL hydrogel; (c) recoverable property of LL/SF hydrogel

2.4 水凝胶稳定性表征

良好的生物稳定性是类器官培养基质胶不可或缺的性能之一。类器官培养基质胶需要具备足够的生物稳定性,才能为类器官生长提供所需的仿生三维微环境。为了探究丝素蛋白的掺杂能否提高水凝胶的稳定性,我们将浸泡在 PBS 中的肽/丝素蛋白复合水凝胶(LL/SF)和纯 Fmoc-LL 自组装形成的水凝胶在 37 °C 下进行孵育,并每天记录孵育状态下水凝胶结构完整程度。如图 5(b)所示,在长达 7 d 的孵育时间内,肽/丝素蛋白复合水凝胶几乎能一直保持初始状态的完整性,未发生解聚,说明水凝胶具有良好的生物稳定性,而 Fmoc-LL 水凝胶则在孵育过程中逐渐解聚,至第 7 d 时已完全解聚(图 5(a)),这使其无法满足作为类器官培养基质胶的基本要求。这一结果充分证明,丝素蛋白的掺入可以增强水凝胶的稳定性,以满足类器官体外培养的应用需求。水凝胶力学性能与稳定性的增强,可归因于两方面作用:一方面,丝素蛋白的大分子链结构为短肽分子的有序排列提供了组装模板,通过提升短肽分子的组装有序性,强化了分子间作用力;另一方面,丝素蛋白分子能与短肽分子借助 π - π 堆积、疏水相互作用等方式实现共组装,进一步稳固了整个组装体系的稳定性。

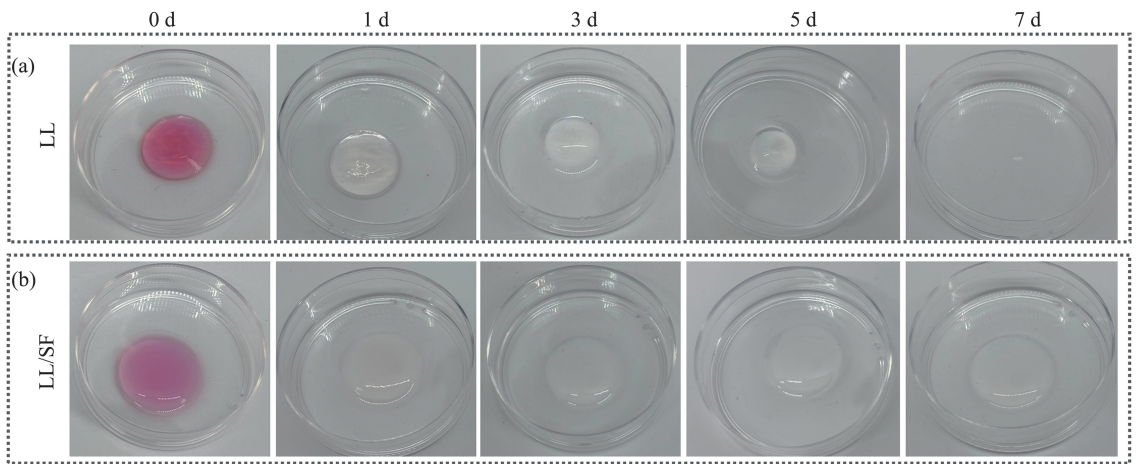


图 5 水凝胶生物稳定性表征

Fig. 5 Characterization of the biological stability of hydrogels

2.5 水凝胶细胞相容性表征

本工作通过监测与复合凝胶共培养细胞的光密度值($OD_{420\text{nm}}$,反映细胞相对数量)及细胞存活率随培养时间的变化评估水凝胶的细胞相容性。如图 6(a)所示,细胞 OD 值随培养天数的增加呈持续增长趋势,也即细胞在该共培养体系中增殖活跃,生长状态良好,由此说明水凝胶具有较高的细胞相容性。同时,采用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率,实验设立对照组(仅细胞)与空白组(仅培养基),并依据公式计算得到(图 6(b))细胞存活率始终维持在 95% 以上,进一步证实了水凝胶高的细胞相容性。

进一步,通过活/死细胞双染实验验证复合水凝胶的生物相容性,通过共聚焦显微镜观察发现(图 6(c)),在培养的第 1、3、5 d,大部分细胞被特异标记活细胞的染料标记,呈现绿色荧光;仅有少部分细胞被特异标记死细胞的 PI 染料标记,呈现红色。且绿色荧光强度随培养时间延长而增强,表明细胞活性较高且能持续增殖。对不同培养天数的细胞活死比例进行统计发现(图 6(d)—(e)),活细胞占比均在 95% 以上。上述结果表明,肽/丝素蛋白复合水凝胶具有良好的细胞相容性,为其在肿瘤类器官体外培养中的应用提供安全性依据。

2.6 水凝胶在肿瘤类器官培养中的应用

我们借助 3D 生物打印技术,将胶质瘤细胞的种植在复合水凝胶支架内(图 7(a)—(b))。这种种植方式可精确控制微球的大小、形状及细胞分布,有利于尺寸均一且稳定的肿瘤类器官的构建,从而保证肿瘤类器官后续应用如药物筛选等结果的可靠性。由于水凝胶基质胶的支撑作用,胶质瘤细胞在培养的第 1 d 即可扩增形成直径约为 200 μm 的实心肿瘤类器官(图 7(c)—(d))。随着培养时间的推移,类器官的尺寸也在不断增大,培养的第 3 d 时,类器官的直径扩增到接近 500 μm ,到培养的第 7 d,类器官的直径约达 800~900 μm 。我们利用活死细胞染色实验对得到的类器官内细胞活性进行表征。如图 7(e)所示,经过 7 d 的培养,肿瘤类器官内的细胞表现出较高的活性(绿色标记的细胞),细胞存活率超过 90%,并且死细胞并非集中在类器官的中心区域,说明类器官中心的细胞仍可以获得足够的生存养料,上述结果表明,我们制备的复合水凝胶可以作为肿瘤类器官体外培养的基质胶,所得到的类器官在药物筛选中能更精准地反映药物对器官功能的影响,提高筛选效率和预测准确性,降低动物实验依赖性。

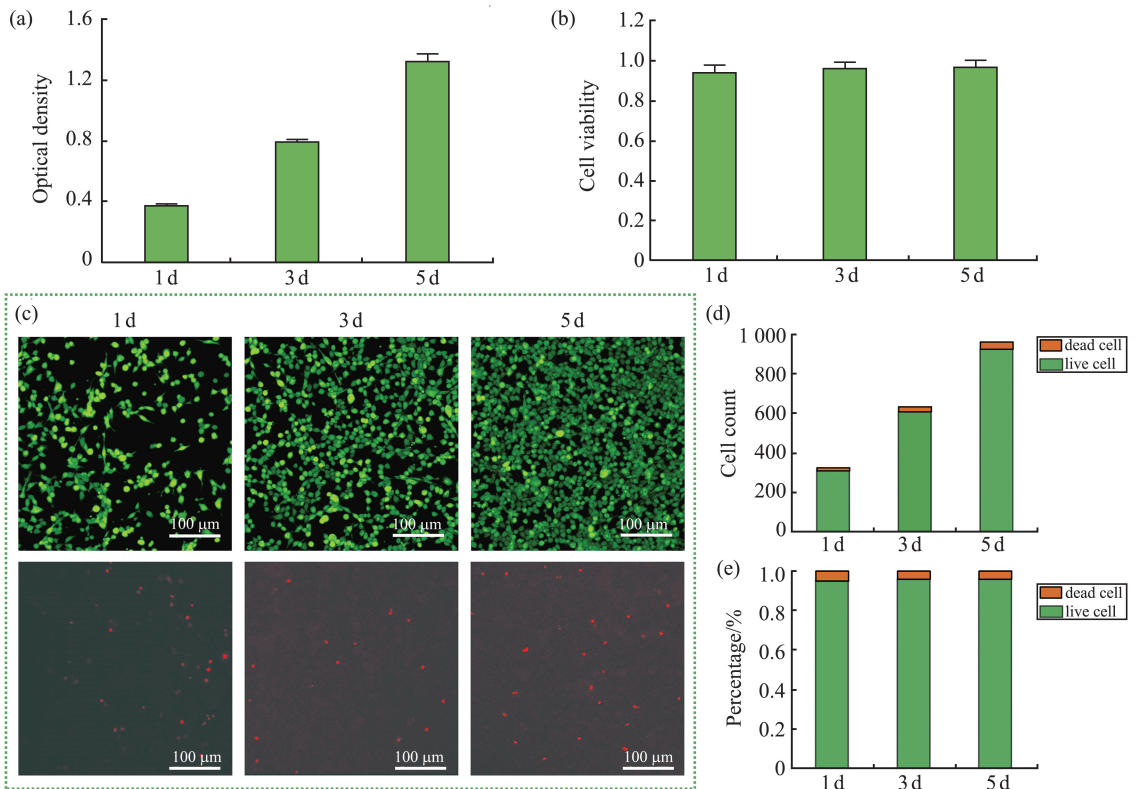


图6 水凝胶生物安全性评估: (a—b) CCK-8 表征; (c) 活性细胞染色表征; (d—e) 活死细胞比例统计
Fig.6 Biological safety assessment of hydrogels: (a—b) CCK-8 characterization; (c) live/dead cells staining; (d—e) statistics on proportion of live and dead cells

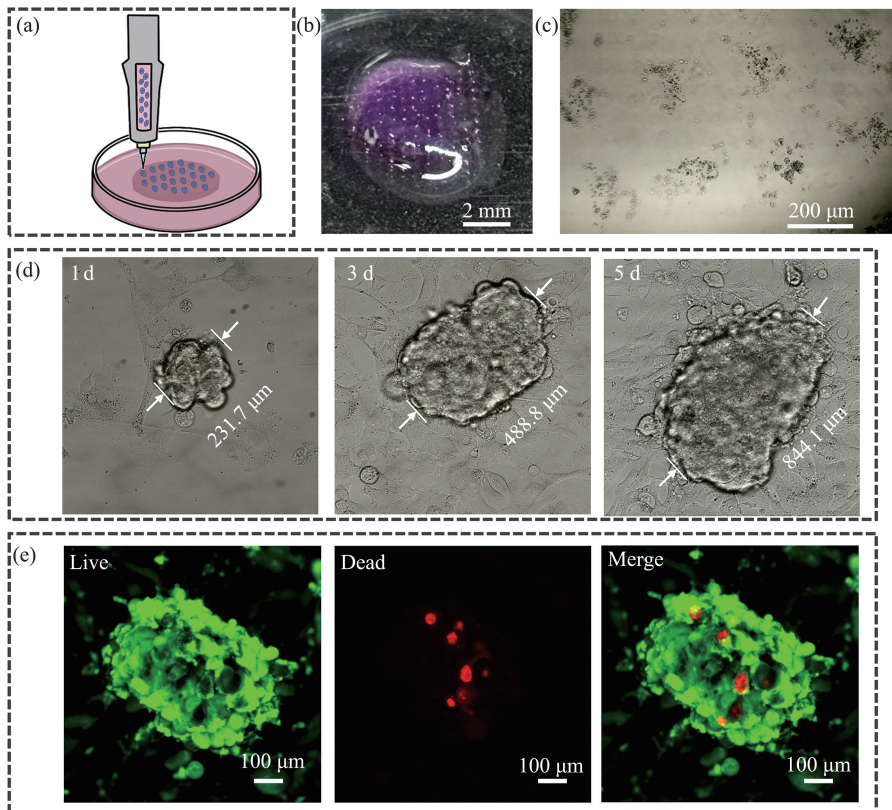


图7 水凝胶 3D 打印的胶质瘤类器官的体外培养: (a) 3D 打印胶质瘤细胞示意图; (b) 种植细胞的水凝胶照片; (c) 细胞团阵列的光学显微镜照片; (d) 不同培养时间的细胞团光学显微镜照片; (e) 培养 7 d 后的细胞团的活死染色表征
Fig.7 Hydrogel used for in vitro culture of 3D-printed glioma organoids: (a) schematic diagram of 3D-printed glioma cells; (b) photograph of cell-containing hydrogel; (c) photomicrograph of cell cluster array; (d) photomicrographs of cell clusters at different culture times; (e) live-dead staining characterization of cell cluster after 7 days of culture

3 结论

本研究针对传统肿瘤类器官培养基质胶的动物源性和质控难题,创新性地构建了兼具仿生微结构和高强度稳定性的肽/丝素蛋白复合水凝胶基质材料。该材料以生物内源肽自组装水凝胶为基础,通过引入少量丝素蛋白,利用其与短肽分子间的氢键、疏水相互作用及模板效应,从分子层面调控自组装行为,显著提升水凝胶的力学强度与生物稳定性。值得强调的是,这种复合策略在实现力学性能、稳定性与加工性协同优化的同时,完整保留了肽自组装水凝胶仿生的纳米纤维结构,并维持了其生物相容性的优势。实验证明,该复合水凝胶在胶质瘤类器官培养中表现优异,一周内即可形成百微米级的类器官,且保持高细胞存活率,展现其作为肿瘤类器官培养基质的可行性。这种天然高分子与短肽“优势互补”的设计思路——丝素蛋白弥补纯肽水凝胶性能缺陷,而短肽确保体系生物相容性与仿生微环境,为开发高性能类器官培养基质提供了新方向。本工作不仅为解决类器官培养的稳定性 and 可重复性问题提供了新方案,更为肿瘤发病机制研究、药物筛选及个性化治疗建立了更可靠的实验模型,将有力推动肿瘤精准医疗的发展。

参考文献:

- [1] MACDONALD W J, PURCELL C, PINHO-SCHWERMANN M, et al. Heterogeneity in cancer[J]. *Cancers*, 2025, 17(3): 441.
- [2] YAMAGUCHI M. Extracellular regucalcin: a potent suppressor in the cancer cell microenvironment[J]. *Cancers*, 2025, 17(2):240.
- [3] GROZINSKY-GLASBERG S, SHIMON I, RUBINFELD H. The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors[J]. *Neuroendocrinology*, 2012, 96(3):173-187.
- [4] VINCENT K M, POSTOVIT L M. Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6):10498-10509.
- [5] TOYOHARA J, ISHIWATA K. Animal tumor models for PET in drug development[J]. *Annals of Nuclear Medicine*, 2011, 25(10):717-731.
- [6] BABU V, PAUL N, YU R. Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Pancreas*, 2013, 42(6): 912-923.
- [7] LI Z T, ZHENG W B, WANG H J, et al. Application of animal models in cancer research: recent progress and future prospects[J]. *Cancer Management and Research*, 2021, 13:2455-2475.
- [8] PU F F, GUO H Y, SHI D Y, et al. The generation and use of animal models of osteosarcoma in cancer research[J]. *Genes & Diseases*, 2024, 11(2):664-674.
- [9] YANG L, YANG S, LI X Y, et al. Tumor organoids: from inception to future in cancer research[J]. *Cancer Letters*, 2019, 454:120-133.
- [10] LV J J, DU X, WANG M M, et al. Construction of tumor organoids and their application to cancer research and therapy[J]. *Theranostics*, 2024, 14(3):1101-1125.
- [11] MAO Y N, HU H L. Establishment of advanced tumor organoids with emerging innovative technologies[J]. *Cancer Letters*, 2024, 598:217122.
- [12] RASSOMAKHINA N V, RYAZANOVA A Y, LIKHOV A R, et al. Tumor organoids: the era of personalized medicine[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2024, 89(1):S127-S147.
- [13] BIAN S, REPIC M, GUO Z M, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(8):631-639.
- [14] DOMINIJANNI A, DEVARASETTY M, SOKER S. Manipulating the tumor microenvironment in tumor organoids induces phenotypic changes and chemoresistance[J]. *iScience*, 2020, 23(12):101851.
- [15] BROGUIERE N, ISENMANN L, HIRT C, et al. Growth of epithelial organoids in a defined hydrogel[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(43):1801621.
- [16] SHI W, MIRZA S, KUSS M, et al. Embedded bioprinting of breast tumor cells and organoids using low-concentration collagen-based bioinks[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(26):2300905.
- [17] XU Z Y, HUANG J J, LIU Y, et al. Extracellular matrix bioink boosts stemness and facilitates transplantation of intestinal

- organoids as a biosafe Matrigel alternative[J]. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2023, 8(1):e10327.
- [18] YAN X H, ZHU P L, LI J B. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(6):1877-1890.
- [19] ALTUNBAS A, POCHAN D J. Peptide-based and polypeptide-based hydrogels for drug delivery and tissue engineering[J]. *Topics in Current Chemistry*, 2012, 310:135-167.
- [20] LI J L, XING R R, BAI S, et al. Recent advances of self-assembling peptide-based hydrogels for biomedical applications[J]. *Soft Matter*, 2019, 15(8):1704-1715.
- [21] XU H Y, FENG J, DAI N, et al. Self-assembling peptide hydrogel scaffold integrating stem cell-derived exosomes for infected bone defects[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2024, 35(10):1511-1522.
- [22] YANG P X, YAO X M, TIAN X, et al. Supramolecular peptide hydrogel epitope vaccine functionalized with CAR-T cells for the treatment of solid tumors[J]. *Materials Today Bio*, 2025, 31:101517.
- [23] DING L Q, LIU X Y, SUN R Y, et al. Silk fibroin-enhanced peptide self-assembled biomimetic hydrogel for 3D cell proliferation[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2025, 720:137123.
- [24] LI J L, XUE Y, WANG A H, et al. Polyaniline functionalized peptide self-assembled conductive hydrogel for 3D cell culture [J]. *Gels*, 2022, 8(6):372.
- [25] JIAN H L, LI X, DONG Q Q, et al. *In vitro* construction of liver organoids with biomimetic lobule structure by a multicellular 3D bioprinting strategy[J]. *Cell Proliferation*, 2023, 56(5):e13465.
- [26] LI X, JIAN H L, HAN Q Q, et al. Three-dimensional (3D) bioprinting of medium toughened dipeptide hydrogel scaffolds with Hofmeister effect[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, 639:1-6.
- [27] SHUAI Y J, ZHENG M D, KUNDU S C, et al. Bioengineered silk protein-based 3D in vitro models for tissue engineering and drug development: from silk matrix properties to biomedical applications[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(28):2401458.
- [28] SHEN C Y, ZHOU Z Y, LI R Y, et al. Silk fibroin-based hydrogels for cartilage organoids in osteoarthritis treatment[J]. *Theranostics*, 2025, 15(2):560-584.
- [29] YAO X, ZOU S Z, FAN S N et al. Bioinspired silk fibroin materials: from silk building blocks extraction and reconstruction to advanced biomedical applications[J]. *Materials Today Bio*, 2022, 16:100381
- [30] ZOU S Z, YAO X, SHAO H L, et al. Nonmulberry silk fibroin-based biomaterials: impact on cell behavior regulation and tissue regeneration[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 153:68-84.
- [31] WANG L L, CHEN Z J, YAN Y F, et al. Fabrication of injectable hydrogels from silk fibroin and angiogenic peptides for vascular growth and tissue regeneration[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 418:129308.
- [32] KIM S H, YEON Y K, LEE J M, et al. Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing[J]. *Nature Communications*, 2018, 9:1620.

(编辑:胡春燕)