综 述

肾脱细胞支架与再细胞化技术的研究进展

耿光瑞，李清刚，陈香美
解放军总医院 肾脏疾病国家重点实验室，北京 100853

摘要：肾脱细胞支架是生物人工肾重要的材料支撑，理想的肾脱细胞支架应具备血管网络和独特的组织特异性结构，既有与天然组织相同的机械强度，又能提供微观和宏观的组织框架结构，利于细胞增殖分化，最终完成工程化的器官构建。本文就肾脱细胞支架的制作方法及质量评价、脱细胞支架再细胞化、肾生物打印技术、未来发展潜力及面临的挑战等做一综述，为未来实践提供参考。

关键词：生物人工肾；脱细胞支架；再细胞化；干细胞；生物打印
中图分类号：R 318.08 **文献标志码：**A **文章编号：**2095-5227(2018)11-0999-05 **DOI：**10.3969/j.issn.2095-5227.2018.11.020
网络出版时间：2018-10-17 09:45 **网络出版地址：**http://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20181017.0945.004.html

Research advances in renal decellularized scaffolds and recellularization techniques

GENG Guangrui, LI Qinggang, CHEN Xiangmei
State Key Laboratory of Kidney Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Corresponding author: CHEN Xiangmei. Email: xmchen301@126.com

Abstract: Renal decellularized scaffold is an important material supporting for bioartificial kidneys. Ideal renal decellularized scaffolds should have a vascular network and unique tissue-specific structure, as well as the same mechanical strength to natural tissue, and provide microscopic and macroscopic tissue frameworks. Renal decellularized scaffold can facilitate cell proliferation and differentiation, and finally complete the construction of engineered organs. This article reviews the preparation methods and quality evaluation of renal decellularized scaffolds, recellularization of decellularized scaffolds, kidney bioprinting technology, future development potential and challenges, and provides evidences for future practice.

Keywords: bioartificial kidney; decellularized matrix scaffold; recellularization; stem cell; bioprinting

肾移植是终末期肾病的首选治疗方法，但肾源紧缺和移植后排斥反应等诸多难题始终难以解决。近年来，生物工程技术的发展与进步为器官功能重建与再生医学注入了强大动力，使其有望成为解决肾移植难题的手段。细胞外基质(extracellular matrix，ECM)是细胞分泌的胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白多糖、透明质酸和非胶原蛋白基质糖蛋白等物质，主要分布在细胞之间和膜表面，形成错综复杂的大分子网络结构。脱细胞技术可以使细胞与组织有效分离，从而获取我们需要的材料[1]，包括维持原有组织或器官形态并用于再细胞化的支架、组织贴片(如颗粒型或粉末型)、可注射凝胶、细胞培养液成分等[2]。理想的肾脱细胞支架应具备复杂的成分、血管网络和独特的组织特异性结构、与天然组织相同的机械强度等特征，并能提供微观和宏观的组织框架结构，利于细胞增殖分化，最终完成工程化的器官构建。本综述主要对肾脱细胞支架的制作方法、脱细胞支架的质量评价、支架再细胞化、生物打印技术等做一总结，并探讨肾脱细胞支架未来发展潜力及面临的挑战。

收稿日期：2018-08-06
基金项目：国家重点研发计划项目 (2016YFC1101403)
Supported by the National Key Research and Development Plan (2016YFC1101403)
作者简介：耿光瑞，男，在读硕士。研究方向：生物人工肾。Email: gengguangrui@126.com
通信作者：陈香美，女，主任医师，教授，博士生导师，中国工程院院士。Email: xmchen301@126.com

1 肾脱细胞支架的制作方法

1.1 肾脱细胞支架的动物选择 人体肾是肾脱细胞支架理想来源[3]，其在组织工程学中的应用较其他物种来源的肾更具临床相容性。Ross等[4]于2009年首次报道了以大鼠肾制作的脱细胞支架后，陆续有学者选用如猪[5]、猴[6]的肾，Orlando等[7]2013年首次选用废弃的人类肾。考虑未来肾脱细胞支架成为标准品并规模量产的可能，因此脱细胞支架的动物来源必须充足并能持续供应，且未来若应用到人体则需体积更大的器官。猪具有繁殖力强、成长快、成熟期较短等优点并且猪源器官很容易获得，因此猪成为最有价值的候选目标[8]。

1.2 脱细胞试剂的选择 脱细胞的目的是去除组织中的细胞成分，保留微观和宏观结构以及功能性蛋白。灌注是制备全器官肾脱细胞支架最常用、最有效的途径，使用血管作为灌注途径将试剂送至器官各个角落，并可最大程度降低机械力作用导致的ECM损伤。制作肾脱细胞支架常用的试剂主要有化学试剂、酶类及其他生物制剂[9]，可根据实验需求及试剂的特点，选择合适的方法。

化学试剂：过氧乙酸[10]可水解器官中的生物分子，对ECM损伤较小；乙酸[11]对器官中的糖胺聚糖(glycosaminoglycan，

GAG)影响较小，但能分解胶原从而影响支架的强度。碱类试剂能降低纤维基质或基质蛋白的交联，从而影响支架的机械强度[11]。非离子表面活性剂如Triton X-100不带电荷，对蛋白和胶原损伤较小；离子型表面活性剂如十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate，SDS)、脱氧胆酸钠对细胞的洗脱更加彻底，但同时对支架的损伤也较大。

酶类试剂：蛋白酶、胶原酶以及核酸酶能裂解细胞膜、细胞与细胞、细胞与ECM或核酸与ECM间的黏附，但单独使用不仅作用时间长且很难完全去除细胞，残余的酶也会对支架的再细胞化产生影响。Yu等[12]发现小剂量酶类试剂联合其他方法对肾的脱细胞效果良好。Crapo等[13]认为胰蛋白酶长时间作用可损伤ECM超微结构，同时消耗胶原蛋白、层黏连蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白和GAG。

其他生物试剂：螯合剂如聚乙二醇(polyethylene glycol，PEG)和乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA)，可与Ca、Fe离子结合，有助于细胞从ECM中分离，单独使用时不能去除组织细胞，但可破坏组织蛋白间的联系，因此常与胰蛋白酶或表面活性剂联合使用[14-15]。丝氨酸蛋白酶抑制剂如苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF)，以及抑肽酶和亮抑肽酶可阻断脱细胞过程中由细胞裂解释放蛋白酶对ECM造成的损伤[16]。抗生素如青链霉素、抗真菌药两性霉素B等常被用来减少脱细胞和再细胞化过程中的污染[17]。

1.3 常用肾脱细胞方法 脱细胞试剂的选择主要取决于实验目的以及试剂和组织的特点，实验最终所需的组织复杂程度越高即要求保留的成分(如生长因子，宏观、微观结构等)越多，则脱细胞方案越复杂(表1)。目前尚无研究系统比较不同脱细胞试剂、暴露时间和不同的方法对DNA去除、ECM宏观和微观结构损失以及支架在体内的影响。肾脱细胞支架常用的制作方法主要有全器官灌注法和组织切片浸泡法。

全器官灌注法：完整的脉管系统和合适的去细胞化试剂，是灌注法制作肾脱细胞支架的关键[18]。Ross等[4]首先通过灌注3% Triton X-100，含0.002 5% DNA酶的高渗溶液后，再依次灌注3% Triton X-100和4% SDS进行肾的脱细胞化，结果表明小鼠肾ECM可保留层黏连蛋白和Ⅳ型胶原，同时能支持小鼠胚胎干细胞向肾的分化。他们同时发现，使用脱氧胆酸盐代替第二步后也能达到相同的结果。

组织切片浸泡法：将肾组织进行切片后再进行脱细胞处理，能增大组织和试剂的接触面积，并能使机械力直接作用于组织，且DNA的去除和ECM成分的损失程度与脱细胞过程中搅拌速度有一定关系。Nakayama等[6]将恒河猴肾制成组织切片，用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline，PBS)洗涤肾切片两次，然后用1% SDS或1% Triton X-100进行洗涤，8 h时首次更换脱细胞溶液，之后每48 h更换一次，直到组织透明(7 ~ 10 d)。

2 肾脱细胞支架的质量评价

脱细胞支架内的细胞残余物在再细胞化的过程中可能会引起细胞相容性问题，且移植体内时存在不良宿主反应的风险[24]。目前脱细胞技术尚不能100%去除支架内所有细胞成分，但可定量测定细胞组分如双链DNA(dsDNA)、线粒体或膜相关分子如磷脂，从而对脱细胞支架质量进行评价，并预估不良反应的风险[13]。

2.1 支架结构的完整性 肾脱细胞支架结构的完整性，是后续灌注及植入细胞的关键，包括宏观和微观结构的完整。前者可通过支架外观、血管铸型和血管网络成像等方法判断肾脱细胞支架结构是否完整[5,25]，后者可通过H&E染色、DAPI染色判断。机械强度是另一个影响支架质量的因素，Mendoza-Novelo的研究[26]发现大多数表面活性剂会从支架中去除一些GAG，从而影响支架的机械强度；而且Conconi等[27]还发现随着脱细胞试剂作用时间的延长，机械强度下降越明显。因此根据不同的实验需要探索合适的试剂及脱细胞时间极为重要[28]。

2.2 DNA含量测定 DNA与不良宿主反应直接相关，因此支架中定量检测残存的DNA极为关键，目前认为脱细胞化组织应具备以下特征[13]：1)H&E或DAPI染色未见细胞核；2)每毫克干重脱细胞支架含小于50 ng的DNA；3)DNA片段小于200 bp。DNA定量测量可通过市售试剂盒、碘化丙啶或双苯甲亚胺以及凝胶电泳测得；也可将组织中加入蛋白酶K恒温37℃约48 h，或利用组织试剂盒提取DNA并绘制标准曲线，最终使用分光光度仪进行定量测定[29]。

2.3 蛋白质定量分析 蛋白质定量分析有助于了解构成ECM的蛋白质种类及数量，以及可能发挥的作用。凝胶电泳和质谱分析是筛选组织或器官中蛋白质和多肽复杂环境的常用工具[30]，主要检测的蛋白包括Ⅰ型、Ⅳ型胶原、层黏连蛋白、弹性蛋白等。熟知精确成分有助于研究人员建立仿生化的生物链，通过对ECM中的具体成分进行排列组合，可构建出适合细胞生长且免疫原性可控的支架。免疫荧光主要针对肾脱细胞支架中的Ⅰ型、Ⅳ型胶原、层黏连蛋白、弹性蛋白等水平以及vwf，CD31和α1钠-钾ATP酶等表达水平进行检测[31]。羟脯氨酸检测主要是定量测量总胶原，二甲基亚甲基蓝检测主要用来测量总硫酸化糖胺聚糖(sulfated glycosaminoglycan，sGAG)含量。

3 肾脱细胞支架再细胞化

对肾脱细胞支架进行再细胞化处理是生物人工肾构建过程中最复杂的阶段。目前进行再细胞化的方法主要分为组织切片、灌注以及直接注射。组织贴片法主要用来研究脱细胞支架的成分对细胞功能的影响；灌注法是再细胞化技术重建功能性肾的最好方法；与灌注技术相比，直接将细胞注射入肾实质则能更好地控制细胞分布和再细胞化的区域。

细胞的来源对于重建具有功能的器官十分重要。目前较为理想的再细胞化的细胞类型主要有内皮细胞、上皮细胞、胚胎干细胞以及诱导多能干细胞。

内皮细胞和上皮细胞：内皮细胞是支架内血管通畅的前提，研究表明如果缺乏内皮细胞即使进行抗凝也会形成明显的血栓[32]，因此支架在移植入体前必须实现再细胞化。Ko等[33]发现内皮细胞特异性抗体与血管壁结合，能促进内皮细胞的黏附。Song等[17]报道的大鼠肾全器官再细胞化的

表 1　肾脱细胞常用的试剂及方法

试剂	实验对象	实验方法	所需时间	作者
化学试剂	大鼠	1. 1% Triton X-100，70 ml/h，90 min 2. PBS，30 min 3. 1% SDS，90 min 4. PBS，30 min 5. 0.9% NaCl，60 ml/h，60 min 6. Panicillicin + streptomycin	5 h	Peloso A, et al[19]
	大鼠	1. 50 U/ml heparin + PBS, 30 min 2. 0.1% Triton X-100, 3 h 3. dH_2O, 30 min 4. 0.8% SDS, 3 h 5. Panicillicin + streptomycin 6. 0.625% glutaraldehyde, 1 ml/min, 12 h 7. dH_2O + panicillicin + streptomycin, 12 h	55 h	Yu Y, et al[20]
	猪	1. PBS, 25 ml/min, 30 min 2. 0.1% SDS until white in color 3. PBS, 8 h 4. 0.1% peracetic acid, 2 h 5. PBS, 12 h	42 h	Hussein KH, et al[5]
	大鼠	1. 1% SDS, 4 h 2. 1% Triton X-100, 4 h (every 2 h increased 1.0 ml/min to 2.0 ml/min) 3. Autoclaved distilled water for 1 h 4. Sterile PBS flush, 5% penicillin-streptomycin and Amphotericin B 5. Stored at 4℃ until use	9 h	Padalhin AR, et al[21]
化学试剂和酶	大鼠	1. 0.02% trypsin/0.05% EDTA, 30 min 2. Double-distilled water (15 min), a 0.2 mmol/L PBS solution (15 min) 3. 1% Triton-X100 (solarbio)/0.05% EDTA (Sigma-Aldrich)/0.1% PMSF (beyotime) (180 min) 4. 0.1% SDS, 30 min; benzonase, 30 min 5. 10% FBS+Pen/Strep + PBS, 24 h	28.5 h	Yu H, et al[12]
化学试剂、非酶和物理法	人	1. Stored at -80℃ until use 2. 2 × PBS + penicillin and streptomicin,15min 3. 0.02% trypsin, 1 h + 2% tween-20, 2 h + 4% sodium deoxycholate, 3 h + 1% SDS overnight 4. 2 × PBS + penicillin and strptomicin, 4 h + 1 × PBS, 4 h	32 h	Bombelli S, et al[22]
	人	1. Renal capsule was removed and the underlying cortex was sectioned 2. 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) in endotoxin-free cell culture grade water, 5 days 3. Tissue sections were then rinsed in water for 5 days and changing water twice daily 4. Stored at -20℃	10 d	Nagao RJ, et al[23]

方法，主要通过大鼠肾动脉灌注人脐静脉内皮细胞，同时从输尿管灌注新生鼠肾细胞，借由此产生的压力梯度使细胞充满整个肾，培养4 d后细胞可迁移至合适位置，且发挥一定的功能。上皮细胞可来源于自体，也可选自其他物种。Abolbashari等[34]将分离的猪肾原代细胞，多次注射到猪肾脱细胞支架实质部分中，实现了细胞黏附和重建肾小管结构，但由于在支架表面形成了创伤，考虑到未来移植入体，故此法不适用于全器官的再细胞化。Caralt等[25]将人肾小管上皮细胞系注入大鼠肾动脉，并以高压灌注促进细胞种植，结果表明高压灌注能使细胞通过微循环穿过血管壁，从而达到细胞定植的效果。

胚胎干细胞(embryonic stem cell，ESC)：Ross等[4]首次使用ESC进行肾脱细胞支架的再细胞化，他们通过肾动脉和输尿管灌注入小鼠ESC，结果证实了小血管和肾小球的再生。Batchelder等[35]从猴肾脱细胞支架的肾动脉和输尿管同时灌入人ESC，恒速灌注培养液并培养5 d后，在髓质的血管或管状腔内发现了细胞。Remuzzi等[32]从肾静脉和输尿管逆行灌注细胞，同时外部给予负压，发现只有少量细胞能够到达皮质和髓质且分布不均匀，随后他们优化了细胞种植的策略，加大灌注压力及细胞数量，最终细胞分布情况较前明显提高，但细胞在接种后7 d增殖显著降低，因此仍需进一步探索更为有效的细胞种植方法。

人诱导多能干细胞：人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells，hiPSC)是由体细胞中转录4种转录因子衍生而来的多能干细胞。Caralt等[25]将hiPSC衍生的内皮细胞通过肾动脉高压注入脱细胞支架内，证实细胞能从血管中转移至管周结构，并且在肾脱细胞支架内分布良好。Du等[36]将hiPSC衍生的PAX-2阳性肾祖细胞和内皮细胞同

时注入小鼠肾脱细胞支架，随后将支架植入SCID小鼠体内长达12周；他们还发现肾小球有一定的尿素和肌酐清除以及白蛋白重吸收的功能，表明内皮细胞与肾祖细胞共培养能促进支架的再细胞化。因此，即使hiPSC也存在畸胎瘤的风险，但其与ESC的相同分化潜力且无伦理争议的优势，使其有望成为未来种植细胞的热门候选。

4 肾生物打印技术

肾再生目前存在的困难主要是如何提高脉管系统再细胞化的效率和选择合适的种植细胞[37]，以及确定最佳接种细胞的方法。面对这些难题，科学家们将目光瞄向生物打印技术，希望能制造出具有高机械强度且生物相容性良好的人工肾[38]。Musah等[39]将hiPSC种植在生物打印的微流体片上，最终较为有效地将hiPSC诱导分化为足细胞，并发挥了一定功能，结果表明生物打印可以为细胞附着和分化提供材料支撑。但生物打印技术用于构建人工肾也面临着诸多困难，如细胞活力是生物打印过程的关键参数，由于打印过程中的高应力可能会导致细胞凋亡[40]，而其原料不仅需要提供物理和机械支持，保证细胞存活，还应解决打印材料的批次变化或细胞和宿主对材料的不良反应等问题，因此寻找满足上述要求的生物打印材料，应该是生物打印技术未来探求的方向。

5 结语

再生医学的发展与进步为损伤修复及疾病治疗提供了新选择。在过去一段时间里，已报道较多关于脱细胞支架构建人工肾的研究。本综述也总结了现阶段肾脱细胞化支架和再细胞化的方法与研究进展。现有的脱细胞方案虽然能将绝大多数细胞（> 99%）洗脱干净，但不可避免地损伤了支架ECM成分以及机械强度，未来应重点关注脱细胞过程中如何尽可能保留支架成分及性质。再细胞化的方案也需进一步优化。尽管目前诞生了几种细胞种植的方法，也实现了细胞定植和功能发挥，但由于肾细胞种类和数量极多，只灌注一种或几种细胞很难真正意义上实现肾再生。

肾器官再生工程仍处于早期阶段。实验室中虽已生产出动物的再细胞化人工肾，也帮助我们理解了肾细胞生物学，细胞分化和重塑，但距离应用于人体仍有巨大的差距，依然有许多困难和挑战亟需解决，如怎样利用肾脱细胞支架的特性消除遗传以及其他因子的干扰，构建出可促进细胞生长分化的微环境等。而合适的灭菌方法、先进的生物反应器、甄选最佳种植细胞、合适的诱导细胞分化方法、实时定量评估脱细胞支架的质量、免疫原性和生物降解、评估重建器官的生长发育等方面则应是现阶段需要关注的问题。

参考文献

1 Keane TJ，Swinehart IT，Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance［J］. Methods，2015，84：25-34.

2 Hoshiba T，Lu H，Kawazoe N，et al. Decellularized matrices for tissue engineering［J］. Expert Opin Biol Ther，2010，10（12）：1717-1728.

3 Figliuzzi M，Bonandrini B，Remuzzi A. Decellularized kidney matrix as functional material for whole organ tissue engineering［J］. J Appl Biomater Funct Mater，2017，15（4）：0.

4 Ross EA，Williams MJ，Hamazaki T，et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds［J］. J Am Soc Nephrol，2009，20（11）：2338-2347.

5 Hussein KH，Saleh T，Ahmed E，et al. Biocompatibility and hemocompatibility of efficiently decellularized whole porcine kidney for tissue engineering［J］. J Biomed Mater Res A，2018，106（7）：2034-2047.

6 Nakayama KH，Batchelder CA，Lee CI，et al. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering［J］. Tissue Eng Part A，2010，16（7）：2207-2216.

7 Orlando G，Booth C，Wang Z，et al. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies［J］. Biomaterials，2013，34（24）：5915-5925.

8 Salvatori M，Peloso A，Katari R，et al. Semi-xenotransplantation：the regenerative medicine-based approach to immunosuppression-free transplantation and to meet the organ demand［J］. Xenotransplantation，2015，22（1）：1-6.

9 Guyette JP，Gilpin SE，Charest JM，et al. Perfusion decellularization of whole organs［J］. Nat Protoc，2014，9（6）：1451-1468.

10 Deeken CR，White AK，Bachman SL，et al. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate［J］. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater，2011，96（2）：199-206.

11 Dong X，Wei X，Yi W，et al. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering［J］. J Mater Sci Mater Med，2009，20（11）：2327-2336.

12 Yu H，Chen Y，Kong H，et al. The rat pancreatic body tail as a source of a novel extracellular matrix scaffold for endocrine pancreas bioengineering［J］. J Biol Eng，2018，12：6.

13 Crapo PM，Gilbert TW，Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes［J］. Biomaterials，2011，32（12）：3233-3243.

14 Wainwright JM，Czajka CA，Patel UB，et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart［J］. Tissue Eng Part C Methods，2010，16（3）：525-532.

15 Reing JE，Brown BN，Daly KA，et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds［J］. Biomaterials，2010，31（33）：8626-8633.

16 Lehr EJ，Rayat GR，Chiu B，et al. Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches［J］. J Thorac Cardiovasc Surg，2011，141（4）：1056-1062.

17 Song JJ，Guyette JP，Gilpin SE，et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney［J］. Nat Med，2013，19（5）：646-651.

18 Baptista PM，Orlando G，Mirmalek-Sani SH，et al. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering［J］. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc，2009，2009：6526-6529.

19 Peloso A，Citro A，Corradetti V，et al. In-Lab Manufacturing of Decellularized Rat Renal Scaffold for Kidney Bioengineering［J/OL］. https：//link.springer.com/protocol/10.1007%2F7651_2017_96.

20 Yu Y，Liu L，Zhang J，et al. Glutaraldehyde Cross-linking Modification of Decellularized Rat Kidney Scaffolds［J/OL］. https：//link.springer.com/protocol/10.1007%2F7651_2017_72.

21 Padalhin AR，Park CM，Lee BT. Streamlined System for Conducting In Vitro Studies Using Decellularized Kidney Scaffolds［J］. Tissue Eng Part C Methods，2018，24（1）：42-55.

22 Bombelli S，Meregalli C，Scalia C，et al. Nephrosphere-Derived Cells Are Induced to Multilineage Differentiation when Cultured on

Human Decellularized Kidney Scaffolds［J］. Am J Pathol，2018，188（1）：184–195.

23 Nagao RJ，Xu J，Luo P，et al. Decellularized Human Kidney Cortex Hydrogels Enhance Kidney Microvascular Endothelial Cell Maturation and Quiescence［J］. Tissue Eng Part A，2016，22（19–20）：1140–1150.

24 Zhang Q，Raoof M，Chen Y，et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury［J］. Nature，2010，464（7285）：104–107.

25 Caralt M，Uzarski JS，Iacob S，et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation［J］. Am J Transplant，2015，15（1）：64–75.

26 Mendoza–Novelo B，Avila EE，Cauich–Rodr í guez JV，et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content［J］. Acta Biomater，2011，7（3）：1241–1248.

27 Conconi MT，De Coppi P，Di Liddo R，et al. Tracheal matrices，obtained by a detergent–enzymatic method，support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells［J］. Transpl Int，2005，18（6）：727–734.

28 Badylak SF，Freytes DO，Gilbert TW. Reprint of：Extracellular matrix as a biological scaffold material：Structure and function［J］. Acta Biomater，2015，23（Suppl）：S17–S26.

29 Soto–Gutierrez A，Zhang L，Medberry C，et al. A whole–organ regenerative medicine approach for liver replacement［J］. Tissue Eng Part C Methods，2011，17（6）：677–686.

30 Mayorca–Guiliani AE，Madsen CD，Cox TR，et al. ISDoT：in situ decellularization of tissues for high–resolution imaging and proteomic analysis of native extracellular matrix［J］. Nat Med，2017，23（7）：890–898.

31 Xue A，Niu G，Chen Y，et al. Recellularization of well–preserved decellularized kidney scaffold using adipose tissue–derived stem cells［J］. J Biomed Mater Res A，2018，106（3）：805–814.

32 Remuzzi A，Figliuzzi M，Bonandrini B，et al. Experimental Evaluation of Kidney Regeneration by Organ Scaffold Recellularization［J］. Sci Rep，2017，7：43502.

33 Ko IK，Abolbashari M，Huling J，et al. Enhanced re–endothelialization of acellular kidney scaffolds for whole organ engineering via antibody conjugation of vasculatures［J］. Technology，2014，2（3）：243–253.

34 Abolbashari M，Agcaoili SM，Lee MK，et al. Repopulation of porcine kidney scaffold using porcine primary renal cells［J］. Acta Biomater，2016，29：52–61.

35 Batchelder CA，Martinez ML，Tarantal AF. Natural Scaffolds for Renal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells for Kidney Tissue Engineering［J］. PLoS ONE，2015，10（12）：e0143849.

36 Du C，Narayanan K，Leong MF，et al. Functional Kidney Bioengineering with Pluripotent Stem–Cell–Derived Renal Progenitor Cells and Decellularized Kidney Scaffolds［J］. Adv Healthc Mater，2016，5（16）：2080–2091.

37 Lee H，Han W，Kim H，et al. Development of Liver Decellularized Extracellular Matrix Bioink for Three–Dimensional Cell Printing–Based Liver Tissue Engineering［J］. Biomacromolecules，2017，18（4）：1229–1237.

38 Ahn G，Min KH，Kim C，et al. Precise stacking of decellularized extracellular matrix based 3D cell–laden constructs by a 3D cell printing system equipped with heating modules［J］. Sci Rep，2017，7（1）：8624.

39 Musah S，Mammoto A，Ferrante TC，et al. Mature induced–pluripotent–stem–cell–derived human podocytes reconstitute kidney glomerular–capillary–wall function on a chip［J/OL］. http：//europepmc.org/abstract/MED/29038743.

40 Choi YJ，Kim TG，Jeong J，et al. 3D Cell Printing of Functional Skeletal Muscle Constructs Using Skeletal Muscle–Derived Bioink［J］. Adv Healthc Mater，2016，5（20）：2636–2645.