

· 综述 ·

器官获取方法研究进展

全彩玲¹, 齐忠权^{1,2} (1. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361102; 2. 广西大学医学院, 广西壮族自治区 南宁 530004)

我国每年有数以万计的患者挣扎在生死线上等待器官移植, 而每年器官移植手术仅约1万例^[1], 很多终末期器官衰竭的患者在等待中离世。器官的体外培养和组织工程器官成为解决器官短缺的重要手段^[2]。

1 组织工程器官

组织工程器官是以细胞学和材料学为基础, 将细胞接种在合适的材料上培养以代替受损的组织或器官的一门学科^[3]。组织工程器官构建需要具备三个必不可少的要素: ① 具有生物相容性良好的支架材料; ② 具有合适接种的种子细胞; ③ 种子细胞在支架上增殖、分化及诱导, 最终分化为具有功能的细胞。随着干细胞研究的深入及生物纳米材料研究的突飞猛进, 组织工程器官的研究也进入了一个新阶段, 越来越多的组织器官走进了大众视野, 如: 组织工程皮肤^[4]、组织工程血管^[5]、组织工程声带^[6]、组织工程心脏^[7]、组织工程肾脏^[8]、组织工程肝脏^[9]、组织工程视网膜^[10]和组织工程膀胱^[11]等。组织工程器官可以在一定时期内代替受损器官工作, 延长动物和人的生存期。耶鲁大学的科学家们已经使用动物细胞制备出鼠的肺部组织, 可以被植入啮齿动物体内, 并在一定时间内发挥功效^[12]。为了方便得到不同的器官, 研究者把材料做成不同的器官形状, 通过改良材料表面使细胞在材料上黏附生长, 从而制造出不同的器官^[13]。用于组织工程的材料需具备以下特征: ① 具有良好的生物相容性。生物材料最终应用于人体内, 具有免疫反应的组织工程材料会受到受体的免疫排斥, 造成移植失败, 给受体带来巨大痛苦; ② 具有合

适的表面结构; ③ 具有一定的力学强度和柔韧性。以去细胞支架为代表的组织工程心脏的研究进展如下: 2008年研究人员用大鼠原代心肌细胞接种心脏脱细胞支架得到可以收缩的心脏, 但是该心脏收缩频率和正常心脏有所不同^[7]。2013年 *Nature Communications* 上发表一篇文章, 将人的诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 诱导为心肌细胞作为种子细胞, 鼠的脱细胞支架作为材料, 构建组织工程心脏, 得到具有收缩功能的心脏^[14]。这些以动物模型为基础的研究都为人类组织工程的构建和应用打下基础。Guyette等^[15]用人的 iPSC 作为种子细胞接种到器官捐赠者的心脏去细胞支架构建组织工程心脏, Weymann等^[16]用猪的去细胞支架接种人的细胞制备组织工程心脏, 这些研究都试图构建可以应用到人类的组织工程心脏, 但这些组织工程心脏由于缺乏传导系统, 其和正常心脏的功能还存在很大差异, 不能代替正常心脏的功能用于移植。去细胞支架在组织工程肝脏及组织工程肾脏研究方面都有一定的进展, 并占据重要的位置^[17]。除脱细胞支架外, 一些无毒亲水性好、生物相容性好及细胞亲和性好的高分子材料, 如: 海藻酸盐^[18]、胶原蛋白^[19]、明胶^[20]、水凝胶^[21]、琼脂^[22]及一些经人工修饰合成的化合物材料, 如: 纳米材料^[23]、合金材^[24]和有机合成材料^[25]都是组织工程常用的材料。

2 3D 打印器官

3D 打印最早由 Charles 在 1986 年提出, 通过电脑建模程序来设计需要打印的器官剖面图, 从而精准指导随后的打印过程, 该技术是一种快速成型技术, 以数字模型为基础, 运用粉末或液体可粘合材料, 通过逐层固化成型的方式来构建

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.02.017

通讯作者: 齐忠权, Email: zqqi@xmu.edu.cn

具有复杂结构的物体^[26], 常被应用于模型制备、工业设计、零部件制造和医学等领域^[26]。3D打印应用于再生医学中各种组织的再生, 包括皮肤、骨骼、血管^[27]、气管、心脏组织和软骨组织, 另外, 3D打印还应用于组织模型、药物传递及药物毒性的研究。加利福尼亚大学研究者利用干细胞和3D打印技术相结合打印出人体肝脏^[28]; 美国北卡罗来纳州的研究者使用复合细胞的水凝胶材料, 逐层打印, 构建出类似肾脏的结构。同时, 他们打印出骨骼、耳鼻、膀胱等人体器官, 以达到为患者提供量身定做器官替代品的目的^[29]。然而, 3D生物打印目前还存在许多不足之处, 例如: 材料的选择, 目前还没有一种材料可以满足器官打印的需求, 使得细胞黏附生长良好, 打印的器官功能良好, 移植到体内后无免疫反应; 另外, 打印精度也是有待解决的重要问题。由于3D打印为逐层打印, 精度越高, 层数越多, 会造成器官分层严重, 整体性和完整性较差。从理论上讲, 3D生物打印机可以使用CT等扫描技术, 得到患者身体的各个部位精确图像数据, 并在随后的短时间内3D打印出相应的组织, 由于这些结构来源于患者的身体扫描, 因此, 打印后的植入物可以完全模拟原有器官, 顺利地进行替换, 从而减轻了植入过程对患者身体带来的负担。但是, 由于器官自组装的机制, 3D生物打印技术还有很长的路要走。相信随着CT扫描技术精准度的提高, 3D打印技术如果可以联合细胞流式分选技术, 使得分选的细胞利用打印机精确的定位到器官的不同位置, 有望得到具有功能的可供移植的器官。

3 器官体外培养研究

器官体外培养技术有着悠久的历史, 早在1964年 *Organ culture* 一书在巴黎以法语的形式出版, 1970年 Thomas 重新修订后以英文的形式重新出版, 该书不断的被修订。该书介绍了体内各个器官的培养条件和方法及如何选择合适的培养基, 并回答了早期胚胎干细胞在体外是否会按照原来的发育, 发育成为器官的问题, 指出胚胎早期干细胞会按照其自身的发育轨迹, 在体外发育成

该细胞应该发育成的器官, 并且指出, 与体内发育相比, 器官的体外培养产物不变, 但体外器官培养生长速度较体内慢。另外, 该书还介绍了一些器官培养的主要方法: ①凝固的血浆基质培养法。最初是由 Fell 和 Robison 创立, 将器官碎片或器官放置在覆盖有凝固的血浆和鸡胚浸出液的表面皿上培养^[30]; ②琼脂基质培养法。1952年研究人员在含有胚胎抽出液的琼脂培养基上直接放置器官的方法进行器官培养^[30]; ③漂浮法; ④格栅培养法; ⑤交替暴露于培养液和气相培养法。19世纪60年代, 人们探索了人小肠体外培养的方法, 并获得了关于器官培养条件的一些经验^[31]。总结器官培养的主要关键点包括: ①器官的3D培养环境。细胞在体内的3D生长环境与细胞在体外的2D培养相比, 细胞在迁移、黏附、增殖和基因表达方面存在着很大的差异^[32], 3D培养能更精确地模拟正常细胞的形态、增殖和分化, 器官体外培养通常用3D培养方法, 人造骨骼即是采用生骨细胞接种3D支架进行骨骼的培养^[33]。聚乙二醇的水凝胶是常用的3D培养基质, 它是一种以水为分散介质的凝胶, 具有交联结构的水溶性高分子中引入一部分疏水基团而形成能遇水膨胀的交联聚合物, 能保持一定的形状, 能吸收大量的水^[34], 类似果冻, 具有高弹性, 它与活体细胞外基质相似, 可使体外细胞培养更接近体内的生理特征, 是基础研究、药物筛选和再生医学等领域细胞功能研究的常用工具。水凝胶支架还可以交联生物活性因子调节细胞的生长分化。水凝胶支架在液态时包裹细胞, 在固态时形成交联网状, 细胞黏附性强, 水分充足, 从而保障三维状态下细胞的水分交换、营养交换和废物排出能力。近年来, 含磁性氧化铁的水凝胶被广泛应用于细胞的3D培养, 细胞可以悬浮在培养基和磁性物质当中, 摆脱细胞因重力的作用而发生聚集^[35]; ②气体组分也是影响器官培养的重要因素, 细胞在培养过程中, 一般需要5%的CO₂浓度和95%的空气, 而器官对O₂的需求量则大大增加, 在心脏^[7]和小肠^[31]培养过程中O₂的浓度达到90%以上。

4 动物嵌合体研究

免疫排斥是器官移植需要解决的一个重要问题,于是从动物嵌合体获取器官成为研究热点^[36-37]。嵌合体在免疫学上是指一个机体有两种或两种染色体组成,不同细胞系同时存在,彼此耐受,不产生免疫排斥反应。早期动物嵌合体采用胚胎时期将一种动物的胚胎干细胞注入另外一种细胞的胚胎期,使其发育成嵌合体,这种方法得到嵌合体极低,且不同器官的基因表达紊乱。随着基因敲除技术的发展,研究人员可以通过基因敲除技术敲除动物某一基因,使其某一器官发育停止,留出“空位”,再注射另一动物的干细胞,使其发育成该器官。这种方法得到的器官有望成为获取器官的重要手段。另外,令人鼓舞的是研究人员通过孤雌单倍体基因印记改造,制备出单倍体干细胞^[38],该细胞具备胚胎干细胞的功能和配子发育能力^[39],这也为器官的获取提供了新希望。

5 展望

尽管现在还没出现一种很好的方法,可以提供大量可供移植的器官,目前器官移植主要来源于器官捐赠。但随着生物科技的发展和进步,更多和更合适的生物材料的出现,组织工程器官研究将进入一个新阶段。从嵌合体动物体内获取可供人类应用的器官在不久的将来也会出现在大众的视野内。

参考文献

- [1] An N, Shi Y, Jiang Y, Zhao L, et al. Organ donation in China: the major progress and the continuing problem [J]. J Biomed Res, 30 (2): 81-82.
- [2] 曹群杰. 肝组织工程支架微结构的仿生设计及动态培养数值模拟[D]. 广州:华南理工大学,2009.
- [3] 胡江,陶祖莱. 组织工程研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2000,17 (1): 75-79.
- [4] Cahn F, Kyriakides TR. Generation of an artificial skin construct containing a non-degradable fiber mesh: a potential transcutaneous interface [J]. Biomed Mater, 2008, 3 (3): 034110.
- [5] Nemen-Guanzon JG, Lee S, Berg JR, et al. Trends in tissue engineering for blood vessels [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 1-14.
- [6] Ling C, Li Q, Brown ME, et al. Bioengineered vocal fold mucosa for voice restoration [J]. Sci Transl Med, 2015, 7 (314): 314ra187.
- [7] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart [J]. Nat Med, 2008, 14 (2): 213-221.
- [8] Uzarski JS, Xia Y, Belmonte JC, et al. New strategies in kidney regeneration and tissue engineering [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23 (4): 399-405.
- [9] Palakkan AA, Hay DC, Anil KPR, et al. Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges [J]. Liver Int, 2013, 33 (5): 666-676.
- [10] Kador KE, Montero RB, Venugopalan P, et al. Tissue engineering the retinal ganglion cell nerve fiber layer [J]. Biomaterials, 2013, 34 (17): 4242-4250.
- [11] Atala A. Tissue engineering of human bladder [J]. Br Med Bull, 2011, 97: 81-104.
- [12] Petersen TH, Calle EA, Zhao L, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation [J]. Science, 2010, 329 (5991): 538-541.
- [13] Yan Y, Li Y, Song L, et al. Pluripotent stem cell expansion and neural differentiation in 3-D scaffolds of tunable Poisson's ratio [J]. Acta Biomater, 2017, 49: 192-203.
- [14] Lu TY, Lin B, Kim J, et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2307.
- [15] Guyette JP, Charest JM, Mills RW, et al. Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix [J]. Circ Res, 2016, 118 (1): 56-72.
- [16] Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, et al. Bioartificial heart: a human-sized porcine model-the way ahead [J]. PLoS One, 2014, 9 (11): e111591.
- [17] Mazza G, Rombouts K, Rennie HA, et al. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation [J]. Sci Rep, 2015, 5: 13079.
- [18] Li Z, Zhang M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering [J]. J Biomed Mater Res A, 2005, 75 (2): 485-493.
- [19] Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering [J]. Biopolymers, 2008, 89 (5): 338-344.
- [20] Hoque ME, Nuge T, Yeow TK, et al. Gelatin based scaffolds for tissue engineering a review [J]. Polym Res J, 2015, 9: 15-32.
- [21] Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds [J]. Expert Rev Med Devices, 2011, 8 (5): 607-626.
- [22] Chen AA, Tsang VL, Albrecht DR, et al. 3-D fabrication technology for tissue engineering [J]. Springer US, 2007: 23-38.

- [23] Alghazali KM. Bone-tissue engineering : complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies [J]. *Drug Metab Rev*, 2015, 47 (4) : 431.
- [24] Santiago-Medina P, Sundaram PA, Diffoot-Carlo N. Titanium oxide : a bioactive factor in osteoblast differentiation [J]. *Int J Dent*, 2015, 2015 : 357653.
- [25] Chapple CR, Osman NI, Mangera A, et al. Application of Tissue Engineering to Pelvic Organ Prolapse and Stress Urinary Incontinence [J]. *Low Urin Tract Symptoms*, 2015, 7 (2) : 63-70.
- [26] Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (8) : 773-785.
- [27] Horvth L, Umehara Y, Jud C, et al. Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting [J]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 7974.
- [28] Ma X, Qu X, Zhu W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (8) : 2206-2211.
- [29] Kang HW, Lee SJ, Ko IK, et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34 (3) : 312-319.
- [30] Thomas J. *Organ culture* [M]. Elsevier Science, 2012.
- [31] Browning TH, Trier JS. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine [J]. *J Clin Invest*, 1969, 48 (8) : 1423-1432.
- [32] Ayala P, Lopez JI, Desai TA. Microtopographical cues in 3D attenuate fibrotic phenotype and extracellular matrix deposition: implications for tissue regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16 (8) : 2519-2527.
- [33] Du C, Cui FZ, Zhu XD, et al. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44 (4) : 407-415
- [34] 程恩隽. 水凝胶[J]. 国外科技新书评价, 2009, 12 : 3.
- [35] Yu DD, Guo SW, Jing YY, et al. A review on hepatocyte nuclear factor-1beta and tumor [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5 (1) : 58.
- [36] 王绕绕, 宋红丽. 自噬在器官移植免疫耐受研究中的进展[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4 (1) : 57-60.
- [37] 周淑华, 谷振祥, 曾盛. 血液吸附联合血液透析在肾移植免疫排斥治疗中的应用[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16 (10) : 632-632.
- [38] Mai Q, Yu Y, Li T, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts [J]. *Cell Res*, 2007, 17 (12) : 1008-1019.
- [39] Qi Q, Ding C, Hong P, et al. X chromosome inactivation in human parthenogenetic embryonic stem cells following prolonged passaging [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35 (3) : 569-578.

(收稿日期: 2017-10-28)

全彩玲, 齐忠权. 器官获取方法研究进展[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2018, 6 (2) : 159-162.

· 国外医学之窗 ·

抑制 Y1 受体信号传导改善胰岛移植效果

无法分泌足够的胰岛素是 1 型和 2 型糖尿病病理特征, 同时也降低胰岛细胞移植成功率, 在此我们要阐明的是 Y1 受体信号通路抑制 β 细胞释放胰岛素, 并探索药物刺激胰岛素分泌的可行性。移植 Y1 受体缺陷的胰岛细胞能使化学诱导的糖尿病小鼠高血糖症更快得到纠正, 而通过短期药物阻断移植小鼠和人类胰岛细胞 Y1 受体同样能获得类似效果。另外, 非肥胖型糖尿病小鼠予以 Y1 受体拮抗剂治疗会延迟糖尿病的发生。机制上, Y1 受体信号抑制胰岛 cAMP 产生, 进而通过 CREB 调控通路下调几种糖酵解关键酶及 ATP 的产生, 因此, 调控 β 细胞中 Y1 受体信号通路将提供一种独特的疗法, 用于改善 1 型糖尿病和胰岛移植时发生的胰岛素分泌不足的病理状态。

金鹏, 编译自 *Nat Commun*, 2017, 8 : 490.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28887564>