

· 述 评 ·

# 浅谈组织工程原理与应用

陶凯

【摘要】 组织工程概念的提出至今已有 24 年的历史。其基本含义是利用生物体的再生能力和细胞所具有的增殖、分化和组织形成能力,应用生物学和工程学原理,生成新的组织或器官,用以再生或修复因各种原因丧失功能的组织和器官。文章回顾了组织工程概念的提出和基本原理,介绍了目前临床应用的实例,并对组织工程未来亟待解决的问题给予评述,以期展望组织工程的未来研究和应用。

【关键词】 组织工程;脂肪组织;脂肪源性干细胞

1993 年,哈佛大学的 J Vacanti 教授和麻省理工学院的 R Langer 教授在《科学》杂志上提出了“组织工程学(tissue engineering)”的概念,给世界带来了巨大的冲击<sup>[1-2]</sup>。随之出现了组织工程的基本技术线路,即“将细胞与支架复合,并在生长因子辅助下进行培养得到组织”。之后,许多研究者进行了将细胞与支架复合后,在体内或体外生成组织或器官的尝试<sup>[3-8]</sup>。二十几年过去了,人们希望看到的再造组织和器官似乎并没有如想象的那样顺利。组织工程的现状如何?是否已经陷入迷途而没有了方向?临床应用是否前景暗淡?二十几年的努力是否“无果而终”?追本溯源,放眼世界,或许会找到这些问题的答案。

## 1 组织工程的缘起与概念

在体内存在多种器官和组织,维持人体正常的生命活动,完成各自重要的生理功能。在许多疾病的过程中,原发疾病及其并发症会对器官和组织造成损害,导致组织或器官功能的丧失,不能完成其正常的生理功能,使机体进入“组织或器官功能不全”状态。针对以上病理状态,利用近年来快速发展的生命科学和生物技术,有可能通过工程技术制造出可用于移植的生物体组织或器官,由此诞生了“组织工程学”。1993 年《科学》杂志发表的组织工程定义是“Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function”。通俗的说法是,利用生物体的再生能力和细胞所具有的增殖、分化和组织形成能力,应用生物学和工程学原理,生成新的组织或器官,用以再生或修复因各种原因丧失功能的组织和器官。

## 2 组织工程的原理

人体是由细胞和细胞外环境构成的。为了便于理解细胞和细胞外环境的关系,可以把细胞比喻成人,无论多么强壮的人,没有了家和食物也会变得衰弱。对于细胞来说也是一样,无论多么有活力的细胞,如果没有了家和食物,也无法发挥自身的能力。细胞的“家”就是细胞周围的细胞外基质,主要成分为蛋白质和多糖。细胞的“食物”就是细胞生长因子等活性物质(图 1)。当细胞活力强时,细胞会自己制造出细胞外基质和各种生长因子,从而变得更有活力。但是,当细胞发生病变或活体组织受到损伤时,细胞会变得衰弱,制造能力也相应降低。工程(engineering)的含义是构建、生产和加工。组织工程的基本思路是在提供有活力细胞的同时,给予细胞以适宜的“家”,即生物材料,同时给予细胞恰当的“食物”,即生长因子,进而生成有活力的组织,实现组织的构建、生产与加工。

## 3 组织工程的临床应用

组织工程的核心目的是通过细胞培养修复或重建组织和器官。自从组织工程提出到现在已有 24 年,虽然目前对于大型器官的构建仍然没有取得成功,但是应用组织工程学思路获得的研究成果已经有许多应用于临床,并展示出良好的应用前景。

3.1 细胞膜片工程学 细胞在体外培养的方式有贴壁培养和悬浮培养两种。目前常用的细胞如成骨细胞、成软骨细胞、骨髓基质细胞、脂肪源性干细胞等,都是采用贴壁培养方式获得的。对于这些细胞的培养通常是

采用细胞培养板或培养皿进行细胞体外贴壁培养,培养一定时间后,可以采用胰蛋白酶将细胞从培养板或培养皿上分离成单个细胞,用于细胞移植或与材料复合后移植。细胞膜片工程学首先将细胞加工成膜片状,然后在此基础上进行组织的构建。它是组织工程学最基本也是最容易应用于临床的形式。

在细胞膜片工程学中最核心的技术是温度敏感性培养基板的研制成功和临床应用。此培养基板采用了温度敏感性高分子材料—聚(N-异丙烯酰胺)[poly(N-isopropylacrylamide), PIPAAm],此类材料的一个特性在低于临界温度时是水溶性高分子,呈现亲水性;而高于临界温度时变为不溶于水,呈现疏水性。PIPAAm 的临界温度 32℃ 左右,其亲水性和疏水性可以相互转换。PIPAAm 固定于温度培养板表面后,在 37℃ 表现为有利于细胞黏附的疏水性。而在低于 32℃ 的温度下,固定 PIPAAm 的培养板表面表现为抑制细胞黏附的亲水性,细胞或细胞膜片不需要经胰蛋白酶的消化作用就可以与培养板分离(图 2)。应用这一技术,在回收细胞时可以保持原有的细胞特性和功能,并且可以形成细胞膜片用于移植<sup>[9]</sup>。目前已商品化的温度敏感性培养基板表面覆盖厚约 15~20 mm、密度为 1.4~2.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  的 PIPAAm,可用于制作供临床应用的细胞膜片。

目前国外已有多种组织细胞膜片移植应用于临床<sup>[10-12]</sup>。例如,对于需要进行角膜移植的患者,可以从局部角膜轮状上皮获得角膜上皮干细胞或者从口腔黏膜分离上皮干细胞,培养于温度敏感性培养基板表面后,能够获得可用于移植的角膜上皮细胞膜片,并已开始临床应用研究。从自体骨骼肌中可以培养骨骼肌母细胞膜片,采用微创方法移植治疗重度心功能不全。经体外培养形成自体口腔黏膜上皮细胞膜片后,经内镜移植可以治疗内镜下黏膜癌切除(endoscopic submucosal dissection, ESD)后形成的食道溃疡。以智齿或者咬合不正的牙齿周围组织作为细胞源,培养自体牙周膜细胞膜片,将其移植包裹于患有牙周病的牙齿周围,可以用于治疗牙周病。国外已开始了以膝关节软骨修复为目标,培养自体软骨细胞膜片用于移植的临床研究。

3.2 人工培养表皮 皮肤是组织工程最先涉及的领域之一<sup>[13-16]</sup>。世界上首次将再生医学应用于实际的是 1981 年美国的格林等进行的格林型自体培养表皮移植。格林等将小鼠 3T3 细胞作为饲养层(feeder layer),开发了将角质形成细胞作为细胞膜片进行培养的方法。这种利用 3T3 细胞作为饲养层培养角质形成细胞的方法称为格林法,应用此方法得到的角质形成细胞膜片称为格林型培养表皮。格林型培养表皮作为皮肤移植的替代物,现已在烧伤创面、溃疡缺损、巨大色素性斑痣、白斑、白化病的治疗领域得到应用。美国的世界首家人工表皮产品 Epicel® 自 1988 年开始上市,2002 年韩国名为 Holoderm 的产品也得到了许可,2007 年 10 月日本研发的 jezz® 得到了生产许可,并自 2009 年 1 月起适用于保险范围。

自体培养表皮在产品特征上完全是按照定单订货的方式进行生产。从医疗机构得到订单后,确定取皮的时间、产品的移植时间、移植次数、移植张数等内容;然后,为了防止取皮错误将具有患者专用条码的皮肤组织取材套装送至医疗机构。待取皮日与移植日确定之后根据培养天数采取指定面积的皮肤,将皮肤浸渍在保存液中,之后封存于专用的隔热运输容器中,由生产厂家负责运输。培养开始后 2~3 周可以完成细胞膜片制备。多余的细胞可以进行冻存,一次取皮可进行多次治疗。在移植操作时,从产品容器中取出附着在载体上的角质形成细胞膜片,贴附到患处,无需缝合移植的细胞膜片,将必要的张数无缝隙的排列,用凡士林纱布等覆盖固定之后移植结束。移植后,患者自身的角化细胞得到增殖,按照常规的更新由基底层开始,形成了棘层、

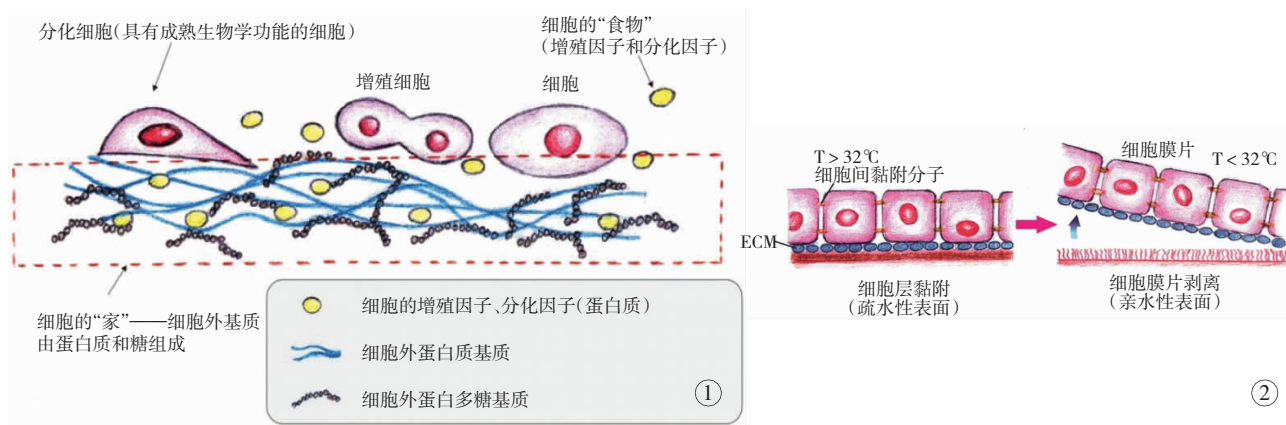


图1 组织工程原理示意:细胞、家和食物的关系 图2 温度敏感性材料形成细胞膜片的原理

颗粒层和角质层,在不发生免疫排斥的情况下完成伤口愈合。

**3.3 应用同种异体细胞的组织工程真皮** 同种异体的方式培养皮肤替代物采用的是他人的角质形成细胞和成纤维细胞,虽然会出现免疫排斥反应,但是他人的来源细胞可以产生多种细胞生长因子,促进肉芽组织及表皮的形成。两种类型的同种异体培养真皮已在美国实现了产品化,其中一种采用生物可吸收性高分子合成材料制成网状支架,之后在其表面接种成纤维细胞,并进行培养;另一种采用贴附了尼龙网格的硅酮树脂膜创伤覆盖材料,在其尼龙网格侧进行成纤维细胞的接种和培养。日本研究者将成纤维细胞接种于透明质酸和胶原蛋白制成的海绵状膜片中,开发出同种异体细胞培养的组织工程真皮。其中的成纤维细胞可以产生多种细胞生长因子促进血管新生过程。作为基质材料的透明质酸分子,可以促进细胞移动。胶原蛋白分子和多肽可以针对成纤维细胞发挥趋化作用。综合作用后,可以促进创面愈合。临床应用于重症烧伤、难治性皮肤溃疡的 415 例患者,治疗满意率达 93%<sup>[17]</sup>。

**3.4 利用药物缓释技术的组织工程学** 生物反应性高分子材料是一种能对热、光和 pH 值等外部刺激作出应答,进而发生较大理化性质变化的高分子材料,应用此类材料可以实现药物释放的调控。类似的药物缓释原理可以应用于组织工程领域,在体内实现多种细胞生长因子的缓释,进而实现生物组织的再生诱导<sup>[18-19]</sup>。例如,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, bFGF)的缓释技术可以治疗缺血性疾病,通过诱导血管新生,对骨、软骨、脂肪、皮肤的再生愈合起到促进作用。bFGF 缓释治疗糖尿病皮肤溃疡、软骨及牙周组织等的再生诱导临床试验,已经得到很好的治疗效果。胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)-1 缓释治疗失聪的临床研究,也取得了很好的治疗效果。缓释 bFGF 的血管诱导技术能增强移植细胞在体内的功能,增强治疗效果。有研究证实,前心肌细胞与 bFGF 缓释结合,可以有效治疗心功能不全。另外,通过细胞培养制作出的表皮-真皮双层皮肤样组织,与 bFGF 缓释系统一起移植,可以提高存活率和治疗效果。目前,组织工程学的再生诱导治疗已经在许多患者身上得到实际的应用(表 1)。在各种移植过程中,细胞生长因子缓释带来的血管新生都是治疗成功的关键。

#### 4 组织工程未来亟待解决的问题

对于未来组织工程的进一步发展,需要在以下几个方面重点研究<sup>[20-23]</sup>:(1)构建支架三维结构时调控其内部微结构;(2)调控三维支架内部细胞的分布;(3)调控多种细胞的有序配置;(4)调控生长因子局部浓度、浓度梯度以及诱导方式;(5)置于生物体内后诱导新生血管形成的方法;(6)生物体内支架可降解性的调控。这些关键技术的突破,将使组织工程学取得更大的突破。

以上仅列出了应用组织工程进行研究并应用于临床的几项成果,实际上,在国外有关细胞移植和组织工程的研究已不仅仅停留在实验室阶段。最

近看过一本国外的再生医学专著,其中一句话令人记忆深刻“真正优秀的基础研究的目的绝不仅限于单纯的论文发表,而是最终为临床应用和治疗服务,要形成研究者与临床医师协同工作的状态,这才是再生医学发展最正确的方向。”组织工程作为再生医学重要的组成部分,希望未来也能够出现这种协同状态,协同研究,协同改进,协同应用,最终将先进的理念和技术应用于临床,为人类健康造福。

#### 参考文献:

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. Science, 1993,260(5110):920-926.
- [2] Langer R, Vacanti JP, Vacanti CA, et al. Tissue engineering: biomedical applications[J]. Tissue eng, 1995,1(2):151-161.
- [3] Kim YJ, Park SJ, Shin B, et al. Osteogenesis for postoperative temporal bone defects using human ear adipose-derived stromal cells and tissue engineering: an animal model study[J]. J Biomed Mater Res A, 2017,105(12):3493-3501.
- [4] Bos EJ, van der Laan K, Helder MN, et al. Noninvasive measurement of ear cartilage elasticity on the cellular level: a new method to provide biomechanical information for tissue engineering[J]. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2017,5(2):e1147.

表 1 用细胞生长因子缓释技术的再生诱导临床研究

疾病、手术名称	生长因子	效果
心脏移植手术	bFGF	促进血管新生
ASO, Burrger 症	bFGF	促进血管新生
糖尿病皮肤溃疡	bFGF	促进血管新生,促进皮肤新生
牙周组织炎	bFGF	促进牙槽骨再生
感觉性失聪	IGF-1	抑制神经变性
半月板损伤	PRP	促进软骨再生
面部重建	bFGF	促进软骨再生,促进组织再生
术后正中切口修复重建	bFGF	促进胸骨再生,促进血管新生
软组织重建	bFGF	促进脂肪组织再生
面神经麻痹	bFGF	促进神经功能恢复
断指修复重建	bFGF	促进血管新生,促进组织再生



- [5] Mellott AJ, Shinogle HE, Nelson-Brantley JG, et al. Exploiting decellularized cochleae as scaffolds for inner ear tissue engineering[J]. Stem Cell Res Ther, 2017,8(1):41.
- [6] Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and Its contents[J]. Clin Plast Surg, 2017,44(3): 635-650.
- [7] Hung SH, Su CH, Lin SE, et al. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization[J]. Laryngoscope, 2016,126(11):2520-2527.
- [8] Hoogenkamp HR, Pot MW, Hafmans TG, et al. Scaffolds for whole organ tissue engineering: Construction and in vitro evaluation of a seamless, spherical and hollow collagen bladder construct with appendices[J]. Acta Biomater, 2016,43:112-121.
- [9] Yang J, Yamato M, Kohno C, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds[J]. Biomaterials. 2005,26(33): 6415-6422.
- [10] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium[J]. N Eng J Med, 2004,351(2):1187-1196.
- [11] Ohki T, Yamato M, Murakami D, et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model[J]. Gut, 2006,55(12):1704-1710.
- [12] Ohki T, Yamato M, Ota M, et al. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered sheets [J]. Gastroenterology, 2012,143(3):582-588.
- [13] Gupta GJ, Karki K, Jain P, et al. Autologous bone marrow aspirate therapy for skin tissue engineering and tissue regeneration[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2017,6(4):135-142.
- [14] Yousefi I, Pakravan M, Rahimi H, et al. An investigation of electrospun Henna leaves extract-loaded chitosan based nanofibrous mats for skin tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017,75:433-444.
- [15] Keskin Z, Sendemir Urkmez A, Hames E. Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017,75:1144-1153.
- [16] Eke G, Mangir N, Hasirci N, et al. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering[J]. Biomaterials, 2017,129:188-198.
- [17] Takagi R, Yamato M, Murakami D, et al. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011,5(4):e63-73.
- [18] Tanigo T, Takaoka R, Tabata Y, et al. Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogen augments bone regeneration[J]. J Control Release, 2010,143:201-206.
- [19] Saito T, Tabata Y. Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy[J]. Acta Biomater, 2012,8(2):646-652.
- [20] Shimizu T. Tissue & organ engineering for regenerative therapy[J]. Arerugi, 2017,66(1):32-35.
- [21] Rothrauff BB, Pauyo T, Debski RE, et al. The rotator cuff organ: integrating developmental biology, tissue engineering, and surgical considerations to treat chronic massive rotator cuff tears[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2017,23(4):318-335.
- [22] Wang X, Ao Q, Tian X, et al. Correction: 3D bioprinting technologies for hard tissue and organ engineering[J]. Materials (Basel), 2016 Nov 10,9(11). pii: E911.
- [23] Akbari M, Tamayol A, Bagherifard S, et al. Textile technologies and tissue engineering: a path toward organ weaving[J]. Adv Healthc Mater, 2016,5(7):751-766.

(收稿日期:2017-10-16)

本文引用格式:陶凯. 浅谈组织工程原理与应用[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(12):705-708.DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.001.

读者·作者·编者

## 参考文献中英文作者名的著录方法

在医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至检索核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,“名”可以有1个、2个或3个,但“姓”只有1个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名。“姓”是不可以简写的;“名”可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为“姓-名-名”,可照录。