

人体组织工程学概论

Renti Zuzhi
Gongchengxue
Gailun

关广聚 姜笃银 主编

山东大学出版社

人体组织工程学概论

主 编 关广聚 姜笃银
副主编 孙大庆 赵冬梅 王吉昌

山东大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

人体组织工程学概论/关广聚,姜笃银主编. — 济南:
山东大学出版社, 2012. 1

ISBN 978-7-5607-4544-2

I. ①人…

II. ①关… ②姜…

III. ①人体组织学—生物工程:医学工程—概论

IV. ①R318.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 002702 号

山东大学出版社出版发行

(山东省济南市山大南路 20 号 邮政编码:250100)

山东省新华书店经销

山东鸿杰印务集团有限公司印刷

787×1092 毫米 1/32 10.25 印张 257 千字

2012 年 1 月第 1 版 2012 年 1 月第 1 次印刷

定价: 39.00 元

版权所有,盗印必究

凡购本书,如有缺页、倒页、脱页,由本社营销部负责调换

《人体组织工程学概论》编委会

主 编 关广聚 姜笃银

副主编 孙大庆 赵冬梅 王吉昌

参编人员 (以姓氏笔画为序)

王 峰 王海斌 刘 景 刘向春

刘海英 吕莎莎 孙伟伟 李 川

李庆波 张 辉 张基勋 杨加峰

聂蕙斌 程 静 蓝鸿雁 霍延青

前 言

组织损伤、缺损后会导致机体功能障碍。传统的修复方法是以牺牲自体健康组织为代价,会导致很多并发症及附加损伤;异体移植的器官来源极为有限,因免疫排斥反应需长期使用免疫抑制剂,由此带来的并发症有时是致命的。美国国家科学基金委员会于1987年正式提出和确定的“组织工程学”,为众多的组织缺损、器官功能衰竭病人的治疗带来了曙光。组织工程学是综合应用工程学和生命科学的基本原理、基本理论、基本技术和基本方法,在体外预先构建一个有生物活性的种植体,然后植入体内,修复组织缺损,替代组织、器官的一部分或全部功能,或作为一种体外装置,暂时替代器官部分功能,达到提高生活、生存质量,延长生命活动的目的。

经过科研工作者20余年的不懈努力,组织工程技术已被证实是解决组织、器官缺损修复与功能重建的最佳手段,避免了传统组织移植修复的继发创伤与供体来源不足等一系列缺陷。近年来不断有成功应用组织工程技术修复临床缺损的报道,证实了其可行性,也展示了其在未来医学中的巨大应用价值与产业化前景。同时不能否认的是,理想的组织工程学组织、器官的构建仍存在一系列瓶颈问题,遇到较多困难需要解决。瑕不掩瑜,这就需要我们继续深入研究,迎难而上,解决问题,实现组织器官的自由更换。

人体组织工程学概论

组织工程学的研究涉及基础生命科学、临床医学材料学、力学、工程学等多个学科。因此,我们编写《人体组织工程学概论》一书,旨在为各学科专业人员提供一个能系统了解组织工程学的平台,使他们更好地学习理解组织工程学的基本概念、研究内容和研究技术,为他们进一步参与人体组织工程学的深入研究提供帮助和参考。

由于编者水平有限,书中错误在所难免,敬请赐正,以备修订。

编 者

2011年9月

目 录

第 1 章 组织工程学研究进展	(1)
1.1 组织工程学的建立与发展	(1)
1.2 组织工程学基本原理及研究方向	(4)
参考文献	(10)
第 2 章 组织工程常用的支架材料	(14)
2.1 组织工程材料的分类.....	(14)
2.2 组织工程中常用的几种生物材料.....	(15)
2.3 材料的表面修饰.....	(33)
2.4 组织工程支架.....	(37)
2.5 组织工程支架的理化性能与生物相容性评价.....	(43)
参考文献	(47)
第 3 章 组织工程常用的种子细胞	(49)
3.1 胚胎干细胞.....	(49)
3.2 成体干细胞.....	(55)
3.3 真皮成纤维细胞.....	(58)
3.4 表皮角质形成细胞.....	(66)

3.5	血管内皮细胞	(68)
3.6	成骨细胞和软骨细胞	(73)
3.7	神经元细胞和施万细胞	(79)
3.8	肌腱细胞与肌肉细胞	(87)
	参考文献	(89)
第4章	肾脏组织工程学	(97)
4.1	肾脏解剖与生理	(97)
4.2	肾脏组织工程学研究进展	(102)
4.3	组织工程学在肾脏病中的具体应用	(112)
	参考文献	(124)
第5章	细胞与生物材料的复合	(126)
5.1	常规种子细胞与支架材料的接种复合技术	(127)
5.2	微重力细胞培养与旋转培养系统	(131)
5.3	可变应力场细胞培养	(140)
5.4	影响细胞与支架材料复合的因素	(145)
5.5	多种细胞与生物材料的复合	(152)
5.6	细胞与生物材料复合的检测	(156)
	参考文献	(161)
第6章	皮肤组织工程	(165)
6.1	皮肤的组织结构	(165)
6.2	皮肤再生和瘢痕形成的机理	(171)
6.3	皮肤组织工程的种子细胞	(172)
6.4	皮肤组织工程的支架材料	(174)
6.5	组织工程皮肤的制备	(176)
6.6	皮肤替代物发展过程中的关键事件	(177)

6.7 皮肤组织工程的体内和体外应用	(180)
6.8 组织工程化人工皮肤存在的问题与展望	(181)
参考文献	(182)
第7章 组织工程化骨和软骨组织的构建	(186)
7.1 组织工程骨	(186)
7.2 组织工程软骨	(196)
参考文献	(206)
第8章 组织工程化肌肉和肌腱组织的构建	(212)
8.1 组织工程肌肉的构建	(213)
8.2 组织工程肌腱的构建	(216)
参考文献	(220)
第9章 组织工程化周围神经组织的构建	(222)
9.1 研究概况	(222)
9.2 问题与展望	(230)
参考文献	(231)
第10章 组织工程化血管组织构建	(234)
10.1 研究概况	(235)
10.2 问题与展望	(245)
参考文献	(246)
第11章 组织工程喉的构建	(250)
11.1 喉的生理功能及重要性	(250)
11.2 喉对组织工程学的要求	(251)
参考文献	(254)

第 12 章 组织工程角膜的构建	(256)
12.1 组织工程技术体外构建角膜上皮组织	(256)
12.2 组织工程技术体内构建角膜基质组织	(259)
12.3 角膜内皮组织体外构建	(260)
参考文献	(261)
第 13 章 组织工程产品的临床应用	(262)
13.1 组织工程皮肤	(262)
13.2 组织工程软骨	(276)
13.3 组织工程骨组织	(278)
13.4 组织工程角膜	(281)
13.5 组织工程肌腱	(282)
13.6 组织工程血管	(283)
13.7 组织工程黏膜	(284)
13.8 其他组织工程器官	(284)
13.9 展望	(285)
参考文献	(285)
第 14 章 常用细胞培养方法和检测技术	(292)
14.1 细胞培养方法	(292)
14.2 培养方法	(302)
14.3 培养细胞的观察	(307)
14.4 组织工程实验动物技术	(314)
参考文献	(319)

第 1 章 组织工程学研究进展

组织、器官的丧失或功能障碍是人类健康所面临的主要危害之一,也是人类疾病和死亡的最直接原因。现代医学主要通过组织移植与生物材料替代等治疗手段,恢复组织结构完整性,重建组织功能。但自体组织移植存在着牺牲自体正常组织、造成机体新的创伤等缺点,是一种以创伤治疗创伤的传统治疗模式。同种异体组织或器官移植,组织或器官来源有限,病人需长期甚至终身应用免疫抑制剂。异种组织或器官移植虽然解决了器官来源问题,但病人仍需终身应用免疫抑制剂,而且存在物种之间致病原传播的风险。生物材料组织替代品虽可在结构上替代损伤组织的完整性,但这种结构性替代是以完全或大部分牺牲被替代组织功能为代价,而且存在继发感染、异物反应、植入后因材料老化而引起断裂与移位等诸多问题。组织工程学成为这一难题的最终解决之道。

1.1 组织工程学的建立与发展

美国麻省理工学院化学工程师 Robert Langer 与波士顿麻省大学医院的 Joseph P. Vacanti 在 20 世纪 80 年代中期提出了一个新的概念,即在一种可生物降解的支架材料上种植人体活细胞,

使其在生长因子作用下再生成为组织,后来经实验证明是可行的。“组织工程”一词首先由 Wolter 于 1984 年提出,用来描述植入体内的 PMMA 骨替代材料表面形成的内皮样结构。将软骨细胞种植于可降解生物材料聚羟基乙醇形成软骨组织、将肝细胞接种于中空纤维以替代部分肝组织的研究,被认为是组织工程研究的最初尝试。“组织工程”这一名称由美国国家科学基金会于 1987 年正式确定,组织工程学也首次以一门新学科的形式得到权威性的确立。在美国国家科学基金会资助下建立了一系列研究室,正式开展了组织工程学研究。随后,日本、加拿大、澳大利亚、欧洲等国家和地区也先后开展了组织工程学研究。

组织工程修复过程本质上是医学治疗原则在细胞水平的体现,以实现机体健康组织的永久性替代。与传统组织移植或生物材料替代相比,组织工程的优点在于:①通过构建结构完整、功能完全、具有生命力的健康活体组织,对病损组织进行形态、结构和功能的全面重建。②所形成的组织在体内与机体正常组织整合良好,可对体内各种生物学刺激产生应答,并实现永久性替代。③以最少量的组织细胞(甚至可用组织穿刺的方法获得)经体外培养扩增后,修复体积较大的组织缺损,达到无损伤修复创伤和真正意义上的功能重建。④可根据组织器官缺损情况,构建相应形态与结构的组织,达到完美的形态修复。各种结构相对简单的组织构建及缺损修复研究均已在高等哺乳动物体内获得成功,部分成果已开始临床应用,这为本世纪组织工程的进一步发展与应用带来了良好的机遇。

应用组织工程技术构建组织工程化组织至今主要经历了三个发展阶段,代表了组织工程阶段性的发展历程。在 20 世纪 80 年代末至 20 世纪 90 年代中期的第一阶段,主要进行了组织工程化组织构建的初步探索,证明了应用组织工程技术形成具有一定结构与形态的组织。至 20 世纪 90 年代中期,主要在免疫功能缺陷

的裸鼠体内构建组织工程化组织,在此阶段成功构建了骨、软骨、肌腱等组织。其中,在裸鼠体内构建具有皮肤覆盖的人耳郭形态软骨的成功,标志着组织工程技术可以形成具有复杂表面结构的软骨组织,向人们展示了组织工程研究的广阔前景。但是,在裸鼠体内的组织工程学研究,不能全面反映机体与细胞、生物材料及组织工程化组织之间的相互作用,因此,组织工程的研究成果向临床应用过渡,必须先实现在具有完全免疫功能的哺乳动物体内构建组织工程化组织,修复组织缺损,重建组织功能,此即组织工程学发展的第二阶段。此阶段的大部分研究集中于20世纪90年代末期,几乎进行了所有组织器官组织工程构建的尝试,为临床应用积累了丰富的实际参数并奠定了理论基础。随着近二十年的飞速发展,目前组织工程已经进入了其发展最为重要的第三阶段,即组织工程的临床应用与初步产业化阶段,世界上许多研究机构、公司正在进行组织工程产品的研发,并有许多产品上市及临床应用。

组织器官缺损或功能障碍的高发病率,严重影响了我国人民的健康,给国民经济发展与社会稳定带来极大的负担。因此,组织工程研究对提高我国人民健康水平以及维持社会、经济的可持续发展同样具有重要意义。中国组织工程学研究起步稍晚,但在我国各级政府的高度重视与扶持、引导下,在国家“973”、“863”、国家自然科学基金等重点资助下,从无到有,逐步发展壮大,从最初的仅有个别、分散的低水平研究单位,发展到目前已经覆盖全国几乎全部的大专院校与科研院所,组织工程学已经成为一门非常重要而有活力的新兴交叉学科,受到了各相关学科研究者的高度重视,已经建立了一批在国际上具有一定知名度的国家级和省市级的组织工程研究与开发平台,提高了我国在国际组织工程研究领域的地位,增强了其参与国际竞争的实力,形成了一支多学科交叉、优势互补、年轻化、专业化的组织工程研究队伍,为国家培养了多学科的年轻学术骨干,增强了我国在组织工程研究领域的人才优势。

更为重要的是,我国组织工程在科学研究、基地建设、人才培养与产业化方面的成果,已经转化成国际组织工程领域的领先优势,从而在国际组织工程学术领域占有了重要的地位。目前我国组织工程临床应用也取得了突破,在上述关键问题研究的基础上,率先开展了组织工程骨、皮肤的临床应用研究,全面、系统地阐明了应用组织工程技术在人体内构建组织工程化组织并修复相应组织缺损问题,获得了组织工程化组织在人体内形成的最直接的组织学证据,并发现人体内形成的组织工程组织能够保持长期稳定。

组织工程概念的提出以及组织工程学的最终确立,顺应了生物医学发展多学科交融、渗透的发展潮流,吸收了生物学、现代医学、材料与工程学等多学科的最新研究成果,克服了传统医学组织器官创伤修复模式,将现代医学推向制造组织与器官的新时代。组织工程学是一门多领域交叉的学科,研究涉及生命科学、材料学、工程学、生物力学等多个领域。组织工程学的研究手段已经不再局限于初始阶段的细胞生物学和动物实验技术,分子生物学技术、基因克隆技术、转基因技术、移植免疫学技术、干细胞技术、遗传工程技术、生物材料合成与改良技术、生物材料的编织技术、生物力学技术、三维打印技术、影像学技术和生物反应器技术等均被用于组织工程的研究,极大地提升了组织工程学的研究水平和其自身的发展速度。组织工程学的进一步发展又对细胞生物学、分子生物学、材料学等众多学科提出了更高的要求,乃至成为带动相关学科甚至生命科学整体发展的主要动力之一。

1.2 组织工程学基本原理及研究方向

组织工程学是应用生命科学和工程学的原理与方法,研究、开发用于修复、增进或改善人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的一门学科。它能以少量种子细胞经体外扩增后与生物材料结

合,修复较大的组织或器官缺损,重建生理功能,是符合创伤修复原则的生理性修复技术(图 1-1)。

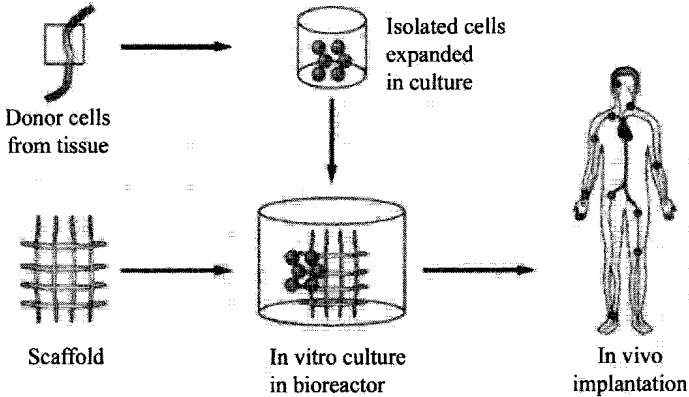


图 1-1 组织工程模式图

引自 <http://archive.student.bmj.com/issues/08/05/education/210.php>

组织工程的提出、建立和发展,改变了传统“以创伤修复创伤”的治疗模式,为最终实现无损伤修复创伤和真正意义上的结构、形态与功能重建开辟了新途径。组织工程的核心是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体。因此,组织工程研究的方向主要集中于三个方面:种子细胞研究,组织工程用生物材料和组织工程化组织构建及构建环境优化。

1.2.1 种子细胞研究

应用组织工程的方法再造组织与器官所用的各类细胞统称为种子细胞。种子细胞的培养是组织工程的基本要素,种子细胞研究的目的在于获取足够数量的接种细胞,同时保持细胞增殖、合成基质等生物功能并防止细胞老化。随着组织工程研究的发展,用于某一种组织构建的细胞来源已不再局限于这种组织,种子细胞

分类也倾向于按细胞分化程度进行。组织工程种子细胞主要有三个来源：①与缺损组织细胞同源的自体细胞，如应用自体软骨、皮肤、肝细胞等修复相应组织缺损。②组织特异干细胞，主要包括骨髓基质干细胞等具有多向分化潜能的多能干细胞及皮肤、肌肉前体细胞等具有定向分化潜能的专能干细胞。此类细胞经过体外分离纯化、诱导分化与基因修饰等技术，定向分化为其他组织类型的细胞，同时保持了干细胞可大量扩增、特异性基质合成与不易老化的特征。组织干细胞的应用扩大了组织工程种子细胞来源，对种子细胞的研究将是极大的推动。③由于胚胎干细胞独特的高度未分化特性以及所具有的发育全能性，即在适当条件下可以在体外培养增殖而不改变进一步形成全身各种组织器官的能力，因而在未来的组织工程种子细胞研究中占有重要的地位。胚胎干细胞将作为组织工程的“上游”研究，为组织工程的进一步发展提供技术储备。

如何进一步拓展种子细胞来源进行组织构建，已经成为国际组织工程发展的焦点问题。成体干细胞(如骨髓基质干细胞、脂肪干细胞、神经干细胞等)在组织工程领域中的广泛研究与应用，代表了现阶段组织工程种子细胞的主要方向。胚胎干细胞是种子细胞的另一重要来源，具有体外无限增殖的能力和分化全能性，但应用胚胎干细胞尚存在伦理道德上的争议，这一问题的解决将使胚胎干细胞成为未来组织工程重要的种子细胞来源。然而，组织工程技术修复组织缺损不能仅局限于个体化治疗模式，应用诱导分化胚胎干细胞植入体内同样面临免疫排斥问题，进一步走向规模化治疗是组织工程未来的发展方向。探索同种异体干细胞或通用型种子细胞应用的可行性，将是解决组织工程种子细胞来源问题的重要途径。研究发现，骨髓间充质干细胞(BMSC)具有特殊的免疫调节功能。实验证明，同种异体 BMSC 可作为种子细胞构建组织工程化骨，并能修复异体骨缺损。解决胚胎干细胞免疫排斥

问题的途径包括通过体细胞核移植技术建立自体胚胎干细胞系,或通过孤雌生殖的方法建立通用型同源双倍体胚胎干细胞库等。核移植技术仍然是个体化的手段,无法达到通用型的要求。孤雌生殖技术是在没有精子参与的情况下卵母细胞经体外激活(物理或化学)形成孤雌胚,发育到囊胚期后分离内细胞团,建立具有同源双倍体核型的胚胎干细胞。在鼠和猴子中已成功地建立了同源双倍体胚胎干细胞系,并证明具有与正常受精胚胎获得的胚胎干细胞相似的分化全能性。

1.2.2 组织工程用生物材料

回顾组织工程的发展历史,最具革命性的思路就是将生物材料的概念引入组织工程的研究中。生物材料为种子细胞提供了适合其生长和基质合成及发挥其他功能的生物学空间。生物材料支架的应用,克服了以往单一的细胞移植中细胞不易成活、基质合成能力低下等缺点,支架降解前为三维组织形成提供了临时的机械支撑,同时也是未来所构建的组织与器官的三维形态模板。用于组织工程种子细胞载体的生物材料以可降解材料为最佳,主要分为两类:一类是合成的生物高分子可降解材料,如聚乳酸和聚羟基乙酸等,目前的研究主要集中于材料的改性,如提高材料的生物相容性、减少材料降解后代谢产物的不良作用等方面;另一类常用的材料主要包括经过特殊工艺处理的天然材料,如具有一定孔径与孔隙率的天然珊瑚、采用脱细胞技术制造的胶原、脱钙骨等,这类材料具有较好的组织相容性,但存在着力学特性较差、性质不稳定等缺点。

生物材料的研究已经从单纯研究材料的组成、降解、相容性,发展到制备有机与无机结合、天然与合成材料结合的复合型材料。通过整合缓释的生长因子或相关基因到材料中以形成具有生物诱导活性的生物材料,使得种子细胞能够在更接近于体内环境的生