

# 组织工程研究进展

胡江 综述 陶祖莱 审校

(中国科学院力学所微重力室, 北京 100080)

**摘要** 组织工程是生物医学工程领域中一个快速发展的新方向, 本文概述了组织工程的基本原理、研究现状和发展方向, 以及相关的市场问题及关键技术的发展。

**关键词** 组织工程 生物人工器官 生物材料 培养系统

## Progress in the Field of Tissue Engineering

Hu Jiang Tao Zulai

(Lab of Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Tissue engineering is a new field in biomedical engineering. In this review, progress in the field of tissue engineering is presented in detail, including a general introduction, design and fabrication principles, key technologies, various applications, new directions, as well as related market and R&D issues.

**Key words** Tissue engineering Bioartificial organs Biomaterials Culture systems

### 1 前言

组织工程是生物医学工程领域中一个快速发展的新方向。这门交叉学科的核心是应用生物学和工程学的原理和方法来发展具有生物活性的人工替代物, 用以维持、恢复或提高人体组织的功能。这种治疗模式不同于目前生物工程中占主导地位的基于蛋白质及重组DNA技术的第二代治疗方式, 而属于新兴的第三代基于细胞的治疗方式<sup>[1]</sup>。并且对于工程组织的活细胞成分, 还可以进行适当的遗传操作, 使其具有特殊的遗传性状, 从而可以结合基因治疗的优点。经过优化设计的工程组织植入体内后, 还可与受体的活组织有机地整合, 可以达到彻底的治疗目的, 是其它传统治疗方式所无法比拟的。

组织工程技术的产生源于早期细胞培养的工作。然而, 尽管在60年代便开始了对细胞进行三维培养的工作, 但直到近年来才成功地培养出真正可用于临床的组织替代物, 总的说来, 这一过程的发展依赖于工程技术解决问题的技巧。因此, “组织工程”这一名词恰如其分地表达了这一学科的内涵: 组织工程是“应用工程学和生命科学的原理和方法来解释正常的和病理的哺乳类动物组织的基本结构-功能关系, 并且发展具有生物活性的人工替代物来恢复、

维持或提高组织的功能”<sup>[2]</sup>。

组织工程技术发展的首要目的是应用于临床, 以治疗因为组织损失或器官衰竭所产生的疾病。传统的治疗方法包括器官移植、外科重建、使用机械装置和定期注入药物等, 这些方法不但昂贵而且通常并不能有效地达到治疗目的。其中, 器官移植常常受到供体数量的限制, 即使进行了成功的移植, 也往往需要附加终身的免疫抑制治疗, 从而使受体易发生其他疾病; 外科重建虽然使用的是自体组织, 没有免疫排斥的危险, 但对于大多数症状, 可供重建的自体组织来源常常是有限的或不合适的, 使得病理组织的功能不能得到很好的恢复; 与之相比, 经过优化设计的工程组织不但可以很好地满足临床的需要, 而且常常不需要长期的、昂贵的术后治疗, 从而大大地降低了医疗费用, 符合现代医疗体制对医疗费用进行控制的要求。

除临床治疗外, 工程组织还可以广泛地应用于需要哺乳类动物组织作为对象的基础研究体系。应用人工软骨培养系统, 可在体外对关节炎的发生过程进行深入的研究<sup>[3]</sup>; 应用组织三维培养系统, 可研究肿瘤浸润和病毒侵袭过程<sup>[4]</sup>; 特别是工程组织还可用来生产内源药物, 以及作为药物试验的体外模拟系统, 从而将组织工程技术与制药业直接联系在

一起。

## 2 基本原理

在组织生长发育过程中,不同的细胞是通过一定的机理聚集并分化形成有功能的整体的。而组织工程的原理便在于在对细胞进行体外培养的过程中,用工程学的方法和手段操纵这一过程<sup>[5]</sup>。

目前组织工程的基本方法主要包括:

(1) 体外设计和培养人体组织,用于移植手术以替换或修复病理组织;

(2) 制造含有活细胞成分或不含细胞成分的装置,植入体内后可诱导并促进功能组织的再生。这一方法除了要求设计、制造新型生物活性材料以提供细胞粘附和生长的基质外,还需要大规模生产、纯化生长因子以辅助生物活性材料诱导的组织再生过程。

(3) 发展含有工程组织的装置,该装置置于体内或体外,用以替代病理组织或器官的功能。通常的程序是从体内分离细胞,经扩增达到一定数量后,种植在高分子骨架上而形成特定的形态、功能结构。这一过程可结合基因治疗的方法,通过改变活性细胞成分的遗传特性,使其能表达特殊的功能蛋白从而有效地恢复病理组织或器官的功能。

从产物的角度看,除了不含活细胞成分的纯生物活性材料外,工程组织(也称为装置)基本上可分为免疫保护装置和开放装置两大类<sup>[6]</sup>。免疫保护装置的外部采用半透性膜包裹,微孔的直径不超过10 nm,只允许小分子物质通过,而截留免疫球蛋白和免疫细胞,从而避免了宿主对移植物的免疫排斥反应。该装置的优点是可以采用异体的或异种的细胞,从而大大地扩展了可供选择和操作的细胞的范围,但其缺点是不能与受体组织整合。开放装置设计的目的是植入体内后,可以与受体组织整合,最终完全取代病理组织。因此,开放装置通常具有较大的孔径,并且在孔径直径大于10 nm的条件下,可以允许受体血管组织的侵入和生长。在材料的选择上,也常常采用可降解性材料。

目前在体外构建含活细胞成分的工程组织的核心方法是首先分离自体或异体组织的细胞,经体外扩增后达到一定的细胞数量,然后将这些细胞种植在预先构建好的聚合物骨架上,这种骨架提供了细胞三维生长的支架,在适宜的生长条件下(通常通过培养系统技术对培养条件进行控制),细胞沿聚合物骨架迁移、铺展、生长和分化,最终发育形成具有特

定形态功能的工程组织<sup>[7]</sup>。

这一技术的关键是在对细胞进行体外培养过程中,通过模拟体内的组织微环境条件,使细胞得以正常生长和分化,主要包含三个关键步骤(表1):

表1 构建工程组织的三个关键步骤

	第一步	第二步	第三步
必要性	扩增细胞达足够的细胞数量	诱导分化	维持分化表型形成具有特定形态功能的组织
方法	常规培养瓶(皿)培养方法	优化设计三维骨架结构和表面性质	采用灌注培养系统提供稳定的环境条件

首先需要大规模扩增从体内分离获取的少量细胞,对于贴壁依赖性细胞,可使用常规的单层培养方法,传代培养后即可达到足够的数量;第二步是将这些细胞种植在聚合物骨架上,通过对骨架的内部结构与表面性能的优化设计,在细胞-材料及细胞-细胞的相互作用下,诱导细胞进行分化;第三步是采用灌注培养系统,维持稳定的环境条件,使工程组织维持长期的分化状态。

采用这一程序已成功地在体外培养了人工软骨、皮肤、肾上皮等多种组织<sup>[8]</sup>。

## 3 关键技术

### 3.1 生物材料技术

材料生物相容性的传统概念是指材料为“惰性”的,不会引发宿主强烈的免疫排斥反应。随着对材料-生物体相互作用机理研究的深入,这一概念已发展到材料是具有生物活性的,可诱导宿主的有利反应,比如可以诱导宿主组织的再生等。

体外构建工程组织或器官,需要应用外源的三维骨架,这种聚合物骨架的作用除了在新组织完全形成之前提供足够的机械强度外,还包括提供三维支架,使不同类型细胞可以保持正确的接触方式,以及提供特殊的生长和分化信号使细胞能表达正确的基因和进行分化,从而形成具有特定功能的新生组织,并且参与工程组织与受体组织的整合过程。

聚合物骨架在三个尺度范围可以控制组织的生长发育过程<sup>[5]</sup>: (1) 大尺度范围(mm~cm)决定工程组织总的形状和大小; (2) 骨架孔隙的形态结构和大小( $\mu\text{m}$ 级)调节细胞的迁移与生长; (3) 用于制造骨架的材料的表面化学性质(nm级)调节与其相接细胞的粘附、铺展与基因表达过程。

工程组织植入体内后,移植物的几何形状与内

部结构同样可以影响受体组织与移植物的相互作用。移植物的几何形状可以影响其周边免疫细胞的数量与免疫因子的活性,尖锐的形状易引发强烈的免疫排斥反应。移植物的内部结构中重要的特征是孔隙的性质,包括孔隙的大小、形状和连续程度。对孔隙的正确设计可以实现选择性的通透作用,从而减少免疫因子及免疫细胞的不利影响。

应用目前先进的材料制造技术,对 $\mu\text{m}$ ~ $\text{mm}$ 级水平的结构采用计算机辅助设计-计算机辅助加工技术进行设计与加工,采用正在迅速发展过程中的纳米技术对材料的纳米结构进行设计与加工。

构建骨架的材料包括合成材料与天然材料。合成材料(高分子聚合物等)可以很容易地加工成不同的形状结构,设计制造过程中能对材料的许多性能进行控制,包括机械强度、亲水性、降解速率等;与之相比,天然材料不易提取和加工,并且材料的物理性能受到限制,但天然材料具有特殊的生物活性并且通常不易引发受体的免疫排斥反应。因此实现材料的优化设计的途径之一是将化学合成的高分子材料与天然成分偶联在一起形成杂交材料<sup>[9]</sup>。其中合成材料具有高机械强度、可降解及易加工的性能,而天然成分包含细胞表面受体的特异识别位点,在调控细胞生长发育方面具有特殊生物活性,这对于构建复杂的组织具有重要作用。这一技术已应用于人工血管的内皮化过程<sup>[10]</sup>。

### 3.2 培养系统技术

体内组织的生长发育过程是在一定的内环境条件下进行的,常规的体外单层培养方法不能提供组织正常生长发育所需的环境条件,通常的后果是细胞发生分化现象,培养的细胞不仅失去了正常的形态,而且失去了其生化与功能性质<sup>[11]</sup>。比如,软骨细胞在单层培养过程中,呈现出类似成纤维细胞的形态,并且由正常条件下的分泌I型胶原转变到分泌II型胶原,这一形态与功能变化与培养条件有关<sup>[12]</sup>。因而需要通过培养系统技术对环境因子进行有效的控制。培养系统能提供以下基本性能:(1)对培养液进行有效的、均一的混合并对传质过程进行精确控制;(2)调节培养容器中的剪应力大小;(3)维持恒定的pH值、气体分压及营养物质的浓度;(4)通过过程控制以满足培养物在生长发育过程中对环境条件的不同需求。然而,不同于普通的用于大规模生产基因工程产物的反应器(容积可高达 $10^5$ 升),用于组织工程的培养系统的设计原则是通过模拟在体的内环境条件,提供工程组织生长发育所需的必要

的生化条件,以及针对不同的组织提供细胞分化所需的特殊条件(容积一般不大于0.5升)。实现这一目的除了要求提供足够大的传质速率以保证细胞的生长外,还需要根据所培养的组织类型,在反应器的设计上模拟组织生长发育的微环境状态,促进不同细胞的分化。

与单层培养相比,三维组织培养通常含有很高的细胞密度,因而需要频繁地换液以保持营养环境的稳定,因此,在培养系统设计中,通常采用灌注培养方式来维持pH值和营养物质的稳定,这种培养方式也避免了在对工程组织的长期培养过程中,由于换液操作而带来的污染风险<sup>[13]</sup>。

高密度细胞培养常常受到营养物质和氧气供应不充分的限制,为了满足培养环境中对高传质速率的需要,对培养槽需要进行特殊的设计。早期的工作曾应用机械搅拌等方式,对贴附在微载体上的细胞进行悬浮培养来维持足够的传质效率。虽然通过对搅拌桨形状的正确设计,添加保护剂等措施可以降低由搅拌引起的强剪应力对细胞造成的损伤,因而可用于生物制药的目的。然而这种混合方式除了产生了强剪应力外,还造成营养物质与pH值的梯度,这种生化环境条件对组织的生长发育产生不利的影响,因而不适用于工程组织的培养。

如何有效地控制反应器中的传质过程是组织工程用培养系统的技术难点。利用二次流是解决问题的一个途径,通过增加内部流体的循环,传质速率大大提高。而由美国宇航局设计的旋转细胞培养仪,具有不同的混合方式<sup>[14]</sup>。通过外部的旋转方式,在低剪应力的条件下,旋转所产生的流动可以实现对培养成分充分的混合,并使一定大小之内的培养物以悬浮状态存在。在这种培养条件下,人肺腺癌细胞可与微载体形成 $0.2\sim 0.5\text{cm}$ 的聚集体并具有显著的分化特性<sup>[15]</sup>。这一技术已应用于人工软骨等多种组织的三维培养<sup>[16]</sup>。

## 4 研究现状与发展方向

从应用角度说,组织工程属于医疗器械行业。由于临床治疗的需要,应用于输血、烧伤、糖尿病、心血管等方面的组织工程技术得以优先发展,目前已有多种产品进入市场或处于临床实验阶段。而在其它组织及器官的基础与应用研究中,也取得了重要的进展。下面就几个重要的领域来说明组织工程的发展。

### 4.1 人工皮肤

人工皮肤是发展较快的一个领域。体外制造人工皮肤已不再是一个技术难题,目前已有数种产品应用于临床治疗。

伤口的形式总的来说,可分为两个大的类型:急性损伤和慢性溃疡。急性损伤中最主要的是烧伤,特别是二度以上的烧伤,需要进行皮肤移植。而慢性溃疡是较难治愈的症状,应用组织工程皮肤技术有很好的疗效<sup>[17]</sup>。与传统的治疗方法相比,使用人工皮肤的优点包括:在对烧伤的治疗中可减少供体组织的需求;减少伤口结疤和收缩现象;对大面积急性伤口可实现快速覆盖;可作为传递外界生长因子的载体等。

人工皮肤基本上可分为三个大的类型:表皮替代物、真皮替代物和全皮替代物。表皮替代物由生长在可降解基质或聚合物膜片上的表皮细胞组成。真皮替代物是含有活细菌或不含细胞成分的基质结构,用来诱导成纤维细胞的迁移、增殖和分泌细胞外基质。而全皮替代物包含以上两种成分,既有表皮结构又有真皮结构。

人工皮肤中对基质材料的要求包括可支持细胞生长、提供粘附基质、促进细胞增殖和分泌细胞外基质以及可被受体的伤口位点吸收等特性。多种材料已用于实验模型,包括胶原、纤粘蛋白、基膜蛋白、透明质酸、聚乳酸和聚羟基乙酸等。而对其中的活细胞成分,可分为自体细胞、异体细胞和异种细胞。使用自体细胞的优点是不易引发免疫排斥反应,但需要较长的培养周期,因而不适用于对急性伤口的治疗。使用异体细胞有免疫排斥和疾病传播的危险,但可以实现即取即用,并且由于源于新生组织的成纤维细胞具有很低的免疫原性,使这一技术在人工皮肤的生产中得到了快速发展。相对来说,异种细胞在人工皮肤技术中应用较少。

虽然对烧伤的治疗是人工皮肤技术中最早发展起来的领域,但是相对较小的烧伤市场并不足以支持这些先进技术的深入发展。大多数组织工程公司将目前的R&D定位在对长期溃疡治疗的产品开发方面,而且随着全球人口老龄化的加重,这一市场也在不断扩大。总的来说,目前主要研究方向是针对不同的临床症状,特别是针对不同病因引起的慢性溃疡,开发对其最适宜的产品。

#### 4.2 神经系统组织工程

神经系统组织工程主要集中在对神经活性物质缺乏症状的细胞治疗和神经损伤的促再生方面。多种神经系统失调疾病与神经活性分子缺乏有关,这

些神经活性分子包括神经递质、神经营养因子、相关的酶等。不同于传统的药物传递系统,组织工程技术采用含有活细胞成分的免疫保护装置,植入体内后可以提供长期有效的治疗。装置的主要成分包括高分子免疫屏障、分泌所需神经活性分子的细胞和用于固定化细胞的基质成分等,对这些成分的优化可以达到更好的治疗目的<sup>[18]</sup>。对于周围神经系统的神经再生,目前采用神经导管的方法来诱导和支持神经纤维的延长。通过对导管的材料性质优化设计、导管内基质成分的选择和导管腔中间质细胞的操作,可以促进受损伤的神经的重建。虽然目前神经再生的工作主要集中在周围神经系统方面,但是由于中枢神经系统中,内源成分对损伤神经的恢复作用很小,这种迫切的需求将推动未来中枢神经系统组织工程的发展<sup>[19]</sup>。

#### 4.3 生物人工器官

生物人工器官的概念起源于人工器官技术的发展,传统的基于生物相容性材料的机械装置不能很好地完全替代衰竭器官的功能,特别是代谢和内分泌器官,而在可以利用转基因动物技术大量获取完全来源于生物体的异种移植体之前,目前比较好的方法是用生物相容性材料和活细胞成分构建具有一定结构和功能的生物人工器官<sup>[20]</sup>。

对于急性肾衰竭的治疗,通常采用肾透析的方法,然而用于透析的半透膜并不能恢复肾脏的复杂代谢功能。而通过组织工程技术将分离扩增的肾上皮细胞培养在生物相容性膜结构上,所形成的装置比较接近天然肾小管的功能<sup>[21]</sup>。对于急性肝衰竭,目前的支持系统无法完成除了移去毒性代谢物以外的其它许多复杂的肝代谢功能,应用生长在高分子骨架上的活的肝细胞所制造的肝反应器有望解决这一问题<sup>[22]</sup>。

由于器官具有非常复杂的结构,相比简单的组织,体外构建完整的组织工程器官仍有许多技术上的困难。生物人工器官将首无作为体外支持系统使用,随着技术的进步,最终有望在体外构建出可供器官移植的完全生物来源的组织工程器官。

#### 5 结束语

组织工程技术深入的发展,一方面受到临床治疗需要的推动,另一方面依赖于关键技术的解决。在美国,每年用于治疗组织损伤和器官衰竭带来的疾病的费用便超过8000亿美元,而全球人口老龄化带来的老年病增多使问题更加严重<sup>[23]</sup>。虽然目前组织

工程技术的研究和开发费用十分昂贵,但是由于组织工程技术不但可以获得更好的医疗质量,而且通过优化设计,减少由于治疗不佳所产生的额外费用,与目前传统的治疗方法相比,反而可能在整体上降低整个治疗过程的总费用。因而,组织工程技术在未来十年中,将会象今日的基因工程技术一样,得到非常迅速的发展。另一方面,早期对生物材料和三维组织培养技术的基础研究,才使体外构建工程组织成为可能。而目前针对不同的临床治疗方式,开发与之相适应的人工器官、组织,对这些关键技术提出了更新的要求,特别是生物材料骨架技术与三维培养系统技术。

### 参 考 文 献

- McIntire LV. 1992 ALZA distinguished lecture: bioengineering and vascular biology. *Annals Biomed Eng*, 1994; 22(1) :2
- Skala R, Fox C F, Fung B. Preface. In *Tissue Engineering* New York: Alan R Liss Inc, 1988 :1
- Schultz O, Keyszer G, Zacher J *et al*. Development of in vitro model systems for destructive joint disease: novel strategies to establish inflammatory pannus. *Arthritis Rheum*, 1997; 40(8) :1420
- Ingram M, Techy GB, Saroufeem R *et al*. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997; 33(6) :459
- Saltzman WM. Weaving cartilage at zero g: the reality of tissue engineering in space. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(25) :13380
- Mooney DL, Langer RS. Engineering biomaterials for tissue engineering: The 10-100 micro size scale. In: *The Biomedical Engineering Handbook* Boca Raton: CRC, 1995 :1690-1618
- Sittinger M, Bujia J, Rutler N *et al*. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*, 1996; 17(3) :237
- Minuth WW, Sittinger M, Kloth S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res*, 1998; 291(1) :1
- Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 1998; 16(5) :224
- Greisler HP, Gosselin C, Ren D *et al*. Biointeractive polymers and tissue engineered blood vessels. *Biomaterials*, 1996; 17(3) :329
- Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem*, 1993; 51(3) :257
- Aulthouse AI, Beck M, Griffey E *et al*. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1989; 25(7) :659
- Sittinger M, Schultz O, Keyszer G *et al*. Artificial tissues in perfusion culture. *Int J Artif Organs*, 1997; 20(1) :57
- Tsao YD, Goodwin TJ, Wolf DA *et al*. Responses of gravity level variations on the NASA/JSC bioreactor system. *Physiologist*, 1992; 35(1Suppl) :S49
- Goodwin TJ, Jessup JM, Wolf DA. Morphologic differentiation of colon carcinoma cell lines HT-29 and HT-29KM in rotating wall vessels. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1992; 28A(1) :47
- Freed LE, Hollander AP, Martin I *et al*. Chondrogenesis in a cell-polymer bioreactor system. *Exp Cell Res*, 1998; 240(1) :58
- Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M *et al*. Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials*, 1996; 17(3) :311
- Woerly S, Plant GW, Harrey AR. Neural tissue engineering: from polymer to biohybrid organs. *Biomaterials*, 1996; 17(3) :301
- Bellamkonda R, Aebischer P. Tissue engineering in the nervous system. In: *The Biomedical Engineering Handbook* Boca Raton: CRC, 1995 :1754-1773
- Martin I, Quarto R, Dozin B *et al*. Producing prefabricated tissues and organs via tissue engineering. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 1997; 16(2) :73
- Minuth WW, Aigner J, Kubat B *et al*. Improved differentiation of renal tubular epithelium in vitro: potential for tissue engineering. *Exp Nephrol*, 1997; 5(1) :10
- Bader A, Knop E, Fruhauf N *et al*. Reconstruction of liver tissue in vitro: geometry of characteristic flat bed, hollow fiber, and spouted bed bioreactors with reference to the in vivo liver. *Artif Organs*, 1995; 19(9) :941
- Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng*, 1995; 1(1) :3

(收稿: 1999-05-13)