

组织工程食管的研究进展

鲍春荣, 丁芳宝* (第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

[摘要] 很多食管疾病需要行食管替代术,用自身组织行食管替代创伤大,术后并发症多,而现有的人工食管无法满足食管替代的要求。利用组织工程技术研究人工食管是解决这些问题的希望,本文就利用组织工程技术研究人工食管的发展进行综述。

[关键词] 组织工程;人工器官;食管;食管疾病

[中图分类号] R 318.1; R 571 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0331-03

Study on tissue-engineered esophagus

BAO Chun-rong, DING Fang-bao* (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Many esophageal diseases need esophageal replacement. Replacement with autograft leads to great damage and complications. The existing artificial esophagus, however, cannot match the demands of esophageal replacement. The study of tissue-engineered esophagus is the hope to solve these problems. This article reviews the progression of tissue-engineered esophagus.

[KEY WORDS] tissue engineering; artificial organs; esophagus; esophageal disease

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 331-333]

许多先天性或后天性食管疾病都需要行食管替代术。手术治疗时食管的替代物主要分两大类:一类是用自身的其他组织或器官,另一类是人工的食管替代物。来自自身的食管替代物有胃、结肠、空肠及游离的空肠等,其缺点是手术打击大,术后并发症多,如吻合口瘘、狭窄、坏死、反流等^[1,2],并且它们都以牺牲部分消化道为代价,常常造成消化功能紊乱和营养吸收障碍,在有胃肠道疾病或做过胃、肠切除术的患者,该方法的应用也受到限制,而且在婴幼儿开展此类手术也存在一定的困难。因此,人们一直在努力寻求适宜的人工食管替代物。

1 研究历史

自 Berman 等在 1951 年率先采用特制的聚乙烯管替代食管缺损以来,至今人工食管的研究已有 50 余年的历史。但在这些研究^[2~4]中,人工食管的材料多为不可降解高分子材料如硅橡胶、Dacron、Teflon、碳纤维等,由于使用不可降解高分子材料制成的人工食管与组织的相容性差,受体血管、组织无法长入,人工食管内腔亦不能完全内皮化,往往会导致严重的并发症,如感染、吻合口瘘、吻合口狭窄等,并由于人工食管无法与受体组织完全愈合而得到生物学固定,最终不可避免发生脱落。之后有文献报道^[5,6]采用生物可降解材料和不可降解高分子材料构成复合体,通过诱导受体食管组织再生行食管重建,在动物实验中取得了较满意的结果,但该方法仍存在较多的缺陷:(1)不可降解高分子材料术后一段时间需经胃镜取出;(2)此类实验方法仅适用于食管缺损较短者,尚不能充分反映食管重建的全貌;(3)再生的食管组

织与自身食管组织结构和功能上尚有较大的差距。

近年来,应用自体组织或细胞体外培育具有生理功能的组织移植物的“组织工程”(tissue engineering)概念的提出无疑为解决这一问题带来希望,1987 年美国麻省理工学院化学工程师 Langer 与波士顿麻省大学医院医生 Vacanti 等^[7]共同提出 tissue engineering 的概念,并于 1988 年由美国国家科学基金会(NSF)的一个专门工作小组对组织工程的内涵做了如下界定:应用组织工程学和生命科学的原理和方法来解释正常和病理的哺乳动物组织器官的结构功能关系,并且发展具有生物活性的人工替代物来恢复、维持或提高组织器官的功能。其基本思路是:在体外分离、培养细胞,或对骨髓干细胞进行诱导分化,并将一定数量的细胞种植到作为细胞外基质的支架上,加以持续培养,并将之移植到体内进行缺损的修复和重建。其具体程式可简化如下^[8]:种子细胞规模扩增和可降解材料构造设计和制备→种植细胞、组织三维培养→植入体内→整合组织器官功能恢复、维持或提高。利用组织工程技术研究自体细胞化的心脏瓣膜、人工血管、人工皮肤、人工膀胱、人工骨及软骨等已成为国内外研究的热点,并已取得了很大的进展。

2 食管组织工程细胞来源

食管上皮细胞增殖较快,从 0.5 cm² 的食管黏膜样本上

[基金项目] 国家自然科学基金(30271293)。

[作者简介] 鲍春荣(1977-),男(汉族),博士生,住院医师。

* Corresponding author. E-mail: drnail@sina.com

获得的上皮细胞置于直径6 cm的培养皿中培养,仅需7 d上皮细胞就可融合并覆盖整个培养皿表面^[9],这就使得将其应用于临床成为可能。相关基础研究表明,上皮细胞间以及无细胞支架间的相互作用是维持上皮细胞生长分化的重要因素,其中整合素(integrin)起重要作用,另外表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)等多种因子也对之有影响。Sato等^[10]将人食管上皮细胞在胶原基质上培养,然后一起植入无胸腺大鼠的背阔肌内,16 d后可见有上皮细胞层长成,并且胶原基质内有新生血管形成。之后他们又将人食管上皮细胞在PGA胶原复合体上培养8~12 d,再制成管状物植入无胸腺大鼠背阔肌内,28 d后形成与正常食管相类似的管状结构,管腔通畅无狭窄,腔内上皮细胞生长良好,分层达15层,且有基底膜层生成^[11];而与之作对照的未种植上皮细胞的PGA胶原管移入大鼠体内后均逐渐塌陷,不能维持管状结构。在此基础上,Miki等^[12]又在体外细胞培养阶段加入了成纤维细胞以促进食管上皮细胞的增殖分化。结果发现,上皮细胞的分层程度与加入的成纤维细胞的密度成正比,当其密度达 8×10^5 /ml时,培育出来的管状物其上皮细胞分层达到20层,与人的正常食管相当,这样可大大提高其屏障保护能力。成纤维细胞的刺激作用可能与其分泌的角化细胞生长因子(KGF)有关。

3 食管组织工程支架材料

可适于作为组织工程支架的材料有可降解高分子基质材料和不可降解高分子材料,可降解高分子材料又有两类,即天然高分子材料(即生物支架)和合成高分子材料^[13~17]。前者的特点是细胞相容性好,亲水性强,但强度较差;后者虽具有较长的耐久性和较强的弹性,然而其固有的疏水性及其与细胞作用的低黏附性,以及体内降解产物具有一定毒性,使其应用受到限制,需进一步完善。组织工程食管天然生物支架方面的研究不多,主要是借鉴了其他器官组织工程研究的方法。Badylak等^[18]用猪小肠黏膜下组织(SIS)和膀胱黏膜下组织(UBS)两种细胞外基质(ECM)作为组织支架修补狗食管缺损。在狗食管上人为造成长5 cm约半周缺损和完全缺损,用ECM修补,术后存活4 d到15个月。30~60 d后异源性支架完全吸收并被骨骼肌和完整的食管鳞状上皮替代,骨骼肌可能来源于与之相连的周围食管。管状替换的食管45 d时表现出明显狭窄。用ECM作为支架来制成组织工程食管来修补食管缺损成为一种可能,但管状替换时狭窄仍是一个主要问题。组织工程用高分子材料支架主要应用聚羧基酸类物质,如聚乳酸(PGA)、聚乙醇酸(PLA),聚乙醇酸与聚乳酸的共聚物(PLGA)等。Mooney等^[19]为了探讨用于组织工程支架的PGA纤维网的合适条件进行了一系列实验研究。非编织的PGA纤维网有以下特征:(1)高孔隙率,允许再生组织的新生血管形成;(2)保证了营养物质的弥散;(3)易于制成各种几何形状;(4)体内易降解,安全无毒。PGA是种植细胞的良好材料,但抗压力强度不够,结构不稳

定,若用它制成稳定的三维管状结构,必须有外部支撑。为了使PGA网更加稳定,将PLA或PLGA(1:1共聚)溶于氯仿后喷洒于用PGA网制成的管子上。PLA或PLGA覆盖其上形成物理连接,连接越多其强度越大,取决于喷洒的浓度和总量。喷洒了PLA的管子比喷洒了PLGA的强度高,降解慢。喷有PLA的管子种植于大鼠体内,在血管组织生长过程中能保持其结构,形成了一个中空的管状结构。其实验结果表明用牙科喷雾器将5%PLA从距离约15 cm处向转动着的PGA纤维网制成的管子喷洒10 s,在时间和浓度上最为合适。

4 食管组织工程的方法

考虑到缺少足够的血供是限制组织再生的主要原因,Hori等^[14]在支架中加入碱性成纤维细胞生长因子(bEGF)以促进新生组织的血管形成。他们制作了两种支架:(1)以1%盐酸胶原溶液通过离心、冻干、真空热交联制成胶原海绵支架,基底部以带状PGA加强;将bEGF以25 μg/ml的浓度溶于PBS溶液中,于移植前吸收到胶原海绵上;(2)以0.5%盐酸胶原溶液与DMEM液按1:4混合,调节pH值至7.4,加入25 μg/ml bEGF溶液(PBS)倒入底层铺有PGA的模具中,37℃下15 min形成凝胶。将分别覆盖有这两种支架(含或不含bEGF)的硅酮管植入狗颈段食管,1个月后取出。在凝胶组,加入bEGF可以显著增加新生血管的数量,在明胶海绵组无显著差异。Grikscheit等^[15]构建的人工食管更加接近真正意义上的组织工程食管。其种子细胞参照组织工程小肠的方法,取新生或成年大鼠食管经过切碎、清洗、消化等步骤获得食管类器官单位(organoid unit, OU)在体外进行培养。支架采用非编织PGA纤维(纤维直径15 μm,厚度2 mm,密度60 mg/cm³,孔隙率>95%),制成1 cm长管状(外径0.5 cm,内径0.2 cm)。以5%PLA氯仿溶液进行封闭,经灭菌、清洗处理后,将含绿色荧光蛋白的水泡性口炎病毒(GFP-VSV)转染到OU中,将OU种植于其上制成组织工程食管种植于大鼠腹腔内。4周后取出已经形成3 cm×2 cm×2 cm至4 cm×3 cm×2 cm的囊状物,其组织学结构与天然食管相似。其腔内充满稀薄的黏液,内层覆盖有类似正常食管的复层鳞状上皮细胞,某些地方可以观察到腺体,平滑肌α-肌动蛋白免疫组化染色阳性,但仅间断存在,少于正常食管。之后将改组织工程食管制成片状或管状植入同源大鼠体内修补或替换部分大鼠腹段食管。2周后处死,行组织学及X线观察。大部分存活,体质量增加,无吞咽困难。补片组管腔无梗阻狭窄,完全替换组上端吻合口狭窄,吻合口以上无扩张。下端吻合口无狭窄。无溃疡及组织损伤。组织工程食管GFP阳性,正常食管阴性。

5 展望

为使组织工程取得成功和发展,有许多关键性领域需要深入研究:(1)细胞生物学方面,是什么控制着细胞的分化和

生长? 细胞或基质成分是怎样影响细胞功能的? 免疫学和分子基因学的研究将有助于细胞的设计或不受免疫系统干扰的细胞转移。(2)细胞来源方面,移植的细胞可以来自细胞系或原始的组织,从患者自己、别人或来自动物或胎儿组织。(3)冷冻保存虽已成功地被用于一些细胞,但需要加以扩大,增加细胞库中细胞种类,以适应不同组织的移植。(4)大规模的细胞培养系统需要用生物反应器,以保证在移植前体外所需细胞的增殖和解决体外培养中营养的运输问题。(5)用于组织工程的材料方面,天然材料含有信息如特殊的氨基酸排列有利于细胞附着或保存分化功能的信息,但许多天然材料每批都不一样;化学合成的聚合物,则可精确控制分子质量、降解性、亲水性和其他属性。目前的策略是将天然的和化学合成的聚合物两者的优点加以结合,即将天然聚合物的氨基酸排列植入到化学合成的聚合物上。(6)材料的加工是另一个关键问题,许多植入物是由合成的材料或高度多孔的结构制成的,制作这种能再生的植入物的方法可能是取得成功的决定性因素。加入某些组织诱导因子、生长因子和血管生成刺激因子将有助于细胞和组织的生长。(7)细胞与材料之间的界面和表面活性问题,与细胞接种后的贴附、生长、增殖和存活有密切关系。(8)组织工程学的研究领域、应用方式将有所扩大,其定义将有所修改或增补。在人工食管替代物的研究中,如何减轻瘢痕增生、预防狭窄的发生仍是关键问题。组织工程化食管在具体临床应用中的效果尚未可知,但它是今后的发展趋势。进一步的研究包括:上皮细胞与肌细胞的同时种植;新生食管的神经丛的再生;如何促进新生血管的形成,加快组织结构的重塑等。相信随着研究的深入,人工食管替代物将会有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Schettini ST, Pinus J. Gastric-tube esophagoplasty in children [J]. *Pediatr Surg Int*, 1998, 14(1-2): 144-150.
- [2] Ahmad SA, Sylvester KG, Hebra A, et al. Esophageal replacement using the colon: is it a good choice[J]? *J Pediatr Surg*, 1996, 31(8): 1026-1030.
- [3] Fukushima M, Kako N, Chiba K, et al. Seven-year follow-up study after the replacement of the esophagus with an artificial esophagus in the dog[J]. *Surgery*, 1983, 93(1 Pt 1): 70-77.
- [4] Giul'mamedov PF. Diseases and pathological states of artificial esophagus[J]. *Klin Khir*, 1998, (4): 7-9.
- [5] Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, et al. Experimental replacement of the thoracic esophagus with a bioabsorbable collagen sponge scaffold supported by a silicone stent in dogs[J]. *ASAIO J*, 1999, 45(4): 311-316.
- [6] Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, et al. Intrathoracic esophageal replacement in the dog with the use of an artificial esophagus composed of a collagen sponge with a double-layered silicone tube[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999, 118(2): 276-286.
- [7] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. *Science*, 1993, 260(5110): 920-926.
- [8] Tao ZL. Biomechanic problems in tissue engineering[J]. *J Med Biomech*, 2000, 15(2): 67.
- [9] Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, et al. Intrathoracic esophageal replacement with a collagen sponge-silicone double layer tube: evaluation of omental-pedicle wrapping and prolonged placement of an inner stent[J]. *ASAIO J*, 2000, 46(6): 734-739.
- [10] Sato M, Ando N, Ozawa S, et al. A hybrid artificial esophagus using cultured human esophageal epithelial cells [J]. *ASAIO J*, 1993, 39(3): M554-M557.
- [11] Nagashima A, Ando N, Sato M, et al. Basic studies on the application of an artificial esophagus using cultured epidermal cells[J]. *Surg Today*, 1997, 27(10): 915-923.
- [12] Miki H, Ando N, Ozawa S, et al. An artificial esophagus constructed of cultured human esophageal epithelial cells, fibroblasts, polyglycolic acid mesh, and collagen[J]. *ASAIO J*, 1999, 45(5): 502-508.
- [13] Sato M, Ando N, Ozawa S, et al. An artificial esophagus consisting of cultured human esophageal epithelial cells, polyglycolic acid mesh, and collagen[J]. *ASAIO J*, 1994, 40(3): M389-M392.
- [14] Hori Y, Nakamura T, Kimura D, et al. Effect of basic fibroblast growth factor on vascularization in esophagus tissue engineering[J]. *Int J Artif Organs*, 2003, 26(3): 241-244.
- [15] Grikscheit T, Ochoa ER, Srinivasan A, et al. Tissue-engineered esophagus: experimental substitution by onlay patch or interposition[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(2): 537-544.
- [16] 秦雄,徐志飞,史宏灿,等. 组织工程构建人工食管的初步实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23(10): 1134-1137.
- [17] 史宏灿,徐志飞,秦雄,等. 生物材料人工气管的设计与动物实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23(10): 1142-1145.
- [18] Badylak S, Meurling S, Chen M, et al. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(7): 1097-1103.
- [19] Mooney DJ, Mazzoni CL, Breuer C, et al. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 115-124.

[收稿日期] 2004-08-19

[修回日期] 2004-12-15

[本文编辑] 曹静