

同种异体气管原位移植模型的改良与观察

张运曾¹, 王成¹, 金锋¹, 陈昶², 高文³ (¹山东省胸科医院胸外科, 山东省济南市 250013; ²上海市肺科医院胸外科, 上海市 200433; ³上海市华东医院胸外科, 上海市 200040)

文章亮点:

- 1 研究发现移植段气管通气量增加能够加快气管上皮分化, 分化良好的气管上皮可以更好的抑制成纤维细胞的增殖。
- 2 实验成功建立改良小鼠原位气管移植模型, 在技术上是可行的, 克服了异位气管移植的缺陷, 保存了实验动物的气管通畅使之得以长期生存, 更好的模拟气管生理功能。此改良的小鼠原位气管移植模型为气管移植及肺移植后气道上皮再生的研究提供了一种新的选择。

关键词:

组织构建; 组织工程; 通气; 原位气管移植; 气道上皮; 再上皮化; 模型; 山东省自然科学基金

主题词:

组织工程; 肺通气; 气管; 上皮

基金资助:

山东省自然科学基金(ZR2010HM045)

摘要

背景: 气管上皮的再生能有效抑制黏膜下组织增生和管腔闭塞的发生, 有研究表明通气能够加快气管上皮的再生。

目的: 建立并改良同种异体小鼠原位气管移植模型, 进一步观察通气对供体气管的影响。

方法: C57BL/6 小鼠的气管作为供体, BALB/c 小鼠作为受体。实验分 2 组, 实验组取 2 个供体气管膜部纵行剖开, 缝合成一扩大管腔的气管原位植入受体气管; 对照组供体气管原位植入受体气管, 28 d 后获取标本进行检测。

结果与结论: 苏木精-伊红染色显示, 与对照组相比, 实验组气管管腔内上皮层可见分化良好的纤毛上皮, 亦可见少量无纤毛的单层或复层扁平上皮, 黏膜下轻度纤维组织增生和炎细胞浸润。形态学定量分析结果显示, 实验组在气管上皮中纤毛上皮的比值高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组固有层与软骨的比值, 固有膜纤维组织的面积、淋巴细胞浸润度均低于对照组 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色显示, 两组移植气管上皮均为为受体上皮表型。结果证实, 实验成功建立了改良的小鼠原位气管移植模型, 移植段气管通气量增加能够加快气管上皮分化, 分化良好的气管上皮可以更好的抑制成纤维细胞的增殖。

张运曾, 王成, 金锋, 陈昶, 高文. 同种异体气管原位移植模型的改良与观察[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(20):3205-3210.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.20.016

Improvement and observation of an orthotopic allogeneic tracheal transplantation model

Zhang Yun-zeng¹, Wang Cheng¹, Jin Feng¹, Chen Chang², Gao Wen³ (¹Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan 250013, Shandong Province, China; ²Department of Thoracic Surgery, Shang Hai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China; ³Department of Thoracic Surgery, Hua Dong Hospital, Shanghai 200040, China)

Abstract

BACKGROUND: Airway epithelial regeneration can effectively inhibit submucosal hyperplasia and the occurrence of obliteration. Studies demonstrated that ventilation could accelerate the regeneration of airway epithelium.

OBJECTIVE: To establish and improve an orthotopic tracheal transplantation model and to further observe the effects of ventilation on trachea in allogeneic mice.

METHODS: C57BL/6 mouse's tracheal served as donor, and BALB/c mouse's tracheal as recipient. This experiment contained two groups. In the experimental group, the membranous part of trachea was longitudinally dissected in two donors and sutured into an enlarged trachea, which was implanted in the recipient. In the control group, donor's trachea was implanted into the recipient *in situ*. Samples were obtained and detected at 28 days after surgery.

RESULTS AND CONCLUSION: Hematoxylin-eosin staining results demonstrated that compared with the control group, well-differentiated ciliated epithelium was visible in the epithelial lamina of tracheal lumen, accompanying a few non-ciliated single or stratified squamous epithelium, mild submucosal fibrosis and inflammatory cell infiltration. Morphological analysis revealed that ciliated epithelial proportion in the experimental group was higher than in the control group ($P < 0.05$). The ratio of lamina propria to the tracheal cartilage, submucous fibrous tissue

张运曾, 男, 1981年生, 汉族, 山东省滕州市人, 2008年苏州大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事气管移植的基础和临床研究。

通讯作者: 王成, 硕士, 主任医师, 山东省胸科医院胸外科, 山东省济南市 250013

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)20-03205-06

稿件接受: 2015-02-17

http://www.crter.org

Zhang Yun-zeng, Master, Attending physician, Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan 250013, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Cheng, Master, Chief physician, Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan 250013, Shandong Province, China

Accepted: 2015-02-17

area and the degree of lymphocyte infiltration were lower in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining demonstrated that the transplanted tracheal epithelium in both groups was recipient epithelial phenotype. Results verified that a modified orthotopic tracheal transplantation model was successfully established. The increased ventilation of the tracheal allografts can accelerate the differentiation of tracheal epithelium. The well-differentiated airway epithelium inhibited the proliferation of fibroblast.

Subject headings: Tissue Engineering; Pulmonary Ventilation; Trachea; Epithelium

Funding: the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2010HM045

Zhang YZ, Wang C, Jin F, Chen C, Gao W. Improvement and observation of an orthotopic allogeneic tracheal transplantation model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(20):3205-3210.

0 引言 Introduction

小鼠原位气管移植是研究肺移植后闭塞性细支气管炎的稳定模型^[1-2]。气管上皮是免疫损伤的靶器官^[3], 是闭塞性细支气管炎发生的始发环节^[2, 4-5], 气管上皮的再生及完整性对预防移植后闭塞性细支气管炎有最为关键的作用^[2, 6], 气管上皮的再生是现在研究的一个热点, 完整的气管上皮是保持移植后气管腔通畅的重要条件^[3]。目前已知加快气管上皮再上皮化的因素有血管内皮生长因子、降钙素基因相关肽、速激肽、P物质和免疫抑制剂等^[7]。再生的上皮通过抑制炎细胞、成纤维细胞的释放, 减轻气管急性和慢性排斥的发生, 抑制纤维组织的生成。国内外相关研究表明通气是气管上皮再生的一个重要因素^[5-8]。但通气对气管上皮再生机制的研究较少, 尚需更加精密的模型验证。

实验通过建立改良小鼠原位气管移植模型进一步探讨通气在气管移植后再上皮化中的作用, 为气管移植及肺移植后气管上皮再上皮化的研究提供一种新的模型选择。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2012年6月至2013年5月在上海市肺科医院动物实验室完成。

材料:

实验动物: 健康雄性SPF BALB/c (H-2Kd)小鼠20只、C57BL/6 (H-2Kb)小鼠30只, 共50只小鼠, 鼠龄均为8周, 体质量约为20 g, 购自中国科学院斯莱克动物有限公司。移植前、后均饲养在屏障系统中。

建立改良原位气管移植模型小鼠相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
手术显微镜(SXP-1C)	上海医疗器械股份有限公司医用光学仪器厂
显微手术器械	上海医疗器械股份有限公司手术器械厂
10-0、7-0、5-0带针锦纶缝合线购	上海医疗器械批发部
抗H-2Kd (SF1-1.1)单克隆抗体、结合有辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)的卵白素二抗(Cat#(AF6550, 946)	BD Pharmingen
Olympus BH2生物显微镜, JVC TK-1481BEC 彩色摄像机	Olympus公司

实验方法:

分组: C57BL/6小鼠30只做供体, BALB/c小鼠20只做受体, 随机分为实验组和对照组, 每组10只, 以BALB/c小鼠作为受体建立改良原位气管移植模型。

原位气管移植小鼠模型的建立: 参照Chen等^[8-12]的标准建立改良小鼠原位气管移植模型共20只。

供体气管的获取: C57BL/6小鼠麻醉前皮下注射阿托品0.05 mg/kg。20 min后腹腔注射地西洋(5 mg/kg)和氯胺酮(100 mg/kg)。麻醉成功后, 取颈部正中切口, 钝性分开颈前带肌、剪断。暴露颈部气管, 分离气管周围组织, 游离颈部气管全段, 取第2-8软骨环7个软骨环之间的气管, 放入4 ℃的生理盐水中备用。

受体气管的准备: BALB/c小鼠麻醉、固定同供鼠。钝性分开颈前带肌, 7-0锦纶线向两旁牵引颈前肌, 固定, 暴露颈部气管。于环状软骨下第4软骨环处横断受体气管, 将头侧受体气管剪除2个气管环, 以备供体气管的植入。

实验组取2个供体气管, 分别在膜部纵行剖开, 10-0锦纶线分别把2个供体气管膜部间断缝合成一扩大管腔的气管, 原位植入受体气管, 10-0锦纶线先在受体气管远心端和和供体气管远心端6点处缝和1针, 然后于4, 8点处各缝合1针, 再于2, 10点处各缝合1针, 最后缝合12点, 照前述方法缝合头侧。注意缝合间距供体气管略大于受体气管以保持吻合口的完整对齐。

对照组供体气管原位植入受体气管。取供体气管, 10-0锦纶线分别在受体气管和供体气管头侧和尾侧6, 3, 9, 12点各缝合1针, 保证对合整齐。

各组确定受鼠气道通畅, 无呼吸困难后, 剪去牵引线, 对和颈前带肌, 5-0锦纶线间断缝合颈部皮肤。建模后受鼠放于白炽灯下复温, 观察3 h, 小鼠生存良好, 无窒息及明显呼吸困难视为建模成功。整个移植过程中, 小鼠无需供应氧气。**图1**为移植模型图例。

标本采集: 建模后28 d, 麻醉处死小鼠, 取出移植体, 然后从中间横断气管, 将一半放入体积分数10%的中性甲醛溶液中固定, 行苏木精-伊红染色; 另一半放入冻存管中, 迅速放入液氮中备免疫组织化学染色。

评价指标:

形态学评价: 经甲醛溶液固定的气管切成厚4 μm的切片, 做苏木精-伊红染色。镜下观察: 气道闭塞(闭塞性细

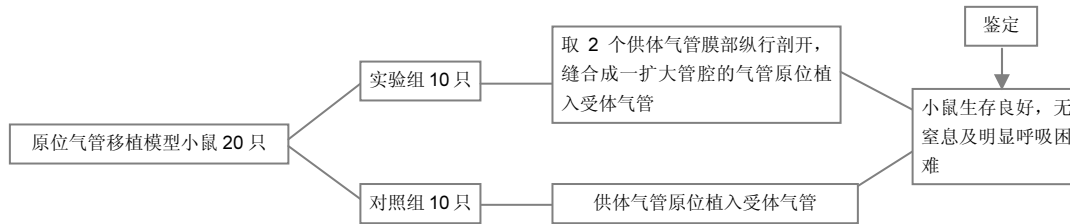


图2 造模流程图

Figure 2 Flow chart of model establishment

 表1 形态学定量分析结果 ($\bar{x}\pm s$)
 Table 1 Results of quantitative morphometry measurements

组别	实验组	对照组
<i>n</i>	10	9
上皮中纤毛上皮的比例(%)	75.1±10.8 ^a	60.9±16.5
固有层与软骨的比值	0.86±0.36 ^a	1.21±0.34
固有膜内纤维组织面积(像素)	31 454.80±6 097.49 ^a	33 735.97±4 951.50
淋巴细胞浸润度	1.50±0.52 ^a	2.00±0.67

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

支气管炎发生与否)情况; 气管上完整性及分化程度; 气管黏膜下炎细胞浸润、纤维组织增生的情况。

形态学定量分析: 将苏木精-伊红染色切片置于Olympus BH2生物显微镜下, JVC TK-1481BEC彩色摄像机获取图像, 应用MIQAS医学图像定量分析及医学图像定量分析软件对图像进行定量分析。评价纤毛上皮所占的比例及同种异体排斥反应引起的黏膜水肿、细胞浸润情况和纤维增生情况^[6-8], 观察指标包括: 气管上皮中纤毛上皮的比例、固有层与软骨的比值(the ratio of the lamina propria to the tracheal cartilage, LCR)、黏膜下层纤维组织的面积、淋巴细胞的浸润度(0级: 没有炎症; 1级: 轻度炎症; 2级: 中度炎症; 3级: 严重炎症)。

免疫组织化学鉴定移植气管上皮的表型: 冻存管中取出的气管放入冰冻组织固定胶中固定, -20℃下切成4 μm厚的切片, 放在防托玻片上, 冰丙酮固定2 min, 室温下干燥1 h, PBS冲洗3次。放于体积分数0.03%的H₂O₂中10 min阻断内源性过氧化物酶。然后PBS漂洗3次, 加入1:200一抗(抗H-2Kd单克隆抗体), 孵育2 h。PBS再漂洗3次, 加入二抗(结合HRP的卵白素), 室温孵育30 min。PBS漂洗3次后, 加入二氨基联苯5 min, 纯净水冲洗后, 复染, 脱水, 封固, 观察。正常BALB/c小鼠气管和C57BL/6小鼠气管分别做阳性和阴性对照。气管为新鲜冰冻标本, 不需要抗原修复。抗H-2Kd(SF1-1.1)单克隆抗体及结合有辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)的卵白素二抗(Cat # 550, 946)均购自BD Pharmingen。

主要观察指标: 28 d后获取标本, 苏木精-伊红染色评价气管上皮的完整性、分化程度、黏膜下炎症细胞浸润和纤维组织增生情况。形态学定量分析软件对苏木精-伊红染色切片进行定量分析。免疫组织化学染色鉴定气管上皮的

表型, 气管黏膜上皮为褐色即为阳性结果, 反之为阴性结果。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 所有的统计应用SPSS 13.0统计软件完成, 组间数据差异比较采用两样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入小鼠原位移植模型20只, 对照组1只造模后死亡, 剩余19只完成实验并进入结果分析。造模流程图见图2。

2.2 原位气管移植模型小鼠气管病理组织学表现 苏木精-伊红染色观察移植气管病理变化。实验组气管管腔通畅, 黏膜上皮完整; 气管管腔内上皮层可见分化良好的纤毛上皮, 亦可见少量无纤毛的单层或复层扁平上皮, 黏膜下轻度纤维组织增生和炎细胞浸润。对照组黏膜上皮完整, 气管管腔内上皮层可见较连续的扁平上皮和纤毛上皮, 纤毛上皮分化程度较实验组低, 黏膜下轻度炎细胞浸润和纤维组织增生, 见图3。

2.3 原位气管移植模型小鼠气管免疫组织化学染色结果以抗BALB/c小鼠H-2Kd抗原的单克隆抗体鉴定移植的C57BL/6小鼠气管上皮的种属来源。结果显示, 两组气管上皮均为H-2Kd阳性表现。对照组的BALB/c小鼠气管上皮为H-2Kd阳性, 对照组的C57BL/6小鼠气管上皮为H-2Kd阴性, 见图4。

2.4 原位气管移植模型小鼠气管形态学定量分析结果实验组在气管上皮中纤毛上皮的比例高于对照组($P < 0.05$), 实验组固有层与软骨的比值、固有膜纤维组织的面积、淋巴细胞浸润度均低于对照组($P < 0.05$), 见表1。

2.5 不良反应分析 建模后两三天内小鼠均有不同程度喘鸣, 无呼吸困难、窒息等, 4 d后明显缓解, 除1只对照组建模后3 d因痰液潴留死亡外, 其余均生存良好。每例模型从标本采集至移植完毕用时(69±13) min, 实验组用时(85±14) min, 对照组用时(48±8) min, 全组受体动物建模后生存率95%, 未见感染。

3 讨论 Discussion

小鼠原位气管移植和异位气管移植均是研究肺移植后闭塞性细支气管炎的重要模型^[9-16], 尽管两种移植都有缺血

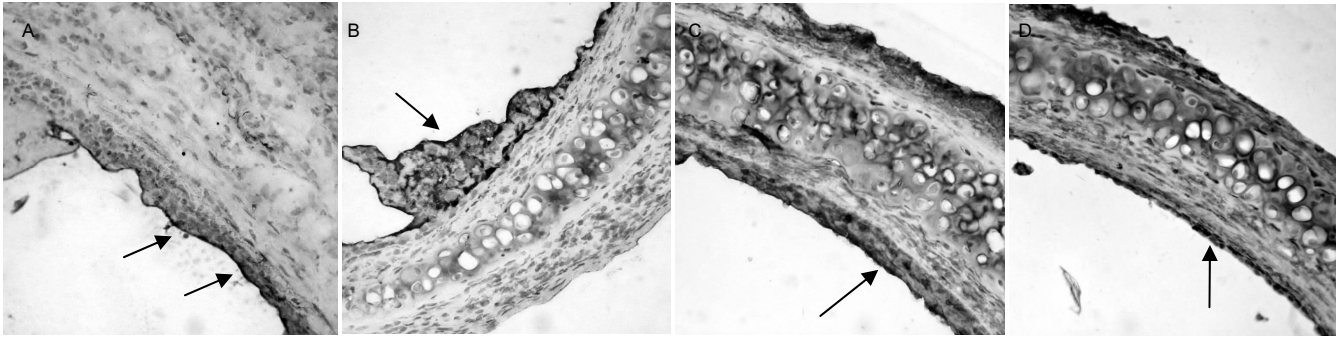


图4 原位气管移植模型小鼠气管免疫组织化学染色结果(免疫组织化学染色, ×400)

Figure 4 Immunohistochemical staining results of mouse trachea in models of orthotopic tracheal transplantation (immunohistochemical staining, ×400)

图注: 实验组(A)和对照组(B)气管上皮均为阳性表现(箭头表示), 对照组的 BALB/c 小鼠气管(C)上皮为阳性(粗箭头表示), 正常对照的 C57BL/6 小鼠气管(D)上皮为阴性(箭头表示)。

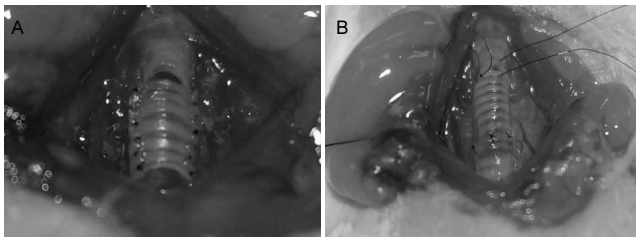


图1 原位气管移植小鼠模型的建立

Figure 1 Establishment of mouse models of orthotopic tracheal transplantation

图注: 图中 A, B 分别为为实验组和对照组。实验组取 2 个供体气管膜部纵行剖开, 缝合成一扩大管腔的气管原位植入受体气管; 对照组供体气管原位植入受体气管。

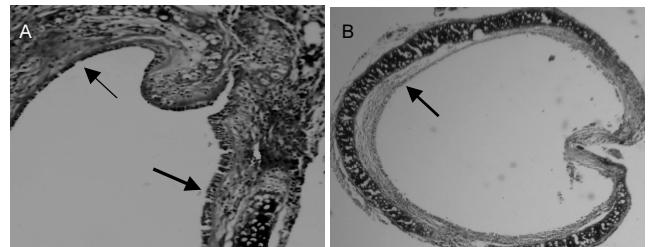


图3 原位气管移植模型小鼠气管病理组织学表现(苏木精-伊红染色, ×100)

Figure 3 Histopathological performance of mouse trachea in models of orthotopic tracheal transplantation (hematoxylin-eosin staining, ×100)

图注: 图 A 为实验组, 气管上皮连续, 上皮为扁平上皮和纤毛上皮的混合型(粗箭头所指为纤毛上皮, 细箭头所指为扁平上皮); 图 B 为对照组, 气管上皮较连续, 可见连续的扁平上皮(箭头所指)。

再灌注、感染和免疫损伤等致黏膜上皮脱落及纤维组织增生过程, 但其最大的区别是原位气管移植中供体气管作为受体气管的一部分和外界是相通的, 异位移植没有考虑到气流和临近受体气管对供体气管的影响^[4], 而原位气管移植则不受此影响, 在研究气管上皮再生过程中更有价值^[9]。

气管上皮的再生是现在研究的热点, 各种实验证明, 如果能将供体气管的上皮成功转化为受体气管上皮, 则能有效抑制黏膜下组织增生和管腔闭塞的发生^[1-2, 4, 6, 17], 完整的气管上皮是保持移植后气管管腔通畅的重要条件。再生的上皮通过抑制炎细胞、成纤维细胞的释放, 减轻气管急性和慢性排斥的发生, 抑制纤维组织的生成。有研究表明气流是影响气管上皮生长的重要条件^[5-8]。有研究分别对小鼠和人气管上皮细胞进行体外分离培养, 气-液界面的培养装置是气管上皮细胞生长的 1 个必要条件^[5-7]。Wang 等^[18]通过成人骨髓间充质干细胞与正常气管上皮细胞共同培养可以诱导骨髓间充质干细胞分化为气管假复层纤毛上皮细胞, 同样需要气液界面的共培养装置。鉴于此实验通过建造改良的原位气管移植模型, 通过扩大移植段气管管腔增加通气量进一步探讨气流在气管上皮再上皮化中的作用。

Genden 等^[9-10]于 2002 年首先建立了小鼠的原位气管移植模型。国内外研究者在此模型基础上进行了一系列有成效的研究。徐保彬^[6]等建立了气管及左主支气管原位移植的模型, 将气管、左主支气管连续气管作为供体, 左主支气管远端结扎, 原位移植到受体气管, 研究发现支气管的纤毛上皮的比例明显少于气管段, 形态学定量分析进一步提示, 支气管上皮中纤毛上皮仅占 19.3%, 而气管上皮中纤毛上皮占 49.2%。上述两段气管的最大不同在于气流的影响, 支气管远端结扎后埋在颈前带肌和气管之间, 成为受体气管上皮可以迁移但是通气不足的盲端气管, 而移植气管作为受体气管的一部分, 气流要比非结扎的左主支气管要大的多。在不考虑气流影响的情况下, 受体气管的上皮按照相同的速度向供体的气管迁移, 支气管上皮纤毛上皮的比例至少应该和供体气管相同, 因为移植段支气管要比移植气管短的多。这提示气流可能是受体上皮迁移和分化的影响因素。

实验考虑小鼠气管管腔较细, 吻合口粗糙、狭窄及管壁水肿、肥厚均可对气管的顺应性及通气量造成影响, 导致移植段气管通气量下降。为探究通气量对供体气管的影

响, 实验对原位气管移植模型进行了进一步改进, 通过扩大移植段气管管腔增加通气量, 进一步观察气管上皮的完整性、分化程度、黏膜下炎症细胞浸润和纤维组织增生情况。

实验于建模后28 d天获取标本, 结果发现实验组和对照组气管管腔均通畅, 黏膜上皮完整; 黏膜下轻度炎细胞浸润和纤维组织增生, 气管管腔内上皮层可见较连续的扁平上皮和纤毛上皮, 但实验组纤毛上皮分化程度更好。分析可能的原因, 实验组模型移植段管腔较对照组粗, 黏膜下炎细胞浸润等造成的管壁变厚, 不足以影响管腔通气量; 实验组吻合口处大管腔对受体管腔有向四周外牵作用, 也最大限度地减轻了吻合口处操作造成的不良影响。对照组1例于建模后3 d死亡, 解剖发现痰液滞留窒息所致, 分析可能和吻合口狭窄有关。

Chen等^[8]设计了原位气管通气移植模型, 使用了两段供体气管进行移植, 其中一段气管以两端打结的7号线封堵以限制气流通过, 另一段气管作为通气管, 然后原位移植到受体气管, 建立可以通气控制的原位气管移植模型, 同时不影响小鼠的呼吸。研究发现通气良好的气管上皮分化良好, 且建模28 d时大部分均被受体上皮替代, 而封堵的气管上皮分化较差, 气管上皮缺损较严重, 电镜下见通气的气管以纤毛柱状上皮为主且分布密集, 而封堵的气管仅见稀疏的扁平上皮。实验形态学定量分析结果显示实验组在纤毛上皮所占的比例较对照组高, 两者之间有显著性意义。实验组固有层与软骨的比值、固有膜纤维组织的面积(以像素表示)、淋巴细胞浸润度均低于对照组, 说明同种异体排斥反应引起的黏膜水肿、细胞浸润情况和纤维增生情况实验组较对照组低。免疫组织化学染色结果显示实验组和对照组在建模28 d取材时气管上皮为受体上皮表型。Dupuit等^[19]在研究气管上皮的分化时发现, 气管上皮再生经历上皮去分化、迁移、增殖和再分化。同种异体原位气管移植中, 上皮再生亦经历类似过程, 受体气管上皮基底细胞由气管膜部向供体气管迁移, 随后逐渐分化成纤毛柱状上皮^[8]。建模28 d时是再生上皮由扁平上皮向纤毛上皮的过渡阶段^[6]。

实验在建模28 d取材发现实验组气管上皮分化程度更好, 可以看到较连续的纤毛上皮, 且上皮表型为受体表型, 这说明管腔粗通气量大的移植段气管上皮分化程度更高、表型转换快, 分化良好的气管上皮可以更好的抑制成纤维细胞的增殖^[20-39], 进而抑制气管的纤维性闭塞。

实验成功建立并改良了同种异体小鼠原位气管移植模型, 通过扩大移植段气管管腔增加通气量进一步探讨气流在气管上皮再上皮化中的作用及对于减轻移植后炎症和纤维组织增生中的作用, 在技术上是可行的, 克服了异位气管移植的缺陷, 保存了实验动物的气管通畅使之得以长期生存, 更好的模拟气管生理功能, 为气管移植和肺移植后慢性排斥反应的研究提供了一种新的选择。但是具体通气

量的控制及何种气体在气管上皮再生中的作用尚需更精密的模型进一步深入研究。

致谢: 实验得到济宁医学院附属医院徐保彬主治医师和兰州大学第二医院王炜博士的大力支持和帮助, 在此深表感谢!

作者贡献: 第一作者和通讯作者共同设计、构思课题、动物实验, 所有作者数据分析、共同起草, 数据分析, 经通讯作者审核。第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 闭塞性细支气管炎-是肺移植建模后的常见并发症, 闭塞性细支气管炎病理特征为首先气管纤毛上皮变形、脱落, 然后细支气管及其周围多种炎性细胞浸润, 黏膜下层基质沉积, 纤维组织增生导致管腔的狭窄, 进行性不可逆发展至小气管纤维化闭塞, 导致移植肺功能丧失。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Adams BF, Brazelton T, Berry GJ, et al. The role of respiratory epithelium in a rat model of obliterative airway disease. *Transplantation*. 2000;69(4):661-665.
- [2] Cleven HA, Genden EM, Moran TM. Reepithelialized orthotopic tracheal allografts expand memory cytotoxic T lymphocytes but show no evidence of chronic rejection. *Transplantation*. 2005;79:861-868.
- [3] 王成, 金锋, 张延安, 等. 同种异体气管移植后长段气管的再血管化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(53): 10435-10438.
- [4] Fernandez FG, Jaramillo A, Chen C, et al. Airway epithelium is the primary target of allograft rejection in murine obliterative airway disease. *Am J Transplant*. 2004;4(3):319-325.
- [5] Davisdon DJ, Grab MA, Kilanowski FM, et al. Murine epithelial cells: isolation and culture. *J Cyst Fibros*. 2004; 8(3): Suppl 2:59-62.
- [6] 徐保彬, 高文, 陈昶, 等. 气道上皮再生对肺移植后闭塞性气道疾病的影响[J]. *中华器官移植杂志*, 2008, 29(5):286-289.
- [7] Widdicombe JH, Sach LA, Morrow JL, et al. Expansion of cultures of human tracheal epithelium with maintenance of differentiated structure and function. *Bio Tech*. 2005;39(2): 249-255.
- [8] Chen C, Zhang YZ, Zheng H, et al. Suppression of the obliteration process by ventilation in a mouse orthotopic tracheal transplantation model. *Transplantation*. 2009;87(12): 1762-1768.
- [9] Genden EM, Iskander AJ, Bromberg JS. Orthotopic tracheal allografts undergo reepithelialization with recipient-derived epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(1): 118-123.
- [10] Genden EM, Iskander A, Bromberg JS, et al. The kinetics and pattern of tracheal allograft re-epithelialization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(6):673-681.

- [11] 王建刚,史乾,曹浩,等.模拟肺移植后闭塞性细支气管炎小鼠模型的建立[J].同济大学学报(医学版),2012,33(1):1-4.
- [12] 张运曾,陈昶,高文,等.气流动力学影响的小鼠气管移植模型的建立[J].同济大学学报(医学版),2008,29(4):32-35.
- [13] Nemska S, Daubeuf F, Reber L, et al. MSK1 kinase in obliterative bronchiolitis after heterotopic tracheal transplantation. *Eur Resp J*. 2011;38(Suppl 55):223.
- [14] Fan K, Qiao XW, Nie J, et al. Orthotopic and heterotopic tracheal transplantation model in studying obliterative bronchiolitis. *Transpl Immunol*. 2013;28(4):170-175.
- [15] Sato M, Keshavjee S, Liu M. Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9(9):1981-1987.
- [16] Junggraithmayr W, Jang JH, Schrepfer S, et al. Small animal models of experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(6):675-684.
- [17] Hysi T, Wurtz A, Zawadzki C, et al. Immune tolerance of epithelium-denuded-cryopreserved tracheal allograft. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;45(6):180-186.
- [18] Wang GS, Bunnell BA, Painter RG, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(1):186-191.
- [19] Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J, et al. Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(1):L165-L176.
- [20] Zhu XJ, Xu R, Meng X, et al. Mechanistic insights of sulfur mustard-induced acute tracheal injury in rats. *Int J Toxicol*. 2014;33(5):382-392.
- [21] Batra H, Antony VB. The pleural mesothelium in development and disease. *Front Physiol*. 2014;5:284.
- [22] Yunus MH, Siang KC, Hashim NI, et al. The effects of human serum to the morphology, proliferation and gene expression level of the respiratory epithelium in vitro. *Tissue Cell*. 2014;46(4):233-240.
- [23] Ross KR, Darrah RJ, Hodges CA, et al. Increased expression of rhoa in epithelium and smooth muscle of obese mouse models: implications for isoprenoid control of airway smooth muscle and fibroblasts. *J Allergy (Cairo)*. 2013;2013:740973.
- [24] Vrana NE, Dupret-Bories A, Schultz P, et al. Titanium microbead-based porous implants: bead size controls cell response and host integration. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(1):79-87.
- [25] Cano E, Carmona R, Muñoz-Chápuli R. Wt1-expressing progenitors contribute to multiple tissues in the developing lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(4):L322-L332.
- [26] Hua X, Deuse T, Chen YJ, et al. The potassium channel KCa3.1 as new therapeutic target for the prevention of obliterative airway disease. *Transplantation*. 2013;95(2):285-292.
- [27] Hoh RA, Stowe TR, Turk E, et al. Transcriptional program of ciliated epithelial cells reveals new cilium and centrosome components and links to human disease. *PLoS One*. 2012;7(12):e52166.
- [28] Bailey CC, Huang IC, Kam C, et al. Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog*. 2012;8(9):e1002909.
- [29] Hartman WR, Smelter DF, Sathish V, et al. Oxygen dose responsiveness of human fetal airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(8):L711-L719.
- [30] Zhao X, Yu F, Li C, et al. The use of nasal epithelial stem/progenitor cells to produce functioning ciliated cells in vitro. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(5):345-350.
- [31] Yoshida K, Ono M, Bito H, et al. Plasmodium induced by SU6656, an Src family kinase inhibitor, is accompanied by a contractile ring defect. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(1):33-40.
- [32] Millner LM, Doll MA, Cai J, et al. NATb/NAT1*4 promotes greater arylamine N-acetyltransferase 1 mediated DNA adducts and mutations than NATa/NAT1*4 following exposure to 4-aminobiphenyl. *Mol Carcinog*. 2012;51(8):636-646.
- [33] Zhu F, Guo GH, Chen RS, et al. Observation on marrow-derived mesenchymal stem cells differentiating into functional cells in rabbit with smoke inhalation injury. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2011;27(2):150-155.
- [34] Vrana NE, Dupret A, Coraux C, et al. Hybrid titanium/biodegradable polymer implants with an hierarchical pore structure as a means to control selective cell movement. *PLoS One*. 2011;6(5):e20480.
- [35] Liu J, Shi WJ, Zhang SN. Experimental use of pulmonary flap with alloy stent for the reconstruction of trachea and esophagus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2011;91(1):65-68.
- [36] Kim TH, Kim SH, Seo JY, et al. Blockade of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med*. 2011;223(1):45-54.
- [37] Tian Y, Kongsuphol P, Hug M, et al. Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *FASEB J*. 2011;25(3):1058-1168.
- [38] Lee YC, Hung MH, Liu LY, et al. The roles of transforming growth factor- β_1 and vascular endothelial growth factor in the tracheal granulation formation. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(1):23-31.
- [39] DeFeo K, Hayes C, Chernick M, et al. Use of dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):1001-1008.