

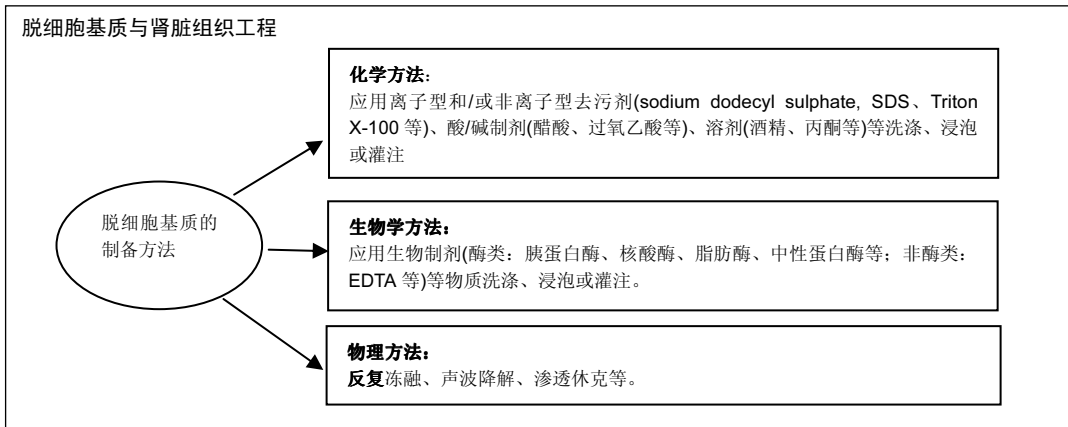
脱细胞基质与肾脏组织工程的应用前景

申江伟^{1,2}, 周六化¹, 贾瑞鹏¹, 刘军¹(¹南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)泌尿外科, 江苏省南京市 210006; ²山东省曹县人民医院泌尿外科, 山东省曹县 274400)

引用本文: 申江伟, 周六化, 贾瑞鹏, 刘军. 脱细胞基质与肾脏组织工程的应用前景[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(10):1589-1595.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.10.019 ORCID: 0000-0001-7607-0871(刘军)

文章快速阅读:



申江伟, 男, 1987年生, 山东省曹县人, 汉族, 2016年南京医科大学毕业, 硕士, 主要从事泌尿系疾病与组织工程研究。

通讯作者: 刘军, 主任医师, 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)泌尿外科, 江苏省南京市 210006

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2017)10-01589-07
稿件接受: 2016-12-01

文题释义:

脱细胞基质: 主要是采用物理和/或化学等方法去除组织/器官的细胞成分, 同时保留其组织构架、生物活性成分及生物力学特征而得到的细胞外基质成分。一方面, 由于去除了细胞成分, 使得这种材料免疫原性较低; 另一方面, 由于保留了组织器官天然细胞外基质支架的三微结构及可促进细胞黏附、迁移和增殖的生物活性因子等细胞外基质重要成分, 同时还保留了血管网络结构, 使得脱细胞基质成为一种理想的支架材料的来源。
肾脏细胞外基质: 是肾脏细胞在其生长的微环境下合成并分泌到细胞外的, 主要由葡萄糖胺聚糖、弹性蛋白、胶原蛋白(主要有 I 型胶原、IV 型胶原等)、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等交织而成的网络结构。

摘要

背景: 研究表明, 脱细胞基质材料和合适的种子细胞的有机结合可构建工程化肾脏。

目的: 综述脱细胞基质和肾脏组织工程的研究进展。

方法: 由第一作者以“脱细胞基质, 细胞外基质, 组织工程, 肾脏, 种子细胞”为中文检索词, 以“decellularized matrix, extracellular matrix, tissue engineering, kidney, seeded cells”为英文检索词, 在 CNKI、万方数据库和 PubMed 数据库检索 1999 年 1 月至 2016 年 4 月的有关肾脏组织工程的文献。

结果与结论: 脱细胞基质材料由于其去除了细胞成分, 失去了免疫原性, 同时保留了细胞外基质中重要的生物活性成分及组织器官的超微结构, 使得其在肾脏组织工程中越来越受到重视, 尤其是在最近新兴的全器官脱细胞技术的推动下, 使得其在工程化全肾脏的构建中发挥着重要作用。尽管近年来基于脱细胞基质的肾脏组织工程研究发展迅速, 并实现了一定功能的工程化肾脏的构建, 但在具有完全肾脏功能的工程化肾脏构建中仍面临着一些列的挑战性问题。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 肾脏; 组织工程; 脱细胞基质; 种子细胞; 细胞外基质; 国家自然科学基金

主题词:

肾; 细胞外基质; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(31500785)

Research progress and prospect of decellularized matrix in kidney tissue engineering

Shen Jiang-wei^{1,2}, Zhou Liu-hua¹, Jia Rui-peng¹, Liu Jun¹ (¹Department of Urology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China; ²Department of Urology, Caoxian People's Hospital, Caoxian 274400, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated that the well combination of decellularized matrix and appropriate seeded cells could construct a tissue-engineered kidney.

Shen Jiang-wei, Master, Department of Urology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China; Department of Urology, Caoxian People's Hospital, Caoxian 274400, Shandong Province, China

Corresponding author: Liu Jun, Chief physician, Department of Urology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

OBJECTIVE: To review advances in kidney tissue engineering and decellularized matrix.

METHODS: The first author retrieved CNKI, Wanfang and PubMed databases for articles addressing kidney tissue engineering published from January 1996 to April 2016. The key words were "decellularized matrix, extracellular matrix, tissue engineering, kidney, seeded cells" in English and Chinese, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The decellularized matrix loses its immunogenicity due to the removal of cellular components, while it retains the important bioactive components of the extracellular matrix and the ultrastructure of the tissues and organs, making it more and more important in kidney tissue engineering. The decellularized matrix especially exerts an important role in the tissue-engineered construction of the entire kidney as driven by recently emerging all-organ acellular cell technology. Remarkable advances in kidney tissue engineering and decellularized matrix have been made in recent years, and realized the construction of a certain functional tissue-engineered kidney. However, there are still many challenges on the way to construct a completely functional tissue-engineered kidney.

Subject headings: Kidney; Extracellular Matrix; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31500785

Cite this article: Shen JW, Zhou LH, Jia RP, Liu J. Research progress and prospect of decellularized matrix in kidney tissue engineering. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(10):1589-1595.

0 引言 Introduction

近年来,慢性肾脏病的患病率在中国甚至全世界均有上升趋势,影响着全世界8%-16%的成年人群,是一个值得关注的公共健康问题^[1-3]。慢性肾脏病以肾小球滤过率下降或不伴蛋白尿为特征,是一种慢性进展性疾病,患者的肾功能可能会出现不可逆转的恶化并最终发展为终末期肾病阶段。目前,终末期肾病的主要治疗方式是肾脏替代治疗,包括透析和肾脏移植。透析能在一定程度上延长患者的存活年限,但因仅能替代患者肾脏的滤过功能,并且属于侵入性治疗,存在一定的弊端,有研究显示依赖透析治疗的病患,生活质量下降并增加了致命性感染的机会^[4];肾移植无论在经济上还是肾功能的缓解程度上均优于透析治疗,被认为是终末期肾病最有效治疗方法,但其也面临着肾脏供体严重短缺和移植后需要长期进行免疫抑制抗排斥治疗的问题^[5]。

再生医学是通过替代、再生人类细胞、组织、器官来修复和重建病理性组织、器官的正常功能学科,它涉及组织工程学、生物学、物理学、生物化学、工程学、化学等多个学科领域^[6]。组织工程学是在1987年由美国科学基金会正式提出的新兴学科,是一门融合了生命科学、工程学和材料学的交叉学科,通过应用以上多种学科的基本原理,研制可以修复重建、维持或提高组织功能的生物替代物^[7-8]。组织工程和再生医学有望通过构建功能性、工程化肾脏来解决肾脏供体短缺的问题^[9]。支架材料是组织工程中的重要元素,通常用于组织工程的材料主要有3种,天然生物材料、人工合成高分子聚合物及细胞外基质衍生物^[7-8]。脱细胞基质材料是由组织器官脱去细胞成份得到,属于细胞外基质衍生物。一方面,由于去除了细胞成分,使得这种材料免疫原性较低;另一方面,由于保留了组织器官天然细胞外基质支架的三微结构及可促进细胞黏附、迁移和增殖的生物活性因子等细胞外基质重要

成分,同时还保留了血管网络结构,使得脱细胞基质成为一种理想的支架材料的来源。目前,有些脱细胞基质材料甚至已投入到临床应用(如小肠黏膜下层^[10]、膀胱^[11]、气管等^[12]),产生了较好的临床效果。因此,脱细胞基质材料凭借其微观结构完整、免疫原性低、组织相容性好等方面的优势也在肾脏组织工程的研究中受到关注。由于肾脏是一种实质性脏器,不仅结构复杂而且功能多样,其脱细胞基质材料的制备与中空器官常采用的脱细胞制剂浸泡/洗涤稍有不同,多采用经肾脏血管灌注脱细胞制剂的方法制备。近年来,尤其随着全器官脱细胞技术的快速发展,更是促进了肾脏组织工程的研究。也有研究者将肾脏横向切片后采用浸泡在脱细胞制剂中,联合搅拌法制备,其制备方案多样。下面就脱细胞基质与肾脏组织工程的研究现状、进展及其在研究中面临的问题作一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索1999年1月至2016年2月为止CNKI、万方数据库以及PubMed数据库,以“组织工程,肾脏,脱细胞基质,种子细胞”为中文检索词,以“tissue engineering, renal/kidney, decellularized matrix, seeded cells”为英文检索词,检索文献总计218篇,其中中文文献20篇。

1.2 入选标准 文章所述内容为基于脱细胞基质的全肾脏组织工程研究文章;同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

1.3 排除标准 内容陈旧的研究文献;与本文研究目的无关的文献。

1.4 质量评估及数据提取 计算机最初检索得到238篇文献,阅读标题和摘要进行初筛,然后查阅全文,进一步筛选与纳入标准一致的文章,要求选取的文献均为该领域近期发表或较有影响力的文献,文献思路严谨,实验科学,内容可靠,分析严谨具有说服力,最终选取51

篇文献进行综述。

2 结果 Results

2.1 脱细胞基质与肾脏组织工程研究

2.1.1 脱细胞基质及其制备方法、评价标准 脱细胞基质主要是采用物理和/或化学等方法去除组织/器官的细胞成分,同时保留其组织构架、生物活性成分及生物力学特征而得到的细胞外基质成分。肾脏细胞外基质是肾脏细胞在其生长的微环境下合成并分泌到细胞外的,主要由葡萄糖胺聚糖、弹性蛋白、胶原蛋白(主要有I型胶原、IV型胶原等)、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等交织而成的网络结构^[13-14]。嵌入在细胞外基质中的可溶性因子如生长因子、细胞因子和趋化因子等,对细胞的存活、增殖、迁移和分化等生物学行为有一定的调控作用^[15-16]。肾脏细胞外基质是一种动态变化的结构,在肾脏不同的层面其分子组成也有差别,其成分分布也具有有一定区域特异性。如层粘连蛋白和IV型胶原在肾小球和肾小管的沉积模式不同。在成人中,IV型胶原是由 α 链($\alpha 1$ - $\alpha 6$)构成的三聚体,层粘连蛋白是由3种类型的层粘连蛋白链(α , β , γ)组成的层粘连蛋白三聚体(12种)。而由 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 三聚体组成的IV型胶原和由 $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ 三聚体组成的层粘连蛋白在成人仅分布于肾小球基底膜。表明这两种特定形式的IV型胶原和层粘连蛋白在肾小球的滤过功能中发挥着重要作用。另外,IV型胶原的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 三聚体及其他类型的层粘连蛋白三聚体,存在于肾小管且不出现在肾小球基底膜上^[13]。肾脏细胞外基质在体内的转化主要受基质金属蛋白酶及其抑制剂调控,细胞外基质合成与降解之间的平衡点是维持肾脏正常功能的基础,如果细胞外基质合成与降解之间发展不平衡将会引起肾脏产生一些病理状态,如熟知的肾脏细胞外基质过度堆积会引起肾脏的纤维化^[17-18]。

目前,脱细胞基质常用的制备方法见表1,可应用其中的一种方法或结合多种方法进行组织/器官脱细胞基质的制备^[19-20]。尽管脱细胞基质的制备方案不同,但在其制备过程中一方面要尽可能完全去除其中的细胞成分,以便减轻或消除脱细胞基质材料移植入机体后可能发生宿主免疫排斥反应或者炎症反应或引发细胞毒性反应;另一方面,要尽可能保留有益于种子细胞生物学行为的细胞外基质成分及其超微结构。因此,脱细胞基质材料的检测和评估尤为重要。其检测的主要内容有:①脱细胞基质材料中细胞其成分的检测:脱细胞基质材料中细胞成分的残留是引起宿主移植排斥反应或炎症反应或细胞毒性反应的根源,因此理想的生物支架材料需要将其细胞成分(目前主要检测的是残留DNA成分)降低到一定阈值,且在这个阈值以下,较少或不引起相关不良反应。尽管,目前对残留DNA成分的安全性评价尚无完全统一的标准,但可通过定量或定性等方法

检测。如:采用苏木精-伊红染色或DAPI荧光染色可对脱细胞基质材料中的核酸成分进行初步的定性检测。此外,也可对脱细胞基质材料采用提取其中总的DNA成分进行(分光光度或荧光)定量分析。Crapo等^[19]推荐的采用DAPI荧光染色或H&E染色定性联合定量法来直观的评价其细胞去除的程度,脱细胞后的组织参考标准有:每mg干组织中dsDNA含量 < 50 ng; DNA碎片的长度应该 < 200 bp; DAPI或苏木精-伊红染色的切片看不到明显的核酸着色;②细胞外基质成分保留情况检测:尽管细胞外基质在组成成分上有一定差异,但其主要成分基本一致,如不同类型的胶原蛋白、葡萄糖氨基葡聚糖、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、弹性蛋白和一些生长因子等。这些成分的保留对种子细胞发挥其生物学行为有重要作用,因此,脱细胞基质材料必须含有这些重要组成成分。这些成分的检测可采用组织形态学、蛋白电泳、酶联免疫吸附试验等方法进行定性或定量检测^[21-22];③脉管结构及其力学性能检测:脱细胞基质材料,尤其是全器官脱细胞基质材料,能够较好的保留组织器官的脉管网络结构是这种支架材料的一大优势,这也有望解决组织工程中面临的一大难题—工程化材料的血管化问题。肾脏脱细胞后能够较好的保留其脉管系统,扫描电镜或微型CT均能较好的显示出其保留情况^[21-22]。生物力学方面特性可通过脉管支架结构压力测试进行评估^[23];④支架材料的生物相容性检测:脱细胞基质材料的最终目的是与种子细胞完美组合构建功能性工程化组织器官,实现其对体内病理性组织器官的功能性替代,这就要求脱细胞基质材料对种子细胞和机体均无毒副作用,无毒性及刺激作用,也就是说一定要具有较好的生物相容性。脱细胞基质的生物相容性可通过在其上面培养种子细胞查看种子细胞的生长情况、移植入体内查看机体内的反应情况、溶血试验、热原试验等方法来检测^[24-25]。

表1 脱细胞基质的制备方法

方法名称	制备方法
化学方法	应用离子型和非离子型去污剂(SDS、Triton X-100等)、酸碱制剂(醋酸、过氧乙酸等)、溶剂(乙醇、丙酮等)等洗涤、浸泡或灌注
生物学方法	应用生物制剂(酶类:胰蛋白酶、核酸酶、脂肪酶、中性蛋白酶等;非酶类:EDTA等)等物质洗涤、浸泡或灌注
物理方法	反复冻融、声波降解、渗透休克等

2.1.2 不同脱细胞方案的选择 尽管脱细胞的方法多种多样,其最终目的都是为了获得较为适用的肾脏脱细胞基质支架材料,但是在脱细胞基质支架材料的制备中受到很多因素的影响,如脱细胞制剂的浓度、脱细胞过程中周围环境的温度、pH值、有无联合其他脱细胞制剂/方法等。因此,为获得最优化的肾脏脱细胞基质的制备方案,研究者也进行了一系列的探索。在肾脏脱细胞基

质制备中, 离子型去污剂SDS是一种较为常用的脱细胞制剂^[21-22, 26-29]。Bonandrini等^[21]单独应用离子型去污剂SDS灌注制备大鼠全肾脏脱细胞基质, 透射和扫描电镜检查显示全肾脏脱细胞支架保留了血管、肾小球、肾小管的三维结构, 微CT扫描进一步确认了血管网络结构的完整性。苏木精-伊红染色确认了细胞成分被完全去除, 免疫组织化学染色显示脱细胞基质材料较好地保留了层粘连蛋白、纤维连接蛋白和IV型胶原成分。Sullivan等^[22]在猪肾脏脱细胞基质的制备中, 通过对比0.5%SDS、0.25%SDS和1%Triton三种脱细胞方案, 结果发现0.5%SDS在去除细胞成分方面效果最好, CT扫描显示这种方案还保留了完整的肾脏微血管网络体系结构, 组织学和定量分析显示还保留了细胞外基质中的葡萄糖氨基葡聚糖和胶原蛋白成分, 进一步研究发现, SDS制备的脱细胞基质材料对人原始肾脏细胞无毒副作用。Wang等^[26]研究发现, 与1%Triton X-100、1%过氧乙酸及1%脱氧胆酸钠相比, 1%SDS组在猪肾脏脱细胞基质的制备中使得DNA残留最少, 脱细胞效果及保留细胞外基质的成分(葡萄糖氨基葡聚糖)最好, 而其他3种脱细胞方案却不能完全去除肾脏细胞成分。同时, 经特殊染色和免疫组织化学还发现Triton X-100和1%脱氧胆酸钠组对细胞外基质的超微结构有一定破坏。尽管灌注SDS在脱细胞方面显示了很好优势, 但也有研究发现当SDS浓度超过0.04%时, 可使细胞外基质成分中的胶原结构变性并能去除细胞外基质中细胞生长需要的成分^[30-31]。

为了减少SDS的暴露时间, 一些研究者采用联合其他方法的制备方案^[25, 32]。如Poornejad等^[32]改进了脱细胞制备方案, 采用机械压力控制灌注离子型去污剂SDS, 联合渗透休克和反复冻融的方法, 将SDS的暴露时间缩短到5 h左右, 使得细胞外基质成分中的胶原和年多糖等成分的保留增加, 使得脱细胞基质材料更有利于种子细胞的生长。也有研究者对反复冻融进行研究, 发现这种方法可导致弹性纤维和胶原纤维等结构蛋白的损伤, 但这项研究中也发现反复冻融对已制备好的脱细胞基质材料无明显影响^[33]。非离子型去污剂Triton为另一种较为常用的脱细胞制剂, 在肾脏脱细胞基质的制备中常与离子型去污剂SDS或其他脱细胞制剂联合^[34-35], 如Caralt等^[34]对比了1%Triton X-100、1%Triton X-100/0.1%SDS和胰蛋白酶/0.05%EGTA/1%Triton X-100三种方案的脱细胞效果及细胞外基质成分保留的情况, 结果发现1%Triton X-100/0.1%SDS方案在保留肾脏微结构及含有生物因子碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子的基质成分方面更有优势。这项研究中还发现胰蛋白酶可以破坏肾脏微结构并使生长因子的丢失。

另外, 也有研究者对不同环境温度下脱细胞效果进行了研究, 如Nakayama等^[36]通过对比同一温度下

不同脱细胞制剂(SDS和Triton)的去细胞效果, 以及不同温度条件下同一脱细胞制剂的去细胞效果, 结果发现, 4 °C条件下SDS去细胞效果最好并能较好地保留其天然结构。有些研究为了能更好的去除核酸成分还联合应用DNA酶^[22, 28]。关于在脱细胞基质制备中最优pH值的选择, 研究者发现在pH为8时制备出的肺脱细胞基质微结构保留最好, 并且这种pH值下制备的肺免疫原性最低^[37], 然而, 肾脏脱细胞基质制备中的最优pH值尚没有文献报道。

2.2 肾脏脱细胞基质的制备

2.2.1 部分肾脏(横向切片)脱细胞基质的制备 部分肾脏(横向切片)脱细胞基质的制备主要是横向将肾脏切成若干个2.0-3.0 mm的薄层切片, 然后将其浸泡在脱细胞制剂中, 过程中联合搅拌/震荡以促进脱细胞过程的进展。如Nakayama等^[36]将恒河猴肾脏薄层切片浸泡在离子型去污剂SDS和非离子型去污剂中Trion-100中制备脱细胞基质, 过程联合震荡的方法, 通过苏木精-伊红染色确认完全去除细胞成分; 免疫组织化学检测证明保留了纤连蛋白、I型胶原、IV型胶原等细胞外基质蛋白; 生物力学检测发现脱细胞基质支架的压缩系数较新鲜肾脏下降; 经过进一步蛋白组学分析显示, 细胞外基质支架还保留了生长因子蛋白和抗微生物蛋白及应激蛋白和补体成分^[38]。他们的团队又更进一步研究发现, 这种脱细胞基质材料能够促进人胚胎干细胞向肾脏细胞的分化^[38-39], 尽管这种方法能够制备出较为适用于种子细胞生长、分化的支架材料, 但在移植入体内进行肾脏替代方面仍有一定的缺陷, 因此, 全器官脱细胞基质的制备受到了更多研究者关注。

2.2.2 全肾脏脱细胞基质的制备 自2008年Ott等^[40]首先报道大鼠全心脏的脱细胞基质后, 研究者也逐渐开始了全肾脏脱细胞基质的研究, 并进行了一系列的相关实验。许多研究者主要用体积较小的啮齿类动物来制备肾脏脱细胞基质, 研究结果也符合肾脏脱细胞基质成分的标准, 为其进行再细胞化和体内移植提供了结构基础^[25, 29, 41]。肾脏组织工程研究的最终目的是要构建功能性工程化肾脏并实现其对无功能人肾脏的替代。因此, 啮齿类动物的肾脏很难实现其向临床的转化。为解决这一问题, 一些研究者将关注点放在了体积较大动物肾脏的脱细胞基质。

猪源性肾脏脱细胞基质材料的主要优势有: 肾脏与人肾脏大小相似, 处理过程中发生感染的风险较小, 并且来源相对安全, 这一点已经被临床应用的猪源性心脏瓣膜和小肠下黏膜的脱细胞基质材料证实^[42-43]。为了验证制备猪源性肾脏支架的可行性, Bonandrini^[22, 44]团队开发了一种可有效的去除细胞成分的脱细胞技术, 结果显示脱细胞的肾脏不仅去除了细胞成分, 还保留了完整组织脉管系统的微观结构和重要的细胞外基质成分。相

似的,也有一些研究者通过不同的脱细胞方案制备猪源性肾脏脱细胞基质支架^[26, 45]。

最近也有一些研究者企图用人废弃的肾脏作为脱细胞支架的来源,所谓废弃肾脏主要指那些获取后用于移植但由于某些疾病如肾小球纤维化、肾小管萎缩、间质纤维化、炎症、皮质萎缩、血管变异等而废弃的人肾脏^[46]。Orlando团队^[44]经过既往的研究已掌握了成熟的脱细胞技术,为了制备一种可进一步向临床转化应用的脱细胞基质支架材料,他们将这种技术应用于人废弃肾脏,制备人源性肾脏脱细胞基质支架材料^[47]。经扫描电镜检查,低倍放大后的图像显示肾小球毛细血管网也保留较完整,且毛细血管壁完整且没有细胞成分;高倍放大后的扫描电镜下可见排列规律无细胞成分肾小球基底膜和复杂的入球小动脉的血管极,另外,肾小囊内侧壁亦无上皮细胞被覆;脱细胞后的细胞外基质横切面可见肾小体内肾小管、小动脉网等组成的复杂蜂巢样结构。进一步证实了人废弃肾脏的细胞成分被完全去除,同时保留了肾小球、肾小管、各级血管的三维结构。经免疫染色显示脱细胞基质材料完全去除了组织相容性复合体HLA-ABC和HLA-D,使得这种脱细胞基质材料失去了免疫原性,从而有利于其体内移植。免疫组织化学检测证实,脱细胞基质材料保留了肾小球基底膜的IV型胶原,还保留了可促进种子细胞黏附于支架结构的Laminin α 5。鸡胚绒毛尿囊膜试验证实这种脱细胞基质材料具有促进血管生成作用,此外,经过血管压力测试,这种脱细胞基质材料仍保留有一定的弹性收缩力,这将有利于后续的(种子细胞、血液等)灌注。后来Peloso等^[28]研究发现,人来源肾脏脱细胞脱细胞基质不仅能够较好地保留肾脏内部超微结构,还能保留包括如血管内皮生长因子家族、转化生长因子家族在内的40种重要的生长因子,这些生长因子与血管化、肾脏发育、再生及糖代谢等重要生物学过程有关。这些研究说明人废弃的肾脏是制备肾脏脱细胞基质支架合适的来源,将它们应用于组织工程化肾脏的构建可能会比动物源性的更具有临床适用性。尽管应用人废弃肾脏看似引人注目的方法,但将其应用与临床,仍需要考虑一些问题,如大多数这些废弃肾脏来源于患有疾病或者老年人,可能会有一些病理性改变如,可能会有血管结构的变异和/或细胞外基质成分的改变。人废弃肾脏脱细胞基质向临床转化的应用仍需要进一步的安全性及可行性评估。

2.3 组织工程化肾脏的构建 肾脏脱细胞基质材料制备的最终目的是与种子细胞一起构建功能性组织工程化肾脏,并实现对其功能的体内替代。组织工程化肾脏的构建与其他工程化组织/器官的构建相同,需要将支架材料与合适的种子细胞和/或生物因子完美的结合。近年来,许多研究者已经着手于工程化肾脏的构建,如Ross

等^[48]将种子细胞经肾动脉灌注移植于脱细胞基质材料上,结果显示有一部分干细胞可向内皮细胞分化,但遗憾的是他们未对肾小管样结构形成以及肾功能重建方面的检测; Song等^[41]为了构建功能性工程化肾脏,改进了种子细胞的种植方法,将合适的种子细胞经肾动脉和输尿管同时输注移植于脱细胞基质材料上,经过3-5 d的生物反应器内培养,经检测形成血管内皮和肾小管上皮样结构,体内外实验表明,再生的肾脏具有部分的滤过大分子物质、重吸收糖和电解质的功能,表明重建了内皮细胞、足突状细胞和肾小管上皮细胞的功能;最近, Abolbashari等^[27]将猪原始肾脏细胞种植于猪的肾脏脱细胞基质材料上,经组织学和免疫组化分析显示,再植后的种子细胞可形成能表达正常肾小管表面标志的肾小管样结构。进一步对其功能研究发现,这种工程化肾脏具有重吸收钠离子和蛋白质的功能,另外,还有水解酶活性并能够产生促红细胞生成素。说明这种工程化肾脏已基本具有了肾脏功能。但遗憾的是,他们并没有对再细胞化的肾脏进行体内移植,进一步验证这种工程化肾脏在体内能否发挥正常的肾功能。

2.4 肾脏组织工程中面临的一些挑战性问题 尽管有许多研究者在基于肾脏脱细胞基质的肾脏组织工程中进行了很多探索,也取得了很大进展,但在功能性组织工程化肾脏的构建中仍面临着一些挑战性问题。第一,如何高效优质的制备脱细胞基质材料。尽管研究者们采用多种方案均能制备出符合标准需要的脱细胞基质材料,但随着其暴露时间的延长,其中的细胞外基质成分会有一些的降解减少,进而有可能会影响到再植细胞的生物学行为。因此,在保证质量的同时,高效也变得尤为重要。如: Guan等^[29]简化了脱细胞基质的制备方案后,将SDS暴露时间缩短至4 h,获得了较为满意的结果,但这项研究总时间约为28 h。Poomejad等^[32]通过联合多种脱细胞方法来改进制备方案,将SDS暴露的时间缩短至5 h,总时间约为12 h。这也许会提供一种优化方案的思路。第二,如何实现脱细胞基质材料的完全再细胞化。脱细胞基质的完全再细胞化对其功能的发挥尤为重要。Guan等^[23]研究发现将肾脏脱细胞基质支架材料移植到体内,发现2周后支架内血液流动消失,经证实肾脏动、静脉内均形成了巨大血栓。为促进血管内皮的再细胞化,有研究者将CD31抗体包被于脱细胞基质材料上,这种方法促进了内皮细胞的停留和黏附,进而提高了脱细胞基质材料再细胞化的程度^[49]。Song等^[41]研究者为了提高再细胞化的程度,将内皮细胞经肾动脉灌注,同时将新生大鼠肾脏上皮细胞经输尿管灌注,经培养后证实有新生血管和肾小管样结构形成,移植到体内后能发挥一定的功能。也有研究者采用细针多点注射移植细胞的方法来提种子细胞的再植效果^[50],根据既往关于干细胞治疗方面的经验,认为这种方案用于脱细

胞基质材料中种子细胞的移植操作繁琐, 另外也可能对支架结构有一定的破坏, 但是在干细胞治疗方面有一定的优势^[51]。第三, 如何实现工程化肾脏在体内长时间的移植。目前关于工程化肾脏在体内替代的研究大多移植时间很短(1.0–2.0 h), 暂时没有数据证明其体内长时间替代的可行性。

构建组织工程化肾脏的最终目的是实现体内长时间的功能替代, 因此, 以后也应该加强对工程化肾脏在体内长时间替代的研究。

3 小结及展望 Conclusion and prospect

脱细胞基质材料由于其去除了细胞成分, 失去了免疫原性, 同时保留了细胞外基质中重要的生物活性成分及组织器官的超微结构, 使得其在肾脏组织工程中越来越受到重视, 尤其是在最近新兴的全器官脱细胞技术的推动下, 使得其在工程化全肾脏的构建中发挥着重要作用。肾脏组织工程作为最有希望缓解供体肾脏资源严重短缺的一种技术, 最近取得了长足发展, 并实现了一定功能的工程性肾脏的构建, 显示了广阔运用前景, 相信在不久的将来工程化肾脏一定能够走向临床应用, 但是在功能性、工程化肾脏的构建中仍面临着一些挑战性问题, 仍需要大量的实验及临床研究来进一步评估其有效性及安全性。

致谢: 感谢南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)泌尿外科老师们的悉心指导。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计综述, 分析并解析相关数据, 所有作者共同起草, 通讯作者进行审校。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2012;379(9818):815-822.
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-272.
- Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158-169.
- Lew SQ, Kaveh K. Dialysis access related infections. *ASAIO J*. 2000;46(6):S6-12.
- Ghanta M, Jim B. Renal Transplantation in Advanced Chronic Kidney Disease Patients. *Med Clin North Am*. 2016;100(3):465-476.
- 谭谦. 再生医学与组织工程[J]. 医学研究生学报, 2011,24(2):113-116.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926.
- Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999;354 Suppl 1:S132-34.
- Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, et al. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 2012;379(9819):943-529.
- Zhang F, Liao L. Tissue engineered cystoplasty augmentation for treatment of neurogenic bladder using small intestinal submucosa: an exploratory study. *J Urol*. 2014;192(2):544-550.
- Valerio IL, Campbell P, Sabino J, et al. The use of urinary bladder matrix in the treatment of trauma and combat casualty wound care. *Regen Med*. 2015;10(5):611-622.
- Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet*. 2014;383(9913):238-244.
- Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int*. 1999;56(6):2016-2024.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010; 123(Pt 24):4195-4200.
- Sebinger DD, Ofenbauer A, Gruber P, et al. ECM modulated early kidney development in embryonic organ culture. *Biomaterials*. 2013;34(28):6670-6682.
- Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):1031-1037.
- Pushpakumar S, Kundu S, Narayanan N, et al. DNA hypermethylation in hyperhomocysteinemia contributes to abnormal extracellular matrix metabolism in the kidney. *FASEB J*. 2015;29(11):4713-4725.
- Xu X, Xiao L, Xiao P, et al. A glimpse of matrix metalloproteinases in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem*. 2014;21(28):3244-3260.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243.
- Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015;84:25-34.
- Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimou E, et al. Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(9-10):1486-1498.

- [22] Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials*. 2012;33(31):7756-7764.
- [23] Guan Y, Liu S, Liu Y, et al. Porcine kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;56:451-456.
- [24] 张炜炜, 刘瑾, 陈伟. 犬肾脏脱细胞基质凝胶的制备及生物相容性实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(19):1942-5194.
- [25] 陈捷, 杨镜秋, 刘春晓. 灌注法制备全肾脏脱细胞基质支架的体内生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(16):2529-2533.
- [26] Wang Y, Bao J, Wu Q, et al. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation*. 2015;22(1):48-61.
- [27] Abolbashi M, Agcaoili SM, Lee MK, et al. Repopulation of porcine kidney scaffold using porcine primary renal cells. *Acta Biomater*. 2016;29:52-61.
- [28] Peloso A, Petrosyan A, Da Sacco S, et al. Renal Extracellular Matrix Scaffolds From Discarded Kidneys Maintain Glomerular Morphometry and Vascular Resilience and Retains Critical Growth Factors. *Transplantation*. 2015;99(9):1807-1816.
- [29] Guan Y, Liu S, Sun C, et al. The effective bioengineering method of implantation decellularized renal extracellular matrix scaffolds. *Oncotarget*. 2015;6(34):36126-36138.
- [30] Andersen KK, Oliveira CL, Larsen KL, et al. The role of decorated SDS micelles in sub-CMC protein denaturation and association. *J Mol Biol*. 2009;391(1):207-226.
- [31] Michaux C, Pouyez J, Wouters J, et al. Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS: a structural study. *BMC Struct Biol*. 2008;8:29.
- [32] Poornejad N, Momtahan N, Salehi AS, et al. Efficient decellularization of whole porcine kidneys improves reseeded cell behavior. *Biomed Mater*. 2016;11(2):025003.
- [33] Poornejad N, Frost TS, Scott DR, et al. Freezing/Thawing without Cryoprotectant Damages Native but not Decellularized Porcine Renal Tissue. *Organogenesis*. 2015;11(1):30-45.
- [34] Caralt M, Uzarski JS, Iacob S, et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(1):64-75.
- [35] Yu YL, Shao YK, Ding YQ, et al. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(25):6822-6828.
- [36] Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, et al. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(7):2207-2216.
- [37] Tsuchiya T, Balestrini JL, Mendez J, et al. Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014; 20(12):1028-1036.
- [38] Nakayama KH, Lee CC, Batchelder CA, et al. Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PloS One*. 2013;8(5):e64134.
- [39] Batchelder CA, Martinez ML, Tarantal AF. Natural Scaffolds for Renal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells for Kidney Tissue Engineering. *PloS One*. 2015; 10(12):e0143849.
- [40] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14(2):213-221.
- [41] Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med*. 2013;19(5):646-651.
- [42] Lawton JS, Moazami N, Pasque MK, et al. Early stenosis of Medtronic Mosaic porcine valves in the aortic position. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137(6):1556-1557.
- [43] Cazzell SM, Lange DL, Dickerson JE Jr, et al. The Management of Diabetic Foot Ulcers with Porcine Small Intestine Submucosa Tri-Layer Matrix: A Randomized Controlled Trial. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(12):711-718.
- [44] Orlando G, Farney AC, Iskandar SS, et al. Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Ann Surg*. 2012;256(2):363-370.
- [45] Park KM, Woo HM. Porcine bioengineered scaffolds as new frontiers in regenerative medicine. *Transplant Proc*. 2012;44(4):1146-1150.
- [46] Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 1:11-46.
- [47] Orlando G, Booth C, Wang Z, et al. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomaterials*. 2013;34(24):5915-5925.
- [48] Ross EA, Abrahamson DR, St John P, et al. Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis*. 2012;8(2):49-55.
- [49] Ko I, Abolbashi M, Huling J. Enhanced Re-endothelialization of acellular kidney scaffolds for whole organ engineering via antibody conjugation of vasculatures. *Technology*. 2014;2:243-253.
- [50] Petrosyan A, Zanusso I, Lavarreda-Pearce M, et al. Decellularized Renal Matrix and Regenerative Medicine of the Kidney: A Different Point of View. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(3):183-192.
- [51] 申江伟, 周六化, 宋群, 等. 脂肪来源的基质血管成分对大鼠保留肾单位急性肾损伤的修复作用研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(12):925-929.