

· 综述 ·

去细胞化肝脏生物支架的应用进展

温旭东 王小军 夏锋

【摘要】 肝脏替代治疗是目前终末期肝病最有效的治疗措施,而去细胞化肝脏生物支架拓宽了肝脏替代治疗的研究领域。目前普遍的支架制备过程是在一定的物理条件下,经灌注设备将化学试剂(去垢剂、消化酶等)注入肝脏自身的脉管结构中,达到去除细胞成分,保留支架内 ECM 和超微脉管结构的目的。再将种子细胞注入到去细胞化肝脏生物支架,获得再细胞化肝脏,模拟机体内肝脏生物环境进行体外或体内培养,观察种子细胞附着情况,检测肝脏代谢功能,评估肝脏替代效果。目前,种子细胞的选取、再细胞化流程、再细胞化肝脏移植等问题仍处于探索阶段。笔者围绕去细胞化肝脏生物支架的制备与评价、检测和应用作一综述,为进一步应用于实验研究和临床实践提供参考。

【关键词】 去细胞化; 肝脏; 生物支架; 制备; 应用

Updates of application of decellularized liver bioscaffold
Wen Xudong, Wang Xiaojun, Xia Feng. Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Xia Feng, Email: frankxia@gmail.com

【Abstract】 Replacement therapy is the most effective method for the treatment of end-stage liver disease, and decellularized liver bioscaffold broadens the research field of the replacement therapy. The present liver bioscaffold preparation is to perfuse chemical reagents (detergents, enzymes, *et al*) into the vascular structure of the liver under certain physical conditions, so as to remove cellular components and retain extracellular matrix and microvascular structure. Cells were reseeded into the decellularized liver scaffold to obtain the recellularized liver, which can be cultured and evaluated *in vitro* or *in vivo* by observing the adhesion of seeded cells, detecting the synthesis and secretion of the recellularized liver. Currently, the selection of seed cells, recellularization protocol and recellularized liver transplantation are still under exploration. In this review, the preparation, evaluation, detection and application of the decellularized liver bioscaffold are introduced for the further experimental study and clinical research.

【Key words】 Decellularization; Liver; Bioscaffold; Manufacture; Application

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.01.020

基金项目:国家自然科学基金(81272224)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所 中国人民解放军西南肝胆外科医院

通信作者:夏锋,Email:frankxia@gmail.com

2006 年 WHO 公布的数据表明:全世界总死亡人口中因肝脏疾病死亡的占 2.5%^[1]。中国是肝病大国,终末期肝病是肝脏疾病的最终结局。肝移植是治疗终末期肝病最有效的方法,但供肝来源不足严重制约了肝移植的发展^[2]。目前生物人工肝应用于肝脏替代治疗成为新的研究热点,全器官灌注法制备去细胞化肝脏生物支架(decellularized liver bioscaffold, DLB)由此应运而生。DLB 是对肝脏形态、结构和功能的三维重建,它作为肝脏细胞增殖和相互间作用的载体,增强了实验研究的说服力,为进一步应用于人造肝脏打下基础,最终达到部分或永久替代^[3]。

1 肝脏替代治疗与去细胞化肝脏生物支架

肝脏替代治疗主要为等待供肝的终末期肝病患者提供短暂支持,目前主要有 3 种方式。第 1 种是肝细胞移植。肝细胞移植是将肝细胞注射到肝脏或通过脾脏或门静脉达到病肝,达到功能替代的目的,动物肝衰竭模型中,肝细胞移植可以有效延长生存时间^[4]。第 2 种是联合复合材料肝细胞移植。包括使用复合材料将肝细胞包裹起来形成微转运体注入体内,或将细胞注入肝脏模型,体外持续为肝细胞提供营养^[5]。第 3 种是生物型人工肝。生物型人工肝支持系统由肝细胞生物反应装置和体外灌流净化装置两部分组成,血液在体外灌流、回输过程中实现解毒、代谢、分泌等功能^[6-7]。以上 3 种替代治疗方法在应用过程中不同程度地出现了细胞营养供给不足、宿主免疫排斥、移植成活率低下、模拟肝脏功能不完善等问题。

在肝脏替代治疗的研究中,DLB 所具有的特殊生物有效性对解决上述问题具有良好的研究前景。在肝脏内运用这项技术包含了脱细胞化处理去除肝细胞成分,确保支架与原器官在形态结构上具有相似性,并保留具有生物学效应的 ECM 成分和超微脉管结构^[8]。随后以 DLB 为载体,将种子细胞(干细胞、原始肝细胞、间充质细胞等)植入支架内,进行体外或体内的灌注培养,从结构和功能上模拟肝脏的功能。

2 去细胞化肝脏生物支架的制备

制备 DLB 是在一定物理条件下,通过灌注设备将化学试剂持续注入肝脏自身的脉管结构中,去除肝脏细胞的过程^[9]。近年来灌注法制备 DLB 的方案种类较多,实验条件各不相同,目前并没有统一的制备标准。理想的肝脏去细胞化技术是在去除细胞成分的同时,尽可能地保存 ECM 和微脉管结构^[10]。

2.1 制备方法与评价

去细胞化技术最早使用浸泡法制备组织和器官支架,对

自身解剖结构较薄的(皮肤、血管、瓣膜等)较适用,但对较大的组织与器官的效果不佳。2008 年, Ott 等^[11]采用灌注法对大鼠心脏进行去细胞化处理。很快该项技术在肝脏、肺、胰腺、肾等器官得到运用^[12-16]。灌注法制备 DLB 需要使用一套动态去细胞化设备,有效控制灌注压及去细胞化试剂灌注的流速^[17]。对于不同类型、不同大小的肝脏所采用的灌注速度也不同。灌注操作中,顺行和逆行灌注都有使用,但最常用的是顺行灌注法^[10]。试剂通过大血管灌注到器官末梢,洗脱的细胞碎片通过静脉系统排出,即试剂从肝门静脉注入,肝静脉回收,这种方法同时也保持了器官原有的血流动力学状态。灌注保留的管道可与宿主的血液循环相连,以获取营养物质和氧气。

2.2 制备试剂与评价

制备 DLB 过程中最常使用的试剂有去垢剂、消化酶和酸碱试剂^[9]。去垢剂通过裂解细胞膜上的膜脂,解离 DNA 与蛋白质而起作用,一般分为离子型及非离子型去垢剂^[18]。Trion X-100 是最常用的非离子型去垢剂,它可以有效地离断 DNA 与蛋白质之间的联系,但对葡糖氨基葡聚糖(glycosaminoglycans, GAGs)清除作用较强。最常用的离子型去垢剂是十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),它对去除致密组织中细胞核成分较为有效,但对组织中超微结构、GAGs、生长因子和胶原蛋白有破坏作用。去垢剂具有细胞毒性,因此去垢剂使用后需要反复清洗支架内残留的去垢剂成分^[19]。Triton X-100 与 SDS 化学性质不同,脱细胞功能的侧重点也不相同^[20]。Ren 等^[21]报道:单独使用 SDS 和 Triton X-100 对大鼠肝脏去细胞化, Triton X-100 作用于大鼠后保留的弹性蛋白、GAGs、肝细胞生长因子成分均优于 SDS。Mattei 等^[22]比较使用 SDS 和 Triton X-100 为主的去细胞化方案,发现最佳去细胞方案为:第 1 天使用 PBS 缓冲液灌洗,第 2 天使用 1% Triton X-100 灌洗,第 3 天用 0.1% Triton X-100 灌洗 0.5 d, PBS 灌洗 0.5 d。Kajbafzadeh 等^[23]制备羊 DLB, 一组使用去离子水和 0.5% Triton X-100 灌注肝脏 72 h, 另一组使用 0.01%、0.1%、1% 的 SDS 灌注 72 h, Triton X-100 组较好地保存了胶原蛋白和 GAGs。Shirakigawa 等^[24]发现 Triton X-100 保护脉管网的能力强于 SDS。因此,在制备 DLB 的过程中建议选择更为温和的 Triton X-100 作为去垢剂使用。

常用的消化酶是胰蛋白酶,其去细胞速度较慢,且仅用酶洗脱细胞难以达到较好的效果^[25]。与去垢剂比较,ECM 中的胶原成分对胰蛋白酶抵抗作用较弱,较容易损伤胶原蛋白和弹性蛋白的结构,但能较好的保存 GAGs^[26]。胰蛋白酶能提高组织的通透性,因此可以在去细胞过程中首先使用胰蛋白酶^[27]。常用的螯合剂有乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA),它能通过结合细胞内外的金属离子阻断蛋白与蛋白之间的联系。胰蛋白酶通常与螯合剂共同使用,起到辅助去垢剂去细胞化的作用,能达到较好的制备效果^[28-30]。酸与碱均可水解生物分子。过氧乙酸是常见的消毒试剂之一,去细胞核作用较强,可较好地保持 ECM 的完

整性^[31]。Baptista 等^[13]报道使用 1% Triton X-100 与 0.1% 氢氧化铵制备 DLB,从 DNA 洗脱数量,保留 ECM 内容和脉管微结构上均取得了良好效果。

目前制备 DLB 最常用的是 Triton X-100 和 SDS 联合去细胞化^[32-33]。胰蛋白酶-螯合剂、酸碱试剂与去垢剂联用会增强肝脏去细胞化效果,但也有使用一种去垢剂制备 DLB 的报道^[13,34-35]。反复使用相同种类、不同浓度的去垢剂去细胞,也可增强去细胞化效果^[36]。

2.3 制备相关因素与评价

制备动物目前局限于小鼠、大鼠、兔子、雪貂和猪,为更加有效模拟人体肝脏体积,逐步从小动物肝脏实验转向大动物肝脏实验。在去细胞化过程中缩短支架制备时间是有意义的,同时也是选择不同制备方法的标准之一。近年的文献报道中,肝脏去细胞化时间跨度范围较大(2~144 h),从各自制备时间来比较,大型动物(猪、兔)的肝脏相对小型动物(小鼠、大鼠)的肝脏需要更多的时间才能达到满意的去细胞化效果^[33-34]。在使用相同去细胞化方法的情况下,去细胞化时间越长,去细胞效果就越强,但对支架的完整性损害也越大。

灌注制备的温度通常使用 4、20、37℃,在使用胰蛋白酶的制备方法中均保持在较高温度,保证胰蛋白酶反应活性^[28,30]。冻融法可以有效溶解组织和器官内的细胞成分,即使反复冻融对 ECM 的蛋白成分损伤也较小^[37]。在 -80℃ 液氮环境下保存肝脏,解冻后用于灌注制备 DLB 即是一个冻融循环。

溶液与试剂通过一定的压力灌注到组织和器官,可使脉管周围(约 100 μm)的细胞与基底膜分离,不同的压力在制备过程中具体表现为灌注流速的不同。相同流速的情况下,所用的灌注管道粗细不同也可造成静水压力不等。灌注速度一般 < 10 mL/min,也有对猪肝脏去细胞化过程使用流速为 30 mL/min 的报道,但数据间没有相关性^[34]。

3 去细胞化肝脏生物支架的检测

DLB 制成后,需要对支架的有效性进行检测,检测主要包括以下 3 个方面,即检测肝脏细胞残留量、肝脏细胞外基质复合物,观察脉管结构。

3.1 肝脏细胞残留量的检测

去细胞化肝脏内残留的细胞 DNA 含量直接影响种子细胞植入支架后发生免疫排斥反应的大小。通过光学显微镜下观察组织学切片或使用 DNA 定量检测支架上未被洗脱的 DNA 含量。Crapo 等^[9]提出:肝脏去细胞化的最低标准需至少满足其中一项:(1)每毫克 ECM 中双链 DNA < 50 ng。(2)DNA 片段长度 < 200 bp。(3)通过 HE 染色或 DAPI 染色后,镜下看不到细胞核成分。近年来,使用不同制备方法制备的 DLB 内残留的细胞学成分均控制在标准范围以内^[13,28-35,38]。

3.2 肝脏细胞外基质复合物的检测

Masson 染色法用于观察胶原蛋白的含量,胶原蛋白和弹性蛋白可用 Movat 染色法观察。在种子细胞再植入支架的过程中,ECM 与种子细胞的附着、分化、成熟和相互作用高度

相关^[30]。近年来制备的 DLB 内胶原蛋白 I、胶原蛋白 IV、纤连蛋白、层黏连蛋白等 ECM 复合物都较好地保留下来^[32-35,39]。胶原蛋白、弹性蛋白、层黏连蛋白在保持去细胞化支架机械强度,辅助细胞增殖中均发挥了重要的作用。胶原蛋白是连接组织和器官的重要组成部分,大量存在于哺乳动物中^[13-14]。这种蛋白可表达一种细胞黏附肽的模体结构,可与细胞表达的黏附序列 RGD 相结合^[39]。弹性蛋白与层黏连蛋白在大多数去细胞化试剂中是不可溶的,因此被大量的保存下来^[40]。层黏连蛋白在去细胞支架中起到了辅助细胞黏附、生长、迁移、分化的作用,其结构上表达具有与细胞黏附相关的 YIGSR 和 IKVAV 多肽序列,与内皮细胞上表达整合素 $\beta 1$ 结合,可以促使内皮细胞附着于支架上^[41]。

细胞因子通过酶联免疫吸附试剂盒测定,阿尔法新蓝/PAS 法可检测 GAGs 含量。肝细胞生长因子和成纤维生长因子可调控 DLB 再植入肝细胞的分化,促进血管生成^[42]。肝细胞生长因子和上皮细胞生长因子从细胞分泌后极易降解^[24,34],但 ECM 中的 GAGs 可以避免生长因子被水解^[43]。

3.3 肝脏微脉管结构的观察

通过扫描电镜和投射电镜可观察去细胞化支架脉管微结构^[8]。血管灌注法制备的 DLB 本身就存在连续且完整的血管结构,只是不同试剂对脉管微结构产生了不同程度的破坏。生物学结构的脉管网可为再植细胞提供模板,可直接附着内皮细胞或者薄壁组织细胞。脉管系统的重新内皮化也可以减少血栓和血凝的风险。

4 去细胞化肝脏生物支架的应用

虽然目前制备 DLB 有多种方法,但通过对支架残留成分的检测和结构的观察,发现不同的制备方法都能够满足应用的需要,可见制备技术已日臻成熟。如何有效地向 DLB 内植入种子细胞,提升再细胞化肝脏效能亦逐步成为目前研究的热点。

4.1 种子细胞的选择

用于肝脏支架再细胞化的种子细胞种类很多,包括成熟肝细胞、胚胎肝细胞、经诱导的多能干细胞、胎肝细胞、肝祖细胞、分化转移的细胞等^[44]。最早使用的是原代肝细胞,因为原代肝细胞可表达完整的细胞表型。人原代肝细胞所培养的肝细胞具有良好的生存能力,但原代肝细胞数量极其有限。胎肝干细胞或肝前体细胞植入 DLB 后,可以分化为肝细胞和胆管上皮细胞,更逼真地还原了肝脏的内部组成^[45]。Wang 等^[46]在 DLB 内培养成肝细胞,发现上皮细胞生长因子可促进成肝细胞增殖,分化为成熟的肝细胞。多能干细胞具有生物学潜能的优点,被认为是可提供较好种子细胞的来源。经诱导的多能干细胞(induced pluripotent stem cells, IPS)能够避免移植过程中发生免疫排斥,但 IPS 仍会保持表观遗传记忆,有分化为其他细胞系的可能。

非实质性细胞(肝血窦上皮细胞,肝星状细胞,胆管上皮细胞)以 1:3 的比例与肝实质细胞共同培养,可对肝脏结构形成、肝实质细胞有效性发挥重要作用^[47]。肝细胞与上皮细胞共同灌注于 DLB,肝细胞选择性地附着于支架实质结构

部分,上皮细胞选择性地附着于脉管周围,可能是不同部位表达了不同的生物信号^[12]。在间充质干细胞和肝细胞共同培养的实验中,间充质干细胞不仅对原代肝细胞有稳定作用,而且可以提供免疫调节因子,参与调控肝脏炎症和损伤的修复^[48]。将骨髓来源的间充质干细胞与原代肝细胞灌注到 DLB,再细胞化肝脏连接体内血液循环,发现黏附因子和血管生成因子有上调表现^[49]。间充质干细胞在 DLB 内进行体外培养,肝细胞样分化能力高于平面培养的实验结果^[34]。

4.2 支架再细胞化过程

DLB 再细胞化是复杂精细的多步骤过程,研究报道对不同的灌注方法、灌注管道、细胞数量均有所比较。利用 DLB 自身脉管结构将种子细胞回输到支架实质部分的有效性均较高,但 Fukumitsu 等^[30]通过比较直接注射细胞、连续灌注细胞、间歇灌注细胞,发现间歇性灌注可以有效避免种子细胞过度聚集,形成微血管死腔,导致细胞死亡。间歇性动态灌注种子细胞已成为 DLB 再细胞化的标准操作方式之一。Baptista 等^[13]比较了从门静脉和腔静脉分别灌注人脐静脉血管上皮细胞,发现两种方法中细胞均能够通过血管腔灌注到肝小叶部分,毛细血管处观察到细胞将其完全包裹,并形成细胞间连接,但大部分细胞存在于血管中心周围,并且沿血管排列。由此可推断两条脉管通路可同时使用,达到种子细胞有效附着全程脉络的目的。种子细胞数量决定了 DLB 中细胞的密度,密度过大容易造成脉管阻塞,营养供给不足,导致细胞大面积死亡;密度太小不容易形成细胞间连接,造成细胞间相互作用减少。Uygun 等^[12]认为再细胞化肝脏中细胞密度为正常肝脏细胞的 80% 为宜。

支架再细胞化过程中非实质性细胞所发挥的作用越来越大。血管内皮细胞附着于血管,血管内皮化还原了肝脏自身血管功能,对防止血栓形成和出血有重要意义。现有的去细胞化技术有效地保存了胆管通道,如果重新附着胆管上皮细胞,则有可能实现对肝脏细胞分泌胆汁的引流。

4.3 再细胞化肝脏的体内培养

理想的再细胞化肝脏是指对原始肝脏的完全替代,包括连接相同的肝动脉、肝静脉、中心静脉和胆管。但目前再细胞化肝脏植入动物体内的研究还处于异位移植的阶段。Uygun 等^[12]将右肾切除后,将肾动、静脉连接植入肝脏的门静脉与腔静脉,肝脏支架成活 8 h。Bao 等^[50]将再细胞化肝脏原位移植到部分肝切除的大鼠,肝脏支架成活时间延长了 16~72 h。Zhou 等^[51]在免疫缺陷的小鼠腹膜下移植入再细胞化肝脏,支架成活时间为 8 周。造成宿主体内存活时间较短的原因,除宿主免疫排斥外,可能还与血管缝合技术的缺陷、血栓形成、缺血再灌注损伤等有关,具体的机制还有待进一步论证。

5 小结

去细胞化肝脏生物支架是一个成功的实验平台,它所提供的三维微环境更加逼真地模拟了肝细胞在肝脏内生长的环境状态。不同的去细胞方法直接影响 DLB 内 ECM 组分和微脉管结构,也就决定了支架在体内外的应用效果。具体采

用哪种去细胞方法更取决于研究者对 DLB 的用途和对去细胞化过程中细胞破坏机制的理解。DLB 的应用目前仍处于探索阶段,选取哪种细胞作为种子细胞再植入,支架内需含有哪些细胞学成分,胆管和血管网的重建,再细胞化肝脏体内移植免疫抑制等问题仍需进一步深入研究。随着组织工程学和再生医学在肝脏领域的不断发展,相信终有一天去细胞化肝脏支架再细胞化这项技术将会应用于临床,对肝脏功能达到完全替代。

参考文献

- [1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global Burden of Disease and Risk Factors[M]. Washington DC: The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank Group, 2006.
- [2] 中华医学会器官移植学分会, 中华医学会外科学分会移植学组, 中国医师协会器官移植医师分会. 中国肝癌肝移植临床实践指南[J]. 中华器官移植杂志, 2014, 35(7): 436-440.
- [3] Ananthanarayanan A, Narmada BC, Mo X, et al. Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering [J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(3): 110-118.
- [4] Palakkan AA, Hay DC, Anil Kumar PR, et al. Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges [J]. Liver Int, 2013, 33(5): 666-676.
- [5] Hou YT, Ijima H, Takei T, et al. Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis [J]. J Biosci Bioeng, 2011, 112(3): 265-272.
- [6] Kumar A, Tripathi A, Jain S. Extracorporeal bioartificial liver for treating acute liver diseases [J]. J Extra Corpor Technol, 2011, 43(4): 195-206.
- [7] 施晓雷, 韩冰, 任昊桢, 等. 新型生物人工肝在临床肝移植前的应用效果[J]. 中华器官移植杂志, 2014, 35(4): 193-197.
- [8] Arenas-Herrera JE, Ko IK, Atala A, et al. Decellularization for whole organ bioengineering [J]. Biomed Mater, 2013, 8(1): 014106.
- [9] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes [J]. Biomaterials, 2011, 32(12): 3233-3243.
- [10] Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2011, 13: 27-53.
- [11] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart [J]. Nat Med, 2008, 14(2): 213-221.
- [12] Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix [J]. Nat Med, 2010, 16(7): 814-820.
- [13] Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid [J]. Hepatology, 2011, 53(2): 604-617.
- [14] Petersen TH, Calle EA, Zhao L, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation [J]. Science, 2010, 329(5991): 538-541.
- [15] Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds [J]. Trends Mol Med, 2011, 17(8): 424-432.
- [16] 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 [J]. Ann Surg, 2012, 256(2): 363-370.
- [17] Choi JS, Williams JK, Greven M, et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma [J]. Biomaterials, 2010, 31(26): 6738-6745.
- [18] Alhamedani MS, Schröder C, Werner J, et al. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays [J]. J Proteome Res, 2010, 9(2): 963-971.
- [19] Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells [J]. Artif Organs, 2010, 34(3): 206-210.
- [20] 姜楠, 季茹, 王建峰, 等. 不同方法制备大鼠肝脏脱细胞支架及其免疫原性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(5): 844-849.
- [21] Ren H, Shi X, Tao L, et al. Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold [J]. Liver Int, 2013, 33(3): 448-458.
- [22] Mattei G, Di Patria V, Tirella A, et al. Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices [J]. Acta Biomater, 2014, 10(2): 875-882.
- [23] Kajbafzadeh AM, Javan-Farazmand N, Monajemzadeh M, et al. Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2013, 19(8): 642-651.
- [24] Shirakigawa N, Ijima H, Takei T. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering [J]. J Biosci Bioeng, 2012, 114(5): 546-551.
- [25] Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves [J]. J Struct Biol, 2003, 143(3): 201-208.
- [26] Yang M, Chen CZ, Wang XN, et al. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009, 91(1): 354-361.
- [27] Yang B, Zhang Y, Zhou L, et al. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(5): 1201-1211.
- [28] Nari GA, Cid M, Comin R, et al. Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers [J]. Rev Esp Enferm Dig, 2013, 105(3): 138-143.
- [29] Ji R, Zhang N, You N, et al. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice [J]. Biomaterials, 2012, 33(35): 8995-9008.
- [30] Fukumitsu K, Yagi H, Soto-Gutierrez A. Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver [J]. Transplant Proc, 2011, 43(6): 2137-2138.
- [31] Gilbert TW, Wognum S, Joyce EM, et al. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix [J]. Biomaterials, 2008, 29(36): 4775-4782.
- [32] Pan MX, Hu PY, Cheng Y, et al. An efficient method for decellularization of the rat liver [J]. J Formos Med Assoc, 2014, 113(10): 680-687.
- [33] Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K, et al. Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach [J]. Cell Transplant, 2013, 22(2): 231-242.
- [34] Jiang WC, Cheng YH, Yen MH, et al. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering [J]. Biomaterials, 2014, 35(11): 3607-3617.

- [35] Barakat O, Abbasi S, Rodriguez G, et al. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ [J]. J Surg Res, 2012, 173(1): E11-25.
- [36] Uygun BE, Price G, Saedi N, et al. Decellularization and recellularization of whole livers [J]. J Vis Exp, 2011, (48): 2394.
- [37] Patel N, Solanki E, Picciani R, et al. Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics [J]. Proteomics, 2008, 8(5): 1055-1070.
- [38] Shupe T, Williams M, Brown A, et al. Method for the decellularization of intact rat liver [J]. Organogenesis, 2010, 6(2): 134-136.
- [39] 汪洋, 刘赞, 叶海林, 等. 新型全肝脏去细胞化流程对细胞外基质及细胞组分残留量影响的研究 [J]. 中国生物医学工程学报, 2013, 32(1): 61-69.
- [40] Almine JF, Bax DV, Mithieux SM, et al. Elastin-based materials [J]. Chem Soc Rev, 2010; 39(9): 3371-3379.
- [41] Schwarzbauer J. Basement membranes: Putting up the barriers [J]. Curr Biol, 1999, 9(7): R242-244.
- [42] Basma H, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes [J]. Gastroenterology, 2009, 136(3): 990-999.
- [43] Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, et al. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation [J]. J Cell Biol, 1988, 107(2): 743-751.
- [44] Li YS, Harn HJ, Hsieh DK, et al. Cells and materials for liver tissue engineering [J]. Cell Transplant, 2013, 22(4): 685-700.
- [45] Oertel M, Menthen A, Chen YQ, et al. Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver [J]. Gastroenterology, 2008, 134(3): 823-832.
- [46] Wang X, Cui J, Zhang BQ, et al. Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors [J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(4): 1017-1025.
- [47] Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Yagi H, et al. Engineering of an hepatic organoid to develop liver assist devices [J]. Cell Transplant, 2010, 19(6): 815-822.
- [48] Yagi H, Parekkadan B, Suganuma K, et al. Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(11): 3377-3388.
- [49] Kadota Y, Yagi H, Inomata K, et al. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts [J]. Organogenesis, 2014, 10(2): 268-277.
- [50] Bao J, Shi YJ, Sun HQ, et al. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats [J]. Cell Transplant, 2011, 20(5): 753-766.
- [51] Zhou P, Lessa N, Estrada DC, et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice [J]. Liver Transplantation, 2011, 17(4): 418-427.

(收稿日期: 2014-10-09)

(本文编辑: 张玉琳)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿中科研设计的要求

科研设计应交代研究设计的名称和主要方法, 遵循随机、对照、均衡、重复的原则。

1. 临床试验设计应交代属于第几期临床试验、采用了何种方法(盲法、随机)、受试对象纳入和排除标准等, 以人为研究对象的前瞻性研究, 应说明是否经某单位或医院伦理委员会批准, 并提供该委员会的审批文件, 受试对象的知情同意以及临床试验注册号。

2. 临床科研设计中样本量要求, 计量资料 ≥ 30 例, 计数资料 ≥ 40 例。

3. 临床研究均应交代随访情况, 队列研究失访率不能高于 20%。

4. 动物实验需提供动物合格证号, 交代实验分组所采用的方法。

本刊对人名汉语拼音书写规范的要求

根据中华医学会编排规范, 在英文摘要中人名汉语拼音书写规范如下:

(1) 少数民族语姓名按民族语读音拼写。如: Ulanhu(乌兰夫)。

(2) 姓仅首字母大写, 名字间不加分隔“-”。如: Wang Minde(王敏德)。

(3) 双姓组合, 双姓间加分隔“-”。如: Zheng-Li Shufang(郑李淑芳), Dongfang-Zhao Feng(东方赵峰)。

(4) 不能分出姓名, 首字母大写。如 Baogong(包公), Taibai Jinxin(太白金星)。

(5) “吕”拼音为“Lyu”, 吕和平(Lyu Heping)。