

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61F 2/04
A61L 27/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02145461.2

[43] 公开日 2003 年 4 月 16 日

[11] 公开号 CN 1410034A

[22] 申请日 2002.11.15 [21] 申请号 02145461.2
[71] 申请人 谭 强
地址 200030 上海市徐汇区虹桥路 550 号
2005 室
[72] 发明人 谭 强

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 组织工程化食道
[57] 摘要

本发明属生物医学工程领域，具体涉及一种组织工程化食道及其制备方法。 本发明根据组织工程学基本原理方法，由支架材料和种子细胞构成含上皮层和真皮层双层结构的组织工程化食道。 本发明真皮层中的血管内皮细胞直接参与毛细血管网的建立，同时利用两种再血管化方法，短时间内与受体血供再通，从而为组织工程化食道上皮提供血供。 本发明改变了既往以损伤修复损伤的治疗模式，可用于简化食道切除和一期重建消化道手术方式，减少医疗创伤，为广大的食管病变患者带来福音。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、 一种组织工程化食道，其特征在于由支架材料和种子细胞构成含上皮层和真皮层双层结构的组织工程化食道。
- 2、 根据权利要求 1 所述的组织工程化食道，其特征是所述的支架材料包括生物材料和人工合成材料。
- 3、 根据权利要求 1 和 2 所述的组织工程化食道，其特征是所述的支架材料是脱细胞基质。
- 4、 根据权利要求 1 和 2 所述的组织工程化食道，其特征是所述的支架材料是猪真皮脱细胞基质。
- 5、 根据权利要求 1 所述的组织工程化食道，其特征是所述的种子细胞包含成纤维细胞、血管内皮细胞、表皮角朊细胞。
- 6、 根据权利要求 1 和 5 所述的组织工程化食道，其特征是所述的血管内皮细胞提取自骨髓，或静脉血管、或动脉血管、或脂肪组织。
- 7、 根据权利要求 1 所述的组织工程化食道，其特征是所述真皮层包含血管内皮细胞。
- 8、 根据权利要求 1 和 5 所述的组织工程化食道，其特征是所述血管内皮细胞用于黏膜下毛细血管网的重建。

本发明所采用的组织工程化皮肤支架材料可以是聚羟基乙(PGA)，皮肤脱细胞基质。其中皮肤脱细胞基质包括同种异体真皮脱细胞基质和异种真皮脱细胞基质。

本发明采用的可降解支架材料猪真皮脱细胞基质，购自上海东润生物制品公司。经临床试用一千余例烧伤病例，证实其组织相容性、细胞相容性良好。

本发明具有下述优点

1. 本组织工程化食道组织是可自我更新，自我修复的活组织，无抗原性，不会引起免疫排斥反应。

2、本发明利用血管内皮细胞加速了重建组织工程化食道血液供应。

完整的上皮组织可防止肉芽组织增生堵塞管腔，是组织工程化食道成功的关键。正常组织再血管化主要有血管生成(angiogenesis)、血管发生(vasculogenesis)两种形式。血管生成即局部血管再生是指正常细胞因子刺激下游离至再生组织生成毛细血管。血管发生则由骨髓中血管内皮细胞在某些细胞因子刺激下游离至再生组织生成毛细血管。本发明同时利用上述两种再血管化方法，短时间内与受体血供再通，从而为组织工程化食道上皮提供血供。

具体实施方式

实施例 1

1) 分离与培养表皮角朊细胞

取患者表皮修剪成宽 1-2mm 的条状，无钙镁 PBS 漂洗两次，表皮面朝上浸于 0.5%中性蛋白酶(DispaseII)中 4℃过夜。将表皮从真皮上撕

组织工程化食道

技术领域

本发明属生物医学工程领域，具体涉及一种组织工程化食道及其制备方法。

背景技术

我国是食道癌的高发国家，又是食道癌死亡率最高的国家，目前临床的治疗原则一般为经胸食道癌切除和一期重建消化道。最常见的食道替代品为胃，结肠和小肠。所行手术创伤大，涉及范围广，并发症多，其中吻合口瘘的发生率在3%---5%左右，是一种典型的以创伤修复创伤的治疗模式。人工食道的研制由于尚无组织相容性良好的合成材料，进展缓慢。

组织工程是二十一世纪生命科学一大热点。其核心内容是体外细胞三维培养，其基本方法是将种子细胞与可降解生物材料组成复合体，替代受损组织器官。其科学意义不仅在于为解除病人痛苦提供了一种新的治疗方法，更主要的是提出了复制"组织"、"器官"的新思想，改变了既往以损伤修复损伤的医疗模式。

发明内容

本发明的目的是提供一种组织工程化食道，改变既往以损伤修复损伤的治疗模式。本发明根据组织工程学基本原理方法，利用组织工程化皮肤支架材料作为可降解支架材料，在体外构建有上皮层和真皮层的食道组织。所述的真皮层包含由血管内皮细胞及成纤维细胞。

下后, 剪碎, 用 0.05%胰酶-0.53mMEDTA 在 37℃消化 20 分钟, 10ml 胰酶抑制剂终止消化。经 150 目不锈钢滤网过滤、离心(1200 转, 10 分钟)、计数后制成单细胞悬液, 按 $3 \times 10^6/75\text{cm}^2$ 密度接种培养, 无血清表皮细胞培养基(GIBRO, USA), 另加牛垂体提取物和重组表皮细胞生长因子, 在 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养, 培养液 3 天换一次。当细胞达到 60-75%密度融合时, 经 0.05%胰酶 37℃消化 10 分钟, 按 1:3 的比例传代培养。

2) 真皮成纤维细胞分离与培养

分离消化

将上述真皮碎块, 在 0.2%的胶原酶 37℃消化 2 小时, 经 150 目不锈钢滤网过滤, 以 1200r/min 离心 5 分钟, 弃去上清, 加入无钙镁 PBS 清洗 3 次。加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 10ml, 混匀, 台盼蓝染色计数。

原代培养

计数后制成单细胞悬液, 按 $1-2 \times 10^6/75\text{cm}^2$ 密度接种培养, 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37℃, 5%CO₂, 100%相对湿度的培养箱中培养, 培养液 3 天换一次。当细胞融合到 60%-75%密度时, 用 10ml 无钙镁 PBS 冲洗, 经 0.25%胰酶 37℃消化 5 分钟, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。弃去上清液, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 10ml, 混匀, 计数, 按 1:3 的比例传代培养。2-3 日换一次培养液, 直到细胞融合至 60%-75%密度时, 再传代培养。

3) 内皮细胞提取

下述提取方法可单独或联合应用。

骨髓来源血管内皮细胞提取

抽取骨髓 5—10ml, PBS 清洗, 离心速度 $1500g \times 10min$ 。Ficoll 分离 (5ml 细胞悬液+ Ficoll 5ml, 离心速度 $200g \times 25min$), 提取有核细胞, PBS+EDTA 清洗两次。加入标有磁珠的 CD31 抗体 $6-12^{\circ}C$ 放置 15min ; 每 10^8 细胞+5-10ccPBS 清洗两次。MACS 分离: MS+/RS+ 柱 预先 500ulPBS 浸润, 细胞悬液过柱后 PBS500ul 清洗滤柱 3 次。1mlPBS 冲洗滤柱得 CD31+细胞。

静脉血管、动脉血管来源血管内皮细胞提取:

取静脉血管、动脉血管 5—10CM, 两端结扎, 管腔内灌注经 0.25---0.5%胰酶或 0.5%中性蛋白酶(DispaseII), $37^{\circ}C$, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中放置 5—10 分钟, 放开一端, 倒出内容物, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。PBS 清洗两次。

脂肪组织来源血管内皮细胞提取:

将抽取的脂肪组织移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。弃去上清液, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 10ml, 混匀。分离脂肪组织中毛细血管。0.25---0.5%胰酶或 0.5%中性蛋白酶(DispaseII), $37^{\circ}C$, 5%CO₂, 饱和湿度的培养箱中放置 5—10 分钟。加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。PBS 清洗两次。

4) 构建组织工程化食道

收集体外培养的血管内皮细胞和真皮成纤维细胞，将其接种于组织工程化皮肤支架材料上，构建成血管内皮细胞、纤维细胞—脱细胞真皮复合物。接种密度为 1×10^5 --- 10^8 。培养液 3 天换一次，培养时间为 7-10 天。

形成双层结构：收集表皮细胞，将其接种在血管内皮细胞、成纤维细胞—可降解支架材料复合物表面。一周后在复合物表面形成气—液界面，促进血管内皮细胞的进一步分化。