

3D打印干细胞技术用于组织器官重建的现状与思考

李金泰 蓝升 刘毅

【摘要】 干细胞具有很强的自我更新和多向分化能力，在组织工程领域具有独特的优势。近几年来，3D打印技术在生物医学领域的应用获得快速发展，特别在人体器官打印方面的应用研究成为社会关注的焦点，具有良好的发展前景和巨大的社会价值。本文主要从干细胞的种类和来源、3D打印器官的定义、干细胞联合3D打印进行器官重建的现状和目前存在的问题等方面，阐述两项技术的结合可能产生1+1>2的效应，为组织器官重建的研究和临床应用提供新思路。

【关键词】 干细胞；3D打印；组织器官重建；生物系统；器官移植

【中图分类号】 R617, R329.2, R318.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2017) 04-0003-04



作者简介:刘毅，医学博士，副主任医师、副教授，硕士研究生导师。现任第二军医大学长海医院麻醉学部临床麻醉科副主任。兼任中华医学会麻醉学分会手术室外麻醉和PACU学组委员、中华消化内镜协会麻醉协作组委员、上海医学会麻醉专科委员会加速康复与日间手术麻醉学组副组长。临床业务擅长复杂、疑难、危重腔镜和内镜手术患者围术期管理及器官移植手术患者围术期管理。主要研究方向为围术期脏器功能保护，在细胞凋亡、自噬以及坏死之间联系方面具有较深入研究。主持国家自然科学基金1项，省部级科研基金1项。参编（译）专著6部，在SCI及核心期刊发表专业论文20余篇。

组织器官移植是目前治疗终末期器官功能障碍唯一有效的方法，但供体器官缺乏、组织相容性问题等原因严重限制组织器官移植的发展。随着医学技术的不断发展，人们正试图从机械器官替代、异种器官移植、组织工程和再生医学等方面来打破组织器官移植的瓶颈，其中3D打印（3D printing）与干细胞移植相结合的技术可能代表了未来研究的突破方向。

从材料学的角度看，人体是由布局精密、功能复杂且互相紧密联系的生物材料构成的。建房子时，建筑工程师首先绘制精确的图纸，然后再购买沙子、水泥、钢筋，最后由建筑工人运用相关的机器按照图纸建造房子。事实上构建人体的组织器官类似于建房子，只不过其过程要远比前者复杂精密。各种干细胞

可以提供“沙子”、“水泥”、“钢筋”，而3D打印技术就是需要“图纸”、灵活的“机器”和“建筑工人”。

1 干细胞的种类和来源

正常组织具有自我更新和修复能力，参与修复更新的主要成分各种组织特异性干细胞，例如造血干细胞、表皮干细胞、肠腺干细胞。在一些更替缓慢的组织如神经组织、心脏组织中，也发现了组织特异性干细胞的存在。干细胞具有很强的自我更新及定向分化能力，在细胞来源、增殖、定向分化及重建器官的植入等方面均具有较明显的优势。根据干细胞来源可分为胚胎干细胞和组织特异性干细胞。胚胎干细胞是

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.04.003

基金项目：国家自然科学基金（81201455）；上海市自然科学基金（12ZR1438600）

作者单位：200433 上海，第二军医大学附属长海医院麻醉科

通讯作者：刘毅，Email: ziboliuyi@yeah.net

在胚胎发育早期——囊胚（受精后约 5 ~ 7 d）细胞团中的细胞，能大量繁殖并保持未分化状态，也可分化成 3 个胚层中的任意一种细胞^[1-2]。组织特异性干细胞是从外周组织分离、培养、扩增而来的。除了以上两类干细胞，还有一类诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS），近些年的研究表明 iPS 的生物学特性、增殖特点及分化潜能类似胚胎干细胞，可以由单个细胞分化为内胚层、中胚层和外胚层所有的细胞，进而形成身体的所有组织和器官^[3]。iPS 获取相对方便，2012 年 Margariti 等^[4]在重编程人皮肤细胞时将 iPS 的获取时间缩短为 4 d。

2 3D 打印的概念

3D 打印技术，在技术界也称为“增材制造”、“自由成形”、“快速成形”或“分层制造”等，是一种快速成型技术，由计算机辅助设计（computer aided design, CAD）数据通过成型设备以材料逐层堆积的方式实现实体成型。3D 打印技术应用在医学上采用 CT、正电子发射断层显像-X 线计算机体层成像（positron emission tomography-computed tomography, PET-CT）、MRI 或 3D 相机等影像手段获得需要打印的器官三维数字信息，使用 CAD 程序建模，然后 3D 打印机根据建好的数字模型逐层打印出实物模型。近几年，3D 打印技术在生物医学领域的应用获得快速发展，特别在人体器官打印方面的应用研究成为社会关注的焦点，具有良好的发展前景和巨大的社会价值。

3 干细胞联合 3D 打印用于器官重建的现状

器官重建在实验室取得了不小的成绩，其通用的做法是首先提供一个生物支架，然后围绕支架进行细胞的培养、聚集，最终形成器官。支架的来源包括两种：一种是 3D 打印的支架，比如把水凝胶等可降解材料打印成细胞支架，可以建立适合活性细胞存活精确三维结构，有研究者将聚乙烯醇水凝胶用于细胞培养，并对细胞的力学响应行为进行了初步研究^[5]；另一种是将脱细胞处理的器官作为支架，有研究利用大鼠脱细胞肝三维支架为小鼠间充质干细胞提供体外培养和诱导分化微环境，能够高效地诱导间充质干细胞向类肝细胞分化、表达更加稳定和丰富的肝细胞功能，并在移植体内后对慢性肝损伤表现出较好的治疗

作用^[6]。

通过 3D 打印进行器官重建取得了如下成果，包括简单器官打印，如耳廓，也包括复杂器官打印，如心脏、肝脏。美国康奈尔大学生物工程学家与威尔康乃尔医学院的医师组成的研究团队利用活细胞制成的可注射胶技术，结合 3D 打印技术造出了与人耳几乎完全一样的器官耳。在 3 个月时间内，这些器官耳长出软骨，替换掉其中用于定型的胶原^[7]。法国蓬皮杜欧洲医院使用生物活性组织与电子元件相结合的方式，制造出一个人造心脏，并完成世界上首例人工心脏移植手术。美国 Organovo 公司利用手术切除的部分肝脏打印的微型肝脏已具备了真正肝脏的大部分功能。在这一微型肝脏中有来自血管内壁的细胞。这些细胞形成一张精妙的管道网向肝细胞供应营养和氧气，使细胞和组织得以存活 5 d 以上^[8]。目前已有可吸收冠状动脉支架应用于人体的报道^[9-10]，外周血管可吸收支架在欧盟和美国已均在临床试验中，国内有学者提出生物 3D 打印结合静电纺丝制备复合生物可吸收血管支架的新方法^[11]，需进一步验证。

当前关于干细胞联合 3D 打印用于器官重建的报道相对较少。苏格兰研究人员利用 3D 打印技术，首次尝试用人类胚胎干细胞进行 3D 打印^[12]。研究人员利用气阀打印技术，通过改变开关气阀的喷嘴直径、进口气压和阀门打开时间来达到精确地控制细胞放置数量，这种气动打印技术非常柔和，足以保持干细胞的高存活率，也能够精确地制造出统一尺寸的细胞团。对打印出来的细胞团检测结果显示，打印 24 h 后，95% 以上细胞仍然存活，打印过程未杀死细胞；3 d 后，超过 89% 细胞存活。检测显示打印出的胚胎干细胞保持了它们的多能性，具备像正常的人类胚胎干细胞一样分化潜能。由胚胎干细胞打印出的三维结构有望创造出更准确的人体组织模型，这是一次真正意义上的干细胞结合 3D 打印技术的实践。

4 干细胞联合 3D 打印用于器官重建存在的挑战

4.1 干细胞来源

目前干细胞无法通过形态进行识别，只能通过免疫表型或者细胞的功能进行判断。同时体内的干细胞数量有限且分布分散，因此想从体内寻找大量干细胞并不容易，而胚胎干细胞的获得面临较大的伦理学障碍。目前人们已在探索将干细胞进行体外克隆以

获得足够多的数量。任卫青等^[13]将3代以内的小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF)按不同密度接种培养,显示发育至囊胚的胚胎其小鼠胎儿成纤维细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,同时培养液中添加干细胞生长因子和胰岛素时更适合昆明小鼠胚胎干细胞的分离培养,所分离的细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色强阳性,Oct-4、SSEA-1免疫荧光检测阳性,具有胚胎干细胞的特点,提示该方法便于小鼠胚胎干细胞的大量分离和培养。但是该方法能否用于人类干细胞分离培养尚未可知。

4.2 打印工艺尚需改进

这个问题涉及范围比较广,至少涉及干细胞的排布、细胞团中血管的打印、打印器官的存活时间及有无生理功能等。例如,人体肾脏的微观结构十分复杂,即便是肾单位这一由不同细胞构成的结构也都极其精妙,而其营养、支撑结构能有机结合在一起就更加复杂了。当前的技术水平还达不到这样精妙微观结构的打印。此外,肾脏的细胞与细胞之间存在复杂的相互作用,同时肾脏与肾外器官具有密切联系,肾脏本身也受到神经内分泌的调控,3D打印的肾脏很难具有这些功能。

4.3 组织相容性问题

3D打印进行器官重建的目的是为了将其应用于人体病变器官的替换。大家都知道凡是外来的组织或者异物移植于人体,正常人都会产生免疫排斥,受者因此不得不长期依赖免疫抑制剂以阻断这种排斥反应。虽然有理由相信将来来源于患者本身干细胞重建的器官有望降低排斥反应,但这一目标的实现仍然需要研究人员长期的探索。

5 对于干细胞联合3D打印用于器官重建的展望

不妨我们换位思考,作为1例尿毒症患者需要移植什么样的肾脏?归纳起来大致可以分两种:一种是其同时具有肾脏的形态结构和生理功能;另一种是其只具有生理功能,而并不具有肾脏的形态、结构。可想而知前者必定制作困难、成本高昂,而后者制作则相对简单,成本相对低廉。目前科研人员在3D打印进行器官重建时或多或少“思维定式”般地认为所制作的器官必须是前者,然而是不是只有重建出如前者那样的器官才算成功?笔者认为科研人员应当看到在当前及今后相当长的一段时间内由于技术和装备所限,

我们难以制作出如前者的器官,或许只能退而求其次,也就是把追求先制作出只具有生理功能的器官也视作一种成功。

科研人员应当跳出如前所述的这个“思维定式”,事实上在某些不影响美观的部位比如腹腔内或者胸腔内,患者首先需要的是移植器官具有相应的功能,并不要求其一定具备相应器官的形状和结构。那么科研人员完全可以探索其它既方便制造、成本低廉又能保证打印器官具有相应生理功能的工艺、方法。例如,完全可以打印一个长方体形的或者几个长方体串联或者并联后形成的“肾脏”,可以将人的肾脏进行类似微分或积分的思考——微分下的肾脏可以是肾单位,先制作出肾单位,然后将更多的肾单位进行有机的整合形成肾实质,再分别进行重吸收系统和集合系统的制作,达到相当的数量时可以通过血管将这些结构串联或者并连起来,形成一个具有上游和下游的结构,这样的结构似乎更像一个具有肾脏生理功能的生物系统。

6 总结

综上所述,干细胞技术和3D打印技术各自具有独特的优势,它们的这些优势特点在组织器官重建领域的价值被寄予相当高的期望,而尝试将两者结合起来,或许更能产生 $1+1>2$ 的效应。虽然目前干细胞的来源、培养、诱导分化等诸多问题尚未解决,且3D打印技术用于器官移植还有众多瓶颈性技术未能突破,但是笔者认为将干细胞技术与3D打印技术的结合可以为将来真正实现器官打印提供强有力的支持,进而为器官移植领域的器官短缺问题开辟出新的路径,为众多患者带来福音。

参考文献:

- [1] 王洋,段星祥,余娟,等. β -catenin对胚胎干细胞自我更新与多能性调控的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2016, 41(2): 206-211. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2016.02.014.
Wang Y, Duan XX, Yu J, et al. Progress in studies on the role of β -catenin in regulating the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells[J]. J Centr South Univ(Med Sci), 2016, 41(2): 206-211. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2016.02.014.
- [2] Ichida JK, Kiskinis E, Eggan K. Shushing down the epigenetic landscape towards stem cell differentiation[J]. Development, 2010, 137(15): 2455-2460. DOI: 10.1242/

- dev.049130.
- [3] 边艳超, 牧仁, 李云章, 等. 不同物种诱导性多潜能干细胞研究进展及应用 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(20): 3960-3963. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.042.
Bian YC, Mu R, Li YZ, et al. Progress and application in induced pluripotent stem cells of different species[J]. Prog Mod Biomed, 2014, 14(20): 3960-3963. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.042.
- [4] Margariti A, Winkler B, Karamariti E, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(34): 13793-13798. DOI: 10.1073/pnas.1205526109.
- [5] 邹小兵, 刘美霞, 于光磊, 等. 用于细胞培养的聚乙烯醇水凝胶力学性能模拟及定量控制 [J]. 世界科技研究与发展, 2013 (6): 679-682. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6055.2013.06.001.
Zou XB, Liu MX, Yu GL, et al. Mathematical simulation and quantitative control of polyvinyl alcohol hydrogel for cell culture[J]. World Sci-Tech R & D, 2013 (6): 679-682. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6055.2013.06.001.
- [6] 姜楠, 季茹, 王建锋, 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.
Jiang N, Ji R, Wang JF, et al. The preparation and immunoreactivity analysis of rat liver bioscaffolds decellularized by three different protocols[J]. Prog Mod Biomed, 2013, 13(5): 844-849.
- [7] Zopf DA, Hollister SJ, Nelson ME, et al. Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer[J]. N Engl J Med, 2013, 368(21): 2043-2045. DOI: 10.1056/NEJMc1206319.
- [8] Coghlan A. 3D printer makes tiniest human liver ever [EB/OL]. (2013-04-01). <http://www.newscientist.com/article/dn23419-3d-printer-makes-tiniesthuman-liver-ever.html#.Ui2l7kDEfn4>.
- [9] Ormiston J, Webster M, Stewart J, et al. First-in-human evaluation of a bioabsorbable polymer-coated sirolimus-eluting stent: imaging and clinical results of the DESSOLVE I Trial (DES with sirolimus and a bioabsorbable polymer for the treatment of patients with de novo lesion in the native coronary arteries)[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2013, 6(10): 1026-1034. DOI: 10.1016/j.jcin.2013.05.013.
- [10] Attizzani GF, Bezerra HG, Ormiston J, et al. Serial assessment by optical coherence tomography of early and late vascular responses after implantation of an absorbable-coating sirolimus-eluting stent (from the first-in-human DESSOLVE I trial) [J]. Am J Cardiol, 2013, 112(10): 1557-1564. DOI:10.1016/j.amjcard.2013.07.013.
- [11] 刘媛媛, 向科, 李瑜, 等. 结合生物 3D 打印和静电纺丝制备复合生物可吸收血管支架用于血管狭窄治疗 [J]. 东南大学学报 (英文版), 2015, 31(2): 254-258. DOI: 10.3969/j.issn.1003-7985.2015.02.017.
Liu YY, Xiang K, Li Y, et al. Composite bioabsorbable vascular stents via 3D bio-printing and electrospinning for treating stenotic vessels[J]. J Southeast Univ (Engl Edit), 2015, 31(2): 254-258. DOI: 10.3969/j.issn.1003-7985.2015.02.017.
- [12] Villar G, Graham AD, Bayley H. A tissue-like printed material[J]. Science, 2013, 340(6128): 48-52. DOI: 10.1126/science.1229495.
- [13] 任卫青, 张志平, 许晓婷, 等. 昆明小鼠胚胎干细胞培养体系的优化 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(2): 316-321.
Ren WQ, Zhang ZP, Xu XT, et al. Optimization of culture system of embryonic stem cells from Kunming mouse[J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2013, 44(2): 316-321.

(收稿日期: 2017-03-31)

(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)