

## 小鼠胰岛与肝脏脱细胞支架三维共培养的实验研究

朱沙俊<sup>1,2</sup>,徐天鑫<sup>1</sup>,王雷<sup>1</sup>,钱海鑫<sup>2\*</sup>,王志伟<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南通大学附属医院普外科,江苏 南通 226001;<sup>2</sup>苏州大学附属第一医院普外科,江苏 苏州 215001)

**[摘要]** **目的:**观测原代小鼠胰岛在小鼠肝脏脱细胞支架上的生长及功能,探讨组织工程学治疗糖尿病的新方法。**方法:**运用灌注法制备结构完整的全肝脏脱细胞支架并检测,运用胶原酶 P 灌注消化法获取小鼠胰岛细胞并行结构和功能完整性分析;将分离纯化的原代小鼠胰岛经门静脉灌入全肝脏脱细胞支架,在三维培养体系培养后进行相关检测。**结果:**肝脏脱细胞支架检测未见细胞结构,胶原结构保存完整。支架内剩余 DNA 定量检测结果为  $(38 \pm 11)\text{ng/mg dsDNA}$ ,生物相容性良好。双硫腙(dithizone,DTZ)染色胰岛呈现特异性猩红色,葡萄糖刺激实验提示在高糖组中培养的原代小鼠胰岛胰岛素分泌功能明显高于低糖组,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );将胰岛移植入肝脏脱细胞支架培养 5 d 后胰岛定植,且胰岛素基因表达显示脱细胞支架三维培养中胰岛素表达水平与平面培养相比,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论:**肝脏脱细胞支架三维培养体系中的胰岛细胞比传统平面培养具有更佳的细胞活力及更有效的胰岛素分泌功能。

**[关键词]** 糖尿病;脱细胞;生物支架;胰岛;移植

**[中图分类号]** R318.14

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)12-1685-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20151203

## Three-dimensional culture of mouse pancreatic islets and liver-derived perfusion-decellularized bioscaffold for potential clinical practice

Zhu Shajun<sup>1,2</sup>, Xu Tianxin<sup>1</sup>, Wang Lei<sup>1</sup>, Qian Haixin<sup>2\*</sup>, Wang Zhiwei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; <sup>2</sup>Department of General Surgery, the First Affiliated of Soochow University, Suzhou 215001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the growth and function of primary mouse islets in the liver decellularized bioscaffold (LDB), and explore the new method of tissue engineering for treatment of diabetes. **Methods:** We perfused the whole mouse liver using detergent through hepatic portal vein in a continuous way and manufactured the whole LDB with the complete structure. The collagenase P was perfused into the mouse common bile duct, and the number of the isolated islets was counted and the integrity of the islets' structure and function were analyzed. The isolated primary mouse islets were transplanted into the LDB and cultured for 5 days in the three-dimensional culture system. Then we applied HE staining, insulin immunohistochemical analysis and fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Results:** The LDB maintained their original round shape after decellularization and demonstrated a complete lack of nuclear staining and blood vessel. Collagenase 1 fluorescent staining showed that the collagen structure intact. The DNA quantification showed  $(38 \pm 11)\text{ng/mg dsDNA}$  in dry weight of ECM. In vivo biocompatibility test of the LDB showed that there didn't exist any pathological presentation. The result of dithizone (DTZ) staining showed that the staining islets had the scarlet color. Glucose stimulation test showed that high quality islets results in a greater insulin stimulation at high glucose concentration than that observed at low glucose concentration ( $P < 0.01$ ). Insulin immunohistochemistry examination showed that the LDB parenchyma in transplanted area had brown stain. Insulin gene expression displayed the expression level of insulin in LDB was two times greater than the level of plate culture with statistical significance ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** In LDB 3D culture system, islets showed better cell viability and more effective insulin secretion function than traditional plate culture.

**[Key words]** diabetes; decellularization; bioscaffold; islets; transplantation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1685-1690]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81471801)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qianhaixin@hotmail.com

外源性胰岛素治疗可以有效预防 1 型糖尿病急性代谢失代偿,但是只有不到 40% 的患者能够达到治疗目的并维持疗效,且其并不能彻底有效地治愈糖尿病<sup>[1]</sup>。胰岛细胞或全胰腺移植可以有效地改变这种状态,然而临床应用中胰岛供体来源短缺、胰岛的提取效率不足、炎症介导的宿主反应以及自体免疫性疾病的复发等问题严重影响其临床推广<sup>[2]</sup>。

目前已有研究表明在胰岛分离纯化后,各种人工合成材料如聚乙醇酸纤维支架以及细胞外基质凝胶制造的微支架可以恢复胰岛细胞和细胞外基质环境之间的关联<sup>[3-4]</sup>。随着组织工程和再生医学的发展,三维脱细胞生物支架为细胞移植及器官再造提供了全新的技术支持<sup>[5]</sup>。目前,这项技术已经成功地应用在了耳蜗、肝脏、肺、食管等<sup>[6-10]</sup>器官再造领域。肝脏脱细胞支架具备完整且清晰的循环管路支撑结构,其完整的细胞外基质构架在生理、生化和几何空间方面都更适宜细胞和组织的生长。其中蛋白质、多糖以及特定的生长因子和细胞因子是基质构架的主要成分,有利于细胞的定植和成熟分化。脱细胞支架同时还能保留大体循环脉管结构,可动态灌注培养液的同时也有助于定植细胞分化为器官特异的表型。换言之,全器官脱细胞支架包含了细胞生长和功能发挥所必不可少的周围信息环境,是最适合细胞生长的 3D 构架。

本研究通过灌注脱细胞技术制备全肝脏脱细胞支架作为移植平台,分离纯化小鼠胰岛,利用全肝脏脱细胞支架保留丰富脉管网络的特点,将分离的小鼠胰岛与肝脏脱细胞支架建成三维培养体系,观察胰岛细胞在支架内定植、存活及功能发挥。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康成年雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 25~30 g,由南通大学实验动物中心提供 [动物许可证号:SYXK (苏)2012-0031],实验符合动物实验标准。RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),Ficoll 400、戊巴比妥钠、Triton X-100、ammonia、双硫脲(dithizone,DTZ)试剂(Sigma 公司,美国),兔抗小鼠胰岛素抗体、羊抗兔荧光二抗(Abcam 公司,英国),细胞培养皿、培养瓶(Corning 公司,美国),胶原酶 P、血糖仪(Roche 公司,瑞士),微量 RNA 提取试剂盒(Omega 公司,美国),PCR 试剂盒(Fermentas 公司,立陶宛),体视显微镜(Leika 公司,德国),蠕动循环泵(MasterFlex L/S 公司,美国),正置、倒置荧光

显微镜(Olympus 公司,日本),CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Nu-aire 公司,美国),PCR 扩增仪(Bio-Rad 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 肝脏脱细胞支架的制备及检测

健康成年 C57/BL6J 小鼠,1%戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 剂量对其行腹腔注射麻醉。消毒,进腹,暴露门静脉,采用 27G 规格针头穿刺门静脉,丝线固定;将预先配置好 1% TritonX-100/0.1% ammonia 洗涤液经门静脉灌注流经整个肝脏,速度为 3 mL/min,用去离子水冲洗 1 h,10%胎牛血清和双抗灌注 48 h; $\gamma$  射线照射消毒,行胶原荧光染色,扫描电镜下观察,为检测支架的组织相容性,将约 1 cm<sup>3</sup> 脱细胞支架组织与肌肉组织四角缝合后关闭切口,分别于 3、7 及 14 d 后将小鼠处死,将移植物连同周围的皮肤和肌肉一同取下,置入 10%中性福尔马林溶液中固定,备行组织学 HE 染色。

#### 1.2.2 小鼠胰岛的分离纯化

麻醉小鼠,消毒,进腹,暴露胰腺及胆总管,在胆总管进入十二指肠处将其夹闭;体视显微镜下采用 30G 规格针头穿刺胆总管,缓慢注入胶原酶 P 溶液 3 mL,剪除剥离胰腺组织,置于备好的 50 mL 离心试管中,37℃水浴静止消化后,过滤,离心收集沉淀。将分离的胰腺组织沉淀混悬于 10 mL 25%的 Ficoll 400 溶液中,依次加入 23%、20%和 11%的 Ficoll 400 溶液各 5 mL。离心后收集 20%~11%界面上的细胞层,保留 23%~20%界面细胞层,10%胎牛血清 Hanks 液洗涤离心保留沉淀。显微镜下观察胰岛的产量及质量;10  $\mu$ L 移液器吸取形态完整的胰岛至含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 1.2.3 小鼠胰岛 DTZ 染色并计数

用 DTZ 对胰岛细胞进行特异性染色,计算胰岛产量及纯度(计数视野内染色细胞团的数目及未染色细胞团数目)。

#### 1.2.4 小鼠胰岛胰岛素免疫荧光检测

将胰岛在 4%多聚甲醛(4% PFA)中固定 24 h,取材、石蜡包埋,5  $\mu$ m 连续切片,70℃烘片 40 min,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,将切片置于 PBS 溶液中利用抗原修复仪在 99℃条件下修复 22 min,PBS 洗涤,抗体稀释液洗涤 2 次;封闭液封闭细胞。将一抗兔抗小鼠胰岛素多克隆抗体(1:100)稀释在抗体稀释液中,加到样品上,4℃放置过夜。PBS(0.1% TritonX-100)洗涤细胞 3~5 次;将二抗羊抗兔 IgG (1:1 000)稀释液滴加到样品上,室温孵育 1 h,BSA

洗涤 3 次;室温避光条件下放置约 30 min,玻片晾干,滴加少量封片剂(含 DAPI)于样品组织处,加盖玻片。立即将制备好的玻片置于荧光显微镜下观察,分别于紫外激发光和绿色激发光下拍取细胞核(DAPI 蓝色)和胰岛素(红色)。

### 1.2.5 分离胰岛葡萄糖刺激实验

将分离获取的胰岛于培养基中培养 2 h 后吸去培养液,加入 KRB 缓冲液,37℃预培养 1 h;吸去缓冲液,加入不同浓度的 KRB 缓冲液(低糖含 2.5 mmol/L 无血清培养基及高糖含 25 mmol/L 葡萄糖无血清培养基)继续 37℃培养 1 h;将缓冲液收集放入-80℃冰箱保存待用;测试前 30 min 将收集液和试剂盒取出,平衡至室温;以 1:10 配好酶结合物稀释液,以 1:20 配好双蒸水稀释洗涤液;96 孔板中每孔加入 10  $\mu$ L 标准品和样本;每孔加入酶结合物稀释液 100  $\mu$ L,在室温下摇床反应 2 h;每孔 350  $\mu$ L 洗涤液洗 6 遍;每孔加入 200  $\mu$ L 显色液并避光孵育 15 min;每孔加入 50  $\mu$ L 终止液并充分混匀;多功能酶谱仪 450 nm 测量结果。

### 1.2.6 胰岛/肝脏脱细胞支架三维共培养

挑选出形态完整的胰岛 200 个经静脉植入脱细胞支架中;将支架置于三维共培养体系中,培养基经门静脉循环灌注培养 5 d;第 6 天将脱细胞支架取出进行下一步检测。将组织投入预先配好的 10%福尔马林溶液使组织、细胞蛋白质变性凝固;常规脱水、透明、石蜡包埋,连续 8  $\mu$ m 切片后 HE 染色。

### 1.2.7 胰岛素免疫组化检测

将移植胰岛的脱细胞支架于 10%福尔马林溶液中固定 48 h;石蜡包埋切片,片厚 10  $\mu$ m,常规脱蜡,PBS 洗 3 次 $\times$ 3 min;用热诱导修复(微波 3 档 20 min),室温自然冷却,PBS 洗 3 次 $\times$ 3 min;0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下抑制内源性过氧化物酶 20 min;PBS 洗 3 次 $\times$ 3 min;20%正常羊血清室温孵育 30 min,不洗;滴加一抗兔抗小鼠胰岛素多克隆抗体(1:100 稀释)37℃孵育 2 h;PBS 洗 3 次,每次 3 min;EnVision 试剂 37℃ 30 min;PBS 洗 3 次 $\times$ 3 min;DAB 显色 8~12 min;苏木素染色,热水蓝化;吹干后,树脂封片;显微镜镜检。

### 1.2.8 平面培养及三维培养中胰岛素基因检测

按微量 RNA 提取试剂盒说明书提取平面培养的胰岛细胞和三维培养的细胞 RNA,分光光度计测定  $D(260\text{ nm})$  及  $D(280\text{ nm})$  值,计算 RNA 浓度并鉴定 RNA 纯度后试剂盒进行逆转录。应用 Primer5.0 软件设计 Insulin 1 引物:Forward primer:5'-AC-TATAAAGCT GGTGGGCATC-3';Reverse primer:5'-

GGGACTTGGGTGTGTAGAAGA-3'; Insulin 2 引物 Forward primer:5'-CAAGCAGCACCTTTGTGGTT-3'; Reverse Primer:5'-AAGGTCTGAAGGTCACCTGC-3'(由上海生工生物工程技术有限公司合成)。PCR 扩增反应条件:94℃预变性 5 min;后经 35 个循环的 94℃变性 30 s,61~62℃退火 30 s,72℃延伸 30 s;最后 72℃总延伸 10 min。

### 1.3 统计学方法

每组数据来自 3 次独立的实验,所有数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 STATA7.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析。以  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝脏脱细胞支架制备及检测结果

肝脏脱细胞支架经双蒸水灌洗后由暗红色变成粉红色(图 1A、B),其内的血细胞完全冲洗干净。后用 1% TritonX-100/0.1% ammonia 溶液灌注后立体肝脏呈现透明状,其内可见血管网络(图 1C)。

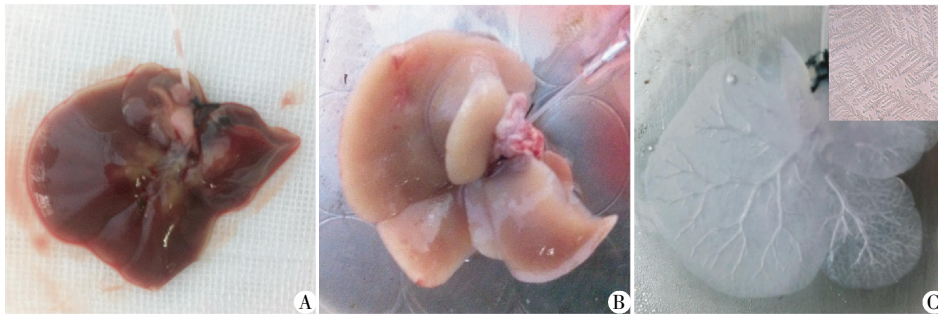
小鼠肝脏及肝脏脱细胞支架的 HE 染色结果显示,经 1% TritonX-100/0.1% ammonium 溶液灌注后,肝脏脱细胞支架内无核染细胞(图 2A),支架剩余 DNA 定量检测为(38 $\pm$ 11)ng/mg dsDNA。小鼠肝脏及肝脏脱细胞支架的扫描电镜,其结果显示肝脏脱细胞支架内胶原结构成分保存完整,未找到明显细胞成分(图 2B)。小鼠肝脏脱细胞前后的胶原 I 荧光显色,其结果显示经洗涤剂灌洗过的脱细胞支架能够保存胶原结构及成分(图 2C)。

小鼠肝脏脱细胞支架种植在小鼠背部皮下,于 3、7、14 d 分别取出做组织学 HE 染色,其结果显示在移植 3 d 后,移植区的中性粒细胞数量明显上升,出现炎症反应。第 7 天,炎症反应有所减轻,中性粒细胞数量明显下降。第 14 天,移植区未找到明显的多核巨细胞的存在,无异物排斥反应。移植区可以看到有新生毛细血管形成(图 3)。

### 2.2 小鼠胰岛的分离纯化及检测

经胶原酶 P 灌注消化、分离提纯后的小鼠胰岛,在显微镜下观察其形态完整,有包膜包裹,大小从 100~300  $\mu$ m 不等。分离提纯的胰岛经 DTZ 染色后,显微镜下观察显示胰岛由原先的黄褐色变成猩红色,其结果显示胰岛形态完整、纯度较高(图 4A、B)。胰岛素免疫荧光特异性染色可以观察到红色标记的胰岛素及蓝色核染(图 4C、D)。

对分离提纯的胰岛进行葡萄糖刺激实验,其



A: 未经处理的小鼠离体肝脏,门静脉插管留置待灌注液灌注;B:经双蒸水灌注后的小鼠离体肝脏;C:经1%Triton X-100/0.1% ammonia 脱细胞溶剂灌注后的肝脏脱细胞支架。

图1 小鼠肝脏脱细胞支架

Figure 1 Mouse liver scaffold fabrication

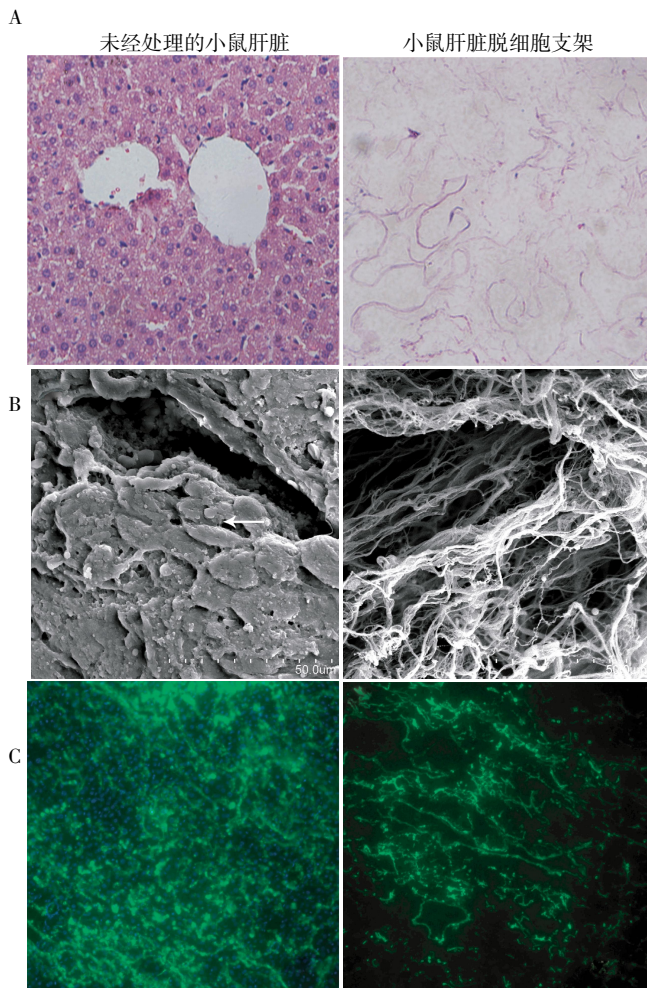


图2 肝脏脱细胞支架 HE 染色(A, ×200)和电镜检查(B, ×1 000)和荧光染色结果(C, ×100)

Figure 2 HE staining (A), scanning electron microscopy (B) and collagen I immunofluorescent staining (C) of native liver and decellularized liver

结果显示用胶原酶 P 灌注消化法所提取的胰岛,用 25 mmol/L 的葡萄糖刺激后,胰岛素分泌量较 2.5 mmol/L 葡萄糖刺激增加 [(26.24 ± 1.18)ng/mL vs. (4.63 ± 0.35)ng/mL,  $P < 0.01$ ], 表明胰岛素分泌

功能良好。

### 2.3 胰岛平面培养与三维培养

分离纯化的胰岛在二维平面培养皿中呈现聚集生长,部分胰岛中心在培养第3天已出现坏死征象(图5A);定植于脱细胞支架中的胰岛细胞,其中心未见黑色暗区(图5B)。

### 2.4 胰岛与肝脏脱细胞支架共培养后相关检测

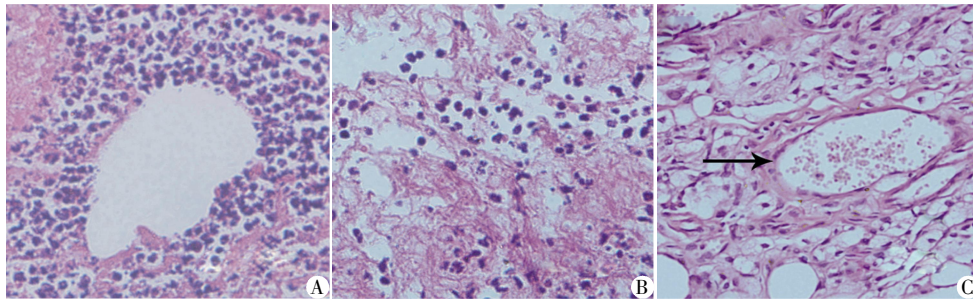
将小鼠胰岛与肝脏脱细胞支架三维培养5d后,将共培养组织块取出做组织学检测。小鼠胰岛可以成功定植在脱细胞支架毛细血管网中,并且其形态完整(图6A)。移植的胰岛细胞内可见内分泌颗粒,细胞形态完好,未见坏死征象(图6B)。胰岛素免疫组化染色,可见棕褐色的特异性染色(图6C、D),表明其胰岛素分泌功能良好。

对相同数量的胰岛进行平面二维培养和三维立体培养5d后,分别对其 Insulin1 和 Insulin2 的表达进行检测,相对于平面培养,Insulin1、Insulin2 在三维培养中的表达分别是其4倍和2倍,其差异具有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ ,图7)。

## 3 讨论

目前的糖尿病细胞移植治疗依然面临着移植细胞效能不佳,移植后存在免疫排斥等诸多问题。近年来,如何提高种子细胞体外培养的效能,使其更好地用于细胞移植一直是研究的热点。随着对人工合成材料研究的进一步深入,越来越多的生物材料用于组织工程及再生医学的研究<sup>[1]</sup>。相比人工合成材料,天然脱细胞生物支架具有完整的脉管系统及胶原成分,并且能高度模拟细胞在体内的生长环境,更有利于细胞生长<sup>[12-14]</sup>。

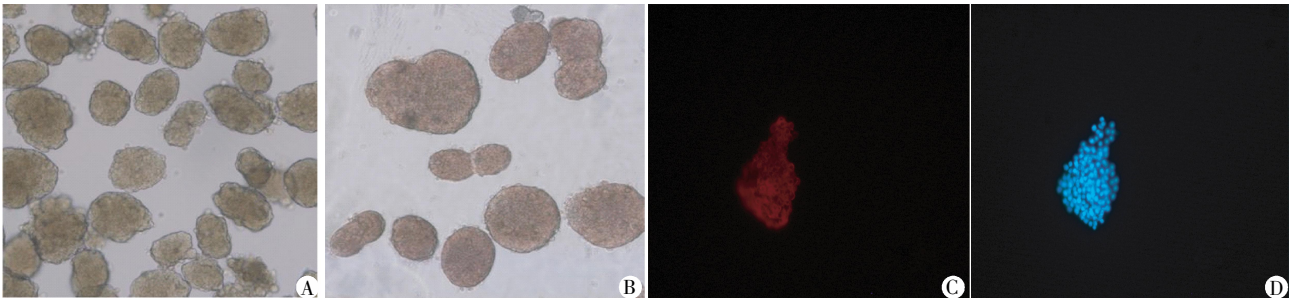
本实验拟初步探讨肝脏脱细胞支架是否具有为胰岛细胞定植并促进其生长及胰岛素分泌的潜



A: 3 d; B: 7 d; C: 14 d, 箭头所示为新生的毛细管。

图 3 肝脏脱细胞支架移植区 HE 染色结果( $\times 200$ )

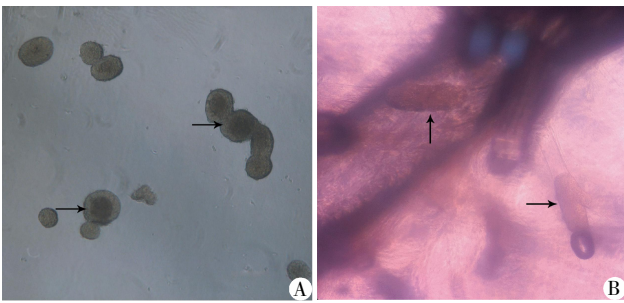
Figure 3 Hematoxylin and eosin staining of the transplanted decellularized liver( $\times 200$ )



A: DTZ 染色前胰岛为黄褐色; B: DTZ 染色后胰岛呈现猩红色; C、D: 胰岛素免疫荧光特异性染色, 显微镜下可以观察到红色标记的胰岛素及蓝色核染。

图 4 胰岛素 DTZ 染色( $\times 200$ )与胰岛素荧光染色结果( $\times 100$ )

Figure 4 IF staining demonstrated the presence of the isolated pancreatic islet constituents( $\times 100$ )

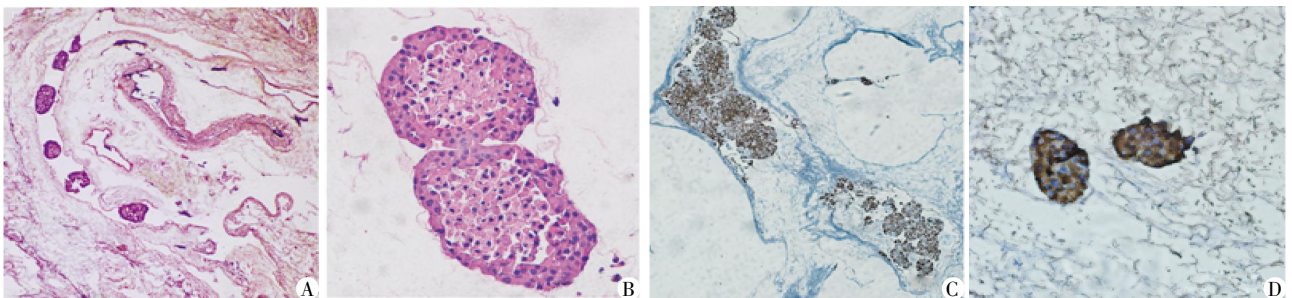


A: 平面培养, 箭头示坏死; B: 三维立体培养, 中心未见黑色暗区。

图 5 不同培养方式的结果观察( $\times 100$ )

Figure 5 The different results of 2D and 3D culture preculture( $\times 100$ )

在能力。实验中移植所用的胰岛是小鼠胰腺经胶原酶胆总管灌注消化, 密度梯度离心纯化所得的原代胰岛。前期实验中我们通过对分离胰岛的平面培养, 发现培养 1 d 后, 部分胰岛中央出现坏死的暗色区域, 无遮光性, 且多见于直径较大的胰岛。3 d 后大部分胰岛会出现这种情况。经过反复试验, 排除胰岛在分离纯化过程中所造成的机械损伤, 推测直径较大的胰岛中央细胞可能由于不能够汲取足够的营养及氧供, 最先出现坏死。培养 3 d 后大部分胰岛被膜出现破口, 胰岛细胞溢出, 镜下观察细胞状态不佳, 培养皿中出现细胞碎片。相对于三维支架培养, 二维平面培养体系效能相对较差。因此, 本实



A、B: HE 染色; C、D: 免疫组化染色。

图 6 共培养支架移植后组织学染色结果观察(A、C,  $\times 200$ ; B、D,  $\times 400$ )

Figure 6 HE and Immunohistochemistry staining of the transplanted islets after cultured in the LDB(A、C,  $\times 200$ ; B、D,  $\times 400$ )

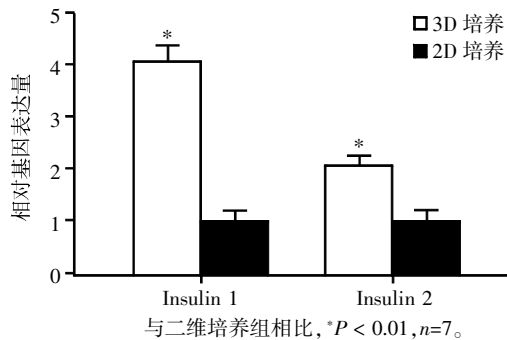


图 7 二维和三维培养胰岛中 *insulin1* 和 *insulin2* 表达检测  
Figure 7 The different results of insulin expression in the 2D and 3D culture

验中将分离胰岛移植入肝脏脱细胞支架内进行三维培养,监测其生长情况及功能发挥,验证三维立体培养是否有利于细胞生长。

本实验中我们通过将胰岛经门静脉注射进入肝脏脱细胞支架建立三维共培养体系,证明原代胰岛细胞在三维培养体系中的生长情况要明显优于传统平面培养。为满足胰岛细胞生长的高氧需求,本实验使用三维培养仪器,其能模拟肝脏脱细胞支架在体内的血供为细胞提供充分的养料并完成代谢。与传统的静态平面培养不同,生物反应器的目的是提供最佳水平持续稳定的动态微环境,其可以保证物质传递、氧含量和细胞培养的最低压力。实验结果显示三维培养体系中 *Insulin* 的表达水平明显高于平面培养,说明肝脏脱细胞支架三维培养体系适合胰岛细胞的生长。免疫组化结果显示胰岛细胞与肝脏支架三维共培养 5 d 后依旧具有良好的胰岛素分泌功能。因此,与二维平面培养相比,经三维培养的胰岛细胞具有更佳的细胞活力及胰岛素分泌功能。

肝脏脱细胞支架可以作为一个优质的细胞定植平台,以支持细胞生长分化及功能发挥,为器官移植供体提供替代性来源。其天然肝脏的结构及血管通道,可允许内分泌细胞分泌的功能性蛋白进入机体的循环系统。通过本研究,为胰岛细胞选择获取结构和功能更好的植入平台,后期研究中将分离获取血管内皮祖细胞,以胰岛细胞为种子细胞共同移植入肝脏脱细胞支架,依托内皮祖细胞定植于脉络化支架内,为种子细胞生长提供更好的载体平台,为体外生物器官支架构建提供进一步的理论依据。

#### [参考文献]

[1] Monnier L, Colette C, Dejager S, et al. Magnitude of the dawn phenomenon and its impact on the overall glucose exposure in type 2 diabetes: is this of concern [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(12): 4057-4062

- [2] Ahearn AJ, Parekh JR, Posselt AM. Islet transplantation for type 1 diabetes; where are we now [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015, 11(1): 59-68
- [3] Scharp D W, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 67-68(1): 35-73
- [4] Daoud JT, Petropavlovskaja MS, Patapas JM, et al. Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three-dimensional microfabricated scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1536-1542
- [5] 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
- [6] Santi PA, Johnson SB. Decellularized ear tissues as scaffolds for stem cell differentiation [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2013, 14(1): 3-15
- [7] 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 Method*, 2013, 19(8): 642-651
- [8] Hoganson DM, Bassett EK, Vacanti JP. Lung tissue engineering [J]. *Front Biosci*, 2014, 19: 1227-1239
- [9] Totonelli G, Maghsoudlou P, Georgiades F, et al. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration [J]. *Pediatr Surg Int*, 2013, 29(1): 87-95
- [10] Goh SK, Bertera S, Olsen P, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(28): 6760-6772
- [11] Lowe SB, Tan VT, Soeriyadi AH, et al. Synthesis and high-throughput processing of polymeric hydrogels for 3D cell culture [J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(9): 1581-1601
- [12] 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
- [13] 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
- [14] Nakamura S, Ijima H. Solubilized matrix derived from decellularized liver as a growth factor-immobilizable scaffold for hepatocyte culture [J]. *J Biosci Bioeng*, 2013, 116(6): 746-753

[收稿日期] 2015-05-03