

• 综 述 •

三维打印技术在肝脏外科和肝毒性评价中的研究进展



姚凤 综述 林蓉 审校

西安交通大学 医学部 药理学系 (西安 710061)

【摘要】 三维(3D)打印作为一种新兴的快速成型技术,已广泛应用于生物医学领域。3D打印最初在医学中主要用于可视化模型、模具的构建,但随着生物医学领域3D打印技术的发展,该技术逐渐应用在复杂组织再生和器官重构等方面,通过生物3D打印获得的人工组织和器官,有望用于器官移植以及进行新药研发和药物毒性评价等医药学相关的研究。本文重点阐述了3D打印技术在肝脏外科中的个体化应用,并重点介绍了生物3D打印技术在肝移植、药物肝脏代谢和肝毒性评价中的研究进展,并进一步对其未来发展趋势进行了展望。

【关键词】 三维打印;肝移植;药物代谢;肝毒性

Research progress of three-dimensional printing technology in liver surgery and hepatotoxicity evaluation

YAO Feng, LIN Rong

Department of Pharmacology, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, P.R.China

Corresponding author: LIN Rong, Email: linrong@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 Three-dimensional (3D) printing, an emerging rapid prototyping technology, has been widely used in biomedical field. 3D printing was originally used to construct the visualization models and molds in medicine. With the development of 3D printing in biomedical field, the technology was gradually applied in complex tissue regeneration and organ reconstruction. Artificial tissues and organs obtained by 3D printing are expected to be used for organ transplantation, new drug development and drug toxicity evaluation in the field of medicine and health care research. This paper describes the individualized application of 3D printing technology in liver surgery and introduces the research progress of 3D bioprinting technology in liver transplantation, drug metabolism and hepatotoxicity evaluation, and prospects its future development trend to provide a reference for further study.

【Key words】 three-dimensional printing; liver transplantation; hepatotoxicity; drug metabolism

引言

三维(three dimension, 3D)打印技术是基于“增材制造”的原理,通过计算机辅助设计模型,在计算机控制下将材料逐层沉积或黏合的方式直接制备具有复杂外形或特殊内部结构实体的快速成型技术^[1]。随着3D打印技术的发展,应用此技术打印皮肤、耳朵、鼻子、微型人体肾脏、肝脏等人体器官已经成为可能。生物3D打印技术是3D打印技术最前沿的领域之一。它是基于3D打印的基

础上,以活性材料包括活体细胞、生长因子、生物材料等为主要内容,以获得所需的人工组织和器官为目标的新型再生医学工程技术。最早3D打印技术是用于构建医学模型、医疗器械及永久性植入物;随着技术的发展,在3D打印的支架上已可以通过种植细胞获得组织和进行器官的重构;而最新发展的3D打印技术是将细胞和支架同时打印,从而构建所需的人工组织和器官。目前,通过生物3D打印技术制造出微型肝脏、心脏、肾脏、血管等组织和器官已应用到生物医学相关领域。

肝脏作为人体内最大的实质器官以及重要的物质代谢和解毒器官,在维持机体生理功能中起着至关重要的作用^[2]。3D打印技术能通过影像学资

DOI: 10.7507/1001-5515.201710074

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81770459)

通信作者:林蓉, Email: linrong@mail.xjtu.edu.cn

料构建出患者的肝脏仿真模型,通过术前模拟,可实现精准化、个性化的手术治疗。此外,供体的极度短缺限制了肝移植技术在临床的广泛应用,通过生物 3D 打印技术重构出可供人体移植使用的人工肝脏就非常有价值和意义。另一方面,在新药进入临床使用前,往往需要进行大量的动物实验,成本高,且与人体存在较大差异,导致动物实验难以准确地体现药物的治疗作用和毒性反应,利用生物 3D 打印技术构建活体肝脏组织进行相关研究,可以更准确地模拟人体对药物的反应,有利于新药研发和药物毒性评价研究的开展。因此,本文对 3D 打印技术在肝脏外科中的个体化应用进行了阐述,并介绍了生物 3D 打印技术在肝移植、药物肝脏代谢和肝毒性评价中的研究进展,为生物 3D 打印技术在肝脏外科、新药研究以及相关领域的研究和应用提供参考。

1 3D 打印技术在肝切除术中的个体化应用

在临床进行肝切除术时,对肝脏中血管、胆管和肿瘤等组织进行精确定位以及明确其相互关系十分重要。在 3D 打印技术出现之前,外科医生只能通过医学成像技术评估各组织器官的相对位置以及与邻近血管的关系^[3]。然而,对于病灶情况复杂或者一些特殊位置的病灶,往往存在肿瘤与肝动脉、肝静脉及门脉分支位置不清的情况,而医学成像技术不能完整显示其内部真实情况,导致手术过程中肝脏体积切除过大,而残余肝体积不足以维持肝脏的正常功能,从而引发肝衰竭等并发症。而 3D 打印技术通过构建个体化肝脏模型,精确评估肝脏的解剖结构,明确病灶及其与周围血管的关系,可有效应用于精准的个体化肝切除手术中。

Igami 等^[4]报道了 2 例结肠癌发生肝转移的病例,他们通过增强计算机断层扫描发现了化疗后缩小的肝脏转移灶,进一步应用 3D 打印技术构建出肝脏转移灶的仿真模型,从而获得了肝脏转移灶的精确定位,提高了肝切除术的成功率。2015 年 Xiang 等^[5]报道了一个罕见的门静脉变异病例,他们在手术前通过 3D 打印技术获得了患者的肝脏模型,通过在肝脏模型上进行个性化分割、体积计算和虚拟操作发现,患者起源于门静脉右前支的 S4 段门静脉缺失,如果忽略了这一变异而进行右半肝切除术,则残余肝体积仅剩余 21.37%,但保留门静脉右前支而进行右肝部分切除术,则残余肝体积有 57.25%,大大降低了发生肝衰竭等并发症的风险。越来越多的研究也提示,通过 3D 打印技术可以获

得患者肝脏个体化模型,外科医生更易了解患者复杂解剖结构的详细信息,以便实现对病灶的精确定位,从而有利于确定手术路线,达到个体化和精准治疗的目的^[6-8]。

此外,3D 打印技术已经成为人体解剖教学中一种新型的辅助教学方法,在医学教育中发挥着重要的作用^[9-10]。Jones 等^[11]发现,将 3D 打印技术用于人体解剖教学中,通过从立体角度向学生展示人体器官、结构和位置,能有效地帮助学生提高对复杂器官的认识,从而提高教学质量及学生满意度。总之,基于影像学数据,通过 3D 打印技术构建出肝脏仿真模型,可以让外科医生、医学生及患者等从立体角度上充分认识肝脏,有助于教学互动及医患沟通。

2 3D 打印技术在肝移植中的个体化应用

迄今为止,对于终末期肝病、肾衰竭等医学难题,临床上行之有效的治疗方式仍为器官移植手术,然而器官移植一直以来都存在着捐献的器官往往供不应求,异体器官移植易出现排斥现象等问题。近年来,随着 3D 打印技术在生物医学领域的发展,器官移植所面临的难题有了解决的可能。

相比其他的组织工程技术,3D 打印技术具有复杂外形与可控内部微结构一体化制造的优势,能将生物材料加工成具有良好生物相容性的器官支架,通过在器官支架上种植细胞,有望构建具有生物学功能的活体组织或器官。Huang 等^[12]采用激光烧结技术构建了 3D 通道支架,结果发现,3D 通道支架上肝细胞的葡萄糖消耗和白蛋白分泌均随着时间增加而增加,循环灌流增加了 3D 通道内肝细胞的葡萄糖消耗和白蛋白分泌,且与静态条件比较差异具有统计学意义,提示 3D 打印技术构建的 3D 通道支架能维持肝细胞良好的代谢能力。Zhong 等^[13]应用肝损伤并伴有三分之二肝切除的小鼠进行研究,结果发现,腹腔植入了不带肝细胞生物支架的小鼠最多可存活 17 d,而植入带有肝细胞生物支架的小鼠存活时间更长,最多可存活 26 d,进一步说明通过在 3D 支架上种植细胞的方式有再造体外肝脏的潜力。然而由于该方法存在一定的局限性,如种植的细胞在生物支架上无法均匀分布以及种植的细胞类型单一等,因此,再生医学科学家进一步利用含有活体细胞的“生物墨水”为材料,打印出具有生物活性的立体细胞组织架构。Wang 等^[14]通过低温沉积制造技术构建了多层肝细胞结构,结果发现,多层肝细胞结构中肝细胞仍可大量存活,

并维持白蛋白、尿素和甘油三酯的合成长达 45 d 以上,说明生物 3D 打印技术构建的多层肝细胞结构具有较久维持肝细胞合成功能的能力,有望构建具有良好功能的体外肝脏组织。最近, Kang 等^[15]以肝样细胞和水凝胶作为“生物墨水”,应用生物 3D 打印技术完成肝脏组织的构建,该研究发现,移植进小鼠腹腔的肝脏组织中的肝样细胞数量增多、白蛋白表达增强,且与体外的肝脏组织相比差异具有统计学意义,进一步说明生物 3D 打印技术构建的肝脏组织在体内也具有良好的生物活性,有望用于肝移植。以上研究表明,通过在 3D 支架上种植细胞获得组织或器官,或者通过生物 3D 打印技术直接打印组织或器官这两种方式,均能重构具有良好功能的体外肝脏组织,且有望用于肝移植,从而延长人类寿命。

虽然通过生物 3D 打印技术构建可供移植的组织或器官目前还存在一些问题亟待解决,但临床上已成功应用 3D 打印的肝脏仿真模型用于肝移植的术前规划和术中指导。Zein 等^[16]通过 3D 打印的肝脏模型可成功评估血管及胆管的解剖结构,从而减少了肝移植手术中的冷缺血时间,增加了肝移植手术的成功率。3D 打印技术不仅在成人肝移植中有重要作用,在儿童肝移植中也有突破性进展。Soejima 等^[17]应用喷墨打印技术,打印了患有先天性胆道闭锁患儿的腹腔仿真模型和患儿父亲的肝脏仿真模型,通过腹腔仿真模型对患儿腹腔容积进行了精确测定,再根据患儿腹腔容积对肝脏仿真模型进行术前模拟修整,最终成功将患儿父亲提供的适当大小的肝脏组织移植给了患儿,且避免了由于供肝体积过大而导致的并发症。因此,3D 打印技术通过构建肝脏仿真模型,能精确地提供供肝的体积信息和可视化的内部结构,有效避免对肝脏周围组织造成人为损伤以及避免产生不必要的并发症。总之,3D 打印技术的使用不仅有助于实现精准化、个性化的移植手术,并且有望实现体外培养发育形成可供移植的组织或器官,而且如果使用患者自身的细胞,不仅不会产生免疫排斥现象,还能有效地解决器官供不应求的问题,促进人造人体器官的发展。

3 生物 3D 打印技术在药物肝脏代谢中的应用

肝脏是药物代谢的主要器官,具有多种参与药物代谢相关的酶和转运体。虽然传统二维(two dimension, 2D)细胞培养模型在药物代谢研究中已经显示出了巨大潜力,但是 2D 培养的细胞是平面

生长的,缺乏细胞与细胞外基质以及细胞与细胞间的接触,细胞容易去极化,而且低表达肝药酶和转运体,导致药物代谢研究存在一定的局限性。因此,科学家开始关注细胞的 3D 培养,因为 3D 培养的细胞模型具有更贴近组织器官的立体结构和更好的生物学功能^[18]。其中,生物 3D 打印技术可以构建复杂的肝脏微结构和动态的肝脏微环境,能为药物代谢研究提供更好的方法。Jeon 等^[19]以人肝癌细胞株 HepG2 和海藻酸盐为材料,通过生物 3D 打印技术构建了体外 3D 肝细胞培养模型,研究发现,3D 培养的 HepG2 细胞中脱唾液酸糖蛋白受体 1、酪氨酸氨基转移酶表达水平较高,且与 2D 培养的 HepG2 细胞相比差异具有统计学意义,提示生物 3D 打印技术构建的 3D 细胞培养使肝细胞拥有更强的肝脏基因表达,可用来研究基因表达的变化。Bhise 等^[20]通过生物 3D 打印技术构建了体外微小肝脏,通过流动培养与静态培养两种不同方式的比较,结果发现流动培养的微小肝脏中 HepG2 白蛋白分泌增大、尿素合成增多,提示流动培养条件比静态培养条件更有利于研究肝脏代谢功能。此外, Kim 等^[21]通过生物 3D 打印技术构建了间充质干细胞和肝细胞共存的肝脏组织,结果发现,肝脏组织中间充质干细胞和肝细胞存活 7 d 且无形态学的改变;同时,间充质干细胞和肝细胞共存的肝脏组织白蛋白分泌和尿素合成增加,脱唾液酸糖蛋白受体 1 表达水平提高,且与只含肝细胞的肝脏组织比较差异具有统计学意义,说明间充质干细胞作为辅助细胞,其分泌的细胞因子可为肝细胞的生长提供支持,而采用生物 3D 打印技术进行多细胞打印有利于构建更接近于人体的肝脏组织。这些研究表明,生物 3D 打印技术构建的肝脏组织能更好地维持肝脏功能,同时流动培养有利于模拟体内肝脏微环境。

此外, Kizawa 等^[22]以原代肝细胞和大鼠成纤维细胞为材料,通过生物 3D 打印技术构建了肝脏组织,结果发现,体外肝脏组织能维持细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 的亚型 CYP3A4 的活性高达 50 d。Ma 等^[23]研究也发现,与 2D 细胞培养模型相比,通过生物 3D 打印技术构建的肝脏组织中 CYP3A4 表达水平显著升高,而肝药酶诱导剂利福平使 CYP3A4、CYP2C9 和 CYP2C19 表达水平进一步升高,但有趣的是,在 2D 细胞培养模型中,利福平并没有诱导 CYP3A4、CYP2C9 和 CYP2C19 表达水平的升高,表明生物 3D 打印技术构建的肝脏组织中肝药酶活性更好。Organovo 公

司以肝细胞、肝窦内皮细胞和肝形状细胞为材料,应用自动化的生物打印方法构建了体外肝脏组织,结果发现,利福平的诱导使 CYP3A4 介导的咪达唑仑的代谢显著增加^[24],提示生物 3D 打印技术构建的肝脏组织能进行药物代谢研究。此外, Snyder 等^[25]以人肝癌细胞株 HepG2 和人乳腺上皮细胞株 M10 为材料,通过生物 3D 打印技术构建了肝脏组织,研究发现,加入了前药氨磷汀的肝脏组织中辐射损伤的细胞百分比下降,且与对照组肝脏组织比较差异具有统计学意义,证实了氨磷汀对肝脏的辐射保护作用,表明生物 3D 打印技术构建的肝脏组织可用于进行药物生物转化、作用效果的研究。总之,通过生物 3D 打印技术构建的肝脏组织,不仅能用于研究肝药酶活性,而且能为药物代谢研究提供一个很好的方法。

4 生物 3D 打印技术在药物肝毒性评价中的应用

药物性肝损伤是造成药物研发失败、药物被限制使用甚至撤出市场的主要原因之一,也是引发肝脏疾病的重要原因之一,因此如果能够准确预测由于药物对人体肝脏的损伤而导致的毒性作用就显得尤为重要。生物 3D 打印技术能构建一种形态和功能上更接近于人类真实肝脏的三维组织结构,因而能更好地模拟人体肝脏对药物的反应,利用生物 3D 打印技术构建的活性肝脏组织进行新药肝毒性评价,不仅可以节省研发时间和费用,还能大大减少动物实验的开展。

为了评价药物对肝脏的损伤程度, Organovo 公司应用自动化的生物打印平台构建了肝脏组织,使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的曲格列酮和吡格列酮处理肝脏组织 7 d, 结果发现,具有严重肝毒性的曲格列酮使肝脏组织三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平显著降低了 93%, 而吡格列酮使肝组织 ATP 水平仅降低了 24%, 表明生物 3D 打印技术构建的肝脏组织能敏感地检测药物引起的线粒体功能变化, 进而反映药物对肝功能损伤的程度^[24]。 Bhise 等^[20]使用 15 mmol/L 对乙酰氨基酚处理生物 3D 打印技术构建的肝脏组织 6 d, 结果显示对乙酰氨基酚处理组肝脏组织中白蛋白、转铁蛋白和铜蓝蛋白等水平显著降低, 多药耐药相关蛋白 2 的表达和成核密度也显著降低, 提示通过生物 3D 打印技术构建的肝脏组织能用于检测对乙酰氨基酚等药物引起的肝脏损伤。此外, Nguyen 等^[18]用曲伐沙星或左氧氟沙星处理通过生物 3D 打印技术构建的

肝脏组织, 结果发现, 4 $\mu\text{mol/L}$ 的曲伐沙星就能显著降低肝脏组织的白蛋白和 ATP 水平, 且通过苏木精-伊红染色从形态学上观察到曲伐沙星导致肝细胞坏死; 而左氧氟沙星高达 100 $\mu\text{mol/L}$ 时才导致肝脏组织白蛋白水平的降低, 且对肝脏组织 ATP 水平无影响, 这些进一步表明了生物 3D 打印技术构建的肝脏组织能敏感地反映药物对肝脏的损伤。此外, 他们进一步发现, 在 2D 培养的肝细胞上, 曲伐沙星只有在 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量时, 才能显著降低白蛋白和 ATP 水平, 而在 3D 打印技术构建的肝脏组织中 4 $\mu\text{mol/L}$ 就显著降低了肝细胞的白蛋白和 ATP 水平, 说明通过生物 3D 打印技术构建的肝脏组织对药物肝毒性具有更高的敏感性。因为肝脏特异性标志分子和肝功能变化能反映肝脏的损伤程度, 因此, 应用生物 3D 打印技术构建的肝脏组织可研究药物对肝脏毒性的差异, 将是理想的评价药物肝毒性的模型。

5 发展趋势

本文介绍了 3D 打印技术在肝切除术和肝移植术中的个体化应用, 还重点阐述了生物 3D 打印技术在肝移植、药物肝脏代谢和肝毒性评价中的研究进展。目前, 生物 3D 打印技术发展迅速, 但大部分研究还停留在单细胞打印上, 多细胞打印仍存在较多的技术瓶颈, 其中如何将不同种类和功能的细胞排列在一个特定的 3D 结构中, 从而构建出具有复杂结构的组织或器官并实现其基本的功能是目前最主要的问题。3D 打印技术在肝脏构建方面已取得了一些成绩, 相信在不久的将来, 随着影像学和材料科学的发展, 通过 3D 打印技术构建的肝脏模型的精确度和仿真程度将会不断提高, 而通过生物 3D 打印技术重构的个体化肝脏组织有望应用到肝脏疾病的临床治疗中。

参考文献

- 1 Alkhouri N, Zein N N. Three-dimensional printing and pediatric liver disease. *Curr Opin Pediatr*, 2016, 28(5): 626-630.
- 2 Lee S Y, Kim H J, Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation. *International journal of stem cells*, 2015, 8(1): 36-47.
- 3 Soon D S, Chae M P, Pilgrim C H, *et al*. 3D haptic modelling for preoperative planning of hepatic resection: a systematic review. *Ann Med Surg*, 2016, 10: 1-7.
- 4 Igami T, Nakamura Y, Hirose T, *et al*. Application of a three-dimensional print of a liver in hepatectomy for small tumors invisible by intraoperative ultrasonography: preliminary experience. *World J Surg*, 2014, 38(12): 3163-3166.
- 5 Xiang Nan, Fang Chihua, Fan Yingfang, *et al*. Application of liver

- three-dimensional printing in hepatectomy for complex massive hepatocarcinoma with rare variations of portal vein: preliminary experience. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18873-18878.
- 6 Oshiro Y, Ohkohchi N. Three-dimensional liver surgery simulation: computer-assisted surgical planning with three-dimensional simulation software and three-dimensional printing. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(11/12): 474-480.
 - 7 Witowski J S, Pędzwiatr M, Major P, *et al.* Cost-effective, personalized, 3D-printed liver model for preoperative planning before laparoscopic liver hemihepatectomy for colorectal cancer metastases. *Int J Comput Assist Radiol Surg.*, 2017: 1-8.
 - 8 Choi Y R, Kim J H, Park S J, *et al.* Therapeutic response assessment using 3D ultrasound for hepatic metastasis from colorectal cancer: application of a personalized, 3D-printed tumor model using CT images. *PLoS One*, 2017, 12(8): 11-13.
 - 9 Javan R, Zeman M N. A prototype educational model for hepatobiliary interventions: unveiling the role of graphic designers in medical 3D printing. *J Digit Imaging*, 2018, 31(1): 133-143.
 - 10 Javan R, Herrin D, Tangestanipoor A. Understanding spatially complex segmental and branch anatomy using 3D printing: liver, lung, prostate, coronary arteries, and circle of willis. *Acad Radiol*, 2016, 23(9): 1183-1189.
 - 11 Jones D B, Sung R, Weinberg C, *et al.* Three-dimensional modeling may improve surgical education and clinical practice. *Surg Innov*, 2016, 23(2): 189-195.
 - 12 Huang Hongyun, Oizumi S, Kojima N, *et al.* Avidin-biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network. *Biomaterials*, 2007, 28(26): 3815-3823.
 - 13 Zhong Cheng, Xie Haiyang, Zhou Lin, *et al.* Human hepatocytes loaded in 3D bioprinting generate mini-liver. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*, 2016, 15(5): 512-518.
 - 14 Wang X H, Yan Y N, Pan Y Q, *et al.* Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng*, 2006, 12(1): 83-90.
 - 15 Kang K, Kim Y, Lee S B, *et al.* Three-dimensional bio-printing of hepatic structures with direct-converted hepatocyte-like cells. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(7/8): 576-583.
 - 16 Zein N N, Hanouneh I A, Bishop P D, *et al.* Three-dimensional print of a liver for preoperative planning in living donor liver transplantation. *Liver Transplantation*, 2013, 19(12): 1304-1310.
 - 17 Soejima Y, Taguchi T, Sugimoto M, *et al.* Three-dimensional printing and bio-texture modeling for preoperative simulation in living donor liver transplantation for small infants. *Liver Transpl*, 2016, 22(11): 1610-1614.
 - 18 Nguyen D G, Funk J, Robbins J B, *et al.* Bioprinted 3D primary liver tissues allow assessment of Organ-Level response to clinical drug induced toxicity *in vitro*. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158674.
 - 19 Jeon H, Kang K, Park S A, *et al.* Generation of multilayered 3D structures of HepG2 cells using a bio-printing technique. *Gut Liver*, 2017, 11(1): 121-128.
 - 20 Bhise N S, Manoharan V, Massa S, *et al.* A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*, 2016, 8(1): 014101.
 - 21 Kim Y, Kang K, Yoon S, *et al.* Prolongation of liver-specific function for primary hepatocytes maintenance in 3D printed architectures, 2018: 1-12.
 - 22 Kizawa H, Nagao E, Shimamura M, *et al.* Scaffold-free 3D bio-printed human liver tissue stably maintains metabolic functions useful for drug discovery. *Biochem Biophys Rep*, 2017, 10: 186-191.
 - 23 Ma Xuanyi, Qu Xin, Zhu Wei, *et al.* Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(8): 2206-2211.
 - 24 Rhiannon N H, Deborah G N, Justin R, *et al.* Functional characterization of 3D human liver tissues generated by an automated bioprinting platform. *Faseb Journal*, 2015, 29: LB424.
 - 25 Snyder J E, Hamid Q, Wang C, *et al.* Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip. *Biofabrication*, 2011, 3(3, SI): 34112-34120.

收稿日期: 2017-10-31 修回日期: 2018-06-21

本文编辑: 陈咏竹