

所属学科组	所属亚学科组
医药科学	基础医学与临床

资助编号
7194338

## 北京市自然科学基金资助项目 任务书（青年项目）

项目名称： 人工生物胆道的研发与应用

负 责 人： 金烁

依托单位： 北京清华长庚医院

资助金额： 10 万元

起止年月： 2019.1 至 2020.12

填写日期： 2019-02-24

北京市自然科学基金委员会办公室

**2019 年**

## 填表说明

- 一、填报任务书前，请登陆北京市自然科学基金网站（<http://kw.beijing.gov.cn/jjb/>），查阅市自然科学基金的有关管理规定。认真填写任务书各项内容，要求科学严谨、实事求是、表达明确。外来语应用中文和英文同时表达，第一次出现的缩写词，须注出全称。
- 二、任务书为 A4 纸，任务书正文要求宋体 5 号字，双面打印，于左侧装订成册，一式两份（均为原件），报送北京市自然科学基金委员会办公室。
- 三、填表说明：
  - 1、简表和研究项目组成员登记表（含负责人）依据申请书生成，不允许修改。
  - 2、任务书正文：
    - 1) 一般情况下，任务书正文依据申请书生成，不允许修改。根据资助通知要求，如需修改资助项目任务书正文，须根据原申请书、学科评审组修改意见认真修改。
    - 2) 字数限制：研究目标和内容不超过 1500 字，研究方案不超过 1000 字，预期研究结果及可考核的指标不超过 800 字，年度目标和年度研究计划不超过 1000 字。
  - 3、项目经费使用计划：
    - 1) 项目经费管理按照《北京市自然科学基金项目资助经费管理办法》执行。
    - 2) 项目经费使用计划包括：
      - (1) 直接费用。在项目实施过程中发生的与之直接相关的费用，具体包括：设备费、材料费、测试化验加工费、燃料动力费、差旅费、会议费、国际合作与交流费、档案/出版/文献/信息传播/知识产权事务费、劳务费、咨询费、其他费用。
      - (2) 间接费用。依托单位在组织实施项目过程中发生的无法在直接费用中列支的相关费用，主要包括依托单位为项目研究提供的现有仪器设备及房屋，水、电、气、暖消耗，结题验收、项目经费审计等管理费用及绩效支出等。绩效支出是依托单位为提高科研工作绩效安排的相关支出。
    - 3) 金额用阿拉伯数字表示，以万元为单位，小数点后取两位。
    - 4) 支出内容与计算依据必须填写。

## 简表

负责人信息	姓名（中文）	金烁		姓名（拼音）	Jin Shuo		
	性别	男		民族	汉族		
	出生日期	1989-02-03		电子邮箱	jsa01263@btch.edu.cn		
	办公电话	56119514		手机	18611172714		
	专业技术职务（职称）	主治医师		最高学位	硕士		
	最高学位授予单位	吉林大学					
	研究领域	肝胆胰外科临床研究					
	其他						
依托单位	单位名称	北京清华长庚医院		单位类别	医院		
	隶属关系	市属		邮政编码	102218		
	通信地址	北京市昌平区立汤路 168 号					
	联系人	丁小庆		联系电话	56118577		
	传真	56118500		电子邮箱	lovelylucky@126.com		
合作单位	单位名称			联系人		联系电话	
	北京佰仁医疗科技股份有限公司			金磊		18515091779	
项目基本信息	项目名称（中文）	人工生物胆道的研发与应用					
	项目名称（英文）	The research and application of bioprosthetic bile duct					
	申报学科 1（名称）	消化系统疾病诊疗新技术		申报学科1(代码)	H0322		
	申报学科 2（名称）	肝胆胰结构与功能异常		申报学科2(代码)	H0304		
	依托实验室	部门开放		起止年月	2019.1 至 2020.12		
	研究性质	应用基础研究		资助金额	10 万元		
	所属学科组	医药科学					
	所属亚学科组	基础医学与临床					

## 二、任务书正文

### （一）研究目标和内容

#### 2.1 研究目标：

（1）应用动物源性材料，经化学改性处理后，研制出免疫相容性良好、可在胆汁内环境中长期稳定的动物源性人工生物胆道。

（2）证实人工生物胆道在远期动物实验中体现出良好的免疫相容性、顺应性、机械强度。

（3）证实人工生物胆道在动物试验中体现出良好的生物相容性，即人工生物胆道与犬正常胆道可正常生长融合。

#### 2.2 研究内容：

本研究主要由人工生物胆道研制阶段、动物实验阶段（动物实验、检验学检测、并发症观察）、术后检测阶段（影像学、病理学、免疫学、生物学、机械强度、电镜检测）三部分构成。

**第一阶段：**以牛输尿管为原料经 Triton-X-100/PBS 脱细胞、固定管径、强化交联及抗钙化处理，制成可以进行异种异体移植的人工生物胆道后，4℃保存于 75%酒精中；

**第二阶段：**在犬胆道损伤模型中应用人工生物胆道替换受损胆道行胆道两侧断端与人工生物胆道吻合术。经过长达两年的远期观察中进行术后近期、远期并发症统计及检验学检测。

##### **第三阶段：**

（1）进行术后人工生物胆道组织形态学、病理及免疫等免疫相容性相关独立检测。

（2）进行机械强度、电子显微镜、CK-19 染色等生物相容性相关的对比检测（与空白对照组对比）。

从临床及基础研究等双重角度综合验证与评价人工生物胆道远期的免疫相容性、生物相容性及生物安全性。

#### 2.1.1 第一阶段：人工生物胆道的制备

##### （1）动物组织的取材与预处理

取新鲜牛输尿管，用 Triton-X-100/PBS 方法进行脱细胞处理，去除牛输尿管中的细胞成分。

##### （2）人工生物胆道取材及管径、厚度的调整

用上述处理后的牛输尿管，内置不同内径的支具，以改变人工胆道的管径及厚度，并在戊二醛中固定。

### （3）强化交联与抗钙化改性

将上述改性后符合要求的人工生物胆道进行戊二醛强化交联和抗钙化改性处理制备成可移植的人工生物胆道，以 4℃ 条件保存在 75% 酒精中。以上实验及处理技术与本项目参与单位，北京佰仁医疗科技股份有限公司合作，即采用该公司已上市产品-外科生物补片以及牛心包生物瓣和猪主动脉瓣膜的制造类似的技术。

## 2.1.2 第二阶段：动物实验的实施、近期及远期术后并发症的统计、术后检验学指标检测

### （1）动物实验分组及实施方案

动物实验共分三组进行对照实验。人工生物胆道实验组（24 只比格犬）与空白对照组（12 只比格犬）。实验组行人工生物胆道移植术：环形切除实验组比格犬胆总管约 2cm。将制备好的人工胆道以端端吻合的方式移植入实验组犬模型体内，前壁及后壁均实行端端吻合，即保留 Oddi's 括约肌的犬胆道-人工生物胆道-犬胆道端端吻合术。空白对照组不行任何手术，仅在第三阶段与实验组进行检测指标。

### （2）术后近远期并发症及术后检验学监测部分

术后近期并发症的统计主要包括：①胆漏②肝损害③腹腔感染④腹腔出血

术后远期并发症的统计主要包括：①胆管狭窄②胆管炎③胆汁性肝硬化

临床检验学监测包括常规在术后第 1、3、5、7 天监测各组实验犬血常规、肝功能。此外，在术后第 3、7 日监测实验犬引流液胆红素、腹腔引流液常规。进行各组检验学指标的收集。

## 2.1.3 第三阶段

（1）进行术后人工生物胆道组形态学、影像学、病理及生物因子等独立检测。

（2）进行机械强度、电子显微镜、CK-19 染色、Masson 分析等比检测指标（与空白对照组对比）。

分别于术后 6 月、12 月、18 月后分别解剖 8 只实验犬。将实验组人工生物胆道取出。空白组对应时间点剖检 4 只实验犬，取 2cm 正常胆道进行对比研究。以上两组分别以下独立检测及与空白对照组的对比检测：

**独立检测：**

- ① 形态学检测：取出人工胆道，观察人工胆道内及上、下方吻合口处大体形态改变，内膜是否光滑。两侧吻合口是否有狭窄及瘢痕组织的过度增生。
- ② 影像学检测：剖检术中行胆道造影检查，观察人工生物胆道是否存在狭窄、肝内外胆道是否有结石。
- ③ 病理及免疫组化检测：行 HE 染色、免疫组化分析观察人工生物胆道内是否存在

排斥反应。是否有非典型增生等异常改变。

#### ④ 生物因子检测：

血浆血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF) 检测：评估人工胆道与两端正常胆道吻合口毛细血管再生情况，评估其吻合口血液供应状态。

抗 $\alpha$ -抗肌动蛋白抗体( $\alpha$ -SMA) 检测：可用来标记再生的成纤维细胞，而纤维组织的过度再生可能造成胆道狭窄。因此，此抗体水平可能与胆道狭窄相关，可用来观察人工生物胆道上、下方吻合口的瘢痕状态。

#### 对比检测：

① 机械拉力实验：检测人工胆道机械强度测与正常犬胆道进行对比。

② 电子显微镜检测：应用电子显微镜观察其组织交联程度、间距及组织形态。同时观察两侧吻合口处的组织生长状态并与空白对照组正常犬胆道对比，综合评价其生物相容性。

③ 免疫染色 CK-19 抗体检测，评估人工生物胆道内再生上皮细胞的爬行状态与正常犬胆道组织结构的相似程度。

④ Masson 三色染色分析，观察人工生物胆道内再生粘膜下层组织的连续性，与正常犬胆道对比的差异性。

从临床及基础研究两个方面进行人工生物胆道远期免疫、生物相容性观察，以此说明 人工生物胆道的远期良好的免疫相容性及生物安全性。

以上部分实验组已成功进行了一次预实验，实验组实验犬存活 5 月后剖检，术后病理证实人工生物胆道有少量肌层组织再生，可见内皮细胞的铺入，未见明显排斥反应。这项成功的预实验也为本次的长期的安全性、有效性及对比性研究提供了可靠的研究基础。

### 2.3 拟解决关键科学问题：

(1) 拟突破动物源人工胆道免疫原性的瓶颈，以牛输尿管为原料经脱细胞、强化交联、及抗钙化技术研发出免疫及生物相容性良好、便于术中吻合、可异种异体移植的动物源性人工生物胆道。

(2) 在远期动物实验中通估不同时间点的多元化检测手段，从临床和基础双重角度证实人工生物胆道的免疫相容性、生物相容性及机械强度良好。



## （二）研究方案

### 3.1 研究方案：

(1)人工生物胆道的制备及体外检测：

1) 人工生物胆道的制备：取新鲜牛输尿管，采用 Triton-X-100/PBS 溶液的去细胞方法，完全去除了组织内的间皮细胞、巨噬细胞、脂肪细胞等成分。用上述处理后的牛输尿管，内置不同内径的支具，以改变人工胆道的管径及厚度。应用戊二醛溶液震荡处理 6 日改变其交联程度，最后进行抗钙化技术处理，制成人工生物胆道，置于 75%的酒精、4℃保存。

2) 人工生物胆道的体外检测：机械强度及电子显微镜检测：在生理盐水中浸泡十分钟后，用拉力试验机测定其机械强度。应用电镜进行超微结构分析。

(2)动物实验部分：

1) 实验动物采用比格犬 36 只年龄 1-2 岁，体重 15-18kg，分为两组，其中人工生物胆道实验组 24 只比格犬，空白对照组 12 只比格犬。实验组应用人工生物胆道在犬胆道损伤模型中行受损胆道置换术。空白对照组不行任何手术。

2) 动物麻醉：舒眠宁 0.1ml/kg 肌注或缓慢静脉注射，此后每 15-20 分钟维持一次。头孢曲松 1g+0.9%氯化钠 100ml 静脉输液术前冲击。

3) 手术方案：

人工生物胆道实验组：暴露胆囊，用手术剪剪开胆囊附着在肝脏的脏膜。分离胆囊管和胆总管。结扎胆囊管、胆囊动脉。（如不切除胆囊，术后发生逆行胆囊炎几率较高且术式与临床不符）注意确认胆总管位置。环形切除 2cm 胆道后，将人工生物胆道用 5、6-0 可吸收缝线。前壁及后壁均采用间断外翻缝合。术后于上段胆道-人工生物胆道吻合口上方留置 T 管引流，两周后拔除。应用 3-0 不可吸收缝线逐层关腹。

4) 术后管理：术后予以头孢曲松（2g+0.9%氯化钠 100ml）静点 3 天，12 小时内禁水，24 小时内禁食。每 3 天换药 1 次。12 天后拆线。

5) 术后并发症的统计及检验学指标的检测：

术后近期并发症的统计主要包括：①胆漏②肝损害③腹腔感染④腹腔出血

术后远期并发症的统计主要包括：①胆管狭窄②胆管炎③胆汁性肝硬化

实验室生化指标：常规在术后第 1、3、5、7 天监测各组实验犬血常规、肝功能。此外，在术后第 3、7 日监测实验犬引流液胆红素、腹腔引流液常规。

(3) 人工生物胆道远期检测

解剖后组织学分析：分别于术后 6 月、12 月、18 月后分别解剖 8 只动物。剖检后取出人工生物胆道。空白对照组分别于上述时间点解剖 4 只动物，取正常犬胆管 2cm。将实验组人工生物胆道进行以下①-④项独立检测的同时，与空白对照组的正常犬胆道进行⑤-⑧项对比检测。

① 形态学检测：检查植入后的人工生物胆道内膜是否光滑，厚度是否一致。两侧与犬胆道的吻合口生长状态是否良好，是否有瘢痕组织的过度增生。

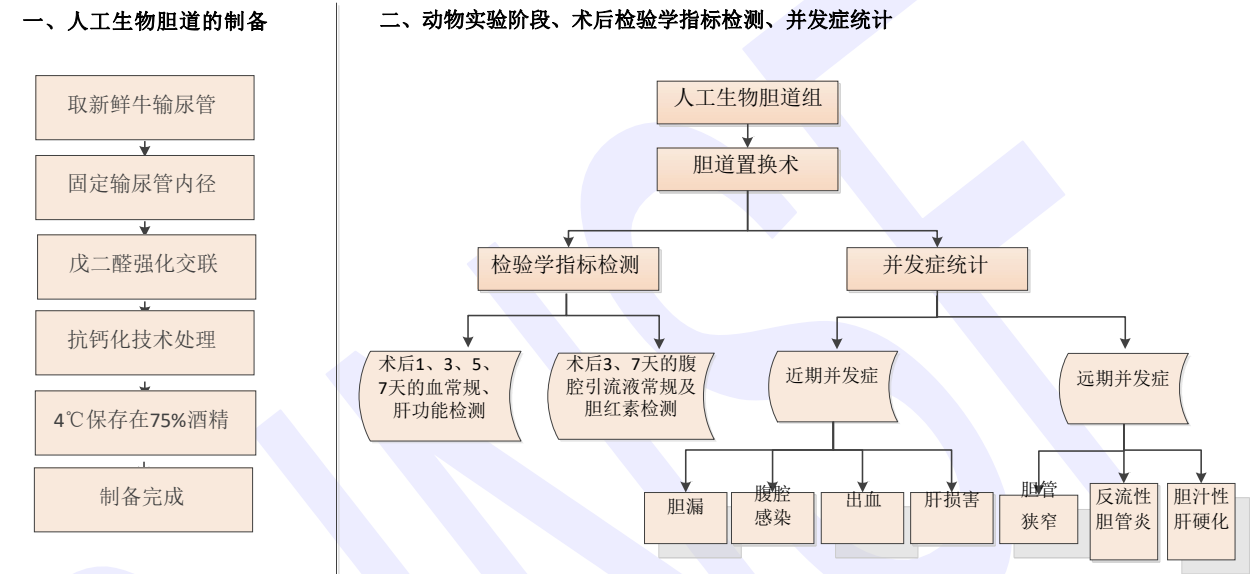
② 影像学检查：剖检前行胆道造影。解剖前行胆道造影术，观察是否有结石或胆道狭窄的形成。

③ 免疫组化以及病理学分析检测人工胆道近端及远端吻合口及胆道体部有无免疫排斥及炎症反应。

④ 血浆血管性血友病因子、抗  $\alpha$ -抗肌动蛋白抗体可反应人工生物胆道两端与正常犬胆道是否可以正常愈合生长，可准确反应人工生物胆道生物相容性是否良好。

- ⑤ 对吻合口两端及人工生物胆道体部进行 Masson 三色染色分析，主要观察是否有胶原纤维的铺入及肌细胞的生长，并与正常犬胆道肌层组织进行对比。
- ⑥ 检测胆道内是否有表达 CK-19 的上皮细胞爬行状态及爬行范围，并与空白对照犬胆道组进行内皮细胞爬行状态对比。
- ⑦ 应用电镜进行超微结构分析。观察人工生物胆道超微结构与术前变化。并对比各组胆道组织结构、内皮细胞、机械强度及超微结构的差异。
- ⑧ 机械强度检测。将植入后的人工生物胆道进行机械强度检测，与正常犬胆道机械强度进行对比。

3.2 技术路线：



3.3 可行性分析：

- (1) 坚实的理论、实践基础及预实验病理结果的支持。
- 1) 已有的预实验基础：预实验采用了胆道-人工生物胆道-十二指肠吻合的方式植入实验犬体内，5 个月后取出，病理结果证实：人工生物胆道-十二指肠吻合口 HE 染色，100 倍显微镜下可看到人工胆道肌层组织的再生，有内皮细胞的铺入，吻合口及人工胆道内未见大量淋巴细胞及炎细胞的浸润，未发生明显排斥反应。人工生物胆道在本次动物预实验中不仅表现出在胆汁内环境保持稳定，且在肠道这一有菌环境中也能保持稳定。
- 2) 申请人科研基础：申请人及课题组一直从事肝胆胰外科临床及基础科研工作。本项目已完成人工生物胆道的制备初步探索，并成功建立了体外检测方法以及进行了初步动物预实验。申请人金烁主要从事胆道及胰腺外科临床科研工作，在胰腺及胆道外科临床科研方向第一作者共发表学术论文 5 篇，其中 SCI3 篇，总影响因子数 11.1。中华肝胆外科杂志 2 篇。以第一作者身份在中华肝胆外科杂志上发表了名为“人工胆道研究进展”的综述。
- 3) 申请团队理论及实践基础：申请人所在团队学科带头人董家鸿院士为国内著名肝



胆外科专家，中华医学会胆道学组名誉组长，长期致力于复杂胆道疾病以及胆道损伤的临床实践及科研工作。对胆道损伤的临床和基础机制有着深刻的科研基础。对该疾病的治疗有着丰富的临床经验，年收治胆道损伤及复杂胆道疾病患者及手术量在国内居于领先地位。此外，还为本次研究动物实验胆道吻合技术提供手术技术保障。

4) 参与单位团队理论及实践基础：本课题参与单位北京佰仁医疗科技股份有限公司，是国内唯一一家专门从事动物源性植入材料研究的国家级高新技术企业。目前已经被 CFDA 批准上市的产品有八个，其中与本课题相关的脱细胞、强化交联及抗钙化-系列化学改性技术处理的牛心包组织制成的人工生物心脏瓣膜已经成功应用上万例，长达 12 年之久。这些技术基础为申请人完成人工生物胆道的脱细胞技术及化学改性技术提供了成功经验 和技术保障。

5) 动物手术基础：动物手术围手术期管理得到了清华大学医学院的指导，充分保证实验动物围手术期安全。在动物实验术后标本的研究方面有北京清华长庚医院病理科、清华大学医学院及北京佰仁医疗科技股份有限公司提供基础实验保障。

## **(2) 技术条件**

申请人及参与者金磊研究员已熟练的掌握 Triton-X-100/PBS 脱细胞及改变组织交联等基础制备技术，该技术已在国内及欧洲、美国申请专利权，相关技术制成的产品已应用在临床，无排斥反应的报道。申请人所在团队专门从事肝胆外科的临床与基础科研工作。在胆道手术技术、胆道损伤治疗经验及胆道损伤发病机制有着坚实的基础及技术条件。依托单位北京清华长庚医院有完善的基础实验室，清华大学医学院也可提供大型科研设备， 以上为本项目的实施提供了完善的基础及临床技术条件。

## **(3) 临床资源**

申请人所在北京清华长庚医院，是清华大学附属医院，集临床、科研及教学为一体的大型综合医院，肝胆中心是医院优先发展的、具有国际水准的医学中心，且为中华医学会外科学会胆道外科分会名誉组长单位，胆道疾病及胆道损伤手术量及手术技术居国内前列，为本项目胆道损伤机制及人工胆道的研发提供了丰富的临床资源。

### （三）预期研究结果及可考核的验收指标

- 1) 拟发表高水平 SCI 论文 2 篇。
- 2) 申请国家专利权 1 项。
- 晋升副高级职称 2 人。

### （四）年度目标和年度研究计划

#### 第 1 年度（2019 年）

##### 1、年度目标

1) 完成人工生物胆道的制备。2) 完成动物实验的主要部分。3) 完成近期检验学检测及并发症的收集。

##### 2、年度研究计划

- (1) 制备人工生物胆道，完成机械强度检测、电子显微镜观察。
- (2) 完成 36 只实验动物手术方案的实施。
- (3) 检验学指标的收集及术后并发症的统计。

##### 3、年度考核指标

- 1) 人工胆道制备情况。2) 动物手术实施情况。3) 检验学指标检测及并发症收集情况。

#### 第 2 年度（2020 年）

##### 1、年度目标

- (1) 完成剩余到达观察窗口期实验动物的解剖并取出人工生物胆道。完成对人工生物胆道理化分析及与空白对照组的对比。
- (2) 完成实验数据的整理，得出研究结论。
- (3) 发表 SCI 论著 1-2 篇，组织小型成果报告会一次。
- (4) 完成国家专利权申请。

##### 2、年度研究计划

- (1) 解剖并取出到观察窗口期的人工生物胆道。完成对人工生物胆道的病理及免疫学分析、生物因子、电镜超微结构分析以及机械强度检测。
- (2) 将取出的人工生物胆道与空白对照组正常犬胆道进行 CK-19 染色、Masson 分析，观察人工生物胆道内再生组织结构、内皮细胞爬行状态、机械强度及超微结构与正常犬胆道的相似性。
- (3) 完成实验数据整理，证实结论。
- (4) SCI 论文的撰写及发表。
- (5) 完成国家专利权申请。

##### 3、年度考核指标

- (1) 完成所有动物实验及基础实验。
- (2) 高水平 SCI 论文发表。
- (3) 完成国家专利权申请。

## 三、研究项目组成员登记表（含负责人）

序号	姓名	出生日期	专业技术职务 (职称)	最高 学位	专业	项目分工	年工作月 数	工作单位
1	金烁	1989-02-03	主治医师	硕士	肝胆胰外科	动物实验及基础实 验部分	5	北京清华长庚医院
2	金磊	1954-09-23	研究员	博士	人工生物材料的研发	基础研究部分	4	北京佰仁医疗科技股份有限 公司
3	项灿宏	1974-01-26	主任医师	博士	肝胆胰外科临床研究	动物实验部分	4	北京清华长庚医院
4	张新静	1987-11-04	在读博士生	硕士	肝胆胰外科临床研究	动物实验及基础实 验部分	4	北京清华长庚医院
5	王文然	1992-03-06	在读硕士生	学士	肝胆胰外科临床及基础研 究	动物实验及基础实 验部分	4	北京清华长庚医院

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生	参加单位数
5	2	1	0	0	1	1	2

说明：高级、中级、初级、博士后、博士生、硕士生人员数、参加单位数由申请者负责填报（含申请者），总人数自动生成。

## 四、项目经费使用计划

单位：万元

资助总金额		10	
直接费用	支出科目	金额	支出内容及计算依据
	1、设备费	2	
	(1) 设备购置费	2	外科手术器械
	(2) 其他设备费		
	2、材料费	6	1) 实验动物购置费 2) 试剂费
	3、测试化验加工费		
	4、燃料动力费		
	5、差旅费		
	6、会议费	0.5	会议学术交流
	7、国际合作与交流费		
	8、档案/出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1	论文出版费
	9、劳务费		
	10、咨询费		
	11、其他费用		
间接费用	12、绩效支出	0.13	
	13、其他费用	0.37	

## 五、共同条款

甲方（北京市自然科学基金委员会办公室）、乙方（资助项目依托单位）、丙方（资助项目合作单位）共同遵守以下条款：

1、甲方按照北京市自然科学基金的有关管理规定对资助项目予以管理。依照经费管理办法及任务书的规定向项目依托单位核拨项目经费；项目实施过程中对项目实施情况进行检查，必要时可进行实地调研；资助期满后，根据验收评审专家的意见，给出验收结论并书面通知依托单位和项目负责人。

2、乙、丙双方须遵守北京市自然科学基金的有关管理规定，保证项目负责人及其研究队伍的稳定和项目实施所需研究条件，协助甲方进行项目中期管理和验收工作。

3、乙、丙双方应按本任务书规定的内容保证整体目标按时完成。

4、乙、丙双方应按照资助项目经费管理办法的规定，监督项目经费的使用。

5、本任务书自各方签字盖章之日起生效。

如合作单位为多方时，合作单位各方均应执行任务书中有关丙方的条款。

## 六、项目负责人承诺书

我承诺按本任务书中相关内容，负责实施本项目。遵守北京市自然科学基金的有关管理规定，保证研究工作时间，认真开展研究工作，按规定报送项目进展报告、验收报告等相关材料；发生重大情况变动时，及时报告；公开发表的论著、论文等相关资料涉及本资助项目内容时，按规定进行标注。

项目负责人（签字）：

## 七、任务书各方签字

甲 方	单位名称	北京市自然科学基金委员会办公室			北京市自然科学基金 委员会办公室  年 月 日	
	单位负责人	(签字)				
	部门负责人	(签字)				
	项目主管	(签字)				
	地 址	北京市海淀区四季青路 7 号院 2 号楼 3 层 311 室				
	邮政编码	100195				
	电 话		传 真			
	电子信箱					
乙 方	单位名称	北京清华长庚医院			单位公章  年 月 日  财务章 (预留银行印鉴)	
	统一社会信用代码	111000002044				
	地 址	北京市昌平区立汤路 168 号				
	邮政编码	102218				
	联系人	丁小庆	电 话	56118577		
	手 机	18600457565	传 真	56118500		
	电子信箱	lovelylucky@126.com				
	帐户名称	北京清华长庚医院				
	开户银行	北京银行股份有限公司太阳宫支行				
	帐 号	20000028396500002202843				
	单位负责人	(签字)				
	项目负责人	(签字)				
	财务负责人	(签字)				
丙 方	合作单位 1		合作单位 2		合作单位 3	
	单位负责人		单位负责人		单位负责人	
	单位公章： 年 月 日		单位公章： 年 月 日		单位公章： 年 月 日	