

文章编号:1006-3080(2009)06-0936-06

利用成体干细胞体外小口径血管的构建

李 宏^{1,2}, 安 琦¹, 吴莹琛²

(1. 华东理工大学机械与动力工程学院, 上海 200237; 2. 上海组织工程研究与开发中心, 上海 200235)

摘要:设计了一套血管生物反应器系统,采用有限元的方法对组织工程小血管托架材料进行了分析,从而开发完成了一套用于构建直径为 2 mm 的小血管托架;通过收集人的原代骨髓基质干细胞(hBMSCs)和脂肪基质干细胞(ADSCs)进行体外扩增和培养,并选用第 3 代细胞与聚羟基乙酸酯(PGA)复合后置于血管生物反应器中动态培养;在生物反应器中动态培养 4 周后,对材料复合物进行取材,分别进行大体观察、HE 染色和扫描电镜等指标检测。结果表明:血管色泽明亮,有一定的弹性,细胞分泌的胶原基质排列较规则,免疫组化结果表明血管含有平滑肌弹性肌动蛋白的成分。说明改进的血管生物反应器能模拟血管的力学环境,并能利用人骨髓间充质干细胞和脂肪基质干细胞成功构建组织工程小血管组织。

关键词:组织工程; 血管生物反应器; 骨髓间充质干细胞; 脂肪基质干细胞; 计算流体力学

中图分类号:Q813;R322.12

文献标志码:A

Construction of Small-Sized Blood Vessel Using SCs *in vitro*

LI Hong^{1,2}, AN Qi¹, WU Ying-chen²

(1. School of Mechanical and Power Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Tissue Engineering Research and Development Center, Shanghai 200235, China)

Abstract: A set of bioreactor system was designed with the application of finite element methods as an analysis method to construct tissue engineered blood vessels in the diameter of 2 mm. hBMSCs and ADSCs were first collected and further cultivated. The third passage of the cultivated cells were then seeded on the poly(glycolic acid) (PGA) to fabricate the cell-scaffold compound. Subsequently, this compound was subjected to dynamical culturing in the blood vessel bioreactor. Tissue-engineered blood vessels can be constructed by culturing the hBMSCs-PGA and hADSCs-PGA compound in a dynamic condition. After cultured for 4 weeks, the tissues were removed from the bioreactor and subjected to analysis by gross view, HE and SEM(scanning electron microscope). It was observed that the tissue-engineered blood vessel has a bright color and certain elasticity. The secreted collagen matrix arrayed orderly around the cells and smooth muscle elastic actin can also be detected in the formed tissues. In conclusion, biological conditions of blood vessels can be simulated using the current blood vessel bioreactor system. Using hBMSCs and ADSCs, the construction of the tissue engineered small-sized blood vessels can be successfully achieved in our bioreactor system.

Key words: tissue engineering; blood vessel bioreactor; hBMSCs; ADSCs; computational fluid

收稿日期:2008-12-02

基金项目:上海交通大学“医工(理)交叉研究基金”重点项目(YG2007ZD06)

作者简介:李 宏(1966-),男,湖南湘潭人,博士生,研究方向:组织工程生物反应器。E-mail:lihongbit@yahoo.com.cn

通讯联系人:安 琦,E-mail:anqi@ecust.edu.cn

dynamics(CFD)

心血管疾病,包括冠状动脉和外围的血管疾病,是人们死亡的主要原因。外科手术替代和旁路手术是最一般的治疗冠状和外围动脉粥样硬化疾病的手段,6 mm 以下的病损血管治疗时所需的替代物最好是来源于自身的血管,但是病人的血管来源受到限制^[1]。采用可降解的支架材料或脱细胞基质接种平滑肌细胞和内皮细胞构建的组织工程血管,在移植进入体内短期易形成血栓^[2-4],且平滑肌细胞和内皮细胞的活力也有限,而成体干细胞具有多向分化的潜能。研究表明将骨髓间充质干细胞(BMSCs)与乳酸/乙酸共聚物(PLGA)复合接种后,在裸鼠皮下可形成血管样组织,并表达血管平滑肌细胞(VSMCs)相关指标,但其结构与正常血管组织差距明显^[5],而将 BMSCs 接种左旋聚乳酸(PLLA)后植于犬下腔静脉后,可形成有一定层次结构的血管组织,在此过程中 BMSCs 也同时被自体血管壁细胞所替代^[6]。

在对脂肪基质干细胞(ADSCs)的研究中,ADSCs 可以从病人的皮下通过介入手术获得脂肪,获得途径相对容易;ADSCs 在培养时更容易粘附和扩增,在每毫升抽吸脂肪组织中可以通过扩增获得 2.0×10^4 个细胞;ADSCs 具有多项分化潜能,可以诱导分化成脂肪、骨、软骨和肌肉细胞等^[7-11];此外,ADSCs 具有更低的致病几率^[12]。在研究 ADSCs 与材料的相容性工作中,人们利用鼠的脂肪干细胞装入藻酸盐微胶囊中进行活力和成骨能力的研究,取得了较好的效果,认为藻酸盐微胶囊可作为三维支架材料用于 ADSCs 的扩增并可以注入体内进行骨组织工程的应用^[13]。此外,采用人的 ADSCs 放在老鼠的心肌细胞提取液中培养 3 周后,ADSCs 显示在特定的环境下可以表达心肌细胞的特性^[14]。而模拟体内的血液动力学环境构建组织工程血管能大大提高血管的力学性能^[15]。本文的目的是研究能构建内径为 2~6 mm 的小血管生物反应器,在此基础上,采用人骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞在生物反应器中初步构建组织工程血管。

1 材料与方法

1.1 血管生物反应器相关参数的确定

体内血管血液的流动主要由径向脉动量、搏动频率、脉动流和血管阻力这几个参数决定,开发血管

生物反应器的首要工作就是确定这几个参数并在体外通过工程的方法实现这个力学环境。

1.1.1 相对径向脉动量分析 血管壁的应变采用相对径向脉动参数来控制。对于动脉管,在生理压力范围内,动脉管壁的径向相对位移比较小,通常定义相对径向脉动量为径向脉动与平均半径的比值,并以此来表示血管径向相对位移的大小。资料显示:对人和狗,肺动脉的相对径向脉动量为 $\pm 5\% \sim \pm 10\%$,主动脉的相对径向脉动量为 $\pm 1\% \sim \pm 3\%$,股动脉和颈动脉的相对径向脉动量大约为 $\pm 0.5\%$ 。而在培养组织工程血管时,为了实用和简化,确定相对径向脉动量为 $\pm 5\%$ 。

1.1.2 脉动流的频率设定 在组织工程血管的培养中,脉动流的频率是一个关键的参数。对人而言,正常胎儿的心率为每分钟 120~160 次,新生儿的心跳每分钟为 120~140 次,怀孕中期,胎心率可达每分钟 160 次以上。正常成年人每分钟心跳大约是 70~80 次。所以,本文在设计血管生物反应器时将频率设定在每分钟 200 次的范围内,可根据实际的实验情况进行设定。

1.1.3 组织工程血管阻力确定 正常的血管几何尺寸和血液的黏度将决定血管中要产生一定的流量需要多大的压力降。这个压力降越大,表明血管中血液流动遇到的阻碍或反抗作用也越大;反之,这个压力降越小,表明血管中血液流动遇到的阻碍越小。因此,通常用压力降 Δp 与流量 Q 之比来度量血管内血液流动所受阻碍作用的大小,称为血管阻力。而在组织工程血管的构建中,应用血管阻力可以调节流速和压力降的值。本文在血管反应器的设计中采用阀门的关闭来模拟阻力的产生。

1.1.4 生物反应器施加力学方式的确定 在组织工程血管的构建中施加的力学刺激,能促进细胞的粘附、增殖及细胞外基质的分泌,避免减少组织工程血管的疲劳破坏等问题的产生。血管对不同力学形式的适应性变化表现为:切应力增大时能使血管的直径增大,切应力减小时能使血管的直径减小;动脉平均压力升高能使血管管壁变厚,动脉平均压力降低能使血管管壁变薄;脉动压升高时能使血管弹性蛋白增多;周期压缩张力能使血管产生疲劳破裂,血管在受到压缩时容易产生钙化现象。血管对所处力学环境产生的适应性变化也总是使得血管的结构尽可能与其功能相适应,使得适应性变化后的血管总

是处于优化的状态。所以脉动流主导的力学形式将对组织工程血管的培养有良好的促进作用,对于提高组织工程血管的力学性能将有很大的帮助。

1.2 血管生物反应器的开发

1.2.1 血管生物反应器的整体方案确定 根据前文血管反应器相关参数分析,确定整个血管反应器博动系统由储液罐、蠕动泵、电磁阀、血管培养室和导管系统组成。储液罐用来储存培养液并进行气体交换;蠕动泵将新鲜的培养液以一定的压力从储液罐中排出;电磁阀的关闭模拟血管系统的阻力。这样,系统在控制元件的控制下就能获得动态培养的血管环境。

1.2.2 血管生物反应器的控制与测量系统开发

血管生物反应器控制系统硬件采用可编程控制器配合外围设备与电路构成。可编程控制器是一种工业控制的计算机,由于配有接口器件及监控软件,其操作使用方式、编程语言和工作原理与计算机有所不同。可编程控制器可以作为继电器控制线路的替代物,为生物反应器进一步的硬件升级扩展提供发展的平台。测量装置对细胞培养室两端的压力、流量和频率进行测量,通过控制压力降来间接控制组织工程血管的径向脉动量。数据采集系统由传感器、信号调理电路、数据采集卡、计算机4部分组成(图1)。图2为应用软件的操作界面。

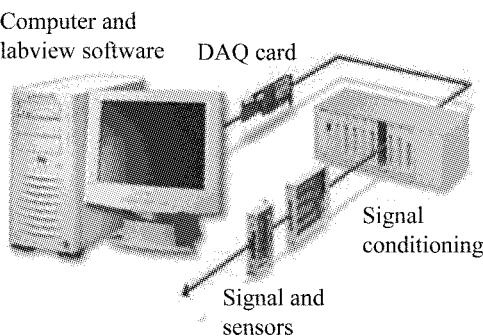


图1 生物反应器测量系统硬件结构

Fig. 1 Measurement system of blood vessel bioreactor

1.2.3 血管生物反应器支架的分析 构建直径为2 mm的小规格组织血管时,由于液体从血管支架大的管径端流入小的管径端,压力增大,流速减慢,导致支架随机的形变,致使支架流场的形状发生变化,从而使得支架的流动环境发生改变。为了避免这种状况的发生,通过采用支架定位机构对支架进行固定。本文对定位后的支架进行了流场分析。图3a为构建支架的计算机模型;图3b为纵截面的形变云图,从图中可知支架管壁的形变均匀;图3c为应力分布云图,从图中可知应力分布均匀合理,说明

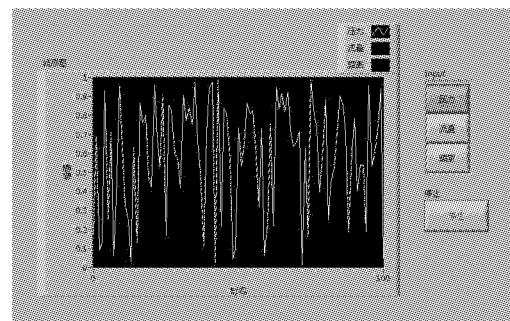
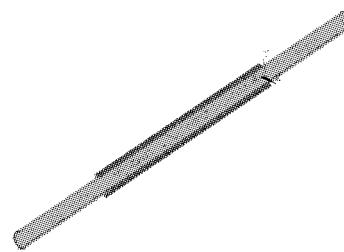
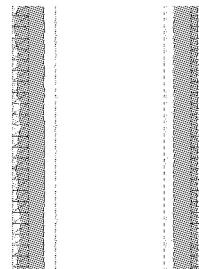


图2 血管生物反应器测量软件界面

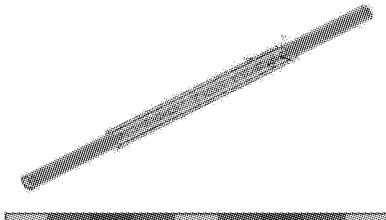
Fig. 2 Interface of measurement software in blood vessel bioreactor



(a) Computational model



(b) Longitudinal cross-section deformation cloud picture



From left to right, the stress is 0.001 256, 0.041 471,

0.081 686, 0.121 900, 0.162 115, 0.202 330, 0.242 545, 0.282 760, 0.322 974, 0.363 189 MPa

(c) Stress cloud picture

图3 小血管托架的压力分布图

Fig. 3 Stress distribution of small blood vessel pedestal

能够满足对PGA(聚羟基乙酸酯)-细胞材料复合物的力学作用。

1.3 骨髓间充质干细胞培养

1.3.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养与鉴定 将健康志愿者的骨髓移入含等量DMEM-LG培养液

(内含 $\varphi=10\%$ 的FBS,肝素150 U/mL)的50 mL无菌离心管中,离心5 min,吸去上层脂肪及部分上清,取中层云雾状单个核细胞层,PBS冲洗离心后,弃去上清收集细胞,用低糖基本培养基重新制成细胞悬液,在37 °C、 $\varphi=5\%$ 的CO₂、95%湿度的培养箱中培养。每天倒置显微镜观察,当细胞达到培养皿80%~90%融合时,进行传代培养。将贴壁细胞消化分离并在培养皿中进行扩增培养,直至贴壁细胞彼此融合并铺满整个培养瓶的底面,并用倒置相差显微镜对人骨髓间充质干细胞原代和传代培养的细胞进行形态学观察。

1.3.2 PGA的制备与消毒 称取未编织网状PGA纤维(直径15 μm,纤维间隙180~200 μm)30 mg/个,制成3 cm×4 cm大小,约1 mm厚的片状结构, $\varphi=75\%$ 的乙醇浸泡30 min,PBS洗3遍后晾干备用。

1.3.3 人骨髓间充质干细胞接种PGA 收集总数为 6×10^7 的人骨髓间充质干细胞,加入100 μL $\varphi=10\%$ 的FBS的DMEM培养液,制成细胞悬液。将上述细胞悬液均匀接种于一片预制好的PGA纤维上,置于37 °C, $\varphi=5\%$ 的CO₂培养箱内,4 h后加入DMEM培养液,静置于培养箱内继续培养,每天更换培养液。细胞接种PGA后,每天在倒置相差显微镜下观察细胞在PGA上的生长、增殖情况,静态培养4 h后卷在反应器的硅胶管上进行动态培养。

1.4 脂肪基质干细胞(ADSCs)培养

1.4.1 脂肪的来源与分离 实验脂肪均来自外科门诊脂肪抽吸术的患者,将脂肪抽吸物在无菌条件下装入175 cm²培养瓶中,带回实验室,用无菌的PBS反复冲洗至抽吸物溶液变清,以去除血细胞、碳酸氢钠、麻药等。加入等体积0.1%Ⅰ型胶原酶,在37 °C恒温摇床消化1 h,1 200 r/min离心10 min,获得高密度的细胞沉淀物,轻轻倾去上清液和漂浮的黄色组织,将细胞振荡混匀,加入DMEM+ $\varphi=10\%$ 的FBS培养液使细胞重悬。

1.4.2 生物材料(PGA)的制备与消毒 参照1.3.2节所述方法操作。

1.4.3 培养与传代 将接种好细胞的培养皿置于37 °C, $\varphi=5\%$ 的CO₂、100%饱和湿度的培养箱内培养,24 h后首次换液。倒置相差显微镜下观察有大量细胞贴壁和漂浮的血细胞,用PBS反复冲洗去除漂浮的细胞,加入DMEM与 $\varphi=10\%$ 的FBS培养液。每周换液2次,细胞融合至占培养皿体积的80%后进行传代。传代前用少量PBS洗涤一次,加

入 $w=0.25\%$ 的胰蛋白酶和 $w=0.02\%$ 的EDTA 2 mL,见大部分细胞质回缩、形态变圆,加入2 mL含血清的DMEM培养液中止消化,收集细胞悬液、计数,以 2×10^4 cm⁻²细胞密度接种于新的培养皿内。5~6 d达到融合状态,继续传代培养。

1.4.4 人脂肪基质干细胞接种PGA 收集总数为 6×10^7 的人脂肪干细胞,加入100 μL $\varphi=10\%$ 的FBS的DMEM培养液,制成细胞悬液。将上述细胞悬液均匀接种于一片预制好的PGA纤维上,置于37 °C, $\varphi=5\%$ 的CO₂培养箱内,4 h后加入DMEM培养液,静置培养箱内继续培养,每天更换培养液。细胞接种PGA后,每天在倒置相差显微镜下观察细胞在PGA上的生长、增殖情况,静态培养4 h后放入反应器中进行动态培养。

2 实验结果

2.1 骨髓间充质干细胞相关检测

2.1.1 倒置相差显微镜观察细胞形态 原代hBMSCs贴壁时呈现小细胞集落生长,细胞由几个到几十个不等,之后细胞逐渐增多,集落范围也相应扩大,细胞为短梭形或多角形。传至第3代,细胞生长状态良好,形态均一完整(图4a、4b)。

2.1.2 倒置相差显微镜观察细胞材料复合物生长状况 将第3代hBMSCs接种PGA纤维后,细胞生长旺盛、增殖并分泌大量基质,至接种一周时细胞分泌产生的基质已将PGA纤维之间的间隙充满,形成膜状物(图4c)。

2.1.3 相关检测 骨髓间充质干细胞-PGA材料复合物置于生物反应器中培养4周后取材,进行大体观察和扫描电镜观察。由图5a观察到:复合物能形成血管样组织,管壁内径为2 mm,管壁外径3.5 mm左右,略有些不规则,血管色泽明亮,有一定的弹性,用镊子反复压下血管能够反弹恢复原样。从图5b、5c观察到:PGA材料未完全降解,仍有部分残留,细胞分泌的胶原基质排列较规则。

2.2 脂肪基质干细胞相关检测

2.2.1 形态观察 分离细胞接种4 h后,开始贴壁,24~48 h内细胞生长处于停滞状态,细胞形态呈小的圆形,直径约5 μm,色深。48 h后,细胞伸展呈成纤维细胞样,生长有方向性,直径增加至20 μm左右。5~6 d后可观察有克隆开始形成。传代后细胞仍呈成纤维细胞样生长(见图6)。ADSCs接种可降解材料PGA后基质分泌旺盛,将ADSCs和PGA材料复合物置于生物反应器中培养。

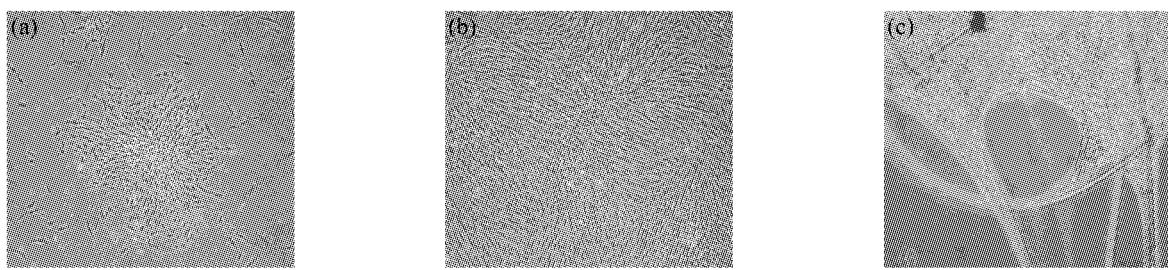


图4 人骨髓间充质干细胞形态学观察

Fig. 4 Morphological observation of hBMSCs

a—hMSCs of passage 0; b—hMSCs of passage 3; c—Compound of hBMSCs and PGA

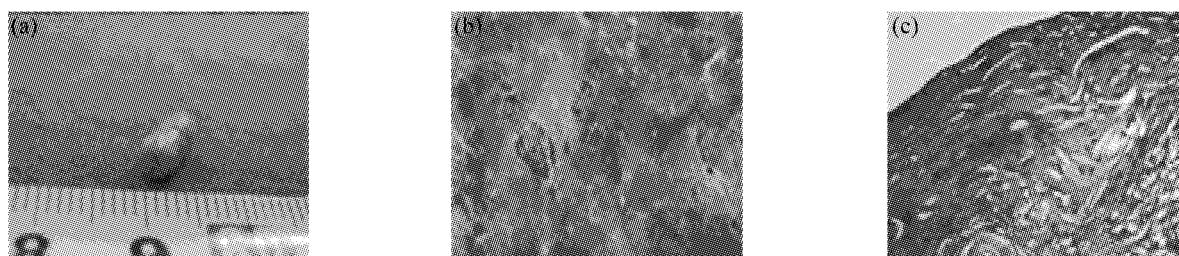


图5 骨髓间充质干细胞-PGA在反应器中培养4周

Fig. 5 Compound of hBMSCs-PGA in incubator culture for 4 weeks

a—Gross view of blood vessel engineered by hBMSCs; b—SEM of blood vessel engineered by hBMSCs(800 \times); c—HE staining of blood vessel engineered by hBMSCs(100 \times)

2.2.2 脂肪基质干细胞构建血管样组织 脂肪干细胞-PGA材料复合物置于生物反应器中培养4周后取材,进行大体观察和扫描电镜观察。由图7a、7b观察到:复合物能形成血管样组织,管径为2 mm,达到了设计时的要求,样品壁厚约为0.5 mm,呈白色并色泽明亮,整体长度为15 mm左右。

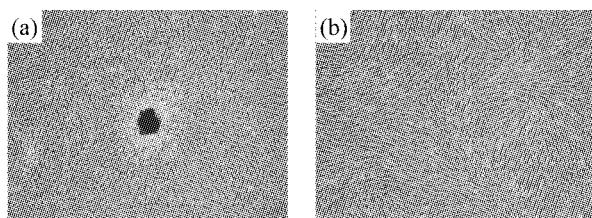


图6 脂肪基质干细胞形态学观察

Fig. 6 Morphological observation of ADSCs

(a) ADSCs of passage 0; (b) ADSCs of passage 3

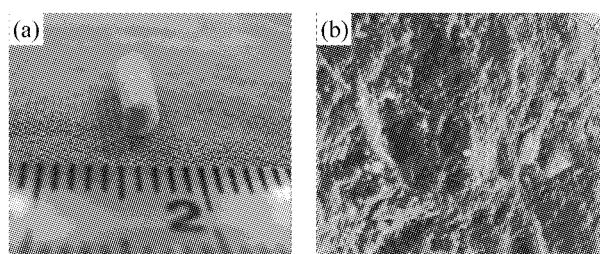


图7 脂肪基质干细胞-PGA在反应器中培养4周

Fig. 7 Compound of ADSCs-PGA in incubator culture for 4 weeks

a—Gross view of blood vessel engineered by ADSCs; b—SEM of blood vessel engineered by ADSCs($\times 1000$)

3 结 论

血管生物反应器是模拟血管力学环境进行培养组织工程血管的装置。在生物反应器的开发中,对托架内腔进行了流场和相关参数进行了分析,反应器能培养内径2~6 mm不同规格的组织工程血管。hBMSCs可以作为血管平滑肌细胞的新的来源并采用hBMSCs在反应器中构建有一定形状的血管,为进一步实验提供基础。同时以hADSCs为种子细胞,在反应器内可以构建出血管样结构,从扫描电镜的检测结果可知:基质分泌较旺盛。此外,在本文的研究中,生物反应器仍存在构建内皮细胞困难,采用脂肪基质干细胞构建的小血管与正常的血管有一定差距等问题,作者将在今后的研究中不断改善生物反应器的结构,摸索脂肪基质干细胞的培养条件,不断完善这一方向的研究。

参考文献:

- [1] Tu J V, Pashos C L, Naylor C D, et al. Use of cardiac procedures and outcomes in elderly patients with myocardial infarction in the United States and Canada[J]. N Engl J Med, 1997, **336**: 1500-1505.
- [2] Weinberg C B, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells[J]. Science, 1986,

- 213;397-399.
- [3] L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, et al. A completely biological tissue engineered blood vessel[J]. FASEB J, 1998, 12: 47-56.
- [4] Niklason L E, Gao J, Abbott W M, et al. Functional arteries grown *in vitro*[J]. Science, 1999, 284:489-493.
- [5] Cho S W, Kim I K, Lim S H, et al. Smooth muscle-like tissues engineered with bone marrow stromal cells[J]. Biomaterials, 2003, 25: 2979-2986.
- [6] Matsumura G, Tomita S M, Shinoka T, et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular auto-grafts *in vivo*[J]. Circulation, 2003, 108:1729-1734.
- [7] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7:211-228.
- [8] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13: 4279-4295.
- [9] Strem B M, Hicok K C, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. Keio J Med, 2005, 54:132-141.
- [10] Guilak F, Lott K E, Awad H A, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 206: 229-237.
- [11] Rahaman M N, Mao J J. Stem cell based composite tissue constructs for regenerative medicine[J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91:261-284.
- [12] Cowan C M, Shi Y Y, Aalami O O, et al. Adipose derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22:560-567.
- [13] Abbah S A, Lu W W, Chan D, et al. *In vitro* evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 347:185-191.
- [14] Kristine G, Gaustad A C, Boquest B E, et al. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 314:420-427.
- [15] 许志成,李宏,刘阳,等.应用生物反应器体外构建组织工程化血管平滑肌[J].中华实验外科杂志,2005,22(7):37-40.