

组织工程血管研究现状*

岳慧敏 梁峰 王韞芳 裴雪涛**

军事医学科学院输血医学研究所干细胞生物学研究室, 北京 100850

摘要 组织工程化血管的产生和发展使人类最终解决完善血管替代物的问题成为可能。随着干细胞功能研究的进步和材料及塑型科学的不断发展, 血管组织工程进展迅速, 备受瞩目。文中就血管组织工程中关键的3大要素: 支架材料、种子细胞和共培养构建的研究进展作一综述。

关键词 组织工程 血管 种子细胞 支架材料

血管损伤、缺血性疾病以及动脉瘤等疾病, 都需要合适的血管移植物, 全球每年大约超过60万人需要各种血管外科手术。目前, 临床上已应用的血管移植物包括自体血管、异体血管和人工合成材料血管。自体血管通常采用乳内动脉和隐静脉, 但由于自体血管来源有限, 供区牺牲较大, 自体静脉在高压下易形成血栓, 内膜增生, 动脉硬化等, 限制了其应用; 异体血管包括异种血管和同种异体血管, 异种血管和新鲜的异体血管因为排斥反应、内皮细胞脱落、与白细胞反应及血管活性的丧失等原因已不在外科中应用。几十年的临床应用表明, 人工合成材料血管涤纶 Dacron 和膨化聚四氟乙烯 ePTFE, 对高流量、低阻力的血管替代效果较好, 但因其在小血管的替代中易于形成血栓, 滋生细菌, 所以不适宜小口径血管的替代。而利用组织工程学方法构建良好血管替代物的血管组织工程学, 因近来干细胞研究的重大进展与材料及塑型科学的不断深入而成为研究热点, 并使得提供一种完美的人造血管成为可能。

1 血管支架的选择

1.1 不可降解材料

普遍用于大血管替代的血管支架如涤纶 Dacron

和聚四氟乙烯 ePTFE 等, 并不适合小血管的替代; 尽管人们试图用肝磷脂、水蛭素、前列腺素、生长因子、抗凝剂缩氨酸序列、右旋糖苷、抗生素等钝化支架材料^[1,2], 同时再种植内皮细胞, 以降低其血栓形成, 效果较为理想^[3], 但却难以进行血管塑形, 没有正常的血管生理反应, 而且易感染, 所以非降解材料已逐渐被淘汰。当然, 由非降解材料所构建的血管严格来讲, 也不是真正意义的组织工程血管。

1.2 可降解的高分子合成材料

目前应用于组织工程血管支架的可降解高分子材料主要有聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、以及两者的混合物聚乳酸羟基乙酸(PLGA)、聚乙醇酸(PLLA)、聚氨酯(Pu)和聚羟基丁酸(P₄HB)等。它们的优点是对微结构、机械性能、形态以及降解时间等都能预先设计和调控, 最终的完全降解可以避免异物所引起的不良反应; 缺点是因为缺乏细胞外基质中的生物信号和功能基因, 与种子细胞的粘附性较差。PGA 虽然在组织工程中被广泛采用, 但 Higgins 等^[4]采用蛋白质印渍术发现在高浓度 PGA 降解产物上生长的平滑肌细胞分化的标志 calponin 表达减少, 从而说明 PGA 降解后产生的局部条件

2004-11-25 收稿, 2004-12-27 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(批准号: 2001CB509906)和国家“八六三”计划领域重大专项(批准号: 2002AA205051 和 2003AA205160)资助

** 通讯作者, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

的改变导致了平滑肌细胞分化和有丝分裂的减少,可见PGA并不是血管组织工程理想的支架材料.也有学者在经过处理的粗糙度在 $10-10^2$ nm 或 $10-10^2$ μ m 的5种Pu上种植相同数量的人脐血内皮细胞,孵育36h后,荧光染色及细胞存活实验证明在 $10-10^2$ nm 水平上而非在 $10-10^2$ μ m 水平上提高生物支架材料Pu表面粗糙程度能够提高人脐血内皮细胞在其表面的粘附和生长^[5]. Xu等^[6]近来研究发现直径400—800 nm 的电镀纳米纤维(electrospun nanofiber)与天然的细胞外基质微结构相似.通过用电镀旋压成形(electrospinning)形成的聚乙醇酸己内酯聚合物(poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) [P(LLA-CL)] (75:25) copolymer)作为细胞外基质材料,并分别与平滑肌细胞和内皮细胞共培养后,经扫描电子显微镜、免疫组化实验、激光扫描共焦显微镜观察和细胞增殖实验证实这种电镀纳米纤维支架能够支持细胞的粘附和增殖,种植的内皮细胞和平滑肌细胞不仅保持了它们的形状和表型,而且通过纳米纤维的连接组成了三维的细胞网络.笔者实验室与清华大学机械系合作,分别检测了各种孔隙率、不同比例的PLGA, PLLA 和Pu与骨髓间充质干细胞(MSC)的相容性、贴附率,通过MTT检测及扫描电子显微镜观察比较,发现腔壁孔隙率为90%,孔径范围为30—50 μ m,并且分布有体积比为9:1的直径为150—200 μ m的大孔的PLGA更有利于MSC生长、增殖及分化,因而确定为我们采用的组织工程血管的支架材料之一.

1.3 可降解的天然生物材料

应用于组织工程血管研究的天然生物材料包括甲壳素、葡聚糖、明胶、胶原蛋白、弹性蛋白、多聚氨基酸、多肽、透明质酸及其复合物等.此类材料多由正常组织细胞外的高分子合成,本身包含许多生物信息,能够提供细胞所需的信号,对细胞的粘附及维持具有优势. Berglund等利用交联的鼠尾胶原作为支架与成纤维细胞共培养至少23d,然后再种植内皮细胞,所形成的血管具有650 mmHg¹⁾的耐压力,其中有些细胞表达 α -平滑肌肌动蛋白和肌凝蛋白重链^[7].也有学者用脱细胞血管作为组织

工程血管,充分利用胶原固有的三维结构发挥血管壁的最大活性功能^[8].以上研究尽管最大程度地发挥了天然生物材料的优点,但它所暴露出来的机械强度差,抗压力弱,性能随批次不同而有差异等缺点也不容忽视.因此近年来,将可降解高分子合成材料与天然生物材料复合成为热点,它们各有特点,又各有不足,把两者结合可发挥两者的优势.通过两者结合,天然生物材料弥补了高分子合成材料种子细胞粘附不高的缺点,而高分子合成材料又弥补了天然生物材料的力学强度较弱的不足. Tet-suji等^[9]通过将碱性凝胶溶液与PLLA直接反应,使其固定在PLLA表面,这种经过修饰的PLLA在体外与单纯的PLLA比较,显示了与细胞更好的粘附性能. Yabin等^[10]比较了人脐血内皮细胞在Pu和经过自由氨基酸基团及天然高分子胶原、凝胶或壳聚糖等修饰的Pu上共培养6d后的增殖率,以及通过扫描和共聚焦激光扫描显微镜观察证明,经过自由氨基酸修饰的Pu不仅亲水性增加,而且为下一步的天然活性高分子的固定提供了重要的连接位点,从而进一步促进了人脐血内皮细胞的再生.

2 种子细胞的选择

为支架材料提供生命源泉,并能形成组织的功能细胞为种子细胞.构建组织工程的种子细胞应易培养,粘附力强,分子结构和功能与正常血管细胞相似,且临床上易获取,具有实用性.近年来对组织工程种子细胞的研究,尤其是干细胞的研究不断向深度和广度扩展,人们对种子细胞的了解更加深入,也带动了血管组织工程的发展.

2.1 自体血管壁细胞

人们设想用内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞依次构建组织工程血管的内膜、中膜和外膜,这就需要用到自体血管壁细胞.内皮细胞具有抗血栓形成,抑制血小板聚集及分泌血管活性因子等作用,使之成为使用广泛的组织工程血管的种子细胞.此外,也有种植平滑肌细胞和成纤维细胞的报道. Weinberg等^[11]以上述3种细胞为种子细胞,首先在体外构建出组织工程化血管. Campbell等也通

1) 1 mm Hg=133.3 Pa

过将内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞一次性种植于支架材料上, 获得了良好的血管塑形和内皮细胞层^[12]。然而此类种子细胞可能存在的不健康, 或功能不完善及易于衰老的缺点限制了其应用。

2.2 干细胞

干细胞是能够自我复制, 尚未分化而且具有可分化为其他多谱系细胞潜能的细胞。它可解决培养细胞稳定传代并增殖的问题, 可能成为组织工程理想的种子细胞, 因此近年来受到愈来愈多的关注。干细胞按照发生学来源, 可分为胚胎干细胞和成体干细胞。

2.2.1 胚胎干细胞 胚胎干细胞是指由胚胎内细胞团或原始生殖细胞经体外抑制培养而筛选出的细胞。它具有发育全能性, 在理论上可以诱导分化为机体中所有种类的细胞。Lenvenberg 等在 2002 年将人的胚胎干细胞成功地诱导出内皮细胞^[13], 为组织工程解决内皮化问题提供了新思路。Shen 等^[14]把兔动脉平滑肌细胞和聚羟基乙酸支架共培养并用硅管包裹, 然后植入裸鼠皮下, 6—8 个月后将带有鼠胚胎干细胞体外诱导分化为内皮的细胞注入移植物, 5d 后, 移植物长成了一个典型的血管样结构。胚胎干细胞是全能的, 是人体各种细胞的源头, 能制造机体需要的全部细胞, 在组织工程中它尽管解决了自体成熟细胞所无法解决的问题, 但胚胎干细胞在伦理、社会、法律、医学、神学和道德等方面的争议及胚胎干细胞的免疫原性限制了其应用。

2.2.2 成体干细胞 成体干细胞和胚胎干细胞一样, 都解决了成体细胞的致命弱点, 在组织工程中有广阔的应用前景。与胚胎干细胞相比, 成体干细胞具有以下优点: 成体干细胞自体移植避免了免疫排斥; 成体干细胞导致细胞“永生化”甚至癌变的可能性较小; 分离和使用成体干细胞不存在伦理学问题。成体干细胞因其来源及分化方向不同可分为造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、皮肤表皮干细胞、内皮祖细胞等。其中可能作为血管组织工程种子细胞的有内皮祖细胞和间充质干细胞。

内皮祖细胞(EPC)又名成血管细胞或血管母细胞, 是血管内皮细胞的前体, 它与造血干细胞一样

来自同一祖细胞, 且定居于骨髓。它可以从骨髓中释放, 并在外周血循环中运行, 可聚集在活跃的血管新生部位, 参与新血管形成。形态上无法分辨内皮祖细胞, 主要靠表面的分子标志 CD34⁺, F1k1⁺, AC133⁺ 来区分。体外培养的结果证实内皮祖细胞随增殖可分化成 CD34⁺, F1k1⁻, AC133⁻ 的成熟内皮细胞。尽管内皮祖细胞有作为种子细胞的上述特性, 但它的缺点是来源较少, 不稳定, 鉴定和纯化技术不成熟, 而且在一些特定的病理条件下, 其表型会发生改变, 生物学活性下降。

间充质干细胞不仅获取方便, 对供体健康无害, 而且不存在免疫排斥及组织配型的问题, 又有包括向血管内皮细胞与平滑肌细胞分化的多向分化潜能, 我们认为其有望成为组织工程中最理想的种子细胞。间充质干细胞是成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成肌肉细胞和骨髓基质细胞的干细胞, 它存在于人体很多部位, 但以骨髓最多。体外培养的骨髓间充质干细胞体积小, 成梭形, 核浆比大。不表达分化相关的细胞标志, 如 I, II, III 型胶原、碱性磷酸酶, 也不表达造血干细胞系的表面标志, 如脂多糖受体 CD14, CD34 以及白细胞表面抗原 CD45 等; 但表达 SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124, CD166 和多种表面蛋白。在体外特定的诱导条件下, 骨髓间充质干细胞可以分化为骨、软骨、脂肪、肌腱、肌肉、神经、内皮、血管平滑肌等多种细胞^[15-17]。在体外 Matrigel 上, 在血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等细胞因子作用下, 本实验室已成功地将人、大鼠及兔的 MSC 诱导分化为 VIII 因子关连抗原(VWF), FLT-1, FLK-1 等内皮细胞特有表面分子阳性的血管内皮细胞, 并形成血管样结构。这种细胞悬液注射于下肢股动脉结扎的兔缺血下肢后, 促进侧枝循环再生, 增进血供效果明显。目前, 用于分离间充质干细胞的方法主要有 3 种: 密度梯度离心法、贴壁筛选和流式细胞仪分离的方法。密度梯度离心法是根据间充质与其他细胞的密度不同用分离液分离的方法; 贴壁筛选法则是根据间充质细胞贴壁生长的特性进行分离; 流式细胞仪分离法是根据间充质细胞体积小, 相对缺少细胞器的特点分选的。间充质干细胞作为基因工程种子细胞有许多优势, 显示出作为种

子细胞的巨大潜能,但现在人们对它的研究还远远不够,仍有许多未知的领域。

3 细胞与材料的共培养

细胞与材料的共培养包括静态培养和动态培养。静态培养即细胞与材料在静止状态、无特殊压力和环境变化的条件下所进行的培养;动态培养包括在生物体内的培养和体外模拟生物体内反应即生物反应器内的培养。血管生物反应器是应用剪切力和张力等力学因素,模拟人体血管搏动和血管冲刷作用,为体外构建组织工程化血管提供适宜的环境的装置,逐渐成为体外构建组织工程血管不可缺少的工具之一。近来有学者报道,外来物体放入腹膜后会自动被成纤维细胞及间皮细胞所包裹,翻转过来形成类似血管结构的管道,可用来进行狗、兔子以及大鼠的股动脉吻合术^[18,19]。以上可以说是模拟体内生物反应器培养血管的特例。组织工程化血管的成熟需要复杂的环境,受着血流动力学的影响。实验证明,在一定搏动压力刺激下构建的血管与在静止条件下构建的血管相比,不仅血管平滑肌细胞形态完整,排列整齐,而且组织强度、胶原含量等均明显好于静态培养的血管,所以充分了解并模拟体内机械应力环境,并深入研究应力作用的机制对组织工程化血管的构建是极其重要的。Matsumura等^[20]将通过骨髓穿刺获取的骨髓经过滤、离心后得到的单核基质细胞种植于外层为聚乳酸己内酯(P(LA/CA))的PLLA支架材料上,放置于培养箱中2—4 h后,应用于7例心血管疾病患者的修补或吻合术中。术后行数字减影血管造影DSA、电子计算机X光断层扫描CT和核磁共振MRI检查,显示移植处血流状态良好,没有血栓形成、狭窄、阻塞等症状的发生,也无一因此而导致死亡。这种移植物有生长的潜能,钙化率低,排斥反应小,感染率低,血栓形成率低,病人可免除长期的抗凝治疗,为组织工程在心血管领域的应用迈出了一大步。我们实验室将4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)标记的人的MSC种植于内表面覆盖有Matrigel并有微血管通道的PLGA管形支架材料上,将其放置于NOD-SCID小鼠腹腔中(或腹膜外或包裹于大网膜中),4周后取出行冰冻组织切片。经观察发现,DAPI标记的MSC来源细胞通过通道穿出支架,参与支架外

壁形成血管结构。Opitz等^[21]把5 mL含有胶原、Matrigel和凝胶的液体与经过盐析技术和溶剂蒸发技术处理的P4HB支架材料放置于滚筒搅拌器,使其易于细胞粘附,30 min后,将表面覆盖有利于细胞粘附的液体的P4HB放入滚筒搅拌器的玻璃管道中,加入 1.25×10^5 个/mL的绵羊血管平滑肌细胞过夜,连续4d种植。一组放入模拟血管搏动,血液流动环境的生物反应器中培养,并逐渐增加压力;另外一组在静态条件下培养。两周后,经组织学检查、生化分析及荧光显微镜、电子显微镜观察证明在生物反应器中培养的血管替代物具有连续的分层的组织形态,且是完全疏水的,其细胞外基质、DNA和蛋白质含量比静态培养的一组显著增加。由此可见,细胞与材料的动态共培养对于组织工程血管能否成为有功能的血管替代物是至关重要的。目前,微环境对血管形成的影响的了解十分有限,动态共培养条件仍有待进一步完善。

4 问题及展望

一个完美的血管替代物应该具有抗感染能力,良好的生物相容性、稳定性、密闭性和抗血栓能力,具有愈合及产生血管的多孔性,具有适当的机械性能,具有一定的血管生理功能,包括对神经和化学物质刺激的收缩舒张功能,以及能够短时间廉价生产出不同种类和足够数量的产品以满足商业需求。可见,找到完美的血管替代物并不容易,我们对血管替代物的研究也还远远不够。目前,血管组织工程的研究和应用仍处于实验探索阶段,还有许许多多的问题需要解决:如何提高支架材料的性质使其易于种子细胞的粘附和增殖;如何短期内获得大量干细胞;如何进行快速扩增的细胞形态、功能的检测以及观察细胞生长与应力的关系等。此外干细胞定向诱导分化技术,体外模拟人体内环境的生物反应器仿生条件的选择以及细胞与支架材料相互作用的深层次研究,建立完善的组织工程血管的人体检测技术和评价标准等等都需要多学科共同努力,深入研究,最终才能应用于临床,造福人类。

参 考 文 献

- 1 Bos G W, Poot A A, Beugeling T, et al. Small-diameter vascular graft prostheses: Current status. Arch Physiol Biochem, 1998.

- 106: 100—115
- 2 Doi K, Matsuda T. Enhanced vascularization in a microporous polyurethane graft impregnated with basic fibroblast growth factor and heparin. *J Biomed Mater Res*, 1997, 34: 361—370
 - 3 Bordenave L, Remy-Zolghadri M, Fernandez P H, et al. Clinical performance of vascular grafts lined with endothelial cells. *Endothelium*, 1999, 6: 267—275
 - 4 Higgins S P, Solan A K, Niklason L E. Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation. *Biomed Mater Res*, 2003, 1(10): 295—302
 - 5 Chung T W, Liu D Z, Wang S Y, et al. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials*, 2003, 24: 4655—4661
 - 6 Xu C Y, Inai R, Kotaki M, et al. S. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. *Tissue Eng*, 2004, 10(7): 1160—1168
 - 7 Berglund J D, Mohseni M M, Nerem R M, et al. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials*, 2003, 24: 1241—1254
 - 8 Teebken O E, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2002, 23: 475—485
 - 9 Tetsuji Y, Yoshiyuki T, Yoshiharu K. Surface modification of poly(L-lactic acid) film with bioactive materials by a novel direct alkaline treatment process. *Jpn J Polym Sci Technol*, 1998, 55: 328—333
 - 10 Zhu Y B, Gao C Y, He T, et al. Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin. *Biomaterials*, 2004, 25: 423—430
 - 11 Weinberg C B, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 1986, 213: 397—400
 - 12 Campbell J H, Efendy J, Campbell G R. Novel vascular grafts grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res*, 1999, 85: 1173—1178
 - 13 Levenberg S, Golub J S, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4391—4406
 - 14 Shen G, Tsung H C, Wu C F, et al. Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells. *Cell research*, 2003, 13(5): 335—347
 - 15 Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science*, 1997, 276: 71—74
 - 16 Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143—147
 - 17 Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells*, 2004, 22: 377—384
 - 18 Campbell J H, Walker P, Chue W L, et al. Body cavities as bioreactors to grown arteries. *International Congress Series*, 2004, 1262: 118—121
 - 19 Chue W L, Campbell G R, Caplice N, et al. The dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous artificial blood vessels. *J Vasc Surg*, 2004, 39(4): 859—867
 - 20 Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, et al. Successful application of tissue engineered vascular autografts: Clinical experience. *Biomaterials*, 2003, 24: 2303—2308
 - 21 Opitz F, Schenke-Layland K, Richter W, et al. Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. *Ann of Biomed Eng*, 2004, 32(2): 212—222