论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0152-04

应用骨髓干细胞和自制胶原-壳聚糖构建组织工程心瓣膜

付建华[1,2],赵 曼[3],杜桂英[4],杨达宽[2],黄云超[5] (252000 山东 聊城,聊城市人民医院:胸心外科[1],信息科[3];650031 昆明,昆明医学院:第二附属医院胸心外科[2],第三附属医院胸心外科[5];252000 山东 聊城,聊城市疾控中心艾防所[4])

【摘要】 **目的** 探讨应用骨髓基质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)诱导分化的内皮细胞为种子细胞,以胶原-壳聚糖复合物为支架材料,运用组织工程学的原理和方法体外构建组织工程心脏瓣膜(tissue engineering heart valve,TEHV)的可行性。**方法** 兔主动脉壁体外分离、培养、传代平滑肌细胞、成纤维细胞,将培养的成纤维细胞、平滑肌细胞与兔骨髓基质干细胞诱导分化的内皮细胞按顺序种植在预湿处理的胶原-壳聚糖复合支架上,通过组织学及倒置显微镜、扫描电镜观察内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞在支架上生长、增殖和基质分泌情况。**结果** HE染色示内皮细胞能够在胶原-壳聚糖复合支架黏附、伸展、增殖,在TEHV表面长成连续的细胞层;扫描电子显微镜示TEHV表面光滑,细胞生长良好,细胞层完整,且瓣膜表面的内皮细胞具有合成和分泌前列环素(PGI_2)的功能。**结论** 以兔主动脉壁体外分离、培养、传代的平滑肌细胞、成纤维细胞和BMSCs诱导分化的内皮细胞为种子细胞,依次种植在胶原-壳聚糖复合支架上可以构建TEHV,且内皮细胞能够分泌PGI_2。

【关键词】 组织工程心脏瓣膜;瓣膜构建;骨髓基质干细胞;诱导分化;内皮细胞

【中图法分类号】 R318.08;R318.11;R329.2 **【文献标志码】** A

Construction of tissue engineering heart valve with rabbit bone mesenchymal stem cells and self-made collage-chitosan complex scaffold

Fu Jianhua[1,2], Zhao Man[3], Du Guiying[4], Yang Dakuan[2], Huang Yunchao[5] ([1]Department of Cardiac and Thoracic Surgery, [3]Department of Information, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng, Shandong Province, 252000; [2]Department of Cardiac and Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, [5]Department of Cardiac and Thoracic Surgery, Third Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan Province, 650031; [4]Institute of AIDS Prevention and Treatment, Liaocheng Center for Disease Control and Prevention, Liaocheng, Shandong Province, 252000, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the feasibility of constructing a tissue engineering heart valve (TEHV) using endothelial cells induced and differentiated from (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) as seeded cells and collagen-chitosan complex as scaffold material. **Methods** Smooth muscle cell and fibroblasts were isolated and cultured from rabbit aortic wall and Fibroblast, smooth muscle cells and endothelial cell induced and differentiated from BMSCs were seeded in pre-moisture collagen-chitosan complex scaffold in turn. The cell adhesion, growth, proliferation and stroma secretion were observed by using histochemistry, inverted and SEM scanning microscopy. **Results** The differented endothelial cells could adhere to, grow and proliferate on collagen-chitosan complex scaffold by HE staining observation, and cells on TEHV surface grew to form a serial cell layer. TEHV surface was smoothd and cells grew better. SEM scanning observation showed that cell layer was intact. Endothelial cells on TEHV surface synthesized and secreted PGI_2. **Conclusion** Smooth muscle cells, fibroblasts cultured from aortic wall and endothelial cells induced and differentiated from BMSCs can seed on collagen-chitosan complex scaffold in turn, to construct TEHV where endothelial cells can secrete PGI_2.

【Key words】 tissue engineering heart valve; valve construction; bone mesenchymal stem cells; induce and differentiate; endothelial cells

Corresponding author: Fu Jianhua, Tel: 86-635-8991028, E-mail: jianhuafu1120@163.com

各种原因引起的心脏瓣膜结构破坏和功能失调,是心脏瓣膜病患者发病和死亡的主要原因[1]。目前瓣膜置换术仍然是临床上治疗此类疾病的最终手段[2]。但无论机械瓣、生物瓣都有一定的缺憾,机械瓣需终身抗凝[3],生物瓣会衰退、钙化[4]。尤其对于

【通信作者】 付建华,电话:(0635)8991028,E-mail:jianhuafu1120@163.com

儿童患者尚无合适的瓣膜[5]。组织工程心脏瓣膜由于具有无免疫原性、无需抗凝以及自我生长、修复的优点，日趋受到关注[6]。本研究应用骨髓基质干细胞(bone mesenchymal stem cells，BMSCs)诱导分化的内皮细胞为种子细胞，以胶原-壳聚糖复合物为支架材料，运用组织工程学的原理和方法体外构建组织工程心脏瓣膜(tissue engineering heart valve，TEHV)，旨在为应用其置换瓣膜提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料

与山东大学联合制作胶原-壳聚糖复合支架[7]。4～6周龄新西兰大白兔40只，雌雄各半，体质量250～300 g，购于昆明医学院实验动物中心[许可证编号 SYXK(滇)2005-0004]。

1.2 支架材料的预湿处理

将胶原-壳聚糖复合支架(质量比为7∶1 A型)制成厚0.3 mm，裁成直径1.0 cm圆片，双蒸水清洗，室温下自然干燥24 h，纸塑包装密封，环氧乙烷消毒，备用。无菌条件下在超净工作台上将消毒支架18片置入3个6孔平底板中，经PBS复合液反复漂洗、DMEM预湿24 h、10%胎牛血清浸泡12 h，以在吸附细胞生长因子的同时增加材料表面的细胞黏附作用。将另外A型支架6片置入1个6孔平地板中，单独用PBS浸泡作为对照。

1.3 组织工程心脏瓣叶体外细胞种植实验

内皮细胞生长添加剂(ECGS)＋肝素组：在第2代骨髓基质干细胞中添加ECGS 50 μg/ml、肝素50 μg/ml诱导其分化为内皮细胞，未加入ECGS及肝素组：取第2代骨髓基质干细胞不添加ECGS及肝素进行培养作为对照。收集3～4代生长状态良好的兔主动脉成纤维细胞、平滑肌细胞，在支架的一面以含$1\times10^6/cm^2$、$1.5\times10^5/cm^2$、$5\times10^4/cm^2$细胞数的细胞悬液分别种植在材料上(每个细胞密度种植于同一个6孔板的材料上)，在37 ℃、5% CO_2和饱和湿度的孵箱中孵育2 h贴壁后，加适量(约5 ml)含10% FBS、双抗、两性霉素混合液的L-DMEM培养，次日于材料反面种植相同数量的平滑肌细胞、成纤维细胞。第3天使用$1\times10^6/cm^2$、$1.5\times10^5/cm^2$、$5\times10^4/cm^2$用上述骨髓基质干细胞诱导分化的内皮细胞数的悬液种植在材料反面(与前3种细胞数相对应的材料)；第4天材料正面种植相同数量上述骨髓基质干细胞诱导分化的内皮细胞，L-DMEM培养。每日换液，并于倒置显微镜下观察细胞在材料上的生长、增殖、基质分泌和细胞形态变化情况。

1.4 倒置显微镜观察、组织学检查和电镜检查

每日于倒置显微镜下观察细胞在材料上的生长、增殖、基质分泌和细胞形态变化情况。组织学检查：以首次种植平滑肌细胞、成纤维细胞的时间计算，培养10 d和4周的TEHV经PBS复合液轻轻冲洗后，取每板的4片以4%多聚甲醛溶液固定，常规行石蜡包埋切片HE染色和内皮细胞第Ⅷ因子免疫组化染色。光学显微镜下观察并摄片。电镜检查：同时取上述每板余下的2片TEHV瓣叶以3.5%戊二醛溶液固定，乙醇梯度脱水，醋酸正戊酯置换，CO_2临界点干燥，离子喷射仪喷金后使用SEM检测体外培养细胞在材料上的黏附、生长、增殖、细胞形态变化和基质分泌情况。

1.5 内皮细胞分泌的前列环素(prostacyclin，PGI_2)测定

采用放射免疫法测定6-keto-$PGF_1\alpha$，间接反映内皮细胞释放PGI_2水平。标本收集：将瓣叶剪成直径1.0 cm的圆片，环氧乙烷消毒后在无菌条件下将瓣叶圆片置入12个6孔板中。

1.5.1 单独种植内皮细胞 在4个6孔板复合支架上均匀接种内皮细胞悬液25 μl，细胞数为4×10^6/ml。加入1 ml 10%的L-DMEM培养液，继续培养24 h，再同样接种1次，每只瓣叶种植细胞数为2×10^5个，再继续培养，2～3 d换液1次。取培养第2、6、10、14天的培养液各1 ml(每个时间点取6个样本)，－20 ℃冻存。设为A组。

1.5.2 平滑肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞复合种植 方法基本同1.5.1，在另4个6孔板复合支架上先种植平滑肌细胞、成纤维细胞2次，再种植内皮细胞2次，间隔时间均为24 h，每只瓣叶种植的成纤维、平滑肌细胞和内皮细胞总数分别为2×10^5、2×10^5个，2～3 d换液1次。取培养第2、6、10、14天的培养液各1 ml(每个时间点取6个样本)，－20 ℃冻存。设为B组。最后4个6孔板复合支架上不种植任何细胞，为空白对照。按试剂盒说明书测定6-keto-$PGF_1\alpha$的含量作为PGI_2的含量。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.5统计软件进行均数间两两比较t检验。

2 结果

2.1 10 d时复合细胞种植在瓣叶支架上常规石蜡切片HE染色

复合种植的细胞紧贴胶原-壳聚糖多孔支架生长，呈多层分布，即见内皮细胞在材料表面较均匀分布，贴壁生长良好，形成单层细胞排列，平滑肌细胞、成纤维细胞比较均匀地分布在支架材料上、内皮细胞下层，并保持细胞活性。有的细胞向支架孔隙内生长(图1)。

2.2 内皮细胞第Ⅷ因子相关抗原和α-平滑肌肌动蛋白免疫组化双染色观察

Ⅷ因子免疫组化染色阳性，表明材料表面覆盖有单层内皮细胞并位于最外层；α-平滑肌肌动蛋白阳性，显示材料上有平滑肌细胞、成纤维细胞存在并在内皮细胞和支架之间呈多层分布(图2)。

2.3 扫描电子显微镜检查

可见多孔支架上有多量细胞黏附，局部成片状，细胞呈球形、梭形、多角形，多层分布，平滑肌细胞、成纤维细胞在支架上，而比较完整的内皮细胞层则覆盖在平滑肌细胞、成纤维细胞上，细胞间建立了部分连接，出现部分融合，并有少许新生基质分泌(图3)。

2.4 放免法检测培养液中内皮细胞分泌的6-keto-$PGF_1\alpha$的含量

复合种植的内皮细胞分泌的PGI_2量在相同时间点比单独种植在瓣膜叶支架上明显增高($P<0.01$)。见表1。

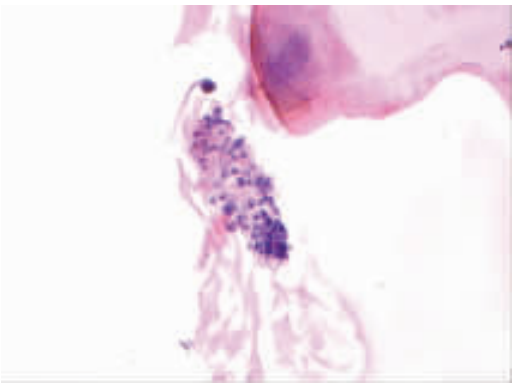


图1 HE染色观察内皮细胞、平滑肌细胞与成纤维细胞分层分布于支架上 （×400）

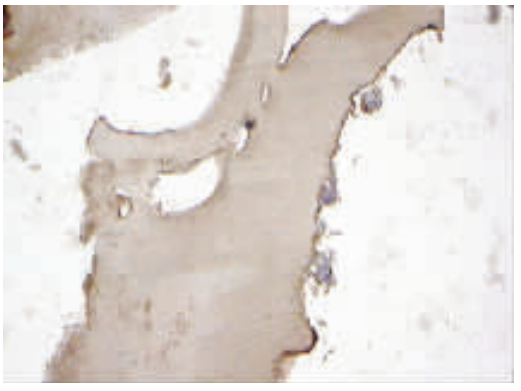


图2 免疫组化观察内皮细胞、平滑肌细胞与成纤维细胞分层分布在支架上 （SABC ×400）

表1 各组培养液中6- keto-$PGF_1\alpha$的含量（pg/ml，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	第2天	第6天	第10天	第14天
A组	264.6±35.2	240.5±30.1	223.3±27.0	201.0±25.2
B组	475.5±53.1[a]	410.2±32.2[a]	385.2±30.1[a]	360.9±15.0[a]

空白对照为0；a：$P<0.01$，与A组比较

3 讨论

组织工程心脏瓣膜由于具有无免疫源性、无需抗凝以及自我生长、修复的优点，受到研究者越来越多的关注[6]。

3.1 预湿处理

细胞必须与材料发生适当的黏附，才能进行迁移、分化和繁殖。黏附是通过细胞膜上的受体来调节的，这些受体能特异地识别材料表面的黏附分子[8]。一些细胞外基质蛋白如纤维粘连蛋白（Fn）、层粘连蛋白（Ln）等能够被细胞膜上的受体特异地识别。当一些生物材料在培养液或体液中能够吸附这类蛋白时，细胞就可以以这类蛋白为介导，黏附于材料表面，进行增殖生长。本研究显示支架材料依次经PBS、DMEM反复漂洗、预湿以清除残留酸性物质及杂质的影响，再经胎牛血清浸泡以吸附粘连蛋白24 h后，比单独用PBS浸泡能增加材料表面的细胞黏附作用，促进细胞的增殖生长。

3.2 适当间隔，反复种植

细胞在三维结构上的分布和黏附很大程度上受限于细胞的重力因素。当细胞被接种在支架后，未黏附牢固的细胞会迅速脱落，所以让细胞快速黏附到支架上是关键。而提高种植细胞的数量则有助于细胞黏附。本实验采用支架正反两面种植，适当间隔（24 h），反复种植的方式，促进种植细胞的增殖，其原因可能在于前期种植的细胞产生的黏附分子增加了后期种植细胞的黏附率。

3.3 复合种植

生理状态下血管内皮细胞不仅是防止血栓和钙化形成的天然屏障，还与平滑肌细胞、成纤维细胞存在形态和功能方面相互影响，以维持瓣膜结构和功能稳定性。本实验细胞复合种植后能均匀在瓣膜叶表面生长，内皮细胞在最外层，内皮细胞和支架间为SMCs，有的SMCs可以嵌入支架的空隙内呈多层生长，有利于内皮细胞贴附并成片平铺生长于支架上。PGI_2是由血管壁内皮细胞合成和释放的一种抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质，生物半衰期很短（3.0～30 min），迅速代谢生成没有活性的6-酮-前列腺素$F_1\alpha$（6-keto-$PGF_1\alpha$），该产物性质相对稳定，本实验用I^{125}标记的



A：平滑肌细胞、成纤维细胞长入支架孔隙内（×100）；B：内皮细胞覆盖在支架表面（×700）；C：内皮细胞与平滑肌细胞、成纤维细胞分层分布在支架表面，细胞间建立了部分连接，出现部分融合，并有少许新生基质分泌（×900）

图3 扫描电子显微镜观察平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞在支架上的分布

6-keto-$PGF_1\alpha$ 抗体，检测培养基中 6-keto-$PGF_1\alpha$ 的含量代替 PGI_2 的累积量。通过测定，复合种植的内皮细胞分泌的 PGI_2 量在相同时间点比单独种植在瓣膜叶支架上明显增高（$P<0.01$），说明 SMCs 的存在能促进 PGI_2 的分泌，其原因为 SMCs 分泌的血管紧张素 2 和血小板衍生生长因子（PDGF）可刺激 PGI_2 的合成，并可通过直接或间接的方式促进了 ECs 分泌 PGI_2，而内皮细胞 PGI_2 分泌量的增加则明显增强了瓣膜的抗凝能力。陈威中等[9]也研究发现复合种植中内皮细胞和平滑肌细胞之间已发生了对话，使内皮细胞的相关功能增强[8]。

3.4 生长因子

本实验中观察到加入 ECGS + 肝素组细胞数量在同一时间点明显较未加入 ECGS 组高，说明 ECGS 能明显促进种植细胞的增殖。ECGS 是从牛垂体中提取出来的，含有 aFGF、bFGF、ECGF 等多种生长因子，能够刺激内皮细胞增殖生长，再加入肝素，使其作用充分发挥，其中血管内皮生长因子被认为是诱导间充质干细胞分化为血管内皮细胞的关键[2]。

3.5 瓣膜构建

1995 年 Shinoka 等[10]首次应用此技术将羊主动脉壁成纤维细胞及血管内皮细胞依次种植于人工合成的聚乙醇酸/聚乳酸共聚物支架上构建组织工程心脏瓣膜并将其植入羊肺动脉瓣区，获得初步成功。之后，Hoerstrup 等[11-13]体外构建组织工程心脏瓣膜，瓣膜功能良好。Dohmen 等[14] 2000 年首次将受体细胞化组织工程同种心脏瓣膜应用于临床。之后，将种植自体大隐静脉内皮细胞的去细胞猪主动脉瓣植入 6 例 Ross 术患者肺动脉瓣区，临床效果满意。又将 1 例主动脉瓣关闭不全的前臂头静脉壁细胞体外培养扩增后，种植于去细胞之同种肺动脉瓣膜上，在术中重建右室流出道，术后早期检查 C 反应蛋白水平及体温无显著升高；术后 1 年时食管超声示瓣叶结构及功能完整，血流动力学良好，平均跨瓣压差稳定；核磁共振示瓣叶形态完整，无血栓及钙化，疗效满意。Naito 等[15]在可降解材料上种植内皮细胞制成组织工程心脏瓣膜的基础上成功为 1 例患儿植入此种组织工程心脏瓣膜，说明静态合理地种植内皮细胞能够构建出符合临床需要的心脏瓣膜。

本实验中，胶原-壳聚糖瓣膜支架经正反两面适当间隔，反复接种平滑肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞后 HE 染色证实材料表面被种植的细胞所覆盖；扫描电镜和内皮细胞Ⅷ因子免疫组化染色阳性证明其表面有内皮细胞覆盖；α-平滑肌肌动蛋白免疫组化染色阳性，证明有平滑肌细胞、成纤维细胞存在于内皮细胞与瓣膜支架材料之间，说明已具备瓣膜的雏形。一般认为先种植的肌成纤维细胞起到桥梁的作用，通过细胞间的相互作用和分泌的 ECM，协助后种植的内皮细胞黏附、分化和生长，抵抗血流的冲击[16]。通过测定，顺序接种平滑肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞的瓣膜支架分泌 PGI_2 均明显高于单纯种植内皮细胞的瓣膜支架，表明内皮细胞不仅能在材料上黏附生长，而且还能够分泌血管活性物质，是具有“生理功能”的组织工程心脏瓣膜，从而可防止血小板、纤维素的沉积，防止免疫反应，减少炎症细胞的浸润，可有效延缓或防止生物瓣的衰坏、钙化，有望从根本上解决生物瓣耐久性的难题，具有重要的临床意义。

参考文献：

[1] 周康，周新民. 组织工程心脏瓣膜及干细胞应用前景[J]. 国际生物医学工程杂志，2006，29(2)：110-113.
[2] 张米，张迪. 心脏瓣膜组织工程研究新进展[J]. 心血管病学进展，2009，30(5)：817-820.
[3] 宋毅，肖颖彬. 人工二尖瓣膜置换术后早期血小板聚集性研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(9)：982-984.
[4] 王韧，翁国星. 瓣膜支架上种植内皮细胞的离体研究[J]. 福建医科大学学报，2006，40(3)：287-289.
[5] 孙晓宁，赵强，徐德民，等. 骨髓间充质干细胞和猪去细胞瓣膜支架构建组织工程瓣膜[J]. 复旦学报：医学版，2007，34(2)：183-186.
[6] Vesely L. Heart valve tissue engineering[J]. Circ Res，2005，97(8)：743-755.
[7] 卢风琦，曹宗顺. 壳聚糖-明胶混合膜的制备及其生物降解性研究[J]. 生物工程学杂志，1998，15(4)：323-324.
[8] Hynes R O. Integrins：versatility，modulation，and signaling in cell adhesion[J]. Cell，1992，69(1)：11-25.
[9] 陈威中，吴满平. 人脐动脉内皮细胞-平滑肌细胞共培养模型的建立及鉴定[J]. 复旦学报：医学版，2009，36(6)：768-775.
[10] Shinoka T，Breuer C K，Tanel R E，*et al*. Tissue engineering heart valves：valve leaflet replacement study in a lamb model[J]. Ann Thorac Surg，1995，60(6 Suppl)：S513-S516.
[11] Hoerstrup S P，Sodian R，Daebritz S，*et al*. Functional living trileaflet heart valves grown *in vitro*[J]. Circulation，2000，102(19 Suppl 3)：Ⅲ44-Ⅲ49.
[12] Stock U A，Nagashima M，Khalil P N，*et al*. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg，2000，119(4 Pt 1)：732-740.
[13] Goldstein S，Clarke D R，Walsh S P，*et al*. Transpecies heart valve transplant：advanced studies of a bioengineered xeno-autograft[J]. Ann Thorac Surg，2000，70(6)：1962-1969.
[14] Dohmen P M，Lembcke A，Hotz H，*et al*. Ross operation with a tissue-engineered heart valve[J]. Ann Thorac Sury，2002，74(5)：1438-1442.
[15] Naito Y，Imai Y，Shin 'oka T，*et al*. Successful clinical application of tissue-engineered graft for extracardiac Fontan operation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg，2003，125(2)：419-420.
[16] 王圣，李温斌. 组织工程心脏瓣膜研究新进展[J]. 中国医疗器械信息，2008，14(9)：31-37，83.

（收稿 2010-07-17 修回 2010-09-01）
（编辑 龙 亮）