·综 述·

小口径组织工程血管的研究进展

Research progression of small- diameter tissue engineering blood vessels

宋 磊,周 强,郭 平 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

[关键词] 组织工程;血管;种子细胞;支架;生物反应器
[中图分类号] R318 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2009)05-0342-03

以动脉粥样硬化性心脏病为代表的动脉缺血性疾病,是引起人类死亡的主要原因之一,其治疗方法主要是进行动脉移植手术。随着心、脑和肾血管病等血管外科疾病手术治疗技术的发展,不同长度和口径的动脉移植材料的研究就成为当前世界关注的热点之一。

血管组织工程的具体内容是指在体外获取、纯化和扩增血管壁的内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞,接种在管状的组织工程支架材料上,体外培养形成同天然血管结构和功能相似的组织,植入体内后一段时间支架材料降解消失,剩余部分经生长和重塑具有体内正常动静脉所需的生物学功能和生物力学强度。组织工程血管培养时间较短,具有良好的生物相容性、可生长性、可塑性,无免疫排斥反应,不易形成血栓,不易钙化和感染,能长期维持其通畅性。组织工程血管为动脉移植材料,特别是为小口径动脉移植材料的研究指出了一条新方向。

1 种子细胞

1.1 血管壁细胞

1.1.1 大血管壁细胞 血管平滑肌细胞在血管壁中具有可收缩性、调节细胞外基质的分泌和提供生物力学的稳定性;完整的内皮细胞层在血流和血管壁之间提供选择性渗透作用和抗凝作用。两者之间相互影响,相互作用,共同维持血管的结构和功能。Wen 等[1]将从人大隐静脉分离培养的平滑肌细胞和内皮细胞分别和共同接种在聚乙醇酸支架上,培养 28 d 后,通过扫描电镜和免疫荧光检测发现,平滑肌细胞填满支架空隙,同平滑肌细胞共培养的内皮细胞的内皮缩血管肽分泌水平,要明显高于单纯接种的内皮细胞,为下一步制备管状组织血管打下基础。Iwasaki 等[2]在 2008 年报道,体外扩增培养牛主动脉的平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞,将平滑肌细胞接种在聚乙醇酸和聚已酸内酯支架上,将成纤维细胞接种在聚乙醇酸支架上,包裹在直径 6 mm 的硅胶管上,放入孵箱中培养 30 d 去掉硅胶管,在管腔内面接种内皮细胞,放入孵箱中培养 2 d,然后放入生物反应器动态培养 2 周,经检测构建的组织工程血管在形态学、组织学和生物力学上,都非常接近天然血管。

1.1.2 微血管壁细胞 脂肪内的微血管内皮细胞也可以用作构建组织工程血管的种子细胞。Cardinal 等[3]通过抽脂法抽取人皮下脂肪,分离培养脂肪微血管内皮细胞,体外培养扩增后接种到高分子聚合组织工程血管支架材料上,然后置入生物反应器内进行动态仿生培养,扫描电镜和免疫组化染色证实内皮细胞在管状支架材料和置入其中的冠状动脉支架内表面形成完整的单层内皮细胞层。但成熟血管壁细胞的获取会造成新的损伤,扩增能力有限,而且多次传代后性状会发生改变,还不能实现组织工程血管的量产和临床使用的需要。

1.2 干细胞

1.2.1 前体细胞

1.2.1.1 平滑肌祖细胞 Xie 等[4]从大鼠外周血获取平滑肌祖细胞,然后用加有血小板衍生生长因子-BB 的内皮生长培养基-2-MV 培养基诱导 3 个星期,经鉴定其具有血管平滑肌细胞的生长特征和分子标记;然后接种到人工合成的高分子聚合组织工程血管支架材料上,表现出很好的增殖能力和代谢活性。

1.2.1.2 内皮祖细胞 Kaushal 等[5]从绵羊的外周血中分离获取内皮祖细胞,体外培养扩增后接种到脱细胞处理过的猪髂血管上,再移植到绵羊的颈动脉,细胞 - 支架复合物保持 130 d 畅通,而未接种细胞的猪髂血管在绵羊体内 15 d 后就阻塞了,而且细胞 - 支架复合物表现出同正常血管相似的收缩性和一氧化氮介导的血管壁细胞释放化学物质功能。Allen 等[6]从猪的外周血中分离获取内皮祖细胞,体外培养扩增后化学诱导,经鉴定表达血管内皮细胞的标记性 von willebrand 因子等,然后和猪主动脉平滑肌细胞一起接种到人工合成管状支架材料 POC 上进行体外培养,经检测内皮祖细胞诱导的类内皮细胞的生长结构、表型和功能都与猪正常主动脉内皮细胞相似。Mendelson 等[7]在 2007 年报道,将羊血中获得的内皮前体细胞和骨髓获得的间充质干细胞体外培养扩增,接种在被 P4HB 预处理过表面的 PGA 支架上,层流培养液中培养 5 d 后,细胞支架复合物移植到羊肺动脉的血管壁上,研究结果表明可以培养出类似正常血管组织分层和功能的组织工程血管。

1.2.2 成体干细胞 最常用于构建组织工程血管的成体干细胞是骨髓间充质干细胞。骨髓间充质干细胞的来源比较多,而且具有很强的增殖能力和定向分化能力,可从自身的骨髓获得进行培养扩增,多次传代表型不会发生改变。Lim 等[8]分离扩增狗骨髓间充质干细胞,然后体外诱导分化成血管平滑肌细胞和内皮细胞,接种到 PLCL 和 PGA 聚合成的长 40 mm、内径

[基金项目] 国家 863 基金资助项目(2006AA02Z4E3)
[收稿日期] 2009-06-17 [修回日期] 2009-07-21

10 mm的支架材料上,然后移植回狗的腹主动脉上,8周后血管仍然通畅,组织学、免疫组化染色和Western blot检测的结果显示组织工程血管的结构和功能都接近正常的狗腹主动脉。Gong等[9]分离扩增人骨髓间充质干细胞,体外化学诱导2周,检测表达血管平滑肌细胞的标志分子;将未经诱导的人骨髓间充质干细胞接种到管状支架材料上,置入生物反应器中进行仿生培养后,经检测表达血管平滑肌细胞的标志分子。建立骨髓间充质干细胞接种到支架材料前后的诱导方法,对将其应用于血管组织工程具有重要的意义。

1.2.3 胚胎干细胞 目前已经证实胚胎干细胞可以分化为血管平滑肌细胞和内皮细胞,并且已有人应用于构建组织工程血管。2006年,Abilez等[10]报道,将种植了鼠胚胎干细胞的3D胶原支架材料在体外仿生生物反应器中培养,实验结果表明鼠胚胎干细胞可以在支架上生长繁殖,并发现在生物反应器中长时间搏动性应力的影响下,鼠胚胎干细胞具有向血管平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞分化的能力。同骨髓间充质干细胞一样,诱导胚胎干细胞定向分化为血管平滑肌细胞和内皮细胞的方法仍不成熟和有效;获取和培养过程较复杂;免疫排斥反应和伦理道德法律的不完善,都是胚胎干细胞应用于血管组织工程需要解决的问题。

1.3 基因修饰种子细胞

一些研究表明,在高血脂、糖尿病和高龄人群,其外周血中存在的内皮祖细胞较少,而且功能也大部分受到损伤,构建的组织工程血管回植体内后,会发生动脉粥样硬化引起血管狭窄。Zhu等[11]通过基因转染技术将A20基因同人内皮祖细胞相结合,然后诱导分化成血管内皮细胞,和血管平滑肌细胞一起接种到猪的脱细胞血管支架上,置入生物反应器内培养,组织学和生物力学检测发现同人体正常动脉接近,移植到大鼠的颈动脉上6个月后,彩色多普勒检查发现管腔畅通。证明可通过使用转基因技术,使组织工程血管具有抗凝性、减少内膜增生以保持血管长期通畅的功能。Cai等[12]在2002年报道通过转基因增加了人间充质干细胞(MSC)血管内皮生长因子(VEGF)的表达,体外研究表明此种人间充质干细胞可以使人脐静脉内皮细胞的增殖能力明显提高,开拓了人间充质干细胞做为构建组织工程血管种子细胞的前景。

2 支架材料

2.1 天然生物材料

天然的支架材料来源于生物体,具有良好的种子细胞相容性,能为细胞粘附、增殖和成熟提供近似于体内正常血管组织细胞间的基质条件,可分为大分子结构材料和脱细胞生物支架。

2.1.1 大分子结构材料 天然胶原是血管壁细胞外基质中主要的结构性物质,占血管壁干重的20%~50%。早在1993年,就有人进行了关于天然胶原在血管组织工程中用作支架材料的研究。Kanayama等[13]将从生物体内提取的胶原经过化学和热处理,交联制备成一种弹性胶原凝胶膜,将扩增后的人脐静脉内皮细胞接种在支架上,分别进行静态和拉伸动态培养,经检测人脐静脉内皮细胞在支架上可以稳定的增殖和发挥功能。纤维蛋白胶是天然的可降解材料,能够形成类似天然的结构性纤维蛋白凝块,具有良好的细胞粘附性、生物相容性、可进行进一步改造、制备方便和无免疫排斥等优点,经研究在血管组织工程方面具有应用价值。

2.1.2 脱细胞生物支架 脱细胞生物支架是脱去细胞的血管基质,保留了正常血管细胞间质和完整的支架结构,基质中的一些物质可以被细胞膜的相应受体所识别,促进细胞的粘附、增殖和成熟;胶原纤维和弹性纤维组成的支架结构维持了组织工程血管生物力学性能。Jo等[14]在2007年报道,从猪的锁骨下动脉获取脱细胞血管基质,植入狗的腹部大动脉,结果发现血管内皮化的程度明显优于对照组,血栓的发生率明显低于对照组,血管平滑肌细胞在血管基质中生长良好。但是异种脱细胞血管基质仍含有少量异种抗原,而同种脱细胞血管基质,生物性能更接近人体,免疫原性进一步降低,更适用于血管组织工程。

2.2 人工合成材料

人工合成材料是最可能进行大规模批量生产的组织工程血管支架材料,其来源丰富,具有良好的生物相容性、可塑性、可降解性、生物力学强度和无免疫原性,并可通过处理精确地控制其形态、尺寸、孔径大小、孔径率、力学强度和降解速率。

PGA是最常用于血管组织工程的支架材料,其多微孔的结构适宜营养的渗透和细胞向组织内部爬行生长,而且易于编织成各种不同的形状。将牛的主动脉平滑肌细胞接种在管状PGA支架上,置入生物反应器中进行动态仿生培养8周,然后接种内皮细胞,构建的组织工程血管移植到猪的隐动脉上能够保持4周的通畅。2006年,Matsumura等[15]报道以聚乙醇酸交酯和聚合海绵制成支架,经种植扩增后的狗单核骨髓细胞,然后将细胞支架复合物移植到同一只狗的下腔静脉,通过生物化学、生物力学和组织学对血管移植物进行分析,结果表明支架材料具有生物相容性,并且接种的细胞具有接近正常细胞的功能和力学特点。Roh等[16]在2008年报道,以聚羟基乙酸和聚左旋乳酸制成支架,研究发现其具有多孔性、生物力学特性和生物相容性,可以做为血管组织工程的支架材料,经接种种子细胞和动态培养后,移植到裸鼠体内,结果证实基本满足移植手术的要求。

2.3 复合生物材料

2007年,Arkudas等[17]报道用纤维蛋白将血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)固定在结缔组织制成的支架上,实验结果发现VEGF和FGF明显促进了血管组成细胞的增殖和分化,开拓了将结合了细胞因子的支架材料作为构建组织工程血管支架的前景。Prasad等[18]在2008年报道,将纤维连接蛋白和生长因子同血管支架材料相结合进行实验,研究结果证实有利于血管内皮细胞在其内腔面贴附增殖,形成完整的血管内膜层,并能有效防止血栓的形成。

3 应力仿生培养方式

3.1 血流动力学的影响

为组织工程血管的体外培养提供稳定的、与生物体内相似

的生长环境,具有重要的意义。培养环境的组成因素分为化学因素和物理因素,而物理因素中最重要的就是对组织工程血管进行模仿生理血管搏动和拉伸的应力刺激。搏动性血流所产生的力学刺激主要包括2种:一种是沿血管周径分布的由血流压力形成的环形张力,可以影响平滑肌细胞的增殖、排列和功能状况;另一种是平行于血流长轴的由血流对血管内表面造成的剪切力,主要影响内皮细胞的排列和功能状态。

3.2 用于组织工程血管仿生应力培养的生物反应器的发展

用于组织工程血管仿生应力培养的生物反应器能够提供可控制的仿生应力刺激环境,在组织工程血管移植到体内以前用于体外培养,以加强组织结构,加快组织生长和成熟分化,也可以用来进行对组织工程血管进行生理和生物力学的检测。

在静止条件下培养的组织工程血管,平滑肌细胞排列散乱,而在一定的搏动仿生刺激条件下培养的组织工程血管,平滑肌细胞形态规整、分布均匀、排列整齐,细胞外基质中的胶原纤维也分布均匀、排列整齐,同时血管组织强度、缝合张力等生物力学指标也明显优于静止培养的组织工程血管。还有研究证明,在生物反应器的仿生应力刺激下,可促进干细胞向血管壁细胞分化。Yamamoto等[19]发现在生物反应器中培养液剪切力的的作用下,可促进内皮祖细胞的增殖和向血管内皮细胞分化。

生物血管、人工合成材料和生物化的人工合成材料在作为血管移植材料方面具有各自的优点和缺点,其中人工合成材料在临床上大、中口径的血管移植中效果满意,但在小口径的血管移植时易发生再狭窄。组织工程血管为小口径动脉移植材料的研究指出了一条新方向,但目前尚处于实验研究阶段,如果要大规模应用于临床,还需要解决以下技术问题:①研究出有效的种子细胞获取、纯化和诱导分化技术,并使其标准化;②寻找具有良好生物相容性,成本低,又易于制造,能够进行大规模量产的支架材料;③血管壁种子细胞的接种技术、顺序和条件的摸索;④研制出能更加真实和全面的模拟体内生理环境的生物反应器,并在此基础上增加如生物力学等检测功能。随着组织工程学技术及其相关学科的发展,一定能够解决上述问题,得到成功应用于临床的小口径组织工程血管。

[参考文献]

[1] Wen SJ, Zhao LM, Wang SG, et al. Human vascular smooth muscle cells and endothelial cells cocultured on polyglycolic acid (70/30) scaffold in tissue engineered vascular graft[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(15): 1331-1335.

[2] Iwasaki K, Kojima K, Kodama S, et al. Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor[J]. Circulation, 2008, 118(14 Suppl): S52-57.

[3] Cardinal KO, Bonnema GT, Hofer H, et al. Tissue-engineered vascular grafts as in vitro blood vessel mimics for the evaluation of endothelialization of intravascular devices[J]. Tissue Eng, 2006, 12(12): 3431-3438.

[4] Xie SZ, Fang NT, Liu S, et al. Differentiation of smooth muscle progenitor cells in peripheral blood and its application in tissue engineered blood vessels[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(12): 923-930.

[5] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo[J]. Nat Med, 2001, 7(9): 1035-1040.

[6] Allen J, Khan S, Serrano MC, et al. Characterization of porcine circulating progenitor cells: toward a functional endothelium[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(1): 183-194.

[7] Mendelson K, Aikawa E, Mettler BA, et al. Healing and remodeling of bioengineered pulmonary artery patches implanted in sheep[J]. Cardiovasc Pathol, 2007, 16(5): 277-282.

[8] Lim SH, Cho SW, Park JC, et al. Tissue-engineered blood vessels with endothelial nitric oxide synthase activity[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008, 85(2): 537-546.

[9] Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) [J]. FASEB J, 2008, 22(6): 1635-1648.

[10] Abilez O, Benharash P, Mehrotra M, et al. A novel culture system shows that stem cells can be grown in 3D and under physiologic pulsatile conditions for tissue engineering of vascular grafts[J]. J Surg Res, 2006, 132(2): 170-178.

[11] Zhu C, Ying D, Mi J, et al. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix[J]. Biomaterials, 2008, 29(17): 2628-2636.

[12] Cai S, Ma Q, Yu X, et al. Expression of human VEGF(121) cDNA in mouse bone marrow stromal cells[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(6): 914-918.

[13] Kanayama T, Nagai N, Mori K, et al. Application of elastic salmon collagen gel to uniaxial stretching culture of human umbilical vein endothelial cells[J]. J Biosci Bioeng, 2008, 105(5): 554-557.

[14] Jo WM, Sohn YS, Choi YH, et al. Modified acellularization for successful vascular xenotransplantation[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(2): 262-269.

[15] Matsumura G, Ishihara Y, Miyagawa Tomita S, et al. Evaluation of tissue-engineered vascular autografts[J]. Tissue Eng, 2006, 12(11): 3075-3083.

[16] Roh JD, Nelson GN, Brennan MP, et al. Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model[J]. Biomaterials, 2008, 29(10): 1454-1463.

[17] Arkudas A, Tjiawi J, Bleiziffer O, et al. Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model[J]. Mol Med, 2007, 13(9-10): 480-487.

[18] Prasad CK, Krishnan LK. Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2008, 4(1): 182-191.

[19] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress[J]. J Appl Physiol, 2003, 95(5): 2081-2088.

(编辑:杨爱军)