

组织工程血管模型中的细胞粘附

刘录山^{1,2}, 王贵学¹, 危当恒^{1,2}, 唐朝克², 王佐², 易光辉², 徐世荣¹, 杨永宗²

(1. 重庆大学教育部生物力学与组织工程重点实验室暨重庆大学生物工程学院, 重庆市 400444;

2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 生物医学工程学; 组织工程血管模型中细胞粘附的变化; 平行平板流动腔; 剪切力; 组织工程血管模型; 细胞粘附

[摘要] 本文运用一种模拟血流动力学状态的平板流动腔血管模型, 研究在不同剪切力作用和不同处理因素对 endothelial 细胞的粘附保留状态的影响。用不同因素处理细胞载片后在其上培养细胞, 再用同一剪切力作用, 或者用同一底物处理细胞载片后用不同剪切力作用。结果发现, 在生理剪切力条件下, 低剪切力(2.1 Pa)作用时细胞保留率为 90.38% ± 2.09%, 比高剪切力(4.2 Pa)作用时细胞保留率(46.58% ± 1.98%)要高; 多聚赖氨酸处理时的细胞保留率(90.38% ± 2.09%)和纤维连接素处理时的细胞保留率(91.59% ± 1.24%)比Ⅲ型胶原处理时细胞保留率(19.77% ± 1.05%)要高, 且不同底物对细胞脱落行为有不同影响; 而血管内皮生长因子基因转染对细胞粘附无明显影响。此结果提示, 低剪切力、多聚赖氨酸和纤维连接素有利于组织工程血管模型中的细胞粘附。

[中图分类号] R3

[文献标识码] A

The Experimental Study of Cells Adhesion and Retention on the Tissue Engineered Vascular Grafts in vitro

LIU Lu-Shan^{1,2}, WANG Gu-Xue¹, WEI Dang-Heng^{1,2}, TANG Chao-Ke², WANG Zuo², YI Guang-Hui², XU Shi-Rong¹, and YANG Yong-Zong²

(1. Key Lab for Biomechanics Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044; 2. The Institute of Cardiovascular Diseases Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Shear Stress; Tissue Engineered Vascular Graft; Cell Adhesion; Parallel Plate Flow Chamber; Substrate

[ABSTRACT] **Aim** To study the adhesion and retention of endothelial cells in different conditions, such as different shear stress and substrates, and gene transfected or not, with the parallel plate flow chamber. **Methods** After treated with different substrates, endothelial cells were cultured on the substrates, and were processed by the same size shear stress. Or endothelial cells were processed by different size shear stress which cultured on the same substrate. **Results** Cells retention ratio was higher in low shear stress than high shear stress although both of them were in normal shear stress. Cells retention ratio was high in poly-L lysine and fibronectin than in collagen Ⅲ. There was no effect on retention of endothelial cells in poly-L lysine that gene transfected into endothelial cells. **Conclusion** Different size shear stress and substrates effect the retention of endothelial cells.

随着组织工程技术的发展, 活细胞在生物支架材料上的粘附与保留成为一个突出的问题, 种植活细胞的生物材料在置入体内以后, 受到体内临近组织的各种影响, 其中包括生物力学方面的影响^[1]。这些因素对种植活细胞的生长和保留是一个值得研究和关注的问题。对于组织工程血管来说, 种植的内皮细胞直接暴露于血流动力学作用之下, 其细胞

粘附与保留将直接影响构建的组织工程血管的质量和组织工程血管研究的发展^[2]。研究在血流动力学作用下内皮细胞的粘附和保留具有重要的意义, 本文应用平板流动腔从生物力学角度研究不同的促进内皮细胞粘附的基质对内皮细胞粘附的影响。

1 材料与方法

1.1 平行平板流动腔装置组成(图 1, Figure 1)

1.1.1 灌流部分 其组成为: 特定玻璃制成的储液上槽、储液下槽 1 个, 垂直放置的两槽之间通过几根聚四氟乙烯管(管径为 1.5~2.0 mm)把 1 个流动腔、1 个微型流量计和 1 个循环泵连接起来。流动保持为定常层流。

[收稿日期] 2003-10-15

[修回日期] 2004-06-18

[基金资助] 高等学校重点实验室访问学者基金和湖南省教委重点课题(972009)基金

[作者简介] 刘录山, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治和血管组织工程。王贵学, 博士, 加拿大 LAVAL 大学博士后, 教授, 博士研究生导师, 重庆大学生物工程学院副院长, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制和心血管材料。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会主任委员, 研究领域为动脉粥样硬化发病机制及防治。

1.1.2 流动腔部分 由有机玻璃块(规格大小可根据不同试验要求设置,本文试验采用规格为 65 mm×20 mm)、垫片(厚度为 0.2 mm)、不锈钢架和细胞载片组成。有机玻璃板两端设有进出口,循环液从进口通过板上的狭缝(其宽度随试验要求而定,本文试验为 2.0 cm)和细胞载片间形成的空间流入出口端的狭缝,再从出口流出。入口口径(1.5~2.0 mm)大于出口口径(1.0~1.5 mm)。

1.1.3 其它部分 包括监视及录象系统。实验期间,保持腔内 5% CO₂ + 95% O₂ 的气体环境和 37℃ 温度。

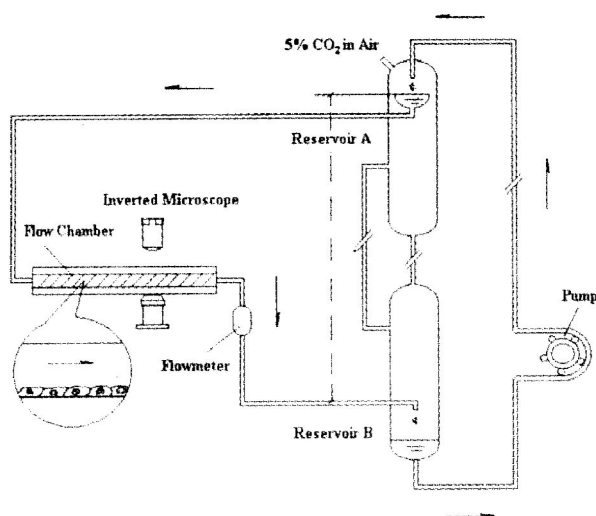


图 1. 平行平板流动腔装置示意图

Figure 1. Schematic diagram of parallel-plate flow chamber

1.2 细胞载片的处理

细胞载片用 75% 乙醇浸泡 30 min, 无菌三蒸水冲洗 3 次后晾干。分别配制 10 mg/L 多聚赖氨酸、10 mg/L Ⅳ型胶原和 20 mg/L 纤维连接素(所采用浓度为预实验确定的最佳浓度), 加到细胞载片上, 37℃ 温育 40 min 或室温下过夜后弃之。

1.3 内皮细胞在载片上培养

制备内皮细胞(ECV304)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)转染 ECV304 细胞悬液, 调节细胞密度至 1×10^8 /L, 加到处理了的细胞载片上, 10% 小牛血清, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养至 80% 融合时做下一步实验。

1.4 剪切力调节与控制

将 80% 融合的细胞载片置入流动腔中, 加入 DMEM-F12 培养基 40 mL 于装置的储液下槽中, 分别调节流量为 14 mL/min, 和 28 mL/min, 即造成对内皮细胞的剪切力分别为 2.1 Pa 和 4.2 Pa, 作用 24 h 后计数保留细胞。

2 结果

2.1 剪切力作用下不同处理因素对内皮细胞的保留效果

2.1 Pa 剪切力作用 24 h 后, 各组细胞保留率见表 1(Table 1)。与对照组比较, Ⅳ型胶原处理组细胞保留率无显著性差异($P > 0.05$), 多聚赖氨酸处理组和纤维连接素处理组细胞保留率显著增加($P < 0.05$); 这两组间细胞保留率无显著性差异。

表 1. 剪切力作用下不同底物处理对内皮细胞保留率影响

Table 1. The effect of shear stress on the retention ratio of endothelial cells planted on different substrates ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

处理因素	细胞保留率
对照组	18.50% \pm 2.08%
Ⅳ型胶原组	19.77% \pm 1.05% ^a
多聚赖氨酸组	90.38% \pm 2.09% ^b
纤维连接素组	91.59% \pm 1.24% ^b

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 不同大小剪切力作用对内皮细胞保留效果的影响

多聚赖氨酸作为底物, 2.1 Pa 剪切力作用 24 h 后细胞保留率为 90.38% \pm 2.09%, 4.2 Pa 剪切力作用 24 h 后为 46.58% \pm 1.98%, 两者间差异有显著性($n = 3$, $P < 0.05$)。

2.3 剪切力作用对内皮细胞脱落的影响

多聚赖氨酸和纤维连接素处理组主要在流动腔入口和出口部位有少量细胞脱落, 在流动腔中间部位几乎看不到内皮细胞脱落, 内皮细胞呈片状脱落。Ⅳ型胶原处理组从 4 h 始见细胞脱落, 12 h 细胞脱落变得明显, 至 24 h 实验结束时, 细胞大部分脱落, 仅在细胞载片中间部位有不成片细胞保留。未处理组细胞载片上剪切力对细胞粘附的影响基本与 Ⅳ型胶原处理组相似, 但细胞开始脱落时间提前。

2.4 血管内皮生长因子转染后对内皮细胞粘附的影响

分别将转染和未转染细胞种植于细胞载片置入平行平板流动腔中, 用 2.1 Pa 剪切力作用 24 h 后, 转染组内皮细胞保留率为 91.15% \pm 0.71%, 未转染组为 90.38% \pm 2.09%, 两者保留率差别无显著性($n = 3$, $P > 0.05$)。转染组细胞保留情况与未转染组基本相似, 即在流动腔的入口和出口部位细胞脱落较多, 而在中间部位几乎无细胞脱落。

3 讨论

平行平板流动腔是一很好的研究内皮细胞与白细胞和血小板之间的相互粘附及剪切力作用对内皮细胞形态功能影响的装置^[3,4]。本文研究结果表明,不同的基质对内皮细胞在流动剪切力作用下保留效果是有差别的,其中多聚赖氨酸和纤维连接素处理组间差异无显著性,而Ⅲ型胶原与多聚赖氨酸和纤维连接素处理组间差异均有显著性。需要指出的是,此种差异的显著性可能并非基质之间、本身粘附能力大小引起的,而是基质与载片之间的粘附能力的差别引发的,这使得我们在人工血管设计及以血管内支架等作为细胞粘附和药物释放的载体时必须考虑此种因素的作用。同时我们的研究可以为以后筛选新的促内皮细胞粘附的新基质提供一个新的方法。在组织工程型血管的构建或血管内支架的内皮细胞覆盖中,有必要对种植的内皮细胞进行基因修饰,以提高内皮细胞某些方面的功能,如细胞生长加快,一氧化氮分泌增加等。以往研究中,建立了转内皮型一氧化氮合酶和组织型纤溶酶原激活剂的内皮细胞模型,研究结果表明转染后可能降低内皮细胞剪切力作用下的粘附保留率^[5,6]。我们以往建立了 VEGF 转染内皮细胞株^[7],目的是利用 VEGF 促内皮细胞快速分裂增殖的作用加速组织工程型血管和血管内支架的快速内皮化。本文在已建立的 VEGF 转染内皮细胞株的基础上研究了 VEGF 转染对内皮细胞粘附的影响。研究结果表明,VEGF 转染不影响

内皮细胞与基质间的粘附,这为 VEGF 转染的内皮细胞在组织工程血管研究中的应用奠定了基础。本文研究结果发现,内皮细胞的脱落主要发生在入口和出口部位,而冠脉搭桥血管在数年后主要在连接部位发生狭窄,这是否也是因为在入口和出口部位由于血流动力学因素导致了该部位的内皮细胞脱落从而导致再狭窄的发生?这两者之间是否有共同的作用机制将是我们下一步研究的一个令人感兴趣的问题。

[参考文献]

- [1] Mironov V, Kasyanov V, McAllister K, Oliver S, Sistino J, Markwald R. Perfusion bioreactor for vascular tissue engineering with capacities for longitudinal stretch. *J Craniofac Surg*, 2003, **14** (3): 340-347
 - [2] Tiwari A, Kidane A, Salacinski H, Punshon G, Hamilton G, Seifalian AM. Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2003, **25** (4): 325-329
 - [3] 张文胜, 陈槐卿, 陈友琴, 杨元. 流体切应力作用时间对内皮细胞 IL-8 基因表达的影响. *生物医学工程学杂志*, 2002, **19** (1): 40-44
 - [4] 张文胜, 陈槐卿, 李良, 陈友琴, 杨元. 流体切应力强度对内皮细胞 IL-8 基因表达的影响. *生物医学工程学杂志*, 2002, **19** (2): 181-185
 - [5] Dunn PF, Newman KD, Jones M, Yamada I, Shayani V, Vimani R, et al. Seeding of vascular grafts with genetically modified endothelial cells. Secretion of recombinant TPA results in decreased seeded cell retention in vitro and in vivo. *Circulation*, 1996, **93** (7): 1 439-446
 - [6] Kader KN, Akella R, Ziats NP, Lakey LA, Harasaki H, Ranieri JP, et al. eNOS overexpressing endothelial cells inhibit platelet aggregation and smooth muscle cell proliferation in vitro. *Tissue Eng*, 2000, **6** (3): 241-251
 - [7] 刘录山, 张善春, 尹卫东, 危当恒, 王贵学, 蔡绍哲, 等. 脂质体介导血管内皮生长因子基因在内皮细胞的稳定表达. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 118-121
- (此文编辑 胡必利)

• 书讯 •

《动脉粥样硬化性心血管病——基础与临床》一书已经出版

由中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会主任委员、《中国动脉硬化杂志》主篇、南华大学病理生理学博士研究生导师杨永宗教授任主编、苏州大学博士研究生导师、中国工程院院士阮长耿教授、北京大学医学部博士研究生导师唐朝枢教授、南京医科大学博士研究生导师范乐明教授和广东省人民医院陈纪言主任医师任副主编,有 40 余位专家参与编写,科学出版社出版的《动脉粥样硬化性心血管病——基础与临床》一书已经面世,动脉粥样硬化研究领域的老前辈、中国医学科学院基础医学研究所余铭鹏教授为该书作序。该书分为基础、临床和进展三篇,35 章 158 节 110 万字。该书在内容与结构上兼顾基础与临床,突出最新进展,全面、详实地介绍了动脉粥样硬化性心血管病的研究成果和发展方向,既可为广大医务工作者提供新的诊疗技术,又可在加深对有关疾病的病因和发病机制的认识过程中起到积极作用。该书由中国动脉硬化杂志编辑部代发行,定价 118 元,个人购买,7 折优惠,每本 85 元(含邮费)。凡需购买者,请汇款到中国动脉硬化杂志编辑部,地址是:湖南省衡阳市南华大学内,中国动脉硬化杂志编辑部,邮政编码 421001,联系人常玲。汇款时请在汇款单上注明购买《动脉粥样硬化性心血管病——基础与临床》,并请详细写明购书人的邮政编码、地址和姓名。