

预血管化细胞膜的构建

任利玲^{1*} 刘斌¹ 马东洋² 冯玉霞¹ 陈佳¹

(¹兰州大学口腔医学院, 兰州 730000; ²兰州军区兰州总医院口腔颌面外科, 兰州 730052)

摘要 为探索新的体外获得毛细血管样网络结构来解决工程化组织预血管化的问题, 该研究将人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)以 $9 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度体外连续培养形成细胞膜片, 将培养的脐静脉血内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种到上述间充质干细胞膜片上, 并培养在内皮细胞培养介质中。在设计的时间点用倒置相差显微镜观察, 发现内皮细胞在膜片上迁移, 细胞重排, 膜片上的基质蛋白也发生重排, 导致微槽和空泡出现。CD31免疫荧光染色观察到进行性管腔形成的过程; CD90免疫荧光染色显示膜片上的hMSCs围绕着HUVECs周边排列, 说明hMSCs作为周细胞支持了HUVECs的生长; 在培养第10 d可见少量的 α -SMA的表达, 暗示着在此种培养模式下, hMSCs具有较低的向肌细胞分化的潜能。这些结果表明, 将内皮细胞接种在未分化干细胞膜片上, 可以在体外形成具有血管网络结构的预血管化膜片, 为构建血管化工程化组织提供了新的思路。

关键词 预血管化; 内皮细胞; 骨髓间充质干细胞; 细胞膜片

Fabrication of Prevascularized Cell Sheet

Ren Liling^{1*}, Liu Bin¹, Ma Dongyang², Feng Yuxia¹, Chen Jia¹

(¹School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730052, China)

Abstract The aim was to explore a new method to acquire capillary-like networks *in vitro* to realize vascularized engineered tissues. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were cultured on a cell culture dish at a cell density of $9 \times 10^4/\text{cm}^2$ to form a thick cell sheet. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were seeded onto the surface of hMSCs sheet at a cell density of $5 \times 10^4/\text{cm}^2$. At designated time points, the image of microscope showed that HUVECs migrated and aligned arrangement on the hMSCs cell sheet. This migration of HUVECs made the hMSCs cell sheet matrix rearrange, leading to the formation of aligned microgrooves and intracellular vacuoles. The immunofluorescent images for CD31 revealed a progressive process of lumen morphogenesis. Immunofluorescent staining for CD90 showed an aligned arrangement around the HUVECs, which suggested that hMSCs supported the growth of HUVECs as pericytes. Immunofluorescent staining for α -SMA indicated that few expressions of α -SMA were observed after 10 days, which suggested that hMSCs have low ability of differentiating into myoblast under these current experimental conditions. These results indicate that it is feasible for endothelial cells to assemble into a 3-dimensional prevascular network in hMSCs cell sheet. Our prevascularizing method using

收稿日期: 2013-07-29 接收日期: 2013-11-28

国家自然科学基金(批准号: 81170938、81300860)和兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: lzujbky-2013-173)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-8915051, E-mail: renlil@lzu.edu.cn

Received: July 29, 2013 Accepted: November 28, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170938, 81300860) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.lzujbky-2013-173)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8915051, E-mail: renlil@lzu.edu.cn

网络出版时间: 2014-03-03 11:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0227.html>

coculture model of culturing endothelial cells onto a hMSCs sheet provides a substantial advance for developing various types of 3-dimensional tissues and contributes to regenerative medicine.

Key words prevascularize; endothelial cells; bone mesenchymal stem cells; cell sheet

如何在移植早期使移植组织获得充足的血供,是目前组织工程技术发展的主要障碍。研究发现,通过在三维条件下共培养内皮细胞与其他类型的细胞体外获得毛细血管网^[1-3],植入体内后这些预先形成的毛细血管网能够与宿主血管吻合,从而保证了移植细胞的活性^[1,4-5]。这种预血管化工程化组织的方法已经逐渐受到学者们的关注。

与传统的基于支架的组织工程相比,由日本学者Okano等^[6]发明的基于细胞膜片的组织工程技术,由于其避免了传统用胰蛋白酶消化的有创处理过程,保留了细胞培养过程中自分泌的细胞外基质等结构,不仅维持了细胞的良好功能,提高了细胞利用率,同时,移植到体内后无免疫排斥反应之忧,因此已成为工程化组织的构建策略之一。

已有研究表明,骨髓基质干细胞既具有向内皮细胞分化的潜能,又可作为血管周细胞,按照一定比例与内皮细胞混合后接种,有助于建立成熟的血管系统^[7-8]。基于此,在本研究中我们将内皮细胞接种在未分化的骨髓基质干细胞膜片上,体外构建预血管化的组织工程膜片,进一步观察在此种共培养模式下内皮细胞体外血管网络形成能力及两种细胞的相互作用关系,以期构建预血管化工程化组织提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人骨髓来源间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)购自美国Lonza公司,已被证明超过90%表达CD105、CD166、CD29和CD44,少于10%表达CD14、CD34和CD45,且此干细胞具有成脂、成软骨和成骨的分化特性^[9]。hMSCs被培养在含10%胎牛血清(FBS)和1%古洛糖醛酸-青霉素-链霉素(guluronic acid-penicillin-streptomycin, GPS, Invitrogen)的未分化基础培养液中, GFP绿色荧光标记的人脐静脉血内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs, 徐州安康生物技术有限责任公司)被培养在含有10% FBS和内皮细胞生长介质[EGM™ (endothelial growth media)]的内皮细胞培

养介质中(EBM-2, Lonza, Co. USA),每3 d更换一次培养液。

1.2 预血管化细胞膜片的产生

将hMSCs以 $9 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度培养在6 cm细胞培养皿中,在未分化基础培养液中加入50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素C、30 mmol/L葡萄糖,连续培养14 d,见培养皿底壁形成细胞膜片。

镜下观察在EBM-2中培养的HUVECs,当细胞达到80%~90%融合后,0.25%胰蛋白酶消化。将消化下来的HUVECs以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种在上述hMSCs膜片上,并培养在EBM-2介质中,每3 d换液一次。倒置相差显微镜下观察细胞及膜片的形态。

1.3 免疫荧光染色

在内皮细胞接种到未分化间充质干细胞膜片上第3, 10 d时,分别使用血小板内皮细胞黏附分子(CD31)观察内皮细胞在膜片上形成血管化网络的模式; CD90染色观察hMSCs的迁移情况;平滑肌细胞肌动蛋白(α -SMA)染色观察hMSCs的分化情况。具体方法如下: HUVECs/hMSCs膜片用PBS洗三遍,多聚甲醛固定,5%山羊血清-PBS缓冲液室温下1 h阻断,后将鼠抗人CD31一抗(89C2, Cell Signaling Technology)按1:3 200稀释、鼠抗人CD90一抗(550402, BD Bioscience)按1:50稀释和鼠平滑肌肌动蛋白actin一抗(CGA7, sc-53015, Santa Cruz Biotechnology Inc)以1:200稀释后溶于1% BSA-PBS, 4 °C孵育过夜。PBS漂洗,使用羊抗鼠二抗(Alexa Fluor® 594, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen)溶入1%羊血清白蛋白-PBS液,室温下避光孵育1 h。PBS漂洗3次,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI进行细胞核复染1 min, PBS冲洗。倒置荧光显微镜下观察。

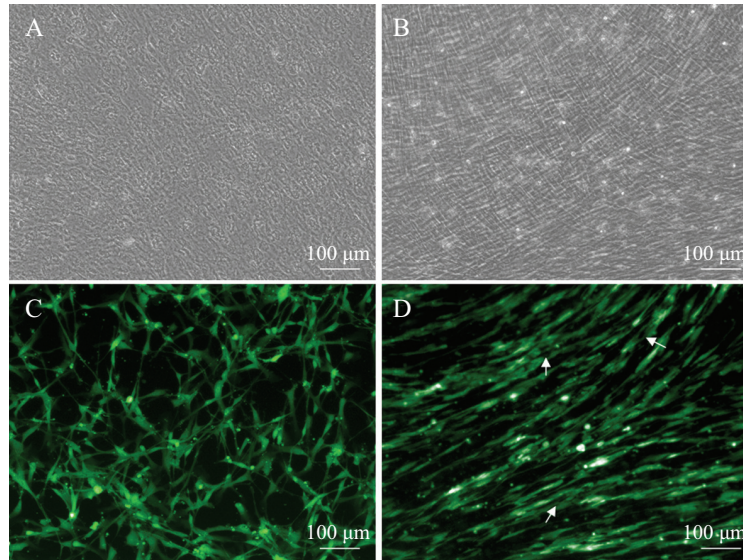
2 结果

2.1 在细胞膜片上的细胞形态

荧光显微镜下观察细胞膜片和HUVECs种在膜片上的形貌特征。结果显示,高密度接种的hMSCs能够迅速融合,3 d后, hMSCs融合并持续生长形成致密的细胞膜片。图1A显示了在未分化介质中培养hMSCs 14 d后形成致密的细胞膜片。当把HUVECs

种在hMSCs膜片上并在内皮细胞培养介质中培养时,观察显示接种2 h后,内皮细胞开始在膜片上迁移,细胞发生重排(图片未显示)。内皮细胞的迁移进

一步导致了细胞膜片中基质的重排,在第3 d膜片上形成整齐的微槽(图1B),在膜片上的HUVECs开始形成细胞空泡(图1D)。然而,在培养皿上的HUVECs

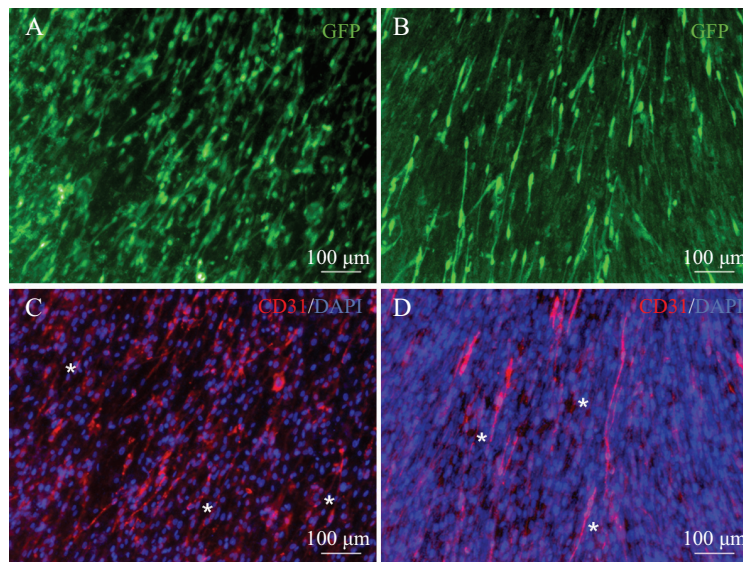


A: 显微镜下可见hMSCs在未分化培养介质中连续培养14 d形成致密的细胞膜片; B: 将HUVECs种在hMSCs膜片上3 d, 光镜下可见膜片上形成整齐的微槽; C: 荧光显微镜下HUVECs在培养皿上随机地生长; D: 共培养3 d后, HUVECs在膜片上有序排列, 出现细胞空泡。白色箭头显示细胞内空泡形成。

A: light microscopy images showed hMSCs formed a dense cell sheet after being cultured in undifferentiated medium for 14 days; B: the light microscopy images showed the formation of aligned microgrooves on the cell sheet when HUVECs seeded on the hMSCs sheet at 3 days; C: the fluorescent images showed HUVECs aligned randomly on the well-plate; D: HUVECs aligned in order and formed intracellular vacuoles after being seeded on the hMSCs cell sheet for 3 days. White arrows indicated intracellular vacuoles formation.

图1 显微镜下细胞形貌

Fig.1 The morphology of cells under microscope



CD31免疫荧光染色显示了HUVECs在hMSCs膜片上培养3 d(A,C)、10 d(B,D)时进行性管腔的形成过程(白色星号显示管腔形成; 红色: Alexa Fluor® 594抗体; 蓝色: DAPI; 绿色: GFP)。

Immunofluorescent staining images of CD31 indicated a progressive process of cord formation when HUVECs were cultured on the hMSCs sheet for 3 days (A,C) and 10 days (B,D). White asterisks indicated cord formation; Red: Alexa Fluor® 594 antibody; Blue: DAPI; Green: GFP.

图2 CD31免疫荧光染色

Fig.2 Immunofluorescent staining of CD31

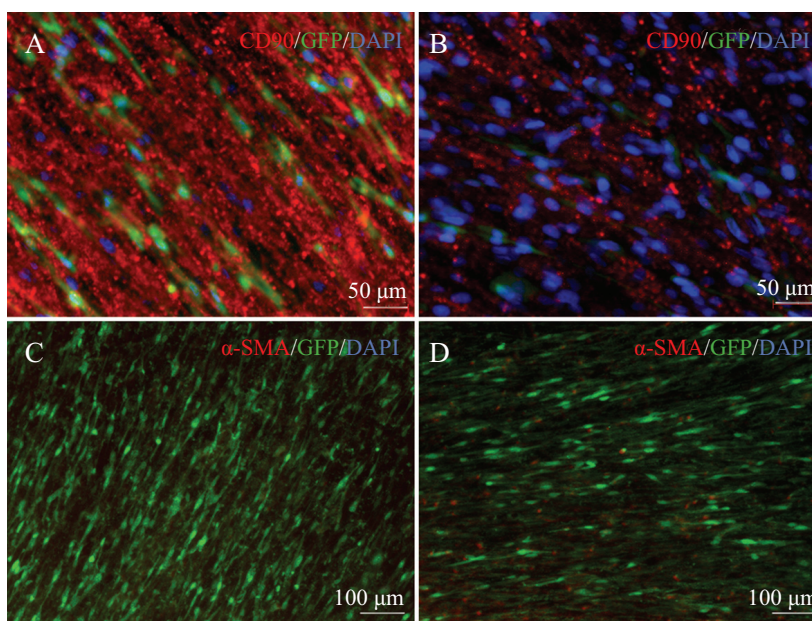
并未见有类似的改变,表现出细胞随机的排列(图1C)。这些结果表明,由hMSCs产生的丰富的细胞外基质是HUVECs发生迁移和排列的关键调节者。

2.2 免疫荧光染色

HUVECs接种在未分化hMSCs膜片上3, 10 d, CD31免疫荧光图像观察到进行性管腔形成的过程(图2A-图2D)。在第3 d, HUVECs发生迁移, 诱导局部融合并形成小的空泡(图2A和图2C)。随着时间延长, 更多的HUVECs延长并动态排列, 一些空泡开始聚集, 到第10 d, 镜下可见更大的细长的分支并形成

细胞内管腔结构(图2B和图2D)。

CD90是hMSCs的表面蛋白标记物。染色结果显示, 当HUVECs种在hMSCs膜片上时, hMSCs表现出围绕着HUVECs周边的排列, 暗示着hMSCs作为周细胞支持了HUVECs的生长(图3A和3B); 此外, α -SMA免疫荧光染色结果显示, 在培养的第3 d, hMSCs没有明显的 α -SMA的表达(图3C), 随着培养时间的延长, 在第10 d, 可见少量的 α -SMA的表达(图3D), 暗示着hMSCs在本培养条件下具有较低的向成肌细胞分化的能力。



当hMSCs膜片与HUVECs共培养在内皮细胞培养介质中3 d(A,C), 10 d(B,D)时, hMSCs膜片上CD90(A,B)及 α -SMA(C,D)的表达。红色: Alexa Fluor[®] 594抗体; 蓝色: DAPI; 绿色: GFP。

Immunofluorescent staining images of CD90 of hMSCs sheet with HUVECs seeded for 3 days (A) and 10 days (B); fluorescent images of α -SMA when HUVECs were cultured on the hMSCs sheet for 3 days (C) and 10 days (D). Red: Alexa Fluor[®] 594 antibody; Blue: DAPI; Green: GFP.

图3 CD90、 α -SMA免疫荧光染色

Fig.3 Immunofluorescent staining of CD90 and α -SMA

3 讨论

本研究通过将内皮细胞培养在未分化骨髓间充质干细胞膜片上, 成功构建了体外预血管化的细胞膜片。实验结果表明, 植入的HUVECs在未分化干细胞膜片上形成毛细血管样网络结构和微血管空腔。在本研究中, 来源于hMSCs的细胞外基质为HUVECs的生长和迁移起到了关键性作用。当内皮细胞在培养皿表面单独培养而没有hMSCs膜片支持时, 内皮细胞随机分布, 而当内皮细胞培养在hMSCs膜片上, 则可见内皮细胞迅速重组形成管样结构。在此过程中有两个关键的因素起作用, 一个

是HUVECs和hMSCs之间的相互作用; 另一个, 也是更重要的, 即来自于间充质干细胞的细胞外基质为内皮细胞的迁移、存活和增殖提供了合适的环境。Garcia等^[10]认为内皮细胞具有高度可塑性, 能够对周围微环境做出反应。而Soucy等^[11]则认为细胞外基质的内皮细胞修饰在管形成过程中起了重要的作用。我们的研究证实了hMSCs支持HUVECs的生长和迁移, 导致HUVECs重排, 逐渐形成微血管网络。另一方面, HUVECs也重排了细胞外基质蛋白, 通过蛋白水解酶的作用, 为初期微血管腔的形成提供了空间。由此可见在这个预血管化结构中, 不仅仅是

细胞与细胞之间,同时,细胞与基质之间的相互作用也一起促成了血管网络的形成。

移植组织的长期存活和功能维持取决于移植体迅速和充足的血管化, 解决这个问题的方法之一是在移植之前在工程化组织上建立内皮细胞血管样网络结构, 即预血管化。通过共培养内皮细胞与其他类型的细胞在体外形成微血管网络结构已经获得了学者们的共识^[1,3-5], 目前常用的共培养方式主要有两种, 一是将不同类型的细胞接种在三维支架上, 二是采用细胞聚集体共培养的方式。Levenberg等^[1]报道了在三维支架上共培养内皮细胞与其他类型的细胞体外形成毛细血管网, 但这种细胞悬液接种在支架上, 经常会导致细胞利用率较低, 采用三维细胞聚集体共培养^[2,12]的方式尽管也形成了毛细血管网, 但聚集体不具有赋形性, 不能很好地构建具有一定尺寸的组织。而本研究中我们通过内皮细胞与未分化间充质干细胞膜片共培养的方式体外获得预血管化细胞膜片, 这种三维培养模式能够控制细胞的接种密度, 提高细胞利用率。同时, 所构建的膜片能够与其他类型的膜片或材料结合, 不仅赋予工程化组织一定的形态, 也为构建三维血管化工程化组织提供了新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 2005; 23(7): 879-84.
- 2 Rouwkema J, de Boer J, van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 2006; 12(9): 2685-93.
- 3 Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA. Inosculation of tissue engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 2005; 5(5): 1002-10.
- 4 Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(2): 573-82.
- 5 Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M, *et al.* Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neo-vascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* 2008; 118: S145-52.
- 6 Elloumi-Hannachi I, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering: A unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. *J Intern Med* 2010; 267(1): 54-70.
- 7 Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, O'Doherty E, *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8): 3311-6.
- 8 Bajpai VK, Andreadis ST. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(5): 405-25.
- 9 Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, *et al.* Engineering robust and functional vascular networks *in vivo* with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ Res* 2008; 103(2): 194-202.
- 10 Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA Jr. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(8): 4478-85.
- 11 Soucy PA, Romer LH. Endothelial cell adhesion, signaling, and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. *Matrix Biol* 2009; 28(5): 273-83.
- 12 Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Farrell E, van Neck JW, Hovius SE, Hofer SO, *et al.* Prevascular structures promote vascularization in engineered human adipose tissue constructs upon implantation. *Cell Transplant* 2010; 19(8): 1007-20.