

联合细胞培养在组织工程血管化中的应用

刘 水 潘奎凤*

(复旦大学上海医学院分子生物学实验室, 上海 200032)

摘要 自从1987年正式提出组织工程这一概念来, 培养具有生物学活性组织器官替代物始终是组织工程学的发展方向。目前, 虽然一些工程化组织如皮肤、软骨等已被成功构建, 并应用于临床, 但其他工程化组织如心脏、骨骼肌、肝脏等体积大、功能复杂, 移植后难以及时建立血液供应。而及时建立的血管网络对组织器官的存活与功能实现至关重要。为此, 国内外一些实验室采用联合细胞培养的方法, 观察不同细胞间的相互作用对血管形成的影响。结果表明, 联合细胞培养在血管的形成、稳定和成熟方面起着重要作用。

关键词 联合细胞培养; 血管化; 组织工程

组织工程一词最早是在1987年由美国麻省理工学院化学工程师 Rober Langer 和波士顿麻省大学医院医生 Joseph P. Vacanti 共同提出^[1]。作为一门交叉性边缘学科, 组织工程涉及分子细胞生物学、器官移植、材料工程学等各个学科领域的理论知识和技术。目前, 体外成功构建的组织工程皮肤体积较小, 血液供应要求较低。但其他人工组织如心脏、骨骼肌、肝脏等因体积大、功能复杂, 体外培养时体积很难超过 1 mm³, 否则移植后由于宿主血管未及时长入而导致组织中心部位细胞坏死。因此, 构建血管化的人工组织是保证移植后器官得以存活的前提条件之一。近几年, 国内外一些实验室应用联合细胞培养的技术方法, 观察不同细胞间的相互作用对血管形成的影响, 尝试进行工程组织体外人工血管化, 使移植后组织尽快与宿主之间建立血液循环。结果表明, 联合细胞培养在血管的形成、稳定和成熟方面起着重要作用。

1 组织血管化机制

体内血管参与运输营养物质、特定细胞(如血液细胞和免疫细胞)、氧气等, 以维持组织的新陈代谢。血管是由血管内皮细胞(endothelial cell, EC)、壁细胞(mural cell, 包括平滑肌细胞和成纤维细胞等)及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成。血管的来源、数目、类型、血管壁的构建以及血管网络和神经系统之间的联系均与血管所在的部位及功能有关^[2]。血管网络形成与构建是物理因素(如血液动力学)和生物化学因素(如细胞因子、细胞与细

胞相互作用等)共同作用的结果。

1.1 血管新生方式

生理条件下, 血管新生方式涉及两种机制: 一是在血管原位由一群前体细胞分化形成毛细血管, 即血管发生(vasculogenesis); 二是成熟血管出芽形成新生血管, 即新生血管形成(angiogenesis)^[3]。后者还参与了一系列生理病理过程, 如创伤愈合、再生性循环、视觉成熟以及肿瘤形成等。

1.2 血管成熟的调节

1.2.1 血管内皮细胞生长因子 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种具有高度生物活性的糖蛋白, 可促进血管内皮细胞增殖, 增强毛细血管通透性, 参与和血管网络成熟有关的一系列分子细胞事件。VEGF 由单核细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、上皮细胞和肿瘤细胞等产生。其合成受多种因素调节, 并与其他血管生成调节因子之间存在协同关系。在缺氧环境中 VEGF 基因表达水平上调; 成纤维细胞生长因子(FGF)、肿瘤坏死因子(TNF)可以从不同水平调节 VEGF 的表达。Benest 等^[4]证明 VEGF 与血管生成素-1(Ang-1)联合作用可以极大促进新生血管的形成。当 VEGF 与内皮细胞表面酪氨酸激酶型受体结合后, 引起胞浆内钙离子升高, 产生一系列生物学效应如血管通透性增加、血浆成分渗出等。继而渗出的血浆蛋白可作为临时胞外基质与整合蛋白(integrin)相互作用而引导血管内皮细胞和成纤维细胞迁移。另一方面胞外基质中的

收稿日期: 2006-11-02 接受日期: 2007-01-29

* 通讯作者。Tel: 021-54237330, E-mail: lfpan@shmu.edu.cn

蛋白酶则降解基质为血管生长提供空间。

1.2.2 血小板源生长因子 血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)有4个家族成员: PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C和PDGF-D。二聚化的PDGF才有活性^[5]。在缺血模型中PDGF可影响血管生成和血流发生。其中PDGF-C能引起血管内皮细胞和平滑肌细胞的迁移,促进VEGF合成分泌,并动员内皮前体细胞进入缺血部位^[6],是血管生成的又一催化因子。

1.2.3 其他调控因素 除了各种细胞分泌的促血管生成因子外,ECM可作为生长因子和蛋白酶原的临时储备场所。ECM中的蛋白激酶(MMP2,MMP3,MMP9)及其抑制物(PAI1)能够控制基底膜和ECM降解过程,进而影响内皮细胞和血管壁细胞的迁移。此外,胞外基质中的生长因子与其他活性分子具有时空调节作用,在不同的生长阶段和特定组织器官精确控制血管内皮细胞和血管壁细胞的增殖与凋亡,调节血管分支和成熟。

总之,特定组织器官中血管形成受到所处微环境包括细胞因子、ECM、力学信号和其他细胞的复杂调控,尽管相关机制仍不十分明确,但是联合细胞培养则是模拟体内复杂生理环境的有效方法。因此,近些年来,许多研究者采用联合细胞培养技术试图探讨和解决工程化组织中血管形成的一系列问题。

2 联合细胞培养与血管形成

联合细胞培养是一门采用不同类型细胞进行混合培养的技术,细胞可源自正常或病理状态的组织和器官。联合培养下的细胞之间存在着精细的相互调控关系。因此,在血管生成的调控机制尚不完全清楚的情况下,联合细胞培养技术为复杂的细胞诱导分化和体外构建组织提供了新思路、新方法,并为越来越多的实验室所采用,特别是应用于由多种细胞参与的组织血管化的体外构建中。大量实验结果表明,联合细胞培养可防止新生血管内皮细胞脱落和凋亡,有利于血管的生成和稳定。

2.1 联合培养与工程化骨骼肌的血管化

骨骼肌是一类高度血管化的组织。传统的组织工程化骨骼肌构建方法是采用单纯骨骼成肌细胞培养,并添加能够释放血管生长因子的ECM,或者利用转基因技术使成肌细胞合成并分泌促血管生成因子^[7,8]。但这些工程化组织不具备自身血管化能力,必需依赖宿主植入部位血管的长入才能长期存活,否则会导致

纤维化和功能丧失^[9]。无疑,及时建立自身血液供应对骨骼肌的功能发挥至关重要。

研究发现,骨骼肌细胞与骨髓间充质细胞联合培养后具有促血管形成的作用^[10]。Wu等^[11]将由前体细胞分化而来的内皮细胞与人平滑肌细胞联合种植在由聚羟基乙酸(PGA)-聚L-乳酸(PLLA)组成的多孔生物可降解三维支架上,在支架中观察到血管样结构,而在只种有内皮细胞的支架中则无血管化迹象。Leverberg等^[12]采用三维联合培养系统观察了工程化骨骼肌的存活及血管化情况。他们采用的种子细胞是成肌细胞、胚胎成纤维细胞和血管内皮细胞,并种植于PLLA和多聚乳酸-甘醇酸(PLGA)组成的可降解支架上。实验结果表明,在成肌细胞和内皮细胞存在的培养体系中,添加胚胎成纤维细胞可以极大促进支架血管化。与只种有成肌细胞和内皮细胞相比,添加了胚胎成纤维细胞的支架中血管内皮细胞总面积和新生血管数目均明显增加。培养一个月后,3种细胞联合培养体系中出现明显的大血管样结构。与培养两周时的结果相比,一个月后的培养体系中有更多的表面积被内皮细胞覆盖,血管样结构的比例也明显增加。不难看出,联合培养形成的血管样结构更稳定。

另外,利用RT-PCR分析上述联合培养体系中VEGF mRNA的表达情况。结果显示:当内皮细胞与成肌细胞或与胚胎成纤维细胞二联培养时,VEGF表达均增加。当内皮细胞与成肌细胞和胚胎成纤维细胞三联培养时,VEGF mRNA表达量则明显高于前两组,与在三联培养中观察到的血管网络的增加现象相一致。由此可见,多种细胞联合培养为骨骼肌的血管化形成提供了更合适的信号。另一相似报道也证明:多种细胞联合培养可增强促血管生成因子的表达,促进血管内皮细胞生长和稳定血管结构^[13]。

2.2 组织工程化心肌的联合培养

理想的组织工程化心肌(engineered heart tissue, EHT)应该具备心肌的功能和特性,如收缩性、电生理稳定性和顺应性,并在移植后能快速血管化^[14]。心肌组织中,除心肌细胞外还存在血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、巨嗜细胞等。这些非心肌细胞既参与了心肌的收缩舒张等生理过程,也参与心肌组织血管网络的构建。

目前,不论采用何种模拟体内环境的培养条件,由于受到营养物质和氧气弥散距离的限制,EHT三维体积很难突破200 μm厚。有研究表明,由多种细胞

构建的 EHT 不论在结构还是功能上均好于由单一细胞构建的 EHT。Zimmermann 等^[15]发现, 在缺血模型中, 利用非单一心肌细胞构建的 EHT 的心肌收缩力比单纯由心肌细胞构建的强两倍。不仅如此, Zimmermann 等^[16]还观察到, 联合培养的 EHT 中, 同时出现了原始毛细血管和大血管样结构。这些血管样结构在移植后较快与宿主建立了血液循环。Memon 等^[17]发现, 将自体骨骼成肌细胞和骨髓单核细胞共同注射入狗受损心脏后, 不仅可以防止心肌结构的重塑, 而且能够促进心肌细胞发生和新生血管形成。

2.3 内皮细胞 / 神经前体细胞联合培养构建血管网络

通常骨骼肌在神经切除后血液供应减少, 促血管生成因子表达降低, 血管退化^[18]。最近一项研究表明: 神经前体细胞(neural progenitor cells, NPCs)在联合细胞培养中能够促进血管化和微循环功能的实现。Ford 等^[19]将三组细胞, 即脑组织来源的永生血管内皮细胞(brain-derived immortalized microvascular endothelial cells, BECs)、NPCs、NPCs:BECs 分别种植于可生物降解大孔径水凝胶支架上, 培养后植入老鼠体内。活体荧光显微镜显示: 移植周围组织的血管长入到联合培养组支架中。免疫组化分析表明, 在任何培养的时间段内, 不论是血管直径还是平均长度, 三组培养体系中均无明显差别, 提示水凝胶支架孔径结构决定了血管直径的大小, 但是三组的血管密度却有显著不同。NPCs 组表现出低密度血管结构和低表达量血小板内皮细胞黏附分子(PECAM-1)。PECAM-1 表达于血管内皮细胞表面, 为血管内皮细胞特异标记物, 介导细胞与细胞黏附。种植后第 6 周, NPCs 组血管密度逐渐升高, 可能与宿主血管内皮细胞迁入支架有关。在整个实验过程中, BECs 组的 PECAM-1 持续低水平表达, 血管平均密度随时间推移保持不变, 但水凝胶支架外围血管密度远大于内部, 提示 BECs 组支架中心的血管内皮细胞可能出现退化现象。不同于前两组, NPCs:BECs 组中, 第 6 周时出现高表达 PECAM-1, 血管密度也远高于第 4 周, 而且未见内皮细胞减少迹象。与 BECs 组相比, 联合培养组中血管密度显著增加。移植后 4 周, 利用苏木精和伊红染色观察到血管腔内出现红细胞, 提示血液循环开始建立, 新生血管开始发挥功能。直到第 6 周, NPCs 组和 NPCs:BECs 组中的血管仍然具有血运功能。

2.4 内皮细胞 / 平滑肌细胞联合培养的抗应力作用

人工构建的血管存在的另一个问题是在生理条件下, 当血流灌注新生血管后, 人工血管内皮细胞存在脱落的可能, 继而引起血栓钙化等一系列病理反应, 导致移植物失败。国内一些实验室研究了与平滑肌细胞联合培养的血管内皮细胞的抗应力能力。对联合培养并已经汇合的血管内皮细胞施加 40 dyn/cm^2 和 20 dyn/cm^2 的应切力, 作用 24 h 后, 内皮细胞形态沿流体方向发生重排。这一方面由于平滑肌细胞的存在使联合培养的内皮细胞呈现近似在体条件下的内皮细胞形态, 另一方面, 与平滑肌细胞联合培养提高了内皮细胞对外界刺激的反应性。研究者还观察到, 联合培养的内皮细胞经过生理范围内切应力作用 24 h 后, 并未出现细胞撕脱现象。进一步研究表明, 平滑肌细胞可以通过刺激内皮细胞分泌层黏连蛋白、纤维连接蛋白进而增强内皮细胞与 ECM 的黏附力^[20]。

2.5 内皮细胞 / 成纤维细胞的联合培养与内皮细胞凋亡

Wenger 等^[21]设计了一种三维球形联合培养系统用来观察人脐静脉内皮细胞(HUVECs)与人原代成纤维细胞(hFBs)共育对血管形成的影响。该三维球形联合培养体系中 HUVECs 和 hFB 种植于固相载体材料且相互接触。另外研究人员还设立了两个对照组, 单一 HUVECs 培养和单一 hFBs 培养。在低血清同时不添加任何生长因子如 VEGF 或 FGF 的条件下, 于 48 h 后用 ELISA 法检测 DNA 碎片评估细胞凋亡情况。结果显示, 3 个实验组中单一 hFB 培养的细胞凋亡水平明显小于单一 HUVEC 培养的细胞凋亡水平, 而 HUVECs/hFB 联合培养中的 HUVECs 的凋亡水平大大降低。由此推测, hFB 的存在稳定了血管内皮细胞, 抑制了其凋亡。

3 展望

综上所述, 联合细胞培养参与了血管形成的多个事件, 为血管形成提供了合适多样的生物学信号, 并可以诱导细胞分化, 增加血管密度, 提高血管功能的稳定性, 防止新生血管内皮在血流应切力作用下撕脱; 另外, 联合培养中的血管内皮细胞凋亡水平也明显降低。尽管涉及血管形成与分化的机制仍不十分清楚, 但一些可溶性因子很可能参与其中。随着基础科研和临床实践经验的积累以及研究方法的进步, 不难预

料,联合细胞培养在组织工程研究中将有广阔的应用前景,为研究体外血管化形成机制和最终构建功能化组织提供了有力工具。

参考文献(References)

- [1] Langer R *et al. Science*, 1993, **260**: 920
- [2] Jain RK. *Nat Med*, 2003, **9**: 685
- [3] Brey EM *et al. Tissue Eng*, 2005, **11**: 567
- [4] Benest AV *et al. Microcirculation*, 2006, **13**: 423
- [5] Betsholtz C. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, **15**: 215
- [6] Dimmeler S. *N Engl J Med*, 2005, **352**: 1815
- [7] Zisch AH *et al. Cardiovasc Pathol*, 2003, **12**: 295
- [8] Von Degenfeld G *et al. Br J Pharmacol*, 2003, **140**: 620
- [9] De Coppi P *et al. Tissue Eng*, 2005, **11**: 1034
- [10] Carvalho KA *et al. Transplant Proc*, 2006, **38**: 1596
- [11] Wu X *et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287**: H480
- [12] Levenberg S *et al. Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 879
- [13] Jain RK *et al. Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 821
- [14] Zimmermann WH *et al. Biomaterials*, 2004, **25**: 1639
- [15] Zimmermann WH *et al. Heart Fail Rev*, 2003, **8**: 259
- [16] Zimmermann WH *et al. Circ Res*, 2002, **90**: 223
- [17] Memon IA *et al. J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, **130**: 646
- [18] Wagatsuma A *et al. Exp Physiol*, 2005, **90**: 403
- [19] Ford MC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2512
- [20] 姜宗来等. *第二军医大学学报*, 2000, **21**: 1007
- [21] Wenger A *et al. Cells Tissues Organs*, 2005, **181**: 80

Application of Cell Co-culture for Vascularization in Tissue Engineering

Shui Liu, Luan-Feng Pan*

(The Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The ultimate goal in the field of tissue engineering has always focused on constructing tissues that may biologically and functionally serve as a substitute for the organs of dysfunction. However, it is still a major challenge in creating thick and complex artificial tissues and cultivating long-lasting and sufficient vascular network in these tissues *in vitro*, which are capable of incorporating with the host's vascular network after transplantation and finally well perform their physiological function. Therefore, vascularization before transplantation plays a significant role in the survival of engineered tissues especially those that highly require sufficient blood supply such as liver, heart, and skeletal muscle. At the same time, new approaches involved in the notion of cell co-culture system aiming for inducing neovascularization before transplantation have been implemented in some laboratories and will be discussed in this review. Furthermore, recent data has showed that such a co-culture approach can effectively facilitate the formation of vessels, regulate the interaction between endothelial cells and mural cells, and promote signal transduction and ultimately the mature of vascular network.

Key words cell co-culture; vascularization; tissue engineering

Received: November 2, 2006 Accepted: January 29, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-21-54237330, E-mail: lfpan@shmu.edu.cn