

组织工程心脏瓣叶皮下包埋实验

瓣膜置换术是解决心脏瓣膜疾病的重要手段，现今临床使用的瓣膜有机械瓣和生物瓣膜两种，两种瓣膜均能有效改善患者生活质量及生存寿命，但存在诸如血栓栓塞、出血、瓣膜衰坏、终生抗凝及感染等并发症。组织工程的出现为瓣膜研究开辟了一条新路。本实验将体外种植平滑肌/成纤维及内皮细胞细胞后生成的组织工程心脏瓣叶包埋在免疫缺陷动物裸小鼠皮下，观察种植细胞的支架材料可能存在的活性。

1 材料与amp;方法

1.1 动物、仪器与材料

杂种猪(购于广州市新市石马实验动物场)；聚羟基烷酸酯(PHA)瓣叶支架材料(清华大学化学系提供)；II型胶原酶(SIGMA, USA.)；M199培养基(GIBCO, USA)；DMEM培养液(GIBCO, USA.)；胎牛血清(杭州四季青生物制品公司)；5% CO₂培养箱(SHELLAB, USA.)。BALB/C裸鼠12只(中山大学医学院实验中心)；体外种植培养4周的组织工程心脏瓣膜片12片；经培养液浸泡未培养细胞的瓣叶支架片12片。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 杂种猪，取主动脉。使用0.25% II型胶原酶分离、培养内皮细胞，传代3~4次可获得106的内皮细胞。使用组织块法培养成纤维、平滑肌细胞，3周后传代。经过3次传代可获得107的成纤维、平滑肌细胞。

1.2.2 组织工程心脏瓣叶体外细胞种植 收集细胞，将收集的细胞在瓣叶支架的正反面，DMEM培养，连续4 d。先种植成纤维、平滑肌细胞，后种植内皮细胞。以首次种植成纤维、平滑肌细胞时间计算，培养28 d后裸鼠皮下种植。

1.2.3 组织工程心脏瓣叶的包埋 (1)将培养28 d的瓣叶片，修剪为面积约0.9 cm²大小，将DMEM浸泡后的空白组支架材料作相同处理。(2)在BALB/C裸小鼠一侧肋背部使用碘伏消毒，使用消毒眼科剪于消毒部位皮肤剪开一长度0.5 cm的切口。(3)钝性分离皮下组织，分离时保持浅表不要进入肌肉层。(4)将实验组瓣叶片(有细胞)包埋入裸鼠皮下。(5)在裸小鼠对侧同一部位使用同样方法包埋对照组支架片(无细胞)。

分别在12、14、21、28 d 4个时间段各处死3只小鼠，取出组织片大体观察并部分送组织学检查。

1.2.4 观察、检测项目 观察包埋部位皮肤是否感染、坏死及局部皮肤色泽是否红润。处死小鼠，取出包埋片观察各时间段支架片的色泽性状。瓣膜组织片取出后立即使用中性福尔马林固定，送病理检查行HE、VG检查，观察瓣膜片细胞生长情况、细胞量。

2 结果

2.1 大体观察

2.1.1 活体观察 裸小鼠生存良好，无明显炎症水肿，切口愈合良好，无感染、坏死。包埋12~14 d，实验组裸小鼠局部皮肤色泽红润，而对照组局部明显苍白，差别显著。21、28 d两组裸小鼠局部皮肤均色泽红润，肉眼观察差别不大。28 d时，局部可见支架形态，可触及质地较硬的支架材料。

2.1.2 标本观察 12、14 d实验组支架片呈现裸小鼠组织色泽，而对照组支架片色泽较为苍白。3、4周两组间肉眼无差别，包埋片均呈现机体组织相同色泽，触摸材料质地较硬，尚未完全降解。

2.2 组织学结果

2.2.1 HE染色 包埋12 d，实验组切片中部细胞与周边细胞均较多，材料中有肌纤维及血管腔形成(图1)。对照组细胞主要集中于材料的周边，少数细胞向中部侵入生长，无肌纤维及小血管生成(图2)。种植4周的材料，低倍镜下见两组细胞数量均明显增加，但细胞生长、细胞种类仍存在差别，实验组切片可见细胞于材料中部及周边生长均好，周边细胞较多，纤维包膜内及材料上已有多量肌纤维形成。对照组切片中部细胞量仍相对较少，未见肌肉纤维的生成。另外，两组切片均有炎症反应，至3、4周炎症明显消退。各期均未出现组织坏死。包埋28 d仍可见大量支架材料残留(图3)。

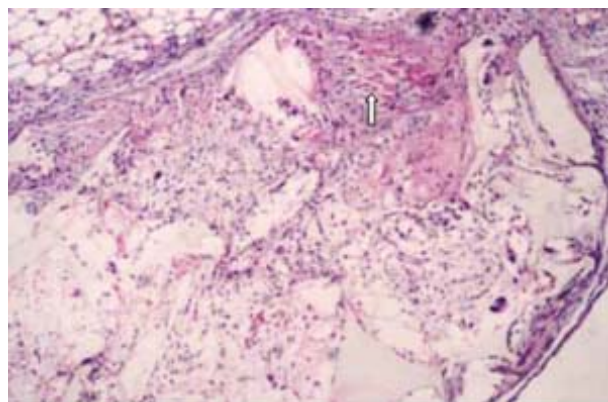


图1 包埋12 d，切片中部存在大量细胞，有少量肌纤维(箭头)生成，组织瓣叶周围有包膜形成，实验组HE染色(Original magnification: $\times 4$)

Fig.1 HE Staining of cell-seeded scaffolds

Twelve days after implantation, muscular fiber-like tissue formation could be seen (arrow).

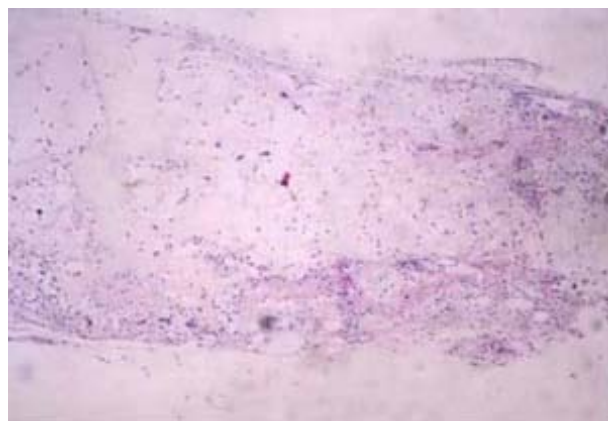


图2 包埋12 d，细胞较图2明显少，而且材料中部细胞稀少，周围有包膜形成，对照组 HE染色 (Original magnification: $\times 4$)

Fig.2 HE Staining of non-seeded scaffolds

Twelve days after implantation, only a few cells were seen on the scaffolds.

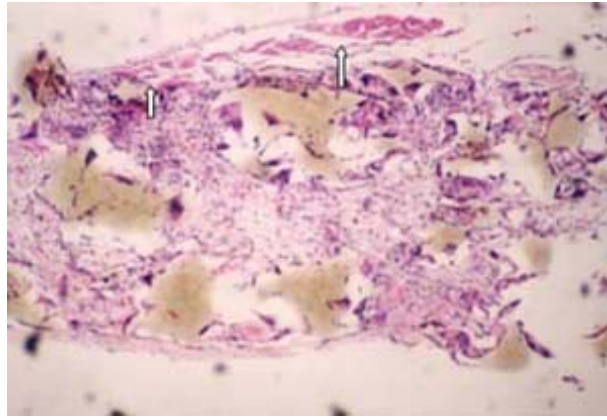


图3 包埋28 d, 大量细胞生长于周边, 中部细胞略少, 有支架材料残留, 包膜内有多量肌纤维形成(箭头)。实验组 HE染色 (Original magnification: $\times 4$)

Fig.3 HE Staining of cell-seeded scaffolds

Twenty-eight days after implantation, extensive muscular fiber formation (arrow) was observed under the scaffold capsules.

2.2.2 VG染色 包埋12 d, 实验组切片有红染胶原纤维, 而对照组支架无明显阳性染色的胶原纤维。包埋14 d后, 两组均有一定量胶原生成, 切片观察无明显差异。

3 讨论

过去的五十年, 因瓣膜研究的进展, 众多心脏瓣膜病患者的生活质量、生存时间得到明显提高。但人工心脏瓣膜存在感染、衰坏、血栓栓塞等缺点, 目前研究显示, 人工瓣膜的这些缺点有望使用组织工程瓣膜解决[1], [2]。

组织工程是组织培养技术与生物工程学相结合产生的学科。理论上, 其产物具有自体组织活性、完整的生理功能及良好的组织相容性, 从而使患者受损的体内组织或器官功能得到最佳修复、维持或改善[3], [4]。

1996年 Shinoka[5]首先报道使用高分子可降解聚合物PGA制成片状瓣叶, 将体外培养扩增的羊自体动脉成纤维、平滑肌细胞及内皮细胞种植于瓣膜片上, 经体外培养1周后将瓣叶用于置换羊(细胞来源)肺动脉瓣叶, 结果显示, 6周以后瓣叶具有自体瓣膜特征。这一实验结果促进了组织工程心脏瓣膜的研究进程。国内对于组织工程心脏瓣膜的研究尚无体内研究报道。汪钢[6]报道使用皮下包埋实验, 研究未种植细胞的胶原膜和PHB的组织相容性, 结果显示支架周围局部存在组织炎症反应, 无脓肿、坏死改变, 认为材料组织相容性良好。相关研究显示[7][8][9]研究显示将种植种子细胞的材料支架种植到裸鼠体内, 在无免疫排斥状态下, 种植于支架载体上的种子细胞可沿支架生长, 用于检测细胞/材料复合物活性。Mizuno H[8]将羊椎间盘纤维环细胞和髓核细胞体外分离扩增后, 复合种植在聚乙醇酸上, 植入裸鼠背部皮下, 12周后取出大体及组织学检测, 显示植入的细胞/支架复合物具有活性, 可生成椎间盘组织。

本实验使用3~4周裸小鼠, 将支架片移植于裸小鼠背部靠近头皮下, 有3个优点: (1) 易于观察组织片的活性。(2) 由于该部位血管丰富, 为带细胞材料成活提供了条件。(3) 该部位不影响裸小鼠的活动。(4) 可通过平滑肌组织的增生而排除皮下纤维结缔组织长入支架材料产生的组织增生假相。通过大体标本的观察、包埋部位皮肤色泽及组织学检测等方法, 评估支架片种植细胞后, 细胞是否存在活性, 能否继续分裂增殖。结果显示包埋12、14 d后, 实验组活体观察, 皮下瓣叶支架材料色泽红润, 细胞明显较多。至28 d时, 镜下检查材料纤维包膜内可见多量的肌纤维形成, 显示细胞增值良好, 经体外种植的平滑肌细胞在包裹材料包膜内已生成肌肉纤维组织, 提示种植平滑肌/成纤维细胞的瓣叶, 平滑肌细胞在裸鼠皮下具有生物学活性, 能生长成为相应组织, 而对照组虽有纤维生长, 却无肌性组织形成。另外, 早期实验组切片显示有胶原蛋白存在, 表明瓣叶已

具有基质合成能力,即具有生物活性。以上结果显示组织工程心脏瓣叶存在生长活性,如将其进行原位移植,在血流动力生长环境下,可能生成具有活性的心脏瓣叶。

参考文献:

- [1]Oxenham H, Bloomfield P, Wheatley DJ, et al. Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses[J]. Heart, 2003, 89: 715-21.
- [2]Moffatt-Bruce SD, Jamieson WRE. Long-term performance of prostheses in mitral valve replacement[J]. J Cardiovasc Surg, 2004, 45: 427-47.
- [3]Flanagan TC, Pandit A. Living artificial heart valve alternatives: A review[J]. Eur Cell Mater, 2003, 6: 28-45.
- [4]Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260:920-26.
- [5]Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, et al. Tissue-engineered heart valves-autologous valve leaflet replacement study in a lamb model[J]. Circulation, 1996, 94: II164-8.
- [6]汪 钢, 张其清, 赵东锴, 等. 胶原膜与聚- β -羟基丁酯在组织工程心脏瓣膜中应用的研究[J]. 中国危重急救医学, 2001, 13(6): 342-45.
- [7]Park SH, Park SR, Chung SI, et al. Tissue-engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation[J]. Artif Organs, 2005, 29: 838-45.
- [8]Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, et al. Tissue-engineered composites of anulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement[J]. Spine, 2004, 29(12): 1290-8.
- [9]Cho SW, Kim IK, Lim SH, et al. Smooth muscle-like tissues engineered with bone marrow stromal cells[J]. Biomaterials, 2004, 25: 2979-86.