

大网膜与颈部皮下包埋DegraPol支架促进体内再血管化的比较*☆

杨林, 武延格, 孙学峰, 王正

Comparison on promoting revascularization of DegraPol scaffold covered by omentum and subcutaneous *in vivo*

Yang Lin, Wu Yan-ge, Sun Xue-feng, Wang Zheng

Department of
Thoracic Surgery,
Shenzhen People's
Hospital, the Second
Clinical Medical
College of Jinan
University, Shenzhen
518020, Guangdong
Province, China

Yang Lin☆,
Post-doctor, Director
Doctor, Department
of Thoracic Surgery,
Shenzhen People's
Hospital, the Second
Clinical Medical
College of Jinan
University, Shenzhen
518020, Guangdong
Province, China
Yanglin70@
yahoo.com

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
30500499*

Received: 2010-06-01
Accepted: 2010-07-13

暨南大学第二临
床医学院深圳市
人民医院胸外科,
广东省深圳市
518020

杨林☆, 男, 1970
年生, 湖北省沙市
人, 汉族, 2000
年-2004年瑞士苏
黎世大学医院胸
外科, 博士后, 主
任医师, 主要从事
气管组织工程, 肺
移植免疫研究。
Yanglin70@
yahoo.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)38-07048-03

收稿日期: 2010-06-01
修回日期: 2010-07-13
(20100601010/D·Y)

Abstract

BACKGROUND: How to solve rapid vascularization is the key to success of tissue engineering when the tissue engineered organs are implanted into body.

OBJECTIVE: To compare the difference of revascularization between the tissue engineered scaffold DegraPol covered by omentum and subcutaneous, and to find an effective method for rapid revascularization *in vivo*.

METHODS: Using the anatomic technology of vascular cast, revascularization of DegraPol scaffold implanted by omentum and subcutaneously was compared.

RESULTS AND CONCLUSION: More blue developing micro-capillary vessels wrapped the outer DegraPol scaffolds in omental implants than in subcutaneous implants. In porous scaffold, relative abundant new vessels formed in omental implant group. Subcutaneous implant group found no neovascularization. The vascularization degree of omentum implant was significantly higher than subcutaneous implant ($P < 0.05$). Omentum is effective in promoting to establish blood circulation, can be used as a viable method of tissue engineered revascularization.

Yang L, Wu YG, Sun XF, Wang Z. Comparison on promoting revascularization of DegraPol scaffold covered by omentum and neck subcutaneous *in vivo*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(38):7048-7050. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 如何解决工程化器官植入体内时快速血管化问题是组织工程取得成功的关键问题。

目的: 比较大网膜与颈部皮下两种方法包埋促进组织工程支架材料 DegraPol 血管化的差异, 为工程化组织体内快速再血管化寻找有效方法。

方法: 应用解剖学中的血管铸型技术, 比较 DegraPol 支架置入大鼠颈部皮下和腹部大网膜包埋新生血管形成的不同。

结果与结论: DegraPol 支架外部发现大网膜包埋组比颈部皮下包埋组有更多的蓝色显影微细血管环绕, 在微孔支架内部, 也有相对丰富的新生血管形成。颈部皮下包埋组在微孔支架内部未发现新生血管形成。大网膜包埋组再血管化程度高于颈部皮下组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。提示大网膜包埋有效地促进血液循环建立, 可作为组织工程化组织再血管化的可行方法。

关键词: 再血管化; 组织工程; 血管铸型; 支架; 材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.38.005

杨林, 武延格, 孙学峰, 王正. 大网膜与颈部皮下包埋 DegraPol 支架促进体内再血管化的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(38):7048-7050. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

组织工程在器官构建方面取得了很大的进步, 但是组织工程构建物由基础研究过渡到临床应用在很大程度上受制于移植缺乏血液供应。体外培养环境中的无血管组织, 其营养供给来源于与培养液的渗透交换, 体内植入后工程化组织建立血供需要一定时间, 而植入支架材料内的种子细胞在缺乏血液细胞间液的营养下, 很难维持正常的功能。工程化组织在原位移植后迅速建立血液供应, 可以保证工程化组织在移植后的存活^[1]。

本实验采用解剖学技术中的血管铸型技术

比较大网膜和颈部皮下体内包埋多孔聚合物支架材料形成新生血管的优劣, 寻找更有利于工程化组织体内再血管化的方法

1 材料和方法

设计: 动物体内观察。

时间及单位: 实验于2008-05/2010-03在深圳市人民医院医学研究中心完成。

材料: 选用健康雄性SD大鼠5只, 体质量50~60 g, SPF级, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号SCXK(粤): 2003-0002。实验过程中动物处置符合科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》中动物伦理学要求^[2]。

DegraPol (3-D polyester-uthane polymer) 材料由瑞士联邦理工大学聚合材料研究所提供, Batson's #17 腐蚀铸型试剂盒购自美国polysciences 公司。

方法:

材料的制备: 采用冷沉淀技术将DegraPol材料制成泡沫管状支架, 支架长20 mm, 内、外径分别为2.5/ 4.0 mm, 管壁厚度为0.75 mm (管壁厚度为内、外径之差), 环氧乙烷消毒后, 置于已灭菌的培养瓶中备用。

铸型液的配置: 从 Batson's #17 腐蚀铸型试剂盒中取单体溶液 40 mL, 先加入蓝色染料, 用力搅拌后分成 A,B 两部分, 每部分各 20 mL。将 16 mL 催化剂加到 A 单体溶液, 8 滴促进剂加到 B 单体溶液, 搅拌均匀后储存待用, 待插管行铸型前将两部分单体溶液混合。

多孔DegraPol支架体内包埋和血管铸型: 将大鼠随机均分为2组: 大网膜包埋组将空白管状DegraPol支架置入SD大鼠腹腔以大网膜包埋; 颈部皮下包埋组将空白管状DegraPol支架置入颈部皮下包埋。

1 周后麻醉大鼠, 通过阴茎背静脉进行肝素化。正中切口剪开腹腔和胸腔, 在肾动脉分支的上方结扎下腔静脉和腹主动脉。肺门处分别套线结扎左右肺动脉、肺静脉。剪开左心室, 置管入升主动脉, 推入 150 mL 盐水(37 °C , 5.99 kPa), 剪开右心耳, 使血液排出并逐渐转清。吸尽胸腹腔渗液, 结扎右心耳破口。混合 A, B 单体铸型液, 快速从升主动脉推入铸型混合液, 铸型液在血管内迅速变硬固定并呈现蓝色。室温静置四五个小时待铸型液充分聚合后, 将支架材料连同外周包裹的组织取出, 浸泡于 2.5%戊二醛溶液中固定备用。

主要观察指标: 观察大网膜和颈部皮下体内包埋多孔聚合物支架材料形成新生血管的情况。

设计、实施、评估者: 实验设计、实施、评估由全部作者共同完成, 均受过专业培训, 未采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用 SPSS 11.0统计软件包进行分析。采用4格表资料Fisher确切概率法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入实验动物5只, 分2组进行实验, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 大网膜和颈部皮下体内包埋多孔聚合物支架材料形成新生血管的情况 从DegraPol支架外部可以看出大鼠大网膜包埋组有更多的蓝色显影微细血管环绕, 颈部皮下包埋组在DegraPol支架外面有少部分蓝色显影的微血管环绕, 见图1。

大网膜包埋组中4个标本在微孔支架内部, 有相对

丰富的新生血管形成, 蓝色显影穿透支架并沿支架内孔分布。而颈部皮下包埋组中5个标本在微孔支架内部均未见新生血管生成, 见图2。用4格表资料Fisher确切概率法进行统计分析, 大网膜包埋组再血管化程度高于颈部皮下组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

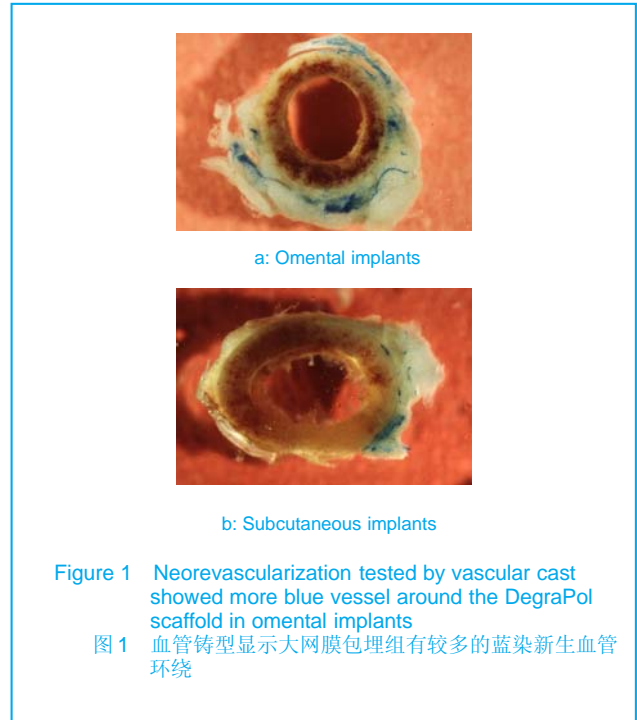


Figure 1 Neorevascularization tested by vascular cast showed more blue vessel around the DegraPol scaffold in omental implants

图1 血管铸型显示大网膜包埋组有较多的蓝色新生血管环绕

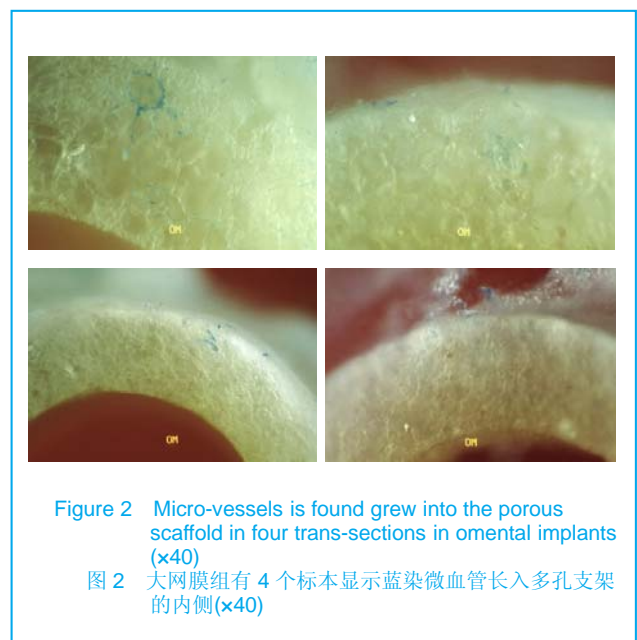


Figure 2 Micro-vessels is found grew into the porous scaffold in four trans-sections in omental implants (x40)

图2 大网膜组有4个标本显示蓝色微血管长入多孔支架的内侧(x40)

3 讨论

在组织工程体外的细胞和材料的复合培养中, 营养物质和氧气的供应主要依赖培养液渗透和扩散作用。细胞-材料复合物植入体内后, 由血液-细胞间液完成细胞

的营养和氧气的供应。超过毛细血管 200~300 μm 以外距离的细胞较难存活, 支架厚度超过 0.8 mm 也可能无法充分保障细胞-支架复合物的营养供应, 这表明早期再血管化研究将是组织工程学发展的关键^[3]。

许多研究将移植体植入动物体内构建血管化组织, 植入部位包括大网膜、皮下组织、筋膜及肌袋中等^[4-6]。Goldsmith 等^[7]尝试将大网膜覆盖在缺血的狗脑表面, 72 h 即能建立部分血管沟通, 至 1 周时已形成良好、广泛的血管连接, 完成了侧支循环。目前, 大量学者采用大网膜应用于移植物的再血管化实验中, 取得了初步的成功^[8-14]。大网膜包裹后之所以能在两种结构之间迅速发生血管连接, 这与其结构和功能有关。大网膜乳斑区和脂肪区的毛细血管呈多层次分布, 增加了大网膜毛细血管与缺血组织的接触面积, 有利于侧支循环形成。大网膜有较丰富的盲端毛细血管, 这可能是大网膜不断新生的毛细血管, 它与侧支循环的建立, 血管的迅速再生密切相关^[15]。Zhang 等^[16]研究表明大网膜脂肪细胞能合成血管内皮生长因子, 大网膜微血管内皮细胞能合成碱性成纤维细胞生长因子。目前已证实碱性生长因子和血管内皮生长因子是最有力的血管生长因子^[17-19]。

本实验比较了大网膜和皮下组织对组织工程支架再血管化的影响, 结果证实大网膜由于具有丰富的血管网和血管生长因子可以更有效的促进新生血管的形成。血管铸型虽然可以清晰显示微细网状血管, 并且标本可以长期保存, 但是并不是良好的定量化检测组织再血管化的指标, 免疫组化法如 CD31、CD34 抗原染色或放射免疫标记技术是否会更加精确的定量分析, 有待于我们今后的实验中进一步探讨。

4 参考文献

[1] Ko HC, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *Eur Cell Mater.* 2007;25(14):1-18.
 [2] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
 [3] Polykandriotis E, Arkudas A, Horch RE, et al. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *J Cell Mol Med.* 2007;11(1):6-20.
 [4] Suh S, Kim J, Shin J, Kil K. Use of omentum as an in vivo cell culture system in tissue engineering. *ASAIO J.* 2004; 50:464-467.
 [5] Patrick CW Jr, Chauvin PB, Hobbey J. Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng.* 1999;5: 139-151.
 [6] Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 1998;43:422-427.
 [7] Goldsmith HS, Chen WF, Duckett SW, et al. Brain vascularization by intact omentum. *Arch surg.* 1973;106:695-698.
 [8] Wang C, Jin F, Zhang YA, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;53(13):10435-10438.
 王成, 金锋, 张延安, 等. 同种异体气管移植后长段气管的再血管化[J].

中国组织工程研究与临床康复, 2009;53(13):10435-10438.
 [9] Wang HY, Tian JJ, Li CS. *Henan Keji Daxue Xuebao: Yixueban.* 2008; 26(1):1-2.
 王红岩, 田建军, 李长栓. 大网膜自体组织移植修复气道缺损的实验研究[J]. *河南科技大学学报: 医学版*[J]. 2008, 26(1):1-2.
 [10] Liu YB, Li J, Disi Junyi Daxue Xuebao. 2007;28(10):封2-01.
 刘亚彬, 李军. 自体组织移植修复气管缺损的实验研究[J]. *第四军医大学学报.* 2007, 28(10):封2-01.
 [11] Baumert H, Simon P, Hekmati M, et al. Development of a seeded scaffold in the great omentum: feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. *Eur Urol.* 2007;52(3):884-890.
 [12] Zhou JS, Tang ZQ, Xiao YZ, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi.* 2006;20(8): 797-800.
 周建生, 唐兆前, 肖玉周, 等. 大网膜包裹人工神经移植体再血管化及神经再生的研究[J]. *中国修复重建外科杂志.* 2006, 20(8): 797-800.
 [13] Baumert H, Simon P, Hekmati M, et al. Development of a seeded scaffold in the great omentum: feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. *Eur Urol.* 2007;52 (3):884-890.
 [14] Baumert H, Mansouri D, Fromont G, et al. Terminal urothium differentiation of engineered neoureter after in vivo maturation in the "omental bioreactor". *Eur Urol.* 2007;52(5):1492-1498.
 [15] Zhang TC, Li SF, Zhang ZM, et al. *Zhongguo Linchuang Jiepu Xue Zazhi.* 1993;11(3):220-222.
 张廷才, 李淑芬, 张子明, 等. 兔大网膜微血管构筑[J]. *中国临床解剖学杂志*[J]. 1993, 11(3):220-222.
 [16] Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res.* 1997;67(2):147-154.
 [17] Liu L, Ratner BD, Sage EH, et al. Endothelial cell migration on surface-density gradients of fibronectin, VEGF, or both proteins. *Langmuir.* 2007;23(22):11168-11173.
 [18] Zhao J, Liu XC, Kong XR, et al. *Xinzang Zazhi.* 2009;21(3):383-386.
 赵健, 刘晓程, 孔祥荣, 等. 聚乳酸/乙醇酸复合 bFGF 降解支架在心肌血运重建中的应用实验[J]. *心脏杂志.* 2009, 21(3):383-386.
 [19] Huang CY, Shen ZY. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi.* 2003;17 (4): 293-297.
 黄晨昱, 沈祖尧. 血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子加速预扩张皮瓣成熟的研究[J]. *中国修复重建外科杂志.* 2003, 17 (4): 293-297.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 (30500499) 课题“大网膜包埋促进血管再生, 不同发展程度的组织工程气管原位重建的动物实验研究”。

课题的创新点: 组织工程人工器官植入体内的血运再生和营养支持仍然是一个难题。为探讨微孔生物材料植入体内后的血管再生机理, 本实验采用血管铸型技术, 通过比较大网膜和颈部皮下体内包埋多孔聚合物支架材料形成新生血管的差异, 寻找更有利于工程化组织体内再血管化的方法。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题评估的“金标准”: 血管铸型是解剖学中常用的血管标本制作技术, 本实验选用血管铸型技术用于观察组织工程植入物新生血管情况。

设计或课题的偏倚与不足: 血管铸型技术虽然可以清晰显示微细网状血管, 并且标本可以长期保存, 但是并不是良好的定量化检测组织再血管化的指标, 免疫组化法如 CD31、CD34 抗原染色或放射免疫标记技术是否会更加精确的定量分析, 有待于我们今后的实验中进一步探讨。

提供临床借鉴的价值: 课题结论将为工程化组织体内再血管化方法的选择提供依据