

双细胞种植改善人工血管内皮细胞的保留率*★

裴 斐, 何 蕊, 李俊彦, 张 莉, 陈 旭

Double layer cells implantation improves retention rate of vascular prosthesis endothelial cells

Pei Fei, He Rui, Li Jun-yan, Zhang Li, Chen Xu

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that vascular endothelial cells were seed in grafts to enhance endothelialization rapidly and early, which can improve graft fluency. But the adhesion of seeded endothelial cells is often poor in single-layer. They are easily washed off under the blood flow.

OBJECTIVE: To improve cell retention on the graft with dual cell seeding technique, adding a layer of smooth muscle cells (SMCs) between the graft and vascular endothelial cells.

METHODS: Rabbit endothelial cells were cultured by standard enzyme separation technique and cell culture technique. Rabbit smooth muscle cells were isolated and cultured using tissue explant method. The lacZ and green fluorescent protein genes were used to transfer endothelial cells and smooth muscle cells. Polytetrafluoroethylene grafts pretreated with fibronectin were seeded with smooth muscle cell followed by endothelial cells in two-layer cells group. Vascular endothelial cells implantation served as controls. Vascular prosthesis was connected to perfusion models for 2 hours. The density of endothelial cells was calculated prior to and following perfusion. *In vivo* experiment, cell retention rate was measured following vascular prosthesis was inserted into the rabbit for 7 days.

RESULTS AND CONCLUSION: 2 hours following perfusion, cell retention rate was (0.39±0.04) in endothelial cells group, and (0.73±0.07) in the two-layer cells group. The cell retention rate was greater in the two-layer cells group compared with endothelial cells group ($P < 0.01$). 7 days following vascular prosthesis implantation, the cell retention rate was (0.63±0.10) in the endothelial cells group, and (0.95±0.06) in the two-layer cells group ($P < 0.05$). Results indicated that using smooth muscle cell as a media layer between endothelial cells and graft surface can improve the retention of seeded endothelial cells *in vitro* and *in vivo*.

Pei F, He R, Li JY, Zhang L, Chen X. Double layer cells implantation improves retention rate of vascular prosthesis endothelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(40): 7505-7508. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期研究表明, 在人工血管内壁种植内皮细胞, 使其早期快速内皮化, 可以改善移植血管的通畅性, 但种植的单层内皮细胞往往黏附力差, 在血流的冲击下容易脱落。

目的: 采用血管内皮细胞和平滑肌细胞双层种植方法, 提高人工血管腔内皮细胞的保存率。

方法: 采用标准酶分离技术和细胞培养技术分离培养兔内皮细胞。采用组织贴块法分离培养兔平滑肌细胞。并分别以 lacZ 和 GFP 基因转染内皮细胞及平滑肌细胞。双层细胞种植组在聚四氟乙烯人工血管管腔面先后种植平滑肌细胞和内皮细胞, 以单纯种植血管内皮细胞为对照。在体外将受试的人工血管接入作者设计的灌注模型下灌注 2 h, 计算比较灌注前后受试标本内皮细胞密度。体内实验, 将人工血管植入兔子体内 7 d, 分别测定内皮细胞保留率。

结果与结论: 灌注 2 h 后, 单纯内皮细胞种植组细胞保留率为 0.39±0.04, 而双层细胞种植组内皮细胞保留率为 0.73±0.07, 双层细胞种植组细胞保存率明显高于单纯内皮细胞种植组 ($P < 0.01$)。人工血管植入兔体内 7 d, 单纯内皮细胞种植组内皮细胞保留率为 0.63±0.10, 双层细胞种植组内皮细胞保留率为 0.95±0.06, 两组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。结果证实在内皮细胞和人工血管壁之间种植平滑肌细胞在体外和体内均可提高内皮细胞的保存率。

关键词: 人工血管; 血管内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 细胞种植; 保留率

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.40.021

裴斐, 何蕊, 李俊彦, 张莉, 陈旭. 双细胞种植改善人工血管内皮细胞的保留率 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(40):7505-7508. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

人工血管是重要的血管移植物, 已被广泛地用于血管重建, 但在人工血管置换病变的静脉和口径小于 6 mm 的动脉时, 常因腔内血栓形成而闭塞。其主要原因是人工血管不具备与自体血管相同的内膜和内皮细胞。前期研究表明, 通过在人工血管内壁种植内皮细胞, 使其早期快速内皮化, 可以改善移植血管的通畅性^[1], 但种植的单

层内皮细胞往往黏附力差, 在血流的冲击下容易脱落^[2]。平滑肌细胞是血管壁的主要细胞成分, 它能产生多量细胞外基质成分, 后者有利于细胞的附着。本实验将平滑肌细胞和内皮细胞双层种植于人工血管, 以提高内皮细胞的保存率。

1 材料和方法

设计: 动物对照实验。

时间及地点: 于 2007-05/2007-11 在西安交

Department of Cardiovascular Surgery, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Pei Fei★, Master, Associate professor, Department of Cardiovascular Surgery, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China menglan6-312@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30470456*

Received: 2010-06-13
Accepted: 2010-07-02

西安交通大学第二附属医院心血管外科, 陕西省西安市 710004

裴斐★, 男, 1964 年生, 陕西省西安市人, 汉族, 1986 年西安医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事生物医学工程和心血管外科学方面的研究。
menglan6-312@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)40-07505-04

收稿日期: 2010-06-13
修回日期: 2010-07-02
(20100613012/GW Q)

通大学医学院生物医学研究实验中心及分子生物实验室进行。

材料: 1, 3月龄新西兰白兔20只, 由西安交通大学医学院动物实验中心提供, 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。体外灌注模型装置自制。

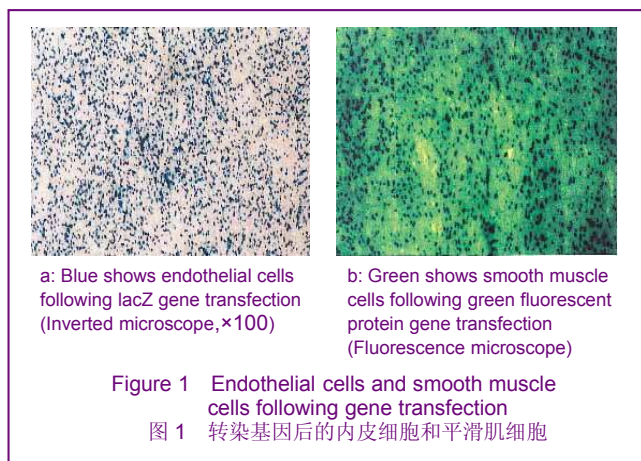
主要试剂:

试剂	来源
DMEM131 培养基、胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	Sigma 公司
8 g/L 多聚季胺(Polybrene)储用液、50 g/L G418 储用液	Gibco 公司
人 293T 细胞、293/GPG 包装细胞系、lacZ 基因的表达质粒、绿色荧光蛋白基因的表达质粒、聚四氟乙烯(PTFE)人工血管	美国迈阿密大学余红博士馈赠
兔抗人平滑肌 α 肌动蛋白单克隆抗体	Sigma 公司
所有质粒 DNA 均用试剂盒(Omega)从大肠杆菌中提取	—

实验方法:

细胞培养: 内皮细胞和平滑肌细胞取自1月龄新西兰白兔主动脉, 内皮细胞用标准酶分离技术和细胞培养技术分离和培养^[3]。平滑肌细胞原代采用组织贴块法^[4]。平滑肌细胞行抗A-肌动蛋白SABC法免疫组织化学染色鉴定, 组织化学染色呈阳性, 在细胞胞浆内可见与细胞的肌丝被染成棕黄色。内皮细胞电镜下可见胞浆中有W-P小体, 证实培养的为内皮细胞。本实验采用第2~4代细胞进行研究。

基因转染: 在细胞培养过程中, 于培养液中加入lacZ和含绿色荧光蛋白(GFP)基因的反转录病毒载体, 使内皮细胞和平滑肌细胞事先分别转入lacZ和GFP基因, 可通过X-gal染色确认内皮细胞, 荧光显微镜检查确认平滑肌细胞^[3], 见图1。



反转录病毒载体保存于293T/17包装细胞^[5], 采用含体积分数10%胎牛血清和2 mol/L谷氨酰胺的(DMEM131)培养基培养包装细胞, 并扩增反转录病毒

载体。

构建含有基因lacZ和基因GFP的假型反转录病毒载体MuLV/VSV-G。MuLV/VSV-G载体均参考3个质粒短暂转染体系方法生产^[6]。采用改良磷酸钙沉淀转染法。

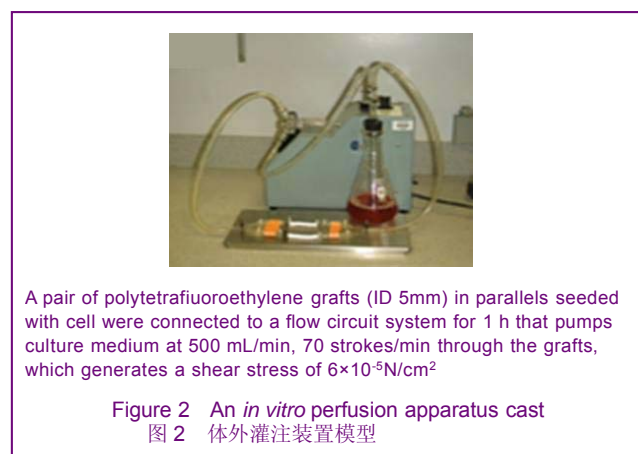
lacZ 基因转染内皮细胞: 第1天将内皮细胞以 3×10^4 /孔接种于直径为30 mm的6孔板中, 第2天当细胞生长至70%~80%融合后, 加病毒上清0.5 mL(含8 mg/L polybrene)孵育 2 h 后添加 2 mL 新鲜培养基, 培养后行X-gal染色, 倒置显微镜下计数10个随机高倍视野下蓝染细胞与总细胞的比率。

GFP基因转染平滑肌细胞: 方法同转染内皮细胞, 培养后荧光显微镜检查确认平滑肌细胞。

细胞种植: 首先, 在经纤维粘连蛋白预衬处理聚四氟乙烯人工血管内注入平滑肌细胞悬浮液($3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$), 两端加热封闭, 在37 °C条件下, 以1次/min的转速转动人工血管共2 h, 使细胞均匀附着种植于内壁。然后剪开封闭口, 将此人工血管放入改良DMEM131培养基中孵育1 d, 使平滑肌细胞在人工血管内壁附壁生长扩增。平滑肌细胞种植完成后, 人工血管内加注内皮细胞悬浮液($3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$), 再次加热封闭两端, 在37 °C条件下, 以1次/min的转速转动人工血管共2 h以后剪开封闭口, 放入改良DMEM131培养基中孵育1 d, 使内皮细胞在平滑肌细胞层表面贴附生长, 完成人工血管内壁腔面的双层细胞种植。

对照组仅种植血管内皮细胞, 方法同上。

体外灌注实验: 将受试的人工血管接入作者设计的灌注模型下灌注2 h(Sarns K II型体外转流泵, 经肝素化管道连接于两个并联的实验组和对照组人工血管, 见图2)。



灌注液采用DMEM131培养液, 灌注脉冲频率为70次/min, 灌注液流速500 mL/min, 剪切力 $6 \times 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ 。

体内种植实验: 将实验用3月龄新西兰白兔随机分为2组, 即单纯内皮细胞种植组和双层细胞种植组, 每组各6只, 将人工血管植入兔腹主动脉, 采用血管旁路的方式, 术中注意避免损害血管上的细胞, 防止细胞脱水, 手术前后给予适当抗凝剂及抗生素, 术后应用适量甲基

泼尼松龙抑制急性免疫排斥反应, 植入7 d, 用于观察人工血管的细胞保留率。

细胞计数检查: 灌流前后各取人工血管标本1段, 纵形剖开, 磷酸缓冲液轻柔漂洗, 40 g/L甲醛固定, X-gal半乳糖染色显示种植的内皮细胞, 相差显微镜(40倍)检查计算内皮细胞数。荧光显微镜观察计算平滑肌细胞数(均随机取10个视野计数计算其平均值), 体内种植前后各取人工血管标本1段, 细胞计数方法同上。体外10个样本, 体内6个样本均按此计数。

主要观察指标: 倒置显微镜下观察计数转染了lacZ基因的内皮细胞, 荧光显微镜下观察计数转染了GFP基因的平滑肌细胞

设计、实施、评估者: 实验设计、评估为本文第一作者, 实施为本文其他作者, 均经过正规培训。

统计学分析: 实验数据用SPSS 13.0软件分析处理。统计学处理由西安交通大学医学院统计学教研室指导完成, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用student t检验。统计学处理由第一作者完成。

2 结果

2.1 细胞种植后内皮细胞密度观察 经纤维连结蛋白预衬处理的人工血管, 单层内皮细胞种植后, 人工血管内壁内皮细胞密度达到 (358 ± 19) 个/ mm^2 。进行平滑肌细胞和内皮细胞双层种植, 人工血管内壁内皮细胞为密度 (330 ± 14) 个/ mm^2 。

2.2 体外循环灌注条件下内皮细胞保留情况 在体外循环装置中灌注2 h后, 人工血管内种植细胞均有脱落现象, 其中单纯内皮细胞种植组($n=10$), 显微镜分析显示, 灌注后平均细胞密度由 (358 ± 19) 个/ mm^2 降至 (137 ± 14) 个/ mm^2 , 细胞保存率为 0.39 ± 0.04 。而双层细胞种植组($n=10$)灌注后平均细胞密度由 (330 ± 14) 个/ mm^2 降至 (243 ± 27) 个/ mm^2 , 细胞保存率达 0.73 ± 0.07 , 明显高于单纯内皮细胞种植组($t=3.973$, $P < 0.01$), 见图3。

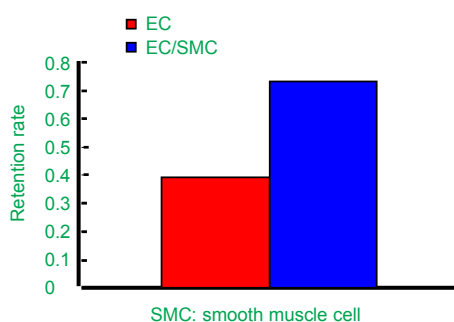


Figure 3 Retention rate of endothelial cells (EC) *in vitro* perfusion test (2 h after *in vitro* perfusion)
图3 体外实验中内皮细胞保留率(灌注2 h后)

2.3 体内种植实验结果 人工血管植入兔子体内7 d后, 分别测定细胞保留率, 其中单纯内皮细胞种植组($n=6$), 细胞保留率为 0.63 ± 0.10 。而双层细胞种植组($n=6$)细胞保留率达 0.95 ± 0.06 , 发现在内皮细胞与人工血管之间种植一层平滑肌细胞, 在体内一定时间内(7 d)可以提高内皮细胞在人工血管的保留率($t=-3.126$, $P < 0.02$), 见图4。

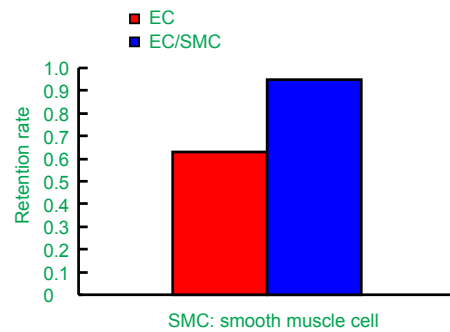


Figure 4 Retention rate of endothelial cells (EC) *in vivo* test (7 d after transplanted into the rabbit)
图4 体内实验内皮细胞保留率(植入兔子体内7 d后)

3 讨论

血管内皮细胞具有防止血液凝固和血栓形成的作用, 并且内皮愈合能够减轻吻合口内膜增生程度^[7], 人工血管腔面内皮细胞种植和早期快速内皮化有利于维持管腔通畅^[1]。但是由于种植的内皮细胞黏附性差, 容易被血流冲脱, 实际应用效果不佳^[2]。因此, 提高内皮细胞的黏附性有着重要意义, 目前主要途径有: ①预衬纤维结合素等细胞外基质^[8]。②人工血管表面进行化学修饰, 掺入精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸特异性的细胞附着肽链序列^[9]。③内皮细胞的基因修饰, 利用基因工程技术, 人们对内皮细胞进行基因修饰, 加强其分泌细胞因子的能力, 促进其黏附生长^[10]。但目前这些方法尚不成熟, 作用不够确切有效。

平滑肌细胞是血管壁的主要细胞成分, 此种细胞能产生多量细胞外基质成分^[7], 从而有利于内皮细胞的附着固定。本实验在内皮细胞和人工血管之间种植平滑肌细胞, 以提高内皮细胞的黏附性和保存率。采用双层细胞种植技术, 即在内皮细胞和人工血管之间种植平滑肌细胞, 可有效地改善种植内皮细胞的保存率, 提高内皮细胞密度。体内外实验中双层细胞种植后内皮细胞的保留率均高于单纯内皮细胞种植中内皮细胞的保留率说明: ①在人工血管与内皮细胞之间种植一层平滑肌细胞, 更接近于生理状态下的血管结构, 从而促进血管的内皮化。②细胞外基质在人工血管内皮细胞的黏附性上起着重要作用。许多实验已证明细胞种植前预衬细胞外基质可以明显改善内皮细胞的种植率^[11-12]。因而一个来

自于细胞分泌的, 稳定的细胞外基质, 必然会对人工血管上细胞的黏附性及保留率带来益处: 平滑肌细胞是血管壁的主要细胞成分, 可以比内皮细胞分泌更多量的细胞外基质, 同时有实验证实内皮细胞的培养液可刺激增加平滑肌细胞的生长和黏附^[13], 因而内皮细胞与平滑肌细胞之间相互的作用, 就能明显提高细胞在人工血管上的保留率。

在体内灌流实验中, 人工血管植入兔腹主动脉, 采用血管旁路的方式, 植入7 d, 用于观察人工血管的细胞保留率, 是在活体内, 自然状态下血液灌流后观察内皮细胞保留率, 比体外灌流更接近生理状态, 对于今后人工血管在人体内的使用更具深远意义。体内灌流后, 同样观察到, 在内皮细胞和人工血管之间种植平滑肌细胞, 可有效改善种植内皮细胞的保存率, 提高内皮细胞密度。

体内种植7 d, 单细胞种植组和双细胞种植组的细胞保留率均比体外灌流后提高, 说明体内细胞增殖率可能大于体外, 或者是血管移植植物植入体内后周围的内皮细胞有向移植植物自发生长的现象^[14]。然而大家都知道, 血管内膜的增生是以平滑肌细胞的增殖与迁移及细胞外基质的降解为特征的^[7], 在人工血管组织化工程中引入平滑肌细胞, 必然要关注是否平滑肌细胞可因缺乏调控而造成血管内膜增生狭窄, 这是作者接下来的实验所要研究的问题, 所以在本实验讨论内皮细胞保留率问题上作者采用植入体内7 d来观察, 刚好能有效检验双细胞种植后内皮细胞在体内的保留率是否比单纯种植内皮细胞有所提高, 又避免了平滑肌细胞过度增殖的影响。

4 参考文献

- [1] Jensen N, Lindblad B, Bergqvist D. Endothelial cell seeded Dacron aortobifurcated grafts platelet deposition and long term follow up. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1994;35(5):425-429.
- [2] Pan MX, Yang JZ, He HB. Zhonghua Xiong Xin Xueguan Waike Zazhi. 1998;14(3):190-191.
潘明新, 杨继震, 何红兵. 人工血管内皮化的研究进展[J]. 中华胸心血管外科杂志, 1998, 14(3):190-191.
- [3] Yu H, Eton D, Wang Y, et al. High efficiency in vitro gene transfer into vascular tissues using a pseudotyped retroviral vector without pseudotransduction. *Gene Ther*. 1999;6(11):1876-1883.
- [4] Lin J, Zhang ZL. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2006;22(4):827-829.
林京, 张子力. 改良植块贴壁法建立大鼠主动脉平滑肌细胞体外培养模型[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(4):827-829.
- [5] Si Tu ZQ, Wu JZ. Xi'an: Shijie Tushu Chubanshan Xian Gongsi. 2004: 71-77.
司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004: 71-77.
- [6] Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, et al. A transient three plasmid expression system for the production of high titer

- [7] retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23(4):628-633.
Qian GQ, Song W. Beijing: Beijing Yike Daxue Beijing Xiehe Yike Daxue Lianhe Chubanshe. 1997:148-155.
钱冠清, 宋为. 血管生理学[M]. 北京: 北京医科大学北京协和医科大学联合出版社, 1997:148-155.
- [8] Falk J, Townsend LE, Vogel LM, et al. Improved adherence of genetically modified endothelial cells to small diameter expanded polytetrafluoroethylene grafts in a canine model. *J Vasc Surg*. 1998;27(5):902-909.
- [9] Herring M, Gardner A, Glover J. A single staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*. 1978;84(4): 498-504.
- [10] Dichek DA, Anderson J. Enhanced in vivo antithrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors. *Circulation*. 1996;93(2):301-309.
- [11] Niwa K, Sakai J, Watanabe T, et al. Improved arterial wall model by coculturing vascular endothelial and smooth muscle cells 2007. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2007;43(1):17-20.
- [12] Liu S, Pan LF. Xibao Shengwuxue Zazhi. 2007;29(3):317-320.
刘水, 潘黎. 联合细胞培养在组织工程血管化中的应用[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(3):317-320.
- [13] One O, Ando J, Kamiya A, et al. Flow effect on cultured vascular endothelial and smooth muscle cell function. *Cell Struct Funct*. 1991;16(5):17-36.
- [14] Dietrich E, Lelkes PI. Fine-tuning of a three-dimensional micro carrier-based angiogenesis assay for the analysis of endothelial-mesenchymal cell co-cultures in fibrin and collagen gels. *Angiogenesis* 2006;9(3):111-125.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30470456), zg-tPA/eNOS 基因修饰/双细胞种植改善小口径人工血管通畅率的实验研究。

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。

致谢: 感谢美国迈阿密大学余红博士馈赠的试剂及细胞。

课题的创新点: 本实验仅为基金资助课题的一部分, 其创新点在于: 应用先进的反转录病毒转染技术, 使得细胞内基因转染效率提高, 持续时间更长; 引入标记基因可以有效区别种植细胞与宿主自发生长细胞; 应用双层细胞种植人工血管, 使平滑肌铺衬于内皮细胞与人工血管之间以增进内皮细胞在人工血管上的保留率。

课题评估的“金标准”: 本实验评价指标包括: 在倒置显微镜下鉴定并计数 lacZ 基因转染的内皮细胞 (蓝色), 在荧光显微镜下鉴定并计数 GFP 基因转染的平滑肌细胞 (绿色)。均为标准的鉴定方法。

设计或课题的偏倚与不足: 此实验设计的不足之处在于: 样本量较小, 数据易出现偏倚; 铺衬平滑肌细胞用于增加内皮细胞保留率的同时, 应进一步研究平滑肌细胞增生对人工血管狭窄的影响。

提供临床借鉴的价值: 本实验针对如何提高人工血管上内皮细胞保留率, 将平滑肌细胞铺衬于内皮之下, 可使种植的含有目的基因的内皮细胞更为牢固的附于人工血管壁, 促进内皮化过程。为应用改造的内皮细胞防止内膜的增生和狭窄提供了条件, 为最终研制出临床迫切需要的高效新型的人工血管奠定了基础。