

具有周向微槽结构管状血管支架制备及诱导平滑肌细胞的取向生长*

章 青¹,冯 杰¹,郑毅雄²,钟明强¹

Fabrication of a tubular vascular scaffold with circumferential microchannels to induce oriented growth of smooth muscle cells

Zhang Qing¹, Feng Jie¹, Zheng Yi-xiong², Zhong Ming-qiang¹

文章亮点:

采用静电纺丝、熔融纺丝制得了具有两层管壁、外壁具有周向微槽结构的管状仿生血管支架。细胞培养证明,该支 架具有良好的细胞相容性,其表面周向微槽对血管平滑肌细胞的取向排列具有明显的诱导作用。

Abstract

BACKGROUND: In vascular tissue engineering, scaffolds that can induce smooth muscle cells align and orientate in circumferential direction, but not simple porous scaffold, would be welcome.

OBJECTIVE: To observe the effect of circumferential microchannels on the *in vitro* induction of smooth muscle cells.

METHODS: Electrospinning, melt spinning, and solvent adhesion techniques were combined and the as-prepared scaffolds were further modified by grafting collagen for improving their biocompatibility. Scanning electron microscope and fluorescence microscope were selected to characterize the alignment of smooth muscle cells on these biomimetic scaffolds.

RESULTS AND CONCLUSION: Mixture of chloroform/alcohol with volume ratio at 5:95 was used to bond the elextro spun poly(lactic-co-glycolic acid) fibers and melt spun poly(ε-caprolactone-co-lactic acid) fibers successfully toward creating a biomimetic vascular scaffold. The scaffold surface was first introducing active carboxylate group by alkali hydrolyzing and then coupling with collagen by using carbodiimide. When the weaving angle in the melt spinning was suitable (30°), the pores of the scaffold could ensure the growth of smooth muscle cells on and in the scaffold homogenously. All the smooth muscle cells aligned along the microfibers and microchannels of the scaffolds, demonstrating that such novel type of scaffold had strong ability in inducing smooth muscle cells regenerating their microarchitecture *in vivo*. It is helpful in developing biomimetic tubular scaffold to induce blood vessel regeneration *in vivo*.

Zhang Q, Feng J, Zheng YX, Zhong MQ. Fabrication of a tubular vascular scaffold with circumferential microchannels to induce oriented growth of smooth muscle cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(29): 5417-5422. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

<mark>背景</mark>:对小口径血管组织工程化而言,平滑肌细胞的周向排列要求彻底改变以前支架的简单多孔结构,代之以能够诱导血管平滑肌细胞三维周向取向和排列新型微观结构。

目的:观察微槽结构对平滑肌细胞体外定向诱导的影响。

方法:用静电纺丝、熔融纺丝并利用溶剂/非溶剂和热压的方式制得了具有两层管壁、外壁具有周向微沟槽结构的仿 生管状血管支架,用胶原蛋白固定改性后,在其上种植人脐静脉血管平滑肌细胞。扫描电镜和荧光显微镜观察支架 不同缠绕角度对平滑肌细胞定向诱导能力的影响。

结果与结论: ①选择比例为 5:95 的氯仿/乙醇溶液,浸润时间为 5 s,可以使乳酸-羟基乙酸共聚物电纺纤维和乳酸-ε-己内酯共聚物熔纺纤维之间形成很好的粘连,形成支架。②通过碱降解使支架表面含有羧基,以 1-(二甲基胺丙基)-3-乙基碳化二亚胺为缩合剂在支架表面接枝胶原。X 射线光电子能谱证实了支架表面胶原大分子的存在。③当纤维之间的编织角度为 30°即网孔尺寸适当时,细胞能在支架内部和表面大面积生长。④具有两层管壁结构的仿生管状血管支架具有良好的细胞相容性,其表面周向微槽结构对平滑肌细胞的取向排列具有明显的诱导作用。提示在电纺层外面再熔纺缠绕降解聚合物是制备管状仿生血管支架的可行方法。血管平滑肌细胞能沿着纤维暨微沟槽方向一致取向排列。

关键词:微槽;仿生;血管支架;血管平滑肌细胞;取向排列;生物材料

章青,冯杰,郑毅雄,钟明强.具有周向微槽结构管状血管支架制备及诱导平滑肌细胞的取向生长[J].中国组织工程研究,2012,16(29):5417-5422. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Materials Science & Chemical Engineering Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China; ²Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Zhang Qing★, Master, Department of Materials Science & Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China grass_zhq@ yahoo.com.cn

Corresponding author: Feng Jie, Associate professor, Department of Materials Science & Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China fengiie@ziut.edu.cn

doi:10.3969/j.issn. 2095-4344.2012.29. 020

Received: 2011-01-17 Accepted: 2012-05-21



¹ 浙江工业大学化 学工程与材料学院,浙江省杭州市 310014;²浙尾,浙 学医院普外雨,浙 江省杭州市 310014

章青★, 女, 1985 年生, 浙江省临安 市人, 汉蔟, 2011 年浙, 江工业大学 毕业, 硕士, 主要 从事生物医用材 料的研究。 grass_zhq@ yahoo.com.cn

通讯作者: 冯杰, 副教授, 浙江工业 大学化学工程与 材料学院, 浙江省 杭州市 310014 fengjie@ zjut.edu.cn

中图分类号:R318 文献标识码:B 文章编号:2095-4344 (2012)29-05417-06

收稿日期: 2011-01-17 修回日期: 2012-05-21 (20110117003/WL · W) ______ 0 引言

传统的组织工程概念是从肌体获得少量自体细胞,在体外扩增后接种到可降解的三维多 孔支架上,经体外培养后再植入体内,达到修 复缺损、替代组织甚至器官一部分或全部功能 的目的^[1-2]。所用支架为适用圆型细胞如成骨、 软骨细胞的传统多孔支架如聚羟基乙酸多孔 网、PLGA相分离/盐漓支架或各种水凝胶。细 胞的形态决定其功能,传统多孔支架或水凝胶 貌似能促进细胞的快速长入,但并不能快速诱 导细胞再现它们在体内时的微堆砌结构,特别 是对非圆形细胞而言。如它不能有效诱导血管 平滑肌细胞的三维取向排列,而血管平滑肌细 胞的三维一致排列是构成血管中间层力学强度 的主要原因^[3]。

Shen等^[4]用微构建技术制备了含有排列微 槽结构的平面状降解材料支架并在其上培养血 管平滑肌细胞,发现血管平滑肌细胞都沿着微 槽方向排列生长,与其在体内时的形态极其相 似,细胞表型也正常。Norman等^[5]先将血管平 滑肌细胞包覆在胶原水凝胶中,再填充到这些 排列微槽内,期望得到三维排列生长的血管平 滑肌细胞,但发现只有靠近微槽槽壁的血管平 滑肌细胞才沿微槽方向排列生长,其他部位的 细胞被水凝胶包裹,很难沿微槽方向"长开"。 受其启发,Feng等^[6]开发了在微槽内层层种植 血管平滑肌细胞的技术,获得了30 µm厚、血 管平滑肌细胞三维一致取向排列的血管中间 层。

但上述三维取向研究工作中,基本上使用 了二维平面支架。要想完全仿生血管,管状支 架是必需的。传统的多孔管状支架大多用无纺 布缠绕^[7]、电纺丝缠绕^[8-9]、纤维编织等技术获 得^[10],重视力学强度和顺应性等指标,忽略了 支架仿生性能如表面微沟槽结构对血管平滑肌 细胞取向排列诱导能力的研究。基于此,实验 用静电纺丝、熔融纺丝技术制备了具有两层管 壁结构(内层PLGA-外层PLCL)的仿生管状支 架并对支架进行了化学和生物改性,观察了其 微槽结构对人脐静脉血管平滑肌细胞体外定向 诱导的影响,为制备能原位诱导血管再生的血 管移植替代物提供实验支持。

1 材料和方法

设计: 材料-细胞学实验, 细胞取向生长观察。

时间及地点: 支架制备与改性于2009-03/ 2010-03在浙江工业大学化材学院高分子材料 实验室完成, 细胞培养及表征于2010-03/ 2010-12在浙江大学医学院华家池校区细胞培 养室完成。

材料:

主要材料和仪器:

材料和仪器	来源
PLGA, LA : GA=75 : 25, M_{w} : 1×10 ⁵ ; PLCL, LA : CL=90 : 10, M_{w} : 1×10 ⁵	济南岱罡生物科技有限公司
1-(二甲基胺丙基)-3-乙基 碳化二亚胺(EDAC)、Ⅰ型 胶原蛋白	Sigma
人脐静脉血管平滑肌细胞 扫描电子显微镜、 荧光显微镜	众磊生物科技发展有限公司 ZEISS,德国
X 射线光电子能谱(XPS) CO₂恒温培养箱	KRATOS,日本 SANYO,日本

方法:

支架制备:

支架内层:以旋转轴(直径为4 mm的芯棒) 为收集装置,在一定工艺条件下通过静电纺丝 技术制备PLGA管状支架。具体纺丝条件为:浓 度27%(溶剂为氯仿),电压15 kV,极距15 cm, 流速6 mL/h,轴心转速4 000 r/min。电纺30 min 后制得沿表面周向平行排列,纤维直径为5~ 7 µm的电纺纤维支架。

支架外层:将20 mL玻璃注射器改装成简 易熔融纺丝装置(在其外表面缠绕加热带并用 热电耦控制温度),将PLCL添加到注射器内, 加热到150 ℃使之熔融后,以一定匀速推力将 熔体通过针孔制成纤维,并趁热将其缠绕在之 前所制静电纺管状支架上。左右来回移动注射 器,即能以一定角度、层层缠绕,制得最外层 具有取向沟槽结构的多孔仿生支架^[11]。实验所 用支架壁厚约0.5 mm。

由于熔纺纤维之间没有黏结性,采用溶剂-

非溶剂法使熔纺纤维之间形成黏结。即将支架浸入一定 比例的氯仿/乙醇溶液中一定时间,取出后用去离子水反 复洗涤数次,具体工艺见表1。纤维之间的黏结性通过 扫描电镜观测。内、外层之间的纤维亦因溶剂-非溶剂 作用得以黏结。

表 1 支架纤维黏结工艺 Table 1 Process for bonding the scaffold fibers		
Sample	Chloroform/alcohol	Duration (s)
а	10:90	5
b	5:95	5
C	5:95	10

支架改性: 将上述管状支架浸入0.4 mol/L的NaOH水 溶液, 40 ℃下碱降解15 min,取出并用去离子水冲洗 数遍。浸入10 g/L的EDAC/PBS溶液中,于4 ℃下反应 24 h,取出并用去离子水洗涤。再置于4 ℃的胶原酸性 水溶液(1%乙酸,胶原2 g/L)中24 h,取出后于0.3%乙 酸溶液中洗涤24 h,以洗去物理吸附的胶原^[12]。

体外细胞静态培养:取对照组(光滑PLCL膜)和两种 不同缠绕角度的仿生管状支架,裁成直径为11 mm的 膜,分别放入48孔培养板中。通过紫外光在正反两面 分别照射1 h灭菌。培养液为DMEM-LG(体积分数为 10%胎牛血清、1%双抗)。种植密度为1×10⁵/cm²。每 孔接种400 µL,将培养板置于37 ℃,体积分数为 5%CO₂培养箱中,隔天换液。倒置显微镜下观察细胞 生长状况。

扫描电子显微镜观察:培养4 d后,用移液枪吸掉旧培养液,PBS反复清洗3次,2.5%戊二醛室温固定4h,再用PBS清洗3次,最后用乙醇(体积分数为50%、体积分数为70%、体积分数为90%、体积分数为95%、体积分数为100%)进行梯度脱水,每个浓度浸10 min。SEM观察细胞在支架上的生长排列状况。

FITC-Phalloidin和PI双荧光染色:吸弃培养液,PBS清 洗3遍。加入40 g/L多聚甲醛/PBS,4 ℃固定30 min, PBS洗涤3遍。用0.1%TritonX-100/PBS室温破膜3 min, PBS清洗3次。滴加0.5%BSA,室温静置2 min,用 100 µL浓度为5 mg/L的F-actin特异性标记物 FITC-Phalloidin在培养箱中染色50 min,PBS清洗3次。 再用5 mg/L的细胞核特异性标记物PI室温染色2 min, PBS清洗3次。把样品放在载玻片上,用荧光显微镜观 察。

主要观察指标:血管平滑肌细胞在仿生支架上的形态即沿纤维/微槽排列与取向。

2 结果

2.1 氯仿/乙醇不同配比与浸泡时间对支架黏结的影响 此前的研究显示,血管平滑肌细胞能沿着纳米至上百微 米宽的沟槽取向排列。扫描电镜观察显示,实验所制熔 纺纤维直径30~50 µm,电纺纤维直径则不到10 µm,见 图1。刚纺完的支架虽然能成管状,但纤维之间比较松 散,必须进行黏结强化。图1a、b是把管状血管支架分 别放入比例为10:90、5:95的氯仿/乙醇溶液中5 s后 取出,所得表面微观结构。图1a中纤维之间大面积黏结, 破坏了支架表面微槽结构,而图1b中纤维之间不仅黏结 良好(用手扯拉管子,保持整体状态,不脱线),还保持 了表面的微槽结构。图1c与图1b相比,只是将浸泡时间 延长到了10 s,从中可以看到纤维不仅大面积黏结在一 起,纤维表面还布满了孔洞。因此,选择比例为5:95 的氯仿/乙醇溶液,浸泡5 s为最佳黏接条件。在此条件 下,电纺纤维表面形貌没有受到影响,见图1d。



2.2 不同缠绕角度对熔纺纤维排列的影响 通过对注 射器移动速率的控制,制备出两种不同缠绕角度的支 架,见图2。其中图2a的缠绕角度为60°(纤维之间的夹 角),图2b的为30°。可见缠绕角度不同,纤维之间的疏 密程度暨网孔尺寸亦不同。显然,这将影响细胞的渗漏 与"长入"快慢。按上述方法对支架进行黏结,即获得 两种不同表面织态结构的仿生支架,以研究血管平滑肌



细胞的响应。对照组样品采用溶液浇注法制备0.2 mm 厚的PLCL膜,表面没有任何人为拓扑结构。



2.3 胶原在PLCL支架上的化学接枝 胶原属于蛋白 类大分子,其分子结构中含有氨基。利用EDAC为缩合 剂,可使通过碱降解而表面富含羧基的PLCL支架与胶 原分子中的氨基发生脱水缩合反映,生成肽键,从而将 胶原化学键合于PLCL支架表面。PLCL支架用胶原改性 后的XPS图见图3。由于PLCL中无氮原子,而EDAC不 作为联接的一部分滞留在生成物分子中,而是转化为具 有极低细胞毒性的水溶性脲衍生物,故图3中在400 eV 附近出现的N1s峰可直接证明支架表面胶原的存在。

2.4 血管平滑肌细胞在支架上的形态学观察 细胞的 形态对功能正常与否有着十分重要的影响。细胞在膜和 支架材料上均能黏附、铺展,生长形态多为梭形,细胞 之间连接成片,表面有大量基质形成,见图4。膜表面 细胞完全无序排列,见图4a;由于纤维之间排列较紧密, 使大部分细胞能在支架表面沿着纤维方向取向生长,融 合成片,并见大量细胞外基质,见图4b。细胞的取向更 可以从荧光显微镜照片中清晰看到,细胞生长十分良 好,密度适宜,可以十分清楚地看到细胞核和细胞质, 但非常无序,见图5a;细胞骨架(绿色部分)和细胞核(红 色部分)大都沿着纤维取向伸长,并一致排列,见图5b。







实验中还发现,当熔纺纤维之间的孔隙大于细胞直径(约10 µm)时,细胞大都漏到支架网孔内部去了,见 图6a。只有当熔纺纤维之间的孔隙尺寸小于细胞尺寸 时,细胞才能够在支架表面生长,并会倾向于沿着支架 表面的织态结构(排列微槽)一致排列。但太小的网孔将 会阻止细胞快速"长入"支架内部。因此,熔纺纤维的 直径和编织角度是关键。只有网孔尺寸和细胞尺寸相近 时,细胞才容易快速长入支架形成周向排列的血管中间 层。另外,为了防止将来移植时出现血液外渗,实验采 用双层血管壁的做法,即在熔纺管状支架内部衬一薄层 电纺支架(形成内腔)。细胞培养结果表明,的确在电纺 层的背面观察到了血管平滑肌细胞,见图6b,但其内表 面没有。所有这些措施和结果,都将对下一步研发能原 位诱导血管再生的血管移植物有所帮助。



6 荧光显微镜观察血管平滑肌细胞在熔纺支架表面和底 部电纺支架表面取向生长(标尺 200 µm)

3 讨论

由于实验条件的限制,没有对细胞的表型进行表征,但转子之前与他人合作进行的研究结果已表明^[13], 平行排列的微通道确实能改变血管平滑肌细胞在体外 培养时的表型:细胞在微通道中"长满"即融合后,会 从合成型(细胞在此表型下会增殖)转变为具有更大收缩 性的表型(表达更多大的收缩蛋白),同时细胞的形态发 生排列取向。比如,MHC(典型弹性蛋白之一)染色即表 明,在微通道内培养且融合的血管平滑肌细胞,MHC 有表达,而在光滑表面上培养的血管平滑肌细胞(无论是 否融合),以及在微通道内培养但尚未融合的血管平滑肌 细胞,则未见MHC表达。另外,最近Nivison-Smith等^[14] 的研究结果亦证明,人的血管平滑肌细胞也可以顺着平 行排列的电纺弹性纤维取向,并表达更多的α肌动蛋白 (平滑肌细胞更具收缩性表型的表现之一)。

与在平面支架的微槽内用Layer-by-layer层层种植 技术构建较厚的血管中间层相比^[6, 15-16],本实验直接采 用了三维管状支架,通过控制熔纺纤维交叉形成的网孔 尺寸,促使细胞能在支架内部和表面沿着纤维方向大面 积三维立体生长。又通过在熔纺支架内壁,加衬一层具 有纳米孔的电纺支架,防止血管平滑肌细胞长入管状支 架内腔,这一设计对今后进行血管平滑肌细胞和内皮细 胞共培养至关重要,因为与内皮细胞共培养可调节血管 平滑肌细胞的表型,加快血管组织工程化进程[17-18],具 体机制是通过内皮细胞分泌的各种信号分子(如血小板 源衍生生长因子或转化生长因子β1等)对血管平滑肌细 胞进行调节。但内皮细胞和血管平滑肌细胞很少直接接 触,而是透过纳米孔,通过血管平滑肌细胞伸出的丝状 伪足与对面的内皮细胞接触[17,19],或者间隔一层薄的纤 维粘连蛋白,形成胞间通讯^[20]。电纺和熔纺支架相组合, 恰好能满足这种共培养需要。

结论:在电纺层外面再熔纺缠绕降解聚合物是制备 管状仿生血管支架的可行方法。血管平滑肌细胞能沿着 纤维暨微沟槽方向一致取向排列。但熔纺纤维直径和编 织角度暨网孔尺寸对细胞的存在层级有着重要影响。当 纤维之间的夹角大于30°时,细胞不能在支架表面生长, 大都"漏到"支架内部,但当网孔尺寸过小时,细胞又 难以快速"长入"支架内部。

4 参考文献

- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993; 260(5110):920-926.
- [2] Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. Biomaterials. 2003;24(24):4353-4364.
- [3] Chan-Park MB, Shen JY, Cao Y, et al. Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels.J Biomed Mater Res A. 2009;88(4):1104-1121.

- [4] Shen JY, Chan-Park MB, He B, et al. Three-dimensional microchannels in biodegradable polymeric films for control orientation and phenotype of vascular smooth muscle cells. Tissue Eng. 2006;12(8):2229-2240.
- [5] Norman JJ, Desai TA. Control of cellular organization in three dimensions using a microfabricated polydimethylsiloxane-collagen composite tissue scaffold. Tissue Eng. 2005;11(3-4):378-386.
- [6] Feng J, Chan-Park MB, Shen J, et al. Quick layer-by-layer assembly of aligned multilayers of vascular smooth muscle cells in deep microchannels. Tissue Eng. 2007;13(5): 1003-1012.
- [7] Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional arteries grown in vitro. Science. 1999;284(5413):489-493.
- [8] Vaz CM, van Tuijl S, Bouten CV, et al. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. Acta Biomater. 2005;1(5):575-582.
- [9] Kanani AG, Bahrami SH. Review on electrospun nanofibers scaffold and biomedical applications. Trends Biomater Artif Organ. 2010;24(2):93-115.
- [10] Yuan JD, Zhao J, Li ZH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(29):5619-5623. 袁健东,赵杰,李忠海,等.新型三维编织型生物支架的研制及体外 生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(29): 5619-5623.
- [11] Chung S, Ingle NP, Montero GA, et al. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. Acta Biomater. 2010;6(6): 1958-1967.
- [12] Ma Z, He W, Yong T, et al. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell Orientation. Tissue Eng. 2005;11(7-8):1149-1158.
- [13] Cao Y, Poon YF, Feng J, et al. Regulating orientation and phenotype of primary vascular smooth muscle cells by biodegradable films patterned with arrays of microchannels and discontinuous microwalls. Biomaterials. 2010;31(24): 6228-6238.
- [14] Nivison-Smith L, Weiss AS. Alignment of human vascular smooth muscle cells on parallel electrospun synthetic elastin fibers. J Biomed Mater Res A. 2012;100(1):155-161.

- [15] Rayatpisheh S, Poon YF, Cao Y, et al. Aligned 3D human aortic smooth muscle tissue via layer by layer technique inside microchannels with novel combination of collagen and oxidized alginate hydrogel. J Biomed Mater Res A. 2011;98(2): 235-244.
- [16] Poon YF, Cao Y, Liu Y, et al. Hydrogels based on dual curable chitosan-graft-polyethylene glycol-graft-methacrylate: application to layer-by-layer cell encapsulation. ACS Appl Mater Interfaces. 2010;2(7):2012-2025.
- [17] Wu HC, Wang TW, Kang PL, et al. Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft. Biomaterials. 2007;28(7):1385-1392.
- [18] Liu Y, Rayatpisheh S, Chew SY, et al. Impact of endothelial cells on 3D cultured smooth muscle cells in a biomimetic hydrogel. ACS Appl Mater Interfaces. 2012;4(3):1378-1387.
- [19] Fillinger MF, Sampson LN, Cronenwett JL, et al. Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. J Surg Res. 1997;67(2):169-178.
- [20] Pang Z, Niklason LE, Truskey GA. Porcine endothelial cells cocultured with smooth muscle cells became procoagulant in vitro. Tissue Eng Part A. 2010;16(6):1835-1844.

来自本文课题的更多信息---

作者贡献:第一、二作者进行实验设计,实验实施 为第一作者,实验评估为第三作者,资料收集为第一作 者,第一作者成文,第三作者审校,通讯作者对文章负 责。

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。

研究的创新之处与不足:基于细胞对表面拓扑结构 的响应,成功研制了血管平滑肌细胞在其表面能周向排 列的管状仿生血管支架。但只观察了细胞的形貌,未就 其表型变化进行表征。