

• 基础研究 •

透明质酸支架构建工程化肝组织小块的初步研究

徐迎新 王文杰 张勇 吴仕和 宋旭华 刘巨超 李荣 冯庆玲

[摘要] 目的 探索肝窦血管内皮细胞和肝细胞与透明质酸支架复合后构建工程化肝组织小块的可行性。方法 分离小鼠肝细胞和肝窦血管内皮细胞,分别种植于透明质酸海绵状支架上培养,形成支架材料-细胞复合体,植于小鼠肝包膜下肝组织表面。2 周后将支架取出观察植入效果。结果 分离获得的肝细胞和肝窦血管内皮细胞活力较高。构建的支架-细胞复合物植入体内后与宿主肝组织紧密融合,可见移植物内有微血管形成,血管周围肝细胞聚集生长,结构类似正常肝组织。结论 利用透明质酸支架复合肝窦血管内皮细胞和肝细胞构建工程化肝组织小块的方法可行。

[关键词] 肝;组织工程;透明质酸;移植

Rudimentary construction of liver histioids by hyaluronic acid scaffold XU Ying-xin, WANG Wen-jie, ZHANG Yong, et al. Institute of General Surgery, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] Objective To study the possibility of the liver histioid construction through co-culturing hepatocytes and sinusoidal vessel endothelial cells (SVECs) on hyaluronic acid (HA) scaffold. Methods Hepatocytes and SVECs of a mouse were isolated respectively, and then were cultured successively in HA scaffold. The scaffold-cell complexes formed later were implanted onto the surfaces of liver in the mouse. After 2 weeks, the implants were taken out for HE staining and compatibility evaluation. Results The isolated hepatocytes and SVECs were vigorous. The implants inoculated well with liver tissue of the host with visible growth of blood vessels in the implants. The hepatocyte aggregation grown around the vessels, the liver-like tissue, were observed. Conclusion It is feasible to construct liver histioid through co-culturing hepatocytes and sinusoidal vessel endothelial cells on hyaluronic acid scaffold.

[Key words] liver; tissue engineering; hyaluronic acid (HA); implantation

中图分类号:R318.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)07-0550-02

[本文著录格式] 徐迎新,王文杰,张勇,等.透明质酸支架构建工程化肝组织小块的初步研究[J].中国康复理论与实践,2005,11(7):550-551.

已知终末期肝病的唯一治疗手段是肝脏移植,然而供肝的严重缺乏是影响众多病人治疗与康复的瓶颈问题。近年来,作为解决肝移植供体不足最具潜力的肝组织工程悄然兴起,为病损组织器官的修复与功能重建开辟了新的前景。肝组织工程的基本原理是利用种子细胞,可降解支架材料、生长和分化因子进行体外构建;其特殊性是对血管化要求更高。在本实验中,我们选用透明质酸(hyaluronic acid)作为支架材料与基质,复合肝窦内皮细胞和肝细胞构建肝组织工程小块。

1 材料与方法

1.1 材料 透明质酸肝支架由清华大学材料科学与工程系制作,为多孔海绵状结构;Ⅳ型胶原酶、DNA 酶和 Percoll 试剂购于美国 Sigma 公司;Ⅷ因子免疫细胞化学检测试剂盒购于中山公司。雄性和雌性 NIH 小鼠购于军医进修学院动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞和肝窦内皮细胞的分离 雄性小鼠乙

醚麻醉,开腹,自门静脉插管固定,注入肝素 30 U。肝下腔静脉切断后,立即向门静脉内灌注 39℃无钙的 Hanks 液。当肝脏变为黄白色时,更换 39℃含钙 Hanks 液(含 0.05%胶原酶、0.001% DNA 酶)20 ml 继续灌注;切下肝脏,置含相同溶液的平皿中 37℃培养 10 min。用剪刀撕去肝包膜,去掉肝内血管和 Glisson's 系统,搜集消化后的细胞悬液,100 目尼龙滤网过滤,100 g 离心 5 min,底层沉淀的细胞即为肝实质细胞;用 DMEM 培养液洗涤 3 遍,用台盼蓝染色检测肝细胞活率,调成 1×10^7 /ml 备用。上层富含肝窦内皮细胞的悬液 300 g 再离心 10 min,沉淀悬浮在 PBS 中洗涤 2 次;将细胞悬液加在两层 percoll 梯度液(上层:25% percoll 4 ml;底层:50% percoll 3 ml)的上层,900 g 梯度离心 20 min;吸管吸取位于 percoll 密度层之间中间带的肝窦内皮细胞,以等体积的 PBS 稀释,900 g 离心 10 min,沉淀物悬浮在加入小牛血清的 DMEM 培养液中,置 24 孔板中,每孔 1 ml,37℃5% CO₂ 培养 20 min,收集未贴壁的细胞,台盼兰染色并计数,测定细胞存活率。在 20%小牛血清的 DMEM 培养液中培养,待细胞融合后,传代扩增。

1.2.2 肝窦内皮细胞的鉴定 用抗Ⅷ因子抗体进行免疫细胞化学染色,按照试剂盒说明和推荐抗体浓度操作。

基金项目:军队医药卫生科研基金“十五”面上项目(01 MB084)。

作者单位:1.100853 北京市,解放军总医院普通外科研究所(徐迎新,吴仕和,刘巨超,李荣);2.100084 北京市,清华大学材料系生物材料实验室(王文杰,张勇,冯庆玲)。作者简介:徐迎新(1953-),女,山东鄄城县人,副研究员,主要研究方向:外科修复与重建。

1.2.3 肝细胞和肝窦内皮细胞与透明质酸支架的复合 将小鼠的肝窦内皮细胞种植在透明质酸支架,在 DMEM 培养液中培养 24 h;然后将肝细胞种植在海绵状结构的孔隙中,体外培养 2 d,再植入体内。

1.2.4 细胞-支架复合体的体内植入 小鼠乙醚麻醉后剖腹,将右肝下缘的肝包膜剥除,看到肝表面有血性渗出,将体外构建的肝组织块紧贴于剥除包膜的肝面,用大网膜将其固定。

1.2.5 移植物的组织学观察 细胞-支架复合体植入体内 14 d 后,将小鼠麻醉、剖腹,对移植物体内的组织工程肝小块进行大体观察,然后将植入物取出,常规固定、石蜡包埋、组织切片和 HE 染色。

2 结果

2.1 细胞制备 分离的肝细胞存活率为 97%,肝窦内皮细胞存活率为 96%。肝细胞在培养板培养 1 周后生长良好(封三图 3.1)。肝窦内皮细胞离心涂片后,抗 VIII 因子抗体免疫细胞化学染色呈阳性反应(封三图 3.2)。

2.2 支架/细胞复合体大体观察 植入支架有所降解,表现为组织块有塌陷;可见支架与周围组织相连,表面有血管长入(封三图 3.3)。剥离该组织块可见表面有出血。

2.3 植入物的组织学观察 可见成片肝细胞生长,内有小血管形成,类似于肝组织,但没有典型的肝小叶结构。靠近宿主组织端有较多淋巴细胞浸润(封三图 3.4)。支架材料大部分已降解,结构已不明显。在高倍镜下可见成团肝细胞生长。由于透明质酸支架材料遇水膨胀脱水时收缩,故镜下肝细胞有些变形(封三图 3.5)。

3 讨论

构建工程化肝组织首先要制备种子细胞。肝细胞是肝组织中执行主要功能的实质性细胞,而肝窦内皮细胞则是建立血供的基本要素。因此,在肝组织工程的基础研究中,我们首先建立了这两种细胞的分离和培养方法,获得了较高活力的种子细胞。酶灌注消化法一次可获得较大量小鼠原代肝细胞,足够用于构建小肝组织块;但是肝窦内皮细胞所得较少,须传代扩增后使用。本实验采用第 3 次传代的肝窦内皮细胞与下次分离的原代肝细胞联合构建工程化肝组织小块。

支架材料也是构建过程的重要因素,可以为肝细胞的贴附提供锚着点,增大肝细胞粘附表面积,支持较大的细胞团块。理想的材料应具有对肝组织细胞的良好相容性,可降解,并能引导组织生长。肝组织工程支架材料的研究目前还处于筛选阶段。透明质酸是一种直链高分子多糖,由葡萄糖醛酸和乙酰氨基葡萄糖组成的双糖单位以糖苷键重复连接而成,它广泛存在于人

和脊椎动物体内,是组成细胞外基质的几种糖胺聚糖之一^[1]。由于其天然性和与人体组织良好的生物相容性,在诸如软骨、皮肤等组织工程领域广泛应用^[2-4]。近年来,也有研究者对透明质酸作为肝组织工程的支架材料做了一些改性和体外相容性评价方面的工作^[5]。本研究显示:海绵状的透明质酸支架与肝细胞和内皮细胞的相容性良好,经过预内皮化处理后植入体内,可以形成微血管,并在微血管周围见有肝细胞成团生长,聚集形成“肝细胞岛”。由于透明质酸材料亲水性强,遇水后体积膨胀较明显,植入物标本从体内取出进行包埋、切片处理过程中须经过脱水程序。因此,切片中肝细胞有些变形。

在组织切片中,我们观察到植入物中有较多淋巴细胞浸润,提示植入物在体内引起了一定的免疫反应。分析原因:①透明质酸是动物体内天生具有的天然材料或细胞外基质,但作为异体来源的多聚糖,理论上是可以成为抗原或免疫佐剂的;目前组织工程中最常用的天然材料壳聚糖和合成材料 PLGA 在降解过程中产生的颗粒状产物有可能使机体产生免疫反应^[6];这表明材料与目标细胞的相容性不能代表机体的相容性,机体相容性还需进行体内实验验证;②植入物中有来自两个个体的细胞(传代肝窦内皮细胞和原代肝细胞),异体细胞移植也可带来排斥反应。如何区别支架材料和异体细胞引起的免疫反应需要进一步研究。

本研究初步探索了工程化肝组织小块的体外构建,建立了主要组织细胞的制备方法以及与海绵状支架材料复合的方法,初步观察到植入物在体内形成带有小血管的类肝组织,为进一步研究打下了基础。

[参考文献]

- [1] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000. 186 - 194.
- [2] Aigner J, Tegeler J. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 42:172 - 181.
- [3] Lindenhayn K, Perka C, Spitzer R, et al. Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for in vitro cartilage engineering[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44:149 - 155.
- [4] Stark GB, Horch RE, Voigt M, et al. Cultured keratinocytes grafting on various biologic matrices[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 1998, 19:1 - 7.
- [5] Risbud MV, Karamuk E, Moser R, et al. Hydrogel-coated textile scaffolds as three-dimensional growth support for human umbilical vein endothelial cells (HUVECs): Possibilities as co-culture system in liver tissue engineering[J]. Cell Transplantation, 2002, 11(4): 369 - 377.
- [6] Yoshida M, Babensee JE. Poly(lactic-co-glycolic acid) moderately enhances maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells[J]. J Lab Clin Med, in preparation.

(收稿日期:2005-06-09)