

组织工程心脏瓣膜生物反应器的改建及初步应用

侯广杰,徐志云*,黄盛东,龚德军(第二军医大学长海医院胸心外科,上海 200433)

[摘要] **目的:**对自主研制脉动生物反应器加以改进,使其脉动流场能够体外模拟高流量高压力的在体瓣膜环境,并对整体构建的组织工程心脏瓣膜(TEHV)进行流场内培养的初步研究。**方法:**采用韩国产双囊搏动泵(T-PLS)作为新脉动流场的动力装置,并设计了新的气液交换通路以减少污染。以脱细胞猪主动脉瓣为支架,人的骨髓间质干细胞(BMSCs)为种子细胞整体构建 TEHV。静态培养 4 d 后,置于生物反应器内分别在小流量(0~600 ml/min)和大流量(0~4 800 ml/min)脉动流场培养 7 d,观察细胞残留情况。**结果:**流场改进后流量范围从 0~1 200 ml/min 提高到 0~6 000 ml/min,系统内压力范围从 0~40 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)提高到 0~180 mmHg。TEHV 在低流量脉动流场内有部分细胞存留(26.3%),而在大流量流场中细胞几无存留。**结论:**新的生物反应器能够基本模拟在体瓣膜的流体动力学环境,能够应用于 TEHV 的体外培育研究,但目前构建的 TEHV 尚不能耐受大流量流体的冲击。

[关键词] 组织工程;心脏瓣膜,人工;生物反应器

[中图分类号] R 654.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0013-03

Modification of bioreactor for tissue-engineered heart valve and its application

HOU Guang-jie, XU Zhi-yun*, HUANG Sheng-dong, GONG De-jun (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To modify the pulsatile bioreactor we constructed previously for simulating the high-flow, high-pressure hemodynamics of heart valve *in vivo*, and to experimentally cultivate the tissue-engineered heart valves (TEHV) in the modified bioreactor. **Methods:** T-PLS system (NewheartBio Co., Ltd Korea) was used to generate pulsatile flow in the modified bioreactor and we designed a new air-exchange pathway to avoid contamination. The TEHV were made by seeding human bone mesenchymal stem cells (BMSCs) on de-cellularized porcine heart valve. After cultured under static condition for 4 d, the TEHVs were moved to the modified bioreactor and exposed to low-flow (0-600 ml/min) or high-flow(0-4 800 ml/min) pulsatile hydrodynamics for 7d, then the cells on TEHVs were evaluated. **Results:** After modification, the flow range expanded from (0-1 200) ml/min to (0-6 000) ml/min and the pressure range expanded from (0-40) mmHg to (0-180) mmHg. In culture experiments, 26.3% of the seeded cells remained under low-flow environment and cells were completely lost under the high-flow dynamics. **Conclusion:** The modified bioreactor can basically simulate the dynamics of heart valve *in vivo* and can be used in TEHV cultivation research. However, the current TEHV can not tolerate the high-flow pulsatile hydrodynamics.

[KEY WORDS] tissue engineering; heart valve prosthesis; bioreactors

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(1):13-15]

用于组织工程心脏瓣膜(tissue engineering heart valve,TEHV)培养的生物反应器(bioreactor)是体外培育 TEHV 的人工装置,它能够产生脉动流场(pulsatile flow),模拟瓣膜在体的血流动力学环境,对于 TEHV 的构建研究具有重要的意义。已有的研究表明,在生物反应器流体的脉动应力作用下可以影响细胞的形态,促进种子细胞外基质的分泌及细胞生长与增殖^[1-2],使之具有更好的机械稳定性。

目前,国内对生物反应器的研制还处于初期阶段,已有的生物反应器流场性能远远不能达到模拟在体流体动力学环境的要求。本实验是在我实验室已构建的生物反应器^[3-4]的基础上,针对其流场动力不足和气液交换通路设计不完善造成的生物反应器流量小、污染率较高的问题加以改进,从而构建新一

代的生物反应器,使之能够模拟在体血流动力学环境,为今后研究 TEHV 的构建和应用研究提供支持。

1 材料和方法

1.1 脉动生物反应器的改建 新构建的生物反应器流场动力系统由双囊搏动泵(Twin-Pulse Life Support,T-PLS,NewheartBio Co., Ltd Korea)搏动泵与其配套的管道构成,以替代原系统中动力不足

[基金项目] 全军医药科研“十五”规划重点课题(01Z060). Supported by Key Medical Program of the 10th Five-Year Plan of PLA(01Z060).
[作者简介] 侯广杰,博士生,主治医师, E-mail:guangjiehou@hotmail.com
* Corresponding author. E-mail:zhiyunx@hotmail.com

管道内液体经过变温管通过热交换迅速达到并稳定在细胞培养所需温度,之后连接的瓣膜室内可安装不同直径的瓣膜支架,构建的组织工程瓣膜可以固定在瓣膜支架上并密封在瓣膜室。以往用于气液交换的具有开放瓶口的储液瓶被摒弃,代之以换气室的设计,换气室具有和细胞培养瓶相同的瓶口设计,能在有效进行气液交换的同时防止污染。改建的生物反应器系统完全安装示意图见图 1。

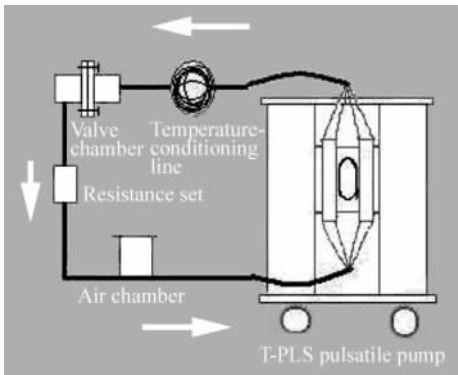


图 1 改建的生物反应器整体构成图
Fig 1 Components of modified bioreactor
The arrows indicate the direction of circulation

1.2 流场性能检测 将环氧乙烷灭菌的系统组件完全安装,并预充细胞培养液,启动 T-PLS 搏动泵并连续运行 7 d,观察系统的稳定性及完整性,并取培养液进行营养琼脂培养基涂板试验 48 h 和霉菌琼脂培养基涂板试验 72 h,分别检测是否有细菌和真菌生长。将系统管道侧孔连接生物多信号分析仪,调整搏动流量及阻力参数,通过多信号分析系统绘制系统的流量压力曲线。

1.3 生物反应器内流场下构建 TEHV

1.3.1 静态三维构建组织工程瓣 按照既往研究的脱细胞方法^[5]将猪主动脉瓣膜脱细胞获得瓣膜支架,取向内皮细胞诱导培养的人骨髓间质干细胞^[6]按照 1×10^6 /次种植在瓣膜支架上,连续种植 2 次,间隔 24 h,再静态下培养 2 d,共计 4 d。然后转入生物反应器。

1.3.2 生物反应器对 TEHV 的培养 将静态下构建的组织工程心脏瓣膜转入生物反应器的瓣膜室。分别脉动流场低流量(流量从 0~600 ml/min 缓慢递增)和高流量(0~4 800 ml/min)连续培养 7 d。然后剪取 3 个瓣叶观察瓣叶上细胞生长状态,具体方法见参考文献^[3]。同时进行扫描电镜观察。

2 结果

2.1 生物反应器的性能检测 系统预充后连续运行 7 d,机械性能稳定,系统组件及管路之间连接紧密,无渗漏发生。7 d 后培养液澄清,细菌真菌培养阴性。血流动力学检测发现搏动泵产生类似人体动脉波型的双峰状搏动波,流量在 0~6 000 ml/min,压力在 0~180 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。

2.2 脉动流场培养对构建的 TEHV 的影响 静态培养的组织工程瓣膜瓣叶 SEM 下可见瓣叶表面形成连续细胞层,但细胞欠均匀。细胞与支架黏附不紧密,部分细胞与瓣膜支架分离(图 2A)。在脉动低流量流场中培养的 TEHV,瓣膜种植面有部分裸露,但仍有部分细胞残留,约为静态培养瓣膜的 26.3%,残留细胞均匀分布与瓣膜贴合紧密(图 2B,图 3A)。高流量组瓣叶细胞基本消失(图 2C,图 3B)。

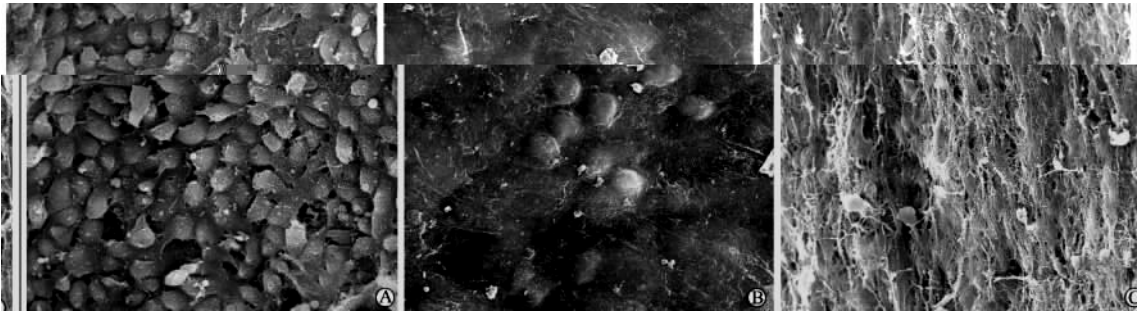


图 2 电镜下静态(A)、低流量脉动流场(B)和高流量脉动流场(C)内培养的 TEHV
Fig 2 TEHV under static(A), low(B), and high(C) pulsatile flow conditions($\times 1\,000$)

3 讨论

生物反应器除了提供组织细胞生长必需的营养物质,以及温度、pH 值等,还必须能够模拟心脏瓣膜的在体血流动力学环境,以促进细胞的黏附增殖和对

瓣膜支架的改建,实现 TEHV 体外培养向体内移植的顺利过渡。生物反应器的流场对于构建 TEHV 具有重要作用^[1,7],因此生物反应器的研制成为 TEHV 研究的一项重要内容,国外某些实验室已经构建了一些性能先进的生物反应器,如 Hildebrand 等^[8]

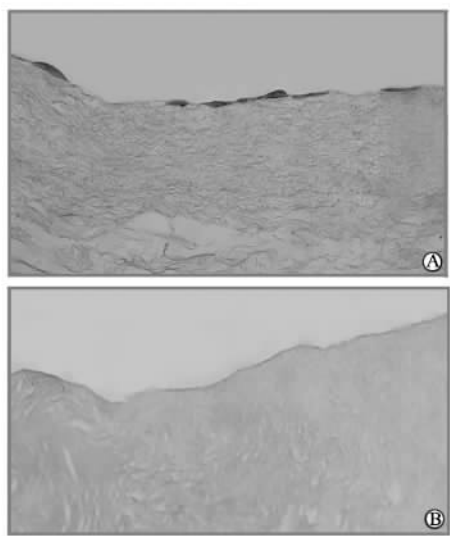


图 3 光镜下低流量(A)和高流量脉动流场(B)内培养的 TEHV

Fig 3 TEHV under low-flow(A) and high-flow(B) pulsatile hydrodynamics(H-E, ×100)

研制的生物反应器能够模拟流量 0~6 L/min、压力 15~180 mmHg 范围内的脉动流场,能够基本模拟在体瓣膜的流体动力学指标。而国内这方面的研究还比较落后,TEHV 多在静态下构建^[9],已研制的生物反应器流场的指标也很落后。本实验室在既往的研究^[3-4]中曾初步构建了用于 TEHV 培养的脉动生物反应器。它们均以简易呼吸机为动力源,能够产生流量 0~1 200 ml/min,压力 0~40 mmHg 范围内的脉动流场。随着对组织工程瓣的研究深入,需要设计新的生物反应器以满足模拟人体流场环境的要求。

在新的生物反应器的设计中,我们首先对原系统流场动力不足的缺点加以改进,采用 T-PLS 系统作为脉动流场的动力源。T-PLS 搏动泵是韩国 NewheartBio 公司生产的用于心脏外科手术体外循环和循环辅助的装置^[10],能够产生 0~6 000 ml/min 的流量。T-PLS 系统通过微电脑控制的电机带动摆动锤左右横摆挤压两个带囊管道,产生类似于动脉波的搏动流。通过它的控制面板可以实现对搏动次数、流量的精确控制,模拟流量 0~6 L/min,压力 0~180 mmHg 范围内的脉动流场,基本满足了模拟瓣膜在体流场环境的要求,从而为今后整体构建 TEHV 打下基础。国内新近的研究还有阜外医院设计的生物反应器^[11],但其具体数据未见公布,它采用的动力装置是恒流转子泵。

我们在流场内培育 TEHV 的实验中观察到,脉动流培养之前,TEHV 瓣叶可基本为细胞覆盖,在

低流量脉动流场内培养 7 d 后,细胞残留约 26.3%,而在高流量脉动流场冲击下,细胞基本无存留。我们推测可能是多种原因的综合作用造成这种现象。首先,细胞自身黏附力不足,用于构建 TEHV 还不能耐受高流量高压力的流场环境,这可能是由于细胞分泌黏附蛋白不足和(或)瓣膜支架亲和力的原因造成。其次,生物反应器内缺乏体内环境存在的生长因子和适宜刺激,细胞不能有效增殖生长。第三,细胞黏附力的增加不足以抵抗流量的增加,因此脉动流场参数调整的时机及范围仍需要进一步的研究。我们希望在未来的研究中,通过基因工程技术加强种子细胞黏附力,对脱细胞瓣膜进行改性及通过对流场参数调整等手段,使细胞黏附的问题逐步得到解决。

综上所述,我们认为改建的新的系统在流场的指标方面大大超过了以往,可以满足体外短期对细胞组织培养及检验的要求。但该系统仍然存在一些有待改进的地方,如系统体积较大、阻力装置还不能做到精确调控等,因此还有必要对目前的生物反应器做进一步的改进。

[参考文献]

[1] Stock U A, Vacanti J P, Mayer J E, et al. Tissue engineering of heart valves-current aspects [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 50: 184-193.

[2] Hoerstrup S P, Kadner A, Melnitchouk S, et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells [J]. Circulation, 2002, 106(suppl I): 143-150.

[3] 王晓伟, 徐志云, 张宝仁, 等. 组织工程心脏瓣膜体外脉动反应器的初步研制 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24: 1140-1142.

[4] 邢建洲, 张宝仁, 徐志云, 等. 新一代组织工程心脏瓣膜体外预适应脉动仪的研制 [J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 972-974.

[5] 姚祖武, 梅 举, 黄盛东, 等. 人骨髓间充质干细胞体外应力培养构建组织工程心脏瓣膜 [J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 376-380.

[6] 杨立信, 徐志云, 黄盛东, 等. 骨髓诱导分化内皮细胞构建组织工程心脏瓣膜的实验研究 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2006, 22: 49-50.

[7] Mol A, Bouten C V C, Zund G, et al. The relevance of large strains in functional tissue engineering of heart valves [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 51: 78-83.

[8] Hildebrand D K, Wu Z J, Mayer J E Jr, et al. Design and hydrodynamic evaluation of a novel pulsatile bioreactor for biologically active heart valves [J]. Ann Biomed, 2004, 32: 1039-1049.

[9] 康 凯, 谭 震, 蒋树林, 等. 体外构建组织工程心脏瓣膜动物实验初步研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39: 240-243.

[10] Rho Y R, Choi H, Lee J C, et al. Applications of the pulsatile flow versatile ECLS: *in vivo* studies [J]. Int J Artif Organs, 2003, 26: 428-435.

[11] 冯 滨, 刘迎龙, 晏明全, 等. 体外构建的同种生物组织工程瓣脉动流培养的实验研究 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2006, 22: 35-37.