

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00124

• 专题报道 •

TGF-β₁ 调控组织工程瓣膜力学性能机制研究

洪 昊,董念国*,史嘉玮

华中科技大学同济医学院附属协和医院心血管外科,武汉 430022

[摘要] **目的:**采用转化生长因子(TGF-β₁)联合肌成纤维细胞构建组织工程心脏瓣膜(TEHV),探讨 TGF-β₁ 能否改善 TEHV 的力学性能及其可能机制。**方法:**分离培养大鼠肌成纤维细胞,细胞鉴定后种植于去细胞瓣叶支架上。将瓣叶置于含 10 ng/ml TGF-β₁ 的培养液中,培养 14 d 构建的 TEHV 做为实验组,对照组除培养液中不添加 TGF-β₁ 外,其余同实验组。检测两组 TEHV 的赖氨酰氧化酶(LOX)和羟脯氨酸含量,LOX 和 I 型胶原(COLL-1) mRNA 表达,以及力学性能。**结果:**实验组 TEHV 的 LOX 和羟脯氨酸含量均高于对照组($P < 0.05$),LOX 和 COLL-1 mRNA 表达均高于对照组($P < 0.05$),最大负荷、最大应力均高于对照组($P < 0.05$),而两组的最大应变和弹性模量的差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**在体外构建 TEHV 过程中,通过 TGF-β₁ 对肌成纤维细胞的调控作用,可以在基因水平增强细胞 COLL-1 和 LOX mRNA 的表达,使得胶原蛋白合成和交联程度增加,从而使 TEHV 的力学强度增加,力学性能得到改善。

[关键词] 转化生长因子 β₁; 组织工程;心脏瓣膜;赖氨酰氧化酶;胶原;力学性能

[中图分类号] R 654.27 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0124-04

Regulatory mechanism of transforming growth factor-beta 1 on mechanical properties of tissue engineered heart valve

HONG Hao,DONG Nian-guo*,SHI Jia-wei

Department of Cardiovascular Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe whether transforming growth factor-beta 1 (TGF-β₁) can improve the mechanical properties of tissue engineered heart valve (TEHV) prepared by TGF-β₁ and myofibroblasts. **Methods:** Myofibroblasts were isolated, cultured, identified, and seeded onto the decellularized aortic valve leaflet. In the experimental group, TEHV were cultured with DMEM containing 10 ng/ml TGF-β₁ for 14 days. In the control group, TEHV were cultured with DMEM only for 14 days. The contents of lysyl oxidase (LOX) and hydroxyproline, the expression of LOX and COLL-1 mRNA, and the mechanical properties of the TEHVs were analyzed in each group. **Results:** The contents of LOX and hydroxyproline, expression of LOX and COLL-1 mRNA, Max-load, and Max-stress were significantly higher in the experimental group than those in the control group (all $P < 0.05$). However, the experimental and control group showed comparable values of Max-strain and elastic modulus. **Conclusion:** TGF-β₁ can increase expression of LOX and COLL-1 mRNA in the seeded cells during TEHV construction, increasing the production and cross-linking of collagen, and improve the mechanical properties of the TEHV.

[KEY WORDS] transforming growth factor-beta 1; tissue engineering; heart valve; lysyl oxidase; collagen; mechanical properties

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2):124-127]

组织工程心脏瓣膜(tissue engineered heart valve, TEHV)是具有自我更新和修复能力的理想人工心脏瓣膜替代物,同时也是瓣膜外科研究的热点^[1]。理想的 TEHV 应具备良好的力学性能,而 TEHV 的力学性能主要由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中胶原成分恰当的含量、胶原分子内

和分子间适中的交联等因素决定^[2]。去细胞瓣膜支架被认为是一种较理想的 TEHV 支架,但已有实验证实去细胞瓣膜支架构建的 TEHV 力学性能欠佳,而种子细胞合成的 ECM 不足是其中的重要原因之一^[3]。转化生长因子 β₁ (transforming growth factor-beta 1, TGF-β₁) 是一类具有高活性和多种功能

[收稿日期] 2008-09-22 **[接受日期]** 2008-11-18

[基金项目] 国家自然科学基金(30571839,30600608)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30571839,30600608)。

[作者简介] 洪 昊, 博士生。E-mail: HH09ronaldo@yhaoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:027-85351609, E-mail:dongnianguo@hotmail.com

的生长因子,能促进细胞的迁移、分化和 ECM 合成^[4]。本实验采用 TGF- β_1 联合肌成纤维细胞构建 TEHV,探讨 TGF- β_1 能否改善 TEHV 的力学性能及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 6~8 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 150~200 g(华中科技大学同济医学院实验动物中心,清洁级);猪心 6 个、牛主动脉 6 根(武汉市肉联厂);无血清和酚酞的 DMEM、高糖 DMEM、胎牛血清(Gibco 公司);TGF- β_1 、Triton X-100、胰蛋白酶、EDTA、核糖核酸酶 I (RNase I)、脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)、II 型辣根过氧化物酶、1,5-diaminopentane、 β -氨基丙腈(β -aminopropionitrile-fumarate, BAPN)均购自 Sigma 公司;鼠抗人 α -SMA、Vimentin(Pharminogen 公司);逆转录反应试剂盒、PCR 试剂盒(Fermentas 公司);Amplex red、TRIzol™ Reagent(Invitrogen 公司);DEPC、无水乙醇、氯仿、异丙醇、琼脂糖、Tris 碱、冰乙酸、溴化乙啶、载样缓冲液、DNA marker、尿素、四硼酸钠(凌飞公司);羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所提供);970CRT 荧光分光光度仪(上海华岩仪器设备有限公司);基因扩增仪(PCR 仪),Power Pac 300 电泳仪(Bio-Rad);Polai 一次性成像系统(华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室)。

1.2 大鼠主动脉肌成纤维细胞的分离和扩增 无菌条件下取大鼠胸主动脉,剥离主动脉血管内层,保留中层和外层,采用组织块培养法,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中体外培养,培养液为高糖 DMEM(含 15% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml),5~7 d 成纤维细胞和平滑肌细胞移行于瓶底,2~3 周两种细胞融合形成单层的肌成纤维细胞。待细胞密度达到 90% 进行传代培养,取第 2 代细胞行细胞鉴定,第 3 代以后细胞用于瓣叶种植。

1.3 去细胞瓣叶支架的制备^[5] 应用胰蛋白酶+EDTA、Triton X-100 和 RNase I + DNase I 等处理猪主动脉瓣叶,制备去细胞瓣叶支架。

1.4 TEHV 的构建和分组 将去细胞瓣叶支架放入 12 孔板中(每孔 1 片),收集培养至第 3 代的细胞悬液 100 μ l(密度 5×10^6 个/ml)接种到去细胞瓣叶支架上,孵化 1 h,将瓣叶翻转,以同样方式再次接种,然后加入含 10 ng/ml TGF- β_1 的高糖 DMEM 培养液(含 15% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素

100 U/ml) 5 ml,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中连续培养 14 d,每日换液,第 15 日用无血清和酚酞的 DMEM 培养 24 h,作为实验组。对照组除培养液中不添加 TGF- β_1 外,其余同实验组。

1.5 细胞免疫化学检测 收集培养至第 2 代的细胞接种于预先放入玻片的 6 孔板中,贴壁 1 h 后加入培养液,次日取出玻片,PBS 冲洗 2 次,1:1(V/V) 无水乙醇和丙酮固定 15 min,并按常规细胞免疫化学方法加入鼠抗人 α -SMA 及 Vimentin 抗体,观察染色结果。

1.6 TEHV 生化检测

1.6.1 TEHV 中赖氨酰氧化酶含量检测 参见文献^[6]方法绘制赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)标准曲线,然后通过检测 TEHV 培养液中 LOX 的浓度,反映种植于瓣叶上的细胞所产生的 LOX 的量。收集两组 TEHV($n=4$)第 15 日的无酚酞培养液 700 μ l,加入荧光试剂(1.2 mol 尿素,0.05 mol 四硼酸钠,1 U/ml II 型辣根过氧化物酶,10 μ mol Amplex red,10 mmol 1,5-diaminopentane),组成总体积为 2 ml 的溶液,并分为各 1 ml 的 2 等份,其中 1 份溶液记为 D 组,对应的另 1 等份溶液中加入 500 μ mol BAPN 记为 E 组,然后将 D、E 两组溶液均放入 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 30 min 后置冰上,立即用荧光分光光度仪以激发波长 563 nm 和发射波长 587 nm 检测其荧光值。用 D 组溶液的荧光值减去 E 组中对应溶液的荧光值,然后根据标准曲线计算出相应的浓度值,即为两组 TEHV 中 LOX 的浓度值。

1.6.2 TEHV 中羟脯氨酸含量检测^[7] 取出 2 组 TEHV($n=4$)弃培养液后按羟脯氨酸试剂盒说明操作检测羟脯氨酸含量。

1.7 RT-PCR 检测 按 TRIzol™ 试剂盒说明书分别提取两组 TEHV($n=4$)的总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 浓度和纯度,要求 $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$ 在 1.8 以上。然后分别取 4 μ g 各组 TEHV 中的总 RNA 逆转录成 cDNA,再用 PCR 仪扩增目的基因。目的基因上下游引物序列分别为:LOX 5'-GCA CCA TTT CAC CGT ATT-3' 和 5'-AAC CCA TCA TCA TTG TCT CA-3',产物长度 421 bp,退火温度 49℃,共进行 36 个循环;I 型胶原(COLL-1)5'-CCT GGA AGA GAT GGT GCT-3' 和 5'-CCA TTC TTG CCA GCA GGA C-3',产物长度 122 bp,退火

温度 52℃,共进行 35 个循环;内参基因(β -actin)5'-TGC TTC TAG GCG GAC TGT TA-3'和 5'-CGT CAC ATG GCA TCT CAC GA-3',产物长度 314 bp,退火温度 57℃,共进行 34 个循环。取终产物 5 μ l,行琼脂糖凝胶电泳,采用 Polai 一次性成像系统快速照相。计算机软件(Bandscan5.0)分析目的基因和内参基因灰度值之比,即为目的基因相对含量。

1.8 力学测试^[8] 取出两组 TEHV($n=4$),沿长轴方向剪成 1.5 cm \times 0.5 cm 矩形条块,将其夹持在自制的两片细砂纸做成的框架中。带瓣叶条块的砂纸框架两边夹于力学测试仪,夹持间距为 8 mm。剪断两边的砂纸,夹子以 5 mm/min 速率进行将瓣叶向两边拉伸,记录最大负荷、最大应力、最大应变和弹性模量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞免疫化学检测 细胞免疫化学染色显示细胞经传代后 α -SMA 和 Vimentin 染色增色均为阳性(图 1)。

2.2 TEHV生化检测 LOX 标准曲线方程为 $y=655.9x-35.114$, $R^2=0.9901$ 。实验组 LOX 含量高于对照组[(0.135 \pm 0.002) vs (0.127 \pm 0.002) μ g/ml, $P<0.05$],羟脯氨酸含量也高于对照组[(8.30 \pm 0.18) vs (6.00 \pm 0.11) μ g/mg, $P<0.05$]。

2.3 RT-PCR检测 RT-PCR检测产物凝胶电泳

图见图 2,灰度值结果表明,实验组 LOX 和 COLL-1 mRNA 表达[(2.02 \pm 0.10)和(1.49 \pm 0.04)]均高于对照组[(1.58 \pm 0.06)和(1.20 \pm 0.06), $P<0.05$]。

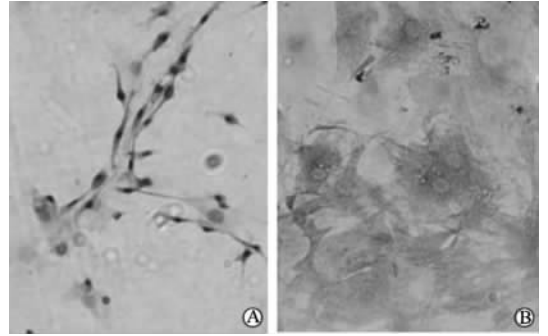


图 1 细胞免疫化学检测

Fig 1 Immunocytochemistry of myofibroblasts

A: α -SMA;B:Vimentin staining. Original magnification: $\times 200$

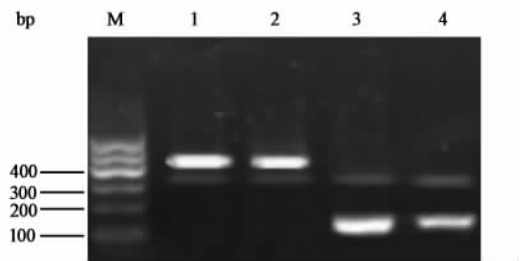


图 2 RT-PCR 检测两组 TEHV LOX 和 COLL-1 mRNA 产物的凝胶电泳图

Fig 2 RT-PCR analysis of LOX and COLL-1 mRNA expression of TEHV in each group

M;Marker;1:LOX in the experimental group;2:LOX in the control group;3:COLL-1 in the experimental group;4:COLL-1 in the control group

2.4 力学测试 力学测试结果显示实验组 TEHV 的最大负荷和最大应力高于对照组($P<0.05$)。两组在最大应变和弹性模量上的差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

表 1 TEHV力学性能测试结果

Tab 1 Mechanical properties of TEHV

($n=4, \bar{x}\pm s$)

Group	Max-load F/N	Max-stress ($\times 10^6$) p/Pa	Max-strain/%	Elastic modulus $\times 10^6$ p/Pa
Experimental	9.90 \pm 0.31*	2.14 \pm 0.09*	37.53 \pm 1.51	9.28 \pm 0.13
Control	7.83 \pm 0.65	1.78 \pm 0.07	38.49 \pm 0.97	9.10 \pm 0.90

* $P<0.05$ vs control group

3 讨论

力学性能是 TEHV 的重要特征。胶原蛋白是 ECM 的主要成分,其含量及交联度在很大程度上决

定了 TEHV 的力学性能^[9-10]。I 型胶原在瓣膜胶原蛋白中含量最多,而羟脯氨酸是 I 型胶原中的主要氨基酸组成,在 I 型胶原中含量相对恒定,故本实验通过检测肌成纤维细胞的 COLL-1 mRNA 表达和

ECM中的羟脯氨酸含量间接反映ECM中胶原蛋白的含量。LOX是胶原合成后三、四级结构分子内及分子间交联的关键酶,能使赖氨酸和羟赖氨酸脱氨生成醛赖氨酸与羟醛赖氨酸,后两者残基氧化后发生醛醇缩合及醛胺缩合,可导致邻近链交联形成稳定的胶原纤维,此过程赋予胶原适宜的强度与弹性,对于维持力学性能具有重要价值,故本实验通过检测LOX mRNA表达和LOX含量间接反映ECM中胶原蛋白的交联程度。

去细胞瓣膜支架具有优良的仿生性和组织相容性等优点,是一种很有临床应用前景的支架。但以往实验发现去细胞瓣膜支架构建的TEHV,由于种子细胞合成的ECM不足等原因,导致瓣膜承受力下降,力学强度不足,使TEHV无法达到正常瓣膜的力学性能要求^[3]。因此对其力学性能进行有针对性的改善十分必要。TGF- β_1 是一类高活性、多功能生长因子,具有促进细胞迁移和增殖,以及使ECM合成增加等作用^[4]。采用TGF- β_1 改善TEHV的力学性能可能比其他生长因子更有针对性。

本研究发现实验组TEHV的LOX和COLL-1 mRNA表达高于对照组,这说明TGF- β_1 可以使TEHV中肌成纤维细胞的LOX和COLL-1基因表达增强。而TGF- β_1 在基因水平对肌成纤维细胞的这种作用,导致相应蛋白质的合成增加,故实验组TEHV的LOX和羟脯氨酸含量均高于对照组。LOX含量增加说明胶原蛋白的交联程度增加,而羟脯氨酸含量增加说明胶原蛋白的含量增加。从宏观上分析,两者共同导致了TEHV的最大负荷和最大应力增加,因而实验组力学强度高于对照组,TEHV的力学性能得以改善。

综上所述,在体外构建TEHV过程中,通过TGF- β_1 对肌成纤维细胞的调控作用,可以改善TEHV的力学性能,而其可能的机制为:TGF- β_1 在基因水平增强COLL-1和LOX mRNA的表达,从而导致胶原蛋白合成和交联程度增加,最终引起

TEHV的力学强度增加,因而力学性能改善。但TGF- β_1 对TEHV力学性能的改善作用,在延长体外培养时间或将TEHV植入体内后的效果如何,有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Knight R L, Wilcox H E, Korossis S A, Fisher J, Ingham E. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves[J]. Proc Inst Mech Eng[H], 2008, 222:129-143.
- [2] Schoen J F. New frontiers in the pathology and therapy of heart valve disease;2006 Society for Cardiovascular Pathology, Distinguished Achievement Award Lecture, United States Canadian Academy of Pathology, Atlanta, GA, February 12, 2006[J]. Cardiovasc Pathol, 2006, 15:271-279.
- [3] Hopkins R A. Tissue engineering of heart valves: decellularized valve scaffolds[J]. Circulation, 2005, 111:2712-2714.
- [4] Narine K, De Wever O, Van Valckenborgh D, Francois K, Bracke M, DeSmet S, et al. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering[J]. Tissue Eng, 2006, 12: 2707-2716.
- [5] 董念国,叶晓峰,史嘉玮,宋 强,孙宗全. 组织工程瓣膜天然支架去细胞方法的比较[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22: 377.
- [6] 洪 昊,董念国,史嘉玮. Amplex Red 荧光法检测组织工程瓣膜赖氨酰氧化酶活性[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2007, 14:27-30.
- [7] 史嘉玮,董念国,孙宗全,仇玉明. RGD 肽联合转化生长因子- β_1 对组织工程瓣膜构建的影响[J]. 中华医学杂志, 2006, 86:2074-2077.
- [8] 韩 啸,蒋雄刚,徐 鹏,张凯伦,杨华静. 聚乙二醇和胰蛋白酶用于猪动脉管道去细胞效果比较[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2007, 36:442-444 .
- [9] Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Döring C, Halhuber K J, Schirmermeister F, et al. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an *in vitro* study[J]. Cardiovasc Res, 2003, 60:497-509.
- [10] Lau Y K, Gobin A M, West J L. Overexpression of lysyl oxidase to increase matrix crosslinking and improve tissue strength in dermal wound healing[J]. Ann Biomed Eng, 2006, 34: 1239-1246.

[本文编辑] 尹 茶