

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00369

CD34 抗体修饰的脱细胞血管支架的体内内皮化

张蔓菁¹, 刘 宾², 杨 阳², 李 杨², 鲁开化^{2*}

1. 昆明医学院第二附属医院整形外科, 昆明 650031
2. 第四军医大学西京医院整形外科, 全军整形外科研究所, 西安 710032

[摘要] **目的** 研究 CD34 抗体修饰的脱细胞血管支架植入动物体内后募集循环中的内皮祖细胞参与再内皮化过程的性能。**方法** 新鲜的羊前肢动脉经反复冻融和超高压处理, SDS 彻底去除细胞, 通过光交联法将 CD34 抗体固定于脱细胞血管腔内腔面。20 只新西兰大白兔右下腹做一带蒂皮瓣, 皮瓣供血动脉为股动脉的分支血管, 血管移植部位选取股动脉, 做 1 cm 长的全段缺损, 随机分为 2 组 ($n=10$), 实验组选用 CD34 抗体修饰的脱细胞血管支架, 对照组用未修饰的脱细胞血管支架, 显微外科端吻合替代缺损的兔股动脉。术后通过对皮瓣色泽质地的观察, 了解皮瓣的血供情况; 行彩色多普勒、数字减影血管造影检查和病理切片观察移植血管的通畅情况及细胞黏附情况。**结果** 实验组皮瓣术后血运较好, 对照组皮瓣术后肿胀坏死。彩色多普勒、数字减影血管造影检查显示, 实验组移植术后 1 周有 3 只动物发生血管闭塞, 另 7 只动物在术后 4 周血管仍通畅、无明显狭窄; 对照组术后 1 周无 1 只动物血管通畅。实验组术后 4 周解剖移植血管, H-E 染色显示脱细胞血管支架表面形成连续融合单层细胞, 管腔无明显狭窄; 对照组术后 1 周解剖移植血管可见血栓形成, H-E 染色显示血管腔内表面缺乏细胞覆盖。**结论** CD34 抗体修饰的脱细胞血管支架在早期抗凝及通畅率上均优于未经修饰的脱细胞血管支架。

[关键词] 脱细胞血管支架; CD34 抗体; 交联试剂; 血管内皮

[中图分类号] R 622.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0369-05

In vivo recellularization of decellularized vascular scaffolds cross-linked with anti-CD34 antibody

ZHANG Man-jing¹, LIU Bin², YANG Yang², LI Yang², LU Kai-hua^{2*}

1. Division of Plastic Surgery, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan, China
2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Institute of Plastic Surgery of PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the role of decellularized vascular scaffolds coated with anti-CD34 antibodies in capturing endothelial progenitor cells from the circulation to participate in recellularization. **Methods** Fresh caprine forelimb arteries were treated with repeated frozen/thawing, ultrahigh pressure and SDS to prepare decellularized vascular scaffolds. After reaction with photochemical crosslinker SANPAH, anti-rabbit CD34 was coated onto the decellularized vascular scaffolds using ultraviolet ray. Twenty New Zealand white rabbits were performed for right lower-abdominal pedicled skin flap, which were supplied by branches of femoral artery. Whole defects (1 cm) were made in femoral arteries and end-to-end anastomosis repaired by 10 cross-linked and 10 non-cross-linked scaffolds in experimental group and control group, respectively. The patency of the pedicle was observed through color and appearance of the flap postoperatively. After transplantation, patency rate and cell seeding were detected by Doppler, DSA, and pathological test. **Results** Flaps of the experimental group had good blood supply after transplantation, while swelling and necrosis could be found in the control group. Doppler and DSA showed that the 7 of 10 cross-linked scaffolds remained patent for 4 weeks and there was no stenosis, but all the scaffolds were obstructed in the control group after 1 week. Hematoxylin and eosin staining revealed that the inner layers of cross-linked scaffolds were partly covered with endothelial cells four weeks later, and there was no noticeable stenosis. In contrast, thrombosis formation was noticed in the control group and there was no cell coverage one week after operation. **Conclusion** Cross-linked scaffolds with anti-CD34 antibodies are superior to bare scaffolds in early postoperative anticoagulation and patency.

[Key words] decellularized vascular scaffolds; anti-CD34 antibodies; cross-link reagents; vascular endothelium

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4):369-373]

[收稿日期] 2009-12-21 **[接受日期]** 2010-03-01

[作者简介] 张蔓菁, 博士生, 主治医师. E-mail: 180zj@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 029-84775306, E-mail: lukaihua@fmmu.edu.cn

组织工程血管构建过程步骤繁多,包括干细胞体外诱导分化内皮细胞、血管支架构建、在生物反应器中复合内皮细胞、移植体内,任何环节出现问题都会导致失败,而且构建过程所需时间长,不适于临床应用和产品化^[1]。研究认为,支架材料内皮化对植入早期防止血栓形成起关键作用^[2]。目前内皮化的研究大多数局限在体外,但干细胞体外诱导分化后移植体内可能引起的病理改变依然不得而知,如细胞因为结合欠牢固,是否会被血流冲走;细胞本身的营养供应是否足够其分裂增殖等。机体本身就是一个生物反应器,于是我们设想能否把体外内皮化放到体内,设计具有自动黏附能力的血管支架,使内皮化在体内自行完成,这样就把组织工程血管体外构建的过程简化,时间缩短。本实验拟通过共价交联的方法,以化学交联剂 SANPAH 为介导,用 CD34 抗体表面修饰脱细胞血管支架,研究 CD34 抗体修饰的脱细胞血管支架材料植入动物体内后募集循环中的内皮祖细胞参与再内皮化过程的可能,以期简化组织工程血管体外构建的过程,找到一种更接近现实应用的组织工程血管。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器 十二烷基硫酸钠(SDS, Sigma, 美国); SANPAH(Thermo Scientific, 美国); 内皮细胞培养基(Sciencell, 美国); L-929 成纤维细胞(第四军医大学口腔医院组织工程中心); 新西兰大白兔(第四军医大学动物实验中心); FITC 标记的兔抗兔 CD34 抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 超高压生物处理器(HPP-L2, HTSM Co. Ltd, 天津华泰森公司); 荧光显微镜(Nikon55i, 日本); 普通倒置显微镜(Olympus, IX70, 日本); 光学显微照相系统(Olympus, PMeeCBAD, 日本); 超低温冰箱(NUAIRE, 日本); HH-S 恒温水浴锅(江苏医疗仪器厂); 真空冷冻干燥机(LGJ-10C, 上海); 扫描电镜(Hitachi Model S-3400N, 日本); BB16 型 CO₂ 培养箱(HERAEUS 公司, 上海); Philips 彩超 HD3(Philips); 血管造影系统(Siemens AXIOM Artis TA, 德国)。

1.2 血管材料的准备 选取西安近郊屠宰场新鲜屠宰的成年山羊前肢动脉 20 根,置于 4℃ 含青霉素和链霉素各 180 mg/L 的无菌 PBS 液中,热缺血时间不超过 15 min。无菌 PBS 液冲洗数次去除血液杂质,锐性去除附属结缔组织和脂肪成分以及大部分血管外膜。截取长度为 15 mm、无明显分支、内径约 2 mm 的动脉作为实验材料。

1.3 脱细胞处理步骤

1.3.1 反复冻融 将采集的血管材料分别置于 4℃ 预冷、-80℃ 冷冻 2 h、37℃ 水浴复温 15 min,上述冻融过程反复进行 3 次。

1.3.2 超高压处理 将血管以无菌 D-Hank 液反复冲洗干净后,密封入特制塑料袋中,袋中浸满 D-Hank 液。将塑料袋置入超高压机器中,5 000 atm(约 506 MPa)、4℃ 条件下处理 20 min,处理结束后无菌条件下将内层特制塑料袋中的血管取出。

1.3.3 化学方法脱细胞处理 将经反复冻融和超高压处理的血管在 0.125% SDS 中 37℃ 振摇(100 次/min)12 h,在大容器中使用 PBS 缓冲液振摇漂洗 48 h,彻底去除残留的 SDS,即得到脱细胞血管支架。

1.3.4 脱细胞血管支架的冻干及消毒 将脱细胞血管支架在 -80℃ 低温冰箱中速冻 24 h,再置入 -70℃、 6.67×10^{-4} kPa 的干燥冷冻机内 6 h 作冷冻干燥处理。用包装袋密闭分装后,⁶⁰Co 辐照消毒。

1.3.5 脱细胞血管支架的评价 经 H-E 染色、Masson 三染色及扫描电镜对脱细胞的效果进行评价,通过接触细胞毒性实验及皮下埋植毒性实验,对制备的脱细胞血管基质进行生物相容性分析。

1.4 制备 CD34 抗体表面修饰的脱细胞血管支架

1.4.1 制备 CD34 抗体和 SANPAH 反应液 用 4% NaOH 滴定无水乙醇,调整 pH 值到 7.9,在避光下配制 0.133 mmol/L SANPAH 溶液;按 CD34 抗体和 SANPAH 反应摩尔比为 1:20 加入抗体溶液中,室温避光混合反应 2 h,10 000 × g 离心 10 min 去除未反应的抗体和 SANPAH。

1.4.2 验证光交联效果 将制备脱细胞血管剪成 0.8 cm × 0.5 cm 大小片状,放置在 6 孔板内,注意血管内腔面与外壁面,滴 100 μl 的上述离心剩液,用波长为 365 nm 的 300 W 紫外灯预热 10 min,置于 6 孔板上 10 cm,照射 5 min;在 6 孔板中加入蒸馏水,在恒温振荡器中漂洗 6 h(振荡频率 100 次/min),彻底漂洗未结合的抗兔 CD34 抗体。将血管片进行快速冰冻切片,厚度为 5 μm,将 FITC 标记的羊抗兔 IgG 分别滴加在血管切片上,荧光显微镜下观察、照相,验证用光交联方法将 CD34 抗体固定于脱细胞血管内腔面的可行性。

1.4.3 制备 CD34 抗体修饰的血管支架 证明抗体通过光交联的方法可以牢固结合在脱细胞血管支架上后,将血管支架用手术丝线固定一端,翻转内壁,滴加 CD34 抗体和 SANPAH 反应液,同样方法紫外灯照射,恒温振荡器漂洗后再次翻转备用,整个过程无菌操作完成。

1.5 移植 新西兰大白兔 20 只,雌雄不限,体质量 2.02.5 kg,随机分为对照组和实验组,每组 10 只。

全部动物经 1%戊巴比妥 25 mg/kg 兔耳缘静脉注射麻醉,在右下腹做一带蒂皮瓣,皮瓣供血动脉为股动脉的分支血管,血管移植部位选取股动脉,做 1 cm 长的全段缺损。实验组选用 CD34 抗体修饰的脱细胞血管支架,对照组用未经处理的脱细胞血管支架,管径尽量匹配,9-0 丝线进行显微外科端端吻合替代缺损的兔股动脉,术毕原位缝合皮瓣。术后常规饲养,庆大霉素 8 万 U 肌注,1 次/d,连续 5 d;肝素钠 50 U/kg,1 次/12 h,连续 3 d;阿司匹林 75 mg/d、辛伐他汀 10 mg/(kg·d)至实验结束。通过对皮瓣色泽质地的观察,了解皮瓣的血供情况,间接反映吻合血管的通畅性。4 周后行彩色多普勒超声、数字减影血管造影检查和病理切片观察移植血管的通畅情况及细胞黏附情况。

2 结果

2.1 脱细胞血管支架的评价 血管经多步处理后,不同染色,光镜及电镜下观察(图 1A-1E),血管细胞已完全去除。接触细胞毒性实验可见细胞在脱细胞血管支架上生长良好(图 1F);皮下埋植实验见 2 周时炎性细胞浸润程度减轻(图 1G),4 周仅见少量炎性细胞(图 1H),说明脱细胞血管支架在动物体内无排斥,经过脱细胞处理后的血管材料具有较好的生物相容性和较低的细胞毒性。

2.2 光交联效果验证 图 2A 为交联抗体的荧光显像,图 2B 为脱细胞血管的明场成像,图 2C 为两张照片的叠加,可以看到抗体牢固交联在脱细胞血管支架内腔壁上。

2.3 皮瓣观察 实验组皮瓣术后血运较好,主要表现为颜色正常,皮温正常,无明显肿胀,质地松软(图 3A);2 周后缝线自行脱落(图 3B);3 周皮瓣与周围再建血运(图 3C);4 周皮瓣瘢痕愈合(图 3D)。对照组皮瓣术后肿胀,1 周呈现暗红色改变,皮温低,无弹性(图 3E);2 周呈紫黄色坏死的表现,无张力(图 3F);3 周后由于周围血供的重新建立,部分坏死皮瓣转归(图 3G);4 周皮瓣颜色、皮温恢复正常,无明显肿胀,质地松软,周围瘢痕愈合(图 3H)。

2.4 移植血管通畅情况 移植术后每周行彩色多普勒超声检查,移植术后 4 周,行数字减影血管造影检查,实验组术后 1 周有 3 只动物发生移植血管闭塞,另 7 只直到术后 4 周移植血管仍通畅,血管管腔无明显狭窄(图 4A、4B),通畅率为 70%;术后 4 周处死动物,解剖移植血管,病理切片行 H-E 染色,显示脱细胞血管支架表面形成连续融合单层细胞,管腔无明显狭窄(图 4C)。对照组术后 1 周行彩色多普勒、数字减影血管造影检查无一例通畅(图 4D、

4E),解剖移植血管可见血栓形成,H-E 染色显示血管腔内表面缺乏细胞覆盖(图 4F)。

3 讨论

脱细胞血管支架材料是将同种异体或异种血管经过特殊处理将具有免疫原性的实质细胞去除,保留相对完整的细胞外骨架结构,具有良好的组织相容性和促细胞生长能力,是目前组织工程血管研究较为理想的支架材料。我们通过物理化学方法结合对羊的前肢动脉进行脱细胞处理,对处理后的血管进行组织形态学观察,评价脱细胞的效果,通过接触细胞毒性实验及皮下埋植毒性实验,对制备的脱细胞血管支架进行生物相容性分析,实验结果证明,血管细胞被彻底清除,但保留了原有的生物力学性能,无细胞毒性,有良好的生物相容性,为构建组织工程血管找到了一种理想的支架材料。

将某些生物活性分子固定在高分子或生物源性材料的表面,修饰其结构特征,提高材料的生物相容性和细胞亲和力,为种子细胞黏附、增殖、扩展和分化提供良好界面,促进细胞外基质(ECM)产生,设计能够引导特定细胞行为的功能性生物材料将是未来组织工程领域的一个热点。早期的材料促内皮化的研究是在材料表面涂覆促细胞黏附蛋白,如纤维连结蛋白(fibronectin)、胶原蛋白(conagen)和层粘连蛋白(laminin)^[3],但是应用蛋白有很多问题,首先必须从组织和器官中分离和纯化蛋白,其次是它有免疫原性,而且在体内易分解,引起局部甚至是全身的反应^[4]。以上问题可以被功能性短肽克服,短肽容易合成,而且比较稳定,如 RGD(Arg-Gly-Asp)肽,但 RGD 肽对内皮祖细胞(EPCs)的吸附不具有特异性。

1997 年,Asahara 等^[5]发现外周血液中存在 EPCs,循环血液中的 EPCs 的数量、性质与内皮细胞修复密切相关。EPCs 能相对特异的表达 CD34 阳性表面抗原^[5]。我们研究的思路来源于 CD34 抗体包被支架预防动脉支架再狭窄的研究。支架术后再狭窄的主要机制是内膜增殖,血管内膜的完整性是维持血管正常功能和结构的重要条件。早期募集 EPCs 能使得内皮快速修复,降低再狭窄的发生率。在支架上涂附 CD34 阳性细胞(EPCs)^[6]或利用抗原-抗体结合原理用 CD34 抗体包被支架^[7],已成为预防支架植入后再狭窄的重要手段并已应用于临床,我们设想是否能用 CD34 抗体修饰脱细胞组织工程血管支架用于体内再内皮化。依据抗原-抗体结合原理,使用 CD34 抗体来与 EPCs 表面抗原结合,通过抗原-抗体反应从而达到选择性的捕捉 EPCs 的目的,促进脱细胞血管支架植入早期的 EPCs 黏附、增殖,防止植入早期血栓形成,可以实现脱细胞血

管支架材料在体内的内皮化,简化组织工程血管的构建过程,让组织工程血管进入临床应用成为可能。

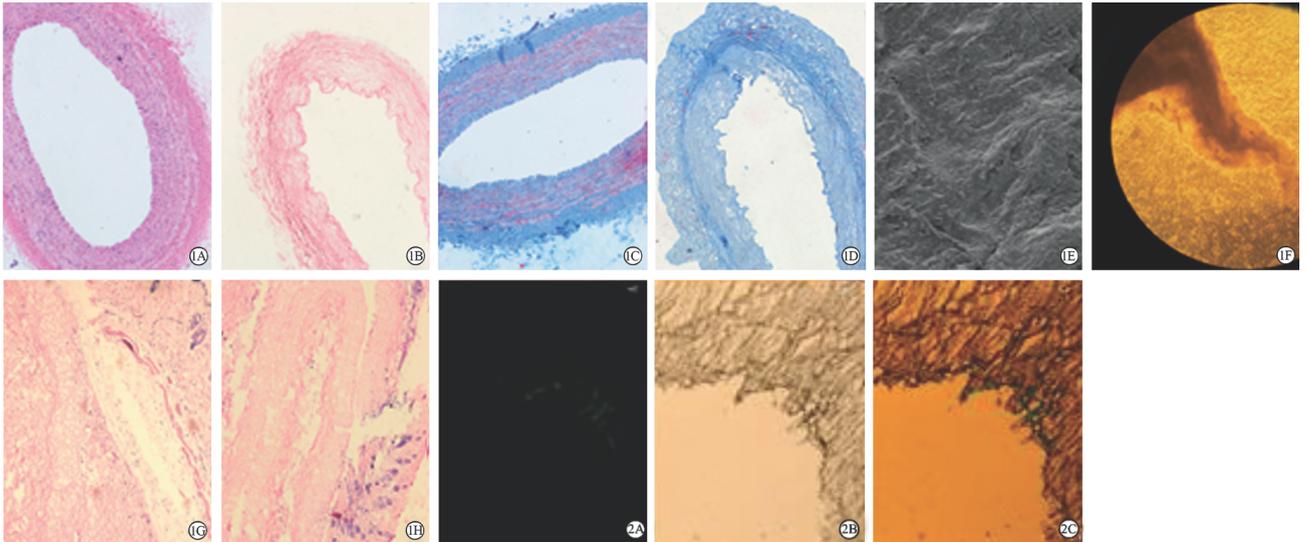


图 1 脱细胞血管支架组织学观察和生物相容性检测

Fig 1 Histological and biocompatibility of decellularized vascular scaffolds

A: Fresh vessel wall(H-E); B: Decellularized vascular scaffolds(H-E); C: Fresh vessel wall(Masson staining); D: Decellularized vascular scaffolds(Masson staining); E: Decellularized vascular scaffolds(SEM); F: Light micrograph of cell adhesion test; G, H: Subcutaneous embedding tests 2 and 4 weeks after transplantation, respectively (H-E). Original magnification: $\times 100$ (A-D, G, H), $\times 200$ (E), $\times 40$ (F)

图 2 交联抗体的荧光显像

Fig 2 Fluorescent imaging of CD34

A: Dark field; B: Bright field; C: Dark field overlay with bright field

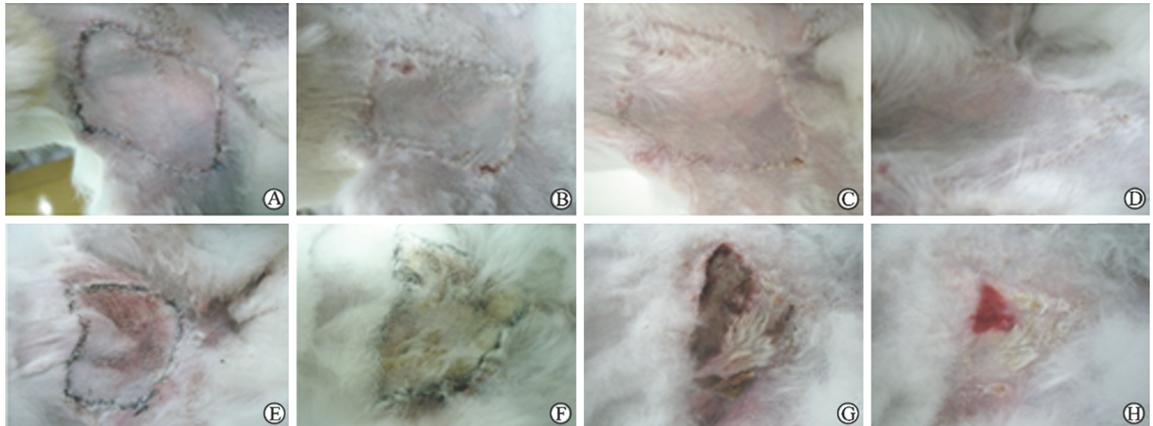


图 3 移植后 14 周两组的皮瓣外观

Fig 3 Appearance of flap 1-4 weeks after transplantation in two groups

A-D: Experimental group(1,2,3, and 4 weeks after transplantation, respectively); E-H: Control group(1,2,3, and 4 weeks after transplantation, respectively)

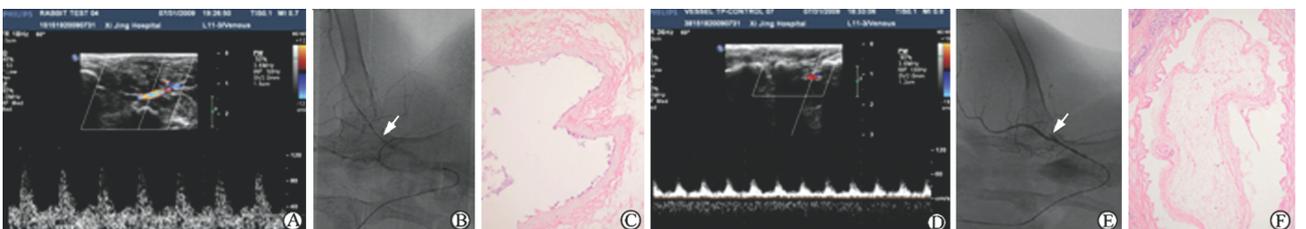


图 4 脱细胞血管支架植入体内的通畅情况

Fig 4 Patency rate after transplantation in two groups

A,D: Doppler; B,E: DSA, arrows showing the anastomotic sites; C,F: Pathological test(H-E, original magnification: $\times 200$). A-C: Experimental group, remained patent for 4 weeks with no stenosis; D-F: Control group, obstructed in 1 week

单纯的物理黏附往往会被血流冲走而起不到生理学作用,而共价结合是解决此问题最佳办法。光化学技术固定蛋白质是利用化学不稳定性物质,在紫外线辐射时被激活、可结合目标分子的特性,将蛋白质共价结合到材料表面。SANPAH 是一种异源双功能交联剂,它可以在紫外线照射下,将其一端含有 N-羧琥珀酰亚胺基团(NHS)与 CD34 抗体的氨基反应,将 CD34 抗体结合到 SANPAH 上^[8]。本研究发现:以化学交联剂 SANPAH 为介导,可将 CD34 抗体牢固交联在血管内腔壁上。

我们通过兔右下腹皮瓣色泽质地的观察来间接了解供血血管的通畅性,皮瓣与周围组织建立血运的时间约为 3 周,早期血管通畅性对皮瓣成活非常重要,实验组中的皮瓣术后血运较好,颜色、皮温正常,无明显肿胀,质地松软,行彩色多普勒和数字减影血管造影检查也证实术后移植血管通畅,而对照组皮瓣术后肿胀,皮温低,无弹性,暗红色改变继而呈紫黄色坏死表现,行彩色多普勒和数字减影血管造影检查证实术后 1 周移植血管已堵塞,3 周后因为周围血供重新建立,坏死皮瓣转归。说明经交联后脱细胞血管支架对比未经交联的脱细胞血管支架无论在早期抗凝及通畅率上均有优势。我们的动物模型在术后都给予辛伐他汀,Dimmeler 等^[9]认为他汀类药物能够动员骨髓中的 EPCs 进外周血循环。病理学检查实验组中脱细胞血管支架表面形成连续融合单层细胞,推测交联 CD34 抗体的血管支架植入兔体内可能募集了受体外周血循环中的 EPCs,局部转换成内皮细胞。当然移植血管内表面形成细胞衬里的途径除了募集了循环中的干细胞外,还有可能部分是宿主血管内皮细胞从吻合口向移植血管的迁移,但对照组术后移植血管血栓形成,血管腔内表面缺乏细胞覆盖,说明依靠宿主血管内皮细胞从吻合口向移植血管的迁移不足以防止早期血栓形成。

Rotmans 等^[10]用 CD34 抗体修饰 ePTFE 材料,植入猪颈动脉颈内静脉间,植入后 3 d 取材,已有内皮细胞覆盖材料表面,未经修饰的 ePTFE 材料植入后无内皮细胞黏附,证实 CD34 抗体 72 h 内可黏附 EPCs 快速内皮化。Avci-Adali 等^[11]提出在材料上交联包括 RGD 多肽、CD34 抗体、磁性分子及适配体,植入体内以募集循环中的 EPCs,简化组织工

程血管体外构建的过程,缩短时间,减少风险,降低费用,为我们展示了更多组织工程血管构建的新策略。

[参考文献]

- [1] Zhang W J, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel[J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11: 945-957.
- [2] Borschel G H, Huang Y C, Calve S, Arruda E M, Lynch J B, Dow D E, et al. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts[J]. *Tissue Eng*, 2005, 11: 778-786.
- [3] Thomson G J, Vohra R K, Carr M H, Walker M G. Adult human endothelial cell seeding using expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts: a comparison of four substrates[J]. *Surgery*, 1991, 109: 20-27.
- [4] Schmidt D R, Kao W J. The interrelated role of fibronectin and interleukin-1 in biomaterial-modulated macrophage function[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 371-382.
- [5] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275: 964-967.
- [6] Szmitko P E, Kutryk M J, Stewart D J, Strauss M H, Verma S. Endothelial progenitor cell-coated stents under scrutiny[J]. *Can J Cardiol*, 2006, 22: 1117-1119.
- [7] Aoki J, Serruys P W, van Beusekom H, Ong A T, McFadden E P, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING - FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1574-1579.
- [8] 赵向东. 去细胞光氧化牛颈静脉血管片内膜光化学接枝 CD34 抗体的制备及初步评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12: 319-322.
- [9] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 391-397.
- [10] Rotmans J I, Heyligers J M, Verhagen H J, Velema E, Nagtegaal M M, de Kleijn D P, et al. *In vivo* cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts[J]. *Circulation*, 2005, 112: 12-18.
- [11] Avci-Adali M, Paul A, Ziemer G, Wendel H P. New strategies for *in vivo* tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials[J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3936-3945.

[本文编辑] 孙岩