

组织工程血管的体内实验动物模型

张佳玲 付 炜 殷 猛

【摘要】 在组织工程血管向临床转化的过程中,进行体内实验是关键,选择合适的动物模型尤为重要。筛选动物模型通常以血管直径的匹配度为主要参考因素,此外还受物种差异、移植部位、促凝性等多种因素的影响。该文介绍近几年血管移植动物模型在组织工程血管领域中的应用。

【关键词】 组织工程血管;体内实验;动物模型

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.02.012

虽然已有许多生物材料以及高分子材料应用于组织工程血管的重建,但是仍然没有一种“完美”的移植材料可以广泛应用。特别是在小口径人工血管(直径 <6 mm)的重建和再生过程中,发生血栓、感染等并发症的概率也在上升^[1]。近年来,多学科交叉研究促进了小口径人工血管的发展,但是其临床转化和应用仍然是一个挑战^[2]。通过动物实验模拟人体内环境,对移植血管进行合理而准确的评估,是组织工程血管向临床转化过程中必不可少的一步,选择合适的动物模型至关重要。

1 动物模型的筛选标准

理想的血管移植动物模型需要考虑以下几个因素:移植血管直径、植入部位、促凝性、免疫原性以及特定的临床需求^[3]。完全理想的动物模型是不存在的,应针对具体的研究目的,根据不同动物的特性以及移植部位等,选择合适的动物模型。在筛选过程中,除了上述条件外,还需要考虑动物的经济成本、实用性;手术以及术后实验易操作;动物对麻醉和手术的反应和耐受性;动物接受移植部位的自体血管固有直径和流量也要作为筛选标准;实验所用的动物模型移植部位在生理功能方面应接近人体相对应的部位^[2-4]。

2 组织工程血管动物模型的应用

血管直径匹配度是选择动物模型最关键的因素。根据动物自体血管直径大小,可将组织工程血管体内实验常用的动物分为以下几类。

2.1 直径为 0.5~2 mm 的血管

直径为 0.5~2 mm 的小口径血管可应用于周围血管疾病,尤其是动脉系统疾病。由于小口径血管远期通畅率不高,临床应用一直较困难,开发空间较大。

2.1.1 兔 兔的颈动脉和股动脉长直且分支少,适用于直径 1.5~2 mm 组织工程血管的移植。

兔颈动脉是小口径血管移植中最常用的部位。Zheng 等^[5]制备的直径为 2.2 mm,长度为 1.5 cm 的小口径人工血管,经多肽修饰后植入到新西兰大白兔颈动脉中段,于术后 2 周和 4 周时分别行数字减影血管造影术(DSA)观察人工血管在体内的通畅性。结果显示,经多肽修饰后的人工血管在通畅率、内皮细胞覆盖率等方面明显优于未经修饰的对照人工血管。

兔股动脉也是建立小口径血管动物模型的常用部位^[6-8],并且逐渐向临床疾病模型转化。Zhu 等^[9]用体外构建的组织工程血管在兔股动脉上建立了外周血管疾病模型,在一定程度上模拟人的冠状动脉(冠脉)慢性完全闭塞病变(CTO),可用于临床疾病的监测、诊断以及治疗。

2.1.2 大鼠 大鼠的颈总动脉和腹主动脉是血管移植中常用的血管模型。尤其是大鼠的腹主动脉较长,易于操作,显影清晰,为后续的影像学监测提供了方便。适用于直径 0.5~1.5 mm 组织工程血管的移植。

Zeng 等^[10]使用 Wistar 大鼠作为受体,将神经生长因子(NGF)偶联后的脱细胞血管植入大鼠右侧颈总动脉,用多普勒超声监测和评估血管通畅情况。基质细胞衍生因子-1 α /肝素涂层的生物可降解人工血管(内径为 1 mm,长度为 6 mm)^[11]和蛋白质

基金项目:国家自然科学基金(81271726),上海交通大学医工交叉基金(YG2012MS35)

作者单位:200127,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心心胸外科(张佳玲,殷 猛);儿科转化医学研究所(付 炜)

通信作者:殷 猛, Email: yinmengmdphd@163.com

表面结合的组织工程血管^[12]均利用 SD 大鼠的颈总动脉为植入位点,研究目的血管的体内过程。

大鼠的腹主动脉也是常用的血管移植部位。将 LacZ 基因转染的肌源性干细胞种植所得的组织工程血管(直径为 1.2 mm,长度为 10 mm),端端吻合于 Lewis 大鼠的腹主动脉,8 周后行血管造影术并作组织学评价,结果显示 LacZ 阳性细胞出现在血管重构形成的平滑肌细胞层中^[13]。转基因动物在组织工程血管体内实验的应用,可以针对性地研究分子水平的机制。

2.1.3 小鼠 小鼠的腹主动脉和下腔静脉是小口径血管较常用的移植部位,适用于直径 0.5~1 mm 组织工程血管的移植。

免疫缺陷类小鼠:Roh 等^[14]将人的骨髓单个核细胞(BMC)种植在高分子材料支架上,制成小口径组织工程血管,在 SCID/bg 小鼠的下腔静脉中段植入,并且进行长达 24 周的实验,组织工程血管在体内的通畅性和形态学则通过各个连续时间点的微型 CT 血管成像来评价。以聚乳酸为材料的内径为 0.5~0.6 mm,长度为 3 mm 的小口径血管植入 SCID/Bg 小鼠的腹主动脉,采用超声波和微型 CT 血管造影作为移植后连续监测的手段^[15]。Nelson 等^[16]也用 SCID/Bg 小鼠的腹主动脉作为目标位点,植入直径约 0.9 mm 的组织工程小动脉,研究其在体内血管新生组织的形成,同样以微型 CT 血管造影来进行连续监测。

活体分子成像技术也被应用在组织工程血管在体内监测领域中,将荧光蛋白标记的种子细胞和支架组装而成的小口径组织工程血管(内径约 1 mm)植入裸鼠颈动脉中段,然后用活体分子成像技术进行分子水平的追踪,监测结果与最后的组织学评价一致^[17]。这种无创监测方法不仅可以观察到组织工程血管在体内的动态重构过程,还可以研究种子细胞的动态和走向,但是活体分子成像技术不能完全穿透整个支架壁,不能观察移植植物在体内是否通畅。

小型动物来源广泛,不仅手术操作简单,而且经济实用,样本量可以很大,统计结果可信度较高。但是小动物与人类差异太大,模拟人体疾病以及免疫反应的相似度不高,只能用于近期实验观察。

2.2 直径为 3~5 mm 的血管

直径为 3~5 mm 的小口径血管临床需求大,是组织工程血管领域研究和开发的重点。

2.2.1 犬 犬的心血管生理机能与人相似,且血管通路相对简单,犬在实验外科的应用历史悠久,但是它在促凝血方面有较强的个体差异性,是犬在血管移植应用中的缺陷^[4]。犬作为血管移植模型,有多个部位可供选择,以满足不同的血管口径需求。

在血管组织工程体内再生中,动物模型可以提供细胞来源,解决了种子细胞的排异反应及免疫反应。将犬的隐静脉酶消化而来的细胞,与脱细胞支架在体外培养一段时间后回植入细胞捐赠犬的颈动脉,术后 6 个月通畅率良好,组织学及免疫组化分析显示血管结构和细胞密度接近天然血管^[18]。除了生物材料支架,目前天然材料以及高分子材料在组织工程血管支架中的应用也颇为广泛^[19-20]。Zhou 等^[21]用犬外周血中分离出来的生长内皮细胞与高分子材料支架(直径为 3 mm,长度为 4~5 cm)体外培养后,植入供体犬的颈动脉内,并用多普勒超声进行监测,3 个月后实验组的通畅率达 83.3%,免疫荧光鉴定也证实种子细胞参与了体内的血管组织再生。

由于组织工程中的体外培养操作要求高且周期较长,近年来有人提出了体内组织工程的概念^[2],即省略种子细胞体外培养阶段,仅对支架进行抗凝血等修饰,或者将支架与天然生物材料交联。将支架直接植入体内受损伤部位,依靠体内自身细胞的趋化作用以及细胞的迁移进行局部组织重建,实现活体内组织的自身修复和原位再生^[22-23]。

2.2.2 猪 猪的心血管系统从解剖学和生理学方面都接近于人类,尤其是猪的冠脉系统在缺血再灌注和冠脉支架技术实验中的应用极为广泛。由于猪的个体相对较大、生长速度过快、麻醉耐受性差、饲养价格较为昂贵,在 3~5 mm 直径的血管组织工程的体内实验中,猪的应用不及犬和羊。

Niklason 等^[24]以高分子材料聚乳酸作为支架制备的组织工程血管(TEBV),在生物反应器内培养 8 周后植入猪体内,进行 28 d 的体内实验,首次证明了体外构建组织工程血管的可行性。针对人工血管的快速内皮化问题,Lu 等^[25]在猪的颈动脉验证了接枝 CD133 抗体和肝素后的膨体聚四氟乙烯(ePTFE)血管在体内的快速内皮化过程。

然而,相比体内血管的中段植入,血管的端侧吻合旁路移植模型能更好地模拟旁路移植手术,但是血管内膜增生的概率较高,对组织工程血管的评价更为严格。Quint 等^[26]在此模型上建立了一个

“现成”的组织工程血管,他们用供体猪的平滑肌细胞和生物可降解材料制备的支架在仿生灌流装置中进行体外培养,在此过程中生物材料降解,而平滑肌细胞产生细胞外基质。将得到的血管进行脱细胞处理,最终得到由细胞外基质组成的“现成”血管支架,再与受体猪的内皮细胞及内皮祖细胞联合培养,制备成组织工程血管。将此血管植入受体猪颈动脉行端侧吻合旁路移植,结果显示 30 d 后通畅率为 100%,无明显内膜增生。该实验证实了同种异体细胞产生的结缔组织在组织工程血管体内实验中的有效性。

2.2.3 羊 羊的凝血系统更接近于人类,但其血液处于相对高凝状态^[4]。羊颈动脉移植在直径 3~5 mm 组织工程血管体内试验中的应用较广泛。Koch 等^[27]将羊颈动脉作为移植部位,对种植有其自身细胞的复合支架分别进行了短期以及中长期评价。另外,动物模型也可以对组织工程血管中的新型材料进行测试,利用羊颈动脉移植进行新型材料细菌纤维素的评估^[28]。

对血管体内移植后的监测手段也在不断地改进和发展,其中动物模型的贡献也必不可少。为了评价无创成像监测过程中纳米颗粒标记材料的作用,用目的标记物标记的编织支架和种子细胞组装而成的 TEBV 在羊颈部作动静脉分流,进行动态监测,结果证明目的标记物的有效性和安全性^[29]。

羊、猪、犬的颈动脉和股动脉直径为 3~5 mm,与人的外周血管匹配,部位浅显易暴露。此外,这类动物模型价格较为低廉,饲养和术后观察方便。组织工程血管体内移植后血管内腔需要实现快速的内皮化,犬和羊的血管内皮化速度远高于人类^[4],这也是临床前期实验中需要考虑到的因素。

2.3 直径>5 mm 的血管

大口径组织工程血管的临床需求和应用也非常广泛,如用在慢性肾病患者血液透析的动静脉短路血管以及外周血管疾病的血管旁路治疗。直径 6~10 mm 的人工血管可应用于四肢动脉及颈部动脉的人工血管转流术。

2.3.1 狒狒及非人灵长类动物 狒狒等灵长类动物能很好地模拟人类,成为组织工程血管在临床前实验中最为准确的评估模型,在基础研究向临床转化的过程中作用重大,但是动物获取来源困难、价格昂贵。

灵长类动物全身多个部位都可用于血管的体

内实验。Clowes 等^[30]在狒狒的颈动脉和髂动脉植入长度为 7~9 cm 的膨体聚四氟乙烯(ePTFE)人工血管,12 个月后 60% 的血管已经达到完全内皮化。

狒狒的血管动静脉短路模型具有操作简便、长度可控等优点,在组织工程血管试验中广泛应用。Jordan 等^[31]用新型材料涂层的 ePTFE 人工血管造成狒狒的动静脉短路,以观察机体对新型材料的凝血活性反应。前文中提到的“现成”的组织工程血管,在狒狒动静脉短路模型上(直径为 6 mm)也得到了证实^[18]。利用狒狒上臂腋动脉和远端肱静脉的短路模型,发现此类血管移植后内膜增生减轻的机制在于血流动力学改变轻微以及炎症反应较弱^[32]。

2.3.2 犬 犬的胸主动脉以及腹主动脉在早期就用于大口径血管(直径为 6~8 mm)的置换研究。为了评价体内组织工程血管,前人建立了胸主动脉和腹主动脉旁路^[33-34]。1996 年,Marois 等^[35]用直径 8 mm,长度为 30 cm 的白蛋白涂层人工血管在犬的胸主动脉和腹主动脉建立旁路,研究血管表面血栓形成以及治疗效果。也有实验利用犬的主要动静脉以构建大口径血管^[22,36]。Isayama 等^[23]用生物可降解材料制备直径 8 mm 的无细胞血管支架,在犬的下腔静脉证实了组织工程血管的原位再生。

大型动物心血管系统的解剖和生理更接近人类,一般用于中长期的移植研究。

3 小结

随着组织工程血管的不断发展以及迫切的临床需求,血管由体外培养和制备向体内实验的转化成为趋势。0.5~2 mm 的小口径血管的抗凝作用和快速内皮化是研究难点和重点,小型动物模型可提供多样本、短期的体内实验观察;直径 3~5 mm 的血管在冠脉搭桥术等手术中应用广泛,羊、猪、犬的全身多部位都可用于体内实验;较大的动物模型在模拟人体反应方面更好,可用于临床前预实验。

由于组织工程血管的免疫原性,免疫缺陷动物模型更适宜体内实验,但是目前应用较多的免疫缺陷动物只限于裸鼠、Beige 小鼠以及 SCID 小鼠等小型动物。近年有学者用基因重组和体细胞克隆技术,培育出 T 细胞和 NK 细胞缺陷的免疫缺陷小型猪模型^[37];Song 等^[38]利用转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs),将家兔负责 T 细胞和 B 细胞重

排的重组激活基因(RAG)敲除,获得了世界上首例免疫缺陷家兔模型。这些免疫缺陷大动物模型的应用将会推动组织工程血管的发展。

参 考 文 献

- [1] Benrashid E, McCoy CC, Youngwirth LM, et al. Tissue engineered vascular grafts: Origins, development, and current strategies for clinical application [J]. *Methods*, 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2015.07.014
- [2] Thomas LV, Lekshmi V, Nair PD. Tissue engineered vascular grafts—preclinical aspects [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4):1091-1100.
- [3] Swartz DD, Andreadis ST. Animal models for vascular tissue-engineering [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(5): 916-925.
- [4] Byrom MJ, Bannon PG, White GH, et al. Animal models for the assessment of novel vascular conduits [J]. *J Vasc Surg*, 2010, 52(1):176-195.
- [5] Zheng W, Wang Z, Song L, et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(10): 2880-2891.
- [6] Dong QS, Shang HT, Wu W, et al. Prefabrication of axial vascularized tissue engineering coral bone by an arteriovenous loop: a better model [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2012, 32(6):1536-1541.
- [7] Dong QS, Lin C, Shang HT, et al. Modified approach to construct a vascularized coral bone in rabbit using an arteriovenous loop [J]. *J Reconstr Microsurg*, 2010, 26(2): 95-102.
- [8] Wong AH, Waugh JM, Amabile PG, et al. In vivo vascular engineering: directed migration of smooth muscle cells to limit neointima [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(2):189-199.
- [9] Zhu B, Bailey SR, Elliott J, et al. Development of a total atherosclerotic occlusion with cell-mediated calcium deposits in a rabbit femoral artery using tissue-engineering scaffolds [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(3):193-204.
- [10] Zeng W, Yuan W, Li L, et al. The promotion of endothelial progenitor cells recruitment by nerve growth factors in tissue-engineered blood vessels [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1636-1645.
- [11] Yu J, Wang A, Tang Z, et al. The effect of stromal cell-derived factor-1 α /heparin coating of biodegradable vascular grafts on the recruitment of both endothelial and smooth muscle progenitor cells for accelerated regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32):8062-8074.
- [12] Wu Y, Li L, Chen W, et al. Maintaining moderate platelet aggregation and improving metabolism of endothelial progenitor cells increase the patency rate of tissue-engineered blood vessels [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(13-14): 2001-2012.
- [13] Nieponice A, Soletti L, Guan J, et al. In vivo assessment of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable elastomeric scaffold and muscle-derived stem cells in a rat model [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(4):1215-1223.
- [14] Roh JD, Sawh-Martinez R, Brennan MP, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(10): 4669-4674.
- [15] Tara S, Kurobe H, Maxfield MW, et al. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft [J]. *J Vasc Surg*, 2015, 62(3):734-743
- [16] Nelson GN, Mirensky T, Brennan MP, et al. Functional small-diameter human tissue-engineered arterial grafts in an immunodeficient mouse model: preliminary findings [J]. *Arch Surg*, 2008, 143(5):488-494.
- [17] Hjortnaes J, Gottlieb D, Figueiredo JL, et al. Intravital molecular imaging of small-diameter tissue-engineered vascular grafts in mice: a feasibility study [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(4):597-607.
- [18] Dahl SL, Kypson AP, Lawson JH, et al. Readily available tissue-engineered vascular grafts [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(68):68-69.
- [19] Ye L, Wu X, Duan HY, et al. The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of heparin-poly (epsilon-caprolactone) conjugate for vascular tissue engineering scaffolds [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(12): 3251-3258.
- [20] Wang S, Mo XM, Jiang BJ, et al. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8(1):2131-2139.
- [21] Zhou M, Qiao W, Liu Z, et al. Development and in vivo evaluation of small-diameter vascular grafts engineered by outgrowth endothelial cells and electrospun chitosan/poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(1-2):79-91.
- [22] Matsumura G, Isayama N, Matsuda S, et al. Long-term results of cell-free biodegradable scaffolds for in situ tissue engineering of pulmonary artery in a canine model [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(27):6422-6428.
- [23] Isayama N, Matsumura G, Sato H, et al. Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(11):3589-3595.
- [24] Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional arteries grown in vitro [J]. *Science*, 1999, 284(5413):489-493.
- [25] Lu S, Zhang P, Sun X, et al. Synthetic ePTFE grafts coated with an anti-CD133 antibody-functionalized heparin/collagen multilayer with rapid in vivo endothelialization properties [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(15):7360-7369.
- [26] Quint C, Kondo Y, Manson RJ, et al. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(22):9214-9219.
- [27] Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS, et al. Fibrin-poly(lactide)-based tissue-engineered vascular graft in the arterial

- circulation [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(17):4731-4739.
- [28] Scherner M, Reutter S, Klemm D, et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes; proof of concept? [J]. *J Surg Res*, 2014, 189(2):340-347.
- [29] Mertens ME, Koch S, Schuster P, et al. USPIO-labeled textile materials for non-invasive MR imaging of tissue-engineered vascular grafts [J]. *Biomaterials*, 2015, 39(1):155-163.
- [30] Clowes AW, Kirkman TR, Clowes MM. Mechanisms of arterial graft failure. II. Chronic endothelial and smooth muscle cell proliferation in healing polytetrafluoroethylene prostheses [J]. *J Vasc Sur*, 1986, 3(6):877-884.
- [31] Jordan SW, Haller CA, Sallach RE, et al. The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(6):1191-1197.
- [32] Prichard HL, Manson RJ, DiBernardo L, et al. An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hyperplasia [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011, 4(5):674-682.
- [33] Torche D, Guidoin R, Boyer D, et al. An arterial prosthesis from Argentina; the Barone Microvelour arterial graft [J]. *J Biomater Appl*, 1989, 3(3):427-453.
- [34] Guidoin R, Marois Y, Zhang Z, et al. The benefits of fluoropassivation of polyester arterial prostheses as observed in a canine model [J]. *ASAIO J*, 1994, 40(3):M870-879.
- [35] Marois Y, Chakfe N, Guidoin R, et al. An albumin-coated polyester arterial graft; in vivo assessment of biocompatibility and healing characteristics [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(1):3-14.
- [36] Matsumura G, Nitta N, Matsuda S, et al. Long-term results of cell-free biodegradable scaffolds for in situ tissue-engineering vasculature; in a canine inferior vena cava model [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35760.
- [37] Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, et al. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6):753-758.
- [38] Song J, Zhong J, Guo X, et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs [J]. *Cell Res*, 2013, 23(8):1059-1062.

(收稿:2015-10-14 修回:2016-01-04)

(本文编辑:丁媛媛)

• 敬告读者 •

为了更好地服务读者和作者,提高稿件的处理速度和效率,缩短文章发表周期,《国际心血管病杂志》编辑部启用远程采编系统(网址: <http://gjxxgz.paperopen.com>)。进入网站,点击左上侧“作者投稿”栏,登记作者信息,注册成功后即可在线投稿。请作者以实名、常用电子邮箱和移动电话登记,以便于后续与您联系。

本刊编辑部