基于细胞-基质材料受控组装技术的类肝组织构建

刘海霞[①②] 颜永年[①②*] 王小红[①②] 程 捷[①②] 林 峰[①②] 熊 卓[①②] 吴任东[①②]

(清华大学①生命科学与医学研究院, ②机械工程系生物制造中心, 北京 100084. * 联系人, E-mail: dmeyyn@tsinghua.edu.cn)

摘要 使用自主研发的细胞受控组装设备, 采用分层堆积技术, 将肝细胞与壳聚糖-明胶共混材料组装成活的三维结构体, 且形状和细胞密度可自由控制. 成形实验结果显示, 采用合理的工艺参数, 在 0.2 MPa 的挤出压力下, 细胞的存活率可达 90%以上. 体外培养 8 周, 三维结构体形态稳定, 肝细胞增殖明显. 在培养 20 d 时, 三维结构体表现出肝组织特征, 有类肝样组织产生, 可检测到特异性白蛋白和一些代谢产物. 结果显示, 肝细胞可以被直接受控组装成三维活的结构体, 并可进一步发展成类肝组织. 本研究为人工体外重建肝组织另辟蹊径.

关键词 肝细胞 细胞直接受控组装 壳聚糖/明胶 类肝组织 溶胶-凝胶

伴随着肝移植技术成熟, 一方面是活体肝移植在临床上的广泛应用[1], 另一方面是活体肝供体日显不足. 因此, 探寻新的肝供体成为必然. 组织工程技术的发展使一些科研人员着手研究采用肝细胞和生物高分子材料来制备肝生理替代物[2]. 主要方法有: 诱导肝干细胞[3], 种植肝细胞于三维多孔支架, 种植肝细胞、内皮细胞于多分支血管支架[4]等. 尽管通过种植细胞于三维支架的形式可以形成类肝样组织, 但尺寸难以做大[5]. 主要原因是种植在支架表面上的细胞由于营养供给不足其增殖受到限制, 从而难以向较厚支架的内部生长. 此外, 难以实现高密度细胞种植. 有鉴于此, 一些研究者提出, 在成形支架的同时让支架内部含有细胞, 可以提高细胞的三维生长能力[6]. 目前, 细胞基质共混材料直接受控组装技术成为前沿性研究[7].

在实验研究的基础上, 利用自主研制的细胞直接受控组装设备, 可快速有效地构建出类肝组织结构体. 高密度的肝细胞-壳聚糖-明胶溶胶混合物通过由步进电机控制的喷头挤出在一个移动的无菌成形底板上, 分层叠加, 进而形成一个含有活细胞的三维空间结构体, 即一个活的肝组织类似物. 体外培养结果表明, 肝细胞保持正常的形态和增殖, 表现出肝组织特征. 这一技术在体外重建可移植肝组织方面具有重大的科学意义和应用前景.

1 材料与方法

(ⅰ) 肝细胞的提取和培养. 肝细胞由重约 150~200 g的 4~6 周雄性SD鼠(Sprague-Dawley rat, 北京大学医学部动物中心)经改良的Seglen胶原酶灌注法提取[8,9]. 将提取的肝细胞悬浮于含 10%胎牛血清, 5 nmol/L 地塞米松, 20 mmol/L 丙酮酸钠, 0.05 mg/mL 抗坏血酸, 100 U/mL 的青霉素/链霉素, 2 mmol/L 谷氨酸钠的细胞培养液DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma)中.

(ⅱ) 共混材料的制备. 将壳聚糖(Sigma-Aldrich), 脱乙酰度 72%, 平均分子量 600 kD 溶解于 1%的醋酸溶液中, 形成质量体积比为 2%的壳聚糖溶液. 将明胶(天津绿岛, 医用级别)溶解在 pH 7.4 的磷酸缓冲液中形成质量体积比为 18%的明胶溶液. 再将两种溶液以体积比 1∶1 形成 10%的共混液, 记为 CG19, 于 70℃磁力搅拌达到均匀共混后, 调 pH 7.3 后 50℃间歇式灭菌.

(ⅲ) 细胞三维受控组装设备. 通过结合快速成形技术[10,11]和水凝胶固化机理[12], 细胞受控组装技术和设备被研究和开发出来. 采用这一技术可构建出具有自然组织特性(细胞微环境、三维组织、细胞间相互作用)[13]的具有活细胞的三维结构体. 设备包括 5 个单元(图 1), 成形平台单元是一个三坐标系的四轴运动控制系统[14], 材料挤出单元由步进电机驱动, 交联剂喷射单元由高频电磁阀驱动, 另外两个单元是温控的成形室单元和用于材料离散-堆积的软件控制单元.

(ⅳ) 材料堆积机制. 细胞的组装过程由数控代码驱动完成. 成形过程中可调参数主要有成形几何形状模型、三轴扫描速度、电磁阀频率、成形室温度、挤出速度、喷头直径等. 其中, 扫描速度可控在 50

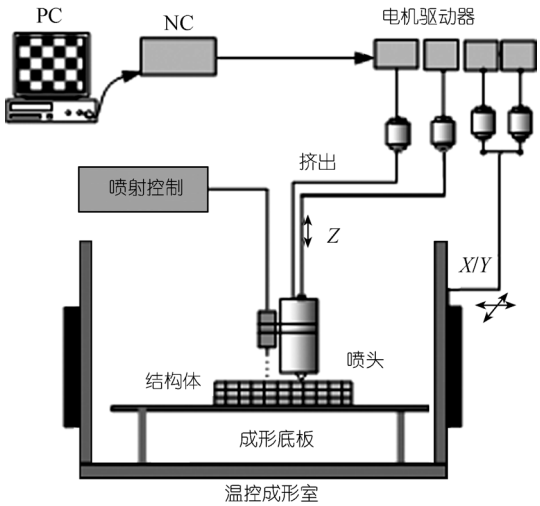


图 1 细胞受控组装设备系统图

μm/s ~ 50 mm/s 范围内, 成形室温度可控在 5~60℃范围内.

将灭菌的 CG19 溶液与肝细胞共混形成浓度为 2×10^8 细胞/mL 的细胞溶液, 装入带有 200 μm 内径喷头的喷腔中, 4℃保温 20 min 实现预凝胶化. 这一凝胶化的共混物按预定义的 CAD 模型(图 2)被沉积到涂敷明胶溶液的成形底板上, 成形底板被固定在 6℃的成形室内. 在扫描速度 0.8 mm/s, 挤出速度 9 μm/s, 层高 350 μm 的成形参数条件下, 约 30 min 后, 一个含有 12 mm×12 mm×4 mm 贯通孔(图 3)的三维结构体以分层叠加的方式形成.

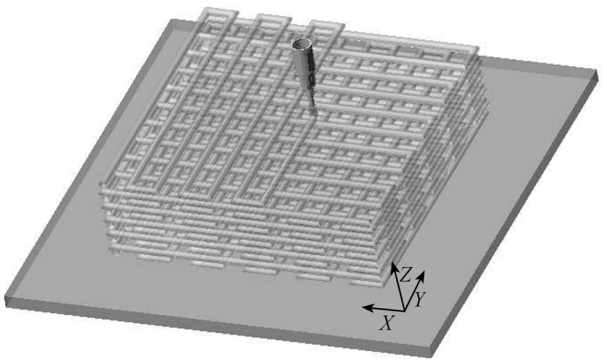


图 2 细胞受控组装过程 CAD 模型

将成形的结构体在无菌的 3%的多聚磷酸钠溶液中浸泡交联 5 min, 然后再置于 0.25%的戊二醛溶液中交联 1 min, PBS 冲洗 3 次. 将经过上述处理的结构体放置于前述的培养液中, 常规培养, 每天换液.

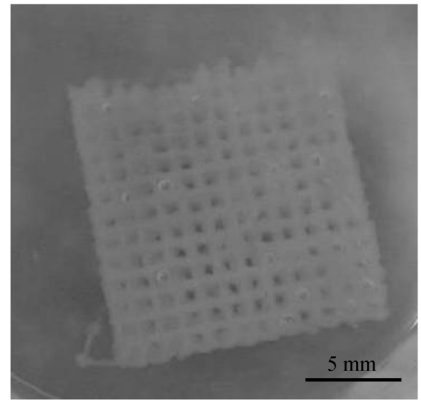


图 3 组装成形后的含有肝细胞的三维结构体

(ⅴ) 细胞存活率测量.

(1) 挤出存活率. 肝细胞共混物于 0.2 MPa挤出压力作用下组装后, 不经过交联, 立即采用CCK-8[15] ((2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium, monosodium salt, Dojindo)测定挤出存活率. CCK-8 能与活细胞中的脱氢酶结合形成一种黄色晶体, 且正比于细胞数量. 具体方法如下: 将成形后的三维结构体(由细胞密度为 2×10^8 细胞/mL 的细胞-CG19 溶液 0.1 mL 成形)溶解于 100 mL 的磷酸缓冲液中形成挤出后的细胞基质溶液, 分别取 100 μL 放置于 96 孔培养板中的 6 孔, 同时将未用于挤出成形的浓度为 2×10^6 细胞/mL 的细胞-CG19 溶液放置于另外的 6 孔中作对照. 然后在每孔中加 10 μL CCK-8, 并将 96 孔板孵育 4 h. 采用酶联免疫法(Molecular Devices, Finland), 测 $A_{450\ nm}$ 值.

(2) 培养期间的增殖检测. 采用前述成形方法构建 7 个肝细胞密度为 2×10^8 细胞/mL 的三维结构体(5 mm×5 mm×3 mm), 常规培养. 在不同的时间 0, 3, 5, 10, 15, 20 及 25 d 内取样, 采用 CCK-8 方法检测细胞增殖.

(ⅵ) 细胞的形态观察. 三维结构体体外培养过程中, 每天采用带有 CCD 的光学相差显微镜(Olympus CK40, 日本)观察. 在不同的时间段, 取样 2 mm × 2 mm × 3 mm, 用磷酸缓冲液冲洗, 4%戊二醛固定, 用 200 μL (50 μg/mL)的 PI (propidium iodide, sigma) 37℃染色 20 min. 最后用激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP2, 德国)观察并记录.

(ⅶ) 荧光免疫检验和组织切片. 采用免疫荧光检测法测定特异性白蛋白的分泌. 将含有肝细胞的结构体冰冻切片后用 4%多聚甲醛固定. 1%羊血清封

闭, 兔抗人(DAKO, Denmark, 1∶100, PBS) 37℃染色 30 min. 磷酸缓冲液冲洗后二抗(IgG, DAKO, Denmark, 1∶20, PBS) 孵育 10 min, PI 复染标记细胞膜. 最后用激光共聚焦显微镜检测.

(viii) 白蛋白及尿素的合成. 每隔 7 d 收集培养液并保存在–20℃, 收集到的培养液采用全自动生化分析仪(Hitachi7600, 日本)检测其中尿素和白蛋白的含量.

2 结果

2.1 形态观察结果

含有肝细胞的三维结构体如图 3 所示, 贯通的孔利于细胞不断地吸收营养和排泄代谢产物. 其中的一些孔道没有像设计的模型一样规则, 主要是由于材料挤出成形的过程中有部分材料融合. 经检测, 细胞挤出后的存活率超过 90%, 凝胶化后的材料弹性模量为 53.01 kPa. 图 4(a)是成形结构体未用戊二醛交联时内部肝细胞的状态. 戊二醛交联后, 三维结构体弹性模量没有明显的变化, 但在大约距离微丝表面 20 μm 的区域内, 大部分细胞死亡, 而内部细胞仍然状态很好. 培养 1 d 后, 结构体内的肝细胞形态与刚挤出成形后变化很明显, 变得大而圆, 甚至能观察到正在分裂的双核细胞. 培养 3 d 后, 肝细胞分裂增殖非常明显, 甚至出现了肝细胞团簇(图 4(b)). 随着培养时间的增加, 肝细胞在整个的三维结构体内部不断地增殖和发育. 在培养的第 6 周后, 结构体内部可以观察到大量细胞相互连接, 甚至有肝小叶样结构体产生(图 4(c)). 图 5 显示了 25 d 的体外培养增殖状况, 在培养的初期阶段, 增殖明显, 随着培养时间的增加, 增殖逐渐平缓.

2.2 免疫组织化学检测结果

为了证实大量白蛋白的分泌以及细胞之间的连接关系, 培养 3 周后, 白蛋白抗原抗体染色结果如图 6 所示. 大量的细胞被正染, 而且, 细胞之间的连接非常的丰富, 细胞与细胞之间以及细胞与自身分泌的细胞外基质材料之间, 像自然肝组织一样紧密地相互连接, 形成了很多类胆管一样的微小结构. 包裹细胞的部分基质材料已被细胞自身分泌的细胞外基质材料取代. 有关胆管及肝小叶样组织的详细鉴定将在以后的研究中给出.

2.3 肝细胞功能检测结果

肝细胞受控组装后的结构体具有与正常肝组织类似的分泌尿素和白蛋白的功能, 而且随着时间的推移呈现递增的规律(图 7), 第 6 周后数值趋于稳定, 并且与相同体积的鼠肝分泌物相当[16], 最高白蛋白和尿素氮合成和分泌量达到 2.5 g/L和 3.2 mmol/L. 这说明结构体在长达 8 周的培养过程中, 其内部肝细胞不仅合成分泌功能表达良好, 而且增殖能力也相当明显. 这进一步说明了构造的三维结构体具有适合鼠肝细胞生长的三维微环境, 整个结构体具有发育成自然肝组织的潜能.

3 讨论

通过细胞三维受控组装技术构建类肝组织的实验, 进一步证实了细胞直接受控组装技术是一种非常有效的构建具有自定义形状、尺寸, 可控细胞密度, 高细胞存活率的具有活细胞的三维结构体成形技术. 在体外 8 周的培养过程中, 肝细胞保持高的活性和增殖能力, 形态和肝功能方面表现稳定. 细胞直接受控

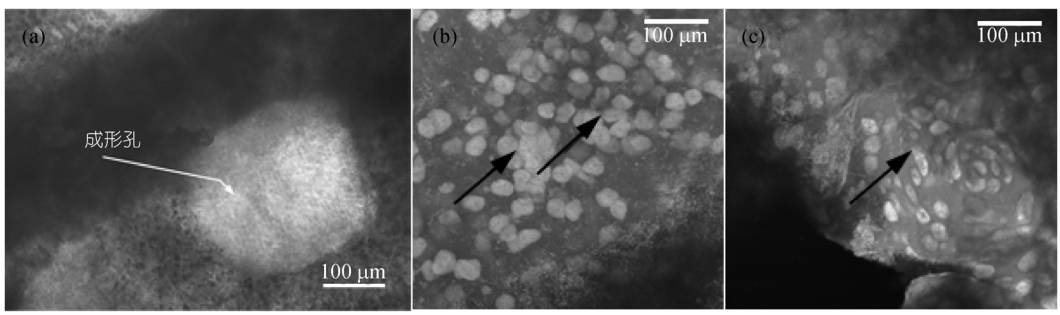


图 4 不同培养时间内三维结构体中肝细胞状态

(a) 未经戊二醛交联的肝细胞三维结构体; (b) 3 d 后, 肝细胞开始分裂增殖并形成团簇; (c) 56 d 后, 肝细胞相互连接并形成类肝小叶样结构

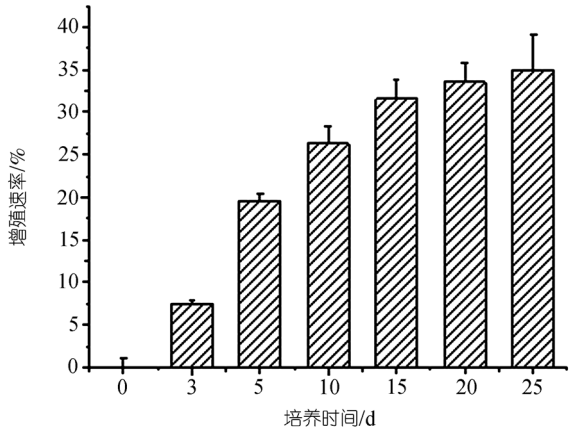


图 5 25 d 体外培养中肝细胞的增殖状况

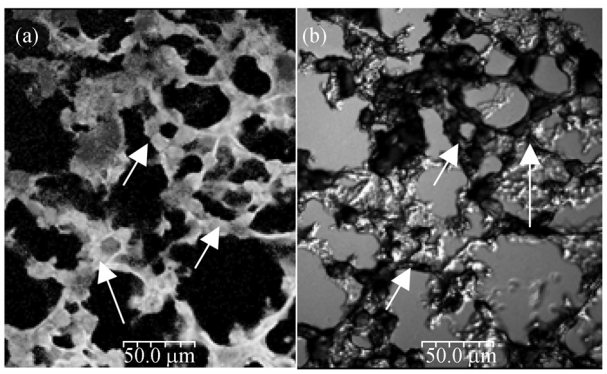


图 6 三维结构体体外培养 3 周后肝细胞的激光共聚焦显微照片

(a) 抗原抗体染色后 PI 复染的照片; (b) 未染色对照. 箭头所示为肝细胞形成的连接

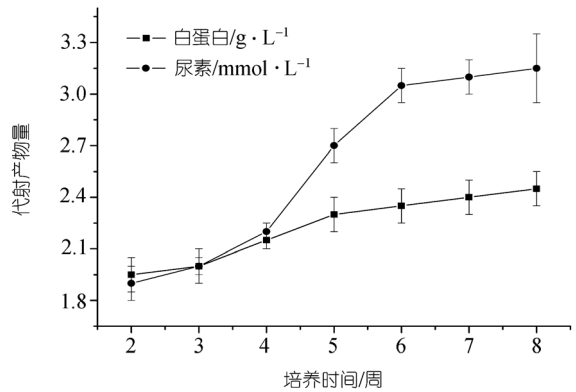


图 7 培养 8 周的结构体(12 mm×12 mm×4 mm)内白蛋白和尿素氮合成量

三样本量取样

组装技术成功的主要原因为: (ⅰ) 由于肝细胞与基质材料弹性模量的明显差异, 在较高压力挤出成形的过程中, 受到应力屏蔽作用影响, 肝细胞可以得到高的细胞挤出存活率. (ⅱ) 具有贯通孔和高扩散率特性的三维结构体可满足细胞新陈代谢及组织形成的需求. (ⅲ) 长期稳定的宏观结构和仿生的微环境有利于细胞与细胞相互作用, 有利于细胞与基质材料相互作用, 从而利于组织自组装的实现. 长期的稳定性对于细胞的生长也是至关重要的. 实验采用戊二醛作为后处理的交联剂, 创建出一个长期稳定的宏观结构(图 8). 尽管在距离表面 20 μm 的区域由于戊二醛的交联有部分细胞死亡(图 9(a)), 但是在后续 30 d 的体外培养过程中, 在原戊二醛交联的区域又出现有大量的肝细胞(图 9(b)). 这一结果进一步说明使用低浓度戊二醛交联后的基质材料没有细胞毒性并具有一定的可降解性. (ⅳ) 明胶-壳聚糖复合材料可以被逐渐酶解, 以提供细胞增殖、迁移和组织形成的空间. 因此, 这一复合材料构建的三维结构体适宜细胞的长期生长, 贯通孔结构提供了大的比表面积

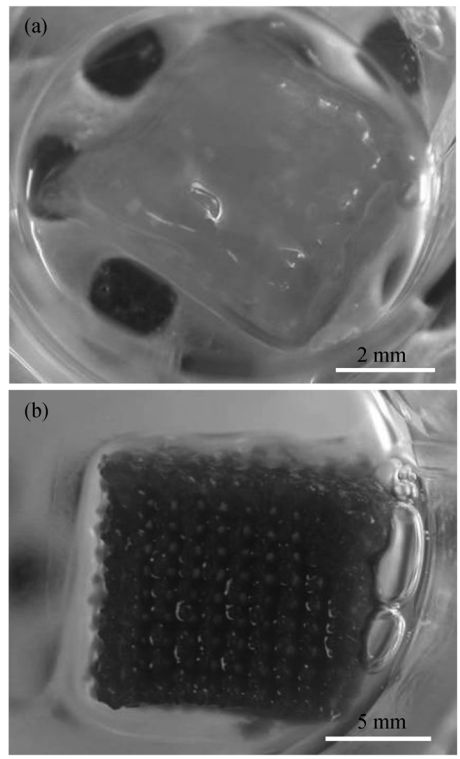


图 8 不同交联条件后培养的对照实验

(a) 3%多聚磷酸钠交联后培养 1 周的结果, 结构体强度明显下降; (b) 3%多聚磷酸钠交联后, 再用 0.8%戊二醛交联, 培养 4 周后的结果, 结构体强度基本未变化

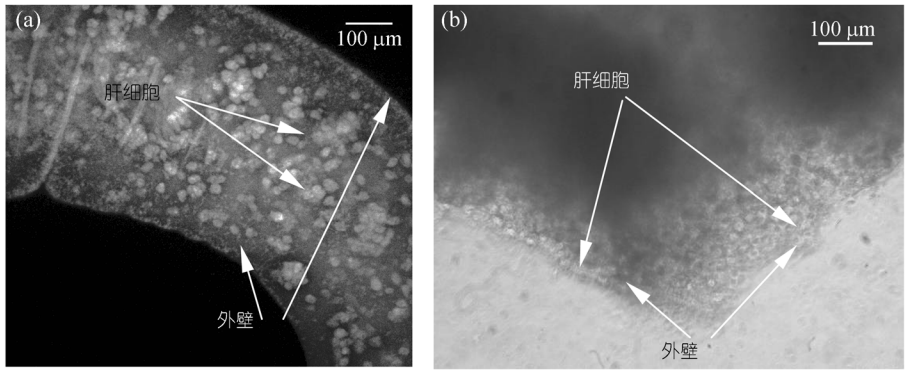


图 9 0.8%戊二醛交联后的微丝在不同培养时间的激光共聚焦照片

(a) 培养 7 d, 微丝外壁没有细胞; (b) 培养 30 d, 微丝外壁出现大量细胞

以供其他细胞(如内皮细胞)的贴附和工程组织的血管化.

4 结论

采用细胞受控组装技术构建的活的三维结构体有效地模仿了自然肝组织, 可以作为一种用于体外重建肝组织或混合型人工肝装置的有效方法. 培养得到的类肝组织具有进一步发展为用于肝脏重建的肝组织的潜力. 此外, 采用这一技术制造的三维类肝组织结构体可以用来进行多种肝细胞的共培养研究, 以及与肝脏相关的药理和病理等其他方面的研究中.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30440043, 30400099)资助项目.

参 考 文 献

1 Trotter J F. Living donor liver transplantation: Is the hype over? J Hepato, 2005, 42(1): 20—23[DOI]
2 Strain A J, Neuberger J M. A bioartificial liver-state of the art. Science, 2002, 295(4): 1005—1009[DOI]
3 Mitaka T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. Biochem Biophys Res Comm, 2001, 281(1): 1—5[DOI]
4 Glicklis R, Shapiro L, Agbaria R, et al. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. Biotechnol Bioeng, 2000, 67(3): 344—353[DOI]
5 Harada K, Mitaka T, Sato F, et al. Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. J Hepato, 2003, 39(5): 716—623[DOI]
6 Mironov V, Boland T, Trusk T, et al. Organ pringting: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechn, 2003, 21(4): 157—162[DOI]
7 Smith C M, Stone A L, Parkhill R L, et al. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineering constructs. Tissue Engin, 2004, 10(9): 1566—1576
8 Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol, 1976, 13(1): 29—83
9 Mitaka T, Mikami M, Sattler G L, et al. Small cell colonies appear in the primary culture of adult rat hepatocytes in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. J Hepato, 1992, 16(4): 440—447
10 Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science, 1993, 260(2): 920—926
11 Xiong Z, Yan Y, Wang S, et al. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition. Scripta Materialia, 2002, 46(11): 771—776[DOI]
12 Landers R, Hübner U, John H, et al. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. J Mater Sci, 2002, 37(15): 3107—3116[DOI]
13 Larry L H, Julia M P. Third-generation biomedical materials. Science, 2002, 295(4): 1016—1019
14 Marsh M A, Grime G W, Breese M B H, et al. Maskless fabrication of 3-dimensional microstructures in PMMA using a nuclear microprobe. Nucl Instrum Meth Phys Res Sec B, 1998, 136: 379—384[DOI]
15 Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. J Cell Biol, 2002, 158(2): 227—233[DOI]
16 Peter T J, Peter J C. The biosynthesis of rat albumin serum. J Biol Chem, 1972, 247(12): 3858—3864

(2005-11-16 收稿, 2006-05-26 接受)