

学校编码: 10384

分类号__密级

学 号: 24520120153966

UDC

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

小口径脱细胞血管支架制备方案的优化、
评价及其异种原位移植的初步研究

Optimization and Evaluation of Preparation Protocol in
Small-diameter Decellularized Scaffolds for Vascular Tissue
Engineering and the Study on Xenotransplantation *In Situ*

徐双悦

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专业名称: 移植免疫学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩日期: 2017年5月

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（组织工程血管）课题（组）的研究成果，获得（齐忠权教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（厦门大学器官移植研究所）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：徐双悦

2017年5月21日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）徐双悦

目录

中文摘要	IV
Abstract	VI
第一章 前言	1
1.1 血管组织工程的发展	1
1.1.1 血管组织工程概述	1
1.1.2 血管组织工程的研究进程	2
1.1.3 血管组织工程的分类	4
1.1.4 组织工程血管的临床应用	9
1.2 血管支架材料分类及其在组织工程血管构建中的重要性	10
1.2.1 天然生物材料	11
1.2.2 合成高分子可降解材料	15
1.2.3 复合材料	17
1.3 支架材料与宿主的相互作用	18
1.3.1 材料反应和宿主反应	18
1.3.2 材料与宿主免疫细胞的相互作用	20
1.3.3 细胞外基质对组织修复的调控作用	21

1.4 脱细胞程式研究的概况	22
1.4.1 脱细胞方法概述.....	23
1.4.2 组织多样性和不同脱细胞方案的影响.....	24
1.4.3 脱细胞效果的评价.....	25
1.5 本实验的选题依据和实验目的	27
1.5.1 选题依据.....	27
1.5.2 实验目的.....	27
第二章 材料与方法	29
2.1 实验材料	29
2.1.1 实验动物.....	29
2.1.2 实验试剂.....	29
2.1.3 实验仪器及主要耗材.....	31
2.1.4 细胞株.....	32
2.2 研究方法	33
2.2.1 标本采集.....	33
2.2.2 脱细胞血管分组制备.....	33
2.2.3 扫描电镜样品制备.....	34
2.2.4 包埋.....	35

2.2.5 石蜡切片/冰冻切片.....	36
2.2.6 H&E 染色.....	36
2.2.7 Masson 染色.....	37
2.2.8 天狼猩红(Sirius Red)染色.....	37
2.2.9 DAPI 细胞核荧光染色.....	37
2.2.10 免疫荧光染色.....	37
2.2.11 DNA 定量检测.....	37
2.2.12 支架体外力学性能检测.....	38
2.2.13 细胞毒性检测.....	38
2.2.14 血管皮下包埋手术步骤.....	39
2.2.15 血管支架原位移植手术步骤.....	39
2.2.16 图像采集软件.....	40
2.2.17 统计学方法.....	40
第三章 实验结果.....	41
3.1 血管支架宏观外观观察及描述.....	41
3.2 血管表面微观结构的观察及描述.....	43
3.3 脱细胞后血管细胞残留的分析.....	43
3.3.1 DNA 量化检测及评估.....	43

3.3.2 DAPI 染色结果	44
3.3.3 H&E 染色结果	44
3.4 不同脱细胞方案对血管支架 ECM 胶原成分的影响	46
3.5 血管支架体外力学性能检测结果.....	47
3.6 细胞毒性实验.....	48
3.7 体内组织相容性实验结果.....	50
3.7.1 各实验组皮下包埋 H&E 实验结果	50
3.7.2 优化方案（组 4）处理后的脱细胞支架皮下包埋免疫荧光实验结果.....	52
3.8 血管支架原位移植实验结果.....	53
第四章 讨论	55
4.1 支架材料的选择.....	55
4.2 脱细胞试剂选择与优化.....	58
4.2.1 脱细胞试剂的选择	58
4.2.2 针对试剂进行的优化	58
4.2.2 实验组设置方案	60
4.3 各实验组脱细胞方案的效果评估与比较.....	61
4.3.1 各实验组脱细胞 ECM 支架外观评价	62
4.3.2 脱细胞 ECM 支架上的 DNA 残留量	63

4.3.3 脱细胞 ECM 支架结构鉴定	64
4.3.4 脱细胞 ECM 支架的力学性能鉴定	66
4.3.5 脱细胞 ECM 支架的细胞毒性鉴定	67
4.3.6 脱细胞 ECM 支架的组织相容性和可降解性鉴定	68
4.4 优化方案脱细胞支架引起宿主免疫反应的检测.....	70
4.5 脱细胞血管支架原位移植可行性的初步探索.....	72
4.5.1 选兔颈动脉定脱细胞 ECM 支架制备的优化方案	72
4.5.2 血管支架原位移植探索性实验	73
第五章 结 论	74
第六章 展 望	76
附 录.....	78
附录一：示图索引.....	78
附录二：表格索引.....	81
附录三：缩略语及中英文对照（按英文字母顺序排列）	82
附录四：攻读博士期间参与课题、发表文章及学术活动.....	85
参考文献	87
致 谢.....	101

Content

Chinese Abstract	IV
English Abstract.....	VI
Chapter I Introduction	1
1.1 Development of vascular tissue engineering.....	1
1.2 Vascular scaffold classification and their importance in the construction of TEBV	10
1.3 Scaffold materials and host cell interactions.....	18
1.4 General situation of study on decellularization processes.....	22
1.5 The basis and purpose of this experiment	27
Chapter II Materials and methods.....	29
2.1 Materials.....	29
2.2 Methods.....	33
Chapter III Experimental results.....	41
3.1 Macro-visual observation and description of vascular scaffold.....	41
3.2 Micro-structure observation and description of vascular scaffold	43
3.3 Analysis of acellular vascular cell residue	43

3.4 The effects of ECM collagen ECM components by diferent decellularization processes	46
3.5 Mechanical testing results of scaffolds <i>in vitro</i>	47
3.6 MTS cell proliferation assay	48
3.7 Biocompatibility testing results <i>in vivo</i>	50
3.8 vascular scaffold transplantation <i>in situ</i>	53
Chapter IV Discussion	55
4.1 Selection of scaffold materials	55
4.2 Selection of decellularizing agents	58
4.3 Evaluation and comparison of decellularization processes	61
4.4 Detection of host immune response to decellularized scaffold by optimized process.....	70
4.5 The feasibility study of acellular vascular scaffold transplantation <i>in situ</i>	72
Chapter V Conclusion.....	74
Chapter VI Prospect	76
Appendices	82
I Figure index	82
II Table index	85
III Abbreviation.....	86
IV Publication and PhD academic activities	89

Reference.....91

Acknowledgement.....101

厦门大学博硕士论文摘要库

中文摘要

血管组织工程 (Vascular tissue engineering, VTE) 的研究核心是种子细胞、可供细胞进行生命活动的血管支架材料以及种子细胞与血管支架间的相互作用, 其中找到合适的血管支架是最关键的步骤。血管支架是种子细胞在体外生长所必须的支撑物, 其力学特性可以为体外血管的组织化提供一定的机械强度, 是种子细胞生长必不可少的三维空间架构。血管支架, 尤其是生物来源的脱细胞支架含有丰富的生物信息可以促进细胞粘附与生长、增殖, 在组织再生过程中亦能为细胞 (包括体外培养时的种子细胞和移植体内后的宿主细胞) 的生长、迁移、分化, 以及新组织的细胞外基质的分泌提供支持, 并且参与决定新生组织的基本结构, 因此血管支架材料在血管组织工程构建中起到非常重要的作用。目前直径 6 mm 以上的大口径血管已有大量临床应用而对 6 mm 以下的小口径血管却仍有许多基础问题亟待解决。天然血管组织经过处理脱除细胞后, 保留了其天然的物理支架结构及力学性能, 非常符合体内血管的生物学结构需求, 并且富含细胞粘附序列及生长因子, 生物相容性较好。但从开始制备血管支架脱细胞基质到最后消毒、储存阶段的每一个处理步骤均会对脱细胞基质的微结构、组成成分、力学特性等产生影响, 进而影响其生物相容性和移植后宿主可能诱发的免疫反应。

因此, 本课题选取了兔颈动脉 ($\phi=2$ mm) 作为小口径血管支架的来源, 通过比对羊的血管支架制备过程 ($\phi=3-4$ mm), 对制备流程进行了细致的优化, 包括物理、化学、生物等多种条件的细节处理。并通过表观评价、组织学评价、血管力学评价、组化评价等多方面条件比较, 最终确定出一个最优方案, 可以使脱细胞后的血管支架具有较低的生物毒性和较高的免疫相容性。并且, 通过探索性实验, 本文发现利用该脱细胞血管的制备流程获得的血管支架可进行原位移植, 初步构建了兔颈动脉-大鼠腹主动脉的异种原位移植模型。从理论和实践上, 验证了不种植细胞的血管支架异种原位移植的可行性; 兔颈动脉与大鼠腹主动脉直径相仿, 吻合度极高, 可将其作为小口径天然细胞外基质

(Extracellular matrix, ECM) 构建的组织工程血管的实验室常规模型；手术移植成功率或与大鼠重量和进食量具有相关性，有望通过进一步研究证实。

关键词：血管脱细胞方案；血管组织工程；兔颈动脉

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

The core of vascular tissue engineering (VTE) is the seeding cells, the scaffolds which could support the cells live in and the interactions between cells and scaffolds. Finding a suitable scaffold is the most crucial step. Vascular scaffold is the 3-D falsework for seeded cell growth *in vitro*, provides the mechanical strength and characteristics for vessel rebuilding. In the scaffold, there was the biological information which could promote cell attachment, growth and proliferation. During the regeneration process of vessel, it supports the cell growth, migration, differentiation, and the extracellular matrix secretion, meanwhile, it decided the new vessel structure. Therefore, vascular scaffolds in tissue engineering of blood vessels play a very important role. Currently, the large diameter vessels ($\text{Ø} \geq 6 \text{ mm}$) have a lot of clinical applications, while there were still many problems needed to be solved in small diameter's ($\text{Ø} \leq 6 \text{ mm}$). The use of decellularized natural matrices takes advantage of the structure and mechanical performance of natural tissue extracellular matrix (ECM) while avoiding any adverse immunological reactions due to its origin. The decellularization process refers to the removal of antigenic cellular material from the vessel. Each step in detail of the decellularization process will have effect for the microstructure and composition of ECM, furthermore, effect the biocompatibility and graft-versus-host reaction. Therefore, in this thesis, the rabbit carotid artery ($\text{Ø} = 2 \text{ mm}$) was chose as the source of small diameter vascular scaffold. Compared with the decellularization process of ovine artery, the whole process for rabbit arteria carotis was optimized in conditions and agents in chemistry, physics and biology. There were five groups set in total. The results were evaluated using various microscopy and immunostaining techniques, such as scanning electron microscopy (SEM), H&E staining, Masson's trichrome staining, picrosirius red staining, mechanical testing *in vitro*, and subcutaneously implanted in rats for biocompatibility *in vivo*. Our findings showed that a 2 h digestion time with 1x EDTA, replacing non-ionic detergent with double-distilled water for rinsing and the application of UV crosslinking gave rise to an ECM scaffold with the highest biocompatibility, lowest cytotoxicity and best mechanical properties for use *in vivo* or *in situ* pre-clinical research in VTE in comparison. Furthermore, we did the pre-operation with this acellular TEVG

replacing the abdominal cavity in rat *in situ*. In six samples, the longest survival time is 10 days and it certified the acellular tissue engineering vessel graft (TEVG) could works in this xenotransplantation model in laboratory. In theory and practice, it was validated the feasibility of acellular vessel scaffold xenotransplantation *in situ*; the diameters of rabbit carotid artery and rat abdominal aortic could matched well, which could be established as a small natural ECM TEVG model in laboratory research. The last hypothesis was the surgical transplant success rates may be relevant with the body weight of rats and the food-intake way. As we still have blockage in the surgery such as intestinal obstruction. It needs further researches to confirm in detail.

Key words:

Blood vessel decellularization process; Vascular tissue engineering; Rabbit arteria carotid

第一章 前言

1.1 血管组织工程的发展

1.1.1 血管组织工程概述

组织工程（Tissue Engineering, TE）是近半个世纪兴起的跨学科的新领域，这一新兴学科创建历史可以回溯到上个世纪的 1980 年代，当时对软骨损伤的修复，有很多学者都选择了用软骨细胞移植来进行治疗，但其治疗结果均不甚理想。然而，有一位学者提出了一个治疗思路，认为如果把细胞接种在一种可降解的支架材料上植入损伤部位，不但可以利用支架使成软骨细胞能够均匀分布，也可以使细胞的位置相对被固定下来，有利于细胞的后续进一步生长、也有利于修复受损部位和新组织的形成。这一设想被广泛公认为是组织工程概念的雏形。1993 年哈佛大学的 J. Vacanti 教授和麻省理工学院的 R. Langer 教授在裸鼠的背部生成了人耳，并在《科学》杂志上提出了“组织工程学”的概念，正式对这一学科定名。之后，许多研究者进行了将细胞与支架复合后在体内/体外构建组织的实验^[1]。随着科技的不断发展，现今的组织工程是以生命科学、材料科学和工程学的理论和方法为基础，并进行学科间的交叉融合，制备含有活细胞的有功能的组织，研究其发生机制并进行不断的优化改良，最终达到能够用这样的人工组织/器官来替代人体因各种原因造成的组织细胞结构缺损，或直接替换功能丧失的组织或器官。而且，随着 90 年代中期以后，人们对干细胞以及其他祖细胞的关注和研究逐渐增加，组织工程的外延扩展成为再生医学的大范畴。组织工程与再生医学研究的核心是活的种子细胞，可供细胞进行生命活动的支架材料以及种子细胞与支架材料的相互作用，这是组织工程学所需要研究的主要科学问题。目前认为，组织工程的三要素是支架、种子细胞以及能够诱导血管生成的微环境（或细胞生长调节因子）^[2-5]。组织工程学是一门重建组织和器官的新兴交叉学科，是生命科学发展史上又一个里程碑，对现代再生医学的发展具有划时代意义的深远影响^[6]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库