

学校编码: 10384

分类号\_\_密级

学号: 24520131153525

UDC

廈門大學

硕士学位论文

在缺血下肢生成具有侧枝循环的功能性动脉的研究

The research of developing functional artery with collateral circulation in the ischemic hindlimb

周旭

指导教师姓名: 赵一麟 副教授

专业名称: 外科学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2016 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( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )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):

年 月 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）：

年 月 日

## 摘要

### 1、背景与目的

随着社会的发展，血管方面疾病的发病率呈现日益增高的趋势。在众多血管疾病中动脉硬化闭塞症、血栓闭塞性脉管炎等这一类疾病均可能伴随出现下肢缺血的症状。其中手术治疗主要包括人造血管旁路移植、支架植入以及球囊成形术等，但血管移植通常会形成血栓而只有短期的通畅性，支架植入和血管成形术往往又会造成扩张部位的再狭窄。对于血管病变广泛而无法进行手术或腔内治疗的患者，就只能通过药物保守治疗，通常是采用扩血管、抗凝和抗血小板等方法来改善其血液供应，随着病程的发展，药物往往不能起到很好的效果，最终导致病人需要截肢。因此在缺血下肢再生带有侧枝循环的功能性动脉以恢复血供，取代已经闭塞的动脉，具有很大的临床意义。

### 2、材料与方法

(1)在体外构建组织工程血管，包括脱细胞血管支架的制备、自体骨髓间充质干细胞的分离培养以及将骨髓间充质干细胞种植到脱细胞血管支架上；

(2)促进侧支循环生成材料的制备，包括血管生长因子-肝素明胶微球的制备、胶原支架的制备，并且将载药微球及骨髓间充质干细胞复合到胶原支架上；

(3)将组织工程血管近端与山羊下肢缺血模型的髂外动脉吻合，并将其远端闭合，最后将负载血管生长因子-肝素明胶微球和骨髓间充质干细胞的胶原支架包绕在组织工程血管外周；

(4)监测血管移植物的通畅性，并检测动脉生成和侧枝循环形成的情况。

### 3、结果与结论

我们通过优化脱细胞的方法，制备了具有结构完好的细胞外基质、机械性能良好以及低细胞毒性和免疫原性的脱细胞血管支架，并在上面种植骨髓间充质干细胞，完成了组织工程血管的构建。同时制备了复合骨髓间充质干细胞及肝素-血管生长因子缓释微球的促血管生成胶原支架，最后我们成功的将它们移

植到山羊下肢缺血模型中。

组织工程血管被移植到体内二个月后，由于血栓形成和内膜增生等原因发生了部分闭塞，但在组织工程血管周围有大量侧枝血管形成。虽然血管移植物部分发生了闭塞，但仍有部分管腔通畅且内壁光滑。通过组织学、免疫组化检测发现组织工程血管移植物上有内皮细胞层和平滑肌细胞层生成，并且有胶原蛋白和弹性蛋白等细胞外基质成分新生。

通过在缺血下肢完全再生一条功能性动脉并带有侧枝循环与毛细血管和静脉相连接，从而改善下肢的血液供应，是治疗下肢缺血性疾病的可行办法。

**关键词：** 下肢缺血 组织工程血管 血管生成

## Abstract

### 1、 Background and purpose

With the development of the society, the incidence of vascular disease shows the tendency of rising day by day. In many vascular diseases, they may be accompanied by the symptoms of limb ischemia, such as arteriosclerosis obliterans (ASO) , thrombosis angiitis obliterans(TAO). Surgical treatment mainly includes stent placement, angioplasty with balloon and synthetic vascular graft bypass surgery. However these methods have certain drawbacks, the vascular grafts indicated shortterm patency with thrombosis, the angioplasty and stent placement usually lead to re-narrowing after expanding the disordered lesion. For extensive vascular lesion unable to surgery or endovascular treatment, only by conservative medication, usually by vasodilator, anticoagulant, antiplatelet and other methods to improve the blood supply. With the development of the disease, drugs often cannot have very good effect, eventually leading to patients requiring amputation. Therefore, it is of great clinical significance to replace the occluded artery and restore the blood supply by regenerated the functional artery with collateral circulation in ischemic hindlimb .

### 2、 Materials and methods

(1)Developing autologous tissue-engineered blood vessels (TEBV) in vitro, including preparing decellularized scaffold, isolating bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and seeding MSCs onto the scaffold ;

(2) Preparing the materials which facilitate the formation of collateral blood vessel, including preparing VEGF-heparin controlled-releasing gelatin microspheres, collagen scaffold acting as the shelves for MSCs and VEGF- heparin microspheres

(3) Anastomosing one end of autologous TEBV to external iliac artery in ischemic model, the other end will be ligated, and wrapping the TEBV with collagen scaffold containing MSCs and VEGF- heparin microspheres;

(4)Monitoring the patency of vascular graft and detecting the forming of functional artery with collateral circulation.

### 3、 Results and conclusion

We have prepared the decellularized vascular scaffold with complete structure of extracellular matrix, good mechanical properties, low cytotoxicity and immunogenicity, then MSCs were planted on the scaffold, completed the construction of tissue-engineered blood vessels. At the same time the collagen scaffold with MSCs and VEGF- heparin controlled-releasing microspheres was prepared to promote angiogenesis. Finally, we successfully transplanted them into the ischemic hindlimb of the goats.

Due to thrombosis, intimal hyperplasia and other reasons, partial occlusion occurred within two months after the tissue engineering blood vessel (TEBV) was transplanted into the body, however around the TEBV with large amount of collateral vessels formed. TEBV were partly occluded, but parts were patency and smooth inner wall. Histological and immunohistochemical analyses of the engineered vascular grafts demonstrated the partly existence of endothelium, smooth muscle infiltration and the presence of extracellular matrix components, such as collagen and elastin.

Developing a completely new functional artery with collateral vessels network which connect to the capillary and vena to improve blood supply in ischemic hindlimb. This is a potential method of treatment for ischemic disease of hindlimb.

**Key words:** Ischemic Hindlimb; TEBV; Angiogenesis

## 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
<b>第一章 绪论.....</b>	<b>1</b>
一、组织工程学的起源与发展 .....	1
二、血管组织工程学的建立与发展.....	2
1、种子细胞 .....	4
2、血管支架材料 .....	6
3、生物信号 .....	8
三、血管生成过程 .....	9
四、药物缓释系统 .....	10
<b>第二章 组织工程血管的体外构建与促血管生成材料的制备 .....</b>	<b>12</b>
一、组织工程血管的体外构建及检测.....	12
1、材料与方法 .....	12
2、结果.....	22
二、促血管新生材料的制备及检测.....	30
1、材料与方法 .....	30
2、结果.....	33
<b>第三章 组织工程血管的体内移植及检测.....</b>	<b>36</b>
一、体内移植组织工程血管及促血管生成材料.....	36
1、材料与方法 .....	36
2、结果.....	38
二、侧枝循环形成和动脉生成检测.....	39
1、材料与方法 .....	39
2、结果.....	42
<b>第四章 结论与讨论 .....</b>	<b>45</b>



---

一、结论 .....	45
二、讨论 .....	45
1、脱细胞血管支架 .....	45
2、种子细胞在支架上的种植培养 .....	47
3、药物缓释系统 .....	49
4、骨髓间充质干细胞（MSCs） .....	50
5、组织工程血管的抗凝 .....	52
参考文献 .....	55
致谢 .....	66

厦门大学博硕士论文摘要库

**Table of Contents**

**Abstract in Chinese..... I**

**Abstract in English..... III**

**Chapter I Introduction.....1**

    i 、 **The origin and development of tissue engineering.....1**

    ii 、 **The establishment and development of vascular tissue engineering.....2**

        1、 Seed cells..... 4

        2、 Vascular stent materials..... 6

        3、 Biological signal..... 8

    iii、 **Process of angiogenesis.....9**

    iv、 **Medicine controlled release system.....10**

**Chapter II Construction of tissue engineering blood vessel in vitro and preparation of angiogenic material.....12**

        i 、 **Construction and detection of tissue engineering blood vessel in vitro....12**

            1、 Materials and methods..... 12

            2、 Result..... 22

        ii 、 **Preparation and detection of angiogenic material.....30**

            1、 Materials and methods..... 30

            2、 Result..... 33

**ChapterIII Transplantation in vivo and detection of tissue engineered blood vessel.....36**

    i 、 **Transplant tissue engineering blood vessel and angiogenic material in vivo.....36**

        1、 Materials and methods..... 36

        2、 Result..... 38

    ii 、 **Detect the formation of arteriogenesis and collateral circulation.....39**

        1、 Materials and methods..... 39

        2、 Result..... 42

---

<b>ChapterIV Conclusion and discussion.....</b>	<b>45</b>
i 、 <b>Conclusion.....</b>	<b>45</b>
ii 、 <b>Discussion.....</b>	<b>45</b>
1、 Acellular vascular stent.....	47
2、 Seeding cells on scaffold.....	45
3、 Medicine controlled release system.....	49
4、 Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) .....	50
5、 Anticoagulation of tissue engineering blood vessel.....	52
<b>Reference.....</b>	<b>55</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>66</b>

## 第一章 绪论

### 一、组织工程学的起源与发展

随着现代人类文明的进步，人们面临着摄入过多的脂肪类膳食、日益增快的生活节奏以及繁重的社会压力等许多问题，人体的正常组织、器官发生功能性障碍或者丧失的比例越来越高，已成了人类健康所面临的主要危害之一，同时也是疾病发生、进展和死亡的最直接原因。针对因原发疾病、车祸外伤或者先天性遗传等造成的组织或器官结构损伤或功能丧失，现代医学主要是采用组织移植和人工合成材料移植等手段进行治疗，以达到恢复组织结构的完整性，重建组织正常的生理学功能的作用。

用于移植的组织、器官的来源主要有以下 3 种：（1）自体组织，自体组织移植可以完全替代病变的组织起到了良好的临床疗效，但它需要从自己健康的组织中截取，这种做法本身就会导致很多并发症以及一些额外的损伤产生。（2）同种异体组织或器官，同种组织或器官由于存在来源有限的问题限制了其在临床的应用，而且还存在相互之间传播致病原的风险。（3）人工合成材料，目前用于临床的人工合成组织中大多数只能保证损伤组织重获完整的形态结构，却无法替代或者比拟正常组织的生理学功能，并且还存在继发感染、免疫排斥以及材料植入后发生降解产生断裂和移位等问题。因此在修复组织结构及重建其功能的同时克服以上治疗方法的缺陷成为了现代医学研究的热点和难点。

随着材料学、医学以及其他相关学科的快速发展和相互交叉融合，组织工程学从无到有逐步发展起来了。1987 年组织工程（tissue engineering，TE）有了一个科学而完整的定义，那就是充分利用生物科学和工程学的基本原理，将组织细胞在体外培养扩增，然后种植于性能优良的生物材料上使其增殖、分化，最终构建成细胞—材料紧密结合的复合生物材料，然后将其植入体内与受体组织相融合及重塑，以达到对受体病变的组织起到结构上修复和功能上重

建的作用<sup>[1]</sup>。组织工程学目前的研究主要关系以下 3 点：（1）种子细胞的选择（2）支架材料的合成（3）体内移植<sup>[1, 2]</sup>，如下图 I 所示：

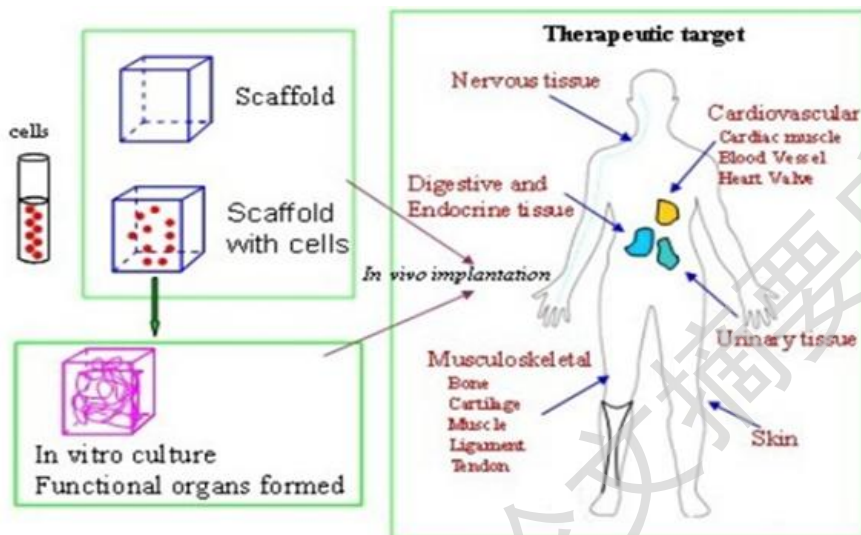


图 I 组织工程的三种基本组成

它给现代医学开辟了一条前所未有的新道路，这必将成为医学以及生命科学领域发展史上的一个崭新里程碑；组织工程产品的产生与发展让正在与病魔做斗争的患者们看到了新的希望。

## 二、血管组织工程学的建立与发展

随着经济的日益发展，不合理的膳食结构以及不健康的生活方式等的出现，血管方面的疾病的患病率与发病率同样逐年增高，血管移植是目前临床上使用较多的治疗方法之一。血管移植材料主要来源于自体血管、异体血管和合成材料血管。

自体血管是最早应用于临床的血管移植物，尤其是自体动脉被认为是最理想的病变血管的替代者，但其来源非常有限且供体本身损伤较大，从而限制了它的临床方面应用<sup>[3-5]</sup>。异体血管由于受到宿主的免疫排斥以及自身的退行性变等原因，血管移植后吻合口狭窄、动脉瘤形成等不良反应的出现影响了移植效

果从而限制了其广泛应用<sup>[6, 7]</sup>。随着材料学的发展, 科研工作者们将目光逐步转移到人工合成材料上。将聚四氟乙烯 (PTFE) 及聚乳酸 (PLA) 等多种合成材料制作的血管支架, 并通过对材料的物理特性、表面性状等的改进, 已基本可以达到血管移植的要求。人工血管在大、中口径人工血管移植方面取得了较好的疗效, 已被广泛用于临床。而小口径移植血管(直径<6mm)在移植后易发生吻合口狭窄、血栓形成等, 远期通畅率不理想。因此血管组织工程技术的出现为血管移植特别是小口径血管移植, 提供了新的思路<sup>[8]</sup>。

血管组织工程是指收集种子细胞种植于血管支架材料上, 以重建与再生和自体血管在结构和功能上相似的血管替代物。首先在体外分离获得种子细胞并使其在体外增殖和诱导定向分化, 然后种植在血管支架上, 在适宜的条件下进行三维立体动态培养, 最终形成具有与自体血管相似或者相同的三维空间结构、机械性能和生理学特性的血管移植体, 可以代替体内的血管病变部位, 并可以长期保持通畅。组织工程血管的构建包含着 3 个方面重要的内容<sup>[9]</sup>: (1) 种子细胞: 选择适合重建组织工程血管的种子细胞, 然后使其增殖和分化; (2) 血管支架材料: 血管支架材料的选择包括天然生物材料、合成高分子材料和去细胞生物源性生物材料等, 需要了解他们各自的优缺点来不断改进; (3) 调控形成血管多层结构并维持功能的信号因子。三者相辅相成, 密不可分共同组成了构建组织工程血管的必要因素, 如下图 II 所示<sup>[10]</sup>:

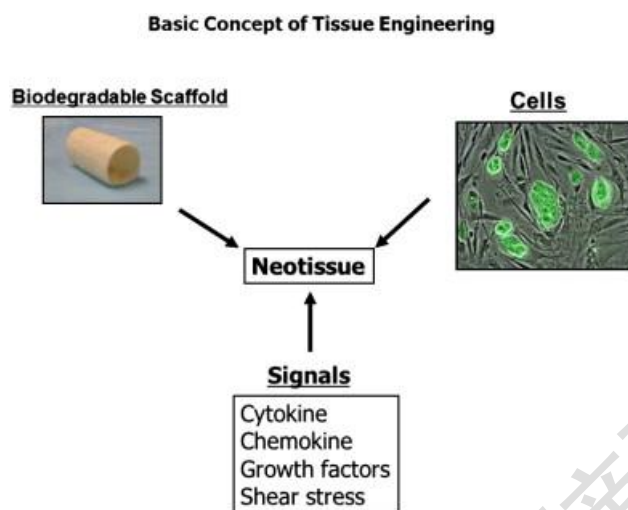


图 II 构建组织工程血管（TEBV）的三个重要因素

## 1、种子细胞

种子细胞的选择、培养以及增值分化，是构建组织工程血管的基础。理想的种子细胞要具备以下几个优点：取材简单方便、增殖能力强易于体外扩大培养，无免疫排斥或极低的免疫排斥反应，临床使用安全等。

### 1.1 血管壁细胞

血管壁细胞包括血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等。早期科研人员从人工血管应该具有和正常血管相类似的结构和功能的角度出发，认为血管内壁的血管内皮细胞层具有重要的生理功能，尤其是其具有抑制血栓形成的作用，可以保证血管的通畅，因此人工血管的内皮化具有重要意义。1970年 Mansifield 等第一次进行了内皮细胞种植实验，使组织工程血管的构建迈进了一个崭新的时代<sup>[11]</sup>。随后 1978 年 Herring 等通过摸索成功地在人工材料上种植了单层内皮细胞<sup>[12]</sup>。实验发现种植了内皮细胞的聚四氟乙烯材料在一定的时间内保持了良好的通畅性<sup>[13]</sup>，但随后发现在没有中膜平滑肌细胞或外膜成纤维细胞的情况下，单一由内皮细胞所构建的组织工程血管内膜内皮细胞层结构较不稳定，说明平滑肌细胞、成纤维细胞等在稳定血管内皮细胞层以及血管的自我更新方面是不可缺少的一部分。在此基础上，Weinbeg 和 Bell 第一次采用牛

主动脉的内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞共同构建出了与正常血管结构相似的组织工程血管<sup>[14]</sup>。Niklason 等将平滑肌细胞种植在 PGA 支架上, 将其放在模仿体内血管搏动的压力条件下培养 8 周, 此法制备的组织工程血管表现出了和天然血管相类似的生理特性和机械性能<sup>[15]</sup>。

### 1.2 干细胞

由于自体细胞来源缺乏等原因, 寻找新的种子细胞成了急需解决的主要问题。近年来随着人们对干细胞的认识越来越深入, 越来越多的科研工作者开始探索干细胞在血管组织工程中的应用<sup>[16, 17]</sup>。之前有研究发现干细胞具有不断自我更新、增殖能力强以及多向分化的潜能<sup>[18, 19]</sup>, 因此干细胞被认为是应用到组织修复中最有潜力的细胞。有研究证实干细胞在合适的环境下体外培养可以分化为血管壁细胞<sup>[8, 20]</sup>。干细胞一般分为以下 3 类: 全能干细胞(如胚胎干细胞 ECS)、多能干细胞(如骨髓间充质干细胞 MSC)和单能干细胞(如神经干细胞 NSC)。其中胚胎干细胞是来源于胚胎内细胞团或原始生殖细胞的全能干细胞。理论上认为胚胎干细胞具有分化为机体任何细胞的能力<sup>[21]</sup>。2002 年 Levenberg 等把人的胚胎干细胞进行诱导分化, 成功培养出了内皮细胞<sup>[22]</sup>。然而将胚胎干细胞应用于组织工程还存在伦理学、免疫排斥反应以及可能导致细胞永生甚至癌变等方面的问题, 就目前来说其还不适宜在临床上广泛应用<sup>[23]</sup>。

随着对干细胞特性了解的不断深入, 为了发挥干细胞的优良特性, 而又尽量减少胚胎干细胞的负面作用, 国内外的科研工作者们将目光转移到了外周干细胞的身上。外周干细胞主要包括间充质干细胞、造血干细胞、内皮祖细胞等种类, 其中间充质干细胞和内皮祖细胞被认为是最有可能作为组织工程血管的种子细胞而被应用的。间充质干细胞是来源于外周或骨髓的一类成体干细胞, 具有多向分化的能力, 在合适的特定培养环境下, 可以分化为血管内皮、心肌细胞、软骨细胞以及脂肪细胞等。2003 年 Matsumura 等将骨髓间充质干细胞种植在人工材料上, 发现组织工程血管最终形成的血管壁细胞主要来源于种植的骨髓间充质干细胞<sup>[20]</sup>。2004 年 Oswald 等研究证明骨髓间充质干细胞在体外培养能够转化为血管内皮细胞, 并且能够出现毛细血管样的组织结构<sup>[24]</sup>。除此之



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.