

组织工程周围神经血管化研究进展



赵斌, 马剑雄, 马信龙

天津市天津医院骨科研究所 (天津 300211)

【摘要】 目的 对组织工程周围神经血管化的研究现状进行文献回顾, 为寻找促进组织工程周围神经血管化的新方法提供理论依据。方法 查阅近年来关于组织工程周围神经血管化方面的相关文献, 围绕周围神经再生局部微环境及血供特点、支架材料修饰、种子细胞、自体血管束的植入、促血管因子等方面进行回顾及总结。结果 组织工程周围神经为神经损伤的修复带来了新的希望, 但对于大段神经缺损的修复效果欠佳, 这主要与神经移植物的血管化程度相关, 因此促进组织工程周围神经早期血管化尤为重要。既往研究多从支架材料修饰、种子细胞、自体血管束植入及促血管生成相关因子 4 个方面单一进行研究, 近年研究表明将上述两种或多种因素共同作用于组织工程周围神经, 能够更好地促进组织工程周围神经血管化。结论 促进组织工程周围神经早期血管化, 能够使支架上的种子细胞及时获得营养支持, 促进轴突生长、神经再生, 有利于修复大段周围神经缺损。

【关键词】 组织工程周围神经; 血管化; 种子细胞; 支架材料; 微环境

Advance of vascularization of tissue engineered peripheral nerve

ZHAO Bin, MA Jianxiong, MA Xinlong

Orthopaedic Institute, Tianjin Hospital, Tianjin, 300211, P.R.China

Corresponding author: MA Xinlong, Email: agzhb@sina.com

【Abstract】 Objective To review the literature on the research status of vascularization of tissue engineered peripheral nerve so as to provide the theoretical basis for the vascularization of tissue engineered peripheral nerve. **Methods** The literature related to the vascularization of peripheral nerve tissue engineering in recent years was reviewed and summarized according to the five aspects of promoting vascularization: local microenvironment and blood supply characteristics of peripheral nerve regeneration, scaffold material modification, seed cells, autologous vascular bundle implantation, and pro-vascular factors. **Results** Tissue engineered peripheral nerve has brought a new hope for the repair of peripheral nerve injury, but the repair effect of large nerve defects is not good, which is mainly related to the degree of vascularization of the nerve grafts. So it is particularly important to promote the early vascularization of tissue engineered peripheral nerve. Previous studies have mainly focused on the four aspects of scaffold material modification, seed cells, autologous vascular bundle implantation, and angiogenesis related factors. Recent studies show that the combination of the above two or more factors in the tissue engineered peripheral nerves can better promote the vascularization of tissue engineered peripheral nerves. **Conclusion** Promoting early vascularization of tissue engineered peripheral nerves can provide timely nutritional support for seed cells on the scaffold, promote axon growth and nerve regeneration, and facilitate the repair of large peripheral nerve defects in clinical practice.

【Key words】 Tissue engineered peripheral nerve; vascularization; seed cells; scaffold material; microenvironment

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81501061)

临床上, 由于创伤、肿瘤等原因造成的周围神经缺损非常常见, 周围神经损伤已成为全球所面临的 健康问题之一^[1]。目前, 临床修复周围神经缺损的主要方法是自体神经移植, 但存在自体神经

来源有限、供区神经功能丧失及神经直径难以匹配等问题。同种异体神经或异种神经是理想的神经来源, 但因存在严重免疫排斥反应常导致治疗失败^[2]。因此需要进一步研究理想的永久性修复材料。

近年来, 随着材料科学、细胞生物学的进步, 采用组织工程技术构建组织工程周围神经, 为神经

DOI: 10.7507/1002-1892.201902032

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81501061)

通信作者: 马信龙, Email: agzhb@sina.com

损伤的修复带来了新希望。但构建的组织工程周围神经修复大段周围神经缺损还存在诸多问题,尤其是组织工程周围神经的血管化问题成为限制其发挥生物学效能的一个“瓶颈”^[3-4]。组织工程周围神经早期血管化问题日益受到学者们的关注。组织工程周围神经血管化的研究主要包括以下5个方面:周围神经再生局部微环境及血供特点、支架材料修饰、种子细胞、自体血管束的植入、促血管因子。本文将围绕上述5个方面进行文献回顾及总结。

1 周围神经再生局部微环境及血供特点

众所周知,周围神经主干结构是由神经纤维束及其周围包括血管在内的结缔组织构成^[5]。神经移植后,移植段神经血管再形成大致有两种形式:①神经内形式,即内部丛状血管,可持续24周;②神经外形式,即外部纵行血管,出现在移植后3~6周内。有研究表明^[6],不带血管的神经移植后3d内为缺血状态,1周左右开始出现血流急剧增加;而带血管的神经移植后早期虽有血流增加,但基本处于平稳状态,这对于维持周围神经微环境的稳定具有一定意义。局部微环境及神经再生所需要的各种营养物质对周围神经的修复再生非常重要,而这些都与局部血供有重要关系^[7]。神经移植早期血管化,可以为移植的各种细胞提供足够营养,进而促进轴突生长、神经再生;另一方面,可以减少体内胶原纤维形成,便于新生轴突通过。另外,神经移植早期的血管化还可以聚集来源于血液中的巨噬细胞^[8],以利于快速清除周围神经损伤后轴突、髓鞘的各种溃变产物,从而为新生轴突向远端生长提供良好的通道^[9]。

近年来,随着组织工程学迅速发展,应用组织工程周围神经修复神经缺损已成为研究趋势^[10]。对于大段神经缺损,血管化不足是制约其修复成功的关键因素。组织工程周围神经不能早期血管化,不能早期在体内建立血液循环,制约了其进一步向临床应用^[11]。有研究表明,细胞在血管周围150~200 μm内才能够通过弥散作用来维持存活,否则移植体内部的细胞将难以通过渗透作用获得养分及营养的支持^[12]。因此,移植早期血管化对组织工程周围神经在体内存活起重要作用。

2 支架材料修饰

组织工程周围神经血管化的最终目的是在移植周围形成功能化的血管网^[13],这就要求组织工

程神经的支架材料与成血管相关细胞具有良好的组织相容性,以便血管长入。对支架材料的修饰,包括外部多孔状结构的构建及内部支架的建立。适宜的外部及内部结构可以支持种子细胞黏附、促进种子细胞分化、生长及轴突再生,防止结缔组织长入。有研究报道^[14],适宜细胞生长的三维支架材料孔径应介于50~400 μm。Chiu等^[15]研究了不同孔径聚乙二醇多孔支架对移植血管化的影响,结果表明大孔径支架比小孔径支架更有利于血管长入,且孔径越大血管化程度越高。Bai等^[16]研究了不同孔径对多孔生物陶瓷材料血管化的影响,结果表明随着孔径尺寸的增加,长入的血管逐渐增多。Sun等^[17]利用高分子聚合材料构建了一种三维支架,研究表明该支架有利于血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)长入及增殖,具有潜在促血管生成的能力。

另外,在支架材料表面可以添加一些促进成血管细胞增殖、黏附的物质,如层粘连蛋白、纤维结合素及胶原纤维等。Kemp等^[18]认识到血管化对神经修复的重要性,采用胶原来源神经导管修复周围神经缺损,促进了轴突生长、雪旺细胞增殖及移植早期血管化。蒋良福等^[19]采用VEGF纳米微囊对去细胞神经支架进行修饰,促进组织工程神经预血管化。在材料表面修饰方面,通过在组织工程神经内植入缓释生长因子,可以诱导成血管相关的细胞向支架材料内部迁移、增殖,进而形成毛细血管网。

肝素用于生物材料修饰已有50余年,最初研究者们试图通过离子交互作用将肝素锚定在生物材料表面,减轻材料致凝性并获得成功^[20]。随着对生物材料研究的深入,为了增加材料的生物相容性以及细胞的黏附性等生物特性,药物缓释系统成为研究热点,而肝素具备与多种蛋白结合的能力,基于肝素的药物缓释系统被证明可以装载各种生物效应迥异的生长因子^[21]。本课题组利用肝素作为缓释载体,制备了能够缓释VEGF的组织工程周围神经,促进了组织工程周围神经形成血管的能力,实现了组织工程周围神经的血管化^[22]。

3 种子细胞

ECs是血管形成、再生中的主要细胞^[23]。刘春晓等^[24]在体外成功建立了人脐静脉内皮细胞与BMSCs共培养体系。高宏阳等^[9]将胎兔ECs与雪旺细胞共培养后,植入脱细胞神经支架中修复兔坐骨神经缺损,结果优于单纯植入雪旺细胞的脱细胞神经支架。

但 ECs 为终末细胞,增殖速度缓慢^[25],短时间内促进血管新生的能力较弱,故应用 ECs 来促进周围神经修复过程中血供的重建及血管的再生较难实现。而血管内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 作为 ECs 的前体细胞,是出生后机体血管形成最主要的干/祖细胞类型^[26]。EPCs 不仅参与了胚胎发育过程中的血管形成,也参与了出生后的血管形成^[27]。EPCs 可有效地促进周围神经缺损区域的血管再生,并能明显增强周围神经修复和再生能力^[28]。在很多种缺血性疾病动物实验中,外源性注入 EPCs 能明显改善损伤组织局部血流供应,增强缺血组织局部的新生血管生成,进而促进组织修复^[29]。当机体发生创伤、缺血等病理变化时,存在于循环血液中的 EPCs 能够迁移并定植在损伤缺血部位,分泌促血管生成因子,促进侧支血管生长至缺血组织,参与组织血管新生,促进组织修复^[30]。EPCs 能够促进骨修复过程中的血管形成,将 MSCs 与 EPCs 共同作为种子细胞,能够加快骨缺损的修复^[31]。Zigdon-Giladi 等^[32]采用人外周血来源内皮祖细胞修复鼠颅骨缺损,促进血管形成及骨形成。对于周围神经而言,伤后 1 周左右是周围神经缺损修复重建过程中血管生成的关键时期,如果错过了这个时期,新生血管的生成效率和速度会明显降低,进而影响神经修复重建的速度。所以对于组织工程周围神经而言,早期血管化至关重要。

因此,本课题组认为将具有血管形成能力的内皮祖细胞与神经细胞或干细胞联合应用,是血管化组织工程周围神经最有前景的方法之一。

4 自体血管束的植入

临床上,随着显微外科技术的发展,有学者采用带血管的神经移植修复大段神经缺损,取得了较好临床效果。早在 1976 年, Taylor 等^[33]为了改善神经移植物的血供,提出吻合血管的神经移植,采用携带桡动脉及桡静脉的桡神经浅支成功修复了正中神经缺损。受其启发,在进行组织工程神经移植的同时,可以寻找 1 根血管固定于组织工程神经周围,形成带血管蒂的组织工程周围神经,这样可以维持移植稳定,并且有持续的血液供应,实现组织工程周围神经早期血管化,最终达到促进周围神经再生及轴突生长的目的。

正常情况下,周围神经与血管存在伴行且距离较近的关系,将血管束植入移植神经符合上述供血关系。1994 年, Cavadas 等^[34]进行了植入血管束预制血管化周围神经的研究。此外,有研究表明,大

网膜脂肪细胞能够合成 VEGF,大网膜微血管内皮细胞能够合成 bFGF^[35], VEGF 及 bFGF 具有促血管生成的作用。有学者将带蒂的大网膜移位包裹人工神经移植修复周围神经缺损,术后 3 d 即出现了血管化,修复效果明显好于单纯人工神经移植^[36]。

以上方法通过增加移植神经血供,达到了促进人工神经移植血管化的目的,取得了较好疗效。但上述方法存在一个共同问题,即在损伤神经周围不一定存在适合吻合、转移且稳定的血管,并且对显微外科技术要求较高,限制了临床应用。

5 促血管因子

多种细胞因子及生长因子能够促进 EPCs 或 ECs 增殖,促进新生血管生成,进而促进组织血管化。VEGF、bFGF、PDGF 等均具有间接或直接促血管生成的作用,其中以 VEGF 应用最为广泛。

VEGF 是目前已知最强的血管生成诱导剂,它可以特异性地作用于内皮细胞,促进内皮细胞增殖和血管形成,促进内皮祖细胞分化为 ECs。有学者将 VEGF 用于神经组织工程研究中,将携带 VEGF₁₆₅ 基因的质粒或病毒载体植入组织内,但该方法不能在局部缓释而起到有效的诱导血管生成作用^[37]。VEGF 的使用可促进血管生成,但因半衰期短,局部直接应用效果欠佳。采用合适的基因转染技术将 VEGF 基因转染到细胞中,使细胞持续表达具有生物活性的生长因子^[38],可以促进新生血管形成,加速神经修复与重建。

6 展望

目前,组织工程周围神经血管化方面的研究,主要集中于利用各种生长因子、成血管细胞、支架材料表面修饰、基因转染生长因子技术、血管植入等技术来促进神经移植血管形成。但每种方法均有一定局限性,都不能完美解决组织工程周围神经血管化的问题。VEGF₁₆₅ 基因与 EPCs 联合应用能够达到事半功倍的效果。因此,我们认为,采用转染技术将 VEGF₁₆₅ 基因转染 EPCs,并与 ADSCs 诱导后的类雪旺细胞共同作为神经组织工程种子细胞,能够促进组织工程周围神经早期血管化,进而提高动物体内神经移植修复效果。

作者贡献:赵斌负责科研实施及文章撰写,马剑雄负责文献检索,马信龙负责科研设计及指导。

利益冲突:所有作者声明,在本课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突,经费支持没有影响文章观点。

参考文献

- Bădoi SC, Lascăr I, Enescu DM. Peripheral nerve allografting-why and how? *Chirurgia (Bucur)*, 2014, 109(5): 584-589.
- Fowler JR, Lavasani M, Huard J, *et al.* Biologic strategies to improve nerve regeneration after peripheral nerve repair. *J Reconstr Microsurg*, 2015, 31(4): 243-248.
- Kian Kwan Oo K, Chen Ong W, Hui Chi Ang A, *et al.* Tissue engineered prefabricated vascularized flaps. *Head Neck*, 2007, 29(5): 458-464.
- Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, *et al.* The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of microvascular networks: a review. *Biomaterials*, 2005, 26(14): 1857-1875.
- Arslantunali D, Dursun T, Yucler D, *et al.* Peripheral nerve conduits: technology update. *Med Devices (Auckl)*, 2014, 7: 405-424.
- Merle M, Dautel G. Vascularised nerve grafts. *J Hand Surg (Br)*, 1991, 16(5): 483-488.
- Vargel I. Impact of vascularization type on peripheral nerve microstructure. *J Reconstr Microsurg*, 2009, 25(4): 243-253.
- 黄涛, 秦建强, 刘大庸, 等. 外周神经损伤后许旺细胞激活巨噬细胞的实验研究. *中华显微外科杂志*, 2002, 25(3): 192-193.
- 高宏阳, 韩金豹, 刘新晖, 等. 血管化同种异体神经复合体桥接修复兔坐骨神经缺损的实验研究. *河北医科大学学报*, 2013, 34(10): 1132-1136.
- Wang G, Hu X, Lin W, *et al.* Electrospun PLGA-silk fibroin-collagen nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47(3): 234-240.
- Zhang YG, Huang JH, Hu XY, *et al.* Omentum-wrapped scaffold with longitudinally oriented micro-channels promotes axonal regeneration and motor functional recovery in rats. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29184.
- Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(8): 434-441.
- 王岚, 邢新, 沈尊理. 人工神经血管化研究的进展. *组织工程与重建外科杂志*, 2009, 5(1): 49-51.
- Bauer-Kreisel P, Goepferich A, Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(7-8): 798-813.
- Chiu YC, Cheng MH, Engel H, *et al.* The role of pore size on vascularization and tissue remodeling in PEG hydrogels. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 6045-6051.
- Bai F, Wang Z, Lu J, *et al.* The correlation between the internal structure and vascularization of controllable porous bioceramic materials *in vivo*: a quantitative study. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(12): 3791-3803.
- Sun J, Wang Y, Qian Z, *et al.* An approach to architecture 3D scaffold with interconnective microchannel networks inducing angiogenesis for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(11): 2565-2571.
- Kemp SW, Syed S, Walsh W, *et al.* Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association, and neovascularization compared to silicone conduits. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(8): 1975-1988.
- 蒋良福, 陈鸥, 虞庆, 等. 预血管化组织工程神经修复周围神经缺损的研究. *中华手外科杂志*, 2014, 30(3): 216-219.
- Gott VL, Whiffen JD, Dutton RC. Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science*, 1963, 142(3597): 1297-1298.
- Cardin AD, Jackson RL, Sparrow DA, *et al.* Interaction of glycosaminoglycans with lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, 556: 186-193.
- Zhao B, Zhao Z, Ma J, *et al.* Modulation of angiogenic potential of tissue-engineered peripheral nerve by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Neurosci Lett*, 2019, 705: 259-264.
- 李宗超, 韦章超, 刘勇, 等. 基质细胞衍生因子1对于血管内皮细胞增殖影响及其相关机制研究. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(1): 91-97.
- 刘春晓, 吴欢欢, 马慧雨, 等. 人骨髓间充质干细胞与脐静脉内皮细胞体外共培养的研究. *组织工程与重建外科杂志*, 2011, 7(2): 65-69, 84.
- Rana D, Kumar A, Sharma S. Endothelial progenitor cells as molecular targets in vascular senescence and repair. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(6): 438-446.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- Goerke SM, Obermeyer J, Plaha J, *et al.* Endothelial progenitor cells from peripheral blood support bone regeneration by provoking an angiogenic response. *Microvasc Res*, 2015, 98: 40-47.
- Kamei N, Atesok K, Ochi M. The use of endothelial progenitor cells for the regeneration of musculoskeletal and neural tissues. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 1960804.
- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, *et al.* Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2003, 108(20): 2511-2516.
- 张静, 易阳艳, 阳水发, 等. 脂肪干细胞来源外泌体对人脐静脉血管内皮细胞增殖、迁移及管样分化的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(10): 1351-1357.
- Pang H, Wu XH, Fu SL, *et al.* Prevascularisation with endothelial progenitor cells improved restoration of the architectural and functional properties of newly formed bone for bone reconstruction. *Int Orthop*, 2013, 37(4): 753-759.
- Zigdon-Giladi H, Khoury N, Evron A. Adult stem cells in the use of jaw bone regeneration: current and prospective research. *Quintessence Int*, 2015, 46(2): 125-131.
- Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg*, 1976, 57(4): 413-426.
- Cavadas PC, Vera-Sempere FJ. Prefabrication of a vascularized nerve graft by vessel implantation: preliminary report of an experimental model. *Microsurgery*, 1994, 15(12): 877-881.
- Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, *et al.* Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res*, 1997, 67(2): 147-154.
- 周建生, 唐兆前, 肖玉周, 等. 大网膜包裹人工神经移植体再血管化及神经再生的研究. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(8): 797-800.
- Rui J, Dadsetan M, Runge MB, *et al.* Controlled release of vascular endothelial growth factor using poly-lactic-co-glycolic acid microspheres: *in vitro* characterization and application in polycaprolactone fumarate nerve conduits. *Acta Biomater*, 2012, 8(2): 511-518.
- Feng L, Wu H, E L, *et al.* Effects of vascular endothelial growth factor 165 on bone tissue engineering. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82945.

收稿日期: 2019-02-17 修回日期: 2019-06-22

本文编辑: 王雁