

组织工程血管构建过程中平滑肌细胞增殖变化及代谢模式

梅静怡¹, 刘江², 肖聪¹, 刘鹏³, 周浩浩³, 林展翼^{2, 3, 4}<https://doi.org/10.12307/2024.116>

投稿日期: 2023-02-10

采用日期: 2023-03-22

修回日期: 2023-04-13

在线日期: 2023-05-06

中图分类号:

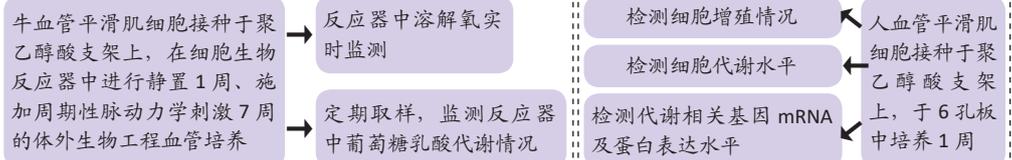
R459.9; R394.2; R318.6

文章编号:

2095-4344(2024)07-01043-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 生物血管组织构建过程中细胞耗氧特征与营养物质代谢



结论:

- (1) 三维培养早期, 平滑肌细胞利用有氧糖酵解维持快速增殖, 氧气消耗量较低;
- (2) 三维支架材料上细胞增殖趋于稳定后, 重构过程主要采用好氧代谢方式, 氧气消耗量较高。

文题释义:

动物细胞生物反应器: 是利用生物工程学技术在体外可控制性为细胞提供稳定的生长环境与适宜的物理刺激的装置, 可实现无菌长时程培养、物理刺激参数可调、培养过程可实时监控等多重功能, 用于生物合成反应或生物转化过程。

周期性脉动力学刺激: 将血管平滑肌细胞培养于三维可降解聚合物环状支架并固定在硅胶管上, 通过施加脉动灌注对硅胶管产生的应变作为机械刺激传递给种子细胞, 促进胶原蛋白和弹性蛋白的分泌、纤维排列和胶原交联。体外组织工程血管培养全周期包括1周的静置期和7周脉动张应力刺激加载。

摘要

背景: 将种子细胞接种于三维支架材料上然后在生物反应器中进行三维培养是一种常见的体外组织工程培养手段, 但是生物工程血管构建过程中的细胞增殖变化及代谢模式尚不清楚。

目的: 探究利用体外生物反应器进行生物血管组织构建过程中细胞耗氧等代谢变化及其原因。

方法: 以自主搭建的血管生物反应器系统为平台, 牛血管壁平滑肌细胞为种子细胞, 常规CO₂培养箱提供培养过程的外部气体环境。将种子细胞接种于管状多孔的聚乙醇酸支架材料上进行三维培养, 全过程包括1周的静置期和7周脉动张应力刺激加载期。搭建一套非侵入式监测体系, 采用光学溶解氧贴片法监测反应器中培养液溶解氧变化, 并通过定期取样测定葡萄糖消耗量及乳酸生成量。采用CCK-8检测平滑肌细胞在聚乙醇酸三维支架材料上增殖情况, 通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的氧化态与还原态比值(NAD⁺/NADH)了解培养早期阶段细胞增殖与代谢状况, 采用RT-qPCR、Western blot方法检测增殖相关基因(Ki67)及糖酵解相关基因(GLUT-1、LDHA)的表达。

结果与结论: ①从细胞加注到静置期结束(第1周)培养液的溶解氧水平为(4.314±0.380) mg/L, 张应力刺激加载后(后7周)溶解氧水平逐步稳定在(1.960±0.866) mg/L, 两者有明显变化(P < 0.05); ②细胞培养液中乳酸生成量与葡萄糖消耗量的比值Y_{L/G}在加注细胞后快速升高, 第5天最高值高于1, 随后缓慢下降至0.5(静置期Y_{L/G}均值为0.89, 加压期均值为0.57, P < 0.05); ③CCK-8检测显示A₄₅₀值在细胞加注之后逐渐增大, 第5天达到最高值3.17, 之后缓慢下降; 同时发现Ki67 mRNA在培养第3天上调最显著, 之后下降, Ki67蛋白在第3-5天的相对表达量较高; ④细胞加注后第5-7天NAD⁺/NADH明显升高, 糖酵解相关基因(GLUT-1、LDHA)表达上调同步改变, 前5 d相对表达量较高; ⑤结果提示: 利用血管生物反应器构建组织工程血管早期, 平滑肌细胞以增殖为主并呈现一种低耗氧的代谢特征, 在脉动张应力刺激阶段呈现耗氧较高的代谢特征。

关键词: 生物反应器; 组织工程; 血管平滑肌细胞; 聚乙醇酸; 溶解氧; 细胞增殖; 有氧糖酵解

Proliferation and metabolic patterns of smooth muscle cells during construction of tissue-engineered blood vessels

Mei Jingyi¹, Liu Jiang², Xiao Cong¹, Liu Peng³, Zhou Haohao³, Lin Zhanyi^{2, 3, 4}

¹School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; ²Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ³Ji Hua Institute of Biomedical Engineering Technology (Ji Hua Laboratory), Foshan 528200, Guangdong Province, China; ⁴School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

华南理工大学, ¹生物科学与工程学院, ⁴医学院, 广东省广州市 510006; ²南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院), 广东省广州市 510080; ³先进制造科学与技术广东省实验室(季华实验室), 广东省佛山市 528200

第一作者: 梅静怡, 女, 1998年生, 安徽省泾县人, 汉族, 华南理工大学在读硕士, 主要从事小口径血管组织工程研究。

通讯作者: 林展翼, 博士, 主任医师, 教授, 南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院), 广东省广州市 510080; 先进制造科学与技术广东省实验室(季华实验室), 广东省佛山市 528200; 华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006

<https://orcid.org/0000-0002-0961-2009> (林展翼)

基金资助: 先进制造科学与技术广东省实验室(季华实验室)科研项目: 动静脉造瘘血管移植体外工程化培养的装置研制(X210111TD210), 项目负责人: 林展翼

引用本文: 梅静怡, 刘江, 肖聪, 刘鹏, 周浩浩, 林展翼. 组织工程血管构建过程中平滑肌细胞增殖变化及代谢模式[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(7):1043-1049.



Mei Jingyi, Master candidate, School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Corresponding author: Lin Zhanyi, MD, Chief physician, Professor, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Ji Hua Institute of Biomedical Engineering Technology (Ji Hua Laboratory), Foshan 528200, Guangdong Province, China; School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Seed cells are seeded on three-dimensional scaffold materials, and three-dimensional culture in bioreactors is a common *in vitro* tissue engineering culture method, but the changes in cell proliferation and metabolic patterns in bioengineered blood vessel construction are still unclear.

OBJECTIVE: To explore the metabolic changes of cells such as oxygen consumption and their causes during the whole process of biological vascular tissue construction by *in vitro* bioreactor.

METHODS: The self-built vascular bioreactor system was used as the platform; bovine vascular smooth muscle cells were used as the seed cells, and a conventional CO₂ incubator provided the external gas environment for the cultivation process. Seed cells were seeded on a tubular porous polyglycolic acid scaffold material for three-dimensional culture, and the whole process included a one-week resting period and a seven-week pulsating tensile stress stimulation loading period. A non-invasive monitoring system was built, and the optical dissolved oxygen patch method was used to monitor the changes of dissolved oxygen in the culture solution in the reactor, and the glucose consumption and lactic acid production were measured by regular sampling. CCK-8 assay was used to determine the proliferation of smooth muscle cells on polyglycolic acid three-dimensional scaffold materials. Nicotinamide adenine dinucleotide oxidation state and reduction state ratio (NAD⁺/NADH) was utilized to understand cell proliferation and metabolism in the early stage of culture. RT-qPCR and western blot assay were applied to detect the expression of proliferation-related genes (*Ki67*) and glycolysis-related genes (*GLUT-1*, *LDHA*).

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The dissolved oxygen level in the culture solution was (4.314±0.380) mg/L from the cell injection to the end of the resting period (the first week), and gradually stabilized at (1.960±0.866) mg/L after the tensile stress stimulation (the last seven weeks); the two had significant changes ($P < 0.05$). (2) The ratio of glucose consumption to lactic acid production in the cell culture medium $Y_{L/G}$ increased rapidly after the cells were injected, and the highest value was above 1 on the fifth day, and then slow down to 0.5 (The mean value of $Y_{L/G}$ in the resting period was 0.89 and the mean value in the pressurized period was 0.57, $P < 0.05$). (3) CCK-8 assay results showed that A_{450} value gradually increased after the cells were injected, and reached the highest value on the fifth day, reaching 3.17, and then slowly decreased. At the same time, it was found that *Ki67* mRNA was up-regulated on the third day of culture, and then declined. The expression level of *Ki67* protein was higher from the third day to the fifth day. (4) The detection of NAD⁺/NADH showed that the increase was obvious from the fifth to the seventh day after the injection of cells, and the expression of glycolysis-related genes (*GLUT-1* and *LDHA*) was up-regulated and changed synchronously, and the relative expression was higher in the first five days. (5) The results showed that the tissue-engineered blood vessels were constructed using the vascular bioreactor and the smooth muscle cells in the early stage mainly proliferated and exhibited a metabolic feature of low oxygen consumption. The metabolic characteristics of high oxygen consumption were observed during the pulsatile tensile stress stimulation stage.

Key words: bioreactor; tissue engineering; vascular smooth muscle cell; polyglycolic acid; dissolved oxygen; cell proliferation; aerobic glycolysis

Funding: a grant from Ji Hua Institute of Biomedical Engineering Technology (Ji Hua Laboratory), No. X210111TD210 (to LZ Y)

How to cite this article: MEI JY, LIU J, XIAO C, LIU P, ZHOU HH, LIN ZY. Proliferation and metabolic patterns of smooth muscle cells during construction of tissue-engineered blood vessels. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(7):1043-1049.

0 引言 Introduction

目前自体血管仍然是心脏搭桥及肾透析动静脉造瘘等手术的主要移植来源, 业内期待小口径血管的人工制造技术不断突破, 希望获得理想移植材料以满足临床巨大需求^[1-2]。利用体外血管生物反应器进行生物血管构建的技术已经逐步成熟, 美国耶鲁大学 Laura E. Niklason 教授参与创建的 Humocyte 公司产品, 日前完成动静脉造瘘血管移植的临床 III 期试验^[3-4], 正等待商品上市许可, 其相关技术主要包括培养支架与种子细胞选择、仿生生物反应器培养环境控制 3 大要素^[5], 后者包括力学加载、氧张力、营养物质和代谢废物去除等内容^[3, 6-7]。

血管平滑肌细胞在无纺布聚乙醇酸支架材料提供的管状多孔三维环境中, 经历早期复苏、增殖和分泌的过程^[8], 其后在脉动张应力刺激下进一步分泌细胞外基质并不断进行组织重构, 最终获得具有手术缝合所需力学性能的生物血管移植材料^[9-10]。适宜氧体积分数是细胞完成其生物学行为的基本条件之一^[11], 而细胞也会根据不同氧气环境调整自身功能状态。适宜氧环境是细胞培养的理想仿生环境^[12], 也是改进生物反应器技术和未来降低构建成本的关键内容之一。目前, 关于血管培养装置研究以及生物反应器条件下种子细胞的全周期生物行为变化及构建条件要求的研究较少^[13-14]。

基于上述技术原理, 作者团队已成功自主搭建了一套完整的脉动式血管生物反应器, 实现长达 8 周的小口径组织工程血管构建^[15]。为了进一步改进培养的技术条件, 该研

究将通过非侵入式、可满足全周期培养监测的溶解氧监测体系, 探讨三维培养全过程中细胞耗氧特征与营养物质代谢情况, 同时对种子细胞在聚乙醇酸多孔材料上早期阶段的变化做进一步研究, 探究细胞增殖与代谢类型变化对氧气需求的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 三维培养组织工程构建及体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 12 月至 2022 年 12 月在佛山季华实验室 B1-201 室完成。

1.3 材料 聚乙醇酸支架 (Biofelt, 美国); Pharmed BPT 管 (Westlake, 美国); 光学溶解氧贴片 PSt3 (Presens, 德国); DMEM/F12 培养基 (Corning, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); CCK-8 (同仁, 日本); 葡萄糖试剂盒 (南京建成, 中国); 乳酸试剂盒 (南京建成, 中国); NAD⁺/NADH 试剂盒 (Beyotime, 中国); Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, 日本); TB Green Premix Ex Taq™ II (Takara, 日本); 无核酶水 (Thermo, 美国); 总蛋白提取液 (中国, 贝博); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国); 10% 预制胶 (天地人和, 中国); 蛋白 marker-ladder (Thermo, 美国); LDHA 抗体 (Cell Signaling Technology, 美国); GLUT-1 抗体 (Proteintech, 美国); Ki67 抗体 (Abcam, 英国); HRP Goat anti-mouse IgG (Abbkine, 美国); HRP Goat anti-rabbit IgG (Abbkine, 美国); TBS 粉末 (Boster, 中国); PVDF 膜 (Merck

Millipore, 德国); ECL 化学发光底物试剂盒 (Biosharp, 中国); PCR 仪 (BIO-RAD, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (耶拿, 德国); 全波长酶标仪 (奥盛, 中国); 高分辨均发射扫描电镜 (Zeiss, 德国); 化学发光成像仪 (Tanon5200, 中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 血管平滑肌细胞的培养 ①牛血管平滑肌细胞的培养: 自屠宰场取成年普通牛主动脉血管, 用镊子分离出血管壁的三层结构, 去除外膜与内膜, 保留中膜组织, 剪成小块贴于培养皿中, 加入含体积分数 20% 胎牛血清以及必要生长因子的 DMEM/F12 培养液, 将其置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中静置 1 周待细胞爬出后进行传代, 每 3 d 换液 1 次。取 3-5 代细胞用于后续实验使用, 血管平滑肌细胞具有贴壁的生长特性, 细胞呈长纺锤状生长。②人血管平滑肌细胞的培养: 取自临床上人主动脉, 分离培养方法与牛血管平滑肌细胞相同。实验已通过广东省人民医院 (广东省医学科学院) 医学伦理委员会批准, 伦理号为 2019285H(R1)。供者对实验知情同意。

1.4.2 生物反应器内非侵入式溶解氧监测体系的构建 实验所用生物反应器如图 1 所示, 具体操作方法见文献报道^[14]。反应器主体为 550 mL 玻璃瓶, 硅胶塞盖上设计有 16 号 BPT 管并接有 0.22 μm 空气过滤塞, 用于内外气体交换。整个三维培养体系由力学刺激加压管路和溶解氧监测回路组成, 光学传感器贴片直径约为 5 mm, 在体积分数 75% 乙醇中消毒 20 min 并用无菌 PBS 漂洗, 再通过硅胶胶水粘贴到反应器瓶内壁, 将容器放在黑暗的地方, 让硅胶固化至少 12 h。荧光涂层与培养液直接接触, 光纤探头置于反应器外并固定以紧贴传感器贴片, 尽管二者不直接接触, 荧光信号仍可透过玻璃瓶传递, 以实现无创非侵入式监测。贴片粘贴高度与血管高度齐平, 以消除不同液面高度对溶解氧监测数值的影响。荧光淬灭波长信号通过 Pof 光纤连接到信号转换器 OXY-1 SMA(-trace)-RS485M-AO-BT 后通过 USB 连接到电脑, 每隔 30 min 通过 PreSens Measurement Studio 2 软件收集来自贴片的数据, 数据曲线实时可见。传感器贴片可重复使用, 可通过高温高压和环氧乙烷进行消毒灭菌, PSt3 贴片已预校正, 使用前只需在软件中输入预校正参数即可, 且重复使用后也无需校正。取第 3-5 代牛血管平滑肌细胞, 以 6.67×10⁹ L⁻¹ 的细胞接种浓度向每根环状聚乙醇酸支架材料上滴加 900 μL 细胞悬液, 静置 1 周后, 通过蠕动泵施加脉动灌注对硅胶管产生的应变作为机械刺激传递给种子细胞, 反应器运行包括 1 周静置期与 7 周的加压期, 静置期静水压为 10 mmHg, 加压后的脉动张应力峰值为 120 mmHg, 蠕动泵加压频率为 165 次/min。为期 8 周的三维培养过程中定期取样, 测定培养基中葡萄糖及乳酸的代谢情况。

1.4.3 葡萄糖消耗量 / 乳酸生成量测定 在三维培养全周期期间, 间隔两三天收集 1 次培养基, 经 1 000 r/min 离心 10 min 收集上清液作为待测样品, 以避免细胞碎片的影响, 再用生理盐水稀释 2 倍备用。①葡萄糖消耗量测定: 96 孔板每

孔中加入待测样品 2.5 μL, 工作液 250 μL, 轻轻振荡孔板, 37 °C 恒温孵育 10 min, 酶标仪检测波长 505 nm 处各孔吸光度并计算葡萄糖浓度。②乳酸生成量测定: 将酶贮备液和稀释液以 1 : 100 混合配制工作液, 现用现配。将试剂四粉剂转入试剂三中配成显色剂。每孔中依次加入待测样品 20 μL, 1 mL 酶工作液, 显色剂 200 μL, 混匀, 37 °C 水浴准确反应 10 min, 每管加入终止剂 2 mL, 涡旋混匀, 96 孔板中每孔加入上述混合物 200 μL, 每组设置 6 个复孔, 使用酶标仪于主波长 530 nm、副波长 625 nm 检测各孔吸光度并计算乳酸浓度。

1.4.4 反应器外细胞三维培养实验分组 将聚乙醇酸材料剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的大小, 用 1 mol/L NaOH 浸泡 75 s, 再用无菌 PBS 漂洗 3 次, 每次 2 min。超净工作台通风 1 h, 再将处理后的聚乙醇酸材料在体积分数 95% 乙醇中浸泡 2 h, 夹出后用无菌棉签吸去残留乙醇, 然后放入非组织培养改性处理的 6 孔板中, 在超净工作台上通风 2 h。取第 3-5 代人血管平滑肌细胞, 待聚乙醇酸充分吹干后以 6.67×10⁹ L⁻¹ 的细胞接种浓度向每片聚乙醇酸材料上滴加细胞悬液 20 μL, 接种后倒扣 6 孔板以避免细胞贴壁于 6 孔板底面, 静置三四个小时后, 加入含体积分数为 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基, 放入普通恒温培养箱中静置培养, 在第 1, 3, 5, 7, 9 天进行收样。

1.4.5 CCK-8 检测 第 0, 1, 3, 5, 7, 9 天从培养箱中取出 6 孔板, 移除培养基后, 重新添加含有 100 μL CCK-8 溶液的 1 000 μL 新鲜培养基, 再放入培养箱中孵育 2 h。将 6 孔板中的液体吸出移入新的 96 孔板中, 使用酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度值。

1.4.6 扫描电镜观察 通过扫描电镜观察聚乙醇酸支架的孔隙结构及细胞黏附情况。将固化后的聚乙醇酸组织块于 -20 °C 冰箱中冷冻, 通过冷冻真空干燥机冻干来制备样品。将干燥的样品放置于载物台暴露其截面, 在 20 mA 电流下用金溅射涂层 70 s, 使用扫描电镜在 5.0 kV 的加速电压下观察样品。

1.4.7 NAD⁺/NADH 指标测定 NAD⁺ 是电子受体, 而 NADH 是电子供体, 细胞内 NAD⁺/NADH 氧化还原状态反映了细胞通过线粒体中的氧化磷酸化和胞质溶胶中的糖酵解产生 ATP 能量的代谢平衡^[16-17]。

第 0, 1, 3, 5, 7, 9 天收集含有聚乙醇酸和细胞的样本, 用 200 μL 冷提取液裂解细胞, 12 000×g、4 °C 离心 10 min, 取上清备用。将 10 mmol/L 的 NADH 标准品用提取液稀释成 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μmol/L 浓度梯度, 检测时 96 孔板中每孔加入 20 μL 的标准品。为了测量 NADH 的量, 将裂解的细胞悬液在 60 °C 水浴孵育 30 min 使 NAD⁺ 全部分解而只保留 NADH, 然后取 20 μL 添加到 96 孔板中; 随后, 每孔加入 90 μL 乙醇脱氢酶并在 37 °C 下避光孵育 10 min; 最后, 每孔加入 10 μL 显色液, 并将混合物在 37 °C 下避光孵育 30 min, 在 450 nm 处测量吸光度值。NAD⁺ 的量是通过从总 NAD⁺ 与 NADH 中减去 NADH 得到的。

1.4.8 RT-qPCR 使用 Trizol 试剂抽提三维培养第 1, 3, 5, 7 天的细胞总 RNA, 然后检测 RNA 的量和纯度, 使用 NanoDropND-1000 检测 A_{260}/A_{280} 的比值, 每个样本取 1 μg RNA, 根据反转录试剂盒的使用说明书进行反转录为 20 μL cDNA。以 cDNA 为模板, 分别扩增增殖相关基因 (*Ki67*) 和糖酵解相关基因 (*GLUT-1*、*LDHA*), 以 *GAPDH* 为内参基因。两步法 PCR 扩增的标准程序为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 1 个循环; PCR 反应: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。引物序列见表 1。

表 1 | RT-qPCR 基因引物序列

Table 1 | Primer sequences for RT-qPCR

基因	引物序列
<i>Ki67</i>	F: 5'-CTG CAA CAT GGA AGG TAT TGC-3' R: 5'-GGC TCA TAT CCC ATC AAT TCG GT-3'
<i>GLUT-1</i>	F: 5'-CTG CTC ATC AAC CGC AAC-3' R: 5'-CTT CTT CTC CCG CAT CAT CT-3'
<i>LDHA</i>	F: 5'-AGC CCG ATT CCG TTA CCT-3' R: 5'-CAC CAG CAA CAT TCA TTC CA-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' R: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

1.4.9 Western blot 收集三维培养第 1, 3, 5, 7 天的细胞, 用预冷 PBS 洗涤 3 次后加入全蛋白裂解液, 冰上裂解 60 min, 提取样本总蛋白, BCA 法检测各组样本蛋白浓度, 按每孔 15 μg 蛋白进行凝胶电泳, 然后转膜至 PVDF 膜上, 5%BSA 室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 随后加入相应一抗 (*Ki67*、*GLUT-1*、*LDHA* 一抗, 稀释比例分别为 1 : 1 000, 1 : 4 000, 1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 第 2 天回收一抗, TBST 洗膜 3 次后加入相应二抗 (稀释比例均为 1 : 20 000), 常温避光孵育 1 h, TBST 再次洗膜 3 次, 利用增强型化学发光试剂检测显影, 使用 ImageJ 软件进行灰度值定量分析, 以 *GAPDH* 作为内参。

1.5 主要观察指标 ①反应器内溶解氧水平; ②葡萄糖消耗量 / 乳酸生成量与 NAD^+/NADH 指标测定血管平滑肌细胞代谢情况; ③ RT-qPCR 检测三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞内 *Ki67*、*GLUT-1*、*LDHA* 的 mRNA 表达水平; ④ Western blot 检测三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞内 *Ki67*、*GLUT-1*、*LDHA* 的蛋白表达水平。

1.6 图片处理与统计学分析 GraphPad Prism 用于进行所有统计分析。RT-qPCR 和 Western blot 实验重复进行 3 次。每组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 遵循正态分布和方差齐的两组, 采用非匹配比 *t* 检验; 服从正态分布的两组数据, 采用非参数检验; 多组数据的比较采用 one-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。使用 ImageJ 软件对 PVDF 膜上的条带进行灰度值分析。文章统计学方法已经广东省人民医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 血管生物反应器中溶解氧全周期的变化曲线与代谢情况 反应器瓶塞上接有 0.22 μm 空气过滤塞与外界进行气体交换,

故反应器内气体氧体积分数与培养箱环境一致, 均为 21%。将反应器置于磁力搅拌器之上, 转子转速为 20 r/min, 内装有 500 mL 培养基, 其余反应体系均与培养状态一致时, 在未接种细胞情况下, 培养基内饱和溶解氧维持在 6.23 mg/L, 停止搅拌一段时间后培养基内饱和溶解氧维持在 1.80 mg/L。反应器内测得溶解氧与饱和溶解氧之差代表反应器内细胞氧气消耗量, 二者差值越大, 表明反应器中的细胞需氧量越大。

三维培养静置第 1 周时溶解氧基本一致, 稳定在 (4.314 \pm 0.380) mg/L 水平, 1 周后施加力学刺激后逐步稳定在 (1.960 \pm 0.866) mg/L 左右, 见图 2A, B, 2 个时期溶解氧水平有显著差异 ($P < 0.000 1$)。

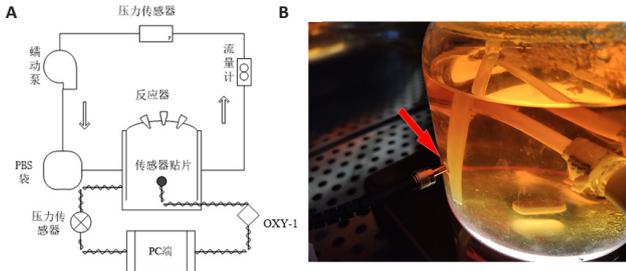
葡萄糖消耗量及乳酸生成量之比 $Y_{L/G}$ 常被用来反映细胞代谢类型变换, $Y_{L/G}$ 越趋向于 0, 则细胞以好氧代谢为主, $Y_{L/G}$ 越趋向于 2, 则细胞以厌氧代谢为主^[18-19]。实验结果表明, 加注细胞后, 细胞培养液中 $Y_{L/G}$ 快速升高, 第 5 天最高值接近 1, 随后缓慢下降至 0.5, 静置期内 $Y_{L/G}$ 为 0.895 \pm 0.239, 而加压期 $Y_{L/G}$ 为 0.566 \pm 0.101, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

上述结果提示, 从细胞加注开始到静置 1 周结束, 反应器中的细胞处于快速增殖状态, 具有有氧糖酵解的趋势, 主要采用的是厌氧代谢方式, 大量消耗葡萄糖, 产生乳酸, 此时对氧气的需求不高, 故测得的培养基中溶解氧水平较高, 见图 2C, D。静置 1 周后 $Y_{L/G}$ 逐渐趋向于 0, 反应器内细胞数目趋于稳定, 力学刺激加载促进细胞外基质重塑, 采用的是好氧代谢方式, 对氧气的需求较高, 故测得的培养基中溶解氧水平较低。

2.2 三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞的增殖情况 三维培养第 0, 1, 3, 5, 7, 9 天, CCK-8 检测结果表明, 血管平滑肌细胞滴注到聚乙醇酸支架上前 5 d, 一直处于增殖状态且增殖速度较快, 5 d 后增殖速度明显放缓, 见图 3A。细胞接种于聚乙醇酸材料后第 5 天的扫描电镜图, 见图 3B, 图中管状材料即为聚乙醇酸支架。第 1, 3, 5, 7 天, RT-qPCR 检测结果可见第 3 天时 *Ki67* mRNA 表达上调最显著, 第 3, 5 天时 *Ki67* mRNA 表达显著高于第 7 天 ($P < 0.05$), 见图 3C。Western blot 结果显示, 前 5 d 血管平滑肌细胞中 *Ki67* 蛋白表达量较高, 均显著高于第 7 天, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 3D, E。

2.3 三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞的代谢情况 三维培养第 0, 1, 3, 5, 7, 9 天分别取样测定葡萄糖消耗量与乳酸生成量, 由表 2 可见, 葡萄糖消耗量与乳酸生成量均随时间增加而增加, 二者比值 $Y_{L/G}$ 则先升高, 到第 7 天时降低。实验结果表明初期细胞具有有氧糖酵解的趋势, 主要采用厌氧代谢方式, 大量消耗葡萄糖产生乳酸, 以完成细胞快速增殖。待细胞数目趋于稳定后, 细胞更多采用好氧代谢方式, 这与反应器中三维培养的代谢分析结果基本一致。

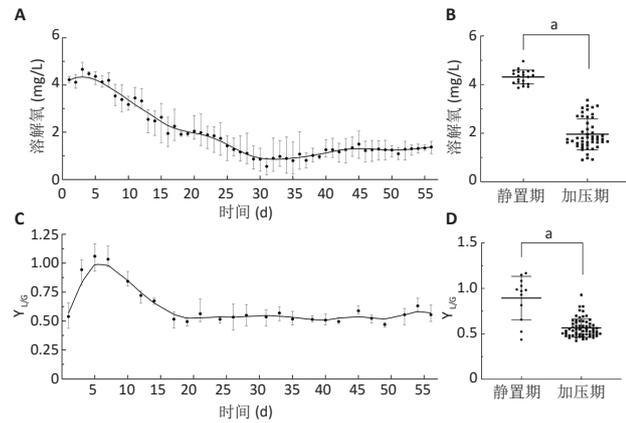
在有氧糖酵解发生时, 乳酸脱氢酶将细胞质中的 NADH 氧化为 NAD^+ , 导致细胞内 NAD^+ 水平升高^[20], 故 NAD^+/NADH



图注：图 A 为生物反应器体系示意图；B 为反应器上非侵入式溶解氧监测实物图，红色箭头所指即为溶解氧贴片与光纤接触点

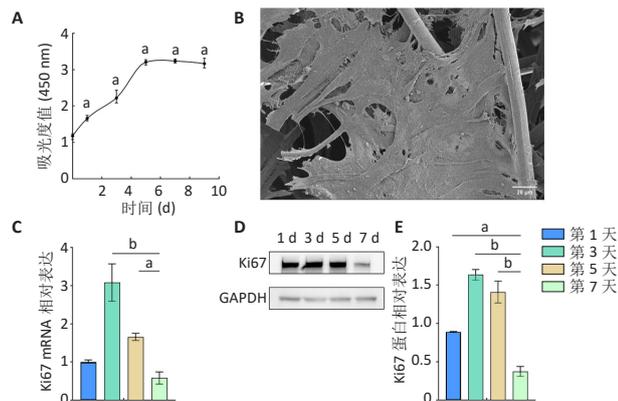
图 1 | 血管生物反应器平台及非侵入式溶解氧监测体系

Figure 1 | Vascular bioreactor platform and non-invasive dissolved oxygen monitoring system



图注：图 A 为 8 周培养全周期溶解氧变化趋势；B 为静置 1 周与加压 7 周的溶解氧数据分布对比图， $^aP < 0.0001$ ；C 为 8 周培养全周期葡萄糖消耗量及乳酸生成量之比 Y_{UG} 变化趋势；D 为静置 1 周与加压 7 周的 Y_{UG} 数据分布对比图， $^aP < 0.0001$

图 2 | 血管生物反应器中溶解氧与细胞代谢全周期变化曲线
Figure 2 | Total cycle variation curves of dissolved oxygen and cell metabolism in vascular bioreactor



图注：图 A 为 CCK-8 检测结果，与第 0 天相比， $^aP < 0.001$ ；B 为增殖期细胞扫描电镜图，标尺为 20 μm ；C 为 Ki67 的 mRNA 相对表达量， $^aP < 0.05$ ， $^bP < 0.001$ ；D 为聚乙醇酸材料上细胞内 Ki67 的蛋白表达；E 为 Ki67 的蛋白相对表达量， $^aP < 0.01$ ， $^bP < 0.0001$

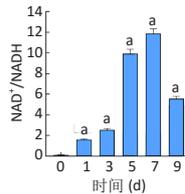
图 3 | 三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞的增殖情况
Figure 3 | Proliferation of smooth muscle cells on a three-dimensional polyglycolic acid scaffold

NADH 指标可反映有氧糖酵解水平。由图 4 可知 NAD^+/NADH 随时间增加而升高，并在第 7 天达到峰值，表明有氧糖酵解在前 7 d 处于较高水平，这与葡萄糖代谢分析结果一致。

表 2 | 三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞的代谢情况
Table 2 | Metabolism of smooth muscle cells on a three-dimensional polyglycolic acid scaffold

时间间隔	葡萄糖消耗量 (mg/L)	乳酸生成量 (mg/L)	Y_{UG}
1 d	101.62±9.09	45.19±7.53	0.45±0.03
3 d	188.12±17.86	230.68±22.70	1.23±0.14
5 d	380.18±52.00	429.92±19.14	1.13±0.13
7 d	1 087.77±122.78	825.42±11.02	0.76±0.09
9 d	970.66±29.08	532.67±11.71	0.55±0.03

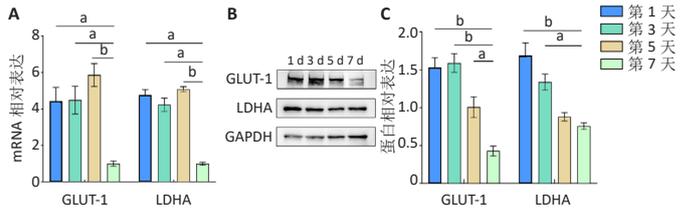
表注： Y_{UG} 为乳酸生成量与葡萄糖消耗量的比值



图注：与第 0 天相比， $^aP < 0.01$
图 4 | 平滑肌细胞内 NAD^+/NADH 水平随时间变化情况

Figure 4 | Changes in NAD^+/NADH levels in smooth muscle cells over time

2.4 三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞内代谢相关基因 *GLUT-1* 与 *LDHA* 的表达 三维培养第 1, 3, 5, 7 天，利用 RT-qPCR 检测结果表明，前 5 d 血管平滑肌细胞中 *GLUT-1*、*LDHA* 的 mRNA 表达较高，且都显著高于第 7 天，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 5A。Western blot 结果显示，前 5 d 聚乙醇酸支架上血管平滑肌细胞内 *GLUT-1*、*LDHA* 蛋白表达较高，且都显著高于第 7 天，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 5B、C。



图注：图 A 为 *GLUT-1*、*LDHA* 的 mRNA 相对表达量， $^aP < 0.01$ ， $^bP < 0.001$ ；B 为 *GLUT-1*、*LDHA* 的蛋白表达；C 为 *GLUT-1*、*LDHA* 的蛋白相对表达量， $^aP < 0.01$ ， $^bP < 0.0001$

图 5 | 三维聚乙醇酸支架上平滑肌细胞内代谢相关基因 *GLUT-1* 与 *LDHA* 的表达

Figure 5 | Expression of metabolism-related gene *GLUT-1* and *LDHA* in smooth muscle cells on a three-dimensional polyglycolic acid scaffold

3 讨论 Discussion

通过融合了细胞生物学、生理学和工程学的组织工程技术，构建在血管修复和置换中真正发挥作用的人体组织，可以避免自体动静脉旁路移植来源有限且存在二次创伤等风险，具有良好的应用前景^[21-22]。

尽管有关组织工程用生物反应器溶解氧监测体系的研究已较为完善^[23-24]，但常用的电化学传感器存在如体积大、较难固定以及需要重新校准等重大问题^[25]，无法满足小型反应器的监测需求，且更容易带来污染风险^[26]，因此有关三维培养全周期的溶解氧以及代谢情况研究甚少。作者所在团队自主搭建的脉动式血管生物反应器可施加周期性脉动灌注，由此对硅胶管产生应变并作为机械刺激传递给种子细胞，进

而促进平滑肌细胞的增殖与胶原蛋白和弹性蛋白的分泌^[27]、纤维排列和胶原交联^[28]，维持收缩表型^[29]，有研究提示机械应力通过调节肌动蛋白细胞骨架从而调节糖酵解^[30]，而非侵入式溶解氧监测体系则可以实现关键溶解氧参数的无创监测，极大程度避免了污染风险并且不会引起剪切应力。

在正常增殖细胞中，有氧糖酵解常常被认为是一种最大限度减少氧化应激的机制，虽然外界氧气充足，但细胞仍处于“类缺氧状态”，并且尽管有氧糖酵解产生的ATP比线粒体氧化磷酸化少，但在反应速率上，有氧糖酵解比氧化磷酸化快得多^[31-32]。有氧糖酵解产生的代谢物也可参与哺乳动物细胞功能的调节，包括增殖、细胞外基质生成、自噬和凋亡等诸多过程^[33-35]。在生物反应器中，细胞加注到静置期结束（第1周）培养液中溶解氧水平接近生理水平4.14 mg/L^[36-37]，显著高于张应力刺激加载后7周内的溶解氧水平，而这一现象与平滑肌细胞的增殖与代谢状态息息相关。该研究观察到三维培养1周前后溶解氧与种子细胞代谢模式存在显著差异的现象后，在6孔板中为细胞提供三维接种环境，从机制角度解释了培养1周内血管平滑肌细胞的生理学变化。

在为期8周的三维培养过程中，静置结束的第7天可以看作“转换节点”，此前接种于聚乙醇酸支架材料上的血管平滑肌细胞处于快速增殖阶段，虽然外界氧气充足，仍趋于厌氧代谢，通过有氧糖酵解的方式实现ATP的快速生成以维持细胞快速的增殖需求，有较多的代谢产物乳酸生成，细胞氧气消耗量不高，故第1周血管生物反应器内培养基中溶解氧维持在(4.314±0.380) mg/L的较高水平。1周后平滑肌细胞增殖与有氧糖酵解水平显著下降，反应器内细胞数目趋于稳定，主要采用的是好氧代谢方式，对氧气的需求较高，培养基中溶解氧水平较低，稳定在(1.960±0.866) mg/L，这也和诸多学者发现有氧糖酵解调节哺乳动物细胞增殖功能的特性一致^[38-39]。而这种平滑肌细胞生理学变化的现象也在一定程度上验证了Laura E. Niklason教授团队选择静置1周后再施加力学刺激的合理性。

值得一提的是，利用光学溶解氧贴片测量的是反应器中培养基的溶解氧水平，而不是管状组织的溶解氧水平梯度，这也是进一步优化的方向，而最适宜血管平滑肌细胞体外培养的溶解氧浓度也仍有待研究。

综上所述，该研究通过三维培养环境的监测，观察到培养7 d前后溶解氧由高降低，细胞代谢方式由厌氧代谢为主转变为有氧代谢为主的现象。在聚乙醇酸支架三维环境下，生物反应器内血管平滑肌细胞早期通过有氧糖酵解的代谢方式影响细胞的快速增殖，这也解释了第1周生物反应器内培养基中溶解氧维持在较高水平的现象，有望从氧气消耗与代谢角度，为小口径组织工程血管移植植物培养研究提供借鉴。

致谢：感谢恩师林展翼老师，实验是在林老师的精心设计与指导下完成的。

作者贡献：实验设计为林展翼，实验实施为梅静怡，实验评估为刘江，资料收集为肖聪、刘鹏、周浩浩。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- NAEGELI KM, KURAL MH, LI Y, et al. Bioengineering Human Tissues and the Future of Vascular Replacement. *Circ Res.* 2022;131(1):109-126.
- GIWA S, LEWIS JK, ALVAREZ L, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol.* 2017;35(6):530-542.
- NIKLASON LE, LAWSON JH. Bioengineered human blood vessels. *Science.* 2020;370(6513):eaaw8682.
- SHAH MOHAMMADI M, BUCHEN JT, PASQUINA PF, et al. Critical Considerations for Regeneration of Vascularized Composite Tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2021;27(4):366-381.
- OBIWELUOZOR FO, EMECHEBE GA, KIM DW, et al. Considerations in the Development of Small-Diameter Vascular Graft as an Alternative for Bypass and Reconstructive Surgeries: A Review. *Cardiovasc Eng Technol.* 2020;11(5):495-521.
- PAPKOVSKY DB, DMITRIEV RI. Imaging of oxygen and hypoxia in cell and tissue samples. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(16):2963-2980.
- CASTRO N, RIBEIRO S, FERNANDES MM, et al. Physically Active Bioreactors for Tissue Engineering Applications. *Adv Biosyst.* 2020;4(10):e2000125.
- 刘江, 冯子倍, 周嘉辉, 等. 多孔隙三维环境下细胞接种密度对血管平滑肌细胞增殖行为的影响 [J]. 岭南心血管病杂志, 2022,28(3):264-268.
- SOLAN A, MITCHELL S, MOSES M, et al. Effect of pulse rate on collagen deposition in the tissue-engineered blood vessel. *Tissue Eng.* 2003;9(4):579-586.
- SOLAN A, DAHL SL, NIKLASON LE. Effects of mechanical stretch on collagen and cross-linking in engineered blood vessels. *Cell Transplant.* 2009;18(8):915-921.
- TSCHOEKE B, FLANAGAN TC, KOCH S, et al. Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(8):1909-1918.
- MONIZ I, RAMALHO-SANTOS J, BRANCO AF. Differential Oxygen Exposure Modulates Mesenchymal Stem Cell Metabolism and Proliferation through mTOR Signaling. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3749.
- 李祯, 张磊, 孙伟. 组织工程血管脉动生物反应器的研制 [J]. 新技术新工艺, 2019(7):47-50.
- 周浩浩. 双层模型结构下生物反应器组织工程血管培养的力学刺激研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2021.

- [15] WEN Z, ZHOU H, ZHOU J, et al. Quantitative Evaluation of Mechanical Stimulation for Tissue-Engineered Blood Vessels. *Tissue Eng Part C Methods*. 2021;27(5):337-347.
- [16] CHANCE B, ITO T. Control of endogenous adenosine triphosphatase activity by energy-linked pyridine nucleotide reduction in mitochondria. *Nature*. 1962;195:150-153.
- [17] ZHU XH, LU M, LEE BY, et al. In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(9):2876-2881.
- [18] ENGLER AJ, LE AV, BAEVOVA P, et al. Controlled gas exchange in whole lung bioreactors. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):e119-e129.
- [19] ZHAO F, PATHI P, GRAYSON W, et al. Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: experiments and mathematical model. *Biotechnol Prog*. 2005;21(4):1269-1280.
- [20] CHRISTOFK HR, VANDER HEIDEN MG, HARRIS MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008;452(7184):230-233.
- [21] ZHANG T, NIE M, LI Y. Current Advances and Future Perspectives of Advanced Polymer Processing for Bone and Tissue Engineering: Morphological Control and Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:895766.
- [22] MIRONOV VA, SENATOV FS, KOUDAN EV, et al. Design, Fabrication, and Application of Mini-Scaffolds for Cell Components in Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2022;14(23):5068.
- [23] SAUNDERS SK, COLE SY, ACUNA SIERRA V, et al. Evaluation of perfusion-driven cell seeding of small diameter engineered tissue vascular grafts with a custom-designed seed-and-culture bioreactor. *PLoS One*. 2022;17(6):e0269499.
- [24] ÇELEBI-SALTIK B, ÖTEYAKA MÖ, GÖKÇINAR-YAGCI B. Stem cell-based small-diameter vascular grafts in dynamic culture. *Connect Tissue Res*. 2021;62(2):151-163.
- [25] BARONE PW, WIEBE ME, LEUNG JC, et al. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies. *Nat Biotechnol*. 2020;38(5):563-572.
- [26] DIAMANTOUROS SE, HURTADO-AGUILAR LG, SCHMITZ-RODE T, et al. Pulsatile perfusion bioreactor system for durability testing and compliance estimation of tissue engineered vascular grafts. *Ann Biomed Eng*. 2013;41(9):1979-1989.
- [27] SONG Y, WENNINK JW, KAMPHUIS MM, et al. Dynamic culturing of smooth muscle cells in tubular poly(trimethylene carbonate) scaffolds for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(3-4):381-387.
- [28] HUANG AH, BALESTRINI JL, UDELSMAN BV, et al. Biaxial Stretch Improves Elastic Fiber Maturation, Collagen Arrangement, and Mechanical Properties in Engineered Arteries. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(6):524-533.
- [29] BEAMISH JA, HE P, KOTTKE-MARCHANT K, et al. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(5):467-491.
- [30] FERNIE AR, ZHANG Y, SAMPATHKUMAR A. Cytoskeleton Architecture Regulates Glycolysis Coupling Cellular Metabolism to Mechanical Cues. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(8):637-638.
- [31] CALDERIN EP, ZHENG JJ, BOYD NL, et al. Exercise-induced specialized proresolving mediators stimulate AMPK phosphorylation to promote mitochondrial respiration in macrophages. *Mol Metab*. 2022;66:101637.
- [32] PALSSON-MCDERMOTT EM, CURTIS AM, GOEL G, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*. 2015;21(1):65-80.
- [33] LUNT SY, VANDER HEIDEN MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441-464.
- [34] CACCIATORE M, GRASSO EA, TRIPODI R, et al. Impact of glucose metabolism on the developing brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1047545.
- [35] RYBKOWSKA P, RADOSZKIEWICZ K, KAWALEC M, et al. The Metabolic Changes between Monolayer (2D) and Three-Dimensional (3D) Culture Conditions in Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Adipose Tissue. *Cells*. 2023;12(1):178.
- [36] BALGUID A, MOL A, VAN VLIMMEREN MA, et al. Hypoxia induces near-native mechanical properties in engineered heart valve tissue. *Circulation*. 2009;119(2):290-297.
- [37] FATHOLLAHIPOUR S, PATIL PS, LEIPZIG ND. Oxygen Regulation in Development: Lessons from Embryogenesis towards Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs*. 2018;205(5-6):350-371.
- [38] ZHAO X, TAN F, CAO X, et al. PKM2-dependent glycolysis promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells during atherosclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020;52(1):9-17.
- [39] JAIN M, DHANESHA N, DODDAPATTAR P, et al. Smooth Muscle Cell-Specific PKM2 (Pyruvate Kinase Muscle 2) Promotes Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Neointimal Hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(5):1724-1737.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)