

基于微流控芯片构建一种新的体外血管生成模型

戴小珍^①, 蔡绍哲^{①*}, 叶群芳^①, 蒋稼欢^①, 晏小清^①, 熊新^{②*}, 江奇峰^①,
WANG Albert Chih-Lueh^③, 谭毅^{④⑤}

① 重庆大学生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室(重庆大学), 重庆 400030;

② 重庆医科大学第一附属医院实验研究中心, 重庆 400016;

③ Muscle and Motility Group, Boston Biomedical Research Institute, 64 Grove Street, Watertown, MA 02472, USA;

④ 温州医学院糖尿病并发症中美合作实验室, 温州 325035;

⑤ Pediatric Diabetes Research at KCHRI of the Department of Pediatrics, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA

* 联系人, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn; xiongxi7104@sina.com

2011-02-22 收稿, 2011-05-18 接受

国家自然科学基金(10872224, 81000067, 30870607)、重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5192)、中央高校基本科研业务费(CDJXS10 23 11 15)和生物流变科学与技术教育部重点实验室(重庆大学)访问学者基金资助

摘要 血管生成在许多生理和病理过程中发挥着重要作用, 但血管生成的机理仍不清楚。因此, 为探明血管生成机理及开发“血管生成相关”疾病的治疗方法, 在体外构建一个合适的血管生成模型是十分必要的。基于微流控系统构建了一种新型体外血管生成模型, 该系统不仅能为内皮细胞生长提供一种近似于在体的微环境, 并能实时监测内皮细胞对其微环境所发生变化的响应。为评价该系统用于血管生成模型建立的可行性和优越性, 考察了促血管生长因子对内皮细胞增殖、迁移和管样结构形成能力的影响。研究结果表明, 在促血管生长因子的诱导作用下, 内皮细胞在三维基质材料中的增殖能力大大提高(提高了59.12%); 在促血管生长因子浓度梯度的诱导作用下, 内皮细胞定向从低浓度往高浓度侵入基质胶且形成管腔样结构。以上结果表明, 该系统不仅能为血管生成机理的阐明提供一个良好的研究平台, 还能为促血管生成药物或者抗血管生成药物的筛选提供一个合适的筛选平台。

关键词

血管生成
微流控系统
微环境
促血管生长因子

血管生成在许多生理、病理过程中发挥着重要作用, 生理性血管生成通常发生于发育、生育和组织修复等过程中, 而病理性血管生成不仅发生在肿瘤发生发展过程中, 还发生在许多被称为“血管生成相关疾病”的过程中^[1]。但血管生成机理和以血管生成成为靶点的治疗研究还不清楚。为阐明血管生成机理和开发有关癌症和其他血管生成相关疾病的治疗方法, 在体外构建一个合适的血管生成模型是十分关键且必要的。

血管生成是血管细胞与细胞外微环境相互作用的复杂过程^[2~4]。血管生成过程通常包含如下步骤: 首先, 在血管新生部位分泌出大量促血管生长因子,

如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)和基质衍生因子(stromal-derived factor 1, SDF-1)等; 其次, 促血管生长因子在细胞外基质中扩散形成梯度分布, 诱导血管内皮细胞从静止状态活化为顶细胞(tip cell), 同时激活间质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP2 或 MMP9), 降解血管的基底膜和胞外基质材料; 再次, 活化的内皮细胞在促血管生长因子浓度梯度的诱导下, 定向迁移到血管新生部位, 增殖并逐步形成网络状或套索样结构; 最后, 周细胞(pericyte cell, PC)和血管平滑肌细胞(vascular smooth

muscle cell, SMC)等支持细胞(mural cell)环绕在内皮细胞周围,形成新的血管基底膜,从而形成稳定的血管腔^[5,6]。目前,研究者们已经构建了许多体外研究模型以期能在体外模拟血管生成这一复杂过程的关键步骤^[7,8]。一个理想的体外血管生成模型应具备以下特征:能为促血管生长因子或抑制血管生长因子提供一个时空可控的浓度梯度分布,并能定量分析其分布曲线,为血管生成药物的剂量效应研究提供平台;能定量分析新生血管的结构;能定量评价新生血管的功能(主要包括内皮细胞的迁移速率、增殖率、成管率、血流速率和血管的通透性等)^[8,9]。然而,目前大量的体外模型只能为细胞生长提供一个二维(2D)生长环境,而细胞的在体生长环境是一个包括一系列细胞与细胞外微环境相互作用的三维(3D)复杂集合,因此需要寻求新的研究手段,从而构建更加接近在体条件的血管生成模型。

近年来随着微流控技术的发展,将微流控技术与传统生物学技术相结合,有可能为细胞的体外生长提供一个近似于在体微环境,实时操控和监控细胞的行为。微流控系统的主要优势表现在所需细胞或试剂的用量十分微小,对微环境实现时空可控并能实时动态地跟踪细胞的动态变化过程^[10,11]。在血管生成领域中,学者们已建立一系列微流控系统,用于构建体外血管生成模型、考察血管生成机理^[10-14],但早期的一些微流控系统还是局限于2D细胞培养。Vickerman等人^[10]构建了一个多参数可控的微流控实验平台用于体外毛细血管生成的研究,该系统不仅能实现内皮细胞的3D生长,提供促血管生长因子浓度梯度的时空可控分布,还可模拟血液流动、施加剪应力刺激,分析基质间的渗流对血管形成的影响。但是,在该系统中实现基质胶图示化分布的操作十分复杂,需要借助显微注射仪、微机械手、微量注射泵、数字显微镜等大量高端仪器设备,这些仪器设备并非常规生物医学实验室都具备的,因此大大限制了其应用范围。

在本研究中,我们构建了一个仅需借助移液器便可以完成基质胶图示化填充的微流控芯片。该芯片由3个平行的主通道组成,平行主通道之间由一组微桥连通,中间的主通道为基质胶通道。该芯片能为内皮细胞的体外生长提供一个近似于在体的微环境,能实现可溶性因子在基质胶中浓度梯度的可控分布,能实时监测内皮细胞对其微环境变化的响应。该芯

片的优势恰好满足了体外构建理想的血管生成模型的关键要求。为评价该芯片用于血管生成模型建立的可行性和优越性,本研究考察了促血管生长因子对内皮细胞增殖、迁移和管样结构形成能力的影响,结果表明,该芯片不仅能为血管生成机理的阐明提供一个良好的研究平台,还能为促血管生成药物或者抗血管生成药物的筛选提供一个合适的筛选平台。

1 材料与方法

(i) 微流控芯片的设计和构建。我们设计了一个微流控芯片,该芯片由3个平行主通道组成,主通道之间由一系列水平微桥连通(图1(a))。主通道宽400 μm ,高150 μm ,长20 mm。连接的水平微桥宽100 μm ,高150 μm ,长300 μm 。采用标准的软光刻技术加工该微流控芯片,即采用PDMS (polydimethylsiloxane; Sylgard 184, Dow Corning Corp. Midland, MI, USA)模塑法,主要包括以下过程:(1)在玻璃基片上涂覆厚度为150 μm 的SU-8 (Microchem Corp, Newton, MA, USA)负性光刻胶,通过曝光、刻蚀、去胶等步骤制作阳模;(2)将PDMS预聚液与固化剂按10:1的比例混合,制成PDMS预凝液,充分搅拌均匀,用真空泵抽真空除去气泡。将制备好的PDMS预凝液倒入盛有光刻阳模的培养皿中,然后置于80 烘箱,加热2 h使PDMS固化;(3)待PDMS充分固化后,将其从阳模上剥离下来并修剪成合适大小,然后利用打孔器在通道的出口和入口处分别打孔,将PDMS基片与载玻片同时放入等离子清洗机中,等离子处理60 s,最后将PDMS与载玻片键合形成密闭通道,为使键合更为牢固,可在键合后放在121 烘箱中加热30 min。

(ii) 基质胶的制备和灌注。将基质胶(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)预聚液放置于4℃的冰上过夜,使其充分融化,同时将移液器及其吸头和微流控芯片提前预冷。用预冷的移液器将融化的基质胶与无血清DMEM培养基(1:1)充分混匀,用移液器吸取10 μL 基质胶预聚液,从微流控芯片中间通道的入口处轻轻注入。然后,将灌注凝胶预聚液微流控芯片放置于湿润的培养皿中,将培养皿放置于37℃培养孵箱中孵育30 min,使其充分聚合形成凝胶。待凝胶形成后,在两边通道中加入无血清培养基或PBS进行平衡处理。

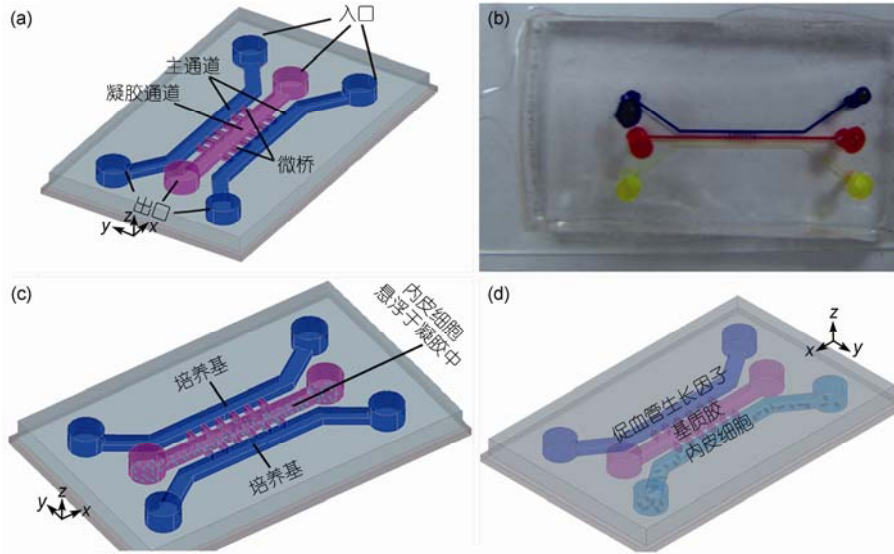


图1 微流控芯片的设计及结构

(a) 微流控芯片的构型图, 该芯片由3个平行主通道组成, 主通道之间由一组平行微桥连通; (b) 微流控芯片实物图; (c) 微流控芯片中内皮细胞的3D培养; (d) 微流控芯片中内皮细胞的2D培养

(iii) 在3D凝胶中可溶性因子浓度梯度的形成及表征分析. 为证明该芯片能实现可溶性因子在3D凝胶中的梯度分布, 我们采用与VEGF分子量相当的FITC标记的葡聚糖(40 kD; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)替代可溶性因子, 通过分析荧光强度的分布来考察浓度梯度的分布情况. 主要步骤如下: 待基质胶聚合后, 从两侧通道注入PBS平衡2 h. 用移液器的枪头作为两侧通道的储液池, 将60 μL PBS加入空白通道的入口储液池, 同时将60 μL FITC-葡聚糖溶液加入源通道的入口储液池. 待溶液从通道的入口处流到出口后, 在出口储液池中加入相同体积的液体以维持通道内的静止状态. 以注入FITC标记的葡聚糖溶液的那一刻计时 $T = 0$, 利用安装了CCD (Olympus DP25, Tokyo, Japan)的荧光显微镜 (Olympus TH4-200), 每隔5 min拍照1次, 共观察10 h. 最后, 将获得的荧光照片转换为灰度图, 用MATLAB (MathWorks, Carlsbad, MA, USA)分析荧光强度, 测量每一帧图片中凝胶通道的荧光度, 以该帧的最大值为1, 进行归一化处理, 同时以距源通道最远一点的距离归一化为1, 以距离为横坐标、荧光强度为纵坐标, 绘制荧光强度的曲线分布图.

(iv) 内皮细胞的3D培养. 制备高密度的脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVECs)悬液(10^7 个/mL), 并置于冰上预冷, 然后将

细胞悬液与基质胶(Matrigel)预聚液以1:1(v/v)混匀, 再将HUVEC-Matrigel混合悬液注入微流控芯片的中间通道, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育30 min, 形成包埋有细胞的基质胶网络. 将DMEM完全培养基(对照组)或含有促血管生长因子的培养基(VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor)和EGF (epidermal growth factor)各10 ng/mL)注入两侧通道中, 为3D胶中的细胞生长提供营养, 考察3D培养时内皮细胞的活性、增殖、迁移和管样结构形成情况.

(v) 细胞活性的检测. 将HUVECs接种到微流控芯片中培养3 d后, 利用2 $\mu\text{mol/L}$ 的钙黄绿素 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)和10 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶(propidium iodide, PI; Molecular Probes)进行双染, 考察细胞的活性状态. 染色后, 立即置于荧光显微镜下观察.

(vi) 增殖能力的考察. 利用Cell-LightTM EdU DNA Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)检测3D培养条件下内皮细胞的增殖能力. 按1(iv)节中3D培养的方法接种细胞, 血清饥饿同步处理过夜, 加入含促血管生长因子的培养基(VEGF, bFGF和EGF各10 ng/mL)诱导培养8 h, 从两侧通道注入50 $\mu\text{mol/L}$ EdU培养基孵育2 h, 用含4%多聚甲醛(Sigma, St Louis, MO, USA)的PBS在常温下孵育细胞30 min以固定细胞, 然后注入2 mg/mL甘氨酸

孵育 10 min, 加入含 0.5% Triton X-100 (Sigma)的 PBS 通透处理 20 min, 利用 Apollo 反应液检测 EdU 标记的细胞, 并用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色, 最后, 在荧光显微镜下观察, 随机拍照并计数处于增殖期的细胞。

(vii) 在促血管生长因子浓度梯度的诱导下, 内皮细胞迁移能力的考察。在微流控芯片的中间通道灌注基质胶预聚液, 置于 37℃ 孵箱中孵育 30 min 使其形成凝胶。接种细胞前, 在两边主通道中加入无血清培养基进行平衡处理 4 h, 用无血清培养基制备 HUVECs 的细胞悬液(5×10^6 个/mL)并将其注入两边主通道的一个通道, 于 37℃ 培养 4 h 使细胞黏附。在没有接种细胞的旁边通道中注入含有各种促血管生长因子的培养基, 同时在细胞通道内加入无血清培养基, 促血管生长因子通过自由扩散在中间通道的 3D 凝胶中形成浓度梯度的分布, 从而诱导内皮细胞掺入基质胶中。为维持浓度梯度的分布, 每隔 12 h 换液一次。利用相差显微镜(Leica DM750, Wetzlar, Germany)观察并拍照细胞的迁移情况, 每天拍照一次, 最后用 Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)计算细胞的最长迁移距离和迁移细胞的面积^[12]。在实验结束时, 通过肌动蛋白丝染色分析最终迁移到基质胶中细胞的分布, 主要步骤如下: (1) 用注射泵在微流控芯片的两边通道分别通入 PBS 清洗细胞 30 min; (2) 用 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 min; (3) 用 0.5% Triton X-100 通透 30 min; (4) 用 5 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h; (5) 加入 5 μ g/mL FITC-鬼笔环肽(Alexis, San Diego, CA, USA)染色 1 h; (6) 用 PBS 清洗 30 min, 置于荧光显微镜下观察细胞骨架的分布。

(viii) 管样结构形成能力的分析。将 HUVECs 按 3D 培养的方法接种于微流控通道内, 加入含有促血管生长因子的培养基诱导培养 5 d, 每天换液一次, 用倒置显微镜考察管样结构形成能力。实验结束后, 用 FITC-鬼笔环肽和 DAPI (凯基生物, 南京)对肌动蛋白丝和细胞核染色, 考察管样结构的形成情况。

(ix) 实验结果的统计分析。所有实验数据采用平均数 \pm 标准差($n \geq 3$)表示, 采用 Origin 7.5 (OriginLab Data Analysis and Graphing Software)进行统计学分析, 采用 *t* 检验进行组间差异比较分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认为两组之间差异显著。

2 实验结果

2.1 微流控芯片的设计及其特征

如图 1 所示, 本研究设计的微流控芯片由 3 个平行主通道组成, 平行主通道之间由一组水平微桥连通。中间通道为灌注基质胶的通道, 用于基质胶的图示化填充, 以构建 3D 环境。水平微桥不仅连通两边主通道, 还对精确控制凝胶的分布有重要作用。微桥的长宽比(L:W)对控制凝胶分布有关键作用, 当长宽比过小(短而宽), 基质胶溶液很容易溢出到旁边通道, 而当长宽比过大(长而窄), 微桥中的凝胶很难填满, 在微桥中容易出现气泡。通过一系列优化, 确定长宽比为 3:1, 使凝胶既能将微桥填满, 又不至于溢出到旁边通道中, 而且灌胶不需要借助任何辅助设备, 仅借助移液器就能方便地实现。

2.2 可溶性因子在凝胶通道中的梯度分布

通过分析 FITC 标记的葡聚糖在凝胶通道中的荧光强度分布情况, 间接反映可溶性因子的浓度梯度分布。如图 2(a)所示, FITC 标记的葡聚糖分子从因子源通道(上通道)经凝胶通道扩散至空白通道(下通道), 凝胶中的荧光强度逐渐增强, 从而形成一个梯度分布。利用 METLAB 软件分析凝胶通道中不同部位的荧光强度(图 2(a)虚线标示区域), 并以距离源通道的距离为横轴, 荧光强度为纵轴, 绘制梯度分布曲线。如图 2(b)所示, 在凝胶通道中, 扩散 1.5 h 后能形成一个近似线性的浓度梯度, 且这种近似线性的浓度梯度可以维持约 10 h。由于没有更新源通道和空白通道中的溶液, 随着扩散时间的增长, 源通道中的荧光物质逐渐消耗, 空白通道中的荧光物质逐渐积累, 最后达到两边通道内的物质平衡, 浓度梯度的分布最终消失。

2.3 脐静脉内皮细胞在微流控芯片中的活性分析

HUVECs 在微流控芯片中的培养分为 2D 和 3D 培养两种方式。在 3D 培养时, 悬浮在基质胶中的 HUVECs 被注入到中间通道; 而在 2D 培养时, 在中间通道灌注基质胶后, 将 HUVECs 接种到旁边的一个通道中, 用来考察 HUVECs 在血管生成因子诱导下在 3D 基质胶中的迁移情况。为评价该芯片是否适合细胞生长, 在细胞接种培养 3 d 后, 利用双染法(钙黄绿素标记活细胞, PI 标记死细胞)考察细胞的生长

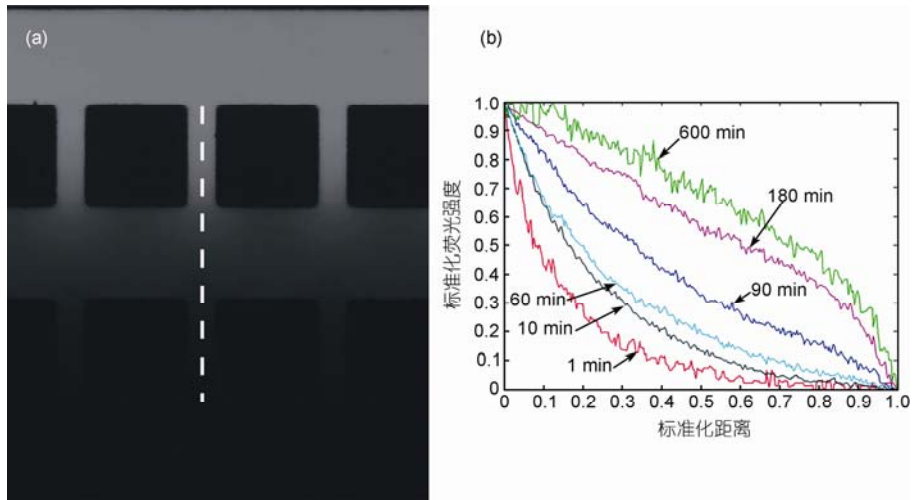


图2 通过分析荧光强度定量分析凝胶通道中 FITC-葡聚糖浓度梯度的分布情况

(a) 荧光强度分布图; (b) 利用 METLAB 软件分析凝胶通道中不同部位的荧光强度((a)中虚线标示区域), 并以距离源通道(上通道)的距离为横轴, 荧光强度为纵轴, 绘制梯度分布曲线

活力. 如图3所示, HUVECs在3D基质胶中形成多细胞集落, 细胞呈圆形, 与2D基质胶中的生长形态完全不同. 在2D生长条件下, 内皮细胞几乎都是活细胞, 而在3D生长条件下, 出现了少量死细胞, 细胞的存活率高达95%. 以上结果表明, 该微流控芯片适合细胞的生长, 为细胞培养提供了良好的实验平台.

2.4 在3D生长条件下, 促血管生长因子对HUVECs增殖能力的影响

在血管生成过程中, 促血管生长因子激活处于静止期的内皮细胞, 活化的内皮细胞定向迁移到血管新生部位, 开始增殖并自组织成网络状结构, 形成初始的血管网络. 因此, 内皮细胞增殖是形成血管的

一个必要的关键步骤, 一个理想的血管生成模型必须能定量分析内皮细胞的增殖能力. 本研究采用 Cell-Light™ EdU DNA Cell Proliferation Kit 标记处于S期的细胞, 考察促血管生长因子对内皮细胞增殖能力的影响. 将 HUVECs 与基质胶混匀后注入到中间通道, 饥饿同步处理后, 用含有促血管生长因子的条件培养基诱导培养8h, 再用EdU孵育2h. 如图4(a)所示, 处于S期细胞的细胞核掺入了EdU, 用Hoechst 33324 染核, 计算S期细胞占细胞总数的比值, 得出细胞增殖率. 结果发现, 在促血管生长因子的诱导下, 内皮细胞的增殖能力显著提高, 大约有 $71.63\% \pm 8.65\%$ 的细胞处于S期, 而在不含促血管生长因子的空白培养基中培养, 只有 $12.51\% \pm 3.1\%$ 的细胞处

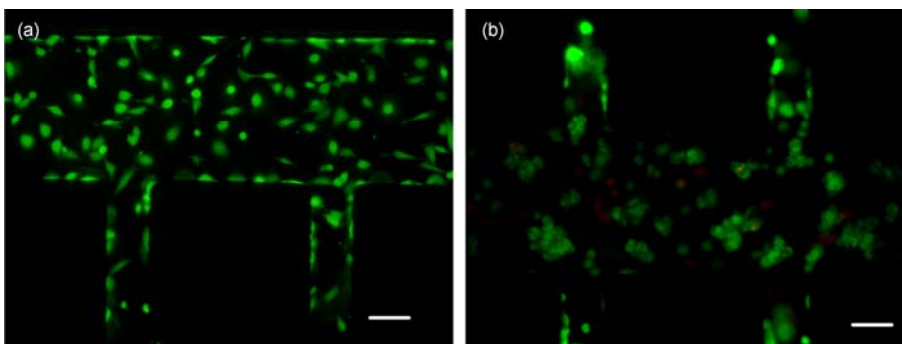


图3 利用钙黄绿素和PI双染法考察内皮细胞在微流控芯片中的生长活性

(a) HUVECs 接种在旁边通道中培养3d后, 几乎所有细胞存活; (b) HUVECs 在3D基质胶中培养3d后, 细胞聚集成团, 出现少量死细胞. 标尺为 $100\ \mu\text{m}$

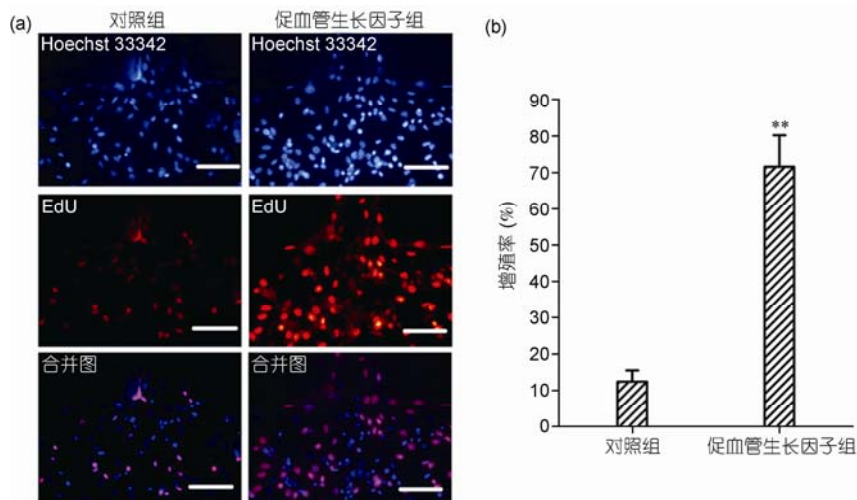


图4 利用 Cell-Light™ EdU DNA Cell Proliferation Kit 考察促血管生长因子对 3D 生长条件下 HUVECs 增殖能力的影响 (a) Hoechst 33342 标记所有细胞的细胞核, EdU 标记处于 S 期的细胞. 标尺为 100 μm; (b) 定量分析处于增殖期细胞的百分比, 与对照组相比, 促血管生长因子显著提高 HUVECs 的增殖能力($n=6$; **, $P<0.01$)

于 S 期(图 4(b)), 表明促血管生长因子能激活内皮细胞并提高其增殖能力。

2.5 在促血管生长因子诱导下, HUVECs 定向迁移到 3D 基质胶中

我们考察了为期 4 d 的 HUVECs 对促血管生长因子浓度梯度的迁移响应情况. 如图 5(B(a-d)), 在促血管生长因子浓度梯度的诱导下, HUVECs 从低浓度区定向迁移到高浓度区, 而在对照组中, 迁移到基质材料中的细胞数量很少(图 5(A(a-d))). 如图 5(B(e)), 在 HUVECs 侵袭进入细胞外基质凝胶的过程中, 通常是“顶细胞”伸出伪足向胶内迁移, 而相邻细胞保持相对静止状态, 没有明显的伪足伸出. 通过细胞骨架的免疫荧光染色发现, 侵入到基质胶中的细胞发生自组织行为, 形成类似管腔样的血管结构(图 5(C)). 通过对细胞迁移距离和迁移面积的测量发现, 促血管生长因子的浓度梯度能显著提高内皮细胞的定向迁移能力(图 5(D(a,b))).

2.6 在促血管生长因子的诱导下, HUVECs 在 3D 基质胶中形成管腔样结构

以往有关内皮细胞形成管样结构的研究通常是将内皮细胞接种到预先包被基质蛋白(基质胶、胶原或纤维蛋白等)的培养孔板中^[15], 在该研究模型中, 内皮细胞仍然处于 2D 培养状态, 不能真实地模拟体

内情况. 本研究将内皮细胞悬浮于 3D 基质胶中, 接种于微流控芯片的中间通道, 在两边通道提供培养基并诱导培养 5 d, 然后通过细胞骨架染色, 在荧光显微镜下观察细胞骨架的排列和分布情况. 结果发现, 在促血管生长因子的诱导下, 3D 生长的 HUVECs 形成多细胞的条索状结构和复杂的管样结构, 而在对照组中, 只有很少的条索状和管样结构形成(图 6).

3 讨论

本研究基于微流控芯片构建了一种新的血管生成模型, 该模型主要具备以下优势: (1) 微流控芯片简单可控、便于操作; (2) 可以模拟在体环境, 为细胞生长提供 3D 生长环境, 并能实现可溶性因子的浓度梯度分布, 可用于考察细胞-细胞和细胞-胞外基质的相互作用; (3) 能定量分析内皮细胞的行为和功能.

血管生成不仅涉及妊娠期、子宫内膜周期性重构等生理过程, 还参与缺血组织的血管修复和重构, 在肿瘤等众多疾病中起着重要作用. 因此, 血管生成的研究对许多疾病的治疗有着重要的临床应用价值, 建立一个生理相关、简单可靠的血管生成模型对血管生成机理的研究以及血管疾病的治疗药物开发十分必要. 1980 年, Folkman 等人^[16]将牛的毛细血管内皮细胞接种在明胶上, 发现在明胶上生长的内皮细胞能自发地形成管样结构. 从此, 血管研究领域的学者们构建了许多体外血管生成模型, 试图模拟在体血

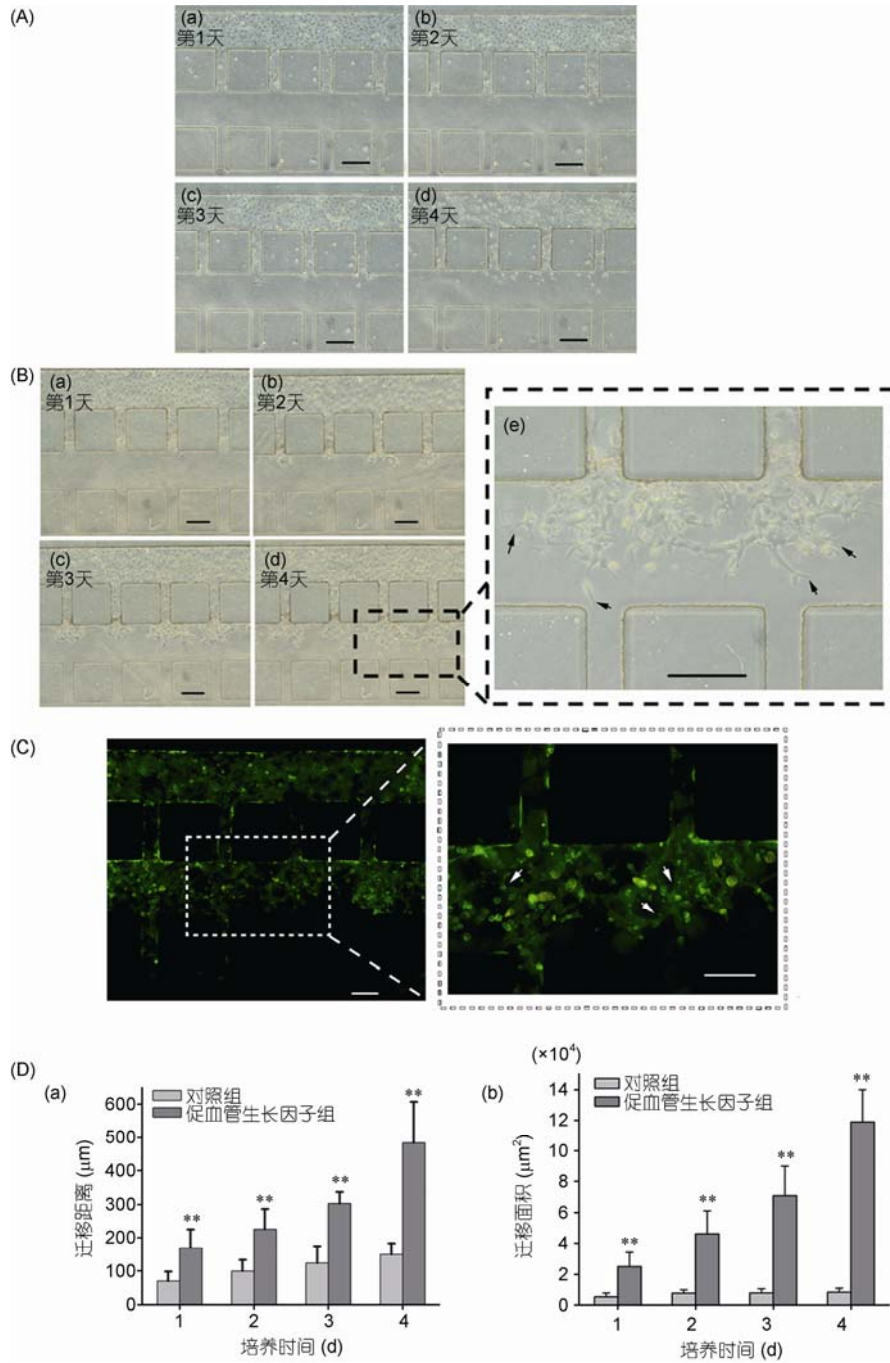


图 5 在促血管生长因子浓度梯度诱导下，内皮细胞定向迁移到基质胶中并形成管样结构

(A)和(B)分别为对照组和促血管生长因子浓度梯度诱导组内皮细胞在 3D 基质胶中的迁移路径图; (B(e)) 内皮细胞侵入 3D 基质胶时, 前端细胞伸出伪足(如箭头所示)、侵入基质; (C) 细胞骨架的免疫荧光染色, 侵入到基质胶中的细胞发生自组织行为, 形成类似管腔样的血管结构(如箭头所示); (D) 计算细胞的最长迁移距离(a)和迁移面积(b), 定量分析 HUVECs 在 3D 基质材料中的迁移情况, 与对照组相比, 在促血管生长因子浓度梯度诱导下, 细胞的迁移距离和迁移面积均显著增加($n=6$, **, $P < 0.01$)

管生成的关键步骤。血管生成是一个血管细胞与其微环境相互作用的复杂过程, 不仅受微环境中促血管生长因子和抑制血管生长因子的调节, 还受血流

剪应力、血管壁的压应力等机械力的调节, 血管生成的复杂性使血管研究者在构建血管生成模型中遇到了诸多挑战。近年来, 随着微流控技术的发展, 将微

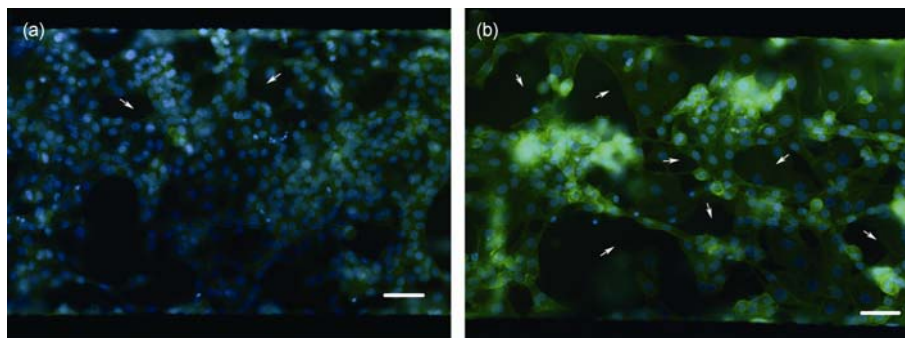


图6 HUVECs在3D基质胶中培养5d后,利用细胞骨架染色考察管样结构的形成能力
(a) 对照组; (b) 促血管生长因子诱导组. 管样结构如箭头所示, 标尺为50 μm

流控技术与传统的细胞培养技术相结合,不仅能为细胞生长提供一个近似在体的生长环境,还能对某些关键参数进行抽象分析并实现其可控调节,定量分析这些参数在血管生成中的调节作用,并能实时监控细胞的行为.

血管生成中一个关键步骤是内皮细胞穿过基底膜,定向迁移到血管生成部位,然后参与新血管的形成^[17].在血管新生部位会分泌大量的血管生长因子和趋化因子,在已有血管和新生部位之间的胞外基质中形成一个梯度分布,从而激活内皮细胞分泌蛋白酶降解胞外基质,并定向迁移到高浓度区域.因此,体外血管生成模型的一个关键指标是实现促血管生长因子的浓度梯度分布.构建可溶性因子浓度梯度分布的传统方法主要有水凝胶扩散法、微吸管法和Boyden小室法等,这些方法在一定程度上能形成一定的梯度分布,但是不能产生恒定的、精确的、时空可控的浓度梯度,不能对其进行定量分析,这种浓度梯度通常只能维持几个小时,大大限制了它们的应用^[18].本研究利用微流控技术构建了一个微流控芯片,该芯片不仅能在3D基质中形成一种稳定、复杂、可控的浓度梯度,长时间维持浓度梯度的分布,而且能实时动态地跟踪内皮细胞在可溶性因子梯度诱导下的迁移行为,既能跟踪单细胞的迁移情况,也能考察细胞的群体迁移行为.这些优势是以往的传统研究模型,如Boyden小室或Transwell小室无法比拟的.

血管生成的另一个重要步骤是到达血管新生部位的内皮细胞相互连接成管腔样结构,形成初始血管网络.内皮细胞形成血管网络的传统体外研究通常是将细胞接种在包被基质胶或胶原凝胶的孔板

中^[15],考察细胞在凝胶表面形成管腔样结构的能力,这种2D培养与在体的情况不一致.在体条件下,细胞生长在3D胞外基质的微环境中.本研究将HUVECs与基质胶在微流控芯片的通道中形成细胞/基质的3D复合结构,考察HUVECs在3D基质材料中形成血管网络结构的能力.结果发现,在多种促血管生长因子的联合诱导作用下,内皮细胞在3D基质材料中的增殖能力大大提高,并能降解胞外基质材料,进行自组织行为,形成细胞与细胞之间的紧密连接,最终形成血管样结构,表明促血管生长因子能大大促进内皮细胞形成血管网络.

通过考察血管生成过程中的细胞增殖、迁移、形成管样结构等几个关键步骤,本研究初步评价了该血管生成模型的可行性和优越性,但对形成血管的功能还有待进一步考察,如血管的完整性、血管的通透性、血流动力学指标等,还应考察化学因子、力学因素以及血管周细胞,如平滑肌细胞、成纤维细胞对血管生成的协同作用.

4 结论

本研究基于微流控芯片构建了一个3D血管生成模型,该模型不仅能为内皮细胞的生长提供一个模拟生理条件的3D生长微环境,还能实时动态跟踪内皮细胞对微环境变化的响应.通过考察促血管生长因子对内皮细胞增殖、迁移和形成管样结构能力的影响,评价该系统作为血管生成模型研究的可行性.在促血管生长因子的诱导下,内皮细胞的增殖能力显著提高并能形成复杂的管腔样结构,同时发现,在促血管生长因子浓度梯度的诱导下,内皮细胞能定向从低浓度区域迁移到高浓度区域,并侵入到3D基质

中, 内皮细胞能自组织成血管网络. 这些研究表明, 该系统可以为体外血管生成机理的研究提供一个良好的研究平台, 同时为血管生成相关疾病治疗药物的初步筛选提供一个可靠的实验平台.

参考文献

- 1 Folkman J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 273–286
- 2 Banfi A, von Degenfeld G, Blau H M. Critical role of microenvironmental factors in angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep*, 2005, 7: 227–234
- 3 Semenza G L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: Mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem*, 2007, 102: 840–847
- 4 柏金根, 杨健, 朱敦皖, 等. 生长因子及其体内微环境的多重相互作用. *科学通报*, 2006, 51: 761–769
- 5 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 1–18
- 6 Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005, 438: 932–936
- 7 Ucuuzian A A, Greisler H P. *In vitro* models of angiogenesis. *World J Surg*, 2007, 31: 654–663
- 8 Jain R K, Schlenger K, Hockel M, et al. Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems. *Nat Med*, 1997, 3: 1203–1208
- 9 Staton C A, Stribbling S M, Tazzyman S, et al. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Exp Pathol*, 2004, 85: 233–248
- 10 Vickerman V, Blundo J, Chung S, et al. Design, fabrication and implementation of a novel multi-parameter control microfluidic platform for three-dimensional cell culture and real-time imaging. *Lab Chip*, 2008, 8: 1468–1477
- 11 Carrion B, Huang C P, Ghajar C M, et al. Recreating the perivascular niche *ex vivo* using a microfluidic approach. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107: 1020–1028
- 12 Chung S, Sudo R, Mack P J, et al. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab Chip*, 2009, 9: 269–275
- 13 Shamloo A, Ma N, Poo M M, et al. Endothelial cell polarization and chemotaxis in a microfluidic device. *Lab Chip*, 2008, 8: 1292–1299
- 14 Chung S, Sudo R, Vickerman V, et al. Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38: 1164–1177
- 15 Lawley T J, Kubota Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J Invest Dermatol*, 1989, 93 (2 Suppl): 59–61
- 16 Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature*, 1980, 288: 551–556
- 17 Lamalice L, Boeuf F L, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 2007, 100: 782–794
- 18 Keenan T M, Folch A. Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip*, 2008, 8: 34–57