

- Mol Cell Cardiol, 2009, 47 (2): 221 – 227
- 18 Boyett MR, Inada S, Yoo S, *et al.* Connexins in the sinoatrial and atrio-ventricular nodes[J]. Adv Cardiol, 2006, 42: 175 – 197
- 19 Ye WG, Yue B, Aoyama H, *et al.* Junctional delay, frequency, and direction – dependent uncoupling of human heterotypic Cx45/Cx43 gap junction channels[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 111: 17 – 26
- 20 Ye W, Song Y, Huang Z, *et al.* Genetic regulation of sinoatrial node development and pacemaker program in the venous pole[J]. J Cardiovasc Dev Dis, 2015, 2(4): 282 – 298
- 21 Mommersteeg MT, Dominguez JN, Wiese C, *et al.* The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development[J]. Cardiovasc Res, 2010, 87 (1): 92 – 101
- 22 Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, *et al.* Localization of Islet – 1 – positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart[J]. Circ Res, 2012, 110 (10): 1303 – 1310
- 23 Wiese C, Grieskamp T, Airik R, *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3[J]. Circ Res, 2009, 104 (3): 388 – 397
- 24 Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, *et al.* Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria[J]. Genes Dev, 2007, 21 (9): 1098 – 1112
- 25 Espinoza – Lewis RA, Liu H, Sun C, *et al.* Ectopic expression of Nkx2. 5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice[J]. Dev Biol, 2011, 356 (2): 359 – 369
- 26 Hausburg F, Jung JJ, David R. Specific cell (Re –) programming: approaches and perspectives[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2018, 163: 71 – 115
- (收稿日期: 2018 – 05 – 23)
- (修回日期: 2018 – 05 – 31)

3D 打印肺混合细胞结构体植入兔体内研究

李跃中 杨亚冬 杨 耿 罗 涛 徐怡朦 唐 靓 张文元

摘 要 **目的** 通过将三维(3D)生物打印的肺混合细胞水凝胶结构体片段植入兔背部皮下,探讨类肺组织结构体片段植入的可行性。**方法** 采用胰蛋白酶消化法提取新生兔原代肺混合细胞。3D 生物打印肺混合细胞 – 海藻酸钠 – 明胶 3D 水凝胶网格状结构体片段,活/死细胞双荧光染色观察细胞存活率。并将该结构体植入兔背部皮下。植入 2 周后,取出结构体片段,并进行组织病理学检测类肺组织结构形成情况。**结果** 打印后的肺混合细胞在三维结构体中的存活率为 $83\% \pm 2\%$ 。兔肺细胞水凝胶支架体内植入 2 周后,可见植入物尚未降解。通过 HE 染色与 Masson 染色观察,表明植入物中肺细胞均匀分布,未见细胞变性 & 死亡。**结论** 3D 生物打印的肺结构体具有再造类肺组织片段的潜力,将于基础医学和临床之间搭建桥梁,为肺脏再生打下基础。

关键词 三维生物打印 兔原代肺混合细胞 水凝胶支架 结构体片段 植入

中图分类号 R318.08 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.02.024

Study on 3D Bioprinted Structure Lamellas of Lung Blend Cells to Implant in the Backs of Rabbits. Li Yuezhong, Yang Yadong, Yang Geng, *et al.* Institute of Health Food, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China

Abstract Objective Three dimensional (3D) bioprinted lung – like hydrogel structure lamellas were implanted in the rabbits' backs to discuss its feasibility of implanting lung – like structure lamellas. **Methods** Lung primary blend cells were extracted from lung tissue pieces of newborn rabbit by 0.25% trypsin digestion. 3D structure lamella containing rabbit lung blend cells – alginate – gelatin blend was constructed using 3D bioprinting technique. Then the cells' survival rate was detected by live – dead cell double fluorescence staining. The 3D structure lamellas were implanted in the rabbits' backs. At 14 days after implantation, histopathological changes of the structure lamellas were examined by hematoxylin – eosin (HE) stain and Masson trichrome stain. **Results** The live/dead cell fluorescence staining results showed that the lung blend cells' survival rate was about $83\% \pm 2\%$ after printing. The hydrogel scaffolds were not degraded at 14 days after implantation. Results of histological observation showed that the lung cells were evenly distributed in the hydrogel scaffolds, and that cell degeneration and death did not happen. **Conclusion** Bioprinted lung structure lamella has the potential to regenerate lung – like tissue structure. Our results demonstrated that it's possible to build a bridge between basic medicine and clinical practice,

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2015ZDA011, 2017KY299, 2017KY307)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院保健食品研究所(李跃中、唐靓);浙江省医学科学院生物工程研究所(杨亚冬、杨耿、罗涛、徐怡朦、张文元)

通讯作者:张文元,电子信箱:zhangwy61@163.com

and lay the foundation for regeneration of the lung structure lamella.

Key words Three - dimensional bioprint; Rabbit lung blend cells; Hydrogel scaffold; Structure lamellas; Implantation

肺是一个由 40 多个不同的细胞类型组成的复杂器官,它有很大的表面积界面,广泛地与环境与循环系统接触。随着年龄的增长,肺功能损失正越来越成为严重的医疗保健问题^[1]。肺部疾病是目前发生率和病死率较高的疾病之一,肺组织在成人慢性破坏后再生能力有限,许多肺部疾患缺乏足够有效的治疗方式^[2-4]。肺移植手术在终末期肺疾病的治疗中已被广泛接受,但存在供体严重缺乏,而且还存在慢性免疫排斥、术后感染并发症和潜在的疾病传播等不良反^[5]。组织工程肺的构建和应用有望解决以上难题,肺基质的再接种是肺再生的一种可行的策略^[6]。但是,由于肺组织结构和生理功能的复杂性,目前肺组织工程研究尚无重大进展^[7]。构建一个有功能、可移植的组织工程肺面临严峻的挑战。3D 生物打印技术有望突破传统组织工程技术的局限与障碍,构建工程化组织与器官。本实验将新生兔肺混合细胞 - 海藻酸钠 - 明胶共混物 3D 生物打印的水凝胶结构体片段植入兔背部皮下,并通过 HE 染色与 Masson 染色观察植入后水凝胶结构体中的肺混合细胞的存活情况,以便为肺脏的再生研究提供新思路。

材料与方法

1. 主要器材和试剂:海藻酸钠、明胶(美国 Sigma - Aldrich 公司),无水 CaCl_2 (分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司),钙黄绿素 - AM(calcein - AM, CAM)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)均为 Solarbio 产品,低糖 - DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),6 孔塑料培养板(美国 Costar 公司)。3D 生物打印机(Bioscaffolder 2.1, GESIM 公司,德国), CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司),荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司,IX73)。新西兰白兔,浙江省实验动物中心提供。实验动物质量合格证号:SCXK(浙)2013 - 0055 号。

2. 新生兔原代肺混合细胞的提取:新生新西兰白兔,1 日龄,体质量约 160g,雌雄不限。断头处死后,浸入 75% 乙醇 5min 消毒。无菌操作下取出肺脏,修剪周边,除去杂质。反复冲洗后,用眼科剪将肺组织剪碎约为 1mm^3 的细小碎块。加入 5 倍于组织碎块体积量的 0.25% 胰蛋白酶,吸管吹打混匀后 37°C 孵

育 8min,吸出已消化的细胞悬液,加到含 10% 胎牛血清的低糖 - DMEM 培养基中,中止消化。将上述消化过的肺组织小碎块同法再消化 1 次,再次吸出已消化的细胞悬液,并再中止消化。合并细胞悬液,充分混合均匀,200 目不锈钢筛过滤,1000r/min 离心 5min, D - PBS 清洗细胞 1 次,再次 1000r/min 离心 5min。通过台盼蓝染色、计数,确认细胞存活率 90% 后,用于如下实验。

3. 三维(3D)生物打印肺结构体:参照文献[8]进行。(1)制备肺细胞共混物:1.6g 海藻酸钠干粉、0.6g 明胶干粉加于 20ml 生理盐水中,低速搅拌混匀,形成水溶胶。每天 $70^\circ\text{C} \times 30\text{min}$ 水浴,连续 3 天间歇灭菌。然后将灭菌后的水溶胶与兔原代肺混合细胞悬液混合,轻柔混匀,经 $300 \times g$ 离心 3min,使气泡消失。得到细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 的肺混合细胞 - 水溶胶共混物。(2)CAD 建模:构建尺寸为 $8\text{mm} \times 8\text{mm} \times 1.2\text{mm}$ 的网格状结构,微丝逐层交错堆积形成的孔隙大小设定为 $600\mu\text{m} \times 600\mu\text{m}$ 。成形温度设定为 10°C ,打印喷头内径为 0.26mm,打印速率为 17mm/s,空气挤出压力 370kPa,层高 0.20mm,料桶温度 32°C ,共打印 8 层。(3)制备肺细胞结构体:将肺细胞共混物置于料桶中,由空气气压推动柱塞水溶胶挤出成形。挤出的微丝逐层交错堆积于 6 孔培养板上。打印后立即用 5% CaCl_2 溶液交联 5min,生理盐水漂洗 3 次。获得半透明网格状带气孔的、有较高孔隙率的肺混合细胞 - 海藻酸钠 - 明胶三维结构体,详见图 1。

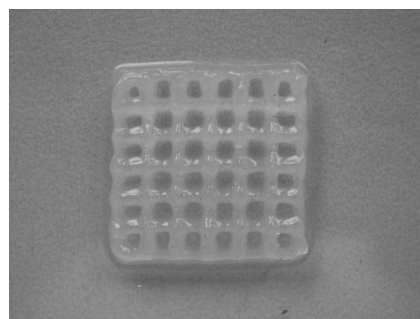


图 1 3D 生物打印的肺混合细胞 - 海藻酸钠 - 明胶三维结构体

4. 新生兔肺细胞结构体的观察:对打印的肺细胞

结构体用活/死细胞双荧光染色剂(含 5 μ mol/L 的钙黄绿素-AM,其激发波长为 488nm;以及含 3 μ mol/L 的碘化丙啶,其激发波长为 543nm) 37℃ 染色 30min。用荧光倒置显微镜分别在 488nm 和 543nm 的激发光下对结构体进行观察,保存图像,并合并这两个激发波长的图像。分别任选 5 个图像,计数图像中的红、绿荧光点(红、绿光点分别代表死细胞、活细胞)个数,计算细胞存活率。细胞存活率为活细胞占全部活死细胞的百分数。

5. 肺细胞结构体植入兔背部:选取健康新西兰白兔 10 只,3 月龄,体重约 2kg,雌雄不限,随机分为 2 组,每组 5 只。3% 戊巴比妥钠 1ml/kg(即 30mg/kg)耳缘静脉注射麻醉,于背部沿正中进行脱毛、消毒、铺巾,无菌条件下,垂直作 1 个长约 1.7cm 的切口,切开背部皮肤。实验组:每只兔皮下左右两侧各植入 1 片肺细胞结构体,间距 3cm。对照组:同法植入不含肺细胞的结构体。术后全部动物于腹部青霉素连续注射 3 天,每只动物 500000U/d。单笼饲养,任其自由活动,并观察生存、饮食、活动情况。

6. 植入物的组织病理学检查:植入 2 周后,将 10 只动物全部耳缘静脉空气针处死。大体观察后,行组织切片染色观察。取适量植入物固定,石蜡包埋、切片,HE 染色和 Masson 染色,光镜观察。

结 果

1. 原代肺混合细胞形态学观察:倒置显微镜下观察,可见分离的新生兔原代肺混合细胞分布均匀,光泽度良好,细胞以类圆球形为主,还有不规则的多角形、三角形等,细胞饱满清晰,细胞活力良好,详见图 2。

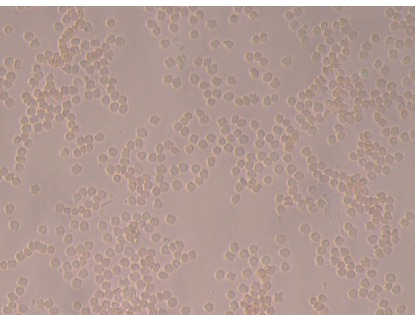
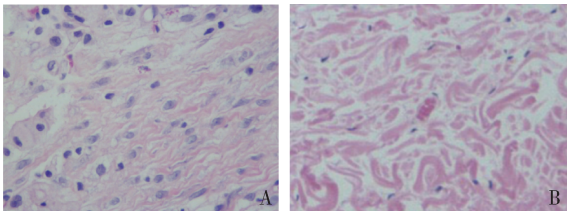


图 2 新生兔原代肺混合细胞(×200)

2. 三维结构体的肺混合细胞存活率:肺混合细胞三维结构体打印后,通过活/死细胞双荧光染色,荧光倒置显微镜观察可见,绝大多数细胞呈绿色荧光染色的活细胞,极少量细胞为染成红色的死细胞,详见图 3。对活、死细胞进行计数,细胞存活率为 83% ± 2%。

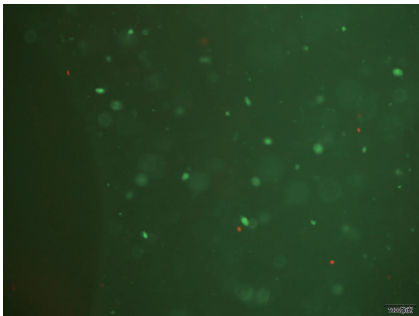


图 3 打印后肺混合细胞三维结构体的双荧光染色(×100)

3. 植入物支架的组织学观察:体内植入 2 周后,可见每个植入物大部分尚未降解。HE、Masson 染色结果表明,实验组植入物中肺细胞均匀分布,未见细胞变性死亡(图 4 中 A、C)。对照组很少见有细胞(图 4 中 B、D)。

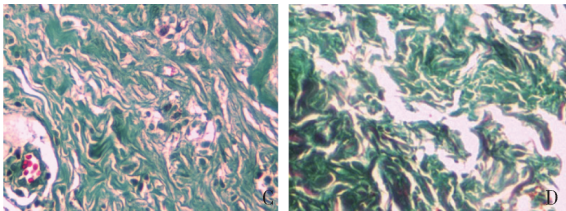


图 4 植入支架的组织学染色(×400)

A、B. 实验组、对照组支架的 HE 染色;C、D. 实验组、对照组支架的 Masson 染色

讨 论

海藻酸钠、明胶是常用的生物打印材料^[9,10]。明胶具有温度敏感性,温度较低时可由溶胶转变为凝胶,使支架得以成形。打印后水凝胶经 CaCl₂ 交联,

使支架结构得以稳固。
传统组织工程技术是将细胞接种于支架表面,细胞难以向内部生长,尤其是支架中心部位细胞生长极少,难以构建结构复杂及具功能活性的工程化组

织^[11]。而3D生物打印技术能定位装配生物材料及细胞单元,能够控制细胞的落点与分布。它改变了传统组织工程难以将细胞深入到支架内部的弊端,为细胞生长和新陈代谢提供了一个较为合适的环境^[12]。3D生物打印的肺脏结构体除了用于移植之外,还可用于体外模拟肺脏进行药物毒性及安全性评估高通量筛选、药物有效性测试与新药发现测试,以及未来药物治疗设计,甚至器官替代^[13-15]。构建复杂结构的3D环境,以及细胞异质性问题可以通过3D生物打印技术实现与解决^[16]。生物打印的可移植支架最终将被用作治疗手段,打印适合于移植的类肺组织可能是克服供体短缺和手术并发症等问题的一个现实选择,将于基础医学和临床之间搭建桥梁,可为肺再生领域提供一个新的医学范例。

然而,在组织工程中应用的3D生物打印技术仍处于初级阶段,需要进一步的改进。作为一种移植体,打印组织的功能比形状更重要,阻碍大规模肺组织再生的一个主要障碍是缺乏伴生的微血管^[17]。组织器官需要进行营养物质与氧气的传输,以及代谢废物的排出。这些都需要有血管或类血管进行血液循环才能完成。不然,处于核心区域的细胞会很快死亡。但是血管细又长,结构复杂,很难打印构建。因此,在血管化、可重复性方面,还需要开展更多的研究^[18]。

基于文献报道,原代分离获得的肺混合细胞群中含有上皮细胞、成纤维细胞、I型及II型肺泡细胞,证明了肺混合细胞群由多种细胞构成^[1,11,19]。为此本实验采用从新生兔肺脏中分离肺混合细胞作为种子细胞。本实验将原代肺混合细胞-海藻酸钠-明胶共混物逐层交叉堆积而成网格状图案的水凝胶3D支架片段,支架里具有逐层交叉的气孔与较高的孔隙率,适于营养物摄入与代谢废物排泄等物质交换。结果表明网格模式的生物打印过程并没有显著影响肺细胞的活力。原代肺混合细胞-海藻酸钠-明胶共混网格状图案的水凝胶3D支架片段在兔背部皮下可形成带有肺细胞组织结构的潜力。由于肺组织结构和生理功能的复杂性,构建具有功能和可供移植的人工肺脏仍是一个极为严峻的挑战。

参考文献

- Garcia O, Carraro G, Navarro S, *et al.* Cell-based therapies for lung disease[J]. Br Med Bull, 2012, 101(1): 147-161
- Nichols JE, Niles JA, Vega SP, *et al.* Modeling the lung: Design and development of tissue engineered macro- and micro- physiologic

- lung models for research use[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(9): 1135-1169
- Kenzaki K, Sakiyama S, Kondo K, *et al.* Lung regeneration: implantation of fetal rat lung fragments into adult rat lung parenchyma[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 131(5): 1148-1153
- Chun YW, Crowder SW, Mehl SC, *et al.* Therapeutic application of nanotechnology in cardiovascular and pulmonary regeneration[J]. Comput Struct Biotechnol, 2013, 7(8): e201304005
- Riquet M, Mordant P, Pricopi C, *et al.* A review of 250 ten-year survivors after pneumonectomy for non-small-cell lung cancer[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2014, 45(5): 876-881
- Petersen TH, Calle EA, Zhao L, *et al.* Tissue-engineered lungs for in vivo implantation[J]. Science, 2010, 329(5991): 538-541
- Lau AN, Goodwin M, Kim CF, *et al.* Stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases[J]. Mol Ther, 2012, 20(6): 1116-1130
- 罗涛,唐靓,杨亚冬,等. 3D生物打印技术在构建兔原代肝细胞水凝胶结构体片段上的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(18): 2596-2599
- Li X, Cai H, Cui X, *et al.* Prevention of late postpneumonectomy complications using a 3D printed lung in dog models[J]. Eur J Cardio-Thorac Surg, 2014, 46(5): e67-e73
- You F, Wu X, Chen X. 3D printing of porous alginate/gelatin hydrogel scaffolds and their mechanical property characterization[J]. Int J Polymeric Mater Polymeric Biomater, 2017, 66(6): 299-306
- Nichols JE, Niles JA, Cortiella J. Design and development of tissue engineered lung: progress and challenges[J]. Organogenesis, 2009, 5(2): 57-61
- Mandrycky C, Wang Z, Kim K, *et al.* 3D bioprinting for engineering complex tissues[J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(4): 422-434
- Wilkinson DC, Alva-Ornelas JA, Sucre JM, *et al.* Development of a three-dimensional bioengineering technology to generate lung tissue for personalized disease modeling[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(2): 622-633
- Horváth L, Umehara Y, Jud C, *et al.* Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting[J]. Sci Rep, 2015, 5: 7974
- Shah SB, Singh A. Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases[J]. Acta Biomater, 2017, 53(1): 29-45
- Radenkovic D, Solouk A, Seifalian A. Personalized development of human organs using 3D printing technology[J]. Med Hypotheses, 2016, 87(1): 30-33
- Zhao Y, Li Y, Mao S, *et al.* The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology[J]. Biofabrication, 2015, 7(4): 045002
- Tan Q, Choi KM, Sicard D, *et al.* Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling[J]. Biomaterials, 2017, 113(1): 118-132
- Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, *et al.* In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids[J]. Elife, 2015, 4: e05098

(收稿日期: 2018-05-02)

(修回日期: 2018-05-22)