

文章编号:1004-7220(2022)01-0180-06

微血管模型的重建和生物力学设计

赵萍, 刘肖*, 苏浩然, 张星, 樊瑜波, 邓小燕*

(北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 生物力学与力生物学教育部重点实验室,
北京市生物医学工程高精尖创新中心, 北京 100083)

摘要:血管生成在许多生理和病理过程中发挥着重要作用,但其机理仍不清楚。血管细胞在体内同时受到多种生物化学和生物力学刺激,处于复杂的微环境中,因此,在体外构建血管模型并重现其在体微环境,对探究血管生成机制十分必要。近年来,随着微加工和微流控技术的进步,各种体外微血管模型应运而生,对剪切力、渗流、血管生成因子浓度梯度等变量进行准确控制,极大地推动了血管生成的研究。本文综述各类微血管模型的构建方式、发展演化及其生物力学设计。

关键词:微流控; 血管模型; 力学微环境

中图分类号:R 318.01 **文献标志码:**A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.01.028

Reconstruction and Biomechanical Design of Microvascular Models

ZHAO Ping, LIU Xiao*, SU Haoran, ZHANG Xing, FAN Yubo, DENG Xiaoyan*

(Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of the Ministry of Education, Beijing Advanced Innovation Centre for Biomedical Engineering, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 10083, China)

Abstract: Neovascularization plays an important role in many physiological and pathological processes, but its mechanism is still unclear. Since vascular cells are subjected to a variety of biochemical and biomechanical stimulations *in vivo* and live in a complex microenvironment, it is necessary to construct the vascular model *in vitro* and simulate the *in vivo* microenvironment to explore the mechanism of neovascularization. Recently, owing to the advance of micromachining and microfluidic technology, various *in vitro* microvascular models have emerged. Variables such as shear stress, interstitial flow and biochemical gradient of angiogenic factors have been controlled in these models, which greatly promotes the research of neovascularization. The construction, development and biomechanical design of various microvascular models are reviewed in this paper.

Key words: microfluidic; vascular models; biomechanical microenvironment

心血管系统是人体胚胎时期形成的第1个器官,也是人体最重要的器官系统之一。心血管疾病是当今世界威胁人类健康的头号杀手,世界卫生组织

预计到2030年,全球每年将有超过2.3亿人死于心血管疾病。异常的血管生成是血管病变的一个重要原因,可引发包括心血管疾病在内的许多常见

收稿日期:2020-12-21; 修回日期:2021-03-09

基金项目:国家自然科学基金项目(11827803,31971244,11772036,32071311,31570947)

通信作者:刘肖,副教授,博士生导师,E-mail:liuxiao@buaa.edu.cn; 邓小燕,教授,博士生导师,E-mail:dengxy1953@buaa.edu.cn

*为共同通信作者

疾病,如动脉粥样硬化、关节炎、哮喘和肿瘤等^[1-3]。因此,加深对血管生成内在机制的理解进而有效地控制血管生成,成为科研工作者和临床医生长期以来的研究重点。迄今为止,血管生成机制仍未完全探明,除生物化学因素(如生长因子、细胞因子)外,越来越多的研究显示,生物力学因素(如血液流动引起的剪切力、循环应变、脉动压力等)也会极大地影响血管生成过程^[4]。但是,在体外构建模拟真实血管生成的微环境,特别是力学微环境,进而研究血管生成机制仍然较为困难。随着微加工和微流控技术的进步,体外微血管模型作为一种新工具,为血管生成机制的研究提供更多可能。相较于传统的体外血管生成模型,体外微血管模型对各类实验变量的控制更加精准,更加接近体内真实环境,并且样品消耗少,通量高,便于多细胞共培养和定量分析,故优势明显^[5-8]。近年来,涌现出一大批体外微血管模型,根据其研究目的和展现形式,大致可分为3种,分别为单血管模型、血管网模型和出芽血管模型。

1 单血管模型

单血管模型是指整个模型由1根单独的微管构成,微管内表面一般覆有内皮细胞。理想的单血管模型应具有正常血管的生理功能,如屏障功能、可对生长因子和力学刺激做出反应等,还可以经受住长时间的灌注。一般来说,管径越小的单血管模型越难以制造。Chrobak等^[9]利用“悬针法”率先在胶原中制造出微米级的通道,随后在其内接种内皮细胞,最终形成能够灌注的单层内皮管道(见图1)。该研究首先利用光刻胶在硅片表面制造出宽度和高度各为1 mm、长度1 cm的长方体模型,该模型凸出于硅片表面。随后,将聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)浇筑于硅片上并进行固化,以此得到单通道PDMS模具。利用一个简单的PDMS辅助支架,将1根直径为120 μm的细针平行悬空于PDMS模具的通道内,并在细针周围灌满胶原。当胶原胶连固化后,小心取出细针,即可得到1条微米级的微管。随后,向微管内接种人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)并培养至单层。以此方法,最终制造出管径75~150 μm的内皮微血管。该微血管可

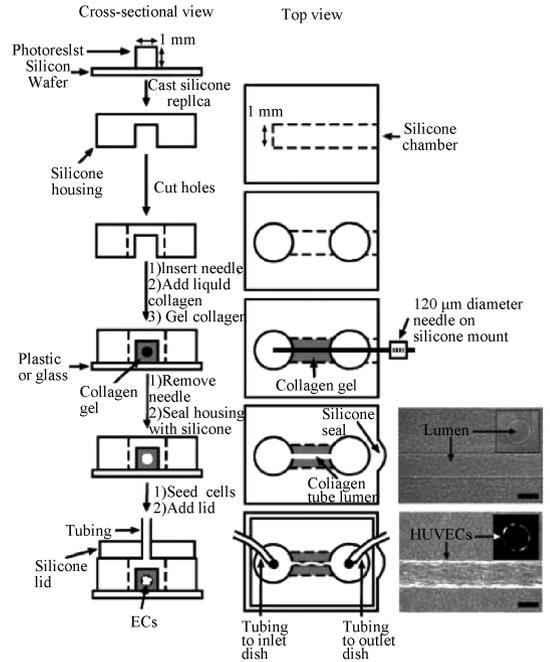


图1 悬针法制造内皮微管示意图^[9]

Fig.1 Schematic diagram for the assembly of endothelial tube by needle suspension^[9]

以在10 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)平均压力、1 Pa剪切力条件下灌注1周左右,具有一定的屏障功能,并且可对炎症刺激快速反应。利用该微血管模型,Price等^[10]研究了力学信号对微血管屏障功能和血管稳定性的影响。通过调整内皮微管的管径或将两条内皮微管平行排列,该研究分别测定流量、剪应力、跨壁压力和平均腔内压力等对内皮微血管渗透率和存续时间的作用,发现剪应力是维持微血管屏障功能的主要因素,而跨壁压力是维持微血管稳定性的主要因素。随后,Polacheck等^[11]也以该单血管模型为基础,研究Notch信号对血管屏障功能的调节,证实Notch1跨膜受体通过一种不依赖转录的信号机制直接调节血管屏障功能,驱动黏着连接组装。他们还将人骨髓间质细胞外衬于内皮微管外共培养,以此探究炎症反应中内皮细胞与壁细胞相互作用对血管屏障功能的影响,发现RhoA、Rac1和N-钙黏素在其中起到重要作用^[12]。文献^[13]也利用类似的方法,将细针替换为可自主设计形状的PDMS细杆,制造出管径50~150 μm、具有一定屏障功能的内皮微管。Ingram等^[14]还使用诱导多能干细胞(induced pluripotent

stem cells, iPSCs)来源的内皮细胞制作微血管,该微血管具备屏障功能,可分泌血管生成因子和炎症介质,并可通过改变血管表型对细胞外微环境的变化作出反应。Mandrycky等^[15]利用不锈钢弹簧在PDMS中构建厘米级的螺旋微管,并在其内侧接种内皮细胞。螺旋微管的弯曲和扭转可控,还可承受50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流量的灌注。利用该模型,该研究证实旋动流可以改变内皮细胞表型。

此外,还有一些研究者尝试用三维生物打印的技术制造单血管模型。生物打印的优势是可以一次制造出任意长度的单血管,但如何直接打印小口径、可灌注的血管仍是一个难题。Daniele等^[16]将光聚合方法与多层同轴生物打印技术相结合,制造出内径125 μm 、外径200 μm 的聚乙二醇微管,但该微管无法承受液体灌注。在此基础上,他们将甲基丙烯酸甲酯(gelatin methacryloyl, GelMA)与聚乙二醇混合,并将血管所需细胞(内皮、平滑肌及周细胞)预先混入混合胶原内,先后制造出纯内皮微血管(human endothelial microvessels, HEMV)和多细胞微血管(multi-cell microvessels, MCMV)^[17]。这两种微管具有相同的管径,可长期存活。随后,他们将微管植入混有成纤维细胞的三维基质,微管经培养展现出一定的出芽能力,可形成原始的血管网,还可承受最高2.5 Pa灌注。

2 血管网模型

相较于单血管模型,血管网模型的结构更加复杂,制造难度也更高。除了基础研究的需要外,构建功能性血管网对组织工程尤为重要。由于氧气扩散的极限距离是100~200 mm,大于该尺寸的人工组织要想存活,必须在内部提供输送养分的通道。在体外培养时,营养和氧气可由生物灌注系统提供。而当植入体内后,则需要依靠功能性毛细血管网^[18-19]。因此,在体外构建功能完善的血管网是组织工程长期以来的研究重点。目前,体外构建的血管网模型大致可分为两种:一是由内皮细胞自组装形成的随机血管网模型;二是在预制模具内形成的规则血管网模型。

2.1 随机血管网模型

内皮细胞可在水凝胶如Matrigel或I型鼠尾胶原中通过自组装,形成类似毛细血管的网格状结

构^[20]。这样形成的网状结构虽然形态上与毛细血管网类似,但无法灌注,也无法长时间存续,在一段时间后会自行降解。Song等^[21]利用PDMS制造了三通道模型,该模型两侧为细胞接种流道,中间为300 μm 宽的胶原通道,3条流道之间由PDMS微柱分隔。内皮细胞在细胞接种流道内环绕形成微管,并从PDMS微柱的间隙间出芽进入中间胶原,在胶原中相互吻合形成网络。两侧的内皮微管被该网络相连通,1 μm 荧光粒子可随灌注液体在压差的作用下通过吻合管。Jeona等^[22]采用类似的结构,将HUVECs和骨髓来源的人间充质干细胞(bone marrow derived human mesenchymal stem cells, BM-hMSCs)直接混合在中间的胶原通道中,将培养基灌注在两侧流道中,形成具有一定屏障功能的内皮血管网。Kim等^[23]将流道扩展到5条,在中间流道注入HUVECs与纤维蛋白原溶液,在其两侧流道加入培养基,并将人肺成纤维细胞(human lung fibroblasts cells, HLFs)与纤维蛋白原混匀后注入最外侧两流道。内皮细胞在中间流道内通过自组装形成了联通两侧流道的血管网,该血管网具有一定的屏障功能,并能承受300 $\mu\text{L}/\text{h}$ 低流量灌注。他们随后增加了中间流道的宽度,并将位于顶板的PDMS替换成带有孔径200 μm 阵列微孔的PDMS薄膜^[24]。这样可以将一些肿瘤细胞团块种植在薄膜上,实现与血管网的共培养。

Moya等^[25]将一系列菱形的微组织腔通过微流道相连,并将人内皮细胞集落形成细胞来源的内皮细胞(human endothelial colony forming cell-derived endothelial cells, ECFC-ECs)与HLFs混合,与纤维蛋白原溶液中一起注入到微组织腔中,使其自组装成随机血管网。他们通过调节组织腔上下两端的压力梯度来改变渗流方向,并定期反转渗流方向以促进血管网的均匀生长。最终,他们得到了管径15~50 μm 、可存活7 d的功能性微血管网。该血管网能承受流速4 mm/s以下、剪切率1 000 s^{-1} 以下的灌注。

2.2 规则血管网模型

另一种构建血管网模型的方法是在预先构建好的模具内接种内皮细胞,使其直接形成规则血管网模型。Zheng等^[26]用PDMS制成直梯状的模具,将I型鼠尾胶原灌注其中,随后将HUVECs接种于

流道内壁,形成具有一定屏障功能且可存活 1~2 周的规则血管网。三维生物打印也是构建规则血管网模型的常用方法,Miller 等^[27]利用一种具有生物兼容性的刚性合成糖纤维编织成三维晶格牺牲模板(sacrificial molding),并将该模板与小鼠胚胎成纤维细胞共同封装于细胞外基质中。模板被溶解后,将 HUVECs 注入形成的管道中,最终得到可承受短时间灌流的三维血管化组织(见图 2)。Kinstlinger 等^[19]随后使用由激光烧结碳水化合物粉末制成的牺牲模板,制成树枝状或其他复杂的血管网络,并使用该模型定量研究细胞增殖和代谢梯度对灌流液体和细胞氧气和代谢物扩散的响应。类似地,Massa 等^[29]使用琼脂糖纤维制作牺牲模板,在 GelMA、SPELA、PEGDA 等水凝胶中构建结构复杂、多种直径(0.1~1 mm)的三维通道。但该研究只将内皮细胞接种进简单的直管中,形成具有一定屏障功能的内皮微管。Kolesky 等^[30]将普朗尼克(pluronic)和凝血酶的混合物作为牺牲模板,利用 hMSCs 和人新生儿真皮纤维母细胞(human neonatal dermal fibroblasts, hNDFs)在细胞外基质中构建脉管系统,并在其内接种 HUVECs,由此得到厚约 1 cm 血管化组织。该组织可灌注,能长期存活,还可通过干细胞分化驱动特定谱系。

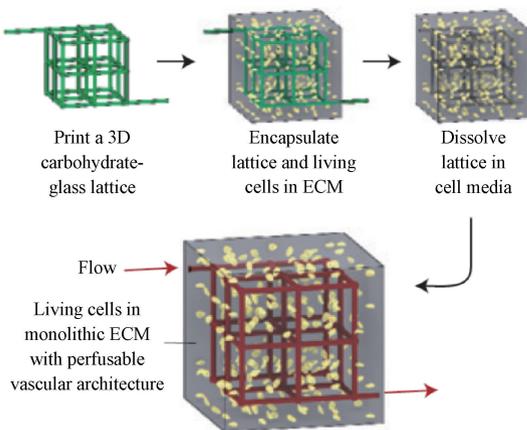


图 2 利用碳水化合物玻璃纤维作为牺牲模板制造可灌注三维网络示意图^[27]

Fig.2 Schematic diagram of using carbohydrate glass as sacrificial template to fabricate perfusable 3D filament networks^[27]

3 出芽血管模型

出芽血管模型以单血管模型或血管网模型为

基础,侧重于研究内皮细胞的出芽过程。在以单血管模型为基础的出芽血管模型中,一般需额外添加生长因子以促进内皮出芽。Nguyen 等^[31]以“悬针法”在胶原内制造了两条平行的内皮微管,向其中一条微管内加入促血管新生因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)等,以诱发另一条内皮微管的出芽。Jeong 等^[32]将内皮细胞接种于 PDMS 制成的微流道中形成小管,随后向相邻通道的胶原中出芽。结合仿真计算,可以较为精准的控制流道内的 VEGF 浓度梯度。他们还研究了内皮出芽的形态,发现出芽直径与延伸率成反比,且位于出芽尖端的顶细胞通过 MMP-2 促进细胞外基质降解,并调节出芽直径^[33]。本课题组在三通道 PDMS 芯片的基础上对流动控制系统加以改良,成功模拟了血管生成初始阶段的微环境^[34]。该模型具有自动化、无泡、高仿真、低消耗等特点,可对内皮细胞所受壁面剪切力、跨内皮流、间质流及生长因子浓度梯度等进行精准调控,实现了对内皮微血管高通量、长时间的灌流(见图 3)。利用该模型发现,腔内流诱导产生的壁面剪切力对血管生成有抑制作用,硫酸乙酰肝素(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)作为力传感器参与介导这一过程。

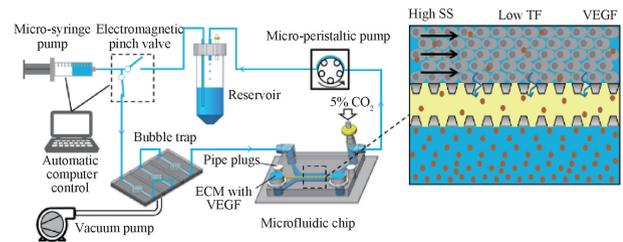


图 3 微流动控制系统示意图^[34]

Fig.3 Schematic diagram of microfluidic control system^[34]

以随机血管网模型为基础的出芽血管模型多依托于的 PDMS 芯片。Song 等^[21]开发了三通道芯片,在内皮出芽吻合成血管网前即可用来研究出芽过程。内皮渗流可通过改变两侧流道的静水压调节,研究发现,VEGF 浓度梯度与渗流共同影响出芽形态,且渗流可通过小 GTP 酶 RhoA 和组蛋白脱乙酰酶 1(histone deacetylase1, HDAC1)的介导影响内

皮出芽^[35-36]。Kim等^[37]开发了六通道芯片,可以同时作为随机血管网模型和出芽血管模型。他们在内侧两条流道中充满胶原,其中一条流道内混入内皮细胞,通过自组装形成血管网;另一条流道内只有纯胶原,可用于出芽。最外侧的两条流道内接种有成纤维细胞,其余两条流道内灌注培养基。在该模型中,渗流同样通过静水压差调节,结果发现,渗流可以使内皮细胞从静息态转向出芽,且逆向渗流促进出芽。

4 结论

目前体外微血管模型对力学微环境的模拟主要集中在血压、血流剪切力和渗流上,通过与数值仿真和微流控技术相结合,体外微血管模型可对上述参数进行较为精准的调控。作为一种新型的体外实验技术,体外微血管模型还需要不断发展。例如,可以对模型中常用的水凝胶弹性、黏弹性等力学特性进行更加精确的控制;也可以通过对模型进行牵拉以模拟血管壁周向应变。综上所述,体外微血管模型对于模拟在体力学微环境、研究血管生成机制具有重要作用。

参考文献:

- [1] ELSHABRAWY HA, CHEN Z, VOLIN MV, *et al.* The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(4): 433-448.
- [2] CIMPEAN AM, RIBATTI D, RAICA M. A brief history of angiogenesis assays [J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(4-5): 377-382.
- [3] LI T, KANG G, WANG T, *et al.* Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 687-702.
- [4] 杨少雄, 龚晓波. 血管细胞在体力学微环境简析 [J]. *医用生物力学*, 2020, 35(4): 111-116.
YANG SX, GONG XB. *In vivo* mechanical niches of vascular cells [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(4): 111-116.
- [5] BERSINI S, YAZDI IK, TALÒ IG, *et al.* Cell-microenvironment interactions and architectures in microvascular systems [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(6): 1113-1130.
- [6] AKBARI E, SPYCHALSKI GB, SONG JW. Microfluidic approaches to the study of angiogenesis and the microcirculation [J]. *Microcirculation*, 2017, 24(5): e12363.
- [7] NOWAK-SLIWINSKA P, ALITALO K, ALLEN E, *et al.* Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 425-532.
- [8] 苏皓然, 赵萍, 邓小燕, 等. 微流体器官芯片研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2019, 34(3): 320-326.
SU HR, ZHAO P, DENG XY, *et al.* The reserch progress of microfluidic organ-on-chips [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(3): 320-326.
- [9] CHROBAK KM, POTTER DR, TIEN J. Formation of perfused, functional microvascular tubes *in vitro* [J]. *Microvasc Res*, 2006, 71(3): 185-196.
- [10] PRICE GM, WONG KH, TRUSLOW JG, *et al.* Effect of mechanical factors on the function of engineered human blood microvessels in microfluidic collagen gels [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(24): 6182-6189.
- [11] POLACHEK WJ, KUTYS ML, YANG J, *et al.* A non-canonical Notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function [J]. *Nature*, 2017, 552(7684): 258-262.
- [12] ALIMPERTI S, MIRABELLA T, BAJAJ V, *et al.* Three-dimensional biomimetic vascular model reveals a RhoA, Rac1, and N-cadherin balance in mural cell-endothelial cell-regulated barrier function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(33): 8758-8763.
- [13] JIMÉNEZ-TORRES JA, PEERY SL, SUNG KE, *et al.* LumeNEXT: A practical method to pattern luminal structures in ECM gels [J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(2): 198-204.
- [14] INGRAM PN, HIND LE, JIMINEZ-TORRES JA, *et al.* An accessible organotypic microvessel model using ipsc-derived endothelium [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(2): 1700497.
- [15] MANDRYCKY C, HADLAND B, ZHENG Y. 3D curvature-instructed endothelial flow response and tissue vascularization [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(38): eabb3629.
- [16] DANIELE M, RADOM K, LIGLER F, *et al.* Microfluidic fabrication of multiaxial microvessels via hydrodynamic shaping [J]. *Rsc Advances*, 2014, 4(45): 23440-23446.
- [17] DIVITO KA, DANIELE MA, ROBERTS SA, *et al.* Microfabricated blood vessels undergo neoangiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2017, 138: 142-152.
- [18] ROUWKEMA J, KHADEMOSSEINI A. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: Beyond creating static networks [J]. *Trends Biotechnol*, 2016, 34(9): 733-745.
- [19] ROUWKEMA J, RIVRON NC, BLITTERSWIJK CA, *et al.* Vascularization in tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(8): 434-441.
- [20] KUBOTA Y, KLEINMAN HK, MARTIN GR, *et al.* Role of

- laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures [J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(4): 1589-1598.
- [21] SONG JW, BAZOU D, MUNN LL. Anastomosis of endothelial sprouts forms new vessels in a tissue analogue of angiogenesis [J]. *Integr Biol*, 2012, 4(8): 857-862.
- [22] JEONA JS, BERSINIB S, WHISLERA JA, *et al.* Generation of 3D functional microvascular networks with mural cell-differentiated human mesenchymal stem cells in microfluidic vasculogenesis systems [J]. *Integr Biol*, 2014, 6(5): 555-563.
- [23] KIM S, LEE H, CHUNG M, *et al.* Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(8): 1489-1500.
- [24] OH S, RYU H, TAHK D, *et al.* "Open-top" microfluidic device for *in vitro* three-dimensional capillary beds [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(20): 3405-3414.
- [25] MOYA ML, HSU YH, LEE AP, *et al.* *In vitro* perfused human capillary networks [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19(9): 730-737.
- [26] ZHENG Y, CHEN J, CRAVEN M, *et al.* *In vitro* microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(24): 9342-9347.
- [27] MILLER JS, STEVENS KR, YANG MT, *et al.* Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues [J]. *Nat Mater*, 2012, 11(9): 768-774.
- [28] KINSTLINGER IS, SAXTON SH, CALDERON GA, *et al.* Generation of model tissues with dendritic vascular networks via sacrificial laser-sintered carbohydrate templates [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(9): 916-932.
- [29] MASSA S, SAKR MA, SEO J, *et al.* Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis [J]. *Biomicrofluidics*, 2017, 11(4): 044109.
- [30] KOLESKY DB, HOMAN KA, SKYLAR-SCOTT MA, *et al.* Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(12): 3179-3184.
- [31] NGUYEN DH, STAPLETON SC, YANG MT, *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(17): 6712-6717.
- [32] JEONG GS, HAN S, SHIN Y, *et al.* Sprouting angiogenesis under a chemical gradient regulated by interactions with an endothelial monolayer in a microfluidic platform [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22): 8454-8459.
- [33] WOOD LB, GE R, KAMM RD, *et al.* Nascent vessel elongation rate is inversely related to diameter in *in vitro* angiogenesis [J]. *Integr Biol*, 2012, 4(9): 1081-1089.
- [34] ZHAO P, LIU X, XING Z, *et al.* Flow shear stress controls the initiation of neovascularization via heparan sulfate proteoglycans within biomimic microfluidic model [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(2): 421-434.
- [35] BAZOU D, NG MR, SONG JW, *et al.* Flow-induced HDAC1 phosphorylation and nuclear export in angiogenic sprouting [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34046.
- [36] SONG JW, DAUBRIAC J, TSE JM, *et al.* RhoA mediates flow-induced endothelial sprouting in a 3-D tissue analogue of angiogenesis [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(23): 5000-5006.
- [37] KIM S, CHUNG M, AHN J, *et al.* Interstitial flow regulates the angiogenic response and phenotype of endothelial cells in a 3D culture model [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(21): 4189-4199.