

· 论著 ·

DOI: 10.12464/j.issn.0253-9802.2025-0078

间充质干细胞与内皮细胞 3D 仿生分布设计 促进组织工程支架血管化的效果

谭佳梦¹, 吴宇¹, 陈建伟², 朱德龙^{1,3}, 王昆³✉, 朱蕾¹✉

(1. 中山大学附属第三医院皮肤与整形美容科, 广东 广州 510630; 2. 深圳清华研究院生物智能制造和活体打印研发中心, 广东 深圳 518063; 3. 中山大学附属第三医院关节与创伤外科, 广东 广州 510630)

【摘要】 目的 通过同轴生物 3D 打印技术构建间充质干细胞 (MSCs) 与人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的 3D 仿生分布设计支架 (Shell-Core 支架), 并对该种支架的仿生血管化功能进行实验验证。方法 通过同轴生物 3D 打印技术构建 Shell-Core 支架, 并通过光镜、染色实验等方式对其仿生结构进行检测。通过分组观察对比、细胞划痕实验检测其体外促血管化效果。采用实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测仿生支架细胞的 RNA 表达水平。结果 成功构建了 Shell-Core 支架, 其结构具有高度保真性, 该结构可以保持到构建后的第 7 日。细胞增殖实验显示在第 7 日可以观察到支架中细胞增殖速度超过 2D 平面下混合培养的细胞增殖速度。细胞划痕实验显示 Shell-Core 条件培养基处理组的 HUVECs 划痕缩短距离大于细胞随机散在分布的 3D-Mix 条件培养基处理组和无血清 DMEM 处理组 [(431.6 ± 33.6) μm vs. (378.7 ± 22.5) μm vs. (302.3 ± 20.1) μm, 均 $P < 0.01$]。将仿生分布设计的组织工程体外培养 7 d 后在荧光显微镜下可以观察到表达绿色荧光蛋白的 HUVECs 仍维持在设计的核通道内, 并向四周自组装出内皮细胞芽。qRT-PCR 的结果显示 Shell-Core 支架中细胞的 MMP-9 基因表达高于 3D-Mix 支架 [(1.55 ± 0.06) 倍, $P < 0.01$]。结论 Shell-Core 支架在确保了仿生设计结构高度保真性的同时具有促进血管化的作用, 为解决组织缺损的修复、制造血管化的工程器官提供了新思路, 也可作为药物测试、研究血管发生等提供新的组织模型。

【关键词】 同轴生物 3D 打印; 预血管化; 仿生设计; 间充质干细胞; 血管生成; 组织修复

3D biomimetic design of mesenchymal stem cells and endothelial cells promotes the vascularization of tissue engineering scaffold

TAN Jiameng¹, WU Yu¹, CHEN Jianwei², ZHU Delong^{1,3}, WANG Kun³✉, ZHU Lei¹✉

(1. Department of Plastic and Aesthetic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Bio-Intelligent Manufacturing and Bioprinting Research Center, Shenzhen Tsinghua Research Institute, Shenzhen 518063, China; 3. Department of Joint and Trauma Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding authors: WANG Kun, E-mail: wangk@mail.sysu.edu.cn; ZHU Lei, E-mail: zhulei@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To fabricate 3D biomimetic design of tissue engineering scaffolds (Shell-Core scaffolds) incorporating mesenchymal stem cells (MSCs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by using advanced coaxial 3D bioprinting technology, and to validate the biomimetic vascularization capacity of the scaffolds by experiments. **Methods** The Shell-Core scaffolds were successfully fabricated via coaxial 3D bioprinting technology. The biomimetic structural features were characterized using optical microscopy and histological staining assay. The *in vitro* pro-angiogenic capacity was evaluated through inter-group comparative observations and cell scratch assays. Furthermore, qRT-PCR was employed to quantify RNA expression levels of angiogenesis-related markers in cells cultured on the Shell-Core scaffolds. **Results** Shell-Core scaffolds were successfully fabricated. The scaffolds possessed high structural fidelity, which could be maintained at 7 d after scaffold fabrication. Cell proliferation assay showed that the cell proliferation rate in the scaffolds at 7 d was higher than that in the mixed culture on the 2D plane. Cell scratch assay showed that the shortening scratch distance of HUVECs treated by Shell-Core-CM was significantly greater than those treated by 3D-Mix-CM and blank

收稿日期: 2025-03-07

基金项目: 广东省自然科学基金 (2023A151501261)

作者简介: 谭佳梦, 硕士研究生, 研究方向: 生物 3D 打印、间充质干细胞、组织工程、预血管化、组织修复、创面愈合, E-mail: tanjm9@mail2.sysu.edu.cn; 王昆, 通信作者, 教授, 主任医师, 研究方向: 运动医学、再生医学、肩袖损伤、组织修复、组织工程, E-mail: wangk@mail.sysu.edu.cn; 朱蕾, 教授, 主任医师, 研究方向: 生物 3D 打印、间充质干细胞、再生医学、组织工程、预血管化、组织修复、创面愈合, E-mail: zhulei@mail.sysu.edu.cn

groups [(431.6 ± 33.6) μm vs. (378.7 ± 22.5) μm vs. (302.3 ± 20.1) μm, both $P < 0.01$]. At 7 d after *in vitro* cultured of engineered biomimetic tissues, under fluorescence microscope, HUVECs expressing green fluorescent protein remained in the designed core channel, and self-assembled endothelial buds in all directions. Furthermore, the results of qRT-PCR show that quantified RNA expression levels of angiogenesis-related markers (MMP-9) in cells cultured on the Shell-Core scaffolds was significantly higher (1.55 ± 0.06, $P < 0.01$) than that in 3D-Mix scaffolds. **Conclusions** The Shell-Core scaffolds integrating MSCs and HUVECs demonstrates high structural fidelity and pro-angiogenic capacity, offering a novel strategy for addressing tissue defect repair and fabricating vascularized engineered organs. This platform further provides a physiologically relevant tissue model for drug testing and mechanistic investigation of angiogenesis.

[Key words] Coaxial 3D bioprinting; Pre-vascularization; Biomimetic design; Mesenchymal stem cell; Angiogenesis; Tissue repair

缺损组织和受损器官的修复与重建一直是医学界的重要挑战,修复与重建效果不佳不仅给患者带来了长期困扰,也成为其家庭和医疗保健系统的经济负担^[1]。对此,利用组织工程和再生医学技术开发人工的组织工程展现出了巨大潜力,部分成果已经转化为实际的治疗措施^[2,3]。其中,组织工程的血管化程度与速度是其存活与发挥功效的关键影响因素^[4]。研究者常将间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和内皮细胞与组织工程结合并将其用于血管化研究。目前的组织工程构建策略以简单地将MSCs与内皮细胞混合于生物材料形成混悬液后进行打印为主,这会导致多种细胞无序随机散在分布。然而,人体内各种细胞在细胞外基质中的分布并不如此,而是更为有序地分布于不同的位置。例如,内皮细胞在体内往往是紧密连接并贴附于中空的管道内表面,而MSCs等支持细胞则散在分布于管壁外甚至更远的基质中。因此,本研究团队在进行组织工程构建时,进行了2种细胞的仿生分布设计,通过结合同轴喷嘴与传统3D打印技术,以简单步骤实现组织工程中细胞的分区分布,成功构建了MSCs与内皮细胞2种细胞分区分布的仿生支架,并探讨了其在促进血管生成方面的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人类脂肪来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)购自美国Sciencell™研究实验室,人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells HUVECs)以及表达绿色荧光蛋白的HUVECs(GFP-HUVECs)购自Lonza(Walkersville, MD)。杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified

eagle medium, DMEM)、胎牛血清和1%青霉素-链霉素均购自Gibco公司。细胞膜红色荧光染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。甲基丙烯酸酯化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)、苯基-2,4,6-三甲苯甲酰基-磷酸锂盐(lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP)和蓝色光源(3 W, 405 nm)购自苏州智能制造研究院。明胶购自Aladdin公司。阿尔玛蓝细胞增殖检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。RNA提取试剂盒及逆转录试剂盒购自TaKaRa公司。生物3D打印机(Livprint norm)购自中国广州迈普再生医学科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将细胞放置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,在细胞生长到融合度约80%时进行传代,每隔一日更新一次培养基。

1.2.2 染色标记间充质干细胞

使用细胞膜红色荧光染色试剂盒对MSCs进行细胞膜染色标记。按照制造商的说明书制备染色工作液。将MSCs培养瓶中培养基吸走,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗3遍,然后加入5 mL的1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(Dil)染色工作液,将培养瓶置于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育30 min。吸收染料工作液,用DMEM洗涤3次后,加入完全培养基,在荧光显微镜下观察。

1.2.3 构建间充质干细胞与内皮细胞3D仿生分布设计支架

构建MSCs与HUVECs的3D仿生分布设计组织工程(Shell-Core支架)。分别制备含细胞的壳通道和核通道生物墨水。壳通道生物墨水:采用DMEM制备包含LAP(质量与体积比为0.3%)的

GelMA 溶液（质量与体积比为 5%），然后用过滤精度为 0.22 μm 的过滤膜（Millipore Corp, Burlington, MA, USA）过滤 GelMA 溶液。核通道生物墨水：采用 DMEM 制备明胶溶液（质量与体积比为 5%）。分别用壳通道生物墨水和核通道生物墨水重悬 MSCs 沉淀和 HUVECs 沉淀。MSCs 最终浓度为 1.5×10^6 个/mL，HUVECs 最终浓度为 5×10^6 个/mL。将上述生物墨水分别泵入同轴喷嘴的壳通道和核通道，通过生物 3D 打印机构建 Shell-Core 支架。打印设置参数：支架大小为 10 mm \times 10 mm \times 2 mm，同轴喷嘴内通道直径约为 200 μm ，外通道直径约为 550 μm ，内通道生物墨水的挤出速度为 0.5 mL/min，外通道生物墨水的挤出速度为 3 mL/min，打印速度为 10 mm/s，打印环境温度为 21 $^{\circ}\text{C}$ ，接收平台温度为 10 $^{\circ}\text{C}$ 。支架按上述参数进行打印，打印后立即用波长为 405 nm、强度为 100 mW/cm² 的蓝光照射 40 s，使 GelMA 完全光交联，然后用生理盐水清洗 3 次，加入完全培养基，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO₂ 的培养箱中进行培养及后续实验。

构建 MSCs 与 HUVECs 随机散在分布的组织工程（3D-Mix 支架）。将 MSCs 与 HUVECs 按 1 : 1 比例混合于壳通道的生物墨水中，2 种细胞的最终浓度均为 1.5×10^6 个/mL，用普通喷嘴直接进行 3D 打印。体外培养条件与 Shell-Core 支架一致。

1.2.4 细胞增殖实验

使用阿尔玛蓝细胞增殖检测试剂盒检测细胞增殖能力。Shell-Core 支架被均匀地切成 4 份，并分别放置在 24 孔板中培养。2D 平面混合培养组（Co-culture 组）的细胞培养如下，将 MSCs 与 HUVECs 按 1 : 1 比例接种于 6 孔板，每孔最终接种 0.8×10^5 个细胞，培养基与 Shell-Core 支架一致，均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱中培养。按照制造商的说明书配制工作液，检测时，吸出被检测孔中的培养基，用 PBS 清洗 3 次，每孔加入 2 mL 工作液，同时在空白孔中加入工作液作为空白对照孔，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 h。随后在每个孔板孵育的工作液中吸取 100 μL 转移到 96 孔板上，并在 570 nm 和 630 nm 处测量吸光值（optical density, OD），将空白对照孔的工作液测得的 OD 作为基线。每次检测完毕后吸去剩余的工作液，每孔用 PBS 清洗 3 次，并更换新鲜培养基继续按上述培养条件进行体外培养。每个样品分别在培养至第 1、4、7 日进行检测。

1.2.5 细胞划痕实验

通过细胞划痕实验评估 3D 仿生分布设计是否影响支架的旁分泌，并通过旁分泌的方式对 HUVECs 迁移产生影响，从而影响血管化。实验共分为 3 个组，分别为空白组（DMEM 组）、作为对照组的 3D-Mix 组、实验组 Shell-Core 组。体外培养的第 4 日，3D-Mix 组与 Shell-Core 组均倒去培养基，用无血清 DMEM 清洗 3 次，每孔加入 2 mL 无血清 DMEM，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h，分别收集上清液作为条件培养基（conditioned medium, CM），1 500 转 / 分离心 10 min，于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待进一步使用。在 6 孔板中接种 HUVECs 进行培养，待其细胞汇合度达到 80% 左右，用 PBS 清洗 2 次，加入新鲜无血清 DMEM 饥饿处理过夜，再用 1 000 μL 移液管尖在单层 HUVECs 中划出一条条状空白区域（即划痕）。随后立即用 PBS 轻柔清洗 2 次以去除脱落的细胞，将 Shell-Core-CM 以及 3D-Mix-CM 解冻加热至 37 $^{\circ}\text{C}$ ，分别加入至带细胞划痕的 6 孔板孔中，空白组的孔中则加入无血清 DMEM。分别在 0 h 和 24 h 用显微镜观察拍照，通过测量 HUVECs 沿划痕区域宽度缩小的距离来量化迁移 / 增殖水平。划痕宽度缩短距离为 0 h 划痕宽度与 24 h 划痕宽度之差。

1.2.6 支架血管化比较

评估 Shell-Core 支架的结构保真性、结构的维持时长以及打印后支架在不同时间的演变，以探究 3D 仿生分布设计对支架功能化的影响。具体来说，同时构建 Shell-Core 支架和 3D-Mix 支架，在打印后当日与第 7 日在光学显微镜和荧光显微镜下观察 2 种支架血管化情况并拍照。其中在荧光显微镜下，Dil-MSCs 显示为红色，GFP-HUVECs 显示为绿色。

1.2.7 定量实时聚合酶链反应

为了评估 3D 仿生分布设计对支架血管生成基因表达的影响，将 Shell-Core 组与 3D-Mix 组体外培养 7 d，分别提取支架总 RNA，评估基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMP）的表达。按照制造商的说明书提取总 RNA，使用逆转录试剂盒进行逆转录。根据试剂盒的实验步骤进行实时定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR）。采用 LightCycler 480 实时荧光 PCR 系统进行 qRT-PCR 检测。以甘油醛-3-磷酸

脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为管家基因, 每个样品测量 3 次。相对基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.2.8 统计学方法

使用 SPSS 22.0 分析数据。符合正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间均数采用 Student *t* 检验进行比较, 多组均数比较采用单因素方差分析, 采用 LSD-*t* 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

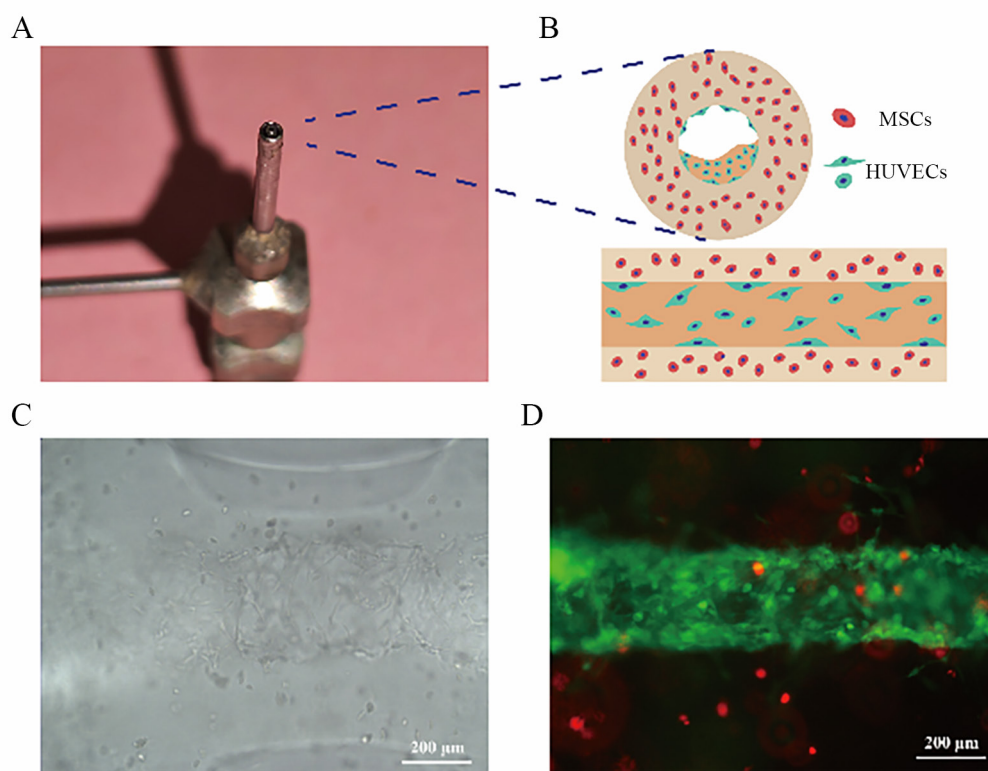
2.1 成功构建 Shell-Core 支架

采用同轴喷嘴 (图 1A), 结合传统的堆叠式 3D 生物打印机, 以实现 2 种生物墨水在喷嘴的不同部位被同时挤出, 2 种细胞精准分区, 沉积壳层、包裹核层, 组成壳-核结构条状纤维 (图 1B), 这

种异质结构的条状纤维在接收平台上平行排列逐层累积, 从而完成整个 Shell-Core 支架的构建。支架构建后在体外培养第 2 日, 可观察到核通道内的 HUVECs 黏附于中空通道的内壁并由载 MSCs 的壳层包绕 (图 1C)。为了更好地观察支架内细胞的分布, 使用 Dil-MSCs (红色) 与 GFP-HUVECs (绿色) 进行打印, 在体外培养第 7 日于荧光显微镜下观察, GFP-HUVECs 仍紧密连接成细胞索道分布于核通道, Dil-MSCs 均匀散在分布于壳通道材料中 (图 1D), 实现了使 MSCs 与 HUVECs 按设计精准分区沉积。经观察, 这种仿生结构可以至少保持到构建后的第 7 日。

2.2 细胞增殖实验

Shell-Core 组体外培养第 4 日的细胞增殖比 Co-culture 组慢 (1.221 ± 0.135 vs. 1.372 ± 0.080 , $P < 0.05$), 但随着培养时间增加, 支架中细胞增殖

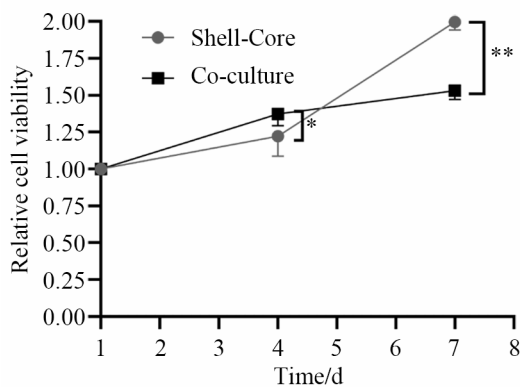


注: A 为同轴喷嘴外观; B 为含 MSCs 的壳通道生物墨水与含 HUVECs 的核通道生物墨水同时挤出形成仿生分区的条状纤维横切面与纵切面示意图; C 为体外培养第 2 日光学显微镜下所见 ($\times 200$, 标尺为 $200 \mu\text{m}$); D 为培养第 7 日荧光显微镜下所见, Dil-MSCs 显示红色, GFP-HUVECs 显示绿色 ($\times 200$, 标尺为 $200 \mu\text{m}$)。

图 1 间充质干细胞与人脐静脉内皮细胞 3D 仿生分布设计组织工程支架的构建

Figure 1 Tissue engineering scaffold of a 3D bionic distribution design scaffold for mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells

速度明显增加(图2),在第7日可以观察到支架中细胞增殖速度超过 Co-culture 组的增殖速度 (1.996 ± 0.056 vs. 1.530 ± 0.060 , $P < 0.01$)。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 阿尔玛蓝实验曲线图

Figure 2 Alma Blue experimental curve graph

2.3 细胞划痕实验

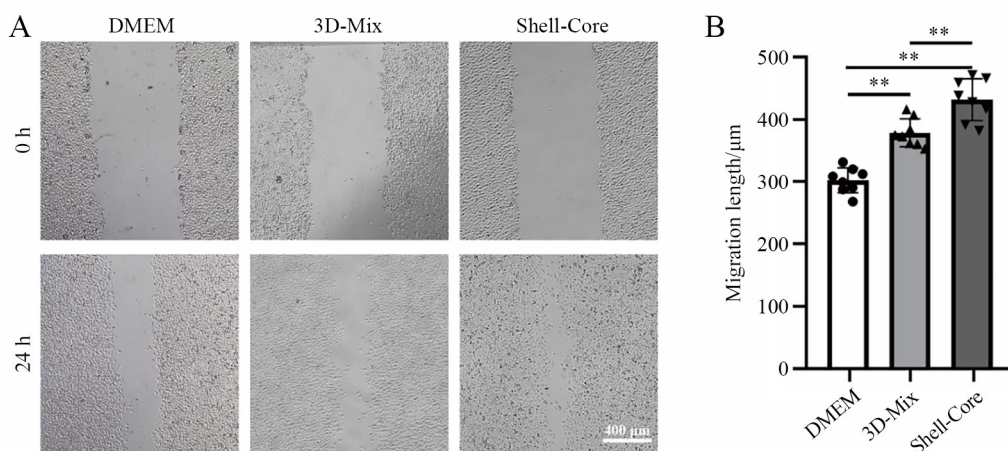
各组在划好划痕后分别用无血清 DMEM、3D-Mix-CM 或 Shell-Core-CM 处理 24 h。结果显示,在 24 h 时, Shell-Core-CM 处理的 HUVECs 划痕缩

短距离明显大于 3D-Mix 组和 DMEM 组 [$(431.6 \pm 33.6) \mu\text{m}$ vs. $(378.7 \pm 22.5) \mu\text{m}$ vs. $(302.3 \pm 20.1) \mu\text{m}$, 均 $P < 0.01$], 提示 MSCs 与 HUVECs 3D 仿生分布设计通过旁分泌的方式促进 HUVECs 迁移,从而有效血管化(图3)。

2.4 支架血管化与 qRT-PCR 结果

打印后当日, MSCs 和 HUVECs 按 3D 仿生分布设计精准分布于 Shell-Core 支架中相应的位置,而在 3D-Mix 支架中,2 种细胞则随机散在分布。体外培养第 7 日可以观察到 HUVECs 在中空通道内表面覆盖并相互连接,初步形成了血管化通道。在支架中多个部位也可以观察到自组装的内皮细胞芽,且越接近预制的内皮管道自组装的内皮细胞芽密度越高。而在 3D-Mix 支架中, HUVECs 仅在原位增殖呈细胞团,几乎见不到 Shell-Core 支架中 HUVECs 自组装现象。

通过 qRT-PCR 比较了 Shell-Core 支架和 3D-Mix 支架的 MMP-9 基因的表达。结果显示 Shell-Core 支架 MMP-9 的 mRNA 表达量是 3D-Mix 组的 (1.55 ± 0.06) 倍 ($P < 0.01$), 提示 3D 仿生分区设计可能通过上调 MMP-9 的表达促进 HUVECs 的迁移和血管生成(图4)。



注: A 为光学显微镜下划痕区域 ($\times 40$, 标尺为 $400 \mu\text{m}$); B 为 24 h 划痕平均缩短距离比较; ** $P < 0.01$ 。

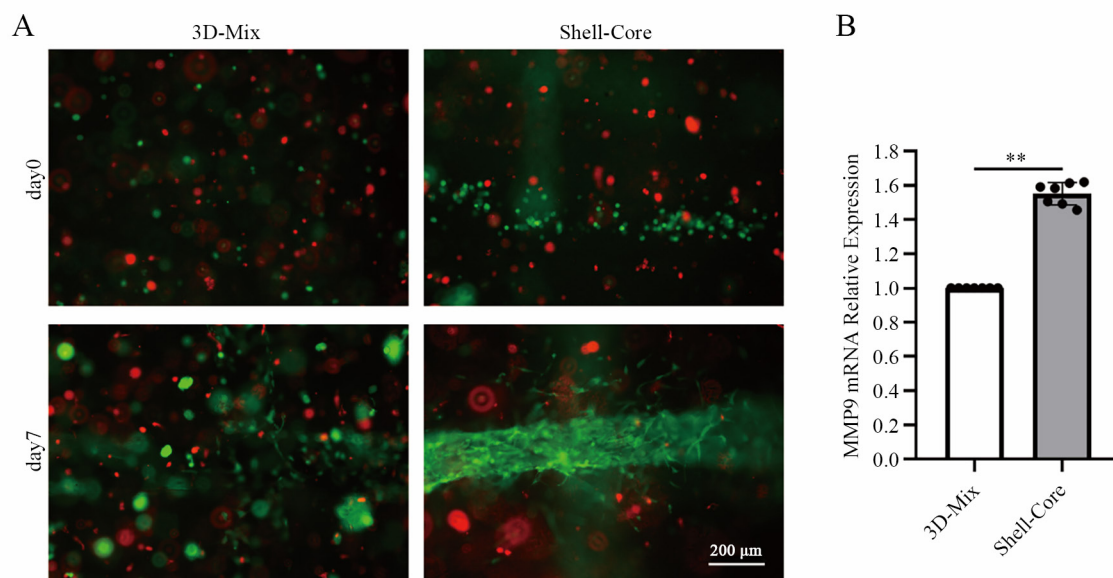
图3 间充质干细胞与人脐静脉内皮细胞 3D 仿生分布设计促进组织工程支架血管化

Figure 3 3D bionic distribution design of mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells promoted vascularization of tissue engineering scaffold

3 讨论

近年来,3D 生物打印技术作为新兴技术成为组织工程领域的研究热点^[5-6]。3D 生物打印是通过

层层沉积的方式,将生物相容性的材料和活细胞组分构建出生物组织结构,旨在模拟体内基质成分和微环境的复杂结构和功能,已经在模拟肝组织、肿瘤、皮肤等领域得到应用^[7-10]。



注: A 为体外培养第 0 和 7 日荧光显微镜下所见的细胞分布 ($\times 100$, 标尺为 $200\ \mu\text{m}$), Dil-MSCs 显示红色, GFP-HUVECs 显示绿色; B 为 MMP-9 的 mRNA 相对表达量比较; $**P < 0.01$ 。

图 4 间充质干细胞与人脐静脉内皮细胞 3D 仿生分布设计组织工程支架中人脐静脉内皮细胞的体外自组装

Figure 4 *In vitro* self-assembly of human umbilical vein endothelial cells in the 3D bionic distribution design tissue engineering scaffold of mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells

传统的组织工程常将 MSCs、多能干细胞等引入合适的支架并植入体内以治疗组织缺损^[11]。然而,当植入物细胞致密或者体积较大的时候,常难以实现移植物中心区域快速血管化,致使氧气和营养物质以及代谢废物高度依赖简单扩散进出组织,会出现移植物中心坏死导致移植失败,从而影响组织修复的效率^[12]。快速和充分的血管形成对于移植后的组织工程移植物中细胞存活与发挥功能作用显得至关重要。为了克服这些问题,有必要制定血管化策略,旨在使组织工程移植物移植入体内后能快速有效地血管化^[13]。目前组织工程的血管化策略主要是在组织工程中添加各种生长因子、小分子药物等促进血管生成,侧重于刺激血管从周围组织长入移植物,但这个过程通常非常缓慢^[7]。研究表明,新生血管的生成速度约为 $5\ \mu\text{m}/\text{h}$ ^[14],这也意味着即便是厚度仅 $2\ \text{mm}$ 的移植物仍需几个星期才能完全血管化,这依赖于添加物的稳定长期释放。因此,组织工程不应该仅依赖于简单的成分添加。

部分研究表明,细胞图案化空间分布的仿生设计可使组织工程在体外实现预血管化,并在组织工程移植进体内后快速血管化,从而更好地实现修复效果。MSCs 和内皮细胞常常结合组织工程

被用于血管化研究,传统的组织工程构建策略^[15-16]仅简单将这些细胞混合于生物材料形成混悬液后进行打印,以构建多种细胞无序随机散在分布的组织工程^[17-18]。而图案化的异质结构设计能使不同细胞更有序地分布于不同的位置,以达到 2 种甚至多种细胞的仿生分布设计^[19]。如内皮细胞在体内往往是紧密贴附中空的管道内表面,而 MSCs 等支持细胞则散在分布于管壁外甚至更远的基质中。部分研究显示,通过在移植物移植前构建微血管网络,能有效促使移植物在植入体内后快速血管化,甚至直接与宿主的微血管融合从而实现更早期的血液灌注^[20]。因此,本研究在进行组织工程支架构建时,将 3D 打印与同轴喷嘴结合,将 MSCs 置于壳通道材料,巧妙利用壳通道中 GelMA 的特性,并置内皮细胞于核通道的牺牲材料中。2 种通道同时于同轴喷嘴挤出,在单一步骤中实现细胞的分区分布,成功实现 2 种细胞的图案化仿生分布。可以观察到,在本研究构建的 Shell-Core 支架中, GFP-HUVECs 之间相互连接并黏附于中空管道内壁,以模拟真皮组织中密集的血管结构, MSCs 则分布于管壁外基质中,以模拟真皮组织中的干细胞分布。在长时间体外培养的观察中,2 种细胞精准分区沉积的 3D 仿生分布设计能够在体外

保持稳定,使2种细胞在支架内实现仿生的空间分布,明确了该支架有较好的结构保真性,同时为后续构建多种细胞且更复杂的仿生组织工程奠定基础。经观察,本研究的Shell-Core支架在体外能长时间培养,且能够维持高的增殖活性。

本研究对Shell-Core支架功能化进行了初步探讨,Shell-Core支架在体外通过促进HUVECs迁移、促进其自组装等而表现出一定的功能化。在显微镜下可以观察到,HUVECs不仅紧密覆盖于核通道内表面,而且向四周的壳通道材料迁移萌芽、自我组装,从而形成各种尺寸的内皮细胞芽。研究表明,与单个细胞的接种方式相比,在水凝胶中以细胞团接种的形式能更快促进体外预血管化,这可能与图案化设计能提高局部内皮细胞的浓度有关^[21],且MSCs具有促进内皮细胞自组装的作用^[22],与本研究的结论一致。这种3D仿生分布的设计允许内皮细胞在中空管道内表面伸展并直接接触,局部提高了内皮细胞浓度,能早期实现内皮细胞的直接接触交流。目前的研究已经证实了MSCs可以通过促进血管化而实现组织修复^[23]。本研究构建的Shell-Core支架不仅能在体外直接预制血管通道,且诱导内皮细胞快速自组装并向管壁外生芽,迅速实现组织工程的体外多级血管化,且能通过旁分泌的方式促进内皮细胞迁移从而促进血管化。大量研究表明,各种MMP在血管生成过程中起着关键作用,尤其是在促进血管萌发方面^[24-26],本研究显示Shell-Core支架的MMP-9表达增高。因此,该支架除了能实现内皮细胞与支持细胞仿生分布设计之外,还实现了支架的功能化。

综上,本研究提出了一种将MSCs与内皮细胞进行3D仿生分布设计的打印策略,通过同轴喷嘴与传统3D技术成功打印出2种细胞仿生分布的组织工程支架,且实现了这种仿生设计结构的高度保真性,为组织工程血管化提供了简单策略。除此之外,本研究进一步明确了这种3D仿生设计在体外的促进血管化作用,提示这种仿生设计或具有较大的应用前景。本研究仍存在一定局限性,未能明确该支架预制的内皮通道及其体外自组装形成的血管网络是否直接与宿主血管网络吻合从而实现早期灌注,这也是未来研究的侧重点。未来,可以考虑引入多种细胞、设计更为复杂的仿生分布,为解决组织缺损的修复提出新方案,甚至为制造血管化的器官工程提出新方案,也可为药物测试、研究血管发生等提供新的组织模型。

参 考 文 献

- [1] TANG X, HAO M, CHANG C, et al. Wound healing driver gene and therapeutic development: political and scientific hurdles [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2021, 10 (8): 415-435. DOI: 10.1089/wound.2019.1143.
- [2] CHAUDHARI A A, VIG K, BAGANIZI D R, et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (12): E1974. DOI: 10.3390/ijms17121974.
- [3] BOATENG J, CATANZANO O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing: a review [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104 (11): 3653-3680. DOI: 10.1002/jps.24610.
- [4] BRADY E L, PRADO O, JOHANSSON F, et al. Engineered tissue vascularization and engraftment depends on host model [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 1973. DOI: 10.1038/s41598-022-23895-2.
- [5] TAN G, XU J, YU Q, et al. Photo-crosslinkable hydrogels for 3D bioprinting in the repair of osteochondral defects: a review of present applications and future perspectives [J]. *Micromachines (Basel)*, 2022, 13 (7): 1038. DOI: 10.3390/mi13071038.
- [6] LIU H, XING F, YU P, et al. A review of biomacromolecule-based 3D bioprinting strategies for structure-function integrated repair of skin tissues [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 268: 131623. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131623.
- [7] BALAVIGNESWARAN C K, SELVARAJ S, VASUDHA T K, et al. Tissue engineered skin substitutes: a comprehensive review of basic design, fabrication using 3D printing, recent advances and challenges [J]. *Biomater Adv*, 2023, 153: 213570. DOI: 10.1016/j.bioadv.2023.213570.
- [8] SULTANPURAM N R, AHMED U, PETERS J T, et al. Tissue engineered cancer metastases as cancer vaccine to improve cancer immunotherapy [J]. *Acta Biomater*, 2022, 153: 299-307. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.09.059.
- [9] ZHANG Y, LI L, DONG L, et al. Hydrogel-based strategies for liver tissue engineering [J]. *Chem Bio Eng*, 2024, 1 (11): 887-915. DOI: 10.1021/cbe.4c00079.
- [10] 张雄, 贺慧华, 高绪照. 胆管癌实验模型研究进展 [J]. *新医学*, 2024, 55 (2): 96-100. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2024.02.004.
ZHANG X, HE H H, GAO X Z. Progress in experimental models of cholangiocarcinoma [J]. *J New Med*, 2024, 55 (2): 96-100. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2024.02.004.
- [11] OZBOLAT I T, HOSPODIUK M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting [J]. *Biomaterials*, 2016, 76: 321-343. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.
- [12] YUE K, TRUJILLO-DE SANTIAGO G, ALVAREZ M M, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2015, 73: 254-271. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045.
- [13] MIN S, KO I K, YOO J J. State-of-the-art strategies for the vascularization of three-dimensional engineered organs [J].

- Vasc Specialist Int, 2019, 35 (2): 77-89. DOI: 10.5758/vsi.2019.35.2.77.
- [14] UTZINGER U, BAGGETT B, WEISS J A, et al. Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2015, 18 (3): 219-232. DOI: 10.1007/s10456-015-9461-x.
- [15] O'DONNELL B T, AL-GHADBAN S, IVES C J, et al. Adipose tissue-derived stem cells retain their adipocyte differentiation potential in three-dimensional hydrogels and bioreactors [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (7): E1070. DOI: 10.3390/biom10071070.
- [16] XIE M, YU K, SUN Y, et al. Protocols of 3D bioprinting of gelatin methacryloyl hydrogel based bioinks [J]. *J Vis Exp*, 2019, e60545. DOI: 10.3791/60545.
- [17] SILVA A S, SANTOS L F, MENDES M C, et al. Multi-layer pre-vascularized magnetic cell sheets for bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2020, 231: 119664. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119664.
- [18] CLAYTON Z E, TAN R P, MIRAVET M M, et al. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells promote angiogenesis and accelerate wound closure in a murine excisional wound healing model [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38 (4): BSR20180563. DOI: 10.1042/bsr20180563.
- [19] JEON O, PARK H, LEE M S, et al. In situ cell-only bioprinting of patterned prevascular tissue into bioprinted high-density stem cell-laden microgel bioinks for vascularized bone tissue regeneration [J]. *bioRxiv*, 2025: 2025.03.17.643708. DOI: 10.1101/2025.03.17.643708.
- [20] BARANSKI J D, CHATURVEDI R R, STEVENS K R, et al. Geometric control of vascular networks to enhance engineered tissue integration and function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110 (19): 7586-7591. DOI: 10.1073/pnas.1217796110.
- [21] KIM M, YUN H W, PARK D Y, et al. Three-dimensional spheroid culture increases exosome secretion from mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 15 (4): 427-436. DOI: 10.1007/s13770-018-0139-5.
- [22] NELLINGER S, SCHMIDT I, HEINE S, et al. Adipose stem cell-derived extracellular matrix represents a promising biomaterial by inducing spontaneous formation of prevascular-like structures by mvECs [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117 (10): 3160-3172. DOI: 10.1002/bit.27481.
- [23] KANG Y, NA J, KARIMA G, et al. Mesenchymal stem cell spheroids: a promising tool for vascularized tissue regeneration [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2024, 21 (5): 673-693. DOI: 10.1007/s13770-024-00636-2.
- [24] COELHO N M, LLOPIS-HERNÁNDEZ V, SALMERÓN-SÁNCHEZ M, et al. Dynamic reorganization and enzymatic remodeling of type IV collagen at cell-biomaterial interface [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2016, 105: 81-104. DOI: 10.1016/bs.apesb.2016.06.001.
- [25] LEE H, CHANG K W, YANG H Y, et al. MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437 (2): 232-238. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.046.
- [26] HUANG K, LIU X, LV Z, et al. MMP9-responsive graphene oxide quantum dot-based nano-in-micro drug delivery system for combinatorial therapy of choroidal neovascularization [J]. *Small*, 2023, 19 (39): e2207335. DOI: 10.1002/sml.202207335.

(责任编辑: 洪悦民)