

• 临床基础研究 •

新型组织工程化心脏瓣膜材料的 体外生物学性能评价*

胡行健¹ 史嘉玮¹ 董念国¹ 邓成¹ 史峰¹

[摘要] 目的:评价枝化状聚乙二醇(PEG)交联去细胞猪主动脉瓣的生物相容性。方法:依据 GB/T16886.6-1997 标准,利用直接接触法和浸提液接触法(间接接触)检测所制备的组织工程化心脏瓣膜材料的凝血性能、致溶血性能,采用 AlamarBlue[®] 细胞活力检测法和 Annexin V 凋亡检测法评价材料的细胞毒性,并应用形态学方法检测瓣膜表面细胞粘附增殖情况,以新鲜天然瓣膜和去细胞瓣膜作为对照。结果:新型材料不会明显刺激血小板引起其粘附、激活(与天然瓣膜对比, $P > 0.5$)。材料接触对凝血功能(INR, APTT)无显著影响。材料直接或间接溶血率均符合生物材料国家标准。AlamarBlue[®] 法检测显示,与材料直接或间接接触对细胞增殖无显著影响,间接接触不增加细胞凋亡概率($P > 0.1$)。细胞接种于材料表面后增殖迅速,形态正常,扫描电镜显示细胞连接致密,呈单层排列覆盖材料。结论:枝化状 PEG 交联去细胞猪主动脉瓣的离体生物相容性达到 GB/T16886.6-1997 标准,是一种有潜力的组织工程化心脏瓣膜替代材料。

[关键词] 组织工程;心脏瓣膜;生物性能;离体

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.01.022

[中图分类号] R542.5 [文献标志码] A

Biological evaluation of novel tissue engineering heart valve material in vitro

HU Xingjian SHI Jiawei DONG Nianguo DENG Cheng SHI Feng

(Department of Cardiovascular Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: DONG Nianguo, E-mail: dongnianguo@hotmail.com

Abstract Objective: To evaluate the biocompatibility of polyethylene glycol (PEG) cross-linked decellularized porcine aortic valve leaflets which knew as "novel tissue engineering heart valve (TEHV) material". **Method:** According to GB/T16886.6-1997 standard, the direct contact method and the extraction liquid contact (indirect contact) method were adopted to test the biological properties of the TEHV material such as hemostasis and hemolytic properties, while the AlamarBlue[®] cell vitality assay and Annexin V apoptosis assay were also used to evaluate the cytotoxicity of the material. Adhesion and proliferation of cells on the material surface were assessed with morphological method. Fresh porcine valves and decellularized valves were chosen as control. **Result:** The novel material did not activate platelet and promote platelet adhesion obviously (compared with fresh valve, $P > 0.5$). Direct and indirect contact with the material had no significant impacts on blood coagulation (INR, APTT). Direct and indirect contact hemolysis rate of the material conformed to the state standards. AlamarBlue[®] assay showed that direct or indirect contact with material had no significant influences on cell proliferation. Indirect contact didn't cause apoptosis rate increase ($P > 0.1$). After incubation, the cell proliferated rapidly with normal form on the material surface, scanning electron microscopy (SEM) proved the material surface was covered by a monolayer of cells which connected tightly. **Conclusion:** PEG cross-linked decellularized porcine aortic valve shows great in vitro biocompatibility conforming to GB/T16886.6-1997 state standard and could be a promising novel material for TEHV or biological heart valve manufacture.

Key words tissue engineering; heart valve; biocompatibility; in vitro

心脏瓣膜病是一种严重的心脏疾患,在发展中国家有着很高的患病率。中国目前有约 250 万风湿性心脏瓣膜病患者,年龄超过 65 岁的瓣膜退行

性病变高发人群高达 1.12 亿,每年全国的瓣膜置换手术量超过 3.5 万例^[1]。改进和提高瓣膜病的治疗效果具有重要的临床意义。目前临床应用的瓣膜替代物都各自存在缺陷,理想的新型瓣膜替代物还有待进一步的探索和研发。其中,利用组织工程方法制备新型心脏瓣膜替代材料是具有广阔前景^[2-3]。

* 基金项目:国家 863 高技术研究发展计划资助项目(No: 2009AA03Z420);国家自然科学基金资助项目(No: 30872540;81170214)

¹ 华中科技大学附属协和医院心外科(武汉,430022)
通信作者:董念国, E-mail: dongnianguo@hotmail.com

枝化状聚乙二醇(PEG)交联的去细胞瓣是本实验组研制的具有自主知识产权的新型组织工程化心脏瓣膜(TEHV)材料,前期实验证实该材料具有理想的力学性能^[4-5]。本文参照 GB/T16886.6-1997《医疗器械生物学评价标准》的规定,通过体外实验评价该材料的生物相容性能。

1 材料与方法

1.1 瓣膜制备及一般处理

新鲜猪主动脉瓣经去污剂+酶处理^[6]去除细胞成分,参照 Chen 等^[7]方法进行 PEG 交联,获得新型 TEHV。实验分组:A组,天然猪主动脉瓣;B组,去细胞猪主动脉瓣;C组,新型 TEHV。3组瓣膜材料分别经离心机 $5\,000\times g$ 离心 15 min 后称重,按照 10 g/L 浓度加入 PBS 液,37℃ 浸泡 48 h,获得浓度 10 g/L 浸提液,0.22 μm 滤器过滤备用。所有人来源材料均取自志愿者并获得其同意,符合伦理学要求。

1.2 凝血性能检测

1.2.1 血小板粘附实验 枸橼酸钠抗凝的人新鲜血样离心,上清即为富含血小板血浆(PRP),转入 12 孔板中,分别浸入 3 组瓣膜($n=4$),37℃ 孵育 30 min,PBS 液轻漂 3 次,戊二醛固定,钨酸处理,CO₂ 临界点干燥,溅射喷金,扫描电镜观察。场发射扫描电镜(武汉科技大学冶金与材料学院)观察。

1.2.2 血小板激活实验 取 3 组瓣膜各 6 片,裁剪成 0.5 cm² 的方块($n=6$),置入 24 孔板中。每孔中加入 PRP 1 ml。37℃ 孵育 30 min。每孔吸取 100 μl 浸泡后 PRP 转入流式管中,分别加入 20 μl CD42P-FITC、CD63-PE,轻混均匀,室温避光反应 15 min。流式细胞仪上机检测。

1.2.3 凝血时间检测 24 个离心管分为 4 组($n=6$),3 组管中分别加入 3 种瓣膜材料,对照组不作处理,分别加入 6 名志愿者新鲜抗凝静脉血 2 ml/管,37℃ 孵育 1 h。所有样本由 STA-R 型全自动血凝分析仪(STAGO 公司,法国)检测 INR、APTT。

1.3 溶血性能检测

1.3.1 直接溶血试验 取 15 份健康志愿者新鲜血样(0.5 ml/份),枸橼酸钠 1:9 抗凝,PBS 1:1 稀释,转入到 15 个 10ml 离心管中(5 ml/管),随机分为 5 组($n=3$),分别加入 37℃ 预热的 3 组瓣膜材料,阴性对照组加入 37℃ 预热的 PBS 液 1 ml,阳性对照组加入 37℃ 预热的双蒸水 1 ml。各组均于 37℃ 孵育 1 h,1 500 $\times g$ 离心 5 min,每管取上清 120 μl ,酶标仪 540 nm 波长读数。溶血率(%)=[(实验组吸光度-阴性组吸光度)/(阳性组吸光度-阴性组吸光度)] $\times 100\%$ 。

1.3.2 间接溶血试验 血样处理与分组同 1.3.1。3 组离心管分别加入 3 种瓣膜材料的浸提液 1 ml (37℃ 预热),阴性对照组加入 37℃ 预热的 PBS 液 1 ml,阳性对照组加入 37℃ 预热的双蒸水 1 ml。各

组均于 37℃ 孵育 1 h,1 500 $\times g$ 离心 5 min,每管取上清 120 μl ,酶标仪 540 nm 波长读数。计算公式同上。

1.4 细胞相容性试验

1.4.1 直接细胞毒性试验 取 4 块 12 孔板,每孔分别加入 0.5 ml 对数生长期 MRC-5 人胚肺细胞悬液(1×10^4 /ml,中国典型培养物保藏中心,武汉)及 0.5 ml 完全培养基(含 10% FBS 的 DMEM-LG),37℃、5%CO₂ 条件下孵育 4 h,其中 3 块孔板每孔分别铺入裁剪成 0.5 cm² 的 3 种瓣膜材料。另 1 块孔板作为空白对照组。继续原条件培养 48 h。弃去培养基,每孔中加入含 10% AlamarBlue[®] 的 DMEM-LG 2 ml,以单纯 DMEM-LG 和含 10% AlamarBlue[®] 的 DMEM-LG 作为参照,原条件下孵育 3 h,每孔取培养基 200 μl 转入 96 孔板内,酶标仪分别读取 OD_{570 nm} 和 OD_{600 nm} 值。

1.4.2 间接细胞毒性试验 取 4 块 6 孔板,每孔接种 1×10^4 /ml 对数生长期末 MRC-5 细胞 3 ml,37℃、5%CO₂ 条件下孵育 12 h。3 块孔板各孔分别加入 3 组瓣膜材料的 37℃ 预热浸提液 1 ml,另一块孔板加入 1 ml 37℃ 预热 PBS 液作为对照。原条件继续孵育 24 h。0.05%胰酶(不含 EDTA)消化 2 min,细胞刮刮下细胞,微量加样器吹匀,计数。4℃ PBS 洗两次,结合缓冲液重悬,调定浓度 2×10^5 /ml。每孔取 195 μl 细胞悬液转入流式管,加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀反应 3 min,再加入 10 μl 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碘化丙锭溶液,混匀,室温避光孵育 10 min,每管加 300 μl 冷 PBS,混匀后流式细胞仪检测。

1.5 细胞接种实验

无菌台中操作:6 孔板每孔内置入一片裁剪为 0.5 cm² 的 TEHV 材料,加入完全培养基,37℃ 预处理 1 h。弃去培养基,每孔中接种 1×10^6 /ml 的对数生长期 MRC-5 细胞悬液 1 ml,再加入 2 ml 完全培养基。37℃、5%CO₂ 条件下孵育 48 h。分别于 4 h、24 h、36 h、48 h 取出于倒置显微镜下观察。48 h 后取出,戊二醛固定,钨酸处理,CO₂ 临界点干燥,溅射喷金,场发射扫描电镜观察。

1.6 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件包处理数据。计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组样本均数比较采用 *t* 检验分析;3 组样本均数总体比较采用 ANOVA 分析,进一步行两两比较采用 LSD-*t* 检验;配对样本采用 Wilcoxon 符号秩检验。检验水准为 $P=0.05$ 。

2 结果

2.1 血小板粘附实验

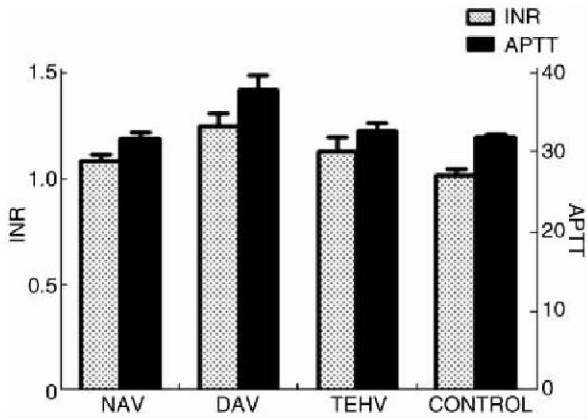
天然猪瓣(A组)上仅有极少量血小板附着,血小板无明显形变;去细胞瓣(B组)上血小板粘附量较多且聚集成团,有伪足伸出,变形明显;TEHV 材料(C组)上亦有少量血小板粘附,无聚集、伪足伸出或变形(图 1)。

2.2 血小板激活实验

A组血小板激活率为 $(0.39 \pm 0.38)\%$, B组血小板激活率为 $(34.22 \pm 3.89)\%$, 而C组血小板激活率为 $(0.48 \pm 0.30)\%$ 。经LSD-*t*检验, A、C组间差异无统计学意义($P > 0.5$); B、C组之间差异有统计学意义(单侧 $P < 0.01$)。

2.3 凝血功能检测

结果见图3, 经配对样本Wilcoxon符号秩检验, TEHV处理后血样INR及APTT均无明显改变($P > 0.1$)。



NAV:天然瓣膜组; DAV:去细胞瓣膜组; TEHV:组织工程心脏瓣膜材料组; CONTROL:对照组。

图2 凝血功能检测结果

Figure 2 Coagulation function

2.4 溶血试验

直接溶血实验结果: A组平均溶血率 $(0.81 \pm 0.20)\%$, B组平均溶血率 $(3.27 \pm 0.74)\%$, C组平均溶血率 $(1.69 \pm 0.12)\%$ 。间接溶血实验结果: A组平均溶血率 $(1.28 \pm 0.53)\%$, B组平均溶血率 $(4.33 \pm 1.05)\%$, C组平均溶血率 $(3.11 \pm$

$1.92)\%$ 。两种试验方法所得TEHV材料溶血率均达到生物材料溶血率国家标准(5%) (单侧*t*检验, $P < 0.001$)。

2.5 直接细胞毒性试验

按照AlamarBlue®试剂说明书所提供的公式计算3组材料接种细胞后细胞活性与正常细胞间差别, A组为 $(1.44 \pm 0.10)\%$, B组为 $(2.05 \pm 0.07)\%$, C组为 $(1.82 \pm 0.03)\%$, 3组间差异无统计学意义(ANOVA, $P < 0.001$), 显示TEHV材料直接接触无明显细胞毒性。

2.6 间接细胞毒性试验

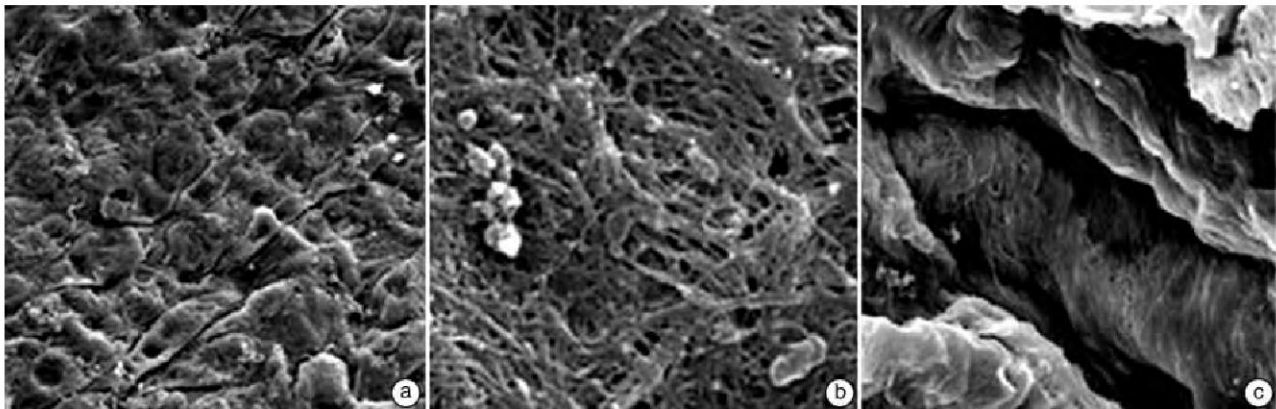
流式细胞仪检测显示, 间接接触后, A组凋亡细胞比例 $(4.39 \pm 3.62)\%$, 正常细胞比例 $(91.31 \pm 6.66)\%$; B组凋亡细胞比例 $(9.76 \pm 4.25)\%$, 正常细胞比例 $(82.80 \pm 5.10)\%$; C组凋亡细胞比例 $(10.59 \pm 6.21)\%$, 正常细胞比例 $(86.90 \pm 5.57)\%$ 。经ANOVA检验, 3组间凋亡细胞比例和正常细胞比例差异均无统计学意义($P > 0.1$)。

2.7 细胞接种实验

光镜下可见细胞增殖迅速, 形态正常, 48 h即可铺满。扫描电镜证实细胞完全覆盖材料表面, 呈单层排列, 连接致密(图3)。

3 讨论

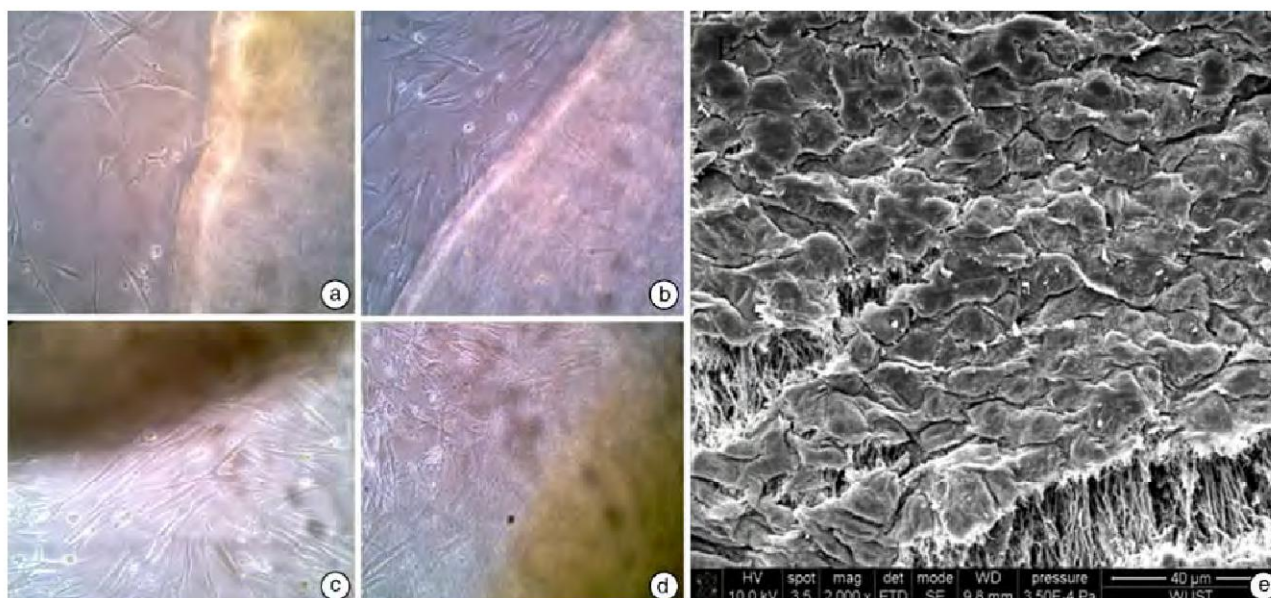
组织工程化材料由于具有良好的生物相容性能, 被认为是最具潜力的医用替代材料来源。组织工程心脏瓣膜理论上可以克服现有心脏瓣膜替代物的缺点, 因而得到广泛的重视。本课题组研制的PEG交联去细胞瓣是一种基于天然基质(去细胞猪主动脉瓣), 进行化学修饰改性的新型TEHV材料, 前期试验已证实其制备工艺可靠, 经处理后的瓣膜材料细胞去除彻底, 交联程度充分, 拥有理想的力学性能和生物信号分子携带功能^[4-5]。本文对该材料的生物学性能进行评价。



a. 天然瓣膜; b. 去细胞瓣; c. TEHV材料。

图1 场发射扫描电镜观察血小板粘附情况($\times 2000$)

Figure 1 Platelet adhesion



a. 4 h; b. 24 h; c. 36 h; d. 48 h; e. 扫描电镜显示, 培养 48 h 后材料表面有单层细胞覆盖, 排列紧密。

图 3 TEHV 材料表面接种细胞后效果 ($\times 2\ 000$)

Figure 3 Effect of inoculation on surface of TEHV material

着眼于克服传统生物瓣的不足, 考虑到临床应用需要以及心脏瓣膜所处的特殊生理环境, 心脏瓣膜替代材料的生物相容性能应满足许多具体要求: 无免疫原性; 有理想的种子细胞招募、粘附能力; 不激活凝血导致血栓形成; 不破坏血液细胞成分; 易于消毒保存等。参照 GB/T16886. 6-1997《医疗器械生物学评价标准》的规定, 本文对枝化状 PEG 交联的去细胞猪主动脉瓣材料进行了离体条件下的相关检测, 结果证实该材料具有满意的生物学性能。

选择去细胞天然瓣膜作为支架构建 TEHV 材料, 可以最大程度重建天然瓣膜的大体形态和微观三维结构, 既有利于材料适应体内脉冲血流力学刺激, 又能为种子细胞生长增殖提供适宜环境。然而旨在去除材料免疫原性的去细胞过程一定程度上损坏了瓣膜原有结构, 导致其中部分可溶性成分丢失, 因而需要选择适宜的交联剂对其进行改性。PEG 是一种具有优良生物相容性的高分子材料, 被广泛应用于制药行业中, 目前已有十余种 PEG 产品获得 FDA 检验应用于临床^[8-9]。枝化状 PEG 是 PEG 的一种衍生物, 在保留 PEG 的基本性能基础上, 通过其分支末端可灵活修饰不同的活性基团, 从而获得共价键合各种生物活性分子的能力, 实现材料的生物学改性。目前实验已证实该材料的离体生物学性能及力学性能满意, 可进一步接受在体水平实验检测。

参考文献

[1] 胡盛寿, 孔灵芝. 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告: 2008-2009[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2010: 10-11.

- [2] FANG N T, XIE S Z, WANG S M, et al. Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120: 696-702.
- [3] KOROSSIS S A, BOOTH C, WILCOX H E, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves[J]. *J Heart Valve Dis*, 2002, 11: 463-471.
- [4] 邹明晖, 周建良, 董念国, 等. 枝化状聚乙二醇交联改善猪去细胞主动脉瓣的力学性能比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(5): 759-761.
- [5] 邹明晖, 周建良, 董念国, 等. 聚乙二醇交联去细胞瓣构建组织工程瓣膜复合支架[J]. *中华临床医师杂志*, 2011, 5(8): 22-25.
- [6] 董念国, 叶晓峰, 史嘉玮, 等. 组织工程瓣膜天然支架去细胞方法的比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(3): 377-378.
- [7] CHEN J S, NOAH E M, PALLUA N, et al. The use of bifunctional polyethylene glycol derivatives for coupling of proteins to and cross-linking of collagen matrices[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2002, 13: 1029-1035.
- [8] VERONESE F M, MERO A. The impact of PEGylation on biological therapies[J]. *Bio Drugs*, 2008, 22: 315-329.
- [9] BANERJEE S S, AHER N, PATIL R, et al. Poly(ethylene glycol)-prodrug conjugates: concept, design, and applications[J]. *J Drug Deliv*, doi:10.1155/2012/103973.

(收稿日期: 2013-05-16)