小口径组织工程血管基质材料的生物学和力学评价

谭 菊,曾 文,周静婷,李 刚,张晓彦,朱楚洪 (第三军医大学基础部人体解剖学教研室,生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研制一种具备正常血管的生理结构和良好的生物相容性,而且具有血管力学特性的小口径组织工程血管基质材料,并按医用输血材料的力学及生物学国家标准评价。**方法** 以去细胞生物衍生材料作为基质,按照国家标准对其进行力学和生物学评价。**结果** 血管的轴向、径向拉伸应力分别为 23.14 N 和 36.79 N,均大于标准规定的 7.5 N;拉伸率分别为 95.19% 和 80.24%,大于标准规定的 20%。血管的缝合强度为 13.71 N,不小于 0.5 N,血管符合力学规定。生物学检测主要用血管或其浸提液检测血管的 pH 值在对照去离子水 pH(7.52 ± 1.5)范围内、溶血率 1.397 2%,小于 5%、全血凝固时间比对照长 50%、对细胞毒性为 0 级,皮内注射无刺激。**结论** 血管基质材料具有良好的力学及生物学性能,它将在小口径血管替代治疗中起重要作用。

[关键词] 小口径组织工程血管基质材料;力学性能;生物相容性
[中图分类号] Q819;R322 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)01-0030-04

Biological and mechanical evaluation of the small-diameter tissue-engineered blood vessels matrix

TAN Ju, ZENG Weng, ZHOU Jing-ting, LI Gang, ZHANG Xiao-yan, ZHU Chu-hong (Department of Anatomy, Key Lab for Biomechanics and Tissue Engineering of Chongqing, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop a small-diameter tissue-engineered blood vessels which possesses normal blood vessels physiological structure, good biocompatibility, and mechanical properties. And it was evaluated by mechanical and biological of national standard of medical transfusion material. **Methods** The bio-derived material were regarded as the ground substance, and it was evaluated by mechanical and biological of national standard after composite modification. **Results** The axial and radial tensile stress of the blood vessel was 23.14 N and 36.79 N respectively, and it was greater than the standard 7.5N. The tensile rate of the axial and radial was 95.19% and 80.24% respectively, which were higher than the standard value 20%. The suture strength of the blood vessel was 13.71 N, which was conform to the mechanical requirement. Mainly used blood vessels or its extracts to detect the pH of the blood vessels is in the scope of control deionized water pH (7.5 ± 1.5); the hemolysis rate was 1.3972% which was less than 5%; the whole blood coagulation time was 50% longer than the control level, and there was no stimulation after intradermal injection. **Conclusion** With bio-derived material as the ground substance and compositely modified, this kind od blood vessels is conform to the mechanical and biological of national standard, and it has the potential of clinical application which could play an important role in the replacement therapy of small-diameter vascular xenografts.

Keywords: small-diameter tissue engineered blood vessel matrix; mechanical property ; biocompatibility

外科替换或旁路移植手术是治疗冠状动脉等疾病的主要手段。临床上主要的血管移植物来源是自体血管和人工合成血管,但自体可供采集的血管数量有限,或者由于患者自身原因而不能使用自体血管[1],很难满足临床需求;人工合成血管在大直径血管移植中取得较好的效果,但在小口径血管(内径小于 6 mm)移植中易导致内膜增生、血栓形成、血管狭窄、阻塞等现象[2-4],这些因素都限制了组织工程血管的应用。因此,研制一种优良的小口径血管移植物就显得特别迫切。为了寻求具备正常血管的生理结构和良好的生物相容性,而且具有血管的力学特性的小口径组织工程血管[5-11],本实验室的小口径组织工程血管基质材料采用天然脱细胞生物衍生材料制备而成,并且按照“中华人民共和国国家标准”对上述血管材料进行生物学和力学性能方面的评价[9-12]。现报告如下。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201401011
[基金项目] 国家自然科学基金(31200731);重庆市自然科学基金(cstc2011jjA0657)
[收稿日期] 2013-08-21 [修回日期] 2013-09-12

1 材料

1.1 血管浸提液制备

根据实验的不同,采用不同的浸提液和浸提时间,标准采用 GB/T 16886.12-2005/ISO 10993-12:2002(医疗器械生物学评价第 12 部分:样品制备与参照样品)细胞毒性实验:采用 3 cm^2/mL(表面积)的比例将无菌血管置于细胞培养液中在二氧化碳培养箱中浸提 24 h。不加血管样品,同条件制备空白对照液。皮内刺激试验:同样采用 3 cm^2/mL(表面积)的比例浸提,将无菌血管放入 0.9% 氯化钠注射液中,封闭后置 CO_2 培养箱中浸提 72 h,即得血管浸提液。不加血管样品,同条件制备 0.9% NaCl 注射液空白对照液。

1.2 动物来源

本试验采用的 C57 健康小白鼠、初成年,同一品系同一来源,雌鼠无孕,动物体重差异不超过平均体质量的 ±20%。在试验前使小白鼠适应实验室环境,做过本试验的小白鼠不得重复使用。本试验采用的兔健康、初成年的白化兔,雄性,同一品系,体质量大于 2 kg,无任何皮肤疾病或损伤,未做过任何试验。

2 方法与结果

2.1 力学特性检测

方法参考 GB/T 528-2009[15]。取已处理好血管样品 1 根,用无菌蒸馏水清洗后沥干备用。在血管样品上截取长度不小于血管内径的一小段测试样本。测量其内径,外径。轴向拉伸测试,将测试样本两端固定在力学测试仪夹具上,小心确保样本没有被拉伸,测量其有效长度(见表 1),力学测试模式为管状物模式。径向拉伸测试(见表 2),在力学测试仪夹具两端各附加一个 90°直角夹具,使两附加夹具水平端平行。将测试样本套在附加夹具上。确保样本没有被拉伸,力学测试模式为块状物模式。缝合强度测试,用一根 4-0 号缝合线从样本一层边缘 2 mm 处穿过血管缝合成一半环。将缝合线和样本固定,以棒状物模式。以上测试均以 100 mm/min 的稳定速度将缝合线拉出血管样本,直至样本断裂。从表 1 的数据可以看出,人工血管基质材料轴向拉伸应力为 23.14 N,大于 7.5 N,且拉断伸长率为95.19%,大于 20%;人工血管基质材料径向拉伸应力为 36.79 N,大于7.5N,且拉断伸长率为 80.24%,大于 20%;检测血管缝合强度为 13.71 N,不小于 0.5 N。从血管的轴向拉伸、径向拉伸及缝合强度测试结果可以判定该血管符合规定。

表 1 血管轴向拉伸力学测试数据

检测指标	有效长度 (mm)	内径 (mm)	外径 (mm)	最大载荷 (N)	拉断伸长率 (%)
轴向拉伸	63	3.5	5.375	23.14	95.19

表 2 血管径向拉伸力学测试数据

检测指标	宽度 (mm)	厚度 (mm)	最大载荷 (N)	拉断伸长率 (%)
径向拉伸	85	27.5	36.79	80.24

2.2 pH 值检测

方法参考 GB/T 16886.5-2003[16]。通过检测脱细胞血管的 pH 值,初步判定血管的血液相容性。无菌条件下将待测血管剪取一小段,测量其重量,将剪下的血管剪碎,分别放入编号 1~10的 4 mL 离心管中,按表 1 在各离心管中添加去离子水(血管重量与去离子水体积比为 0.1 g ∶ 1 mL)。振荡后,使血管在去离子水中完全浸泡,37 ℃下浸提 24 h。另取 1 支 4 mL 离心管,加入 3 mL 去离子水作对照。25 ℃下,用 PHB-2 型酸度检定仪计测试各管中液体 pH 值,记录所测数据(见表 3)。同样条件下测得去离子水 pH 值为 7.52。检测标准规定样品 PH 值需在空白对照液 pH 值 ±1.5 的范围内。实验测得各血管浸提液 pH 值均在对照去离子水 pH(7.52 ±1.5)范围内,与正常血液 pH 值接近,符合规定要求,由此可得出血管符合要求。

2.3 溶血试验检测

溶血试验方法参考 GB/T 14233.2-2005[17]。按照 50%(质量体积比)浸提比例称取血管,剪成 0.5 cm 长小段,装入 EP 管中,加入 4 mL 生理盐水。阴性对照和阳性对照不加血管,分别加入 4 mL 生理盐水和无菌蒸馏水。另心脏采取新鲜兔血,按比例(兔血/草酸钾 =20/1)加入 20 g/L 草酸钾制成抗凝血,再按比列稀释(兔血/生理盐水 =8/10)加入生理盐水混匀,配制稀释血液,待用。用前先从中取出 0.1 mL,与 5 mL 蒸馏水混匀,紫外分光光度计下波长为 545 nm 时的光密度值(OD545),当其值在(0.8 ±0.3)时,该稀释血液才可正常使用。将样品和对照在水浴放满 30 min 后取出,按 0.5% 比例加入稀释血液,再次放入 37 ℃恒温水浴箱 1 h 后,1 000 r/min 离心 5 min,取上清液,测上清液的 OD545(见表 4)。紫外可见风光光度计测量。血管浸提液溶血率按下式计算:溶血率 =(试验样品的溶血吸光度值 - 阴性对照的吸光度值)/(阳性对照的吸光度值 - 阴性对照的吸光度值)×100%。

材料的溶血率高表明对血细胞(主要是红细胞)的破坏程度大。溶血率与血管的性质有关,若血管的溶血率小于 5%,则说明血管符合医用材料的溶血率试验要求,若溶血率大于 5%,则预示试验血管有溶血作用。国家标准[17]规定,溶血实验中,阴性对照管的吸光度应不大于 0.03;阳性对照管的吸光度应为(0.8 ±0.3),检测结果可信。如表 3 所示,实验结果可信,且血管的溶血率结算结果为 1.3972%,小于标准规定的 5%,则判定血管符合医用材料的溶血率试验要求。

2.4 全血凝固时间检测

方法参考 GB/T 14233.2-2005[17]。本试验系将脱细胞血管与动物静脉血液接触,通过观察供试品对凝血时间的影响,以平价供试品是否为内源凝血系统激活物。取处理好的内径 3~4 mm,外径 4~5 mm 长约 10 cm 的血管两根,分别用缝合线封闭血管一端。准备相同内外径的医用硅橡胶管 1 根(20 cm)作为阴性对照管。将血管和对照管清洗后沥干备用。麻醉实验兔,将连接实验导管的静脉针刺入兔颈静脉,使静脉血分别充盈两根血管和硅橡胶管。血管用缝合线将开口端闭合,硅橡胶管用止血钳夹住两端,并开始计时。室温下,每 5 min 剪取约

表 3 血管重量及所需去离子水体积以及测得的 pH 值

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血管(g)	0.37	0.36	0.35	0.34	0.33	0.35	0.37	0.37	0.33	0.38
去离子水 (mL)	3.70	3.60	3.50	3.40	3.30	3.50	3.70	3.70	3.30	3.80
pH 值	6.39	6.30	6.68	6.45	6.61	6.20	6.42	6.38	6.44	6.52

表 4 血管浸提液在 545 nm 时的光密度值(OD545)

组别	1	2	3	平均值
OD545 阳性	0.568 0	0.567 0	0.555 0	0.563 0
OD545 阴性	0.025 0	0.025 7	0.027 9	0.026 2
OD545 血管	0.033 0	0.032 0	0.036 0	0.033 7

3 cm 长一段血管,放入 9 mL 低渗溶液(1.08 g NaCl/300 mL 蒸馏水)中,将血全部挤出,观察有无凝块或血栓条(表 5)。凝块或血栓条出现时即为血管的凝血时间。对照硅橡胶管操作方法同血管。表 4 实验结果显示,血液在血管中的凝固时间比在对照硅橡胶管长 50%。因此可以判断血管具有一定的抗凝血性能。

表 5 血管及硅橡胶管的凝血时间

检测时间点(min)	5	10	15	20	25	30
血管	无凝块	无凝块	无凝块	无凝块	无凝块	有凝块
硅橡胶管	无凝块	无凝块	无凝块	有凝块	有凝块	

2.5 细胞毒性检测

方法参考 GB/T 16886.5-2003[16]。将血管基质材料浸提液接触培养的平滑肌细胞 7 d,通过对细胞形态、增殖和抑制影响的观察,评价血管对体外细胞的毒性作用。置显微镜下进行形态学观察,细胞毒性记分为 0,细胞形态正常,贴壁生长良好,细胞呈棱形或不规则三角形(见图 1),说明血管浸提液对细胞无毒性作用。阳性(含 6.3% 苯酚)、阴性和血管组细胞平均浓度分别为:0.493 056 × 10^4 个/瓶、62.945 42 × 10^4 个/瓶和 220.972 2 × 10^4 个/瓶,计算出各组相对增值率(RGR)分别为阳性 0.783 3%、血管组 351.053 7%。血管浸提液的相对增殖度为 0 级(RGR≥100),则可判断血管样品合格。

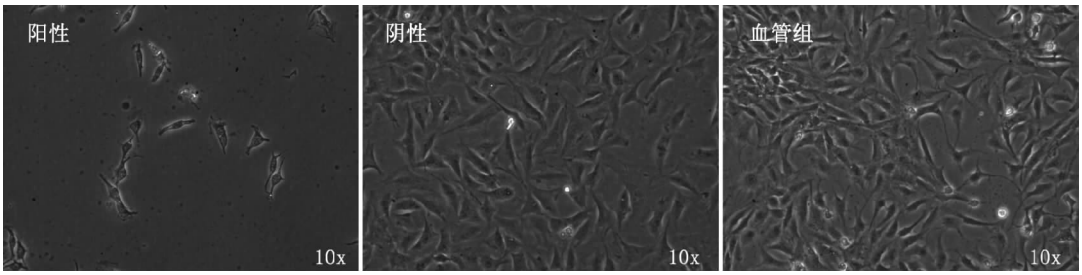


图 1 浸提液培养 7 d 后细胞形态

2.6 皮内刺激试验检测

试验方法参考 GB/T 16886.10-2005[18]。取体质量 2.0 ~ 2.5 kg 健康兔 2 只,分别标记为 1 号、2 号,实验前 4 ~ 24 h 在兔脊柱两侧各剪剃 5 cm × 15 cm 区域兔毛,避免损伤皮肤。用 75% 乙醇清洁家兔暴露皮肤,在兔脊柱一侧选择 10 个点,每点间隔 2 cm,各点注射 0.2 mL 血管浸提液;脊柱另一侧选择 5 个点,每点间隔 2 cm,各点注射 0.2 mL 空白对照液。注射后24 h、48 h、72 h 观察注射局部及其周围皮肤组织反应,包括红斑、水肿和坏死等,按照标准进行皮内反应记分。

注射后家兔皮内反应记分情况计算,溶剂对照皮肤红斑与水肿综合平均记分为 0,血管组的红斑与水肿综合平均记分为 0,试验样品和溶剂对照平均记分之差为 0 不大于 1.0,表明血管浸提液对皮肤无刺激作用,血管样品符合试验要求。

3 讨论

目前,血管组织工程的热点主要是制备管径小于 6 mm 的小口径血管。以往小血管移植失败的主要原因是在急性期血栓形成,在慢性期主要为移植物管腔内膜增生和吻合处的血管瘤形成导致管腔堵塞[2-4]。目前主要通过组织工程构建的方法来解决以上问题,组织工程构建需要种子细胞和血管机制材料,在血管基质材料方面,人工材料尽管有许多优点,但在降解时可导致无菌性炎症,同时有亲水性差、机械强度不足。天然材料可促进细胞吸附和保留分化功能,促进细胞种植。目前利用上述材料合成的组织工程血管顺应性要与人血管顺应性相匹配尚有相当的距离[19]。有研究表明猪血管与人血管极为相似,具有相似的机械张力、弹性系数和顺应性,及适合外科缝合的特性,是优良的人血管替代品[20]。因此我们通过一系列酶处理,将猪血管进行脱细胞处理,血管纤维完整,未见断裂,血管力学特性无明显改变,仅留下具有三维结构的基质[21]。经脱细胞处理后的猪血管,其保留胶原蛋白和弹性纤维,这种结构使血管具有良好的机械性和顺应性,其生理功能及机械性能接近正常血管组织[22]。

通过检测发现血管基质材料轴向拉伸和径向拉伸应力分别为 23.14 N 和 36.79 N,均大于 7.5 N,且拉断伸长率分别为 95.19% 和 80.24%,大于 20%;检测血管基质材料缝合强度为 13.71 N,不小于 0.5 N。结果表明该血管基质材料符合医用材料的力学性能试验要求,因此能够保证在血管缝合时能承受手术线的拉伸负荷,确保移植血管与宿主血管的端口吻合,在力学性能上可达到正常血管要求。

小口径人工合成血管移植后,易发生血管栓塞以及生物相容性等方面的问题,这些因素都限制了组织工程血管的应用[23-25]。人工血管移植物的生物相容性问题的解决至关重要。本文通过对脱细胞血管的 pH 值、溶血率、全血凝固时间和细胞毒性的检测,对脱细胞血管的生物相容性进行平价。血管的 pH 值与正常血液接近,在植入时,不会由于过酸或过碱而发生急性溶血。血液在血管中的凝固时间比在对照硅橡胶管长 50%,因此可以判断血管具有一定的抗凝血性能。通过检测血管溶血率为 1.397 2%(小于 5%),表明血管对血细胞的破坏程度不大、血液相容性好,血管符合医

用材料的溶血率试验要求。另通过将血管浸提液接触培养细胞,检测血管对体外细胞的毒性,细胞贴壁生长良好,细胞呈棱形或不规则三角形,血管浸提液培养的细胞相对增殖率(RGR)为 351.053 7%(>100),毒性为 0 级,说明血管具有较好的细胞相容性。此外通过将血管浸提液对家兔进行皮内刺激试验,验证得出血管进入体内后没有潜在的刺激性,刺激性方面亦符合临床使用的要求。

人源性小口径血管移植物材料的供应不足使同种异体脱细胞血管材料的应用受到极大的限制,经过脱细胞处理的猪血管来源丰富,且具备较好的生物力学性质,同时具有良好的血液相容性和细胞相容性,通过检测符合生物医用植入物的国家标准,这为小口径血管移植物提供了很好的基质材料来源。

[参考文献]

[1] Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Tranquillo. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro[J]. Circ Res,2006,98(1):25 - 35.

[2] Hong Y, Ye SH, Nieponice A, et al. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend[J]. Biomaterials,2009,30(13):2457 - 2467.

[3] Conte MS. The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? [J]. FASEB J,1998,12(1):43 - 45.

[4] Derham C, Yow H, Ingram J, et al. Tissue engineering small-diameter vascular grafts: preparation of a biocompatible porcine ureteric scaffold [J]. Tissue Eng Part A,2008,14(11):1871 - 1882.

[5] 毛志刚,陈朝辉,韩宏光. 人工血管材料生物相容性和血液相容性的研究与分析[J]. 中国组织工程研究,2012,16(16):2981 - 2988.

[6] 罗新锦,吴清玉. 小口径人工血管的研究进展[J]. 中国胸心外科临床杂志,2001,8(3):193 - 196.

[7] Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, et al. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998,115(3):536 - 546.

[8] Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional arteries grown in vitro [J]. Science,1999,284(5413):489 - 493.

[9] 孙庆兰,张 华,张西正,等. 血管组织工程支架材料的研究进展[J]. 化工新型材料,2009,37(11):1 - 4.

[10] Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, et al. A novel hyaluronan-based biomaterial(Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts[J]. Biomaterials,2004,25:5955 - 5964.

[11] Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering[J]. Annu Rev Biomed Eng,2001,3:225 - 243.

[12] Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, et al. Cardiovascular tissue engineering: state of the art[J]. Pathol Biol (Paris),2005,53(10):599 - 612.

[13] Zhu C, Ying D, Mi J, et al. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix [J]. Biomaterials, 2008, 29 (17):2628 - 2636.

[14] Zeng W, Wen C, Wu YX, et al. The use of BDNF to enhance the patency rate of small-diameter tissue-engineered blood vessels through stem cell homing mechanisms[J]. Biomaterials,2012,33 (2):473 - 484.

[15] GB/T 528-2009,硫化橡胶或热塑性橡胶拉伸应力应变性能的测定[S].

[16] GB/T 16886.5-2003,医疗器械生物学评价(第 5 部分):体外细胞毒性试验[S].

[17] GB/T14233.2-2005,医用输液、输血、注射器具检验方法(第 2 部):分生物学试验方法[S].

[18] GB/T 16886.10-2005,医疗器械生物学评价(第 10 部分):刺激与迟发型超敏反应试验[S].

[19] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials[J]. Science, 1994,263(5154):1715 - 1720.

[20] Bader A, Steinhoff G, Strobl K, et al. Engineering of human vascular aortic tis-sue based on a xenogeneic starter matrix[J]. Transplantation, 2000,70(1):7 - 14.

[21] 朱楚洪,应大君,张 伟,等. 生物血管基质材料的抗原表达及力学特性[J]. 生物医学工程学杂志,2002,19(4): 602 - 605.

[22] 刘国锋,杨大平,郭铁芳. 血管组织工程支架材料的研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报,2007,41(3):291 - 293.

[23] Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg,2002,23(6):475 - 485.

[24] Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter arti? cial arteries engineered in vitro[J]. Circ Res,2006,98(1):25 - 35.

[25] Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease[J]. Circ Res,2003,92(10):1068 - 1078.

(编辑:左艳芳)

(上接第 29 页)

[13] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, et al. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb,1991,11 (5):1223 - 1230.

[14] Enjoji M, Kotoh K, Iwamoto H, et al. Self-regulation of type I collagen degradation by collagen-induced production of matrix metalloproteinase-1 on cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2000,36(2):71 - 73.

[15] Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of Smad2/3-dependent signaling pathways: potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids[J]. Int J Mol Med,2013,31(5):1148 - 1152.

(编辑:余汇洋)