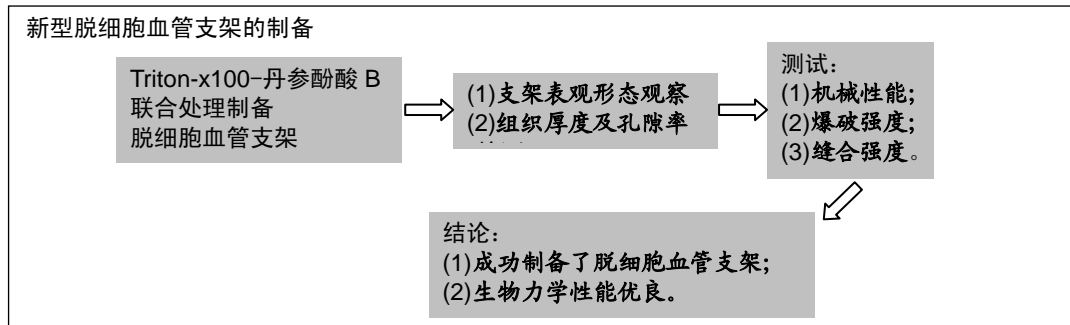


Triton-x100与丹参酚酸B制备脱细胞血管支架及其生物力学性能

赵亮^{1,2}, 李霞飞³, 周坤², 闫欢欢², 张其清² (1北京工业大学, 北京市 100871; 新乡医学院, ²生命科学技术学院, 生命科学与健康研究院, ³生物医学工程学院, 河南省新乡市 453003)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1540 ORCID: 0000-0001-8264-2944(赵亮)

文章快速阅读:



赵亮, 男, 河南省新乡市人, 博士, 主要从事组织工程和人工血管研究。

并列第一作者: 李霞飞, 女, 河南省新乡市人, 硕士, 主要从事生物医疗器械研究。

通讯作者: 赵亮, 北京工业大学工学院, 北京市 100871; 新乡医学院生命科学技术学院, 生命科学与健康研究院, 河南省新乡市 453003

文献标识码: B
稿件接受: 2018-10-25



文题释义:

脱细胞血管支架: 是极佳的血管移植材料, 在制备过程中将原材料彻底去除细胞成分, 最大限度地保存血管壁成分中的弹性纤维和胶原纤维, 最大程度地减低移植产生的免疫原性, 较为完好地保留种子细胞黏附生长所需的三维微环境, 以及机械性能良好等优点, 因此在血管组织工程中得到了越来越多的重视。

细胞-材料复合物的制备: 从机体获取少量的活体组织, 用特殊的酶或其他方法将细胞(又称种子细胞)从组织分离出来在体外进行培养扩增, 然后将扩增的细胞与具有良好生物相容性、可降解性和可吸收的生物材料(支架)按一定的比例混合, 使细胞黏附在生物材料(支架)上形成细胞-材料复合物。

摘要

背景: 脱细胞血管支架具有优良性能, 但是在其制备过程中其生物力学性能出现不同程度的降低。

目的: 观察在组织工程制备脱细胞血管支架中丹参酚酸 B 的应用前景。

方法: 经 Triton-x100 单独处理, Triton-x100-丹参酚酸 B 联合处理制备脱细胞血管支架, 分别设为 Tx 组和 Tx-sal 组, 对其进行形态学观察、组织厚度测量、孔隙率检测及生物力学特性检测, 比较在应用丹参酚酸 B 后处理之后脱细胞血管支架在形态学等各种指标上的变化。

结果与结论: Tx 组和 Tx-sal 组的血管管壁厚度及血管孔隙率差异无显著性意义($P > 0.05$), 形态学无明显变化。Tx-sal 组的脱细胞血管支架可以较完好地保留血管壁的胶原纤维和弹性纤维, 抗拉强度、最大变形量、断裂伸长比、爆裂压力及缝合强度均优于 Tx 组($P < 0.05$)。结果证实, Triton-x100 联合丹参酚酸 B 处理能够成功制备脱细胞效果良好、生物力学性能优良的脱细胞血管支架。

关键词:

丹参酚酸 B; 脱细胞血管支架; 血管移植材料; 孔隙率; 抗拉强度; 主动脉; 细胞-材料复合物; 缝合强度; 组织构建

主题词:

支架; 生物力学; 组织工程

中图分类号: R456; R318

基金资助:

河南省高等学校重点科研项目计划(17A180034), 项目负责人: 赵亮; 第二届大学生生命科学联赛立项课题(SKYLS017), 项目负责人: 赵亮

Preparation of acellular vascular scaffold using Triton-x100 and salvianolic acid B and its biomechanical performance

Zhao Liang^{1,2}, Li Xiafei³, Zhou Kun², Yan Huanhuan², Zhang Qiqing² (1College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2School of Life Sciences and Technology, Life Science and Health Research Institute, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3School of Biomedical Engineering, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The acellular vascular scaffold has excellent properties, but its biomechanical properties have been reduced to varying degrees during preparation.

OBJECTIVE: To explore the application prospect of salvianolic acid B in the tissue-engineered preparation of acellular vascular scaffold.

METHODS: The rat thoracic aorta was decellularized using Triton-x100 alone (Tx group) or combined with

Zhao Liang, PhD, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; School of Life Sciences and Technology, Life Science and Health Research Institute, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Li Xiafei, Master, School of Biomedical Engineering, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Zhao Liang and Li Xiafei contributed equally to this work.

Corresponding author: Zhao Liang, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; School of Life Sciences and Technology, Life Science and Health Research Institute, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

salvianolic acid B (Tx-sal group) to prepare acellular vascular scaffolds. Morphology of the two groups of acellular vascular scaffolds was observed. Measurements of tissue thickness, porosity and biomechanical properties were conducted, and changes in the morphology of acellular vascular scaffolds were compared between two groups.

RESULTS AND CONCLUSION: The use of salvianolic acid B treatment had no effect on the wall thickness and porosity of acellular vascular scaffolds, and there was no significant difference between the Tx group and Tx-sal group ($P > 0.05$). There was also no significant change in the scaffold morphology. Compared with the Tx group, the acellular vascular scaffold in the Tx-sal group was better to retain collagen fibers and elastic fibers of the vessel wall. The biomechanical indicators in the Tx-sal group such as tensile strength, maximum deformation, elongation at break, burst pressure, and suture strength were all superior to those in the Tx group ($P < 0.05$). Therefore, Triton-x100 combined with salvianolic acid B treatment can produce acellular vascular materials with good decellularization and excellent biomechanical properties.

Subject headings: Stents; Biomechanics; Tissue Engineering

Funding: The Key Scientific Research Project of Henan Higher Education Institutions, No. 17A180034 (to ZL); the Project of the Second College Student Life Sciences League, No. SKYLS017 (to ZL)

0 引言 Introduction

近20年, 中国因冠状动脉粥样硬化性心脏病死亡的人数居高不下, 每年不少于100万例^[1]。冠状动脉粥样硬化性心脏病的治疗手段有药物治疗: 抗血栓(抗血小板及抗凝), 减轻心肌氧耗(β 受体阻滞剂), 缓解心绞痛(硝酸酯类), 调脂稳定斑块(他汀类调脂药); 血运重建治疗: 包括介入治疗(血管内球囊扩张成形术和支架植入)和外科冠状动脉旁路移植术。外科冠状动脉旁路移植术多数情况都是使用大隐静脉和乳内动脉作为手术中的桥血管^[2], 但患者身体条件各异, 再加上在获取血管的同时难免对机体造成损伤, 故需要优良的血管替代品来补救个体差异情况, 并加以推广使用以优化手术方案, 减轻对患者的机体创伤, 挽救更多的生命。还有在心血管疾病治疗中有许多需要进行血管移植, 例如血管严重缺损不能满足直接缝合的各方面要求而需要进行嵌合血管移植等。其移植血管材料来源可以说是极为广泛, 如自体动脉和静脉, 或同种异体动、静脉, 或人造血管, 各具优劣^[3]。因此, 探究并制备出具有极高应用价值的血管移植材料成为血管组织工程的重中之重。

研究发现脱细胞血管支架是极佳的血管移植材料^[4-9]。在制备过程中将原材料彻底去除细胞成分, 最大限度地保存血管壁成分中的弹性纤维和胶原纤维, 最大程度地减低移植产生的免疫原性, 较为完好地保留种子细胞黏附生长所需的三维微环境, 以及机械性能良好等优点, 因此在血管组织工程中得到了越来越多的重视。许多资料显示, 仅采用酶或/和去垢剂制备的脱细胞血管基质仍存在诱发血栓形成、力学机械性能不足和移植产生免疫反应等方面的问题^[4-10]。因此, 实验基于丹参酚酸B的药理作用^[5], 在使用Triton-x100等制备脱细胞血管支架的基础上, 比较有应用丹参酚酸B后处理的两组脱细胞血管支架在形态学及生物力学性能的差别, 探讨其在组织工程脱细胞血管材料制备中的应用前景。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料学实验。

1.2 时间及地点 于2018年2月至6月在新乡医学院生物医学材料重点实验室完成。

1.3 材料 所用的血管取自健康成年SD大鼠21只, 雌雄不限, 体质量250-280 g, 平均(263±25) g, 购自河南省实

验动物中心, 动物许可证号: SCXK(豫)2017-0001, 置于新乡医学院动物房普通饲养。

1.4 实验方法

1.4.1 脱细胞血管支架的制备与分组

大鼠胸主动脉的获取: 将21只SD大鼠解剖获得并截取10 cm SD大鼠胸主动脉, 由于胸主动脉分离复杂、耗时长, 故将先获得的血管放入生理盐水中浸泡, 以防止血管损伤。待血管全部取出完毕, 用体积分数75%的乙醇反复消毒处理4-6次, 再使用PBS溶液(北京索莱宝生物科技有限公司)冲洗3次以上至溶液澄澈, 开始分组。

实验分组: 随机数字法将血管随机分为3组, 每组7根: 新鲜组(新鲜血管)、Triton-x100(Tx)组和Triton-x100-丹参酚酸B(Tx-sal)组。Triton-x100-丹参酚酸B(Tx-sal)作为实验组, Triton-x100(Tx)组作为对照组。

Tx组处理方法: 将分好组的待用血管用PBS反复冲洗后置入含0.25%的脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate) (合肥博美生物科技有限公司)、0.25% Triton-x100(北京索莱宝生物科技有限公司)、0.02% DNA酶(合肥博美生物科技有限公司)、0.02% RNA酶(合肥博美生物科技有限公司)和0.02% EDTA(天津市东丽区天大化学试剂厂)的脱细胞培养液中, 将含血管及培养液的50 mL离心管放置入恒温37 °C摇床中, 持续震荡48 h, 之后用镊子取出使用PBS洗涤至液体保持清澈, 并放入4 °C Hanks液中, 置于冰箱保存待用。

Tx-sal组处理方法: 将分好组的待用血管用PBS反复冲洗后置入含0.25%的脱氧胆酸钠、0.25% Triton-x100、0.02% DNA酶、0.02% RNA酶和0.02% EDTA的脱细胞培养液中, 将含血管及培养液的50 mL离心管放置入恒温37 °C摇床中, 持续震荡48 h, 然后取出血管立即放置于体积分数0.5%的丹参酚酸B溶液(合肥博美生物科技有限公司)中, 在37 °C恒温摇床(上海一恒科学仪器有限公司)中震荡48 h, 随后再用PBS洗涤至清澈, 并放入4 °C Hanks液中, 置于冰箱保存待用。

1.4.2 光学显微镜和电子显微镜观察表面形貌 取各组3根血管, 将血管平放于长方形软塑槽(长约13 cm), 然后将软塑槽缓缓平稳地放入盛有液氮的大杯内, 当槽底部与液氮接触时即开始沸腾、气化, 此时务必软塑槽保持原位以免浸入液氮中, 10-20 s血管即可迅速冰冻冻结。在制成冻

块后,即可置入恒冷箱切片机(无锡莱浦仪器设备有限公司)于低温密闭室内冷冻切片。将样品固定于载玻片上并存放于载玻片盒内,再放入-18℃冰箱内待用。取各组切片进行苏木精-伊红染色(苏木精-伊红染液试剂盒,新乡晶美生物工程有限公司)、Masson染色(Masson染液试剂盒,晶美生物工程有限公司),使用光学显微镜(尼康YS100)观察各组染色切片。分别观察两组脱细胞血管的脱细胞程度,以及两组处理方法对脱细胞血管壁的胶原纤维的影响。

两组各取一组切片,用体积分数3%戊二醛预固定,1%的四氧化锇再固定,乙醇梯度脱水,离子溅射喷金,扫描电镜(尼康JCM-5000)观察。

1.4.3 组织厚度测量 每组各截取3根血管,剪开摊平,分别应用HD-10型厚度仪(沧州恒胜伟业公路仪器有限公司)测量血管壁的组织厚度,精确度为0.01。

1.4.4 孔隙率测量 冷冻干燥法处理各组的血管支架,每组的样本数为3个。选用一个比重瓶装满乙醇称质量 m_1 ;把质量 m_s 的样品浸入乙醇中,脱气,使乙醇充盈于多孔支架的孔中,然后再加满乙醇,称质量为 m_2 ;把浸满了乙醇的样品取出后,剩余的乙醇与比重瓶称质量 m_3 。 ρ 为测定温度下乙醇密度。样品支架孔隙率 $\epsilon=(m_2-m_3-m_s)/(m_1-m_3)$ 。计算各组血管支架的孔隙率。

1.4.5 机械性能测试 将血管分割成2 cm长的血管环,将血管两端固定在电子拉力试验机 WDW-300H(中昌路试验机制造有限公司)上进行拉伸实验,标距为2 cm,牵拉血管直至断裂,计算抗拉强度、最大变形量及断裂伸长比。

1.4.6 爆破强度测试 是使用医用球囊扩张压力泵ID1220即高压注射器(深圳市安特高科实业有限公司)完成。使用生理盐水将注射器填满(20 mL),将其插入截取约50 mm的各组血管的一端,血管的另一端用丝线结扎固定。以200 mm Hg/s(1 mm Hg=0.133 kPa)为医用球囊扩张压力泵加压,当血管出现泄漏或破裂,记录最大压力值即为血管爆破压力。

1.4.7 缝合强度测试 测试血管支架的最大缝合强度需要取各组40 mm长的血管并从中间切分两段,用解剖工具袋中的7-0聚丙烯缝合线沿血管边缘1 mm,每隔120°进行血管缝合。将缝合的血管两端分别固定在电子拉力试验机 WDW-300H(中昌路试验机制造有限公司)的气泵加压夹上,由此测试各组血管支架的最大缝合强度。设定3 mm/min的轴向拉伸速度,当缝线穿破血管支架之时,即可记录下缝合血管的最大缝合强度。

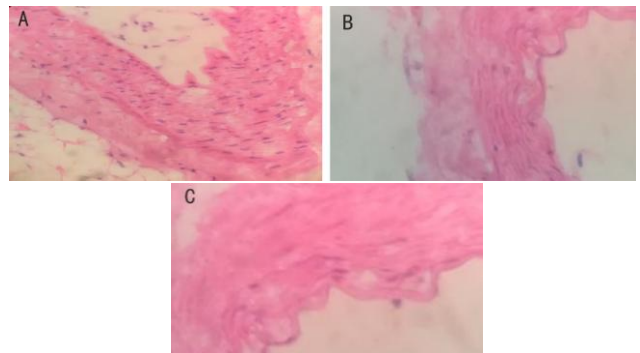
1.5 主要观察指标 各组的血管管壁厚度、血管孔隙率、形态学变化、抗拉强度、最大变形量、断裂伸长比、爆裂压力及缝合强度变化。

1.6 统计学分析 使用SPSS 19.0统计软件处理实验数据,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析,组内数据两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 各组标本形态变化 将血管外膜完全剥除后新鲜组血管为淡红色,血管管腔无塌陷。Tx-sal组在经脱细胞处理后血管为白色半透明,在经丹参酚酸B处理后血管呈乳白色,脱细胞管壁无明显损伤,脱细胞血管管腔无塌陷,两组脱细胞血管与新鲜组血管相比,其长度与管径均未有明显改变。

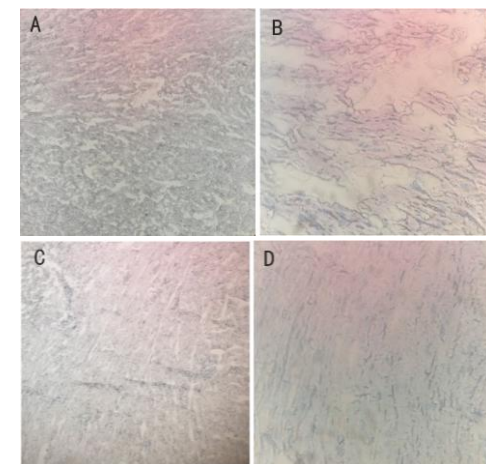
2.2 各组标本组织学形态变化 苏木精-伊红染色显示,新鲜组有许多间质细胞和染成蓝色的内皮细胞核,血管结构紧密,Tx组和Tx-sal组血管脱细胞较彻底,内皮细胞全部除去,见图1。Masson染色显示。Tx组胶原纤维结构出现明显改变,纤维走向紊乱不清,排列也较为松散,原有的波浪状平行排列结构消失;Tx-sal组弹性纤维和胶原纤维较完好的保持着原来的形态和结构,如呈波浪状规则排列等,并且纤维走向自然清晰,见图2。



图注:图A为新鲜鼠胸主动脉血管;B为Tx组鼠胸主动脉脱细胞血管支架;C为Tx-sal组鼠胸主动脉脱细胞血管支架,本组支架几乎无细胞。

图1 各组标本组织学形态变化(苏木精-伊红染色,×40)

Figure 1 Histomorphological changes of specimens in each group (hematoxylin-eosin staining, ×40)

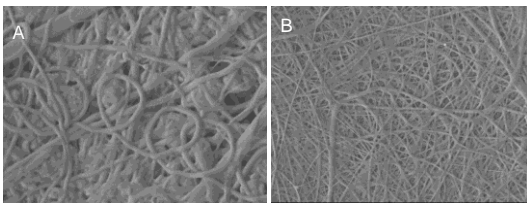


图注:图A(×10)和B(×40)为Tx组鼠胸主动脉脱细胞血管支架;C(×10)和D(×40)为Tx-sal组鼠胸主动脉脱细胞血管支架,该组支架的弹性纤维和胶原纤维的形态和结构较完好。

图2 各组标本切片胶原纤维形态(Masson 染色)

Figure 2 Morphology of collagen fibers in the specimens of each group (Masson staining)

2.3 各组标本组织超微结构变化 扫描电镜显示, 两组脱细胞血管的间质细胞和内皮细胞已被全部除去, 无DNA等细胞碎片残存。Tx组脱细胞血管的超微结构改变明显, 其胶原纤维出现轻度断裂, 形成松散的长沟。相比之下, Tx-sal组脱细胞血管基质的弹性纤维和胶原纤维的三维网状结构保留完整、规则、无断裂, 超微结构转变不明显, 见图3。



图注: 图A为Tx组; B为Tx-sal组, 该组的弹性纤维和胶原纤维无断裂, 形态良好。

图3 扫描电子显微镜观察支架微观形貌($\times 3\ 000$)

Figure 3 Microstructure of the vascular scaffold under scanning electron microscope ($\times 3\ 000$)

2.4 各组标本组织厚度变化 Tx组与Tx-sal组的脱细胞血管的血管壁厚度分别为 (0.23 ± 0.05) mm和 (0.25 ± 0.06) mm, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.5 各组标本孔隙率变化 新鲜组血管、Tx组脱细胞血管及Tx-sal组脱细胞血管的孔隙率分别为 $(68.8\pm 0.7)\%$ 、 $(90.5\pm 0.3)\%$ 及 $(90.7\pm 0.9)\%$, 经分析Tx组和Tx-sal组数值差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.6 各组生物力学性能变化

2.6.1 机械性能测试结果 根据结果显示, Tx-sal组制备的脱细胞血管, 其指标无论是抗拉强度还是最大变形量亦或是断裂伸长比都要明显优于Tx组($P < 0.05$)。见表1。说明丹参酚酸B联合Triton-x100所制备的脱细胞血管支架的机械性能优良。

表1 各组血管生物力学性能测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

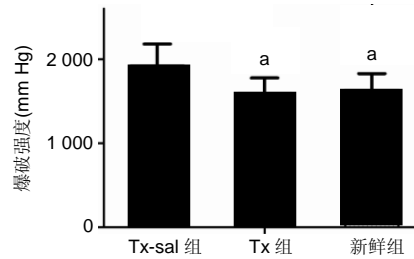
Table 1 Biomechanical properties of the vascular scaffold in each group

组别	抗拉强度(MPa)	最大变形量(mm)	断裂伸长比(λ)
新鲜组	3.03 ± 0.24	3.34 ± 0.32	1.33 ± 0.24
Tx组	2.89 ± 0.30	3.47 ± 0.56	1.03 ± 0.11
Tx-sal组	3.43 ± 0.56^a	3.78 ± 0.27^a	1.47 ± 0.56^a

表注: 与Tx组比较, $^aP < 0.05$ 。

2.6.2 血管爆破强度测试结果 Tx-sal组脱细胞血管支架的爆裂压力要明显高于新鲜组与Tx组($P < 0.05$)。新鲜组与Tx组的爆破压之间的差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图4。

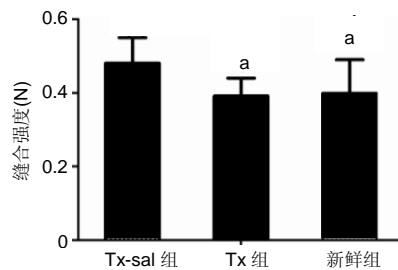
2.6.3 血管支架缝合强度 Tx-sal组脱细胞血管支架的最大缝合强度高于新鲜组与Tx组($P < 0.05$)。Tx组的缝合强度略微低于新鲜组但两组之间的差异无显著性意义($P > 0.05$)。见图5。



图注: 与Tx-sal组比较, $^aP < 0.05$ 。1 mm Hg=0.133 kPa。

图4 各组血管支架的爆破强度比较

Figure 4 Burst pressure of the vascular scaffold in each group



图注: 与Tx-sal组比较, $^aP < 0.05$ 。

图5 各组血管支架的缝合强度

Figure 5 Suture strength of the vascular scaffold in each group

综合各组实验结果来看, Tx-sal组的处理方法所制备的脱细胞血管有着十分优越的机械性能和生物力学特性, 满足血管移植材料的条件。

3 讨论 Discussion

随着医疗手段不断进步, 尤其血管移植术日益纯熟渐成体系, 冠状动脉粥样硬化型心脏病等需要血管移植才能治疗的疾病面临的又一大难题是血管移植材料获得和其质量、安全保证。由于个体差异与再次手术等的限制以及自体血管有限, 而且获取会创伤身体功能, 使得研究者们越来越重视挖掘如组织工程血管移植体等血管替代品的价值。

脱细胞血管支架具有良好的应用前景, 但是还存在多种问题需要解决。作为组织工程血管研究领域的研究热点之一, 对于脱细胞血管材料优化研究正在逐渐深化, 在组织血管研究领域显示出了明显的优势^[7]。脱细胞血管材料除去了血管原有的间质细胞和DNA等具有免疫原性的物质, 保留了血管的原有形态结构及物理性能, 而且保存了富含生长因子及细胞黏附信号的细胞识别结合位点, 易于进行种植内皮细胞, 并且能有效避免血栓形成, 具有十分良好的生物相容性, 能够满足血管移植等各方面要求, 是较为理想的血管组织工程血管支架移植材料。

脱细胞血管基质较为完备的保留了天然血管壁组分中的胶原纤维和弹性纤维, 所以具有与天然血管相似的生物力学特性, 能够抵抗生物体内动脉压力的冲击, 并保持足够的机械强度以满足移植血管的功能需求^[8]。研究发现动

脉血管壁与其他血管相比较厚,其平滑肌层十分发达,弹力纤维的含量充足,拥有良好的管状形态等优势,所以实验主要是为了改进动脉的脱细胞处理方法,以制备出优良的脱细胞动脉血管支架。大量资料表明用Triton-x100和脱氧胆酸钠脱细胞法处理血管较为理想,但是在长期的应力中出现钙化、衰败等现象,因此研究如何更加完好的保留胶原纤维与弹性纤维,提高材料的机械强度,降低移植产生的各种免疫原性,以及为种子细胞的种植提供更理想的三维微环境,对于脱细胞血管材料的研究开发具有重要意义。

经丹参酚酸B处理的脱细胞血管支架,其生物力学性能得到了显著改善。丹参的提取物中含有一种重要组成成分——丹参酚酸B($C_{56}H_{30}O_{16}$),为一种缩酚酸多羟基化合物,许多的羟基决定其功能多种多样^[5-6, 11-28]。丹参酚酸B能够清除氧自由基和降低羟基自由基活性,因此具有很强的抗氧化作用,是最强的抗氧化天然产物之一,这一点已被很多研究验证^[5-6, 28]。另外丹参酚酸B对心脏和血管性疾病还具有防治作用,例如防治动脉粥样硬化。丹参酚酸B能够消除自由基、螯合铜离子^[7-15],所以能有效抑制铜离子诱导的LDL的氧化修饰,而且丹参酚酸B剂量依赖性的抑制泡沫细胞血管内皮生长因子的表达^[16-17],以及内源性胆固醇的合成也要受到丹参酚酸B的抑制等等,在动脉粥样硬化的防治中发挥重大作用^[18]。丹参酚酸B的这些药理学功能能够改善胶原纤维,使脱细胞处理之后不稳定的胶原纤维变得更加稳定,从而使脱细胞血管壁改性,提升了脱细胞血管生物力学性能。除此之外,丹参酚酸B还可能黏附与脱细胞血管上使其获得抗氧化等能力,改善了胶原纤维的三维微环境,延长了使用寿命。脱细胞处理会对血管组织结构造成破坏^[19-27],所以实验基于丹参酚酸B的多种药理学功能^[28],结合Triton-x100进行脱细胞血管制备。

实验结果表明,经丹参酚酸B后处理可以使脱细胞SD大鼠胸主动脉改性,所制得的脱细胞动脉壁的胶原纤维、弹性纤维等形成的三维网状结构的细胞外基质明显优于未使用丹参酚酸B后处理的Triton-x100法。通过对脱细胞血管的孔隙率的检测,血管支架的孔隙率为90.7%,发现由此制得的脱细胞血管支架符合细胞迁移与物质运输的要求,满足营养物质运输及种子细胞生长、迁移的各方面条件。此外,根据力学特性检测结果,表明了Tx-sal组脱细胞血管的抗拉强度、最大变形量、断裂伸长比明显优于Tx组和新鲜组,显示了由丹参酚酸B和Triton-x100联合制备的脱细胞血管支架具有优良机械性能。实验组血管支架爆破压力高于对照组远高于生理血压;血管支架缝合强度高达(0.48±0.07) N,可见改进方法所制备的脱细胞血管支架拥有极佳的生物力学特性符合血管移植的要求。爆破压力与缝合强度的测试结果也说明了实验制备的脱细胞血管支架能够承受循环系统所带来的血管血流的压力,这有助于提高血管移植于生物体内后的使用寿命和成功率^[29-30]。

应用Triton-x100这一柔和的非离子型去垢剂不仅去除细胞彻底,还能够减少脱细胞过程中的纤维损伤,再联合丹参酚酸B进行后处理,由此制备的脱细胞血管材料,在完全去除了细胞和DNA残留物的同时,细胞外基质的胶原纤维等成分保存完整连续并能拥有稳定良好的机械性能,是良好的制备脱细胞血管材料的方法。Triton-x100联合丹参酚酸B制备的脱细胞血管支架脱细胞彻底,其胶原纤维、弹性纤维保留较为完整,排列有序,走向清晰,三维微环境结构完整,其管壁厚度与Triton-x100法制备的脱细胞血管支架相比几乎无变化。使用Triton-x100联合丹参酚酸B制备脱细胞血管支架是可行的,具有非常不错的应用前景。

实验使用丹参酚酸B后处理所制备的脱细胞血管支架可以使其改性,较为完备的保留了胶原纤维和弹性纤维,极大的减少了胶原纤维的损伤,提升了血管支架生物力学性能。丹参酚酸B具有良多的药理学功能,将其应用到脱细胞血管支架材料的制备中,可以有多种方式,实验仅试验了后处理,后续研究还可以采用别的方式,此外,丹参酚酸B还可以与其他药物联合使用具有更好的药理学作用,实验还可以继续改进制备方法,以求制备出生物力学性能更加优良的脱细胞血管支架。

致谢: 感谢新乡医学院研究生院和北京大学工学院各位老师提供的技术帮助。

作者贡献: 实验设计及资料收集为第一作者和通讯作者。实验实施为第一、二、四作者。实验评估为第五作者和通讯作者。

经费支持: 该文章接受了“河南省高等学校重点科研项目计划(17A180034)”与“第二届大学生生命科学联赛立项课题(SKYL5017)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经新乡医学院动物实验伦理委员会批准,批准号:201704001。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Oda S, Otsuki S, Kurokawa Y, et al. A new method for meniscus repair using type I collagen scaffold and infrapatellar fat pad. J Biomater Appl. 2015;29(10):1439-1448.

- [2] Doryab A, Amoabediny G, Salehi-Najafabadi A, et al. Advances in pulmonary therapy and drug development: Lung tissue engineering to lung-on-a-chip. *Biotechnol Adv*. 2016; 34(5):588-596.
- [3] Wu J, Ravikumar P, Nguyen KT, et al. Lung protection by inhalation of exogenous solubilized extracellular matrix. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171165.
- [4] 孙良,李丕宝,栾保华,等.脱细胞基质软骨支架的制备[J].中国组织工程研究,2015,19(16):2494-2499.
- [5] 吕志刚,徐列明.丹酚酸B的药理研究概况[J].医学研究杂志,2008,37(8):114-116.
- [6] 李克明,付桂香.丹参中丹酚酸B的药理研究进展[J].中日友好医院学报,2008,22(6):366-377.
- [7] 刘宾,张蔓菁,夏纬,等.反复冻融与超高压处理制备脱细胞组织工程血管支架的实验研究[J].中国美容整形外科杂志,2009,20(12):761-764.
- [8] 刘宾,李菲,张蔓菁,等.超声空化法对脱细胞血管支架组织结构及生物力学特性影响的实验研究[J].中国美容整形外科杂志,2015,26(12):755-759.
- [9] 赵艳红,杨强,彭江,等.新型脱细胞骨基质材料的组织学结构及其细胞相容性观察[J].中国修复重建外科杂志,2013,27(7):781-785.
- [10] 杰永生,慕惠,陈磊,等.脱蛋白联合冷冻干燥法制备异种骨的实验研究[J].中国医药生物技术,2013,8(5):331-335.
- [11] 刘昊,张永刚,郭全义,等.新型脱细胞骨基质-壳聚糖骨组织工程支架的制备及性能评价[J].军医进修学院学报,2011,32(6):616-619.
- [12] 夏建春,米立国,高英,等.NaOH消蚀法制备胎儿脱细胞真皮基质的研究[J].中国临床解剖学杂志,2005,23(4):409-412.
- [13] 彭希亮,张玉红,倪文琼.脂肪组织来源干细胞构建皮肤复合组织修复创面缺损[J].中国组织工程研究,2016,20(1):8-12.
- [14] 李一平.冠状动脉粥样硬化型心脏病发病机制的代谢组学初步探索及优化冠状动脉粥样硬化型心脏病介入治疗的临床研究[D].北京:北京协和医学院,中国医学科学院,清华大学医学部,北京协和医学院中国医学科学院.2017.
- [15] 李晓玉,廉东波,肖萌萌,等.脱细胞血管基质管状支架用于猪胆管损伤修复的实验研究[J].中华普通外科杂志,2018,33(2):152-155.
- [16] 刘俊,张晓膺.纳米APS外膜肝素化内膜小口径组织工程血管的实验研究[J].上海交通大学学报(医学版),2017,37(3):337-343.
- [17] 邵擎东,汪铮,李宇飞,等.部分间质血管-脱细胞骨基质-壳聚糖支架在促进兔桡骨骨折愈合中的作用[J].中华实验外科杂志,2017,34(1):97-101.
- [18] 陶然岑,郭光伟.丹酚酸B后处理脱细胞猪心脏瓣膜的形态学及生物力学研究[J].中国现代医生,2011,49(22):13-14,28.
- [19] 陈晓波,吴英锋,段红永,等.不同方法制备脱细胞血管基质的比较[J].中华临床医师杂志(电子版),2011,5(20):6098-6101.
- [20] 付炜,薛继鑫,何晓敏,等.应用血管脱细胞基质膜片构建组织工程血管的初步研究[J].中华临床医师杂志(电子版),2012,6(22):7090-7094.
- [21] 刘国锋,何志娟,杨大平,等.生物酶连续消化法对犬颈总动脉脱细胞基质材料生物力学的影响研究[J].中国美容医学,2010,19(7):996-999.
- [22] Zhang J, Huang X, Wang L. Sheep acellular dermal matrix microparticle transplant for wound in rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2018;43(7):711-717.
- [23] Kong X, Kong C, Wen S, et al. The use of heparin, bFGF, and VEGF 145 grafted acellular vascular scaffold in small diameter vascular graft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34160.
- [24] Lee JW, Park JY, Park SH, et al. Cross-linked electrospun cartilage acellular matrix/poly(caprolactone-co-lactide-co-glycolide) nanofiber as an antiadhesive barrier. *Acta Biomater*. 2018;74:192-206.
- [25] de Resende DRB, Gregghi SLA, Siqueira AF, et al. Acellular dermal matrix allograft versus free gingival graft: a histological evaluation and split-mouth randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2018. doi: 10.1007/s00784-018-2470-6.
- [26] Moyer HR, Hart AM, Yeager J, et al. A Histological Comparison of Two Human Acellular Dermal Matrix Products in Prosthetic-Based Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017;5(12):e1576.
- [27] Boháč M, Danišovič L, Koller J, et al. What happens to an acellular dermal matrix after implantation in the human body? A histological and electron microscopic study. *Eur J Histochem*. 2018;62(1):2873.
- [28] 肖玲芳,张卫芳,龚志成.丹酚酸B的心血管药理研究进展[J].中南医学科学杂志,2015,43(1):90-94.
- [29] 方宁涛,孙洪亮,谢尚喆,等.十二烷基肌氨酸钠法制备带瓣管道支架及其生物学性能分析[J].中华胸心血管外科杂志,2007,23(4):260-262.
- [30] 史振宇,张祥满,陈枫,等.聚己内酯-碳酸亚乙酯和血管内皮生长因子静电混纺支架的构建及其生物学性能[J].复旦学报(医学版),2015,42(1):50-56.