

• 专题报道 •

三种去细胞方法构建的猪主动脉瓣膜支架的性能比较

杨立信,徐志云,黄盛东,刘延玲,张宝仁 (第二军医大学长海医院胸心外科,上海 200433)

[摘要] **目的:**评价不同去细胞方法制备的猪主动脉瓣支架的组织学、生物力学特性及组织相容性,寻找更合适的去细胞心脏瓣膜支架制备方法。**方法:**分别采用3种不同的去细胞方法对新鲜猪主动脉瓣叶及带瓣主动脉管道进行脱细胞处理:0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组用含有0.01%胰蛋白酶-1%Triton和核酸酶的去细胞溶液37℃持续震荡24h;0.01%胰蛋白酶8h+1%脱氧胆酸(DCA)+核酸酶组先用0.01%胰蛋白酶37℃持续震荡消化处理8h,终止胰酶后加入含有1%DCA和核酸酶的去细胞溶液37℃持续震荡24h;1%DCA+核酸酶32h组;用含有1%DCA和核酸酶的去细胞溶液37℃持续震荡32h;同时以PBS漂洗的新鲜瓣叶作为对照组。通过H-E染色、扫描电镜和透射电镜观察评价去细胞效果。测定瓣叶弹性模量、最大抗张强度、应力伸长比及断裂伸长比以评价各组瓣叶的生物力学特性。大鼠皮下包埋实验评价去细胞支架的免疫源性、体内炎症反应及改建情况。**结果:**0.01%胰蛋白酶8h+1%DCA+核酸酶组细胞去除完全,优于0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组和1%DCA+核酸酶32h组。所制备瓣膜支架的弹性模量及最大抗张强度大于0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组。应力伸长比及断裂伸长比则小于0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组,与新鲜瓣叶无明显差异。体内埋植实验炎症反应轻微,宿主成纤维细胞能够长入支架并对其进行改建。**结论:**短时间低浓度胰蛋白酶与1%DCA和核酸酶相结合的去细胞法方便有效,既能完全去除猪带瓣主动脉管道的细胞成分,使免疫源性显著下降;同时瓣叶的生物力学特性保持稳定,可为受体细胞化组织工程心脏瓣膜的提供可靠的支架材料。

[关键词] 组织工程;心脏瓣膜,人工;去细胞;猪主动脉瓣膜支架

[中图分类号] R 318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0008-05

Decellularized porcine aortic valve scaffolds created by different decellularization protocols: a comparison of their histological, biomechanical, and biocompatible characteristics

YANG Li-xin*, XU Zhi-yun, HUAGN Sheng-dong, LIU Yan-ling, ZHANG Bao-ren (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the histological, immunological, and biomechanical characteristics of decellularized porcine aortic valve scaffold created by 3 different decellularization protocols and to search for a more suitable technique for creating acellular tissue-engineered cardiac valve conduit. **Methods:** Porcine aortic valve leaflets and whole aortic roots were decellularized by 3 different protocols. Decellularization procedure in group I involved treatment with 0.01% trypsin, 1% Triton, and nuclease for 24 h; that in group II involved treatment with 0.01% trypsin (8 h), 1% DCA, and nuclease for 24 h; and that in group III involved treatment with 1% DCA and nuclease for 32 h. All the treatments were conducted during continuous shaking at 37°C. Porcine aortic valve leaflets and whole aortic roots treated with PBS were taken as control. The decellularization efficiencies of each protocol were assessed by H-E staining, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. The biomechanical features of the acellular valve matrices were examined by stress-strain tests and tensile strength tests. The immunogenicity and inflammatory responses of the decellularized matrices, valve leaflets, and aortic wall were investigated by subcutaneous implantation of them in rats. **Results:** The native cells in porcine aortic valve leaflets and aortic roots were completely removed in group II, which was superior to group I and III. The values of elasticity modulus and ultimate tensile strength (UTS) of group II were greater than those in group I ($[5.77 \pm 0.95]$ MPa vs $[4.15 \pm 1.13]$ MPa and $[7.82 \pm 1.51]$ MPa vs $[4.65 \pm 0.85]$ MPa, respectively; $P < 0.05$). The extension ratios at 1.5 MPa and at rupture in group II were less than those in group I ($[0.33 \pm 0.04]$ vs $[0.41 \pm 0.09]$ and $[0.45 \pm 0.02]$ vs $[0.60 \pm 0.06]$; $P < 0.05$), but the extension ratio at rupture was similar to that of fresh porcine aortic valves ($[0.45 \pm 0.02]$ vs $[0.46 \pm 0.03]$). Histological analysis showed only slight inflammatory responses in group II and the host cells grew into the matrix, rebuilding the acellular matrices gradually. **Conclusion:** Decellularization using 8-hour pretreatment with 0.01% trypsin, followed by 24 hours incubation with 1% DCA plus nuclease is effective and convenient; it not only removes the cells but also decreases the immunogenicity of the aortic valve matrices, making the product an excellent material for tissue-engineered cardiac valve conduit.

[KEY WORDS] tissue engineering; heart valve prosthesis; decellularization; porcine aortic valve scaffolds

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 8-12]

去细胞天然瓣膜支架保留了完整的细胞外基质结构和功能,为细胞的黏附和生长提供了重要的微

[作者简介] 杨立信,博士,副教授、副主任医师。
E-mail: yunglixin@163.com

环境,同时还具有良好的生物力学性能,是构建组织工程心脏瓣膜的重要支架材料。制备去细胞带瓣管道支架一方面要求完全去除管道壁内部和瓣下肌肉组织的细胞成分,同时还要保持瓣膜的力学性能不受损害。现有去细胞方法的研究多侧重于去细胞瓣叶支架的制备,对整体带瓣管道支架的研究较少。本研究采用短时间低浓度胰酶、核酸酶与表面活性剂脱氧胆酸(DCA)相结合的方法制备去细胞猪主动脉带瓣管道,以寻找更合适的去细胞心脏瓣膜支架制备方法。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 新鲜猪主动脉瓣,取自上海市大场肉联场。雄性SD大鼠,第二军医大学实验动物中心。0.01%胰蛋白酶(*m/m*)、200 $\mu\text{g/ml}$ DNA 酶 I、20 $\mu\text{g/ml}$ RNA 酶 A 和 DCA 购自美国 Sigma 公司,1% Triton-X100 (V/V) 购自美国 Amresco 公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司。所有去细胞溶液均由自制的 PBS 液配制而成。

1.2 猪主动脉瓣的获取 在猪宰杀后 20 min 内清洁条件下取出心脏,生理盐水冲洗,将主动脉瓣连同瓣上 2 cm 升主动脉一并取出。置入 4 $^{\circ}\text{C}$ Hank 液中带回实验室,无菌条件下清除主动脉外膜,仔细修剪瓣下肌肉组织,制备整体主动脉瓣。75%乙醇消毒 2 min, PBS 液冲洗后放入含抗生素 Hank 液中 30 kGy γ 射线照射消毒。主动脉瓣叶则于切取后 PBS 液冲洗,直接采用 75%的乙醇溶液消毒 2 min。之后进行脱细胞处理。

1.3 实验分组及脱细胞处理 分别采用 3 种不同的去细胞方法对新鲜猪主动脉瓣叶及带瓣主动脉管道进行脱细胞处理:0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组用含有 0.01%胰蛋白酶-1%Triton 和核酸酶的去细胞溶液处理 24 h;0.01%胰蛋白酶 8 h+1%DCA+核酸酶组:先用 0.01%胰蛋白酶消化处理 8 h,胎牛血清终止胰酶、PBS 液漂洗后放入含有 1%DCA 和核酸酶的去细胞溶液再行脱细胞处理 24 h;1%DCA+核酸酶 32 h 组:用含有 1%DCA 和核酸酶的去细胞溶液处理 32 h。同时以 PBS 液漂洗的新鲜瓣叶作为对照组。所有去细胞过程均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 持续震荡中进行,核酸酶包括 DNA 酶 I (200 $\mu\text{g/ml}$) 和 RNA 酶 A (20 $\mu\text{g/ml}$)。脱细胞瓣叶和整体瓣膜经 PBS 液反复震荡漂洗后,移入含抗生素的保存中备用。

1.4 组织学观察 去细胞瓣叶经 PBS 液振荡漂洗

后以分别以中性甲醛溶液和 4%多聚甲醛溶液固定,常规行石蜡包埋切片 H-E 染色,扫描及透射电镜检查。去细胞主动脉管道行石蜡包埋切片 H-E 染色。

1.5 生物力学测试 (参照 Vesely 等^[1]的方法)将各组去细胞瓣叶周向裁成 1.0 cm \times 0.5 cm 样品条,每组各 6 个。台式测厚仪(上海市轻工业局标准计量管理所实验二厂)测量样品两端及中间的厚度,取平均值作为样品的初始厚度,计算出样品的初始横截面积。将标本固定在 Instron-1122(英国 Instron 公司)拉伸机上进行单轴横向拉伸试验,整个测试过程中用 Hank 液保持样品的湿润。以 10 mm/min 的速度将试件拉到承受 500 g 应力时卸载,预调 5 次后可见滞后环基本消失,然后进行加载-卸载试验(载荷范围、应变率同预调)、拉断试验(应力松弛试验后以 20 mm/min 的速度加载至标本破坏,记录破坏应力值,并记录试件拉伸长度)。以应力为纵坐标,应变为横坐标绘制出应力-应变关系曲线;采用 Matlab 力学分析软件处理数据。

1.6 组织相容性评价 将去细胞瓣叶及主动脉管道裁剪后埋植入 SD 大鼠背部皮下,并分别于埋植 2 周和 4 周后取出瓣叶,4 周和 8 周后取出主动脉壁,常规石蜡包埋切片 H-E 染色评价去细胞支架的免疫源性、体内炎症反应及改建情况。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用软件 SPSS 10.0,应用 *F* 检验和 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 去细胞瓣膜支架的组织学及超微结构观察 3 种去细胞方法均可完全去除猪主动脉瓣叶的细胞成分,H-E 染色示瓣叶组织表面及中间的细胞成分完全消失,纤维波浪状结构保存完好(图 1A),0.01%胰蛋白酶 8 h+1%DCA+核酸酶组完全去除了猪带瓣主动脉管道的细胞成分(图 1B),0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组和 1%DCA+核酸酶 32 h 组未能去除主动脉壁深层的细胞成分(图 1C)。扫描电镜示去细胞瓣叶表面细胞去除完全,0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组瓣叶表面胶原纤维束的排列稍紊乱,但无断裂现象(图 2A)。0.01%胰蛋白酶 8 h+1%DCA+核酸酶组和 1%DCA+核酸酶 32 h 组瓣叶表面胶原纤维束排列整齐(图 2B,2C)。透射电镜示 3 组去细胞瓣叶内的细胞成分均完全去除,胶原纤维排列整齐,纤维横纹清晰,无溶解和断裂现象(图 2D)。

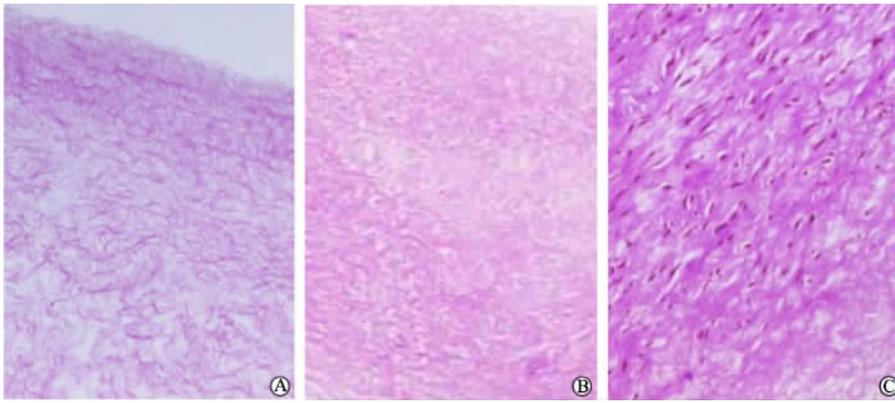


图1 去细胞瓣叶及主动脉管道的H-E染色

Fig 1 H-E staining of decellularized porcine aortic valves and conduits

A: Decellularized valves in 0.01% trypsin 8 h+1% DCA+nuclease group($\times 200$); B: Decellularized aortic conduits in 0.01% trypsin 8 h+1% DCA+nuclease group($\times 100$); C: Decellularized aortic conduits in 0.01% trypsin+1% Triton+nuclease group($\times 100$)

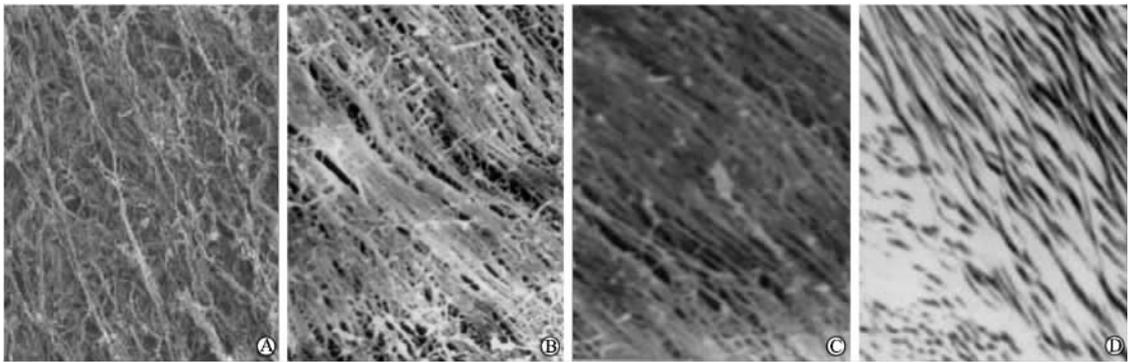


图2 去细胞瓣叶扫描电镜和透射电镜观察

Fig 2 Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of decellularized valve leaflets

A-C: Scanning electron microscopy of ($\times 1500$); A: 0.01% trypsin+1% Triton+nuclease group; B: 0.01% trypsin 8 h+1% DCA+nuclease group; C: 1% DCA+nuclease 32 h group; D: Transmission electron microscopy in 0.01% trypsin 8 h+1% DCA+nuclease group($\times 12000$)

2.2 去细胞瓣叶的生物力学测试结果 去细胞瓣叶的应力应变曲线与正常瓣膜组织相似,均为典型的非线性曲线。各组去细胞瓣叶的最大抗张强度均低于新鲜瓣叶,0.01%胰蛋白酶8h+1%DCA+核酸酶组去细胞瓣叶的弹性模量及最大抗张强度大于

0.01%胰蛋白酶+1% Triton+核酸酶组($P < 0.05$),特定应力(1.5 MPa)时伸长比及断裂伸长比则小于0.01%胰蛋白酶+1% Triton+核酸酶组($P < 0.05$),与新鲜瓣叶无显著差异。各组瓣叶应力-应变实验数据及瓣叶最大抗张强度测试结果见表1。

表1 各组瓣叶应力-应变及抗张强度实验数据

Tab 1 Parameters in stress - strain tests and tensile strength tests of aortic valve leaflets

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	E(p_B /MPa)	Extension ratio at stress of 1.5 MPa	UTS (p_B /MPa)	Extension ratio at rupture
0.01% trypsin+1% Triton+nuclease	4.15 \pm 1.13	0.41 \pm 0.09	4.65 \pm 0.85	0.60 \pm 0.06
0.01% trypsin 8 h+1% DCA+nuclease	5.77 \pm 0.95*	0.33 \pm 0.04*	7.82 \pm 1.51* Δ	0.45 \pm 0.02*
1% DCA+nuclease 32 h	5.54 \pm 1.02*	0.32 \pm 0.06*	6.24 \pm 1.12* Δ	0.44 \pm 0.04*
Control	5.90 \pm 0.87*	0.32 \pm 0.05*	9.02 \pm 0.90	0.46 \pm 0.03*

* $P < 0.05$ vs 0.01% trypsin+1% Triton+nuclease; $\Delta P < 0.05$ vs control group

2.3 皮下埋植实验结果 各组去细胞瓣叶包埋2周时瓣叶结构存在,少量炎性细胞浸润,主要为单个

核及淋巴细胞(图3A)。包埋4周时瓣叶结构消失,炎性细胞减少,瓣膜基质被成纤维细胞改建为纤维

组织(图 3B)。0.01%胰蛋白酶 8 h+1%DCA+核酸酶组去细胞主动脉管道包埋 4 周时包膜下有轻度炎症细胞浸润,并少量成纤维样细胞沿胶原纤维间隙长入主动脉管道支架浅层(图 3D)。8 周时包膜下炎症反应明显减轻,细胞长入至主动脉壁深层,胶原纤维无明显吸收和破坏(图 3G)。0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组去细胞主动脉管道包埋 4

周时包膜下炎症细胞浸润明显,除单个核细胞和淋巴细胞外,尚可见中性粒细胞和类上皮样细胞(图 3C)。8 周时较多成纤维细胞长入主动脉壁深层,但仍伴有大量炎性细胞(图 3F)。1%DCA+核酸酶 32 h 组去细胞主动脉壁包埋后的组织学所见与 0.01%胰蛋白酶+1%Triton+核酸酶组相似,并可见新生血管形成,组织破坏形成空隙(图 3E、3H)。

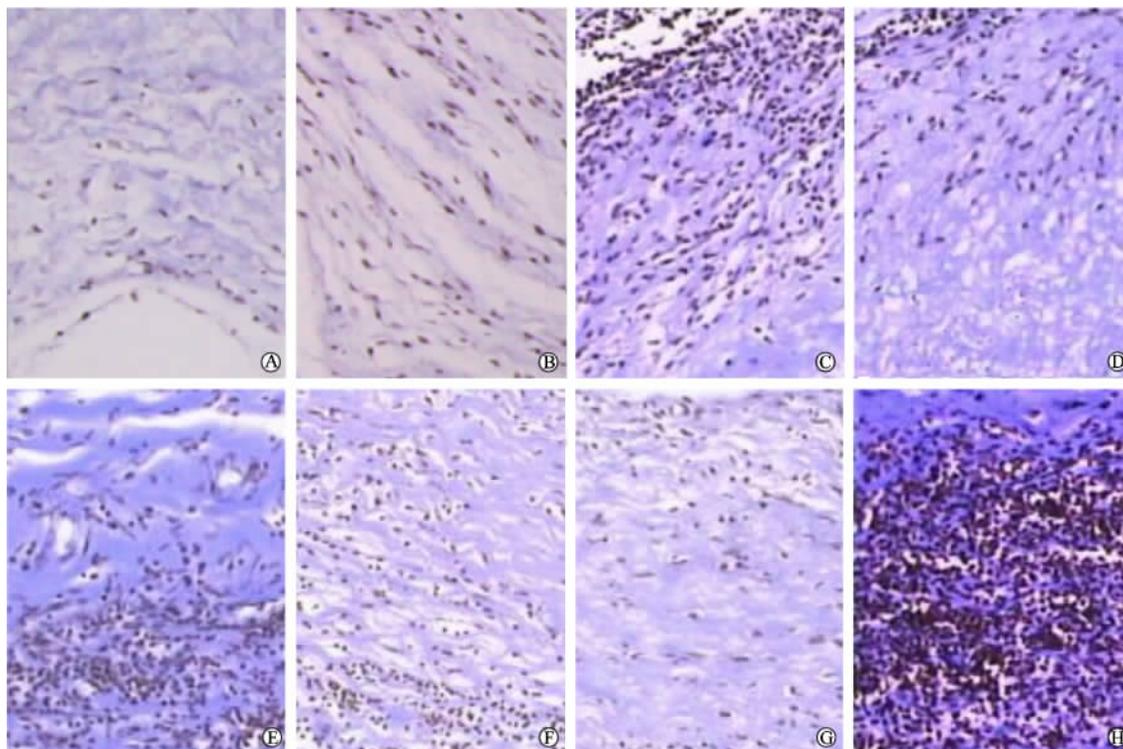


图 3 去细胞猪主动脉瓣叶及主动脉管道大鼠皮下包埋后的 H-E 染色

Fig 3 H-E staining of decellularized porcine aortic valve leaflets and conduits after implanted subcutaneously in rats ($\times 200$)

A,B: Decellularized leaflets in 0.01% trypsin 8 h+1% DCA+ nuclease group 2 weeks and 4 weeks after implantation, respectively; C-E: Decellularized conduits after 4 weeks implantation; F-H: Decellularized conduits after 8 weeks implantation; C, F: 0.01% trypsin+1% Triton+nuclease group; D,G: 0.01% trypsin 8 h+1% DCA+nuclease group; E,H: 1% DCA+nuclease 32 h group

3 讨论

目前去细胞瓣膜支架的制备方法主要有胰蛋白酶消化法和化学方法^[2-3]。在体研究表明:去细胞过程中胰蛋白酶消化过度可引起细胞外基质破坏,造成较多氨基多糖和蛋白多糖的暴露,进而导致瓣膜早期钙化和变性^[4]。反之,如细胞成分去除不彻底则可引起严重的免疫反应和炎症反应,同样导致瓣膜早期衰败^[5]。Booth 等^[3]的研究表明单纯非离子型去污剂 Triton 作用 72 h 也未能完全去除瓣叶中的细胞,而采用离子型去污剂 0.01%SDS 虽能够去除瓣叶细胞,但要完全去除主动脉壁的细胞则需加大 SDS 浓度至 0.03%。Samouillan 等^[6]对去细胞

主动脉组织进行热重分析和热量测定发现 SDS 处理可使胶原的螺旋结构不稳定,弹力纤维网水肿,SDS 残留毒性,不利于细胞生长。单纯脱氧胆酸脂的脱细胞效果也未得到一致认可^[7],且单纯去污剂脱细胞通常需要结合渗透压的改变,需要较长时间的浸泡和漂洗,增加了制作过程中的污染机会。

我们前期研究表明,低浓度(0.01%)胰蛋白酶加去污剂 Triton X-100 和核酸酶的方法能够完整去除猪主动脉瓣叶的细胞成分,且较好地保持其生物力学性能^[8],但这一方法对猪带瓣主动脉管道的去细胞效果尚不确切,因此,现有的去细胞瓣膜支架制备方法尚需进一步优化。

本研究采用先用低浓度(0.01%)胰蛋白酶消化

8 h,对血管壁中的某些基质进行溶解使细胞间隙疏松和对细胞的完整性加以破坏后再终止胰蛋白酶,加入离子型去污剂,溶解细胞的脂质双分子层,使细胞溶解。同时加入核酸酶以破坏细胞核碎片的核酸,防止残留细胞核碎片引起炎性反应。这样既可以缩短胰蛋白酶的作用时间,减轻胰蛋白酶对支架结构的破坏,同时还增强了化学表面活性剂 DCA 的去细胞效果。结果表明这种去细胞方法不但可以去除整体主动脉瓣的管道部分与瓣下肌肉组织深部的细胞成份,而且对瓣膜支架的生物力学性能无明显影响,而另外两种去细胞方法因未能去除主动脉壁及肌肉组织的细胞成份,从而引起机体产生了明显的炎性反应。

我们认为采用短时间低浓度胰蛋白酶与 1% DCA 和核酸酶相结合的方法去细胞效果确切,对瓣膜支架的生物力学性能影响较小,优于低浓度胰蛋白酶联合 Triton 加核酸酶以及单纯非离子型去污剂加核酸酶的方法。

[参考文献]

[1] Vesely I, Lavin L G, Graf D. Mechanical testing of cryopreserved aortic allografts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1990, 99: 119-123.

- [2] Zeltinger J, Landeen L K, Alexander H G, et al. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves[J]. Tissue Eng, 2001, 7: 9-22.
- [3] Booth C, Korossis S A, Wilcox H E, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold[J]. J Heart Valve Dis, 2002, 11: 457-462.
- [4] Leyh R G, Wilhelm M, Bebe P, et al. *In vivo* repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75:1457-1463.
- [5] Simon P, Kasimir M T, Seebacher G, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients[J]. Eur J Cardiothorac Surgery, 2003, 23: 1002-1006.
- [6] Samouillan V, Dandurand-Lods J, Lamure A, et al. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve prostheses[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 46: 531-538.
- [7] 顾春虎,刘维永,刘洋,等.不同试剂脱除猪主动脉瓣细胞的对比研究[J].中华胸心血管外科杂志,2006,22:127-129.
- [8] 黄思远,徐志云,张宝仁,等.不同脱细胞方法对猪主动脉瓣的组织学及生物力学特性的影响[J].第二军医大学学报,2003,24:1293-1296.

[收稿日期] 2006-10-30

[修回日期] 2006-12-14

[本文编辑] 曹静

欢迎订阅《第二军医大学学报》

《第二军医大学学报》是由第二军医大学主办的国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊。本刊面向全国和海外作者征稿,主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果。由中国科学院院士、肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超教授任主编。辟有:院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、个案报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构和高等医药院校的师生。本刊自1980年创刊以来,一直连续被确认为“中国基础医学类核心期刊”、“中国综合性医药卫生类核心期刊”;被权威机构确定为“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”;被包括万方数据——中国数字化期刊群、中国学术期刊综合评价数据库等在内的国内所有重要检索系统,以及20多种重要的文摘性刊物收录,被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)、波兰《哥白尼索引》收录。本刊2002年荣获“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”,2004年荣获“第三届国家期刊奖提名奖”和全国高校优秀科技期刊评比一等奖,2006年荣获首届中国高校精品科技期刊奖。

本刊为月刊,A4开本,80g铜版纸彩色双胶印刷,2007年起每期定价15元,全年共180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址:上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部,邮编:200433

联系人:商素芳。电话:021-25074352,021-25074340转824分机

E-mail:bxue@smmu.edu.cn,bxue304@yahoo.com.cn

http://journals.smmu.edu.cn