

各向异性 PCL/明胶复合人工心脏瓣膜瓣叶材料的制备及性能

陈昱欣^{1a,1b} 王雅娟^{1a,1b} 郑小凡^{2a,2b} 王富军^{1a,1b} 王璐^{1a,1b}
侯永泰³ 王盛章^{2a,2b} 李超婧^{1a,1b}

- 东华大学 a. 纺织学院, b. 纺织面料技术教育部重点实验室, 上海 201620;
- 复旦大学 a. 工程与应用技术研究院生物医学工程技术研究所, b. 航空航天系生物力学研究所, 上海 200433;
- 上海昊海生物科技股份有限公司, 上海 200052

摘要:为制备模拟人体原生瓣膜层状结构及力学各向异性的人工心脏瓣膜瓣叶材料,采用静电纺丝技术,以不同质量配比的聚己内酯(PCL)和明胶为原料,通过调整各层纤维膜的纤维排列情况,顺序堆叠纺制3层结构的PCL/明胶复合支架。结果表明,PCL质量体积比为10%时,随着明胶质量分数增加,纤维直径和复合支架厚度随之增加,复合支架的弹性模量和极限抗拉强度减小。其中,PCL和明胶质量配比为5:3的复合支架在两个相互垂直方向上的弹性模量分别为 (26.98 ± 3.01) MPa和 (3.39 ± 0.36) MPa,各向异性比约为7.96,接近原生主动脉瓣的力学各向异性比,其体外脉动流测试显示有效开口面积(EOA)为 1.79 cm^2 、平均跨瓣压差(MPD)为 1.67 kPa (即 12.52 mmHg)、反流分数(RF)为24.22%。同时,制备的复合支架溶血率均小于5%,细胞相对增殖率均大于80%,具有良好的血液相容性和细胞相容性,有望应用于人工心脏瓣膜瓣叶材料。

关键词:人工心脏瓣膜;各向异性;静电纺丝;层状结构;弹性模量;极限抗拉强度;溶血率;有效开口面积(EOA);平均跨瓣压差(MPD);反流分数(RF)

中图分类号:R 318.11; TS 176

文献标志码:A

文章编号:1004-7093(2024)07-0001-10

Preparation and properties of anisotropic PCL/gelatin composite artificial heart valve leaflet materials

Chen Yuxin^{1a,1b}, Wang Yajuan^{1a,1b}, Zheng Xiaofan^{2a,2b}, Wang Fujun^{1a,1b}, Wang Lu^{1a,1b},
Hou Yongtai³, Wang Shengzhang^{2a,2b}, Li Chaojing^{1a,1b}

a. College of Textiles, b. Key Laboratory of Textile Science & Technology, Ministry of Education,

1. Donghua University, Shanghai 201620, China;

a. Institute of Biomedical Engineering and Technology, Academy for Engineering and Technology, b. Institute of Biomechanics Department of Aeronautics and Astronautics, 2. Fudan University, Shanghai 200433, China;

3. Shanghai Haohai Biological Technology Co., Ltd., Shanghai 200052, China

Abstract: To fabricate artificial heart valve leaflet materials that mimic the layered structure and mechanical anisotropy characteristics of human native heart valve leaflets, different mass ratios of

基金项目:中国博士后科学基金(2023M732187);中央高校基本科研业务费专项资金资助(2232023G-01);111计划2.0(BP0719035)

收稿日期:2024-04-08

作者简介:陈昱欣,女,1998年生,在读硕士研究生,研究方向为各向异性人工心脏瓣膜

通信作者:李超婧,副教授,lcj@dhu.edu.cn

polycaprolactone (PCL) and gelatin were used to produce PCL/gelatin composite scaffolds by electrospinning technology. The three-layered composite scaffolds were stacked sequentially by adjusting the fiber arrangement of each layer membrane. The results showed that with a PCL mass-volume ratio of 10%, as the gelatin mass fraction increased, the fiber diameter and the thickness of the composite scaffolds increased, while the elastic modulus and ultimate tensile strength of the scaffolds decreased. Specifically, the elastic modulus of the composite scaffold with a mass ratio of PCL and gelatin of 5:3 was (26.98 ± 3.01) MPa and (3.39 ± 0.36) MPa in two mutually perpendicular directions, respectively, with an anisotropy ratio of approximately 7.96, approaching the mechanical anisotropy ratio of native aortic valve leaflets. *In vitro* pulsatile flow experiments showed that the effective opening area (EOA) was 1.79 cm^2 , the mean pressure difference (MPD) was 1.67 kPa (12.52 mmHg) and the regurgitant fraction (RF) was 24.22%. Meanwhile, the hemolysis rate of the prepared composite scaffolds was less than 5%, and the relative cell proliferation rate exceeded 80%, indicating good hemocompatibility and cytocompatibility, which suggested potential application in artificial heart valve leaflet materials.

Keywords: artificial heart valve; anisotropy; electrospinning; layered structure; elastic modulus; ultimate tensile strength; hemolysis rate; effective opening area (EOA); mean pressure difference (MPD); regurgitant fraction (RF)

心脏瓣膜是位于心脏心房与心室之间或心室与动脉之间的重要组织,其规律的单向开合可保证血液稳定流动^[1]。当瓣膜发生狭窄或关闭不全等病变时,一般需进行瓣膜置换使之恢复正常功能^[2]。目前,临床上用于瓣膜置换的人工心脏瓣膜 (artificial heart valve, AHV) 主要有机械瓣和生物瓣 2 类。机械瓣结构耐久性好,但因易形成血栓而引发故障,故需持续服用抗凝药物;生物瓣原料来源广泛,且无需终身抗凝,但存在生物力学不匹配、钙化失效等问题^[3-4]。当前,针对现有 AHV 的不足,利用高度可调可控的聚合物材料,通过调节组分、结构及性能,制备满足植入要求的 AHV,已成为该领域重要的研究方向。

人体心脏包含主动脉瓣、肺动脉瓣、二尖瓣和三尖瓣等 4 个瓣膜,每个瓣膜由一定数量的薄膜状瓣叶和相应的瓣环组成^[5]。瓣叶主要由纤维层、海绵层和心室层这 3 层异质结构组成,整体厚度小于 1 mm 且柔韧性良好^[6]。其中,纤维层主要由沿瓣叶周向排列的胶原纤维组成,厚度占比一般小于 45%;中间海绵层主要由糖胺聚糖和蛋白多糖组成,呈多孔结构;心室层主要由胶原纤维和沿径向排列的弹性纤维组成,厚度占比一般小于 30%^[7-8]。原生瓣叶在微观上具有结构各向异性特点,这导致其

在宏观上表现为力学各向异性。人体原生主动脉瓣的单轴拉伸测试结果显示,瓣叶周向的弹性模量和极限抗拉强度均大于径向的,其力学各向异性特点对保持较大的有效开口面积、较低的反流量具有重要作用^[9]。此外,瓣膜细胞群与瓣叶细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的微纳米级架构存在细胞-基质相互作用,细胞在环境的物理、机械和生理学刺激下展开基质重塑和组织修复等行为,从而表现出良好的生物活性^[10-12]。因此,构建模拟原生瓣膜层状结构,以及具有接近原生瓣膜力学各向异性特征的无细胞可吸收支架,有望诱导内源性再生并促进新组织形成。生物可降解聚合物由于具有可控的降解速率,可根据细胞环境进行定制化设计,因而成为组织工程支架的首选材料^[13]。

静电纺丝技术利用高压静电作用,以天然或合成聚合物溶液或熔体为原料,制备比传统纺丝工艺获得的直径更小的微纳米级纤维,赋予纤维材料优异的延展性以适应各种尺寸和形状,并可根据研究目标控制纤维组分以获得所需的性能。在组织工程领域,静电纺丝技术展现出巨大应用潜力^[14]。目前,已有不少研究利用静电纺丝技术制备仿原生瓣膜层状结构的瓣叶材料。Snyder 等^[15]利用静电纺丝技术制备纤维呈取向-随机-取向顺序堆叠的层状

支架,测试结果表明该 3 层结构的支架比纤维随机排列的支架更有利于细胞增殖与基质重建;Wang 等^[16]根据原生瓣膜各层组分设计了聚合物原料各异的 3 层静电纺丝支架。该支架具备合适的力学性能,以及抗钙化和组织再生能力,有望用于原位组织工程瓣膜。尽管利用可降解聚合物制备的原位组织工程瓣膜会表现出力学性能、降解性能和细胞浸润性能可调的优势,但现有研究仍较少得到与原生瓣膜力学各向异性相匹配的瓣膜材料^[17]。本研究针对这一问题,利用可降解聚合物制备在层状结构和力学各向异性方面仿原生瓣膜特征的组织工程瓣膜,以期在植入后既能立即提供瓣膜功能,又能促进宿主细胞的黏附和组织的形成。

聚己内酯(PCL)是一种生物相容性和物理、力学性能较好的疏水性聚合物材料,在组织工程支架方面具有广泛的应用,已有研究将其用于制备组织工程瓣膜^[18-19]。明胶是胶原水解后获得的亲水性产物,具有良好的细胞亲和性,但容易降解,力学性能较差^[20]。PCL 和明胶结合可以弥补 2 种材料的不足^[21]。本研究采用静电纺丝技术,以不同质量配比的 PCL、明胶为原料,通过调整纺丝参数和各层纤维膜的纤维取向,获得仿原生瓣膜层状结构和力学各向异性的复合支架,对其表观形貌、力学性能、渗透性能和生物相容性等进行测试与分析,并对优选的复合支架进行脉动流测试,探究其用于 AHV 的可能性。

1 试验部分

1.1 试验主要原料及设备

六氟异丙醇(HFIP,纯度 99.5%),阿拉丁试剂(上海)有限公司;乙酸(冰醋酸,纯度 $\geq 99.8\%$),国药集团化学试剂有限公司;PCL, $M_n = 80\ 000$,Sigma-Aldrich 试剂有限公司;明胶(约 250 g Bloom),麦克林试剂有限公司;人脐静脉内皮细胞(HUVECs,货号 GNHu39),中国科学院上海细胞库;RPMI1640 培养基(货号 A1049101)、胎牛血清(FBS,货号 10091148)、青链霉素(PB,货号 25200056)、胰蛋白酶(货号 2445462),美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒(货号 40203ES60),上海翌圣生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)片剂,北京索莱宝科技有限公司;

抗凝兔血,广州鸿泉生物科技有限公司。

ME204E 型电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;X86-2S 型磁力搅拌器,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;DZF-6050 型真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;TL-Pro-BM 型静电纺丝机,深圳通力维纳科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 不同配比的 PCL/明胶纺丝液的配制

PCL/明胶复合支架的纺丝液及对照组 PCL 纺丝液的制备参数见表 1。先称取一定质量的 PCL 颗粒溶解于 HFIP 中,使用磁力搅拌器在室温下搅拌 6 h,配制质量体积比为 10% 的 PCL 纺丝液。再按照 PCL 和明胶 5:1、5:3、5:5 的质量配比向 PCL 纺丝液中加入明胶,使用磁力搅拌器在室温下搅拌 24 h 后,加入乙酸搅拌至溶质完全溶解,获得不同配比的 PCL/明胶纺丝液。将不添加明胶的 PCL 纺丝液作为对照组纺丝液。

表 1 PCL/明胶复合支架纺丝液及对照组纺丝液的制备参数
Tab. 1 Spinning solution preparation parameters of PCL/gelatin composite scaffolds and the control group

试样名称	$V_{\text{HFIP}}/\text{mL}$	$V_{\text{乙酸}}/\text{mL}$	m_{PCL}/g	$m_{\text{明胶}}/\text{g}$	$m_{\text{PCL}}:m_{\text{明胶}}$
PCL (对照组)	10	0	1.0	0	—
P5G1	10	0.02	1.0	0.2	5:1
P5G3	10	0.02	1.0	0.6	5:3
P5G5	10	0.02	1.0	1.0	5:5

1.2.2 PCL/明胶层状复合支架的制备

静电纺丝采用 21 号规格针头,纺丝电压为 $(14 \pm 2)\text{ kV}$,接收距离为 15 cm,注射泵推注速率为 1 mL/h。先设置接收滚筒的转速为 3 000 r/min,纺丝 2.25 h 后获得高取向度纤维层,再将转速减小为 500 r/min,纺丝 1.75 h 后获得随机排列纤维层,最后将转速重新增大至 3 000 r/min,纺丝 1.00 h 后获得另一高取向度纤维层。

同样,采用对照组纺丝液在上述纺丝条件下制备用于对照的 PCL 层状支架。

1.3 测试与表征

1.3.1 表观形貌与厚度

将纤维膜样品喷金处理后置于 SU8010 型场发射扫描电子显微镜(SEM,日本日立公司)下,分别

观察不同配比 PCL/明胶层状复合支架的取向层和随机层形貌。采用 Image J 软件测试纤维直径,每种纤维膜样品选取 100 根纤维。采用台式测厚仪测量湿态下复合支架的厚度,每种纤维膜样品选取 50 处不同位置测量。

1.3.2 红外与热重测试

将纤维膜样品进行真空干燥处理后,使用 Spectrum TWO 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司)测定 500~4 000 cm^{-1} 波数范围内纤维膜样品的特征化学基团;采用 CLARUS SQ8-STA8000 型热重分析仪/差示扫描量热仪/气质-同步热分析联用仪(美国 PerkinElmer 公司)测试样品的热稳定性,每种测试样品质量在 8~10 mg,并于 20 mL/min 氮气氛围下控制升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,测量样品在 50~600 $^{\circ}\text{C}$ 范围内的热分解情况。

1.3.3 接触角测试

使用 OCA15EC 型接触角测量仪(德国 DataPhysics 公司)测量样品的静态水接触角。将裁剪好的纤维膜样品固定在载玻片上,采用气泡法测试气泡稳定于复合纤维膜样品表面的接触角,并采用液滴法测试对照组 PCL 纤维膜样品。每种样品随机选取 5 处进行测量,结果取平均值。

1.3.4 拉伸力学性能测试

将平行于高取向纤维层纤维取向的方向标记为纵向(LD)、垂直于 LD 的方向标记为横向(TD)。将各组纤维膜样品分别沿 LD 和 TD 方向随机裁剪出 5 块 5 mm×20 mm 的试样,使用 CTM2050 型微机控制电子万能材料试验机(上海协强仪器制造有限公司)测试其拉伸力学性能。设置拉伸速度为 6 mm/min,标距为 10 mm。将试样拉伸至断裂后,根据测试数据计算其弹性模量和极限抗拉强度,结果取平均值。

1.3.5 渗透性能测试

使用实验室搭建的人造血管渗透仪测试样品在恒定水压 15.96 kPa(即 120 mmHg)下的水渗透性。将各组样品裁剪出 1.5 cm×1.5 cm 的正方形试样,测试 10 min 内通过该截面的水流体积,计算得到试样 10 min 内的平均水渗透性[$\text{mL}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$]。

1.3.6 溶血率

将抗凝兔血以 5 000 r/min 的高速离心 15 min 后除去上层血浆,用无菌 PBS 溶液反复洗涤后,再

经过多次高速离心,得到下层含红细胞的溶液。将下层溶液按 1:34 的体积比与 PBS 溶液混匀,得到红细胞溶液(HRBC)。将纤维膜样品裁剪成直径 15 mm 的圆形试样并置于不同的离心管内。取 1 mL HRBC 与 4 mL PBS 溶液混匀获得试验用混合溶液,并将其加入含不同试样的离心管中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中孵育 2 h。将含试样的离心管以 2 000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液,用 Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司)测量 540 nm 波长处的吸光度值。上述试验用混合溶液设为阴性对照组,阳性对照组为含 1 mL HRBC 与 4 mL 去离子水的混合溶液。溶血率的计算式:

$$H_R = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: H_R 为溶血率; D_t 为待测组试样的吸光度值; D_{nc} 为阴性对照组的吸光度值; D_{pc} 为阳性对照组的吸光度值。

1.3.7 细胞毒性

将样品裁剪成 24 孔板圆形大小(面积约 3 cm^2),每组各准备 3 个平行样。经充分洗涤灭菌后,将样品置于 24 孔板中,每孔加入 0.5 mL 完全培养基,浸泡 3 d,经 0.22 μm 微孔过滤器过滤后,每孔取 3 份 100 μL 浸提液转移到 96 孔板中,并与 100 μL 完全培养基混合,获得 200 μL 体积分数为 50% 的浸提液,空白对照组(TCP)为 200 μL 完全培养基。96 孔板内种有密度为 10 000 mL^{-1} 的人脐静脉内皮细胞,培养 1 d 后移除原培养基。试验组及 TCP 组分别补充等量浸提液和完全培养基,继续培养 1 d。最后利用 CCK-8 法,使用酶标仪测量 450 nm 波长处的吸光度,计算各组的细胞相对增殖率。

1.3.8 脉动流测试

根据文献[22]设计的瓣叶模具,将优选的复合支架裁剪成含 3 个瓣叶形状样品。使用 7-0 缝合线将样品固定在直径为 20 mm 的球囊扩张型瓣膜支架上,并在支架内外缝制裙边以减少瓣周反流。再采用达到国际标准 ISO 5840-2:2021 的模块化人工心脏瓣膜脉动流测试系统(上海心瓣测试设备有限公司)进行脉动流测试。系统测试条件如下:平均主动脉压 13.3 kPa(即 100 mmHg),心率 70 次/min,心输出量 5 L/min,收缩期占比 35%,工作液为

37 ℃、质量分数 0.9% 的生理盐水。使用高速成像相机捕获瓣膜在完整心动周期内的运动状态,记录瓣膜的有效开口面积(effective opening area, EOA)、平均跨瓣压差(mean pressure difference, MPD)和反流分数(regurgitant fraction, RF)等性能参数。

1.3.9 统计学分析

本文数据的表示方式为平均值±标准方差。采用单因素方差分析(ANOVA)比较各组样品的差异。若 $P < 0.050$, 则认为存在统计学上的差异,用 * 表示;若 $P < 0.010$, 则认为组内差异非常显著,用 ** 表示;若 $P < 0.001$, 则认为组内差异极其显著,用 *** 表示。

2 结果与讨论

2.1 表观形貌分析

图 1 为不同配比 PCL/明胶纤维膜取向层(A)和随机层(R)的 SEM 照片,及其对应的纤维直径分布图,图中 P5G1-A 表示 P5G1 复合支架的取向层,其他以此类推。由图 1 可知,当纺丝液中 PCL 质量体积比一定时,随着明胶质量的增大,一方面单位体积纺丝液中高分子含量增加,纺丝液黏度增加,因此当纺丝条件不变时,纤维直径逐渐增大,同时纺丝液也更易在喷嘴处堆积,牵伸成形不够充分,导致纤维黏结;另一方面,P5G5 纤维膜表面有少量皱纹,这通常是纺丝液挥发不完全所致。当接收装置的转速为 3 000 r/min 时,P5G1-A 的纤维平均直径为 $(0.46 \pm 0.01) \mu\text{m}$ 、P5G3-A 的纤维平均直径为 $(0.74 \pm 0.02) \mu\text{m}$ 、P5G5-A 的纤维平均直径为 $(1.74 \pm 0.05) \mu\text{m}$;当接收装置的转速为 500 r/min 时,P5G1-R 的纤维平均直径为 $(0.55 \pm 0.02) \mu\text{m}$ 、P5G3-R 的纤维平均直径为 $(0.70 \pm 0.01) \mu\text{m}$ 、P5G5-R 的纤维平均直径为 $(1.55 \pm 0.04) \mu\text{m}$ 。其中,P5G3 组取向层和随机层的纤维直径分布集中且差异较小。此外,转速越高,纤维排列的取向程度越高。

瓣叶厚度影响 AHV 的植入方式和血流动力学行为。较薄的瓣叶材料适用于微创介入手术,且有利于表现出良好的血流动力学性能^[23-24]。图 2 为湿态下不同配比 PCL/明胶复合支架厚度。纤维直径与明胶质量分数相关,故在相同的纺丝参数下,当纺丝液用量一定时,明胶质量分数增大,复合支架的

厚度也随之增大。图 2 显示 P5G1、P5G3 和 P5G5 复合支架的厚度分别约为 70.8、91.0 和 115.8 μm , 都满足 AHV 植入的厚度要求。

2.2 红外与热重测试结果分析

图 3 为不同配比 PCL/明胶复合支架、PCL 支架及明胶的傅里叶变换红外光谱(FTIR)图与热重(TG)曲线。由图 3a)可知,PCL/明胶复合支架在 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 527\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了明胶具备的酰胺吸收带 I 和酰胺吸收带 II 的特征峰,在 $2\ 941\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 170\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了 PCL 原料具备的 C—H、C—O—C 基团的伸缩振动峰,证明复合支架包含 PCL 与明胶 2 种原料。随着明胶质量分数的增加,样品在 $3\ 100 \sim 3\ 655\ \text{cm}^{-1}$ 处的 N—H 伸缩振动峰和氢键作用增强,而 $1\ 723\ \text{cm}^{-1}$ 处 C=O 的吸收峰强度有所减弱,说明 PCL 和明胶之间可能存在氢键作用。由图 3b)可知,PCL 支架降解的起始温度约为 360 ℃,在 370~450 ℃ 质量急剧下降,质量残留率为 10%;明胶的起始降解温度较低,自 55 ℃ 开始损失水分,温度升至 250 ℃ 左右时质量开始急剧下降,即发生蛋白质的热降解^[25];随着明胶质量分数的增加,复合支架在同一降解温度下的质量残留率减小,说明复合支架热稳定性下降。

2.3 接触角测试结果分析

生物材料表面的亲疏水性与细胞黏附、增殖及迁移有关^[26]。图 4 为不同配比 PCL/明胶复合支架与 PCL 支架的水接触角测试结果。与 PCL 支架相比,PCL/明胶复合支架的水接触角显著减小,这主要是因为明胶中含有大量羧基、羟基、氨基等极性基团,这些基团能与水分子形成氢键。PCL 支架的水接触角为 $(121.10 \pm 1.85)^\circ$, 表面疏水,而 P5G1、P5G3 和 P5G5 的水接触角分别为 $(58.70 \pm 3.47)^\circ$ 、 $(51.60 \pm 7.01)^\circ$ 和 $(46.83 \pm 2.85)^\circ$, 说明明胶和 PCL 的结合显著提高了复合支架的亲水性。

2.4 拉伸力学性能分析

AHV 材料需要合适的弹性模量和极限抗拉强度以保证其循环开合的有效性和稳定性。图 5 为不同配比 PCL/明胶复合支架在 LD 和 TD 两个相互垂直方向上的弹性模量和极限抗拉强度。由图 5 可知,随着明胶质量分数的增加,复合支架的弹性模量和极限抗拉强度逐渐减小,复合支架的柔软度提高。其中,P5G3 复合支架在 LD 和 TD 两个方向的弹性

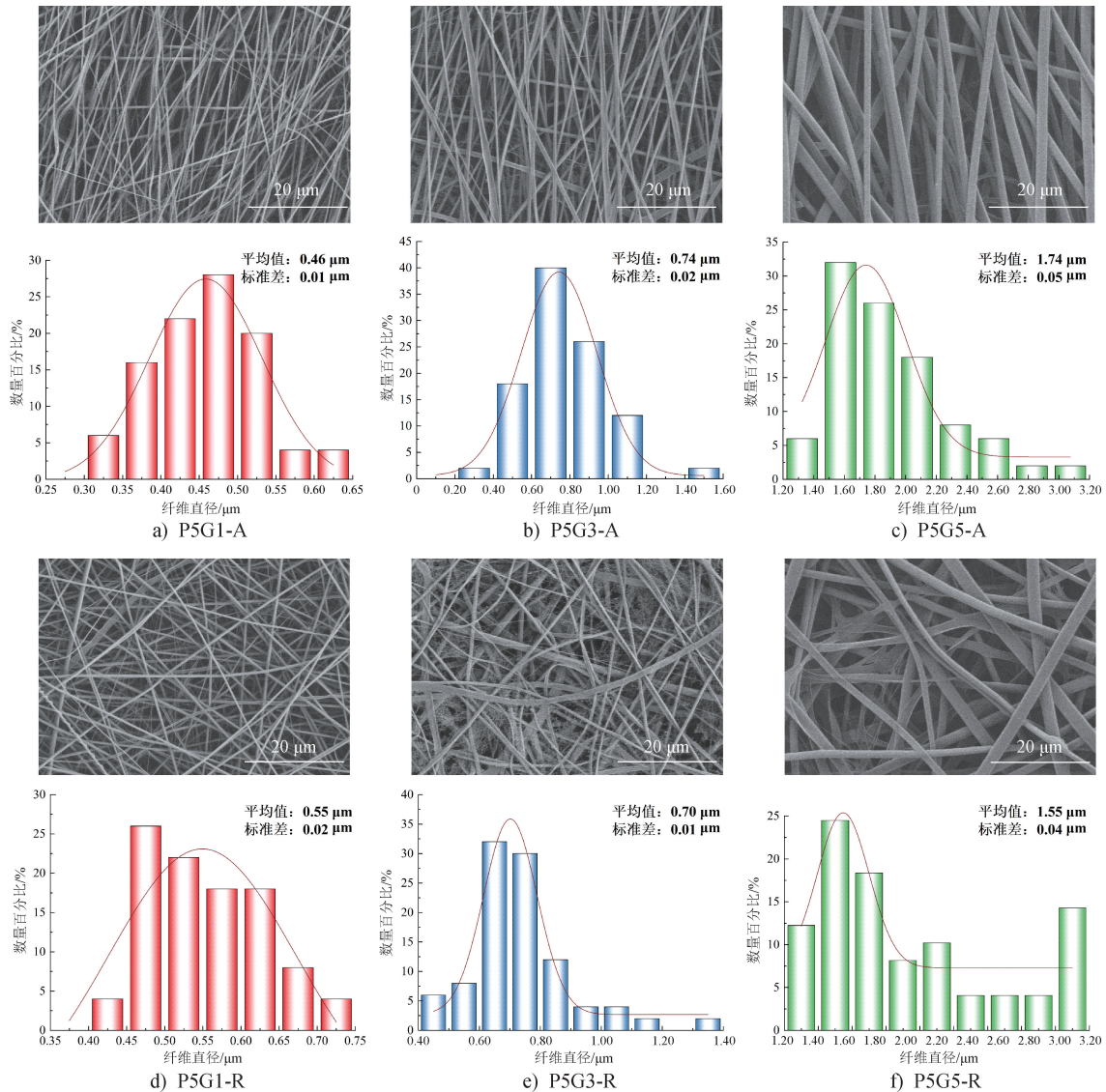


图1 不同配比PCL/明胶纤维膜取向层和随机层的SEM照片及其纤维直径分布图
Fig. 1 SEM images of alignment layer and random layer of different ratio PCL/gelatin fiber film and the corresponding fiber diameter distribution

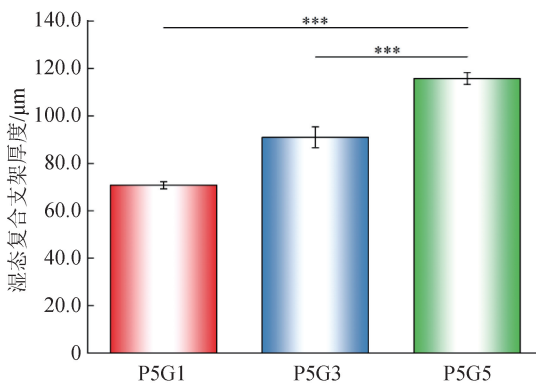


图2 湿态下不同配比PCL/明胶复合支架的厚度
Fig. 2 The thickness of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds in wet state

模量分别为 (26.98 ± 3.01) MPa 和 (3.39 ± 0.36) MPa, 各向异性比约为 7.96, 较其他复合支架更接近人体原生主动脉瓣叶周向和径向的弹性模量 (周向 15~16 MPa, 径向 1~2 MPa) 和各向异性比 (约 7.8)^[27-28]。P5G3 复合支架 LD 和 TD 两个方向的极限抗拉强度分别为 (12.47 ± 1.96) MPa 和 (4.32 ± 0.55) MPa, 符合原生瓣膜组织周向更坚硬、径向更易变形的力学各向异性特点, 这有利于 AHV 表现出良好的血流动力学行为。

2.5 渗透性能分析

AHV 瓣叶的渗透性越小, 则瓣叶在闭合状态下

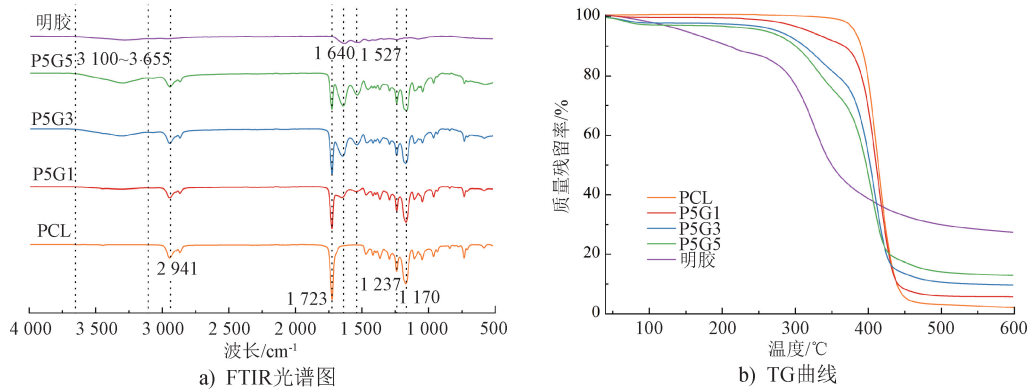


图 3 不同配比 PCL/明胶复合支架、PCL 支架及明胶的 FTIR 图和 TG 曲线

Fig. 3 FTIR spectra and TG curves of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds, PCL scaffold and gelatin

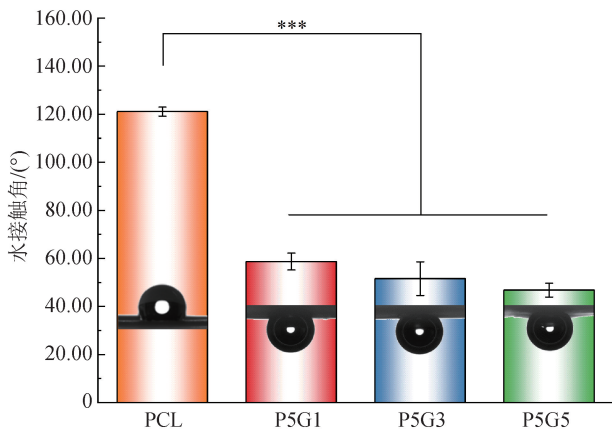


图 4 不同配比 PCL/明胶复合支架与 PCL 支架的水接触角

Fig. 4 Water contact angles of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds and the PCL scaffold

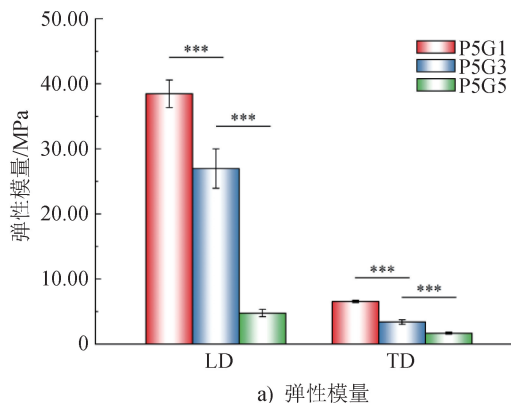


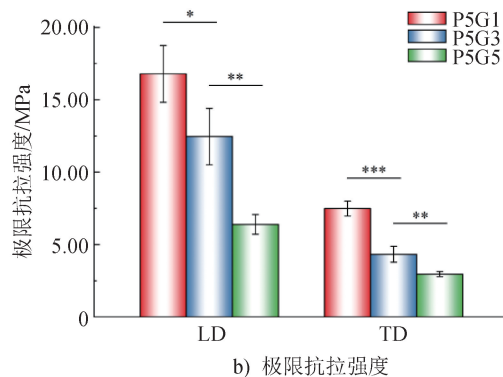
图 5 不同配比 PCL/明胶复合支架在两个相互垂直方向上的拉伸力学性能

Fig. 5 Tensile mechanical properties of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds in two mutually perpendicular directions

血液的渗透量越少,这有利于表现出较小的反流量。图 6 为不同配比 PCL/明胶复合支架在 15.96 kPa (即 120 mmHg) 静水压下 10 min 内的平均水渗透性。由图 6 可见,随着时间推移,各组复合支架的平均水渗透性逐渐下降并趋于稳定,这可能是由于纤维间发生了位置调整,导致水分可透过的孔隙减小。P5G1、P5G3 和 P5G5 在 10 min 时的平均水渗透性分别为 6.30、4.96 和 4.07 mL/(cm²·min),均低于人工血管对织物水渗透性 300 mL/(cm²·min) 的要求^[29]。P5G5 的平均水渗透性最小,可能是因为其在湿态下厚度较其他组的大,样品的亲水性好,故而阻碍了水分的渗透。

2.6 血液相容性分析

瓣叶是与血液直接接触的软组织。溶血率可以



表征生物材料对血液中红细胞的破坏程度,是评价材料血液相容性的指标之一。溶血率越低,则材料的血液相容性越好^[30-31]。图 7 为不同配比 PCL/明胶复合支架的溶血率。由图 7 可见,P5G1、P5G3

和 P5G5 的溶血率分别为 (0.59±0.06)%、(0.47±0.05)% 和 (0.38±0.08)%,均小于国际标准 ISO 10993.4 规定的 5%,表明所有复合支架都具有良好的血液相容性^[32]。

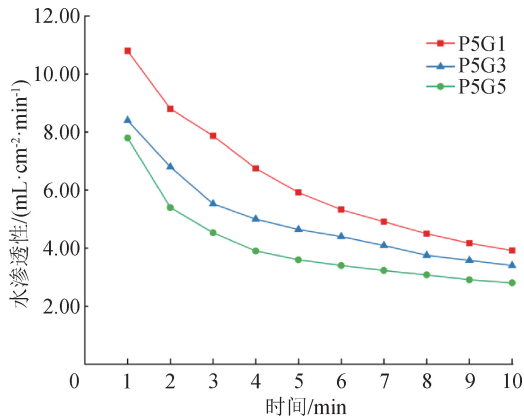


图6 不同配比 PCL/明胶复合支架的平均水渗透性
Fig. 6 Average water permeability of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds

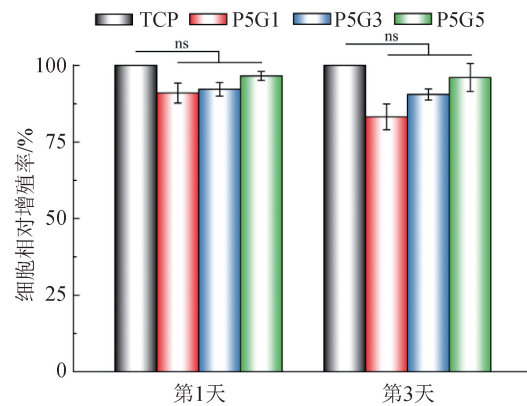


图8 不同配比 PCL/明胶复合支架第1天和第3天的细胞相对增殖率
Fig. 8 Cell relative proliferation rates of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds on the 1st day and the 3rd day

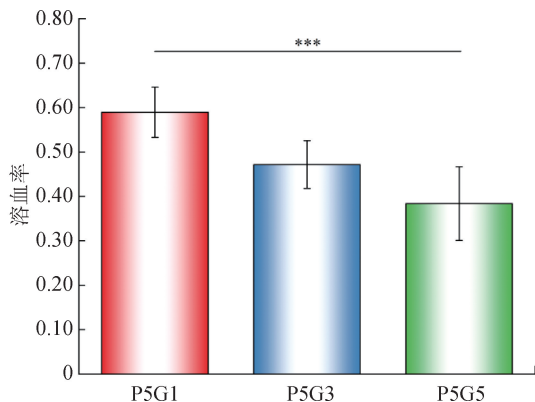


图7 不同配比 PCL/明胶复合支架的溶血率
Fig. 7 Hemolysis rates of different ratio PCL/gelatin composite scaffolds

2.7 细胞毒性分析

体外细胞毒性试验也是评价生物材料安全性的试验方法之一。图8为不同配比PCL/明胶复合支架第1天和第3天的CCK-8法细胞相对增殖率。由图8可知,P5G1、P5G3和P5G5复合支架在第1天和第3天的细胞相对增殖率均大于80%,且与TCP组无显著差异(no significance, ns)。GB/T 16886.5—2017《医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验》规定,细胞活性下降大于30%则认为有细胞毒性反应。据此可以认为,所有PCL/明胶复合支架均无细胞毒性。

2.8 脉动流测试

由于心脏瓣膜在血液环境中循环开合,因而为了确保AHV在植入后发挥功能,常将其放入模拟心脏脉动流体情况的装置中进行测试。图9显示的是P5G3复合人工心脏瓣膜实物照片及其在模拟心动周

期内的波形曲线和开合状态。由图9可知,在脉动压真实流体力学环境下,瓣叶在收缩期充分开合,随后3个瓣叶逐渐闭合进入舒张期,但闭合后瓣叶自由边出现部分折叠。脉动流测试结果中,瓣膜的EOA为 1.79 cm^2 ,大于标准中对该项的要求($\geq 1.05\text{ cm}^2$)。MPD为 1.67 kPa (即 12.52 mmHg),小于依据超声心动图评估主动脉瓣狭窄的标准($< 2.67\text{ kPa}$ 即 20.00 mmHg ,属轻度狭窄)。瓣叶具备原生主动脉瓣周向更坚硬、径向更易变形的力学各向异性特点,其在承受高周向应力的同时径向延伸,这有利于抵抗高水平舒张期的跨瓣压力,同时瓣叶厚度仅约 $100\text{ }\mu\text{m}$,因此表现出较大的EOA和较低的MPD。但RF为 24.22% ,略大于标准要求($\leq 20\%$),其中关闭反流分数和泄露反流分数分别为 12.01% 和 12.21% 。瓣膜在关闭状态下有反流出现,可能与瓣叶自由边形状设计导致其折叠,中心孔处有较多液体反流有关。后续可以通过调整优化瓣叶厚度和瓣叶形状加以改进。

3 结论与展望

根据原生瓣膜3层结构和各向异性的特点,利用静电纺丝技术制备了不同质量配比的PCL/明胶复合支架P5G1、P5G3、P5G5。该复合支架仿照原生瓣膜纤维层、海绵层、心室层厚度比例,层状结构由取向层、随机层、取向层纤维膜顺序堆叠而成。对复合支架的表现形貌、力学性能、渗透性能和生物相容性等进行测试。结果表明:当PCL质量体积比一

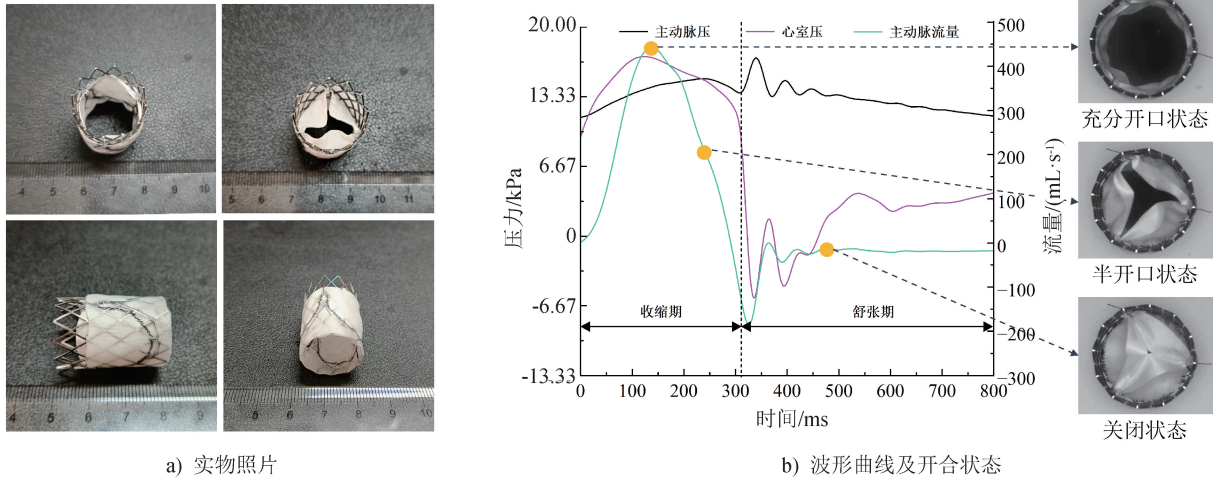


图 9 P5G3 复合人工心脏瓣膜实物照片及其在模拟心动周期内的波形曲线和开合状态

Fig. 9 Physical photographs, waveform curve and open-close state of P5G3 composite artificial heart valve in simulated cardiac cycle

定时,在相同的纺丝条件下,随着明胶加入质量的增加,纤维直径和复合支架厚度也随之增加,样品纤维直径范围为 $0.46 \sim 1.74 \mu\text{m}$ 、厚度范围为 $70.8 \sim 115.8 \mu\text{m}$,水接触角较纯 PCL 支架下降了 50%,均小于 60° ;复合支架的弹性模量和极限抗拉强度也随明胶质量分数的增加而减小,LD 方向弹性模量从 38.48 MPa 减小至 4.76 MPa 、极限抗拉强度从 16.79 MPa 减小至 6.40 MPa ,TD 方向弹性模量从 6.55 MPa 减小至 1.68 MPa 、极限抗拉强度从 7.49 MPa 减小至 2.95 MPa 。各组复合支架的水渗透性均低于 $300 \text{ mL}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$,符合人工血管的植入要求,溶血率均小于 5%,且无明显细胞毒性。综合分析测试结果认为,P5G3 复合支架的纤维直径更均匀一致,在两个相互垂直方向上的弹性模量分别为 $(26.98 \pm 3.01) \text{ MPa}$ 和 $(3.39 \pm 0.36) \text{ MPa}$,各向异性比约为 7.96,接近原生主动脉瓣的力学各向异性特点,脉动流测试结果显示其 EOA 为 1.79 cm^2 、MPD 为 1.67 kPa (即 12.52 mmHg)、RF 为 24.22%。若后续对瓣叶厚度和瓣叶形状加以优化,P5G3 复合支架有望用于原位 AHV。不过,AHV 作为体内接触的移植材料,还需要对其诱导再生性能和长期的安全性进行系统地探究。

参考文献

- [1] 郝凤阳,苏健,孙璐,等. 人工心脏瓣膜的发展[J]. 医疗装备, 2017, 30(13): 186-190.
- [2] MOL A, SMITS A I, BOUTEN C V, et al. Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges [J]. Expert Review of Medical Devices, 2009, 6(3): 259-275.
- [3] IBRAHIM D M, KAKAROUGKAS A, ALLAM N K. Recent advances on electrospun scaffolds as matrices for tissue-engineered heart valves [J]. Materials Today Chemistry, 2017, 5: 11-23.
- [4] 王世杰,刘鹏,温妹钰,等. 主动脉瓣疾病手术治疗现状与进展[J]. 临床心血管病杂志, 2023, 39(6): 417-424.
- [5] 雷洋,胡雪丰,张婕好,等. 组织工程方法在人工心脏瓣膜领域中的应用[J]. 生命科学, 2020, 32(3): 288-298.
- [6] KHERADVAR A, GROVES E M, DASI L P, et al. Emerging trends in heart valve engineering: part I, solutions for future[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2015, 43(4): 833-843.
- [7] BUTCHER J T, MAHLER G J, HOCKADAY L A. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, 63(4/5): 242-268.
- [8] MASOUMI N, ANNABI N, ASSMANN A, et al. Tri-layered elastomeric scaffolds for engineering heart valve leaflets[J]. Biomaterials, 2014, 35(27): 7774-7785.



期刊采编平台



中国知网下载

- [9] GUO F, LIU C, HAN R Z, et al. Bio-inspired anisotropic polymeric heart valves exhibiting valve-like mechanical and hemodynamic behavior [J]. *Science China Materials*, 2020, 63(4) : 629-643.
- [10] BAKER B M, CHEN C S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues [J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125 (13) : 3015-3024.
- [11] WANG H, LEINWAND L A, ANSETH K S. Cardiac valve cells and their microenvironment – insights from *in vitro* studies [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2014, 11(12) : 715-727.
- [12] WANG Y Y, NALEWAY S E, WANG B. Biological and bioinspired materials: structure leading to functional and mechanical performance [J]. *Bioactive Materials*, 2020, 5(4) : 745-757.
- [13] FIORETTA E S, MOTTA S E, LINTAS V, et al. Next-generation tissue-engineered heart valves with repair, remodelling and regeneration capacity [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2021, 18(2) : 92-116.
- [14] BHARDWAJ N, KUNDU S C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(3) : 325-347.
- [15] SNYDER Y, JANA S. Trilayer anisotropic structure versus randomly oriented structure in heart valve leaflet tissue engineering [J]. *Bio-Design and Manufacturing*, 2023, 6(4) : 423-438.
- [16] WANG X X, JIANG H H, ZHANG W J, et al. Biomimetic polymeric transcatheter heart valve leaflets with low calcification and good regenerative ability [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(25) : 5805-5816.
- [17] FIORETTA E S, DIJKMAN P E, EMMERT M Y, et al. The future of heart valve replacement: recent developments and translational challenges for heart valve tissue engineering [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, 12(1) : e323-e335.
- [18] 刘艳华, 朱舟, 万乾炳. 静电纺丝伤口修复载药体系: 组分的选择及构建策略 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(28) : 4465-4473.
- [19] JANA S, FRANCHI F, LERMAN A. Fibrous heart valve leaflet substrate with native-mimicked morphology [J]. *Applied Materials Today*, 2021, 24 : 101112.
- [20] 李曼, 武丁胜, 魏安方, 等. 静电纺丝聚己内酯/明胶载姜黄素生物活性敷料的制备和性能 [J]. *材料导报*, 2022, 36(11) : 229-235.
- [21] 吴奇霞, 马建中, 张雷, 等. 明胶基静电纺丝复合纤维材料的研究进展 [J]. *精细化工*, 2023, 40(10) : 2189-2199.
- [22] ZHANG H F, YE M, CHEN G, et al. 0.1 mm ePTFE versus autologous pericardium for hand-sewn trileaflet valved conduit: a comparative study [J]. *Journal of Artificial Organs*, 2019, 22(3) : 207-213.
- [23] 金昌, 吴泽斌, 靳永富, 等. 牛心包液氮冷冻减薄后性能研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2019, 36(5) : 827-833.
- [24] ZHOU J Y, LI Y J, LI T, et al. Analysis of the effect of thickness on the performance of polymeric heart valves [J]. *Journal of Functional Biomaterials*, 2023, 14(6) : 309.
- [25] TORRES F G, TRONCOSO O P, MONTES M R. The effect of temperature on the mechanical properties of a protein-based biopolymer network [J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2013, 111(3) : 1921-1925.
- [26] 胡星友, 赵新哲, 高晶, 等. 静电纺材料结构对细胞生长的影响 [J]. *产业用纺织品*, 2016, 34(5) : 1-5.
- [27] CHEN S P, ZHANG B W, HU J Y, et al. Bioinspired NiTi-reinforced polymeric heart valve exhibiting excellent hemodynamics and reduced stress [J]. *Composites Part B: Engineering*, 2023, 255 : 110615.
- [28] BALGUID A, RUBBENS M P, MOL A, et al. The role of collagen cross – links in biomechanical behavior of human aortic heart valve leaflets – relevance for tissue engineering [J]. *Tissue Engineering*, 2007, 13 (7) : 1501-1511.
- [29] 李慧慧, 陈诗萍, 魏岑, 等. 涤纶基人工心脏瓣膜的设计制备及其物理和力学性能初探 [J]. *生物医学工程学进展*, 2021, 42(2) : 78-82.
- [30] CHENG H, LI C J, JIANG Y J, et al. Facile preparation of polysaccharide-based sponges and their potential application in wound dressing [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(4) : 634-640.
- [31] ZHAO X, WU H, GUO B L, et al. Antibacterial antioxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing [J]. *Biomaterials*, 2017, 122 : 34-47.
- [32] LI C P, MU C D, LIN W, et al. Gelatin effects on the physicochemical and hemocompatible properties of gelatin/PAAm/laponite nanocomposite hydrogels [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7 (33) : 18732-18741.