

# 体外和体内内皮化在胶原包埋羟基磷灰石涂层的人工机械瓣膜的实验研究

程光存, 严中亚, 李春生, 严宇, 韦晓勇, 李建华, 汤丹丹, 程光明, 董桂福, 姜波, 蔡燕

**摘要** 目的 通过体外内皮化和体内内皮化, 探讨沉积胶原包埋羟基磷灰石(HA)涂层人工机械瓣膜的可行性及其在人工机械瓣膜支架体内的再细胞化能力。方法 制备犬血管内皮细胞(VEC)悬液, 接种在胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜材料上, 置培养箱内分组培养如下: ① 37℃ 孵箱中静态培养2周; ② 动态旋转培养装置中培养2周, 比较两组VEC分泌一氧化氮(NO)、前列环素(PGI<sub>2</sub>)水平; 再分别将人工机械瓣膜植入犬右心房, 术后6周, 取出部分材料, 扫描电子显微镜(SEM)下观察VEC在HA材料上的附着情况, 了解HA支架材料在体内的再细胞化能力。结果 与静态系统相比, 人工机械瓣膜在动态旋转系统构建胶原包埋HA涂层VEC分泌NO、PGI<sub>2</sub>水平显著升高( $P < 0.05$ ); 在犬右心房人工机械瓣膜取出材料中, 动态旋转系统构建胶原包埋HA涂层VEC层均匀分布, 并有心脏内皮细胞附着, 而静态培养系统中VEC层分布不均匀, 胶原包埋HA涂层有心脏血管内皮细胞附着, 而单纯人工机械瓣膜表面出现较多的血栓形成。结论 动态旋转系统中构建的组织工程化瓣膜模型中, VEC可能成为组织工程化机械瓣膜材料; 胶原包埋的HA涂层人工机械瓣膜有利于VEC的黏附和生长。

**关键词** 羟基磷灰石薄膜; 犬血管内皮细胞; 细胞培养; 组织工程

中图分类号 R 318.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1556-04

目前, 临床上广泛应用热解碳制成的人工心脏机械瓣膜, 具有经久耐用的优点, 但易出现表面凝血, 患者往往需要终生抗凝治疗<sup>[1]</sup>。脉冲激光沉积(pulsed laser deposition, PLD)技术广泛地应用于制备各种功能薄膜、梯度膜等, 近年来, 为提高人工移植植物表面的生物相容性, 采用各种类型金刚石薄膜材料在临床上应用<sup>[2]</sup>。该研究采用PLD技术制备类

金刚石膜, 通过体外培养犬血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)种植在胶原复合羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)的人工机械瓣膜上, 观察它们的生物相容性, 并将此种涂有胶原复合HA薄膜的人工机械瓣膜植入犬右心房内, 模拟体内实际情况, 6周后, 观察机械瓣膜上的HA涂层组织吸收代谢和再生情况。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 30只健康8月龄成年雄性beagle犬, 12~16 kg, 购自安徽省实验动物中心。在安徽省实验动物中心清洁级环境中饲养, 动物处置符合安徽省动物实验伦理学要求。胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜材料是由合肥大学和中科院安徽光学精密机械研究所联合研究的新型合成的瓣膜材料, 应用PLD技术在人工心脏机械瓣膜上沉积胶原包埋HA涂层, 环氧乙烷消毒, 将材料制备成5 mm × 5 mm × 1 mm和10 mm × 5 mm × 1 mm大小结构<sup>[3]</sup>。细胞培养用RPMI-1640培养基、DMEM培养基、新生胎牛血清(美国Gibco公司); II型胶原酶、苯酚、0.25%胰蛋白酶、M199培养液(美国Sigma公司); 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(美国Santa Cruz公司); 一氧化氮(nitric oxide, NO)放射免疫试剂盒、前列环素(prostacyclin, PGI<sub>2</sub>)购自南京建成生物科技有限公司; 实验用灭菌生理盐水自制; 余试剂为分析纯等。

**1.2 试验主要仪器** CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司); BHC-1300型生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司); 荧光倒置相差显微镜(日本Olympus公司); 高速低温冷冻离心机(德国Heraeus公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 体外内皮化进行犬VEC的分离培养** 对实验犬编号, 用3%戊巴比妥30 mg/kg缓慢血管内麻醉后, 侧卧位固定于手术台上, 前肢悬吊, 取前肢隐静脉长约10 cm, M199培养液冲洗血管3次, 至无血液残留; 1 g/L II型胶原酶注入隐静脉使其充盈,

2015-06-18 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH143)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院胸心外科, 安徽省心血管病研究所, 合肥 230001

作者简介: 程光存, 男, 副主任医师;

严中亚, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: yan20047@163.com

结扎两端,放入培养皿中,37℃恒温水浴30 min,轻揉血管,收集消化液, M199 培养液反复冲洗静脉腔,收集灌洗液于离心管中,离心后弃上清液,加入 1.5 ml M199 完全培养液(内含体积分数 25 μg/L VEGF 和 15% 胎牛血清),重悬沉淀细胞,置细胞培养瓶中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。5~7 d 后可传代,实验取 2~4 代处于对数生长期的细胞。

**1.3.2 体内内皮化进行细胞种植** 处于对数生长期 2~4 代的犬 VEC 2.5 g/L 胰酶消化后,浓度为 4 × 10<sup>6</sup>/L 的 VEC 细胞悬液。将胶原包埋 HA 涂层人工机械瓣膜在无菌条件下置入 96 孔板中,接种 25 μl VEC 细胞悬液(细胞数 1 × 10<sup>6</sup> 个),37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内静置 2~3 h,吸弃未贴壁细胞。加入 1 ml 含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液,置培养箱,每天换液 1 次。实验分组如下:① 胶原包埋 HA 涂层人工机械瓣膜 37℃ 孵箱中静态培养 2 周;② 胶原包埋 HA 涂层人工机械瓣膜动态旋转培养装置(通过微型马达驱动,使旋转部件上的管形支架绕中轴作缓慢旋转,转速 60°/min) 中培养 2 周。

**1.3.3 放射免疫法检测两组 NO、PGI<sub>2</sub> 浓度** 分别于培养 3、5、7、11 d 收集两组(静态和动态旋转系统) VEC 细胞的培养上清液,按试剂盒说明书,采用放射免疫法检测上清液中 NO、6-酮-PGF<sub>1α</sub>(作 PGI<sub>2</sub> 的含量)含量。

**1.3.4 扫描电镜观察** 分别上述两组培养有 VEC 细胞的人工机械瓣膜植入犬右心房,每组犬 15 只,术后 6 周,取出部分材料,磷酸盐缓冲液清洗瓣膜表面可能的污物,2.5% 戊二醛固定,梯度(50%、70%、80%、90%、100%)乙醇溶液脱水,临界点干燥、喷金,Philips 525M 型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM) 下观察 VEC 在 HA 材料上的附着情况,了解体内的 VEC 在 HA 材料上的附着、形态和界面情况。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS 17.0 软件进行分析,其中计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用重复测量设计的方差分析,组间资料分析采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 犬 VEC 的观察** 传代的 VEC 与鼠抗人 FVIII Ag 多克隆抗体标记阳性,倒置荧光显微镜下,细胞呈梭形,生长状况良好,核卵圆形,位于细胞中央,可判定细胞为 VEC。倒置显微镜下,可见犬 VEC 在胶

原包埋 HA 涂层人工机械瓣材料上呈圆形,单个或成小团存在,核圆形或卵圆形,见图 1。

**2.2 NO、PGI<sub>2</sub> 测定** 采用放射免疫法检测在静态和动态旋转系统中,胶原包埋 HA 涂层的人工机械瓣膜犬 VEC 分泌 NO 和 PGI<sub>2</sub> 含量。先采用重复测量设计的方差分析,动态旋转系统与静态培养条件 NO、PGI<sub>2</sub> 相比,检验统计量 *F* 值分别为 6.87、7.12。与静态培养条件相比,动态旋转系统 NO、PGI<sub>2</sub> 升高明显,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。表明动态旋转系统与体内环境更为接近,具有与正常 VEC 类似的“生理功能”。见表 1。

表 1 犬 VEC 在静态和动态旋转系统中产生 NO、PGI<sub>2</sub> (*n* = 15)

项目	静态组	动态组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
NO(μmmol/L)				
2 d	80.9 ± 6.2	109.9 ± 6.1	4.23	<0.05
5 d	81.3 ± 6.4	114.6 ± 6.5	4.52	<0.05
8 d	82.9 ± 5.9	117.4 ± 5.5	4.86	<0.05
11 d	84.2 ± 4.9	121.2 ± 4.9	5.37	<0.05
PGI <sub>2</sub> (μg/L)				
2 d	16.4 ± 0.7	19.5 ± 0.7	3.98	<0.05
5 d	25.0 ± 0.6	29.0 ± 0.7	4.01	<0.05
8 d	21.7 ± 0.7	26.2 ± 0.6	4.25	<0.05
11 d	17.4 ± 1.5	21.8 ± 1.0	4.16	<0.05

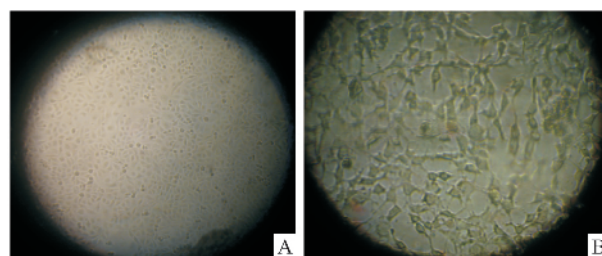


图 1 培养犬 VEC 在胶原包埋 HA 涂层人工机械瓣材料上的生长情况

A: ×100; B: ×400

**2.3 形态学观察** 6 周后,取出犬右心房,可见在特制动态旋转培养装置下,胶原包埋 HA 涂层人工机械瓣膜形成完整 VEC 层,内皮细胞均匀分布(图 2A);在静态培养系统中,形成内皮细胞层结构不完整,HA 材料上细胞分布不均匀(图 2B);单纯人工机械瓣薄膜表面有血栓形成现象(图 2C)。

## 3 讨论

由于风湿性心脏病或感染性心内膜炎等病变累及心脏瓣膜,常常引起患者的二尖瓣、主动脉瓣狭窄

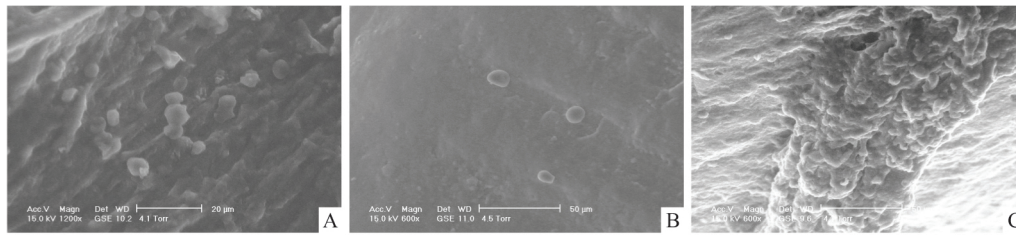


图2 VEC层胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜生长情况

A: 动态旋转培养装置形成完整VEC层胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜  $\times 1\ 200$ ; B: 静态培养系统中形成不完整VEC层的胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜  $\times 600$ ; C: 单纯人工机械瓣膜表面大量的血栓  $\times 600$

或关闭不全 患者往往需要采用人工合成材料制成的机械瓣来替换病变心脏瓣膜即心脏瓣膜置换术。在心脏瓣膜置换术中,当血液与机械瓣膜接触时常激活血小板,导致血栓形成,患者换瓣术后往往需要终生服用抗凝药,以防血栓形成<sup>[4]</sup>;且抗凝不当易造成出血或栓塞,患者生活质量严重受损<sup>[5]</sup>。因此,临床上获取理想的人工机械瓣膜,解除心脏瓣膜置换术后终生服用抗凝药物的痛苦非常关键。

本研究在合肥工业大学和中科院协助下,利用PLD技术,将胶原包埋HA涂层沉积在人工心脏机械瓣膜上,通过体外内皮化和体内内皮化研究胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜与VEC相容性,构建组织工程化机械瓣膜材料,以期获得理想的胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜,解除人工机械瓣膜置换患者术后需终生服用抗凝药物的痛苦。胶原包埋HA涂层为一种新型的仿生复合材料,先制备纳米径粒HA,然后制备胶原,应用PLD技术将其沉积在人工心脏机械瓣膜上,该材料主要成分是羟基磷灰石和胶原纤维,同人体骨组织结构与成分相似<sup>[6]</sup>,其多孔隙间相通的特殊结构为VEC生长提供良好的基质,为细胞和支架材料之间提供最大面积的贴附,有利于VEC成长,且生物相容性好,无排斥反应,为瓣膜外科手术提供了一种优质的全新植入材料。

本研究先进行体外内皮化,即通过体外培养VEC,种植在胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜上,观察机械瓣膜上的HA涂层被组织吸收和瓣膜层的再生情况。研究表明,该种处理的心脏瓣膜具有无免疫原性、无需抗凝、可以生长和耐久性好等优点,是一种新型的较为理想的组织工程心脏瓣膜,可能为进一步应用于临床的组织工程心脏瓣膜奠定基础<sup>[7-8]</sup>。同时,本研究又进行了体内内皮化研究,将胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜植入实验犬的右心房中,模拟心脏内部的微环境,6周后显示,心脏

VEC附着在HA薄膜表面,表明该项研究可能的光明前景。传统静态培养VEC方法再移植入机体可能存在一定的缺陷,而动态培养体系模拟微重力环境,培养物处于悬浮状态<sup>[9-10]</sup>。本实验采用自制的动态旋转培养装置,VEC始终受到变动切应力作用,实验表明其促进了VEC在胶原包埋HA人工机械瓣膜上的黏附,形成均匀的组织。VEC可分泌多种血管活性物质,在动态旋转系统中VEC分泌NO、 $PGI_2$ 明显高于静态条件,NO、 $PGI_2$ 可调节血管的通透性,以及凝血-纤溶平衡系统,可抑制血小板聚集,拮抗血栓烷A<sub>2</sub>生成<sup>[11]</sup>,故动态旋转系统表现较静态系统抗凝作用增强,抑制血栓形成。故在动态旋转系统中接种于胶原包埋HA涂层人工机械瓣膜表面VEC,不仅贴附生长强,参与机体的代谢,形成具有“生理功能”的组织工程化瓣膜,是保持组织工程化血管流畅和防止血栓形成的重要因素。本研究将材料科学和生命科学结合起来,可能具有一定的社会意义和经济价值,值得进一步深入研究。

(致谢:感谢合肥工业大学理学院罗乐教授,中科院安徽光学精密机械研究所方晓东、陶汝华研究员在实验中的指导和材料合成)

#### 参考文献

- [1] 杨平,张莉,刘达兴,等.华法林抗凝治疗老年心脏机械瓣膜置换术的疗效[J].中国老年学杂志,2014,34(13):3568-9.
- [2] Jung U W, Lee J S, Park W Y, et al. Periodontal regenerative effect of a bovine hydroxyapatite/ collagen block in one-wall intrabony defects in dogs: a histometric analysis[J]. J Periodontal Implant S, 2011, 41(6): 285-92.
- [3] 罗乐,储雅琼,秦娟娟,等.用脉冲激光沉积法在Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>上沉积类金刚石薄膜[J].红外与激光工程,2011,40(6):1106-10.
- [4] 张小飞,肖亦敏,程云阁,等.心脏机械瓣膜置换术后华法林低

- 强度抗凝治疗的临床分析[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2014, 21(2): 270-1.
- [5] Kaushick B T, Jayakumar N D, Padmalatha O, et al. Treatment of human periodontal infrabony defects with hydroxyapatite +  $\beta$  tricalcium phosphate bone graft alone and in combination with platelet rich plasma: a randomized clinical trial[J]. *Indian J Dent Res*, 2011, 22(4): 505-10.
- [6] Park S J, Jang J M. Electrodeposition of hydroxyapatite nanoparticles onto ultra-fine TiO<sub>2</sub> nanotube layer by electrochemical reaction in mixed electrolyte [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11(8): 7167-71.
- [7] Ahmed R, Faisal N H, Paradowska A M, et al. Neutron diffraction residual strain measurements in nanostructured hydroxyapatite coatings for orthopaedic implants [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011, 4(8): 2043-54.
- [8] 程光存, 严中亚, 罗乐, 等. 羟基磷灰石膜复合材料与人血管内皮细胞的相容性[J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(6): 626-9.
- [9] Zhang X, Hu J, Li Y, et al. Effects of ibandronate-hydroxyapatite on resorptive activity of osteoclasts [J]. *Arch Med Sci*, 2011, 7(1): 53-60.
- [10] Shigeishi H, Takechi M, Nishimura M, et al. Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure [J]. *Dent Mater J*, 2012, 31(1): 54-60.
- [11] Friddle R W, Battle K, Trubetskoy V, et al. Single-molecule determination of the face-specific adsorption of Amelogenin's C-terminus on hydroxyapatite [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(33): 7541-5.

## Experimental study of *in vitro* or *in vivo* endothelialization in collagen embedding hydroxyapatite film coated artificial mechanical valve

Cheng Guangcun, Yan Zhongya, Li Chunsheng, et al

(Dept of Cardiac Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001)

**Abstract Objective** Through endothelialization *in vitro* and *in vivo*, to explore the feasibility of the collagen deposit to embed hydroxyapatite (HA) coating of artificial mechanical valve and the ability of recellularization in artificial mechanical valve scaffolds. **Methods** To prepare canine vascular endothelial cells (VECs) suspension, seed in collagen embedding HA coating artificial mechanical valve material. The VECs were cultured in grouping as follows: ① 37 °C static training in the incubator ② dynamic rotation cultivation device. After two weeks, to compare the secretion levels of nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) in VECs of the two groups. And then, the artificial mechanical valves were implanted in right atrium of dogs respectively. After six weeks of surgery, some materials were taken out from dogs right atrium to scan by electron microscope and observe the adhesion situation of VECs on HA material and explore the recellularization ability of HA scaffold material *in vivo*. **Results** Compared with the static culture system, the secretion levels of NO and PGI<sub>2</sub> of building collagen embedding HA coating VEC of artificial mechanical valve in dynamic rotation system were significantly elevated ( $P < 0.05$ ). In the materials taken from dog right atrial mechanical valve, collagen embedding HA coating VEC layer was distributed evenly and had cardiac endothelial cells adhesion in the dynamic rotation culture system. The distribution of VECs layer was uneven in static culture system. There was collagen embedding HA coating with heart endothelial cells adhesion too. There were some thrombosis on pure artificial mechanical valve film surface. **Conclusion** To construct tissue-engineered heart valves model in dynamic rotation culture system, VECs might become a tissue-engineered mechanical valve materials. HA coating of artificial mechanical valve embedded by collagen is advantageous to the adhesion and growth of VECs.

**Key words** hydroxyapatite film; vascular endothelial cells of dog; cell culture; tissue engineering