

一种非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料的生物相容性研究



温晓晓¹, 张坤¹, 潘孔荣¹, 汪文涛¹, 潘文志²

1. 沛嘉医疗科技(苏州)有限公司(江苏苏州 215000)

2. 复旦大学附属中山医院 心内科 中国医学科学院心血管技术与器械创新单元(上海 200032)

【摘要】 目的 研究一种基于非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料的生物相容性,为其临床应用提供安全性数据。方法 所有实验均参照 GB/T16886 系列标准:采用噻唑蓝法进行体外细胞毒性实验;取 15 只豚鼠,分为实验组($n=10$)和对照组($n=5$),进行皮肤致敏实验;取 3 只新西兰大白兔,每只动物左右两侧背部各取 5 个点作为实验部位和对照部位,进行皮内反应实验;取 20 只 ICR 小鼠,随机分为 4 组:实验组(极性介质)、对照组(极性介质)、实验组(非极性介质)、对照组(非极性介质),每组 5 只,开展急性全身毒性实验;取 40 只 SD 大鼠,分为实验组($n=20$)和对照组($n=20$),开展亚慢性全身毒性实验。结果 非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料 100% 样品浸提液的细胞活力为 75.2%,皮肤致敏阳性率为 0.0%,皮内反应最终计分为 0 分,急性全身毒性实验中实验组与对照组动物体重差异无统计学意义($P>0.05$),亚慢性全身毒性实验中实验组与对照组体重、主要器官重量、血常规和血生化数据差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料具有良好的生物相容性,符合国家相关标准,有可能应用于临床瓣膜置换中。

【关键词】 生物瓣膜;牛心包;碳二亚胺;生物相容性;毒性反应

Biocompatibility of bioprosthetic heart valve materials with a non-glutaraldehyde-based chemical treatment

WEN Xiaoxiao¹, ZHANG Kun¹, PAN Kongrong¹, WANG Wentao¹, PAN Wenzhi²

1. Peijia Medical Limited, Suzhou, 215000, Jiangsu, P. R. China

2. Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Research Unit of Cardiovascular Techniques and Devices, Chinese Academy of Medical Sciences, Shanghai, 200032, P. R. China

Corresponding authors: WEN Xiaoxiao, Email: wenxiaoxiao@peijiamedical.com; PAN Wenzhi, Email: peden@sina.com

【Abstract】 Objective To study the biocompatibility of bioprosthetic heart valve material with a non-glutaraldehyde-based treatment, and to provide the safety data for the clinical application. **Methods** All the tests were conducted according to GB/T16886 standards. The *in vitro* cytotoxicity was determined by methyl thiazolyl tetrazolium assay. Fifteen guinea pigs were divided into a test group ($n=10$) and a control group ($n=5$) in the skin sensitization test. Three New Zealand white rabbits were used in the intradermal reactivity test. Five sites on both sides of the rabbit back were set as test sites and control sites, respectively. In the acute systemic toxicity test, a total of 20 ICR mice were randomly assigned to 4 groups: a test group (polar medium), a control group (polar medium), a test group (non-polar medium) and a control group (non-polar medium), 5 in each group. Forty SD rats were divided into a test group ($n=20$) and a control group ($n=20$) in the subchronic systemic toxicity test. **Results** The viability of the 100% extracts of the bioprosthetic heart valve material with a non-glutaraldehyde-based treatment was 75.2%. The rate of positive reaction was 0.0%. The total intradermal reactivity test score was 0. There was no statistical difference in the body weight between the test group and control group in the acute systemic toxicity test. There was no statistical difference in the body weight, organ weight, organ weight/body weight ratio, blood routine test or blood biochemistry between the test group and control group in the subchronic systemic toxicity test. **Conclusion** The bioprosthetic heart valve material with a non-glutaraldehyde-based treatment has satisfying biocompatibility, which conforms to relevant national standards. The material might be a

promising material for application in valve replacement.

【Key words】 Bioprosthetic heart valve; bovine pericardium; carbodiimide; biocompatibility; toxic reaction

心脏瓣膜疾病是一种具有高发病率的心血管疾病。据统计,我国心脏瓣膜疾病的加权患病率为3.8%,约有2500万患者^[1]。由于心脏瓣膜的特殊位置,目前尚无有效的治疗药物,往往需要进行心脏瓣膜置换。用于置换手术的人工瓣膜假体分为机械瓣膜和生物瓣膜,与机械瓣膜相比,生物瓣膜具有更好的血流动力学性能,且不需终身抗凝,患者具有更好的生活质量^[2-3]。目前商品化的生物瓣膜往往是采用戊二醛处理的异种生物组织,戊二醛作为一种高效水溶性二元醛,能够与蛋白质的胺基反应形成交联,提高生物组织材料的强度和抗酶解性,同时还具有降低材料免疫原性、病毒灭活、灭菌及作为液体环境长期保存生物瓣叶材料的作用^[4-8]。然而戊二醛交联后产生的残留醛基具有细胞毒性并且会加速钙化进程,最终可能导致生物瓣膜衰败^[9]。因此,开发全新的非戊二醛化学处理体系,制备具有更好生物相容性的生物瓣膜,成为当前研究热点之一。目前已有采用碳二亚胺(carbodiimide, EDC)^[10-12]、京尼平^[13-14]、环氧化物^[15-16]等各种非戊二醛交联剂处理生物组织的相关研究,但是仅替换新的交联剂并不能在整个处理体系中完全替代戊二醛的作用并达到最优的处理效果。我们在EDC交联的基础上,开发了一整套非戊二醛处理技术,采用经过优化的EDC复合交联处理,在保证最好交联效果的同时让材料保持较好的柔韧性;采用除原体细胞处理技术,进一步降低材料免疫原性,提高抗钙化性能;同时还采用超临界流体病毒灭活、抗氧化及超低温真空干燥、气体灭菌等一系列新处理技术,在完全替代戊二醛作用的同时,实现了瓣膜材料的干燥保存,从而获得具有更好生物相容性、抗钙化性能和耐久性的瓣膜材料。

尽管已有许多研究证明单纯EDC交联的生物材料具有良好的生物相容性,但目前尚未有基于一整套全新的非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料的生物相容性研究。本文从体外细胞毒性、皮肤致敏、皮内反应、急性毒性和亚慢性全身毒性几方面对制备的生物瓣膜材料进行了初步的生物相容性评估,为其在临床瓣膜置换中的应用提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 实验样品

基于非戊二醛化学体系处理的牛心包生物瓣

膜材料由沛嘉医疗科技(苏州)有限公司提供。新鲜牛心包剥离脂肪组织后,清洗数次,固定于定制模具中,经复合交联、除原体细胞、超临界流体病毒灭活、抗氧化及超低温真空干燥、气体灭菌处理后备用。

1.2 实验动物

哈特兰豚鼠,300.0~500.0 g,来源于上海甲干生物科技有限公司,许可证号SCXK(沪)2020-0006;新西兰大白兔,不低于2.0 kg,来源于苏州高新区镇湖实验动物科技有限公司,许可证号SCXK(苏)2020-0007;ICR小鼠,18.0~19.5 g,SD大鼠,181.0~207.6 g,均来源于上海杰思捷实验动物有限公司,许可证号SCXK(沪)2018-0004。

1.3 实验试剂

主要实验试剂包括:噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma公司),胎牛血清(Corning公司),MEM培养基(HyClone公司),异丙醇(国药集团化学试剂有限公司),弗氏完全佐剂(Sigma公司),十二烷基硫酸钠(罗恩试剂),0.9%氯化钠注射液(广西裕源药业有限公司),棉籽油(北京百灵威科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 体外细胞毒性实验 无菌条件下,取生物瓣膜样品,以含10%胎牛血清的MEM培养液为浸提介质,37℃下浸提72 h,按照6 cm²/mL的浸提比例制备浸提液。阴性对照为高密度聚乙烯,阳性对照为二乙基二硫代氨基甲酸锌。将1×10⁵/mL的L929细胞悬液接种至96孔板,培养24 h后吸去原来培养液,分别加入100 μL 100%、75%、50%、25%的样品浸提液,以及空白对照、阳性对照和阴性对照液,培养24 h后,吸去培养液,每孔加入50 μL MTT(1 mg/mL),孵育2 h后弃去上清,加入100 μL 异丙醇溶解结晶,在酶标仪上以570 nm为主吸收波长,650 nm为参考波长测定吸光度(optical density, OD)。按照下式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{650})_{\text{样品组}}}{(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{650})_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$$

1.4.2 皮肤致敏实验 无菌条件下,取生物瓣膜样品,以生理盐水为浸提介质,37℃下浸提72 h,按照6 cm²/mL的浸提比例制备浸提液。阴性对照为生理盐水。取15只豚鼠,随机分为2组:实验组10只,对照组5只。在皮内诱导阶段,在每只动物

肩胛骨内侧部位成对皮内注射 0.1 mL 受试液。注射液分别为：溶液 1（弗氏完全佐剂与生理盐水以 50 : 50 体积比例混合的稳定性乳化剂）、溶液 2（实验组为样品浸提液，对照组为生理盐水）、溶液 3（溶液 1 与溶液 2 以 50 : 50 体积比例混合）。注射 6 d 后，在实验区皮肤按摩导入 10% 的十二烷基硫酸钠，24 h 后，将浸透了 0.5 mL 受试液的 8 cm² 大小的纱布贴敷于诱导注射部位 48 h。14 d 后，将 0.5 mL 受试液浸透后的 2.5 cm×2.5 cm 的纱布贴敷于诱导阶段未实验部位 24 h。贴敷结束后 24 h 和 48 h 观察实验部位，根据 Magnusson 和 Kligman 分级标准对皮肤红斑和水肿反应进行描述并分级；见表 1。如果对照组动物等级 < 1，而实验组等级 ≥ 1 则提示致敏。

1.4.3 皮内反应实验 无菌条件下，取生物瓣膜样品，以生理盐水为浸提介质，37℃ 下浸提 72 h，按照 6 cm²/mL 的浸提比例制备浸提液。取 3 只新西兰大白兔，在兔背一侧 5 个点作为实验部位，注射 0.2 mL 样品浸提液作为实验部位；兔背另一侧 5 个点作为对照部位，注射 0.2 mL 生理盐水。观察即时、24 h、48 h 和 72 h 注射局部及周围组织反应，根据标准 GB/T 16886.10-2017 中皮肤反应记分系统对红斑、焦痂和水肿反应进行记分；见表 2。将每只动物在每一规定时间的记分相加后再除以 15 即为每只动物的记分，3 只实验动物记分的平均数即为平均记分。实验样品的平均记分减去对照样品的平均记分即为实验样品的最终记分。

1.4.4 急性全身毒性实验 无菌条件下，取生物瓣膜样品，分别以生理盐水和植物油为浸提介质，37℃ 下浸提 72 h，按照 6 cm²/mL 的浸提比例制备浸提液，并分别以生理盐水和植物油作为阴性对照。取 20 只 ICR 小鼠，随机分为 4 组，每组 5 只：实验组（极性介质），尾静脉注射生理盐水浸提液；对照组（极性介质），尾静脉注射生理盐水；实验组（非极性介质），腹腔注射植物油浸提液；对照组（非极性介质），腹腔注射植物油。观察即时、4 h、24 h、48 h 和 72 h 注射局部及周围组织反应，在 24 h、48 h 和 72 h 对动物称重，并根据标准 GB/T 16886.11-2011 中常见临床症状与观察项目对动物的毒性表现进行记录。

1.4.5 亚慢性全身毒性实验 无菌条件下，取生物瓣膜样品，以生理盐水为浸提介质，37℃ 下浸提 72 h，按照 6 cm²/mL 的浸提比例制备浸提液。取 40 只 SD 大鼠，实验组和对照组各 20 只，雌雄各半，按 10 mL/kg 的剂量进行尾静脉注射，实验组注

表 1 Magnusson 和 Kligman 分级

贴敷实验反应	等级
无明显改变	0 级
散发性或斑点状红斑	1 级
中度融合性红斑	2 级
重度红斑和水肿	3 级

表 2 皮内刺激反应计分（分）

皮肤反应	刺激评分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑（勉强可见）	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑至无法进行红斑分级的焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿（勉强可见）	1
清晰水肿（隆起边缘清晰）	2
中度水肿	3
重度水肿	4

射样品浸提液，对照组注射生理盐水，连续 28 d，第 28 d 所有动物禁食，每日观察动物状态，记录每周及禁食前后动物体重。第 29 d，将动物称重，收集血液标本，进行血液和血生化分析。无痛处死所有动物，取心、胸腺、肝、脾、肾、肾上腺、性腺和脑组织称湿重。对动物的心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、肠、性腺等主要脏器进行解剖观察。

1.5 统计学分析

数据统计采用 SAS 6.12 软件包进行，数据经正态性检验后，服从正态分布的数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述，组间比较采用独立样本 *t* 检验，*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

1.6 伦理审查

本研究动物实验通过苏州大学卫生与技术研究所伦理审查，实验编号 M202005387-2，SDWH-M202005387-3，实验操作符合实验动物伦理原则。

2 结果

2.1 体外细胞毒性

采用 MTT 法检测非戊二醛化学体系处理的牛心包生物瓣膜材料细胞毒性。阴性对照组细胞活

力为 100.3%，阳性对照组细胞活力为 22.2%；100% 实验样品浸提液的细胞活力为 75.2%，满足标准 GB/T 16886.5-2017 要求的实验样品细胞活力 > 70.0%，表明实验样品浸提液对 L929 细胞无潜在毒性影响；50% 实验样品浸提液细胞活力为 94.9%，符合评价标准要求的实验样品 50% 浸提液的细胞活力比 100% 浸提液的细胞活力高；见表 3。

2.2 皮肤致敏实验

采用豚鼠最大剂量实验，评价非戊二醛化学体系处理的牛心包生物瓣膜材料潜在的皮肤致敏反应。实验组和对照组在各观察时间点的皮肤反应计分均为 0，实验样品浸提液在豚鼠皮肤未发现皮肤致敏反应，致敏阳性率为 0.0%。根据标准 GB/T 16886.10-2017，可以判定样品无潜在的皮肤致敏反应；见表 4。

2.3 皮内反应实验

通过皮内注射方法，评价非戊二醛化学体系处理的牛心包生物瓣膜材料潜在的皮内刺激反应。实验样品组浸提液皮内反应未超过对照组，实验组和对照组平均计分均为 0 分；实验过程中动物未出现异常症状或死亡。实验组平均计分减去对照组平均计分为最终计分，结果符合标准 GB/T 16886.10-2017 要求的实验样品最终计分不大于 1 分。

2.4 急性全身毒性实验

急性全身毒性实验前后的小鼠体重变化观察结果见表 5。在 72 h 观察期内，无论是生理盐水浸提还是植物油浸提，实验组和对照组小鼠体重均稳定增长，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。实验组和对照组小鼠均未观察到临床毒性症状，实验组小鼠反应不大于对照组，根据标准 GB/T 16886.11-2011，表明非戊二醛化学体系处理的牛心包生物瓣膜材料无急性全身毒性。

2.5 亚慢性全身毒性实验

观察期内，所有动物实验局部和全身均未观察到临床毒性症状。各时间点的实验组和对照组大

鼠体重、主要器官重量、血常规和血生化数据差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；见表 6 ~ 9。解剖观察发现实验组和对照组的主要脏器均未见异常表现。根据标准 GB/T 16886.11-2011，结果表明非戊二醛化学体系处理的牛心包生物瓣膜材料无明显的亚慢性全身毒性。

3 讨论

牛心包作为生物瓣膜材料已有着数十年的应用历史。为了将此种材料应用于临床，需要采用交联剂在牛心包胶原纤维之间建立化学交联并进行灭病毒、灭菌等处理，以提高其抗酶解性，保证其结缔组织的完整性，并降低其抗原性。戊二醛是应用最为广泛的制备生物瓣膜材料的试剂，能够桥接不同多肽链上赖氨酸或羟赖氨酸残基上的氨基，在牛心包组织中形成分子间或分子内的交联，并且也能很好地灭病毒、灭菌。然而，戊二醛处理后可能

表 3 体外细胞毒性实验结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	吸光度	细胞活力 (%)
空白对照组	0.920±0.049	100.0
阴性对照组	0.923±0.030	100.3
阳性对照组	0.204±0.014	22.2
100% 样品浸提液组	0.692±0.011	75.2
75% 样品浸提液组	0.803±0.033	87.3
50% 样品浸提液组	0.873±0.058	94.9
25% 样品浸提液组	0.818±0.056	88.9

表 4 皮肤致敏实验结果

组别	动物数量 (只)	24 h 反应计分为 0		48 h 反应计分为 0		激发后阳性发生率 (%)
		动物数量 (只)		动物数量 (只)		
		实验部位	对照部位	实验部位	对照部位	
实验组	10	10	10	10	10	0.0
对照组	5	5	5	5	5	-

表 5 急性全身毒性实验前后小鼠体重变化 ($n=5$, g)

时间	生理盐水		P 值	植物油		P 值
	实验组	对照组		实验组	对照组	
注射前	18.78±0.58	18.74±0.30	0.95	18.94±0.43	18.70±0.42	0.40
注射后 24 h	21.34±1.05	21.52±0.85	0.77	21.80±0.95	21.26±0.94	0.39
注射后 48 h	23.22±1.16	23.62±0.78	0.54	23.84±0.88	23.18±0.97	0.29
注射后 72 h	25.40±1.03	25.64±0.62	0.67	25.98±0.90	25.10±0.99	0.18

表 6 大鼠体重 ($n=10$, g)

时间	实验组雄	对照组雄	P 值	实验组雌	对照组雌	P 值
0 d	194.58±7.02	193.52±6.30	0.72	194.34±6.31	192.55±6.57	0.54
7 d	245.77±7.27	244.84±6.75	0.77	224.43±6.93	224.67±7.40	0.94
14 d	296.63±7.60	295.76±7.40	0.80	254.79±8.34	255.70±8.37	0.81
21 d	348.74±10.68	346.30±8.05	0.57	283.61±10.17	287.20±11.46	0.47
禁食前 (28 d)	398.92±10.75	397.43±9.85	0.75	313.96±10.89	319.11±12.28	0.33
禁食后	384.02±10.82	382.84±10.50	0.81	299.09±11.14	304.49±12.54	0.32

表 7 大鼠器官重量 ($n=10$, g)

器官	实验组雄	对照组雄	P 值	实验组雌	对照组雌	P 值
心	1.15±0.09	1.13±0.09	0.61	0.90±0.07	0.87±0.07	0.41
肝	11.97±0.13	12.01±0.13	0.52	8.82±0.44	8.63±0.54	0.40
脾	0.79±0.06	0.77±0.09	0.53	0.65±0.05	0.65±0.05	0.97
肾	3.19±0.06	3.19±0.08	0.98	2.47±0.08	2.45±0.05	0.39
肾上腺	0.07±0.01	0.07±0.01	0.66	0.05±0.01	0.05±0.01	0.75
性腺	7.51±0.43	7.46±0.33	0.79	0.73±0.05	0.74±0.05	0.58
胸腺	0.68±0.05	0.66±0.08	0.68	0.51±0.06	0.51±0.05	0.85
脑	1.85±0.11	1.87±0.11	0.77	1.71±0.07	1.71±0.27	0.98

表 8 大鼠血常规数据 ($n=10$)

项目	实验组雄	对照组雄	P 值	实验组雌	对照组雌	P 值
白细胞 ($\times 10^9/L$)	6.34±1.18	7.87±2.31	0.08	8.42±2.86	7.01±3.24	0.32
红细胞 ($\times 10^{12}/L$)	6.95±0.31	7.06±0.53	0.60	6.96±0.45	7.01±0.37	0.80
血红蛋白 (g/L)	149.10±6.70	148.80±8.30	0.93	144.00±7.40	143.70±6.20	0.92
淋巴细胞 (%)	74.19±5.62	76.14±3.00	0.35	72.54±3.78	74.30±7.78	0.53
单核细胞 (%)	2.43±0.40	2.43±0.34	1.00	2.81±0.42	2.51±0.46	0.14
中性粒细胞 (%)	23.38±5.49	21.43±2.84	0.33	24.65±3.61	23.19±7.44	0.58
红细胞压积 (%)	42.85±1.97	42.39±2.89	0.68	41.74±2.24	42.36±1.86	0.51
平均红细胞体积 (fL)	61.71±2.07	60.21±2.00	0.12	60.11±2.32	60.57±1.41	0.60
平均血红蛋白浓度 (g/L)	347.50±5.10	351.00±8.40	0.28	344.90±13.30	338.50±4.70	0.17
血小板 ($\times 10^9/L$)	684.80±78.60	704.60±91.80	0.61	676.20±75.50	732.00±129.50	0.26
凝血酶原时间 (s)	8.75±0.46	9.22±0.72	0.10	8.76±0.42	8.42±0.49	0.11
活化部分凝血激酶时间 (s)	12.22±1.44	12.60±3.73	0.77	13.83±1.06	12.90±1.08	0.07

导致瓣膜材料异位钙化, 并且由于其毒性导致对宿主组织的适应性降低^[17-18]。戊二醛可直接诱导细胞死亡和细胞碎片形成, 而细胞碎片又会成为钙化的病灶; 此外, 不完全与组织蛋白结合的戊二醛也会产生具有细胞毒性的醛基残留物, 这也可以诱导钙化形成^[9, 19]。为克服戊二醛的不足, 研究者已进行各种非戊二醛交联剂的开发, EDC 即是其中研究

较为广泛的一种。EDC 可以与牛心包胶原中的羧基发生反应, 生成 O-酰基异脲中间体, 在 N-羟琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 作用下可以形成更稳定的活性酯结构, 继而与氨基发生反应形成酰胺键, 过程中 EDC、NHS 不会成为交联化学键的一部分, 中间产物可以释放出来并被清洗掉, 具有较小的细胞毒性^[20]。有研究比较了 EDC

表 9 大鼠血生化数据 (n=10)

项目	实验组雄	对照组雄	P 值	实验组雌	对照组雌	P 值
血糖 (mmol/L)	8.07±0.71	7.93±0.63	0.65	7.08±0.98	6.38±0.70	0.08
总蛋白 (g/L)	66.70±5.90	73.10±8.30	0.06	66.70±4.90	65.10±2.90	0.39
白蛋白 (g/L)	43.60±5.60	45.30±1.90	0.38	43.60±3.00	41.80±2.30	0.15
球蛋白 (g/L)	23.00±1.10	27.50±7.30	0.07	23.10±2.30	23.30±2.40	0.85
丙氨酸氨基转移酶 (U/L)	49.40±10.30	46.90±7.10	0.54	59.30±14.00	49.80±8.70	0.08
天冬氨酸氨基转移酶 (U/L)	185.30±44.40	167.40±35.30	0.33	159.10±51.00	135.40±24.50	0.20
碱性磷酸酶 (U/L)	152.30±33.60	131.60±37.70	0.21	242.30±56.20	225.10±56.40	0.50
尿素氮 (mmol/L)	9.04±0.83	8.40±0.76	0.09	9.24±1.47	8.24±1.68	0.17
肌酐 (μmol/L)	32.60±2.10	33.30±1.60	0.42	28.40±3.20	30.10±3.60	0.28
总胆固醇 (mmol/L)	1.9±0.26	2.09±0.36	0.19	2.04±0.28	1.84±0.17	0.07
甘油三酯 (mmol/L)	0.50±0.17	0.41±0.04	0.09	0.64±0.19	0.53±0.11	0.13
钙 (mmol/L)	2.72±0.07	2.72±0.08	0.93	2.70±0.10	2.68±0.05	0.57
磷 (mmol/L)	2.25±0.28	2.43±0.17	0.09	3.08±0.40	2.89±0.22	0.21

和戊二醛交联对牛心包性能的影响,两种交联剂均能提高牛心包对胶原酶降解和溴化氰化学降解的抗性,但在热变性后,经 EDC 处理的组织对胶原酶的抗性略强于戊二醛处理,对胰蛋白酶的抗性则明显强于戊二醛处理组织。在抗钙化性能方面,有研究^[21]表明,EDC 交联的猪主动脉瓣在植入大鼠皮下 30 d 后,与戊二醛交联相比,组织钙化程度明显降低。但是,单纯的 EDC 交联不能完全替代戊二醛的病毒灭活和杀菌作用,同时由于 EDC 属于零长度交联,经单纯 EDC 处理后的心包相对天然瓣叶具有较强的硬度,由其制作而成的瓣叶容易应力集中,动态响应略差。因此,我们基于优化的 EDC 复合处理开发了一整套非戊二醛处理技术以获得具有良好生物相容性、耐久性和抗钙化性能的生物瓣膜材料。为了保证非戊二醛体系处理技术在临床使用中的安全性,有必要对该技术处理的生物瓣膜材料的生物相容性进行系统性评估。本研究通过体外细胞毒性、皮肤致敏、皮内反应、急性毒性和亚慢性全身毒性实验评价了基于非戊二醛体系技术处理的牛心包生物瓣膜材料的生物相容性。

体外细胞毒性结果显示, L929 细胞在基于非戊二醛体系技术处理的牛心包生物瓣膜材料浸提液中生长良好,材料无潜在细胞毒性。相关研究也表明 EDC 交联胶原能够支持成骨细胞生长^[22],血管内皮细胞在 EDC 交联的猪主动脉瓣材料上也能够良好增殖^[21],提示 EDC 交联生物材料具有良好的细胞相容性。另一方面,有研究^[23-25]表明,戊二醛交联的牛心包或猪心包具有明显的细胞毒性,在相

关材料浸提液中的 L929 细胞活性受到明显抑制。这可能是由于 EDC 分子不会参与到实质交联中,不易产生因为交联剂残留而导致的细胞毒性,而戊二醛则可能形成不稳定的聚合体长期存在于交联组织间隙中,导致潜在的细胞毒性。

生物瓣膜作为永久植入的医疗器械,必须对其可能引起的接触性危害进行评价。本研究中皮肤致敏和皮内反应实验结果表明,基于非戊二醛体系技术处理的牛心包生物瓣膜材料不会导致潜在的皮内刺激和皮肤致敏反应。而有研究^[25]表明,戊二醛交联牛心包材料的生理盐水浸提液则会产生阳性刺激反应。

生物材料在植入体内后可能产生的溶出物有可能导致全身毒性反应。本研究先采用极性和非极性浸提液注射评价急性全身毒性反应,然后又通过生理盐水浸提液连续给样 28 d,结合大鼠体重、血常规、血生化和组织病理学检测指标,对亚慢性全身毒性反应进行综合评价。结果表明,基于非戊二醛体系技术处理的牛心包生物瓣膜材料不会导致潜在的急性和亚慢性全身毒性反应。另一方面,有研究^[25]表明小鼠静脉注射戊二醛交联牛心包的生理盐水浸提液后,会产生异常反应和死亡。戊二醛的毒性作用已在各种研究中得到证明,采用戊二醛交联的生物瓣膜材料在植入前一般均需要彻底清洗,或采用中和试剂进行解毒处理。相比之下,基于非戊二醛体系技术处理的牛心包生物瓣膜材料不会引起明显的毒性反应,在临床应用中具有较大潜力。

综上所述,非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料无细胞毒性、无致敏性和刺激性、无急性和亚慢性全身毒性,具有良好的生物相容性,符合国家相关标准。本研究为非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料在临床瓣膜置换中的应用奠定了一定的理论和实验基础,但尚不足以识别材料作为医疗器械部件在整个寿命期内所有潜在的生物危害,后续将针对材料的遗传毒性、血液相容性、生殖/发育毒性以及致癌性等作进一步的深入研究。

利益冲突:温晓晓、张坤、潘孔荣、汪文涛为沛嘉医疗科技(苏州)有限公司在职员工,本研究由沛嘉医疗科技(苏州)有限公司资助,研究结果客观公正。

作者贡献:温晓晓负责实验设计与论文撰写;张坤、汪文涛负责实验执行与论文修改;潘孔荣、潘文志负责论文审阅与修改。

参考文献

- Yang Y, Wang Z, Chen Z, *et al.* Current status and etiology of valvular heart disease in China: A population-based survey. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 339.
- Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Rezvova MA, *et al.* Degeneration of bioprosthetic heart valves: Update 2020. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(19): e018506.
- Li KYC. Bioprosthetic heart valves: Upgrading a 50-year old technology. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6: 47.
- Botes L, Laker L, Dohmen PM, *et al.* Advantages of decellularized bovine pericardial scaffolds compared to glutaraldehyde fixed bovine pericardial patches demonstrated in a 180-day implant ovine study. *Cell Tissue Bank*, 2022. [Epub ahead of print]
- Gao M, Wang Y, He Y, *et al.* Comparative evaluation of decellularized porcine liver matrices crosslinked with different chemical and natural crosslinking agents. *Xenotransplantation*, 2019, 26(1): e12470.
- Welzel C, Dittfeld C, Jannasch A, *et al.* Hemocompatibility assays offer a new option for evaluation of decellularized bovine pericardium for application in cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 69(S 01): DGTHG-eP33.
- Brill FHH, Becker B, Todt D, *et al.* Virucidal efficacy of glutaraldehyde for instrument disinfection. *GMS Hyg Infect Control*, 2020, 15: Doc34.
- Lin Q, Lim JYC, Xue K, *et al.* Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View (Beijing)*, 2020: e16.
- Simionescu DT. Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(12): 1971-1985.
- Jorge-Herrero E, Fernández P, Turnay J, *et al.* Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*, 1999, 20(6): 539-545.
- Tam H, Zhang W, Infante D, *et al.* Fixation of bovine pericardium-based tissue biomaterial with irreversible chemistry improves biochemical and biomechanical properties. *J Cardiovasc Transl Res*, 2017, 10(2): 194-205.
- Tam H, Zhang W, Feaver KR, *et al.* A novel crosslinking method for improved tear resistance and biocompatibility of tissue based biomaterials. *Biomaterials*, 2015, 66: 83-91.
- Sung HW, Chang WH, Ma CY, *et al.* Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 64(3): 427-438.
- Chang Y, Tsai CC, Liang HC, *et al.* *In vivo* evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Biomaterials*, 2002, 23(12): 2447-2457.
- Sung HW, Hsu HL, Shih CC, *et al.* Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials*, 1996, 17(14): 1405-1410.
- Zhuravleva IY, Karpova EV, Oparina LA, *et al.* Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: A multiparametric assessment study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 118: 111473.
- Cipriano PR, Billingham ME, Oyer PE, *et al.* Calcification of porcine prosthetic heart valves: A radiographic and light microscopy study. *Circulation*, 1982, 66(5): 1100-1104.
- Schoen F J, Harasaki H, Kim K M, *et al.* Biomaterial-associated calcification: Pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J Biomed Mater Res*, 1988, 22(A1 Suppl): 11-36.
- Tod TJ, Dove JS. The association of bound aldehyde content with bioprosthetic tissue calcification. *J Mater Sci Mater Med*, 2016, 27(1): 8.
- 杨春蓉. 交联对胶体生物学和物理性能的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(3): 521-524.
- Luo Y, Huang S, Ma L. A novel detergent-based decellularization combined with carbodiimide crosslinking for improving anti-calcification of bioprosthetic heart valve. *Biomed Mater*, 2021, 16(4): 0450221.
- Yang C. Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. *Bull Mater Sci*, 2012, 35(5): 913-918.
- Guo G, Jin L, Jin W, *et al.* Radical polymerization-crosslinking method for improving extracellular matrix stability in bioprosthetic heart valves with reduced potential for calcification and inflammatory response. *Acta Biomater*, 2018, 82: 44-55.
- Jorge-Herrero E, Fonseca C, Barge AP, *et al.* Biocompatibility and calcification of bovine pericardium employed for the construction of cardiac bioprostheses treated with different chemical crosslink methods. *Artif Organs*, 2010, 34(5): E168-E176.
- Umashankar PR, Mohanan PV, Kumari TV. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicol Int*, 2012, 19(1): 51-58.

收稿日期: 2021-12-24 修回日期: 2022-03-02
本文编辑: 雷芳