

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.29.019

[http://www.crter.org]

吴桐, 黄晨, 莫秀梅. 新型组织工程血管材料: 静电纺复合纳米纤维小口径管状支架[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(29): 5387-5394.

新型组织工程血管材料: 静电纺复合纳米纤维小口径管状支架*

吴桐¹, 黄晨^{1,2}, 莫秀梅¹(¹生物材料与组织工程实验室, 化学化工与生物工程学院, 东华大学, 上海市 201620; ²纺织学院, 东华大学, 上海市 201620)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 静电纺复合纳米纤维制备的小口径管状支架, 既能克服天然高分子材料力学性能的不足, 又能避免合成材料在生物相容性和安全性上的缺陷, 同时制备多层血管进行功能化修饰, 模拟天然细胞外基质的结构和功能, 已成为心血管组织修复及再生小口径血管组织工程研究的新方向。

2 文章增加的新信息: 在天然材料与合成材料之间找到一个最佳比例, 使复合材料的力学性能和血管相容性达到一个平衡, 经动物实验检验静电纺血管支架的体内原位再生情况。

3 临床应用的意义: 进一步探索静电纺复合纳米纤维在小口径血管组织工程中的应用, 对于优化人工血管支架的力学性能和生物相容性、模拟天然细胞外基质的结构和功能、支架植入体内的安全性评价, 以及其在体内原位诱导血管再生方面的应用有着重要的意义。

关键词:

生物材料; 生物材料综述; 血管组织工程; 静电纺丝; 小口径管状支架; 原位再生; 纳米纤维; 聚合物; 天然材料; 合成材料生物材料

摘要

背景: 小口径人工血管对生物相容性和抗凝血的要求远远高于普通大口径人工血管, 因此血管移植体内原位诱导组织再生成为了新的研究方向。

目的: 总结近几年静电纺复合纳米纤维小口径管状支架的主要研究进展, 并讨论其在体内原位诱导血管再生方面的重要应用。

方法: 由第一作者检索中国期刊网 CNKI 全文数据库、万方数据库及 ISI Web of Knowledge 外文数据库, 有关复合纳米纤维小口径管状支架的制备方法、血管支架仿生天然细胞外基质微环境的表面修饰以及种植体植入后生物相容性和安全性评价等方面的文献。

结果与结论: 静电纺复合纳米纤维制备小口径管状支架, 即将天然材料和合成材料共纺在一起, 这样既能克服天然生物高分子材料力学性能的不足, 又能避免合成材料在生物相容性和安全性的缺陷, 成为制备小口径血管组织工程支架的必然趋势。同时制备多层血管, 进行功能化修饰, 模拟天然细胞外基质的结构和功能, 将成为用于心血管组织修复及再生小口径血管组织工程研究的新方向。在获得上述新进展的同时, 经动物实验检验的静电纺血管支架以聚合物为主。尽管这类支架采用了各种手段避免血栓、炎症等不良反应, 其生物相容性仍旧无法与天然材料相比。由此可见, 在天然材料与合成材料之间找到一个最佳比例, 使复合材料的力学性能和血管相容性达到一个平衡, 将会显著提高静电纺复合纳米纤维支架在小口径血管组织再生中的应用。

A new vascular tissue engineering material: Electrospun small-diameter nanofibrous scaffolds

Wu Tong¹, Huang Chen^{1,2}, Mo Xiu-mei¹(¹Biomaterials and Tissue Engineering Laboratory, College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China
²College of Textiles, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract

BACKGROUND: Due to the much higher requirement of biocompatibility and anticoagulant of small-diameter vascular grafts than those of large-diameter ones, *in situ* blood vessel regeneration occurs as a new research direction.

OBJECTIVE: To summarize the recent research development of electrospun small-diameter scaffolds and to explore the application of *in situ* blood vessel regeneration and the development tendency.

METHODS: The first author retrieved China National Knowledge Infrastructure database, Wanfang data and ISI Web of Knowledge foreign database to retrieve literatures addressing the fabrication of electrospun small-diameter nanofibrous vascular grafts, surface modification and mimicking extracellular matrix, as well as the evaluation of biocompatibility and security after grafting.

RESULTS AND CONCLUSION: Electrospun small-diameter nanofibrous vascular grafts have emerged as promising candidates in vascular tissue engineering. By using both natural and synthetic polymers, the scaffolds

吴桐★, 女, 1989年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 东华大学在读硕士, 主要从事生物材料与组织工程方面的研究。
2110431@mail.dhu.edu.cn

通讯作者: 莫秀梅, 博士, 博士生导师, 教授, 东华大学生物所生物材料与组织工程课题组, 上海市 201620
xmm@dhu.edu.cn

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2013)29-05387-08

收稿日期: 2012-09-11

修回日期: 2012-10-05

(20120726001/GW·W)

Wu Tong★, Studying for master's degree, Biomaterials and Tissue Engineering Laboratory, College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China
2110431@mail.dhu.edu.cn

Corresponding author: Mo Xiu-mei, Doctor, Doctoral supervisor, Professor, Biomaterials and Tissue Engineering Laboratory, College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China
xmm@dhu.edu.cn

Received: 2012-09-11

Accepted: 2012-10-05

can achieve a good balance between mechanical property and biocompatibility. Meanwhile, the fabrication of multi-layered vascular scaffolds, functional surface modification and mimicking extracellular matrix structurally and functionally are now becoming attractive research directions. However, at current stage, electrospun vascular scaffolds used clinically are basically formed by synthetic materials, which have limited biocompatibility and anticoagulant activity. In this case, more efforts should be paid to find an optimal ratio between natural and synthetic materials for the improvement of biocompatibility and anticoagulant ability of small-diameter vascular grafts.

Key Words: biomaterials; biomaterial review; vascular tissue engineering; electrospinning; small-diameter tubular scaffold; *in situ* regeneration; nanofibers; polymer; natural materials; synthetic materials

Wu T, Huang C, Mo XM. A new vascular tissue engineering material: Electrospun small-diameter nanofibrous scaffolds. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(29): 5387-5394.

0 引言

心血管疾病被认为是引起人类高死亡率的重要原因,其比例已经占全球死亡总数的30%(世界卫生组织,2011年9月)^[1]。心血管系统包括心脏、血管和血液,它们对于确保各器官的正常功能起着重要的作用。然而动脉粥样硬化和血管瘤等病因造成的大大小小的动脉和静脉血管缺损,特别是心脏冠状动脉硬化造成心脏停跳致死的情况在现代社会呈上升趋势。因此,心血管疾病因其较高的发病率成为人类健康的巨大威胁之一。而冠状动脉搭桥等手术方法成为了治疗动脉堵塞的有效方法,但这种方法受到自体血管来源的限制,因为有30%的患者体内缺乏合适的替代血管^[2]。这一比例在50周岁以上的患者中更高,这部分人也恰恰是血管疾病发作的高危人群,可见临床上需要大量的血管移植或代用品作为修补。越来越多的患者,尤其是中老年患者需要移植人工血管支架,这就对小口径人工血管有了更高的要求。

虽然由Dacron[®]、聚四氟乙烯等合成材料制成的较大口径血管支架已被成功应用于动脉与髓血管的替换中,但是对于小口径血管(直径<6 mm),如冠状动脉、周围血管的移植而言,这些材料的应用并不成功^[3-5]。其主要缺陷表现在血栓形成、支架闭合、炎症反应等移植后的不良反应,而其根本原因则是人工合成材料在抗凝血性、生物相容性、移植安全性等方面的欠缺。理想的小口径人造血管具有良好的物理稳定性、力学性能、生物相容性、抗凝血性及抗感染性,其中力学性能和组织血液相容性是保证血管长期稳定性及通畅性的主要因素,也是突破人造血管技术的关键^[6]。因此,组织工程静电纺复合纳米纤维小口径管状支架展现了重要的应用前景。

目前,小血管组织再生主要是通过体外构建支架或者体外种植细胞(多为自体细胞)后移植到体内培养获得。无论是体外构建支架,还是体外种植细胞再移植入体内培养,方法虽然简便易行,但是生物相容性较差,尤其对于小口径血管支架,生物相容性不好更容易引起血栓形成和再狭窄,所以由血栓形成而引起

的再狭窄是小口径血管组织工程的一个重大挑战。因此,为了治疗心血管疾病中小口径人工血管支架的需求,研究者们致力于通过改善制备支架的方法以及表面修饰或者功能化来预防血栓堵塞和再狭窄,研究重点在于尽量使制备的人工支架接近天然血管的性能,这就有必要从提高支架的生物功能入手,如抗凝作用、快速内皮化及平滑肌再生等。

由于小口径人工血管对于生物相容性和抗凝血的要求远远高于普通的大口径人工血管,为了达到这一目的,小口径管状支架体内原位诱导血管再生成为了生物医学与临床医学的研究热点。普通的移植方法是将支架体外种植细胞后再植入体内,而小口径管状支架体内原位诱导血管再生则是通过构建一种功能性支架,使其在结构和功能上模拟天然细胞外基质的微环境,这种支架能够在体内募集细胞并诱导细胞定向分化,随着支架的逐渐降解,受损部位重新长出新组织。若再结合抗凝血作用的增强修饰,就能够有效促进细胞的黏附、增殖、分化以及内皮组织和平滑肌细胞层的再生,为小口径血管支架的移植手术带来福音^[7]。文章总结了近几年静电纺复合纳米纤维小口径管状支架的主要研究进展,并讨论了其在体内原位诱导血管再生方面的重要应用,展望了其发展趋势,以期在生物医学领域中有更深入的发展,为人类健康带来福音。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者检索中国期刊全文数据库、万方数据库及ISI Web of Knowledge外文数据库。英文检索词为“Vascular tissue engineering, Electrospinning, Small-diameter tubular scaffold, *in situ* regeneration”,中文检索词为“血管组织工程,静电纺,小口径管状支架,体内原位再生”。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①文章所述内容需与静电纺复合血管支架的制备、支架表面修饰模拟天然细胞外基质微环境,种植体植入后生物相容性和安全性评价,以及体内原位再生等方面的研究密切相关。②同一领域选择

近期发表或在权威杂志上发表的文章。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取 共检索到文献78篇, 其中中文文献20篇, 英文文献58篇, 排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献21篇, 纳入57篇符合标准的文献进行综述。

1.4 质量评价 符合纳入标准的57篇文献中, 文献[1-7]综述了静电纺小口径管状支架在血管组织工程中的应用, 文献[8-32]探讨了静电纺复合纳米纤维小口径管状支架的制备方法, 文献[33-50]探讨了支架表面修饰与模拟天然细胞外基质微环境的关系, 文献[51-57]探讨了种植体植入后的生物相容性和安全性评价, 以及体内原位再生情况。

2 结果

2.1 静电纺复合纳米纤维小口径管状支架研究进展

2.1.1 静电纺复合血管支架的制备 静电纺丝技术是组织工程中制备支架的常用方法, 此种方法制备的支架比表面积大、孔隙率高, 纳米纤维直径与体内许多细胞尺寸相当, 能够负载生长因子诱导细胞黏附、增殖和分化, 对于体外细胞培养、模拟细胞外基质构造具有特殊优势^[8]。因此, 静电纺丝技术逐渐成为组织工程应用中制备支架的常用方法。然而, 若是静电纺纯聚合物材料或者聚合成材料与天然材料的比例不适合, 支架植入后将会导致血栓形成和增生现象, 这就限制了小口径人造血管仿生支架的临床应用, 因此血管移植体内原位诱导组织再生成为了新的研究方向, 即原位移植一种生物可降解支架, 这种支架在血管组织再生的同时又可保持机械性能^[9]。同时血管组织工程支架的尺寸稳定性、顺应性等对其在体内长期使用有着重大影响^[10]。

为了制备这种既有良好生物相容性, 又能维持合适机械性能的血管组织工程支架, 人们常将天然材料与合成材料共混或复合, 制备成纳米纤维支架。而静电纺丝方法由于操作简便、成本适中, 能够模拟天然细胞外基质, 制备合适比例的合成材料/天然材料支架用于组织工程的再生和修复而受到广泛关注。本课题组正是基于此目的, 致力于制备、表征一种新型小口径血管支架, 在此基础上与医院合作开展动物实验, 对其生物安全性进行评测, 以期最终制备出一种能够最终用于临床的纳米纤维基血管支架。

电纺制备血管支架的原理是使聚合物溶液在数万伏电压作用下带上电荷, 当电荷达到临界值时, 由于静电排斥使得溶液克服表面张力形成喷射细流, 溶剂在喷射过程中挥发, 通过不同口径的旋转轴心收集装置得到定向排列或随机排列的纳米纤维管, 以开发

一种能模仿血管形态和力学性能的圆管状支架结构^[11]。常用制备方法包括单纺、共混静电纺、同轴共纺等, 此外还有一些针对特定应用提出的特殊制备方法。

单一材料静电纺: 即通常所说的纯纺静电纺, 是指只选用一种纯高分子聚合物作为静电纺丝材料, 制备支架。在小口径血管组织工程研究初期, 常选用丙交酯和己内酯的共聚物[P(LLA-CL)或PLCL]作为常用的一种高分子聚合物。通过静电纺P(LLA-CL)最终获得了长度为10 cm, 内径为2.3-2.5 mm的管状支架^[12]。选择P(LLA-CL)为原料有两个原因, 首先这个材料与纯的聚左旋乳酸, 聚己内酯相比, 更适合作为血管等软组织的支架。它模量较前两者低, 断裂伸长率大^[13-15], 调节共聚比甚至可得到类似血管弹性的材料。另外, 这个材料已有成功应用于人体血管再造的例子^[16], 利用此材料本课题组研究了纺丝参数对P(LLA-CL)纳米纤维尺寸、结构, 以及P(LLA-CL)特异降解行为的影响^[17-19]。然而, 单一材料静电纺存在生物相容性不好的弊端, 由此研究者们想到了将合成材料与天然材料混合, 进行共混静电纺。

共混静电纺: 顾名思义, 即是直接将两种或两种以上材料的纺丝溶液共同混合在一起, 然后确定合适的纺丝参数, 采用旋转接收装置作为接收器, 通过静电纺丝法制备血管支架。

本课题组率先采用共混静电纺方法制备了不同混合比例的胶原-壳聚糖纳米纤维支架, 通过一系列表征和生物评价, 证明了当壳聚糖含量为20%时, 此种支架与细胞外基质有着高度相似的组成以及纳米级结构^[20]。同时还用共混方法制备了多种血管支架, 比较相互的性能。如静电纺制备“胶原-壳聚糖-聚左旋乳酸聚己内酯”支架, 得到纤维平均直径为224 nm, 血管支架长度为0.9 cm的多层复合血管组织工程支架^[21]。此种复合支架具有良好的力学性能和生物相容性, 适用于组织工程血管移植。此外, 本课题组还用此种方法制备了“明胶-壳聚糖”支架^[22], 纤维平均直径分别为360, 256nm的无规和取向“胶原-壳聚糖-热塑性聚氨酯”支架^[23]。采用天然聚合物与合成聚合物的共混体系制备静电纺丝纳米纤维膜, 以求在机械性能和生物相容性之间找到最佳平衡点。

同轴共纺: 组织工程中制备仿生支架, 不仅要为组织再生提供一定的空间和力学支持, 还要具有一定的生物活性, 即能够诱导细胞的增殖、分化, 促进组织再生。因此, 研究者们提出一种制备“壳-芯”结构纳米纤维的方法—同轴共纺技术, 目前最多的是应用于制备具有抗凝血功能的功能化支架^[24]。

同轴共纺技术的原理与传统静电纺丝相同, 只是稍作改进。将不互溶的芯层和壳层材料溶液分别装入

两个注射器中, 以适当的流速通过一个同轴的内外层针头装置, 壳层液体流出与芯层溶液汇合, 在同一电压下形成泰勒锥, 通过同轴静电纺丝得到“壳·芯”结构纳米纤维^[25]。作者所在课题组采用同轴静电纺丝方法, 选用可降解、生物相容性良好的P(LLA-CL)生物可降解材料作为基本材料, 制备了具有良好抗凝血性能, 且孔径约 90 nm, 壳·芯纤维直径约 470 nm 的 P(LLA-CL)/肝素壳·芯纳米纤维^[26]。通过同轴共纺制备 P(LLA-CL)/肝素壳·芯纳米纤维支架, 研究肝素缓释情况时发现, 随着芯层肝素含量从 0 增加到质量分数 2% P(LLA-CL), 得到的纳米纤维平均直径从 765 nm 减小到 437 nm^[27]。此外, 还采用此方法制备了负载生物活性因子的 TPU 功能纳米纤维。将 P(LLA-CL) 溶解于六氟丙烯作为同轴静电纺丝的外层溶液, 用于形成纳米纤维的壳层; 将胶原蛋白溶解于六氟丙烯中作为内层溶液, 用于形成纤维的芯层, 得到具有壳·芯结构的功能化纳米纤维支架^[28]。

同轴电纺被广泛用于制备“壳·芯”型纳米纤维结构, 在生物医学等领域具有广泛的潜在用途, 如用来保存不稳定的生物试剂或病毒, 防止不稳定化合物的分解, 分子药物的持续释放, 通过芯层材料实现生物功能获得功能化的纳米纤维支架等^[29]。

支架制备的特殊方法: 在传统静电纺复合纳米纤维支架方法的基础上, 研究者们又针对特定的实验及应用要求研发出一些特殊方法。如: 在静电纺丝过程中将细胞与纳米纤维混合加工制备小口径血管, 即在静电纺丝制备纳米纤维的同时进行细胞悬液的电喷雾, 使喷出的细胞直接混在血管支架中^[30]; 又如: 制备“层状纳米纤维支架”, 即先静电纺丝制备一层支架, 然后在两层纳米纤维之间种植人成纤维细胞, 如此重复, 一层细胞, 一层支架, 使细胞与电纺纤维支架组成多层结构血管支架, 证明了该结构有利于细胞的黏附增殖^[31]。

再如采用静电纺丝法制备三维-梯度肝素化纳米纤维壳聚糖/聚己内酯支架, 为了进一步模拟天然血管微环境, 还对梯度支架进行肝素化, 并固定血管内皮生长因子。此种方法制备的支架更接近于天然血管的 3 层结构, 并有助于内皮细胞在管内的附着, 防止血栓形成而引起的血管再狭窄^[32]。

2.1.2 支架表面修饰模拟天然细胞外基质微环境
纳米纤维的研究使得组织工程的发展进入了一个新的阶段, 即纳米仿生组织细胞间质(细胞外基质)的阶段。实际上动物组织本身就是细胞镶嵌在胶原蛋白的纳米丝中。组织工程支架就是要起到仿生组织细胞间质的作用。这又对支架材料提出了新的要求, 即尽可能的与组织的细胞间质相似。同时, 体内诱导血管原位再生, 不仅需要支架的结构和特性与天然血管相接

近, 更需要在结构和功能上仿生细胞外基质。目前对于小口径组织工程血管支架来说, 首要的挑战就是避免由于凝血、血栓的形成而引起的再狭窄。因此, 要求人工小口径管状支架具有原位诱导组织再生的能力, 重建功能化血管, 诱导血管完全内皮化和平滑肌细胞层再生, 这成为了研究者们关注的焦点。目前热点研究的抗凝血方法集中于内皮化及肝素化。

血管内皮化: 血管这个人体的重要器官实际上由复杂的 3 层结构组成, 其内层由单层均匀排列的内皮细胞组成, 起到抗凝血的作用。应用组织工程构建血管的关键就是使构成的血管具有完整的内皮细胞层。内皮细胞层具有抗血栓形成、防止血小板黏附、防止白细胞黏附和阻止平滑肌细胞增生的功能, 对于维持血管通畅、防止管腔狭窄非常重要^[33]。

在现阶段的血管植入手术中, 一般应用的血管支架材料如 PTFE 等在植入初期就会形成堵塞并形成血栓, 后期更易引起内膜增生^[34-35]。有鉴于此, 一种改善生物相容性的方法就是促进血管内层自体内皮细胞的形成。取受体同一部位的内皮细胞进行体外培养, 之后将这些细胞植入血管内腔进行内皮化, 由于内皮细胞是天然血管的重要组成部分, 具有重要的抗血小板黏附、抗凝血及预溶解纤维蛋白的作用^[36-37], 可防止凝血现象的发生。

然而, 由于内皮细胞自体来源的限制, 以及体外种植细胞的诸多弊端, 研究者们更期待能够通过对支架进行表面修饰, 使其具备一定的生物功能, 在体内促进内皮化组织的形成。此时内皮祖细胞引起了研究者的注意。内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞, 是成年个体中与血管新生关系最为紧密的干细胞成分。自内皮祖细胞首次在成体外周血中发现以来, 有关内皮祖细胞的研究日益增多, 彻底改变了传统血管新生的概念, 其在保持内皮功能及血管生成方面发挥重要作用^[38]。

内皮祖细胞可在一定条件下向内皮细胞方向分化, 并且具有增殖、迁移、黏附的功能, 而内皮祖细胞本身又能够分泌细胞因子和生长因子, 因此可以通过自分泌和旁分泌的方式作用于自身及邻近成熟内皮细胞和组织中的祖细胞, 从而有利于发挥内皮样作用。因此, 使内皮祖细胞黏附于支架上, 可加速内皮化进程, 防止血栓形成^[39]。在人工血管支架表面种植内皮祖细胞, 能够促进活性内皮组织的生成, 提高血管张力, 有助于预防血栓形成和再狭窄现象。人工血管支架经过表面修饰改变生物学功能, 以期通过血液循环有效捕获内皮祖细胞, 实现人工血管内皮化。常用的方法是将捕获分子固定在人造血管移植体表面, 模拟内皮祖细胞的归巢过程。理想的捕获分子应该具有对内皮祖细胞较高的亲和力、特异性和选择性^[32]。

到目前为止, 常用的捕获分子包括抗体^[40]、多肽^[41]、磁性分子^[42]、低聚糖和适配子等^[43-44]。通过对材料进行功能化修饰, 可以促进内皮组织形成, 有利于血管移植后的组织再生。

材料表面肝素化: 抗凝血是预防血栓及再狭窄现象的基本要求。抗凝血物质的种类很多, 肝素是较为重要的一种。肝素作为抗凝血物质, 被用来提高支架材料的抗凝血性。所谓肝素化就是指肝素或其衍生物在材料上的固定化。

肝素可通过离子交换反应、功能基团反应(-OH、-NH)固定在材料表面, 对于那些惰性高分子材料, 肝素则可以通过第三种物质的媒介作用与他们结合起来^[45]。本实验室曾采用等离子体技术引发表面接枝肝素方法, 使纳米P(LLA-CL)的表面肝素化, 以提高材料的抗凝血性^[46]。材料表面肝素化通常与生长因子的作用偶联。已有报道通过多重生长因子的协助, 有效诱导了血管再生^[47]。如一些靶向的基因实验, 以及生长因子拮抗实验表明血管内皮生长因子能够有效诱导血管再生。最近发育生物学方面的研究提供了有力证据, 表明肝素硫酸盐蛋白聚糖能够在细胞外基质中保持血管内皮生长因子扩散和保留最佳平衡^[48]。因此, 肝素化的支架能够用于血管内皮生长因子^[49], 以及其他能与肝素结合生长因子的缓释, 以加强血管的再生作用^[50]。此外, 用肝素偶联生长因子对支架进行功能化修饰, 在具有抗凝血作用的同时又能促进细胞的黏附、增殖与生长, 增强了支架的生物相容性。

2.1.3 生物相容性和安全性评价 用于血管组织工程的静电纺复合纳米纤维小口径管状支架, 同样需要评价其生物相容性及安全性。植入人体的人工管状支架必须对人体无毒性、无致敏性、无刺激性、无遗传毒性和无致癌性, 对人体组织、血液、免疫等系统不产生不良反应^[51]。生物相容性及生物学评价的研究涉及多个学科, 一般是通过细胞学、组织学、免疫学、遗传毒理学和整体动物实验, 以及物理、化学等体内外的实验方法和手段研究生物医用材料及装置与生物体的相互作用, 以评价最终产品是否安全有效^[51]。血液相容性和组织相容性是评定支架材料生物相容性的两个基本内容^[52]。

一般来说, 材料的生物相容性越好, 植入体内后安全性就越高。因此, 制备人工支架之后, 要设计相关实验检测其生物相容性。例如: ①材料对人体细胞培养、黏附、克隆化的实验方法。②细胞扩增过程中细胞生长与凋亡基因调控的实验方法。③人体各种促进细胞功能的或抑制细胞功能的因子与材料相互作用产生的正、负效应的实验方法。④材料在体内降解过程中降解产物对体内代谢影响的实验方法^[51]。人工血管支架生物相容性的好坏是决定

该种材料能否用于组织工程器官修复与替换的重要因素。针对不同材料、不同应用设计出合适的生物学评价方法, 有助于促进功能性人工小口径管状支架的研发及应用。

2.1.4 静电纺复合纳米纤维小口径管状支架的应用 尽管临床上需要大量的小血管植入材料, 然而世界上还没有一种理想的小血管代用品出现, 组织工程小血管还处于研究阶段。研究者们致力于制备既具有抗凝血性又具有血管弹性的小血管支架, 有望推出一种理想的血管组织工程支架。通过体内外组织再生的研究, 揭示组织再生机制。随着对静电纺丝技术研究的深入, 以及后续细胞实验、动物实验乃至临床实验的继续开展, 静电纺血管支架在治疗人类血管疾病与创伤中的应用前景较为光明。尤其是在小口径管状支架组织工程再生应用中, 由于自体移植静脉血管力学性能较弱, 内皮细胞层易被撑破而导致内膜增生, 而合成血管不具备良好的生物相容性易引起血栓, 因此自体血管和合成血管难以满足心脏血管搭桥手术的要求^[8]。静电纺复合纳米纤维小口径管状支架兼具良好的力学性能及生物相容性, 在受损心脑血管的修复和替换中更具优势。通过优化静电纺丝条件、选择合适的复合材料, 以及对支架进行功能化修饰等途径, 最终获得智能性仿生材料用于心血管及其外周组织的修复与再生。伴随纳米技术和组织工程的发展静电纺复合纳米纤维小口径管状支架必将得到进一步的应用和开发。

2.2 体内小口径血管再生 血管再生有两条途径, 其一是体外培养血管组织, 其二是体内再生血管组织。前者由于培养时间长、费用高、操作复杂, 其应用受到限制。体内再生血管是将制备好的血管支架直接移植到血管缺损处, 使之暂时代替血管组织, 保持血流畅通, 之后随着新生组织的长入而逐渐降解, 直至再生出新的血管组织。体内再生血管对植入管状支架有较高的要求, 即具有类似血管组织的顺应性和力学性能, 并且不会漏血。静电纺纳米纤维管状支架的研究使得体内小口径血管再生的发展进入了一个新阶段^[53-56]。由于生物体内环境的复杂性, 制备静电纺纳米纤维后需要开展动物实验, 对其生物安全性进行评测, 对其在动物体内血管组织再生情况进行研究, 常用兔子、鼠、狗等构建实验动物模型, 解释纳米纤维支架的降解及新组织再生的全过程。

支架植入后血管内表面的内皮组织覆盖、细胞渗透、新生毛细血管的形成等是评测支架医用性能的重要因素, 尤其是快速建立一个流畅的、稳定的内皮细胞层对于小口径血管支架植入的通畅性具有重要意义, 这些要通过体内血管再生实验来研究^[55]。如: 通过静电纺聚己内酯, 并经RGD表面修饰制备的内径约

2.2 mm、长度约 3 cm 的功能化血管支架植入兔颈动脉, 研究血管原位再生情况。发现支架植入 4 周后通畅率较好, 血管造影显示没有明显的再狭窄现象, 植入 4 周后将支架取出, 观察内皮细胞形成情况, 发现内皮细胞层从缝合位点一直延伸到支架中部, 且内皮细胞层均匀有序, 支架外层周围也发现有新生毛细血管组织, 对平滑肌细胞的免疫组织化学实验也显示了相似的实验结果, 平滑肌细胞层也从缝合位点延伸到了支架的中部, 这些结果都表明了聚己内酯-RGD 支架的良好通畅性^[7]。又如: 通过静电纺 P(LLA-CL) (70:30) 制备 3 mm 直径的血管支架, 将人冠状动脉内皮细胞体外培养后, 种植到血管支架内表面, 研究体外内皮化情况, 再将 P(LLA-CL) 支架植入兔子腹部静脉建立动物模型, 通过免疫组织化学法对血管支架移植动物体内后内皮组织的再生情况进行研究^[55]。再如: 通过静电纺聚己内酯制备的 2 mm 直径的血管支架植入 30 只大鼠腹主动脉中, 通过血管造影术研究其血管通畅性和结构完整性, 发现移植后的聚己内酯支架没有出现再狭窄情况, 也没有出现动脉瘤性扩张, 通过组织学分析揭示了支架内表面快速内皮化过程, 移植 6 周后, 97% 的聚己内酯支架内表面被内皮组织覆盖, 12 周时, 均匀流畅的内皮细胞单层即从毗邻本体主动脉位置延伸到支架, 形成完整的内皮组织层, 表明了聚己内酯材料在血管支架应用中的广泛前景^[57]。体内血管再生研究是组织工程应用于临床不可缺少的重要一环, 研究人工血管支架在体内环境中的功能和作用具有重要的理论与实际意义。然而, 目前大部分研究者对于体内血管再生的研究都集中在人工血管短期体内植入研究, 然而对于中长期植入, 即从植入体内到支架完全降解, 以及支架降解后体内组织的生长情况等并没有太多研究, 这也成为了下一阶段血管组织工程支架应用于临床的重要问题。

作者所在课题组也在进行相关方面的研究: 通过静电纺制备直径 4 mm、长度 3-5 cm, 并且负载肝素的 P(LLA-CL)、胶原/壳聚糖/P(LLA-CL) 管状支架, 植入健康成年比格犬双边股动脉中, 建立体内移植动物模型, 通过血管造影术和彩色多普勒血流显像检测技术研究移植血管支架在体内的流通情况, 同时研究支架在体内及体外降解性能, 以期制备出一种能够最终应用于临床的纳米纤维基血管支架, 同时解决血管再生的基本理论问题。

3 讨论

文章总结了近几年来静电纺复合纳米纤维小口径管状支架的主要研究进展, 并讨论了其在体内原位

诱导血管再生方面的重要应用, 展望了其在生物医学领域中的深入发展, 以期制备出一种能够最终用于临床的血管组织工程支架, 为人类健康带来福音。

总体来说, 静电纺复合纳米纤维制备小口径管状支架, 即将天然材料和合成材料共纺在一起, 这样既能克服天然生物高分子材料力学性能的不足, 又能避免合成材料在生物相容性和安全性的缺陷, 成为制备小口径血管组织工程支架的必然趋势。同时制备多层血管, 进行功能化修饰, 模拟天然细胞外基质的结构和功能, 将成为用于心血管组织修复及再生的小口径血管组织工程研究的新方向。在获得上述新进展的同时发现, 之前所报道的、经过动物实验检验的静电纺血管支架以聚合物为主。尽管这类支架采用了各种手段避免血栓、炎症等不良反应, 其生物相容性仍旧无法与天然材料相比。由此可见, 在天然材料与合成材料之间找到一个最佳比例, 使复合材料的力学性能和血管相容性达到一个平衡, 将会显著提高静电纺复合纳米纤维支架在小口径血管组织再生中的应用。若能制备出一种成熟的、具备自主知识产权的生物材料静电纺血管支架, 将具有巨大的社会和经济效益。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计本综述, 分析并解析数据, 所有作者共同起草, 经通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 静电纺丝就是高分子流体静电雾化的特殊形式, 此时雾化分裂出的物质不是微小液滴, 而是聚合物微小射流, 可以运行相当长的距离, 最终固化成纤维。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Canver CC. Conduit options in coronary artery bypass surgery. Chest. 1995;108(4):1150-1155.
- [2] Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, et al. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. Surgery. 1979;85(3):253-256.
- [3] Huang Y, Gloviczki P, Noel AA, et al. Early complications and long-term outcome after open surgical treatment of popliteal artery aneurysms: Is exclusion with saphenous vein bypass still the gold standard? J Vasc Surg. 2007;45(4):706-715.e1.
- [4] Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, et al. Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004;27:357-362.

- [5] Neale ML, Graham JC, Lane RJ, et al. The influence of graft type on patency of infrainguinal arterial bypass grafts. *J Am Coll Surg*. 1994;178:155-163.
- [6] 杨红军, 许海叶, 王维慈, 等. 仿生结构小口径人造血管的制备与研究[C]. 第三届全国血管外科和组织工程学术会议暨第二届全国下肢血管疾病论坛论文集, 2008.
- [7] Zheng W, Wang Z, Song L, et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials*. 2012;33(10):2880-2891.
- [8] 尹桂波. 静电纺纳米纤维支架在组织工程中的应用进展[J]. 南通纺织职业技术学院学报: 综合版, 2007, 7(2): 15-18.
- [9] Hong Y, Ye SH, Nieponice A, et al. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend. *Biomaterials*. 2009; 30: 2457-2467.
- [10] Qiu Y, Tarbell JM. Computational simulation of flow in the end-to-end anastomosis of a rigid graft and a compliant artery. *ASAIO J*. 1996;42(5):M702-709.
- [11] 向萍, 李敏. 静电纺丝制备小直径血管支架[J]. 材料导报A: 综述篇, 2011, 25(3): 132-135.
- [12] Inoguchi H, Kwon IK, Inoue E, et al. Mechanical responses of a compliant electrospun poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) small-diameter vascular graft. *Biomaterials*. 2006;27(8): 1470-1478.
- [13] Malin M, Hiljanen-Vainio M, Karjalainen T, et al. Biodegradable lactone copolymers. II. Hydrolytic study of epsilon-caprolactone and lactide copolymers. *J Appl Polym Sci*. 1996;59(8):1289-1298.
- [14] Karjalainen T, Hiljanen-Vainio M, Malin M, et al. Biodegradable lactone copolymers. III. Mechanical properties of epsilon-caprolactone and lactide copolymers after hydrolysis in vitro. *J Appl Polym Sci*. 1996;59(8):1299-1304.
- [15] Hiljanen-Vainio M, Karjalainen T, Seppälä J. Biodegradable lactone copolymers. I. Characterization and mechanical behavior of epsilon-caprolactone and lactide copolymers. *J Appl Polym Sci*. 1996;59(8):1281-1288.
- [16] Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med*. 2001;344:532-533.
- [17] Mo XM, Xu CY, Kotaki M, et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials*. 2004;25(10):1883-1890.
- [18] Mo XM, Weber HJ, Bhujji S, et al. Investigation of Biodegradable Nanofibers in Tubular Scaffolds for Tissue Regeneration. *J Med Biomech*. 2005;20:90-91.
- [19] Zhang K, Yin A, Huang C, et al. Degradation of electrospun SF/P(LLA-CL) blended nanofibrous scaffolds in vitro. *Polym Degrad Stabil*. 2011;96:2266-2275.
- [20] Chen ZG, Wang PW, Wei B, et al. Electrospun collagen-chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:372-382.
- [21] Huang C, Geng X, Qinfei K, et al. Preparation of composite tubular grafts for vascular repair via electrospinning. *Prog Nat Sci: Mater Int*. 2012;22:108-114.
- [22] 钱永芳, 莫秀梅, 柯勤飞. 明胶和壳聚糖共混静电纺[C]. 第六届中国国际纳米科技研讨会论文集, 2007.
- [23] Huang C, Chen R, Ke Q, et al. Electrospun collagen-chitosan-TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;82(2):307-315.
- [24] Su Y, Li X, Liu Y, et al. Encapsulation and Controlled Release of Heparin from Electrospun Poly(L-Lactide-co-epsilon-Caprolactone) Nanofibers. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2010 [Epub ahead of print].
- [25] Yan S, Li XQ, Tan LJ, et al. Poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating and sustained releasing proteins. *Polymer*. 2009;50:4212-4219.
- [26] Chen F, Huang P, Mo XM. Electrospinning of Heparin Encapsulated P(LLA-CL) Core/Shell Nanofibers. *Nano Biomed Eng*. 2010;2(1):84-90.
- [27] Su Y, Li X, Liu Y, et al. Encapsulation and Controlled Release of Heparin from Electrospun Poly(L-Lactide-co-epsilon-Caprolactone) Nanofibers. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2010 [Epub ahead of print].
- [28] Chen R, Li XQ, Ke QF, et al. Fabrication and characterization of collagen (shell) /thermoplastic polyurethane (core) composite nanofibers by coaxial electrospinning. *e-Polymers*. 2010; No009: 1618-7229.
- [29] Chen R, Huang C, Ke Q, et al. Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;79(2):315-325.
- [30] Stankus JJ, Soletti L, Fujimoto K, et al. Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization. *Biomaterials*. 2007; 28(17):2738-2746.
- [31] Yang X, Shah JD, Wang H. Nanofiber enabled layer-by-layer approach toward three-dimensional tissue formation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(4):945-956.
- [32] Du F, Wang H, Zhao W, et al. Gradient nanofibrous chitosan/poly varepsilon-caprolactone scaffolds as extracellular microenvironments for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(3):762-770.
- [33] 刘隽炜, 董念国. 内皮祖细胞研究进展[J]. 心血管病学进展, 2011, 32 (4):528-530.
- [34] Sayers RD, Raptis S, Berce M, et al. Long-term results of femorotibial bypass with vein or polytetrafluoroethylene. *Br J Surg*. 1998;85:934-938.
- [35] Faries PL, LoGerfo FW, Arora S, et al. A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: All-autogenous conduit versus prosthetic grafts. *J Vasc Surg*. 2000;32:1080-1090.
- [36] Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91(10):3527-3561.
- [37] Jaffe EA. Physiologic Functions of Normal Endothelial Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;454:279-291.
- [38] 李桂琼, 陈庆伟. 内皮祖细胞移植策略研究进展[J]. 心血管病学进展, 2011, 32 (3):411-414.
- [39] 赵清, 魏盟. 内皮祖细胞支架的研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2008, 7(3):251-253.
- [40] Anderson SM, Chen TT, Iruela-Arispe ML, et al. The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*. 2009;30:4618-4628.
- [41] Jun HW, West JL. Endothelialization of microporous YIGSR/PEG-modified polyurethaneurea. *Tissue Eng*. 2005; 11(7-8): 1133-1140.
- [42] McCarthy JR, Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug*

- Deliv Rev. 2008;60(11):1241-1251.
- [43] Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, et al. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133 + progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation*. 2006;114(1 suppl): 1138-144.
- [44] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287): 818-822.
- [45] 熊党生. 生物材料与组织工程[M]. 北京: 科学出版社, 2010:163.
- [46] 石海涛, 莫秀梅, 何创龙, 等. 肝素化纳米材料P(LLA-CL)的制备及其表征和抗凝血性特征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(1):10-14.
- [47] Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, et al. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*. 2001; 19(11): 1029-1034.
- [48] Singh S, Wu BM, Dunn JC. The enhancement of VEGF-mediated angiogenesis by polycaprolactone scaffolds with surface cross-linked heparin. *Biomaterials*. 2011;32(8): 2059-2069.
- [49] Nillesen STM, Geutjes PJ, Wismans R, et al. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*. 2007;28:1123-1131.
- [50] Jeon O, Song SJ, Kang SW, et al. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials*. 2007;28:2763-2771.
- [51] 赵长生. 生物医用高分子材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 33-42.
- [52] 曾伟杰, 凌友, 支晓兴. 心血管支架材料生物力学及生物相容性特征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(13): 2531-2534.
- [53] Smith MJ, McClure MJ, Sell SA, et al. Suture-reinforced electrospun polydioxanone-elastin small-diameter tubes for use in vascular tissue engineering: A feasibility study. *Acta Biomaterialia*. 2008;4:58-66.
- [54] Tillman BW, Yazdani SK, Lee SJ, et al. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*. 2009;30:583-588.
- [55] He W, Ma Z, Teo WE, et al. Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(1):205-216.
- [56] Nottelet B, Pektok E, Mandracchia D, et al. Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ε-caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89(4):865-875.
- [57] Pektok E, Nottelet B, Tille JC, et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(ε-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation*. 2008;118(24):2563-2570.

● 关于临床注册

SCI 数据库收录的外科杂志对临床试验注册的要求^③

● *ACTA Chirurgica Belgica* (《比利时外科学报》), SCI 收录杂志, ISSN: 0001-5458, 2012 年影响因子 0.359。主要发表研究原著, 综述, 技术报告, 病例报告, 给编辑的信等类型稿件。

对临床试验注册的要求: 《比利时外科学报》要求前瞻性介入性试验在北美临床试验注册中心 (www.clinicaltrials.gov) 及英国当前对

照试验注册库 (www.controlled-trials.com) 进行临床试验注册, 并在稿件摘要末尾处标注注册号。