



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03121540.8

[43] 公开日 2003年9月3日

[11] 公开号 CN 1439431A

[22] 申请日 2003.4.1 [21] 申请号 03121540.8

[71] 申请人 北京市普惠生物医学工程公司

地址 100083 北京市海淀区学院路北口三建  
公司仓库院内

[72] 发明人 胡盛寿 李胜利 汪 胜

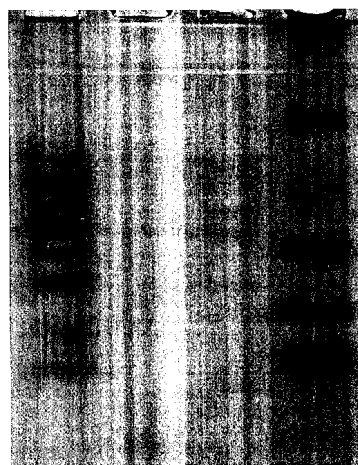
[74] 专利代理机构 北京北新智诚专利代理有限公司  
代理人 程凤儒

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 5 页

[54] 发明名称 异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法。该方法先对异种心脏植入物胶原组织进行预处理，然后将异种心脏植入物胶原组织浸泡于光氧化处理液中，并进行光照处理。由于在处理中不使用戊二醛，所以光氧化法得到的交联异种心脏植入物胶原组织，具有抗钙化性、低免疫原性和无生物毒性等优点。



1. 一种异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：对异种心脏植入物胶原组织进行预处理，然后将异种心脏植入物胶原组织浸泡于光氧化处理液中，并进行光照处理。

2. 根据权利要求1所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的预处理采用10-30wt%蔗糖PBS液，PH值在6.8-8.6之间，渗透压为393-800mosm，处理温度为0-20℃，处理时间为10-16小时。

3. 根据权利要求1所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光氧化处理液由光氧化催化剂和PBS液混合而成，光氧化剂浓度为0.01-0.1wt%，光氧化处理液的PH值为6.8-8.6。

4. 根据权利要求3所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光氧化催化剂可以是美蓝、亚甲绿、孟加拉玫瑰红、核黄素、原黄素、荧光素、伊红和5磷酸吡哆醛中的一种。

5. 根据权利要求3所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光氧化处理液的PH值为7.4-8.0。

6. 根据权利要求3所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光氧化催化剂是美蓝。

7. 根据权利要求1所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光氧化处理液和异种心脏植入物胶原组织的重量比为10:1至30:1。

8. 根据权利要求1所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光照处理中，氧体积比浓度为0-25%，处理温度为0-25℃，光照的强度为100-20000流明小时。

9. 根据权利要求8所述的异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法，其特征在于：所述的光照处理中，氧体积比浓度为5-20%。

## 异种心脏植入物胶原组织的光氧化方法

### 技术领域

5 本发明涉及一种胶原组织的交联方法。

### 背景技术

10 目前，对异种心脏植入物胶原组织进行交联处理的目的是为了得到人工心脏瓣膜。这种由动物胶原组织得到的人工心脏瓣膜，又常称为异种生物瓣。交联方法主要是加入化学交联剂。交联剂通过掺入到蛋白质的构架中，使蛋白质的赖氨酸、羟基赖氨酸以及其它的氨基酸的氨基交联而起作用。通常使用的交联剂主要有甲醛、戊二醛，还可以使用邻苯二甲酰、半己二酰、硫醇等。其中，以戊二醛最为常见。其机理主要是通过对胶原组织的氧化，产生二硫键而起作用。

15 这种方法存在一些局限性，如容易钙化，具有生物毒性，耐久性较差，因而不能达到使用要求。中国专利 ZL 92100096.0 对这种方法进行了改进。该专利公开了一种先以戊二醛进行预处理，然后以羟基铬溶液对异种生物瓣进行交联处理的方法。虽然，得到的生物瓣的性能有所改进，但耐久性差的问题并没有得到根本的解决。

20

### 发明内容

本发明的目的是提供一种光氧化方法，对异种心脏植入物胶原组织进行交联处理，以得到性能优异的异种生物瓣。

25 为实现上述目的，本发明采取以下方案：首先对异种心脏植入物胶原组织进行预处理，以增强交联组织的抗降解性。然后，将异种心脏植入物胶原组织浸泡于光氧化处理液中，并进行光照处理。

在光氧化处理后，还需要碘复合溶液（0.1wt%碘、0.1wt%碘化钠、0.1wt%碘化钾 PBS 溶液）消毒，并保存于 50wt%酒精溶液中。

30 本发明主要是用于异种心脏植入物胶原组织，如牛心包、猪心包、猪主动脉瓣和牛颈静脉等。一般来说，含有酪氨酸、色氨酸和组氨酸残基的蛋白类物质易于用此方法固定。

本文所称的 PBS 液，为磷酸缓冲溶液。

预处理采用 10-30wt%蔗糖 PBS 液，PH 值在 6.8-8.6 之间，渗透压为 393-800mosm。处理温度为 0-20℃，处理时间为 10-16 小时。

光氧化催化剂可以是美蓝、亚甲绿、孟加拉玫瑰红、核黄素、原黄素、荧光素、伊红和 5 磷酸吡哆醛中的一种。将光氧化催化剂与 PBS 液混合即可配制光氧化处理液。光氧化催化剂浓度为 0.01-0.1wt%。光氧化处理液和异种心脏植入物胶原组织的重量比为 10:1 至 30:1。

在进行光氧化处理时，氧体积比浓度为 0-25%，优选为 5-20%；处理温度为 0-25℃，光照的强度在 100-20000 流明小时。

10 因为酸性的环境容易使蛋白质变性，所以光氧化处理液应为中性或碱性。即，PH 值应在 6.5 以上，优选 PH 值为 6.8-8.6，最优选 PH 值为 7.4-8.0。

交联物的评价方法如下：

1. 消化实验包括把交联物和化学消化剂或胃蛋白酶等一起孵育，随后离心，上清液电泳，提示这种交联方法固定的组织有很好的生物稳定性。

15 2. 鼠皮下埋植试验，把材料埋植于大鼠皮下，分别在第 4 周和第 12 周取出材料，了解组织是否被吸收，进行钙含量测定，组织学检查了解炎性浸润程度。进一步证明光氧化固定的组织具有生物稳定性，抗钙化性，低免疫原性。

3. 内皮细胞种植试验，证明光氧化固定的材料没有细胞毒性。

20 把光氧化固定的瓣膜或管道植入大动物如狗、羊体内，监测血液动力学性能，6 个月至 1 年之后取出，进行大体观察及组织学检查、钙含量测定等。证明光氧化法固定的材料与戊二醛固定的材料相比，具有抗钙化性、低免疫原性和无生物毒性。

25 本发明的优点是：以光氧化方法对异种心脏植入物胶原组织进行交联处理，处理中不使用戊二醛。因而，光氧化法得到的交联胶原组织，具有抗钙化性、低免疫原性和无生物毒性等优点。

## 具体实施方式

### 1.试剂配制

#### 1) PBS 溶液

30 称取 NaCl(A.R)16 克，KCl(A.R)0.4 克，NaHPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O(A.R)3.12 克，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(A.R)0.4 克，加于 2000ml 容量瓶后加去离子水至刻度线。

#### 2) 美蓝 PBS 溶液

2 克美蓝 (A.R) 加 PBS 液至 200ml。

## 2. 材料的制备

取新鲜的牛颈静脉, 冲洗掉残余的血液, 去除表面的脂肪和疏松结蒂组织, 4℃条件下, PBS 液浸泡 12 小时。

5

## 3. 处理过程

1) 预处理, 材料浸泡于 20%蔗糖 PBS 液, 4℃条件下 12 小时, PBS 液冲洗。

2) 预处理之后的材料浸泡于 0.1wt%美蓝 PBS 溶液, 置于恒温水浴, 4℃, 10 150 瓦白炽灯, 离液面 7 厘米, 光照 96 小时。

3) 氧化之后的材料, 先使用 PBS 溶液冲洗, 脱去残留的美蓝及残渣。然后经碘复合溶液消毒后, 保存于 50wt%酒精溶液备用。

## 4. 交联物的评价

15 光氧化固定后的牛带瓣颈静脉经化学和酶消化之后的上清液电泳之后出现极淡的蛋白条带, 明显淡于新鲜的未处理的材料, 戊二醛固定的材料几乎不出现蛋白条带, 如图 1 所示。

图 1 中, 第一条带是新鲜牛颈静脉组, 第二条带是戊二醛固定组, 第三条带是光氧化固定组, 第四条带是蛋白标记物。

20 皮下埋植 3 周后, 经钙含量测定, 光氧化组显著低于戊二醛组, 统计学上差异有显著性意义, 如图 2 所示。

钙染色, 戊二醛组可见大量的钙沉积, 光氧化组只见少量钙沉积。详见图 3 和图 4。其中, 图 3 为戊二醛固定组, 图 4 为光氧化固定组。

25 组织学检查提示光氧化组细胞浸润明显少于其他两组 (图 5 为光氧化固定组, 图 6 为新鲜牛颈静脉组, 图 7 为戊二醛固定组)。细胞种植实验提示细胞在光氧化固定牛颈静脉血管片生长良好 (图 8)。



图 1

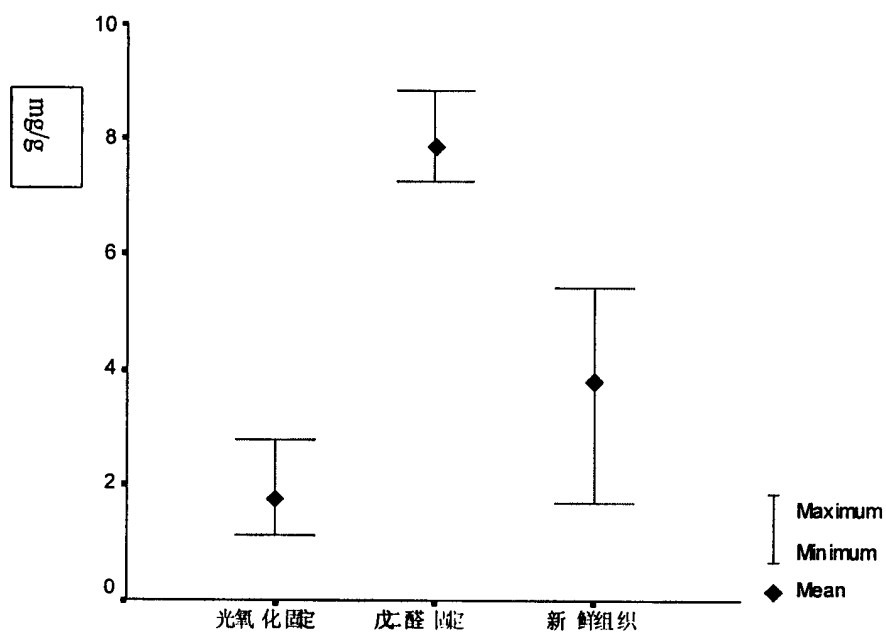


图 2

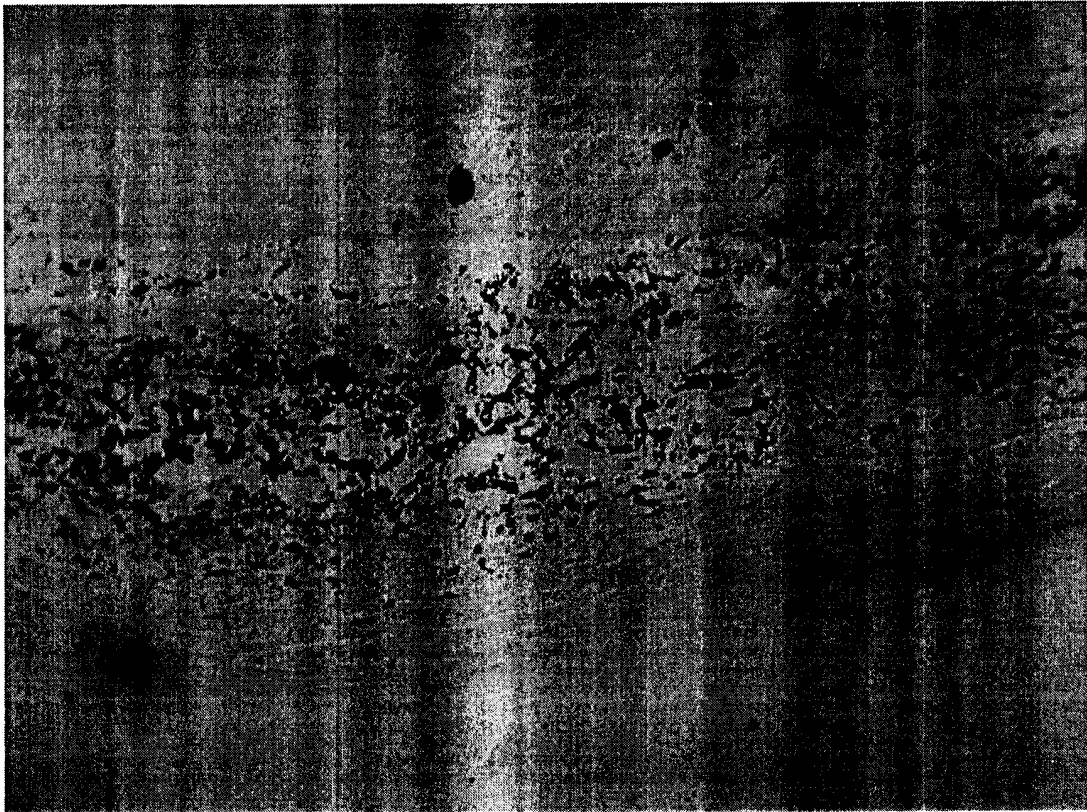


图 3

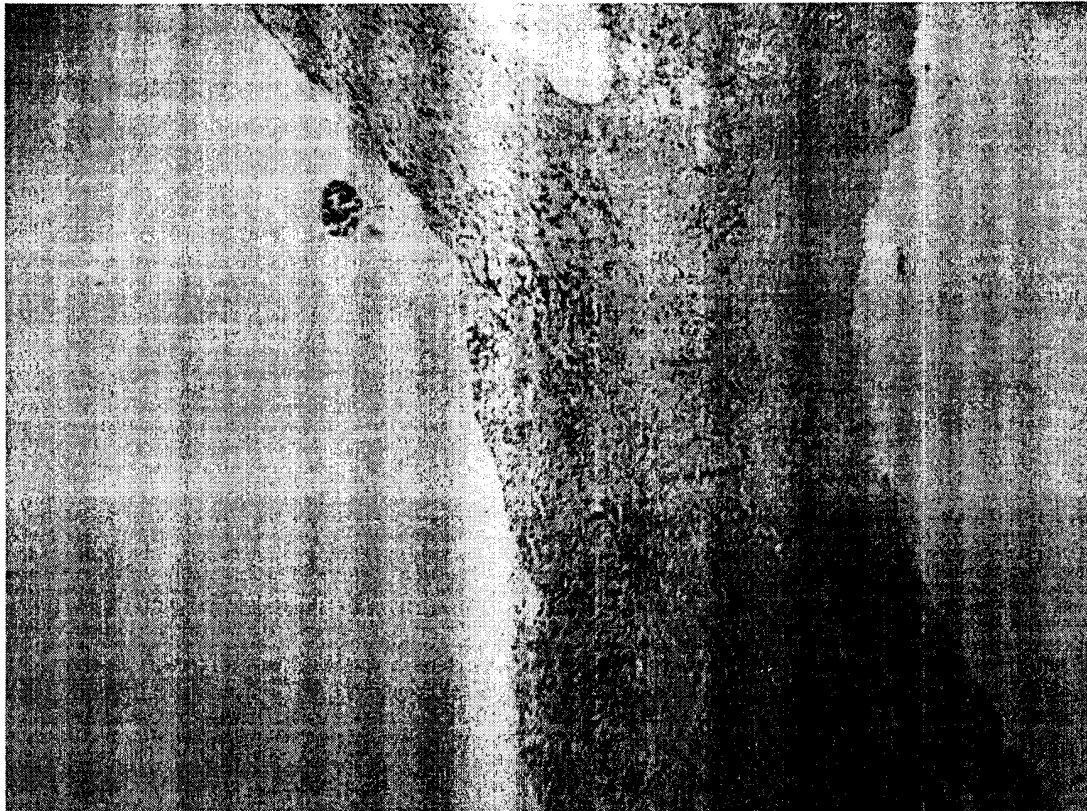


图 4



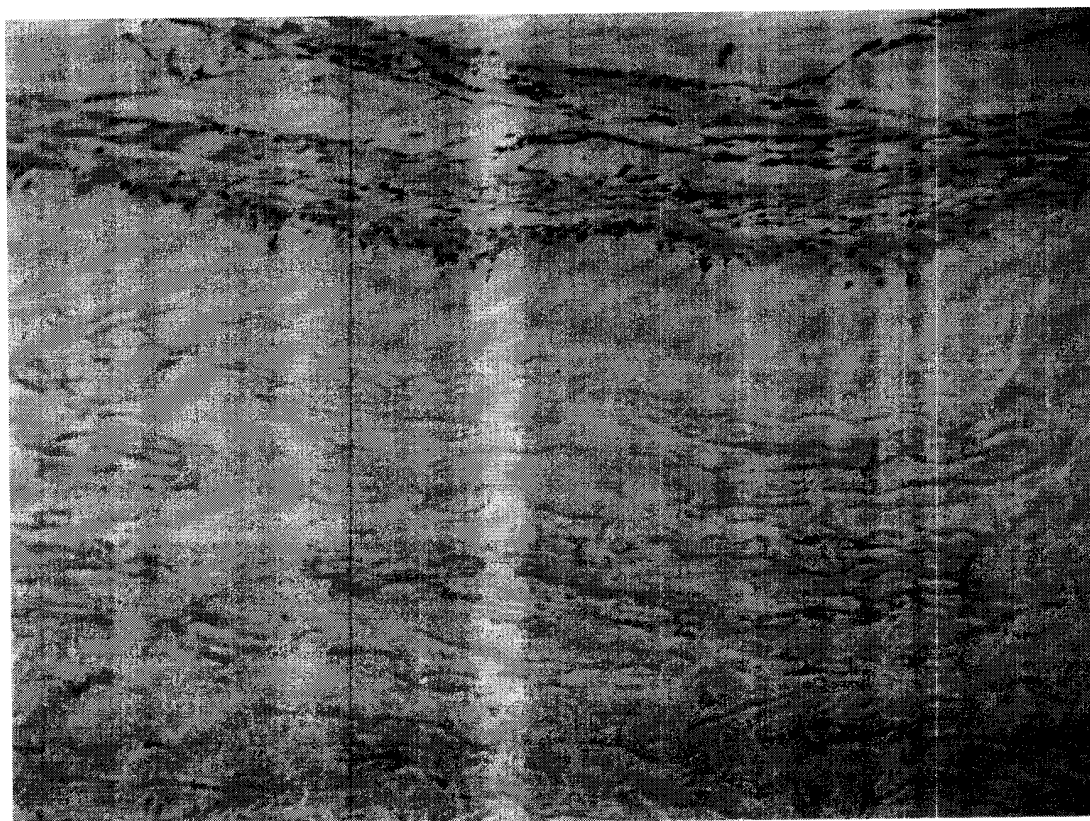


图 5

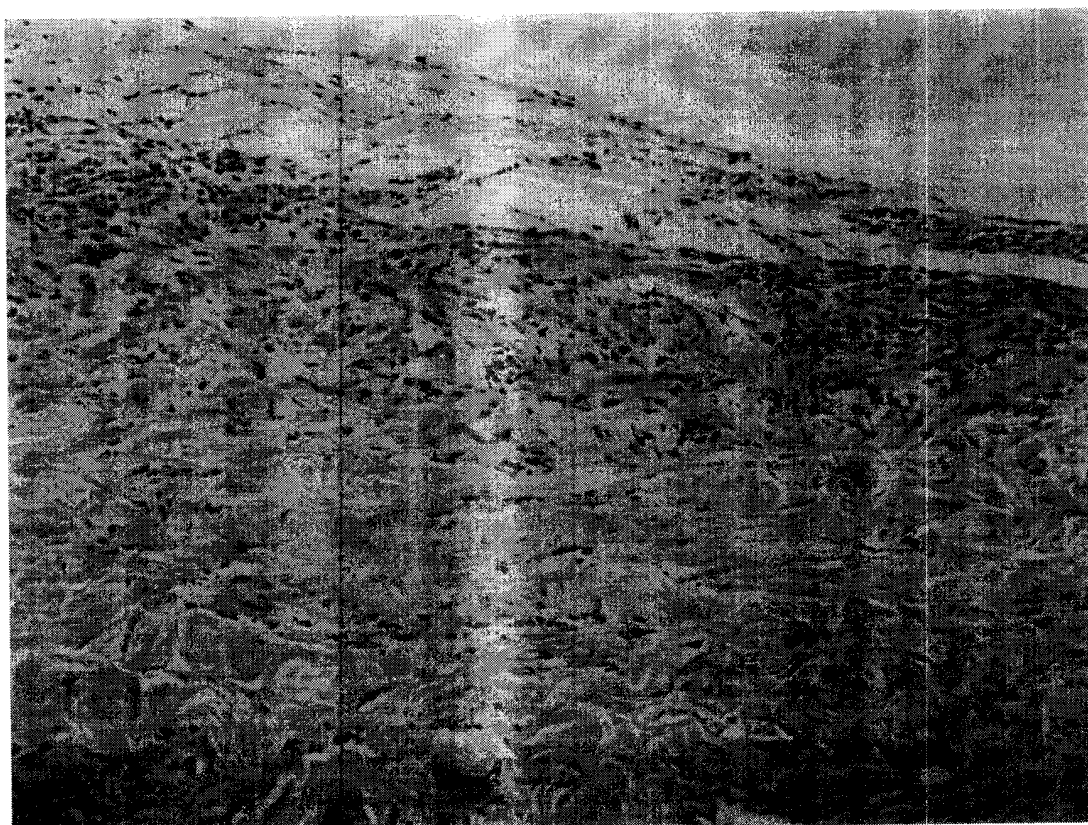


图 6

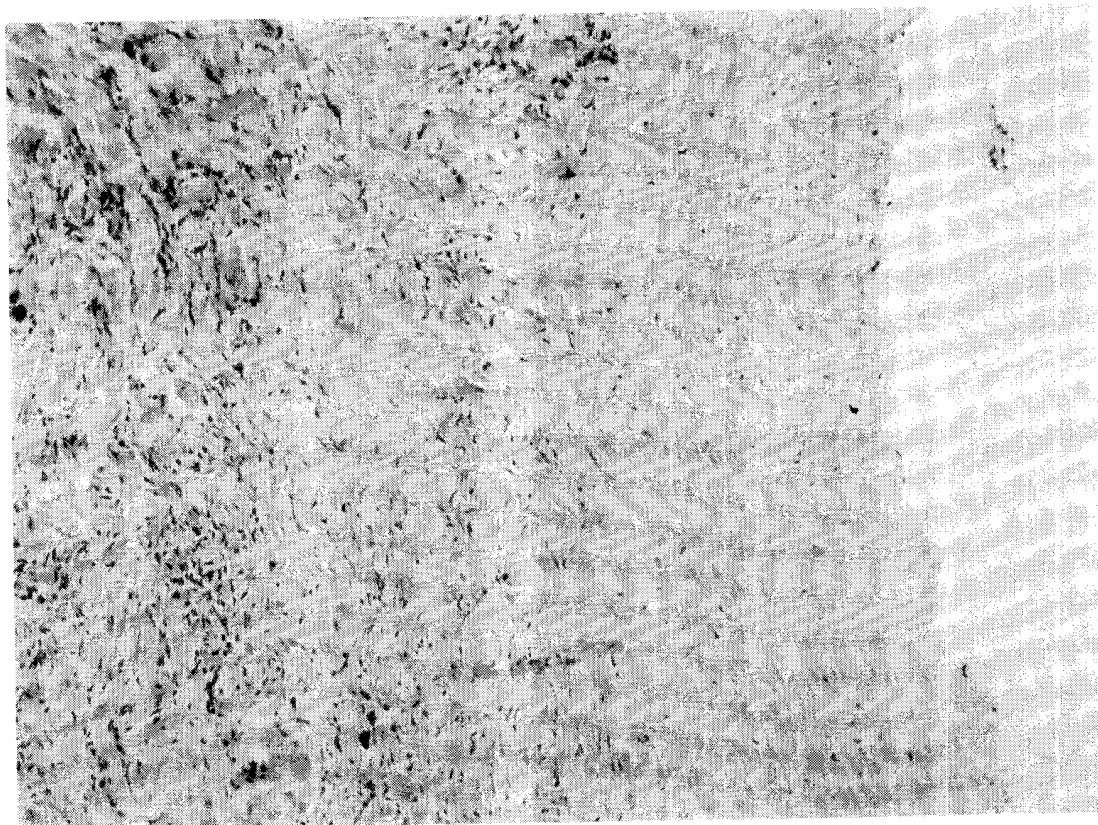


图 7

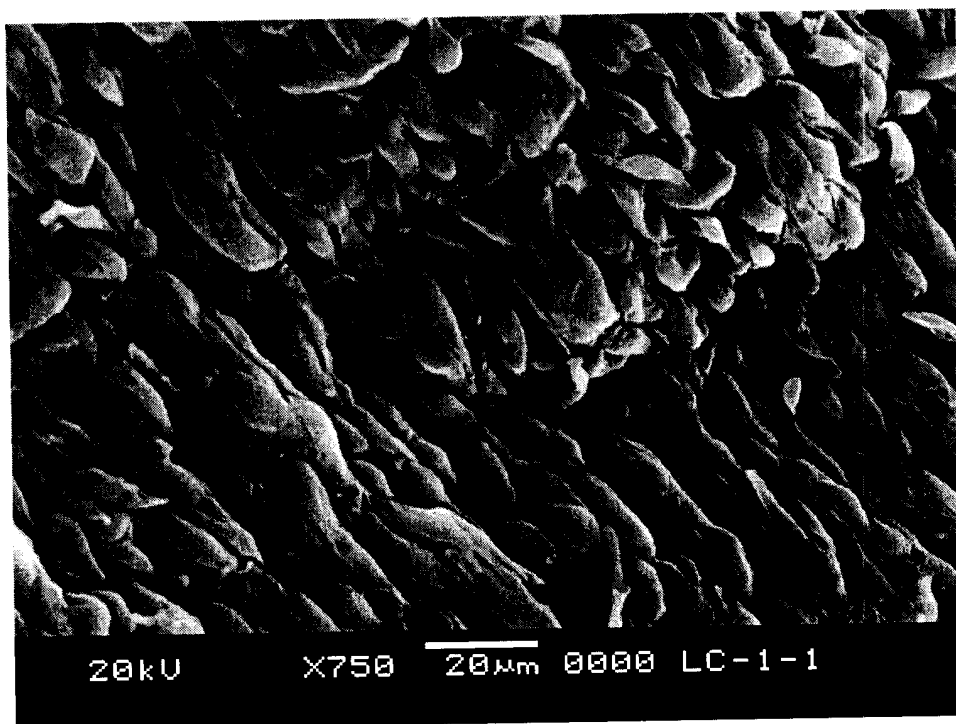


图 8