

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610095120.X

A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61F 2/82 (2006.01)

[43] 公开日 2007年3月14日

[11] 公开号 CN 1927413A

[22] 申请日 2006.9.13

[21] 申请号 200610095120.X

[71] 申请人 重庆大学

地址 400030 重庆市沙坪坝区沙坪坝正街174号

[72] 发明人 王贵学 赵宏伟 罗来龙 江涛

[74] 专利代理机构 重庆华科专利事务所

代理人 康海燕

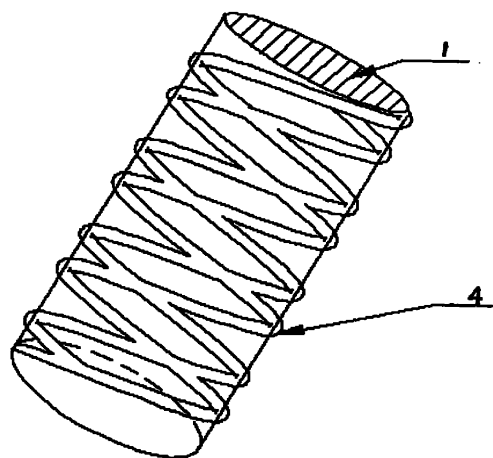
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

[54] 发明名称

羊膜基质覆膜血管内支架及制备方法

[57] 摘要

本发明提供一种羊膜基质覆膜血管内支架及制备方法，是对血管内支架进行覆膜修饰并进行内皮细胞种植处理，防止以至解决其术后再狭窄问题的发生。支架由血管内支架、覆盖在血管内支架上的羊膜基质以及种植在羊膜基质上的内皮细胞构成，具体方法是把羊膜通过“去细胞”处理，使其成为仅保留基底膜与致密层的生物膜材料，通过一定的工艺使其覆盖修饰血管内支架，使支架内表面形成一光滑、平整的薄膜层，然后进行内皮细胞种植，使血管内支架内表面形成内皮细胞的衬里，具有一个血管样的内层，使支架表面接近于血管内壁，增加生物相容性和血液相容性。为改善或解决支架植入术后的再狭窄问题提供一条新的途径。本发明为覆膜支架提供了一种新的生物膜材料来源，并进行体外内皮细胞种植，显著提高内皮细胞在血管内支架上的粘附率。



1、一种羊膜基质覆膜血管内支架，其特征在于：它由血管内支架、覆盖在血管内支架上的羊膜基质以及种植在羊膜基质上的内皮细胞构成。

2、制备权利要求1所述的羊膜基质覆膜血管内支架的方法，其步骤如下：

① 制备羊膜基质；

② 在羊膜基质的底膜上进行内皮细胞种植，获得内皮化处理的羊膜基质；

③ 用羊膜基质覆盖修饰血管内支架。

3、根据权利要求2所述的方法，其中步骤③需用的材料有橡胶棒、血管内支架、内皮化处理的羊膜基质、硝酸纤维素膜，制作过程如下：

A、首先使橡胶棒周长与支架内径相当，然后把内皮化处理的羊膜基质上皮面正面向于硝酸纤维素膜，贴附于硝酸纤维素膜上，精确裁剪羊膜，使其长度略长于橡胶棒周长0.5~1.0 mm，宽度与血管内支架的长度等同，而硝酸纤维素膜的长度恰好等于橡胶棒周长，即比已处理羊膜基质长度短0.5~1.0 mm，待用；

B、在橡胶棒中央部分涂上一层粘合剂，把附有羊膜基质的硝酸纤维素膜粘合在上面，正好可以围绕橡胶棒一周，多余出来0.5~1.0 mm的羊膜基质部分用医用粘合胶使其连接在一起；

C、分别在羊膜基质向外的一面和血管内支架内表面涂上一层医用粘合胶，然后把血管内支架套在已附有羊膜基质的橡胶棒外面；

D、待羊膜基质与血管内支架充分粘合后，把血管内支架和整个橡胶棒浸入已灭菌的PBS液中，轻轻拨开羊膜基质与硝酸纤维素膜，使其出现空隙，慢慢分离，然后取出橡胶棒，羊膜基质即被覆盖在了血管内支架上。

羊膜基质覆膜血管内支架及制备方法

技术领域

本发明涉及对血管内支架进行覆膜修饰并进行内皮化处理，为防止以至解决血管内支架植入术后引发的再狭窄问题提供新的思路，属于医疗器械技术领域。

背景技术

心脑血管疾病是严重危害人类健康的一大类疾病，在发达国家被称为“头号杀手”，在此背景下，血管内支架因其独特的成型性和生物相容性成为治疗心血管疾病的重要手段，在国内外被广泛应用。但支架本身具有致凝性，其植入几个月后，仍有 25—30%的再狭窄率，1 年内的再狭窄率可高达 40%，至今仍是一个未被解决的难题。因此，防止支架植入术后再狭窄问题已成为目前的重要研究方向。国内外进行了许多相关的实验研究，主要集中在新材料的合成、材料表面的生物学改性，支架表面药物涂层和内皮细胞种植等方面。最近还研制了一种覆膜支架，即支架内面或外面部分或完全覆盖不透血液的膜性材料。覆膜支架的应用为防治支架植入术后再狭窄提供了一种新的方法，不但可以通过膜的机械性阻隔，阻止局部组织的弹性回缩，而且可以作为各种药物、内皮细胞及放射性核素的载体防治血栓形成和内膜增生。

目前报道覆膜血管内支架的种类主要有聚合物膜支架、药物包膜支架和生物膜支架，不同程度取得了良好的实验和临床效果，但也仍然存在着一些问题。如聚合物膜支架显著地增加了与血液接触的表面积，若处理不当，会导致更严重的血栓形成和平滑肌细胞的过渡生长，并会出现膜材料的老化降解现象；药物包膜支架对药物涂层的种类、载药量、缓释特性等问题仍需进一步的探讨和改进；生物膜支架是最具发展潜力的一种覆膜支架类型，膜材料主要包括自体或异体静脉、肌体浆膜结构及高强度胶原纤维等，其来源有限且来源途径可能会对人体造成一定的伤害。所以选择更好的覆膜材料来源成为改进覆膜支架应用的主要研究方向。

发明内容

本发明的目的是研发一种新的生物膜血管支架，针对目前生物膜支架覆膜材料来源有限且来源途径可能会对人体造成一定伤害的现状，提供一种新的生物膜材料的来源途径，并以其为内皮细胞生长的载体对血管内支架进行内皮化处理，提高内皮细胞在支架上的粘附率。

人羊膜去除羊膜上皮后保留的基膜及基质层称为羊膜基质，去除羊膜上皮的方法有机械法和化学浸泡法，其中化学浸泡法应用最多，效果良好（参见文献：Davis GE, Blaker SN. 人羊膜负载生长性神经元轴突的体内和体外实验. *Science*, 1987, 263: 1106-1109）；羊膜基质具有薄而透明、无抗原性，在体内可促进细胞的粘附生长和增殖等特性，并且来源广泛（参见文献：Adinolfi M, Akle C A, McColl I, et al.

HLA 抗原, b2-微球蛋白和酶在人羊膜上皮细胞的表达. *Nature*, 1982, 295:325-327; Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, et al. 异体移植实验中人羊膜的免疫原性. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 1539-1546; Kozum iN, Fullwood NJ. 角膜上皮细胞在完整羊膜和去细胞羊膜上的培养. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41(9): 2506; 何清义, 陈秉礼, 王智彪 等. 人羊膜细胞外基质与成纤维细胞体外培养的实验研究, *中华整形外科杂志*, 2002, 18(4): 229-231)。羊膜及羊膜基质已用于缺损组织、眼部组织修复, 并作为细胞支撑材料在组织工程中得到初步应用, 因此羊膜基质可能会成为覆盖修饰血管内支架的良好的新的生物膜性材料 (参见文献: Kim J S, Kim J C, Na B K, et al. 急性角膜碱性灼伤愈合中羊膜修补促进愈合抑制蛋白酶活性. *Exp Eye Res*, 2000, 70: 329-337; 闫国和, 粟永萍, 艾国平等. 人羊膜负载猪骨髓间充质干细胞生长的形态学研究. *中国临床康复*, 2002, 24(7): 775 - 778)。

鉴于羊膜基质的独有特性, 本发明首先提出了一种羊膜基质覆膜血管内支架, 它由血管内支架、覆盖在血管内支架上的羊膜基质以及种植在羊膜基质上的内皮细胞构成。

进一步, 本发明提出了获得这种支架的方法:

本发明的技术思路是把获取羊膜首先进行“去细胞”处理, 然后运用组织工程原理, 进行内皮细胞种植, 使其形成内皮细胞的衬里, 再通过一定的工艺使其覆盖修饰血管内支架, 使支架内表面形成一光滑、平整的薄膜层, 具有一个血管样的内层, 使支架表面接近于血管内壁, 增加生物相容性和血液相容性。

具体步骤如下:

- 1 制备羊膜基质: 取羊膜采用现有的方法制备, 如参见文献: Davis GE, Blaker SN. 人羊膜负载生长性神经元轴突的体内和体外实验. *Science*, 1987, 263: 1106-1109; 罗静聪, 李秀群, 杨志明 等. 脱细胞羊膜的制备及其生物相容性研究. *中国修复重建外科杂志* 2004, 18(2): 108-111。羊膜为胎膜内层, 自外向内分5层: 上皮细胞层, 基底膜, 致密层, 纤维母细胞层和海绵层。“去细胞”羊膜基质, 即羊膜基质, 是去除羊膜上皮细胞层、纤维母细胞层和海绵层, 仅保留基底膜与致密层的生物膜材料, 其主要成分是胶原纤维和网状纤维。
- 2 在羊膜基质的底膜上进行内皮细胞种植, 获得内皮化处理的羊膜基质: 内皮细胞种植的方法也是现有的, 如参见文献: 傅瑶, 范先群, 刘伟 等. 以羊膜为载体培养角膜内皮细胞的实验研究. *眼科研究*, 2003, 21(2): 147-149; 许丽英, 郑建梁, 李家灵 等. 人结膜上皮细胞在不同浓度甘油羊膜表面负载培养的研究. *解剖学研究*, 2001, 23(4): 306-307。
- 3 用羊膜基质覆盖修饰血管内支架;

需用的材料有橡胶棒、血管内支架、内皮化处理的羊膜基质、硝酸纤维素膜, 制作过程如下:

A、首先使橡胶棒周长与支架内径相当, 然后把内皮化处理的羊膜基质上皮面正面向于硝酸纤维

素膜，贴附于硝酸纤维素膜上，精确裁剪羊膜，使其长度略长于橡胶棒周长 0.5~1.0 mm，宽度与血管内支架的长度等同，而硝酸纤维素膜的长度恰好等于橡胶棒周长，即比已处理羊膜基质长度短 0.5~1.0 mm，待用；

B、在橡胶棒中央部分涂上一层粘合剂，把附有羊膜基质的硝酸纤维素膜粘合在上面，正好可以围绕橡胶棒一周，多余出来 0.5~1.0 mm 的羊膜基质部分用医用粘合胶使其连接在一起；

C、分别在羊膜基质向外的一面和血管内支架内表面涂上一层医用粘合胶，然后把血管内支架套在已附有羊膜基质的橡胶棒外面；

D、待羊膜基质与血管内支架充分粘合后，把血管内支架和整个橡胶棒浸入已灭菌的 PBS 液中，轻轻拨开羊膜基质与硝酸纤维素膜，使其出现空隙，慢慢分离，然后取出橡胶棒，羊膜基质即被覆盖在了血管内支架上。

本发明的主要优点在于：①提出了一种新的覆膜支架的膜性材料来源，羊膜基质不但具有生物膜材料的优点，而且克服了其来源有限或对人体会产生一定伤害的缺点；②不但可进行血管内皮细胞的种植，还可进行内皮祖细胞或骨髓间充质干细胞的种植，使其在羊膜基质上分化为血管内皮细胞，以达到使血管内支架内皮化的目的。

附图说明

下面结合附图对本发明进行进一步的说明：

图 1 是羊膜经过“去细胞”处理，经 HE 染色后的结果，可见羊膜上皮细胞已被完全去除，镜下羊膜基质为网状结构，可见大量浅红色胶原，无蓝染核物质。

图 2 是内皮细胞种植于羊膜基质 4 h 经染色后观察到的结果，可见细胞核圆，色淡蓝，胞浆丰富，色浅红。因为细胞尚未长满，所以可看到只被伊红染为粉色的羊膜基质。

图 3 是种植内皮细胞 3~5 d 融合成片形成单层后的形态，可见其成不规则多角形，排列紧密，成典型铺路石状排列。

图 4 是羊膜基质覆盖修饰血管内支架的工艺流程示意图。

图 5 是被羊膜基质覆盖修饰后形成的新的覆膜支架模式图。

具体实施方式

第一步：制备羊膜基质

① 羊膜的获取：羊膜来源于肝炎病毒抗体、梅毒抗体及 HIV 均为阴性的剖腹产妇的胎盘组织，通过羊膜与绒毛膜间的潜在间隙钝性分离，生理盐水冲洗 3 次，然后用含 0.1% 庆大霉素及二性霉素 B 平衡盐液浸泡 15min，将羊膜与绒毛膜剥离干净，上皮面向上平铺于硝酸纤维素膜，纯甘油获得光滑、透明、无血管的羊膜，纯甘油 4℃ 保存法。

② 羊膜的“去细胞”处理:

i) 0.25%胰酶消化: 放入电热恒温水浴锅中 37℃消化 15 min, 刮去残留的上皮细胞。

或 ii) 0.25%胰酶+0.02%EDTA 混合消化液消化: 同样放入电热恒温水浴锅中 37℃消化 15 min 刮去残留的上皮细胞。

第二步: 羊膜基质的内皮化修饰: 以羊膜基质为内皮细胞粘附的载体进行内皮化处理。采用人脐静脉内皮细胞株 ECV 304, RPMI 1640 培养基, 细胞在 5%CO₂ 培养箱中 37℃孵育培养并传代。将制备好的羊膜基质, 用紫外线灯照射 15 min, 滴加 10%小牛血清预湿 10 min, 吸出弃掉。将传代培养的内皮细胞用 0.25%胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液, 以 $2.0\sim 3.0\times 10^4$ 个/ml 的细胞密度滴加 2ml 于制备好的羊膜基底膜上。然后补充 RPMI 1640 培养液, 置入 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。

第三步: 羊膜基质覆盖修饰血管内支架:

参见图 4, 选用工具和材料橡胶棒 3、血管内支架 4、内皮化处理的羊膜基质 1、硝酸纤维素膜 2, 把经过高压消毒灭菌的橡胶棒和血管内支架等放入超净工作台, 紫外线照射 30 min, 然后严格按照无菌原则, 所有步骤均在超净工作台中进行操作。具体步骤为:

① 首先使橡胶棒周长与支架内径相当, 然后把羊膜基质 1 上皮面正面向于硝酸纤维素膜 2, 使其贴附于硝酸纤维素膜上, 精确裁剪羊膜, 使其长度略长于橡胶棒周长 0.5~1.0 mm, 宽度与血管内支架的长度等同, 而硝酸纤维素膜的长度恰好等于橡胶棒周长, 即比已处理羊膜长度短 0.5~1.0 mm, 放置一边待用。

② 在橡胶棒 3 中央部分涂上一层粘合剂, 小心的把附有羊膜基质 1 的硝酸纤维素膜 2 粘合在上面, 正好可以围绕橡胶棒 3 一周。多余出来 0.5~1.0mm 的羊膜基质部分用医用粘合胶使其连接在一起。

③ 分别在羊膜基质 1 向外的一面和血管内支架 4 内表面涂上一层医用粘合胶, 然后把血管内支架 4 小心地套在已附有羊膜基质的橡胶棒 3 外面, 静置 10 min。

④ 待羊膜基质 1 与血管内支架 4 充分粘合后, 把整个橡胶棒 3 浸入已灭菌的 PBS 液中, 用细针轻轻拨开羊膜与硝酸纤维素膜, 使其出现空隙, 慢慢分离, 然后取出橡胶棒。取出已被有羊膜基质覆盖的血管内支架, 得到的结构见图 5。

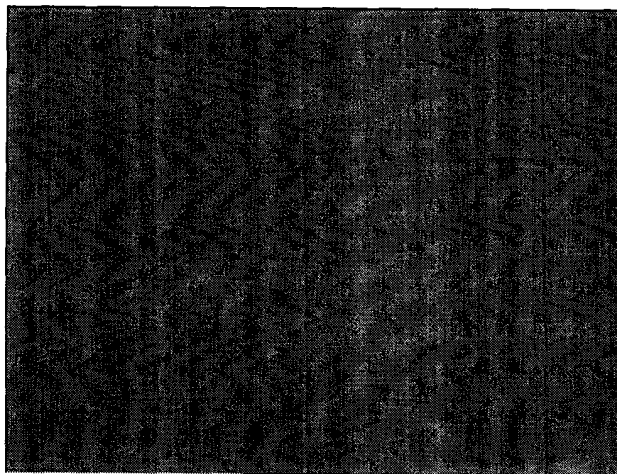


图 1



图 2

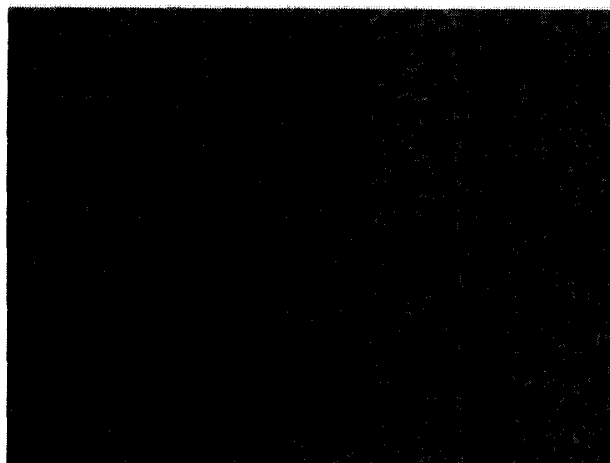


图 3

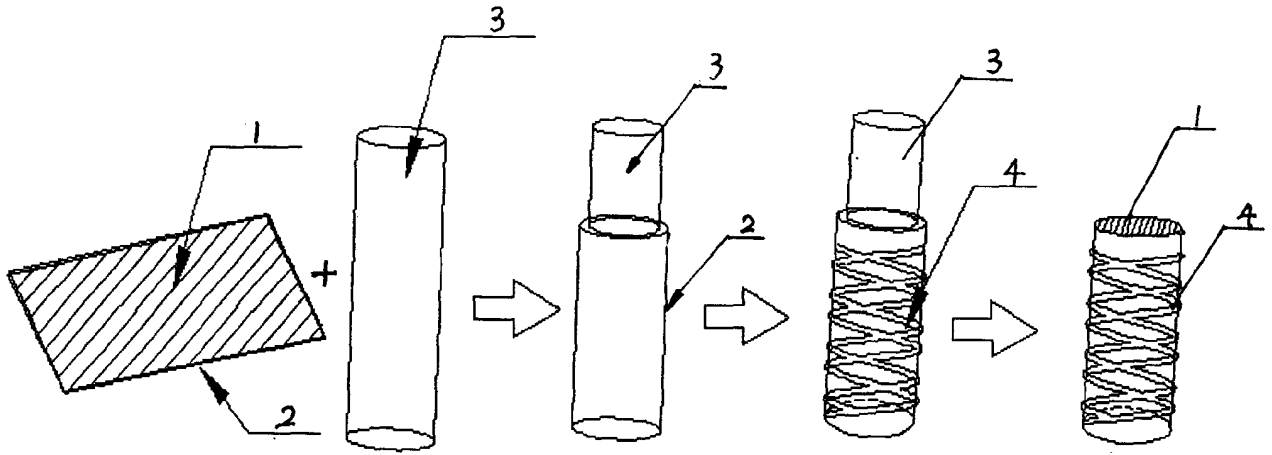


图 4

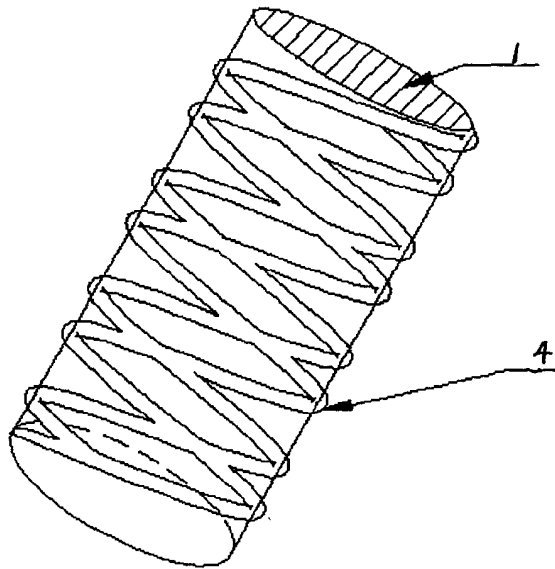


图 5