

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61F 2/24

A61L 27/54 A61L 27/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02145458.2

[43] 公开日 2003 年 4 月 16 日

[11] 公开号 CN 1410036A

[22] 申请日 2002.11.15 [21] 申请号 02145458.2

[71] 申请人 谭 强

地址 200030 上海市徐汇区虹桥路 550 号  
2005 室

[72] 发明人 谭 强

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 组织工程化瓣膜

[57] 摘要

本发明属生物医学工程领域，具体涉及一种组织工程化瓣膜及其制备方法。本发明采用脱细胞基质作为可降解支架材料，提取血管内皮细胞及成纤维细胞作为种子细胞，由经培养和传代，种植于可降解支架材料，制成组织工程化瓣膜。本发明的可降解支架材料其生物相容性好、易于种植细胞，并能保存正常组织的天然结构和组织强度。本组织工程化瓣膜组织是一种具有正常瓣膜组织组织结构，并可自我更新，自我修复的活组织。无抗原性，不会引起免疫排斥反应。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、 一种组织工程化瓣膜，其特征是按下述方法制备：  
通过多种途径提取种子细胞，进行体外培养、传代和增殖后，分步种植于可降解支架材料，构建成组织工程化瓣膜。
- 2、 按权利要求 1 所述的组织工程化瓣膜，其特征是所述的可降解支架材料是脱细胞基质。
- 3、 按权利要求 1 所述的组织工程化瓣膜，其特征是所述的种子细胞是血管内皮细胞和成纤维细胞。
- 4、 按权利要求 1 和 2 所述的组织工程化瓣膜，其特征是所述的脱细胞基质是同种异体和异种瓣膜组织脱细胞基质，心包组织脱细胞基质和血管组织脱细胞基质。
- 5、 按权利要求 1 和 3 所述的组织工程化瓣膜，其特征是所述的血管内皮细胞来源于骨髓，静脉血管、动脉血管和脂肪组织。
- 6、 按权利要求 1 和 3 所述的组织工程化瓣膜，其特征是所述的成纤维细胞来源于骨髓和皮下结缔组织。
- 7、 按权利要求 1 所述的组织工程化瓣膜，其特征是所述瓣膜制备方法是先接种成纤维细胞于支架材料上，制成成纤维细胞---支架材料复合物，再于复合物表面接种血管内皮细胞。
- 8、 根据权利要求 1 所述的组织工程瓣膜，其特征是种子细胞接种密度为  $1 \times 10^5$ --- $10^8$ /CM。

组织工程化瓣膜包含血管内皮细胞及成纤维细胞两类种子细胞，目前重建瓣膜实验需取患者大段血管，再通过复杂的技术分离成纤维细胞及内皮细胞，故无法摆脱以创伤修复创伤的模式。此外众所周知体细胞体外培养难度极大，一般传几代即发生变性，而构建瓣膜需要大量血管内皮细胞。对此，既往研究重点大多放在胚胎干细胞与端粒酶上，但前者面临伦理学的异议，后者因其可能诱发肿瘤而鲜有问津。

目前认为，组织工程支架材料有如下作用：1) 维持组织结构的完整性并防止变形，2) 作为屏障抑制周围组织的过度再生，3) 作为细胞迁移和增殖的支架，4) 通过与细胞表面细胞受体的相互作用促进细胞增殖和分化。理想的支架材料应具备良好的细胞相容性、组织相容性、与细胞生长速率相匹配的降解速率及一定的强度和可塑性。既往多利用聚羟基乙酸（PGA）等合成高分子降解材料，但其生物相容性和细胞亲和性不甚理想。

## 发明内容

本发明的目的是克服上述技术难点，体外构建一种组织工程化瓣膜。本发明通过多种途径提取种子细胞，将所得种子细胞进行体外培养、传代和增殖后，分步种植于脱细胞基质，构建成组织工程化瓣膜。

本发明采用脱细胞基质作为可降解支架材料。其生物相容性好、易于种植细胞，并能保存正常组织的天然结构和组织强度。

本发明通过多种途径提取种子细胞。所述种子细胞为内皮细胞和成纤维细胞。

本发明通过提取骨髓血管内皮细胞，静脉、动脉血管血管内皮细

## 组织工程化瓣膜

### 技术领域

本发明属生物医学工程领域，具体涉及一种组织工程化瓣膜及其制备方法。

### 背景技术

心脏瓣膜置换术是心外科常用手术，目前临床上所用的人工瓣膜有机械瓣、生物瓣两类。接受机械瓣者需终生抗凝以减少血栓栓塞并发症，近期有统计显示其10年生存率仅60%，主要死因是瓣膜脱离、卡阻和抗凝引起凝血功能障碍导致的并发症。生物瓣无须终生抗凝，五年生存率高达100%，但其耐久性差，易于发生钙化，8-10年后因退行性变需再次手术。目前随着微创手术技术的发展及组织工程概念的提出，新型的组织工程化生物瓣成为各国研究的重点。

组织工程学应用生命科学和工程学的原理和方法，研究、开发用于修复、增进或改善人体各种组织或器官损伤后功能和形态的生物替代品。所述生物替代品的基本制备方法是将细胞经体外扩增后与可降解生物材料相结合形成细胞—可降解生物材料复合体，用以替代受损组织器官。它具有形成具有生命力的活体组织，少量细胞修复大块缺损，并可按组织、器官缺损情况任意塑型等特点。就组织工程化心瓣膜而言，目前尚存在血管内皮细胞来源及寻找合适的可降解支架材料两大技术难点。

胞，脂肪组织毛细血管内皮细胞得到内皮细胞种子细胞；通过提取骨髓成纤维细胞，皮下结缔组织成纤维细胞得到成纤维细胞种子细胞。将所得种子细胞体外进行细胞培养和传代，达到所需数量后，分步接种于可降解支架材料，先接种成纤维细胞制成成纤维细胞—支架材料复合物，再于复合物表面接种血管内皮细胞构建成本发明组织工程化瓣膜。

本发明所述脱细胞基质可以是同种异体和异种瓣膜组织脱细胞基质，心包组织脱细胞基质和血管组织脱细胞基质。

本发明所述血管内皮细胞可来源于骨髓，静脉血管、动脉血管和脂肪组织。还可以是经过基因修饰、改造的血管内皮细胞。

本发明所述成纤维细胞可来源于骨髓和皮下结缔组织。还可以是经过基因修饰、改造的成纤维细胞。

本发明组织工程化瓣膜，具有以下特点：

具有正常瓣膜组织的组织结构，表面为血管内皮细胞覆盖，中间是以成纤维细胞为主要成分的结缔组织，是具有新陈代谢功能的活组织。

## 具体实施方式

### 实施例

提取种子细胞（下述各方法可单独或联合采用）

#### 血管内皮细胞的提取

骨髓来源血管内皮细胞的提取方法：抽取受体自体骨髓5—10ml，PBS清洗，离心速度  $1500g \times 10min$ 。Ficoll分离（5ml

细胞悬液+ Ficoll 5ml, 离心速度  $200g \times 25min$ ), 提取有核细胞, PBS+EDTA 清洗两次。加入标有磁珠的 CD31 抗体  $6-12^{\circ}C$  放置 15min ; 每  $10^8$  细胞+5-10ccPBS 清洗两次。MACS 分离: MS+/RS+柱 预先 500ulPBS 浸润, 细胞悬液过柱后 PBS500ul 清洗滤柱 3 次。1mlPBS 冲洗滤柱得 CD31+细胞。

静脉血管、动脉血管来源血管内皮细胞的提取方法: 取静脉血管、动脉血管 5-10CM, 两端结扎, 管腔内灌注经 0.25---0.5%胰酶或 0.5% 中性蛋白酶(DispaseII),  $37^{\circ}C$ , 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中放置 5—10 分钟, 放开一端, 倒出内容物, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。PBS 清洗两次。

脂肪组织来源血管内皮细胞的提取方法: 将抽取的脂肪组织移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。弃去上清液, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 10ml, 混匀。如此分离脂肪组织中毛细血管。0.25---0.5%胰酶或 0.5%中性蛋白酶(DispaseII),  $37^{\circ}C$ , 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中放置 5—10 分钟。加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 移入离心管中, 1200r/min 离心 5 分钟。PBS 清洗两次。

### 成纤维细胞的提取

骨髓来源成纤维细胞的提取方法: 将上述(A1.1)过柱细胞 (CD31 阴性) 另置培养皿中培养, DMED 培养液, 成纤维细胞较易生长, 利用差速贴壁法可得到成纤维细胞。

皮下结缔组织来源成纤维细胞的提取方法: 将撕下表皮后的真皮剪成碎块, 用 0.2%的胶原酶在  $37^{\circ}C$  消化 2 小时, 经 150 目不锈钢滤网

过滤，以 1200r/min 离心 5 分钟，弃去上清，加入无钙镁 PBS 清洗 3 次。加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 10ml，混匀。

#### 细胞培养和传代：

将上述方法得到的细胞计数后制成单细胞悬液，按  $1-2 \times 10^6/75\text{cm}^2$  密度接种培养，含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液，37℃，5%CO<sub>2</sub>，100%相对湿度培养，培养液 3 天换一次。细胞融合到 60%-75%密度时，用 10ml 无钙镁 PBS 冲洗，经 0.25%胰酶 37℃消化 5 分钟，加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化，移入离心管中，1200r/min 离心 5 分钟。弃去上清液，加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 10ml，混匀，计数，按 1：3 的比例传代培养。2-3 日换一次培养液，细胞融合至 60%-75%密度，再传代培养。

#### 制备脱细胞基质

取供体瓣膜、心包或血管组织，顺次放入下列溶液中处理：

- 1、预冷的蒸馏水漂洗；
- 2、5%盐酸-10%氯化钠溶液中持续搅拌，4℃；
- 3、氯仿：甲醇（1：1），25℃；
- 4、叠氮化钠，25℃；
- 5、过氧化氢浸泡；
- 6、磷酸盐缓冲液，25℃；

再经冷冻干燥，环氧乙烷消毒后，备用。

所述供体可以来源于同种异体或异种组织。

#### 制备组织工程化瓣膜：

先收集成纤维细胞，将其接种于上述支架材料上，接种密度为  $1 \times 10^5$ --- $10^8$ /CM。培养液 3 天换一次，培养 7-10 天，构建得成纤维细胞—支架材料复合物。

收集血管内皮细胞，将其接种在成纤维细胞—支架材料复合物表面，制备血管内皮细胞—成纤维细胞—支架材料复合物，再将其按瓣膜形状缝合塑型，制成组织工程化瓣膜。

本发明构建的组织工程化瓣膜组织具有正常瓣膜组织组织结构，是可自我更新，自我修复的活组织，并且无抗原性，不会引起免疫排斥反应。