

生物可降解聚合物结合碱性成纤维细胞生长因子与内皮细胞的黏附***◇

武欣¹, 谷涌泉¹, 张建¹, 叶霖², 段红永¹, 吴英峰¹, 陈兵¹, 李建新¹, 张淑文¹, 冯增国², 汪忠镐¹

Adhesion of endothelial cells with biodegradable polymer and basic fibroblast growth factor

Wu Xin¹, Gu Yong-quan¹, Zhang Jian¹, Ye Lin², Duan Hong-yong¹, Wu Ying-feng¹, Chen Bing¹, Li Jian-xin¹, Zhang Shu-wen¹, Feng Zeng-guo², Wang Zhong-gao¹

¹Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; ²School of Material Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Wu Xin☆, Doctor, Attending physician, Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China
wuxinbj@yahoo.cn

Correspondence to: Gu Yong-quan, Doctor, Chief physician, Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China
gu-yq@263.net

Supported by: the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A134*; Beijing Natural Science Foundation, No. 5082007*, 2103049*

Received: 2010-08-25
Accepted: 2010-10-07

Abstract

BACKGROUND: The application of biodegradable materials is the important research component of small-caliber tissue engineered vessels *in vitro*. How to modify degradable materials so as to facilitate *in vitro* anticoagulant and promote endothelial cell adhesion, is one of the hotspots in the study of vascular tissue engineering.

OBJECTIVE: To *in vitro* load basic fibroblast growth factor (bFGF) by using biodegradable polycaprolactone (PCL) graft heparin materials, and to observe the effects on endothelial cell adhesion.

METHODS: Applying PCL biodegradable materials, the activated heparin esterified with PCL hydroxyl end and then anchored at both ends of the PCL. The vascular scaffold was prepared with electrospinning technique. Using the electrostatic adsorption between heparin and growth factors, the scaffold was loaded with bFGF. After low-density short-term static cultivation of endothelial cells, the bFGF-loaded biodegradable PCL on the adhesion of endothelial cells was investigated.

RESULTS AND CONCLUSION: The bFGF-loaded biodegradable PCL graft heparin scaffold is successfully fabricated. Endothelial adhesion experiments demonstrated that the biodegradable scaffold was conducive to endothelial cell adhesion. Biodegradable PCL graft heparin material loading bFGF is beneficial to endothelial cell adhesion *in vitro*.

Wu X, Gu YQ, Zhang J, Ye L, Duan HY, Wu YF, Chen B, Li JX, Zhang SW, Feng ZG, Wang ZG. Adhesion of endothelial cells with biodegradable polymer and basic fibroblast growth factor. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(8): 1336-1340. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 可降解材料的应用是体外构建小口径组织工程血管的重要研究部分。如何对可降解材料进行改性, 以利于材料本身体外抗凝与促进内皮细胞黏附, 是目前血管组织工程研究的热点之一。

目的: 利用可降解聚己内酯接枝肝素材料体外负载碱性成纤维细胞生长因子, 观察其对于内皮细胞黏附的影响。

方法: 应用聚己内酯可降解材料, 将肝素活化后并与聚己内酯的端羟基发生酯化反应从而被锚定在聚己内酯两端。经过电纺丝技术, 制备血管支架。同时利用肝素和生长因子间的静电吸附作用, 使支架负载碱性成纤维细胞生长因子。采用低密度内皮细胞短期静态种植, 观察负载细胞生长因子的可降解聚己内酯材料对内皮细胞生长黏附情况的影响。

结果与结论: 成功地制备了负载成纤维细胞生长因子的可降解聚己内酯接枝肝素支架。内皮黏附实验证实, 该支架利于内皮细胞黏附。提示可降解聚己内酯接枝肝素材料负载碱性细胞生长因子支架对内皮细胞有很好的体外黏附性。

关键词: 可降解; 聚己内酯; 肝素; 支架; 内皮细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.002

武欣, 谷涌泉, 张建, 叶霖, 段红永, 吴英峰, 陈兵, 李建新, 张淑文, 冯增国, 汪忠镐. 生物可降解聚合物结合碱性成纤维细胞生长因子与内皮细胞的黏附[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1336-1340.

[http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

大中口径人工血管替代人体大中动脉已获成功, 但当所需血管内径 $< 6\text{ mm}$ 或血流速度较低时, 作为替代人体小动脉的人工血管一直未能获得满意的效果^[1]。小口径血管移植失败的具体原因尚不清楚, 可能是血栓形成和新生内膜增厚使人工血管闭塞。因此, 目前小血管重建仍多采用自体血管移植。然而, 由于自体可供采集的血管数量有限, 或者由于患者自身原因而不能使用自体血管, 因此研制一种优良的小

口径血管替代品就显得特别迫切^[2]。

组织工程学的兴起为从根本上解决以上存在的问题带来了新的曙光^[3-4]。聚己内酯 (polycaprolactone, PCL) 结晶度高, 强度高, 降解速率、孔径人工可调且易加工, 在体内逐渐降解成乳酸, 最终转化成二氧化碳和水, 还具有较好的机械强度、弹性模量和热成型性, 广泛应用于再生医疗、药物缓释、防粘连等领域^[5]。由于PCL的初始强度高而且降解速率慢, 因此作为可生物降解支架材料可以维持较长时间而不被破坏^[6], 尤其适合作为血管组织工程支架材料使用。

近年来,人们逐渐认识到,对于生物材料而言,材料的表面性能决定了材料的用途^[7]。材料表面的改性能够显著增强材料与生物体之间的相互作用,同时材料本身所具有的各种性质如力学强度,降解性能等并不会因表面改性而受到影响。因此,支架材料表面改性是提高支架与细胞间的相互作用,促进细胞在材料表面的贴附和增殖具有非常重要的意义^[8]。相关研究表明,将如肝素以及生长因子等生物活性分子引入到材料表面会明显提高材料的生物相容性,促进细胞对材料的贴附和生长^[9]。肝素具有优良的抗凝作用,在临床上作为抗凝药物而被长期使用并且对内皮细胞也有一定的调控作用,血管内皮生长因子以及成纤维细胞生长因子家族则被证明能够促进内皮细胞黏附,有效地促进局部的血管化^[10-12]。

本文利用可降解聚己内酯接枝肝素材料,体外负载碱性成纤维细胞生长因子,观察其对于内皮细胞黏附的影响。

1 材料和方法

设计: 细胞水平的对比观察实验。

时间及地点: 于2010-03/05在首都医科大学宣武医院再生医学实验室完成。

材料:

主要材料	来源
聚己内酯接枝肝素(PCL-H)血管支架	北京理工大学
碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)	北京中科物源生物有限公司
EBM-2 培养液(包含体积分数5%FBS、血管内皮生长因子、hFGF-b、IGF-1、hEGF、Hydrocortisone 和 Ascorbic acid 等)	Lonza, 瑞士
LG-DMEM 犬间充质干细胞诱导分化的内皮样细胞	Gibco, 美国 中国药品生物制品 检定所馈赠与鉴定

方法:

PCL-H组织工程血管支架的制备: 以辛酸亚锡/丁二醇为催化体系,通过 ϵ -己内酯的开环聚合制备了可降解的PCL。然后通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)体系在水/四氢呋喃混合溶液中将肝素活化后并与PCL的端羟基发生酯化反应从而被锚定在PCL两端,再利用电纺丝技

术制备管状支架。该部分实验由北京理工大学材料科学与工程学院协助完成。

bFGF-PCLH支架制备: 利用肝素和生长因子间的静电吸附作用,将支架浸于含生长因子500 $\mu\text{g/L}$ bFGF的PBS(pH=7.4)溶液中成功地制备了负载bFGF组织工程人工血管支架。即将PCL-H支架浸泡于含有500 $\mu\text{g/L}$ 的PBS缓冲液,浸泡液放于室温下净化工作台1 h,即可以获得利用bFGF-PCLH支架。

可降解支架材料的内皮黏附实验: 为比较可降解支架负载bFGF因子后,构建的血管支架对内皮细胞黏附性的影响,实验设计了可降解支架材料及负载bFGF因子支架的内皮黏附比较实验,主要观察低密度内皮细胞接种,内皮细胞黏附情况。实验分为4组,分别是PCL组、PCL-H组、bFGF-PCL组及bFGF-PCLH组。支架材料由北京理工大学材料学院提供。

具体步骤: ①支架消毒:可降解4组材料分别裁剪成1 cm \times 1 cm大小的小块,用体积分数75%乙醇浸泡1 h消毒后,用无菌PBS冲洗浸泡3遍,每次1 h,以去除消毒乙醇。②负载bFGF:消毒好的bFGF-PCL组、bFGF-PCLH组支架材料,浸泡于含有500 $\mu\text{g/L}$ bFGF的PBS液1 h后,获得bFGF-PCL和bFGF-PCLH支架。③细胞的选择:取采用犬间充质干细胞诱导分化的内皮样细胞,用2.5 g/L胰酶和0.2 g/L的EDTA消化后,细胞计数。④支架准备:消毒好的可降解支架材料(PCL组与PCL-H组)及负载bFGF的支架材料(bFGF-PCL组与bFGF-PCLH组)置于24孔板内,用EBM-2培养液浸泡12 h。⑤细胞种植:消化计数好的内皮细胞第2代,采用低密度种植即 $1\times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种到24孔板的可降解材料的支架上,接种6 h后,将每组材料各取出2块,20 g/L戊二醛固定,留取扫描电镜标本,观察低密度、短时间内内皮细胞种植材料细胞生长情况。

主要观察指标:

内皮细胞黏附情况: 每天于倒置相差显微镜下观察材料边缘内皮细胞黏附生长情况。

内皮细胞生长情况: 将种植内皮细胞的4组材料用20 g/L戊二醛固定,留取扫描电镜标本,观察低密度、短时间内内皮细胞种植材料细胞生长情况。

MTT观察结果: 于种植的第3, 5, 7天,分别每孔加入MTT试剂20 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱内培养4 h。取出后,小心吸去培养液,再加入150 μL DMSO溶液,轻轻振荡10 min后,用酶联免疫

¹首都医科大学宣武医院血管外科,北京市 100053;
²北京理工大学材料学院,北京市 100081

武欣,男,1975年生,河北省石家庄市人,汉族,2010年首都医科大学毕业,博士,主治医师,主要从事血管外科基础与临床研究。
wuxinbj@yahoo.cn

通讯作者:谷涌泉,博士,主任医师,首都医科大学宣武医院血管外科,北京市 100053
gu-yq@263.net

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2011)08-01336-05

收稿日期:2010-08-25
修回日期:2010-10-07
(20100702011/G·Y)

检测仪检测LP-400分光光度每孔的吸光度(A)值, 测定各组570 nm波长的A值, 取平均值。通过下面的公式计算相对增殖率(RGR)。以时间(d)为横坐标, A值(表示细胞相对数量)为纵坐标, 分别绘制3, 5, 7 d内皮细胞的生长曲线, 分析细胞生长规律, 绘制细胞生长曲线。

$$RGR = (\text{实验组}A\text{值} / \text{对照组}A\text{值}) \times 100\%$$

统计学分析: 由本文作者采用SPSS 11.5软件包进行数据处理, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 PCL-H组织工程血管支架形态 支架外观呈乳白色, 质地均匀且具有良好的柔韧性及弹性, 支架内径2.5 mm, 外径3.5 mm。扫描电镜下, 可以看到超细纤维粗细均匀、外表平滑, 纤维直径范围1~5 μm , 孔隙直径为10~30 μm , 平均15 μm 。见图1。

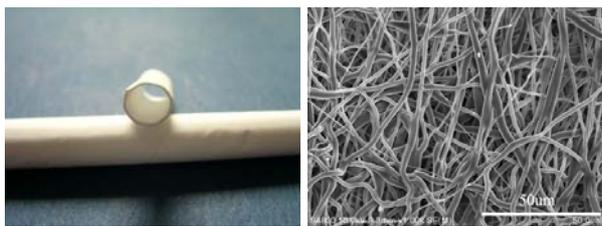
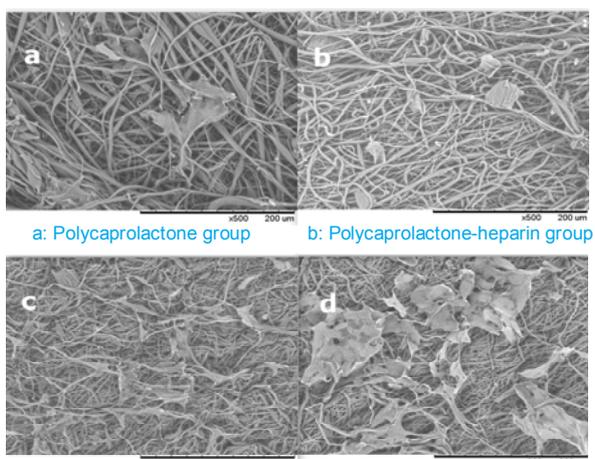


Figure 1 Polycaprolactone grafted heparin scaffold and electron micrograph
图1 聚己内酯接枝肝素人工血管支架及其电镜照片

2.2 内皮细胞种植6 h电镜细胞形态 见图2。



a: Polycaprolactone group b: Polycaprolactone-heparin group
c: Polycaprolactone-basic fibroblast growth factor group d: Basic fibroblast growth factor-polycaprolactone-heparin group
Figure 2 Scanning electron microscopy of endothelial cell adhesion at 6 h (x500)
图2 各组材料内皮细胞黏附6 h扫描电镜结果(x500)

图2可见, 种植6 h, 观察内皮细胞低密度短时间种植, 负载生长因子对内皮细胞黏附的影响。实验电镜观察到负载bFGF的支架上细胞数量要多于没有负载bFGF的支架, 而且细胞的伸展比较好, 呈扁平的形态, 贴附比较好。以bFGF-PCLH组内皮细胞黏附最多。

2.3 MTT结果 见表1。

表1 各组细胞种植不同时间黏附情况比较
Table 1 Adhesion of cells at different time points ($\bar{x} \pm s, A$)

Group	3 d	5 d	7 d
PCL	0.257±0.11 ^a	0.275±0.13 ^a	0.280±0.10 ^a
PCL-H	0.258±0.06	0.281±0.09 ^a	0.296±0.07 ^a
bFGF-PCL	0.395±0.04 ^a	0.399±0.04 ^a	0.405±0.13 ^a
bFGF-PCLH	0.458±0.17	0.503±0.06	0.623±0.14

PCL: polycaprolactone; H: heparin; bFGF: basic fibroblast growth factor; ^a $P < 0.05$, vs. bFGF-PCLH group

表1中MTT实验统计学分析结果显示, PCL组、PCL-H组、bFGF-PCL组与bFGF-PCL-H组内皮细胞黏附结果比较, 第3, 5, 7天差异均具有显著性意义($P < 0.05$), 显示bFGF-PCLH组负载bFGF内皮细胞黏附最多。内皮细胞黏附生长曲线见图3, 显示bFGF-PCLH组内皮细胞生长状况最好。

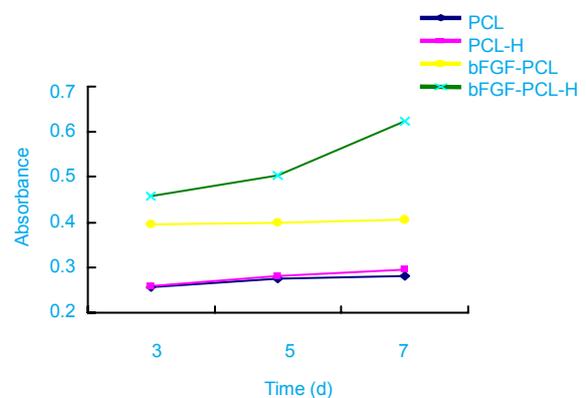


Figure 3 Cell growth curve of endothelial cell adhesion at different time points
图3 各种支架材料上内皮细胞黏附不同时间的细胞生长曲线

3 讨论

采用可生物降解的合成材料制作组织工程血管, 是血管组织工程目前研究的热点。目前常用的可降解材料有聚乙醇酸、聚乳酸、PCL、聚乙醇酸与聚乳酸共聚物、聚羟基丁酸酯、聚三亚甲基碳酸酯等^[13]。用此类材料构建的血管支架, 有良好的组织相容性和可塑性, 在完成一定时间的机械支撑后, 在体内可逐渐降解为小分子物质, 降解速率和三维结构易于调控^[14]。

PCL结晶度高, 强度高, 降解速率、孔径人工可调

且易加工, 在体内逐渐降解成乳酸, 最终转化成二氧化碳和水, 还具有较好的机械强度、弹性模具和热成型性, 广泛应用于再生医疗、药物缓释、防粘连等领域^[15]。通过静电纺丝技术所成型出的由纳米到微米级纤维组成的多孔支架, 能够模仿细胞外基质的组成和结构, 为细胞提供良好的生长环境, 从而在组织工程领域得到了广泛应用^[16]。本文采用接枝肝素抗凝可交联PCL材料成功应用静电纺技术加工成型血管支架, 电镜检测超细纤维粗细均匀、外表平滑, 纤维直径范围1~5 μm, 孔隙直径在10~30 μm之间, 平均15 μm^[17]。

天然材料所制备的支架的降解性能以及其在体内产生的异物残留会不会对于人工血管长期使用性能产生不良影响一直也是人们所关注的问题。人工合成的可降解材料的缺点也是十分明显的, 此类材料普遍是生物惰性的材料, 其表面没有任何可供细胞识别的位点, 不利于细胞的生长和黏附^[18]。而且, 如果不采取有效的抗凝措施, 这类材料也极易诱发急性血栓的发生^[19]。因此, 人工合成的可降解材料必须经过一系列的改性, 才有可能成为合适的血管组织工程支架材料^[20]。

近年来, 人们逐渐认识到, 对于生物材料而言, 材料的表面性能决定了材料的用途。材料表面的改性能够明显增强材料与生物体之间的相互作用, 同时材料本身所具有的各种性质如力学强度, 降解性能等并不会因表面改性而受到影响^[21]。因此, 支架材料表面改性是提高支架与细胞间的相互作用, 促进细胞在材料表面的贴附和增殖具有非常重要的意义^[22]。相关研究表明, 将如肝素、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽以及生长因子等生物活性分子引入到材料表面会显著提高材料的生物相容性, 促进细胞对材料的贴附和生长。肝素具有优良的抗凝作用, 在临床上作为抗凝药物而被长期使用并且对内皮细胞也有一定的调控作用, 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽可以促进各种细胞对材料的黏附, 生长因子血管内皮生长因子以及成纤维细胞生长因子家族则被证明能够有效地促进局部的血管化^[23-25]。在血管组织工程领域, 采用生物活性分子对支架材料的表面进行改性, 提高自体细胞对人工血管支架表面的贴附和增殖能力显然也是非常必要的, 甚至可以说是影响组织工程人工血管成败的关键技术^[26-27]。

肝素自从1937年在临床上用作抗凝剂以来一直是一种主要的临床用抗凝药物, 因此也有人提出将肝素涂覆在人工血管内表面以解决人工血管移植后初期的抗凝问题。但是, 由于游离的肝素的半衰期很短, 只有几十分钟或几个小时, 这种方法的抗凝效果不佳。实验证实对于固定化肝素的稳定性和效率而言, 通过化学键, 特别是共价键结合的化学结合法远较物理吸附高。作者前期实验证实, 可降解PCL接枝肝素材料可以实现肝素的持续释放, 并能体外凝血实验表明达到很好的抗凝效果^[28]。

肝素改性后的组织工程支架非常适宜植入体内, 这不但是因为肝素化材料的抗凝作用, 更因为肝素与很多生长因子能够结合(如血管内皮生长因子、bFGF)。生长因子是由细胞分泌的具有特定功能的一类蛋白质, 其可以促进细胞的趋化和有丝分裂, 从而反过来可以调控细胞的生长, 促进组织的再生^[29]。通过引入具有特定功能的生长因子, 将支架植入体内后, 生长因子能在肝素的调控下实现长期缓慢释放, 使材料更适宜细胞的附着、生长、分化和增殖。

Cucina等^[30]则在四臂的星形PEG的4个端基上引入了肝素, 然后分别加入血管内皮生长因子和bFGF, 发现两种生长因子均可以很好地与PEG端基上的肝素相结合。并且由于PEG的星形结构, 生长因子加入使得材料形成了“物理交联”的结构, 动态黏弹谱的测试发现生长因子加入后, 材料的贮存模量明显增加。但如果再加入生长因子的受体, 如含有细胞的培养液, 则贮存模量明显降低, 交联结构破坏, 从而验证了“物理交联”的结构。

Cucina等^[30]还全面的研究了生长因子的吸附率和释放行为, 特别是发现肝素结合的生长因子在水溶液中的释放率只有20%~30%, 但是其在含有细胞的培养液中的释放率却高达80%左右。这说明采用肝素结合的生长因子是具有生物活性的。

本实验采用PCL接枝肝素可降解材料, 并负载bFGF, 其目的就是希望接枝肝素的降解支架, 能够缓慢释放肝素, 并能够达到抗凝血作用, 来抑制移植早期的血栓形成。又通过肝素与bFGF的静电引力作用, 吸附bFGF, 通过bFGF的缓慢释放, 生长因子的支架更有效地促进了植入部位附近新的内皮黏附生成, 促进新生内膜生长。

MTT法是利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的四唑盐还原为蓝紫色甲臞结晶而沉积于细胞内, DMSO则可溶解细胞内的结晶物, 并通过测定A值间接反映活细胞的数量^[31]。其优点在于操作简单, 灵敏度高, 仅反映活细胞的情况。本实验中采用低密度内皮细胞种植, 种植5 d后, 从PCL支架上释放出bFGF的生物活性和作用, 通过它刺激内皮细胞生长来评估。结果证实, 肝素化的PCL负载bFGF的内皮黏附结合效率高于未肝素化的PCL负载bFGF及PCL材料, 因为bFGF在生理pH下是一种正电荷蛋白, 其多肽链功能区主要包括肝素结合区和受体结合区两部分, 肝素结合区主要包括N末端的1个和C末端的2个碱性氨基酸富集区, 两者通过静电作用结合, 缓慢释放, 增强了bFGF的释放活性, 实验发现, 随着bFGF的缓慢释放, 促进了内皮细胞的黏附, 达到了预期的效果。

结论: 可降解PCL接枝肝素材料负荷bFGF支架具有良好的细胞, 利于内皮细胞黏附, 可用于小口径组织工

程血管支架的研究。

4 参考文献

- [1] Bos GW, Poot AA, Beugeling T, et al. Small diameter vascular graft prostheses: current status. Arch Physiol Biochem. 1998; 106:100-115.
- [2] Fan XL, Zou YW. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(29): 5732-5734.
范晓丽, 邹远文. 组织工程血管构建中支架材料的特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(29): 5732-5734.
- [3] Martin I, Quarto R, Dozin B, et al. Producing prefabricated tissues and organs via tissue engineering. IEEE Eng Med Biol Mag. 1997; 16:73-80.
- [4] Niklason LE. Replacement arteries made to order. Science. 1999; 286:1493-1494.
- [5] Xie CQ, Zhou YL, Ma JJ, Suliao Keji. 2009; 37(4): 100-104.
谢长琼, 周元林, 马佳俊. 聚己内酯改性研究进展[J]. 塑料科技, 2009, 37(4): 100-104.
- [6] Li J, Zheng YF. Zhongguo Keji Lunwen Zaixian. 2009;4(4): 274-278.
李佳, 郑玉峰. 医用聚ε-己内酯的合成及热行为研究[J]. 中国科技论文在线, 2009, 4(4): 274-278.
- [7] Inoguchia H, Kwon IK, Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. Biomaterials. 2005;26(1):37-46.
- [8] Vaz CM, van Tuijl S, Bouten CV, et al. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. Acta Biomater. 2005;1(5):575-582.
- [9] Jordan SW, Chaikof EL. Novel thromboresistant materials. J Vasc Surg. 2007;45 Suppl A:A104-A115.
- [10] Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. Biomaterials. 2005;26(1):37-46.
- [11] He W, Ma Z, Yong T, et al. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. Biomaterials. 2005;26(36):7606-7615.
- [12] Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. Polymer. 2008;49: 5603-5621.
- [13] Tai D, Ren W. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(23): 4503-4506.
邵蔚, 任为. 组织工程血管的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(23): 4503-4506.
- [14] Cucina A, Scavo MP, Muzzioli L, et al. High density lipoproteins downregulate basic fibroblast growth factor production and release in minimally oxidated-LDL treated smooth muscle cells. Atherosclerosis. 2006;189(2):303-309.
- [15] Jordan SW, Chaikof EL. Novel thromboresistant materials. J Vasc Surg. 2007;45 Suppl A:A104-115.
- [16] Wu YC, Cui L, Li G, et al. PDGF-BB initiates vascular smooth muscle-like phenotype differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Zhonghua Zhengxing Waikē Zazhi. 2007;23(4): 335-339.
- [17] Huang ZM, He CL, Yang A, et al. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. J Biomed Mater Res A. 2006;77(1):169-179.
- [18] Bolgen N, Menciloglu YZ, Acatay K, et al. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(epsilon-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. J Biomater Sci Polym Ed. 2005;16(12): 1537-1555.
- [19] Chen SB, Chen F. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(45): 9152-9156.
陈柏松, 陈方. 血管再生与组织工程[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(45): 9152-9156.
- [20] Pektok E, Nottet B, Tille JC, et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. Circulation. 2008;118(24):2563-2570.
- [21] Li S, Liu L, Garreau H, et al. Lipase-catalyzed biodegradation of poly(epsilon-caprolactone) blended with various polylactide-based polymers. Biomacromolecules. 2003;4(2):372-377.
- [22] Matsuda T, Ihara M, Inoguchi H, et al. Mechano-active scaffold design of small-diameter artificial graft made of electrospun segmented polyurethane fabrics. J Biomed Mater Res A. 2005; 73(1):125-131.
- [23] Hosokawa R, Kikuzaki K, Kimoto T, et al. Controlled local application of basic fibroblast growth factor(FGF-2) accelerates the healing of GBR: An experimental study in beagle dogs. Clin Oral Implants Res. 2000;11(4): 345-357.
- [24] Badyrak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Transpl Immunol. 2004;12(3-4):367-377.
- [25] Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, et al. Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Biomaterials. 2008;29(34): 4532-4539.
- [26] Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. Eur Cell Mater. 2003;5:1-16; discussion 16.
- [27] McClure MJ, Sell SA, Ayres CE, et al. Electrospinning-aligned and random polydioxanone-polycaprolactone-silk fibroin-blended scaffolds: geometry for a vascular matrix. Biomed Mater. 2009; 4(5):55010.
- [28] Wang PJ, Geng L, Ye L, et al. Keji Daobao. 2009;27(21): 50-55.
王培境, 耿雷, 叶霖, 等. 具有抗凝功能的可交联四臂星形聚己内酯的合成及其电纺丝加工的初步研究[J]. 科技导报, 2009, 27(21): 50-55.
- [29] Yoon JJ, Chung HJ, Lee HJ, et al. Heparin-immobilized biodegradable scaffolds for local and sustained release of angiogenic growth factor. J Biomed Mater Res A. 2006;79(4): 934-942.
- [30] Cucina A, Scavo MP, Muzzioli L, et al. High density lipoproteins downregulate basic fibroblast growth factor production and release in minimally oxidated-LDL treated smooth muscle cells. Atherosclerosis. 2006;189(2):303-309.
- [31] Kutzer A, Marquardt H, Westendorf J, et al. Polyetheretherketone-cytotoxicity and mutagenicity in vitro. Biomaterials. 2002;23(8): 1749-1759.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目: “小口径组织工程血管的基础及应用研究” (2006AA02A134); 北京市自然科学基金资助项目: 多孔脱细胞小口径组织工程动脉支架及其再细胞化研究” (5082007)和 “在体靶向自组装小口径组织工程动脉的初步研究” (2103049)。

致谢: 首先衷心感谢首都医科大学宣武医院血管外科张建教授、谷涌泉教授, 课题是在两位教授的精心指导、严格要求和亲切关怀下完成的。特别感谢血管外科李建新教授、陈兵教授, 再生医学实验室张淑文老师, 吴英峰博士, 感谢 863 课题协作组北京理工大学冯增国教授、叶霖老师, 在各位老师的协作与技术支持下, 课题才可以顺利完成。同事感谢 “863” 计划(2006AA02A134)及北京市自然科学基金(5082007、2103049)的资金支持!

作者贡献: 实验设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训。

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。

伦理批准: 文中无涉及伦理冲突的内容。

本文创新性: 检索 PUBMED 数据库及中国期刊全文数据库 2001/2010 相关文献, 发现小口径血管替代物的移植效果不是十分满意。实验利用 PCL 可降解材料, 将肝素活化后并与 PCL 的端羟基发生酯化反应从而被锚定在 PCL 两端, 经过电纺丝技术, 制备血管支架, 同时利用肝素和生长因子间的静电吸附作用, 将支架浸于含 bFGF 的 PBS 液中成功地制备了负载 bFGF 的组织工程人工血管支架, 观察其对内皮细胞有很好的体外黏附性, 可为下一步用此种材料体外构建小口径组织工程血管打下基础。