



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116173300 A

(43) 申请公布日 2023.05.30

(21) 申请号 202211454496.0 A61L 27/22 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.21 A61L 27/24 (2006.01)

(71) 申请人 郑州大学第一附属医院 A61L 27/50 (2006.01)

地址 450000 河南省郑州市二七区建设东
路1号 A61L 27/52 (2006.01)

(72) 发明人 张金盈 侯雅尘 唐俊楠 沈德良
崔小林 张格 秦臻 郭嘉城
曹昶 苏畅 杜鹏翀

(74) 专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理
有限公司 11385
专利代理师 吕永齐

(51) Int. Cl.
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)

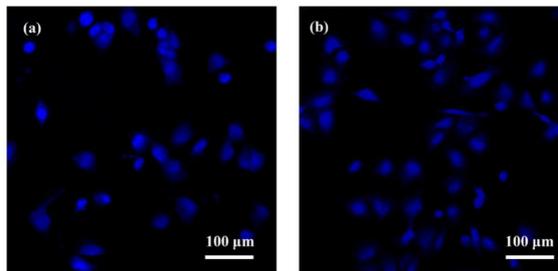
权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

一种植物脱细胞人工血管及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于人造血管的制备技术领域,具体涉及一种植物脱细胞人工血管及其制备方法。本发明提供的制备方法:将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,得到脱细胞支架;在波长为365~550nm的光照的条件下,将光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于所述脱细胞支架外表面进行光固化反应,得到所述植物脱细胞人工血管;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液包括光聚合水凝胶溶液、外泌体和光引发剂。本发明制备的植物脱细胞人工血管可促进内皮细胞的粘附和增殖,模仿人体血管中膜的天然形态,以获得仿生和内皮化效果良好的人工血管。本发明提供的制备方法简单,无需昂贵试剂,成本较低,制备的人工血管具备良好的内皮化效果。



1. 一种植物脱细胞人工血管的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,得到脱细胞支架;
在光照的条件下,将光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于所述脱细胞支架外表面进行光固化反应,得到所述植物脱细胞人工血管;所述光照的波长为365~550nm;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液包括光聚合水凝胶溶液、外泌体和光引发剂。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述光聚合水凝胶溶液中的光聚合水凝胶包括甲基丙烯酸酐化明胶、甲基丙烯酰化透明质酸、甲基丙烯酰化胶原蛋白、酪胺取代透明质酸、酪胺胶原蛋白和酪胺明胶中的一种或多种。
3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述外泌体源头包括血液血清、骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、血管内皮细胞来源和血管收缩型平滑肌细胞来源中的一种或多种。
4. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述光聚合水凝胶溶液中含有的光聚合水凝胶的质量百分含量为5~10wt%。
5. 根据权利要求1或3所述的制备方法,其特征在于,所述光聚合水凝胶-外泌体悬液中,所述外泌体源头的质量浓度为2~200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。
6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述光引发剂包括Irgacure 2959、VA-086、曙红Y和Ru/SPS中的一种或多种;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液中,所述光引发剂的质量百分含量为0.1~1wt%。
7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述涂覆为喷涂,所述喷涂的工作参数包括:所述脱细胞支架的旋转速度为50~200r/min;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液经喷头喷出的速度为0.1~2 $\mu\text{L}/\text{s}$ 。
8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述喷涂间歇进行,每次喷涂的持续时间为1~3s;相邻两次喷涂的间隔时间为5~60s。
9. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述脱细胞包括以下步骤:
使用玻璃棒材穿过具有空心结构的植物根和/或茎的空心部分作为支撑,然后将具有空心结构的植物根和/或茎浸渍于己烷溶液中去掉所述植物根和/或茎表面的角质层,得到去角质根和/或茎;
将十二烷基硫酸钠溶液灌注入所述去角质根和/或茎的空心结构中进行预去除植物细胞组织处理,得到预处理根和/或茎;
将聚乙二醇辛基苯基醚和亚氯酸钠的混合溶液冲洗所述预处理根和/或茎的外表面和空心结构的内表面,进行去除植物细胞组织处理,得到所述脱细胞支架。
10. 权利要求1~8任一项所述的制备方法制备得到的植物脱细胞人工血管,其特征在于,所述植物脱细胞人工血管包括脱细胞支架和附着于所述脱细胞支架上的水凝胶-外泌体光固化涂层。

一种植物脱细胞人工血管及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于人造血管的制备技术领域,具体涉及一种植物脱细胞人工血管及其制备方法。

背景技术

[0002] 心血管疾病(CVD)是全球发病率和死亡率的主要原因,估计每年有约1780万人(每10万人中有233.1人)死于CVD。CVD常规的治疗方法是通过血管搭桥手术,使用血管移植物使血流绕过阻塞部位。血管搭桥手术中,使用自体血管是金标准,但由于患者可能存在的基础疾病,自体血管的普遍性通常受到限制。

[0003] 目前,市售人造移植物由聚合物制成,即膨体聚四氟乙烯(ePTFE;称为Gore-Tex)或聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET;称为Dacron),二者均可制备成各类大口径(>6mm)血管以供储存使用。但聚合物血管较硬,表面粗糙,并且表面高度疏水,导致该类血管的生物相容性较差,并容易激活血液凝固的级联反应,因此这种聚合物并不适合小口径人造血管。尽管目前具备3D打印技术和微流体技术,但是在复制微血管结构的方面仍具备巨大的挑战。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种植物脱细胞人工血管及其制备方法,本发明提供的植物脱细胞人工血管适合小口径人造血管,具备良好的仿生和内皮化效果。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种植物脱细胞人工血管的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,得到脱细胞支架;

[0008] 在光照的条件下,将光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于所述脱细胞支架外表面进行光固化反应,得到所述植物脱细胞人工血管;所述光照的波长为365~550nm;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液包括光聚合水凝胶溶液、外泌体和光引发剂。

[0009] 优选的,所述光聚合水凝胶溶液中的光聚合水凝胶包括甲基丙烯酸酐化明胶、甲基丙烯酰化透明质酸、甲基丙烯酰化胶原蛋白、酪胺取代透明质酸、酪胺胶原蛋白和酪胺明胶中的一种或多种。

[0010] 优选的,所述外泌体源头包括血液血清、骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、血管内皮细胞来源和血管收缩型平滑肌细胞来源中的一种或多种。

[0011] 优选的,所述光聚合水凝胶溶液中含有的光聚合水凝胶的质量百分含量为5~10wt%。

[0012] 优选的,所述光聚合水凝胶-外泌体悬液中,所述外泌体源头的质量浓度为2~200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0013] 优选的,所述光引发剂包括Irgacure2959、VA-086、曙红Y和Ru/SPS中的一种或多种;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液中,所述光引发剂的质量百分含量为0.1~1wt%。

[0014] 优选的,所述涂覆为喷涂,所述喷涂的工作参数包括:所述脱细胞支架的旋转速度

为50~200r/min;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液经喷头喷出的速度为0.1~2 μ L/s。

[0015] 优选的,所述喷涂间歇进行,每次喷涂的持续时间为1~3s;相邻两次喷涂的间隔时间为5~60s。

[0016] 优选的,所述脱细胞包括以下步骤:

[0017] 使用玻璃棒材穿过具有空心结构的植物根和/或茎的空心部分作为支撑,然后将具有空心结构的植物根和/或茎浸渍于己烷溶液中去除所述植物根和/或茎表面的角质层,得到去角质根和/或茎;

[0018] 将十二烷基硫酸钠溶液灌注入所述去角质根和/或茎的空心结构中进行预去除植物细胞组织处理,得到预处理根和/或茎;

[0019] 将聚乙二醇辛基苯基醚和亚氯酸钠的混合溶液冲洗所述预处理根和/或茎的外表面和空心结构的内表面,进行去除植物细胞组织处理,得到所述脱细胞支架。

[0020] 本发明提供了上述技术方案制备方法制备得到的植物脱细胞人工血管,所述植物脱细胞人工血管包括脱细胞支架和附着于所述脱细胞支架上的水凝胶-外泌体光固化涂层。

[0021] 本发明提供了一种植物脱细胞人工血管的制备方法,包括以下步骤:将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,得到脱细胞支架;在光照的条件下,将光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于所述脱细胞支架外表面进行光固化反应,得到所述植物脱细胞人工血管;所述光照的波长为365~550nm;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液包括光聚合水凝胶溶液、外泌体和光引发剂。本发明将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,获得脱细胞支架,进而利用光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于脱细胞支架上,在波长为365~550nm的光照条件下,使水凝胶迅速均匀固化在脱细胞支架表面,同时包裹外泌体,借助水凝胶的仿生环境维持外泌体的体外活性,形成稳定的人工血管结构,适合小口径人造血管;而且通在人工血管壁表面构造的固化水凝胶包裹外泌体的涂层膜结构,可促进内皮细胞的粘附和增殖,模仿人体血管中膜的天然形态,以获得仿生和内皮化效果良好的人工血管。本发明提供的制备方法流简单,无需昂贵试剂,成本较低,制备的人工血管具备良好的内皮化效果。

[0022] 本发明提供了上述技术方案所述的制备方法制备得到的植物脱细胞人工血管,所述植物脱细胞人工血管包括脱细胞支架和附着于所述脱细胞支架上的水凝胶-外泌体光固化涂层。本发明通过空心管状的纤维结构,为人工血管提供了良好的支撑能力,同时适合小口径人造血管;通过光固化后的水凝胶-外泌体涂层模仿人体血管中膜结构,固化后的水凝胶具有丰富的三维网状孔隙结构,包裹外泌体的同时可促进内皮细胞的粘附和增殖,从而具备良好的仿生和内皮化效果。

附图说明

[0023] 图1为本发明实施例提供的脱细胞支架涂覆光聚合水凝胶-外泌体悬液进行光固化反应的装置示意图;

[0024] 图1中,1为支撑台,2为旋转夹具,3为旋转轴,4为脱细胞支架,5为喷嘴,6为原料储存容器,7为光源;

[0025] 图2为本发明实施例2提供的脱细胞支架的通畅情况;

[0026] 图3为本发明实施例2制备的Glema-VSMC脱细胞人工血管的通畅情况;

- [0027] 图4为冷冻电镜拍摄的实施例3制备的G1ema-VSMC脱细胞人工血管的电镜照片；
- [0028] 图5为本发明实施例4使用的G1ema的应力-应变曲线；
- [0029] 图6为本发明实施例4制备的脱细胞支架的应力-应变曲线；
- [0030] 图7为本发明实施例4制备的G1ema-VSMC-脱细胞人工血管的应力-应变曲线；
- [0031] 图8为本发明实施例5制备的G1ema-VSMC脱细胞人工血管浸提液与内皮细胞共培养1天后的细胞核的DPAI光染色结果；

具体实施方式

- [0032] 本发明提供了一种植物脱细胞人工血管的制备方法,包括以下步骤:
- [0033] 将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,得到脱细胞支架;
- [0034] 在光照的条件下,将光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于所述脱细胞支架外表面进行光固化反应,得到所述植物脱细胞人工血管;;所述光照的波长为365~550nm;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液包括光聚合水凝胶溶液、外泌体和光引发剂。
- [0035] 在本发明中,若无特殊说明,所有制备原料/组分均为本领域技术人员熟知的市售产品。
- [0036] 本发明将具有空心结构的植物根和/或茎进行脱细胞,得到脱细胞支架。
- [0037] 在本发明中,所述植物根和/或茎优选为空心菜的根和/或茎。
- [0038] 在本发明中,所述植物根和/或茎的内径优选为1~3mm;所述植物根和/或茎的长度优选为1.5~5cm。
- [0039] 在本发明中,所述脱细胞优选包括以下步骤:
- [0040] 使用玻璃棒材穿过具有空心结构的植物根和/或茎的空心部分作为支撑,然后将具有空心结构的植物根和/或茎浸渍于己烷溶液中去除所述植物根和/或茎表面的角质层,得到去角质根和/或茎;
- [0041] 将十二烷基硫酸钠溶液灌注入所述去角质根和/或茎的空心结构中进行预去除植物细胞组织处理,得到预处理根和/或茎;
- [0042] 将聚乙二醇辛基苯基醚和亚氯酸钠的混合溶液冲洗所述预处理根和/或茎的外表面和空心结构的内表面,进行去除植物细胞组织处理,得到所述脱细胞支架。
- [0043] 本发明使用玻璃棒材穿过具有空心结构的植物根和/或茎的空心部分作为支撑,然后将具有空心结构的植物根和/或茎浸渍于己烷溶液中去除所述植物根和/或茎表面的角质层,得到去角质根和/或茎。
- [0044] 本发明将具有空心结构的植物根和/或茎浸渍于己烷溶液之前,本发明优选对所述具有空心结构的植物根和/或茎进行前处理,在本发明中,所述前处理优选包括:将所述具有空心结构的植物根和/或茎浸渍于水中进行洗涤。在本发明中,所述浸渍洗涤的温度优选为4℃;所述水优选为超纯水,所述浸渍洗涤的时间优选为2~6h。本发明优选通过所述浸渍洗涤去除所述植物根和/或茎表面的污渍。
- [0045] 在本发明中,所述己烷溶液具体优选为己烷的磷酸缓冲盐溶液(PBS缓冲溶液)。
- [0046] 在本发明中,所述己烷溶液的质量百分含量优选为90wt%。
- [0047] 在本发明中,所述己烷溶液的用量具体优选为5~10mL。
- [0048] 在本发明中,所述己烷溶液浸渍的温度优选为室温;所述己烷溶液浸渍的时间优

选为4~24h。

[0049] 在本发明中,所述己烷溶液浸渍完成后,本发明优选对所述去角质根和/或茎进行洗涤,所述洗涤用溶剂优选为PBS缓冲溶液;所述洗涤优选为冲洗;所述洗涤的次数优选为3次;本发明优选通过洗涤去除所述去角质根和/或茎表面残留的己烷和角质层残留物。

[0050] 得到去角质根和/或茎后,本发明将十二烷基硫酸钠溶液灌注入所述去角质根和/或茎的空心结构中进行预去除植物细胞组织处理,得到预处理根和/或茎。

[0051] 在本发明中,所述十二烷基硫酸钠(SDS)溶液优选为SDS的PBS缓冲溶液。

[0052] 在本发明中,所述SDS溶液的质量百分含量优选为1~10wt%。

[0053] 在本发明中,所述灌注优选使用蠕动泵进行,所述蠕动泵的灌注速度优选为20~200r/min。

[0054] 在本发明中,所述预去除植物细胞组织处理的温度优选为室温;所述预去除植物细胞组织处理的时间优选为5~7天。

[0055] 在本发明中,所述预去除植物细胞组织处理完成后,本发明优选对预处理根和/或茎进行洗涤,所述洗涤用溶剂优选为PBS缓冲溶液;所述洗涤优选为冲洗;所述洗涤的次数优选为3次;本发明优选通过洗涤去除预处理根和/或茎表面残留的SDS和细胞组织残留物。

[0056] 得到预处理根和/或茎后,本发明将聚乙二醇辛基苯基醚(Triton-X-100)和亚氯酸钠的混合溶液冲洗所述预处理根和/或茎的外表面和空心结构的内表面,进行去除植物细胞组织处理,得到所述脱细胞支架。

[0057] 在本发明中,所述Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液优选为Triton-X-100和亚氯酸钠的PBS缓冲溶液。

[0058] 在本发明中,所述Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,所述Triton-X-100的质量百分含量优选为0.1~0.5wt%。

[0059] 在本发明中,所述Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,所述亚氯酸钠的质量百分含量优选为10wt%。

[0060] 在本发明中,所述冲洗优选使用蠕动泵进行,所述蠕动泵冲洗的速度优选为以20~200r/min。

[0061] 在本发明中,所述Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液的体积优选为5~10mL。

[0062] 在本发明中,所述冲洗的温度优选为室温;所述冲洗的时间优选为12~144h。在本发明中,所述冲洗时,本发明优选每间隔12h更换所述Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液。

[0063] 在本发明中,所述去除植物细胞组织处理完成后,本发明优选对得到的脱细胞支架进行洗涤。所述洗涤用溶剂优选为PBS缓冲溶液;所述洗涤优选为冲洗;所述洗涤的次数优选为3次;本发明优选通过洗涤脱细胞支架表面残留的Triton-X-100、亚氯酸钠和细胞组织残留物。

[0064] 得到脱细胞支架后,本发明优选将所述脱细胞支架浸泡于去离子水中24h。

[0065] 本发明优选将所述脱细胞支架储存于4℃的无菌去离子水中。

[0066] 得到脱细胞支架后,本发明在光照的条件下,将光聚合水凝胶-外泌体悬液涂覆于所述脱细胞支架外表面进行光固化反应,得到所述植物脱细胞人工血管;所述光照的波长为365~550nm;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液包括光聚合水凝胶溶液、外泌体和光引发

剂。

[0067] 在本发明中,所述光聚合水凝胶溶液中的光聚合水凝胶优选包括甲基丙烯酸酐化明胶(GelMA)、甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)、甲基丙烯酰化胶原蛋白(ColMA)、酪胺取代透明质酸(HATyr)、酪胺胶原蛋白(ColTyr)和酪胺明胶(GelTyr)中的一种或多种,更优选为GelMA。

[0068] 在本发明中,所述光聚合水凝胶溶液中含有的光聚合水凝胶的质量百分含量优选为5~10wt%。

[0069] 在本发明中,所述外泌体源头优选包括血液血清、骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、血管内皮细胞来源和血管收缩型平滑肌细胞(VSMC)来源中的一种或多种。

[0070] 在本发明中,所述VSMC的培养方法优选包括以下步骤:

[0071] 使用VSMC培养基对人原代人VSMC进行扩增,当VSMC密度达到90%后进行VSMC传代处理,当VSMC细胞密度达到90%后,采用胰酶对VSMC传代培养液进行酶处理,得到VSMC悬液;将所述VSMC悬液进行固液分离,得到所述VSMC沉淀,弃上清。在本发明中,所述VSMC培养基优选购买自(iCellBioscienceInc,Shanghai)的VSMC专用培养基;所述人原代人VSMC优选购买自(iCellBioscienceInc,Shanghai);本发明优选采用75T培养瓶进行所述扩增和传代处理;在本发明中,所述VSMC悬液的细胞浓度优选为 $10^5 \sim 10^7 \text{ cell/cm}^2$;所述固液分离优选为离心。

[0072] 在本发明中,所述光聚合水凝胶-外泌体悬液中,所述外泌体源头的质量浓度优选为2~200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0073] 在本发明中,所述光引发剂包括Irgacure2959、VA-086、曙红Y和Ru/SPS中的一种或多种,更优选为Ru/SPS。

[0074] 在本发明中,所述光聚合水凝胶-外泌体悬液中,所述光引发剂的质量百分含量优选为0.1~1wt%,更优选为0.1~0.8wt%。

[0075] 在本发明中,所述光聚合水凝胶-外泌体悬液的制备方法优选包括以下步骤:

[0076] 将所述光聚合水凝胶和PBS缓冲溶液在避光的条件下进行第一混合,得到光聚合水凝胶溶液;

[0077] 将所述光聚合水凝胶溶液和所述外泌体第二混合,得到第二混合液;

[0078] 将所述第一混合液和所述光引发剂在避光的条件下进行第三混合,得到所述光聚合水凝胶-外泌体悬液。

[0079] 在本发明中,所述第一混合优选在搅拌的条件下进行,所述搅拌优选使用磁力搅拌机进行,所述搅拌的转速优选为200~1000r/min,更优选为250~900r/min。在本发明中,所述第一混合的温度优选为35~40 $^{\circ}\text{C}$;所述的以混合的搅拌时间优选为5~60min。

[0080] 在本发明中,所述第二混合液优选保存于避光和4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的无菌环境中。

[0081] 在本发明中,所述第一混合液优选在1h之内使用完毕。

[0082] 在本发明中,所述涂覆优选为喷涂,所述喷涂的工作参数优选包括:所述脱细胞支架的旋转速度为50~200r/min,更优选为60~180r/min;所述光聚合水凝胶-外泌体悬液经喷头喷出的速度为0.1~2 $\mu\text{L}/\text{s}$,更优选为0.15~1.5 $\mu\text{L}/\text{s}$ 。

[0083] 在本发明中,所述涂覆进行光固化反应优选在图1所示的喷涂装置中进行;图1中:1为支撑台,2为旋转夹具,3为旋转轴,4为脱细胞支架,5为喷嘴,6为原料储存容器,7为光

源。在本发明中,所述光源7优选固定连接于所述支撑台1的内部底面上;所述旋转夹具2优选固定连接于所述支撑台1的内部侧壁上;所述旋转轴3优选与所述旋转夹具2转动连接;所述原料储存容器6优选通过管道与所述喷嘴5连通;所述喷嘴5优选位于所述旋转轴3的上方。

[0084] 本发明优选将所述脱细胞支架的空心结构插入旋转轴3上,通过旋转夹具2使脱细胞支架在喷涂过程中旋转。

[0085] 在本发明中,所述喷涂优选间歇进行,每次喷涂的持续时间优选为1~3s;相邻两次喷涂的间隔时间优选为5~60s,更优选为10~30s。

[0086] 在本发明中,所述喷涂的间歇次数优选为1~9次。

[0087] 本发明优选采用间歇喷涂,将光聚合水凝胶-外泌体的混合体系以层层光固化的方式稳定的喷涂在脱细胞支架表面,通过递加光能,使水凝胶-外泌体混合体迅速均匀固化在脱细胞支架表面,从而形成稳定的人工血管结构;本发明通在人工血管壁表面构造光固化后的水凝胶水凝胶-外泌体的结构,模仿人体血管中膜的天然形态,以获得仿生和内皮化效果良好的人工血管。

[0088] 本发明提供了上述技术方案所述的制备方法制备得到的植物脱细胞人工血管,所述植物脱细胞人工血管包括脱细胞支架和附着于所述脱细胞支架上的水凝胶-外泌体光固化涂层。

[0089] 为了进一步说明本发明,下面结合附图和实施例对本发明提供的技术方案进行详细描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0090] 实施例1

[0091] 取长度为1.5cm,内径在1mm的空心菜根茎,在4℃、超纯水中浸泡4h去除表面污渍;使用长度为3cm直径为1mm的玻璃棒材穿过空心部分作为支撑,使用PBS缓冲溶液将己烷稀释至85wt%获得己烷溶液,使用10mL己烷溶浸泡空心菜的根茎6h以去除植物表面的角质层,使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除己烷和角质层残留物;使用PBS缓冲溶液将SDS稀释至5wt%并灌注在空心部位7天,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除SDS和组织残留物;使用PBS缓冲溶液稀释Triton-X-100至0.5wt%,用稀释后的Triton-X-100溶液和亚氯酸钠配置Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,Triton-X-100的质量百分含量为0.5wt%,亚氯酸钠的质量百分含量为10wt%,将5mLTriton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液冲洗根茎的空心部位和植物外部144h,每12h换新的Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除Triton-X-100、亚氯酸钠和组织残留物;使用无菌去离子水浸泡脱细胞支架24h。将获得的脱细胞支架在4℃无菌去离子水中存储。

[0092] 选取甲基丙烯酸化水凝胶(Gelma)作为表面改性材料:使用PBS缓冲溶液将其按照5wt%的浓度进行避光搅拌,磁力搅拌机的转速为200r/min,37℃,10min,获得澄清溶液;选取人原代人VSMC(细胞购自iCellBioscienceInc,Shanghai),使用专用培养基(购于iCellBioscienceInc),采用75T培养瓶进行扩增,当细胞密度达到90%后使用T75培养瓶进行细胞传代处理;在细胞数目达到90%后,胰酶进行处理,获取浓度为 10^7 cell/cm²的悬液细胞悬液,使用离心机获得细胞沉淀后,弃上清;使用Gelma溶液将细胞沉淀重新制备成浓度为 10^7 cell/cm²的悬液,避光、无菌保存在4℃,并在1h内使用完毕。使用前,避光加入0.1wt%

Ru/SPS作为光引发剂,并将脱细胞支架的空心棒材插入图1所示结构装置中,固定于喷涂设备旋转轴,设定转速为50r/min,将喷头以0.2 μ L/s的速率进行喷涂,配以持续的500nm波段光进行固化。每喷涂2s后停止,加强光固化15s,再次开始喷涂流程,该程序共重复5次。获得的Glema-VSMC脱细胞人工血管浸泡于PBS中,4 $^{\circ}$ C保存。

[0093] 实施例2

[0094] 取长度为3cm,内径在1.5mm的空心菜根茎,在4 $^{\circ}$ C、超纯水中浸泡6h去除表面污渍;使用长度为5cm直径为1.5mm的玻璃棒材穿过空心部分作为支撑,使用PBS缓冲溶液将己烷稀释至90wt%获得己烷溶液,使用8mL己烷溶浸泡空心菜的根茎4h以去除植物表面的角质层,使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除己烷和角质层残留物;使用PBS缓冲溶液将SDS稀释至7wt%并灌注在空心部位5天,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除SDS和组织残留物;使用PBS缓冲溶液稀释Triton-X-100至0.5wt%,用稀释后的Triton-X-100溶液和亚氯酸钠配置Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,Triton-X-100的质量百分含量为0.5wt%,亚氯酸钠的质量百分含量为10wt%,将10mLTriton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液冲洗根茎的空心部位和植物外部48h,每12h换新的Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除Triton-X-100、亚氯酸钠和组织残留物;使用无菌去离子水浸泡脱细胞支架24h。将获得脱细胞支架在4 $^{\circ}$ C无菌去离子水中存储。

[0095] 选取甲基丙烯酸化水凝胶(Gelma)作为表面改性材料:使用PBS将其按照6wt%的浓度进行避光搅拌,磁力搅拌机的转速为400r/min,37 $^{\circ}$ C,15min,获得澄清溶液;选取人原代人VSMC(细胞购自iCellBioscienceInc,Shanghai),使用专用培养基(购于iCellBioscienceInc),采用75T培养瓶进行扩增,当细胞密度达到90%后使用T75培养瓶进行细胞传代处理;在细胞数目达到90%后,胰酶进行处理,获取浓度为 10^7 cell/cm²的悬液细胞悬液,使用离心机获得细胞沉淀后,弃上清;使用Gelma溶液将细胞沉淀重新制备成浓度为 10^7 cell/cm²的悬液,避光、无菌保存在4 $^{\circ}$ C,并在1h内使用完毕。使用前,避光加入0.5wt% Ru/SPS作为光引发剂,并将脱细胞支架的空心棒材插入图1所示结构装置中,固定于喷涂设备旋转轴,设定转速为100r/min,将喷头以0.3 μ L/s的速率进行喷涂,配以持续的530nm波段光进行固化。每喷涂2s后停止,加强光固化20s,再次开始喷涂流程,该程序共重复5次。获得的Glema-VSMC脱细胞人工血管浸泡于PBS中,4 $^{\circ}$ C保存。

[0096] 图2为本实施例制备的脱细胞支架的通畅情况;图3为本实施例制备的Glema-VSMC脱细胞人工血管的通畅情况。

[0097] 实施例3

[0098] 取长度为2cm,内径在1mm的空心菜根茎,在4 $^{\circ}$ C、超纯水中浸泡6h去除表面污渍;使用长度为3cm直径为1mm的玻璃棒材穿过空心部分作为支撑,使用PBS缓冲溶液将己烷稀释至90wt%获得己烷溶液,使用5mL己烷溶浸泡空心菜的根茎6h以去除植物表面的角质层,使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除己烷和角质层残留物;使用PBS缓冲溶液将SDS稀释至5wt%并灌注在空心部位7天,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除SDS和组织残留物;使用PBS缓冲溶液稀释Triton-X-100至0.5wt%,用稀释后的Triton-X-100溶液和亚氯酸钠配置Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,Triton-X-100的质量百分含量为0.5wt%,亚氯酸钠的质量百分含量为10wt%,将10mLTriton-X-

100和亚氯酸钠的混合溶液冲洗根茎空心部位和植物外部24h,每12h换新的Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除Triton-X-100、亚氯酸钠和组织残留物;使用无菌去离子水浸泡脱细胞支架72h。将获得脱细胞支架在4℃无菌去离子水中存储。

[0099] 选取甲基丙烯酸化水凝胶(Gelma)作为表面改性材料:使用PBS将其按照7wt%的浓度进行避光搅拌,磁力搅拌机的转速为500r/min,40℃,15min,获得澄清溶液;选取人原代人VSMC(细胞购自iCellBioscienceInc,Shanghai),使用专用培养基(购于iCellBioscienceInc),采用75T培养瓶进行扩增,当细胞密度达到为90%后使用T75培养瓶进行细胞传代处理;在细胞数目达到90%后,胰酶进行处理,获取浓度为 10^5 cell/cm²的细胞悬液,使用离心机获得细胞沉淀后,弃上清;使用Gelma溶液将细胞沉淀重新制备成浓度为 10^5 cell/cm²的悬液,避光、无菌保存在4℃,并在1h内使用完毕。使用前,避光加入0.3wt%的Irgacure作为光引发剂,并将脱细胞支架的空心棒材插入图1所示结构装置中,固定于喷涂设备旋转轴,设定转速为80r/min,将喷头以0.2μL/s的速率进行喷涂,配以持续的365nm波段光进行固化。每喷涂1s后停止,加强固化5s,再次开始喷涂流程,该程序共重复2次,获得的Gelma-VSMC脱细胞人工血管浸泡于PBS中,4℃保存。

[0100] 图3为冷冻电镜拍摄的本实施例制备的Gelma-VSMC脱细胞人工血管,有明显的组织脉络和细胞分布。

[0101] 实施例4

[0102] 取长度为3cm,内径在2mm的空心菜根茎,在4℃、超纯水中浸泡6h去除表面污渍;使用长度为5cm直径为2mm的玻璃棒材穿过空心部分作为支撑,使用PBS缓冲溶液将己烷稀释至90wt%获得己烷溶液,使用10mL己烷溶浸泡空心菜的根茎12h以去除植物表面的角质层,使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除己烷和角质层残留物;使用PBS缓冲溶液将SDS稀释至8wt%并灌注在空心部位5天,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除SDS和组织残留物;使用PBS缓冲溶液稀释Triton-X-100至0.1wt%,用稀释后的Triton-X-100溶液和亚氯酸钠配置Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,Triton-X-100的质量百分含量为0.5wt%,亚氯酸钠的质量百分含量为10wt%,将10mLTriton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液冲洗根茎的空心部位和植物外部48h,每12h换新的Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除TTriton-X-100、亚氯酸钠和组织残留物;使用无菌去离子水浸泡脱细胞支架48h。将获得脱细胞支架在4℃无菌去离子水中存储。

[0103] 选取甲基丙烯酸化水凝胶(Gelma)作为表面改性材料:使用PBS将其按照10wt%的浓度进行避光搅拌,磁力搅拌机的转速为1000r/min,40℃,5min,获得澄清溶液;选取人原代人VSMC(细胞购自iCellBioscienceInc,Shanghai),使用专用培养基(购于iCellBioscienceInc),采用75T培养瓶进行扩增,当细胞密度达到90%后使用T75培养瓶进行细胞传代处理;在细胞数目达到90%后,胰酶进行处理,获取浓度为 10^5 cell/cm²的细胞悬液,使用离心机获得细胞沉淀后,弃上清;使用Gelma溶液将细胞沉淀重新制备成浓度为 10^6 cell/cm²的悬液,避光、无菌保存在4℃,并在1h内使用完毕。使用前,避光加入0.5wt%的Ru/SPS作为光引发剂,并将脱细胞支架的空心棒材插入图1所示结构装置中,固定于喷涂设备旋转轴,设定转速为120r/min,将喷头以0.3μL/s的速率进行喷涂,配以持续的550nm波段

光进行固化。每喷涂1s后停止,加强固化20s,再次开始喷涂流程,该程序共重复3次,获得的Glema-VSMC脱细胞人工血管浸泡于PBS中,4℃保存。

[0104] 图5为本实施例使用的GelMA的应力-应变曲线;图6为本实施例制备的脱细胞支架的应力-应变曲线;图7为本实施例制备的Glema-VSMC脱细胞人工血管的应力-应变曲线;由图5~7可以得出:本实施例制备的Glema-VSMC脱细胞人工血管的强度较高,符合人工血管的使用标准。

[0105] 实施例5

[0106] 取长度为5cm,内径在3mm的空心菜根茎,在4℃、超纯水中浸泡6h去除表面污渍;使用长度为7cm直径为3mm的玻璃棒材穿过空心部分作为支撑,使用PBS缓冲溶液将己烷稀释至90wt%获得己烷溶液,使用10mL己烷溶浸泡空心菜的根茎24h以去除植物表面的角质层,使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除己烷和角质层残留物;使用PBS缓冲溶液将SDS稀释至10wt%并灌注在空心部位7天,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除SDS和组织残留物;使用PBS缓冲溶液稀释Triton-X-100至0.5wt%,用稀释后的Triton-X-100溶液和亚氯酸钠配置Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,Triton-X-100的质量百分含量为0.5wt%,亚氯酸钠的质量百分含量为10wt%,将10mLTriton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液冲洗根茎的空心部位和植物外部48h,每12h换新的Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除Triton-X-100、亚氯酸钠和组织残留物;使用无菌去离子水浸泡脱细胞支架72h。将获得脱细胞支架在4℃无菌去离子水中存储。

[0107] 选取甲基丙烯酸化水凝胶(Gelma)作为表面改性材料:使用PBS将其按照5wt%的浓度进行避光搅拌,磁力搅拌机的转速为800r/min,40℃,60min,获得澄清溶液;选取人原代人VSMC(细胞购自iCellBioscienceInc,Shanghai),使用专用培养基(购于iCellBioscienceInc),采用75T培养瓶进行扩增,当细胞密度达到90%后使用T75培养瓶进行细胞传代处理;在细胞数目达到90%后,胰酶进行处理,获取浓度为 10^6 cell/cm²的细胞悬液,使用离心机获得细胞沉淀后,弃上清;使用Gelma溶液将细胞沉淀重新制备成浓度为 10^6 cell/cm²的悬液,避光、无菌保存在4℃,并在1h内使用完毕。使用前,避光加入1wt%的Ru/SPS作为光引发剂,并将脱细胞支架的空心棒材插入图1所示结构装置中,固定于喷涂设备旋转轴,设定转速为200r/min,将喷头以0.5μL/s的速率进行喷涂,配以持续的550nm波段光进行固化。每喷涂2s后停止,加强固化10s,再次开始喷涂流程,该程序共重复4次,获得的Glema-VSMC脱细胞人工血管浸泡于PBS中,4℃保存。

[0108] 图8为本实施例制备的Glema-VSMC脱细胞人工血管浸提液与内皮细胞共培养1天后的细胞核的DPAI光染色结果。

[0109] 对比例1

[0110] 取长度为3cm,内径在2mm的空心菜根茎,在4℃、超纯水中浸泡6h去除表面污渍;使用长度为5cm直径为2mm的玻璃棒材穿过空心部分作为支撑,使用PBS缓冲溶液将己烷稀释至90wt%获得己烷溶液,使用10mL己烷溶浸泡空心菜的根茎12h以去除植物表面的角质层,使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除己烷和角质层残留物;使用PBS缓冲溶液将SDS稀释至8wt%并灌注在空心部位5天,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除SDS和组织残留物;使用PBS缓冲溶液稀释Triton-X-100至0.1wt%,用稀释后的Triton-X-100溶液和亚氯酸钠配

置Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液中,Triton-X-100的质量百分含量为0.5wt%,亚氯酸钠的质量百分含量为10wt%,将10mLTriton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液冲洗根茎的空心部位和植物外部48h,每12h换新的Triton-X-100和亚氯酸钠的混合溶液,后使用PBS缓冲溶液冲洗表面3次以去除Triton-X-100、亚氯酸钠和组织残留物;使用无菌去离子水浸泡脱细胞支架48h。将获得脱细胞支架在4℃无菌去离子水中存储。

[0111] 选取甲基丙烯酸化水凝胶(Gelma)作为表面改性材料:使用PBS将其按照10wt%的浓度进行避光搅拌,磁力搅拌机的转速为1000r/min,40℃,5min,获得澄清溶液;使用前,避光加入0.5wt%的Ru/SPS作为光引发剂,并将脱细胞支架的空心棒材插入图1所示结构装置中,固定于喷涂设备旋转轴,设定转速为120r/min,将喷头以0.3μL/s的速率进行喷涂,配以持续的550nm波段光进行固化。每喷涂1s后停止,加强固化20s,再次开始喷涂流程,该程序共重复3次,获得的Gelma-脱细胞人工血管浸泡于PBS中,4℃保存。

[0112] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例,这些实施例都属于本发明保护范围。

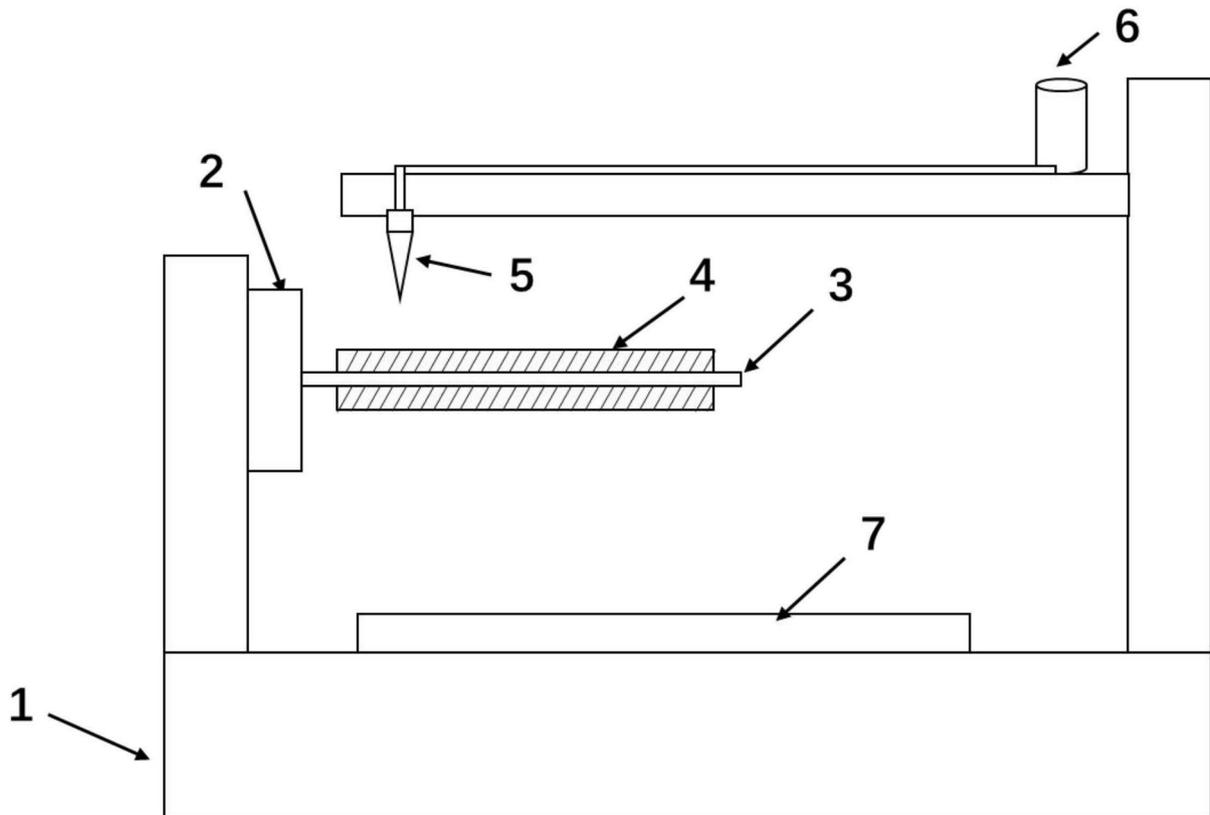


图1



图2



图3

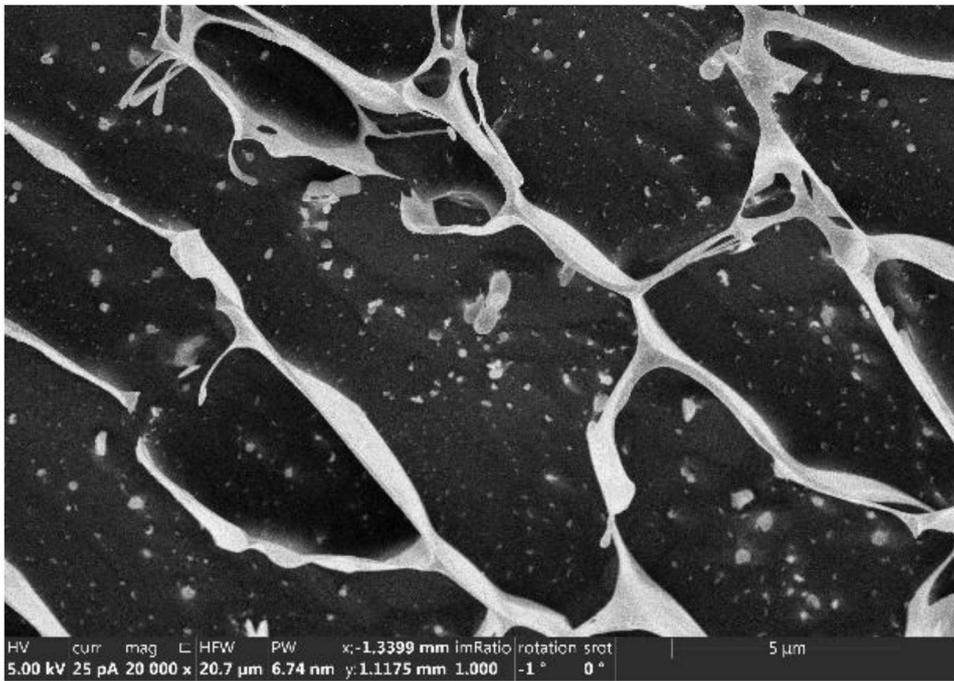


图4

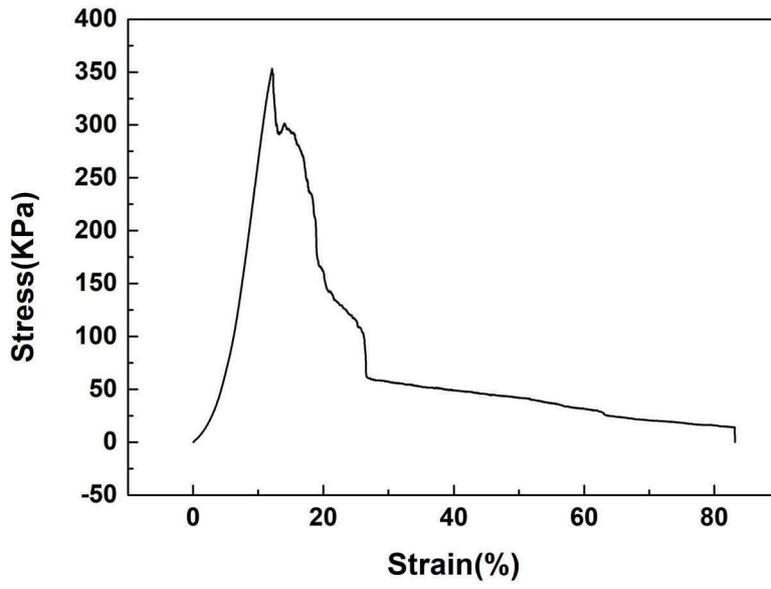


图5

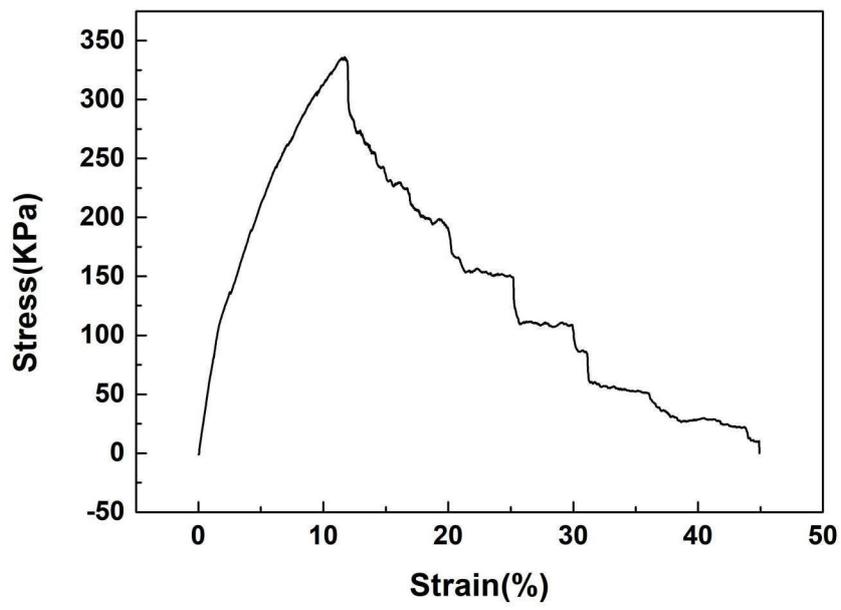


图6

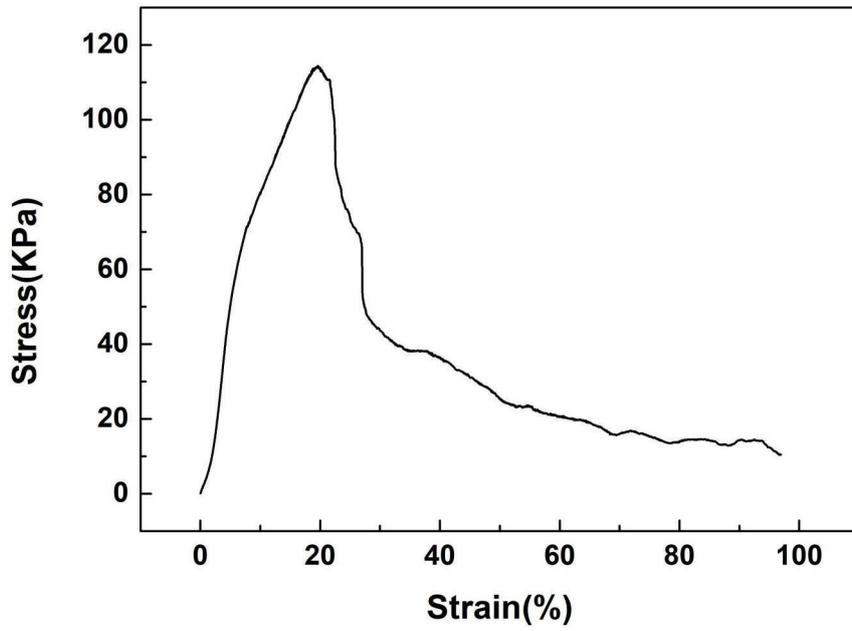


图7

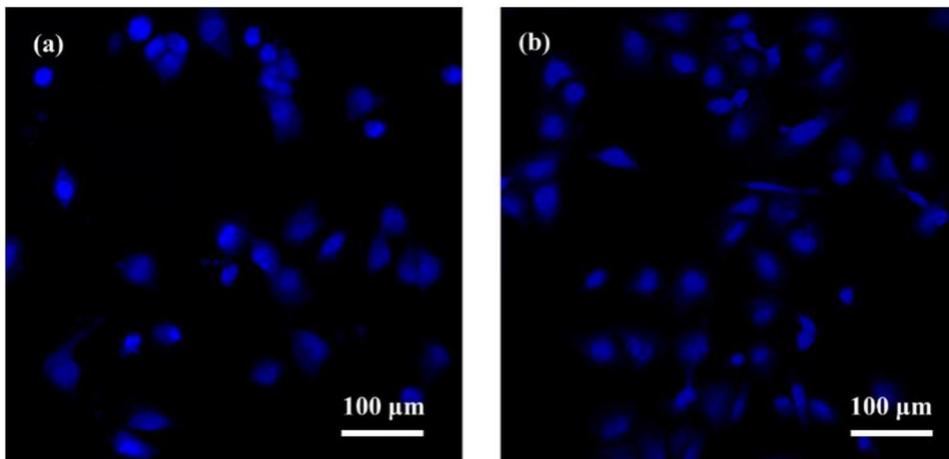


图8