

3D 打印聚己内酯多级管道支架促进梗死后心肌修复

黄世兴 雷东 杨骐 陈闻一 游正伟 叶晓峰

【摘要】 目的:探讨聚己内酯(PCL)多级管道支架对 SD 大鼠梗死后心肌修复的作用及潜在机制。 方法:通过 3D 打印技术,制备 PCL 多级管道支架,选取体质量为 200~250 g 的 SD 大鼠 24 只,随机分为 3 组,分别为假手术组(Sham 组)、急性心肌梗死组(MI 组)以及治疗组(MI + scaffold 组)。采用 Masson 染色,评价术后 28 d 各组 SD 大鼠纤维化程度及心梗面积大小;通过免疫荧光染色,评价术后 28 d 各组心肌梗死交界区和支架内部血管再生情况。 结果:3D 打印成功制备 PCL 多级管道支架;Masson 染色表明,术后 28 d MI 组心肌梗死范围和瘢痕面积明显大于 MI + scaffold 组 $[(64.63 \pm 7.72)\% \text{ 对 } (42.01 \pm 8.68)\%, P < 0.01; (13.85 \pm 1.98)\text{mm}^2 \text{ 对 } (9.82 \pm 1.47)\text{mm}^2, P < 0.01]$;免疫荧光染色表明,术后 28 d MI + scaffold 组心肌梗死交界区域心肌再血管化程度明显高于 MI 组 $[(15 \pm 3.13) \text{ 个/HPF} \text{ 对 } (5.29 \pm 0.91) \text{ 个/HPF}, P < 0.01]$, MI + scaffold 组补片内部血管化程度高于心肌梗死交界区 $[(17.7 \pm 2.71) \text{ 个/HPF} \text{ 对 } (15 \pm 3.13) \text{ 个/HPF}, P < 0.05]$ 。 结论:3D 打印 PCL 多级管道支架通过缩小 SD 大鼠心肌梗死范围及瘢痕区域,促进心肌再血管化来修复心肌。

【关键词】 3D 打印;多级管道结构;血管再生;心肌梗死;左室重构

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.05.010

Effect of 3-dimensionally printed polycaprolactone hierarchical vascular scaffold on repairing myocardium after myocardial infarction HUANG Shixing¹, LEI Dong², YANG Qi¹, CHEN Wenyi³, YOU Zhengwei³, YE Xiaofeng¹. 1. Department of Cardiac Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025; 2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620; 3. State Key Laboratory for Modification of Chemical Fibers and Polymer Materials, College of Materials Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects and potential mechanism of polycaprolactone (PCL) hierarchical vascular scaffold on repairing myocardium in SD rats with myocardial infarction (MI). **Methods:** PCL hierarchical vascular scaffold was created in vitro by three-dimensional printing technique. Twenty-four SD rats weighing 200~250 g were randomly divided into 3 groups, namely sham operation group (sham group), MI group and treatment group (MI + scaffold group). At 28 days post operation, the degree of fibrosis and infarction size in each group were determined after Masson staining. Angiogenesis in infarction border zone as well as scaffold was assessed by immunofluorescence staining.

Results: PCL hierarchical vascular scaffold was successfully obtained by three-dimensional printing. Masson staining showed that infarction size and scar area in MI group were significantly larger than in MI + scaffold group at 28 days after operation $[(64.63 \pm 7.72)\% \text{ vs. } (42.01 \pm 8.68)\%, P < 0.01; (13.85 \pm 1.98) \text{ mm}^2$

基金项目:国家自然科学基金(81571826,81671832)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院心脏外科(黄世兴,杨骐,叶晓峰);201620 上海,东华大学化学化工与生物工程学院(雷东);201620 上海,东华大学材料科学与工程学院纤维材料改性国家重点实验室(陈闻一,游正伟)

通信作者:叶晓峰,Email:xiaofengye@hotmail.com

vs. $(9.82 \pm 1.47) \text{ mm}^2$, $P < 0.01$, respectively]. Compared to MI group, MI + scaffold group showed upregulated angiogenesis in border zone [$(15 \pm 3.13)/\text{HPF}$ vs. $(5.29 \pm 0.91)/\text{HPF}$, $P < 0.01$]. Remarkably, in MI + scaffold group the density of new vessels within patch increased significantly, compared with in border zone [$(17.7 \pm 2.71)/\text{HPF}$ vs. $(15 \pm 3.13)/\text{HPF}$, $P < 0.05$]. **Conclusions:** Three-dimensionally printed PCL hierarchical vascular scaffold repairs myocardium via reducing infarction size as well as scar area and promoting angiogenesis in rats with MI.

【Key words】 Three-dimensionally print; Hierarchical vascular scaffold; Angiogenesis; Myocardial infarction; Left ventricular remodeling

研究表明,心肌补片移植于心肌梗死部位可以为心肌梗死区域提供良好的力学支持,改善心肌梗死后心脏左室重构,减少心肌凋亡,进而改善心功能^[1-3]。大多数相关研究集中在心肌补片良好的力学性质上,而忽略其在促血管化方面的作用,而心肌再血管化对梗死后处于缺血的心肌细胞功能的恢复非常关键^[4]。近年来,3D 打印技术在心肌补片支架领域应用广泛,可精准设计特定的结构促进移植区域的血管化,故心肌补片在促血管化方面有很好的应用前景^[5-6]。本研究中,我们通过 3D 打印技术,以蔗糖和聚己内酯(PCL)为材料,制备多级管道支架,移植于 SD 大鼠心肌梗死区域,探讨其对 SD 大鼠心肌梗死后再血管化作用及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,体质量为 200~250 g,由上海交通大学医学院实验动物科学部提供,动物生产许可证号为 SCXK(沪)2018-0006,使用许可证号为:SYXK(沪)2013-0050,将动物饲养在 12 h 光照、黑暗交替,恒湿恒温环境下。

1.2 主要试剂和仪器

CD31 抗体(1:100,美国 Abcam); α -SMA 抗体(1:200,美国 Abcam);DAPI(美国 Vector);Alexa Fluor 594 荧光二抗(1:1000,美国 Thermo Scientific);Alexa Fluor 488 荧光二抗(1:200,美国 Thermo Scientific);小动物人工呼吸机(DW-3000A/B,北京众实迪科技发展有限公司);共聚焦激光扫描显微镜(LSM-710,德国 Zeiss);PCL(80 000 g/mol,美国 Sigma);六氟异丙醇(HFIP,上海达瑞精细化工);食用蔗糖(市售);CD31 抗体(1:100,美国 Abcam); α -SMA 抗体(1:200,美国 Abcam);DAPI(美国 Vector);Alexa Fluor 594 荧光二抗(1:1000,美国 Thermo Scientific);Alexa Fluor 488 荧光二抗(1:200,美国 Thermo Scientific);扫描电子显微镜(SEM, JSM-5600LV,日本 JEOL);力学试验机(Exceed 40,美国 MTS)小动物人工

呼吸机(DW-3000A/B,北京众实迪科技发展有限公司);共聚焦激光扫描显微镜(LSM-710,德国 Zeiss)。

1.3 3D 打印 PCL 多级管道支架

以市售蔗糖作为原料,在熔融沉积成型(FDM)打印机中加热 1 h,焦糖化处理后作为打印墨水;并进一步通过 3D 打印制备焦糖化模板,打印温度为 135 ℃。将 4% 的 PCL/HFIP 溶液,通过溶剂浇铸法在模板表面形成涂层,然后通过牺牲模板法将焦糖化模板去除,经过冷冻干燥后获得 PCL 多级管道支架。将含有 PCL 涂层的蔗糖支架放置在载玻片上,在载玻片上滴加适量蒸馏水,使支架的一侧与蒸馏水接触,用显微镜观察并视频记录蔗糖溶解的过程。通过 SEM 和力学试验机表征 PCL 多级管道支架的结构和力学参数。将 PCL 支架浸渍红色染料溶液,观察染液在管道中分布情况。

1.4 急性心肌梗死模型构建及支架体内移植

2%戊巴比妥(30 mg/kg)对 SD 大鼠进行腹腔麻醉后,将大鼠固定于手术台,行气管插管,小动物呼吸机维持其呼吸。胸部去毛并消毒铺巾,于左侧第 4~5 肋间隙打开胸腔,打开心包,暴露 SD 大鼠心脏,6-0 聚丙烯缝线于左心耳前下部约 3~4 mm 处缝合,结扎左冠状动脉前降支(LAD),结扎后可观察到心尖部及前壁心肌组织出现苍白色,前壁收缩运动减弱。关闭胸腔并缝合皮肤,将 SD 大鼠送回动物房饲养。Sham 组 SD 大鼠仅开胸,不结扎 LAD。术后 2 d 行超声检查确定基线,筛选出射血分数为 40%~45% 的 SD 大鼠 16 只,随机分成 2 组,分别为 MI 组($n=8$)和 MI + scaffold 组($n=8$)。MI + scaffold 组进行二次开胸,用 6-0 聚丙烯缝线将补片缝合于心脏表面,补片覆盖梗死区域,Sham 组和 MI 组仅二次开胸,关闭胸腔,缝合后将 SD 大鼠送回动物房饲养。

1.5 石蜡包埋及 Masson 染色

术后 28 d 取材 SD 大鼠心肌组织,浸于 4%多聚

甲醛固定 24 h。将固定好的心肌组织置入不同浓度的酒精中脱水(75% 4 h、85% 2 h、90% 2 h、95% 1 h、100% 1 h),将脱水的心肌组织石蜡包埋,于石蜡切片机上连续切片,每层 5 μm ,摊片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤后室温保存备用。将切片先用 Weigert 氏铁苏木素染 5 min,自来水洗后,以 1% 的盐酸酒精分化数秒,流水冲洗数分钟后返蓝。以丽春红酸性品红液染 5~10 min 后,蒸馏水快速漂洗,最后磷钼酸水溶液处理 3~5 min,苯胺蓝液复染 5 min。将染好的切片置于 1% 冰醋酸处理 1 min,脱水封片,显微镜镜检观察。

1.6 免疫荧光染色

将组织切片置于盛满柠檬酸抗原修复液的高压锅内进行抗原修复。冷却后用 PBS 清洗甩干,加入自发荧光淬灭剂 5 min,流水冲洗 10 min。在切片上滴加一抗(CD31 抗体 + α -SMA 抗体),切片平放于湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;玻片置于 PBS 中洗涤 3 次,每次 5 min,稍甩干后滴加与一抗相应种属的二抗覆盖组织,避光室温孵育 50 min;玻片置于 PBS 中洗涤 3 次,每次 5 min,稍甩干后滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min,封片后于共聚焦激光扫描显微镜下观察并采集图片,每个区域取 3 个视野,取平均值。

1.7 统计学分析

计量数据采用均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析(One-way

ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3D 打印 PCL 多级管道支架

3D 打印机需要设定的主要参数有打印温度和打印速率,参数的设定关系到模板打印能否成功和成品支架的形态。图 1A 显示焦糖墨水可以在高温下被顺利挤出形成纤维,并在 3D 打印机的控制下进行排列,温度降低后焦糖墨水很快凝固,所打印的形状能很好保持。如图 1B 所示,3D 打印的蔗糖模板具有精细的三维结构,为直径 400~600 μm 的焦糖丝连续均匀地堆积而成,层与层之间晶丝交叉粘接形成整体。

图 1C 展示了管道内部相互连通,提供管道之间的物质运输通道,这种多级管道结构模拟了血管在组织中的运输功能。采用 4%PCL 浇筑法能够制得厚度适中,均匀完整的三维支架(见图 1D)。支架管路排列整齐,分布均匀,纵横交错。图 1E~1G 显示,由于蒸馏水滴加于支架一侧,支架的溶解从接触蒸馏水一侧开始,并逐渐向另一侧发展。随着溶解时间的增长,蒸馏水与蔗糖之间的固液界面不断向支架内部推移。可以观察到蔗糖已溶解的部分呈白色管状支架,而蔗糖未溶解的支架部分呈浅黄色,蔗糖支架内的气泡也随着溶解向外部迁移。上层支架内蔗糖溶解的同时,下层支架内的蔗糖也在溶解,当所有蔗糖全部溶解时,支架所形成的孔道结构与原有的模板形态结构完全一致。

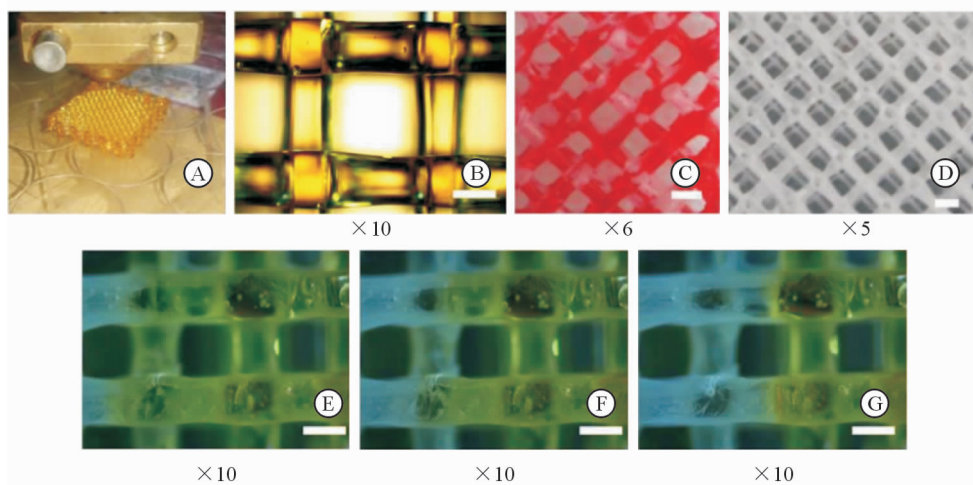


图 1 PCL 多层管道支架制作过程及结构特点(标尺为 500 μm)

2.2 PCL 多级管道支架缩小 SD 大鼠梗死面积及瘢痕面积

术后 28 d 收集各组 SD 大鼠心脏组织,进行 Masson 染色,每组 8 个样本。3 组切面 Masson 染

色整体及局部代表图见图 2。Sham 组心肌组织无明显的纤维化;MI 组术后 28 d 梗死区域纤维化明显,梗死范围比例为(64.63 \pm 7.72)%,瘢痕面积为(13.85 \pm 1.98)mm²;MI + scaffold 组梗死区域纤维

化较 MI 组少,梗死范围为 $(42.01 \pm 8.68)\%$, 瘢痕面积为 $(9.82 \pm 1.47)\text{mm}^2$, 与 MI 组相比均存在明显差异 ($P < 0.01$)。

2.3 PCL 多级管道支架促进心肌再血管化

图 3 中 A 和 B 分别表示 MI 组和 MI + scaffold 组心肌梗死交界区血管再生情况,绿色荧光代表 α -SMA,标记平滑肌细胞,红色荧光代表 CD31,标记血管内皮细胞,蓝色荧光代表 DAPI,标记细胞核。对比两者结果发现,MI + scaffold 组梗死交界区新生血管密度为 (15 ± 3.13) 个/HPF,而 MI 组梗死交界区新生血管密度为 (5.29 ± 0.91) 个/HPF,两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明 PCL 多级管道支架对梗死交界区具有较强的促血管化的能力。图 3 表示 MI + scaffold 组支架内血管再生情况。PCL 多级管道支架内部的新生血管密度为 (17.7 ± 2.71) 个/HPF,与另两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明 PCL 多级管道支架具有良好的生物相容性,并具有促血管再生的能力。

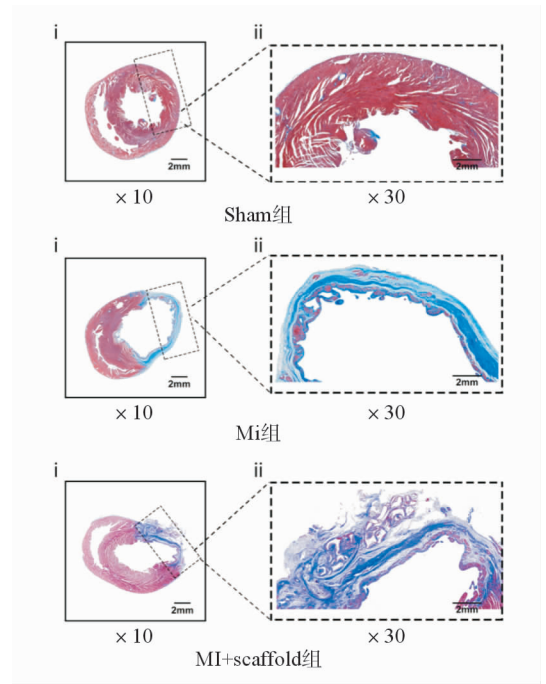
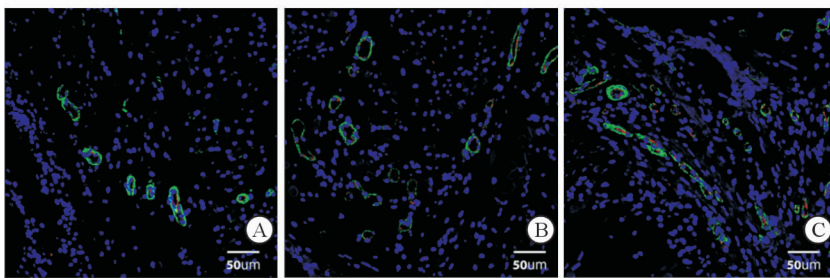


图 2 术后 28 d 心肌组织 Masson 染色



注:A 为 MI 组梗死交界区;B 为 MI + scaffold 组梗死交界区;C 为 MI + scaffold 组支架内部

图 3 术后 28 d 梗死交界区及支架内部血管再生情况 ($\times 200$)

3 讨论

我们通过 3D 打印技术,成功制备 PCL 多级管道支架,并移植于 SD 大鼠梗死心肌表面,发现其可缩小心肌梗死范围和瘢痕区域,并促进交界区域的再血管化,从而修复梗死后的心肌。

目前,心肌补片支架因其在力学性能上的优越性,在梗死后心肌修复方面取得了较好的成果^[7]。然而,大多研究主要关注补片支架的力学性能,在其生物相容性和促血管化方面仍然面临很大的挑战^[8]。3D 打印技术能准确设计和调控支架结构,在心肌补片支架方面应用广泛。

本研究采用 3D 打印构筑三维结构仿生血管网络。受限于现有设备的精度和材料流动加工过程中的变形性,3D 打印技术尚无法直接打印薄壁血管网络结构,因此采取间接倒模的方式来制备血管网络支架。利用间接倒模法制备三维支架已经取得一定的成果,但仍然面临一定的挑战,包括材料的

选择、三维支架结构的稳定性、生物相容性及可降解性^[9-10]。我们选择食用级的蔗糖作为原料,利用熔融层积成型技术打印支架的模板。模板的形态结构可以通过 3D 打印实现宏观和微观层面上个性化的定制。焦糖化的蔗糖具有诸多优点:良好的生物相容性、原料的易得性、适宜的熔点、熔融状态下良好的流动性和降温时快速的固化成型性。采用液浇铸和模板浸出法,将生物材料制备成三维连通的管状网络支架,并通过调控相分离在支架管道壁上形成均匀分布的微纳米级的开放孔,模拟天然血管壁的通透性,保证氧气和营养物质能够通过管壁,使仿生血管网具备类似血管壁的物质交换功能。该巧妙的多级管道结构有利于血管的生长。

心脏发生心肌梗死后,随着病情的进展,心脏左室发生不良的左室重构,即心脏左室扩大,胶原纤维沉积,瘢痕形成,最终导致心力衰竭,故逆转不良的左室重构对于梗死后心肌修复至关重要^[11]。

本研究中我们发现,PCL 多级管道支架移植于 SD 大鼠梗死心肌表面 28 d 后,MI + scaffold 组梗死范围和瘢痕区域明显小于 MI 组,说明 PCL 多级管道支架在一定程度上能促进心肌修复。心肌再血管化在心肌修复中起重要作用,早期再血管化有助于梗死交界区处于缺血的心肌获得足够的血供,防止其因长期的缺血而导致凋亡^[12]。本研究中,PCL 多级管道支架中长入大量的新生血管,同时梗死交界区也有大量的新生血管,为处于缺血的心肌细胞提供了良好的血供,减少梗死交界区心肌细胞的凋亡,故最终可缩小梗死范围和瘢痕面积,这与组织学结果相符。

我们通过 3D 打印技术成功制备 PCL 多级管道支架,经动物实验证实可促进梗死心肌再血管化,缩小梗死范围和梗死面积,达到修复心肌的作用。

参 考 文 献

- [1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the american heart association[J]. *Circulation*, 2017, 135(10):e146-e603.
- [2] Coulombe KL, Bajpai VK, Andreadis ST, et al. Heart regeneration with engineered myocardial tissue[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2014, 16:1-28.
- [3] Huang S, Yang Y, Yang Q, et al. Engineered circulatory scaffolds for building cardiac tissue[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(suppl20):S2312-S2328.
- [4] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(4/5):300-311.
- [5] Richards D, Jia J, Yost M, et al. 3D bioprinting for

vascularized tissue fabrication[J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45(1):132-147.

- [6] Zhang YS, Arneri A, Bersini S, et al. Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip[J]. *Biomaterials*, 2016, 110:45-59.
- [7] Yang Y, Lei D, Huang SX, et al. Elastic 3D-printed hybrid polymeric scaffold improves cardiac remodeling after myocardial infarction[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(10):e1900065.
- [8] Silvestri A, Boffito M, Sartori S, et al. Biomimetic materials and scaffolds for myocardial tissue regeneration[J]. *Macromol Biosci*, 2013, 13(8):984-1019.
- [9] Hernández-Córdova R, Mathew DA, Balint R, et al. Indirect three-dimensional printing: a method for fabricating polyurethane-urea based cardiacscaffolds[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(8):1912-1921.
- [10] Jung JM, Lee H, Hong JM, et al. A new method of fabricating a blend scaffold using an indirect three-dimensional printing technique[J]. *Biofabrication*, 2015, 7(4):045003.
- [11] D'Amore A, Yoshizumi T, Luketich SK. Bi-layered polyurethane-extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model[J]. *Biomaterials*, 2016, 107:1-14.
- [12] Akintewe OO, Roberts EG, Rim NG, et al. Design approaches to myocardial and vascular tissue engineering[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19(1):389-414.

(收稿:2019-05-12 修回:2019-06-24)

(本文编辑:丁媛媛)