

经戊二醛固定的牛心包生物瓣膜材料的 生物安全性评价

黄虹蓉¹, 林钟石¹, 臧德跃², 袁丽欣², 钟文雨¹, 林柏佑², 刘尧¹

(深圳市医疗器械检测中心体外诊断试剂检测部¹, 无源医疗器械检测部²,
广东 深圳 518000)

摘要:目的 对经戊二醛固定的牛心包瓣膜材料进行生物安全性评价,为其在未来的临床使用中提供安全有效的依据。方法 依据 GB/T 16886/ISO 10993 系列标准要求,选择体外细胞毒性试验噻唑盐比色法(MTT)、皮肤致敏试验、皮内反应试验、热原试验、急性全身毒性试验、遗传毒性组合试验(Ames 试验、体外小鼠淋巴瘤 tk 试验和体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传毒评估试验)和溶血试验等对经戊二醛固定的牛心包瓣膜材料进行生物安全性评价,通过细胞存活率、溶血率的计算结果及对动物皮肤红斑和水肿反应、刺激反应、毒性反应的观察以及对潜在的致突变性和致癌性的评估,判断牛心包瓣膜材料的生物安全性。结果 牛心包瓣膜材料的细胞存活率为 73.60%;皮肤致敏反应等级为 0 级;皮内反应总平均记分为 0;急性全身毒性试验浸提液组与对照组小鼠体重无显著性差异;热原试验家兔的体温升高均低于 0.6℃;溶血率为 1.26%;Ames 试验浸提液组回变菌落数均未比阴性组回变菌落数增加 1 倍或者 1 倍以上;MLA 试验浸提液组 MF 值与阴性对照相比无超过 126×10^{-6} 的增长;体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传毒评估试验浸提液组染色体结构畸变率与阴性对照无显著性差异。结论 经戊二醛固定的牛心包瓣膜材料符合国家医疗器械标准的要求,表现出良好的生物安全性。

关键词:生物安全性;戊二醛;牛心包;生物瓣膜

中图分类号:R318

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.24.018

文章编号:1006-1959(2022)24-0095-07

The Biosafety Evaluation of Glutaraldehyde-fixed Bovine Pericardium Biovalve Materials

HUANG Hong-rong¹, LIN Zhong-shi¹, ZANG De-yue², YUAN Li-xin², ZHONG Wen-yu¹, LIN Bai-you², LIU Yao¹

(Department of In-vitro Diagnostic Reagent Testing¹, Department of Passive Medical Device Testing²,

Shenzhen Testing Center of Medical Devices, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

Abstract: Objective To evaluate the biosafety of glutaraldehyde-fixed bovine pericardial valve materials and provide a safe and effective basis for their future clinical use. **Methods** According to the requirements of GB/T 16886/ISO 10993 series standards, the biological safety of glutaraldehyde-fixed bovine pericardial valve materials was evaluated by MTT assay, skin sensitization test, intradermal reaction test, pyrogen test, acute systemic toxicity test, genetic toxicity combination test (Ames test, in vitro mouse lymphoma tk test and in vitro mammalian chromosome damage cell genetic toxicity assessment test) and hemolysis test. Through the calculation results of cell survival rate and hemolysis rate, the observation of animal skin erythema and edema reaction, stimulation reaction, toxicity reaction and the evaluation of potential mutagenicity and carcinogenicity, the biosafety of bovine pericardial valve material was judged. **Results** The cell survival rate of bovine pericardial valve material was 73.60%. The skin sensitization reaction grade was 0; the total average score of intradermal reaction was 0; there was no significant difference in body weight between the extract group and the control group in acute systemic toxicity test. The temperature rise of rabbits in pyrogen test was lower than 0.6℃. Hemolysis rate was 1.26%. The number of revertant colonies in the Ames test extract group did not increase by one time or more than one time compared with the negative group. The MF value of the MLA test extract group did not increase by more than 126×10^{-6} compared with the negative control; cytogenetic toxicity assessment of mammalian chromosome damage in vitro There was no significant difference in chromosome structural aberration rate between the extract group and the negative control. **Conclusion** The glutaraldehyde-fixed bovine pericardial valve materials meets the requirements of national medical device standards and shows good biosafety.

Key words: Biological safety; Glutaraldehyde; Bovine pericardium; Biological valve

瓣膜疾病属于老年病,随着我国人口进一步老龄化,瓣膜病的患者也逐渐增多;然而由于我国瓣膜材料的稀缺,多数治疗需求主要依赖于国外。由此看来,瓣膜行业是一个长期发展的黄金赛道,而我国瓣膜行业正处于发展的基点^[1]。基于机械瓣膜血栓

栓塞形成的风险较高,且植入后患者需要进行长期的抗凝治疗,因此生物瓣膜的使用备受重视^[2,3]。而在生物瓣膜领域,已经有大量文献数据证明了牛心包瓣膜的耐久度要优于猪心包瓣膜。与猪心包瓣膜相比,牛心包瓣膜的组织结构更为致密,对心动周期的压力具有更好的耐受性,抗撕裂的能力更强,所以经过同样处理水平的牛心包瓣膜的耐久性会更高^[4-6]。通过戊二醛处理的生物材料,可以降低免疫原性并具有一定的柔性,因此目前大部分生物心瓣膜多使用戊二醛来进行固定。戊二醛是常用的医

作者简介:黄虹蓉(1993.3-),女,广东河源人,本科,助理工程师,主要从事无源医疗器械产品微生物学、体外生物学和洗消验证检验检测工作

用有机化合物,对细胞和皮肤都一定的毒性和刺激性^[7,8]。本研究旨在对戊二醛固定后的牛心包生物瓣膜材料按照 GB/T 16886/ISO 10993 的标准的 要求,选择体外细胞毒性、致敏、皮内反应、热原、急性全身毒性、遗传毒性和溶血试验等进行生物安全性评价,为其在未来的临床使用和瓣膜材料的行业发展提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料与动物 小鼠成纤维细胞(L929 细胞)、小鼠淋巴瘤细胞 L5178YTK+/-3.7.2C、中国仓鼠肺细胞(CHL 细胞)来源于 National Collection of Authenticated Cell Cultures。鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 来源于 moltox 公司。普通级新西兰兔(2.9~3.0 kg)、普通级白化豚鼠(300~400 g)来源于广州市白云区龙归兴科动物养殖场。SPF 级 NIH 小鼠(17~23 g)来源于广东省医学实验动物中心。动物的护理和使用遵循了所有适用的有关动物伦理法规的要求,且实验方案得到了深圳市药品检验研究院(深圳市医疗器械检测中心)伦理委员会的批准。牛心包生物瓣膜材料来源于深圳市健心医疗科技有限公司。

1.2 主要试剂 含酚红 MEM 培养基、不含酚红 MEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶、RPMI1640 培养基、马血清、2-氨基苄(2-AF),均来

源于 Thermo Fisher。弗氏完全佐剂(FCA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO),来源于 Merck。鼠肝微粒体酶(S9),来源于 moltox 公司。三氟胸苷(TFT)、葡萄糖-6-磷酸钠盐(G6P)、环磷酸胺(CP)、4-硝基喹啉氧化物(NQO)、氧化型辅酶 II (NADP)、丝裂霉素 C(MMC)、L-组氨酸、敌克松,均来源于 SIGMA 公司。氧化型辅酶 II (NADP),来源于阿拉丁公司。姬姆萨储备液,来源于珠海贝索生物。0.9%氯化钠注射液,来源于江西科伦药业。棉籽油,来源于 ACROS 公司。技术琼脂粉,来源于广东环凯。

1.3 主要仪器设备 二氧化碳培养箱(美墨尔特);恒温摇床(Thermo Scientific);倒置显微镜、正置荧光显微镜、荧光倒置显微镜(德国徕卡);高压蒸汽灭菌器(HIRAYAMA);恒温水浴箱(美墨尔特);紫外可见分光光度计(日本岛津);电子天平(梅特勒);细胞计数器(BIORAD);微生物培养箱(Thermo Scientific)。

1.4 样品材料制备 将浸泡在戊二醛固定液中的牛心包生物瓣膜材料取出,用 500 ml 的无菌生理盐水清洗 3 次,清洗过程中注意要轻轻挤压瓣膜的裙边,以除去残留的戊二醛。对清洗后的牛心包生物瓣膜材料按照 6 cm²/ml 的比例加入极性浸提液和非极性浸提液(表 1),置于 37 ℃ 的恒温振荡器浸提 24~72 h^[9]。

表 1 样品生物相容性样品浸提液制备

浸提介质		试验
极性	非极性	
含血清 MEM 培养基		细胞毒性试验
0.9% NaCl		热原试验、溶血试验
0.9% NaCl	棉籽油	皮肤致敏试验、皮内反应试验、急性全身毒性试验
0.9% NaCl	DMSO	Ames 试验
不含血清 RPMI1640 培养基	含血清 RPMI1640 培养基	体外小鼠淋巴瘤 tk 试验
不含血清 MEN 培养基	含血清 MEN 培养基	体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传毒评估试验

1.5 体外细胞毒性试验 选择 MTT 细胞毒性试验对牛心包瓣膜材料进行细胞毒性检测^[10]。将培养至近汇合状态的 L929 细胞调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/ml 后接种于 96 孔培养板,置 37 ℃ 培养 24 h 后弃去原培养液,分别加入 100 μl 的空白对照、阴性对照(高密度聚乙烯)、阳性对照(10% DMSO)、样品浸提液,每组设 6 孔。培养 24 h 后,弃去原培养液并加入 50 μl 的 MTT 溶液再孵育 2 h。然后弃去,每孔加入 100 μl 异丙醇,在酶标仪 570 nm 波长(参比波长 650 nm)下测定光密度并计算细胞存活率。

1.6 皮肤致敏试验 选择豚鼠最大剂量法对牛心包瓣膜材料进行皮肤致敏试验^[11]。取普通级豚鼠 50

只,随机分成 5 组,分别为样品组(极性浸提液组、非极性浸提液组)、阴性对照组(极性阴性对照组、非极性阴性对照组),阳性对照组(2,4-二硝基氯苯);剔除豚鼠肩胛骨内侧部位的毛发后进行 0.1 ml 的皮内注射作为皮内诱导。皮内诱导 6 d 后,将浸透浸提液的纱布块局部贴敷于豚鼠的肩胛骨内侧部位,覆盖诱导注射点并于 48 h 后除去作为局部诱导。13 d 后,将浸透浸提液的纱布块贴敷于诱导阶段未试验部位(每只动物的上腹部)并于 24 h 后除去进行激发。局部诱导和激发阶段结束后,观察皮肤:按 Magnusson 和 Kligman 分级标准对每一激发部位和每一观察时间皮肤红斑和水肿反应进行

分级与评价。

1.7 皮内反应试验 取普通级家兔 3 只,在每只家兔脊柱左侧皮内注射极性样品浸提液和非极性样品浸提液;家兔脊柱右侧皮内注射极性溶剂对照液和非极性溶剂对照液作为对照,注射后按标准规定的时间点观察各注射部位情况,根据记分系统观察各部位的红斑和水肿的组织反应情况并进行评分。

1.8 急性全身毒性试验 将 20 只 SPF 级小鼠随机分成极性和非极性的浸提液组和对照组,每组 5 只。其中极性组按 50 ml/kg 的注射剂量将浸提液自尾静脉分别注入动物;非极性组按 50 ml/kg 的注射剂量将浸提液自腹腔分别注入动物,注射完毕后,按标准要求的时间点观察小鼠的临床症状反应,并记录动物体重^[12]。

1.9 热原试验 取适用的家兔 3 只,将测温探头插入肛门以监测家兔的体温,试验前 30 min 内测量体温作为该兔的对照体温。测定体温正常后自耳静脉缓慢注入规定剂量(10 ml/kg)样品浸提液,在注射后的 3 h 内,每隔 30 min 测量其体温 1 次,共计 6 次,以 6 次体温中最高的 1 次减去对照体温,即为该兔体温升高的温度。

1.10 溶血试验 从健康家兔心脏抽取新鲜抗凝血,

加入生理盐水液稀释备用。将样品分装于 3 支试管中,5 g/支,并加入 0.9% NaCl 作为样品组;阴性对照组 3 支试管加入 0.9% NaCl;阳性对照组 3 支试管加入蒸馏水后置 37 ℃保温 30 min 后加入稀释兔血,混匀并置于 37 ℃保温 60 min。保温结束后倒出管内液体以 800 g 离心 5 min,吸取上清液移入比色皿内,用紫外分光光度计在 545 nm 波长处测定吸光度并计算溶血率^[13]。

1.11 遗传毒性试验 依据 GB/T 16886.3 选择 Ames 试验,体外小鼠淋巴瘤 tk 试验和体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传毒评估试验对样品进行遗传毒性评价^[14,15]。

1.11.1 Ames 试验 将 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 这 5 种菌株接种在营养肉汤中,在 37 ℃振荡(100 r/min)培养得到约 1×10^9 个/ml 活菌数的菌液。依次在顶层培养基中加入菌液、试验样品浸提液(极性和非极性浸提液组)、样品浸提介质、表 2 所示的诱变剂溶液。各组中的活化组加入 0.5 ml S9 混合液,无活化组加入 0.5 mol/L PBS。混匀后迅速倾入底层培养基上。每种浸提液在加入和不加入 S9 的条件下各做 3 个平行,37 ℃培养 48 h,计算菌株的回变菌落数。

表 2 Ames 试验阳性对照物质

	菌株	阳性剂	终浓度(μg/皿)
-S9	TA97a、TA98、TA100	敌克松	100
-S9	TA1535	叠氮化钠	50
-S9	TA102	丝裂霉素 C	0.5
+S9	TA97a、TA98、TA102	敌克松	100
+S9	TA100	2-氨基苄	10
+S9	TA1535	环磷酰胺	300

1.11.2 体外小鼠淋巴瘤 tk 试验 取 1×10^6 个/ml 的 L5178Y 细胞 10 ml,样品组加入 9 ml 样品浸提液(极性和非极性浸提液组);阴性对照组加入 9 ml 浸提介质;阳性对照加入 9 ml 诱变剂(+S9;CP;-S9;NQO)的溶液混合。各组中的活化组加入 S9 混合液,无活化组加入 150 mmol/L KCL 溶液,按标准规定进行接触处理和表达,培养结束后目视观察各 96 孔板无集落生长的孔数,计算细胞悬浮增长率(SG)、相对总增长率(RTG)、平板效率(PE₀ 和 PE₂)、相对存活率(RS₀ 和 RS₂)、TFT 抗性突变总频率(T-MF)和 TFT 抗性突变小集落频率(S-MF)。

1.11.3 体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传毒评估试验 将 1×10^5 个/ml 的 CHL 细胞接种于培养皿培养 24 h 后弃去培养液,样品组加入 9 ml 样品浸提

液(极性和非极性浸提液组);阴性对照组加入 9 ml 浸提介质混合;阳性对照加入 9 ml 诱变剂(+S9;CP;-S9;MMC)的溶液混合。各组中的活化组加入 S9 混合液,无活化组加入培养基,置于 CO₂ 培养箱受试物接触 6 h 和 24 h。接触结束后,弃去培养液并加入细胞分裂中期阻断剂秋水仙素,培养结束后进行细胞计数并离心弃上清。按标准规定进行低渗、固定、滴片和染色。在光学显微镜下每组选择 200 个分散良好的中期分裂相(染色体数为 $2n \pm 2$)进行染色体畸变分析。计算相对细胞增长数、染色体结构异常百分率等。

1.12 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件对染色体畸变数进行统计学处理,服从泊松分布的数据以(%)描述,数据经泊松检验后,组间比较采用 *t* 检

验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为统计学意义显著。

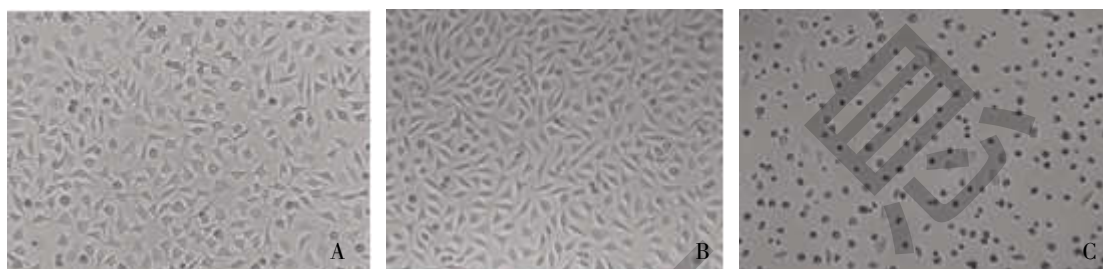
2 结果与分析

2.1 体外细胞毒性试验 在显微镜下观察细胞(图1),阴性对照组均贴壁生长良好,细胞形态正常,细胞多呈梭形或不规则三角形;阳性对照组细胞稀疏且多成圆形,贴壁不牢;样品组无大范围细胞溶解,但细胞生长受到轻微抑制,少量细胞形态发生改变,偶见悬浮死细胞。采用 MTT 法测量吸光度,计算细胞存活率,结果显示,阴性对照细胞存活率为 99.50%,阳性对照细胞存活率为 8.69%,样品 100%浸提液细存

活率为 73.60%,无潜在细胞毒性。

2.2 皮肤致敏试验 观察动物试验部位皮肤,结果显示,样品浸提液组动物在观察期内致敏反应等级均为 0 级,未观察到样品的两种浸提液有引起动物皮肤致敏反应的现象见图 2。

2.3 皮内反应试验 样品浸提液组和溶剂对照组动物在观察期内的反应均为无红斑、无水肿,样品组和对照组的总平均记分之差为 0,未观察到被测样品的两种浸提液对家兔产生刺激反应的任何现象,见图 3,家兔观察并评分见表 3。



注:A:样品对照组;B:阴性对照组;C:阳性对照组

图 1 细胞毒性显微镜下各组细胞形态($\times 40$)



图 2 皮肤致敏试验样品组结果



图 3 皮内反应试验样品组结果

表 3 皮内反应试验结果($n=3$,分)

组别	记分(ER/OE)			平均记分	总平均记分
	24 h	48 h	72 h		
极性样品浸提液组	0/0	0/0	0/0	0	0
非极性样品浸提液组	0/0	0/0	0/0	0	0
极性溶剂对照组	0/0	0/0	0/0	0	0
非极性溶剂对照组	0/0	0/0	0/0	0	0
样品组和对照组的总平均记分之差		0			

注:表中 ER/OE,ER 为红斑和焦痂形成,OE 为水肿形成

2.4 急性全身毒性试验 观察动物的临床反应并记录体重,结果显示,样品浸提液组小鼠在观察期内体重均有所增长且与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。观察期间未出现如呼吸急促、异常运动、软便腹泻、水肿红斑等常见临床症状反应,结果表明被测样品两种浸提液无急性全身毒性。

2.5 热原试验 记录监测到家兔体温,试验结果显示,3 只家兔的体温升高均低于 $0.6\text{ }^{\circ}\text{C}$,结果表明被测样品浸提液无致热性。

2.6 溶血试验 用紫外分光光度计在 545 nm 波长处测定吸光度,结果显示,样品吸光度为 0.025 ,阴性对照的吸光度为 0.014 ,计算样品溶血率为 1.26% ,低于标准要求的 5% ,符合医疗器械溶血率的规定。

2.7 遗传毒性试验

2.7.1 Ames 试验 浸提液组回变菌落数均未比阴性组回变菌落数增加 1 倍或者 1 倍以上。故在加与不加代谢活化系统的情况下,样品极性和非极性浸提液细菌回复突变试验结果均为阴性,见表 4。

2.7.2 MLA 试验 与阴性对照相比,浸提液组 MF 值未出现超过 126×10^{-6} 的增长。故在加与不加代谢活化系统的情况下,样品极性和非极性浸提液体外小鼠淋巴瘤 tk 试验结果为阴性,见表 5、表 6。

2.7.3 体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传毒评估试验 浸提液组染色体结构畸变率与阴性对照比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 7。故在加与不加代谢活化系统的情况下,样品极性和非极性浸提液体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传评估试验结果均为阴性。

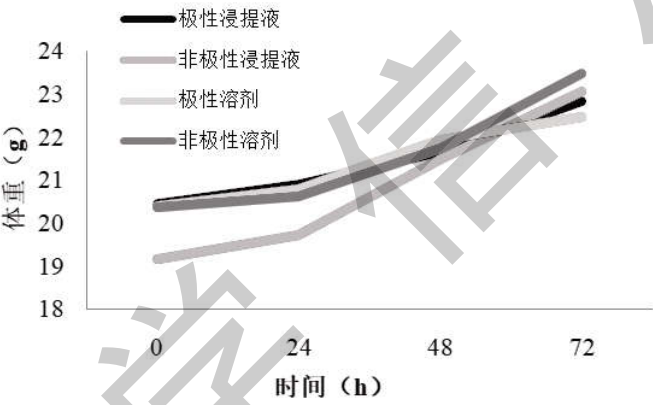


图 4 急性全身毒性试验各组动物体重变化

表 4 Ames 试验菌株的回变菌落数($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
极性阴性组	130±6	98±13	31±7	23±3	141±8	123±11	281±33	212±17	17±4	18±4
极性浸提液组	128±10	100±17	34±6	31±3	144±7	136±28	285±9	224±25	18±2	14±4
非极性阴性组	128±13	100±4	30±9	25±5	160±6	135±3	234±17	218±28	20±5	13±4
非极性浸提液组	130±4	95±5	37±3	24±3	156±13	141±11	261±6	207±12	16±2	15±5
敌克松	1289±79	921±146	1257±59	1132±47	/	745±12	2515±302	/	/	/
叠氮化钠	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1894±106
环磷酸胺	/	/	/	/	/	/	/	/	867±49	/
2-氨基苄	/	/	/	/	740±39	/	/	/	/	/
丝裂霉素 C	/	/	/	/	/	/	/	1569±384	/	/

注:表中数值为 3 个平皿菌落数的均值

表 5 样品 4 h 接触细胞突变频率

结果	无活化系统				阳性对照	有活化系统				阳性对照
	极性		非极性			极性		非极性		
	阴性对照	浸提液组	阴性对照	浸提液组		阴性对照	浸提液组	阴性对照	浸提液组	
PE ₀ (%)	67.69	68.66	69.65	77.01	40.77	77.01	80.45	85.35	86.65	45.95
RS ₀ (%)	/	109.88	/	108.31	60.93	/	128.81	/	112.01	56.67
PE ₂ (%)	79.28	79.28	90.68	87.96	59.59	90.68	80.45	82.85	81.64	71.66
RS ₂ (%)	/	100.00	/	97.00	65.72	/	88.72	/	98.54	86.49
SG	13	14	13	13	8	14	13	14	14	7
RTG(%)	/	122.68	/	86.18	36.39	/	104.37	/	106.61	52.06
T-MF(×10 ⁻⁶)	111	92	104	137	645	97	137	53	75	513
S-MF(×10 ⁻⁶)	111	92	97	133	547	97	129	53	67	421

表 6 样品 24 h 接触细胞突变频率

结果	极性		非极性		阳性对照
	阴性对照	浸提液组	阴性对照	浸提液组	
PE ₀ (%)	86.64	73.75	72.70	81.64	52.42
RS ₀ (%)	/	80.82	/	113.48	64.51
PE ₂ (%)	104.62	82.85	89.30	79.28	43.98
RS ₂ (%)	/	79.19	/	88.78	49.24
SG	35	30	34	34	24
RTG(%)	/	64.77	/	91.10	31.85
T-MF($\times 10^{-6}$)	81	95	62	73	849
S-MF($\times 10^{-6}$)	81	81	33	73	753

表 7 体外哺乳动物染色体损伤的细胞遗传评估试验结果

组别	相对细胞增长数(%)		细胞畸变数		染色体畸变率(%)	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
阴性对照 6 h 接触(极性)	/	/	5	7	2.50	3.50
极性浸提液组 6 h 接触	90.88	94.63	5	6	2.50	3.00
阴性对照 6 h 接触(非极性)	/	/	8	5	4.00	2.50
非极性浸提液组 6 h 接触	113.60	93.36	6	7	3.00	3.50
阳性对照组 6 h 接触	/	/	23*	41*	11.50*	20.50*
阴性对照 24 h 接触(极性)	/	/	/	7	/	3.50
极性浸提液组 24 h 接触	/	90.68	/	5	/	2.50
阴性对照 24 h 接触(非极性)	/	/	/	7	/	3.50
非极性浸提液组 24 h 接触	/	90.55	/	5	/	2.50
阳性对照组 24 h 接触	/	/	/	33*	/	16.50*

注:与阴性对照比较,* $P < 0.01$

3 总结

心脏是人体最复杂的器官,很难做到经常更换瓣膜,所以瓣膜能不能用的足够久,是衡量一款瓣膜是否为好产品的最重要的因素,因此抗钙化的性能是人工生物心脏瓣膜的主要评价指标,它直接决定了生物瓣膜材料在人体内的耐久度,是整个处理过

程中相对最难也是最关键的一步。

目前,已有研究发现可采用环氧化物^[16]、京尼平^[17,18]、茶多酚^[19]、姜黄素^[20]等各种非戊二醛体系处理生物瓣膜以提高瓣膜的性能,但仍不能在整个处理体系中完全替代戊二醛的作用并达到最优的处理效果。戊二醛是应用最为广泛的制备生物瓣膜材料

的试剂,其不仅能够桥接不同多肽链上赖氨酸或羟赖氨酸残基上的氨基,在牛心包组织中形成分子间或分子内的交联,降低瓣膜的免疫原性和提高柔性,大大提升瓣膜组织抗钙化的能力,促进耐久度的提高;并且能很好的灭病毒、灭菌以及为瓣膜的长期保存提供稳定的环境^[21]。由于戊二醛对皮肤、黏膜具有一定的毒性和刺激性,本研究通过用生理盐水清洗瓣膜的方法排除瓣膜上残留的戊二醛后,再按照标准方法对样品进行制备,以排除戊二醛对试验体系的干扰作用。

依据 ISO10993.1 的要求,本研究通过细胞毒性、皮肤致敏和刺激或皮内反应、急性全身毒性、热原、溶血、遗传毒等试验对经戊二醛固定后牛心包瓣膜材料进行了生物相容性研究,结果显示经戊二醛固定后的牛心包生物瓣膜材料经生理盐水清洗后具有良好的生物相容性,符合医疗器械标准的要求。此外,牛心包生物瓣膜材料作为一种动物源性医疗器械,后续将针对其在免疫毒理学方面作进一步的研究,为动物源性医疗器械未来在临床上的有效性、安全性和质量控制评价提供有效的参考依据。

参考文献:

- [1]范阜东,汤鑫龙,周庆,等.50~60岁二尖瓣患者机械瓣与生物瓣植入术后临床疗效对比:倾向性评分匹配研究[J].中国胸心血管外科临床杂志,2021,1(1):1-5.
- [2]王寅,董念国.我国生物瓣临床应用现状与思考[J].中国胸心血管外科临床杂志,2018,25(6):458-460.
- [3]Tirone David.How to decide between a bioprosthetic and mechanical valve[J].Can J Cardiol,2021,37(7):1121-1123.
- [4]吴泽斌,金昌,王丽珍,等.经导管瓣膜瓣叶材料力学性能研究[C]//第十二届全国生物力学学术会议暨第十四届全国生物流变学学术会议会议论文摘要汇编.2018:114.
- [5]Song M,Tang Z,Liu Y,et al.Yak Pericardium as an Alternative Biomaterial for Transcatheter Heart Valves [J].Front Bioeng Biotechnol,2021,9:766991.
- [6]Luehr M,Wahlers T.Use of the BalMedic bovine pericardial bioprosthetic valve in China: a new light on the horizon?[J].Annals of Translational Medicine,2021,9(6):444.
- [7]Rassoli A,Li YM,Bao XH,et al.Donkey pericardium as a select sourcing to manufacture percutaneous heart valves: Decellularization has not yet demonstrated any clear cut advantage to glutaraldehyde treatment [J].Medicine in Novel Technology and Devices,2019,4(C):100029.
- [8]杨文笑,曲道旭,刘天起,等.戊二醛鞣制驴心包作为一种新型生物瓣膜材料的生物相容性研究[J].中华临床医师杂志(电子版),2016,10(16):2434-2437.
- [9]GB/T16886.12-2017,医疗器械生物学评价第12部分:样品制备与参照材料[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [10]GB/T16886.5-2017,医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性试验[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [11]GB/T16886.10-2017,医疗器械生物学评价第10部分:刺激与皮肤致敏试验[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [12]林曦,张卫达,王晓武,等.TritonX-100、环氧氯丙烷联合改性处理牛颈静脉带瓣管道的体内外生物相容性研究[J].中国现代医学杂志,2011,21(35):4405-4408.
- [13]GB/T16886.4-2003,医疗器械生物学评价第4部分:与血液相互作用试验选择[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [14]GB/T16886.3-2008,医疗器械生物学评价第3部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [15]黄虹蓉,林钟石,刘尧,等.一种肠镜润滑消泡剂的细胞毒性和遗传毒性生物学评价[J].医学信息,2019,32(16):62-65,79.
- [16]Zhurayleva IY,Karpova EV,Oparina LA,et al.Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: A multiparametric assessment study [J].Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,2021,118:111473.
- [17]王建光,刘天起,王雪梅,等.京尼平与戊二醛鞣制牛心包材料的对比研究[J].山东大学学报(医学版),2011,49(5):24-28.
- [18]田聪,万荣欣,刘欣,等.生物交联剂京尼平交联牛心包生物支架材料的性能[J].中国生物医学工程学报,2011,30(2):281-286.
- [19]Liu J,Li B,Jing H,et al.Curcumin-crosslinked acellular bovine pericardium for the application of calcification inhibition heart valves[J].Biomed Mater,2020,15(4):045002.
- [20]王云兵,雷洋,菅振军.一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法:CN110841110B[P].2020-02-28.
- [21]温晓晓,张坤,潘孔荣,等.一种非戊二醛化学体系处理的生物瓣膜材料的生物相容性研究[J].中国胸心血管外科临床杂志,2022,29(12):1653-1659.

收稿日期:2022-06-13;修回日期:2022-08-16

编辑/肖婷婷