http://pmse.scu.edu.cn

基于红光光交联制备具有多层仿生结构的胶原基人工血管支架

陈 诚[1,2], 高闻语[1,2], 奚晓玮[1,2], 高嘉遥[1,2], 刘子睿[1], 孟羿飞[1], 季培红[2,4], 刘 杨[1,2,3]

(1. 常州大学 医学与健康工程学院,江苏 常州 213164; 2. 常州大学 药学院 生物与食品工程学院,江苏 常州 213164;
3. 常州大学 生物医学工程与健康科学研究院,江苏 常州 213164; 4. 杭州矩正医疗科技有限公司,浙江 杭州 311100)

摘要:血管移植术是临床上治疗受损血管的常见手段。虽然目前已有一些高分子基的人工血管报道,但如何在成分和结构两方面同时实现人工血管支架的仿生构建,更好地匹配缺损血管的修复需求,仍是值得重点关注的难题。胶原蛋白(Col)作为天然血管的主要成分,具有良好的理化性能和生物相容性。文中通过调控胶原溶液的凝胶化过程及胶原纤维在二维平面的差异性分布,成功构建出直径可控且具有多层结构的胶原基仿生人工血管(CVG/E),并通过红光处理得到光交联的胶原基人工血管(CVG/E-R)。采用红外光谱、溶胀测试、力学拉伸、热重分析、降解试验及红光照射原位修复受损血管实验对材料进行了表征。结果表明,成功制备了内外层致密且中层疏松的多层仿生人工血管支架。与 CVG/E 相比,CVG/E-R 的力学性能显著提升了 2.28 MPa。同时,CVG/E-R 能够缓慢降解,具有良好的降解稳定性,降解周期达到 42 d。综上,红光交联多层仿生胶原基人工血管有可能为未来临床的血管移植提供新的选择方案。

关键词:胶原蛋白;仿生支架;多层;红光交联;人工血管
中图分类号:R318.08 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-7555(2025)09-0130-10

心血管疾病是目前影响人类健康的常见疾病[1],因血管不可逆损伤导致的人体循环功能障碍会直接威胁生命安全。对于该类患者,临床上通常采用血管搭桥或血管移植手术来进行治疗[2]。然而,在目前可供选择的血管修复材料中,自体或同种异体血管的来源有限,且质量难以保证[3];异种血管存在免疫排斥反应并伴随许多并发症[4];硅橡胶[5]、聚氨酯(PU)[6]等合成高分子制备的人工血管面临着理化性能或生物学性能与天然机体组织不匹配的风险。

为了解决该问题,国内外研究者尝试采用具有良好生物相容性的天然高分子来构建与人体组织兼容的血管修复材料[7]。其中,胶原蛋白作为天然血管组织的主要成分[8],具有优良的生物降解性能和低免疫原性[9],被认为是构建人体软组织修复的首选原材料[10]。Wu 等[11]采用胶原蛋白构建出可生物降解的胶原基小口径血管移植物,其具备良好的生物相容性和血管再生能力;Fu 等[12]采用胶原蛋白和聚乳酸-ε-己内酯(PLCL)复合制备出具有良好力学和生物学特性的新型血管修复支架,成功地提升了胶原基支架的力学性能。然而,天然血管的内膜、中膜和外膜在结构上存在一定的差异,各层组织承载着不同的生理微环境。其中,致密的内膜层能够维持血管的光滑内壁和血流的顺畅性,疏松的中膜层为血管组织提供力学支撑和运动调节作用,致密外膜具有保护和固定血管的作用,这 3 层组织共同维持着天然血管的正常结构和功能[13]。鉴于此,如何在保证材料优良的理化性能和生物相容性的基础上,构建具有内膜-中膜-外膜多层仿生结构的胶原基人工血管支架材料,更好地与缺损血管进行精准匹配并实现个性化修复,具有重要的研究价值。

鉴于此,本文以牛跟腱胶原蛋白为原材料,通过

doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2025.0168
收稿日期: 2024-09-09
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81900814)
通讯联系人: 刘杨, 主要从事生物医用材料研究, E-mail: liuyang@cczu.edu.cn

调控胶原溶液的凝胶化过程及胶原纤维在二维平面的差异性分布,成功构建出与天然血管具有相似结构与功能的内、外层致密且中层疏松的多层仿生胶原基人工血管(CVG/E),并在此基础上,引入 635 nm 的红光照射得到光交联的胶原基人工血管(CVG/E-R)。最后,考察了具有仿生结构设计的多层胶原基人工血管的结构特性、力学性能、降解稳定性及红光处理对结构重塑的原位修复效果,以期为人工血管构建领域提供新的思路与方法。

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC,≥98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,≥98%)、胃蛋白酶(猪源):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙酸、30% 过氧化氢、硝酸银($AgNO_3$)、氯化钠(NaCl)、盐酸(HCl):分析纯,国药集团化学试剂有限公司;透析袋:MD34,截留相对分子质量为 8×10^3 ~1.4×10^4,北京索莱宝科技有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS)片剂:赛默飞世尔科技公司;Ⅰ型胶原蛋白:汇丰生物科技有限公司;超纯水:Millipore 超纯水。

LGJ-10 冷冻干燥机:美国 Labconco 公司;IS10 型傅里叶红外光谱仪:美国 Thermo-Nicolet 公司;CKX53 光学显微镜:日本 Olympus 公司;ELF3200 生物材料力学性能试验机:美国 Bose 公司;TG 209F1 型热重分析仪:德国 NETZSCH 公司;光纤球囊:杭州矩正医疗科技有限公司;RM2245 轮转切片机:德国 Leica 公司。

1.2　具有多层仿生结构的胶原基人工血管的制备

首先,将胶原蛋白溶于 0.5 mol/L 乙酸溶液中配置成 6 mg/mL 和 8 mg/mL 的胶原溶液,并按 w(Col):w(EDC):w(NHS)=6:1:1 的质量比加入 EDC(交联剂)与 NHS(催化剂)进行化学交联;其次,在自制方形模具的 3 个分腔的两侧加入 8 mg/mL 的胶原溶液,中间加入 6 mg/mL 的胶原溶液,且两侧与中间溶液的体积比为 1:2。调控胶原溶液的凝胶化过程,使得特定区域的胶原基纤维实现差异性分布,即待两侧溶液中的水分挥发 80% 时,撤去中间隔板,形成中间高、两边低的凝胶体系,且成为互相连接的二维平面结构;继续风干至两侧干燥成膜,当中间未成膜的凝胶态的上表面距模腔槽底部 1.5 mm 时进行冷冻干燥,得到胶原薄膜-海绵-薄膜相连接的二维平面结构,最后导管(导管周长为薄膜绕轴 1 周)沿着薄膜侧进行绕轴卷曲,且层与层之间的接触面涂覆 8 mg/mL 胶原溶液,使其紧密黏连后抽离导管,获得内外层致密且中层疏松的胶原基人工血管(CVG/E)。在此基础上,将 CVG/E 通过红光光交联处理 3 min 得到 CVG/E-R。由于人工血管的内径取决于管轴的外径,人工血管的直径可通过导管的外径控制。具有多层仿生结构的胶原基人工血管制备示意图如 Fig.1 所示。

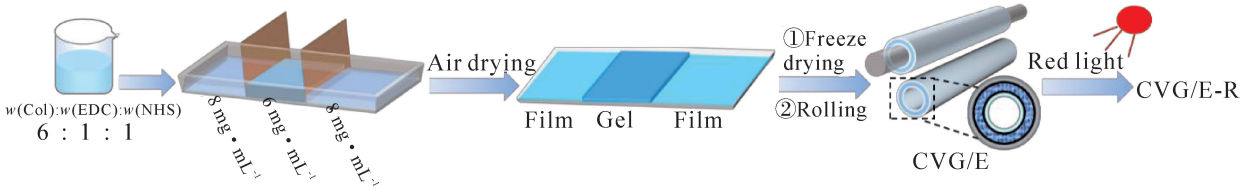


Fig. 1　Schematic illustration of fabrication of the collagen-based vascular grafts

1.3　测试与表征

1.3.1　傅里叶变换红外光谱分析:使用衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪分别测试 CVG/E 和 CVG/E-R 的组成成分。将样品裁剪成适宜大小后,置于 ATR 装置试验区进行采集,分辨率为 4 cm^{-1},扫描波数范围为 500~4000 cm^{-1}。

1.3.2　外观形态及微观结构表征:取内径为 3 mm,长度为 6 cm 的干态胶原基人工血管 CVG/E 和 CVG/E-R,对其轴向和径向的宏观形貌分别拍照观察。裁切成长度为 2 mm 的人工血管,待其在纯水中充分浸润 10 min 后,通过光学显微镜在不同倍镜下观察湿态 CVG/E 和 CVG/E-R 的微观形态特征。采用扫描电子显微镜(SEM)在 5 kV 的电压下观察人工血管壁多层结构的微观形态。

1.3.3　保湿性能测试:取长度为 2 cm 的胶原基人工血管,干燥并称量。溶胀于 37 ℃的 PBS(pH=7.4)溶液中测试 CVG/E 和 CVG/E-R 的吸水率。用滤纸轻轻擦拭血管样品表面和内腔内的多余水分后,

立即称量,准确记录人工血管湿质量,结果用平均值和标准差表示。以预定的时间间隔测量胶原基人工血管的厚度和表面积变化。样品的厚度通过螺旋测微计测定;表面积通过计算中空管腔的总表面积获得。每种样品平行测定 5 次。根据式(1~3)分别计算吸水率(W)、厚度(T)和表面积(S)变化

$$W=(m_t-m_0)/m_t \quad (1)$$

$$T=T_t/T_0 \quad (2)$$

$$S=S_t/S_0 \quad (3)$$

式中:m_0,T_0 和 S_0——分别表示样品的初始质量和尺寸;m_t,T_t 和 S_t——分别表示湿态样品的最终质量和尺寸。

1.3.4 孔隙率测试:使用液体置换法测定人工血管的中层疏松层的孔隙率。使用无水乙醇作为置换液体。在比重瓶中充满乙醇后,将预先称量的样品浸入其中,再次加满乙醇后于真空烘箱中真空脱气后,称量,最后取出支架,将比重瓶及剩余乙醇同时称量,每组样品至少平行测定 5 次。根据式(4)计算孔隙率(Φ)

$$\Phi=(m_2-m_3-m_1)/(m_0-m_3) \quad (4)$$

式中:m_0——比重瓶中装满乙醇后的质量;m_1——支架质量;m_2——真空脱气后比重瓶中支架充满乙醇的总质量;m_3——支架取出后剩余乙醇及比重瓶总质量。

1.3.5 力学性能测试:为了评估样品 CVG/E 和 CVG/E-R 的力学强度,将待测人工血管沿管壁裁剪成尺寸 10 mm×6 mm 的大小,在磷酸盐缓冲液中浸泡 12 h 后,采用生物材料力学性能试验机进行测定比较,并记录夹距,量程为 100 N,以 5 mm/min 的拉伸速率进行单轴拉伸试验以获得恒定的应变速率,每组至少测试 5 个样品。根据应力-应变曲线计算拉伸强度、断裂伸长率和弹性模量。使用 6-0 尼龙缝合线将 2 cm 长度的血管样品悬挂在 50 g 砝码上,测试样品的缝合能力及强度。

1.3.6 热重分析:通过热重分析仪(TGA)分别对 CVG/E 和 CVG/E-R 进行热稳定性分析。裁剪长度 2 mm 的人工血管样品于坩埚中,称量后置于样品台上。升温速率为 10 ℃/min,在 N_2 环境保护下,从室温升温至 800℃。

1.3.7 体外降解性能试验:将人工血管裁切成长度为 2 cm 的若干段,依次称量后置于无菌玻璃皿中充分浸入 PBS(pH = 7.4)溶液中,密封后在 37 ℃恒温箱中保存,模拟体外降解过程,设置 1 d,3 d,7 d,11 d,16 d,21 d,28 d,35 d 和 42 d 共 9 个时间点,取出样品(n = 5),蒸馏水洗涤后冷冻干燥并称量。根据式(5)计算体外降解率(Degradation ratio,DR)

$$DR=(m_0-m_t)/m_0 \quad (5)$$

式中:m_0——干燥胶原基人工血管的初始质量;m_t——每个降解时间点取出并冷冻干燥后的样品质量。

1.3.8 红光处理对猪血管及 CVG/E 损伤后的修复测试:采用球囊损伤法在目标血管内充盈球囊,保持压力扩张,构建血管机械性损伤模型。鉴于在临床上,血管介入治疗常用的球囊扩张压强范围介于 6.01×10^5~10.01×10^5 Pa 之间。因此,本文选取 3 mm 口径的猪外周动脉血管,使用光纤球囊施加 6.01×10^5 Pa 的压强持续损伤 3 min,再对扩张后血管立即进行 3 min 的红光处理。此外,为了拓宽研究的广度,将 CVG/E 作为另一研究对象,同样以 6.01×10^5 Pa 的球囊扩张压强进行 3 min 的扩张处理,随后再进行 3 min 的红光照射,旨在全面深入地探讨红光照射光交联是否具备原位修复受损血管壁的能力。

1.3.9 猪血管组织苏木精-伊红(HE)染色检查:对猪外周动脉血管分别施加 2.01×10^5 Pa,6.01×10^5 Pa 和 10.01×10^5 Pa 的球囊扩张压强 3 min,模拟不同强度的血管损伤,并立即采用红光照射 3 min 进行原位修复。取未损伤血管、不同压强下扩张损伤的血管及损伤后接受红光照射修复的血管,进行组织切片及 HE 染色观察,考察血管对不同程度损伤的响应程度及红光处理后的恢复效果。

2 结果与讨论

2.1 CVG/E 和 CVG/E-R 的 FT-IR 分析

采用傅里叶变换红外光谱分析每种样品的化学组成成分,CVG/E 和 CVG/E-R 的红外光谱图如 Fig.2 所示。2 种胶原基人工血管均呈现出胶原蛋白典型的红外特征吸收峰,酰胺 A 带(N—H 伸缩,强)位于 3300 cm^{-1} 附近;酰胺 B(C—H 的不对称伸缩振动)位于 2930 cm^{-1} 左右;酰胺 I(C ═O 伸缩)、酰胺 Ⅱ(C—N 伸缩和 N—H 弯曲)和酰胺 Ⅲ(C—N 伸缩、N—H 弯曲)吸收带分别位于 1630 cm^{-1},1550 cm^{-1} 和 1240 cm^{-1} 处。结果表明,红光光交联对胶原基人

工血管的化学组成成分没有影响。

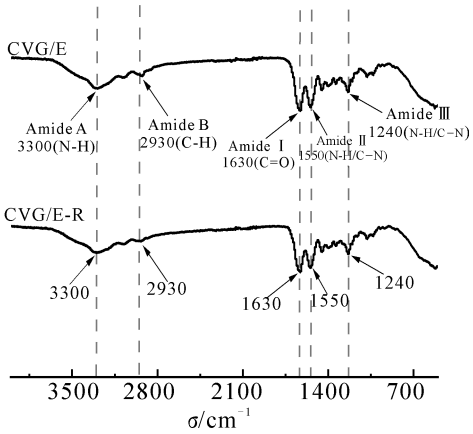


Fig. 2　FT-IR spectra of CVG/E and CVG/E-R grafts in the wavenumber range of 500~4000 cm^{-1}

2.2　多层胶原基人工血管的仿生结构

为了验证是否成功制备出类似天然血管的多层胶原基人工血管,本文对 2 种胶原基人工血管样品在干、湿态下进行观察。在干态下,CVG/E 及 CVG/E-R 的轴向和径向宏观形态如 Fig.3(a, e)和 Fig.3(b, f)所示。可以明显观察到,两者均呈现出规则的圆环管状形态,且管径大小一致,均为 3 mm。此外,经过红光照射后,其外观形态无显著变化,这进一步证实了其结构的高度稳定性和一致性。Fig.3(c, g)与 Fig.3(d, h)展示了在湿态下,胶原基人工血管在不同倍数下拍摄的光学显微图片,可以明显看到,人工血管在水中浸润后依然能维持其完整的环状结构,各层之间结合紧密,无任何分散或形变的现象。此外,在血管壁的中间区域,存在一些明显的孔洞结构。这些孔洞不仅模拟了天然血管内的复杂通道网络,而且为血液的顺畅流通提供了有力保障。Fig.3(i, j)为 CVG/E 的截面 SEM 图。可以看出,制得的胶原基人工血管呈多层的圆形管腔结构,管壁表面致密无孔,而中间层疏松多孔。以上结果表明,本文成功构建了具有多层仿生结构的胶原基小口径人工血管。

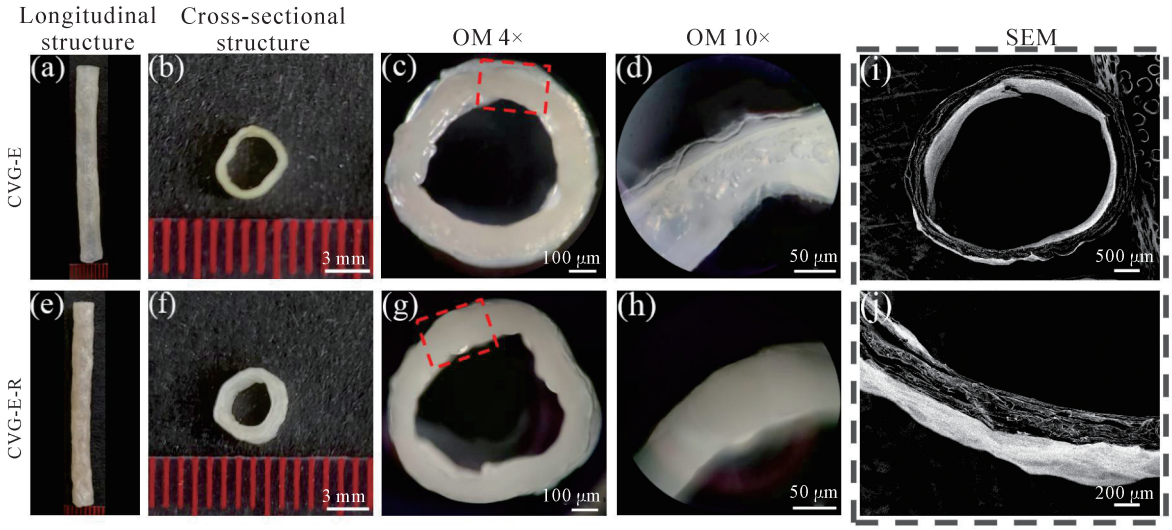


Fig. 3　Digital images of macroscopic and microscopic morphology of CVG/E and CVG/E-R grafts: (a, e) longitudinal structure; (b, f) cross-sectional structure; (c, g) optical microscopic images of 4× and (d, h) optical microscopic images of 10× in the wet state; (i, j) SEM images revealed the microstructures of CVG/E at 20× and 80×, respectively

2.3　CVG/E 和 CVG/E-R 的保湿性能评价

人工血管优异的保湿性能可以增强其组织相容性。本文对胶原基人工血管的吸水性能、管壁厚度及表面积随时间的变化进行了分析。吸水率如 Fig.4(a)所示,CVG/E 与 CVG/E-R 的吸水率在 24 h 内均高于 90%,在饱和状态时,CVG/E 与 CVG/E-R 的吸水率分别为 96.2% ±0.38% 和 95.6% ±0.46%,这归因于胶原蛋白固有的丰富亲水基团及三螺旋结构的保水能力,且红光光交联对吸水率无显著影响。量化血管管壁厚度变化(Fig.4(b))和管壁表面积变化(Fig.4(c))情况。结果表明,经红光光交联的人工血管(CVG/E-R)短时间内无显著形变,即使在达到吸水饱和状态后,也能维持其结构的相对稳态,进一步说明胶原基人工血管具备优良的保湿性能和结构稳定性。

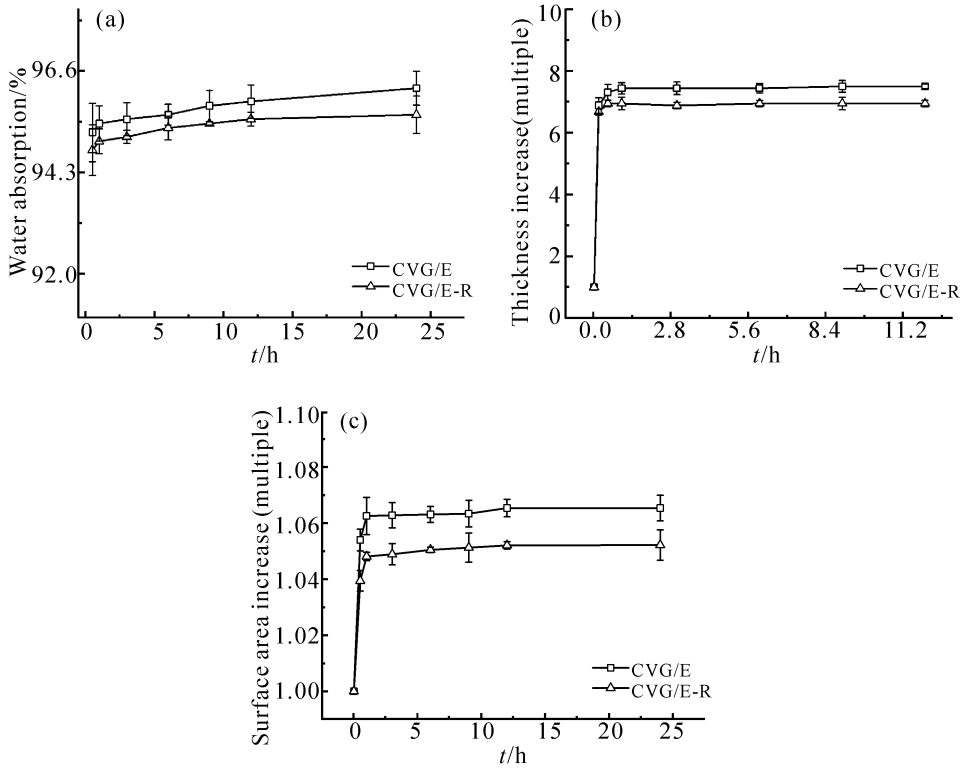


Fig. 4 (a) Water absorption rate, (b) variation curves of pipe wall thickness and (c) pipe wall surface area of CVG/E and CVG/E-R grafts vs. time

2.4 CVG/E 和 CVG/E-R 的孔隙率分析

人工血管的多孔管腔结构在稳定内膜和促进细胞浸润方面发挥着关键作用。Fig.5 清晰地展示了 2 种胶原基人工血管中间疏松层的孔隙率大小。CVG/E 与 CVG/E-R 的孔隙率分别为 77.65% ± 1.80% 和 66.52% ± 1.19%。CVG/E-R 的孔隙率较 CVG/E 低,这可能是由于红光照射能够促进胶原纤维的重排,使得孔密度变大,孔洞空间体积减小。但 CVG/E-R 的孔隙率仍符合人工血管材料对高孔隙率(通常为 60%~90%)要求,能增强移植物周围组织的渗透,发挥锚固作用。

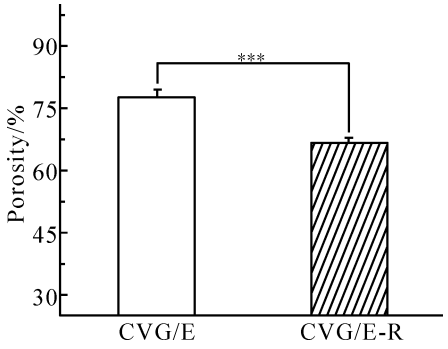


Fig. 5 Porosity of CVG/E and CVG/E-R grafts. *** p<0.01, which was considered to be statistically significant

2.5 CVG/E 和 CVG/E-R 的力学性能评价

对于体内移植物的力学性能,如人工血管此类与血液直接接触的材料,其要求尤为严苛。这类材料不仅要承受血液的压力,还需具备良好的力学耐久性。因此,本文通过单轴拉伸实验(Fig.6(a))评估了 2 种人工血管的力学性能。应力-应变曲线如 Fig.6(c)所示。CVG/E-R 的拉伸强度为(12.50±0.26) MPa,显著高于 CVG/E 的(10.22±0.20) MPa(Fig.6(d)),且均高于人隐静脉(HSV)的最大拉伸强度(1.8~4 MPa)[14]。CVG/E 和 CVG/E-R 的断裂伸长率分别为 42.80% ±0.46% 和 48.55% ±0.43% (Fig.6(e)),显示出优良的柔韧性,可以为血管移植物提供必要的弹性和适应能力。CVG/E 与 CVG/E-R 的弹性模量分别为 (23.89 ± 0.22) MPa 和 (25.74 ± 0.53) MPa (Fig.6(f)),均显著优于大隐静脉(HSV)的初始模量,有利于维持人工血管的稳定形态。上述结果表明,经红光光交联的胶原基人工血管(CVG/E-R)力学性能良好,符合血管移植物植入的力学要求。值得注意的是,CVG/E-R 血管壁能够承受 50 g 砝码的质量(Fig.6(b)),说明其具备良好的缝合固位性的手

术可操作性,这也得益于高刚度的内外致密层与强韧性的中间疏松层相结合,共同保证了 CVG/E-R 血管具有良好的耐缝合性能。

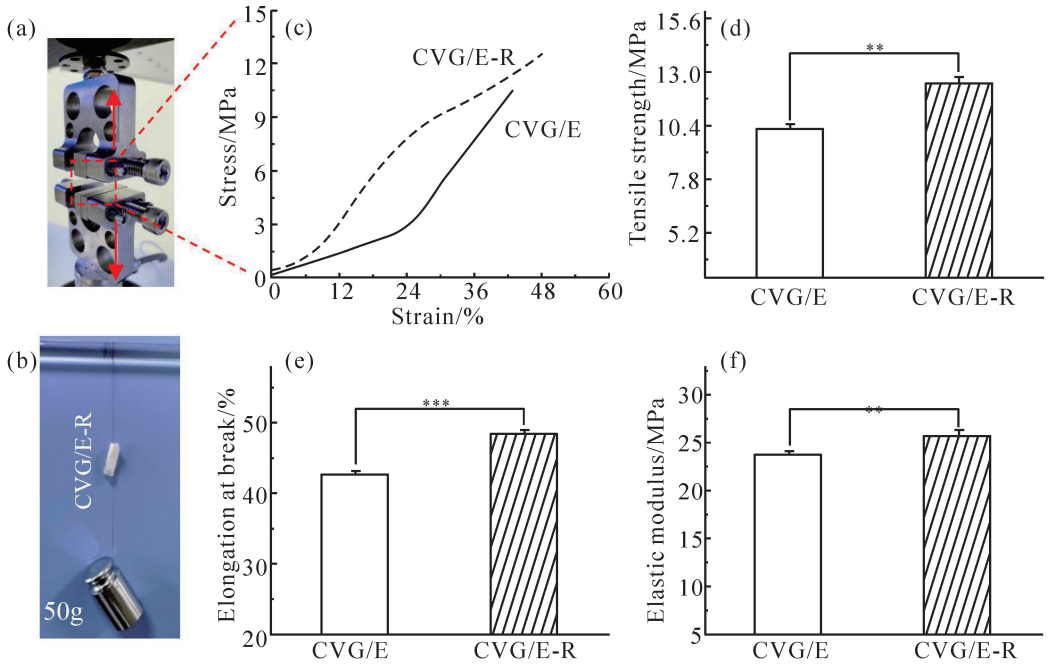


Fig. 6　Mechanical properties of CVG/E and CVG/E-R grafts: (a) mechanical tensile test digital; (b) diagram CVG/E-R can tolerate surgical sutures of size 6-0; (c) stress-strain curves; (d) tensile strength, (e) elongation at break and (f) elastic modulus. $^{**}p<0.05$ and $^{***}p<0.01$ were considered to be statistically significant. Among them, $***p$ denoted the highest level of significance

2.6　CVG/E 和 CVG/E-R 的热重分析

热稳定性是人工血管的一项重要性质,直接关乎到植入体内后的耐久性。如 Fig.7 所示,在 45~800 ℃的升温范围内,材料的质量损失过程包括 3 个阶段。第一阶段为脱水阶段(45~255 ℃),这是由于随着温度逐渐升高,胶原分子内或分子间氢键遭受破坏,导致物理吸附水蒸发,2 种胶原基人工血管的失重率范围为 10.10%~13.10%。第二阶段为主要失重阶段(255~550 ℃),胶原链在热作用下断裂,致使胶原逐渐降解为多肽和氨基酸。最终氨基酸残基被破坏,发生脱氨和脱水反应。在此阶段中,相比于 CVG/E 的 52.22% 的失重率,CVG/E-R 的降解速率及最大失重率明显降低,仅为 42.89%,说明在相同高温时失重较少,即经红光光交联后,在热作用下,胶原分子中的肽键稳定性增强,更不易断裂,使其热稳定性得到显著提升。第三阶段为煅烧阶段(550~800 ℃),胶原蛋白的热解产物发生炭化,此时 2 种人工血管的质量损失速度均逐渐减慢,并最终趋于稳定。结果表明,与 CVG/E 相比,CVG/E-R 在高温高热环境中的热稳定性更高。

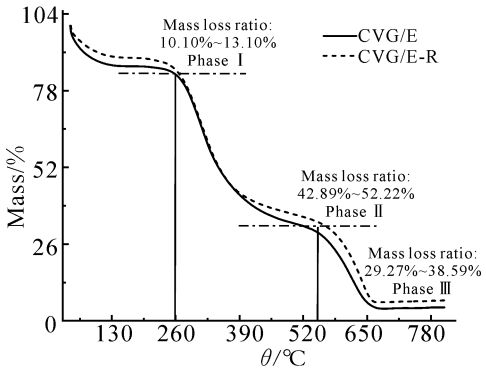


Fig. 7　TGA curves of CVG/E and CVG/E-R grafts

2.7　CVG/E 和 CVG/E-R 的体外降解性能评价

体外降解性能是评估人工血管质量的关键指标之一,直接关系到组织渗透的顺畅性及宿主免疫反应等。Fig.8 为胶原基人工血管的体外降解情况。在以 PBS 为降解介质的 42 d 测试周期内,通过对比 2 种材料在多个时间点的降解速率,发现两者始终以稳定且均匀的速度降解,表明其具有良好的结构稳定性。与未光交联组相比,经红光光交联的胶原基

人工血管能够缓慢降解，在第 42 d 时，其降解率为 28.94%±1.36%，表明 CVG/E-R 具有优良的降解稳定性。这种缓慢的降解有助于结构的完整性，减少因降解过快导致的结构失效风险，并且能够承受人工血管植入体内后的长期稳定降解，在一定程度上能减轻宿主免疫系统的负担，促进细胞的生长和组织的修复。

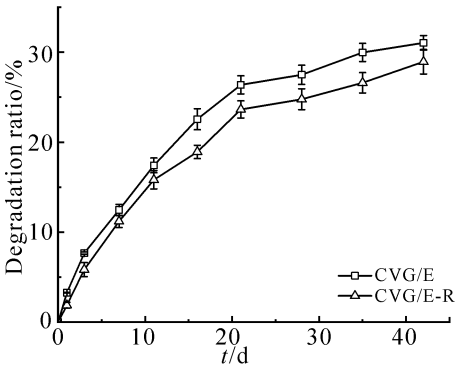
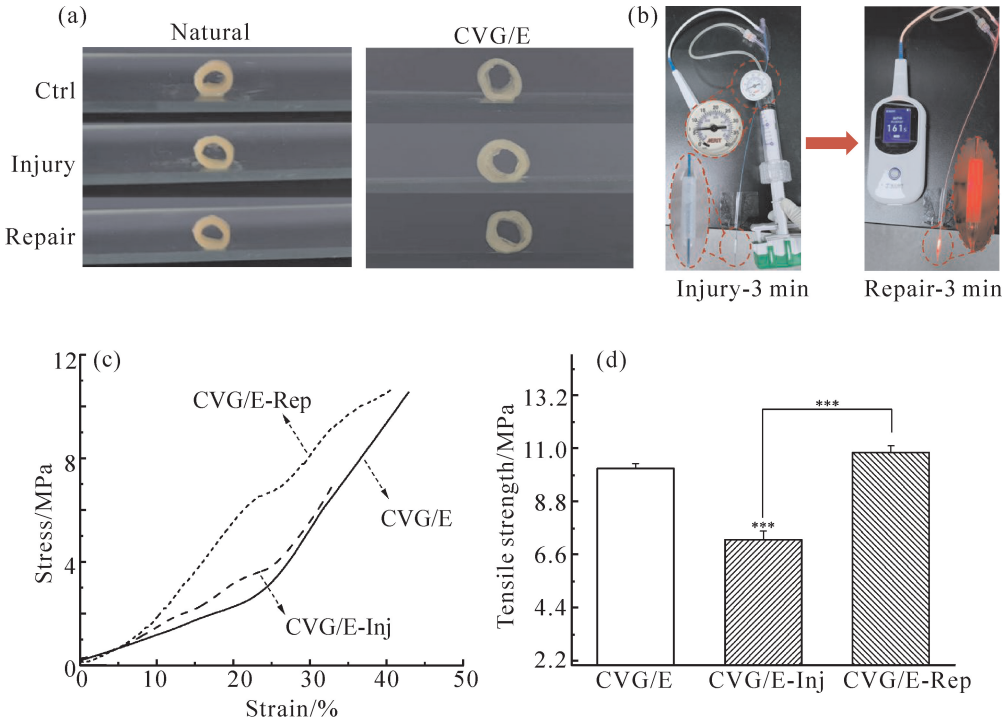


Fig. 8 In vitro the degradation characteristics of CVG/E and CVG/E-R grafts in PBS: degradation ratio during the fdegradation period

2.8 红光处理对猪血管和 CVG/E 损伤后的修复结果分析

为了观察红光处理对球囊扩张损伤之后的猪血管和 CVG/E 支架的形态和力学性能的影响，本文对受损猪血管及 CVG/E 支架在光处理前后的结构和力学性能进行了系统研究。从 Fig.9(a)中可以观察到，与未损伤的对照组相比，经过球囊 6.01×10^5 Pa 高压扩张损伤后的猪血管及 CVG/E 的口径均显著增大。但当损伤后的血管接受红光照射处理后，修复组的口径明显变小，甚至恢复至受损前的状态，这与红光在其它软组织的照射修复方面有着类似的效果[15]。Fig.9(b)展示了 CVG/E 在体外模拟光纤球囊介入血管中扩张及红光照射原位修复的操作示意图。球囊扩张损伤后的人工血管(CVG/E-Inj)及光交联原位修复的人工血管(CVG/E-Rep)的力学性能如 Fig.9(c~f)所示。与 CVG/E 相比，经球囊扩张损伤后的 CVG/E-Inj 的拉伸强度和弹性模量显著下降。然而，进一步经红光照射处理后，CVG/E-Rep 的拉伸强度及弹性模量与对照组无明显差异，说明红光照射光交联对受损组织具有原位修复的效果，且能进一步增强其力学性能，是促进血管壁结构恢复的有效方法。



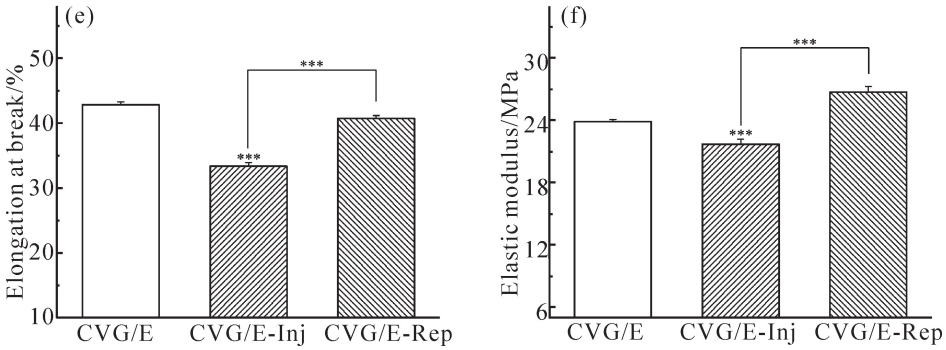


Fig. 9　(a) Digital images of porcine peripheral arterial vasculature and CVG/E repaired by irradiated red light after balloon pressure dilatation at 6.01×10^5 Pa; (b) schematic diagram of simulated balloon interventional vasodilatation and irradiated red light. Mechanical properties of red light repair of CVG/E after 6.01×10^5 Pa balloon dilation: (c) stress-strain curves, (d) tensile strength, (e) elongation at break and (f) elastic modulus. $^{***}p < 0.01$, which was considered to be statistically significant

2.9　受损猪血管经红光处理后的 HE 染色切片结果分析

为了进一步探究红光照射光交联对血管组织中的胶原纤维修复具有一定的促进作用。取猪血管对照组、损伤组和修复组血管段进行组织切片及 HE 染色观察。如 Fig.10(a)所示,对照组血管的内、中、外膜完整,平滑肌细胞层结构清晰,细胞外基质分布均匀,呈现出健康血管的特征。血管经球囊扩张损伤后,随着扩张压强的增大,平滑肌纤维的排列更加紊乱,呈卷曲状,血管壁可见明显的局部撕裂孔洞,甚至出现内皮细胞脱落的现象(Fig.10(b~d))。扩张损伤的血管经红光照射修复后,与损伤组相比,修复组血管壁的整体结构趋于恢复原状,平滑肌纤维有序排列且更加紧密,由卷曲状变成竖直状(Fig.10(e~g))。结果表明,红光照射对于受损血管组织各层结构的原位重建具有显著促进作用,这可能与红光交联能促进天然血管内保留的细胞外基质中大量蛋白成分的交联,以及胶原纤维的结构变化和重组排列有关[16]。这种修复和重塑的效果能够在一定程度上减轻血管的损伤程度,也进一步说明红光照射光交联能够增强胶原基人工血管的理化性能。

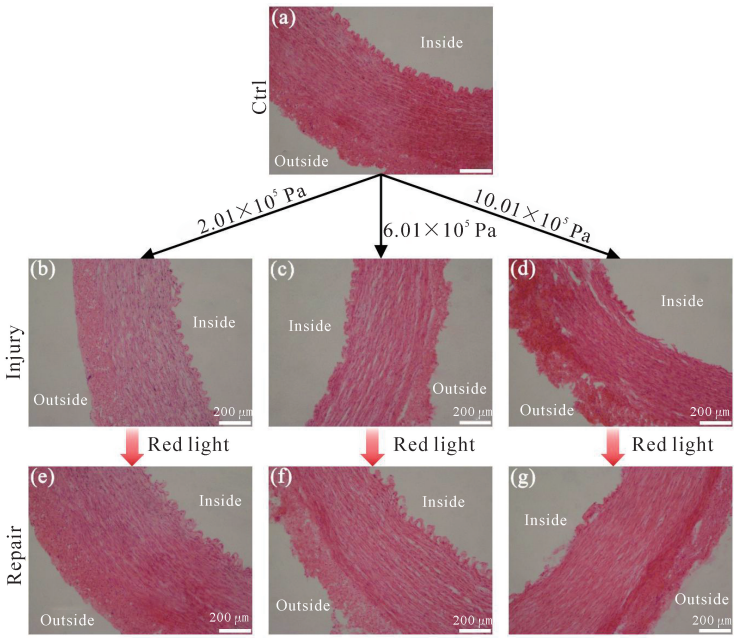


Fig. 10　(a) HE staining of vessels in control group; (b~d) HE staining of vessels in the injured group after balloon pressure dilatation at 2.01×10^5 Pa, 6.01×10^5 Pa, and 10.01×10^5 Pa; (e~g) HE staining of repaired group after balloon intervention in the injured vessels with red light irradiation for 3 min

3 结论

本文采用胶原蛋白作为原材料,通过调控胶原溶液的凝胶化过程及胶原纤维在二维平面的差异性分布,并结合冷冻干燥和绕轴卷曲技术,成功构建出内、外层致密且中层疏松的多层仿生胶原基人工血管支架材料。结果表明,相较于未光交联的对照组(CVG/E),经红光光交联处理的 CVG/E-R 在热稳定性、降解性能及力学特性上均有显著提升,其具有与天然血管相似的弹性模量。此外,本文还发现红光处理能够对受损血管中的胶原纤维实现原位交联和修复。这也进一步说明本文采用的化学交联与光交联结合的双重交联方法能够有效提升胶原基人工血管的力学性能。综上,结合 EDC/NHS 化学交联与红光光交联的双重交联策略,本文制备的 CVG/E-R 支架不仅具有类似天然血管的多层仿生结构,而且具备优良的力学性能和稳定性,这为临床血管移植提供了一种新的选择方案。同时,本文也为组织工程人工血管的仿生构建与个性化修复研究提供了新的思路。

参考文献:

[1] Evens L, Belin H, D′hease S, *et al.* Combinational therapy of cardiac atrial appendage stem cells and pyridoxamine: the road to cardiac repair?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 9266.

[2] Tanaka T, Abe Y, Cheng C J, *et al.* Development of small-diameter elastin-silk fibroin vascular grafts[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 622220.

[3] Jin W, Liu H, Li Z, *et al.* Effect of hydrogel contact angle on wall thickness of artificial blood vessel[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23: 11114.

[4] Cui S, Wang H, Huang J, *et al.* Allogeneic vessels in pancreaticoduodenectomy with portal vein resection: risk of portal vein thrombosis and prognosis[J]. Journal of Gastrointestinal Surgery, 2023, 27: 2797-2805.

[5] Karimpour P, Ferizoli R, May J M, *et al.* Customisable silicone vessels and tissue phantoms for in vitro photoplethysmography investigations into cardiovascular disease[J]. Sensors, 2024, 24: 1681.

[6] Li J, Chen Z, Yang X. State of the art of small-diameter vessel-polyurethane substitutes[J]. Macromolecular Bioscience, 2019, 19: e1800482.

[7] Moore M J, Tan R P, Yang N, *et al.* Bioengineering artificial blood vessels from natural materials[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40: 693-707.

[8] Koens M J, Faraj K A, Wismans R G, *et al.* Controlled fabrication of triple layered and molecularly defined collagen/elastin vascular grafts resembling the native blood vessel[J]. Acta Biomaterialia, 2010, 6: 4666-4674.

[9] 熊新, 李炜钊, 杨育灿, 等. 基于胶原蛋白的多孔微球制备及应用研究进展[J]. 高分子材料科学与工程, 2022, 38(11): 183-190.
Xiong X, Li W Z, Yang Y C, *et al.* Preparation and application of porous microspheres based on collagen[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2022, 38(11): 183-190.

[10] Copes F, Pien N, Vlierberghe S, *et al.* Collagen-based tissue engineering strategies for vascular medicine[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 166.

[11] Wu H C, Wang T W, Kang P L, *et al.* Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft[J]. Biomaterials, 2007, 28: 1385-1392.

[12] Fu W, Liu Z, Feng B, *et al.* Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering[J]. International Journal of Nanomedicine, 2014, 9: 2335-2344.

[13] Shi J, Teng Y, Li D, *et al.* Biomimetic tri-layered small-diameter vascular grafts with decellularized extracellular matrix promoting vascular regeneration and inhibiting thrombosis with the salidroside[J]. Materials Today Bio, 2023, 21: 100709.

[14] Hasan A, Memic A, Annabi N, *et al.* Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts[J]. Acta Biomaterialia, 2014, 10: 11-25.

[15] Reddy G K, Stehno B L, Enwemeka C S.Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats[J]. Wound Repair and Regeneration, 2001, 9: 248-255.

[16] Prabhu V, Rao B S S, Rao A C K, *et al.* Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice[J]. Lasers in Medical Science, 2022, 37: 171-180.

Preparation of Collagen-Based Artificial Vascular Grafts Scaffold with Multilayered Bionic Structures by Photo-Crosslinking with Red Light

Cheng Chen[1,2], Wenyu Gao[1,2], Xiaowei Xi[1,2], Jiayao Gao[1,2], Zirui Liu[1], Yifei Meng[1], Peihong Ji[2,4], Yang Liu[1,2,3]

(*1. School of Medical and Health Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;*
2. School of Pharmacy, School of Biology and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;
3. Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China;
4. Hangzhou Juzheng Medical Technology Co., LTD, Hangzhou 311100, China)

ABSTRACT: Vascular grafting is a common clinical procedure used to heal damaged vessels. Although some polymer-based artificial vascular grafts have been reported, how to realize the bionic construction of artificial vascular scaffolds simultaneously in terms of composition and structure, so as to better match the repair needs of defective blood vessels, is still a difficult problem that deserves focused attention. Collagen (Col), the primary component of natural blood vessels, exhibits excellent physicochemical properties and biocompatibility. In the study, collagen-based bionic artificial vascular grafts (CVG/E) with controllable diameter and multilayered structure were successfully constructed by regulating the gelation process of collagen solution and the differential distribution of collagen fibers in the two-dimensional planes, and collagen-based artificial vascular grafts after photo-crosslinking were obtained by red light treatment (CVG/E-R). FT-IR, swelling test, mechanical stretching, thermogravimetric analysis, degradation test and red light irradiation in situ repair of injured blood vessels experiment were used to characterize the materials. The findings show that multilayer bionic artificial vascular grafts with dense inner and outer layers and a sparse middle layer can be successfully constructed. Compared with CVG/E, the mechanical properties of CVG/E-R are significantly improved by 2.28 MPa, and it may degrade slowly with good degradation performance, with a degradation cycle of up to 42 d. Furthermore, red light irradiation possesses excellent in situ vascular repair capability. In conclusion, the red light crosslinked multilayer bionic collagen-based artificial vascular grafts obtained from the study could provide a new option for future clinical vascular grafting.

Keywords: collagen; bionic scaffold; multilayered; red light crosslinking; artificial vascular grafts