

Progress on Cardiac Extracellular Matrix (ECM): Acquirement, Evaluation and Modification of Cardiac ECM*

Yudong Jiang, Wensi Li, Mengmeng Yin, Chong Yu, Xinwu Hu, Jiaoya Xi[#]

Department of Physiology and Chinese-German Stem Cell Center, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, The Key Laboratory for Drug Target Researches and Pharmacodynamic Evaluation of Hubei Province, Wuhan
Email: #zhengyall@hotmail.com

Received: Apr. 17th, 2013; revised: Apr. 20th, 2013; accepted: May 19th, 2013

Copyright © 2013 Yudong Jiang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Both acute and chronic myocardial infarction can lead to necrosis of functional myocardial cells as well as impaired cardiac-pump function. The cardiac patches generated from cardiomyocytes and extracellular matrix scaffold by tissue engineering can be used to repair the impaired function. Cardiac extracellular matrix (ECM) has been widely considered as an ideal source of biological scaffolds, and the application of ECM in myocardial reconstruction is one of the main research fields in myocardial tissue engineering. ECM, generated from the process of decellularization, has relatively low immunogenicity, strong self-renewal ability and good biocompatibility. Currently, the methodology of cardiac ECM is greatly diversified. Although thorough decellularization is the essential process of eliminating immunogenicity, it will damage the ultrastructure of ECM, having a negative effect on recellularization and myocardial reconstruction afterwards. Researchers are trying various methods to detect and evaluate the effect of decellularization, and continuously optimize the protocol of decellularization. Moreover, they promote the biocompatibility and mechanical properties of cardiac ECM by modifying and transforming it. Our review focuses on the acquisition, evaluation and modification of cardiac ECM, and summarizes the recent research progress on it.

Keywords: Decellularization; Tissue Engineering; Myocardium; Extracellular Matrix

心肌 ECM 研究进展：心肌 ECM 的获取、评价、和改造*

姜煜东, 李文思, 尹盟盟, 余 翀, 胡新武, 席姣娅[#]

华中科技大学同济医学院基础医学院生理学系, 中德干细胞中心, 药物靶点研究与药效学评价湖北省重点实验室, 武汉
Email: #zhengyall@hotmail.com

收稿日期: 2013 年 5 月 31 日; 修回日期: 2013 年 6 月 15 日; 录用日期: 2013 年 6 月 29 日

摘 要: 急、慢性心肌梗死导致功能性心肌细胞坏死, 心泵功能受损, 可利用组织工程技术将心肌细胞与细胞外支架制备成心肌补丁进行心功能修复。心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)被认为是构建细胞外支架的理想材料。使用 ECM 构建重组心肌是心肌组织工程研究的重要方向。脱细胞处理制得的 ECM 具备较低的免疫原性、强大的自我更新能力以及良好的生物相容性。目前心肌 ECM 的制备方法多种多样, 相对彻底的脱细胞化处理是消除免疫原性的必要步骤, 但同时会造成 ECM 超微结构的破坏, 不利于 ECM 重细胞化和心肌重建。研究者尝试通过各种手段检测并评价脱细胞方法的效果, 不断改良脱细胞化技术, 并通过修饰和改造心肌 ECM, 提升其生物相容性和机械性能。本综述围绕心肌 ECM 的获取、评价、和改造, 对目前组织工程的心肌 ECM 相关研究新进展进行总结。

*资助信息: 本文受中国国家自然科学基金项目(No.31100828)、湖北省自然科学基金项目(2011CDB363)、教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(第 42 批, 席姣娅)、华中科技大学自主创新基金(HUST:2011QN211)、中央高校基本科研业务费专项资金(HUST:2011QN211 和 2013TS145)、华中科技大学大学生自主创新基金(HUST:2011B142 和 2012B366)和国家级创新创业训练计划项目(HUST:2012175)资助。

[#]通讯作者。

关键词：脱细胞化；组织工程；心肌；细胞外基质

1. 背景

急、慢性心肌梗死是临床常见的心脏疾病，主要导致功能心肌细胞凋亡、坏死，造成心脏泵血功能下降，代偿性增生肥大乃至最后的心力衰竭。治疗心脏衰竭的有效办法之一是通过细胞移植替换原有受损细胞，以弥补原有心肌组织收缩功能的缺陷，这一技术被称作“替代疗法”或“再生医学”。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和 iPS 细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)等多潜能干细胞均被视为细胞替代疗法中理想的细胞来源。然而，近二十年来的研究表明，无论选用何种细胞作为供体细胞进行细胞移植，都面临着移植后生存寿命过短、移植后细胞大量死亡、潜在排斥反应、以及和宿主组织功能整合效果低下等缺点^[1]，严重制约了其对心泵功能的修复效果。

最新研究表明，利用组织工程技术构建心肌片(cardiac patch)和心肌细胞片(cardiomyocyte sheet)等具有收缩性的人工心肌组织，再将其植入体内，可以很好的弥补细胞移植的局限性，明显提高心泵功能的修复效果，因而成为新兴的研究方向^[2]。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)包含各个组织或器官组成细胞所分泌的产物，受微环境调控与邻细胞相互作用处于动态平衡，影响细胞迁移、增殖和分化^[3,4]。通过脱细胞处理(decellularization)后获得的 ECM，保留天然成分、超微结构和三维结构，在诱导接种细胞粘附、迁移、增殖、分化和集成功能性组织等方面明显优于其它人工合成的支架，是目前最受瞩目的生物支架之一^[3,4]。

目前，再生医学中心肌组织工程的综合思路是“ECM 获取 - 重组细胞化 - 功能表达 - 补丁修复”(如图 1 所示)。ECM 在心肌修复的过程中起到促进生长、支持细胞及物质运输(特别是心肌细胞的血供)和诱导前体细胞生长分化的作用^[5]，而对于目前热门的干细胞移植，ECM 能有效促进干细胞归位，还有可能诱导间充质干细胞产生定向分化^[6]。ECM 相比于现有临床上广泛应用的高分子人工材料具有更好的相容性，作为一个有生物活性的支架，重组支架能发挥收缩功

能，并可以自我更新，大大延长了使用寿命。ECM 的来源有很多种，包括来自动物的异种 ECM、来自捐献者的同种 ECM 和从患者自身获取的自体 ECM，它们在组织相容性和加工性能等方面各有优劣(如表 1 所示)。

2. 脱细胞化：构建心肌 ECM 的关键

构建重组心肌的关键在于先获得高品质的心肌 ECM，即心肌组织经过脱细胞试剂的洗涤或灌注，除去心肌细胞成分，保留 ECM。但是目前制备脱细胞 ECM 的方法需要在脱细胞程度和 ECM 保留上寻找合适的平衡点，进一步提高脱细胞 ECM 品质^[3,4,7,8]。虽然目前不能达到理论上期望的除去所有细胞并消除免疫原性的目的，但一些改进的脱细胞化技术已能将细胞残余成分降低到原有的 1%以下^[9]，大大降低引起排斥反应的风险。

2.1. 脱细胞处理的原理

脱细胞化主要原理是用脱细胞化试剂渗透组织，

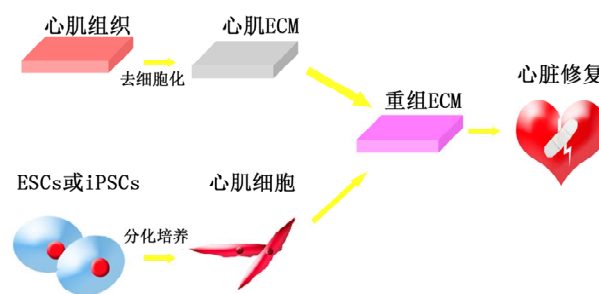


Figure 1. Comprehensive thinking of myocardial tissue engineering in regenerative medicine

图 1. 心肌组织工程在再生医学中的综合思路

Table 1. Comparison of autogenous, homogenous and heterogenous ECM

表 1. 自体、同种与异种 ECM 来源比较

	来源	优点	缺点
自体 ECM	患者自身	不易排斥，相容性好	极难获取
同种 ECM	捐献者	相容性好，来源较广	较难获得
异种 ECM	动物	来源广泛，适合大批量生产	极容易获得

破坏细胞的膜结构及其与 ECM 的连接；或直接消化细胞成分，再漂洗并留下 ECM^[10]。常见的方法是将心肌组织放置于脱细胞液中震荡反应，或利用心脏本身的脉管系统，通过灌注将脱细胞液输入组织达到脱细胞化的目的^[4,10]。后者虽然操作较复杂，但能在三维平面建立心肌组织乃至完整心脏的 ECM^[11,12]，并能通过天然脉管系统种植心肌细胞或血管内皮细胞^[4,12]。目前的 ECM 制备主要遵循以下思路：1) 选定样品材料及去细胞试剂；2) 设定反应条件(时间、浓度、流速、压力)并设定对照组；3) 效果对比及评价^[4,13]。

2.2. 脱细胞试剂

目前常用的脱细胞试剂主要有三类：1) 离子型去垢剂，如十二烷基磺酸钠(SDS)和脱氧胆酸钠(SDC)；2) 非离子型去垢剂，例如 3-(3-胆胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸(CHAPS)和曲拉通(Triton X-100)；3) 酶类，如胰蛋白酶，DNase，RNase；4) 其它，如 Igepal CA630 和 tert-octylphenyl-polyoxyethylen 等^[14,15]。

很多研究将不同种类的脱细胞试剂进行比较^[16,17]或组合使用^[12]，而报道的结果往往存在很大差异。Wang K. X.等报告胰酶对猪主动脉瓣去细胞化作用彻底，对细胞支架伤害小^[18]。而 Kasimir 等则报告 TritonX-100 对猪主动脉瓣和肺动脉瓣的去细胞化效果更佳^[19]。这种差异可能与各实验组选用组织种属、脱细胞组织体积或处理方法和时间不同有关。

研究表明细胞胞质与细胞核成分去除存在不同步的现象^[9]，选用单一试剂的脱细胞化效果往往并不彻底，因此比较完善的方法是将两种或以上的脱细胞化试剂联合使用。其中最具代表性的是去垢剂-核酸酶联合法，即先用去垢剂破坏细胞结构，再用核酸酶消化大分子的核质，最终将绝大多数细胞成分洗出。然而脱细胞试剂由于其本身的生物毒性，通常会在一定程度上消化或降解 ECM 的关键成分(如胶原和弹性蛋白)，从而造成 ECM 损伤^[20]，破坏移植细胞的生长环境。

此外，L. Gui 等研究表明在传统脱细胞化试剂处理过程中配合细胞培养基能提高脱细胞效率，并对 ECM 结构起到一定的保护作用^[9]，其机制可能与培养基中的血清成分(如核酸酶)有关。S. Cebotari 等研究发

现在漂洗不完全的情况下，残留的脱细胞化试剂对内皮细胞具有一定毒性，并妨碍其附着于 ECM 上生长^[21]。因此，重细胞化 ECM 前必须充分漂洗去除残留的脱细胞化试剂。

2.3. 物理方法脱细胞

如利用电势场破坏细胞膜结构造成其破裂，达到去细胞目的^[22]，还有在聚乙二醇(PG)交联下利用 γ 射线辐照法进行脱细胞化^[23]。经证实，在这两种物理方法得到的 ECM 能有效粘附内皮细胞并促进其生长。

然而，由于脱细胞试剂的选择、试剂浓度、所处理的组织的特性、反应时间等因素都会引起效果上的差异^[8]，一种动物的组织达到最佳脱细胞效果的实验方案往往不适用于其它组织。因此在参考其他研究组报道的脱细胞方案时需要慎重综合考虑。

3. ECM 品质评价：多种方法结合

理想的心肌 ECM 应该保留天然的成分、三维结构和超微结构。观察心肌 ECM 形态最为直观的方法是染色和镜检，HE 染色可以初步观察残留细胞状况。运用免疫组织化学和免疫荧光染色检测 ECM 主要成分如胶原蛋白、纤连蛋白等^[5]，可以直观地评价 ECM 关键结构在脱细胞化前后的变化。细胞核的特异性染色如 DAPI 和 Hechst33347 可以评价脱细胞核效果是否完全。而 ECM 的超微结构和形态可以用扫描电镜和透射电镜技术进一步观察。此外 Western Blot、质谱分析可进一步检测和定量心肌 ECM 组成或残余细胞成分^[11,24]。Udi Sarig 等报道用胰酶/Triton 灌注法制备的心肌 ECM 保留天然的纤维形态和血管结构、无细胞结构残留，胶原蛋白 I、II、III 和 V 为 ECM 的主要成分^[12]。

4. 心肌 ECM：具有生物活性的力学材料

心脏的主要功能是泵血，心肌正常收缩是心脏发挥泵血功能的重要因素，这就对重组心肌材料的力学特性提出了近乎苛刻的要求：重组心肌要能完成收缩和舒张，并且有一定的增长能力和修复能力。如果心肌补丁不能与原有组织同步收缩，将诱发心律不齐增加心力衰竭的危险。因此，对 ECM 的力学特性测试是衡量 ECM 质量的关键步骤。

目前在测量 ECM 力学特性时，多数实验组采用的是拉伸试验，测量指标主要有两个：抗拉强度(即胡克常数 k)和最大拉伸比(拉断时材料长度与正常长度的比值)，并与正常组织进行对比^[12]。通常在脱细胞化后，ECM 由于被去细胞试剂破坏，胶原蛋白和弹性蛋白有一定损失^[25]，ECM 的弹性有所降低^[26]。

然而，由于不同实验组之间由于缺乏统一测量标准，难以进行横向比较。因此，笔者建议将工程力学上常用的标准指标——杨氏模量 Y 进行跨实验组的同种 ECM 力学特性比较。对于心肌 ECM， Y 越大，意味着弹性越好。

5. 免疫原性评价与消除：理想与现实的差距

理想情况下，脱细胞处理制得的 ECM 的成分主要为结缔组织，富含胶原及弹性蛋白等^[10]。很显然，脱细胞化过程不仅为移植细胞提供了生长场所，还将绝大部分免疫原性物质如细胞蛋白，核酸等去除，然而去除细胞的异种支架在临床上被证明仍然具有引发人体排斥反应的能力，美国 Crylife 公司曾使用猪去细胞瓣膜(cynergraft 瓣膜)对心脏病患儿进行移植，诱发了严重的排异反应并导致患者死亡，最终不得不停止使用。检查发现去细胞瓣膜植入机体后，早期炎症反应严重削弱了基质结构，引起瓣膜的结构破坏和衰败，最终发生钙化并丧失生物功能。实验室已经通过免疫组化等方法证实猪去细胞瓣膜确实具有免疫原性^[27]。因此，用心肌 ECM 制备的人工心肌组织真正用于临床治疗前必须彻底解决排斥反应的问题。

ECM 免疫原性评价的方法有体外和体内两种。在体外进行检测的常用方式是免疫组化，通过抗体抗原反应直接观察残余物质。在体内检测的方法是将制取的 ECM 植入实验动物体内，过一段时间(通常为 6~8 周)后取出，观察细胞覆盖情况，并对可能发生的钙化进行定量以评价机体对 ECM 的排斥程度^[28,29]。越来越多的研究者通过体外共培养模拟排斥反应的方法直观地评价 ECM 免疫原性。Keane 等人将参与排斥反应的细胞与 ECM 进行共培养，观察其生长状况并检测免疫相关代谢产物如 NO、TNF- α 等，可了解 ECM 与免疫细胞间的相互作用。虽然相对于新鲜组织，经过脱细胞化处理得到的 ECM 大大减少了血小板、巨噬细胞和细胞毒性 T 细胞的聚集，但仍存在一定程度

的巨噬细胞活化和血小板聚集^[30]。

Keane 等对 ECM 免疫原性的动物实验探究证实，诱发机体对 ECM 产生排斥的物质主要为未清除的细胞成分，使一些物种特异性成分引起排斥^[30]。因此高效而彻底的脱细胞技术成为消除免疫原性的关键。来自捐献者的人心肌 ECM 引起排斥反应的可能性理论上固然比动物源性心肌 ECM 更低，但临床上极难获得。

6. ECM 改造：解决免疫原性，组织相容性及机械强度问题的新思路

研究发现，在重组支架培养中，种植细胞并不能在 ECM 中进行有效的主动迁移，而是通过破坏支架孔结构转移生长^[31]。细胞间通讯不甚理想，造成重细胞化的不均一性。培养条件下主要通过培养基“扩散”供给营养，人工心肌组织中心区域由于缺乏功能性血管结构，出现不同程度的细胞凋亡和坏死，严重限制了人工心肌组织的面积和厚度^[12]。

重细胞化主要取决于两个因素：细胞粘附和支架纤维化。一般情况下，细胞只有与支架紧密贴附才能生长(这与细胞贴壁培养有异曲同工之处)，而只有当支架发生纤维化才能进行功能发挥。

为了解决异种细胞的粘附，目前主要的思路有两种：一是采用活性物质对 ECM 进行活化修饰，二是用相容性好的中间介质包被 ECM。

在对 ECM 活化修饰研究中，细胞融合试剂——聚乙二醇(PEG)作为活化物质被广泛应用，实验已经证实聚乙二醇和血管内皮生长因子(VEGF)交联的心脏瓣膜 ECM 能促进种植细胞的增殖^[32]。而有报道利用精氨酸—甘氨酸—天冬氨酸肽(RGD 肽)对 ECM 中的胶原纤维进行交联化修饰，再用环氧氯丙烷(EC)对二硫键进行处理，大幅提高了细胞的粘附贴壁率^[33]。此外，一些科研组在人工心脏瓣膜构建过程中，对动脉瓣进行生物素化修饰，再将亲和素与细胞表面生物素接合，结果在对细胞生长影响较小的前提下提高了粘附效率^[34]。这项技术也为心肌 ECM 的改造提供了新思路。

利用中间介质包被 ECM，使免疫原性物质与宿主的免疫细胞隔离也是解决粘附问题的新颖思路。中间介质一方面要与 ECM 有良好的亲和能力，另一方面

又不会被人体免疫系统认定为抗原。除聚乙二醇外，用人细胞外基质包被 ECM 也可以满足要求，免疫组化方法证实人细胞外基质可以有效覆盖猪动脉瓣 ECM，消除免疫原性^[35]。这项技术提高了利用来源广泛的动物材料进行 ECM 构建的实用性。

为了提升 ECM 的机械性能，使其力学特性接近于人体组织，一些经典方法正在被应用，如前文提到的聚乙二醇交联方法不仅能促进细胞粘附，还提高了 ECM 的机械强度^[32]。此外一些特殊的方法也在研究中，例如用亚甲基蓝等染料介导光氧化反应处理牛心包 ECM，提高了 ECM 的机械性能，制得的心包 ECM 还可作为心肌 ECM 的替代品使用^[36]。而戊二醛 - 维生素的联合方法还使 ECM 具备良好的抗钙化性能^[28]。但这些新技术在心肌 ECM 上的实际效果还有待探索。

7. 展望：心肌 ECM 能否作为组织工程支架的可靠来源？

相比于传统人工合成细胞外基质，心肌 ECM 作为新兴的支架材料，其良好的生物相容性和细胞亲和力具有较大的优势。ECM 来源于生物体自身，其复杂而精细的超微结构和生物活性为移植细胞的生长与分化提供了最接近于生物体内的环境，这是人工合成材料所不能比拟的。

就目前研究进展而言，用胶原等物质人工合成的支架由于来源相对广泛，加工性能良好和制造成本低廉等因素依然占据主导地位。而 ECM 目前尚不能实现批量生产，ECM 的力学特性与理想情况有一定差距，免疫原性有部分残留，这也限制了 ECM 在组织工程中的应用。因此目前研究一方面集中于优化脱细胞化方法，在保留细胞外基质固有成分的同时最大限度去除细胞成分，另一方面则关注心肌 ECM 的改造和修饰，提升力学性能和生物相容性以满足收缩功能的发挥。随着去细胞化技术的不断改进和完善，心肌 ECM 的性能必将提升并超越人工合成材料，具有批量生产和实用于临床的良好前景。

参考文献 (References)

[1] R. Passier, L. W. van Laake and C. L. Mummery. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*, 2008, 453(7193): 322-329.

[2] B. C. Karikkineth, W. H. Zimmermann. Myocardial tissue engineering and heart muscle repair. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 14(1): 4-11.

[3] M. He, A. Callanan. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2012, 19(3): 194-208.

[4] H. C. Ott, T. S. Matthiesen, S. K. Goh, et al. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 2008, 14(2): 213-221.

[5] A. F. Godier-Furnemont, T. P. Martens, M. S. Koeckert, et al. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2011, 108(19): 7974-7979.

[6] H. W. Cheng, Y. K. Tsui, K. M. Cheung, et al. Decellularization of chondrocyte-encapsulated collagen microspheres: A three-dimensional model to study the effects of acellular matrix on stem cell fate. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2009, 15(4): 697-706.

[7] P. Somers, F. de Somer, M. Cornelissen, et al. Decellularization of heart valve matrices: Search for the ideal balance. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*, 2012, 40(1-2): 151-162.

[8] T. Jiao, R. J. Clifton, G. L. Converse, et al. Measurements of the effects of decellularization on viscoelastic properties of tissues in ovine, baboon, and human heart valves. *Tissue Engineering Part A*, 2012, 18(3-4): 423-431.

[9] L. Gui, S. A. Chan, C. K. Breuer, et al. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Engineering Part C Methods*, 2010, 16(2): 173-184.

[10] J. M. Wainwright, C. A. Czajka, U. B. Patel, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Engineering Part C Methods*, 2010, 16(3): 525-532.

[11] A. Weymann, S. Loganathan, H. Takahashi, et al. Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model-generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds. *Circulation Journal*, 2011, 75(4): 852-860.

[12] U. Sarig, G. C. Au-Yeung, Y. Wang, et al. Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: A potential platform for myocardial tissue regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 2012, 18(19-20): 2125-2137.

[13] C. V. Montoya, P. S. McFetridge. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering Part C Methods*, 2009, 15(2): 191-200.

[14] E. Rieder, M. T. Kasimir, G. Silberhumer, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2004, 127(2): 399-405.

[15] M. T. Kasimir, G. Weigel, J. Sharma, et al. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: Platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost*, 2005, 94(3): 562-567.

[16] P. Akhyari, H. Aubin, P. Gwanmesia, et al. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: A comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Engineering Part C Methods*, 2011, 17(9): 915-926.

[17] E. Rieder, M.-T. Kasimir, G. Silberhumer, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2004, 127(2): 399-405.

[18] K. X. Wang, J. F. Zhang, Q. P. Zhan, et al. [Effect of trypsin and triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25(1): 22-25.

[19] M. T. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *The International Journal of Artificial Organs*, 2003, 26(5): 421-427.

[20] J. Y. Zhou, O. Fritze, M. Schleicher, et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*, 2010, 31(9): 2549-2554.

[21] S. Cebotari, I. Tudorache, T. Jaekel, et al. Detergent decellulari-

- zation of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artificial Organs*, 2010, 34(3): 206-209.
- [22] M. Phillips, E. Maor and B. Rubinsky. Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2010, 132(9): Article ID: 091003.
- [23] T. Ota, S. Taketani, S. Iwai, et al. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2007, 83(4): 1501-1507.
- [24] B. Mendoza-Novelo, E. E. Avila, J. V. Cauich-Rodriguez, et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater*, 2011, 7(3): 1241-1248.
- [25] P. Akhyari, H. Aubin, P. Gwanmesia, et al. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: A comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2011, 17(9): 915-926.
- [26] C. Witzenburg, R. Raghupathy, S. M. Kren, et al. Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization. *Journal of Biomechanics*, 2012, 45(5): 842-849.
- [27] M. T. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *Journal of Heart Valve Disease*, 2006, 15(2): 278-86; Discussion 286.
- [28] H. G. Lim, S. H. Kim, S. Y. Choi, et al. Anticalcification effects of decellularization, solvent, and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2012, 41(2): 383-390.
- [29] C. Collatusso, J. G. Roderjan, E. D. Vieira, et al. Decellularization as an anticalcification method in stentless bovine pericardium valve prosthesis: A study in sheep. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 2011, 26(3): 419-426.
- [30] T. J. Keane, R. Londono, N. J. Turner, et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 2012, 33(6): 1771-1781.
- [31] B. Wang, A. Borazjani, M. Tahai, et al. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 94(4): 1100-1110.
- [32] 周建良, 邹明晖, 胡行健等. 血管内皮细胞生长因子修饰的聚乙二醇化去细胞瓣构建心脏瓣膜复合支架[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(10): 2890-2895.
- [33] 顾春虎, 王云雅, 魏旭峰等. 精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸肽联合环氧氯丙烷改良去细胞猪瓣研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 9: 1188-1189.
- [34] 叶晓峰, 赵强, 孙晓宁. 生物素化去细胞猪主动脉瓣构建组织工程心脏瓣膜研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(1): 80-82.
- [35] 李秋泽, 徐志云, 黄盛东等. 人细胞外基质包被猪去细胞瓣膜支架构建的组织工程心脏瓣膜[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(42): 8269-8272.
- [36] 张振亮, 周建业, 胡盛寿等. 光氧化处理脱细胞牛心包构建组织工程心肌补片的实验研究[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2011, 27(8): 485-488.