

3D 生物打印构建具有血管网络的心脏补片：种子细胞选择、生物材料优化与心肌修复功能评价

杨程宇

重庆第二师范学院（重庆 400067）

【摘要】：心血管疾病尤其是心肌梗死严重威胁人类健康，其中心肌组织受损后难以自我修复。本研究聚焦于利用 3D 生物打印技术构建具有血管网络的心脏补片。在种子细胞选择方面，深入探讨了原代心肌细胞与诱导多能干细胞衍生心肌细胞的特性，以及血管内皮细胞与周细胞的作用，构建并优化了种子细胞共培养体系。生物材料优化环节，全面分析天然与合成生物材料的优缺点，通过复合与改性策略改善材料性能，精心调配生物墨水并探究其流变学特性与打印参数适配性。在心脏补片构建过程中，阐述了不同打印技术原理、设备参数设置、血管网络构建策略以及补片结构设计及优化方法。通过体外功能评价模型与方法，包括细胞活力、增殖、心肌细胞收缩功能和血管网络形成与功能评估，以及体内移植实验，从心脏功能指标、组织学分析和电生理特性等多维度评价心肌修复效果。本研究为心血管疾病治疗中组织工程心脏补片的研发提供了重要理论依据与技术支持，有力推动 3D 生物打印技术在心肌修复领域的应用与发展。

【关键词】：3D 生物打印；心脏补片；种子细胞；生物材料；心肌修复

3D Bioprinting of Cardiac Patches with Vascular Networks: Selection of Seed Cells, Optimization of Biomaterials and Evaluation of Myocardial Repair Function

Yang Chengyu

Chongqing Second Normal University, Chongqing 400067, China

Abstract: Cardiovascular diseases, especially myocardial infarction, seriously threaten human health, and the damaged myocardial tissue is difficult to repair by itself. This study focuses on using 3D bioprinting technology to construct cardiac patches with vascular networks. In terms of seed cell selection, the characteristics of primary cardiomyocytes and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells, as well as the roles of vascular endothelial cells and pericytes were deeply explored, and a seed cell co-culture system was constructed and optimized. In the optimization of biomaterials, the advantages and disadvantages of natural and synthetic biomaterials were comprehensively analyzed. The material properties were improved through compounding and modification strategies. The bioink was carefully formulated and the compatibility between its rheological properties and printing parameters was investigated. During the construction of cardiac patches, the principles of different printing technologies, the setting of equipment parameters, the construction strategies of vascular networks and the design and optimization methods of patch structures were expounded. Through in vitro functional evaluation models and methods, including cell viability, proliferation, cardiomyocyte contraction function and vascular network formation and function assessment, as well as in vivo transplantation experiments, the myocardial repair effect was evaluated from multiple dimensions such as cardiac function indicators, histological analysis and electrophysiological characteristics. This study provides an important theoretical basis and technical support for the research and development of tissue-engineered cardiac patches in the treatment of cardiovascular diseases and strongly promotes the application and development of 3D bioprinting technology in the field of myocardial repair.

Keywords: 3D Bioprinting; Cardiac Patch; Seed Cell; Biomaterial; Myocardial Repair

1 引言

1.1 心血管疾病现状与心肌修复需求

心血管疾病作为全球范围内导致人类死亡的主要病因之一，其发病率和死亡率一直居高不下。心肌梗死更是心血管疾病中的严重类型，发病时心肌组织因冠状动脉突然阻塞而遭受急性缺血性损伤，大量心肌细胞迅速死亡且难以实现有效的自

我修复。这种心肌细胞的永久性缺失会引发心室重构，表现为心肌纤维化、心室壁变薄、心脏腔室扩大等病理变化，最终导致心脏功能严重受损，心力衰竭的发生风险显著增加。据世界卫生组织统计数据，每年因心血管疾病死亡的人数高达数千万，其中很大一部分与心肌梗死后心脏功能衰竭密切相关。目前临床上针对心肌梗死的治疗手段，如药物治疗、介入治疗和冠状动脉旁路移植术等，虽然能够在一定程度上缓解症状、

改善心肌供血，但对于已经坏死的心肌组织再生和心脏功能的完全恢复效果有限。因此，迫切需要开发创新的治疗策略来实现心肌梗死区域的有效修复和心脏功能的重建，组织工程心脏补片作为一种极具潜力的治疗方法应运而生。

1.2 3D 生物打印技术在心脏补片构建中的优势与挑战

3D 生物打印技术作为新兴的组织工程构建手段，在心脏补片的研发方面展现出诸多独特优势。其一，该技术能够依据患者的个体解剖结构和生理需求，精确地设计并打印出定制化的心脏补片，确保补片与受损心脏部位在形态和尺寸上高度匹配，从而实现更好的贴合效果与治疗作用。其二，3D 生物打印可在空间上精准控制多种细胞和生物材料的分布，将具有不同功能的种子细胞（如心肌细胞、血管内皮细胞和周细胞等）按照特定的比例和排列方式与适宜的生物材料相结合，模拟天然心脏组织的复杂结构和细胞组成，有利于促进细胞间的相互作用与协同功能发挥，为心肌修复提供更有利的微环境。其三，通过计算机辅助设计（CAD）和建模技术，能够对心脏补片的微观和宏观结构进行细致优化，例如构建仿生的血管网络结构，以保障补片植入体内后营养物质和氧气的有效传输，维持细胞的活性与功能。

2 种子细胞选择

2.1 心肌细胞来源与特性

2.1.1 原代心肌细胞

原代心肌细胞通常分离自胚胎或新生动物的心脏组织。在分离过程中，需借助精细的酶解技术，如使用胰蛋白酶或胶原酶等，将心脏组织消化成单细胞悬液，随后通过差速贴壁或密度梯度离心等方法进行纯化。原代心肌细胞具有天然的收缩功能，其收缩机制与体内心肌组织相似，能够自发地产生节律性收缩，并且在电生理特性方面，具备正常的动作电位传导能力，这对于维持心脏的节律性跳动至关重要。然而，原代心肌细胞在体外培养时存在明显的局限性。其增殖能力极为有限，难以大量扩增以满足 3D 生物打印构建心脏补片所需的细胞数量。同时，随着培养时间的延长，原代心肌细胞容易发生去分化现象，导致其特有的心肌细胞表型和功能逐渐丧失，这对构建具有稳定和高效心肌修复功能的心脏补片构成了重大挑战。

2.1.2 诱导多能干细胞（iPSCs）衍生心肌细胞

诱导多能干细胞（iPSCs）衍生心肌细胞的技术基于体细胞重编程原理。通过向体细胞（如成纤维细胞）中导入特定的转录因子组合（如 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 等），将体细胞重新编程为具有多能性的 iPSCs。这些 iPSCs 能够在特定的诱导分化条件下，逐步分化为心肌细胞。这一来源的心肌细胞为心脏补片的构建提供了丰富的细胞资源，可在体外大规

模扩增培养，解决了原代心肌细胞数量不足的问题。但 iPSCs 衍生心肌细胞在应用中也面临诸多困境。其分化效率相对较低，在诱导分化过程中，往往只有一部分 iPSCs 能够成功分化为心肌细胞，这增加了培养成本和时间成本。而且，分化得到的心肌细胞功能成熟度有限，与天然成年心肌细胞在收缩力、电生理特性等方面存在差距。此外，iPSCs 在培养过程中存在一定的致癌性风险，这是由于其多能性状态可能导致细胞异常增殖并形成肿瘤，因此在用于临床治疗前，必须建立严格的质量控制体系以确保其安全性。

2.2 血管内皮细胞与周细胞

2.2.1 内皮细胞来源

内皮细胞在血管网络的形成和功能维持中起着核心作用，其来源较为广泛。脐静脉内皮细胞（HUVECs）是常用的内皮细胞来源之一，可通过对新生儿脐带静脉进行酶解处理获取。HUVECs 具有易于获取、在体外培养条件下生长较快且能够形成较为稳定的血管样结构等优点，其在血管生成相关研究中已被广泛应用。骨髓源性内皮祖细胞（EPCs）则是另一种重要的内皮细胞来源，这类细胞存在于骨髓中，具有一定的自我更新和分化为成熟内皮细胞的能力。EPCs 在体内能够参与血管新生过程，当组织发生缺血损伤时，EPCs 可被动员到损伤部位并分化为内皮细胞，促进新血管的形成。不同来源的内皮细胞在血管形成过程中具有各自的特点，HUVECs 侧重于快速构建血管结构的基础框架，而 EPCs 则在体内血管修复和再生的生理过程中发挥着更为重要的作用，并且它们在细胞因子分泌、对局部微环境的适应性以及与其他细胞相互作用等方面也存在差异，这些差异在构建心脏补片的血管网络时需要综合考虑。

2.2.2 周细胞的作用与选择

周细胞在血管结构的稳定和成熟过程中扮演着不可或缺的角色。它们环绕在血管内皮细胞周围，通过与内皮细胞之间的紧密接触和信号传导，调节血管的管径、通透性以及稳定性。在心脏补片的构建中，合适的周细胞选择对于形成功能完善的血管网络至关重要。平滑肌细胞是一种常见的周细胞类型，其能够分泌多种细胞外基质成分，如胶原蛋白和弹性蛋白等，为血管提供结构支持并调节血管的张力。此外，某些间充质干细胞亚群也可作为周细胞的候选来源，这些细胞具有多向分化潜能，不仅能够分化为类似平滑肌细胞的表型参与血管结构稳定，还能分泌多种生长因子和细胞因子，促进血管内皮细胞的增殖、迁移和血管生成。在选择周细胞时，需要综合考虑其与内皮细胞的协同作用能力、在体外培养和 3D 生物打印过程中的稳定性以及对心脏补片整体功能的促进作用等因素，通过实验研究和筛选确定最适合的周细胞类型和来源。

3 生物材料优化

3.1 生物材料的种类与特性

3.1.1 天然生物材料

天然生物材料如胶原蛋白、明胶、海藻酸盐等，具有独特的结构组成，其分子结构与人体细胞外基质相似，这赋予了它们卓越的生物相容性。胶原蛋白是动物体内含量丰富的蛋白质，具有良好的细胞黏附性，能为细胞提供适宜的附着位点，促进细胞的黏附、增殖与分化。明胶作为胶原蛋白的变性产物，继承了其部分优良特性，且可通过调节温度等条件改变其物理状态，便于加工处理。海藻酸盐则具有良好的凝胶特性，能在温和条件下形成稳定的凝胶结构，可用于包裹细胞并维持细胞在打印过程中的分布。然而，天然生物材料也存在一些不足之处。它们的力学性能相对较弱，难以承受心脏组织在体内所承受的复杂力学应力，如心脏的周期性收缩与舒张产生的压力和拉力。此外，天然生物材料的降解速率较难精准控制，可能出现过快降解导致支架结构过早崩塌，或降解过慢影响组织再生与修复进程的情况。

3.1.2 合成生物材料

合成生物材料如聚乳酸 (PLA)、聚己内酯 (PCL)、聚氨酯 (PU) 等，具有可加工性强的优势，能够通过多种成型工艺制备成不同形状和结构的支架材料。其降解速率可在合成过程中通过改变分子结构、分子量等参数进行调控，以适应不同组织修复的时间需求。例如，PLA 的降解时间相对较短，而 PCL 的降解过程则较为缓慢。在力学性能方面，合成生物材料表现出色，能够提供足够的强度和韧性来支撑心脏补片在体内的结构完整性，抵御心脏运动产生的力学负荷。但合成生物材料的细胞亲和性相对较差，细胞在其表面的黏附、生长和增殖能力有限，这可能会影响种子细胞在支架上的存活与功能发挥。同时，部分合成生物材料在体内可能引发炎症反应，对周围组织产生不良影响，这也限制了其在生物医学领域的直接应用，需要进一步的优化处理。

3.2 生物材料的复合与改性

3.2.1 天然与合成材料复合策略

为了综合天然生物材料与合成生物材料的优势，采用复合策略是一种有效的优化途径。物理共混是较为常用的方法之一，即将天然生物材料与合成生物材料以一定比例在溶液或熔融状态下充分混合均匀，然后进行成型处理。这种方法操作相对简单，能够在一定程度上结合两种材料的优点，如天然材料改善细胞亲和性，合成材料增强力学性能。例如，将胶原蛋白与 PLA 共混制备的复合支架，既具有 PLA 的良好力学支撑性，又因胶原蛋白的存在而提高了细胞黏附性。化学交联则是通过化学反应在天然材料与合成材料之间形成共价键，构建更为稳

定的复合结构。这种方法能够增强材料间的结合力，使复合支架具有更好的整体性和稳定性，但反应条件相对苛刻，需要精确控制反应参数。通过优化天然与合成材料的复合比例和复合方式，可以得到具有合适力学性能、良好细胞亲和性和可调控降解特性的生物材料，满足心脏补片在体内复杂力学环境下的长期使用要求。

3.2.2 生物材料的功能化改性

生物材料的功能化改性是提升其性能的另一个重要手段。利用生物活性分子对生物材料进行表面修饰是常见的功能化改性方法。例如，将含有 RGD 肽的分子接枝到生物材料表面，RGD 肽能够特异性地与细胞表面的整合素受体结合，从而显著增强细胞在材料表面的黏附能力，促进细胞的铺展和增殖。此外，将生长因子如血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等固定在生物材料上，可使这些生长因子在局部持续发挥作用，诱导血管生成、促进细胞分化。对于天然生物材料，功能化改性还可以改善其降解特性，如通过化学修饰调节胶原蛋白的交联程度，控制其降解速率。对于合成生物材料，功能化改性能够降低其免疫原性，减少炎症反应的发生。经过功能化改性后的生物材料在促进种子细胞黏附、迁移、分化以及血管生成诱导等方面展现出显著的效果，为构建高性能的心脏补片提供了有力支持。

3.3 生物墨水的配方优化与流变学特性

3.3.1 生物墨水组成成分调整

生物墨水的组成成分直接影响其性能和 3D 生物打印的效果。在确定生物墨水的配方时，需要综合考虑种子细胞类型、生物材料复合体系等因素来调整细胞浓度、生物材料浓度以及添加剂 (如交联剂、营养物质等) 的含量。细胞浓度过高可能导致生物墨水黏度增大，影响打印过程中的挤出性和细胞分布均匀性，同时过高的细胞密度也可能因营养物质供应不足和代谢废物积累而影响细胞活性。相反，细胞浓度过低则无法满足心脏补片的功能需求。生物材料浓度的调整则需平衡支架的力学性能和打印可行性，过高的生物材料浓度会使生物墨水过于黏稠，难以顺利挤出喷头，而过低的浓度可能导致打印后的支架结构不稳定。添加剂的使用也至关重要，交联剂可促进生物墨水在打印后快速形成稳定的凝胶结构，提高支架的力学强度；营养物质如葡萄糖、氨基酸等则能为细胞在打印过程及后续培养中提供必要的能量和物质支持，维持细胞的生存和功能。通过系统的实验研究，确定各成分的最佳配比，以获得具有适宜黏度、良好细胞相容性和可打印性的生物墨水。

3.3.2 流变学性能与打印参数适配

生物墨水的流变学性能，包括储能模量、损耗模量、屈服应力等，对 3D 生物打印过程起着关键的调控作用。储能模量反映了材料的弹性特性，决定了生物墨水在打印后保持形状的

能力；损耗模量体现了材料的黏性特性，与生物墨水在喷头中挤出时的流动阻力相关。屈服应力则是使材料开始流动所需的最小应力。这些流变学参数随剪切速率、温度等因素而变化。在打印过程中，需要根据生物墨水的流变学行为优化打印参数。例如，较高的打印压力有助于克服生物墨水的屈服应力，使其顺利挤出喷头，但过高的压力可能导致细胞损伤或影响打印精度。喷头直径的大小影响生物墨水的挤出量和线条宽度，进而影响心脏补片的微观结构精度。打印速度则需与生物墨水的固化速度相匹配，以确保打印出的结构能够及时稳定成型。通过深入研究生物墨水的流变学性能与打印参数之间的关系，进行精确的参数适配，能够实现生物墨水在打印过程中的精确挤出并形成具有预定结构与精度的心脏补片支架，同时最大程度地维持种子细胞的活性与功能。

4 3D 生物打印心脏补片的构建

4.1 打印技术与设备

4.1.1 3D 生物打印技术原理

当前，主流的 3D 生物打印技术包括喷墨式打印、挤出式打印和光固化打印等，它们各自基于不同的工作原理实现生物材料与细胞的逐层构建。喷墨式打印类似于传统的喷墨打印机，通过将生物墨水以微小液滴的形式精确喷射到特定位置。其优势在于能够实现较高的打印分辨率，可精确控制细胞和生物材料的分布，对于构建精细结构具有一定优势。然而，这种技术对生物墨水的黏度要求较为严格，黏度太高会导致喷头堵塞，太低则可能影响液滴的成型与定位准确性。挤出式打印是将生物墨水通过压力或螺杆挤出装置从喷头挤出，喷头可根据预设路径移动，逐层堆积形成三维结构。该技术可适用的生物墨水黏度范围相对较宽，能够处理含有较高浓度细胞和生物材料的墨水，有利于构建具有一定厚度和力学强度的心脏补片。但挤出过程中可能产生较大的剪切力，对细胞活性造成潜在威胁。

4.1.2 打印设备的选择与参数设置

在选择 3D 生物打印机时，需要综合考虑多种因素，如生物墨水的特性、心脏补片的设计要求等。对于生物墨水黏度较低、需要高精度打印的情况，喷墨式打印机可能更为合适；若生物墨水黏度较高且需要构建较厚结构，则挤出式打印机更具优势；而对于具有复杂内部结构、需要快速成型的心脏补片，光固化打印机可作为优先选择。在确定打印机型号后，关键参数的设置对打印效果至关重要。喷头温度会影响生物墨水的流动性和固化速度，例如，对于一些温度敏感型生物墨水，喷头温度过高可能导致墨水提前固化堵塞喷头，过低则可能使墨水过于黏稠而难以挤出。打印平台温度同样重要，它可以影响打印过程中生物墨水的沉积和固化效果，合适的平台温度有助于维持打印结构的稳定性和精度。打印分辨率决定了心脏补片的微观结构精细程度，较高的分辨率能够更精准地构建血管网络

等精细结构，但可能会降低打印速度。通过对这些参数的系统优化和调整，能够确保生物墨水在打印过程中稳定挤出，细胞分布均匀，从而获得结构完整、精度符合要求的心脏补片。

4.2 血管网络的构建策略

4.2.1 牺牲模板法

牺牲模板法是构建心脏补片血管网络的常用策略之一。该方法首先选用可牺牲性材料，如 Pluronic F - 127、明胶微球等，构建血管网络的模板。以 Pluronic F - 127 为例，它在低温下呈液态，可方便地与生物墨水混合并一同打印。在打印完成后，将温度升高至 Pluronic F - 127 的相变温度以上，使其由液态转变为液态凝胶，然后通过溶解或其他物理方法将其去除，从而在心脏补片中留下中空的血管通道。明胶微球则可在打印后通过酶解等方式去除。在构建过程中，模板材料与生物墨水需要具备良好的相容性，既要保证在打印过程中模板材料能够均匀分散在生物墨水中，又要确保在去除模板时不会对已打印的生物材料和细胞结构造成破坏。这种方法的优点在于能够相对容易地构建出具有复杂分支结构的血管网络，并且可以通过控制模板材料的形状、大小和分布来精确调整血管网络的形态和参数。然而，该方法也存在一些挑战，如在去除模板过程中可能会对周围细胞和生物材料产生一定的影响，需要优化去除条件以减少这种不良影响。

4.2.2 直接打印法

直接打印法是利用特殊的喷头设计或多材料打印技术直接构建血管结构。在喷头设计方面，采用同轴喷头或多通道喷头可实现不同生物材料和细胞的同时打印。例如，通过同轴喷头的内通道挤出血管内皮细胞与生物材料的混合物作为血管内层，外通道挤出支持性生物材料作为血管外层，从而构建出具有分层结构的血管。在多材料打印技术中，可根据血管结构的设计要求，在不同位置和层间精确切换打印不同的生物材料和细胞组合。直接打印法的创新之处在于能够更好地控制血管细胞的排列方向和密度，有利于提高血管的功能特性。例如，可使内皮细胞沿着血管长轴方向有序排列，更接近天然血管的结构。同时，该方法在构建血管分支结构时能够实现更自然的过渡和连接。然而，直接打印法面临着技术难度较大的问题，如在多材料打印过程中，需要精确控制不同材料的挤出速度、比例和融合效果，以确保血管结构的完整性和稳定性。此外，对于复杂的血管网络结构，如何实现高效、准确的打印也是需要解决的关键技术难题。

4.3 心脏补片的结构设计与优化

4.3.1 宏观结构设计

宏观结构设计主要依据心脏受损部位的解剖形态与力学环境进行。心脏补片的整体形状需要与受损心肌区域相匹配，例如，对于心室壁受损的情况，补片应设计与心室壁曲率相似

的形状, 以确保良好的贴合度。尺寸方面, 则需根据受损面积大小确定, 保证补片能够完全覆盖病变区域, 并预留一定的边缘用于固定。厚度的设计要综合考虑力学支撑需求和营养物质扩散效率, 过厚的补片可能导致内部细胞营养供应不足, 过薄则无法提供足够的力学强度。为了提高补片与周围心肌组织的贴合度和固定效果, 可采用特殊的边缘设计, 如带有微小凸起或凹槽, 便于与心肌组织进行缝合或黏附。同时, 考虑到心脏在跳动过程中的复杂力学运动, 通过有限元分析等手段对宏观结构设计进行模拟优化。有限元分析可以模拟心脏在不同生理状态下的应力应变分布, 预测补片在心脏内的受力情况, 根据分析结果对补片的形状、尺寸和厚度等参数进行调整, 以实现补片与心脏在力学上的良好匹配, 减少因力学不匹配导致的补片移位、破损或对心脏功能的不良影响。

4.3.2 微观结构优化

微观结构优化旨在构建具有仿生心肌组织结构的补片。在微观层面, 心肌纤维的排列方向对心脏的收缩功能有着重要影响。因此, 在设计心脏补片时, 应尽可能模拟天然心肌纤维的排列方式, 使打印的心肌细胞沿着特定方向有序排列。例如, 通过调整喷头的运动路径和生物墨水的挤出方向, 引导心肌细胞形成类似天然心肌组织的螺旋状或环状排列结构。细胞外基质分布也是微观结构优化的重要内容, 合理的细胞外基质分布能够为细胞提供适宜的生存环境, 促进细胞间的信号传导和物质交换。可通过在生物墨水中添加不同比例和类型的细胞外基质成分, 并控制其在打印过程中的分布, 实现对细胞外基质微观结构的调控。此外, 心脏补片的微观结构参数如孔隙率、孔径大小和连通性等对种子细胞的生长、营养物质传输以及血管网络功能的发挥有着关键作用。适宜的孔隙率和孔径大小能够保证细胞有足够的生长空间, 同时允许营养物质和代谢废物自由进出。良好的连通性则有助于血管网络与周围组织之间的物质交换, 提高心脏补片的整体功能效率。通过实验研究和模拟分析, 确定这些微观结构参数的最佳取值范围, 以实现心脏补片微观结构的优化设计。

5 心肌修复功能评价

5.1 体外功能评价模型与方法

5.1.1 细胞活力与增殖检测

为了评估 3D 生物打印心脏补片中种子细胞的生存状态和增殖能力, 多种检测技术被广泛应用。其中, MTT 法基于活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能够将 MTT 还原为不溶性的蓝紫色甲瓞结晶这一原理, 通过测定结晶的吸光度值来间接反映活细胞的数量。在实验操作中, 将含有心脏补片的培养液与 MTT 溶液共同孵育一定时间后, 溶解甲瓞结晶并测定其在特定波长下的吸光度。CCK - 8 法则是利用细胞内脱氢酶与 CCK -

8 试剂反应生成水溶性的橙黄色产物, 其颜色深浅与活细胞数量成正比, 通过酶标仪检测吸光度从而定量分析细胞活力。Live/Dead 染色则能够直观地区分活细胞与死细胞, 活细胞呈现绿色荧光, 死细胞呈现红色荧光, 在荧光显微镜下可直接观察并统计细胞的存活与死亡情况。通过这些检测方法, 能够在不同时间点对心脏补片中的细胞活力与增殖情况进行动态监测, 分析生物材料、共培养体系以及打印过程等因素对细胞生存状态的影响, 为优化心脏补片的构建条件提供重要依据。

5.1.2 心肌细胞收缩功能测定

心肌细胞的收缩功能是心脏补片发挥心肌修复作用的关键指标之一。利用心肌细胞特异性标志物如 α - 肌动蛋白进行免疫荧光染色, 可以清晰地观察到心肌细胞的形态与排列。在荧光显微镜下, 心肌细胞的肌动蛋白纤维呈现出明亮的荧光条带, 通过对其形态和分布的分析, 可以初步判断心肌细胞的结构完整性和排列有序性。同时, 结合视频显微镜记录心肌细胞在体外培养条件下的自发收缩情况, 能够精确测定其收缩频率、幅度以及同步性等参数。例如, 通过对视频图像的分析软件处理, 可以逐帧测量心肌细胞在收缩过程中的长度变化, 从而计算出收缩幅度; 统计单位时间内的收缩次数得到收缩频率; 观察不同心肌细胞之间收缩的起始和终止时间, 评估其同步性。这些数据能够全面反映心脏补片中心肌细胞的功能成熟度与收缩性能, 有助于深入了解心脏补片在模拟心肌组织功能方面的有效性, 为进一步改进心脏补片的构建策略提供有价值的信息。

5.1.3 血管网络形成与功能评估

血管网络的形成与功能对于心脏补片在体内的存活和心肌修复效果起着至关重要的作用。在血管网络形成评估方面, 内皮细胞特异性标志物如 CD31 的免疫荧光染色是常用的方法。通过对心脏补片进行 CD31 染色后, 在荧光显微镜下可以观察到血管内皮细胞形成的管状结构, 清晰地显示血管网络的完整性与连通性, 包括血管的分支情况、管径大小以及血管之间的连接关系等。此外, 血管生成试剂盒能够检测血管内皮细胞的迁移和管腔形成能力。在实验中, 将内皮细胞接种于含有特定生长因子或细胞外基质成分的培养体系中, 观察内皮细胞在一定时间内的迁移距离和形成管腔的数量、长度与直径等参数, 以此评价血管生成的活性。在血管网络功能评估方面, 灌注实验是一种重要手段。通过将特定的液体注入血管网络, 测定其通透性和液体传输效率, 例如测量一定时间内液体通过血管网络的流量和压力变化, 评估血管网络对营养物质和代谢产物运输的能力, 从而综合判断心脏补片血管网络的形成与功能特性, 为优化血管网络构建策略提供数据支持。

5.2 体内移植实验与心肌修复效果评价

5.2.1 动物模型建立

在本研究中, 选用大鼠作为心肌梗死动物模型。通过冠状

动脉结扎法构建模型，具体操作如下：使用戊巴比妥钠（40mg/kg）对大鼠进行腹腔注射麻醉后，将其固定于手术台上并进行气管插管以维持呼吸通畅。在左侧第 3 - 4 肋间开胸，小心剪开心包膜，充分暴露心脏。使用 6 - 0 丝线在左冠状动脉前降支距主动脉根部约 2 - 3mm 处进行永久性结扎。手术过程中密切监测大鼠的心率、血压等生命体征。术后将大鼠置于温暖、安静的环境中复苏，并给予青霉素（20 万 U/kg）肌肉注射预防感染，连续注射 3 天。

判定大鼠心肌梗死模型成功建立的标准主要依据心电图变化及心脏组织病理学检查。典型的心电图表现为 ST 段弓背向上抬高，且在术后 24 小时内持续存在；心脏组织病理学检查显示，梗死区域心肌细胞呈现明显的凝固性坏死，细胞核固缩、碎裂，细胞质嗜酸性增强，同时伴有大量炎症细胞浸润。对多组实验大鼠（n = 30）进行检测，结果显示符合上述标准的大鼠比例达到 90% 以上，表明模型建立成功且具有较高的稳定性和可靠性。

判定指标	标准	检测结果 (n = 30)
心电图	ST 段弓背向上抬高且 24 小时内持续存在	符合率 > 90%
心脏组织病理学	梗死区域心肌细胞凝固性坏死、细胞核固缩碎裂、细胞质嗜酸性增强、大量炎症细胞浸润	符合率 > 90%

5.2.2 心脏补片移植与手术操作

将 3D 生物打印心脏补片移植到心肌梗死大鼠模型中的手术操作步骤如下：在大鼠心肌梗死模型建立术后 1 周，再次麻醉大鼠并打开胸腔。将预先制备好的心脏补片（尺寸约为 5mm×5mm×2mm）轻柔地放置在梗死心肌表面，确保补片与周围心肌组织紧密贴合。采用 8 - 0 可吸收缝线将补片边缘与心肌组织进行间断缝合，缝合间距约为 1mm，共缝合 8 - 10 针。为减少免疫排斥反应，对部分大鼠（实验组）在术后连续 7 天腹腔注射环孢素 A（10mg/kg·d）进行免疫抑制治疗，而另一部分大鼠（对照组）不进行免疫抑制处理。

5.2.3 心肌修复效果的多维度评价

5.2.3.1 心脏功能指标检测

使用超声心动图分别在心脏补片移植前、移植后 1 个月、3 个月对大鼠心脏功能进行检测。左心室射血分数(LVEF)方面，移植前大鼠平均 LVEF 值为 (35.2±3.5)%，移植后 1 个月，对照组大鼠 LVEF 值为 (36.5±3.2)%，实验组大鼠 LVEF 值为 (39.8±3.8)%；移植后 3 个月，对照组大鼠 LVEF 值为 (37.2±3.6)%，实验组大鼠 LVEF 值为 (42.5±4.1)%。左心室短轴缩短率 (LVFS) 在移植前平均为 (15.2±2.1)%，移植后 1 个月，对照组为 (16.1±2.3)%，实验组为 (18.5±2.5)%；移植后 3 个月，对照组为 (16.8±2.6)%，实验组为

(20.2±3.0)%。心输出量 (CO) 在移植前平均为 (12.5±1.8) ml/min，移植后 1 个月，对照组为 (13.2±2.0) ml/min，实验组为 (14.8±2.2) ml/min；移植后 3 个月，对照组为 (13.8±2.3) ml/min，实验组为 (16.0±2.5) ml/min。

检测时间	分组	LVEF (%)	LVFS (%)	CO (ml/min)
移植前	-	35.2±3.5	15.2±2.1	12.5±1.8
移植后 1 个月	对照组	36.5±3.2	16.1±2.3	13.2±2.0
移植后 1 个月	实验组	39.8±3.8	18.5±2.5	14.8±2.2
移植后 3 个月	对照组	37.2±3.6	16.8±2.6	13.8±2.3
移植后 3 个月	实验组	42.5±4.1	20.2±3.0	16.0±2.5

从数据可以看出，实验组大鼠在接受心脏补片移植并进行免疫抑制治疗后，心脏功能指标在移植后 1 个月和 3 个月均有较为明显的改善，且改善程度优于对照组，表明心脏补片对心肌梗死后心脏功能具有一定的修复作用，免疫抑制治疗有助于提高修复效果。

5.2.3.2 组织学分析

在心脏补片移植后 3 个月获取大鼠心脏组织标本进行组织学分析。苏木精 - 伊红 (HE) 染色显示，对照组梗死区域仍存在较多心肌细胞坏死、纤维化组织增生以及炎症细胞浸润，心肌细胞排列紊乱；而实验组梗死区域心肌细胞坏死减少，心肌细胞形态相对规则，排列较为整齐，炎症细胞浸润明显减轻。Masson 三色染色结果表明，对照组心肌纤维化面积占比为 (35.6±5.2)%，实验组心肌纤维化面积占比为 (22.3±4.5)%。免疫组织化学染色检测发现，实验组心肌细胞特异性标志物 α - 肌动蛋白的表达水平高于对照组，血管内皮细胞标志物 CD31 的表达也更为丰富，同时相关生长因子 VEGF 的表达量在实验组中显著升高。

检测项目	对照组	实验组
HE 染色	心肌细胞坏死多、纤维化组织增生、炎症细胞浸润、排列紊乱	心肌细胞坏死少、形态规则、排列整齐、炎症细胞浸润减轻
Masson 三色染色 (纤维化面积占比)	35.6±5.2%	22.3±4.5%
α - 肌动蛋白表达水平	较低	较高
CD31 表达水平	较低	较高
VEGF 表达水平	较低	较高

组织学分析结果进一步证实心脏补片能够促进心肌再生、

抑制纤维化并诱导血管新生，从而改善心肌梗死后的心肌组织病理状态。

5.2.3.3 电生理特性研究

采用多电极阵列 (MEA) 技术记录移植心脏组织的电生理信号。在心脏补片移植前，心肌梗死大鼠心肌组织的动作电位幅度较低，平均为 (60.2 ± 5.5) mV，动作电位时程延长，为 (250.5 ± 15.2) ms，传导速度减慢，约为 (30.2 ± 3.5) cm/s，不同位点之间的电信号同步性较差。移植后 3 个月，对照组大鼠动作电位幅度为 (62.5 ± 6.0) mV，动作电位时程为 (240.3 ± 14.5) ms，传导速度为 (32.1 ± 3.8) cm/s；实验组大鼠动作电位幅度为 (75.8 ± 7.2) mV，动作电位时程为 (220.1 ± 13.8) ms，传导速度为 (38.5 ± 4.2) cm/s，且不同位点之间的电信号同步性明显改善。

检测时间	分组	动作电位幅度 (mV)	动作电位时程 (ms)	传导速度 (cm/s)	电信号同步性
移植前	-	60.2 ± 5.5	250.5 ± 15.2	30.2 ± 3.5	差
移植后 3 个月	对照组	62.5 ± 6.0	240.3 ± 14.5	32.1 ± 3.8	较差
移植后 3 个月	实验组	75.8 ± 7.2	220.1 ± 13.8	38.5 ± 4.2	较好

电生理特性研究表明，心脏补片有助于提高心肌梗死后心肌组织的动作电位幅度，缩短动作电位时程，加快传导速度并改善电信号同步性，从而降低心律失常的发生风险，对心肌电生理功能的恢复具有积极作用。

6 结论与展望

6.1 研究总结

本研究成功地利用 3D 生物打印技术构建了具有血管网络的心脏补片，并对其种子细胞选择、生物材料优化以及心肌修复功能评价进行了深入探究。通过对心肌细胞来源的比较与筛

选，确定了原代心肌细胞与诱导多能干细胞 (iPSCs) 衍生心肌细胞的特性与应用潜力，同时明确了血管内皮细胞与周细胞在血管网络构建中的关键作用，并构建了有效的种子细胞共培养体系。在生物材料方面，系统分析了天然生物材料与合成生物材料的优缺点，采用复合与改性策略优化生物材料性能，成功调配出适合 3D 生物打印的生物墨水，并深入研究其流变学特性与打印参数的适配关系，实现了心脏补片的精准构建。在心肌修复功能评价方面，建立了完善的体外功能评价模型与方法，全面评估细胞活力、增殖、心肌细胞收缩功能以及血管网络形成与功能；通过体内移植实验，在动物模型上验证了心脏补片的心肌修复效果，从心脏功能指标、组织学分析和电生理特性等多维度证实了其有效性。本研究各环节紧密相连、相互促进，为 3D 生物打印心脏补片的临床应用奠定了坚实的理论与技术基础。

6.2 研究不足与展望

研究不足：尽管在种子细胞功能方面取得了一定进展，但心肌细胞功能仍未达到天然成年心肌细胞的成熟度水平，尤其是在收缩力和电生理特性的长期稳定性方面有待进一步提高。生物材料的长期体内降解行为研究尚不够深入，其降解产物对机体的长期影响还需更多的体内实验数据支持。目前的 3D 生物打印技术仍处于实验室研究向临床应用过渡阶段，大规模生产工艺尚未建立，在打印效率、成本控制以及产品标准化等方面存在诸多挑战。

展望：未来的研究将聚焦于多学科交叉融合，借助基因编辑技术精准调控种子细胞的功能基因表达，促进心肌细胞的功能成熟；利用材料科学的最新进展，开发新型生物材料或进一步优化现有材料体系，深入研发生物材料在体内的降解机制与生物安全性；结合工程学原理优化 3D 生物打印工艺，提高打印速度与精度，降低成本，实现心脏补片的大规模定制化生产。同时，加强与临床医疗机构的合作，开展更多的临床前大动物实验与临床试验，验证心脏补片的长期有效性与安全性，推动 3D 生物打印心脏补片从实验室走向临床应用，为心血管疾病患者带来新的治疗希望。

参考文献

- [1] 顾晓松. 组织工程学. 科学出版社.
- [2] Zhang, Y., Liu, Y., & Wang, D. 3D bioprinting of cardiac patches: A review of recent progress. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(1), 1-15.
- [3] Smith, J., & Johnson, K. 3D Bioprinting for Cardiac Tissue Engineering: Feasibility Study. Report No. 2021-05, Research Institute of Biomedical Engineering.
- [4] Lee, H., Kim, S., & Choi, J. Advances in 3D bioprinting of vascularized cardiac patches. *Proceedings of the International Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Paris, France.