

文章编号: 1004-7220(2021)05-0747-04

# 人体主动脉瓣膜钙化组织的力学性质

杨贤达<sup>1</sup>, 冯文韬<sup>1</sup>, 刘 琨<sup>2</sup>, 张海波<sup>2</sup>, 姚 杰<sup>1</sup>, 冯成龙<sup>1</sup>, 王丽珍<sup>1\*</sup>, 樊瑜波<sup>1\*</sup>

(1. 北京航空航天大学 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京市生物医学工程高精尖创新中心, 生物与医学工程学院, 北京 100083; 2. 首都医科大学附属安贞医院 心外科, 北京 100029)

**摘要:**目的 采用纳米压痕测试方法, 测量人体主动脉瓣取出物的钙化组织的材料力学性能。方法 采集5名主动脉瓣狭窄患者的瓣叶取出物, 选取钙化瓣叶进行纳米压痕测试, 获得钙化组织弹性模量、硬度等材料力学参数。结果 瓣叶钙化组织的弹性模量为(15.69±3.89) GPa, 硬度为(0.59±0.15) GPa。结论 通过纳米压痕测试方法得到瓣叶钙化组织的弹性模量和硬度, 为瓣膜的生物力学研究提供实验数据参考。

**关键词:** 主动脉瓣; 瓣叶; 钙化组织; 纳米压痕; 弹性模量

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2021.05.013

## Mechanical Properties of Calcification from Human Aortic Valve

YANG Xianda<sup>1</sup>, FENG Wentao<sup>1</sup>, LIU Kun<sup>2</sup>, ZHANG Haibo<sup>2</sup>, YAO Jie<sup>1</sup>, FENG Chenglong<sup>1</sup>, WANG Lizhen<sup>1\*</sup>, FAN Yubo<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, Beijing Advanced Innovation Centre for Biomedical Engineering, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing, 100083, China; 2. Department of Cardiac Surgery, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100029, China)

**Abstract: Objective** To measure mechanical properties of calcified tissues from human aortic valve by nanoindentation test. **Methods** Leaflets from 5 patients with aortic stenosis were collected. Elastic modulus and hardness of the calcified leaflets were obtained by nanoindentation test. **Results** The elastic modulus and hardness of the calcified leaflets were (15.69±3.89) GPa and (0.59±0.15) GPa, respectively. **Conclusions** The elastic modulus and hardness of the calcified valve tissues can be obtained by nanoindentation test, which provides experimental data for biomechanical research of the valve.

**Key words:** aortic valve; leaflets; calcification; nanoindentation; elastic modulus

心脏瓣膜钙化是瓣膜退行性病变的主要成因之一, 会引起瓣膜狭窄或关闭不全, 与冠脉疾病、心肌劳损等密切相关<sup>[1-2]</sup>。重度主动脉瓣狭窄会导致

心力衰竭, 2年病死率高达50%<sup>[3]</sup>。钙化组织质地坚硬, 与周围正常的瓣叶组织的力学性质存在较大差异。钙化组织的存在会改变正常瓣叶的原有力

收稿日期: 2020-10-30; 修回日期: 2021-01-18

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFB0702500), 北京自然科学基金项目(7194287), 科技部创新人才推进计划重点领域创新团队(11421201), 国家重大科研仪器设备研制专项(11827803)

通信作者: 樊瑜波, 教授, 博士生导师, E-mail: yubofan@buaa.edu.cn; 王丽珍, 教授, 博士生导师, E-mail: lizhenwang@buaa.edu.cn

\* 为共同通信作者

学属性和开闭形态,从而影响周围的力学和流场环境,加速瓣膜老化甚至损毁,引发其他病症。目前,瓣膜钙化组织具体的力学属性尚不明确,阻碍了钙化瓣膜的生物力学研究。

因此,研究主动脉瓣膜钙化组织的力学性质具有重要意义。一方面,有助于探究心脏瓣膜的病理和生理学改变;另一方面,有利于进行后续治疗方案和植介入器械的研究,例如介入瓣放置在钙化组织中的生物力学问题。目前针对瓣膜钙化组织力学性质的研究较少,鲜有关于瓣叶钙化组织力学性质的准确数据。相关研究多采用动脉粥样硬化、腹主动脉瘤等组织的力学参数替代瓣膜钙化组织参数。Luraghi 等<sup>[4-5]</sup>和 Wang 等<sup>[6]</sup>有关瓣膜钙化的研究工作引用了动脉粥样硬化斑块的力学性能<sup>[7]</sup>,该数据并不能准确体现瓣膜钙化组织的力学性能。

瓣膜钙化组织一般呈块状,多分布于纤维层,周围呈点状分布,钙化颗粒形态各异且体积微小<sup>[8]</sup>。对于这种微小组织结构,无法采用传统的材料力学拉伸方法进行测量。纳米压痕测试技术通过计算机程序控制载荷发生连续变化,实时测量压痕深度,具有纳米级位移分辨率,可以在纳米尺度上测量材料的力学性质(弹性模量、硬度、载荷-位移曲线、断裂韧性等),适用于瓣膜钙化组织力学性能的相关研究。本文基于纳米压痕测试技术,对5名患者的钙化主动脉瓣膜取出物进行测量,得到较为准确的钙化组织材料力学性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品准备

钙化的瓣叶(见图1)取自首都医科大学附属安贞医院5名患者[年龄(56.4±5.2)岁,其中男性3名,女性2名]的损毁主动脉瓣膜取出物。经0.9%生理盐水清洗后,使用多聚甲醛进行样本固定。根据每个瓣叶的具体钙化分布进行对样本进行裁剪制备,暴露出较为完整的钙化组织。裁剪后的样本标记为1~5号,并进行进一步处理。

(1) 前固定。保持组织的固有形态和结构。首先将样本在缓冲液中冲洗2~3次,每次7 min;然后向样品中加入1%四氧化锇缓冲固定液进行后固定,4℃条件下固定3 h;最后再在缓冲液冲洗3次,每次7 min。



图1 损毁的主动脉瓣膜取出物及其钙化组织

Fig.1 Defective aortic valve and the calcification tissue

(2) 脱水。用脱水剂(酒精)把含于组织内或细胞内的水分置换出来,以避免水分流失影响后续包埋、测试等过程。用30%、50%、70%、90%、95%、100%酒精对样品进行梯度脱水,每步12 min;其中100%酒精重复2次,以保证脱水完全。

(3) 渗透。利用性质较为稳定的丙酮替换易挥发的酒精,再用树脂渗透组织。首先用丙酮置换酒精,12 min;再进行树脂渗透,室温下,在丙酮与环氧树脂比例为3:1、1:1、1:3条件下分别渗透样品3、3、12 h,最后在纯环氧树脂条件下渗透72 h。以上各步都在旋转混合仪上进行摇晃旋转,以加速渗透。

(4) 包埋与聚合。将较小尺寸的试样包埋于尺寸较大且较硬的树脂中,以便后续处理、测试过程中的固定或夹持。向纯环氧树脂中按1.5%比例加入催化剂并混匀后注入包埋模具中,摆放在包埋模具中,放入烘箱中聚合,70℃下进行24 h聚合。

(5) 机械研磨与抛光。粗糙的试样表面会干扰纳米压痕测试结果,故需要对试样进行表面处理。首先利用粗糙度为800目的砂纸将样品组织磨至钙化部位,然后利用抛光机配合抛光膏和绒布将表面打磨光滑。

经上述处理,包埋后的样本为圆柱形,直径15 mm,高度5 mm,上下表面光滑且平行。

### 1.2 纳米压痕测试

纳米压痕测试技术利用特定形状和硬度的压头压入被测材料,通过高分辨率的位移传感器和力传感器获取压头压入深度和载荷数据,通过载荷位移曲线计算出被测材料的力学性能。使用Nano Indenter G200型纳米压痕测试仪(Agilent Technologies公司,美国)。在每个样本的钙化区域选取10个点进行测试,采用静态加载位移控制模式,压头压入深度为2 μm(见图2)。

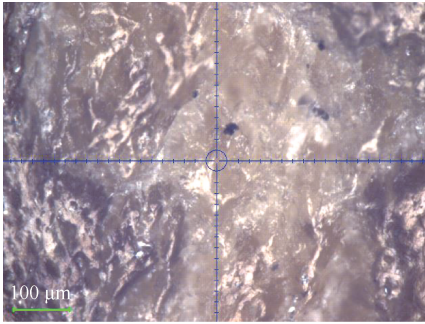


图2 纳米压痕测试环境下的钙化组织表面

Fig.2 Surface of calcification tissue during the nanoindentation test

## 2 结果

经测试,得到49个有效数据(样本4的1个测试点未得到数据)。通过SPSS 22.0软件(SPSS公司,美国)进行Shapiro-Wilk检验,所得数据符合正态分布( $P>0.05$ )。结果表明,5个样本总体弹性模量为 $(15.69\pm 3.89)$  GPa,硬度为 $(0.59\pm 0.15)$  GPa(见表1)。

表1 瓣叶钙化组织力学性能测试结果

Tab.1 Test results of mechanical properties for calcified leaflets

样本编号	弹性模量/GPa	硬度/GPa
1	10.26±1.15	0.51±0.14
2	17.82±2.17	0.62±0.08
3	12.83±1.96	0.67±0.15
4	19.91±3.60	0.67±0.12
5	15.58±2.49	0.45±0.11
总体	15.69±3.89	0.59±0.15

## 3 讨论

针对主动脉瓣膜钙化组织力学性质的研究比较有限。Wang等<sup>[6]</sup>瓣膜钙化组织相关仿真研究中所采用,弹性模量参数为10 MPa数量级,其数据来源于Holzapfel等<sup>[7]</sup>对动脉粥样硬化组织的单轴拉伸测试,该数据并不能真实表征瓣膜钙化组织的力学性能。表2列举了部分关于血管钙化组织力学性质的研究结果,由于所研究的钙化组织部位不同以及研究方法的差异,钙化组织弹性模量由2.5 MPa到22.7 GPa不等,相差10 000倍,上述研究结果均被相关钙化组织力学性能的研究工作所引用,在该领域尚未有统一的认知。瓣膜钙化组织

具有体积小、形状不规则、分散在柔软的瓣叶组织中、质地坚硬等特点,无法采用常规的力学试验机进行拉压方式的测量。结合以上研究方法,本文认为,选择纳米压痕测试方法应是现阶段最合适的测量瓣膜钙化组织力学性能的实验手段。

表2 钙化组织力学性质相关研究

Tab.2 Studies on mechanical properties of calcification tissues

研究工作	研究对象	研究方法	研究结果 (弹性模量)
Ebenstein等 <sup>[9]</sup>	动脉粥样硬化钙化组织	纳米压痕	10~20 GPa
Marra等 <sup>[10]</sup>	腹主动脉瘤钙化沉积组织	纳米压痕	22.7 GPa
Loree等 <sup>[11]</sup>	动脉粥样硬化钙化组织	单轴拉伸	2.5 MPa
Lee等 <sup>[12]</sup>	动脉粥样硬化钙化组织	未注明	1 GPa

数值仿真方法广泛应用于评价主动脉瓣膜的生物力学性能<sup>[13]</sup>。钙化组织材料属性的准确性对相关仿真研究结果具有较大影响。Ebenstein等<sup>[9]</sup>利用纳米压痕测量人体动脉粥样硬化组织中钙化组织的力学属性,结果表明,斑块组织的刚度随金属元素含量的增大而变大,并且发现Loree等<sup>[11]</sup>有限元仿真研究工作中有关钙化组织的材料属性(弹性模量为2.5 MPa)被严重低估,实际测量值(10~20 GPa)要高得多。Buffinton等<sup>[14]</sup>通过理想的冠状动脉平面-应力有限元模型研究钙化组织材料属性与仿真结果的关系,结果表明,应力集中于钙化-纤维斑块界面,并随着钙化组织弹性模量的不断增大而增大,说明钙化组织材料属性影响数值仿真结果,并进一步影响主动脉瓣膜的生物力学性能的评价与分析。钙化组织材料属性准确性对于瓣膜生物力学性能评价与分析具有重要意义。

通过探讨瓣膜钙化组织的力学性能,有助于对钙化后的瓣膜开展更加深入的生物力学研究。一方面,建立更为准确的钙化瓣膜模型,进行相关数值仿真分析。瓣膜组织硬化会改变该位置的生物力学特征,影响后续球囊扩张或者介入瓣置换术等针对主动脉瓣膜疾病的介入治疗<sup>[15]</sup>。准确的钙化瓣膜模型不仅可以促进优化介入瓣的相关设计及其治疗手段,还可以进一步应用到瓣中瓣的设计及治疗方案的优化。另一方面,有利于研究钙化后瓣膜的生物力学表现。相关研究表明,钙化组织与周边组织力学性质的显著性差异会造成应力集中,力学破坏发生的风险变大<sup>[11,16]</sup>。瓣膜上较硬的钙化

组织与周围瓣叶等组织较大的力学性能差异会造成应力集中,进而增大瓣膜损毁的风险。瓣叶钙化是瓣膜结构性损毁的主要原因之一,会导致材料硬化,引起尖部破裂。准确的钙化组织力学性能有助于分析钙化瓣膜的损毁机制,为钙化瓣膜的临床研究提供生物力学参考。

#### 4 结论与展望

本文对人体主动脉瓣瓣叶钙化组织的力学性质进行测量,得到弹性模量和硬度等力学参数,为心脏瓣膜生物力学及病理生理学方面的研究提供实验基础,对主动脉瓣膜钙化相关的数值仿真和实验研究提供较为准确的材料属性参考。

钙化组织的成分影响其力学性质,其刚性会随金属元素含量的增加而增大,后续研究中应根据钙化组织的成分进行分类,再分别进行测量。钙化组织的尺寸也会影响测量结果,较小尺寸钙化组织可能受周围组织的影响,会对测量结果产生干扰。因此,选取研究样本时应注意样本尺寸的筛选,并对含有较小尺寸钙化组织的样本采用相关适用的方法进行研究。纳米压痕测量技术对样本表面处理的要求较高,后续研究中应提升表面处理工艺以满足测试要求,避免增大测量结果误差。同时,应增大样本量,考虑固定处理对实验结果的影响,促使实验结果更加稳定、准确,并进一步总结钙化组织力学性能的深层规律,得到更加丰富、翔实、系统性的结论。

#### 参考文献:

- [ 1 ] KIM IY, KIM MJ, LEE DW, *et al.* Cardiac valve calcification is associated with presence and severity of coronary artery disease in patients with pre-dialysis chronic kidney disease [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2015, 19(6): 1090-1097.
- [ 2 ] CHEN ZW, YANG HB, CHEN YH, *et al.* The influence of aortic valve calcification on the risk of periprocedural myocardial injury after elective coronary intervention [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2015, 27(5): 631-636.
- [ 3 ] OTTO CM, PRENDERGAST B. Aortic-valve stenosis: From patients at risk to severe valve obstruction [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(8): 744-756.
- [ 4 ] LURAGHI G, MIGLIAVACCA F, GARCIA-GONZALEZ A, *et al.* On the modeling of patient-specific transcatheter aortic valve replacement: A fluid-structure interaction approach [J]. *Cardiovasc Eng Technol*, 2019, 10(3): 437-455.
- [ 5 ] LURAGHI G, MATAS JFR, BERETTA M, *et al.* The impact of calcification patterns in transcatheter aortic valve performance: A fluid-structure interaction analysis [J]. *Comput Methods Biomech Biomed Eng*, 2021; 24(4): 375-383.
- [ 6 ] WANG Q, KODALI S, PRIMIANO C, *et al.* Simulations of transcatheter aortic valve implantation: Implications for aortic root rupture [J]. *Biomech Model Mechan*, 2015, 14(1): 29-38.
- [ 7 ] HOLZAPFEL GA, SOMMER G, REGITNIG P. Anisotropic mechanical properties of tissue components in human atherosclerotic plaques [J]. *J Biomech Eng-T Asme*, 2004, 126(5): 657-665.
- [ 8 ] LI Y, WANG X, ZHU MQ, *et al.* Mineralogical characterization of calcification in cardiovascular aortic atherosclerotic plaque: A case study [J]. *Miner Mag*, 2014, 78(4): 775-786.
- [ 9 ] EBENSTEIN DM, COUGHLIN D, CHAPMAN J, *et al.* Nanomechanical properties of calcification, fibrous tissue, and hematoma from atherosclerotic plaques [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(4): 1028-1037.
- [ 10 ] MARRA SP, DAGHLIAN CP, FILLINGER MF, *et al.* Elemental composition, morphology and mechanical properties of calcified deposits obtained from abdominal aortic aneurysms [J]. *Acta Biomater*, 2006, 2(5): 515-520.
- [ 11 ] LOREE HM, GRODZINSKY AJ, PARK SY, *et al.* Static circumferential tangential modulus of human atherosclerotic tissue [J]. *J Biomech*, 1994, 27(2): 195-204.
- [ 12 ] LEE RT, LOREE HM, CHENG GC, *et al.* Computational structural analysis based on intravascular ultrasound imaging before *in vitro* angioplasty: Prediction of plaque fracture locations [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 21(3): 777-782.
- [ 13 ] 刘铨铨, 金昌, 冯文韬, 等. 不同钙化模式对经导管主动脉瓣膜植入效果影响的数值模拟研究 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(6): 506-512.
- [ 14 ] LIU RH, JIN C, FENG WT, *et al.* The impact of different aortic valve calcification patterns on the outcome of transcatheter aortic valve implantation: A numerical simulation study [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(6): 506-512.
- [ 15 ] BUFFINTON CM, EBENSTEIN DM. Effect of calcification modulus and geometry on stress in models of calcified atherosclerotic plaque [J]. *Cardiovasc Eng Technol*, 2014, 5(3): 244-260.
- [ 16 ] FENG WT, YANG XD, LIU Y, *et al.* An *in vitro* feasibility study of the influence of configurations and leaflet thickness on the hydrodynamics of deformed transcatheter aortic valve [J]. *Artif Organs*, 2017, 41(8): 735-743.
- [ 17 ] HOSHINO T, CHOW LA, HSU JJ, *et al.* Mechanical stress analysis of a rigid inclusion in distensible material: A model of atherosclerotic calcification and plaque vulnerability [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(2): H802-H810.