

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407001



超临界 CO₂ 流体技术制备脱细胞外 基质材料及其生物学应用

吴冰, 段又愈, 陈爱政

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 脱细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)材料在组织工程和再生医学中具有重要应用,超临界 CO₂ 流体(supercritical CO₂ fluid, SCF-CO₂)技术已被证明可用于 dECM 材料的制备。文中综述了 SCF-CO₂ 的基本原理、SCF-CO₂ 脱细胞及其灭菌机制,介绍了辅助溶剂的使用与预处理技术对 SCF-CO₂ 脱细胞的影响,以及 dECM 材料的生物学应用。结果表明:与常规方法相比,具有高渗透性、高扩散性的 SCF-CO₂ 能更有效地保持细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的结构完整性和生物活性,同时展现出高效灭菌的优势,且制备的 dECM 材料在组织修复和再生医学领域具有显著应用潜力。

关键词: 超临界 CO₂ 流体;脱细胞外基质;超临界灭菌;组织工程

中图分类号: R 318

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0551-08

Supercritical CO₂ Fluid Technology-Assisted Fabrication of Decellularized Extracellular Matrix Materials and Biomedical Applications

WU Bing, DUAN Youyu, CHEN Aizheng

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Decellularized extracellular matrix (dECM) materials play a significant role in tissue engineering and regenerative medicine. Supercritical CO₂ fluid (SCF-CO₂) technology has been proven to be applicable in the preparation of dECM materials. By reviewing relevant literature in recent years, this paper summarizes the basic principles of SCF-CO₂, the mechanisms of decellularization and sterilization by SCF-CO₂, and discusses the impact of auxiliary solvents and pretreatment techniques on SCF-CO₂-assisted decellularization, as well as the biomedical applications of dECM materials. The results show that, compared with conventional methods, SCF-CO₂ with high permeability and high diffusivity could maintain the structural integrity and biological activity of extracellular matrix (ECM) more effectively and show the advantage of high sterilization efficiency. Moreover, the prepared dECM materials have significant potential for application in the field of tissue repair and regenerative medicine.

Keywords: supercritical carbon dioxide fluid; decellularized extracellular matrix; supercritical sterilization; tissue engineering

收稿日期: 2024-07-01

通信作者: 陈爱政(1978-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事超临界流体技术、生物材料与组织工程的研究。E-mail: azchen@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(32271410)

生物材料在组织工程与再生医学领域发挥着重要作用,具有巨大的临床应用前景。随着生物医学工程技术的快速发展,脱细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)材料因其独特的生物相容性、低免疫原性和生物活性,在再生医学、组织工程和药物递送等领域展现出巨大的应用潜力。dECM材料通过去除具有免疫原性的细胞成分、同时保留天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分和结构以兼具生物相容性和生物活性。然而,传统的脱细胞方法,如使用极性洗涤剂或强酸强碱溶液,可能会导致多糖的损失和蛋白质结构的改变;使用生物酶会因浓度过高或作用时间过长破坏生物活性物质且成本高昂。

超临界 CO₂ 流体(supercritical CO₂ fluid, SCF-CO₂)技术利用 CO₂ 在超临界状态下的高渗透性、高扩散性和对极性组分(如蛋白质和多糖)的低反应性,有效地防止了在组织提取过程中生物分子的变性,从而最大限度地保留了 ECM 的天然成分和结构,因此成为一种可能的脱细胞方法^[1]。此外,温和、绿色的 SCF-CO₂ 在 dECM 材料的灭菌中也展现出了独特的优势。本文综述了 SCF-CO₂ 的基本原理、SCF-CO₂ 脱细胞及其灭菌机制,介绍了辅助溶剂的使用与预处理技术对 SCF-CO₂ 脱细胞的影响,以及 dECM 材料的生物医学应用。

1 SCF-CO₂ 概述

超临界流体技术是一种利用物质在超临界状态下的特殊性质进行材料加工和化学合成的技术。当一种特定物质的温度和压力达到其临界点之上时,如果对该气体状态的物质施加压力,它不会转变为液态,只是密度会增加,展现出类似液体的特性,同时仍然保持气体的一些性质,这种介于两者之间的一种特殊流体状态被称为超临界流体状态^[2]。超临界流体技术可以使用多种不同的流体作为溶剂,如水、甲醇、乙醇、丙烷和二氧化碳等,每种流体都有其独特的物理和化学性质,适用于不同的应用。其中,二氧化碳是最常用的超临界流体,因为它达到超临界状态的条件相对温和(临界温度约为 31.3 °C,临界压力约为 7.38 MPa),且对环境友好,具有较低的粘度、较高的扩散性以及很好的溶解能力。

SCF-CO₂ 因其独特的物理和化学特性,在材料加工领域有着广泛的应用,主要包括 SCF-CO₂ 萃取、SCF-CO₂ 造粒、SCF-CO₂ 发泡三个方面。SCF-CO₂ 萃取技术是一种利用 SCF-CO₂ 为萃取剂,从液体或固体中萃取出特定成分的技术^[3]。SCF-CO₂ 萃取在接近室温的条件下操作,可以最大限度地保留食品的原有风味和营养成分,因此被广泛应用于在食品工业提取香料、油脂和色素等成分^[4]。在医药与化妆品工业中,SCF-CO₂ 萃取技术被用于提取药物有效成分,可以保证产品的纯天然性和无化学污染。SCF-CO₂ 造粒技术是将溶质溶解于超临界流体中,通过特制的喷嘴进行快速降压膨胀,使溶质瞬间形成大量的晶核并生长成微粒,从而制备出粒度均匀、分布狭窄的超细微粒^[5],广泛应用于材料科学和生物医药领域制备高性能超细微粒材料和药物微纳米颗粒。SCF-CO₂ 发泡技术利用超临界流体的溶解和膨胀性质,在材料内部形成均匀分布的气泡结构,以制备出轻质、高强度的发泡材料^[6],适宜于建筑材料和汽车工业领域制备轻质、隔热、隔音的发泡板材,轻量化、高性能的发泡零部件等,以及在生物医药领域制备具有良好生物相容性的多孔支架,可用于组织工程和再生医学^[7]。

近年来,在生物医学领域,SCF-CO₂ 因其低粘度和高扩散性被广泛地用于 dECM 材料的制备,可以有效去除具有免疫原性的细胞成分并最大限度保留其生物活性成分。与传统的化学洗涤剂相比,SCF-CO₂ 的使用能够减少对 ECM 成分的伤害,并且有效避免因洗涤剂残留引起的细胞毒性。此外,SCF-CO₂ 也因其独特的物理和化学性质,在 dECM 材料的灭菌中也展现出了显著优势^[8]。

2 SCF-CO₂ 在 dECM 材料中的应用

SCF-CO₂ 制备 dECM 材料及其生物医学应用,如图 1 所示。

2.1 SCF-CO₂ 用于脱细胞

dECM 作为一种新兴的生物材料,近年来在组织工程和再生医学领域受到了广泛关注。dECM 是通过去除组织或器官中的细胞成分,保留其 ECM 的结构和成分得到的。dECM 材料的来源广泛,包括皮肤、心脏、血管、骨骼、软骨等多种组织和器官。这些组织和器官经过脱细胞处理后,可得到富含胶原

蛋白、糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs)、生长因子等生物活性物质的 dECM^[9], 对于细胞的增殖、迁移、黏附和分化具有重要影响, 为组织工程和再生医学提供了理想的生物材料。

传统上, 动物组织的脱细胞过程涉及物理、化学和生物方法的多种组合, 如使用酸碱溶剂、洗涤剂、生物酶处理或通过反复冻融来实现^[10]。然而, 在这些脱细胞方法中, 为防止因化学试剂引起 ECM 成分的损失降解是一个挑战。ECM 中的一些关键物质, 例如糖蛋白和生长因子, 对于组织再生至关重要, 但它们可能会因洗涤剂的表面活性作用而变性或被移除。SCF-CO₂ 作为一种温和的处理方法, 可以在较低的温度和压力下有效地去除细胞成分, 同时避免对 ECM 结构的破坏。如图 2 所示, SCF-CO₂ 渗透扩散至原始组织细胞内, 将细胞胀大破裂使细胞内内容物流出, 留下 ECM 成分与结构。

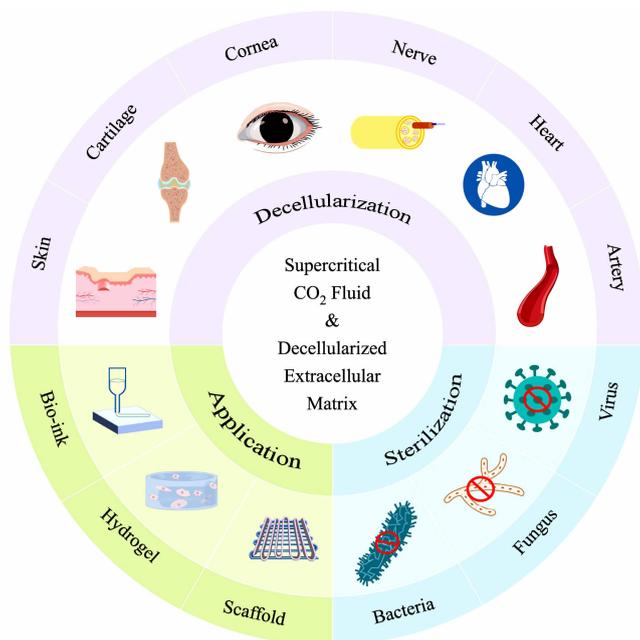


图 1 SCF-CO₂ 制备 dECM 材料及其生物医学应用

Fig. 1 SCF-CO₂-assisted fabrication of dECM materials and biomedical applications

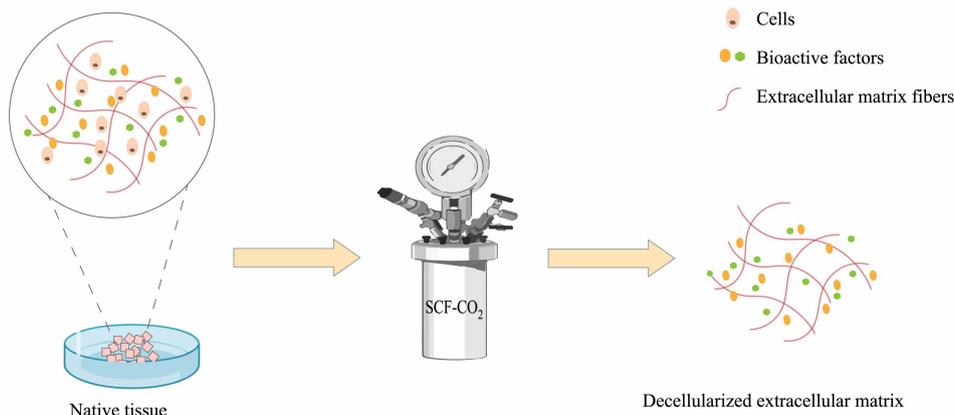


图 2 SCF-CO₂ 脱细胞示意图

Fig. 2 Schematic diagram of SCF-CO₂ decellularization

基于 SCF-CO₂ 制备的 dECM 材料具有优异的生物相容性、低免疫原性和生物活性, 在组织工程、再生医学和药物递送等领域具有广泛的应用前景^[11]。CO₂ 分子是非极性的, 但在超临界状态下, 其溶剂特性可以发生变化, 如 SCF-CO₂ 能够溶解一些通常难溶于非极性溶剂的极性物质^[12]。SCF-CO₂ 通过渗透进入组织, 利用其溶解能力将细胞内的部分成分溶解, 从而实现细胞内内容物的去除。此外, SCF-CO₂ 可以增加细胞膜的流动性, 加速细胞膜破裂, 释放细胞内容物, 进一步促进脱细胞过程。

由于不涉及化学试剂的使用, SCF-CO₂ 脱细胞在去除 DNA 的同时可以较大程度地保留 ECM, 相较于传统的脱细胞方法展现出了明显的优势。SCF-CO₂ 脱细胞技术是一种绿色高效的脱细胞方法, 然而, SCF-CO₂ 本身可能不足以完全去除组织中的所有细胞成分, 特别是当组织结构复杂或细胞间连接紧密时^[13]。因此, 研究通过引入辅助溶剂和优化预处理步骤等方法, 可以进一步提升 SCF-CO₂ 脱细胞的效率。

2008 年, Sawada 等^[14] 首次尝试使用 SCF-CO₂ 进行猪主动脉的脱细胞。但是单独使用 SCF-CO₂

不能完全去除细胞核,而添加乙醇作为辅助溶剂后可以成功地从主动脉彻底去除细胞核。辅助溶剂的作用机制是通过与 SCF-CO₂ 混合,降低其表面张力,增加其溶解极性分子的能力。这些溶剂可以是极性小分子、表面活性剂或酶,它们能够与细胞膜相互作用,削弱细胞间的连接,从而促进细胞的分离和去除。例如,表面活性剂可以降低细胞膜的稳定性,使得 SCF-CO₂ 更容易渗透进入细胞并去除细胞成分。

在一项软骨组织的脱细胞研究中^[15],以乙醇为助溶剂使用 SCF-CO₂ 进行脱细胞处理,不仅成功去除了 DNA,而且在 dECM 中培养的软骨细胞,其 COL-II 和聚集蛋白的基因表达水平有所增加,表明细胞在培养过程中保持了较高的活性。此外,将上述软骨 dECM 材料应用于软骨缺损的体内实验,观察到植入的 dECM 材料与周围的天然组织实现了良好的整合。在 Anton 团队的研究中,通过使用亲 CO₂ 洗涤剂(Ls-54)与 SCF-CO₂ 共溶剂成功进行了软骨、肌腱和皮肤的脱细胞^[16]。

另外,使用辅助溶剂的另一个重要考虑是它们的生物相容性和环境影响。理想的辅助溶剂应该具有良好的生物相容性,不会对后续的细胞培养或组织工程应用产生负面影响。此外,考虑到成本和环境可持续性,辅助溶剂的回收和再利用也是重要的考量因素。尽管使用辅助溶剂可以显著提高 SCF-CO₂ 脱细胞的效率,但仍存在一些问题和限制,如当组织结构致密时,即使使用辅助溶剂也需要较长的处理时间,且某些辅助溶剂可能难以从最终产品中完全去除。因此,研究人员需要不断探索优化脱细胞过程,以实现更高效、经济的脱细胞技术。

为了使 SCF-CO₂ 和辅助溶剂能够更好地通过渗透和溶解作用将细胞成分从 ECM 中分离出来,选择合适的预处理方法是关键的一步^[13]。预处理的目的是使组织更易于 SCF-CO₂ 处理,从而提高脱细胞效率并减少对 ECM 成分的损害。常见的预处理方法主要包括物理处理和化学处理两种方式。

物理预处理技术包括冻融循环、机械搅拌或压力处理。冻融循环通过冷冻和融化的过程破坏细胞膜,释放细胞内容物,为 SCF-CO₂ 的渗透创造通道;机械搅拌通过物理方式促进 SCF-CO₂ 与组织接触,加速细胞成分的去除;压力处理通过改变细胞的结构完整性,帮助 SCF-CO₂ 更深入地渗透到组织内部。

化学预处理通常涉及使用低浓度的表面活性剂或酶,低浓度的非离子表面活性剂(如 Triton X-100)可以轻微破坏细胞膜,有助于 SCF-CO₂ 的渗透和细胞内容物的去除;特定的酶,如胶原酶或透明质酸酶,可以特异性地分解 ECM 中的某些成分,促进细胞内容物的分离和去除。要注意的是,酶处理需要精确控制用量,以避免过度破坏 ECM。

联合预处理方法结合了物理和化学处理的优势,通过相互补充提高脱细胞效率,同时减少对 ECM 的损害。例如,可以先使用冻融循环或机械搅拌破坏细胞结构,再使用低浓度的化学试剂进一步促进细胞的去除。预处理条件的优化同样重要,需要根据具体的组织类型和所需的 ECM 特性进行调整。这包括确定最佳的冻融循环次数,机械搅拌的强度、时间和压力处理的参数,以及化学试剂的浓度和处理时间等。SCF-CO₂ 应用于脱细胞的研究结果,如表 1 所示。

表 1 SCF-CO₂ 用于脱细胞
Tab. 1 SCF-CO₂-assisted decellularization

组织来源	溶剂组成	处理时间/h	压力/MPa	温度/℃	预处理	参考文献
软骨(猪)	75%乙醇,CO ₂	0.6	10.00~35.00	30~50	—	[15]
神经(猪)	无水乙醇,CO ₂	3.0	20.00~40.00	37	—	[16]
肌腱(马)	CO ₂ ,Ls-54	1.0	25.00	37	—	[17]
皮肤(人)	CO ₂ ,Ls-54	1.0	25.00	37	1 mol·L ⁻¹ NaCl	[17]
软骨(牛)	CO ₂ ,Ls-54	1.0	25.00	37	冻融循环,高渗溶液,0.05%胰蛋白酶	[17]
心肌(牛)	70%乙醇,CO ₂	1.0	17.24	37	5次冻融循环,1.5 mol·L ⁻¹ NaCl	[18]
视神经(牛)	70%乙醇,CO ₂	4.0	7.39	37	1次冻融循环,0.5% EDTA	[18]
角膜(牛)	70%乙醇,CO ₂	1.0	17.25,31.03	37	生理盐水	[19]
主动脉(羊)	95%乙醇,CO ₂	1.0	10.00,15.00, 25.00	37	1 mol·L ⁻¹ NaOH, 0.8 mol·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ ,0.5% SDS	[20]
脂肪组织(猪)	CO ₂	0.5	10.00~30.00	30~40	0.05%胰蛋白酶-EDTA, 0.032 mol·L ⁻¹ 脱氧胆酸钠	[21]
主动脉(猪)	CO ₂ ,Ls-54, 水,无水乙醇	1.0	10.30,27.60	10~37	0.1% SDS,0.2 mg·mL ⁻¹ DNase, 0.02 mg·mL ⁻¹ RNase	[22]

2.2 SCF-CO₂ 用于灭菌

对于 dECM 材料的临床转化和实施,除了成功制备以外,还必须包括有效的灭菌方法。在材料植入体内之前,最关键的步骤是确保其经过彻底的灭菌处理,以避免因植入物引起的感染和免疫反应,从而提高植入的成功率及安全性。选择灭菌技术必须综合考虑脱细胞组织移植物的尺寸、复杂性,以及对结构完整性和 ECM 的影响。

常用的灭菌技术包括 γ 辐照、电子辐照及环氧乙烷(ETO)处理。 γ 辐照是一种冷过程,使用放射性同位素钴 60 作为辐射源,可以在无需额外处理的情况下对湿物料进行灭菌,适合于热敏感的生物材料。然而,辐照过程可能会对 ECM 的胶原蛋白网络造成一定程度的损害^[23]。电子辐照也是一种冷杀菌工艺,使用电子加速器作为辐射源,与伽马辐照相似,能够有效破坏微生物 DNA,但同样也可能对 ECM 造成损伤。ETO 是一种烷基化剂,将材料暴露于 ETO 气体中能够通过破坏 DNA 来阻止微生物的复制,但由于其在材料中的渗透性有限,仅能作用于材料表面,可能需要额外的步骤以确保完全灭菌^[24]。

1951 年,Fraser 首次报告 SCF-CO₂ 作为一种灭菌方法^[25]。在后来研究中,SCF-CO₂ 杀菌作用被大量的文献证明,并广泛应用于食品、医疗等领域中。SCF-CO₂ 是一种具有化学惰性、易获得、溶解能力高、粘度低以及高扩散系数等物理化学性质的物质,能够不受多孔隙及结构较复杂材料的影响,穿透材料后可作用在病原微生物上,对细菌、酵母菌、霉菌、病毒等微生物具有很好的杀灭能力^[26]。

多年来,一些研究人员一直致力于了解 SCF-CO₂ 灭菌作用背后的机制。根据 Garcia-Gonzalez 等^[27]的假设,SCF-CO₂ 灭菌涉及 H₂CO₃ 的形成和解离,扩散进细胞膜内后会增加膜的流动性与通透性;同时,也会使细胞内的 pH 值降低,导致关键酶的失活、细胞代谢受抑制,最终导致细胞平衡紊乱、细胞成分流失,实现灭菌效果。SCF-CO₂ 灭菌过程,如图 3 所示

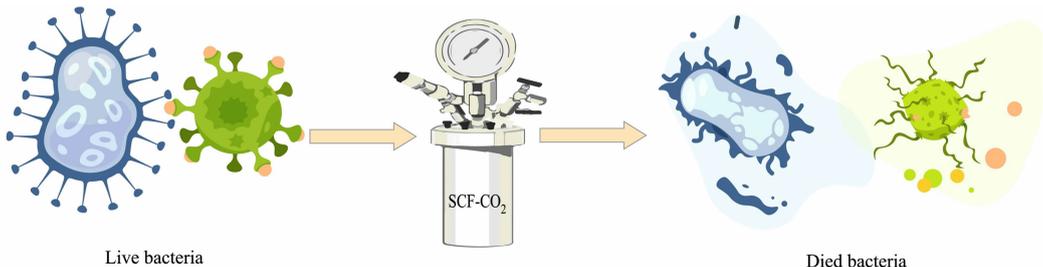


图 3 SCF-CO₂ 灭菌示意图

Fig. 3 Schematic diagram of SCF-CO₂ sterilization

因此,SCF-CO₂ 为脱细胞外基质材料的灭菌提供了一种非热、非化学的方法。但在大部分情况下,SCF-CO₂ 本身不足以使全部的病原体灭活,所以 SCF-CO₂ 可以与抗菌剂、氧化剂等辅助剂结合使用,进一步提高灭菌效果和效率^[28]。有研究显示,添加低剂量过氧乙酸的 SCF-CO₂ 处理可有效灭活细菌,同时保持生物力学性能,这创造了在一个步骤过程中整合脱细胞和灭菌的可能性,从而提高了效率。

de Wit 等^[8]采取三种方法对使用 SCF-CO₂ 制备的猪气管脱细胞支架材料进行灭菌,分别是 NaOH 清洗后 γ 射线照射灭菌、仅有 γ 射线照射灭菌,以及 SCF-CO₂ 配合低剂量过氧乙酸灭菌。研究结果显示,与 γ 射线灭菌相比,用 SCF-CO₂ 灭菌后支架材料的功能结果更接近于原始气管。

在 Ryan 等^[29]的研究中比较了 SCF-CO₂、电解水、 γ 射线、乙醇-过氧乙酸和过氧化氢方法对脱细胞猪心脏主动脉瓣无菌性和机械完整性的影响。通过组织学、微生物培养和电子显微镜分析,发现乙醇-过氧乙酸和 SCF-CO₂ 处理的瓣膜是无菌的,而且 SCF-CO₂ 处理的瓣膜尖端拉伸性能高于其他技术处理的瓣膜,且在用 SCF-CO₂ 灭菌处理的脱细胞瓣膜中发现了优异的无菌性和完整性。

综上所述,SCF-CO₂ 为 dECM 材料提供了一种理想的灭菌方法。

3 dECM 材料的生物医学应用

3.1 3D 打印

在 3D 生物打印领域,dECM 溶液可以通过改变温度和离子浓度形成固态作为生物墨水,为细胞生长、迁移和分化提供理想的支持环境,为构建具有生物活性的组织或器官提供了可能^[30]。通过将

dECM 与其他生物材料或细胞结合,可以打印出与原生组织相似的结构,为组织工程和再生医学提供了新的解决方案。Daniel 等^[31]的工作中突出了基于 SCF-CO₂ 来提取由不同细胞类型(人真皮成纤维细胞、脂肪干细胞)组成的细胞片的 ECM 成分,用于制备 dECM 生物墨水的优势,并开拓了 dECM 生物墨水在打印组织样结构开发中的前景。

3.2 水凝胶

dECM 水凝胶的形成是一种基于胶原蛋白的自组装过程,同时受到其他的蛋白成分、GAGs 以及蛋白多糖的影响。dECM 干燥粉末经胃蛋白酶消化后,通过调节 pH 值、盐离子浓度与温度以诱导形成凝胶。dECM 水凝胶结合了 dECM 的生物活性和水凝胶的吸水性,具有模拟生理基质环境,促进细胞粘附、浸润和增殖的能力^[32]。在皮肤创面修复、软骨再生等领域,dECM 水凝胶能够作为伤口敷料或细胞载体,加速组织的修复和再生,从而促进细胞的增殖和分化。Seo 等^[1]开发了一种使用 SCF-CO₂-乙醇共溶剂系统代替洗涤剂处理方法的心脏组织脱细胞方法,所制备的心脏 dECM 水凝胶有效促进了血管生成。

3.3 组织工程支架

dECM 材料还可作为组织工程支架,能够支持细胞的粘附和增殖,为细胞的生长和组织的形成提供模板^[33]。在骨缺损修复、神经修复再生等领域中,dECM 生物支架已被广泛应用。超临界脱细胞过程可以能够保持动物组织原有的三维结构,有效去除组织内的抗原性细胞和遗传物质。因此,采用 SCF-CO₂ 进行脱细胞的多种组织已被广泛应用于组织工程支架,以促进受损部位的修复再生。

Wang 等^[34]报道了一种用 SCF-CO₂ 技术从猪皮中制备脱细胞真皮基质的方法,实验结果显示 4 cm×3 cm 的全层创面经 dECM 处理后,创面缺损未出现组织学类型的异常纤维化或细胞团簇。有研究表示,SCF-CO₂ 处理后的脱细胞组织也可用于角膜移植实验。即使在猪与兔的异种移植实验中,移植的 SCF-CO₂ 脱细胞组织也没有表现出任何细胞毒性或炎症反应。经过板层角膜移植术,将眼睛的基质部位移除并用植入物代替,观察到脱细胞组织和原生眼组织完全融合,脱细胞组织被角质形成细胞浸润,未观察到免疫细胞识别和分化^[35]。此外,使用 SCF-CO₂ 对神经组织进行脱细胞,能更有效地保留神经组织中的 ECM 成分,植入后能够为轴突提供物理引导和化学信号,促进受损神经的再生和修复。Kim 等^[21]的研究表明,基于 SCF-CO₂ 的方法比传统的化学脱细胞能够更好地保存 ECM 成分和机械性能,以及更好地促进细胞反应。

4 结论与展望

综上所述,SCF-CO₂ 因其独特的物理和化学性质,如高渗透性、高扩散性以及绿色高效等特点,在 dECM 材料的制备过程中发挥了至关重要的作用。深入了解 SCF-CO₂ 脱细胞和灭菌原理,不仅能够更好地掌握其在 dECM 材料制备中的核心作用机制,还有助于进一步优化 SCF-CO₂ 的应用工艺,这对于对提高 dECM 材料的制备效率、降低生产成本,以及促进 dECM 材料的产品开发、临床应用与产业化具有重要意义。

参考文献:

- [1] SEO Y, JUNG Y, KIM S H. Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 67: 270-281. DOI: 10. 1016/j. actbio. 2017. 11. 046.
- [2] COUNSELL J F, EVERETT D H. Nature of fluids in the hypercritical region[J]. *Nature*, 1960, 188(4750): 576-577. DOI: 10. 1038/188576a0.
- [3] YOUSEFI M, RAHIMI NASRABADI M, POURMORTAZAVI S M, *et al.* Supercritical fluid extraction of essential oils[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 118: 182-193. DOI: 10. 1016/j. trac. 2019. 05. 038.
- [4] 吕东灿, 刘运权, 王夺, 等. 生物油萃取分离技术的研究进展[J]. *化工进展*, 2012, 31(7): 1425-1431. DOI: 10. 16085/j. issn. 1000-6613. 2012. 07. 025.
- [5] FRANCO P, DE MARCO I. Nanoparticles and nanocrystals by supercritical CO₂-assisted techniques for pharmaceutical applications: a review[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(4): 1476. DOI: 10. 3390/app11041476.

- [6] DONG Mengyao, WANG Gang, ZHANG Xiangning, et al. An overview of polymer foaming assisted by supercritical fluid[J]. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2023, 6(6): 207. DOI: 10.1007/s42114-023-00790-6.
- [7] KANKALA R K, ZHANG Y S, WANG Shibin, et al. Supercritical fluid technology: An emphasis on drug delivery and related biomedical applications[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(16): 1700433. DOI: 10.1002/adhm.201700433.
- [8] DE WIT R J J, VAN DIS D J, BERTRAND M E, et al. Scaffold-based tissue engineering: Supercritical carbon dioxide as an alternative method for decellularization and sterilization of dense materials[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 155: 323-332. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.11.028.
- [9] BEJLERI D, DAVIS M E. Decellularized extracellular matrix materials for cardiac repair and regeneration[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(5): 1801217. DOI: 10.1002/adhm.201801217.
- [10] YAO Qing, ZHENG Yawen, LAN Qinghua, et al. Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 104: 109942. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109942.
- [11] KIM B S, KIM J U, LEE J W, et al. Comparative analysis of supercritical fluid-based and chemical-based decellularization techniques for nerve tissue regeneration[J]. *Biomaterials Science*, 2024, 12(7): 1847-1863. DOI: 10.1039/D3BM02072J.
- [12] KANG Xing, MAO Lihao, SHI Jinwen, et al. Supercritical carbon dioxide systems for sustainable and efficient dissolution of solutes; a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2024, 22(2): 815-839. DOI: 10.1007/s10311-023-01681-4.
- [13] CHASCHIN I S, BRITIKOV D V, KHUGAEV G A, et al. Decellularization of the human donor aortic conduit by a new hybrid treatment in a multicomponent system with supercritical CO₂ and Tween 80[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2022, 180: 105452. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105452.
- [14] SAWADA K, TERADA D, YAMAOKA T, et al. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, 83(6): 943-949. DOI: 10.1002/jctb.1899.
- [15] CHEN Yiting, LEE H S, HSIEH D J, et al. 3D composite engineered using supercritical CO₂ decellularized porcine cartilage scaffold, chondrocytes, and PRP: Role in articular cartilage regeneration[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2021, 15(2): 163-175. DOI: 10.1002/term.3162.
- [16] KIM B S, KIM J U, LEE J W, et al. Comparative analysis of supercritical fluid-based and chemical-based decellularization techniques for nerve tissue regeneration[J]. *Biomaterials Science*, 2024, 12(7): 1847-1863. DOI: 10.1039/D3BM02072J.
- [17] ANTONS J, MARASCIO M G M, AEBERHARD P, et al. Decellularised tissues obtained by a CO₂-philic detergent and supercritical CO₂[J]. *European Cells and Materials*, 2018, 36: 81-95. DOI: 10.22203/eCM.v036a07.
- [18] TOPUZ B, GÜNAL G, GULER S, et al. Chapter 4 - Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization [M]// CABALLERO D, KUNDU S C, REIS R L. *Methods in Cell Biology*. Academic Press. 2020: 49-79. DOI: 10.1016/bs.mcb.2019.10.012.
- [19] GULER S, ASLAN B, HOSSEINIAN P, et al. Supercritical carbon dioxide-assisted decellularization of aorta and cornea[J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2017, 23(9): 540-547. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0090.
- [20] GAFAROVA E R, GREBENIK E A, LAZHKO A E, et al. Evaluation of supercritical CO₂-assisted protocols in a model of ovine aortic root decellularization[J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3923. DOI: 10.3390/molecules25173923.
- [21] CHUNG S, KWON H, KIM N P. Supercritical extraction of decellularized extracellular matrix from porcine adipose tissue as regeneration therapeutics[J]. *Journal of Cosmetic Medicine*, 2019, 3(2): 86-93. DOI: 10.25056/JCM.2019.3.2.86.
- [22] CASALI D M, HANDLETON R M, SHAZLY T, et al. A novel supercritical CO₂-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2018, 131: 72-81. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.07.021.
- [23] AFFATATO S, BORDINI B, FAGNANO C, et al. Effects of the sterilisation method on the wear of UHMWPE acetabular cups tested in a hip joint simulator[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(6): 1439-1446. DOI: 10.1016/s0142-9612(01)00265-4.
- [24] MENDES G, BRANDÃO T, SILVA C. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review[J]. *American Jour-*

- nal of Infection Control, 2007, 35(9): 574-581. DOI: 10.1016/j.ajic.2006.10.014.
- [25] FRASER D. Bursting bacteria by release of gas pressure[J]. Nature, 1951, 167(4236): 33-34. DOI: 10.1038/167033b0.
- [26] ZHANG Jian, DAVIS T A, MATTHEWS M A, *et al.* Sterilization using high-pressure carbon dioxide[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38(3): 354-372. DOI: 10.1016/j.supflu.2005.05.005.
- [27] GARCIA-GONZALEZ L, GEERAERD A H, SPILIMBERGO S, *et al.* High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1): 1-28. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018.
- [28] SHIEH E, PASZCZYNSKI A, WAI C M, *et al.* Sterilization of bacillus pumilus spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(3): 247-252. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.11.005.
- [29] HENNESSY R S, JANA S, TEFFT B J, *et al.* Supercritical carbon dioxide - based sterilization of decellularized heart valves[J]. JACC: Basic to Translational Science, 2017, 2(1): 71-84. DOI: 10.1016/j.jacbts.2016.08.009.
- [30] 闫伽宁, 胥义. 脱细胞基质生物墨水制备方法及应用进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(11): 4024-4035. DOI: 10.13345/j. ejb. 210091.
- [31] REIS D P, DOMINGUES B, FIDALGO C, *et al.* Bioinks enriched with ECM components obtained by supercritical extraction[J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 394. DOI: 10.3390/biom12030394.
- [32] SALDIN L T, CRAMER M C, VELANKAR S S, *et al.* Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 49: 1-15. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.068.
- [33] ZHANG Ying, ZHANG Chenyu, LI Yuwen, *et al.* Evolution of biomimetic ECM scaffolds from decellularized tissue matrix for tissue engineering: A comprehensive review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 246: 125672. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125672.
- [34] WANG C H, HSIEH D J, PERIASAMY S, *et al.* Regenerative porcine dermal collagen matrix developed by supercritical carbon dioxide extraction technology: Role in accelerated wound healing[J]. Materialia, 2020, 9: 100576. DOI: 10.1016/j.mtla.2019.100576.
- [35] HUANG Y H, TSENG F W, CHANG W H, *et al.* Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 58: 238-243. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.05.060.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)