

猪心包塑形三瓣叶管道的制备及其体外评价

杨 阳 李晓峰 郭 健 柏 松 刘 晖 赵宇东 郑 佳 丁 楠 李奇林

【摘要】 目的 制备出猪心包塑形三瓣叶管道,在体外条件下检测其抗反流性、力学强度、抗酶降解能力、血液相容性和免疫原性,并与牛颈静脉三瓣管道相比较,以探讨其临床应用前景。**方法** 以心包制备三瓣叶管道共计 12 根,并取与猪心包三瓣叶管道直径大致相同的带瓣牛颈静脉 8 根,通过 HE 染色、Masson 三色染色和 Elastica-vall-Gienson 染色粗略了解管道的免疫原性;以蠕动泵模拟心脏搏动以评价管道的抗反流特性;计算最大拉伸强度和断裂伸长率来评价力学性能;以胶原蛋白酶降解管道来比较抗酶降解的能力;以体外溶血率比较管道的血液相容性。**结果** ①牛颈静脉管道组(A 组)的溶解百分比为 $30.12\% \pm 2.37\%$,猪心包管道组(B 组)的溶解百分比为 $36.27\% \pm 4.62\%$;②蠕动泵转速为 30 r/min 时,A 组反流比率为 $24.17\% \pm 10.53\%$,B 组为 $18.91\% \pm 13.48\%$,50 r/min 时,A 组反流比率为 $47.6\% \pm 9.8\%$,B 组为 $44.9\% \pm 9.64\%$,70 r/min 时,A 组反流率为 $57.2\% \pm 10.7\%$,B 组为 $53.3\% \pm 19.4\%$;③横轴血管片最大拉伸强度分别为 A 组 $(2.82 \pm 1.2) \text{ N/mm}^2$ 、B 组为 $(11.84 \pm 4.69) \text{ N/mm}^2$,断裂伸长率分别为 A 组 $78.43\% \pm 19.24\%$ 、B 组 $49.26\% \pm 11.27\%$,纵轴血管片最大拉伸强度 A 组 $(1.92 \pm 1.25) \text{ N/mm}^2$ 、B 组 $(13.29 \pm 5.08) \text{ N/mm}^2$,纵轴断裂延伸率分别为 A 组 $77.07\% \pm 18.74\%$ 、B 组 $49.72\% \pm 15.85\%$;④A 组溶血率为 $0.14\% \pm 0.465\%$,B 组溶血率 $0.0975\% \pm 0.445\%$ 。**结论** 自制的猪心包带瓣管道,大体和微观形态无明显改变,在抗反流性能上与牛颈静脉无明显差异,机械性能明显优于牛颈静脉,短期抗酶降解能力较牛颈静脉略有不足,免疫原性上优于牛颈静脉管道,具备良好的血液相容性。

【关键词】 心包;猪;颈静脉;牛;心脏瓣膜;心脏病

Porcine pericardium three valve conduit preparation and in vitro evaluation. YANG Yang, LI Xiao-feng, GUO Jian, et al. Children Heart Center of Beijing Children's Hospital, Beijing 100045, China

【Abstract】 Objective Prepared porcine pericardium three valve conduit, and in vitro conditions, detected the anti-reflux, mechanical strength, resistance to enzyme degradation ability, blood compatibility and immunogenicity, and compared with bovine jugular vein, in order to discuss the clinical application. **Methods** Porcine pericardium sewn three valve conduit a total of 12 pipelines. Take the same conduit diameter valve bovine jugular vein a total of 8, doing the HE, Masson and Elastica-vall-Gienson stained light microscopy test to observe the changes in morphology and sketchy understanding conduit immunogenicity, use peristaltic pump simulating heart throb to evaluate the anti-reflux. Doing a Villa extended experiment to draw the stress-strain curves, then calculating the slope k, evaluate the mechanical properties, degrading them in the circumstance of collagen type I to understand the capacity of resistance to enzymatic degradation, detecting the rate of haematolysis to see whether they fit the principal of hemolytic compatibility. **Results** (1) Dissolved percentagethe for group A $30.12\% \pm 2.37\%$, group B $36.27\% \pm 4.62\%$; (2) Peristaltic pump for 30 r/min, A group of reflux ratio for $24.17\% \pm 10.53\%$, as group B $18.91\% \pm 13.48\%$; 50 r/min, A group of reflux ratio for $47.6\% \pm 9.8\%$, group B $44.9\% \pm 9.64\%$; 70 r/min, A group for $57.2\% \pm 10.7\%$, group B $53.3\% \pm 19.4\%$; (3) The horizontal axis of the maximum tensile strength of vascular piece for A group $(2.82 \pm 1.2) \text{ N/mm}^2$, group B $(11.84 \pm 4.69) \text{ N/mm}^2$, elongation ratio at break for A group $78.43\% \pm 19.24\%$, group B $49.26\% \pm 11.27\%$, the vertical axis of maximum tensile strength of vascular piece for group A $(1.92 \pm 1.25) \text{ N/mm}^2$, group B $(13.29 \pm 5.08) \text{ N/mm}^2$, elongation ratio for group A $77.07\% \pm 18.74\%$, group B $49.72\% \pm 15.85\%$.

15.85%; (4) Hemolysis rate for group A $0.14\% \pm 0.465\%$, group B $0.0975\% \pm 0.445\%$. **Conclusion** Porcine pericardium three valve conduit had no significant difference in morphology when compared with the bovine jugular vein pipeline. In resistance to reflux performance, porcine pericardium three valve conduits and bovine jugular veins are no obvious difference, mechanical performance and the immunogenicity better than bovine jugular vein, short-term resistance to enzyme degradation ability is insufficient slightly. They all have a good blood compatibility.

【Key words】 Pericardium; Swine; Jugular Veina; Cattle; Heart Valves; Heart Diseases

先天性心脏病发病率居出生缺陷首位, 出生婴儿中的发病率为 $4\% \sim 8\%$ ^[1], 在复杂先心病的外科治疗中, 常见的法洛四联症、右室双出口、大血管转位等, 常合并严重的肺动脉狭窄或肺动脉闭锁。带瓣管道在右心室流出道重建中的应用极大地提高了此类先心病的外科手术疗效^[2-5]。目前国际上常用的右室流出道管道材料可分为 3 种: 同种带瓣管道, 异种带瓣管道(牛颈静脉带瓣管道)和 Gore-tex 三瓣叶管道。自制猪心包三瓣叶管道具有以下三个特点: ①瓣膜为三叶瓣, 在右室流出道重建中可达到解剖学重建; ②瓣膜下方相互交通, 形成一个环形闭合瓣窦, 更有利于瓣膜的关闭及增强其抗反流能力; ③猪心包组织免疫原性低, 价格低廉, 来源广泛, 而且可以制作成不同规格的带瓣管道。本研究拟使用戊二醛交联固定的处理方法, 制备猪心包塑形三瓣叶管道, 以牛颈静脉为对照, 观察其大体及微观结构, 检测其抗反流性能、力学强度、抗酶降解能力、血液相容性及免疫原性, 现报告如下。

材料与方法

一、材料制备

新鲜猪心包片及带瓣牛颈静脉, 分别进行以下处理: ①将猪心包片及牛颈静脉置于 200 mL 含有 0.3% 戊二醛溶液中 4°C 冰箱中保存 1 周。②浸泡后的猪心包片, 剪裁为 $5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$ 的心包矩形片(共 12 片), 沿宽边(3.5 cm)向上反折心包片, 使反折高度达 1 cm, 用 6-0 滑线连续缝合两边, 取宽边 3 等分点, 用 6-0 滑线间断缝合两针, 形成瓣窦结构, 连续缝合心包片两个长边, 制成心包管道(B 组), 共计 12 根。③取浸泡后的牛颈静脉, 沿管道纵轴剪开静脉, 选取瓣窦发育好的 3 个静脉瓣对齐瓣根用 6-0 滑线连续缝合静脉管壁, 修剪管道直径为 3.5 cm, 制成牛颈静脉管道(A 组), 共计 8 根。

二、检测方法

1. 大体形态及微观结构观察经戊二醛溶液固定后其颜色、厚度、直径、硬度、瓣膜活动度等一般情

况。

2. HE 染色、Masson 三色染色, Elastica-vall-Gienson(EVG)染色 A、B 两管道, 于 200 倍光镜下分别观察表皮细胞或血管内皮细胞残留、胶原纤维崩解及弹力纤维崩解情况。

3. 抗反流实验, 将两组管道连接 longerpump 蠕动泵(图 1), 计算两组管道的反流比率, 比较相同转速下不同管道的抗反流能力及相同管道在不同转速下的抗反流能力。反流比率 = 反流量/灌流总量 $\times 100\%$ 。

4. 一维拉伸实验及应力-应变曲线, 应用 bose 力学试验台(图 2), 计算血管片横轴及纵轴最大拉伸长度、最大拉伸强度、断裂拉伸率。最大拉伸强度 = 最大拉伸载荷/血管横截面积; 断裂延伸率 = 最大拉伸长度/血管原有长度 $\times 100\%$ 。

5. I 型胶原蛋白酶溶液降解试验, 计算被酶降解组织所占百分比 = (降解前重量 - 降解后重量)/降解前重量 $\times 100\%$ 。

6. 体外溶血试验, 计算溶血程度 = (样品吸光度 - 阴性对照吸光度)/(阳性对照吸光度 - 阴性对照吸光度) $\times 100\%$ 。

三、统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。固定前后及组间比较采用独立样本 t 检验及方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、大体形态及微观结构观察

A 组带瓣牛颈静脉管道(图 3), 呈黄白色, 较僵硬, 表面无光泽, 瓣膜半透明柔软, 可完成开闭活动。B 组自制猪心包三瓣叶管道(图 4), 呈乳白色, 柔软, 表面无光泽。

二、HE 染色、Masson 三色染色, Elastica-vall-Gienson(EVG)染色

HE 染色: A 组带瓣牛颈静脉见图 5, 表面可见

一定数量的内皮细胞,排列不紧密,有部分内皮细胞脱落现象。B 组自制猪心包带瓣管道(图 6),管道内皮细胞较牛颈静脉存留少。两组管道的中层可见少量细胞散在分布,无细胞聚集成团。Masson 三色染色:A 组见图 7,B 组见图 8,胶原纤维排列整齐,结构清晰紧凑,无胶原纤维断裂现象。EVG 染色:A 组见图 9,可见大量弹力纤维平行于血管表面方向排列,无明显断裂,B 组见图 10,未见到明显弹力纤维。

三、抗反流实验

两组不同蠕动泵转速下反流率比较见表 1。

表 1 抗反流实验
Table 1 Anti reflux experiment

组别	转速(r/min)	反流率(%)
A 组	30	24.17 ± 10.53
	50	47.6 ± 9.8
	70	57.2 ± 10.7
B 组	30	18.91 ± 13.48
	50	44.9 ± 9.64
	70	53.3 ± 19.4

注: 30 r/min,两组反流率($t=0.998,P>0.05$)无明显统计学差异;50 r/min,两组($t=0.628,P>0.05$)无明显统计学差异;70 r/min,两组($t=-0.595,P>0.05$)无明显统计学差异。

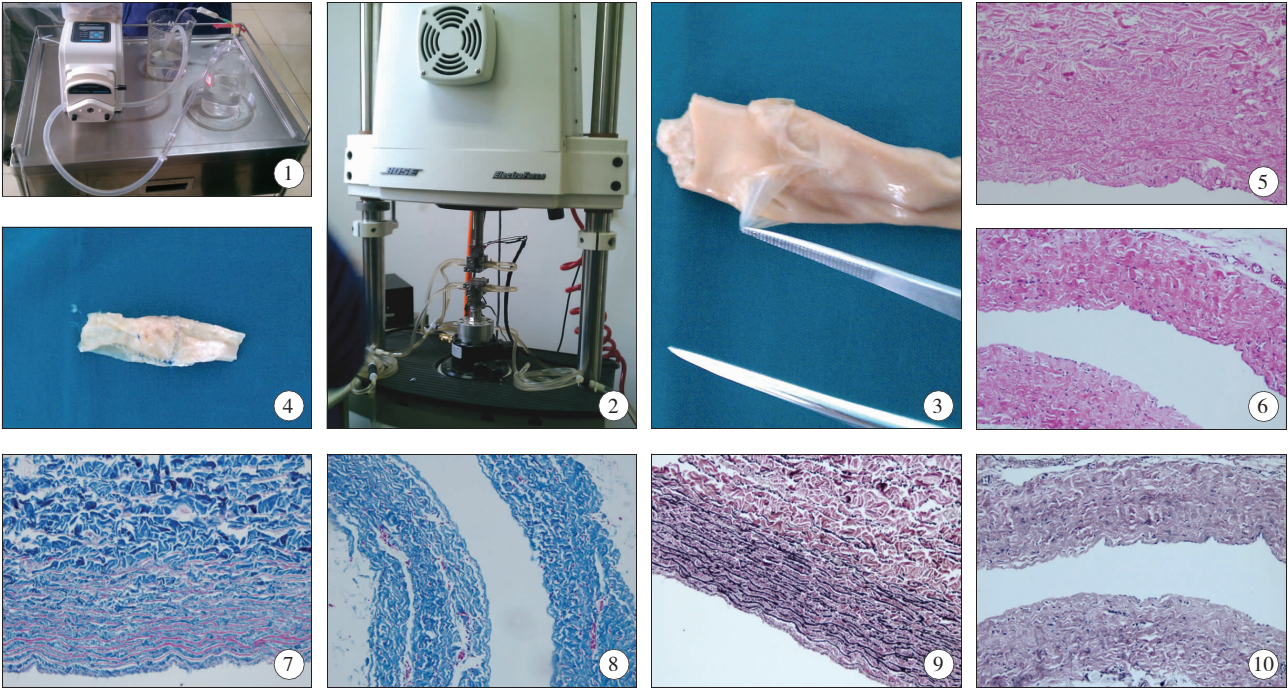


图 1 longerpump 蠕动泵; 图 2 Bose 力学实验台; 图 3 牛颈静脉; 图 4 猪心包三瓣管道; 图 5 牛颈静脉(HE × 200); 图 6 猪心包三瓣管道(HE × 200); 图 7 牛颈静脉(Masson, × 200); 图 8 猪心包三瓣管道(Masson, × 200); 图 9 牛颈静脉(EVG, × 200); 图 10 猪心包三瓣管道(EVG, × 200)
Fig. 1 Longerpump peristaltic pump. **Fig. 2** Bose mechanical test bench. **Fig. 3** Bovine jugular vein. **Fig. 4** Porcine pericardium three valve conduit. **Fig. 5** Bovine jugular vein(H. E × 200). **Fig. 6** Porcine pericardium three valve conduit(H. E × 200). **Fig. 7** Bovine jugular vein(Masson × 200). **Fig. 8** Porcine pericardium three valve conduit(Masson × 200). **Fig. 9** Bovine jugular vein(EVG × 200). **Fig. 10** Porcine pericardium three valve conduit(EVG × 200).

四、一维拉伸实验及应力-应变曲线

如图 11 所示,计算出在最大拉伸载荷下的血管拉伸长度及最大拉伸强度和断裂延伸率。两组一维拉伸实验结果见表 2。

五、I 型胶原蛋白酶溶液降解试验

两组酶降解实验结果见表 3。

六、体外溶血试验

两组溶血实验结果见表 4。

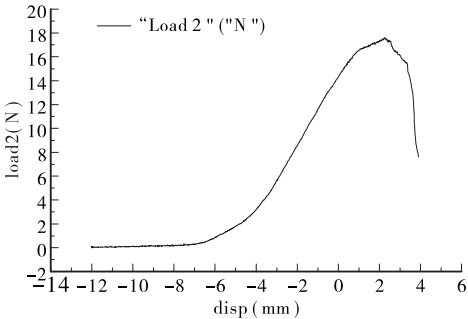


图 11 拉伸应力-应变曲线
Fig. 11 Stress-strain curves

表 2 一维拉伸实验($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Stretching experiment($\bar{x} \pm s$)

组别	宽度(mm)	厚度(mm)	横截面积(mm ²)	轴向	最大拉伸强度(N/mm ²)	断裂延伸率(%)
A 组	5	1.2	6	横向	2.82 ± 1.2	78.43 ± 19.24
				纵向	1.92 ± 1.25	77.07 ± 18.74
B 组	5	0.16	0.8	横向	11.84 ± 4.69	49.26 ± 11.27
				纵向	13.29 ± 5.08	49.72 ± 15.85

注: 两组横轴最大拉伸强度($t = 8.617, P < 0.05$)差异有统计学意义,断裂伸长率($t = -6.325, P < 0.05$)差异有统计学意义;纵轴最大拉伸强度($t = 10.039, P < 0.05$)差异有统计学意义,断裂延伸率($t = -5.592, P < 0.05$)差异有统计学意义。

表 3 酶降解实验($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Enzymatic degradation experiment($\bar{x} \pm s$)

组别	被降解百分比(%)
A 组	30.12 ± 2.37
B 组	36.27 ± 4.62

注: 两组($t = -2.643, P < 0.05$)差异有统计学意义。

表 4 溶血实验($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Hemolysis experiment($\bar{x} \pm s$)

组别	管道溶血率(%)	阳性对照溶血率(%)	阴性对照溶血率(%)
A 组	0.14 ± 0.465	100	0
B 组	0.0975 ± 0.445	100	0

注: 两组溶血率($t = -0.203, P > 0.05$)差异无统计学意义。

讨论

近年来心脏外科的发展日新月异,越来越多的复杂先天性心脏病可以通过手术得到治疗,而心脏外科生物组织替代材料的发展和应用起了重要的推动作用。不少先天性心脏病如肺动脉闭锁、重症法洛四联症、Taussing-Bing 畸形、共同动脉干、三尖瓣闭锁、大动脉转位合并肺动脉狭窄畸形及行 Ross 手术时,需要重建肺动脉与右室连接,带瓣管道的使用对这些疾病的有效治疗功不可没^[6-14]。我们近年曾用新鲜自体心包,自制三瓣叶管道治疗重度法洛四联症及肺动脉闭锁,效果满意,无免疫原性。但此类先心病患儿手术年龄均较小,第 1 次手术后大多数患儿均需在几年后更换更大口径管道。因人体心包组织有限,只能应用 1 次,自体心包难以满足多次制备管道的需要。寻找更好的右室流出道替代材料是我们主要的研究方向之一。

猪心包是一种天然衍生支架材料,主要成分是 I 型胶原,胶原含量高,柔韧性好,抗原性小,生物相容性好,与其他人工合成材料相比,更方便经济、安

全可靠,且来源广泛。

评估生物材料综合性状需进行体外研究、动物体内实验及后期的临床应用检测。体外评价体系在短时间内得以迅速发展,成为研究生物材料相容性的主要方法。通过观察可以看出经戊二醛处理的管道,猪心包管道更加柔软,缝制的三瓣叶闭合开放更加自如,其内皮细胞残留少,免疫原性低于牛颈静脉,且胶原蛋白含量高于牛颈静脉,同时胶原纤维排列完整,保存其作为管道骨架的功能。用于右室流出道的带瓣管道必须要有一定的抗反流性能,良好的抗反流性能可以使术后右室短时间内恢复正常大小,降低右心功能衰竭的发生率,改善右室重构,对患儿远期手术效果有巨大的影响。猪心包塑形三瓣叶管道其环形且相互交通的瓣窦在增加瓣膜的抗反流能力上起到至关重要的作用。瓣膜关闭时,瓣窦内形成的涡流不仅能清理瓣膜及管壁上的血浆沉积物,环形的瓣窦可使管壁均匀分担瓣膜关闭时造成的冲击力,有效避免了管壁的局部扩张,可加强瓣膜的关闭,增加瓣膜抗反流能力^[15]。牛颈静脉管道作为现今研究较热门的管道,大量文献报道其抗反流性能在早期及中期可取得良好的效果,已获得国际认可。自制猪心包管道可以达到牛颈静脉带瓣管道的抗反流性能。生物材料的机械强度是评价材料性能的一个重要指标,足够的机械强度是管道植入体内后不形成瘤样扩张的有利保障。通过力学实验可以看出,猪心包管道具有更强的最大拉伸强度,这可以使猪心包管道抵抗更高的血压,但其管道的顺应性不如牛颈静脉,这可能会造成管道吻合过程中缝合针孔易于出血而延长手术时间^[16]。生物材料良好的组织稳定性是植入机体后不被化学消化和酶降解的保证,猪心包管道降解率高于牛颈静脉,这可能是因为猪心包的胶原含量高于牛颈静脉,在极端胶原酶的作用下降解更加明显所致,牛颈静脉中还含有除胶原蛋白外的其他组织,可能影响牛颈静脉的降解效果,从而使其抗胶原酶的降解率高于猪心

包。组织相容性是指材料与生物体之间相互作用产生生物、物理、化学反应的一种概念。植入人体的生物材料首先接触的是血液,继而材料表面出现血浆蛋白吸附,血小板粘附、聚集、变形,凝血系统、纤溶系统激活,最终形成血栓。溶血性主要体现了材料与血细胞间相互作用的强弱,材料的溶血性高,表明其对血细胞的破坏程度大。当材料有溶血活动时,提示材料具有细胞毒性^[17]。自制猪心包管道符合溶血率<5%的国家标准,达到移植的生物材料所要求的血液相容性初筛条件,短期内不会发生溶血反应。综上所述,自制猪心包管道具有一定的抗反流作用,力学强度和抗酶降解的能力,同时要满足血液相容性的要求。

参 考 文 献

- 1 刘凯波,潘迎,李红梅,等.北京市 10 年围产儿先天性心脏病资料分析.中国优生与遗传杂志,2008,16(3):100-101.
- 2 Thomas Breymann, Dietmar Boethig. The Contegra bovine valved jugular vein conduit for pediatric RVOT reconstruction: 4 years experience with 108 patients [J]. J CARD SURG, 2004, 19: 426-431.
- 3 Volkhard Gober, Pascal Berdat. Adverse mid-term outcome following RVOT reconstruction using the Contegra Valved bovine jugular vein [J]. Ann Thorac Surg, 2005, 79: 625-631.
- 4 Younes Boudjemline, Damien Bonnet. Use of bovine jugular vein to reconstruct the right ventricular outflow tract: Early results [J]. Surgery for Congenital Heart Disease, 2003, 8: 490-497.
- 5 Ardawan Rastan, Thomas Walter. Bovine jugular vein Conduit for Right Ventricular Outflow Tract reconstruction: Evaluation of risk factors for mid-term outcome [J]. Ann Thorac Surg, 2006, 82: 1308-1315.
- 6 Ross DN, Somerville J. Correction of pulmonary atresia with a homograft aortic valve [J]. Lancet, 1966, 23: 1446-1447.
- 7 McGoon DC, Rastelli GC, Ongley PA. An operation for the correction of truncus arteriosus [J]. JAMA, 1968, 205: 69-

- 73.
- 8 Rastelli GC. A new approach to "anatomic" repair of transposition of the great arteries [J]. Mayo Clin Proc, 1969, 44: 1-12.
- 9 Kouchoukos NT, Barcia A, Barger LM, et al. Surgical treatment of congenital pulmonary atresia with ventricular septal defect [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1971, 61: 70-83.
- 10 Kyger ER III, Chiariello L, Hallman GL, et al. Conduit reconstruction of right ventricular outflow tract [J]. Ann Thorac Surg, 1975, 19: 277-288.
- 11 De Vivie ER, Hellberg K, KutZner DD, et al. AJ. Conduit repair for complex congenital heart disease with Pulmonary atresia or right ventricular outflow tract obstruction. Part I: surgical results [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1981, 29: 329-336.
- 12 Rupprath G, Vogt J, De Vivie ER, et al. Conduit repair for complex congenital heart disease with pulmonary atresia or right ventricular outflow tract obstruction. Part II: early and late hemodynamic and echocardiographic findings [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1981, 29: 337-344.
- 13 Bull C, De Leval MR, Stark J, et al. Use of a subpulmonary ventricular chamber in the Fontan circulation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1983, 85: 21-31.
- 14 Homann M, Haehnel JC, Mendler N, et al. Reconstruction of the RVOT with valved biological conduits: 25 years experience, with allografts and xenografts [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2000, 17: 624-630.
- 15 Miyazaki T. Expanded polytetrafluoroethylene valved conduit and patch with bulging sinuses in right ventricular outflow tract reconstruction [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 134(2): 327-32.
- 16 Chang Y, Tsai CC, Liang HC, et al. Reconstruction of the right ventricular outflow tract with a bovine jugular vein graft fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin) in a canine model [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122: 1208-1218.
- 17 Wang Y, Kong W, Bi S. Compatibility research of self-designed scaffold biomaterials of nature extracellular matrix [J]. Lin Chunag Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, 2004, 18(6): 363-366.