

采用环氧化合物交联牛颈静脉带瓣管道的实验研究

徐朝军, 吴忠仕*, 胡铁辉, 胡建国, 冯耀光, 马忠厦, 王 晖, 胡 剑, 胡野荣
(中南大学湘雅二医院心胸外科, 长沙 410011)

[摘要] 目的:探讨采用环氧化合物交联新型肺动脉血管替代物之一牛颈静脉带瓣管道(BJVC)的方法和效果。方法:新鲜BJVC 24根,随机分为环氧化合物处理组(PC组, $n=8$),戊二醛处理组(GA组, $n=8$)及新鲜对照组($n=8$)。分别测量各组处理前后管壁厚度、管腔外径及瓣膜的抗返流功能的变化。测定处理前后各组的组织含水量、热皱缩温度、组织断裂强度及断裂伸长率。另外进行大鼠皮下埋植试验,60 d后测定组织钙含量。结果:PC组外观形态、管腔外径、瓣膜抗返流功能更接近天然血管;PC组及GA组机械性能相当,且明显强于新鲜对照组($P<0.05$);大鼠皮下包埋后PC组钙含量显著低于GA组($P<0.05$)。结论:PC交联BJVC可有效保持组织的柔软性,保护其瓣膜的抗返流性能,且具备良好的抗钙化性能,是一种有效的合适的生物组织处理制备的新型技术。

[关键词] 牛; 颈静脉; 环氧化合物; 交联

[中图分类号] R318.11; R322.123 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)03-0355-04

Bovine jugular venous conduit treated with the polyepoxy compound

XU Zhao-jun, WU Zhong-shi*, HU Tie-hui, HU Jian-guo,
FENG Yao-guang, MA Zhong-sha, WANG Hui, HU Jian, HU Ye-rong
(Department of Cardiothoracic Surgery, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To determine the feasibility whether the bovine jugular venous conduit (BJVC) can be fixed with polyepoxy compound (PC). **Methods** Twenty-four BJVCs were divided into 3 groups and fixed with polyepoxy compound (PC group, $n=8$), glutaraldehyde (GA group, $n=8$), and unfixed group (Control group, $n=8$), respectively. The morphologic and mechanical properties of BJVCs in the 3 groups, including thickness, diameter, moisture content, denaturation temperature, tensile strength, elongation at break, and fixation index were measured. The rat subcutaneous model for the assessment of tissue calcification was used. The calcium content in bovine jugular vein patches and valves was determined by flame atomic absorption spectrophotometer. **Results** There was no difference in the wall thickness, diameter, and tissue water content between PC and the control group, but significant difference was found between GA and PC groups. The mechanical properties of PC group and GA group were not significantly different, but they were better than those of the control group. GA-fixed BJVC samples showed clear calcification, while PC fixed BJVC were calcified significantly less. **Conclusion** PC is an effective and suitable choice for the treatment of BJVC since it can effectively preserve the structure and the anti-reflow function of valves in bovine jugular vein and it has better anti-calcification properties.

Key words: bovine; jugular venous; polyepoxy compound; fixation

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(3):0355-04]

牛颈静脉带瓣管道(bovine jugular venous conduit, BJVC)近年已作为心脏外科手术中右心室流出道与肺动脉连接重建替代材料之一^[1,2]。目前应用于临床的 BJVC 采用戊二醛(glutaraldehyde, GA)交联处理,而经 GA 交联的异种生物材料容易出现血栓、钙化、早期败坏等问题,学者们认为这与交联剂 GA 的缺点有关^[3-5]。改进 BJVC 的处理技术是保持其优良性能的关键,也是目前的研究热点之一。与 GA 相比,环氧化合物乙二醇二缩水甘油醚(polyepoxy compound, PC)交联的生物材料有其独特的优点^[6,7],但未见 PC 交联 BJVC 的报道。本实验旨在探讨 PC 处理 BJVC 的方法及效果,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 取材 方法参见文献^[8]。

1.2 固定处理 将样本随机分为 3 组,环氧化合物处理组(PC 组, $n=8$),戊二醛处理组(GA, $n=8$)和新鲜对照组(Control, $n=8$)。PC 组和 GA 组的标本均采用自制的灌流装置加压固定^[8],分别应用 4% 乙二醇二缩水甘油醚溶液(pH 10.5)(中国石化特种树脂有限公司,型号:EPG-669)和 0.625% 戊二醛溶液交联处理,处理时间分别为 3 d 和 2 h,蒸馏水浸泡 24 h。均置于 0.5% 肝素溶液中浸泡 1 h。PC 组标本置于 50% 酒精中保存,GA 处理标本用 0.3% GA 溶液保存。并在不同时间点取各组少许标本行固定指数分析。新鲜对照组:不做固定处理,置于生理盐水中备用。

1.3 形态学观察 各组在处理前后观察大体形态、测量管壁厚度、管腔直径和检测瓣膜处理前后的抗返流功能。

1.4 机械性能测定

1.4.1 组织含水量测定 剪取处理前后的管道片,用滤纸吸去组织表面水分,称湿质量,然后置于烤箱 120 °C 烘烤 24 h,再称干质量,计算组织含水量。

1.4.2 热皱缩温度测定 横向剪取各组管道片,剪成 0.5 cm × 3 cm 大小,一端固定,一端系 100 g 重物,以蒸馏水为介质,从室温开始加热,每分钟升高 10 °C,测定出热皱缩温度。

1.4.3 断裂强度测定 分别纵向剪取各组管道片,每片用切割刀切成每片 0.5 cm × 4.0 cm,两端固定于拉力检测器上(LRXPLUS 万能材料试验机,英国 LLOYD 公司),间距 2 cm,以 20 mm/min 速度牵拉管道片至断裂,记录断裂强度和断裂伸长率。

1.4.4 固定指数分析 生物材料经固定后,组织中游离氨基酸减少,而茚三酮(ninhydrin, NHN)

与氨基酸显色反应能指示组织游离氨基酸的含量,因此可作为环氧化合物固定牛颈静脉带瓣管道的效果评价。剪取瓣膜样品,冻干 24 h,然后与 0.1% 茚三酮乙醇溶液置沸水浴反应 20 min,待冷却后测定溶液吸光度值(波长 570 nm)。按下式计算固定指数^[9]:

$$\text{固定指数}(\%) = \frac{(\text{与茚三酮反应的氨基酸浓度})_{\text{新鲜}} - (\text{与茚三酮反应的氨基酸浓度})_{\text{交联}}}{(\text{与茚三酮反应的氨基酸浓度})_{\text{新鲜}}}$$

1.5 抗钙化性能测定 取制备好的 BJVC 修剪成带瓣试片,每个试片含瓣膜两个,细菌培养 2 次阴性。取刚离乳的昆明 SD 大鼠,共 8 只,质量 45 ~ 50 g,以戊巴比妥钠 25 mg/kg 腹腔注射麻醉,背部去毛,沿正中切开皮肤,游离皮下组织,将试片包埋于皮下,每只大鼠包埋 GA 组及 PC 组试片各一个,以 2-0 涤纶线缝合皮肤切口,火棉胶涂覆保护切口,15 U/g 青霉素注射,每日 2 次,共 3 d 以预防切口感染。常规饲料喂养。大鼠喂养 60 d 后拉颈处死,切开背部皮肤,取出试片,以去离子水清洗后,剪下试片瓣膜,将瓣膜与管壁分开放置,分别剪取适量标本采用原子吸收光谱仪测定钙含量、行石蜡包埋及电镜检测。

1.6 统计学处理 实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} + s$)表示,运用 SPSS11.0 软件进行统计分析,所有数据经方差齐性检验后采用单因素方差分析或 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 固定指数 PC 交联和 GA 交联后的牛颈静脉管道固定指数结果见图 1。实验初期 GA 反应速度较 PC 快,PC 组 72 h 达最大固定指数且 GA 组与 PC 组的固定指数相近。

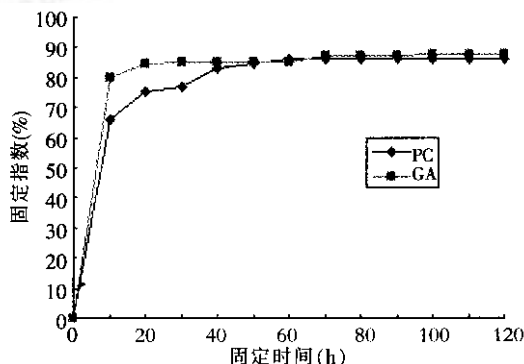


图1 PC组和GA组交联72 h后固定指数分析

Fig.1 Seventy-two hours was required to produce a similar fixation index for PC fixation

2.2 不同固定方法对牛颈静脉形态学的影响

PC 组在环氧化合物交联后呈乳白色,管壁和瓣膜质地柔软,与新鲜对照组相似,弹性大。GA 组管壁稍变厚,管腔直径稍变小,瓣膜抗返流性能略

下降。GA 组经戊二醛交联后,管道外观呈淡黄色,仍富有弹性,管壁稍变硬变厚(图 2)。管腔呈

扩张状态,管腔内径稍有减少,管道抗返流性能明显降低($P < 0.05$)。

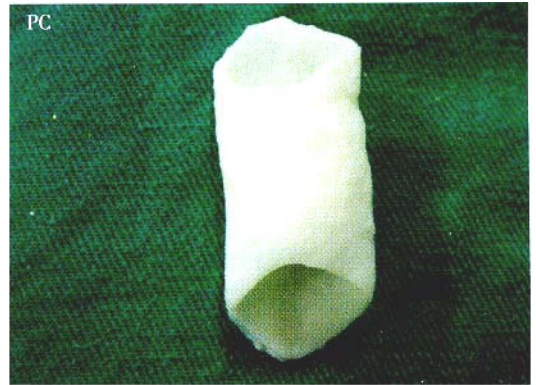


图 2 2 种交联方法对 BJVC 形态学的影响 PC 交联的 BJVC 呈乳白色,而 GA 交联的呈微黄色,前者质地柔软富有弹性

Fig. 2 Photograph of the glutaraldehyde-fixed BJVC and PC-fixed BJVC Color of the GA-fixed tissue turns yellowish while the PC-fixed tissue is slightly white and the PC-fixed BJVC is relatively softer than the GA counterparts

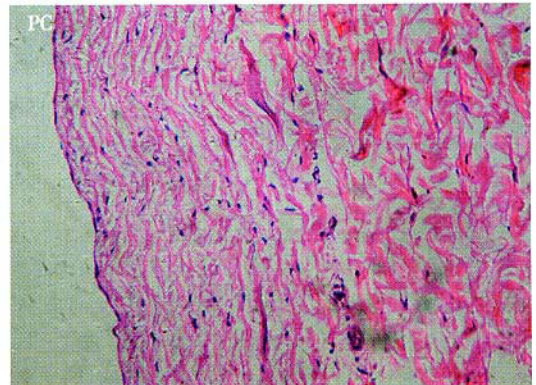
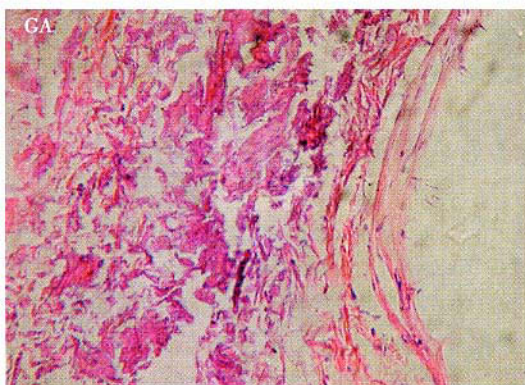


图 3 2 种方法交联的 BJVC 大鼠皮下包埋后组织形态学改变 GA 组大量胶原变性溶解;PC 组的胶原仅轻微变性溶解(HE × 200)

Fig. 3 Photomicrographs of the GA-fixed BJVC and PC-fixed BJVC Collagen fibril structures of the GA-fixed BJVC is disintegrated into pieces while those of the PC-fixed tissue is slightly disintegrated (HE × 200)

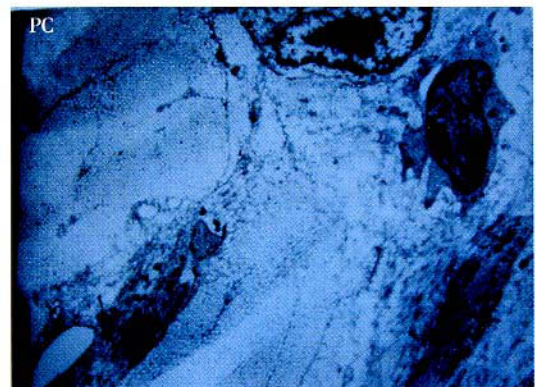


图 4 2 种方法交联的 BJVC 大鼠皮下包埋后电子显微镜下组织形态学改变 GA 组示胶原纤维较稀疏,有局部溶解;PC 组示胶原纤维密集、完整,无灶性溶解(TEM × 5 000)

Fig. 4 TEM of the GA-fixed BJVC and PC-fixed BJVC Collagen fibril structures of the GA-fixed is degenerated while those of the PC-fixed remain intact (TEM × 5 000)

表 1 不同方法固定牛颈静脉前后的形态学特征及抗返流性能 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	管壁厚度 (mm)		管道外径 (mm)		瓣膜抗返流率 (%)	
	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后
PC 组	0.63 ± 0.12	0.66 ± 0.11 *	16.4 ± 1.3	16.5 ± 1.5 *	45.4 ± 10.1	45.6 ± 9.9 *
GA 组	0.67 ± 0.15	0.76 ± 0.11 #	17.3 ± 1.2	15.6 ± 1.7 #	43.5 ± 9.8	61.5 ± 14.7 #

处理后组间比较, * $P < 0.05$;处理前后比较, # $P < 0.05$

2.3 机械性能 与对照组比较,PC和GA处理的管道组织含水量降低($P < 0.05$),热皱缩温度,组织断裂强度和断裂伸长率较新鲜组明显提高(均 $P < 0.05$),而PC组组织含水量、断裂伸长率较GA组高(均 $P < 0.05$)。

2.4 钙含量测定 GA组BJVC试片皮下包埋后钙含量明显高于PC组($P < 0.05$) (表3)。

2.5 光镜和电镜观察 GA组试片中胶原纤维玻璃样变性、排列紊乱、胶原纤维断裂。PC组纤维排列整齐,胶原玻璃样变程度轻,钙化灶较少(图3,4)。

表2 各组牛颈静脉管壁处理前后机械性能比较($n=8 \bar{x} \pm s$)

组别	热皱缩温度(°C)	组织含水量(%)	断裂强度(N)	断裂伸长率
PC组	86.70±0.79*#	83.21±0.89*#	5.43±0.21*	3.89±0.21*#
GA组	90.74±0.46	78.09±0.93	5.45±0.34	2.71±0.12
对照组	70.72±0.82	86.09±0.69	3.46±0.27	5.34±0.35

组间比较,* $P < 0.05$;与GA比较,# $P < 0.05$

表3 各组牛颈静脉包埋后钙含量的比较($n=8 \bar{x} \pm s$)

组别	瓣膜(mg/g)	管壁(mg/g)
PC组	24.54±5.18	125.00±5.83
GA组	60.36±4.73*	148.00±16.67*

组间比较,* $P < 0.05$

3 讨论

BJVC由于其良好的瓣膜抗返流性能,取材方便,管径范围选择大,已逐步成为复杂先心病外科治疗中重建右室肺动脉连接的替代材料之一^[1-3,9]。经传统生物组织交联剂GA交联后的BJVC存在抗返流性能降低、血管壁僵硬、细胞毒性及后期钙化等问题,这些缺点改变了BJVC独特的天然结构,缩短了其临床应用寿命。PC是一种新型交联剂,用PC固定处理的生物材料较之用传统交联剂GA既能保持原材料的柔顺结构,又能减轻钙化,提高耐久性^[6,7]。环氧化合物中富含醚基,而醚基为亲水性基团,故其处理的生物材料含水量高,质地柔顺,接近生物材料的天然结构^[7]。本研究结果显示经PC交联处理后的牛颈静脉外观更接近新鲜组织、质地柔软富有弹性、管径大小、瓣膜抗返流功能更接近新鲜牛颈静脉(表1)。柔顺的BJVC手术缝合或吻合时不滞针、不漏血。而富含疏水性基团的戊二醛处理的材料则质地僵硬,进针困难。

耐久性较差是生物材料临床应用的主要障碍。如何增强生物组织的耐久性一直是人们关注的焦点。影响生物组织耐久性的因素很多,其中生物组织的机械稳定性和远期钙化与生物组织衰败有着密切的关系。钙的高摄取是GA处理材料

的缺点,PC为亲水性交联剂,其环氧基团不但能与氨基反应,而且尚能与羟基、羧基反应,能与生物组织形成均匀致密的交联并且消除了 Ca^{2+} 结合的位点^[10]。理论上,用PC能有效交联异种生物材料,提高其机械强度且不容易引起钙化。本实验结果显示,PC组和GA组的热皱缩温度与断裂强度均高于新鲜组($P < 0.05$),表明两种处理BJVC方法均可显著提高其机械强度和组织稳定性。胶原结构完整是保持生物材料机械强度的重要因素,大鼠皮下包埋后光镜及电镜结果显示其胶原结构PC组较GA组完好,由此可知PC处理BJVC耐久性强。大鼠皮下包埋后PC组的瓣膜和管壁钙含量均低于GA组($P < 0.05$),这表明PC处理的BJVC较GA处理的不易钙化。

综上所述,经PC交联的BJVC能保持其天然结构,提高机械强度,大鼠皮下包埋后钙化轻,有望成为较好的BJVC交联处理方法。但PC交联的BJVC植入体内后细胞毒性和细胞再生情况,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hitendu HD, Alexander K, Felix B, et al. Early results of the bovine jugular vein graft used for reconstruction of the right ventricular outflow tract[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 79(2):618-624.
- [2] Dietmar B, Wolf-Rudiger T, Hartmut H, et al. Mid-term course after pediatric right ventricular outflow tract reconstruction: a comparison of homografts, porcine xenografts and contegras[J]. *European Cardiothorac Surg*, 2005, 27(1):58-66.
- [3] Volkhard G, Pascal B, Mladen P, et al. Adverse mid-term outcome following RVOT reconstruction using the contegra valved bovine jugular vein[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 79(2):625-631.
- [4] Bart M, Leen VG, Derize B, et al. The contegra conduit in the right ventricular outflow tract induces supravalvular stenosis[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 128(6):834-840.
- [5] Andreas RT, Jorg SS, Ulrich R, et al. Right ventricular outflow tract reconstruction with the contegra bovine jugular vein conduit: A word of caution[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(6):2151-2156.
- [6] Shen SH, Sung HW, Tu R, et al. Characterization of a polyepoxy compound fixed porcine heart valve bioprosthesis[J]. *J Appl Biomater*, 1994, 5(1):159-162.
- [7] Sung HW, Hsu HL, Shih CC, et al. Cross-linking characteristic of biological tissue fixed with monofunctional multifunctional epoxy compounds[J]. *Biomaterials*, 1996, 17(14):1405-1410.
- [8] 吴忠仕,张竟超,程端,等.牛颈静脉带瓣管道结构特性及流体动力学的实验研究[J]. *湖南医科大学学报*, 2003, 28(3):298-300.
- [9] 吴忠仕,胡建国,杨一峰,等.带瓣牛颈静脉在治疗复杂先天性心脏病中的应用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2005, 30(4):471-473.
- [10] Sung HW, Shih CC, Hsu CS, et al. Crosslink characteristics of porcine tendons-effect of fixation with glutaraldehyde or epoxy[J]. *J Biomed Mater Res*, 1996, 30(4):361-367.