

## 光氧化处理牛颈静脉带瓣管道重建肺动脉与右心室连接

冯耀光<sup>1,2</sup>, 胡建国<sup>2</sup>, 吴忠仕<sup>2</sup>, 胡铁辉<sup>2</sup>, 周新民<sup>2</sup>, 邓又华<sup>2</sup>, 王晖<sup>2</sup>, 徐朝军<sup>2</sup>, 马忠夏<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属第一医院心胸外科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中南大学湘雅二医院心胸外科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 外科学; 光氧化处理的牛颈静脉带瓣管道的性能; 原子吸收光谱法; 光氧化反应; 牛颈静脉带瓣管道; 右心室流出道重建; 血流动力学

[摘要] 目的 观察光氧化处理的牛颈静脉带瓣管道用于重建右心室—肺动脉连接后, 在体内循环系统中与血流接触条件下的抗钙化性能及其血流动力学性能。方法 以经光氧化反应处理的牛颈静脉带瓣管道为研究对象, 以单纯戊二醛交联固定的牛颈静脉带瓣管道作为对照, 建立犬重建右心室—肺动脉连接的动物模型; 实验动物饲养观察 10 个月后, 通过超声心动图和心导管检查等方法评价两种不同方法固定处理的牛颈静脉带瓣管道重建犬右心室—肺动脉连接后的血流动力学性能, 并了解牛颈静脉管道内的瓣膜在犬的右心系统内的功能。屠宰实验动物后取出标本, 通过原子吸收光谱法测定组织钙含量, von Kossa 钙盐染色观察组织钙化情况。结果 心脏超声显示两组管道均通畅, 瓣叶活动良好。光氧化处理组结扎肺动脉前、后直接测压及术后 9~10 个月通过心导管测压, 所测得的跨瓣压差维持在较低水平, 跨瓣压差无明显升高; 戊二醛组结扎肺动脉前、后及术后 9~10 个月测得的跨瓣压差与光氧化组相似。光氧化组管道血管壁钙含量为  $7.60 \pm 8.02 \text{ mg/g}$ , 戊二醛组管道血管壁钙含量为  $22.05 \pm 10.78 \text{ mg/g}$ , 两组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 光氧化组和戊二醛组管道瓣膜钙含量分别为  $0.74 \pm 0.23 \text{ mg/g}$  和  $0.88 \pm 0.69 \text{ mg/g}$ , 两组相比无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。结论 光氧化反应处理固定的牛颈静脉带瓣管道可用于重建右心室—肺动脉连接, 血流动力学性能良好, 与自体肺动脉相当, 远期血流动力学性能尚待进一步观察研究。光氧化反应处理固定的牛颈静脉带瓣管道在犬的动物模型中, 抗钙化性能优于戊二醛固定的牛颈静脉管道。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

### Research On the Hemodynamic Property of Bovine Jugular Vein Conduit Cross-Linked by Dye-Mediated Photooxidation

FENG Yao-Guang, HU Jian-Guo, WU Zhong-Shi, HU Tie-Hui, ZHOU Xin-Min, DENG You-Hua, WANG Hui, XU Chao-Jun, and MA Zhong-Xia

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Dye-Mediated Photooxidation; Bovine Jugular Vein Conduit Cross; Reconstruct Right Ventricular Outflow Tract; Transvalvular Pressure; Anti-Calcification

[ABSTRACT] **Aim** To research the hemodynamic property and the anti-calcification feature of bovine jugular vein conduit cross-linked by dye-mediated photooxidation. **Methods** Right ventricular outflow tract (RVOT) was reconstructed for 12 canines, 7 with bovine jugular vein conduits cross-linked by dye-mediated photooxidation treatment, 7 with bovine jugular vein conduits simply cross-linked by glutaraldehyde. After feeding 9 to 10 months, then the hemodynamic property was evaluated by echocardiography and heart catheter examination. Tissue calcium content was analyzed by flame atomic absorption spectrophotometer. **Results** Echocardiography revealed that the motion of the valvular leaflets in both groups of conduit that cross-linked by glutaraldehyde and cross-linked by dye-mediated photooxidation were satisfying. Heart catheter revealed the transvalvular pressure gradients of both studied groups were minimal. Walls of bovine jugular vein conduit that cross-linked by dye-mediated photooxidation treatment had less calcification than bovine jugular vein conduits that simply cross-linked by glutaraldehyde. Compared with the latter ones, the tissue calcium content of the formers decreased 65.6%. It is also found that the walls of the bovine jugular vein had far more calcification than the valves in both groups. **Conclusions** RVOT with bovine jugular vein conduits was reconstructed at 9~10 months, which hemodynamic property seems equivalent to pulmonary artery. The bovine jugular vein cross-linked by dye-mediated photooxidation treatment appears to have less calcification.

[收稿日期] 2005-11-29 [修回日期] 2006-04-01

[基金项目] 湖南省科技计划重大专项基金(04SK1005)资助

[作者简介] 冯耀光, 博士, 主治医师, 主要从事心血管外科研究。胡建国, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心胸血管外科学。吴忠仕, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事先天性心脏病外科治疗。

牛颈静脉带瓣管道用于复杂先心病右心室流出道重建, 取得了满意的近期效果, 目前国外临床已有成品(Contegra 管道)应用, 并有望成为重建右心室流出道的良好材料之一<sup>[1,2]</sup>。牛颈静脉带瓣管道是经戊二醛处理后的生物材料, 与戊二醛处理生物材料的方法相比, 光氧化反应处理的牛心包片显示

出良好的生物相容性,内皮化程度高,低免疫性,无细胞毒性,钙化程度低等优点<sup>[3,4]</sup>。本实验以经光氧化反应处理的牛颈静脉带瓣管道为研究对象,建立犬重建右心室-肺动脉连接的动物模型,以评价在体内循环系统中与血流接触的情况下两种不同方法处理的牛颈静脉带瓣管道的抗钙化性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

家养健康杂种犬,雌雄不限,5~12个月龄,体重7~15 kg,随机分为戊二醛组及光氧化组,每组术后长期存活7只。

### 1.2 牛颈静脉带瓣管道的取材和制备

见参考文献[5]。

### 1.3 动物麻醉

术前禁食禁饮12 h,用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,右侧卧位固定于动物手术台上,穿刺股动脉连续血压监测;静脉注射仙林、芬太尼加深麻醉;气管内插管,连接呼吸机,潮气量6~8 ml/kg,呼吸频率18~25 beat/min,氧浓度40%~60%,定时进行动脉血气监测,以便调整呼吸机参数。

### 1.4 动物手术

左前外侧切口,第三或四肋间进胸,于左膈神经前纵行切开心包,充分显露肺动脉和右心室前壁。游离肺动脉主干并套带。侧壁钳纵行夹闭右心室流出道前壁,纵行切开右心室流出道前壁,长约1.8~2.5 cm,修剪牛颈静脉管道,两端成斜面,远心端保留距瓣环3~5 mm。远心端与右心室流出道吻合后夹闭管道,松开右心室侧壁钳。侧壁钳夹肺动脉主干前部分约4~5 mm,长约1.5 cm,管道近心端与肺动脉切口吻合。避免管道扭曲和吻合口狭窄。手术中牛颈静脉带瓣管道重建肺动脉与右心室连接前后置右心室及肺动脉测压管,测定肺动脉压和右心室压;试行阻断肺动脉主干(在肺动脉瓣水平);动脉血压和心率无明显改变即结扎肺动脉。止血,安放胸腔引流,缝闭胸腔。自主呼吸恢复,麻醉清醒前拔除引流管,动脉测压和静脉穿刺管。

### 1.5 围术期处理

术中静脉注射青霉素800 ku,术后每只动物常规肌注青霉素800 ku,庆大霉素80 ku,均2次/天,共3天;术后动物不用抗凝药物;普通饲料笼中喂养9~10月。

### 1.6 心脏彩色超声检查

喂养9~10月后,将犬麻醉(3%戊巴比妥钠25

mg/kg,肌肉注射),剪除左胸部毛发,进行心脏彩色超声检查。观察牛颈静脉带瓣管道的通畅情况、瓣叶活动情况、瓣膜抗返流功能等血流动力学情况。

### 1.7 右心导管测压

心脏彩色超声检查后追加麻药,维持全麻状态。穿刺股静脉,导入6F心导管,测量右心室压力及肺动脉压,计算跨瓣压差,并获得心血管造影图像。

### 1.8 标本采取

术后9~10月,取出植入的牛颈静脉带瓣管道,沿管道长轴纵行剪开,肉眼观察;然后将瓣膜沿根部剪下,将标本分为血管壁和瓣膜两部分,分别剪取适量血管壁和瓣膜组织样本,放入10%福尔马林内保存,行HE染色;剩余的样本,烘干(80℃烘箱,至少24 h),进行原子光谱吸收法定量检测钙含量。

### 1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。使用SPSS 10.0统计软件完成。

## 2 结果

### 2.1 动物存活情况

戊二醛组共完成手术10只,围术期死亡3只,术后成活7只。光氧化组共完成手术8只,围术期死亡1只,术后存活7只。

### 2.2 心脏彩超检查情况

戊二醛组1只犬管道内有赘生物附着,瓣叶活动受限,有较严重返流(解剖后发现血栓及赘生物附着于瓣叶及其周围处),但管道通畅。两组其余带瓣管道均通畅,瓣叶活动良好,无或仅有少量返流,无右心室肥厚,各心腔没有明显扩大,心功能良好。

### 2.3 右心室压和肺动脉压

结扎肺动脉前后跨瓣压差和右心室舒张压无统计学差异;术后9~10月跨瓣压差和右心室舒张压与结扎肺动脉后相比也无统计学差异(表1)。

表1. 戊二醛组和光氧化组管道测压结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ , mmHg)

测压时间	戊二醛组		光氧化组	
	跨瓣压差	右心室舒张压	跨瓣压差	右心室舒张压
结扎肺动脉前	6.7±5.6	3.0±1.7	6.6±5.8	3.6±1.9
结扎肺动脉后	10.6±6.1	1.9±1.3	9.7±9.3	3.5±1.6
术后9~10月	11.0±7.6	0.8±1.3	10.1±8.4	2.8±1.4

### 2.4 组织钙含量

两组血管壁钙含量有显著性差异( $P < 0.05$ ),

瓣膜钙含量无显著性差异( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2. 两组管道血管壁和瓣膜钙含量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{g/g}$ )

分 组	血管壁	瓣膜
戊二醛组	22.05 $\pm$ 10.78	0.88 $\pm$ 0.69
光氧化组	7.60 $\pm$ 8.02 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.23

a 为  $P < 0.05$ , 与戊二醛组比较。

## 2.5 形态学变化

肉眼下, 术前、术中戊二醛处理的牛颈静脉呈棕黄色, 血管壁较僵硬, 管壁轻度增厚; 瓣膜较柔软, 活动自如, 表面光滑, 缝合时有一定柔韧性。光氧化反应处理的牛颈静脉带瓣管道呈浅蓝色, 管道壁及瓣膜均柔软, 瓣膜活动好。术后 9~10 月, 戊二醛组 1 只犬的牛颈静脉带瓣管道管壁明显变硬, 有明显钙化结节, 管道内有赘生物形成, 可见血栓及赘生物附着于瓣膜基底部及其周围管壁, 成月牙形, 瓣膜明显变厚, 部分破坏, 与管壁有粘连, 活动受限; 光氧化处理组的牛颈静脉带瓣管道与周围组织亦有粘连, 但较疏松, 容易分离, 管壁无明显变硬, 未见有明显钙化点, 管壁内膜光滑, 无血栓形成, 瓣膜柔软, 仍透明, 活动自如, 有如新鲜牛颈静脉带瓣管道的瓣膜, 未见有钙化点。两组心脏标本右心室均无明显肥厚, 右心室流出道无梗阻, 管道无明显扩张, 植入前后的牛颈静脉带瓣管道内径无明显变化, 无假性动脉瘤形成(图 1)。光镜下, 戊二醛组管道组织胶原纤维玻璃样变性严重, 光氧化组管道亦有胶原松散、断裂现象, 但纤维变性、淋巴细胞浸润的程度轻于戊二醛组。光氧化组牛颈静脉管道的内壁有内皮样细胞生长, 而戊二醛组未有内皮样细胞生长(图 2)。

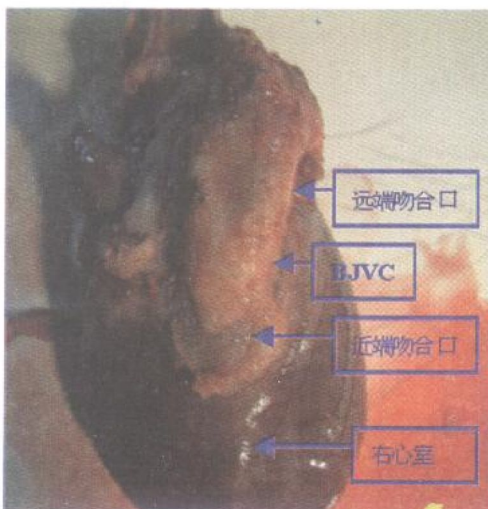


图 1. 心脏及牛颈静脉带瓣管道标本

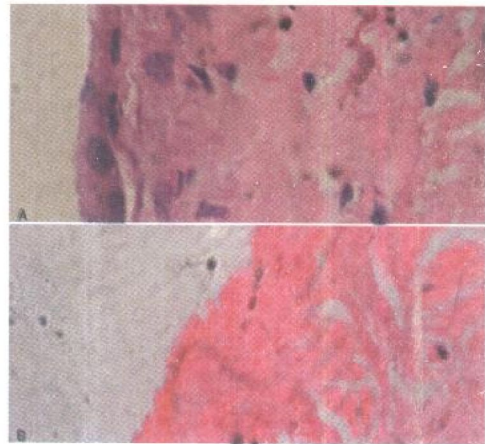


图 2. HE 染色 ( $\times 1000$ ) A 为光氧化组, B 为戊二醛组。

## 3 讨论

在先天性心脏病的治疗过程中, 有许多情况需要应用带瓣管道来重新建立右心室—肺动脉的连接, 带瓣管道是心血管外科必不可少的材料<sup>[6]</sup>。

自 1966 年 Ross 首次报道应用同种带瓣管道重建右心室—肺动脉连接成功以来<sup>[7]</sup>, 有多种带瓣管道被用于临床。目前, 可用于临床的带瓣管道, 主要被分为两大类: 同种管道及异种管道。公认比较好的带瓣管道是以含抗生素的营养液或液氮冷冻保存的同种异体的主动脉带瓣管道, 但存在着供体不足, 来源受限的问题, 其数量远远不能满足临床需要。异种带瓣管道多为嵌有生物瓣膜或机械瓣膜的 Dacron 人工合成材料血管, 人工瓣膜特别是机械瓣膜植入后容易形成血栓, 血栓栓塞的并发症较多, 目前已经很少应用<sup>[8]</sup>。因此, 继续寻找更为理想的、容易取材的带瓣管道以作为同种带瓣管道的替代品仍是心血管外科重大的课题。

牛颈静脉具有 2~4 组天然瓣膜, 瓣膜与管道融为一体, 全为天然材料, 不需要另外的缝制, 长度足够, 不需要加补其他材料; 牛颈静脉来自静脉系统, 管壁薄且柔软, 瓣膜开放压力低, 生物力学性能接近人体肺静脉瓣, 适合人体右心系统的低压环境, 在低压条件下具有良好的抗返流性能, 及管径选择范围大, 来源不受限制且便于缝合等优点, 可作为异种带瓣管道的一个新的选择。牛颈静脉作为右心室—肺动脉连接管道最早由日本人提出, 并作了动物实验的研究结果报道<sup>[9]</sup>。1999 年, 美国 Venpro 公司用戊二醛固定的方法对牛颈静脉带瓣管道进行处理, 研制成名为 Contegra<sup>TM</sup> 的临床产品。Corno 等<sup>[10]</sup>报道,



10例使用了牛颈静脉带瓣管道(Contegra™)作右心室流出道的重建,并与另外的7例用同种瓣的Ross手术进行统计学比较,无明显统计学差异,随访没有发现瓣膜的返流,跨瓣压差没有明显升高。由于牛颈静脉带瓣管道具有以上所述的优点,所以在心脏外科中被看作有应用前景的右心室-肺动脉连接生物材料。

目前处理牛颈静脉带瓣管道的方法有三种,分别是经戊二醛、环氧化物及Genipin。虽然有多种处理方法,但目前应用于临床的还是经典的戊二醛处理的牛颈静脉。Andreas等报道牛颈静脉管道在重建右心室-肺动脉连接术后中期血流动力学效果满意,但有血栓形成的危险。因而,现在对牛颈静脉的研究主要集中在对它的处理方法上,光氧化反应方法处理生物材料不需要刺激性强的化学交联剂的参与<sup>[3,4]</sup>,在光氧化反应过程中,蛋白质中的某些氨基酸能在光敏感剂的作用情况下,通过可见光的照射被特异性地氧化,并进一步导致组织的交联固定,具体的光氧化反应使生物材料产生交联的假设如下:光氧化反应改变了组织中组氨酸的咪唑环的结构,导致侧链的形成,该侧链再与组织中的赖氨酸的自由氨基反应形成稳定的分子内和分子间交链,从而加强了组织的稳定性能<sup>[8]</sup>。光氧化反应是一种酶促反应,它使组织基质复合物内产生改性及交联形成,最终形成一种更接近自然生物材料的物质,且不明显增加原生物材料的硬度。光氧化反应处理后的牛心包经研究生物相容性好,无明显的免疫原性,无明显钙化,且柔软度好。经光氧化反应处理固定的牛心包(PhotoFix™)组织在某些物理性能上(如柔软度、质地、热皱缩温度等)很像自然的、未经处理过的新鲜组织,但它在某些方面又不像自然材料,具有化学上的、酶学上的及体内的组织稳定性。光氧化反应处理的牛心包及血管移植物,由于没有经过有细胞毒性物质的处理,因而在体内更利于内皮细胞的生长<sup>[11]</sup>。

本实验结果发现,光氧化组管道血管壁钙含量较戊二醛组管道降低了65.6%,统计学上有显著性

差异( $P < 0.05$ ),光氧化反应处理后的管道的抗钙化性优于戊二醛固定处理的管道,这可能和戊二醛引起钙化的机理有关。而光氧化反应处理的方法没有这些促使组织钙化的原因,因而牛颈静脉管道的钙化程度轻。

通过本实验可知光氧化反应处理固定的牛颈静脉带瓣管道可用于重建右心室-肺动脉连接,血流动力学性能良好,与自体肺动脉相当,远期血流动力学性能尚待进一步观察研究。光氧化反应处理固定的牛颈静脉带瓣管道在狗的动物模型中,抗钙化性能优于戊二醛固定的牛颈静脉管道,并有利于体内的内皮化。

#### [参考文献]

- [1] Breyman T, Thies WR, Boethig D, Goerg R, Blanz U, Koerfer R. Bovine valve venous xenografts of RVOT reconstruction: results after 71 implantations [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, **21** (4): 703-710
- [2] Yen Chang, Cherr-Chi Tsai, Huang-Chien Liang, Hsing-Wen Sung. 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** (6): 1 208-218
- [3] Moore MA. Pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation: a review article [J]. *J Heart Valve Dis*, 1997, **6** (5): 521-526
- [4] Moore MA, Phillips RE. Biocompatibility and immunologic properties of pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation [J]. *J Heart Valve Dis*, 1997, **6** (3): 307-315
- [5] 冯耀光,胡建国,吴忠仕,胡铁辉,邓又华,王晖,等. 光氧化反应处理牛颈静脉带瓣管道的形态学与理化性能研究 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2004, **29** (4): 429-431
- [6] Homann M, Haehnel JC, Mandler N, Paek SU, Holper K, Meisner H, 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
- [7] Ross DN, Somerville J. Correction of pulmonary atresia with a homograft aortic valve [J]. *Lancet*, 1966, **23**: 1 446-447
- [8] Adams AK, Tamlan EA, Campbell L, Mellroy BK, Moore MA. Crosslink formation in porcine valve stabilized by dye-mediated photooxidation [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, **57**: 582
- [9] Corno AF, Humi M, Griffin H, Jeanrenaud X, von Segesser LK. Glutaraldehyde-fixed bovine jugular vein as a substitute for the pulmonary valve in the Ross operation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, **122**: 493-494
- [10] Corno AF, Humi M, Griffin H, Calar OM, Payot M, Sekarski N, et al. Bovine jugular vein as right ventricle-to-pulmonary artery valved conduit [J]. *J Heart Valve Dis*, 2002, **11** (2): 242-247
- [11] Bengtsson LA, Phillips R, Haegerstrand AN. In vitro endothelialization of photooxidatively stabilized xenogeneic pericardium [J]. *Ann Thorac Surg*, 1995, **60** (Suppl 2): S365-368

(此文编辑 文玉珊)