

小口径人工血管表面改性研究进展

夏成勇 综述, 刘长建 审校

(南京大学医学院附属鼓楼医院血管外科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 外科学; 人工血管; 小口径; 表面改性; 内皮细胞

[摘要] 由于低血流量, 小口径人工血管移植后, 腔内血栓形成, 通畅率较低, 因此有必要对小口径人工血管进行表面的接枝改性, 减少血栓形成, 增加通畅率。对人工血管的表面改性主要有以下几方面: 人工血管表面结构的改变; 增加人工血管表面内皮细胞的粘附; 人工血管表面接枝改性, 增加血液相容性。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

当人工血管移植体内后, 材料表面会吸附 γ -球蛋白或纤维蛋白原, 易于使血液中细胞成分如血小板粘附表面, 血小板一旦被吸附, 可以变成扁平状而被激活, 从而导致血小板不可逆聚集而产生血栓。在大于 6 mm 口径人工血管移植中, 有较高的血管通畅率, 而在小口径人工血管 (< 6 mm) 移植中, 由于低血流量状态, 易形成血栓。因此有必要对小口径人工血管进行表面改性, 增加血液相容性。人工血管表面与血液的相互作用取决于材料表面的性质如表面能、表面的形态结构、表面电荷(静电电位)、与水的亲和力以及表面化学性质。材料的表面性质不同, 会引发不同的凝血途径。本文就小口径人工血管表面改性的研究进展综述如下。

1 人工血管材料表面结构的改变

细胞所接触的人工血管表面结构对细胞的位向和生物相容性、蛋白质的合成与分泌、基因表达与识别都有重要影响。而微米和纳米技术在生物领域中的应用, 激发人们去研究表面结构与细胞生长两者之间的关系。2002 年 Miller 等^[1,2]构建了有纳米表面特征的聚乳酸更易促进血管内皮细胞和平滑肌细胞的粘附, 并研究了相关的机理, 发现有表面纳米特征的聚乳酸表面更容易吸附玻粘蛋白和纤维连接蛋白。韩本松等^[3]利用等离子体技术引发小肠粘膜下层组织膜(small intestinal submucosa, SIS)表面纳米改性, 发现改性 SIS 膜表面呈现出“岛状”、“沟槽样”纳米仿生形态, SIS 小口径血管支架在移植 6 周仍保持通畅, 组织学检测显示管腔内壁有完整的内皮覆盖。

微槽效应以及表面微小的钉和柱对内皮细胞的粘附也会有较大的影响。Ratner 等^[4]用蛋白质作模板, 研究了一种纳米范围固体基体的模板, 首先把模板蛋白吸附在云母上, 再在模板蛋白及云母上吸附二糖溶液, 然后用 13.56 MHz 的射频辉光放电等离子体处理后, 形成与二糖共价键合的 10 ~ 30 nm 厚的氟聚合物薄膜。将此氟聚合物薄膜用环氧树脂

固定, 烘干, 剥离云母后浸入 NaOH / NaClO 中溶解掉模板蛋白, 这样与蛋白相符的纳米凹陷就会留在聚合物表面, 形成模板印迹纳米结构。它可高度选择性识别模板蛋白, 如白蛋白、纤维蛋白原等。如果使模板印迹纳米结构高度选择抗凝血生物分子, 可大大提高抗凝血活性。

低温等离子体技术包括低温等离子体聚合、低温等离子体表面处理、低温等离子体接枝聚合等, 它可以对材料表面进行镀膜、聚合、修饰和改性等处理, 改善生物材料的亲水性、血液相容性。Garfinkle 等^[5]在内径为 4 mm 的聚酯人造血管内壁均匀沉积一层含氟聚合物的等离子体聚合膜, 从而降低了表面能, 使纤维蛋白的吸附量减少, 提高了抗凝血性能, 有效地改善了血液相容性。低温等离子体表面处理主要是用非聚合性的无机气体(如 Ar、N₂ 和 O₂ 等)产生的等离子体对材料表面进行处理。常用的处理方法有两类: 一类是常压低频或高压中频电晕放电, 另一类是低压高频辉光放电。苏葆辉等^[6]利用 N₂ 和 NH₃ 的混合气体对几种口腔生物材料进行等离子体处理, 并由 XPS 证实材料表面引入了生物活性基团氨基(-NH₂)。体外生物实验结果表明, 材料的亲水性、细胞的吸附与生长得到显著改善。低温等离子体接枝聚合是通过等离子体表面处理技术使材料表面产生活性中心, 引发单体在材料表面接枝聚合, 或利用材料表面活性基团通过化学反应接枝, 材料通过表面接枝聚合, 表面上生长出一层具有新的特殊性能的接枝聚合膜, 从而改善材料表面性能。

2 人工血管材料表面内皮细胞内衬

内皮细胞(endothelial cell, EC)具有抗凝、调控细胞增殖和抑制血栓形成等重要功能。由于内皮细胞具有很强的免疫原性, 所以, 用于人工血管内皮化的细胞主要取自体的内皮细胞。近年来, 随着干细胞尤其是成体干细胞研究技术的成熟, 通过干细胞定向培养技术建立无免疫原性的自体内皮细胞株值得关注。

直接把内皮细胞种植在人工血管材料表面粘附能力低, 移植体内被血流冲刷后大多脱落太多。为了提高材料表面的内皮细胞化速度, 除了增加内皮细胞的种植密度、延长内

[收稿日期] 2007-01-05 [修回日期] 2007-08-05

[作者简介] 夏成勇, 博士研究生, 研究方向为人工血管改性和组织工程血管, E-mail 为 chengyong_xia@163.com。刘长建, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为血管外科, E-mail 为 dr_cjliu@hotmail.com。

皮细胞衬层的体外孵育时间和促进人工血管上融合内皮层的形成外,目前还有以下几个方面的研究。

2.1 改变植入内皮细胞的带电性

正常人体血管壁内皮细胞、血液中的红细胞、白细胞及血小板等均带负电荷,因此细胞间不易发生粘附。利用这一特性,可以进行特定的设计使材料表面带上负电荷,从而减少血栓的形成。但人工血管内壁携负电荷后,对同样携负电荷的内皮细胞却有排斥作用,不易粘附内皮形成内膜。用静电转换法,可使其内壁暂时降低负电荷或转为正电荷,这样即可大大减少内皮细胞的丢失。

2.2 种植方法的影响

Gulbins 等^[7]在 4 mm 直径聚氨酯人工血管表面,行内皮细胞的种植,发现混合种植培养成纤维细胞和平滑肌细胞,将更有利于内皮细胞的粘附。

2.3 人工血管壁上预衬可吸收的细胞外基质粘附蛋白

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)不仅为细胞提供粘附结构,而且对细胞的迁移、增殖分化以及基因表达都具有调控作用。因此在人工血管壁上预衬 ECM 粘附蛋白和生长因子,可以提高内皮细胞的粘附、增殖及分化能力。

2.4 利用生物素与抗生物素蛋白的特异结合力增加内皮细胞的粘附

Mathur 等^[8]在生物素-抗生物素影响内皮细胞粘附的短期(1 h)研究基础上,研究了细胞粘附 24 h 后的情况,发现内皮细胞粘附后,生物素和抗生物素蛋白在基底灶性接触,并影响细胞铺展,粘着斑密度增加。

2.5 生物反应器中对人工血管进行二维流动培养

研究发现,切应力作用能够促进内皮细胞应力纤维和粘附结构的形成,调控内皮细胞的多种生理功能和细胞增殖。许多研究者尝试利用生物反应器研究表面,生物反应器不仅提供了机械性的刺激,而且为适应长期的培养提供了营养和氧供。

2.6 刺激细胞生长因子的作用和内皮细胞的基因修饰

目前已知的能刺激内皮细胞增生的蛋白有酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), Conklin 等^[9]用 bFGF 处理肝素固化的去细胞支架,明显增加人微血管内皮细胞和内皮祖细胞的增殖,并使种植的细胞在流体作用下能相对稳固。

利用基因工程技术,人们对内皮细胞进行基因修饰,加强其分泌细胞因子的能力,促进其粘附生长以及抗血栓功能。目前,已经有多种基因如 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)、组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF-1)和 VEGF 等已经或正在用于内皮细胞的基因修饰研究。

3 人工血管表面的接枝改性

将具有生物活性的分子固定在材料表面提高其亲水性

及生物活性,降低表面自由能,可以明显地降低纤维蛋白原的吸附、沉积以及血小板的活化,显现出极好的生物相容性,称之为人工血管表面的接枝改性。有关高分子生物材料表面接枝的研究主要集中在两个方面。一是接枝方法的研究,二是通过接枝单体的设计或选择来研究表面结构、性质的改变对抗凝血活性的影响。

3.1 接枝磷酰胆碱聚合物

据 Ishihara 等^[10]研究表明,2-甲基丙烯酸氧基乙基磷酰胆碱(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC)聚合物能够降低蛋白质吸附,抑制血小板的粘附与活化。MPC 聚合物之所以具有如此性质是因为 MPC 聚合物中含有磷酰胆碱基团,它是细胞膜外层组成结构成分,使其易于与细胞相容。其次是因为在 MPC 聚合物极性基团的周围产生的水性结构,大大降低了材料与血液的界面自由能,因此即使有蛋白质吸附在 MPC 聚合物表面也不会使吸附的蛋白质构象发生变化。所以在血管内支架表面接枝 MPC 聚合物可以提高血管支架的血液相容性。

3.2 肝素固化的研究

肝素是一种天然有效、应用最广泛的抗凝剂。研究表明,肝素预涂的表面具有血液相容性是因为其对血浆蛋白具有选择吸附性^[11]。Bosiers 等^[12]2006 年用肝素固化的膨体聚四氟乙烯(expanded poly-tetrafluoroethylene, ePTFE)人工血管行股腓动脉旁路术,1 年后结果表明,特别在膝下动脉旁路和远侧流出道较差的情况下,肝素固化的 ePTFE 人工血管达到了预期的早期通畅率和保肢结果。

3.3 其他研究

Kikuchi 等^[13]在人工血管表面固定抗凝生物分子和蛋白, Karrer 等^[14]通过在 ePTFE 人工血管上涂布 PPS-PEG(聚丙烯硫化物-聚乙烯乙二醇), Chaouat 等^[15]通过在直径 2 mm 的人工血管支架上用交联的方法结合多糖, Heise 等^[16]通过在 4 mm 直径 ePTFE 人工血管上接枝聚乙二醇、水蛭素及前列腺素复合物,均较对照组有较高的通畅率和减少内膜增生。除了临床常用的涤纶(Dacron)和 ePTFE 人工血管外, Yang 等^[17]用二相性的弹力橡胶, Buttafoco 等^[18]用丙交酯复合环丙烷碳酸酯材料,他们做成的人工血管在动物试验中都取得了一定的效果。尽管通过生物工程学和临床医学等多学科的努力,小口径人工血管的血液相容性研究取得了巨大成就,但离临床实际应用尚有差距,许多问题亟待解决,如高强度往往导致低顺应性,而这和吻合口的内膜增生有关,以及异体内皮细胞的免疫原性、自体内皮细胞和平滑肌细胞扩增所需要的时间长。临床对小口径人工血管的研究需要生物学、工程学和临床三方面的共同研究,推动功能性小口径人工血管的发展。

[参考文献]

- [1] Miller DC, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of vascular and bladder cells on poly-lactic-co-glycolic acid polymers with nanostructured surfaces [J]. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2002, 1 (2): 61-66.
- [2] Miller DC, Haberstroh KM, Webster TJ. Mechanism(s) of increased vascular cell adhesion on nanostructured poly (lactic-co-glycolic acid) films [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 73 (4): 476-484.

- [3] 韩本松, 范存义, 刘生和. 表面纳米仿生改性的组织工程血管支架材料对猪血液相容性的影响[J]. 中华医学杂志, 2006, 86 (29): 2 065-068.
- [4] Shi H, Tsai WB, Garrison MD, Ferrari S, Ratner BD. Template imprinting nanostructured surfaces for protein recognition [J]. *Nature*, 1999, 398 (6728): 593-597.
- [5] Garfinkle AM, Hoffman AS, Ratner BD, Reynolds LO, Hanson SR. Effects of a tetrafluoroethylene glow discharge on patency of small diameter dacron vascular grafts [J]. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1984, 30: 432-439.
- [6] 苏葆辉, 冉均国, 陈治清. 低温等离子体处理聚羟基磷酸钙钠提高生物活性的研究[J]. 航天医学与医学工程, 2003, 6 (1): 68-71.
- [7] Gulbins H, Pritisanac A, Dauner M, Petzold R, Goldemund A, Doser M, et al. Seeding of human vascular cells onto small diameter polyurethane vascular grafts [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, 54 (2): 102-107.
- [8] Mathur AB, Chan BP, Truskey CA, Reichert WM. High affinity augmentation of endothelial cell attachment: long-term effects on focal contact and actin filament formation [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 66 (4): 729-737.
- [9] Conklin BS, Wu H, Lin PH, Lumsden AB, Chen C. Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin coated vascular graft [J]. *Artif Organs*, 2004, 28 (7): 668-675.
- [10] Ishihara K, Oshida H, Endo Y, Ueda T, Watanabe A, Nakabayashi N. Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism [J]. *J Biomed Mater Res*, 1992, 26 (16): 1 543-552.
- [11] Weber N, Wendel HP, Ziemer G. Hemocompatibility of heparin coated surfaces and the role of selective plasmaprotein adsorption [J]. *Biomaterials*, 2002, 23 (2): 429-439.
- [12] Bosiers M, Deloese K, Verbist J, Schroe H, Lauwers G, Lansink W, et al. Heparin bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for femoropopliteal and femorocrural bypass grafting: 1-year results [J]. *J Vasc Surg*, 2006, 43 (2): 318-319.
- [13] Kikuchi A, Taira H, Tsuruta T, Hayashi M, Kataoka K. Adsorbed serum protein mediated adhesion and growth behavior of bovine aortic endothelial cells on polyamine graft copolymer surfaces [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1996, 8 (2): 77-90.
- [14] Karrer L, Duwe J, Zisch AH, Khabiri E, Cikiricicoglu M, Napoli A, et al. PPS-PEG surface coating to reduce thrombogenicity of small diameter ePTFE vascular grafts [J]. *Int J Artif Organs*, 2005, 28 (10): 993-1 002.
- [15] Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (32): 5 546-553.
- [16] Heise M, Schmidmaier G, Husmann I, Heidenhain C, Schmidt J, Neuhaus P, et al. PEG-hirudin/ iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006, 32 (4): 418-424.
- [17] Yang J, Motlagh D, Webb AR, Ameer GA. Novel biphasic elastomeric scaffold for small diameter blood vessel tissue engineering [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11 (11-12): 1 876-886.
- [18] Buttafoco L, Boks NP, Engbers-Buijtenhuijs P, Grijpma DW, Poot AA, Dijkstra PJ, et al. Porous hybrid structures based on P(DLLA-co-TMC) and collagen for tissue engineering of small-diameter blood vessels [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006, 79 (2): 425-434.

(此文编辑 许雪梅)

•读者•作者•编者•

我刊报道的疾病和诊治方法

- | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 肥胖症 | 9.4 动脉硬化性闭塞症 | 15 脑动脉硬化症 |
| 2 小儿肥胖病 | 9.5 动脉硬化性周围动脉缺血 | 16 动脉硬化性精神病 |
| 3 原发性高脂蛋白血症 | 10 高血压病 | 17 其他缺血性脑血管疾病 |
| 4 高脂血症 | 11 周围血管疾病 | 18 粥样栓塞性肾病 |
| 5 原发性肺动脉高压症 | 11.1 血栓闭塞性脉管炎 | 19 肾动脉血栓形成或栓塞 |
| 6 早老症 | 11.2 雷诺综合征 | 20 糖尿病合并心血管疾病 |
| 6.1 弥散性动脉粥样硬化 | 11.3 手足紫绀症 | 20.1 糖尿病并发冠心病 |
| 6.2 冠状动脉栓塞 | 11.4 急性动脉栓塞 | 20.2 糖尿病性心肌梗死 |
| 7 冠状动脉粥样硬化性心脏病 | 11.5 肢端动脉痉挛病 | 20.3 糖尿病并发血管病变 |
| 7.1 原发性心跳骤停 | 12 伯格氏病 | 21 代谢综合征 |
| 7.2 心绞痛 | 13 短暂性脑缺血发作 | 22 血管疾病的影像学诊断 |
| 7.3 心肌梗死 | 13.1 黑矇 | 23 血管疾病的手术疗法 |
| 7.4 冠状动脉性心力衰竭 | 13.2 视野异常 | 23.1 动脉旁路移植术 |
| 7.5 缺血性心律失常 | 14 脑梗死 | 23.2 动脉内膜切除术 |
| 8 急性冠状动脉综合征 | 14.1 脑血栓形成 | 23.3 激光心肌内血管重建术 |
| 9 动脉硬化症 | 14.2 脑血管栓塞 | 23.4 经皮腔内血管成形术 |
| 9.1 颈动脉硬化症 | 14.3 腔隙性脑梗死 | 23.5 其它血管手术 |
| 9.2 肾动脉硬化 | 14.4 多发梗死性痴呆 | 24 血管疾病的基因疗法 |
| 9.3 动脉硬化性主动脉瘤 | | |

(胡必利编写)