

## 磷酸胆碱接枝涤纶人工血管的生物相容性

夏成勇, 刘长建, 乔彤, 黄佃, 刘晨, 冉峰

(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; 磷酸胆碱; 人工血管; 生物相容性; 兔

[摘要] 目的 通过臭氧活化的方法在涤纶人工血管表面接枝 2-甲基丙稀酰氧基乙基磷酸胆碱, 进行接枝后人工血管血液相容性研究。方法 通过臭氧活化的方法, 在涤纶人工血管表面接枝 2-甲基丙稀酰氧基乙基磷酸胆碱, 接枝后的涤纶人工血管修剪后作兔腹主动脉补片(实验组), 并和未接枝涤纶人工血管作对照。术后观察兔腹主动脉人工血管通畅率、吻合口狭窄程度、血流量和吻合口周围 BrdU 阳性细胞数。结果 接枝 2-甲基丙稀酰氧基乙基磷酸胆碱的涤纶人工血管补片吻合后, 兔腹主动脉通畅率较对照组无明显差异; 实验组兔腹主动脉吻合口狭窄程度小于对照组, 而吻合口血流量大于对照组, 吻合口周围 BrdU 阳性细胞数明显少于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 涤纶人工血管经接枝 2-甲基丙稀酰氧基乙基磷酸胆碱后, 能有效抑制吻合口内膜和平滑肌增生, 减少吻合口狭窄程度, 增加血流量。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

### Biocompatibility of Dacron Vascular Prosthesis Coated with 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine in Animal Model

XIA Cheng-Yong, LIU Chang Jian, QIAO Tong, HUANG Dian, LIU Chen, and RAN Feng

(Department of Vascular Surgery, Nanjing Gulou Hospital Affiliated to Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[KEY WORDS] Phosphorylcholine; Vascular Prosthesis; Biocompatibility; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To study the biocompatibility of Dacron vascular prosthesis surface in rabbit model coated with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) by ozonization. **Methods** Dacron vascular prosthesis was exposed to ozone and then followed by grafted polymerization with MPC. Pruned the vascular prosthesis coated with MPC and patched the abdominal aorta of twelve rabbits (treated group) controlled with uncoated grafts. The patency rate of abdominal aorta, level of anastomotic stenosis, volume of blood flow of vascular prosthesis and the BrdU labeling index were observed. **Results** After patched the abdominal aorta of rabbits using different Dacron vascular prosthesis, there was no significant difference in the patency rate between the two groups. Level of stenosis in anastomotic area was less in treated group than control group. The BrdU labeling index in neointimal tissue and smooth muscle around stoma was significantly less ( $P < 0.05$ ) in the treated group than in the control group. **Conclusions** These data demonstrated that Dacron vascular prosthesis coated with MPC significantly reduces anastomotic intima and smooth muscle hyperplasia, reduces level of anastomotic stenosis and increase volume of blood flow of vascular prosthesis.

在心血管材料中, 涤纶(Dacron)材料易于加工成独特的微孔结构和具有优异的力学性质而被认为是比较具有应用潜力的血管移植材料。但它们疏水的表面易于诱导凝血, 形成血栓。本试验通过在涤纶人工血管表面接枝磷酸胆碱(phosphorylcholine, PC)和甲基丙烯酸酯的共聚物 2-甲基丙稀酰氧基乙基磷酸胆碱(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC), 进行接枝后人工血管动物实验的血液相容性研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物及分组

新西兰大白兔 24 只, 重约 2~3 kg, 雌雄不限, 由江苏省实验动物中心提供, 随机分为实验组和对照组, 每组 12 只。

#### 1.2 涤纶人工血管表面接枝 2-甲基丙稀酰氧基乙基磷酸胆碱

涤纶人工血管直径 8 mm, 由美国波士顿科学有限公司提供, 将涤纶人工血管修剪成 5 mm × 10 mm 补片, 经臭氧活化, 真空脱气, 加入 MPC<sup>[1]</sup> 溶液, 恒温箱中接枝聚合, 最后干燥<sup>[2]</sup>。修剪成 5 mm × 2 mm 的椭圆形补片保存。

#### 1.3 动物实验模型的建立

将新西兰大白兔用盐酸氯胺酮全身麻醉, 静脉

[收稿日期] 2007-03-03 [修回日期] 2007-12-05

[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 chengyongxia@163.com。刘长建, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事血管外科研究, E-mail 为 dr\_cjliu@hotmail.com。乔彤, 博士, 副主任医师, 从事血管外科研究, E-mail 为 joutoo@163.com。

推注肝素 2 mg/kg 后阻断腹主动脉, 阻断间纵行切开腹主动脉前壁, 长约 5 mm; 血管腔内肝素生理盐水冲洗, 远端及分支灌注肝素生理盐水。实验组 12 只兔, 将接枝后的涤纶人工血管补片以 8-0 国产聚丙烯线吻合到腹主动脉纵形切口上, 间断缝合, 腹主动脉阻断时间约 25 min; 对照组 12 只兔, 用未接枝的涤纶人工血管, 余同前。术后青霉素 40 万 u/d、肝素 2 mg/(kg·d) 静脉推注, 共 7 天。

#### 1.4 组织学和形态学的观察

实验过程中, 分别于术后 1、7、14、28 天 B 型超声波检查人工血管通畅率, 并记录腹主动脉血流速度和腹主动脉狭窄程度。

术后 28 天时, 盐酸氯胺酮全身麻醉, 游离出腹主动脉, 兔腹主动脉放血致死, 将补片及两端长约 2 mm 正常动脉一起取出, 放入 0.3 g/L 的 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) (sigma 公司) 中 37℃ 孵育 1 h 后<sup>[3]</sup>, 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 层厚切片, HE 染色。光镜观察吻合口周围兔腹主动脉血管内膜、弹力纤维和胶原纤维等情况。

#### 1.5 免疫组织化学检测

将标本行免疫组织化学检测, 一抗为小鼠抗人尿嘧啶脱氧核苷单克隆抗体, 二抗选用非生物素辣根酶标记羊抗小鼠多聚体 (北京中山生物技术有限公司), 并在显微镜下计数吻合口周围 BrdU 阳性细胞数。

#### 1.6 统计学处理

数据统计以软件 stata 7.0 统计, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验比较实验组与对照组间差异。

表 2. 各时间点兔腹主动脉人工血管补片移植术后腹主动脉狭窄程度

分 组	1 d	7 d	14 d	28 d
对照组	11.21% ± 1.67%	50.72% ± 2.24%	80.93% ± 3.35%	90.26% ± 6.39%
实验组	10.41% ± 0.89%	35.25% ± 2.19% <sup>a</sup>	67.91% ± 2.76% <sup>a</sup>	77.43% ± 5.41% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

#### 2.3 B 超记录腹主动脉血流速度和血流量

B 超记录腹主动脉血流速度, 通过公式: 血流量 (L/min) =  $\pi \times r^2 \times V \times 60$  ( $\pi$  为常数,  $V$  为每秒血流速度,  $r$  为动脉半径) 计算腹主动脉血流量。术后第 1 天, 两组腹主动脉血流量无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 术后第 7 天起, 实验组血流量大于对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ , 表 3)。

#### 2.4 免疫组织化学染色结果

每只兔取一张吻合口部位切片行免疫组织化学检测, 每张切片取 10 个视野计算 BrdU 阳性细胞数

## 2 结果

### 2.1 手术结果及血管通畅率

手术过程中无兔死亡; 分别于术后 1、7、14 和 28 天 B 型超声波检查人工血管通畅情况, 吻合口见血流视为通畅, 未见血流为闭塞, 实验组与对照组腹主动脉通畅率无统计学差异 (81% ± 9% 比 74% ± 13%,  $P < 0.05$ ; 表 1)。对照组术后第 3 天和实验组术后第 4 天各有 1 只兔双下肢完全截瘫, 分别在术后第 7 天和第 9 天死亡, 解剖发现腹主动脉闭塞, 以 2 例血管闭塞纳入以后的统计处理; 对照组术后第 18 天有 1 例死亡, 解剖发现腹主动脉不完全闭塞, 腹腔有感染, 未纳入 28 天的统计。实验观察期间另有兔出现不同程度的双下肢截瘫, 未见死亡。

表 1. 各时间点兔腹主动脉人工血管补片移植术后通畅数/移植总数(例)

分 组	1 d	7 d	14 d	28 d
对照组	12/12	11/12	8/12	5/11
实验组	12/12	11/12	9/12	7/12

### 2.2 腹主动脉狭窄程度

以  $(b-a) \div b \times 100\%$  表示腹主动脉狭窄程度, 其中  $a$  为最狭窄处口径,  $b$  为正常血管口径。术后第 1 天, 两组兔腹主动脉狭窄程度无统计学差异; 第 7 天以后, 实验组兔腹主动脉狭窄程度小于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

(呈棕褐色反应的核为阳性细胞, 即 s 期增殖细胞)。实验组 BrdU 阳性细胞数 (2.35 ± 0.58) 明显少于对照组 (6.17 ± 0.49), 差异有显著性 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

表 3. 人工血管补片移植后兔腹主动脉血流量 (L/min)

分 组	1 d	7 d	14 d	28 d
对照组	20.1 ± 2.2	14.1 ± 1.1	8.9 ± 1.6	5.4 ± 0.6
实验组	20.2 ± 2.2	16.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	13.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.9 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

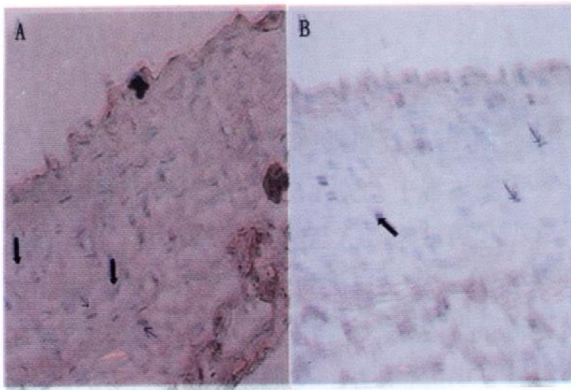


图 1. 血管壁 BrdU 免疫组织化学检查 (HE,  $\times 200$ ) A 为实验组, B 为对照组; 粗箭头示正常细胞核, 细箭头示 BrdU 阳性细胞核。

### 3 讨论

材料与血液的相互作用取决于材料表面的性质, 材料的表面性质不同, 会引发不同的凝血途径。材料表面的改性包括材料表面结构的改变、内皮细胞固定、固定抗凝血蛋白及表面接枝。表面接枝改性是发展不凝血材料的好途径, 既可提高材料表面的不凝血性, 又能保留材料原有的物理力学性能。目前接枝改性较好的材料有磷酸胆碱、肝素化材料和聚乙二醇。

自 1990 年, Ishihara 等<sup>[1]</sup>研究合成了 MPC, 在多种生物材料和金属材料表面接枝磷酸胆碱已有报道, 并证明能增加材料的生物相容性且无毒性副作用<sup>[4,5]</sup>。国内有在聚丙烯薄膜表面进行等离子体处理, 还原胺化法成功接枝磷酸胆碱<sup>[6]</sup>。文献检索涤纶人工血管接枝 MPC 未有报道, 本实验通过在涤纶人工血管表面接枝 MPC, 研究在体的内膜和平滑肌增生情况和对血管通畅性的影响。

涤纶人工血管一旦移植后, 血浆蛋白、血小板和白细胞的沉积, 单核细胞的浸润, 内皮细胞、平滑肌细胞的迁移就开始发生, 就会在其腔内形成纤维层, 纤维层的形成一方面由血液蛋白沉积所致, 另一方面是由外层纤维组织透过管壁涤纶纤维间隙向管腔内生长, 并逐渐被自吻合口移行的宿主自体组织替代, 最终形成新内膜。新内膜和吻合口平滑肌细胞的增殖决定了人工血管的通畅性。既往实验表明, 在人工材料表面接枝 MPC, 能减少纤维蛋白原的吸附, 并通过减少血小板的粘附和活化, 减少新内膜的增生, 增加生物材料的生物相容性<sup>[4]</sup>, 并减少病原微生物的吸附<sup>[7,8]</sup>。

本实验结果表明, 实验组和对照组在血管通畅率上无明显差异 ( $P < 0.05$ ), 但在血流量和吻合口狭窄程度方面, 对照组腹主动脉血流量低于实验组, 吻合口狭窄程度高于实验组, 表明接枝 MPC 对减少吻合口狭窄、增加腹主动脉血流量有显著作用。

BrdU 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷的类似物, 能选择性地掺入到处于细胞周期 S 期 (即 DNA 合成期) 细胞的单链 DNA 核苷酸序列中。新鲜组织在 BrdU 液中  $37^{\circ}\text{C}$  浸浴, 使增殖期细胞可竞争性地替代胸腺嘧啶而掺入, 成为细胞增殖的重要标志。本实验中进一步通过免疫组织化学检测人工血管吻合口周围的腹主动脉切片 BrdU 阳性细胞数, 来比较实验组和对照组的平滑肌细胞增殖情况, 结果表明, 对照组吻合口平滑肌细胞增殖比实验组更显著。

总的来说, 通过生物、工程和临床医学等多学科的努力, 小口径人工血管的生物相容性研究取得了巨大成就, 但仍有许多问题尚待解决。本实验通过接枝 MPC 改性涤纶人工血管, 在兔腹主动脉补片移植过程中取得了较好的抑制吻合口狭窄的作用, 可能是通过抑制血小板和纤维蛋白原的粘附, 以及内膜和平滑肌细胞增殖, 从而减少吻合口狭窄的发生率。

#### [参考文献]

- [1] Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes [J]. *Polym J*, 1990, **22** (5): 355-360.
- [2] Xu JM, Yuan YL, Shan B, Shen J, Lin SC. Ozon-induced grafting phosphorylcholine polymer onto silicone film to improve hemocompatibility [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, **30** (3): 215-223.
- [3] Smith MD, Healy E, Thompson V, Morley A, Rees JL. Use of in situ detection of histone mRNA in the assessment of epidermal proliferation: comparison with the Ki67 antigen and BrdU incorporation [J]. *Br J Dermatol*, 1995, **132** (3): 359-366.
- [4] Campbell EJ, O'Byrne V, Stratford PW, Quirk I, Vick TA, Wiles MC, et al. Biocompatible surfaces using methacryloyl phosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer [J]. *ASAIO J*, 1994, **40**: 853-857.
- [5] Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K. In vitro and ex vivo blood compatibility study of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) copolymer-coated hemodialysis hollow fibers [J]. *J Artif Organs*, 2003, **6** (4): 260-266.
- [6] 宫永宽, WINNIK, Françoise M. 聚丙烯表面的生物相容性修饰: 表面氨基放大还原胺化接枝磷酸胆碱[J]. *化学学报*, 2005, **63** (7): 643-647.
- [7] Hirota K, Murakami K, Nemoto K, Miyake Y. Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) copolymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **248** (1): 37-45.
- [8] Shigeta M, Tanaka T, Koike N, Yamakawa N, Usui M. Suppression of fibroblast and bacterial adhesion by MPC coating on acrylic intraocular lenses [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2006, **32** (5): 859-866.

(此文编辑 许雪梅)