

去细胞牛颈静脉构建组织工程右心带瓣管道体内实验初步研究

李 悟^{1△} 王忠华¹ 王卫东¹ 张 民² 刘维永³ 金 峰³

(1 兰州军区乌鲁木齐总医院心胸外科 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 兰州军区乌鲁木齐总医院超声科 新疆 乌鲁木齐 830000; 3 第四军医大学西京医院心血管外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:将体外构建的组织工程右心带瓣管道,以带瓣补片的形式移植于犬主肺动脉,观测带瓣管道材料体内情况。方法:去细胞处理牛颈静脉体,无菌处理后种植标记过的犬骨髓间质干细胞,构建组织工程带瓣管道,犬开胸手术,将体外构建的组织工程右心带瓣管道,以带瓣补片的形式移植于犬主肺动脉,术后4、8、12行胸部B超检查;取出补片,HE染色;荧光显微镜下标记细胞检测;样本钙含量测定。结果:术后犬胸部B超观察:瓣叶无增厚,钙化,管道血流通畅,无血栓及钙化。术后4、8、12周除了瓣叶逐渐缩小外,补片无动脉瘤形成,瓣膜表面光滑,无血栓形成,弹性良好,血管壁内面光滑,无血栓形成。种植种子细胞牛颈静脉带瓣补片成活。4周钙含量增加,8周时候,钙含量又有增加,12周时钙含量与8周相比无明显变化。结论:组织工程技术构建组织工程右心带瓣管道有可行之处。

关键词:组织工程;牛;颈静脉;带瓣管道

中图分类号:Q95-3 R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)02-246-03

Experimental Study on Construction of Valved Conduits by Decellularized Bovine Jugular Vein in Vivo

LI Wu^{1△}, WANG Zhong-hua¹, WANG Wei-dong¹, ZHANG Min², LIU Wei-yong³, JIN Feng³

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Urumqi General Hospital, Lanzhou Command, Urumqi, 830000;

2. Department of Ultrasound Diagnosis, Urumqi General Hospital, Lanzhou Command, Urumqi, 830000;

3. Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT Objective: To implant bovine jugular vein conduit containing living autologous cells into the canine pulmonary artery and to observe the influence in vivo environment. **Methods:** Tissue-engineered right ventricular valved conduit was constructed in vitro using the decellularized bovine jugular vein as the scaffolds, the canine bone marrow mesenchymal stem cells as the seeded cells. These patch were implanted into 10 canine pulmonary artery and explanted by 4, 8, 12 weeks interval respectively to observe their morphologic and histologic changes. **Results:** The pulmonary artery with patch were patent with no narrowing, without thrombus organization. The surface of leaflet was partially covered with seeded cells. **Conclusions:** Labeled BMSCs can be planted on dcellularized BJV to reconstruction tissue-engineered right ventricular valved conduit.

Key words: tissue engineering; bovine; jugular vein; valved conduit

Chinese Library Classification: Q95-3 R318 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-246-03

前言

目前国内外,右室流出道重建重建材料主要应用 Contegra 管道(戊二醛处理的牛颈静脉)。但近年观察发现 Contegra 管道仍未摆脱戊二醛处理生物材料的命运—钙化和衰坏,多数病人需二次手术更换管道^[1]。牛颈静脉取材方便,天然的静脉瓣在低压系统中抗返流能力强,管径选择范围大(12~22mm),是制作带瓣管道的良好材料。本研究去细胞处理牛颈静脉,拟构建组织工程右心带瓣管道,并进行了初步体内实验研究。

1 材料与方法

作者简介:李悟,(1972-),男,医学博士,副主任医师,主要研究方向:心血管组织工程

△通讯作者:李悟,E-mail:goodli002@163.com

(收稿日期:2010-07-28 接受日期:2010-08-30)

1.1 材料

去细胞处理牛颈静脉体,无菌处理后种植标记过的犬骨髓间质干细胞,体外构建组织工程右心带瓣管道^[2]。

1.2 动物

健康杂种犬 10 只(第四军医大学实验动物中心,平均年龄:12±3 月,体重:20±Kg,雌雄不限)。

1.3 体内移植

杂种犬,以 3%戊巴比妥钠(1ml/kg)静脉注射麻醉,股静脉穿刺输液,气管内插管,呼吸机控制呼吸,15 次/分,潮气量 10ml/kg;仰卧位固定于手术台上,胸部备皮,常规消毒铺巾;取左前外侧第四肋间切口逐层入胸,盐水纱布垫小心隔离并保护左肺,呼吸机改为 25 次/分,潮气量 5ml/kg;静脉注射肝素钠(1mg/kg)抗凝,动脉侧壁钳夹心包外主肺动脉;纵行切开主肺动脉壁,长约 1.5~2.0cm,将体外构建的种植有犬骨髓间质干细胞的带瓣补片顺血流方向,5/0 Prolene 线连续缝合植入主肺

动脉;排气后开放侧壁钳,检查无出血后逐层关胸,胸部切口放置胸腔闭式引流管,接闭式引流瓶,肌肉、皮下组织荷包缝合,胸腔完全闭合后,经气管插管球囊加压膨胀肺脏,听诊呼吸音清晰后,拔除闭式引流管,荷包线打结;缝合皮下组织、皮肤。皮肤缝合线留置2根不予剪除,用来捆绑碘伏纱布,包扎伤口;继续输入平衡盐等液体,补充血容量,麻醉快要清醒时,拔除气管插管术后3日肌注青霉素80万单位/次,2次/日。

1.4 取材与检测

(1) 分别于术后4、8、12周取犬2只行胸部B超检查。

(2) 术后4、8、12周随机取两条犬麻醉后放血法处死取出补片,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋切片,行HE染色。

(3) 荧光显微镜下标记细胞检测。

(4) 样本钙含量测定 ①植入4、8、12周后,取植入牛颈静脉瓣膜、血管壁各6小块,经50℃烘干72h;②1/100000电子天平称重,置于5ml小烧杯,加入1ml HNO₃、0.5ml HClO₄置于通风橱内过夜,低温下消化样品至透明,升高温度,继续消化至无碳化为止;③加入0.3ml去离子水洗涤3次,收集洗涤液于1.5ml离心管,加入40μl 15% LaCl₃;④取60μl加样于原子吸收分光光度计测试槽,在波长422.7nm下测试。将吸光度转化为浓度(μg/ml)与瓣叶干重(g)比较为样本钙含量。

2 结果

2.1 动物存活情况

实验用犬10只,早期采用846合剂肌肉注射麻醉,其中2只犬于术中开胸后,发现心脏收缩力弱,给予盐酸肾上腺素等药物,抢救无效死亡;1只犬术中主肺动脉与带瓣补片缝合时麻醉清醒,挣扎致使动脉侧壁钳脱落,大出血死亡。余7只犬改为戊巴比妥麻醉效果满意。1只犬术后第三天死于腹泻。1只犬术后左侧胸腔积液,麻醉后胸腔穿刺,抽出不凝血150ml左右,逐渐康复。2只犬术后出现伤口感染,拆除局部皮肤缝线,伤口冲洗换药处理后逐渐康复。其余犬术后恢复顺利。

2.2 B超检查

4周后,犬胸部B超观察显示:瓣叶无增厚,钙化,瓣叶可随血流漂动,补片内膜面光滑,血流通畅,无血栓及钙化;8周后,B超观察结果基本同4周表现;术后12周,B超观察:瓣叶无钙化,可随血流漂动,补片内膜光滑,血流通畅,无血栓形成(图1)。



图1 超声检查肺动脉带瓣补片 A 4周 B 8周 C 12周

Figure1 Ultrasonograph pulmonary artery valved patch A 4week

B 8week C 12week

2.3 标本大体观察

4、8、12周除了瓣叶逐渐缩小外,其余情况基本相同:补片无动脉瘤形成,外侧面观与动脉壁生长融合一起,管壁无明显纤维组织包裹,宿主管壁未见明显炎症反应。瓣膜呈白色,表面光滑,无血栓形成,弹性良好,血管壁内面光滑,无血栓形成(图

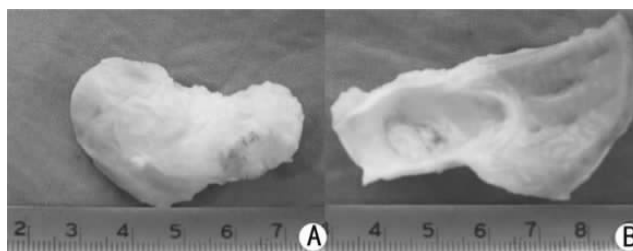


图2 植入带瓣补片12周大体观察

Figure2 Implanted valved patch 12 week

2.4 组织学观察

HE染色:4周时即可见瓣膜表面有细胞覆盖,部分细胞已长入去细胞支架中。12周时可见去细胞支架已基本被间质细胞合成分泌的细胞外基质所重塑,趋向成纤维细胞形态,表面有部分内皮细胞覆盖,大量间质细胞长入支架间隙内。

荧光显微镜下标记细胞检测 种植种子细胞牛颈静脉带瓣补片呈现阳性。(图3)



图3 荧光显微镜下检测植入带瓣补片标记细胞 A 4周 B 8周 C 12周

Figure3 Detection of valved patch with fluorescence microscope

A 4week B 8week C 12week

2.5 样本钙含量测定

再细胞化去细胞牛颈静脉瓣膜和血管壁植入4周钙含量增加,8周时候,钙含量又有增加,12周时钙含量与8周相比无明显变化(图4)。

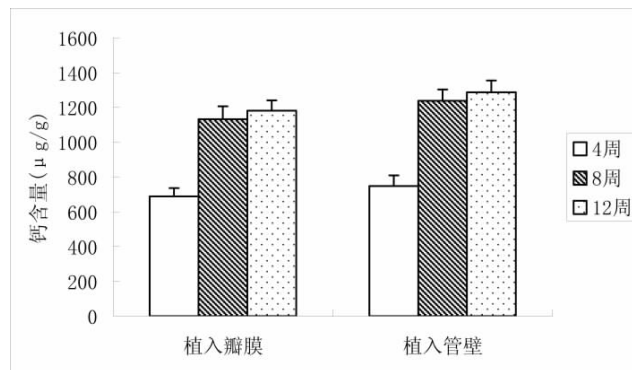


图4 植入犬肺动脉区牛颈静脉补片钙含量变化

Figure4 Calcium content analysis of valved patch

3 讨论

很多复杂先天性心脏病的手术需要利用带瓣管道重建肺动脉与右心室连接,如肺动脉闭锁、重症法洛四联症、右室双出口、共同动脉干等,用牛颈静脉重建肺动脉与右心室连接有广阔的前景^[3,4]。同种带瓣管道来源有限,大小难以匹配,适合婴幼儿的小管径管道更少。猪肺动脉管道应用于临床,易钙化、衰败,因而使用期有限。较为理想的材料应是组织相容性、血流动力学性能好,取材容易,大小易匹配。带瓣牛颈静脉被认为是一种很有前途的材料。牛颈静脉瓣生物力学性能接近人肺动脉

瓣,对右心系统低压环境适应好^[5],国内外应用牛颈静脉最多的是戊二醛处理牛颈静脉,其余有光氧化法、戊二醛处理后化学改性等研究成为热点,但都没有真正应用到临床。戊二醛处理的牛颈静脉带瓣管道,虽近期效果较好,但存在缺乏生长、塑形潜能,随年龄增长不少儿童需再次手术更换管道,吻合口内膜增生、退行性变、钙化、血栓形成、动脉瓣,对右心系统低压环境适应好^[5],国内外应用牛颈静脉最多的是戊二醛处理牛颈静脉,其余有光氧化法、戊二醛处理后化学改性等研究成为热点,但都没有真正应用到临床。戊二醛处理的牛颈静脉带瓣管道,虽近期效果较好,但存在缺乏生长、塑形潜能,随年龄增长不少儿童需再次手术更换管道,吻合口内膜增生、退行性变、钙化、血栓形成、动脉瘤的形成等问题,限制了它们在临床的应用^[6-9]。

牛颈静脉血管壁分为3层,内膜为内皮细胞;中膜薄,由少量平滑肌、胶原纤维、弹性纤维组成;外膜有较多的疏松结缔组织。一般带有3~4组瓣膜,瓣膜半透明、极薄,表面覆一层内皮细胞,内层支架为血管壁中层的延续。戊二醛等材料固定导致生物材料失活的内皮细胞、基质细胞及碎片存留于其表面和内层,形成早期钙化的好发部位,随着时间的延长,这种细胞介导的钙沉积发展到细胞外基质,导致生物材料的钙化衰败。如果去细胞技术去除牛颈静脉的细胞成分,将减少管道钙化发生的机会。但是,由此又出现了新的问题:经过去细胞处理的牛颈静脉血管,血管内皮细胞缺失,如果直接植入体内,很容易在基质表面形成血栓。在去细胞材料表面种植种子细胞内皮化处理将减少血栓发生率。可能起到防止或延缓其移植体内后的钙化作用^[10]。本实验先于体外将骨髓间质干细胞作为种子细胞种植于去细胞牛颈静脉支架上^[2],进而将其植入犬肺动脉,模拟右心带瓣管道的体内环境,观察12周,对体内构建组织工程右心带瓣管道进行了初步探索。

本研究检测犬体内植入材料情况时,使用了超声技术。由于犬胸廓与人体相去甚远,并且犬的膈肌较薄,心脏在胸腔内活动度较大,往往难以精确定位。需仔细探索以寻找心脏长轴、短轴等最佳切面。彩色多普勒时要求多普勒取样线保持与血流平行。

实验表明种植的骨髓间质干细胞能在体内微环境存活^[11],未见血栓形成。12周瓣叶表面部分有内皮细胞覆盖,荧光检测显示为种植细胞来源^[12],推测所覆盖的内皮细胞是由种植的骨髓间质干细胞所分化而来。再细胞化去细胞牛颈静脉植入4周瓣膜和血管壁钙含量增加,8周时,钙含量又有增加,12周时钙含量与8周相比无明显变化。初步说明采用组织工程技术构建组织工程右心带瓣管道有可行之处。另外,本实验犬体内移

植后观察时间为术后12周,长期移植效果将进一步观察。另外,如果将去细胞处理的带瓣膜管道完全替代犬肺动脉实验,更能检验此方法在完全体内血流动力学环境下的相关情况。

参考文献(References)

- [1] Tiete AR, Sachweh JS, Roemer U, 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
- [2] 李悟,周仲毅,王忠华,等.牛颈静脉组织工程带瓣管道实验研究. 2008,8(7),39-42
Li Wu, Zhou Zhong-yi, Wang Zhong-hua, et al. An experimental study on construction of valved conduits using bovine jugular vein in vitro [J]. *Progress in modern biomedicine*, 2008,8(7): 39-42
- [3] Gober V, Berdat P, Pavlovic M, et al. Adverse midterm outcome following RVOT reconstruction using the Contegra valved bovine jugular vein [J]. *Ann Thorac Surg*, 2005,79(2):625-631
- [4] Meyns B, Garsse LV, Boshoff D, et al. The Contegra conduit in the right ventricular outflow tract induces supraventricular stenosis [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 128 (6) : 834- 840
- [5] Dearani J A , Daniels on G K, Puga F J, et al. Late follow up of 1095 patients undergoing operation for complex congenital heart disease utilizing pulmonary ventricle to pulmonary artery conduits [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003;75(2):399-411
- [6] Dave HH, Kadner A, Berger F, 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
- [7] Carel T, Berdat P, Pavlovic M, et al. The bovine jugular vein: a totally integrated valved conduit to repair the right ventricular outflow [J]. *J Heart Valve Dis*, 2002, 11(4): 552- 556
- [8] Corno AF, Hurnimi M, Griffin H, et al. Bovine jugular veins right ventricle- to- pulmonary artery valved conduit [J]. *J Heart Valve Dis*. 2002, 11(2): 242- 247; discussion 248
- [9] Breymann T, Thies WR, Boethin D, et al. Bovine valved venous xenografts for RVOT reconstruction: results after 71 implantations [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 21(4): 703- 710
- [10] Dohmen PM, Costa F, Lopes SV, et al. Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model [J]. *Heart Surg Forum*, 2005, 8(2):E100-104
- [11] Brown JW, Ruzmetov M, Rodefeld MD, et al. Valved bovine jugular vein conduits for right ventricular outflow tract reconstruction in children: an attractive alternative to pulmonary homograft [J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 82(3): 909-916
- [12] Hickey EJ, McCrindle BW, Blackstone EH, et al. Jugular venous valved conduit (Contegra) matches allograft performance in infant truncus arteriosus repair [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 33(5): 890-898