

丹宁酸交联后续处理对牛颈静脉血管的影响

孙嘉康¹,周建业¹,唐跃¹,罗富良¹,汪胜¹,周庆亮²,霍美俊²

(1. 北京协和医学院 中国医学科学院 阜外医院 国家心血管病中心 心血管疾病国家重点实验室,北京 100037;

2. 北京迈迪顶峰医疗科技有限公司,北京 101312)

【摘要】 目的 观察丹宁酸固定后续处理对改善丹宁酸交联牛颈静脉贮存液稳定性,和对血管热稳定性、抗钙化能力、生物力学性能及纤维结构的影响。**方法** 新鲜牛颈静脉分别经戊二醛固定(戊二醛组)、丹宁酸交联(丹宁酸组)及丹宁酸交联后续处理(实验组),采用大鼠皮下植入模型测定钙含量、热收缩温度、断裂强度和断裂伸长率,以及组织病理学检查等指标进行评价。**结果** 研究组所有指标均优于戊二醛组($P < 0.05$);与丹宁酸组比较,实验组的贮存液颜色不再变化,热收缩温度有所降低,21 d 钙含量略升、60 d 钙含量略低($P < 0.01$),两组材料力学强度结果无统计学差异($P > 0.05$),且两组的胶原纤维和弹力纤维均保持较好的完整性。**结论** 丹宁酸交联后处理可提高贮存液的稳定性,使牛颈静脉血管的柔软性有所恢复,同时保持了血管抗钙化能力、组织强度和纤维结构的完整性。

【关键词】 牛颈静脉;丹宁酸;钙化;生物力学

【中图分类号】 R318.0 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 06-0087-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.005.014

Effect of post-treatment on tannic acid fixed bovine jugular vein

SUN Jia-kang¹, ZHOU Jian-ye¹, TANG Yue¹, LUO Fu-liang¹, WANG Sheng¹,

ZHOU Qing-liang², HUO Mei-jun²

(1. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 10037, China;

2. Beijing Med Zenith Medical Scientific Co. . Ltd, Beijing 101312, China)

【Abstract】 Objective To investigate effects of post-treatment on stability of storage solution/ thermostability, anti-calcification, the biomechanics and fibred structures of tannic acid fixed bovine jugular vein (BJV). **Methods** Fresh bovine jugular vein were treated with glutaraldehyde (Glut group), tannic acid (TA group), and post-treatment on TA-fixed (Study group). Calcium level was measured by implanting BJVs subcutaneously into the rats. The shrinkage temperature, tensile strength, elongation at break and histological changes were evaluated as well. **Results** Compared with Glut group, all results were better in Study group ($P < 0.05$). Compared with TA group, in the Study group, color of storage solution did not change, shrinkage temperature and 60-days' calcium level decreased, 21-days' calcium level increased ($P < 0.01$); biomechanical properties were not statistics difference between TA group and Study group ($P > 0.05$), and collagen fibers and elastic fibers were maintained well in TA group and Study group. **Conclusion** Post-treatment on TA-fixed Bovine Jugular Vein can improve stability of storage solution and BJVs elasticity, and do not change anti-calcification, biomechanical properties and fibred structures of TA-fixed BJVs.

【Key words】 Bovine jugular vein; Tannic acid; Calcification; Biomechanics

牛颈静脉带瓣血管因其具有天然瓣膜结构、规格齐全、来源易得等优点,是良好的心血管外科修

[作者简介] 孙嘉康(1983-),男,硕士生,助理研究员,主要从事生物材料研究。

[通讯作者] 周建业(1966-),男,硕士,研究员,硕士生导师,主要从事生物材料和人工器官研究, E-mail: zhoujy@263.net。

补材料^[1],但由于血管壁易发生严重钙化而制约了牛颈静脉血管的广泛应用。本课题组前期的研究发现,在传统戊二醛固定的基础上增加丹宁酸序贯交联可显著提高牛颈静脉血管的抗钙化能力和其他理化性能^[2]。但在随后的研究中也发现,丹宁酸既能交联弹力纤维,也能交联胶原纤维,在增加组织强度的同时也带来了血管变硬、顺应性变差、手术操作性能下降的问题。此外,丹宁酸溶液是多元醇和多元酚的混合物,组成成分和化学反应复杂,容易发生自聚合反应,放置在丹宁酸溶液里的牛颈静脉会持续变硬,溶液颜色也持续变深。因此,如何解决血管的血管顺应性下降,和改善贮存液稳定性的问题,是本文的研究目标。本研究在丹宁酸序贯交联的基础上再增加漂洗及更换贮存液的后继处理,并评价了该处理对牛颈静脉血管抗钙化性能、生物力学性能和纤维结构的影响。

1 材料和方法

1.1 样品采集及分组处理

取新鲜牛颈静脉,去除血管表面脂肪,分为 3 组。戊二醛固定为对照组(戊二醛组):用 0.6% 戊二醛于 4℃ 固定 2 d,再于 0.3% 戊二醛溶液中处理 7 d 以上,长期保存备用;丹宁酸交联组(丹宁酸组),在戊二醛固定组基础上,用 0.3% 丹宁酸于 4℃ 避光处理 4 d 以上,长期保存备用;丹宁酸后处理组(实验组):丹宁酸交联基础上,用 0.3% 戊二醛溶液 4℃ 振荡漂洗 10 次,每次 8 h,最后于 0.3% 戊二醛中保存备用。

1.2 贮存液稳定性观察

分别取丹宁酸组交联完成后最小包装一瓶(含一根牛颈静脉血管和 50 mL 溶液)、实验组处理完成后最小包装一瓶,4℃ 避光保存 30 d,取出静脉血管,比较颜色改变情况。

1.3 热皱缩温度测定

将 5×40 mm 长方形血管片挂于皮革温度收缩测定仪测试架(MSW-YD4,陕西科技大学)的上、下挂钩之间,以纯化水作为加热介质,测量待测样品的热皱缩温度。

1.4 周向断裂拉伸力

在牛颈静脉血管上避开瓣膜窦部分,取长度为 30 mm±0.5 mm 的血管为样品,保持血管完整形态横向固定于电子万能材料试验机(WDW-1,上海松顿机械设备有限公司),设定拉伸速度 100 mm/min,记录血管断裂时拉力及断裂拉伸率。

1.5 轴向拉伸断裂力

取长度为 50 mm±0.5 mm 的血管为样品,保持血管完整形态纵向固定于电子万能材料试验机(WDW-1,上海松顿机械设备有限公司),夹具间距 50 mm,拉伸速度 100 mm/min,记录血管断裂时拉力及断裂拉伸率。

1.6 大鼠皮下植入模型的钙含量测定

1.6.1 大鼠皮下埋植模型

30 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,21 d(70~80 g),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2015-0001】。无菌手术在中国医学科学院阜外医院屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2013-0025】。实验动物使用经中国医学科学院阜外医院“实验动物福利与伦理审查委员会”讨论同意使用。

1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,SD 大鼠俯卧位固定,背部正中切口,在皮下植入分别经过戊二醛组、丹宁酸组和实验组的牛颈静脉血管片各 1 片,随后缝合皮肤切口,并消毒。每个植入片为 1 cm×1 cm,植入前用无菌生理盐水清洗 3 次,每次 2 min,每次生理盐水用量为 500 mL。

术后大鼠随机分为 2 组,分别于术后 21 d 和 60 d 采用吸入 CO₂ 的方法处死大鼠,取出植入血管片,去除表面的宿主组织,生理盐水冲洗备用。

1.6.2 钙含量测定

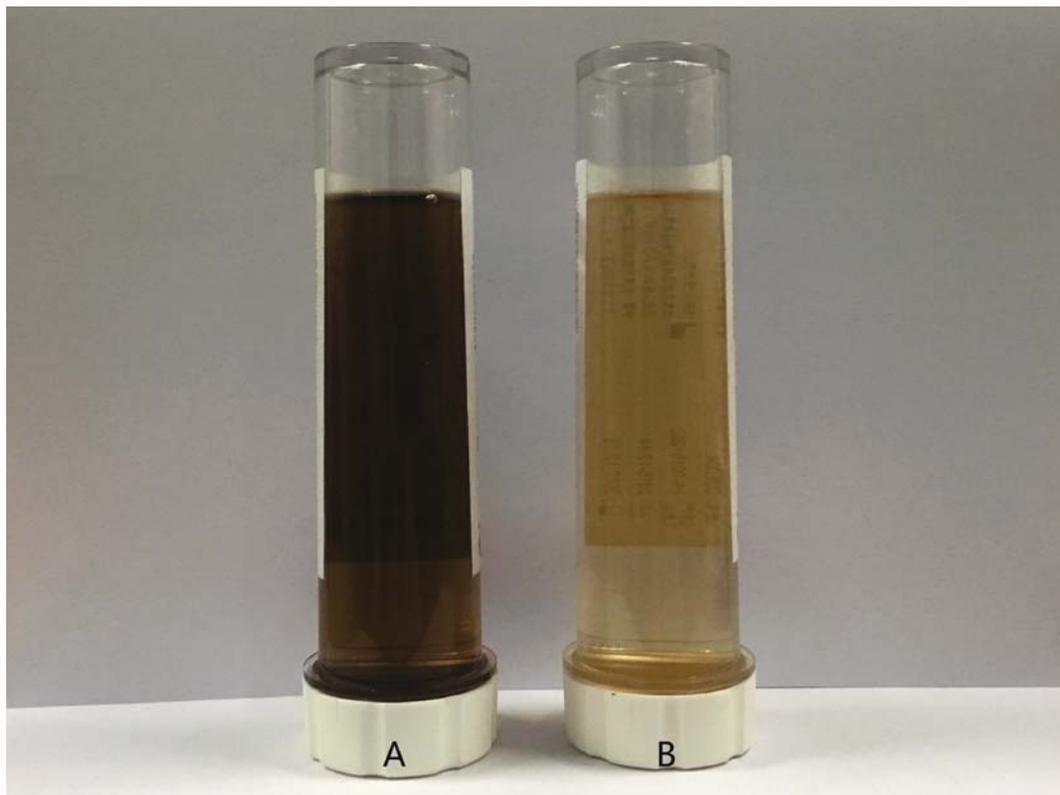
将样品经恒温烘箱 80℃ 干燥 48 h 至衡重,称重并记录,随后用优级纯 HNO₃ 1 mL,低温加热至样品溶解,并继续加热至溶液近干,用去离子水定容至 20 mL 容量瓶中待测。检测使用仪器为电感耦合等离子体光谱仪(icap 6300, Thermo)。用钙标准储备液(1000 μg, 购于国家标准物质研究中心)绘制标准曲线。随后将样品注入检测仪器,计算钙含量。计算公式 元素含量(μg/g) = (A-A₀) * V/m,其中 A 为样品溶液中待测元素浓度值,单位 μg/mL; A₀ 为样品空白溶液中待测元素浓度值,单位 μg/mL; V 为样品定容体积,单位 mL; m 为样品质量,单位 g。

1.7 组织病理学观察

皮下植入后血管片标本石蜡包埋、切片、酒精梯度脱水后分别做 Masson 染色和 ET+VG 染色,蔡司光学显微镜下观察照相。

1.8 统计学分析

所有数据使用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,采用方差分析。检验结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:(A)为丹宁酸处理组;(B)为实验组。

图 1 贮存液颜色

Note:(A) TA group;(B) Study group.

Fig.1 Color of storage solution

2 结果

2.1 贮存液变色情况

由图 1 可见实验组颜色保持不变,表明贮存液已趋于稳定。

2.2 热皱缩温度

表 1 所示,实验组热皱缩温度低于丹宁酸组,戊二醛组热皱缩温度最低,3 组间差异具有显著性($P < 0.01$)。说明后续处理会影响牛颈静脉血管的热稳定性,但仍优于戊二醛组。

表 1 热皱缩温度

Tab.1 Shrinkage temperature

组别 Group	热皱缩温度 Shrinkage temperature(°C)
戊二醛组(Glut group)	89.52 ± 1.12
丹宁酸组(TA group)	96.52 ± 0.93
实验组(Study group)	94.16 ± 0.97

2.3 周向/轴向拉伸断裂力

根据表 2 所示结果,实验组与戊二醛组比较,实验组周向/轴向拉伸断裂力均优于戊二醛组($P <$

0.05);实验组与丹宁酸组比较,周向/轴向拉伸断裂力无差异($P > 0.05$)。

2.4 大鼠皮下埋植血管片钙含量

表 3 所示,实验组、丹宁酸组钙含量各时间点均优于戊二醛组($P < 0.01$);与丹宁酸组比较,实验组 21d 钙含量略升、60d 钙含量略低($P < 0.01$)。

2.5 组织病理学观察

由图 2 可见,实验组与丹宁酸组比较,弹力纤维结构基本保持完整,未见明显变化。图中箭头指处蓝紫色为弹力纤维,戊二醛组的弹力纤维断裂、排列杂乱,60 d 组尤其明显(B);丹宁酸组和实验组两个时间点的弹力纤维的基本保存完好,明显好于戊二醛组。提示后续的处理手段并未削弱丹宁酸对牛颈静脉管壁胶原纤维与弹力纤维结构的稳定作用。

图 3 中箭头指处红色为胶原纤维,3 组在植入 21 d 时,胶原纤维基本保持原有结构;植入 60 d 时,戊二醛组胶原纤维断裂(B),而其他两组胶原纤维仍保持较好的完整性。

表 2 周向/轴向拉伸断裂力

Tab. 2 Circumferential/Axial tensile biomechanical properties

组别 Group	周向拉伸断裂力 (Circumferential)		轴向拉伸断裂力 (Axial)	
	最大荷重 Tensile strength (N)	断裂伸长率 Elongation at break (%)	最大荷重 Tensile strength (N)	断裂伸长率 Elongation at break (%)
戊二醛组 (Glut group)	260.93 ± 46.06	305.47 ± 30.34	145.7 ± 44.57	867.24 ± 130.62
丹宁酸组 (TA group)	354.48 ± 67.55	308.79 ± 53.34	176.63 ± 49.05	832.03 ± 182.51
实验组 (Study group)	360.71 ± 52.64	347.73 ± 40.46	199.81 ± 40.55	765.35 ± 114.35

表 3 大鼠皮下埋植血管片钙含量

Tab. 3 Calcium level of implanting BJVs subcutaneously into the rats

组别 Group	植入 21d 21-days' (mg/g)	植入 60d 60-days' (mg/g)
戊二醛组 (Glut group)	50.07 ± 17.87	158.83 ± 14.7
丹宁酸组 (TA group)	1.06 ± 0.24	2.57 ± 0.70
实验组 (Study group)	1.47 ± 0.25	1.56 ± 0.50

3 讨论

人工带瓣血管是肺动脉闭锁、永存动脉干、大动脉转位等外科矫治手术中重建右室流出道不可缺少的修补材料^[3]。目前临床中广泛使用戊二醛固定的异种生物材料,虽然生物力学性能达到要求^[4],但远期钙化问题始终无法解决,这是以 Contegra 为代表的商业化牛颈静脉带瓣管道不能回避的待解问题^[5]。因此,近年来学者们聚焦于新型交联方法的探索,例如使用原花青素等改性方法,得到了比较满意的结果^[6-8]。

本课题组前期的研究证明,在戊二醛固定的牛颈静脉带瓣血管的基础上再经过丹宁酸交联处理,牛颈静脉的生物力学强度及抗钙化能力得到显著改善^[2]。这是由于戊二醛仅能交联固定胶原纤维,而丹宁酸不仅能交联胶原纤维,还能交联弹力纤维^[9-10]。在血管类富含弹力纤维的生物材料中,弹力纤维断裂、衰败引起的炎症反应和成骨过程,诱发了钙结晶的形成^[11-12],是容易发生严重钙化的主要原因,丹宁酸对弹力纤维的交联作用,减少了弹力纤维断裂的发生,从而减轻了牛颈静脉的钙化程度。

虽然丹宁酸序贯交联使牛颈静脉血管抗钙化

能力和力学强度得到显著提高,但在进行大动物植入实验时,发现经丹宁酸交联后的血管较硬、顺应性变差,手术操作性能下降;另外发现,丹宁酸交联后,随着保存时间延长血管材料持续变硬,同时贮存液颜色持续变深。虽然具体原因不明,但我们推测可能有两个原因:一是交联处理完成时组织中残留有未反应的丹宁酸,二是丹宁酸成分复杂,在酸性环境下会持续发生自体聚合反应^[13],而且丹宁酸主要通过氢键与弹力纤维等结合^[14-15],键能较低,不够稳定。因此,我们计划采用多次漂洗的方法去除多余的丹宁酸,再将血管贮存到偏碱性的 0.3% 戊二醛溶液中,希望能遏制多余的聚合反应,保持贮存液的稳定性。

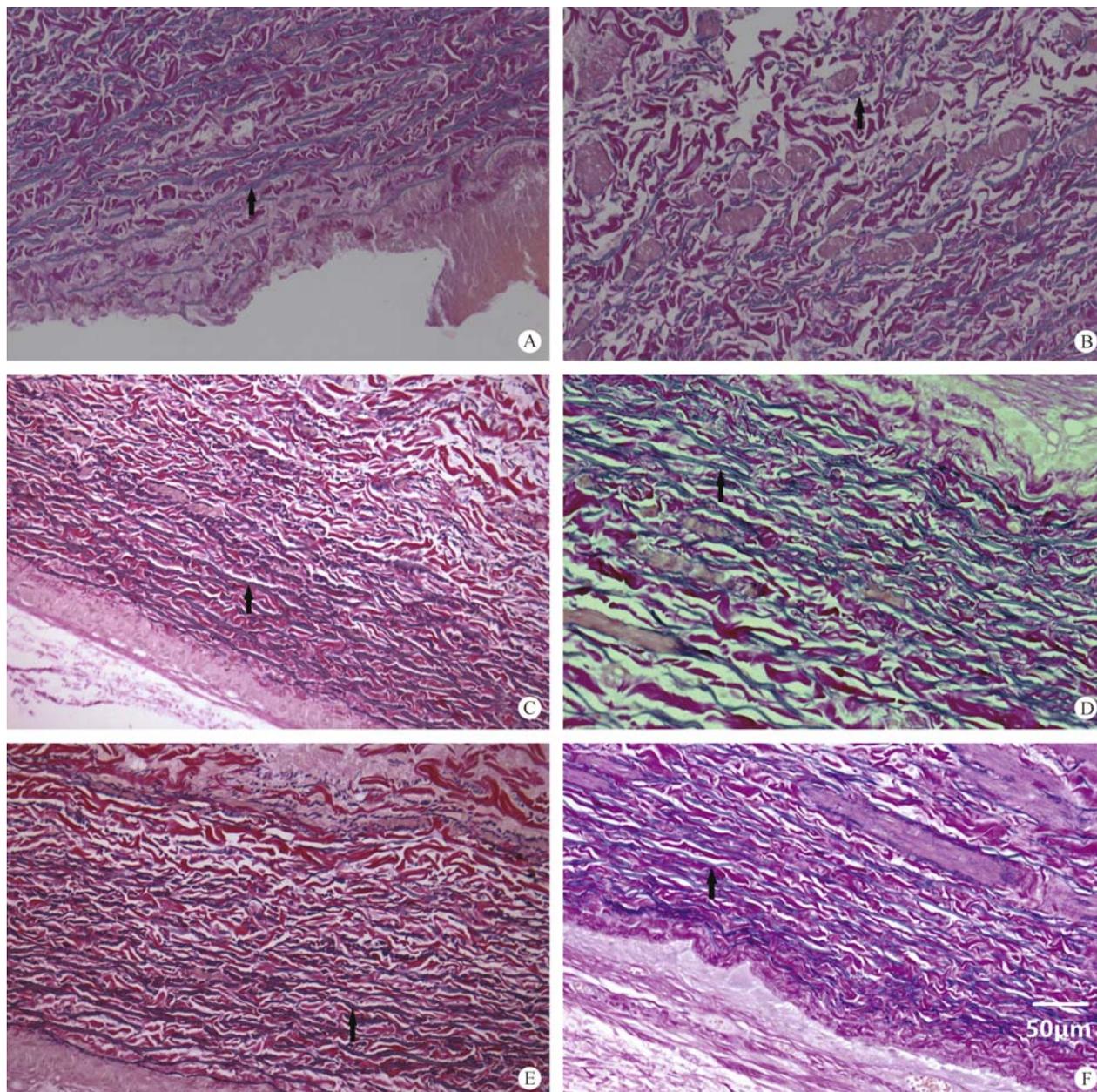
经过上述的后处理措施,可以直观地观察到贮存液颜色不再变深,表明贮存液趋于稳定。同时发现后处理组的血管变软,血管顺应性和大动物植入手术的操作性能提升明显,虽然没有合适的方法进行量化的测定,但血管材料变软确实是客观存在。这一现象也可以从热皱缩温度的降低得到证实,热皱缩温度反映组织材料中的键合程度,后处理步骤使热皱缩温度降低了 2℃,表明血管组织中的键合程度有所降低,材料变软有合理的解释。

后续处理在改善了血管材料的柔顺性的同时,保持了组织强度不减弱,无论是轴向还是周向的断裂拉力和断裂伸长率都没有显著变化。而对于丹宁酸处理带来的优异的抗钙化性能也得到了很好的保持,虽然丹宁酸组和实验组钙含量在统计学上表现为有差异,但相对于戊二醛 50 mg/g 和 150 mg/g 的量级而言,相差 1 mg/g 是没有实际意义的,因此我们认为后处理步骤维持了丹宁酸的抗钙化性能。病理学观察也表明后处理并未破坏血管的弹力纤维和胶原纤维结构的完整性。

综上所述,本研究通过对丹宁酸处理的牛颈静

脉带瓣血管进行多次漂洗和更换贮存液的后处理,改善了贮存液稳定性,提高了血管顺应性和手术操作性能,同时保持了血管材料的抗钙化性能、

力学强度和纤维结构的完整性。而丹宁酸交联反应和自体聚合的具体机制有待进一步深入研究。

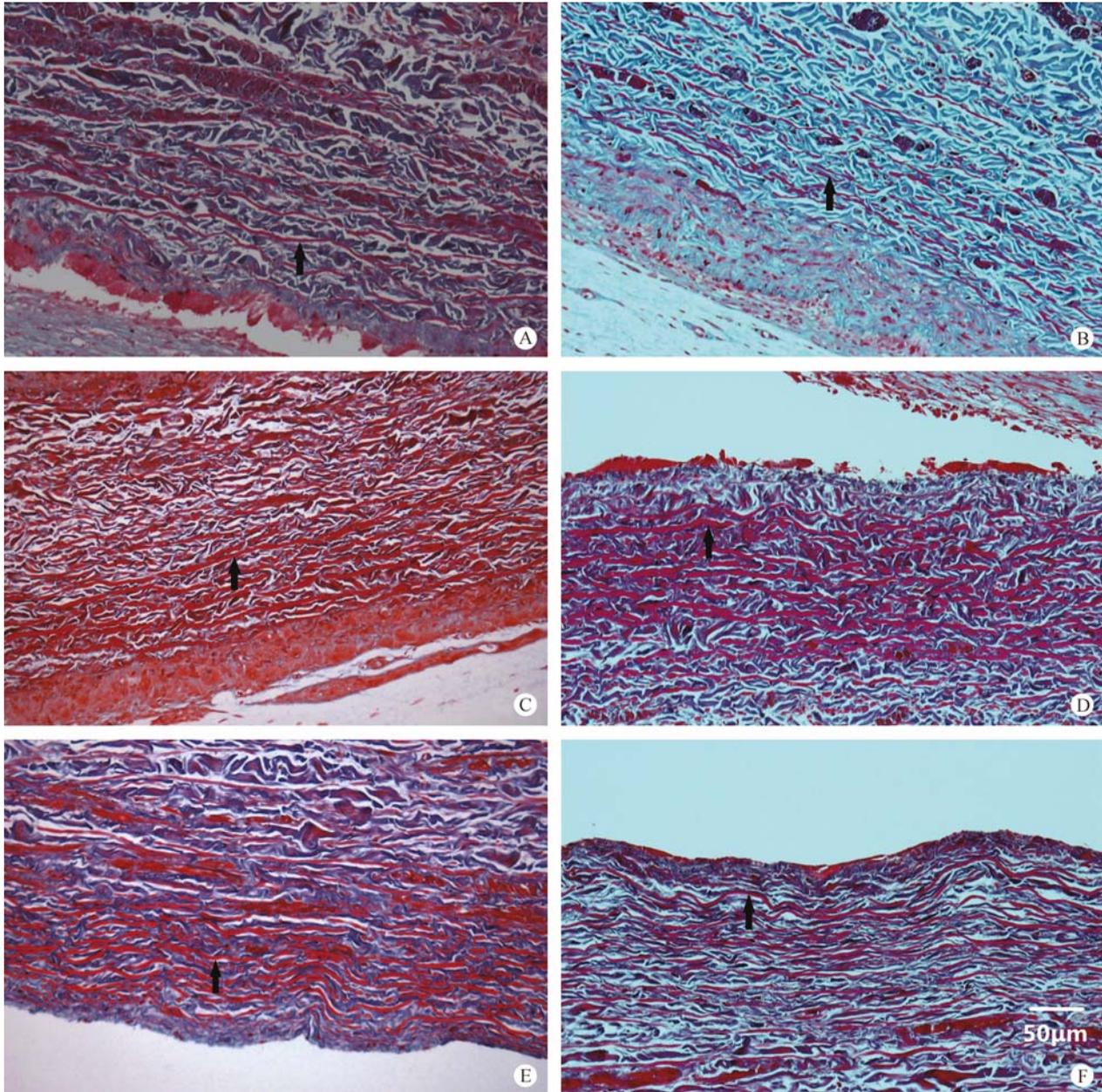


注:(A)和(B)为戊二醛组,分别埋植 21 d 和 60 d;(C)和(D)为丹宁酸组,分别埋植 21 d 和 60 d;
(E)和(F)为实验组,分别埋植 21 d 和 60 d。

图 2 牛颈静脉植入大鼠皮下后血管片的弹力纤维情况(ET + VG 染色, ×20)

Note:(A) 21-days' Glut group (B) 60-days' Glut group; (C) 21-days' TA group (D) 60-days' TA group;
(E) 21-days' Study group (F) 60-days' Study group.

Fig. 2 Vascular elastic fiber after implanting BJVs subcutaneously into the rat (ET + VG, × 20)



注:(A)和(B)为戊二醛组,分别埋植 21 d 和 60 d;(C)和(D)为丹宁酸组,分别埋植 21 d 和 60 d;
(E)和(F)为实验组,分别埋植 21 d 和 60 d。

图 3 牛颈静脉植入大鼠皮下后血管片的胶原纤维情况(Masson 染色, ×20)

Note:(A) 21-days' Glut group (B) 60-days' Glut group; (C) 21-days' TA group (D) 60-days' TA group;
(E) 21-days' Study group (F) 60-days' Study group.

Fig. 3 Vascular collagenous fiber after implanting BJVs subcutaneously into the rat (Masson, × 20)

参考文献:

[1] 金晶,陶凉,吴忠仕,等.牛颈静脉带瓣补片在复杂先天性心脏病患者右心室流出道重建中的应用[J].中国胸心血管外科临床杂志,2012,05;534-537.

[2] 王德,周建业,胡盛寿,等.丹宁酸改性处理对戊二醛固定牛颈静脉管道理化特性的影响[J].中国医学科学院学报,2009,01;65-67.

[3] Yong MS, Yim D, d'Udekem Y, et al. Medium-term outcomes of bovine jugular vein graft and homograft conduits in children [J]. ANZ Journal of Surgery, 2015 May, 85(5):381-385.

[4] 笪琳萃,龚梅,王旻,等.新型交联方法在生物衍生材料中的应用进展[J].中国修复重建外科杂志,2014,06;777-783.

[5] Krishna S Iyer. The Contegra bovine jugular valved conduit: Living up to expectations [J]? Ann Pediatr Cardiol, 2012 Jan-Jun, 5(1): 34-35.

(上转第 86 页)

降低,则发生抑郁,本实验结果显示,模型组大鼠海马组织中 5-HT、DA、NE 的含量明显降低,血浆 CORT、ACTH、CRH 含量升高,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂可显著降低血浆 CORT、ACTH、CRH 的含量,升高海马组织单胺类神经递质。综上所述,乌灵菌粉贯叶连翘复方制剂具有抗抑郁作用,其机制与提高海马单胺类神经递质含量,调节 HPA 轴功能有关。

参考文献:

- [1] Lavergne F, Jay TM. A new strategy for antidepressant prescription[J]. *Front Neurosci*,2010,4:192.
- [2] Aung SK, Fay H, Hobbs RF. Traditional Chinese medicine as a basis for treating psychiatric disorders: a review of theory with illustrative cases[J]. *Med Acupunct*,2013,25(6):398-406.
- [3] Yilmaz N, Demirdas A, Yilmaz M, *et al.* Effects of venlafaxine and escitalopram treatments on NMDA receptors in the rat depression model[J]. *J Membr Biol*,2011,242(3):145-151.
- [4] Zhang L, Hu L, Chen M, *et al.* Exogenous interleukin - 6 facilitated the contraction of the colon in a depression rat model [J]. *Dig Dis Sci*,2013,58(8):2187-2196.
- [5] Zhang Z, Fei P, Mu J, *et al.* Hippocampal expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 and neuronal PAS domain protein 4 in a rat model of depression[J]. *Neurol Sci*, 2014,35(2):277-282.
- [6] Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-

analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*,2008,11(8):1169-1180.

- [7] Rohleder N, Wolf JM, Wolf OT. Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder[J]. *Neurosci Biobehav Rev*,2010,35(1):104-114.
- [8] Strelakova T, Couch Y, Kholod N, *et al.* Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters[J]. *Behav brain funct*,2011,7:9.
- [9] 周晓莉,饶一武. 应激状态下患者下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的变化[J]. *医学综述*,2014,20(13):2439-2440.
- [10] Lin LC, Sibille E. Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? [J]. *Front Pharmacol*,2013,4:110.
- [11] Sandi C, Haller J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015,16(5):290-304.
- [12] Foy MR. Ovarian hormones, aging and stress on hippocampal synaptic plasticity[J]. *Neurobiol Learn Mem*,2011,95(2):134-144.
- [13] 童妍,金钊,赵焕瑛. 大黄素甲醚对慢性轻度不可预见应激大鼠海马单胺类神经递质的影响[J]. *中药药理与临床*,2015,31(1):54-57.

[修回日期]2016-02-01

(下接第 92 页)

- [6] Zhai W, Zhang H, Wu C, *et al.* Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood vessel replacement [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014 Aug,102(6):1190-1198.
- [7] 徐朝军,宋岚,杨进,等. 原花青素交联去细胞牛颈静脉带瓣管道的实验研究[J]. *现代生物医学进展*,2012,30:5831-5835.
- [8] 林曦,张卫达,王晓武,等. Triton X-100、环氧氯丙烷联合改性处理牛颈静脉带瓣管道的体内生物相容性研究[J]. *中国现代医学杂志*,2011,35:4405-4408+4413.
- [9] Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid [J]. *Biomaterials*,2004 Jul,25(16):3293-302.
- [10] Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall [J]. *Bimaterials*,2005,26(11):1237-1245.
- [11] D. M. Basalyga, D. T. Simionescu, W. Xiong, *et al.* Elastin

degradation and calcification in an abdominal aorta injury model [J]. *Circulation*, 2004,110:3480-3487.

- [12] Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, *et al.* Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses [J]. *American Journal of Pathology*,2006 Feb,168(2):490-498.
- [13] 刘小为. 丹宁酸与给水处理过程相关的若干化学行为研究 [D]. 哈尔滨工业大学,2007.
- [14] Jastrzebska M, Zalewska-Rejaki, Wrazlik R, *et al.* Tannic acid-stabilized pericardium tissue: IR spectroscopy, atomic force microscopy, and dielectric spectroscopy investigations [J]. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul,78(1):148-156.
- [15] Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, *et al.* Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins[J]. *Biomaterials*,2006 Jul,27(19):3645-3651.

[修回日期]2016-04-26