

# 磷酸胆碱接枝Dacron人工血管移植后血管表面的生物相容性☆

夏成勇<sup>1</sup>, 刘长建<sup>2</sup>, 杨能华<sup>1</sup>

## Surface biocompatibility of Dacron vascular prosthesis coated with phosphorylcholine

Xia Cheng-yong<sup>1</sup>, Liu Chang-jian<sup>2</sup>, Yang Neng-hua<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Preliminary study found that Dacron vascular prosthesis may inhibit anastomotic intimal and smooth muscle hyperplasia, reduce anastomotic stenosis and increase blood flow by grafting 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC).  
**OBJECTIVE:** To study the biocompatibility of Dacron vascular prosthesis coated with 2-MPC by ozonization in rabbit model.  
**METHODS:** Dacron vascular prosthesis was grafted with MPC by ozonization and pruned into oval patches at 5 mm × 2 mm. Totally 24 New Zealand rabbits were processed into occluding the abdominal aorta and longitudinally incising the anterior wall of the abdominal aorta. Rabbits were divided into two groups randomly. The treated group was transplanted with Dacron prosthesis grafted MPC, while control group with Dacron prosthesis without MPC graft. At 1 day and 1, 2, 4 weeks postoperation, rabbits were killed for hematoxylin-eosin staining and Masson staining. Scanning electron microscopy was used to observe the intimal hyperplasia and blood cell adhesion on the surface of Dacron prosthesis.  
**RESULTS AND CONCLUSION:** The surface of Dacron vascular prosthesis grafted MPC reduced neointimal proliferation compared with the control group. The thickness of intimal hyperplasia was not measured due to Dacron graft surface was not flat. Stratification of the neointima was found in the control groups at 2 weeks postoperation in Masson staining, and a great deal of cells infiltrated in the lower layer, not obvious in the superficial layer. No obvious stratification in neointima was found in the treated group until 4 weeks. Perhaps it had stratification. The lower lay was so thin than attachment to the Dacron graft surface was not obvious. It is believed that in the Dacron vascular prosthesis grafted MPC, effectively inhibit thrombosis, infiltration of inflammatory cells and deposition of fibrinogen, reduce hyperplasia of neointimal. Dacron vascular prosthesis coated with MPC significantly gets better biocompatibility.

Xia CY, Liu CJ, Yang NH. Surface biocompatibility of Dacron vascular prosthesis coated with phosphorylcholine. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(38): 7055-7058. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:**前期研究发现涤纶人工血管经接枝 2-甲基丙烯酸酯氧基乙基磷酸胆碱(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC)后,可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。  
**目的:**通过臭氧活化的方法在 Dacron 人工血管表面接枝 MPC,进一步观察接枝后 Dacron 人工血管的生物相容性。  
**方法:**通过臭氧活化的方法在 Dacron 人工血管表面接枝 MPC,修建成 5 mm×2 mm 的椭圆形补片。取新西兰大白兔 24 只,阻断其腹主动脉,纵形切开腹主动脉前壁,以抽签法随机分为两组:实验组将接枝后的 Dacron 人工血管作新西兰兔腹主动脉补片移植,对照组移植未接枝 Dacron 人工血管作对照。于术后 1 d, 1 周, 2 周, 4 周,进行人工血管苏木精-伊红、Masson 染色及扫描电镜观察 Dacron 人工血管表面内膜增生、血细胞黏附情况。  
**结果与结论:**与对照组比较,实验组新内膜增生明显减少,由于 Dacron 人工血管表面的不平整,未能进行新内膜增生厚度的测量。术后第 2 周,通过 Masson 染色在对照组人工血管补片表面观察到新内膜的分层,底层多量细胞浸润,浅层细胞浸润不明显;而实验组未见明显分层现象或者也出现了分层,但底层较薄,附着在 Dacron 人工血管表面而不明显,这现象持续到术后的第 4 周。证实在 Dacron 人工血管补片表面接枝 MPC,有效抑制了早期补片表面血栓形成,抑制炎症细胞的浸润,抑制纤维蛋白原的沉积,使早期的新内膜增生减少,较接枝前有更好的生物相容性。  
**关键词:**磷酸胆碱;人工血管;2-甲基丙烯酸酯氧基乙基磷酸胆碱;生物相容性;材料生物相容性  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.38.007

夏成勇, 刘长建, 杨能华. 磷酸胆碱接枝 Dacron 人工血管移植后血管表面的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(38):7055-7058. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

在血管内支架材料中, Dacron(PET)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,在小口径人工血管移植中不能完全满足心血管疾病的要求<sup>[1]</sup>。既往实验表明,在人工材料表面接

枝甲基丙烯酸酯的共聚物 2-甲基丙烯酸酯氧基乙基磷酸胆碱(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC),能减少纤维蛋白原的吸附,并通过减少血小板的黏附和活化来增加生物材料的生物相容性<sup>[2-5]</sup>。作者在既往的研究中发现涤纶人工血管经接枝 MPC 后,较对照组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<sup>[6]</sup>。

本实验通过在 Dacron 人工血管表面接枝

<sup>1</sup>Department of Vascular Surgery, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Vascular Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Xia Cheng-yong ☆, Doctor, Attending Chinese medicine physician, Department of Vascular Surgery, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
chengyong-xia@163.com

Received: 2010-05-05  
Accepted: 2010-06-19

<sup>1</sup>江苏省中医院血管外科,江苏省南京市 210029;  
<sup>2</sup>南京大学附属鼓楼医院血管外科,江苏省南京市 210008

夏成勇 ☆, 男, 1973 年生, 江苏省宝应市人, 汉族, 南京大学毕业, 博士, 主治中医师, 主要从事人工血管研究。  
chengyong-xia@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:1673-8225  
(2010)38-07055-04

收稿日期:2010-05-05  
修回日期:2010-06-19  
(20100505005/GW·Y)

MPC, 进行接枝后Dacron人工血管动物实验, 对人工血管表面的内膜增生和细胞黏附进行进一步研究。

## 1 材料和方法

**设计:** Dacron人工血管生物相容性实验。

**时间及地点:** 于2009-02/09在南京大学医学院附属鼓楼医院实验室完成。

**材料:** Dacron人工血管由美国波士顿科学有限公司提供, 直径8 mm。MPC由南京大学化工学院提供。新西兰大白兔24只, 雌雄不限, 体质量2.0~3.0 kg, 由江苏省实验动物中心提供。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

BX-9臭氧活化发生仪(北京市环境保护科学研究院); LEO 1530 VP扫描电镜(LEO公司, 德国); 光学显微镜(OLYMPUS公司, 日本)。

**实验方法:**

**Dacron人工血管表面接枝MPC:** 将Dacron人工血管修建成5 mm×10 mm补片, 经臭氧活化, 真空脱气, 加入MPC溶液<sup>[7]</sup>, 恒温箱中接枝聚合, 最后干燥<sup>[8]</sup>。修剪成5 mm×2 mm的椭圆形补片, 高压蒸汽灭菌后干燥保存备用。

**实验动物分组:** 将新西兰大白兔以盐酸氯胺酮全身麻醉, 静脉推注肝素2 mg/kg后阻断腹主动脉, 腹主动脉前壁纵行切开, 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。将新西兰兔以抽签法随机分为实验组和对照组, 每组12只。实验组将制备的接枝后的Dacron人工血管以8-0国产聚丙烯线吻合到腹主动脉纵形切口上, 间断缝合(图1); 对照组以未接枝的Dacron人工血管移植, 余同前。术后青霉素40万U/d、肝素2 mg/(kg·d)静脉推注, 共7 d。于术后1 d, 1周, 2周, 4周, 各组处死3只动物进行观察。

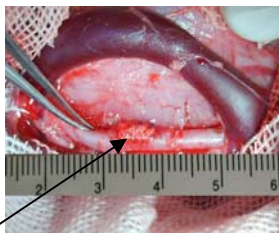


Figure 1 Transplantation of Dacron vascular prosthesis (arrow points Dacron prosthesis)  
图1 Dacron人工血管移植(箭头所指为Dacron人工血管)

**组织学观察:** 游离兔腹主动脉, 切取移植段腹主动脉标本, 包括移植Dacron人工血管及吻合口两侧正常腹主动脉各1 cm, 生理盐水冲洗, 甲醛固定, 5 μm层厚横切片, 苏木精-伊红和Masson染色, 光镜观察Dacron人工血管表面内膜增生、血细胞黏附情况。

**扫描电镜观察:** 切取移植段腹主动脉标本, 纵形切开,

生理盐水冲洗, 在4 °C下2%戊二醛固定24 h后, 依次在体积分数为50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%乙醇溶液中浸泡30 min, 进行逐级脱水, 晾干后临界点干燥喷金, 扫描电镜观察兔腹主动脉Dacron人工血管表面组织学改变。

**主要观察指标:** 接枝后Dacron人工血管的生物相容性。

**设计、实施、评估者:** 均由第二作者完成, 采用盲法评估。

## 2 结果

### 2.1 Dacron人工血管组织学观察结果

**苏木精-伊红染色:** 术后1 d, 实验组腔内血栓形成不明显, 而对照组腔内开始有血栓形成; 1周时, 两组Dacron人工血管吻合处兔腹主动脉有不同程度的皱缩, Dacron人工血管表面新内膜形成(图2a, b); 2周后, 实验组Dacron人工血管表面新内膜和吻合口动脉内膜相延续, 表面有扁平样细胞附着(图3a), 而在对照组Dacron人工血管表面新内膜层较厚, 有大量细胞浸润, 表面未见扁平样细胞附着(图3b); 4周时, 实验组腔内血栓形成不明显(图4a), 而对照组实验动物腹主动脉腔内大量血栓形成, 血管闭塞(图4b)。

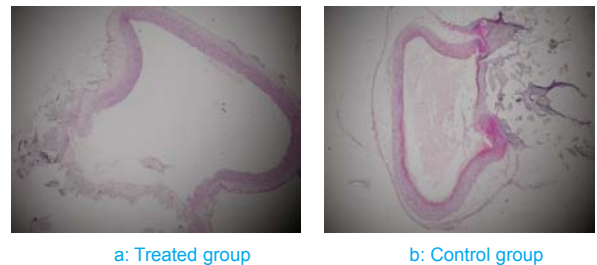


Figure 2 Cross-section of Dacron vascular prosthesis of two groups at 1 wk postoperation (Hematoxylin-eosin staining, ×100)

图2 术后1周两组Dacron人工血管横切面苏木精-伊红染色观察(×100)

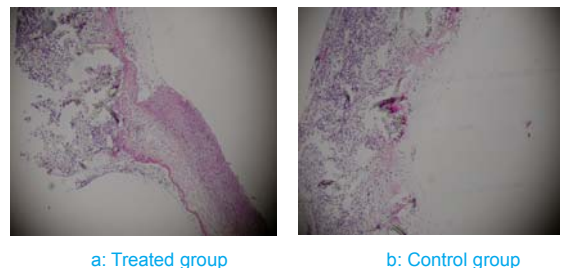
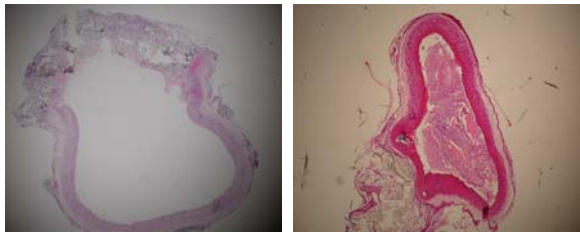


Figure 3 Neointima on the surface of Dacron vascular prosthesis of two groups at 2 wk postoperation (Hematoxylin-eosin staining, ×200)

图3 术后2周两组Dacron人工血管表面新内膜苏木精-伊红染色观察(×200)



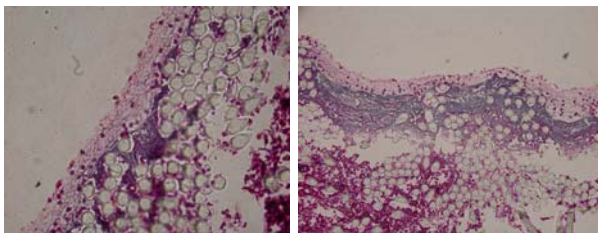
a: Treated group

b: Control group

Figure 4 Cross-section of Dacron vascular prosthesis of two groups at 4 wk postoperation (Hematoxylin-eosin staining,  $\times 100$ )

图4 术后4周两组Dacron人工血管横切面苏木精-伊红染色观察( $\times 100$ )

**Masson染色:** 术后第1天, 两组Dacron人工血管表面少量血栓形成, 第1周时, 观察到两组Dacron人工血管表面新内膜形成, 在这两时间点, 两组未见明显差异(图5a, b)。自第2周起, 实验组Dacron人工血管表面未出现新内膜分层现象, 层间细胞浸润不明显(图6a), 而对照组Dacron人工血管表面出现新内膜分层现象, 底层大量细胞浸润, 浅层细胞浸润不明显(图6b)。4周时两组观察结果与2周时一致。

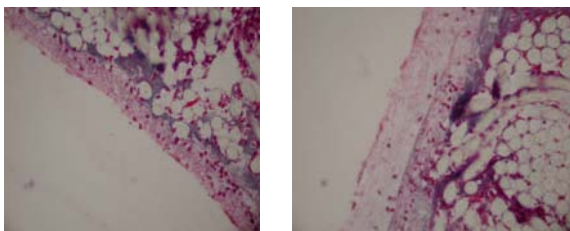


a: Treated group

b: Control group

Figure 5 Neointima on the surface of Dacron vascular prosthesis of two groups at 1 wk postoperation (Masson staining,  $\times 400$ )

图5 术后1周, 两组Dacron人工血管表面新内膜Masson染色观察( $\times 400$ )



a: Treated group

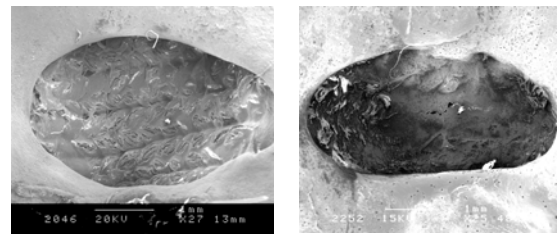
b: Control group

Figure 6 Neointima on the surface of Dacron vascular prosthesis of two groups at 2 wk postoperation (Masson staining,  $\times 400$ )

图6 术后2周, 两组Dacron人工血管表面新内膜Masson染色观察( $\times 400$ )

## 2.2 Dacron人工血管扫描电镜观察结果 术后1 d, 两

组Dacron人工血管表面见有血栓形成, 差异不明显; 1周时, 两组Dacron人工血管表面开始有新内膜形成, 实验组新内膜及Dacron人工血管表面附有大量红细胞, 但血小板及纤维素附着不明显。对照组Dacron人工血管新内膜表面有大量红细胞、血小板及纤维素附着, 见图7, 8; 术后第4周时, 实验组Dacron人工血管表面红细胞聚集明显, 血小板聚集黏附不明显(图9a); 而对照组Dacron人工血管表面新内膜形成, 新内膜表面多量血小板和红细胞黏附, 聚集在一起(图9b)。

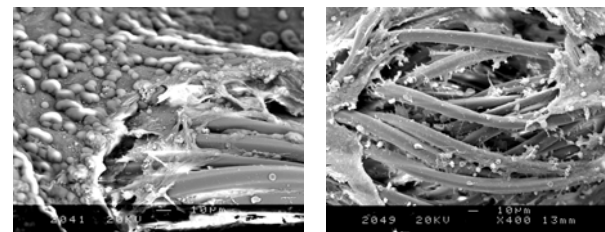


a: Treated group

b: Control group

Figure 7 Surface of Dacron vascular prosthesis of two groups at 1 wk postoperation (Scanning electron microscope,  $\times 27$ )

图7 术后1周, 两组Dacron人工血管表面(扫描电镜,  $\times 27$ )

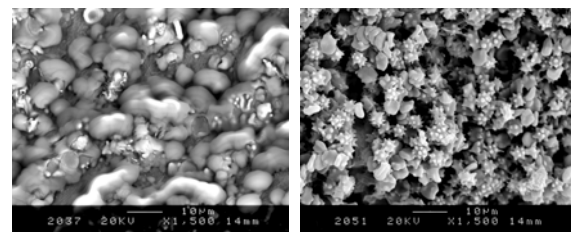


a: Treated group

b: Control group

Figure 8 Surface of Dacron vascular prosthesis of two groups at 1 wk postoperation ( $\times 400$ )

图8 术后1周, 两组Dacron人工血管表面( $\times 400$ )



a: Treated group

b: Control group

Figure 9 Surface of Dacron vascular prosthesis of two groups at 4 wk postoperation ( $\times 1\,500$ )

图9 术后4周, 两组Dacron人工血管表面( $\times 1\,500$ )

### 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。表面接枝改性是发展不凝血材料的好途径, 既可以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研究合成了MPC, 在其他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和没有毒性副作用<sup>[7]</sup>。

人工血管移植后, 首先发生的是血小板聚集和活化, 及纤维蛋白原的沉积; 后续巨噬细胞和淋巴细胞的浸润。既往研究表明, 在高分子材料表面接枝MPC, 能明显减少血小板的黏附和激活, 减少炎症细胞的浸润<sup>[9]</sup>。在本实验中, 通过在Dacron人工血管表面接枝MPC, 较对照组明显减少了新内膜的增生, 由于Dacron人工血管表面的不平整, 未能进行新内膜增生厚度的测量。术后第2周、通过Masson染色在对照组人工血管补片表面观察到新内膜的分层, 底层多量细胞浸润, 浅层细胞浸润不明显; 而实验组未见明显分层现象, 或者也出现了分层, 但底层较薄, 附着在Dacron人工血管表面而不明显, 这现象持续到术后的第4周。作者认为在Dacron人工血管补片表面接枝MPC, 有效抑制了早期补片表面血栓形成, 抑制炎症细胞的浸润, 抑制纤维蛋白原的沉积, 使早期的新内膜增生减少。

生物材料移植接触血液后, 首先发生的是蛋白的吸附, 吸附的蛋白有白蛋白、免疫球蛋白和纤维蛋白原等。吸附的蛋白的种类决定了材料的血液相容性, 吸附多量纤维蛋白原的材料血液相容性差, 吸附多量白蛋白的血液相容性好<sup>[10]</sup>。既往研究表明, 表面接枝MPC的生物材料能明显减少纤维蛋白原的吸附、增加白蛋白的吸附<sup>[7]</sup>。而白蛋白吸附的增加有利于内皮细胞的黏附。

总的来说, 通过生物、工程、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, 但许多问题尚待解决。本实验通过接枝MPC改性Dacron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人工血管表面新内膜的增生作用, 为进一步研究小口径人工血管提供了新的思路; 对移植一整段接枝MPC的小口径Dacron人工血管后的通畅率、内膜增生等情况, 以及长期的通畅率在进一步研究中。

### 4 参考文献

- [1] Roald HE, Barstad RM, Bakken IJ, et al. Initial interactions of platelets and plasma proteins in flowing non-anticoagulated human blood with the artificial surfaces Dacron and PTFE. *Blood Coagulation Fibrinolysis*. 1994;5(3): 355-363.
- [2] Sawada S, Iwasaki Y, Nakabayashi N, et al. Stress response of adherent cells on a polymer blend surface composed of a segmented polyurethane and MPC copolymers. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(3):476-484.
- [3] Kihara S, Yamazaki K, Litwak KN, et al. In vivo evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs*. 2003;27(2):188-192.
- [4] Berrocal MJ, Johnson RD, Badr IH, et al. Improving the blood compatibility of ion-selective electrodes by employing poly(MPC-co-BMA), a copolymer containing phosphorylcholine, as a membrane coating. *Anal Chem*. 2002;74(15):3644-3648.
- [5] Campbell EJ, O'Byrne V, Straford PW, et al. Biocompatible surfaces using methacryloyl phosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer. *J ASAIO*. 1994; 40(3): 853-857.
- [6] Xia CY, Liu CJ, Qiao T, et al. Zhongguo Dongmai Yinghua Zazhi. 2007;15(12): 906-908.  
夏成勇, 刘长建, 乔彤, 等. 磷酸胆碱接枝涤纶人工血管的生物相容性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(12):906-908.
- [7] Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes. *Polym J*. 1990; 22 (5): 355-360.
- [8] Xu JM, Yuan YL, Shan B, et al. Ozone-induced grafting phosphorylcholine polymer onto silicone film grafting 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine onto silicone film to improve hemocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003;30(3): 215-223.
- [9] Rose SF, Okere S, Hanlon GW, et al. Bacterial adhesion to phosphorylcholine-based polymers with varying cationic charge and the effect of heparin preadsorption. *J Mater Sci Mater Med*. 2005; 16(11): 1003 -1015.
- [10] Packham MA, Evans G, Glynn MF, et al. The effect of plasma proteins on the interaction of platelets with glass surfaces. *J Lab Clin Med*. 1969; 73(4):686-697.