

# 膨体聚四氟乙烯人工血管表面肝素固化替代犬下腔静脉的表面抗凝血性能\*☆

张明, 刘长建, 刘晨, 乔彤

## Heparin immobilization on the surface of expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts and its anticoagulation effect with replacement of canine inferior vena cava

Zhang Ming, Liu Chang-jian, Liu Chen, Qiao Tong

### Abstract

**BACKGROUND:** After various types of vein grafts are implanted in the body, due to the incompatibility of blood vessels with artificial surface and slow venous blood flow, low pressure, it is easy to lead to intravascular thrombosis  
**OBJECTIVE:** To study a new way to immobilize the heparin molecule on the expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft's surface and to evaluate its anticoagulation effect by replacing the canine inferior vena cava.  
**METHODS:** Chitosan molecule with photoallergic radical was firstly immobilized to the surface of ePTFE graft, secondly heparin was immobilized to the chitosan molecule under acid condition. Thus the ePTFE graft' surface was immobilized with a layer of heparin molecule. Local canines' vena cava was replaced with control and experiment ePTFE grafts. Angiography from the femoral vein and scanning electron microscope (SEM) observation were performed.  
**RESULTS AND CONCLUSION:** All canines' vena cava which was replaced with untreated ePTFE grafts was thrombosed since the first week after operation, while the canines' vena cava which was replaced with ePTFE grafts immobilized with heparin kept unobstructed until the fourth week after operation. SEM observation found that mass of platelets, red blood cells and fibrin deposited on the untreated grafts' surface, while seldom blood components could be observed on the grafts' surface which were immobilized with heparin. ePTFE graft which surface is immobilized with heparin has an excellent anticoagulant ability, and it is an ideal venous graft in clinical usage.

Department of Vascular Surgery, Gulou Hospital of Nanjing City, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Zhang Ming☆, Doctor, Attending physician, Department of Vascular Surgery, Gulou Hospital of Nanjing City, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China zhang\_ming@163.net

Supported by: the Scientific Research Project of Nanjing Health Bureau, No. YKK0442\*

Received: 2011-04-21 Accepted: 2011-05-25

Zhang M, Liu CJ, Liu C, Qiao T. Heparin immobilization on the surface of expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts and its anticoagulation effect with replacement of canine inferior vena cava. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(47): 8833-8836. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 各种类型人工血管植入机体静脉后, 由于血液与人工血管材料表面的不相容性和静脉内血流慢、压力低等原因, 极易导致血管腔内血栓形成。  
**目的:** 观察膨体聚四氟乙烯人工血管表面固化肝素后代替犬下腔静脉的表面抗凝血性能和长期通畅效果。  
**方法:** 将壳聚糖分子中引入光敏基团后, 通过光化学固定至膨体聚四氟乙烯材料表面, 在酸性条件下将肝素以离子键形式接枝到壳聚糖上, 在膨体聚四氟乙烯人工血管表面形成光滑的肝素层。以固化肝素的膨体聚四氟乙烯人工血管与未处理膨体聚四氟乙烯人工血管间置代替犬下腔静脉, 检测其抗凝血性能。  
**结果与结论:** 固化肝素的膨体聚四氟乙烯人工血管植入后 2 周、1 个月人工血管内壁光滑, 仅有少量附壁血栓形成, 无充盈缺损, 吻合口无狭窄, 通畅率达 100%; 未处理膨体聚四氟乙烯人工血管植入后 1 周即显示人工血管内附有大量血栓成分, 完全堵塞, 形成丰富的侧枝。说明固化肝素膨体聚四氟乙烯人工血管是一种理想的下腔静脉替代物。  
**关键词:** 膨体聚四氟乙烯(ePTFE); 肝素; 人工血管; 下腔静脉; 抗凝血性  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.47.023

张明, 刘长建, 刘晨, 乔彤. 膨体聚四氟乙烯人工血管表面肝素固化替代犬下腔静脉的表面抗凝血性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(47):8833-8836. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

膨体聚四氟乙烯 (expanded polytetrafluoroethylene e-PTFE, ePTFE) 人工血管是目前最常用的移植血管, 其在大、中动脉的代用方面已取得了很大的成功, 但用于静脉系统时, 由于血流缓慢, 血管内压力低, 人工血管本身缺乏抗凝血性能, 顺应性太低, 可出现血小板黏附、聚集导致血栓形成, 在术后经常发生人工血管内血栓形成, 甚至完全阻塞。因而研制一种理想的可应用于静脉系统的人工血管代用品是目前血管外科亟待解决的问题。

ePTFE人工血管表面改性提高抗凝血性能成为提高其长期通畅率的研究重点。采用碳涂层人工血管可以减少血小板聚集, 但长期通畅率并未见明显改善<sup>[1]</sup>; 采用磷脂多聚体涂层制成的复合多聚体人工血管<sup>[2]</sup>, 植入动物模型1个月未发现血栓和假膜形成, 但长期能否抑制内膜增生仍然值得怀疑, 因为磷脂多聚体虽然有类似细胞膜样磷脂结构, 具有抗血栓形成作用, 但多聚化合物在机体内吸附血浆蛋白的效应仍然存在, 吸附蛋白的自组装作用可能会影响其长期的抗血栓活性<sup>[3]</sup>。人工血管材料表面连接聚环氧乙烷侧链可提高其亲水性, 使其界面自由能降低, 减少血浆蛋白吸附, 使人工血管内假膜

南京大学医学院附属南京市鼓楼医院血管外科, 江苏省南京市 210008

张明☆, 男, 1974年生, 江苏省南京市人, 汉族, 2003年南京大学医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事血管代用品及其表面抗凝改性研究。zhang\_ming@163.net

中图分类号:R318 文献标识码:B 文章编号:1673-8225 (2011)47-08833-04

收稿日期:2011-04-21 修回日期:2011-05-25 (20110410006/GW-44)

形成薄而均匀, 避免血栓形成, 但体内实验发现代替静脉时仍易形成血栓<sup>[4]</sup>。

作者在ePTFE人工血管表面固化肝素以改变其腔面的抗凝血性能, 间置代替犬下腔静脉后, 于体内检测其抗凝血效果。

## 1 材料和方法

**设计:** 观察性实验。

**时间及地点:** 于2008-05/2010-06 在南京市鼓楼医院动物实验中心完成。

**材料:** 南京当地杂种犬16只, 体质量(15.0±0.3) kg, 雌性6只, 雄性10只, 分为2组: 实验组8只(植入固化肝素的ePTFE人工血管)、对照组8只(植入未处理的ePTFE人工血管)。

**主要材料:** 直径8 mm ePTFE人工血管(上海塑料研究所); 肝素钠粉剂(Sigma公司); 复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖(南京大学表面和界面化学工程技术研究中心)。

**实验方法:**

**ePTFE人工血管表面肝素固化:** 将ePTFE人工血管浸于3%复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖的稀醋酸溶液中10 min, 取出后在棕色干燥器中干燥。将干燥后附有复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖的ePTFE人工血管置于紫外灯下(8 W, 254 nm UV)光照1 min, 依次以体积分数1%醋酸溶液、0.05%NaOH, 生理盐水冲洗, 去除未接枝的复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖, 再次干燥后备用。

将0.05 g肝素加入5 mL乙酸缓冲液(pH值4.5)制成肝素溶液, 将接枝有复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖的ePTFE人工血管浸入肝素溶液中2 h, 生理盐水冲洗后干燥待用。

**动物实验:** 固化肝素的ePTFE人工血管8根, 未处理ePTFE人工血管8根, 长度均为2 cm, 高压蒸汽(133 °C, 26 kPa, 4 min)灭菌后待用。肌注氯胺酮(20 mg/kg)后, 静脉推注经腹正中切口显露并游离肾静脉下方一段下腔静脉, 静脉注射肝素(1 mg/kg)后, 以无损伤血管钳阻断, 切除部分下腔静脉, 以固化肝素的ePTFE人工血管或ePTFE人工血管间置移植, 两端吻合口均以7-0 Prolene®无损伤线单层连续缝合。吻合完毕后排气, 恢复血流, 仔细止血、关腹。术中青霉素80×10<sup>4</sup> U溶于5% GNS 500 mL中静滴。术后3 d每日肌注青霉素80×10<sup>4</sup> U单位, 皮下注射肝素1.5 mg, 3 d后改口服肠溶阿司匹林0.3 g/d至处死。实验组和对照组术后均喂养14~30 d, 分别于植入后14, 30 d各取4只行静脉造影后处死<sup>[5]</sup>。

**取材:** 处死后切取移植的ePTFE人工血管及相连的宿主下腔静脉, 纵行切开标本后大体观察血管内壁情况。取部分血管2.5%戊二醛固定, 乙醇逐级脱水, CO<sub>2</sub>临界点干燥, 表面喷金, 扫描电镜观察。

**主要观察指标:** 固化肝素的ePTFE人工血管与未处理ePTFE人工血管间置代替犬下腔静脉的抗凝血性能。

## 2 结果

2.1 实验动物数量分析 16只犬均进入结果分析。

2.2 固化肝素的ePTFE人工血管与未处理ePTFE人工血管植入后下腔静脉造影观察结果 实验组人工血管植入后2周和1个月下腔静脉造影均显示ePTFE人工血管内壁光滑, 无充盈缺损, 吻合口无狭窄, 通畅率达100%, 见图1, 2。对照组人工血管植入后7 d下腔静脉造影示人工血管完全闭塞, 近远端吻合口间形成丰富侧枝, 见图3。



Figure 1 Canine vena cava was replaced with expanded polytetrafluoroethylene heparin-chitosan vascular graft at 2 wk after operation

图 1 肝素-壳聚糖固化膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 2 周



Figure 2 Canine vena cava was replaced with expanded polytetrafluoroethylene heparin-chitosan vascular graft at 1 mon after operation

图 2 肝素-壳聚糖固化膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 1 个月



Figure 3 Canine vena cava was replaced with untreated expanded polytetrafluoroethylene vascular graft at 1 wk after operation

图 3 未处理膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 1 周

**2.3 固化肝素的ePTFE人工血管与未处理ePTFE人工血管植入后人工血管大体观察结果** 实验组人工血管植入后1个月取出, 见ePTFE人工血管内壁光滑, 无明显附壁血栓, 吻合口无狭窄, 见图4。对照组人工血管植入后7 d即见人工血管内壁附有大量血栓成分, 见图5。

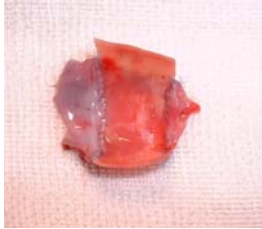


Figure 4 Canine vena cava was replaced with expanded polytetrafluoroethylene heparin-chitosan vascular graft at 1 mon after operation and there was no thrombosis

图 4 肝素-壳聚糖固化膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 1 个月无血栓



Figure 5 Canine vena cava was replaced with untreated expanded polytetrafluoroethylene vascular graft at 1 wk after operation with thrombosis

图 5 未处理膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 1 周血栓形成

**2.4 固化肝素的ePTFE人工血管与未处理ePTFE人工血管植入后人工血管扫描电镜观察结果** 实验组人工血管植入后1个月取出, 扫描电镜( $\times 1\ 000$ )检查示ePTFE人工血管内壁有少量血小板和纤维蛋白黏附, 见图6。对照组人工血管植入后7 d扫描电镜( $\times 1\ 000$ )检查示人工血管内壁附有大量血栓成分, 见图7。

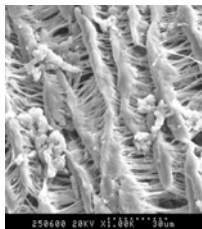


Figure 6 Canine vena cava was replaced with expanded polytetrafluoroethylene heparin-chitosan vascular graft at 1 mon after operation, there was no thrombosis and few platelets, fibrin deposited under scanning electron microscope ( $\times 1\ 000$ )

图 6 肝素-壳聚糖固化膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 1 个月, 扫描电镜观察无血栓, 少量血小板、纤维蛋白黏附( $\times 1\ 000$ )

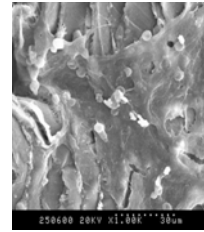


Figure 7 Canine vena cava was replaced with expanded polytetrafluoroethylene vascular graft at 1 wk after operation, mass thrombosis deposited under scanning electron microscope ( $\times 1\ 000$ )

图 7 膨体聚四氟乙烯人工血管代替犬下腔静脉植入后 1 周扫描电镜观察发现血栓( $\times 1\ 000$ )

### 3 讨论

**3.1 大静脉替代物研究的意义** 各种类型的人工血管植入机体静脉后, 由于血液与人工血管材料表面的不相容性和静脉内血流慢、压力低等原因, 极易导致血管腔内血栓形成<sup>[6]</sup>。现已有的研究表明, 在人工血管移植至机体后, 除吻合口边缘有内皮细胞自宿主血管爬行延伸外, 大部分人工血管内不能形成完整的内皮细胞层, 故易引起血小板黏附、聚集、释放和纤维蛋白附着<sup>[7]</sup>, 从而导致人工血管内血栓形成, 所以人工血管代替静脉的通畅率很低<sup>[8]</sup>。

为提高静脉人工血管移植通畅率, 20世纪70年代末即开始进行人工血管内皮细胞种植的研究, 以期通过血管内皮细胞特有的抗血栓性提高人工血管近远期通畅率, 但即便如此, 在其行静脉移植时效果仍不理想, 尚需辅以远侧暂时性动静脉瘘和术后抗血小板和抗凝疗法<sup>[9]</sup>。本实验通过在人工血管材料表面固化肝素/壳聚糖复合物, 较人工血管表面内皮细胞种植简单方便, 没有脱落细胞血管支架的残留抗原性, 是一种理想的临床大静脉替代物<sup>[10]</sup>。

**3.2 肝素/壳聚糖复合物的抗凝特点** 壳聚糖是一种天然阳离子聚糖, 作者通过在其分子结构中引入芳香叠氮类的光活性基团制备成复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖, 在紫外光(254 nm UV)辐射下, 复合有芳香叠氮类基团的壳聚糖中的芳香叠氮基团发生不可逆光解, 产生氮气和活性十分高的氮烯中间物, 这种中间物具有加入到碳-碳双键的能力, 能形成氮杂环丙烷系物质, 也可直接插入到碳-氢键形成仲胺, 最终可使壳聚糖以其价键形式接枝到ePTFE材料表面。已有研究表明, 相对光滑的表面可阻止纤维蛋白和血小板聚集和黏附<sup>[11]</sup>, 从而只能在高聚物材料表面形成微栓, 相反, 粗糙的表面会促进黏附, 导致血栓形成<sup>[12]</sup>。壳聚糖是一种线性的高分子, 光化学固定法将其接枝到ePTFE材料表面时<sup>[13]</sup>, 仍可保持其处于高度有序的状态, 避免了使用等离子体<sup>[14]</sup>、臭氧活化等方法改性时可导致高聚物处于高度无序状

态的缺陷<sup>[15]</sup>。从而使壳聚糖在ePTFE材料表面形成光滑的膜状,可减少ePTFE材料表面血栓的形成。

肝素是一种相对分子质量为2 000左右的酸性黏多糖,其链节单位是由葡萄糖胺磺酸、葡萄糖醛酸和艾社糖磺醛酸等所组成,从其结构图上可以看出,肝素分子中含有两类活性基团,一是:  $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{COO}^-$ 等负离子,另一类是:  $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 。如果将肝素直接硬连接到聚合物的表面不仅会降低聚合物本身的顺应性,而且肝素分子的空间构型、构象可能会发生改变,不能与抗凝血因子III很好的配合,而降低其抗凝活性。已有研究表明使肝素分子与聚合物表面有一定的距离可以提高肝素涂层的抗凝血性能。有研究采用采用亲水性PEG的PEG作为间隔基合成了Biomed-PEG-Hep材料,显示出通过PEG为间隔基键合肝素,肝素的抗凝血性能可得到充分的发挥<sup>[10]</sup>。本实验在弱酸条件下使壳聚糖上的 $-\text{NH}_3^+$ 与肝素分子中的负离子 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{COO}^-$ 形成离子键(图8),使肝素稳定地键合在ePTFE材料表面,ATR-FTIR谱显示壳聚糖键合肝素后,在 $1\ 226\ \text{cm}^{-1}$ 处出现肝素的特征吸收峰。键合到壳聚糖表面的肝素能依靠柔软的接枝链保持其链段的可运动性,维持肝素分子自然的构型和构象,从而保持肝素天然的抗凝血活性。

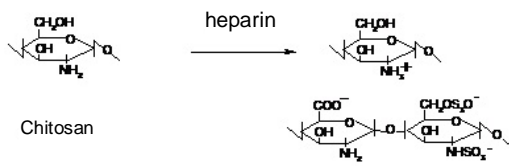


Figure 8 Chitosan-heparin complex  
图8 壳聚糖-肝素复合物分子示意图

3.3 固化肝素ePTFE人工血管代替犬下腔静脉的评价实验组植入后2周、1个月血管造影显示ePTFE人工血管内壁光滑,无充盈缺损,吻合口无狭窄,通畅率达100%;而对照组植入后1周即显示人工血管完全堵塞,形成丰富的侧枝。大体观察和扫描电镜检查示实验组人工血管内壁仅有少量附壁血栓形成,吻合口无明显组织增生;而对照组人工血管内附有大量血栓成分,管腔完全堵塞。本实验在未附加远侧动静脉瘘的情况下,植入后1个月人工血管通畅率高达100%,且固化肝素的ePTFE人工血管具有易缝合、不漏血、易消毒和保存等优点,这些均表明肝素固化的ePTFE人工血管是一种理想的大静脉移植替代物。

#### 4 参考文献

[1] Wang HF,Liu JJ,Wang YW,et al.Waive Lilun yu Shijian. 2009;14(3):175-177.  
王豪夫,刘军军,王曰伟,等.股-腘动脉旁路术应用袖状接头碳涂层人工血管的临床分析[J].外科理论与实践,2009,14(3):175-177.

[2] Ishihara K,Iwasaki Y,Ebihara S,et al. Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on polyethylene membrane surface for obtaining blood cell adhesion resistance. Colloids Surf B Biointerfaces. 2000;18(3-4):325-335.

[3] Zhang XD,Ni ZB,Li Y,et al.Huaxue Xuebao. 2007;65(22):131-136. 张晓冬,倪忠斌,李英,等.MMA/MPC共聚物膜的制备及其抗凝血性能研究[J].化学学报,2007,65(22):131-136.

[4] Han DK,Park K,Park KD,et al.In vivo biocompatibility of sulfonated PEO-grafted polyurethanes for polymer heart valve and vascular graft. Artif Organs.2006;30(12):955-959.

[5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[6] Wang ZG,Wu JD,Du W,et al.Zhonghua Waive Zazhi. 1994;32(3):133.  
汪忠镐,吴继东,杜玮,等.血管内皮细胞衬里腔静脉移植物的研究和应用[J].中华外科杂志,1994,32(3):133.

[7] Torikai K,Ichikawa H,Hirakawa K,et al.A self-renewing, tissue-engineered vascular graft for arterial reconstruction. J Thorac Cardiovasc Surg. 2008;136(1):37-45.

[8] Fortan F,Choussat A,Deville C,et al. Aortic valve homografts in the surgical treatment of complex cardiac malformations. J Thorac Cardiovasc Surg.1984;87:649.

[9] Zhou M,Liu CJ,Wei ZQ,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(36):7118.  
周敏,刘长建,卫志庆,等.以肝素固化脱细胞支架构建的小口径抗凝人工血管[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(36):7118.

[10] Lin XF.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(52):10357.  
林雪芳.血管支架置入与纤维蛋白原的相关变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(52):10357.

[11] Hecker JK,Scandrett LA. Roughness and thrombogenicity of the outer surface of intravascular catheters.J Biomed Mater Res.1985;19:381-395.

[12] Zuo WY,Feng YK,Zhang SF.Cailiao Daobao. 2005;19(9):105-107. 左文耀,冯亚凯,张世锋.光固化改善医用高分子材料血液相容性[J].材料导报,2005,19(9):105-107.

[13] Li SB,Yan YS,Li H,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu . 2010;14(8):1357-1360.  
李少彬,闫玉生,李辉,等.等离子体磺酸化肝素蛋白膜聚四氟乙烯复合小口径人工血管的制备[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(8):1357-1360.

[14] Xia CY,Liu CJ,Yang NH. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2010;14(38):7055-7058.  
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.

[15] Kim M,Lee JY,Jones CN,et al.Heparin-based hydrogel as a matrix for ncapsulation and cultivation of primary hepatocytes. Biomaterials.2010;31(13):3596-3603.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金资助:** 南京市卫生局科研课题项目(YKK0442), 课题名称: 血管腔内材料表面肝素固化的研究。

**作者贡献:** 张明进行实验设计, 实验实施为张明、刘晨、乔彤, 实验评估为乔彤, 资料收集为张明、张明成文, 刘长建审校, 刘长建对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 经本院伦理委员会批准, 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

**本文创新性:** 以“肝素, 人工血管; 肝素, 表面固化”为关键词检索中文期刊全文数据库(CHKD)、中国生物医学期刊引文数据库(CMCC/CMCI)、中国生物医学文献服务系统(Sinomed)1995/2010 文献, 未检索到相关文章。本文开发出一种新型的表面抗凝剂-肝素/壳聚糖复合物, 并通过光化学固定法将其接枝固化至各种血管腔内材料和人工血管材料表面, 在其表面形成光滑的肝素层, 并于体外实验证实具有良好的抗凝血效果。