

# 3 种血管替代物植入人体后的变化及比较分析

张磊 付炜 白洁 张文 冯蓓 殷猛 张海波

**【摘要】** 目的:了解临床上 3 种常用血管替代物人体内移植后的变化。 方法:临床获取因治疗需要而取出的先天性心脏病患儿早期植入的 Gore-Tex 管道、牛颈静脉管道和同种带瓣管道标本,通过对大体标本观察,组织学切片 HE 染色、Masson 染色、Verhoeff 弹性纤维染色以及特异性细胞标记物( $\alpha$ -SMA、calponin、VE-cadherin)免疫组织化学染色,评价移植物植入人体后的变化。 结果:Gore-Tex 管道移植后原管道未降解,管道壁中无细胞长入,管腔内形成假膜,其中假膜富含胶原纤维,无弹性纤维,散在  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 细胞和 calponin<sup>+</sup> 细胞。牛颈静脉管道移植后,原管道未降解,管道壁中无细胞长入,管腔内可见假膜,假膜较厚,富含胶原纤维,但存在特殊排列的弹性纤维,弹性纤维所在区域聚集  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 细胞和 calponin<sup>+</sup> 细胞。同种带瓣管道移植后,管道近乎全层钙化,仅残留浅薄的内膜,内膜表面光滑,无假膜形成,可见 VE-cadherin<sup>+</sup> 内皮细胞层及残存的平滑肌细胞。 结论:Gore-Tex 管道和牛颈静脉管道难以降解,且不具备生长性,远期易出现管道狭窄;同种带瓣管道移植后无假膜形成,但易出现钙化,限制了管道的使用寿命。

**【关键词】** Gore-Tex 管道;牛颈静脉管道;同种带瓣管道;人体内移植

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.03.010

**Histological changes and comparisons of three great vessel substitutes after human implantation** ZHANG Lei, FU Wei, BAI Jie, ZHANG Wen, FENG Bei, YIN Meng, ZHANG Haibo. Department of Cardiothoracic Surgery, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the changes of three commonly used blood vessel substitutes in vivo after implantation. **Methods:** Gore-Tex conduit, bovine jugular vein conduit and valved homograft conduit were obtained from patients who had received graft implantation in their early ages. The conduit grafts were processed for gross observation, HE stain, Masson stain, Verhoeff elastin stain and immunohistochemistry stains on specific cell markers, including  $\alpha$ -SMA, calponin and VE-cadherin, for investigations on the histological changes after human implantation. **Results:** After human implantation, the Gore-Tex conduit didn't degrade, and cell ingrowth was not observed. However, neointima formed inside the lumen, which included much collagen and scattered  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> and calponin<sup>+</sup> cells, but no elastin fiber. After bovine jugular vein conduit was implanted, the graft didn't degrade with no cell ingrowing into the wall, but neointima formation was observed. The neointima formed inside the bovine jugular vein was thicker than that inside the Gore-Tex conduit, and was with abundant collagen and particularly arranged elastin fiber. Histological sections revealed a cluster of  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> and calponin<sup>+</sup> cells

基金项目:国家自然科学基金(31200735);上海市科委基金(15411966800);上海卫生和计划生育委员会基金(20144Y0166);浦东新区科委基金(PKJ2015-Y01)

作者单位:200127 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心心胸外科

通信作者:张海波,Email:haibo.z@yahoo.com

in the area where elastin fiber was observed. After valved homograft conduit was implanted, a nearly full-layer calcification leaving only a thin layer of intima was observed, however, no neointima formed and the luminal surface was smooth. VE-cadherin<sup>+</sup> endothelial cells covered the luminal surface and was beneath the residual smooth muscle cell. **Conclusions:** Gore-Tex conduit and bovine jugular vein conduit are incapable of degrading and growing after implantation, which is easy to result in restenosis of the conduit in the late follow-up. Valved homograft conduit is the only vessel substitute with no neointima formation. Calcification is the main drawback of valved homograft conduit, which restrains the lifespan of the graft.

**【Key words】** Gore-Tex conduit; Bovine jugular vein conduit; Valved homograft conduit; Human implantation

先天性心脏病(先心病)常合并各种血管畸形,手术时可能需要搭建新的心内外血液循环途径,合适的血管替代物不可或缺。先心病手术中常用的血管替代材料主要可分为两类,一类是包括涤纶(Dacron)、膨体聚四氟乙烯(expanded Polytetrafluoroethylene, ePTFE, 商品名为 Gore-Tex)等在内的人工合成材料,另一类是以同种带瓣管道、牛颈静脉管道等为代表的生物材料。这些材料各有优缺点:人工材料不受供体来源限制,不易发生生物源性交叉污染,但需要克服组织-材料相容性问题;生物材料具有天然组织的结构,但易发生免疫排斥反应,可能会降低管道的使用寿命。

我们在先心病手术实践中,建立了同种带瓣管道获取、保存和应用规范,利用牛颈静脉管道避免了同种带瓣管道的来源不足,还将 Gore-Tex 管道广泛应用于右室流出道重建和心内外管道搭建手术。因有患者需再次手术置换管道,我们对置换下的管道进行观察,以期研究新型血管替代物提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本的获取

组织标本来源于上海儿童医学中心心胸外科 3 例因治疗需要行管道置换的患儿。研究取得患儿家属同意,并经医院伦理委员会批准。标本取自重建的右室流出道-肺动脉部位:(1)Gore-Tex 管道移植标本取自肺动脉闭锁行右室流出道重建术后 9 年的患儿;(2)牛颈静脉管道移植标本取自肺动脉闭锁行右室流出道重建术后 8 年的患儿;(3)同种带瓣管道标本取自完全性大动脉转位/肺动脉瓣狭窄/室间隔缺损行 Rastelli 术后 11 年的患儿。所有标本获取后直接浸泡在 4℃生理盐水中,置于冰盒内作进一步处理。

### 1.2 主要试剂

HE 染色试剂盒、改良 Masson 三色染色试剂

盒、Verhoeff 弹性纤维染色试剂盒购自上海哈灵生物科技有限公司;抗血管内皮细胞钙黏蛋白(VE-cadherin)抗体、抗调宁蛋白(calponin)抗体、抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体购自 Abcam 公司;GTVision<sup>TM</sup> + 抗鼠/兔通用型免疫组织化学检测试剂盒、增强型 DAB 显色试剂盒购自上海基因科技股份有限公司。

### 1.3 3 种管道移植人体植入后的变化

管道植入后,通过胸部平片、心血管磁共振了解管道移植后是否发生钙化、瘤样扩张或管道狭窄。管道取出术中及术后,观察管道是否有钙化、管腔内是否有新生假膜以及管道是否发生降解。此外,为了了解人工合成的 Gore-Tex 管道人体植入前的微观结构特征,我们取相同的 Gore-Tex 管道样本进行扫描电子显微镜观察。

### 1.4 3 种管道移植组织切片的特殊染色

术中获取的管道标本经 4%多聚甲醛溶液固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,进行石蜡包埋、切片,梯度二甲苯和乙醇溶液复水。按照试剂盒说明书完成各切片 HE 染色、Masson 三色染色、Verhoeff 弹性纤维染色,观察管道组织学形态、胶原纤维和弹性纤维的分布特征。

### 1.5 3 种管道移植组织切片的免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡复水、3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)处理后,分别滴加  $\alpha$ -SMA (1 : 200)、calponin (1 : 200) 和 VE-cadherin (1 : 200) 一抗,4℃孵育过夜后,以 GTVision<sup>TM</sup> + 抗鼠/兔通用型免疫组织化学二抗室温孵育约 30 min, DAB 显色,细胞核采用苏木素套染着色。

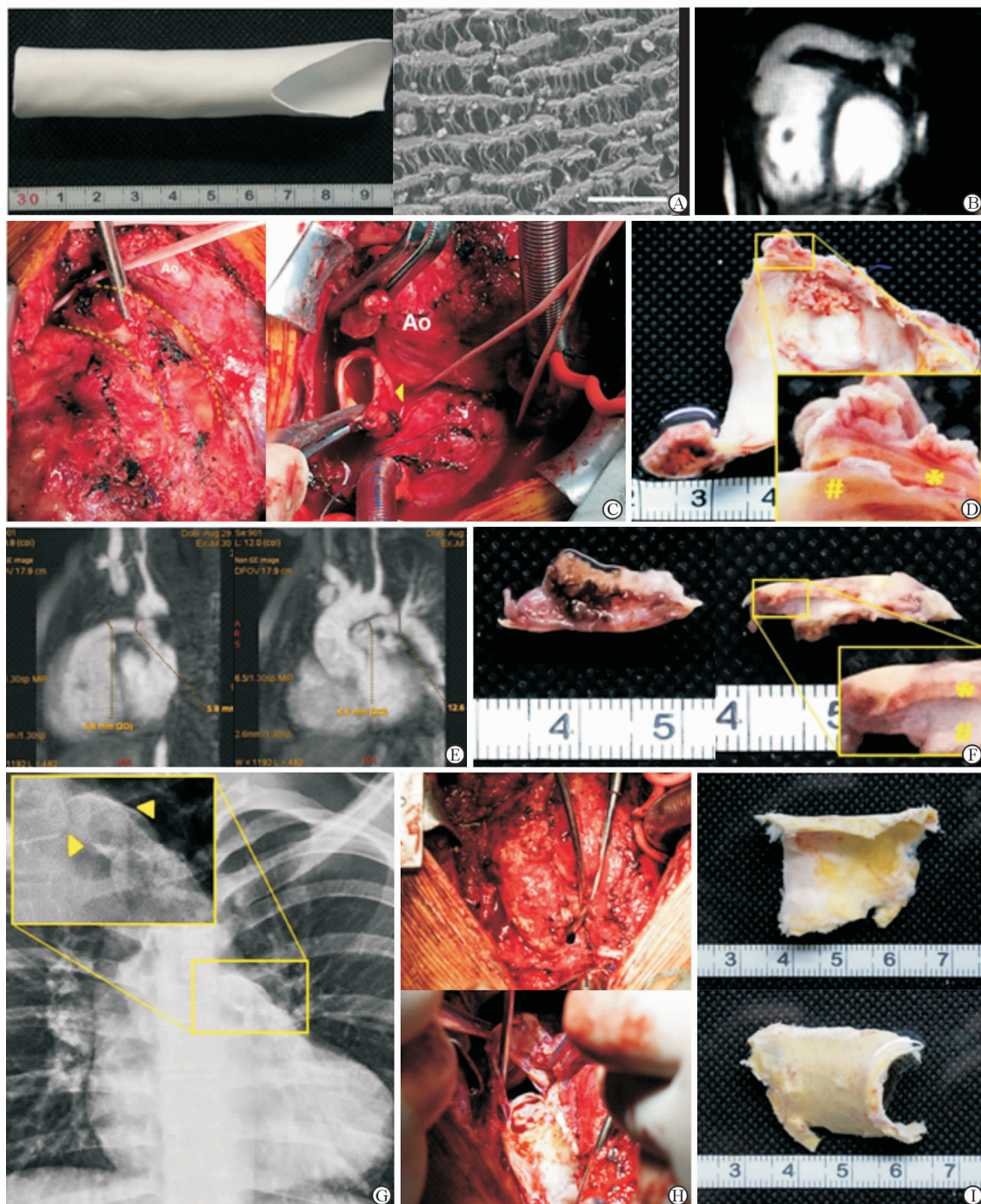
## 2 结果

### 2.1 3 种管道移植人体植入后的变化

Gore-Tex 管道植入前,内外面光滑平整,管道弹性较强,扫描电子显微镜示管道表面有嵴样突

起,突起之间有约  $20\ \mu\text{m}$  孔隙,孔隙中有细纤维连接(见图 1A)。患儿植入 Gore-Tex 管道 9 年后,心血管磁共振示管道无动脉瘤样扩张,但管道相对狭窄(见图 1B)。术中见管道移植物完整、未降解,可

与周围组织分离,管腔内尚通畅(见图 1C)。大体标本可见管腔内假膜,部分区域光滑、半透明、柔软,可较容易地与 Gore-Tex 管道分离,部分区域钙化,突出于管腔,触之有沙粒感(见图 1D)。



注:A为Gore-Tex管道植入前形态及扫描电子显微镜观察(标尺为 $50\ \mu\text{m}$ );B为患儿移植Gore-Tex管道9年后管道磁共振图像;C为Gore-Tex管道取出术中情况;D为术后Gore-Tex管道大体标本(\*标示Gore-Tex管道本身,#为管腔内新生假膜);E为患儿移植牛颈静脉管道8年后磁共振图像;F为术后牛颈静脉管道大体标本(\*标示牛颈静脉管道本身,#为管腔内新生假膜);G为患儿移植同种带瓣管道11年后胸部平片,可见钙化影(箭头处);H为同种带瓣管道取出术中情况;I为术后同种带瓣管道大体标本

图1 3种管道移植物植入人体后的变化



植入牛颈静脉管道的患儿手术 8 年后,心血管磁共振管道无动脉瘤样扩张,但管道整段狭窄(见图 1E)。对大体标本观察发现,管道壁稍钙化,管腔有假膜形成,但较 Gore-Tex 管道的假膜厚。假膜与管道分界清晰,易于剥离。假膜内侧极不光滑,有组织凸向管腔,触之局部稍硬(见图 1F)。

另一患儿移植同种带瓣管道替换原有肺动脉 11 年后,胸部平片示替换的同种带瓣管道严重钙化(见图 1G)。术中见管道无动脉瘤样扩张,管道内较通畅,但钙化严重,整体坚硬(见图 1H)。大体标本可见管道壁接近完全钙化,管腔内残余组织表面光滑,与钙化组织分界清晰易剥离,管腔表面未见明显突起的组织(见图 1I)。

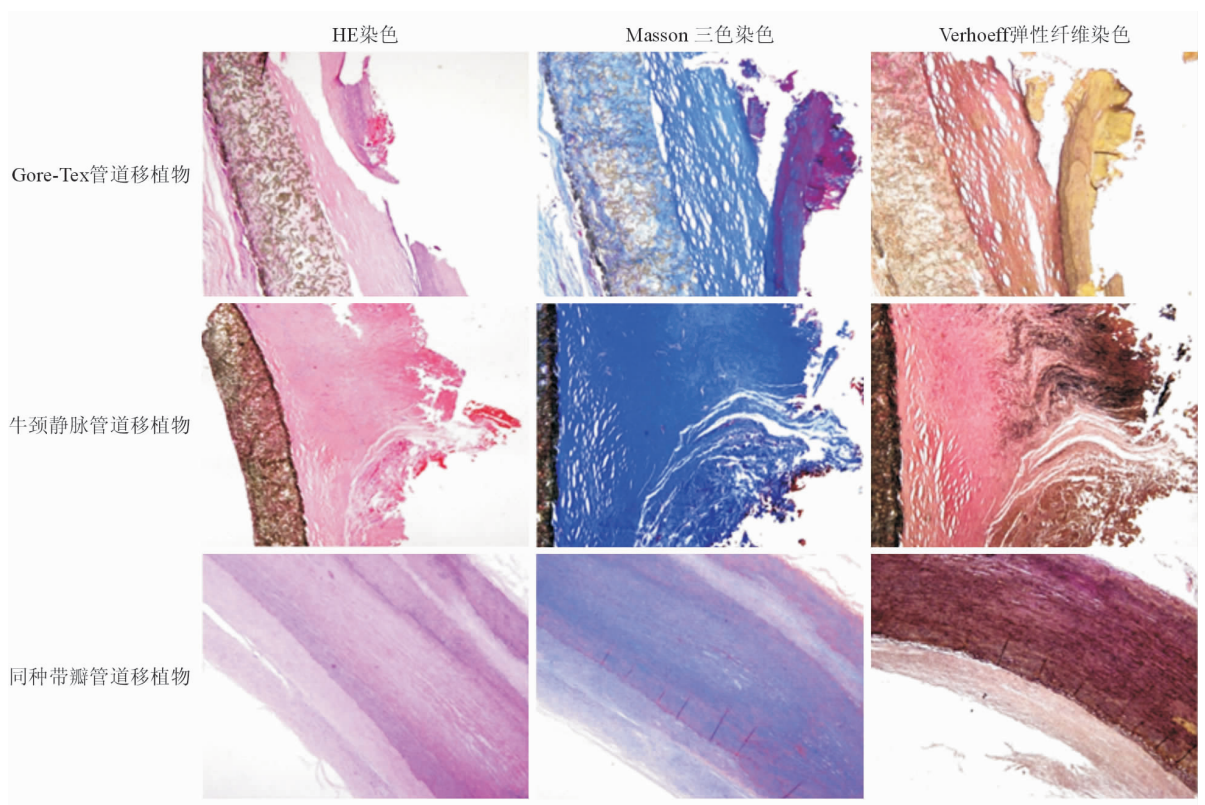
### 2.2 3 种管道移植物的组织标本观察

HE 染色可了解管道移植物的组织学变化及新生假膜的细胞学成分。Gore-Tex 管道移植切片中可见假膜与管道本身分界清晰,假膜内仅含有少量细胞成分,但富含细胞外基质,假膜钙化部分无细胞核。组织切片还显示 Gore-Tex 管道未降解,管道间隙内无细胞核。牛颈静脉管道移植物的管道本身不能被 HE 着色,也未被吸收降解。管道壁中有大量孔隙,但无细胞成分。新生假膜厚实,表面不光滑,部分组织突向腔内,假膜中可见细胞核,

细胞外基质排列结构类似 Gore-Tex 管道移植植物。同种带瓣管道的管腔中没有假膜形成,表面光滑平整。脱钙后管壁组织分层明显,钙化部分残余极少量细胞核,未钙化部分组织结构类似正常大动脉,细胞及细胞外基质沿管壁呈环形排列。

Masson 染色是了解细胞外基质纤维性质的常用方法,胶原纤维可被 Masson 三色染色剂染为蓝色。Gore-Tex 管道移植植物可见新生假膜全层富含蓝染的胶原纤维,而假膜表面钙化组织呈红色,基本不含胶原纤维。与 Gore-Tex 管道的假膜类似,牛颈静脉管道移植植物内假膜也见全层蓝染的胶原纤维,表面少量钙化组织被染为红色。由于胶原纤维是正常大动脉细胞外基质的主要成分,因此同种带瓣管道移植植物脱钙后全层可见蓝染的胶原纤维,对比内层未钙化组织,外侧钙化部分染色不均匀。

Verhoeff 弹性纤维染色可将组织中的弹性纤维染成黑色。同种带瓣管道为天然大血管移植植物,移植 11 年后尽管管壁全层严重钙化失去原有弹性,但仍可见残留的弹性纤维。Gore-Tex 管道移植植物中新生假膜没有覆盖弹性纤维,但在牛颈静脉管道移植植物突出管腔的部分组织中可见染为黑色的弹性纤维,呈径向排列,新生假膜底层即靠近牛颈静脉管道壁的组织中无弹性纤维。见图 2。



注:牛颈静脉管道移植植物 HE 染色图片为数张图片的拼接图

图 2 3 种管道移植物的组织学染色结果(×50)

### 2.3 3 种管道移植物的免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色法检测管道移植物的平滑肌细胞标记物  $\alpha$ -SMA、calponin 及内皮细胞标记物 VE-cadherin, 相应标记物阳性细胞显棕黄色。结果显示, Gore-Tex 管道和牛颈静脉管道移植物的新生假膜中散在分布  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 细胞和 calponin<sup>+</sup> 细胞。但对比牛颈静脉管道移植物的 Verhoeff 弹性纤维染色结果(见图 2), 可见牛颈静脉管道新生假

膜组织中弹性纤维染色阳性区域聚集更多的  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 和 calponin<sup>+</sup> 细胞。Gore-Tex 管道和牛颈静脉管道移植物的假膜表面未发现 VE-cadherin<sup>+</sup> 内皮细胞, 但同种带瓣管道移植物的管腔表面可观察到较连续的 VE-cadherin<sup>+</sup> 细胞。同种带瓣管道移植物流未钙化组织中可见残留的 calponin<sup>+</sup> 细胞和  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 细胞, 且仍保留大动脉中层的环形排列结构。见图 3。

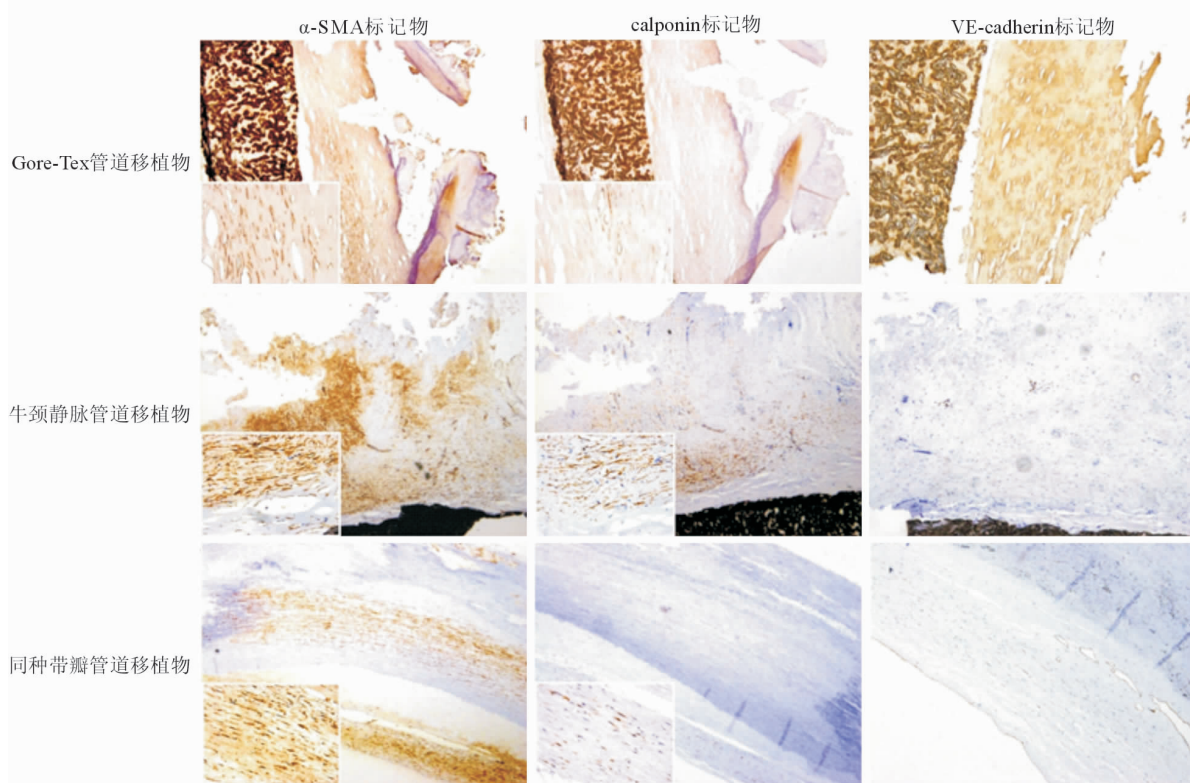


图 3 3 种管道移植物的免疫组织化学染色结果(大图×50, 框内小图×400)

### 3 讨论

血管替代物与移植宿主间的组织相容性对移植植物功能的维持具有重要意义。ePTFE (Gore-Tex) 的生物惰性及良好的弹性和可塑性使其成为制备人工移植物的材料。该材料中的孔隙被认为有利于移植后细胞长入<sup>[1]</sup>。本研究中, 扫描电子显微镜证实 Gore-Tex 管道存在大量 10~30  $\mu$ m 的孔隙, HE 染色可见 Gore-Tex 管道移植物的管道孔隙中存在红色着色, 但细胞多集中于管道浅表面, 这与 Serin 等<sup>[2]</sup>将 Gore-Tex 片移植到大鼠皮下或骨膜下的结果稍不同, 后者宿主细胞长入了 Gore-Tex 片的深层。造成结果不同的原因, 一方面可能是不同的移植部位使本例 Gore-Tex 管道移植后尽管形成的假膜中也存在细胞, 但不及静态条件下组织与移植物流紧密贴附时细胞长入的效率高; 另一方面, Gore-Tex 管道深层纤维丝间隙仅数微米, 可能阻碍

细胞长入。即使移植后宿主细胞完全长入 Gore-Tex 管道深层, 也因材料的生物学惰性使 Gore-Tex 管道难以生物降解, 导致移植物流没有生长性。缺乏生长性的管道移植到低龄患者, 远期容易出现管道狭窄, 以致再次手术置换。

牛颈静脉管道是牛颈静脉脱细胞后通过交联增强力学后制成的生物来源血管替代物<sup>[3]</sup>。但化学交联在增强力学的同时, 也使管道难以生长及生物降解。低龄患者移植后, 远期仍然可能会出现管道狭窄的问题。因此, 研制下一代管道替代物或组织工程血管时需考虑管道组织的生长性。

Gore-Tex 管道移植物流中可以观察到管腔内新生假膜形成, 这是 Gore-Tex 管道植入后发生梗阻的重要原因<sup>[4]</sup>。免疫组织化学染色显示, 假膜中基本不含 VE-cadherin<sup>+</sup> 内皮细胞, 但有  $\alpha$ -SMC<sup>+</sup> 和 calponin<sup>+</sup> 平滑肌细胞。人工管道不具有天然血管

的抗凝特性,因此移植后具有较高的血栓发生率和再狭窄率<sup>[5]</sup>,其中,缺乏内皮细胞覆盖是凝血反应的诱发因素,在纤维蛋白沉积的同时,血液中游离的有核细胞如间充质干细胞沉积并增殖,导致假膜形成<sup>[6]</sup>。

牛颈静脉管道作为脱细胞异种血管,移植后也可观察到假膜形成。在动物模型中,脱细胞血管移植 4 周后即可因假膜形成造成血管梗阻,这与血液中游离干细胞沉积和无定向分化有关<sup>[7]</sup>。本例牛颈静脉管道植入人体后,新生假膜的内表面粗糙,突出假膜表面的部分组织中含有弹性纤维。弹性纤维是维持大动脉正常顺应性的重要结构,其形成是动脉发生重构的标志<sup>[8]</sup>。结合本研究牛颈静脉管道中  $\alpha$ -SMC<sup>+</sup> 和 calponin<sup>+</sup> 平滑肌细胞与弹性纤维部位重叠的现象,推测可能是由于突出于假膜的组织随血流摆动,促使假膜中沉积的游离干细胞向平滑肌细胞方向分化,促进弹性纤维形成及组织重构。

同种带瓣管道血流动力学稳定,是目前理想的大血管替代物。文献报道其用于新生儿或婴儿右室流出道重建后,可以避免短期内出现梗阻,并能平衡肺血流,有利于肺动脉发育<sup>[9]</sup>。在本研究中,同种带瓣管道是 3 种体内移植植物中唯一没有形成新生假膜,但也是唯一管壁几乎全层钙化的移植植物。由于同种带瓣管道保持了天然大动脉的组织成分,且具有内皮细胞层,因此移植后局部凝血反应轻微,不易发生慢性血栓,不需要特殊的抗凝处理<sup>[10]</sup>。但是,同种带瓣管道移植后钙化极为常见,国外曾报道同种带瓣管道主动脉置换 10 年后发生全层钙化的病例<sup>[11]</sup>。大鼠同种带瓣管道移植 4 周后即可见大量动脉平滑肌细胞坏死和管道钙化,移植 12 周后达到高峰;予以适当免疫抑制治疗可以减轻移植植物钙化<sup>[12]</sup>。这种钙化可能类似主动脉瓣钙化,是由多因素参与的异位钙化过程<sup>[13-14]</sup>。

本研究所有管道均为右室流出道重建术后中远期标本,包括最常见的 Gore-Tex 管道、牛颈静脉管道和同种带瓣管道,结果基本反映了上述管道临床使用中存在的问题。其中,低龄患者管道移植后,管道在体内长期不降解、自体细胞难以长入管壁、继发狭窄是再次手术置换风险增高的主要原因(不具有生长性)。非自体管道移植后,产生的移植植物排斥反应可能导致移植组织坏死、钙化,也会使管道使用寿命缩短(异体性)。因此,下一代血管替代物或组织工程血管应主要改进以下方面:(1)血管组织支架需要有大孔径,以利于自体细胞长入;

(2)血管支架材料在细胞长入、组织形成后可以缓慢生物降解;(3)覆盖有功能性内皮细胞层以减少移植后血栓及假膜的形成。

### 参 考 文 献

- [1] Serin GM, Polat S, Aksoy E, et al. Importance of placing Gore-Tex in the subperiosteal plane for augmentation rhinoplasty[J]. J Craniofac Surg, 2012, 23(4):e359-e361.
- [2] Serin G, Baylancicek S, Aksoy E, et al. Evaluation of tissue response to Gore-Tex (expanded polytetrafluoroethylene) implantation[J]. J Craniofac Surg, 2013, 24(4):1428-1430.
- [3] 刘 洋, 刘珊珊, 朱海龙, 等. 染料介导光氧化处理去细胞牛颈静脉带瓣管道的细胞毒性研究[J]. 国际心血管病杂志, 2011, 38(3):170-173.
- [4] Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, et al. Current status of prosthetic bypass grafts; a review[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, 74(1):570-581.
- [5] Hoshi RA, Van Lith R, Jen MC, et al. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts[J]. Biomaterials, 2013, 34(1):30-41.
- [6] Wei Y, Ji Y, Xiao LL, et al. Surface engineering of cardiovascular stent with endothelial cell selectivity for in vivo re-endothelialisation [J]. Biomaterials, 2013, 34 (11): 2588-2599.
- [7] Tsai TN, Kirton JP, Campagnolo P, et al. Contribution of stem cells to neointimal formation of decellularized vessel grafts in a novel mouse model[J]. Am J Pathol, 2012, 181 (1):362-373.
- [8] Yang X, Wei J, Lei D, et al. Appropriate density of PCL nano-fiber sheath promoted muscular remodeling of PGS/PCL grafts in arterial circulation [J]. Biomaterials, 2016, 88: 34-47.
- [9] Hibino N, He D, Yuan F, et al. Growth of diminutive central pulmonary arteries after right ventricle to pulmonary artery homograft implantation[J]. Ann Thorac Surg, 2014, 97(6):2129-2133.
- [10] Joudinaud TM, Baron F, Raffoul R, et al. Redo aortic root surgery for failure of an aortic homograft is a major technical challenge [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 33 (6): 989-994.
- [11] Ravenni G, Pratali S, Sciotti G, et al. Total calcification of an aortic homograft used as aortic root replacement [J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2011, 12(3):191-192.
- [12] Chang Q, Jing H, Sun M, et al. Exploring the role of short-course cyclosporin a therapy in preventing homograft valve calcification after transplantation[J]. Cell Immunol, 2014, 287(1):36-45.
- [13] 袁昭顺, 冯 翔, 廖晓波. 主动脉瓣钙化性狭窄的异位钙化机制[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(2):69-71.
- [14] 高佳斌, 徐志云. 主动脉瓣钙化发病机制的研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2016, 43(4):210-212.

(收稿:2016-09-28 修回:2017-02-13)

(本文编辑:胡晓静)