

亚硫酸氢钠处理后牛心包的血液相容性

韩茂生^{1,2}, 周建业¹, 胡盛寿¹, 汪 胜¹, 蒋 虹¹

¹中国医学科学院 北京协和医学院 阜外心血管病医院卫生部心血管疾病再生医学重点实验室, 北京 100037

²山西晋城煤业集团总医院心胸外科, 山西晋城 048006

通信作者: 周建业 电子邮件: zhoujy@263.net

摘要: 目的 评价经亚硫酸氢钠(SOB)溶液抗钙化处理后的牛心包的血液相容性。**方法** 对戊二醛处理后再经SOB溶液处理的牛心包, 采用体外动态凝血实验、血小板黏附实验、D-二聚体测定和补体激活实验进行血液相容性评价; 仅经过戊二醛处理者作为对照组。**结果** SOB处理后牛心包的凝血性能和血小板黏附性能与对照组相比无明显差异; D-二聚体含量两组均在正常范围内, 且SOB处理组显著低于对照组($P < 0.05$); 补体激活实验中SOB处理组补体C3a水平显著低于对照组($P < 0.05$)。**结论** 经SOB抗钙化处理后的生物材料体外血液相容性符合临床应用要求。

关键词: 亚硫酸氢钠; 牛心包; 血液相容性

中图分类号: R318.08 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)05-0638-04

Hemocompatibility of Bovine Pericardium with Additional Sodium Bisulfite Treatment

HAN Mao-sheng^{1,2}, ZHOU Jian-ye¹, HU Sheng-shou¹, WANG Sheng¹, JIANG Hong¹

¹Research Center for Cardiovascular Regeneration Medicine of the Ministry of Health, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China

²Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, General Hospital of Jincheng Anthracite Mining Group, Jincheng, Shanxi 048006, China

Corresponding author: ZHOU Jian-ye E-mail: zhoujy@263.net

ABSTRACT: Objective To evaluate the hemocompatibility of glutaraldehyde (GA)-tanned bovine pericardium additionally treated by sodium bisulfite (SOB) solution. **Methods** The hemocompatibility of GA-tanned bovine pericardium treated by SOB solution is evaluated by using dynamic clotting time test, blood platelet adhesion test, D-dimeride determination, and complement activation test. The GA-tanned bovine pericardium was used as control. **Results** The curve of absorbance-clotting time of two kinds of bovine pericardium was similar in dynamic clotting time test. There was no significant difference between SOB-treated and control groups in blood platelet adhesion test. The D-dimeride contents of all bioprostheses were at normal level, and the D-dimeride content of GA-tanned bovine pericardium treated by SOB solution was significantly lower than that of control group ($P < 0.05$). In complement activation test, the level of complement C3a in SOB-treated group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** GA-tanned bovine pericardium treated by SOB solution meets the demands of cardiac interstitial implanted materials in hemocompatibility.

Key words: sodium bisulfite; bovine pericardium; hemocompatibility

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(5): 638-641

牛心包组织因其来源广泛,价格低廉,组织相容性好,无排斥反应,易于塑形和缝合,并发症少,已广泛应用于心血管外科临床,特别是用作先天性心脏病的补片和生物瓣膜的制备。但传统的戊二醛处理后牛心包容易钙化,因此,寻求抗钙化的方法成为目前的研究热点之一,如采用多聚环氧化物、丙三醇、 α -氨基油酸等改性处理后的牛心包钙化得到明显改善。

医用生物材料与血液间接或直接接触,与血液中血小板、红细胞、白细胞及血浆蛋白等成分发生相互作用,结果会导致血栓形成、溶血、补体系统激活及血液中有形成分改变等。因此,本研究希望通过对经亚硫酸氢钠(sodium bisulfite, SOB)抗钙化处理后的牛心包进行体外血液相容性评价,为进一步的动物实验及临床试验提供符合安全性要求的生物材料。

材料和方法

材料及处理 屠宰场取2~3岁牛新鲜心包经清水漂洗后置冷生理盐水中运回,24 h内处理。冷PBS冲洗材料上的残留血渍,修剪材料表面的脂肪和多余的疏松结缔组织,Hank's液连续漂洗,经0.6%戊二醛溶液处理后放入0.3%戊二醛溶液中,4℃~12℃封闭保存,备选使用。经以上方法处理后的牛心包置于SOB溶液中4℃保存4 d后作为实验组,仅经过戊二醛处理者作为对照组。实验用血均为新鲜采集的正常人全血,由阜外心血管病医院血库提供。

体外动态凝血实验 采用改良的动态凝血时间实验方法^[1]。取1 cm×1 cm大小的牛心包片置于小烧杯的底部中心,37℃恒温5 min后,用微量枪向膜片中心注入0.25 ml枸橼酸钠抗凝全血,恒温5 min后向血液中心注入0.2 mol/L的CaCl₂溶液0.02 ml,开始计时,摇晃烧杯1 min,使血和CaCl₂溶液混匀。每组试样设5个时间点,间隔为10 min,到预定时间后,向烧杯中加蒸馏水50 ml,摇晃烧杯10 min,吸取上清液用分光光度计在540 nm处测吸光度。每组材料做3个平行实验,取其平均值,作时间-吸光度曲线。

血小板黏附实验 参考Tsai等^[2]方法。将牛心包片制备成1 cm×1 cm膜片,浸泡于新鲜PBS液中1 h后取出,置于24孔细胞培养板中,每孔中分别加入浓度为 1×10^9 /ml的新鲜富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)2 ml,在37℃含5% CO₂

的孵育箱中孵育1 h,取出以PBS漂洗,3%戊二醛固定后行扫描电镜观察血小板黏附情况。PRP的制备方法:采血15 ml,2% EDTA-Na按1:9体积抗凝,立即500×g离心5 min,上清液即为PRP。

D-二聚体测定 取新鲜采集的人全血分装于10个试管中,每管3 ml,将牛心包片制备成5 mm×30 mm的条状,按1.25 cm²/ml比例置于血液中,每组材料5管,置于37℃水浴1 h,取出后2 000×g离心30 min,取上清血浆用ELISA法测定D-二聚体含量。

补体激活实验 制备1 cm×1 cm牛心包膜片,放在细胞培养板孔中,对于同一个献血者(同一种血浆)每组材料做6个平行样。向放有膜片的板孔中加入1 ml血浆,并向未放膜片的6个板孔中也分别加入1 ml血浆作为空白对照,将细胞培养板置37℃含5% CO₂的孵育箱中孵育30 min。用ELISA法对血浆中的补体C3a进行测定。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件,数值以均数±标准差表示,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

结果

体外动态凝血实验 经SOB处理后的牛心包动态凝血时间曲线与戊二醛组相近,呈较缓慢向下倾斜(图1)。凝血性能在临床适用范围内。

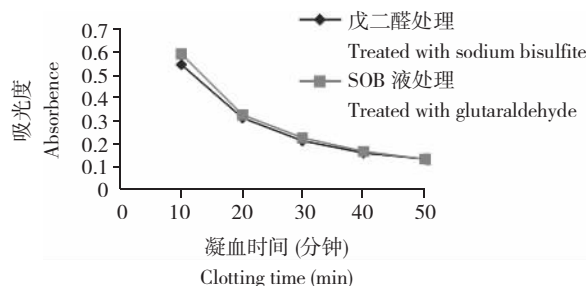


图1 凝血时间-吸光度曲线

Fig 1 Clotting time-absorbance curve

血小板黏附实验 扫描电镜观察结果显示,SOB处理组和戊二醛处理组的小血小板黏附性能无明显差异,血小板均无明显变形(图2)。

D-二聚体测定 与血液接触后,ELISA法测得SOB溶液处理组的D-二聚体含量为(0.07 ± 0.03) $\mu\text{g}/\text{ml}$,显著低于对照组的D-二聚体含量(0.12 ± 0.02) $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.05$);但两组D-二聚体含量均在正常范围($< 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)内。

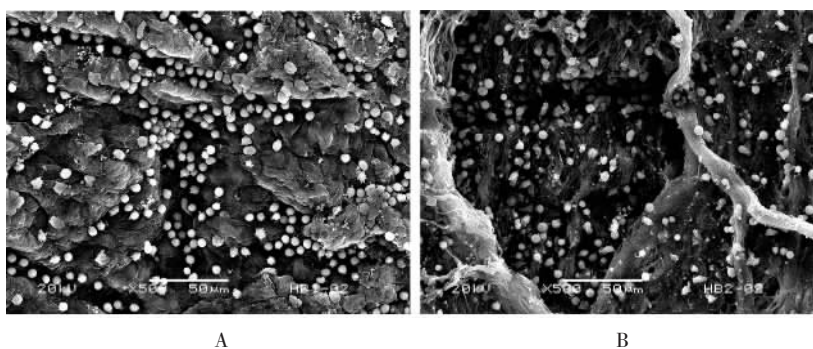


图2 血小板黏附实验的扫描电镜观察结果 (×500)

Fig 2 Results of blood platelet adhesion test observed under scanning electron microscope (×500)

A. 亚硫酸氢钠溶液处理组; B. 戊二醛处理组

A. treated with sodium bisulfite; B. treated with glutaraldehyde

补体激活实验 采用 ELISA 法检测与牛心包接触后的血液补体 C3a 水平, 结果表明: 经 SOB 处理后的牛心包与血浆接触后补体 C3a 水平为 $(0.902 \pm 0.130) \mu\text{g/ml}$, 显著低于仅经过戊二醛处理的对照组 $(1.416 \pm 0.143) \mu\text{g/ml}$ 的水平 ($P < 0.05$), 而与空白对照组 $(0.852 \pm 0.057) \mu\text{g/ml}$ 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

讨 论

体外动态凝血时间实验可评价植入材料对凝血功能的影响, 其目的是检测内源性凝血因子被激活程度, 观察材料对凝血时间的影响。动态凝血时间曲线呈缓慢向下倾斜且经历时间长, 表示抗凝血性能优; 曲线呈急陡向下倾斜且经历时间短, 表示抗凝血性能差^[1]。本实验结果表明 SOB 处理后没有明显影响牛心包的凝血性能。

当血液和人工材料表面接触时, 机体凝血系统会产生一系列的反应, 人工材料的表面会迅速吸附血浆蛋白, 进一步引起血栓的形成。血浆蛋白吸附的多少主要取决于人工材料的表面性状和机体的自身的血凝状态。纤维蛋白原为主要吸附的蛋白质, 其他的血浆蛋白有: 白蛋白、 γ -球蛋白等。血小板的黏附继发于血浆蛋白吸附之后, 这一过程是血小板膜黏蛋白、血浆 von Willebrand 因子等参与和相互作用的结果。黏附过程包括: 吸附、接触、附着、扩展 4 个过程, 它是一个血小板重要的在体内、体外均具有的特征性功能, 血浆蛋白吸附的多少影响血小板黏附的数量, 血小板黏附的数量也可以反映血浆蛋白吸附的多少。因此, 血小板黏附性能是衡

量人工材料表面性状的重要指标之一。本实验结果提示增加 SOB 处理的牛心包血小板黏附性能没有改变。

凝血途径中, 纤维蛋白原转化为纤维蛋白单体 (fibrin monomer, FM), FM 形成二聚或多聚体, 在被凝血酶激活的 XIII 因子和钙离子的作用下, FM 的 γ 链 c 端谷酰胺与另一 FM 的 γ 链的赖氨酸以共价键结合, 发生交联, 产生 D-二聚体结构。纤溶酶作用于交联纤维蛋白时, 不能将交联部位降解分开, 从而形成含有 D-二聚体的各种片段, 它是交联纤维蛋白形成的特异指标和纤溶酶被激活的结果^[3]。D-二聚体既反映体内的纤溶性, 又反映凝血活动, 是体内处于高凝状态的标志之一。根据实验结果, 可以认为 SOB 抗钙化处理后的牛心包短期内不会引起血液的高凝状态, 符合植入材料的要求。

由于生物材料接触血液时会通过经典或旁途径激活补体系统, 补体激活产物 C3 和 C5 是过敏毒素, 二者被血清羧肽酶分解为 C3a des Arg 和 C5a des Arg。因此, C3a 水平的监测能作为补体激活的重要标志之一。补体激活与血液相容性的关系及机制尚不十分清楚, 但有研究指出二者之间存在着潜在的关系。Herzlinger 等^[4]发现加入补体活化抑制剂 Mg-EGTA 不但可抑制尼龙引起的 C3 活化, 还可抑制血小板聚集。注射了蛇毒因子的犬血中无补体, 尼龙与这种犬血接触时血小板聚集明显降低^[5]。另一支持补体是血小板活化调节剂的证据是: 许多能引起血小板聚集的表面也能活化补体^[6]。因此补体激活实验被选作生物材料血液相容性评价方法之一。从本实验结果也表明增加 SOB 处理的牛心包比单纯戊二醛处理牛心包补体激活程度减轻。

总之,本研究参考《中华人民共和国国家标准》GB/T16886.4-2003/ISO 100993-4:2002 中“医疗器械生物学评价试验方法第4部分:与血液相互作用试验选择”选择了体外动态凝血实验、血小板黏附实验、D-二聚体测定和补体激活实验对经 SOB 抗钙化处理后的牛心包进行血液相容性评价。结果表明,戊二醛交联后再经 SOB 抗钙化处理后的牛心包体外血液相容性优于单纯戊二醛处理,且达到国家标准有关安全性的要求,可有望应用于临床。

参 考 文 献

- [1] 刘兴光,汪 钢,俞世强,等. 组织工程心脏瓣膜支架材料的血液相容性 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(30): 6659-6661.
- [2] Tsai CC, Chang Y, Sung HW, *et al.* Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an *in vitro* study [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(6):523-533.
- [3] 薛慧芳. 测定 FDP 和 D-二聚体的血标本保存条件探讨 [J]. 实用医技杂志, 2005, 12(11):1427.
- [4] Herzlinger GA, Bing DH, Stein R, *et al.* Quantitative measurement of C3 activation at polymer surfaces [J]. *Blood*, 1981, 57(4):764-770.
- [5] Herzlinger GA, Cumming RD. Role of complement activation in cell adhesion to polymer blood contact surfaces [J]. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1980, 26 :165-171.
- [6] 黄 嘉,程莉萍,乐以伦,等. 血液净化材料在体外静态接触血浆时血浆中 C3a des Arg 生成的研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 2000, 17(4) 385-389.

(2007-01-05 收稿)