

# 玻璃化保存对家兔颈总动脉松弛行为的影响

郑宇轩, 赵刚

(中国科学技术大学近代力学系生物力学实验室, 安徽合肥 230027)

**摘要:** 实验测定了玻璃化保存前后家兔颈总动脉的松弛曲线  $G(t)$ , 利用数学方法将连续松弛谱函数简化, 并结合经验公式对实验数据进行非线性拟合, 得到了动脉的 3 个材料参数 ( $C, \tau_1$  和  $\tau_2$ )。通过比较玻璃化保存前后动脉松弛行为特征参数的差异, 得到了玻璃化保存对动脉力学行为的影响。结果表明: ① 经过约 600 s 的松弛过程后, 新鲜动脉约可保持初始应力的 70%, 而玻璃化保存动脉则仅可保持初始应力的约 60%; ② 玻璃化保存动脉的短期松弛时间常数  $\tau_1$  相对新鲜对照组而言显著较小, 约降低 60%, 长期松弛时间常数  $\tau_2$  约降低 15%, 而  $C$  几乎不变。

**关键词:** 动脉; 玻璃化保存; 粘弹性; 连续松弛谱

**中图分类号:** R318.52; Q66 **文献标识码:** A

## Effect of vitrification cryopreservation on continuous spectrum based stress relaxation of common carotid arteries in rabbits

ZHENG Yu-xuan, ZHAO Gang

(Biomechanics Laboratory, Department of Modern Mechanics, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** Stress-relaxation behaviors of both fresh and vitrification cryopreserved rabbit carotid arteries were experimentally examined. Three material parameters ( $C, \tau_1$  and  $\tau_2$ ) were determined by fitting experimental results to the continuous relaxation spectrum model simplified by mathematical methods and empirical formulas. The essential influences of vitrification cryopreservation method on the mechanical behaviors of the arteries were available by analyzing the difference of the relaxation parameters between the fresh and the cryopreserved arteries. The study indicates that: ① the fresh group can keep about 70% of the original stress after relaxation of 600 s, while the vitrification group can only keep about 60%; ② the short-term relaxation time constant of the vitrification group is apparently smaller than that of the fresh group (decrease about 60%), the long-term relaxation time constant decreases about 15%, while  $C$  is nearly invariable.

**Key words:** artery; vitrification; viscoelasticity; continuous relaxation spectrum

## 0 引言

随着修复外科、血管重建手术和冠状动脉旁路

移植术等先进医学手段的发展, 临床移植用小弹性动脉近年来供不应求。将血管低温保存, 储备大量的源血管, 则既可缓解上述供需矛盾, 又可提供充足的

收稿日期: 2008-04-04; 修回日期: 2008-06-05

基金项目: 国家自然科学基金(50506029)和安徽省自然科学基金(070413099)资助。

作者简介: 郑宇轩, 男, 1986年生, 本科生。研究方向: 软组织生物力学。E-mail: xyzc@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 赵刚, 博士/副教授。E-mail: zhaog@ustc.edu.cn

时间用于 HLA 配型和疾病检测,因此,血管的低温保存技术已成为近年来的研究热点。

近年来新兴的玻璃化保存方法相对传统的低温冷冻保存方法而言,无需价格昂贵的程序降温仪,操作更简便,且在保存过程中没有冰晶形成,因而细胞和组织所受损伤可降低至最小化。且已有研究表明,从药理学、病理学和生理学角度而言,玻璃化保存家兔动脉的质量均优于传统低温冷冻保存方法<sup>[1]</sup>。但考虑到低温保存动脉经移植后,将长期工作于脉动压力和剪切应力环境,其力学性能,尤其是粘弹性的保持对于其发挥正常生理功能至关重要。目前国内外对玻璃化保存动脉的粘弹性力学性能的研究均不多见,而粘弹性力学性能是评估低温保存动脉质量的重要指标之一<sup>[2]</sup>,因此有必要全面研究玻璃化保存对动脉粘弹性力学性能的影响。

1972年,冯元桢等提出了准线性粘弹性(QLV)理论<sup>[3]</sup>,该理论已被广泛用于描述生物组织的非线性历史依赖性粘弹性行为<sup>[4~8]</sup>。该理论指出,引入连续松弛谱后,软组织应力松弛行为可由5个材料参数( $A, B, C, \tau_1$ 和 $\tau_2$ )完全确定。实际松弛实验过程中,往往施加近似的阶跃应变,若忽略应变快速线性增加段的影响,则随后的归一化应力衰减曲线将由连续松弛谱函数唯一确定,该函数仅涉及 $C, \tau_1$ 和 $\tau_2$ 三个参数,模型得到了进一步简化。其中, $C$ 代表粘性大小,与总的应力松弛比例有关; $\tau_1$ 和 $\tau_2$ 分别为短期和长期松弛时间常数,与应力松弛曲线早期和后期的斜率有关<sup>[9]</sup>。

本文选取家兔总颈动脉为模型,比较研究了玻璃化保存前后动脉连续应力松弛谱的差异;测定了玻璃化保存前后家兔颈总动脉的应力松弛曲线 $G(t)$ ,利用数学方法将连续松弛谱函数简化,并结合经验公式对实验数据进行非线性拟合,从而得到了动脉的3个材料参数( $C, \tau_1$ 和 $\tau_2$ )。通过比较玻璃化保存前后动脉松弛行为关键参数的差异,得到了玻璃化保存对动脉力学行为的影响。

## 1 动脉松弛实验

### 1.1 动脉取材

4只新西兰大白兔(2.5~3 kg,雌雄不限),空气栓塞处死。取其左右两侧颈动脉,置于4℃ Hank's 溶液,解剖显微镜下去除管壁结缔组织和脂肪。随机分成新鲜组(对照组,4根)和玻璃化组(4根)。并置于4℃ Hank's 溶液,备用。

### 1.2 动脉低温保存

本研究中,玻璃化保护剂溶液为VS溶液,其成分为:基液为RPMI 1640细胞培养液,含有2.67 mol/L的DMSO(二甲基亚砷),1.3 mol/L的PG(1,2-丙二醇),2.67 mol/L的EG(乙二醇),60 g/L的PEG(聚乙二醇)。在低温生物医学领域,VS溶液是一种常用的复合型生物组织玻璃化保存溶液,其凝固点约为-35.7℃,玻璃化转化温度约为-127.8℃,是一种可在冻结过程中实现部分玻璃化的低温保护剂<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.1 玻璃化保护剂的添加

将动脉从4℃的Hank's溶液中取出,依次转移到预冷至4℃的经稀释的玻璃化保护剂溶液中(1/5×,2/5×,3/5×,4/5×),每个浓度下,均置于4℃冰箱平衡7 min。再将单根动脉和玻璃化保护剂溶液(1×,约1.5 ml)放入2 ml标准冷冻管(Bio Basic Inc., Canada;有效刻度为1.5 ml),置于4℃冰箱,平衡7 min左右开始玻璃化保存。

#### 1.2.2 冷冻和复温

冷冻为:将上述冷冻管快速掷入液氮中(经T型热电偶测试,在0~-150℃之间,降温速率约为147℃/min),并长期保存。

复温过程中,将保存时间不少于72 h的冷冻管从液氮中取出并快速置于37℃水浴,轻轻摇动,至其全部融化。

#### 1.2.3 玻璃化保护剂的去除

复温后,将动脉从玻璃化保护剂溶液中取出,依次转移预冷至4℃的经稀释的玻璃化保护剂溶液中(4/5×,3/5×,2/5×,1/5×)和RPMI 1640细胞培养液中,4℃冰箱中完成,每步均平衡7 min,再将其转移至4℃ Hank's 溶液中,置于4℃冰箱,备用。所有动脉均在4~8 h内完成力学实验。

### 1.3 动脉松弛实验

所有动脉松弛实验均使用微机控制电子万能试验机完成(DMA, CMT 8501,深圳新三思集团)。在室温下,将一根动脉剪成纵向长约1.5 cm的2个试样,然后将其压扁后,使用带刻度的工具显微镜预先测定其特征尺寸。再将其两端包上滤纸,夹于仪器上进行单向拉伸。本研究采用材料力学领域常用的应力松弛标准测试实验:以400 mm/min的速度(应变率约为4 000%/min)对试样施加应变,最终控制应变水平为75%,然后保持该应变约10 min。实验过程中,软件自动采集并记录试件在夹具间的长度

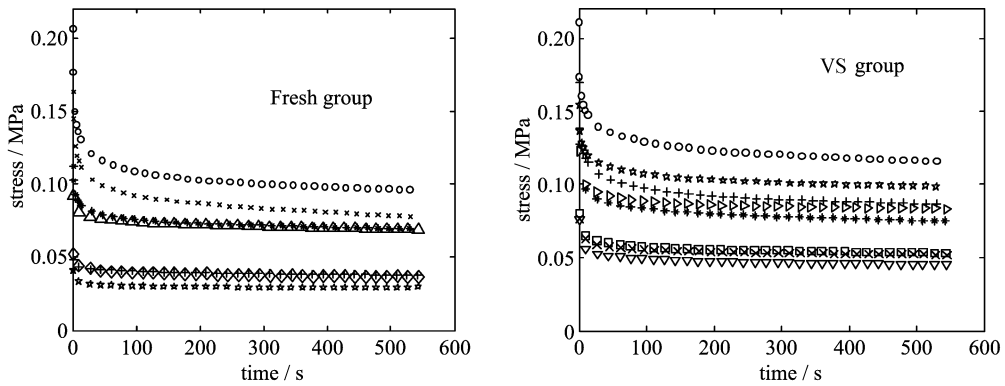


图 1 新鲜组 ( $n = 7$ ) 和低温保存组动脉 ( $n = 8$ ) 应力松弛实验数据

Fig. 1 Stress relaxation data of both the fresh ( $n = 7$ ) and the cryopreserved groups ( $n = 8$ ) obtained by DMA

及其所受拉应力等数据。

#### 1.4 动脉归一化松弛函数

本文选用由冯元桢构造的归一化松弛函数  $G(t)$ <sup>[11]</sup>, 该函数适用于对应变变化率相对不敏感的软组织:

$$G(t) = \frac{\{1 + c[E_1(t/\tau_2) - E_1(t/\tau_1)]\}}{1 + c \ln(\tau_2/\tau_1)}. \quad (1)$$

式中,  $E_1(x) = \int_x^\infty (e^{-t}/t) dt$ .  $C$ ,  $\tau_1$  和  $\tau_2$  为材料参数,  $C$  为粘性常数,  $\tau_1$  和  $\tau_2$  分别为短期和长期松弛时间常数,  $t$  为时间。

根据  $E_1(x)$  的表达式, 当时间  $t$  趋于无限大时,  $E_1(t/\tau_2)$  和  $E_1(t/\tau_1)$  趋于零, 于是

$$G(\infty) = \frac{1}{1 + c \ln(\tau_2/\tau_1)}. \quad (2)$$

由于实际实验中不可能松弛无穷长时间, 而对于本研究对象家兔颈总动脉, 600 s 的松弛时间可使其基本完成松弛, 从采集的实验数据可知最后 50 s 时间内应力变化已不超过 1%. 故本文将采用最终时间点对应的  $G(t)$  值近似为  $G(\infty)$  的值。

根据文献[11], 松弛实验数据的中间部分典型点能很好地符合以下经验关系式, 即当  $\tau_1 \ll t \ll \tau_2$  时,  $G(t)$  的经验关系式可表示为

$$G(t) = R \ln t + d. \quad (3)$$

在本研究中取  $t$  为 10 s 量级, 因此有  $\tau_1 \ll 10$ ,  $\tau_2 \gg 10$ , 于是  $E_1(t/\tau_1) \rightarrow 0$  且  $E_1(t/\tau_2) \simeq -\gamma - \ln(t/\tau_2)$ , 其中,  $\gamma$  为欧拉常数. 此时,

$$G(t) = \frac{1 - c\gamma - c \ln(t/\tau_2)}{1 + c \ln(\tau_2/\tau_1)}. \quad (4)$$

在 (10, 100) 区间中, 应力松弛的斜率为

$$\frac{dG(t)}{d(\ln t)} = \frac{-c}{1 + c \ln(\tau_2/\tau_1)} = R. \quad (5)$$

取  $t = 10$  s, 则

$$G(10) = \frac{1 - c\gamma - c \ln 10 + c \ln \tau_2}{1 + c \ln(\tau_2/\tau_1)} = R \ln 10 + d. \quad (6)$$

由上面关系式(2)、(5)、(6), 可通过松弛实验曲线, 求得材料参数  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  和  $C$ , 进而通过比较玻璃化保存组和新鲜组的材料参数, 可分析玻璃化保存后的动脉粘弹性力学性能改变。

## 2 结果分析

图 1 分别为实验测定的新鲜动脉 (7 根, 由于实验意外导致新鲜组缺少一个试样) 和玻璃化保存动脉 (8 根) 的应力松弛曲线. 图 2 为新鲜对照组和玻璃化保存组平均值的归一化松弛曲线. 其中 Fresh 为新鲜对照组, 而 VS 为玻璃化保存组. 从图中可看出, 玻璃化保存组和新鲜对照组动脉归一化松弛曲线相似, 保持初始应力的能力相近 (分别为 60% 和 70%).

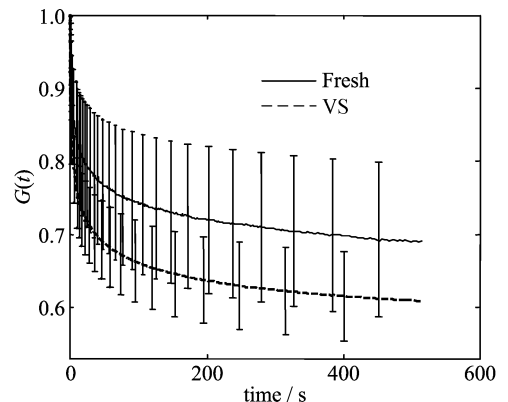


图 2 玻璃化保存和新鲜对照组动脉的归一化松弛曲线  
Fig. 2 The normalized stress relaxation curves of both the fresh and the vitrification cryopreserved groups

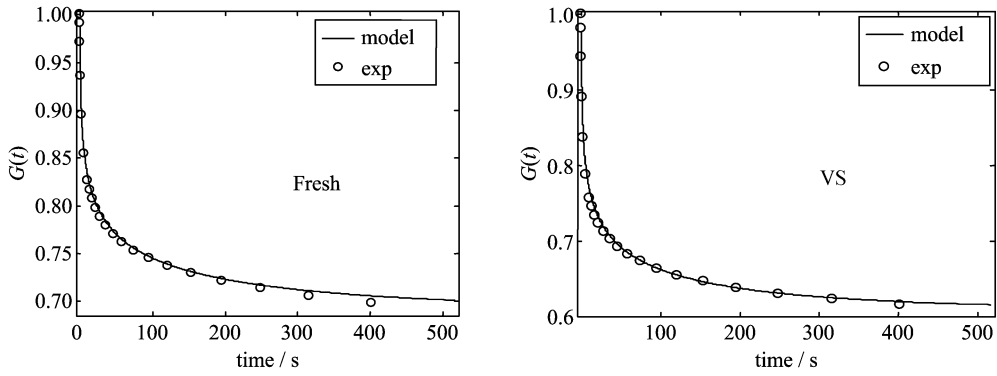


图 3 连续松弛谱模型预测结果和实验数据比较(Fresh,新鲜对照组; VS,玻璃化保存组)

Fig. 3 Predictions of the continuous relaxation spectrum model versus experimental data (Fresh, the fresh group; VS, the cryopreserved group)

表 1 新鲜对照组连续松弛谱参数  $C$ ,  $\tau_1$  和  $\tau_2$  的值

Tab. 1 Parameters describing the continuous relaxation spectrum of the fresh group

新鲜组	$\tau_1/s$	$\tau_2/s$	$C$	$R^2$
1	0.364 4	599.16	0.056 9	0.976 9
2	0.494 2	1 119.06	0.038 0	0.991 6
3	0.110 6	591.44	0.072 2	0.996 4
4	0.041 3	479.92	0.123 2	0.992 9
5	0.493 2	797.79	0.045 1	0.989 9
6	0.132 0	710.76	0.127 1	0.995 1
7	0.116 2	256.69	0.047 9	0.986 1
mean±SD	0.250 3±0.194 4	650.69±269.31	0.072 9±0.037 3	—

表 2 玻璃化保存组连续松弛谱参数  $C$ ,  $\tau_1$  和  $\tau_2$  的值

Tab. 2 Parameters describing the continuous relaxation spectrum of the vitrification group

玻璃化保存组	$\tau_1/s$	$\tau_2/s$	$C$	$R^2$
1	0.097 7	663.12	0.078 7	0.997 0
2	0.192 6	606.32	0.061 7	0.997 9
3	0.039 7	486.84	0.071 5	0.997 9
4	0.152 1	501.96	0.058 6	0.999 1
5	0.134 9	639.22	0.067 3	0.998 0
6	0.034 3	666.38	0.082 8	0.996 7
7	0.066 3	494.88	0.106 6	0.999 2
8	0.017 6	513.96	0.059 7	0.992 4
mean±SD	0.091 9±0.063 1*	571.59±79.62*	0.073 4±0.016 3*	—

【注】 \* 与新鲜组比较,  $F=5.450\sim 14.897$ , \*  $p<0.05$

图 3 为将本研究所获得的参数( $C$ ,  $\tau_1$  和  $\tau_2$ )代入至式(1)所得  $G(t)$  的理论预测结果和实验数据的比较,结果表明,本研究获得的动脉材料参数可以准确预测其松弛行为。

表 1 和表 2 分别是本研究所获得新鲜对照组和玻璃化保存组的动脉应力松弛参数  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  和  $C$  的值及其代入模型后与实验数据比较所得拟合优度( $R^2$ )。

从表 1 和表 2 中可以看出,连续松弛谱可以较好地描述家兔颈总动脉保存前后的松弛行为,吻合度较高( $R^2>0.95$ )。通过对材料参数( $C$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ )的组间差异性分析,发现玻璃化保存后的动脉和新鲜动脉的粘弹性具有显著性的差异( $p<0.05$ )。由此可知,玻璃化保存过程对动脉粘弹性力学性能有一定影响。

### 3 结论

连续谱应力松弛函数可较好地用于描述低温保存前后动脉的松弛行为,获得其特征材料参数( $C$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ),通过比较低温保存前后动脉的 3 个材料参数的差异,可有效评估其力学性能损伤. 尽管前人研究结果表明,玻璃化方法可较好地保存动脉的组织形态、生理功能和内皮细胞活性<sup>[1,10]</sup>,是目前为止较为理想的动脉低温保存方法,但本研究结果表明,玻璃化保存方法仍会对家兔颈总动脉的力学性能产生一定影响. 这种力学性能的差异,究竟在临床移植后会产生怎样的远期负面影响,尚不清楚.

进一步的研究中,拟尝试建立基于动脉松弛行为特征参数( $C$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ )的评价因子,通过该评价因子反映低温保存过程对动脉粘弹性力学性能的影响. 从而,以此评价因子为目标函数,可望进一步优化现有的动脉低温保存方法.

#### 参考文献(References)

- [1] 魏民. 玻璃化法保存异体动脉的实验研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2002.
- [2] 赵刚, 雷冬, 张保, 等. 低温保存动脉的粘弹性力学评价指标的初步建立[J]. 航天医学与医学工程, 2007, 20(4): 304-307.
- [3] Fung Y C. Stress strain history relations of soft tissues in simple elongation [C]// Biomechanics: Its Foundations. and. Objectives. Englewood. Clifs, NJ: PernticeHall, 1972: 181-207.
- [4] Woo S L, Simon B R, Kuei S C, et al. Quasilinear viscoelastic properties of normal articular cartilage[J]. J Biomech Eng, 1980, 102(2): 85-90.
- [5] Woo S L, Gomez M A, Akeson W H. The time and history-dependent viscoelastic properties of the canine medical collateral ligament[J]. J Biomech Eng, 1981, 103(4): 293-298.
- [6] Carew E O, Talman E A, Boughner D R, et al. Quasi-linear viscoelastic theory applied to internal shearing of porcine aortic valve leaflets[J]. J Biomech Eng, 1999, 121(4): 386-392.
- [7] Abramowitch S D, Woo S L, Clineff T D, et al. An evaluation of the quasi-linear viscoelastic properties of the healing medial collateral ligament a goat model[J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32: 329-335.
- [8] Abramowitch S D, Woo S L. An improved method to analyze the stress relaxation of ligaments following a finite ramp time based on the quasi-linear viscoelastic theory[J]. J Biomech Eng, 2004, 126: 92-97.
- [9] Sauern A A, Rousseau E P. A concise sensitivity analysis of the quasi-linear viscoelastic model proposed by Fung[J]. J Biomech Eng, 1983, 105(1): 92-95.
- [10] Arnaud F. Endothelial and smooth muscle changes of the thoracic and abdominal aorta with various types of cryopreservation[J]. Journal of Surgical Research, 2000, 89: 147-154.
- [11] 冯元桢. 生物力学[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 149-155.