

血管移植物的研究及应用进展

冯玉庆, 王政禄 (天津市第一中心医院生物样本库, 天津市器官移植临床医学研究中心
天津 300192)

随着国内饮食结构的改变、人口增长及老龄化, 血管疾病已成为威胁中国人健康最常见的疾病之一^[1]。近 20 年来, 血管移植在治疗血管源性疾病及器官移植的循环重建中发挥着至关重要的作用, 肢体损伤常伴有血管损伤, 重建血供需要血管移植^[2]。按照来源血管替代物可分为 3 类: 自体血管、人工血管和同种异体血管。

1 自体血管

1906 年, Carrel 试验性应用自体静脉进行血管移植成功, 至今仍在沿用自体血管移植^[3], 随着器官移植学科和血管外科的发展, 越来越需要应用血管移植进行血管搭桥和血管修补。自体血管因其具有良好的机械性能、增生修复能力和组织相容性, 是当前最为理想的血管移植^[2]。由于当前可成功用于临床的小口径人工血管很少, 所以自体血管仍有其特殊的应用价值。自体大隐静脉容易获得, 取材前应做血管的相关检查, 如使用血管超声仪器可以了解将要切取的大隐静脉情况, 明确没有曲张、硬化和闭塞等病变, 移植后通畅率高, 是目前外科手术中替代中、小血管最理想的生物血管。自体动脉移植有很多优点, 但自体可切除的动脉很少, 使其来源受到很大限制。自体血管得到了广泛的临床应用, 但是获取自体血管会增加患者的手术创伤, 并且可获取的自体血管资源有限, 其管径相对细小, 已不能满足当前日益增长的临床需求, 这就需要寻找良好的自体血管替代物。

2 人工血管

人工血管发明于 20 世纪 50 年代, 在生物血管供应有限, 组织工程化血管还不能完全应用于临床的情况下, 人工血管的出现对推动外科重建手术的发展和人类健康方面做出了巨大贡献^[4-5]。

2.1 人工合成血管: 人工合成血管具有取材方便、易于消毒灭菌及无存储条件限制等特点, 临床应用不受来源、长度及口径大小限制, 是目前最常用的血管代替品。随着组织工程技术的发展, 利用通过对高分子材料的大量研究, 改变其性能来提高其生物相容性^[6]。设计出类似天然血管的取代物, 首先需要进行组织培养, 使其表面形成一层组织, 然后再包覆成圆管状而形成人工血管。由于一般合成的高分子材料生物相容性不佳, 在材料表面通过一些途径而接上一层生物性材料, 以提高其生物相容性^[7]。

人工合成材料制成的人造血管必须满足以下几个方面的要求: 管壁应有一定的孔度、不扭曲、不塌陷、易缝合及抗松散的基本条件外, 还应具有一定的强度、吸水性、良好的组织相容性及耐酸碱等特点。但是现代工程技术水平还不能较好地仿制血管组织复杂的结构与功能, 人工材料有破裂的可能性和远期栓塞发生率高的缺点, 其治疗效果并不十分令人满意^[8]。

2.2 生物材料合成血管: 生物材料合成血管至今仍是临床上广泛应用的血管及心脏替代和修补材料, 其优点是与宿主具有相同的组织结构和功能, 而这些结构和功能又是保证宿主所获疗效的必要因素。光滑的表面和适当的内皮分泌功能是保证血管远期通畅的关键因素, 必要的血管张力是组织灌注和压力维持的重要保证, 所有这些基本条件都是人工合

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2017.06.016

基金项目: 国家人类遗传资源共享服务平台上海创新中心建设项目 (YCZYPT [2017]02), 国家人类遗传资源共享服务平台 (2005DKA21300)

通讯作者: 王政禄, Email: 13920474643@163.com

成材料不具有的。与庞大的需求量相比,新鲜血管供体不足且来源有限,使得通过血管移植来救治某些心血管疾病的这种有效疗法受到很大限制^[9]。

3 同种异体血管

20世纪70年代,Tice等^[10]将深低温冻存人的同种异体大隐静脉应用于患者下肢动脉的重建(血型相符),25例患者的2年通畅率为48%,开创了深低温冻存血管临床应用的先河。20世纪80年代初,一些国外医疗设备公司开始经营深低温冻存静脉如大隐静脉等,用于外周动脉和冠状动脉重建。1989年1月,欧洲同种移植物保存库(Europe Homograft Bank, EHB)在布鲁塞尔成立,由于动脉细胞构成和组织结构的复杂性,保存难度较大,直到1991年,EHB才开始收纳人体动脉以供临床使用,并在1992年为临床提供了第一个用于临床移植的冻存动脉。到20世纪末,比利时和英国等国家相继建立了血管库。1998年,Wu等^[11]对欧洲9个中心100例接受同种异体深低温冻存大动脉移植的患者进行了一项回顾性研究,发现冻存人体动脉移植远期通畅率与新鲜同种异体动脉移植相比无显著差异。

同种异体血管现有3种保存方法:常温保存、低温保存和深低温保存。

3.1 常温保存:戊二醛保存异体血管的研究都是针对人脐静脉(human umbilical vein, HUV)作为血管通道,这些血管是人工制备,经戊二醛酸化处理后在血管外覆盖一层Dacron网状物,这种构成的复合血管保存在50%酒精中,移植之前需要经过一道漂洗的程序^[12]。在大多数的相关文献中并没有对戊二醛保存的方法进行详细描述。

3.2 低温保存:低温保存法具有简便易行、设备和条件要求不高等优点,但是其保存时限相对较短,相关的研究也比较少^[13-14]。低温(2~4℃)可以减少细胞的代谢活动、耗氧量及细胞膜上泵的活动,尤其是Na⁺/K⁺ATP酶,同时减少ATP的消耗,低温条件可以保护细胞,减少缺血及损伤^[15]。20世纪90年代,开展了对同种异体血管冷保存的一系列临床应用研究,目前,临床上同种异体血管

冷保存的研究大部分是针对静脉,采用盐溶液中加入少量抗菌药物(氯霉素+两性霉素)的方法,临床研究中的保存时限为10~40天,用于下肢血管栓塞性疾病的外科治疗,其中同种异体血管保存3周以内再用于替换患者阻塞的病变血管,其1个月的累计通畅率可达83%,1年的累计通畅率仍可达65%,但2~3年后通畅率仅为38%^[16]。

3.3 深低温保存:深低温保存方法可以保存同种异体血管数年之久^[17],其方法分为-80℃保存和气相液氮保存,两者在方法学上相同,只是保存时限上有所差异。同种异体血管深低温保存就是在一定低温保存液存在的条件下,在一系列变温控制中,使同种异体血管组织在一定条件下冻结,组织代谢降低到极低的范围内,使其在离体情况下组织代谢处于近零点,从而使组织活性得以长期保存^[18]。在20世纪70年代首次报道了应用深低温保存的大隐静脉用于下肢动脉的重建,25例患者的重建血管2年的通畅率为48%,在随后的30年,深低温保存方法进一步得到改善、细化和标准化,至2007年1月,EHB共为临床提供了2000多份深低温保存的人体同种异体血管^[19]。动物实验研究显示,深低温保存小牛颈动脉与新鲜动脉比较,血管的收缩功能降低20%,而血管内皮的舒张功能减少60%~70%^[20]。人体下肢动脉的临床研究表明,1年血管通畅率为13%~79%,加权平均后1年血管通畅率为41%^[21]。深低温保存同种异体血管的处理方法还是相对复杂的,成本也是相对较高。将同种异体血管放入RPMI1640溶液中涮洗,将清洗后的同种异体血管放置在纱布内完全包裹,程控降温放入气相液氮中。深低温保存同种异体血管虽然可以长期保存血管组织(达数年之久),但是这种保存方法并不完美,保存过程会导致一定程度的细胞损伤,从而影响同种异体血管的机械性能^[22],而其组织损伤主要发生在降温和复温的过程中^[23]。

3.4 降温和复温:降温或复温速率不当,均会导致血管损伤。采用较慢的降温速率将缩小降温过程中血管组织中的温度梯度,使血管壁内部温

度分布均匀,减小热应力^[24]。以恒定降温速率为 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -60°C ,以恒定降温速率为 $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -100°C ,即可转移至液氮中保存。降温过程约70分钟。操作人员做好低温防护后将已降温处理好的同种异体血管迅速转移至液氮存储箱内进行保存,保存温度低于 -150°C 。

复温采用 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 水浴快速复温,经过这样处理的静脉获得80%的内皮细胞存活率^[25]。有学者发现,保存于液氮中的同种异体血管经过快速复温,同种异体血管表面以及内膜出现破裂的几率大大高于缓慢复温,产生破裂的机制是复温时在 $-150\sim -100^{\circ}\text{C}$ 血管发生了部分玻璃化的反玻璃化现象,为由此所产生的断裂应力所导致。控制 $-150\sim -100^{\circ}\text{C}$ 的复温速率,会降低同种异体血管出现破裂的发生率^[26]。

3.5 组织活力鉴定:低温保存同种异体血管组织活力鉴定是对所采用的保存技术是否成功的最终判别,组织活性常用细胞培养法和代谢测定法^[27]。葡萄糖消耗率测定法,因对组织无损伤,出结果快,被广泛应用。O'Brien等^[28]认为在能量代谢过程中,细胞摄取消耗葡萄糖,使营养液中葡萄糖含量下降。经组织学鉴定具有活细胞形态,或糖代谢用量达到一定数值,即可判定该标本是有活性的。公认24小时葡萄糖消耗率大于 0.89 mmol/L 为存活。研究者发现,对冷冻同种异体血管的酶组织化学变化进行测定,发现这些酶存在活性,并与新鲜对照结果极为相近^[29]。许多学者认为,内皮细胞的完整性是保持同种异体血管移植较高通畅率的重要因素之一。研究发现,电镜下内皮细胞超微结构显现不同程度的损伤^[19]。理想的同种异体血管低温保存方法,其关键在于如何使同种异体血管组织的生物活性以及内皮细胞的完全性得到良好的保存,可以使冷冻损伤减轻至最低程度。

4 总结

总之,3种不同的血管都有着各自的优缺点,人工血管已商品化,但其后期通畅率不佳。自体血管移植后期通畅率高,但其来源于患者本身,可切除用于移植血管很少,使其来源受到很大限制。同

种异体血管有着广泛的应用价值,随着国内器官捐献的规范化,同种异体血管的来源也得到了相当大的支持。目前同种异体血管移植已经取得很大成功,并展示出令人激动的前景,但仍有许多尚未解决的问题和难点,同种异体血管移植技术关键性问题的解决主要针对于冷冻保存技术的发展以及与组织工程学科的交叉来实现。如冷冻保存能否降低抗原性,依靠冷冻保存技术维持血管冷冻保存后的生物活性和机械强度,同时结合组织工程学技术手段恢复并完善同种异体血管冻存后的生物活性及机械强度将会是同种异体血管移植未来的发展方向。

参考文献

- [1] 康熙雄. 心脑血管疾病诊断与治疗领域的检测指标和特色[J]. 实用检验医师杂志, 2015, (2): 65-69.
- [2] 何菊, 李晓峰, 杨森, 等. 同种异体血管临床应用现状[J]. 中华普通外科杂志, 2015, 30 (9): 750-752.
- [3] 张文霞, 刘典晓, 董圣军, 等. 同种血管深低温保存研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8 (8): 142-143.
- [4] 罗新锦, 吴清玉. 小口径人工血管的研究进展[J]. 中国胸心外科临床杂志, 2001, 8 (3): 193-196.
- [5] 张秀军. 双层储药式人工血管[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16 (12): 746.
- [6] 王继亮, 王国斌. 人工血管基因修饰的研究进展[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2001, 24 (4): 158-162.
- [7] Browning MB, Dempsey D, Guiza V, et al. Multilayer vasculargrns based on collagen-mimetic proteins [J]. Acta Biomater, 2011, 8 (3): 1010-1021.
- [8] Bouten CV, Dankers PY, Driessen-Mol A, et al. substrates forcardiovascular tissue engineering [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63 (4-5): 221-241.
- [9] Dvir T, Timko BP, Kohane Ds, et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues [J]. Nat Nanotechnol, 2011, 6 (1): 13-22.
- [10] Tice JA, Sellke FW, Schaff HV. Transcatheter aortic valve replacement in patients with severe aortic stenosis who are at high risk for surgical complications: summary assessment of the California Technology Assessment Forum [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 148 (2): 482-491.
- [11] Wu J, Wang W, Zhang M, et al. Reconstruction of middle hepatic vein in living donor liver transplantation with modified right lobe graft: a single center experience [J]. Transpl Int, 2008, 21 (9): 843-849.

- [12] Hwang S, Lee SG, Song GW, et al. Use of endarterectomized atherosclerotic artery allograft for hepatic vein reconstruction of living donor right lobe graft [J]. Liver Transpl, 2007, 13 (2): 306-308.
- [13] Soejima Y, Takeishi K, Ikegami T, et al. All-in-one ex vivo self-reconstruction technique using an autologous inferior vena cava for right lobe liver graft with multiple and complex venous orifices [J]. Liver Transpl, 2010, 16 (7): 909-913.
- [14] 郑章强, 朱志军. 肝脏低温机械灌注保存的研究进展 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2013, (2): 120-123.
- [15] Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of vascular tissues [J]. Organogenesis, 2009, 5 (3): 97-104.
- [16] Yan LN, Chen ZY, Lin YX. Current status of adult-to-adult living donor liver transplantation: surgical techniques and innovations [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122 (24): 3066-3071.
- [17] Fujimoto E, Yoshizumi M, Kanbara T, et al. Functional restoration of endothelial cells of the cryopreserved heart valve [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 59 (3): 169-174.
- [18] Yu PF, Wu J, Zheng SS. Management of the middle hepatic vein and its tributaries in right lobe living donor liver transplantation [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6 (4): 358-363.
- [19] Jashari R, Tabaku M, Van Hoeck B, et al. Decontamination of heart valve and arterial allografts in the European Homograft Bank (EHB): comparison of two different antibiotic cocktails in low temperature conditions [J]. Cell Tissue Bank, 2007, 8 (4): 247-255.
- [20] Chalam KV, Balaiya S, Murthy RK. Accurate estimation of vascular endothelial growth factor levels in microsamples with a low-cost bead-based assay [J]. Retina, 2010, 30 (5): 815-819.
- [21] Friebe A, Volk HD. Stability of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and interleukin 8 in blood samples of patients with systemic immune activation [J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132 (11): 1802-1806.
- [22] Campochiaro PA, Choy DF, Do DV, et al. Monitoring ocular drug therapy by analysis of aqueous samples [J]. Ophthalmology, 2009, 116 (11): 2158-2164.
- [23] Rosenling T, Slim CL, Christin C, et al. The effect of preanalytical factors on stability of the proteome and selected metabolites in cerebrospinal fluid (CSF) [J]. Proteome Res, 2009, 8 (12): 5511-5522.
- [24] Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2007, 53 (3): 421-428.
- [25] Richardson MR, Price MO, Price FW, et al. Proteomic analysis of human aqueous humor using multidimensional protein identification technology [J]. Mol Vis, 2009, 15 : 2740-2750.
- [26] thanasiou T, Ashrafian H, Mukherjee D, et al. Are arterial grafts superior to vein grafts for revascularisation of the right coronary system? A systematic review [J]. Heart, 2013, 99 (12): 835-842.
- [27] Murphy EH, Szeto WY, Herdrich BJ, et al. The management of endograft infections following endovascular thoracic and abdominal aneurysm repair [J]. J Vasc Surg, 2013, 58 (5): 1179-1185.
- [28] O'Brien MF, Stafford EG. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 94 (6): 812-818.
- [29] Buzzi M, Mirelli M, Vaselli C, et al. Contraceptives in tissue banking: State of the art transplantation [J]. Proceedings, 2005, 37 (6): 2428-2429.

(收稿日期: 2017-08-27)

冯玉庆, 王政禄. 血管移植物的研究及应用进展 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2017, 5 (6): 469-472.