

文章编号:1005-6947(2008)06-0551-05

· 基础研究 ·

去内皮、冻干辐照后异体小血管的组织结构、物理性能及抗原性变化

向东洲, 赵渝, 王学虎, 杨冰

(重庆医科大学附属第一医院 血管外科, 重庆 400016)

摘要:目的 研究去内皮、冻干辐照后同种异体小血管的组织结构、物理性能及抗原性的变化,旨在了解处理后的异体血管是否适用于血管移植。**方法** 将血管随机分为A、B两组;A组为对照组,B组为去内皮冻干辐照处理组。光镜下观察每组血管的组织结构,电镜下观察血管去内皮化情况,测出血管张力在达到15,30,45,60,90,120N及180N时的扩张直径、伸展长度及血管在横向和纵向被拉断时所能承受的最大拉力,并计算出血管在该张力下的横向和纵向变化率;采用免疫组化SP法检测处理前后主要组织相容性复合体(MHC)-II类抗原的表达水平。**结果** 处理组血管组织结构保持良好,两组血管在不同张力下的横向及纵向变化率差异无统计学意义($P > 0.05$)。处理组血管在横向上被拉断时所能承受的最大张力和在纵向上被拉断时所能承受的最大张力显著大于对照组($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$)。处理组MHC-II类抗原水平明显低于对照组($P < 0.01$)。**结论** 经去内皮、冻干辐照处理后异体小血管组织结构未发生改变,且在正常生理范围内保留一定的血管物理性能;MHC-II类抗原水平下降明显。提示,经处理的血管基本符合血管移植的要求,是小口径同种异体血管移植的理想材料。 [中国普通外科杂志,2008,17(6):551-555]

关键词: 血管/解剖学和组织学;去内皮;异体血管;组织结构;物理性能;抗原性

中图分类号:R 322.1 **文献标识码:**A

The structural, physical performance and antigenic changes of allogenic small vessels after treatment by removal of endothelial cells, gelsiccation and irradiation

XIANG Dongzhou, ZHAO Yu, WANG Xuehu, YANG Bing

(Key Laboratory of General Surgery, Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the structural, physical performance and antigenic changes of allogenic small vessels after treatment by removal of endothelial cells, gelsiccation and irradiation. This research was intended to learn whether treated allogenic small vessels are suitable for blood vessel transplantation. **Methods**

The blood vessels were randomly divided into A group and B group, in which A group was control group while B group had removal of endothelial cells as well as gelsiccation and irradiation. The tissue structure of each group was examined by light microscopy, and the condition after removal of endothelial cells was examined under electron microscope. The dilated diameter, expanded length and the largest force that the vessels could sustain in transverse and perpendicular directions when the vascular tension reached 15, 30,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30640062)。

收稿日期:2008-01-16; **修订日期:**2008-03-29。

作者简介:向东洲,男,重庆医科大学附属第一医院硕士研究生,主要从事血管疾病和血管移植方面的研究。

通讯作者:赵渝 E-mail:zhaoyu@cta.cq.cn

45, 60, 90, 120N and 180N were calculated, and the degree of change both in transverse and perpendicular directions of the vessels under such forces was calculated. Finally, the expressive level of major histocompatibility complex (MHC)-II antigens both pre-and post treatment was detected using immunohistochemistry S-P statistic way. **Results** The blood vessels maintained almost the same tissue structure after treatment in B group, and the changed rates both in transverse and perpendicular directions of the vessels under different tensions of the two groups had no statistical significance ($P > 0.05$). However, in B group, the greatest tension that the vessels could withstand in the transverse and perpendicular direction at the time of rupture was significantly greater than that of the control ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). The MHC-II antigen level of B group was significantly lower compared to control group ($P < 0.01$). **Conclusions** There is no obvious change in tissue structure of allogenic blood vessels after treatment by removal of endothelial cells, gelsiccation and irradiation, meanwhile, the blood vessels could maintain certain physical characteristics. The MHC-II antigen level decreased dramatically. The vessel after treated with the method of B group basically meets the demands for vascular transplantation, and is an ideal material for such kind of operation. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6):551-555]

Key words: Blood Vessels/anatomy and histology; De-endothelium; Allogenic Blood Vessel; Tissue Construction; Physical Characteristic; Antigenicity

CLC number: R 322.1

Document code: A

血管重建术是血管外科临床的主要治疗手段,其中小血管(直径 $< 3 \sim 4$ mm)移植的远期通畅率低下一直是一世界性难题。影响远期通畅率的主要因素是移植后再狭窄,主要表现在内膜增生和血管重塑,这与血管的物理性能和免疫排斥反应密切相关。本实验旨在研究去内皮、冻干辐照后异体小血管的组织结构、物理性能及抗原性的变化,以期小口径异体血管移植的临床应用提供较理想的血管。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

1.1.1 实验动物 选用重庆地区健康成年毕格犬12只,雌雄各半,体重 $10 \sim 15$ kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验材料及药品 I型胶原酶购自美国sigma公司;肝素钠注射液购自苏州新宝制药有限公司;鼠抗犬MHC-II类抗体购自AbD Serotec公司;免疫组织化学检测试剂盒(抗小鼠)购自晶美生物工程有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 实验仪器 CS501型电热恒温水浴箱购自重庆实验设备厂; -80°C 超低温冰箱购自Sanyo Ultra. Law.公司;冷冻干燥机购自上海医用分析仪器厂;直线加速器购自美国,Varian2300C/D;扫描电子显微镜购自美国,Hitachi公司S-3000N型;

光学显微镜购自日本,Nikon公司ECLIPSE E200型;BL-410生物功能实验系统购自成都泰盟科技有限公司;张力换能器购自北京新航兴业科贸有限公司;VIDAS图象处理系统购自德国Kontron公司;血管拉伸夹具为自制工具。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 (1)血管处理组 血管取自毕格犬的颈静脉,长约 15 cm,管径约 0.5 cm,用 37°C 肝素生理盐水冲净管腔内血液3遍,然后注入 0.1% I型胶原酶 $2.0 \sim 2.5$ mL至血管充盈,两端用血管夹夹闭,置入 37°C 水浴中消化 30 min;反复3次,完全消化掉内皮细胞。然后将去内皮的异体血管置入 -70°C 速冻 24 h, -70°C $5 \mu\text{Hg}$ 冷冻干燥 6 h, $^{60}\text{Co}200\text{cGy}$ 辐照 30 s。(2)对照组:以新鲜颈静脉为对照组。

1.2.2 观察指标指及方法

1.2.2.1 组织结构观察 A,B两组各截取颈静脉 1 cm,福尔马林溶液固定,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜观察管壁结构。同时两组各截取颈静脉 0.5 cm, 2.5% 戊二醛固定后行扫描电镜观察。

1.2.2.2 物理性能测试 A,B两组各截取 0.5 cm长的12段颈静脉,其中A组血管置于 37°C 生理盐水中 30 min。将两组各12条血管夹在自制的血管拉伸夹具内,并在BL-410生物功能实验系统上作垂直牵拉。张力换能器可感受张力。用游标卡尺测量血管在张力达到 $15, 30, 45, 60,$

90, 120N 及 180N 时的扩张直径、伸展长度及血管在横向和纵向被拉断时所能承受的最大拉力。计算 $\delta D = \Delta D/D_0 = (D-D_0)/D_0$; $\delta L = \Delta L/L_0 = (L-L_0)/L_0$ 。式中 δD 为血管在达到某一张力时的横向变化率, ΔD 为血管扩张后增加的直径, D_0 为血管原始直径, D 为血管达到某一张力时的直径; δL 为血管在达到某一张力时的纵向变化率, ΔL 为血管伸展后增加的长度, L_0 为血管原始长度, L 为血管达到某一张力时的长度。

1.2.2.3 免疫水平测试 两组各截取 1 cm 长的一段颈静脉, 冷冻切片, 厚 5 μm , 冷丙酮固定 10 min, 3% H_2O_2 -甲醇液中浸泡 10 min, 正常山羊血清室温孵育 10 min, 鼠抗犬 MHC-II 类抗原的单克隆抗体普通冰箱过夜; 用相应免疫组化检测试剂盒染色, 制备 DAB 显色液显色。以上每步骤间均以 PBS 缓冲液冲洗 3×2 min; 常规脱水, 透明, 中性树胶封片。用 VIDAS 图象处理系统处理, 半定量分析处理前后的 MHC-II 类抗原水平。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS11.5 软件包进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用两独立样本均数比较的 t 检验。检验水准 = 0.05。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织结构的变化

在光镜下可见对照组弹力膜上覆盖血管内皮细胞, 血管纤维结构清晰; 扫描电镜下可见丰富的血管内皮细胞, 呈椭圆形, 排列较整齐(图 1)。处理组血管内皮细胞消失, 血管纤维结构保持良好, 细胞外基质成分成网状; 扫描电镜发现处理组血管腔面裸露平滑肌细胞, 未见血管内皮细胞(图 2)。

2.2 血管物理性能测试

(1) A, B 两组的血管横向及纵向变化在 0 ~ 180N 的张力下差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1-2)。(2) 但血管在拉断时承受的最大张力处理组明显大于对照组 ($P < 0.05 \sim 0.01$) (表 3)。

表 1 两组血管在不同张力下的横向变化率 ($\bar{x} \pm s$)

张力(N)	对照组	处理组	P 值
15	0.1454 \pm 0.0851	0.1383 \pm 0.0087	0.779
30	0.2126 \pm 0.1166	0.2001 \pm 0.0205	0.721
45	0.2662 \pm 0.1267	0.2449 \pm 0.0300	0.580
60	0.3223 \pm 0.1212	0.3074 \pm 0.0281	0.686
90	0.3566 \pm 0.1157	0.3516 \pm 0.0199	0.885
120	0.4255 \pm 0.1102	0.4086 \pm 0.0262	0.616
180	0.5146 \pm 0.1313	0.5052 \pm 0.0228	0.811

表 2 两组血管在不同张力下的纵向变化率 ($\bar{x} \pm s$)

张力(N)	对照组	处理组	P 值
15	0.1056 \pm 0.0653	0.1019 \pm 0.0122	0.847
30	0.1811 \pm 0.1112	0.1612 \pm 0.0182	0.546
45	0.2736 \pm 0.1429	0.2456 \pm 0.0464	0.526
60	0.3869 \pm 0.1101	0.3358 \pm 0.0608	0.174
90	0.4760 \pm 0.1279	0.4065 \pm 0.0791	0.124
120	0.5504 \pm 0.1079	0.4831 \pm 0.1174	0.158
180	0.6106 \pm 0.1002	0.5429 \pm 0.0878	0.092

表 3 两组血管被拉断时所能承受的最大张力 ($\bar{x} \pm s$)

组别	横向	纵向
对照组	194.3333 \pm 6.7599	199.3333 \pm 5.5813
处理组	206.7500 \pm 8.2144	203.8333 \pm 4.7641
P	<0.01	<0.05

2.3 血管免疫原性的变化

对照组血管免疫组化细胞染色显示血管结构清晰, 棕黄色主要表达在内弹力膜及其血管内皮细胞, 整体组织均呈淡黄色(图 3)。而经处理组阳性表达量明显减少(图 4)。处理组的 MHC-II 类抗原水平下降明显, 与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.01$) (表 4)

表 4 两组血管 MHC-II 类抗原水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MHC-II
对照组	0.2963 \pm 0.0104
处理组	0.2056 \pm 0.0090
P	<0.01

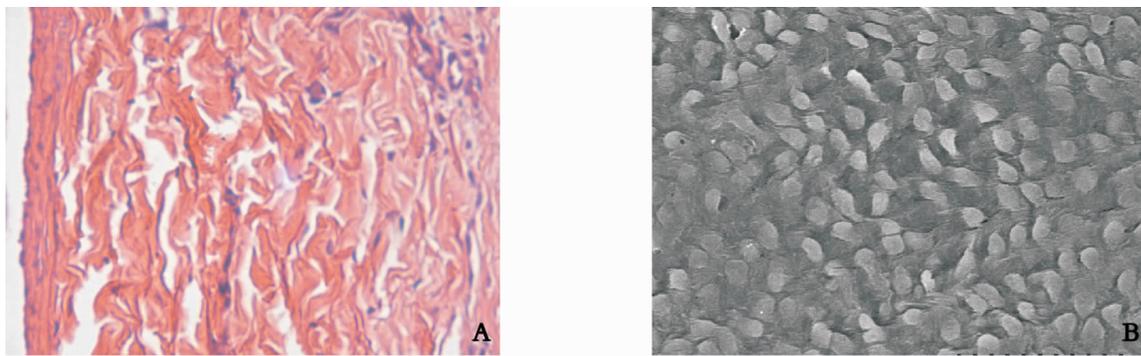


图1 对照组组织结构 A:光镜所见(HE×400); B:扫描电镜所见(SEM×400)

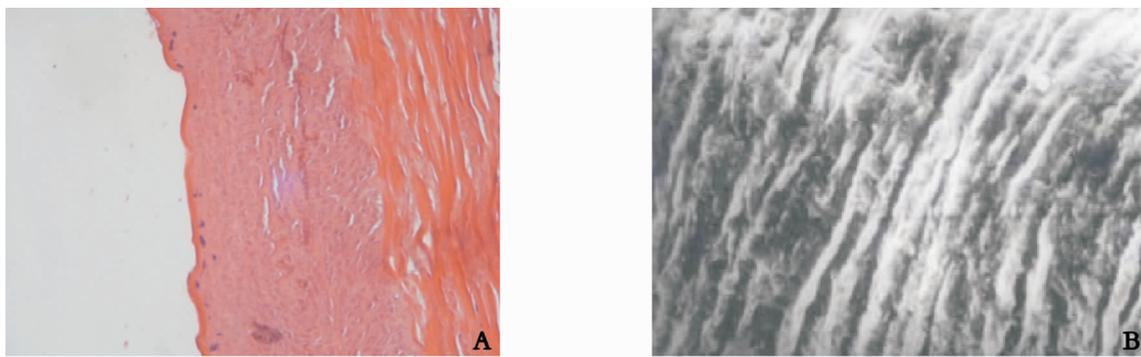


图2 处理组组织结构 A:光镜所见(HE×400); B:扫描电镜所见(SEM×400)

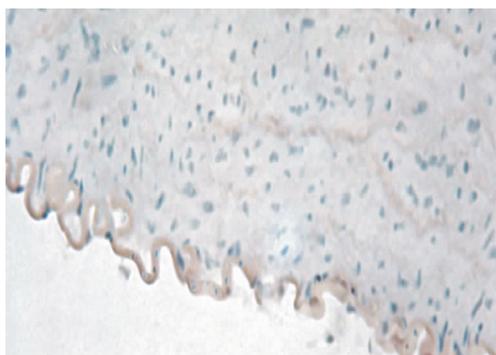


图3 新鲜血管免疫组化细胞染色(SP×200)

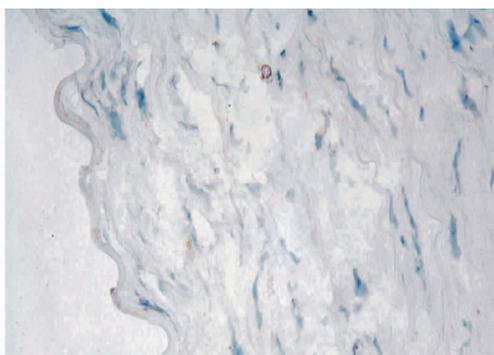


图4 处理后血管免疫组化细胞染色(SP×200)

3 讨论

随着器官和组织移植技术的发展,血管移植已成为一个重要的研究课题。同种异体血管移植是中小口径(内径 $< 6\text{ mm}$)血管移植中较理想的血管代用品。异体血管移植必须具备三个条件:消除抗原性;保持血管结构和物理性能;增强组织相容性。

研究表明,血管的物理特性在血管移植后保持远期高通畅率中发挥重要作用;物理性能较差的异体血管植入具有正常物理性能的宿主血管时,将引起血流动力学的变化。表现在:连接处

由于不同的管壁弹性造成不同的压力波传播率,引起波的反射并形成涡流,容易导致血液凝结和细胞内壁增殖^[1-2];由于移植血管和宿主血管的直径膨胀率不同,在吻合处将会有过多的应力产生,导致吻合处产生缝合线的疲劳、宿主血管产生剪切力,并产生纤维组织。为得到良好的压力传递而不产生反射效应,移植后的血管必须与宿主血管有相同的管道。因此,物理性能的匹配是异体血管生物动力学性能中的一个重要部分。本研究表明,随着血管受到的张力的变化,经过去内皮、冻干辐照处理后血管的横向和纵向变化逐渐增大;在正常生理范围内,处理组血管的物

理特性和正常血管之间无明显差异,可以推测经处理后的血管不会因为物理特性的关系而影响血流,也就不会因为物理特性的变化而引起血管移植后狭窄。因此,就血管物理特性而言,处理组的血管适合作为一种血管移植替代物。

在提高异体血管移植远期通畅率中,不仅要保持异体血管和宿主血管物理性能的一致,同时还要降低异体血管的抗原性。血管内皮细胞层是由菲薄的扁平形细胞汇合而成的,它覆盖在所有血管的内表面,是与血液之间的理想界面,是供、受者细胞间最早接触的部位,也是最早被受者免疫系统所识别的供体细胞。血管的抗原性主要存在于内皮细胞中赖氨酸、羟赖氨酸、组氨酸等残基^[3]。首先被受体的免疫系统所接触,表达 ABO 血型抗原、MHC 抗原、淋巴细胞相关抗原(CD 抗原)、血管内皮细胞抗原系统(VEC-Ag),使内皮细胞成为异体血管移植免疫重要的免疫原和靶抗原。同时血管内皮细胞通过抗原提呈、表型变化、细胞因子的合成参与免疫反应,使其成为首先接触受体的血液,并成为排斥反应的主要靶细胞;免疫反应可造成内膜增生、中膜坏死和外膜浸润;排斥反应可使血管出现血栓,最终失去功能^[4-5]。为了降低异体血管的抗原性,学者们曾采用许多不同的方法,如用乙醇、甲醛、甘油浸泡,戊二醛、多聚环氧化合物交联,冷冻干燥,低温等处理,但移植后的远期通畅率很低。冻干处理可使部分 MHC 抗原决定簇被封闭,从而降低异体血管的抗原性。辐照能较好地保存血管结构,灭菌并能阻止病毒的传播^[6],并可通过改变蛋白的空间构象减少血管 MHCI, II 类抗原的表达,有效地降低血管的抗原性。Cattral 等^[7]通过小鼠转基因移植表明,冷冻处理的移植植物,因在冻融过程中使部分 MHC 抗原决定簇封闭而减少抗原的表达。运用冻干技术可使移植血管 MHCI 类和 II 类抗原表达减少 70%。Raman 等^[8]对兔耳缘-股静脉异体移植的研究表明,通过辐射处理可改变移植植物抗原的蛋白质空间构象,从而减少抗原的表达。单纯辐射处理可使移植血管 MHCI 类抗原表达减少 30%, II 类抗原表达减少 35%^[9]。张培华等^[10]报道,将异体血管置于 -70℃ 低温速冻 24 h, -70℃ 5 μHg 冷冻干燥 6h,封装;⁶⁰Co 2.5 × 10⁴ Gy 辐照处理后(有报道,此剂量辐照的异体血管移植后成活率最高),观察到免疫排斥反应可降低 85% ~ 95%。Vesely 等^[11]在其研究中表明,经冻干加辐射处理的血管异体移植后 6 个月行组织化学观察,其结构未发生明显变化,抗原性微弱,宿主免疫反应轻,管壁

弹力纤维和胶原纤维数目正常,仅有轻微外膜炎性反应,与自体血管移植相似。Galumbeck 等^[12]在动物实验中发现,用物理方法去除内膜的同种异体血管近期通畅率较未去除内膜的异体血管明显增高。本研究发现,通过对血管进行去内皮处理后,内皮层的抗原性完全消失,然后经过冻干辐照处理,血管的抗原性大大降低,与处理前相比差异具有显著性。

本实验证实,去内皮、冻干辐照处理后异体小血管在保持血管组织结构的情况下,血管的物理特性与新鲜血管无明显差别,且在正常生理范围内能保留一定的血管物理性能,抗原性大大降低,基本符合血管移植的要求,是同种异体小血管移植的理想材料。

参考文献:

- [1] Quaglino V, Villa T, Migliavacca F, *et al.* An in vitro methodology for evaluating the mechanical properties of aortic vascular prosthesis [J]. *Artif Organs*, 2002, 26 (6): 555 - 564.
- [2] How T V, Guidoin R, Young SK. Engineering Design of vascular prosthesis [J]. *Proc Instn Mech Engrs*, 1992, 206 (6): 61 - 69.
- [3] 张纪蔚, 梅劲华, 张柏根. PC 预处理同种异体静脉重建犬股动脉的研究 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2005, 25 (1): 8 - 11.
- [4] Timaran CH, Stevens SI, Freeman MB, *et al.* Infrainguinal bypass grafting using lyophilized saphenous vein allografts for limb salvage [J]. *Cardiovasc Surg*, 2002, 10 (4): 315 - 319.
- [5] Wusteman MC, Pegg DE, Warwick RM. The banking of arterial allografts in the United Kingdom. A technical and clinical review [J]. *Cell Tissue Bank*, 2000, 1 (4): 295 - 301.
- [6] Moore T M, Gendler E. Viruses adsorbed on musculoskeletal allografts are inactivated by terminal ethylene oxide disinfection [J]. *J Orthop Res*, 2004, 22 (6): 1358 - 1361.
- [7] Cattral MS, Warnock GL, Kneteman NM, *et al.* The effect of cryopreservation on the survival and MHC antigen expression of murine islet allografts [J]. *Transplantation*, 1993, 55 (1): 159 - 163.
- [8] Raman J, Hargrave JC. Freeze-dried microarterial allografts [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1990, 85 (2): 248 - 251.
- [9] 曲明, 于永山, 张培华, 等. 同种异体血管移植的实验研究与临床应用 [J]. *中华显微外科杂志*, 1999, 22 (3): 216.
- [10] 薛连, 张培华. 冻干辐照处理前后人大隐静脉同种异体抗原和组织结构的变化 [J]. *中华实验外科杂志*, 1996, 3 (6): 323 - 324.
- [11] Vesely I, Gonzalez-Lavin L, Graf D, *et al.* Mechanical testing of cryopreserved aortic allografts. Comparison with xenografts and fresh tissues [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1990, 99 (1): 119 - 123.
- [12] Galumbeck MA, Ratz PH. Functional integrity of vascular allografts after endothelial removal [J]. *J Vasc Res*, 1995, 32 (2): 120 - 128.