文章编号:1000-5404(2010)04-0361-03

论著

硫酸软骨素对不同时期液氮冷冻保存的家兔心脏瓣膜的影响

吴爱萍[1], 周海英[2], 陈银苹[3],刘 岩[1], 孙 影[1] (063000 河北唐山,华北煤炭医学院:病理教研室[1],流行病学与卫生统计学教研室[3];河北医科大学附属唐山工人医院胸外科[2])

[摘要] **目的** 观察含硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)的液氮冷冻保存的同种异体心脏瓣膜在不同保存时间内细胞活性及瓣膜组织学结构的变化。**方法** 取48枚兔主动脉瓣随机分成6组,每组8只并经灭菌处理。对照组于灭菌后立即行瓣膜细胞活性测定及组织学检查;实验Ⅰ~Ⅴ组分别在含有硫酸软骨素的保护液中液氮深低温保存1、3、5、7、9个月后取出,复温后行瓣膜细胞活性测定、光镜及电镜检查。**结果** 实验Ⅰ~Ⅴ组D(490)值分别为(0.073±0.014)、(0.067±0.021)、(0.066±0.015)、(0.063±0.020)、(0.042±0.018),与对照组(0.105±0.029)比较,瓣膜细胞活性明显下降($P<0.05$);实验Ⅰ~Ⅳ组间,各组瓣膜细胞活性无明显差异($P>0.05$);实验Ⅴ组与实验Ⅰ组比较,瓣膜细胞活性明显下降($P<0.05$)。各实验组瓣膜组织学结构保存尚好。**结论** CS能维持液氮深低温中保存的心脏瓣膜的细胞活性,使冷冻保存7个月内细胞活性无明显下降,组织学结构保存较好,瓣膜可用性大。

[关键词] 硫酸软骨素;心脏瓣膜;低温保存时间;细胞活性

[中图法分类号] R322.11;R446.8;R916.3 **[文献标志码]** A

Chondroitin sulfate protects cardiac valves reserved in cryoprotectant for different periods

Wu Aiping[1], Zhou Haiying[2], Chen Yinping[3], Liu Yan[1], Sun Ying[1] ([1]Department of Pathology, [3]Department of Epidemiology and Health Statistics, North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei Province, 063000; [2]Department of Thoracic Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Hebei Medical University, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the pathological changes of cryopreserved homograft cardiac valves in liquid nitrogen with chondroitin sulfate (CS). **Methods** Forty-eight rabbit aortic valves were randomly divided into control and 5 experiment groups according to different time points ($n=8$). All the valves were germicidal treated. The experiment groups were cryopreserved in liquid nitrogen contained 7.5% CS for 1, 3, 5, 7 and 9 months respectively. Then, the activities of cells in different groups were examined and the specimens were observed under light and electron microscopy. **Results** Compared with the control, cytoactive of the experiment groups were significantly declined ($P<0.05$), but there was no significant difference among these experiment groups ($P>0.05$). Compared with 1-month group, cytoactive of 9-month group was significantly declined ($P<0.05$). There were slight morphologic changes in all experiment valves. **Conclusion** The cryoprotectant with 7.5% CS has the protective effect on cryopreserved cardiac valves in liquid nitrogen. Within 7 months after cryopreservation, the cytoactive declined little, histologic structure is preserved better, and valves have better availability.

[Key words] chondroitin sulfate; heart valves; cryopreservation; cytoactive

Supported by the Clinical Medicine Research Project of Tangshan (08130204A-1). Corresponding author: Zhou Haiying, Tel: 86-315-3722213, E-mail: zhy_2000_214@163.com.

同种异体心脏瓣膜具有结构自然、不需抗凝、不易老化等优点,是心脏瓣膜置换和复杂先天性心脏病纠治中带瓣管道良好的替代材料,应用范围和使用数量随之增加[1,2]。由于同种瓣的来源有限,而大多数同种瓣在采集后不是立即使用,因此,同种瓣的保存就显得非常重要。液氮深低温保存是同种异体心脏瓣膜保

[基金项目] 唐山市临床医学研究计划(08130204A-1)

[通信作者] 周海英,电话:(0315)3722213,E-mail:zhy_2000_214@163.com

存的最佳方法,但冷冻对细胞的损害严重影响了瓣膜的长期耐用性。在以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为抗冻剂的基础上,加入适量硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)可以改善瓣膜的保存效果,且这种保护作用与CS的体积百分比浓度有关,浓度为7.5% 时效果最佳[3]。由于瓣膜保存成本较高、瓣膜移植手术风险较大、移植成活率与瓣膜的可用性关系密切[4],因此,本实验进一步研究含硫酸软骨素(体积比浓度为7.5%)的液氮深低温保存液中的心脏瓣膜,在不同保存时长内瓣膜细胞活性及瓣膜结构的变化,以确定不同保存时长的心脏瓣膜的可用性。

1 材料与方法

1.1 瓣膜的采集及处理

选取健康成年兔48只,体质量2~3 kg,雌雄不拘购自哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心(由哈尔滨医科大学实验动物室提供)。按完全随机方法分为6组(对照组及实验组Ⅰ~Ⅴ组),每组8只。所有兔在处死后30 min内按无菌方法取出心脏,修剪主动脉瓣,保留升主动脉1 cm。各组瓣膜于消毒液(100 ml RPMI1640液中加入青霉素10 000 U,链霉素10 mg,氟康唑5 mg)中,4 ℃下灭菌24 h后,对照组立即行瓣膜细胞活性测定和组织学检查。实验各组转入装有不同抗冻剂的无菌冻存管内。抗冻剂为含有10% 胎牛血清、10% DMSO及7.5% CS的RPMI1640液。将各组冻存管先置4 ℃冰箱中保存2 h,再利用速率控制降温容器转入-80 ℃冰箱中过渡12 h,然后转入液氮中长期保存。实验Ⅰ~Ⅴ组瓣膜分别于冻存1、3、5、7、9个月后取出。复温时将冻存管在液氮气相中过渡1 h后,浸入37 ℃温水中,待营养液解冻后,将主动脉瓣取出放入37 ℃无菌生理盐水中快速复温,再在纯净的RPMI1640液中平衡15~30 min,每组各取2枚瓣膜,分别用10%甲醛及3%戊二醛固定后行组织学检查,其余6枚主动脉瓣采用XTT比色法测定瓣膜细胞活性。

1.2 XTT比色法测定瓣膜细胞活性

XTT用60 ℃预热的无血清培养基(DMEN)溶液,浓度为1.0 mg/ml,过滤除菌,现配现用。硫酸酚嗪甲酯(PMS)用PBS缓冲液配置,浓度为1.53 mg/ml。实验前每5毫升的XTT液中加入25 μl的PMS液,制成XTT/PMS混合液。将处理后的每个瓣叶标本在PBS液中洗涤后分成3份,称湿质量后分别放入每孔含有100 μl DMEN液的96孔平底培养板内,然后每孔加入50 ml XTT/PMS混合液,在37 ℃含5% CO_2孵箱中孵化1.0 h后,将瓣膜组织转入到另一个96孔培养板内,每孔加入150 μl Triton-100,再在37 ℃含5% CO_2孵箱中孵化1.5 h后,丢弃瓣膜组织。以同时加入150 μl Triton-100的空白孔调零,在酶标仪上测定每孔的吸光度值(D值);测量波长490 nm,D(490)值取3孔均值。瓣膜细胞活性以每毫克瓣膜组织将XTT还原成甲臜所产生的吸光度表示。

1.3 光学显微镜检查

10%甲醛固定的瓣叶组织标本,行石蜡包埋切片,HE染色后光镜下观察瓣膜结构。

1.4 超微结构观察

3%戊二醛预固定的瓣膜组织标本,经1%四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,2%醋酸铀和6%柠檬酸铅双重染色后,在JEM-1220型(日本电子公司)透射电镜下观察。

1.5 统计学处理

应用SAS 8.0统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及Bonferroni t检验。

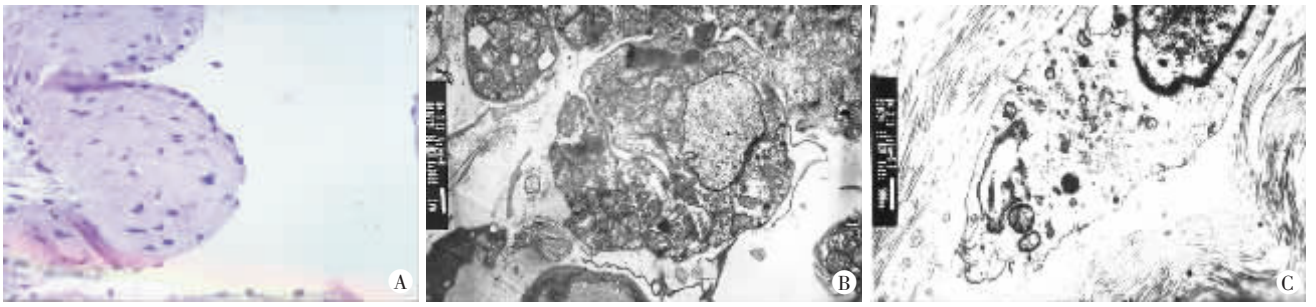
2 结果

2.1 瓣膜细胞活性检测结果

实验Ⅰ~Ⅴ组D(490)值分别为:(0.073 ± 0.014)、(0.067 ± 0.021)、(0.066 ± 0.015)、(0.063 ± 0.020)、(0.042 ± 0.018)与对照组(0.105 ± 0.029)比较,冷冻保存的瓣膜细胞活性较新鲜瓣膜明显下降($P<0.05$);实验Ⅰ~Ⅳ组间,各组瓣膜细胞活性无明显差异($P>0.05$);实验Ⅴ组与实验Ⅰ组比较,瓣膜细胞活性明显下降($P<0.05$)。

2.2 光镜观察结果

对照组:内皮细胞连续性完整,连接紧密,弹力纤维平行分布,弹力层下富于胶原纤维组织。实验组:内皮细胞略水肿,偶见部分细胞脱落,但内皮下组织结构无明显变化(图1A);实验Ⅰ~Ⅴ组间瓣膜结构比较无明显差异。



A:实验组光镜观察(HE ×200);B:对照组透射电镜观察;C:实验组透射电镜观察

图1 2组家兔主动脉瓣膜组织学结构观察

2.3 电镜观察结果

对照组:瓣膜内皮结构完好,胶原纤维排列整齐,内皮下可见网状纤维丝分布,细胞核圆形,细胞质内线粒体结构完好(图1B)。实验组:内皮细胞数量减少,部分线粒体肿胀,无明显空泡变性,嵴整齐,粗面内质网无明显扩张脱颗粒,胶原纤维走行仍较规则,周期性横纹结构仍较清晰(图1C),实验Ⅰ~Ⅴ组间无明显差异。

3 讨论

目前,有4种不同类型的瓣膜置换术应用于临床:机械瓣膜置换、冷冻保存的同种心脏瓣膜置换、异种心脏瓣膜置换和肺动脉瓣代主动脉瓣的自体移植。4种瓣膜置换术均有各自不同的缺点。人工心脏瓣膜植入术后面临血栓形成和栓塞的危险,患者需长期服用抗凝药物,从而导致某些患者出现出血倾向[5-7]。异种心脏瓣膜易发生钙化和退行性变,远期效果不很理想[8]。肺动脉瓣代主动脉瓣的自体移植需要同时行肺动脉瓣的同种异体移植,技术难度大,面临着两个瓣膜的功能不全问题。同种异体心脏瓣膜具有同正常人主动脉瓣膜相同的血流动力学特征和效果,有效瓣口面积大、瓣口阻力低、射血期左室耗能低,致使短期内左室内径和收缩功能均明显改善。但是同种瓣的来源有限,如何保存非常重要。目前广泛应用的是液氮深低温保存法。

液氮深低温(-196 ℃)条件下,细胞的生物化学反应几乎完全停止,避免了组织长期保存时可能的结构改变,故能较长时间地保存同种瓣的细胞活性和结构完整性;同时也可导致瓣膜细胞活性降低及超微结构的改变[9,10],总的蛋白合成功能明显下降和瓣膜基质的损害,这些损害将直接影响到瓣膜移植后的使用寿命[11],因此这只是一种相对保存。

本研究表明,冷冻保存的确能对瓣膜造成一定程度的损害,冷冻保存的瓣膜细胞活性明显低于新鲜瓣膜的细胞活性($P<0.05$)。而含硫酸软骨素的液氮深低温保存液中的心脏瓣膜,不同保存时长内(1~7个月)瓣膜细胞活性下降不明显($P>0.05$),此时期内心脏瓣膜的可用性大,移植成活率高。随着冷冻时间的延长,9个月后瓣膜细胞活性又明显降低,表明冻存过程中对瓣膜细胞仍可造成损害,其原因可能为:在深低温冷冻情况下,瓣膜组织代谢并没有完全停止,仍处于缓慢的无氧代谢过程,细胞内外可能仍有离子交换及渗透压的改变,随保存时间延长,细胞内外代谢产物不断积累,以及冷冻降温过程中各种物质浓度积累到有害程度,可导致细胞完整性的破坏,从而使细胞受到损伤。

光镜及电镜观察,含硫酸软骨素的液氮深低温保存液中的心脏瓣膜在冷冻保存1~9个月,仅内皮细胞有部分脱落,瓣膜结构及细胞的超微结构保存尚完好,且膜结构未见明显异常损害表现,提示此种保存方法可以较长时间对瓣膜起到较好的保存作用,究其原因为CS的保护作用。CS是一种带负电荷的黏滞性较高的物质,降温过程中,抗冻剂的高黏滞性妨碍了分子弥散,负电荷破坏了运动的极性,可以抑制冰晶的形成,使细胞免受损害。同时,CS又是大分子聚阴离子物质,在一定浓度下,具有高度黏弹性,在冷冻保存过程中可聚集在瓣膜组织周围而使其免受氧自由基的侵袭,并且作为内源性抗氧剂,抵抗氧自由基作用,保护组织免受损伤。综合考虑,移植选瓣膜时应首先考虑瓣膜细胞活性的因素,结合瓣膜组织学结构,尽量挑选保存时间1~7个月的瓣膜。

参考文献:

[1] Adachi I, Ho S Y, McCarthy K P, *et al*. Morphologic findings of the aortic homograft implanted in the tricuspid position[J]. Ann Thorac Surg, 2009, 87(6): 1951-1952.

[2] O'Brien M F, Harrocks S, Stafford E G, *et al*. The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1, 022 valve replacements[J]. J Heart Valve Dis, 2001, 10(3): 334-344.

[3] 吴爱萍, 周海英, 朱海燕, 等. 硫酸软骨素对液氮深低温保存的同种异体主动脉瓣的保护作用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41(5): 441-443.

[4] Goffin Y A, Van-Hoeck B, Jashari R, *et al*. Banking of cryopreserved heart valves in Europe: assessment of a 10-year operation in the European Homograft Bank (EHB)[J]. J Heart Valve Dis, 2000, 9(2): 207-214.

[5] 刘健, 肖颖彬, 陈林, 等. 136例巨大左室瓣膜置换术后并发症危险因素分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2386-2389.

[6] 顾强, 陈柏成, 郝嘉, 等. 重庆地区心脏机械瓣膜置换术后稳定华法林抗凝剂量的探讨[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 647-649.

[7] 顾强, 陈柏成, 郝嘉, 等. 重庆地区人工机械瓣膜置换术后患者VKORC1-1639A/G遗传基因多态性与华浊林剂量调整的研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2370-2373.

[8] 李峰,胡建国,尹邦良,等. 52例人工生物瓣膜临床应用分析[J]. 中南大学学报: 医学版, 2008, 33(3): 257-261.

[9] Burkert J, Krs O, Vojacek J, *et al*. Cryopreserved semilunar heart valve allografts: leaflet surface damage in scanning electron microscopy[J]. Zentralbl Chir, 2008, 133(4): 367-373.

[10] Krs O, Burkert J, Slízová D, *et al*. Allograft semilunar cardiac valves processing and cryopreservation - morphology in scanning electron microscope[J]. Cell Tissue Bank, 2006, 7(3): 167-173.

[11] Krs O, Slízová D, Burkert J, *et al*. Impact of processing on surface structure of human cardiac valve allografts[J]. Acta Medica (Hradec Kralove), 2004, 47(2): 97-99.

(**收稿**:2009-08-14;**修回**:2009-09-24)

(编辑 龙 亮)