论著

文章编号:1000-5404(2010)12-1282-04

喷射心肌打孔填充不同凝胶支架后心肌孔道演变规律的实验研究

周大燕,黄 晶,熊 鹿,郭 睿,吴 奇,容顺康,江永红,刘地川,邓昌明 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院心血管内科)

[摘要] **目的** 观察喷射心肌打孔填充不同凝胶支架后犬心肌孔道的演变规律以及不同凝胶支架在心肌组织中的组织相容性。**方法** 12只健康杂种犬,体质量9~13 kg,年龄1~2岁,均分为琼脂糖凝胶(agarose hydrogel,AH)组、纤维蛋白凝胶(fibrin glue,FG)组、壳聚糖凝胶(chitosan hydrogel,CH)组,每组4只。各组用无针注射器分别喷射各种凝胶心肌打孔,于术后2、4、6周取含有孔道的心肌组织行HE、Masson染色,观察各种凝胶支架在心肌组织中的降解性和组织相容性,以及各组心肌孔道是否保留和开放。**结果** 纤维蛋白凝胶2周内绝大部分已经降解,引起较少的炎性反应和胶原纤维增生,降解后心肌孔道闭塞,同时心内膜面发现附壁血栓形成;琼脂糖凝胶6周时仍有较多凝胶未降解,引起周围组织大量胶原增生,心肌孔道完全闭塞;壳聚糖凝胶的降解周期为4~6周,降解后可见心肌孔道开放及孔道壁内皮化。**结论** 琼脂糖凝胶和纤维蛋白凝胶均不适合作为心肌孔道支架,而壳聚糖凝胶是一种良好的心肌孔道支架。

[关键词] 心肌;注射,喷射;凝胶类;支架;狗

[中图法分类号] R318.08; R654.2; R-332 **[文献标志码]** A

Changes of transmyocardial channels filled with different hydrogel scaffolds after transmyocardial jet revascularization in dogs

Zhou Dayan, Huang Jing, Xiong Lu, Guo Rui, Wu Qi, Rong Shunkang, Jiang Yonghong, Liu Dichuan, Deng Changming (Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of transmyocardial channels after being filled with different hydrogel scaffolds by transmyocardial jet revascularization (TMJR) in dogs and the histocompatibility of different hydrogel scaffolds in myocardium. **Methods** Twelve healthy mongrel dogs, with body weight 9 to 13 kg, aged 1 to 2, were randomly divided into 3 groups, agarose hydrogel group (AH group), fibrin glue group (FG group) and chitosan hydrogel group (CH group), 4 animals in each group. Transmyocardial revascularization in different groups was performed with needle-free systems to jet out different hydrogels. Samples of myocadial tissues of 3 groups were obtained at 2, 4, and 6 weeks after operation for hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining to observe the degradation and histocompatibility of the 3 hydrogels in the myocardium and whether the channels in 3 groups could keep patency. **Results** Fibrin glue had been degraded mostly in less than 2 weeks with less inflammatory response and collagen fibers. The channels in this group were almost occluded after degradation. Moreover mural thrombus was found on the endocardial surface. There were much undegraded agarose hydrogel at 6 weeks, with the collagen fibers proliferating in surrounding tissue and the channels being occluded completely. The degradation cycle of chitosan hydrogel was observed at 4 to 6 weeks and the channels kept patency and endothelialization after degradation. **Conclusion** Agarose hydrogel and fibrin glue are not suitable for transmyocardial channel scaffolds, while chitosan hydrogel is a good substance for preparing transmyocardial channels scaffolds.

[Key words] myocardium; injections, jet; gels; stents; dogs

Supported by the Key Program (30527001) and General Program (30670870) of National Natural Science Foundation of China and the Tackling Program for Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2005AA5008-5). Corresponding author: Huang Jing, Tel: 86-23-63693083; E-mail: huangjing_9901@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30527001)、面上项目(30670870);重庆市科技攻关重点项目(CSTC2005AA5008-5)

[通信作者] 黄 晶,电话:(023)63693083,E-mail:huangjing_9901@yahoo.com.cn

激光心肌打孔术是利用激光的瞬时汽化作用在心脏缺血区制作多个与左心室腔相通的孔道，使心腔内血液注入到缺血心肌内，同时通过激光诱发的新生血管可以营养该区域心肌，从而改善缺血心肌灌注。激光心肌打孔即刻可形成孔道，但随着时间的延长，绝大部分的孔道将闭塞[1]。针对上述血运重建方法的不足，本实验采用一种新的心肌打孔方式——喷射心肌打孔。该方法可以避免激光心肌打孔对心肌组织带来的热损伤，而且在喷射心肌打孔的同时喷入具有三维支架作用的凝胶，凝胶在一定时间内可以对孔道起到支撑作用，可能使孔道得以保留，而且内皮化及血管化。本实验选择 3 种可注射性天然材料，观察其组织相容性以及喷射不同凝胶支架心肌打孔后心肌孔道的演变规律。

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

健康杂种犬 13 只（重庆医科大学实验动物中心），雌雄不限，体质量 9～13 kg，年龄 1～2 岁；琼脂糖（西班牙 biowest 公司）；纤维蛋白凝胶（广州倍绣生物有限公司）；壳聚糖盐酸盐（脱乙酰度 80%～90%，浙江金壳生物化学有限公司）；β-甘油磷酸钠（Sigma 公司）；羟乙基纤维素（上海生工生物工程有限公司）；Injex 无针注射器（德国 Rösch AG Medizintechnik 公司）。

1.2　方法

1.2.1　3 种凝胶支架的制备　　琼脂糖凝胶的制备：1.2 g 琼脂糖加入 30 ml 灭菌蒸馏水，微波炉中加热至琼脂糖全部熔化，熔化的琼脂物冷却后立即用消毒的安瓿吸入 100 μl 备用；纤维蛋白凝胶的制备：取主体胶（含纤维蛋白原 200 mg，凝血因子Ⅷ 25 U）200 mg 溶解于溶解液（含抑肽酶 7 500 kU）1.5 ml 形成 A 液，取催化剂 48 mg（含凝血酶 625 U，氯化钙 6.875 mg）溶解于溶解液（灭菌注射用水）1.5 ml 形成 B 液，取 50 μl B 液与 50 μl A 液迅速混合，立即用消毒的安瓿吸入备用；壳聚糖凝胶的制备：参照 Lu 等[2]方法，壳聚糖 0.25 g 溶解于 5 ml 灭菌蒸馏水并高压灭菌，配制 5% 的溶液，β-甘油磷酸钠 0.23 g 溶解于 2 ml 灭菌蒸馏水并用 0.22 μm 过滤器除菌，配制 11.5% 的溶液，取 β-甘油磷酸钠溶液 1 ml 与壳聚糖溶液 4 ml 混合，之后加入 2.5% 的羟乙基纤维素溶液 1.25 ml 混合，用消毒的安瓿吸入 100 μl，并在 37 ℃中水浴 30 min。

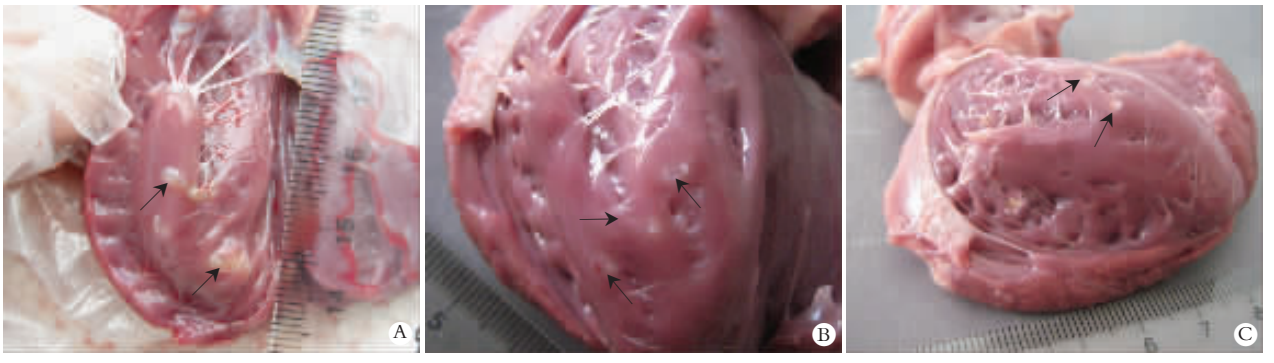
1.2.2　动物分组及处理　　12 只犬均分为琼脂糖凝胶（agarose hydrogel，AH）组、纤维蛋白凝胶（fibrin glue，FG）组、壳聚糖凝胶（chitosan hydrogel，CH）组，每组 4 只。3% 戊巴比妥钠（30 mg/kg）腹腔麻醉，气管插管，连接呼吸机和电生理仪。经左侧第 4 肋间开胸，暴露心脏左室前壁，将无针注射器头部垂直于心外膜喷射心肌打孔。每只犬喷射心肌打孔 10 个，孔间距离约 1 cm，心肌打孔时由于凝胶填充在孔道中，仅有少量出血，以纱布压迫即可止血。之后缝合心包，逐层关胸，负压抽气，待有自主呼吸时脱机。各组术后肌肉注射青霉素 200×10^4 U/d，连续 5 d，继续喂养至观察终点。

1.2.3　组织学检查　　①HE 染色：犬到观察终点后（各组于 2、4、6 周），用 3% 戊巴比妥麻醉犬，经颈静脉注入 10% 的 KCl 10 ml 使心脏停跳于舒张期，取出心脏，从心内膜观察孔道情况，选择数个含有孔道的全层心肌组织进行冰冻切片，并将另外的含有孔道的心肌组织用 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋行 Masson 染色。做冰冻切片时，沿孔道纵行方向切片并常规 HE 染色，在光学显微镜下观察凝胶的降解情况，心肌孔道内情况及孔道周围的炎症反应。②Masson 染色：4% 多聚甲醛固定后，石蜡包埋，做常规 Masson 染色。每个标本选择数张切出孔道的 Masson 染色切片在光学显微镜下观察，胶原纤维染成蓝色，肌纤维染成红色，主要观察孔道周围的胶原增生情况。

2　结果

2.1　实验过程的一般情况、动物存活情况及心脏大体标本观察

在喷射打孔瞬间，心电图显示有室性早搏，而整个喷射心肌打孔过程中，没有其他心律失常发生，同时无犬死亡，打孔术后 6 h 内心电图监护亦未发现心律失常。AH 组和 CH 组各死亡 1 只，FG 组死亡 2 只，补入 1 只，共有 9 只动物进入观察终点。心脏大体标本观察：2 周时，各组在心内膜均可见突起的凝胶（图 1）；4、6 周时，AH 组心内膜仍可见明显突起的凝胶，FG 组和 CH 组心内膜均未见凝胶，但可见孔道内口，边缘苍白色。在 FG 组犬心内膜面喷射孔附近发现有附壁血栓形成，而在 AH 组及 CH 组均未发现左心室附壁血栓形成。



A：AH 组；B：FG 组；C：CH 组　　↑：凝胶

图 1　各组动物 2 周时心脏标本大体观察

2.2 凝胶支架支撑度与生物降解性、心肌孔道演变规律及孔道周围炎症反应

HE染色切片在光学显微镜下，AH组琼脂糖凝胶有较好的支撑度，但在2周时即观察到大量的胶原纤维和炎症细胞，4周和6周时胶原纤维增生明显并且形成纤维包裹（图2A），孔道完全闭塞，孔道周围少量血管新生。FG组2周时可见纤维蛋白凝胶大部分已降解，4周和6周时纤维蛋白凝胶完全降解，孔道被纤维组织及组织碎片填充，孔道闭塞，孔道内及孔道周围有少许炎症细胞和较多血管新生（图2B）。CH组2周时孔道内有大量的炎性细胞，尤其是巨噬细胞，可见部分残留的壳聚糖凝胶块（图2C）；4周时壳聚糖大部分已降解，炎性细胞基本消失，留下开放的孔道，并在孔道内形成血管腔样结构（图2D），孔道周围无明显的纤维组织增生；6周时壳聚糖完全降解，孔道开放，并见孔道壁内皮化（图2E）。

2.3 心肌孔道周围的胶原纤维增生情况

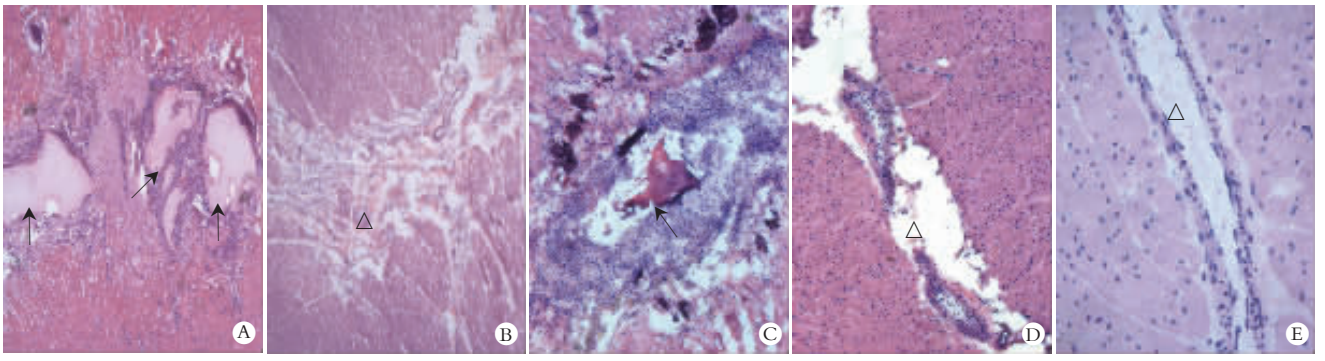
Masson染色下，AH组心肌孔道内及孔道周围有大量的胶原纤维增生，并且将琼脂糖凝胶包裹。FG组孔道内及孔道周围的纤维组织显著少于琼脂糖凝胶组，并且无包裹形成。CH组壳聚糖凝胶降解后，心肌孔道壁及孔道周围有少量胶原纤维组织增生，尚有大量空腔存在（图3）。

3 讨论

激光心肌打孔术即建立心室腔和心肌间的直接供血隧道，并通过广泛的微循环网灌注缺血心肌，其作为治疗晚期缺血性心脏病的一种新方法，可以单独应用或作为冠状动脉旁路移植术的一种辅助治疗手段，能缓解心绞痛症状及提高病人生活质量[3]。关于激光心肌血运重建术（transmyocardial laser revascularitation，TMLR）的作用机制以及远期疗效，尤其是孔道是否能长期开放，目前尚存有争议。一些动物实验及临床报道发现TMLR数月后心肌孔道内皮化以及孔道内发现红细胞[4]，但近来这一观点受到普遍质疑。多项动物实验及临床报告[5,6]并未找到激光孔道长期开放的证据。同样，其他心肌打孔方式（如针刺打孔和电钻打孔）的心肌孔道也存在心肌孔道闭塞的问题[4]。

针对上述血运重建方法的不足，本实验采用无针喷射进行心肌打孔。此打孔方式既可以避免针刺打孔和电钻打孔将针头插入搏动的心脏导致的损伤，也可以避免TMLR对心肌组织造成的热损伤，而且在喷射心肌打孔的同时可以向心肌孔道内投递物质，从而提高了操作的安全性和可行性。在心肌打孔过程中，仅发现在喷射瞬间有室性早搏，而无其他心律失常发生，表明喷射心肌打孔术中是安全的。

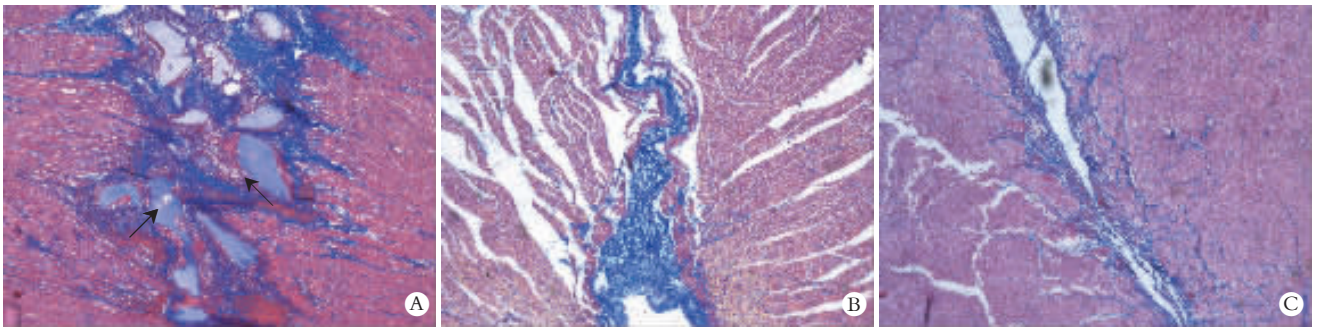
本实验所采用的无针喷射系统为Injex无针注射器。Injex无针注射器原装的安瓿喷口直径大小为0.172 mm，为了在心肌组织内形成直径适当的心肌孔道，我们对原装的安瓿喷口进行了加工，制作的喷口直径分别为0.25、0.30、0.35、0.40、0.50 mm。Injex无针



↑：凝胶；△：孔道

A：AH组4周（×100）；B：FG组4周（×100）；C：CH组2周（×100）；D：CH组4周（×100）；E：CH组6周（×400）

图2 凝胶支架在各组动物心肌孔道内的降解过程及规律观察 （HE）



A：AH组 ↑：未降解的琼脂糖凝胶；B：FG组；C：CH组

图3 各组动物4周时心肌孔道及孔道周围胶原增生观察 （Masson ×100）

注射器原装的弹簧动力太大，因此我们配制了不同动力的弹簧，并进行犬离体及活体心脏实验，结果发现选择势能较小的弹簧（动力约为原装弹簧的 50%），喷口直径为 0.5 mm 的安瓿，并且安瓿内凝胶的喷射体积为 100 μl 时，能将凝胶喷入犬左室前壁心肌内形成直径约 1.2 mm 的透壁性孔道，此条件下喷射速度约为 58 m/s。

为了防止孔道的闭塞，本实验在喷射心肌打孔的同时喷入具有三维支架作用的支架材料。支架材料主要分为天然材料和人工合成材料。由于天然材料具有良好的生物相容性和降解性，因此我们选用了 3 种可注射的天然材料：琼脂糖，纤维蛋白胶和壳聚糖。琼脂糖是线性的多聚物，具有较好的支撑强度。琼脂糖凝胶可以作为椎间盘组织工程支架材料[7]以及神经支架修复材料[8]。纤维蛋白胶具有良好的生物相容性、可黏附性及可降解性，同时可通过释放转化因子和血小板衍生生长因子等来促进血管新生[9]。最近有研究[10,11]发现纤维蛋白胶具有维持心肌梗死后心室几何形态等作用。朱向明等[12]将纤维蛋白凝胶作为 TMLR 后孔道的填充物，结果发现此方法能改善缺血心肌的血流灌注。壳聚糖是多糖中仅有的一种碱性氨基多糖，其结构和某些性质与细胞外基质中的主要成分氨基多糖极其相似，具有良好的生物降解性和生物相容性，而且具有较好的力学性能，还能促进血管新生以及抑制成纤维细胞生长和瘢痕组织的形成[13-15]。

本研究表明琼脂糖凝胶具有一定的支撑度，但是其生物降解性差，同时组织相容性差，引起孔道周围大量胶原纤维增生并且形成纤维包裹，从而使孔道完全闭塞。纤维蛋白凝胶具有较好的组织相容性，但降解过快，而且支撑度弱，其降解后心肌孔道大部分闭塞，同时心内膜面发现附壁血栓形成，可能与纤维蛋白胶的止血功能有关[16]。壳聚糖凝胶具有很好的支撑度、生物降解性和组织相容性，多项研究观察了壳聚糖及其衍生物对组织的反应，结果表明其引起的异体反应小，短时期内嗜中性粒细胞以及巨噬细胞等炎症细胞在壳聚糖附近堆积，释放溶菌酶缓慢将壳聚糖降解为无毒的氨基葡萄糖，之后炎症细胞分散，而此非特异性反应并不对周围组织有明显破坏，长期观察并没有慢性炎症反应[17]。本实验观察到壳聚糖在心肌组织中的反应与上述报道一致。而且 HE 染色表明壳聚糖降解后心肌孔道开放，并且孔道壁内皮化；HE 染色和 Masson 染色提示孔道内及孔道周围纤维组织增生少，可能与壳聚糖抑制成纤维细胞生长和瘢痕组织形成有关[15]。

本实验采用的心肌打孔方式是经心外膜的透壁性喷射心肌打孔，此方法可能使少部分凝胶进入心室腔，导致心内膜附壁血栓形成或者凝胶随血流运动导致远隔器官栓塞。本课题组正在研制导管化的心肌喷射系统，从而可以经心内膜喷射心肌打孔而避免血栓形成或者远隔器官栓塞。

参考文献：

[1] Tasse J, Arora R. Transmyocardial revascularization: peril and potential[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2007, 12(1): 44-53.

[2] Lu W N, Lu S H, Wang H B, *et al*. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(6): 1437-1447.

[3] Allen K B, Kelly J, Borkon A M, *et al*. Transmyocardial laser revascularization: from randomized trials to clinical practice. A review of techniques, evidence-based outcomes, and future directions[J]. Anesthesiol Clin, 2008, 26(3): 501-519.

[4] 赵健，王颖，刘晓程. 激光、机械心肌打孔血运重建机制的探讨及比较[J]. 心血管病学进展，2007，28(6)：927-930.

[5] Briones E, Lacalle J R, Marin I. Transmyocardial laser revascularization versus medical therapy for refractory angina[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2009, (1): CD003712.

[6] Horvath K A. Transmyocardial laser revascularization[J]. J Card Surg, 2008, 23(3): 266-276.

[7] 李长青，周跃. 椎间盘组织工程支架材料研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志，2005，19(12)：1033-1035.

[8] 王伟，范明，智小东，等. 神经支架复合体修复周围神经缺损[J]. 中国医学科学院学报，2005，27(6)：688-691.

[9] Bensaid W, Triffitt J T, Blanchat C, *et al*. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation[J]. Biomaterials, 2003, 24(14): 2497-2502.

[10] Yu J, Christman K L, Chin E, *et al*. Restoration of left ventricular geometry and improvement of left ventricular function in a rodent model of chronic ischemic cardiomyopathy[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 137(1): 180-187.

[11] Mukherjee R, Zavadzkas J A, Saunders S M, *et al*. Targeted myocardial microinjections of a biocomposite material reduces infarct expansion in pigs[J]. Ann Thorac Surg, 2008, 86(4): 1268-1276.

[12] 朱向明，王新房，刘望彭，等. 激光心肌打孔隧道埋植 bFGF 缓释胶对急性缺血心肌血管生成及血流灌注的影响[J]. 中国超声医学杂志，2004，20(1)：4-8.

[13] Jiang T, Kumbar S G, Nair L S, *et al*. Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine[J]. Curr Top Med Chem, 2008, 8(4): 354-364.

[14] Kang G D, Song S C. Effect of chitosan on the release of protein from thermosensitive poly (organophosphazene) hydrogels[J]. Int J Pharm, 2008, 349(1/2): 188-195.

[15] 夏平光，侯春林，王万宏. 几丁糖抑制人成纤维细胞增殖的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2007，21(8)：833-836.

[16] Ahmed T A, Dare E V, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2008, 14(2): 199-215.

[17] 朱爱萍，吴钧，张娜，等. 壳聚糖——一种具有应用潜力的组织工程支架材料[J]. 化学通报，2002，65(3)：1-5.

（**收稿**：2009-12-03；**修回**：2010-02-11）

（编辑 栾 嘉）