

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.009

文章编号: 1005-8982(2017)13-0044-06

可降解室间隔缺损封堵器的安全性与有效性的动物实验研究

陈艺丹¹, 潘一峰², 赵天力³

(1.中南大学湘雅医院,湖南长沙 410008;2.中南大学湘雅医院肝胆肠研究中心,湖南长沙 410008;3.中南大学湘雅二医院心血管外科,湖南长沙 410011)

摘要:目的 评价新型可吸收封堵器的生物安全性、相容性、可行性和有效性,为临床应用提供参考。**方法** 选取实验动物成年比格犬 27 只,17 只实验组用犬通过开胸 B 超引导下经右室游离壁穿刺室间隔方法复制室间隔缺损(VSD)动物模型,模型犬复制后,即刻植入可吸收 VSD 封堵器,术后抽血查生化指标,并在第 3、6、9 和 12 个月随机处死 3 只实验组犬和 2 只对照组犬,取其心脏及其他脏器标本。通过比较血液生化指标、心脏大体标本、病理学、免疫组织化学检查,对其他器官进行病理学检查,评价新型可吸收封堵器植入后的安全性及有效性。**结果** 所有实验用犬均存活,无并发症,病理组织学检查示封堵器逐渐被破坏吸收并完全被纤维组织及内皮细胞覆盖,免疫组织化学检查示封堵器表面逐渐出现上皮细胞,并可见新生血管组织。**结论** 新型可吸收封堵器设计科学合理、操作简便,具有很好的生物相容性,其内皮化完全且迅速,并发症少,可有效的封堵 VSD,具有良好的临床安全性应用前景。

关键词: 室间隔缺损;比格犬;可吸收封堵器;经胸介入;食管超声

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Animal study on safety and effectiveness of absorbable ventricular septal occluder

Yi-dan Chen¹, Yi-feng Pan², Tian-li Zhao³

(1. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China;
2. Hepatobiliary Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 3. Department of Cardiovascular Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

Abstract: Objective To evaluate the safety, biocompatibility and effectiveness of the new absorbable occluder. **Methods** A total of 27 adult Beagle dogs were enrolled and divided into 2 groups. Ventricular septal defect (VSD) animal models were prepared in experimental group (17 dogs) by open chest. VSD was punctured and the new absorbable occluder was implanted by guiding of transthoracic echocardiography. Laboratory examinations were done after surgery and pathological samples were obtained after euthanasia in the 3rd, 6th, 9th and 12th month. Then the safety and effectiveness were evaluated by comparing laboratory results, clinical and histopathological manifestations of the 2 groups. **Results** All dogs survived. No complications occurred. Histopathological examination showed the occluders were biocompatible and immunohistochemical examination showed epithelial cells and new vessels were growing on the occluder surface. **Conclusions** The new absorbable occluder has been proven to be safe, effective and biocompatible in this study.

Keywords: VSD; Beagle dog; absorbable occluder; transthoracic intervention; TEE

收稿日期:2016-12-14

[通信作者] 赵天力, E-mail: dr.zhaotl@gmail.com; Tel: 15574389964

室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 是最常见的先天性心脏缺损之一, 占所有先天性心脏病的 20% 左右^[1]。自从 2002 年 AMPLATZER 发明偏心型镍钛合金室间隔缺损封堵器, 取得不错的短中期疗效, 但也出现许多无法忽视的并发症, 特别是远期房室传导阻滞, 这也是美国食品药品监督管理局 (food and drug administration, FDA) 拒绝审批该封堵器在美国上市的主要原因^[2]。而许多假说认为^[3] 远期房室传导阻滞与其封堵器在室间隔长期刺激有关, 并且金属封堵器永久留存心脏内的远期安全性尚缺乏远期随访资料。本研究选用可降解高分子聚合材料聚对二氧环己酮 (polydiox-anone, PDO)、聚左旋乳酸 (poly-L-lactic acid, PLA) 无纺布和聚乙醇酸 (polyglycolic acid, PGA) 制作而成的可吸收 VSD 封堵器, 通过经胸介入的方法置入实验动物体内, 并对其生物安全性和有效性进行评估。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

选取实验动物成年比格犬 17 只为实验组, 雌性, 体重 (19.60 ~ 26.80) kg, 平均 (22.92 ± 1.48) kg。另外选取成年比格犬 10 只为对照组, 雌性, 体重 (18.50 ~ 25.90) kg, 平均 (23.82 ± 1.96) kg, 两组体重比较差异无统计学意义。

实验用比格犬均由中南大学实验动物中心提供, 中南大学实验动物中心鉴定为纯种比格犬, 采购自四川成都比格犬饲养基地。HE 染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司) 和 CD34 染色试剂盒 (美国 Vector 公司) 由中南大学湘雅二医院病理科提供。

1.2 仪器与设备

实验用封堵器、封堵器输送装置及超声仪器 (美国 GE 公司) 由上海形状记忆公司提供。

1.3 实验过程

1.3.1 麻醉 实验犬以丙泊酚 1.5 mg/kg 静脉推注, 氯胺酮 10 mg/kg、地西洋 0.3 mg/kg 肌内注射, 约 5 ~ 10 min 即可诱导麻醉, 呈仰卧位固定于手术床上, 经口气管插管接呼吸机。

1.3.2 复制 VSD 模型 犬的胸廓区常规消毒、铺单, 经右胸 3、4 肋间切口进胸, 于右室游离壁经 6 F 动脉鞘管内芯缓慢送入钝头穿刺针, 经胸彩色 B 超 (彩超) 下使针尖指向室间隔, 穿过室间隔后有“落空感”, 鞘管内芯继续前送少许, 退出穿刺针, 经鞘管内芯送入导丝, B 超下可见导丝于左室内弯曲呈环, 犬

VSD 模型复制成功。通过彩超看 VSD 穿刺大小 (一般为 2 ~ 4 mm) 是否符合 VSD 模型要求。

1.3.3 植入 VSD 封堵器 沿制备模型实验中保留的导丝送入 7 F 小切口专用输送鞘管至左室内, 退出导丝及扩张鞘。封堵器 (腰长为 6 mm) 均由鼠齿钳推送杆负载送入输送鞘, 彩超观察下先后释放左室及右室盘面。观察 5 min 左右, 再次彩超确认封堵器未发生偏移、脱落、残余漏等, 止血后逐层关胸。

1.3.4 术后处理 实验当天抽取所有犬只血液送检血常规、凝血功能、C 反应蛋白、血沉及肝肾功能, 术后第 3 天复查, 处死前复查。

所有犬只术后由中南大学实验动物中心继续饲养。喂养环境保持温度 18 ~ 30℃, 湿度 40% ~ 50%, 每日喂食, 术后常规应用氨苄青霉素 3 d (0.5 g/d), 喂服阿司匹林肠溶片 5 mg/(kg·d), 直至处死。

术后第 3、6、9、12 和 24 个月分别随机取 3 只实验组犬和 2 只对照组犬再次实行全身麻醉, 经胸彩超评估实验组犬体内可吸收封堵器超声下影像表现, 然后予以推注 10% 氯化钾 50 ml, 待心脏停跳后取出心脏, 大体观察封堵器位置、形态及盘面组织覆盖情况。

1.3.5 体内吸收速率与内皮化速率测定 对所取实验组大体标本每个盘面各切两片, 一片进行 HE 染色, 制成病理学标本, 另一片用 CD34 (内皮细胞标志物) 进行免疫组织化学标记, 并采用 SP 法 (AEC 染色) 制成免疫组织化学切片。

在不同时间点 (第 1、3、6、9、12 和 24 个月) 的每组标本不同盘面 (A、B、C、D 面) 的病理学切片中各随机取 15 个点 (放大倍数 × 400), 测算其空泡面积, 以时间为横坐标, 空泡吸收率 (1 - 空泡面积 / 总面积 × 100%) 纵坐标, 画出体内吸收率变化曲线。

在不同时间点 (第 1、3、6、9、12 和 24 个月) 的每组标本不同盘面 (A、B、C、D 面) 的免疫组织化学切片中各随机取 15 个点 (放大倍数 × 400), 测算内皮细胞, 以时间为横坐标, 内皮化 (内皮细胞数 / 总细胞数 × 100%) 为纵坐标, 画出体内吸收率变化曲线。

1.3.6 生物毒性相关研究 术后处死犬只进行实验组和对照组对比, 比较两组心肌组织外观有无区别, 有无明显坏死灶, 并对肝脏、脾脏、肾脏、肺部进行外观比较。然后对其进行细胞形态学检测比较。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检

验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 封堵成功率

共对 17 只复制 VSD 模型的实验比格犬分别植入可吸收 VSD 封堵器, 均成功植入, 成功率为 100%。超声观测下记录、观察封堵器的位置、形态, 结果显示 17 只实验犬植入的可吸收 VSD 封堵器位置理想, 双侧盘面平整无移位(见图 1)。

2.2 术后一般状态

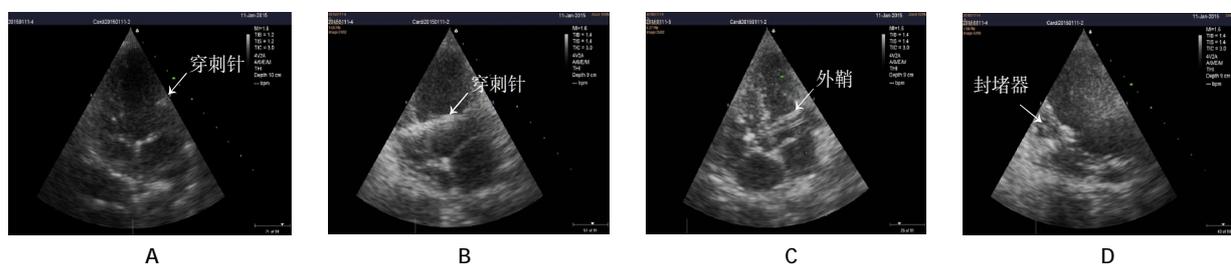
实验犬术后一般情况良好, 无死亡, 无并发症,

进食正常, 活动无异常, 无偏瘫, 无行为异常, 无肉眼血尿及黑便。实验组犬与对照组犬术后状态未见差异。术后血常规、C 反应蛋白除术后当天外, 差异无统计学意义, 肝肾功能、凝血功能、血沉差异无统计学意义。见附表。

2.3 大体解剖

实验组犬与对照组犬心脏大体标本无明显差别, 除实验组犬心脏封堵器处有薄层组织覆盖外, 两组均未见明显坏死组织及其他异常。

实验组可吸收 VSD 封堵器植入位置理想, 瓣膜均不受影响, 术后第 1 个月标本可见封堵器双侧盘



A: 穿刺针刺穿右室游离壁; B: 穿刺针刺穿室间隔; C: 外鞘扩张室间隔缺损; D: 封堵器成功封堵室间隔缺损

图 1 经胸超声介入下室间隔缺损封堵术

附表 两组术后生化结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	白细胞 / ($\times 10^9/L$)	红细胞 / ($\times 10^{12}/L$)	血小板 / ($\times 10^9/L$)	谷丙转氨酶 / (u/L)	谷草转氨酶 / (u/L)
术后当天					
实验组	21.15 ± 3.26	7.05 ± 2.17	756.16 ± 89.65	23.71 ± 18.65	32.17 ± 15.46
对照组	8.72 ± 4.58	8.04 ± 3.17	796.27 ± 95.46	32.53 ± 27.16	29.48 ± 12.95
t 值	3.629	-0.340	-0.480	-0.442	0.201
P 值	0.018	0.378	0.332	0.344	0.427
术后第 3 天					
实验组	12.89 ± 4.29	7.68 ± 2.26	752.75 ± 87.15	24.19 ± 15.96	33.15 ± 16.73
对照组	8.96 ± 4.87	8.16 ± 4.18	789.25 ± 102.47	33.09 ± 21.65	28.15 ± 11.53
t 值	0.958	-0.173	-0.432	-0.540	0.360
P 值	0.204	0.437	0.347	0.313	0.371
术后 3 个月					
实验组	9.17 ± 2.96	7.97 ± 1.85	769.37 ± 92.37	25.81 ± 17.54	33.04 ± 17.09
对照组	8.84 ± 3.75	7.63 ± 3.81	762.14 ± 91.03	24.22 ± 19.50	31.78 ± 16.03
t 值	0.111	0.140	0.086	0.096	0.082
P 值	0.459	0.449	0.468	0.465	0.470
术后 6 个月					
实验组	9.01 ± 3.57	8.80 ± 2.69	742.15 ± 113.96	25.13 ± 15.70	30.33 ± 15.98
对照组	8.82 ± 4.21	8.09 ± 3.01	769.26 ± 106.39	27.09 ± 20.19	30.86 ± 15.20
t 值	0.055	0.278	-0.266	-0.124	-0.037
P 值	0.480	0.400	0.404	0.455	0.486
术后 9 个月					
实验组	7.99 ± 5.20	7.56 ± 3.84	749.28 ± 121.77	26.67 ± 14.92	32.06 ± 14.71
对照组	8.29 ± 3.96	8.14 ± 4.02	751.02 ± 109.35	29.83 ± 14.65	33.13 ± 18.63
t 值	-0.068	-0.163	-0.162	-0.233	-0.073
P 值	0.475	0.440	0.494	0.415	0.473

续附表

组别	尿素氮/(mmol/L)	肌酐/(μ mol/L)	凝血酶原时间/s	C 反应蛋白/(mg/L)	血沉/(mm/h)
术后当天					
实验组	5.27 ± 3.24	72.18 ± 21.96	8.56 ± 1.45	42.87 ± 14.62	12.04 ± 2.62
对照组	6.21 ± 4.10	75.89 ± 14.75	8.32 ± 1.76	4.16 ± 2.18	12.50 ± 3.17
t 值	-0.290	-0.205	0.169	3.538	-0.179
P 值	0.395	0.425	0.438	0.020#	0.435
术后第 3 天					
实验组	5.79 ± 3.89	73.25 ± 24.80	8.49 ± 1.52	10.71 ± 5.82	13.56 ± 3.31
对照组	6.26 ± 5.70	76.32 ± 15.12	8.14 ± 1.79	4.26 ± 3.01	11.92 ± 4.11
t 值	-0.113	-0.153	0.237	1.396	0.500
P 值	0.459	0.444	0.414	0.128	0.326
术后 3 个月					
实验组	5.34 ± 4.82	72.75 ± 16.10	8.39 ± 1.62	5.03 ± 3.21	13.09 ± 3.70
对照组	5.48 ± 2.89	74.10 ± 20.94	8.83 ± 2.03	4.84 ± 2.04	14.20 ± 4.91
t 值	-0.036	-0.083	-0.273	0.072	-0.294
P 值	0.489	0.470	0.401	0.473	0.394
术后 6 个月					
实验组	6.34 ± 3.59	75.03 ± 19.56	8.89 ± 3.19	4.37 ± 3.96	12.09 ± 2.10
对照组	6.09 ± 4.14	74.52 ± 23.33	8.52 ± 1.98	4.55 ± 4.10	15.82 ± 6.19
t 值	0.072	0.027	0.142	-0.049	-1.031
P 值	0.473	0.490	0.448	0.482	0.189
术后 9 个月					
实验组	5.93 ± 3.07	74.29 ± 19.42	8.26 ± 2.51	4.39 ± 2.96	14.10 ± 3.62
对照组	5.85 ± 4.02	75.06 ± 20.10	8.72 ± 3.05	4.06 ± 3.17	12.70 ± 2.82
t 值	0.026	-0.043	0.432	0.119	0.454
P 值	0.491	0.484	0.432	0.456	0.340

面均有一薄层透亮组织覆盖,盘面边缘部分与周围组织融合,无血栓和赘生物,术后第 3、6 个月,标本显示封堵器双侧盘面上覆盖的组织逐渐增厚,手感封堵器 PDO 丝变脆,其左侧盘面结构平整,腱索与盘面无黏连,盘面均未发现血栓,术后第 12 个月封堵器 PDO 丝进一步变脆,并逐渐柔软,大部分被吸收(见图 2)。封堵器在超声下声像在第 3 个月时最强,第 12 个月时最弱,几乎难以在超声下看到(见图 3),说明封堵器随着时间逐渐被吸收。

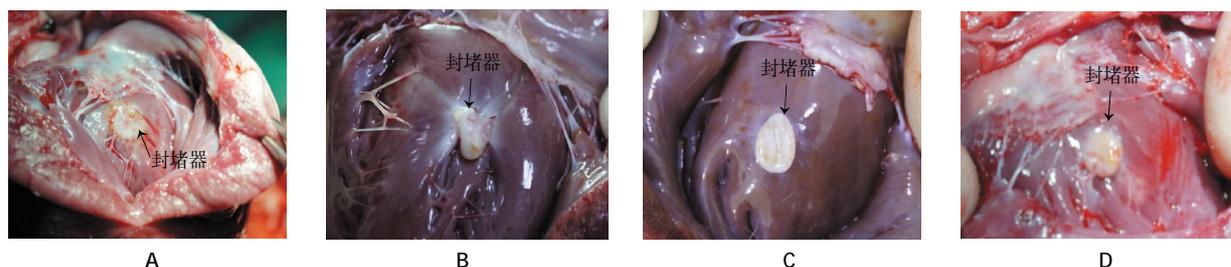
2.4 其他重要脏器

心脏、肝、脾、肺、双肾等大体标本观察未见异

常,实验组犬与对照组犬未见差异。

2.5 病理组织学检查结果

两组犬只心脏、肝、脾、肺、双肾细胞形态学差异无统计学意义。取出实验组大体标本后本研究按上述方法进行分组对封堵器表面组织各个盘面组织行光镜组织学检查。封堵器表面被纤维组织和其表面的内皮细胞覆盖,可见少量慢性炎症细胞存在。经染色,封堵器双侧盘面组织覆盖情况无明显差异。封堵器在第 3 个月还可见较为完整的封堵器晶体,第 6 个月晶体逐渐破碎,第 9 个月晶体空隙逐渐被填满,第 12 个月组织逐渐规则排列于晶体空隙中(见图 4)。

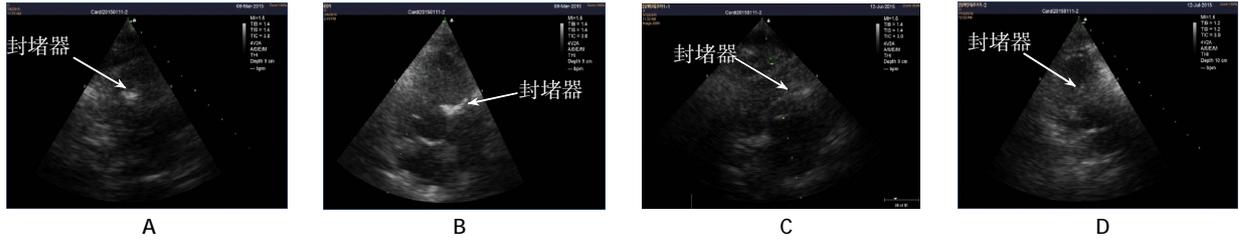


A: 第 3 个月; B: 第 6 个月; C: 第 9 个月; D: 第 12 个月

图 2 不同时期右室面大体观

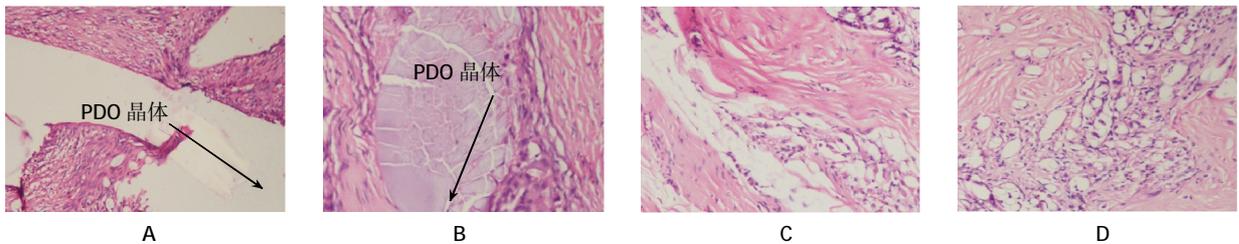
2.6 免疫组织化学检查结果

取出实验组大体标本后本研究按上述方法进行分组对封堵器表面组织各个盘面组织行免疫组织化学检查。可见封堵器表面组织在第 3 个月上皮细胞(红色为上皮细胞,蓝色为其他细胞细胞核)已经大量覆盖,第 6 个月逐渐增多,第 12 个月基本全部被上皮组织覆盖,并可见新生血管组织。见图 5。



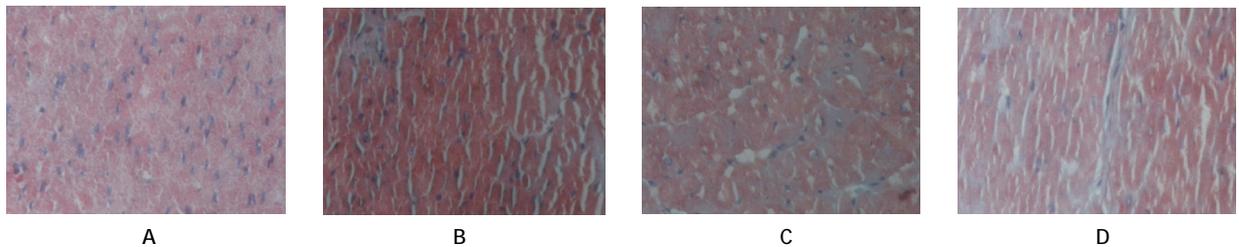
A:第3个月;B:第6个月;C:第9个月;D:第12个月

图 3 封堵器在不同时期超声下影像



A:第3个月;B:第6个月;C:第9个月;D:第12个月

图 4 病理组织学检查结果 (×100)



A:第3个月;B:第6个月;C:第9个月;D:第12个月

图 5 免疫组织化学检查结果 (×400)

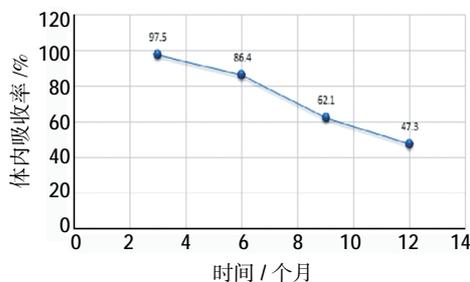


图 6 可吸收封堵器体内吸收率

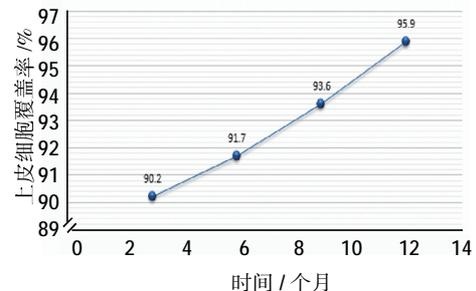


图 7 可吸收封堵器体内上皮细胞覆盖率

3 讨论

VSD 的传统治疗方法为体外循环下心内直视手术修补,但由于其创伤大、体外循环辅助相关并发症多、需要输血等^[4-5]无可避免的缺点,越来越多的

2.7 体内吸收速率与内皮化速率

实验组封堵器在第 3 个月已经开始被逐渐裂解,但吸收率不高,第 3 个月封堵器开始裂解,第 12 个月吸收率增高(47.3%)。见图 6。

封堵器在第 3 个月上皮细胞已大量覆盖(90.2%),第 6 个月进一步增多,第 12 个月基本全部被上皮组织覆盖(95.9%)。见图 7。

心脏科医师开始寻求更微创的治疗方式,1998 年 AMPLATZER 封堵器的问世使室间隔缺损的介入治疗成为可能,而室间隔缺损的介入治疗一直以来便是结构性心脏病治疗领域的一大争议以及难题,美

国 FDA 由于镍钛合金的远期并发症率过高一直未批准其应用于室间隔缺损^[2],可吸收性室间隔缺损封堵器被认为可以避免远期并发症,因此也成为国内外研究热点之一^[6-9]。本研究中可吸收封堵器所采用的制备材料 PDO、PLA 和 PGA 均已在临床应用于可吸收缝线^[10]、外科修补补片^[11]和呼吸道修复^[12]中,已被证明具有良好的安全性能和可吸收性。

文献报道^[6-9]对可吸收封堵器的介入路径采取的是经皮介入治疗,但是可吸收封堵器的弹性恢复能力较镍钛记忆合金差,而经皮介入路径长,且释放回收等操作较复杂,因此并未取得很好的实验效果。随着介入治疗的发展,一种新型的介入治疗方式——食管超声下经胸介入治疗开始出现^[13],该方式主要是通过食管超声的引导,在胸前小切口内,通过心脏表面直接将封堵器置入心脏内,从而达到封堵缺损的目的,该方式具有路径短、路径垂直于缺损、操作易掌握等优点^[14-15]。

本研究对 PDO、PLA 和 PGA 制成的可吸收室间隔缺损封堵器进行动物实验研究,利用食道超声下经胸介入路径成功将所有封堵器置入实验用犬体内,且封堵效果满意。所有生化检验结果除术后当天白细胞和 C 反应蛋白两组有差异外,其余均无差异,可见白细胞与 C 反应蛋白为术后正常反应性增高,封堵器置入无明显毒副作用。整个实验过程期间,无 1 例死亡,无栓塞、三度房室传导阻滞等严重并发症,所有实验用犬术后均恢复良好,组织学检查也证明其吸收率及上皮细胞覆盖率均令人满意,既没有出现吸收过快室间隔缺损再通的现象,也没有出现不吸收的情况。另还有 5 只实验用犬有待第 18 个月和第 24 个月制成标本,进一步研究观察,补充数据。

尽管本次研究实验结果令人满意,但是由于复制的室间隔缺损模型室缺直径较小,并且为即刻置入封堵器,损伤后的炎症反应较重,未能完全模拟临床病情,因此该封堵器的有效性和安全性仍有待进一步人体实验。

综上所述,尽管可吸收室间隔缺损封堵器仍需要进一步的临床研究,但是本研究证明该封堵器设计科学合理、操作简便,具有很好的生物相容性,其内皮化完全且迅速,并发症少,可有效地封堵 VSD,具有良好的临床安全性应用前景。

参 考 文 献:

- [1] HOFFMAN J I, KAPLAN S. The incidence of congenital heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [2] BACHA E. New procedures, new complications, and new strategies to deal with them[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 149(2): 531.
- [3] HU S, YANG Y, WU Q, et al. Surgical treatment for patients with complete atrioventricular block after device closure of perimembranous ventricular septal defects[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 149(2): 530-531.
- [4] DOENST T, BORGER M A, WEISEL R D, et al. Relation between aortic cross-clamp time and mortality-not as straightforward as expected[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 33(4): 660-665.
- [5] HOGUE C W, PALIN C A, ARROWSMITH J E. Cardiopulmonary bypass management and neurologic outcomes: an evidence-based appraisal of current practices[J]. *Anesth Analg*, 2006, 103(1): 21-37.
- [6] HUANG X M, ZHU Y F, CAO J, et al. Development and pre-clinical evaluation of a biodegradable ventricular septal defect occluder[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2013, 81(2): 324-330.
- [7] 朱玉峰, 陈文瑶, 黄新苗, 等. 生物可吸收室间隔缺损封堵器的体外降解和力学性能[J]. *第二军医大学学报*, 2013(6): 660-665.
- [8] 朱玉峰, 王贵明, 黄新苗, 等. 生物可吸收心脏间隔缺损封堵器的生物相容性研究[J]. *介入放射学杂志*, 2013(9): 756-760.
- [9] MULLEN M J, DEVELLIAN C A, JUX C. Bio STAR bioabsorbable septal repair implant[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2007, 4(6): 781-792.
- [10] INOTSUME-KOJIMA Y, UCHIDA T, ABE M, et al. A combination of subcuticular sutures and a drain for skin closure reduces wound complications in obese women undergoing surgery using vertical incisions[J]. *J Hosp Infect*, 2011, 77(2): 162-165.
- [11] CHIA H L, RASHEED M Z, ONG K K, et al. Repair of ectopia cordis using a resorbable poly-L-lactic-polyglycolic acid plate in a patient with pentalogy of cantrell[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(6): e1-4.
- [12] VONDRYS D, ELLIOTT M J, MCLAREN C A, et al. First experience with biodegradable airway stents in children[J]. *Ann Thorac Surg*, 2011, 92(5): 1870-1874.
- [13] AMIN Z, DANFORD D A, LOF J, et al. Intraoperative device closure of perimembranous ventricular septal defects without cardiopulmonary bypass: preliminary results with the perventricular technique[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 127(1): 234-241.
- [14] LIU L, ZHAO T L, YANG Y F, et al. Intraoperative device closure of subaortic ventricular septal defects[J]. *J Card Surg*, 2013, 28(4): 456-460.
- [15] HU S, YANG Y, WU Q, et al. Results of two different approaches to closure of subaortic ventricular septal defects in children[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46(4): 648-653.

(张蕾 编辑)