

## • 实验研究 Experimental research •

生物可吸收心脏间隔缺损封堵器的  
生物相容性研究

朱玉峰, 王贵明, 黄新苗, 张建鹏, 陈翔, 吴弘,  
张瑾, 秦永文, 赵仙先

**【摘要】 目的** 对自主研发的生物可吸收房间隔缺损封堵器和室间隔缺损封堵器进行体外毒性实验和肌肉内植入实验,评价可吸收心脏间隔缺损封堵器的生物相容性。**方法** 可吸收心脏间隔缺损封堵器的制作材料为聚对二氧环己酮(PDO)丝、聚左旋乳酸(PLA)无纺布、聚乙醇酸(PGA)缝线。将小鼠成纤维细胞瘤细胞(L-929 细胞)与可吸收封堵器盘片共培养 7 d,观察细胞生长情况,并采用四甲基偶氮唑盐比色法定量测试可吸收封堵器的细胞毒性。在 SD 大鼠背部肌肉内植入封堵器盘片,检测封堵的组织相容性。**结果** ① 细胞毒性:封堵材料对细胞的贴壁、增殖无明显影响,培养上清液对细胞毒性为 0 或 1 级。② 组织相容性:封堵器盘片植入 SD 大鼠背部肌肉后 1~2 周,组织病理检查可见 PDO 和 PLA 丝周围有大量成纤维细胞及炎性细胞浸润。4 周时炎性细胞显著减少,可见较多的纤维结缔组织,6~8 周时周围有较丰富的胶原纤维,可见较多的多核巨细胞,12 周时可见 PDO 和 PLA 丝明显降解,周围新生血管形成。**结论** 采用可降解高分子聚合材料制作的生物可吸收心脏间隔缺损封堵器具有良好的生物相容性。

**【关键词】** 先天性心脏病;生物可吸收;生物相容性;封堵器;实验研究

中图分类号:R541.1 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-09-0756-05

**Experimental study of the biocompatibility of a self-made bio-absorbable occluder used for cardiac septal defect** ZHU Yu-feng, WANG Gui-ming, HUANG Xin-miao, ZHANG Jian-peng, CHEN Xiang, WU Hong, ZHANG Jin, QIN Yong-wen, ZHAO Xian-xian. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: QIN Yong-wen, E-mail: ywqin1@citiz.net

**【Abstract】 Objective** To evaluate the biocompatibility of a self-made ASD occluder and VSD occluder made from bio-absorbable materials through implanting it in the muscles of SD rats and determining its toxicity in vitro. **Methods** The materials for self-made cardiac occluder included polydioxanone (PDO), poly-L-lactic acid (PLA) and polyglycolic acid (PGA) sutures. L-929 cells of rats were co-cultured with bio-absorbable occluder disk samples for 7 days, and the cell culture medium was assessed by MTT assay to determine the cytotoxicity of the bio-absorbable occluder. The occluder disk samples were implanted into the dorsal muscles of SD rats to test its histocompatibility. **Results** (1) Cell toxicity test. L-929 cells and the occluder discs were co-cultured for 7 days, and no significant effect on the cell adhesion and proliferation was found. The cytotoxicity of different concentrations of the culture medium supernatant was 0 or 1 grade determined by MTT colorimetric assay. (2) Histocompatibility. One to two weeks after the implantation of occluder discs into the dorsal muscles of SD rats, histological examination showed that infiltration of abundant

fibroblasts and inflammatory cells was seen around the PDO and PLA wires. Inflammatory cells were significantly reduced after 4 weeks. Abundant collagen fibers and multinuclear giant cells were found after 6 to 8 weeks. PDO and PLA filament degradation with neighboring new vascularization was seen at the 12th week.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170150);上海市科委医学引导基金资助项目(10411960200)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.09.013

作者单位:200433 上海 第二军医大学长海医院心内科(朱玉峰、黄新苗、陈翔、吴弘、秦永文、赵仙先),基础部分子生物学教研室(张建鹏);广东省第二人民医院病理科(王贵明);上海锦葵医疗器械有限公司研发部(张瑾)

通信作者:秦永文 E-mail: ywqin@citiz.net

**Conclusion** The bio-absorbable cardiac septal defect occluder made from degradable macromolecule polymer carries excellent biocompatibility. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 756-760)

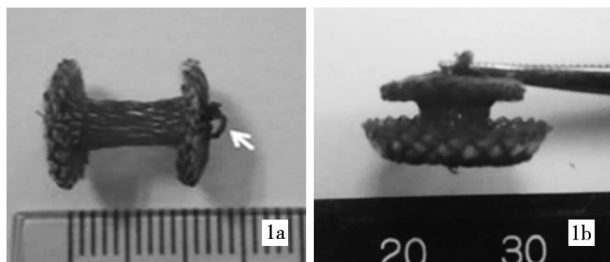
**[Key words]** congenital heart disease; biodegradation; biocompatibility; occluder; experimental study

封堵器植入体内后,缺损周围的组织向内生长并完成内皮化,封堵器的作用在于为心脏的自身修复提供一座临时“桥梁”。当缺损被自身结缔组织和内皮细胞牢固覆盖时,封堵器就失去了存在价值,因此研制可吸收心脏间隔缺损封堵器有着重要意义,可使缺损完全由自身组织修复,并消除封堵器永久存留体内造成潜在的远期并发症。在进行可吸收心脏间隔缺损封堵器的动物实验之前,必须评价其生物相容性,以了解其是否满足植入物的要求。本研究采用心脏间隔缺损封堵器的制作材料编制成的封堵器一侧盘片样结构,进行体外细胞毒性实验和 SD 大鼠体内植入法评价其生物相容性,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞毒性实验

可吸收心脏间隔缺损封堵器(图 1)的制作材料为聚对二氧环己酮(polydioxanone, PDO)丝、聚左旋乳酸(poly-L-lactic acid, PLA)无纺布、聚乙醇酸(polyglycolic acid, PGA)缝线,形状呈由一腰部链接的双盘状外观,双侧盘片为平整圆形,右侧面留有环形襻,供输送系统钳夹输送,盘片上对称部位缝上的金属钽颗粒可作为 X 线下显影标记。



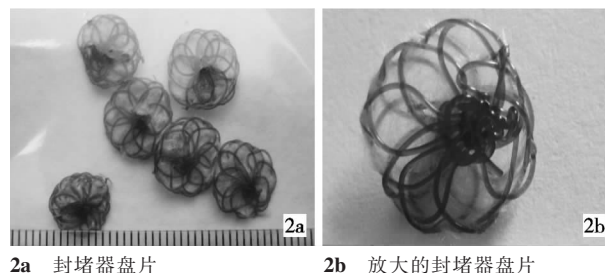
**1a** 室间隔缺损封堵器,白色箭**1b** 房间隔缺损封堵器,镊子挑头为供输送系统钳夹的环形小襻 起部分为供输送系统钳夹的环形小襻

**图 1** 心脏间隔缺损封堵器

采用相同材料制作封堵器盘片样结构(图 2)作为本研究的样品。在 6 孔培养板中放入灭菌后的封堵器盘片,将 L-929 细胞悬液浓度调整为  $1.9 \times 10^4$  /ml,每孔加 3 ml,设样品孔 3 个,空白孔 3 个,观察 1 ~ 7 d 细胞生长形态特征。另制备 L-929 细胞悬液  $1.9 \times 10^7$  /L,接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l,置 37℃、

5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。取 6 孔板中的培养液上清,以不同浓度(100%、80%、60%、40%、20%、0)加入到 96 孔板中(交换孔中培养液),每孔 100  $\mu$ l,每组 5 孔。置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2、4、7 d 后。每孔加入 5 mg/ml 的四甲基偶氮唑盐(MTT)50  $\mu$ l,继续培养 2 h 后弃原培养液,PBS 液洗 3 次,加入 DMSO 150  $\mu$ l/孔,室温轻度振荡 15 min,在波长 492 nm 处测吸光度(A)值,参考波长为 540 nm。

细胞相对增值率(RGR) = 实验组平均 A 值/阴性对照组平均 A 值  $\times 100\%$ ,并根据《GB/T 16175 2008,医用有机硅材料生物评价试验方法》中的细胞 RGR 与细胞毒性的分级关系评定细胞毒性。RGR  $\geq 100\%$  为 0 级,80% ~ 99% 为 1 级,50% ~ 79% 为 2 级,30% ~ 49% 为 3 级,0% ~ 29% 为 4 级,0 级和 1 级符合生物植入材料要求。



**图 2** 消毒备用的封堵器盘片

### 1.2 组织相容性实验

取与体外细胞毒性检测相同的封堵器盘片(图 2)备用。选用 SD 大鼠共 18 只,用 10%水合氯醛麻醉后俯卧于小动物手术台上,四肢用细绳固定,背部剃毛,聚维酮碘消毒背部皮肤,铺无菌洞巾,沿背部脊柱右侧切开皮肤和皮下组织,用自制的钝头不锈钢针沿背部肌肉深筋膜层表面向脊柱旁作潜行分离。切开深筋膜层,钝性分离肌层,形成 2.5 cm  $\times$  1.5 cm 大小植入床,埋入可吸收心脏室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)封堵器盘片,用 0 号线缝合肌层和深筋膜层表面,关闭皮肤切口,不包扎,喂养(图 3),观察大鼠一般状况,并分别于术后 1、2、4、6、8、12 周,随机抽选 3 只实验大鼠处死,取皮下埋藏的封堵器盘片及周围附着组织,10%甲醛溶液固定 48 h 后,石蜡包埋,每张蜡块连续作 5 张切片,行 HE 染色,光镜下观察炎性反应,周围组织



3a 切开背部脊柱旁肌肉

3b 钝性分离肌肉层, 形成 2.5 cm × 1.5 cm 大小植入床, 埋入封堵器盘片

3c 缝合肌肉层

3d 缝合皮肤

图 3 皮下埋植盘片手术过程

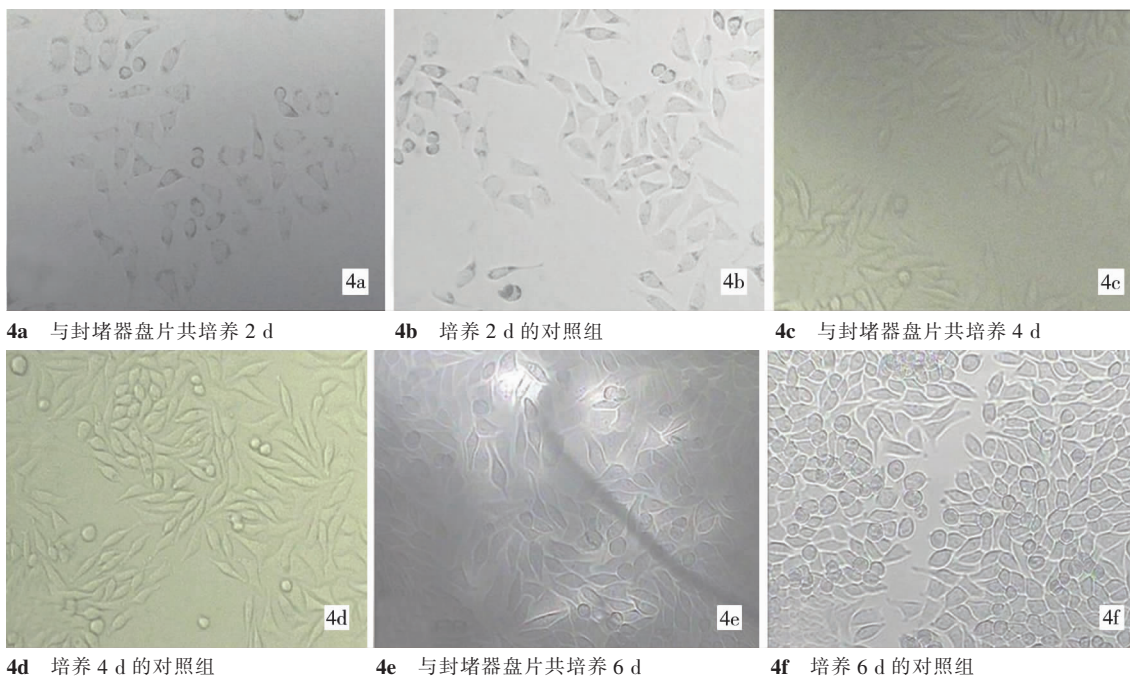
增生情况及材料降解情况等。

## 2 结果

### 2.1 细胞毒性实验结果

2.1.1 细胞形态学观察 L-929 细胞与可吸收 VSD 封堵器盘片共同培养 2 d, 封堵器下方及其周围细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞质内有离散颗粒, 无

细胞溶解(图 4a)。培养 4 d, 出现极少数漂浮并呈圆形细胞, 其他贴壁生长良好, 无细胞溶解(图 4c)。培养 6 d, 封堵器下方及其周围有 10% 的细胞呈圆形, 并漂浮于封堵器上或细胞培养液中, 其他细胞贴壁生长良好, 偶见细胞溶解(图 4e)。与未加封堵器盘片培养的对照组比较(图 4b、4d、4f), 封堵器盘片对共培养的 L-929 细胞的贴壁、增殖无明显影响。



4a 与封堵器盘片共培养 2 d

4b 培养 2 d 的对照组

4c 与封堵器盘片共培养 4 d

4d 培养 4 d 的对照组

4e 与封堵器盘片共培养 6 d

4f 培养 6 d 的对照组

图 4 倒置显微镜观察与封堵器盘片共培养后 L-929 细胞的形态学变化(× 100)

2.1.2 MTT 比色法检测 封堵器盘片与 L-929 共培养 7 d 后(对照组未放封堵器, 同样条件培养), 用不同浓度的培养液上清于 96 孔板中继续培养细胞。MTT 检测不同浓度、不同培养天数 L-929 的相对增值率(RGR), 进而根据 RGR 进行毒性分级。从表 1 可见, 2 d 实验组中, 100% 浓度的培养上液清

对细胞的毒性分级为 1 级, 该浓度以下培养上清液在培养 2 d 时均对细胞的毒性分级为 0 级; 在培养 4 d 和 7 d 实验组, 共培养液各浓度对细胞毒性分级均为 1 级。其中 0% 浓度实验组为新鲜培养液, 在 2 d 和 4 d 时的毒性分级为 0 级, 7 d 时为 1 级。

### 2.2 组织相容性结果

表 1 MTT 检测结果及毒性分级

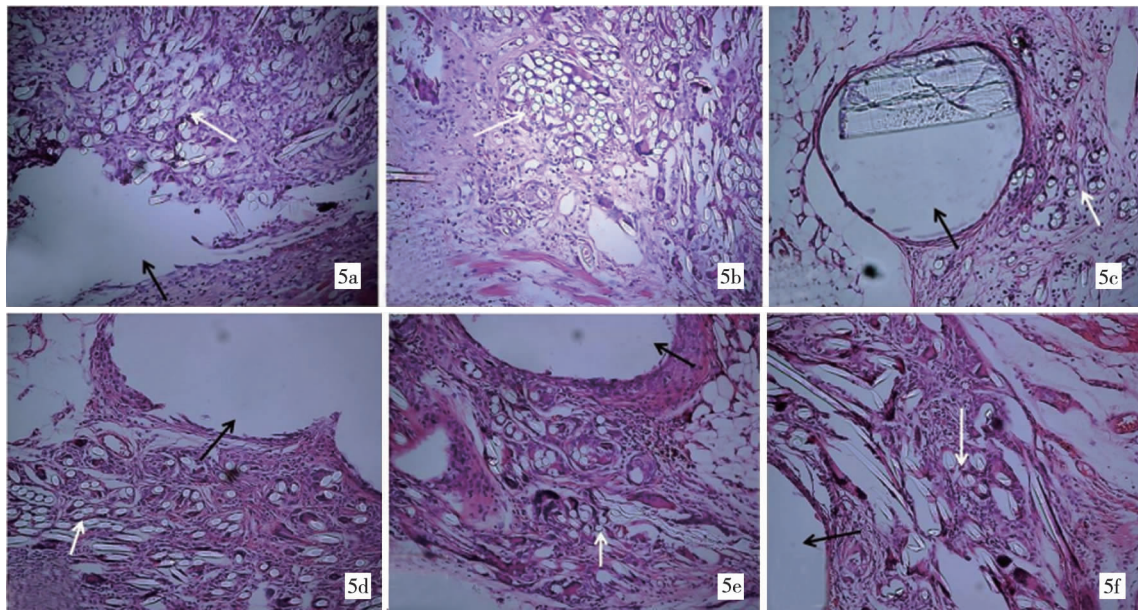
| 浓度   | A 值           |               |               | RGR(%) |        |        | 毒性分级 |     |     |
|------|---------------|---------------|---------------|--------|--------|--------|------|-----|-----|
|      | 2 d           | 4 d           | 7 d           | 2 d    | 4 d    | 7 d    | 2 d  | 4 d | 7 d |
| 100% | 0.151 ± 0.055 | 0.329 ± 0.039 | 0.341 ± 0.068 | 82.40  | 81.21  | 95.05  | 1    | 1   | 1   |
| 80%  | 0.249 ± 0.056 | 0.702 ± 0.120 | 0.717 ± 0.111 | 121.62 | 93.13  | 102.01 | 0    | 1   | 0   |
| 60%  | 0.222 ± 0.036 | 0.761 ± 0.128 | 0.685 ± 0.053 | 117.75 | 83.26  | 95.17  | 0    | 1   | 1   |
| 40%  | 0.219 ± 0.024 | 0.609 ± 0.100 | 0.879 ± 0.118 | 108.63 | 84.33  | 97.80  | 0    | 1   | 1   |
| 20%  | 0.308 ± 0.018 | 0.670 ± 0.044 | 0.994 ± 0.053 | 119.27 | 86.69  | 96.76  | 0    | 1   | 1   |
| 0%   | 0.259 ± 0.040 | 0.515 ± 0.582 | 1.088 ± 0.073 | 107.55 | 102.38 | 93.35  | 0    | 0   | 1   |

2.1.1 大鼠一般情况 所有实验动物术后活动正常,进食好,切口无红肿、积液、感染、坏死或窦道形成,均一期愈合。

2.1.2 解剖标本肉眼大体观察 术后 1 周,盘片周围组织可见充血、水肿,无脓肿及坏死,周围新生组织开始包裹盘片,PDO 网材及 PLA 膜清晰可见,颜色未见明显变化。植入后 2 ~ 4 周,材料被周围新生的纤维组织紧密包裹,可见新生组织长入并穿透网材间隙,与网材融为一体,包裹其中的 PDO 网材及 PLA 膜清晰可见,颜色变淡。植入后 6 ~ 8 周,新生组织进一步包裹并与盘片融合,包裹其中的 PDO 丝

材尚可辨认,网状结构保持完好,颜色进一步变淡。植入后 10 ~ 12 周,新生组织与网材结合更加紧密,包裹其中的网材料隐约可见。

2.1.3 组织病理学所见 植入后 1 ~ 2 周,光镜下可见 PDO 和 PLA 丝周围有大量成纤维细胞及炎性细胞浸润。4 周时炎性细胞显著减少,PDO 和 PLA 丝周围可见较多的纤维结缔组织。6 ~ 8 周时 PDO 和 PLA 丝周围有较丰富的胶原纤维及新生血管,可见较多的多核巨细胞。12 周时可见 PDO 和 PLA 丝明显降解,周围新生血管形成(图 5)。



5a ~ 5f 分别为植入后 1、2、4、6、8、12 周(黑色箭头示 PDO 丝材,白色箭头示降解不完全的 PLA 颗粒)

图 5 封堵器盘片植入 SD 大鼠体内后各个时期病理检查所见(HE,× 200)

### 3 讨论

生物材料在应用于人体之前,除临床应用所要求的机械及理化性能外,还应具备良好的生物相容性,包括组织相容性和细胞相容性。制作可吸收心脏间隔缺损封堵器所用的 PDO、PLA 和 PGA 材料在临床上一直被用于可吸收手术缝线、外科补片、呼吸管道的修复等,具有良好的生物相容性<sup>[1-3]</sup>。在国际标准化组织发布的 ISO 10993 医疗器械生物学

评价系列标准中,细胞培养法和皮下植入法是植入材料最常用的组织相容性评价方法<sup>[4-6]</sup>。

L-929 细胞具有传代稳定、繁殖迅速、体外培养条件低、能为许多材料细胞毒性所共用等优点,成为体外细胞毒性实验中应用最广泛的细胞。MTT 比色法定量检测植入材料的细胞毒性,对受试材料溶出物的毒性检测敏感度高,是一种较好的体外评价生物材料细胞毒性的研究方法。本实验采用 L-929 细胞和封堵器盘片共培养方法检测封堵器的细胞

相容性,结果显示封堵材料对细胞增殖无明显影响,MTT 法检测培养上清对细胞无明显毒性,具有良好的细胞相容性。

体内组织相容性实验是将材料试样植入动物皮下或肌肉组织内,经一定时间后,根据组织反应评价材料的组织学毒性,同时可以观察可降解材料在体内的吸收代谢过程<sup>[7]</sup>。植入的生物材料被机体组织包裹是生物体对异物材料较温和的反应形式,包括早期的炎性反应和随后的纤维增生反应。早期炎性反应在 1 周左右达到高峰,2 周后逐渐消退并继发增生反应。纤维囊壁为异物进入受试机体引起机体对异物包裹的病理过程,这一过程持续的长短和反应程度常与材料的自身性质有关,能较好的反映材料的生物相容性。对于可降解高分子材料而言,除了炎性反应的逐步减轻以外,还有一个逐步降解的过程。其降解机制主要有两种,一是化学降解,主要指聚合物主链受水作用,酯键水解断裂,导致相对分子质量降低,这一期间主要是发生急性炎性反应,表现为淋巴细胞、中性粒细胞、多核巨细胞的增多和局部聚集,随后,成纤维细胞增生并分泌胶原纤维将材料包裹,并伴有毛细血管长入。二是生物降解,又称生物侵蚀,即聚合物主链酯键受水解作用断裂以后,成为小碎片直至小颗粒,随着时间延长,炎性细胞逐渐减少,纤维组织持续增生并填充封堵器网材空隙内,与材料溶为一体,动物体内的各种酶、吞噬细胞及微生物会逐渐溶解、消化、吞噬这些微小颗粒。最后完全代谢排出体外。当然这两种降解过程不是绝对分开的,但各个时期各有侧重。

本研究结果表明,植入后 1~2 周,缝有 PLA 膜的 PDO 盘片被周围组织包裹,纤维结缔组织长入、填充网孔,其周围可见大量成纤维细胞及新生毛细血管,组织疏松、水肿伴多核巨细胞、中性粒细胞及淋巴细胞等浸润,主要表现为急性炎性反应,而材料结构完整,无明显降解。4~8 周组织水肿减轻,PDO 和 PLA 膜开始降解成圆形或类圆形小碎片,降解碎片由成纤维细胞、纤维细胞围绕,周围有较丰富胶原纤维及毛细血管,炎性细胞减少,仍可见较多多核巨细胞浸润。12 周时 PDO 单丝纤维被纤维组织紧密包裹,发生部分降解,材料碎裂,聚乳酸碎裂为小圆形碎片,植入部位可见少量浆细胞、异物巨噬细胞和吞噬细胞。表明炎性反应进一步减轻。随访至 3 个月,炎性反应逐渐减轻,未见组织变性、坏死或肉芽肿异常增生现象,未见对周围组织产生的不良刺激和异物反应,显示了 PDO、PLA 及

PGA 材料具有良好的组织相容性。本实验结果与 Kontio 等<sup>[8]</sup>报道的 PDO 血管支架的组织相容性研究结果一致,显示了 PDO 材料良好的组织相容性。

根据既往先天性心脏病介入治疗经验,封堵器表面完成内皮化一般需要 3 个月,所以,本研究也对 SD 大鼠肌肉植入实验随访了 3 个月。结果表明,由 PDO、PLA 无纺布经 PGA 可吸收缝线缝制的封堵器盘片组织反应轻,对细胞形态、生长代谢和增殖不构成损害,未对周围组织产生不良刺激。而细胞培养显示,由 PDO、PLA 及 PGA 制作的封堵器盘片细胞毒性轻微,说明该生物可吸收封堵器可满足体内植入材料的要求,事实上,我们在完成封堵器的生物相容性测试之后,已经成功进行了经导管封堵心脏间隔缺损动物模型的实验研究<sup>[9-10]</sup>。

#### [参 考 文 献]

- [1] Vondrys D, Elliott MJ, McLaren CA, et al. First experience with biodegradable airway stents in children [J]. *Ann Thorac Surg*, 2011, 92: 1870 - 1874.
- [2] 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: 162 - 165.
- [3] Chia HL, Rasheed MZ, Ong KK, 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: e1 - e4.
- [4] 韩 蓉, 刘彦斌, 张同成, 等. 生物医用材料的生物相容性评价[J]. *苏州大学学报: 医学版*, 2010, 30: 773 - 776.
- [5] ISO10993(ISO/Tc194): Biological evaluation of medical devices [S].
- [6] ISO10993-6:1994(GB/T 16886.6-1997)植入后局部反应实验 [S].
- [7] 董 生, 袁 正, 吴胜伟, 等. 碳纳米管-聚氨酯复合膜的力学特性及生物相容性初步研究 [J]. *介入放射学杂志*, 2011, 20: 127 - 130.
- [8] Kontio R, Ruuttila P, Lindroos L, et al. Biodegradable polydioxanone and poly (l/d)lactide implants: an experimental study on peri-implant tissue response [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2005, 34: 766 - 776.
- [9] Zhu YF, Huang XM, Cao J, et al. Animal experimental study of the fully biodegradable atrial septal defect (ASD) occluder[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 735989.
- [10] Huang XM, Zhu YF, Cao J, et al. Development and preclinical evaluation of a biodegradable ventricular septal defect occluder [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2013, 81: 324 - 330.

(收稿日期:2013-03-12)

(本文编辑:侯虹鲁)