

## 合成人工血管细胞毒性的比较

### COMPARISON OF CYTOTOXICITY OF VASCULAR PROSTHESES *IN VITRO*

---

目的：研究并比较用于动脉重建手术的主要合成假体的细胞毒性，包括聚四氟乙烯（PTFE）和聚对苯二甲酸乙二醇酯（涤纶）。

**材料与方法。**在人脐静脉内皮细胞（英文：human umbilical vein endothelial cells, HUVEC）培养 3 代中，进行了 MTS 检测，用于实验室研究，利用细胞技术研究药物和医疗器械的细胞毒性。测试涉及使用 MTS 试剂，即 3-(4,5-二甲基噻唑 2-基)-5-(3-羧基甲氧基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑；此外，还使用了吩嗪硫酸甲酯（PMS），其起到了电子结合试剂的作用。在实验中，细胞与聚四氟乙烯和涤纶在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 含量下孵育 24 小时。在标准生长培养基中培养人脐静脉内皮细胞作为对照。经吩嗪硫酸甲酯存在时，内皮细胞线粒体脱氢酶将 MTS 降低为甲瓩，其中有蓝色染色。使用 Stat Fax3200 分析仪（microplate reader）Awareness technology Inc. Palm City Fl.（美国）进行细胞培养上清液光热测定。

**结果。**涤纶组光密度的最低平均值平均为 0.21（0.20-0.22）个光密度单位，对照组平均光密度最高，为 0.36（0.35-0.38）个光密度单位；聚四氟乙烯组指标为 0.35（0.33-0.36）。实验组比较，对照组与涤纶（ $p < 0.001$ ）、对照组与聚四氟乙烯（ $p = 0.037$ ）、涤纶与聚四氟乙烯（ $p < 0.001$ ）差异有统计学意义。与对照组相比，涤纶潜伏期导致细胞代谢活性下降 41.7%（ $p < 0.001$ ）。暴露于聚四氟乙烯的细胞代谢活性与对照组接近，即符合内皮细胞体外培养的最佳条件。

**结论。**与聚对苯二甲酸乙二醇酯（涤纶）相比，聚四氟乙烯（PTFE）是体外内皮细胞代谢活动最不明显的抑制剂。

关键词：细胞毒性；聚四氟乙烯；涤纶；人脐静脉内皮细胞；体外

---

**Aim.** To study and compare cytotoxicity of the main types of synthetic prostheses used in arterial reconstructive surgery, including polytetrafluoroethylene (PTFE) and polyethylene-terephthalate (Dacron).

**Materials and Methods.** On the culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) of the 3<sup>rd</sup> passage, MTS test was conducted that is used in laboratory examinations with attraction of cellular technologies to study cytotoxicity of medical drugs and medical products. The test implies use of MTS reagent that is 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; additionally phenazine methosulfate (PMS) was used that plays the role of electron-binding reagent. In the experiment, cells were incubated with PTFE and Dacron within 24 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. For control, HUVEC cultured in the standard growth medium, were used. In the presence of PMS, MTS was reduced by mitochondrial dehydrogenases of endothelial cells to formazan staining blue. Supernatant of cell cultures was evaluated by photolorimetric method on Stat Fax 3200 analyzer (microplate reader) of Awareness technology Inc. Palm City Fl. (USA).

**Results.** The lowest mean values were noted in Dacron group – 0.21 (0.20-0.22) optical density units, the highest values were noted in the control group – 0.36 (0.35-0.38); parameters in PTFE group were 0.35 (0.33-0.36). In comparison of the groups statistically significant differences were found between the control group and Dacron group ( $p < 0.001$ ), control and PTFE group ( $p = 0.037$ ), Dacron and PTFE ( $p < 0.001$ ). Incubation with Dacron led to suppression of metabolic activity of cells by 41.7% as compared to the control group ( $p < 0.001$ ). Metabolic activity of cells exposed to PTFE, approached that of the control group, that is, it corresponded to the optimal conditions of culturing of endothelial cells *in vitro*.

**Conclusion.** In comparison with polyethylene-terephthalate (Dacron), polytetrafluoroethylene (PTFE) showed the least suppression of metabolic activity of endothelial cells *in vitro*.

**Keywords:** cytotoxicity; PTFE; Dacron; HUVEC, *in vitro*.

---

在开放的外周动脉重建手术中，血管重建的最佳方法是使用自体材料，特别是大隐静脉。在复杂的临床情况下，很少使用新鲜制备或冷冻保存的同种异体静脉或动脉假体，其使用可能与免疫敏化反应和不可控的降解过程有关。在没有自体材料的情况下，可使用血管假体，主要由聚四氟乙烯（PTFE）和苯二甲酸乙二醇酯（涤纶）制成的。

由聚四氟乙烯制成的血管导管自 1976 年以来一直用于临床实践[1]。涤纶假体在心血管外科的应用已有 70 多年的历史。目前，大多数涤纶假体都涂上胶原蛋白或明胶，或浸银；此外，为了减少血栓形成，假体用肝素包覆[2]。

在早期的研究中，显示涤纶移植物在使用 3.5 mm x 4 cm 的短切面来制造主动脉-冠状动脉分流时，可以有 16 个月的令人满意的通畅性[3]。与此同时，由聚四氟乙烯制成的主动脉-冠状动脉分流的血管假体在 45 个月内只有 14%的通畅[4]。然而，小直径的人工合成骨移植由于并发症的高风险，目前还没有被实际应用。

与此同时，人工假体在四肢主动脉和大动脉重建手术中得到了广泛的应用。许多作者报道，涤纶假体的安全性和可靠性并不比聚四氟乙烯假体差：根据研究数据，术后长期结构缺陷的病例不超过 0.2%[5]。然而，与涤纶相比，聚四氟乙烯是一种渗透性较弱的材料，这也是该材料对血液渗透性较弱的原因；尽管物质化学惰性，血液中的蛋白质和细胞元素也可以沉积在聚四氟乙烯上[6]。根据大量的临床研究，聚四氟乙烯和涤纶假体的通畅度是可比的[7]。

重建干预的早期并发症通常可以解释为假体和原生血管的生物相容性差。吻合区以外的人工移植物易缺乏内皮化；血浆蛋白，主要是纤维蛋白原和血小板沉积在假体的非内皮化区域，形成所谓的《假新生内膜》，其厚度通常达到 1 毫米，从而使假体易于形成血栓，并增加了菌血症感染的风险[8]。后期的严重并发症包括人工假体植入后，由于各种分子机制、细胞相互作用和物理因素导致的内膜增生，尤其是在远端吻合区[9]。大量的实验和临床研究在体外和体内都致力于研究发病机制的分子和遗传方面的发展以及可能的方法来防止周边动脉粥样硬化和整形外科手术的并发症，包括内膜增生、血栓形成、缺血再灌注[10-13]。

在生理条件下，内皮具有无细胞性表面，其上表达硫酸软骨素和肝素；内膜的抗凝血特性也由前列腺素 I<sub>2</sub>、一氧化氮（NO）和腺苷三磷酸酶（ATPase）的产生提供[14]。由于人造血管假体不能完全重建血管的空化特性，决定了外周动脉手术中人造材料在动脉位置的命运。假体材料的孔隙度、移植物与原生血管的顺应性、吻合区血流特征是并发症发生的重要因素。

改善血管假体的内皮化和血液相容性，以及一般改变其表面，旨在防止各种血浆蛋白的沉积和增加人工移植物的长期开放。通过应用各种化合物，如亲水聚乙二醇、两性离子聚合物、肝素等，移植物内腔的这种变化是可能的。然而，过多的亲水性阻止了内皮细胞的粘附和形成一个最佳的内部衬里假肢。因此，许多研究都致力于通过分子遗传技术提高假体的功能内皮化[15,16]。

体外研究在血管外科中使用的人造材料对血管壁细胞的影响，可以提供更多的了解天然血管、血液和血管假体细胞元素的相互作用机制。检查了人脐静脉内皮细胞在聚四氟乙烯材料上的粘附特性，例如，对最后者低温等离子体进行改性，特别是对丝素、聚氨酯膜等各种材料与人脐静脉内皮细胞培养时的生物相容性进行改性后，对人工材料在不同类型照射下的细胞毒性进行了体外评估[17-19]。

体外细胞毒性评估通常广泛应用于临床前研究，以研究各种药物和医疗器械对细胞培养物的影响。MTT 和 MTS 检测是常规实验室中最常用的检测方法之一。

MTT 检测是基于活细胞和代谢活性细胞的线粒体脱氢酶将水溶性 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 转化为不同染色程度甲瓩的能力。当加入二甲基亚砷（DMSO）到甲瓩，然后后者就溶化了，这可以测量得到的溶液的光密度，从而评估细胞的代谢活性，并相应地评估测试物质或医疗设备的细胞毒性。

一种类似的细胞毒性研究方法是使用 MTS 试剂，其在吩嗪硫酸甲酯（PMS）存在下为 3-(4,5-二甲基噻唑 2-基)-5-(3-羧基甲氧基)-2-(4-磺苯基)-2h-四唑，起到电子结合试剂的作用。MTS 类似地 MTT 通过细胞恢复到甲瓩产物；细胞上清染色的程度可以用光度计测量（图 1）[20]。

目前在各种血管疾病和病理条件的体外研究中最流行的对象是人脐静脉内皮细胞—HUVEC 细胞（英 human umbilical vein endothelial cells）。人脐静脉内皮细胞具有许多优点：分离方便，成本相对较低，易于在实验室中培养。1973 年，E. Jaffe 和他的同事首次在体外分离并培养出人脐静脉内皮细胞[21]。人脐静脉内皮细胞细胞系是血管生物学领域最常用的体外研究。人脐静脉内皮细胞既用于研究内皮内发生的生理过程，也用于模拟各种病理过程，进行药理研究，研究医疗器械的作用。

进行基础研究时，人脐带内皮细胞常常是生物医学工业和临床前实验的选择模型。

因此，这项研究的目的是研究并比较用于动脉重建手术的主要合成假体的细胞毒性，包括聚四氟乙烯（PTFE）和聚对苯二甲酸乙二醇酯（涤纶）。

### 材料与方法

在实验过程中，使用人脐静脉 HUVEC3 代原代内皮细胞培养。细胞的分离和培养是在 Ryazan State Medical University 中央研究实验室细胞技术实验室按照标准接受协议进行的。测试对象为 4×4 毫米的聚四氟乙烯（PTFE）和苯二甲酸乙二醇酯（涤纶），重量相同为 25 毫克。计算的尺寸和重量的材料被选择考虑到最佳表面积复盖的膜插入和初步实验研究的结果；作为对照，使用了添加类似量的 ECGM（Cell Applications Sigma/Aldrich，目录号 211-500）生长内皮培养基到片剂中的井。实验用不同的人脐静脉内皮细胞主线进行了三次，以消除测量误差。

在每次实验中，将初级人脐静脉内皮细胞（3 代）播种到 12 孔片（Corning，目录号 3512）的小孔行中。在加入测试对象之前，细胞在 12 孔平板中生长 48 小时，温度为 37°C，CO<sub>2</sub> 含量为 5%（CO<sub>2</sub> 培养箱 WS-180CS，World Science，韩国）。当达到合流 80%时，将用于 12 孔片剂的膜插入物（Corning，6.5 毫米，生长面积 0.33 平方厘米，孔隙 0.4 微米，目录号 3413）填充有重量为 25 毫克的测试对象，并在 37°C，CO<sub>2</sub> 含量为 5%下孵育 24 小时（表 1）。

24 小时后，将膜插入物从片剂中取出，置于 MTS/PMS 试剂（Abcam，目录号 ab223881）中，在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 含量下暴露 1.5 小时。在规定的时间内，将得到的不同颜色的溶液（细胞上清液）转移到 96 孔片（Corning，目录号 3599）上，在 490 纳米（参考值—640 纳米）评估分析仪（Stat Fax 3200（microplate reader），Awareness technology Inc.Palm City Fl.，美国）上的光密度；为了排除测量误差，每口井至少取 5 个样本（图 2）。

使用 Statistica 10.0 软件包（Stat Soft Inc.，美国）对获得的数据进行统计处理。

### 结果与讨论

涤纶组上层清液光密度的最低平均值平为 0.21（0.2-0.22）个光密度单位（ODU），对照组上清平均光密度最高为 0.36（0.35-0.38）个光密度单位；聚四氟乙烯组的光密度单位指标为 0.35（0.33-0.36）。在比较研究小组时，对照组和涤纶之间（ $p<0.001$ ）、对照组与聚四氟乙烯（ $p=0.037$ ）、涤纶组与聚四氟乙烯（ $p<0.001$ ，图 3）差异有统计学意义。

细胞毒性分析包括对任何物质影响细胞活力的可能性的研究，例如，代谢活性，细胞膜的完整性，细胞生长。细胞毒性和/或细胞活力的体外研究有许多优点，例如研究速度快、成本相对低、能够使用人类细胞而不会对病人的健康造成风险；此外，体外使用人源细胞系可能提供比一些动物体内实验更准确的数据。

有大量的技术用于评估细胞毒性：1）排除使用任何染料/染色类型的方法；2）比色方法；3）荧光方法；4）辉光方法。本工作中使用的 MTS 检测与 MTT、XTT、WST-1、WST-8、LDH、SPB、NRU 等方法均属于比色法[22]。

MTS 试验是一种快速、灵敏、特异的体外细胞毒性研究方法。该方法的局限性可能是对孵育时间和细胞类型的影响。但研究结果表明，选择 MTS 最佳曝光时间可以得到可靠的实验结果[22]。

MTS 测试可用于研究各种医学领域中使用的材料的细胞毒性，既可用于评估与细胞的直接接触，也可用于诸如膜系统等间接接触[23]。细胞毒性的研究在心血管手术中也起着重要的作用。因此，基于聚乙烯 LLDPE、聚四氟乙烯、涤纶、透明质酸包覆牛和猪心包的瓣膜假体的研究工作正在进行中，其中积极使用细胞毒性评估方法（LDH-方法）[24]。

在本文作者的实验中，涤纶对人脐静脉内皮细胞的细胞毒性最高：从与该材料孵育的细胞中获得的上清液的光密度的一项研究显示出最小的结果，其相当于与对照组相比细胞代谢活性的 41.7%抑制。暴露于聚四氟乙烯的细胞代谢活性与对照组接近（光密度下降不超过 2.8%），即符合内皮细胞体外功能的最佳条件。

细胞毒性的评估使能够研究细胞对各种材料的影响的反应。在这项研究的框架下进行的工作是对血管外科关键材料的细胞毒性进行研究，通过对人脐静脉原代内皮细胞进行 MTS 试验，其是一种方便、容易的体外研究材料，已经表明，一种相对简单和可行的实验室评估人工假体对血管壁关键元素的影响是可能的。重复实验的结果证明了这种方法是可重复的。

在这项工作中使用的方法可以让研究不同条件的细胞外环境，假体涂层，化学剂对细胞代谢活动的影响，其能有助于在体外条件下扩大关于血液相容性过程的知识，血管假体内皮化和内膜增生。

### 结论

1. 苯二甲酸乙二醇酯（涤纶）在体外对人脐静脉原代内皮细胞具有细胞毒性作用，显著抑制细胞代谢活性。

2. 与苯二甲酸乙二醇酯（涤纶）相比，聚四氟乙烯在体外对内皮细胞的损伤最小。

MTS 试验可用于体外重建动脉干预中使用的材料对血管壁细胞的影响的常规实验室研究。

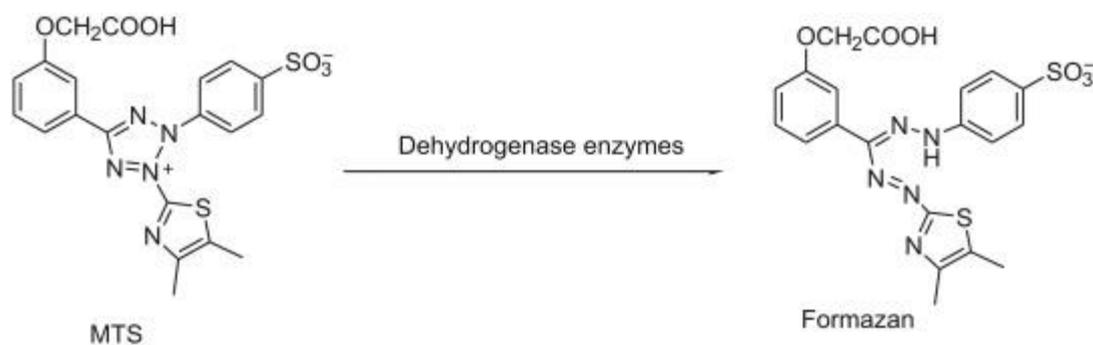


图 1 脱氢酶作用下将 MTS 还原为甲瓚的研究方案

表 1

### 实验的设计

时间	对照组	涤纶	聚四氟乙烯
0 小时	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>	HUVEC 0.1 x 10 <sup>6</sup>
48 小时	ECGM	涤纶的 25 毫克	聚四氟乙烯的 25 毫克
72 小时	MTS/PMS	MTS/PMS	MTS/PMS
73.5 小时	将孔的内容物转移到 96 孔平板上进行光密度测量		

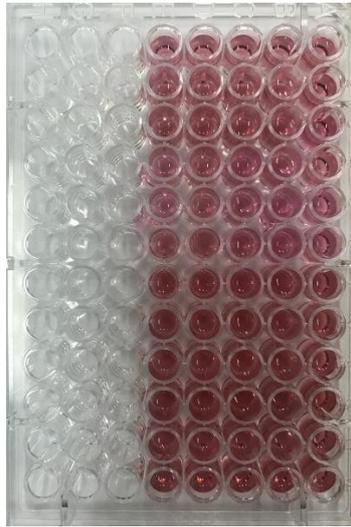


图 2 96 孔微滴板与细胞上清经 MTS/PMS 孵育后测量光密度

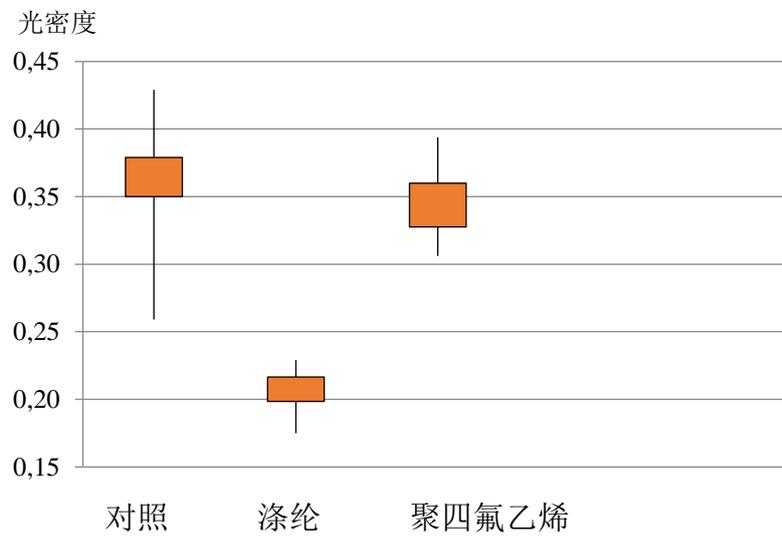


图 3 细胞毒性实验各组光密度值的比较

注：组间比较均有统计学意义 ( $p < 0.05$ )