



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104027844 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410138204. 1

(22) 申请日 2014. 04. 04

(71) 申请人 张志辉

地址 510000 广东省广州市荔湾区康王北路
1022 号 2203 房

(72) 发明人 张志辉 张梅 俞晓立

(51) Int. Cl.

A61L 27/34 (2006. 01)

A61L 27/50 (2006. 01)

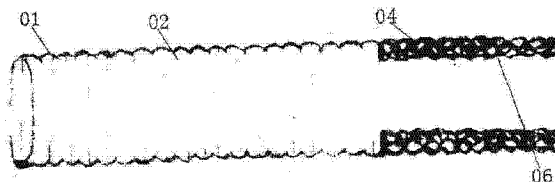
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种用黄芪多糖涂层人工血管的新方法

(57) 摘要

本发明提供一种用黄芪多糖涂层人工血管的新方法,由一涤纶(学名聚对苯二甲酸乙二酯)材质机织或针织的弹性多孔隙管型或Y字型结构的合成血管假体,通过使用黄芪多糖混合溶液涂层3到10遍制成,上述的混合溶液主要包括有黄芪多糖和塑化剂,通过浸润使其均匀分布于血管假体全层,然后置于含有碳化二亚胺蒸汽的干燥箱中交联固定。



1. 一种制备预凝涂层的人工血管假体的方法,所述具有涂层的人工血管假体包括人工血管假体和涂在人工血管假体上的涂层,其特征在于所述涂层含有黄芪多糖和塑化剂。

2. 根据权利要求 1 所述的制备人工血管的方法,特征在于将含有黄芪多糖和塑化剂的混合溶液均匀涂覆在人工血管全层,然后在含有碳化二亚胺蒸汽的干燥箱中进行交联固定,最终获得所述的人工血管假体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备人工血管假体的方法,其特征在于塑化剂选自阿拉伯胶。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备人工血管假体的方法,其特征在于人工血管假体由生物相容性材料制成,其为涤纶材质(学名聚对苯二甲酸乙二酯)并具有弹性多孔隙管型或 Y 字型结构的合成编织物,可以是机织型或针织型。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备人工血管假体的方法,其特征在于黄芪多糖的浓度为 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$,塑化剂浓度为 20-25% (重量百分比)。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备人工血管假体的方法,其中涂覆涂层溶液一般要 3-10 层。

一种用黄芪多糖涂层人工血管的新方法

所属技术领域

[0001] 本发明涉及一种可用于置换病变人体血管的人工血管假体的预凝涂层方法,尤其是使用混合有塑化剂的黄芪多糖溶液涂层人工血管假体,使其不漏血和促进血管组织再生,从而免除手术过程中预凝血操作和促进血管组织再生的方法。

背景技术

[0002] 目前,使用人工血管置换人体病变血管是一项重要的外科操作技术。人工血管有多种类型并且有多种材质。涤纶(学名聚对苯二甲酸乙二酯)材质的人工血管在现代血管置换手术中使用最为普遍,由涤纶编织的人工血管管壁通常有不同程度的孔隙,便于受体组织侵入生长、包裹人工血管假体并促其愈合。但同时,人工血管的孔隙亦有其不利的一面,即植入时会导致大量血液通过管壁渗漏到体腔中,明显增加手术风险。

[0003] 预凝涂层是指在目前使用的涤纶材质人工血管置换机体病变血管时,由于涤纶材质的人工血管本身具有多渗漏性,同时缺乏组织生长的引导性,若涂上适合的生物组织相容性化学物质作为涤纶材质人工血管的涂层(此过程称为预凝),即可防止血液的渗漏,同时还可促进血管平滑肌细胞和成纤维细胞迁移再生的物质,即预凝涂层。在目前临床上通常使用的预凝涂层主要是可降解的生物材料,包括自体血浆、白蛋白、胶原、丝素蛋白和明胶等(沈宗林. 介绍一种涤纶血管预凝方法. 中国循环杂志. 1990;冯慕贤. 马凡综合征心血管病的手术配合. 岭南心血管病杂志. 1998;黄福华. 丝素蛋白涂层人工血管的研制. 中国医学科学院博士论文;Kuijpers et al, Journal of Biomaterials Science :Polymer Edition, 11, 225, 2000;Folk JE. Transglutaminases. Biochemistry 1980, 49 :517 ~ 531; Falcone P, Serafini D, Del Duca S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of helianthus tuberosus. Plant Physiol 1993, 142 :263 ~ 273; Yasueda H, Kumazawa Y, Motoki M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream. Bioscience Biotechnology Biochemistry 1994, 58 :2041 ~ 2045)。但以上所述涂层材料不稳定,提取和提纯困难,同时价格昂贵(J. H. Lee, W. G. Kim, and S. S. Kim, "Development and characterization of an alginate impregnated polyester vascular graft," J Biomed Mater Res 36, 200-208(1997))。

发明内容

[0004] 为克服涂层材料不稳定,提取和提纯困难,同时价格昂贵的困难,本发明采用可降解的生物材料黄芪多糖混合溶液涂层人工血管假体,同样达到免除手术过程中预凝血操作,减少漏血,同时促进血管组织重塑的目的。该人工血管由具有生物相容材料构成的多孔隙管状或Y状合成血管假体与混合有塑化剂的黄芪多糖溶液交联而成,使得人工血管假体不漏血,从而免除手术过程中的预凝操作。该多孔隙人工血管假体由涤纶材质机织或针织而成。

[0005] 从中药黄芪提炼并通过微波辅助和沉淀等方法得到高纯度的黄芪多糖原粉后,通过配比制成悬浮液。将高纯度的黄芪多糖溶液均匀涂于合成血管假体的内外面,使人工血管结构上充满弹性而且具备较好的操控性和纵向伸展能力。使用黄芪多糖蛋白混合溶液涂层 3 到 10 遍,干燥后将其暴露于碳化二亚胺蒸汽的干燥箱中交联固定。

[0006] 为保持人工血管假体在干燥状态下保持柔软不塌陷而具有弹性,在使用黄芪多糖溶液涂层人工血管假体前需要阿拉伯胶或其他生物相容性的塑化剂。混合涂层材料中黄芪多糖浓度为 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$,塑化剂浓度为 20-25% (重量百分比)。

[0007] 合成针织或机织型的人工血管依照本发明的方法使用黄芪多糖和塑化剂的混合液涂层后获得最重要的特征是使原来多孔隙结构的血管基质的渗水率约降至零,并且有利于血管组织的生长。作为对照实验,随机取未涂层的 10 根合成机织型的涤纶血管,平均渗水率为 $:357.9 \pm 20.4 \text{ml} / \text{min} * \text{cm}^2$,按照本发明涂层后渗水率降至零。同时取未涂层的 5 根合成机织型的涤纶血管植入实验动物体内 6 小时后,病理组织学检验显示并无血管组织生长,按照本发明涂层后有血管组织生长。

[0008] 由此,本发明目的是提供一种制备不漏血和促进血管组织再生的人工血管假体的方法。

[0009] 本发明进一步的目的是提供一种制备黄芪多糖溶液涂层合成血管假体使其不漏血并且可促进血管组织再生的方法。

[0010] 本发明其他的目的和益处将在以下的实例说明中得到清晰的显示。

[0011] 本发明包含的特征、性质以及相关原理和操作步骤和各步骤之间的关系将在以下具体实例中的细节逐一阐述,而本发明的范围将在权利要求中说明。

附图说明

[0012] 为更好的理解本发明,须参考说明书附图及说明:

[0013] 图 1 是按照本发明的方法制备的黄芪多糖溶液涂层的直线型人工血管假体部分的横截面;

[0014] 图 2 是按照本发明的方法制备的黄芪多糖溶液涂层的 Y 型人工血管假体部分的横截面;

[0015] 图 3 表示人工血管假体的渗水率随着按照本发明的方法运用黄芪多糖溶液涂层次数增多逐步降低;

[0016] 图 4 表示运用本发明的方法黄芪多糖涂层人工血管上血管组织生长表现。

图 5 表示不同浓度黄芪多糖对细胞增殖的影响。

具体实施方式

[0017] 按照本发明制备的合成人下血管假体如图 1 所示:包括管型结构主体 01,它是由具生物相容性的纤维合成材料,尤其是聚对苯二甲酸乙酯(即涤纶)针织或机织而成的基质 02 构成的多孔隙结构体。基质 02 具有内外侧两层绒面 04。涤纶构成管型结构主体 01,并且使其具备多孔隙的结构允许受体的血管组织侵入生长,同时保持开放的管腔结构允许血液顺畅通过。在绒面 04 内侧面覆盖有黄芪多糖溶液涂层 06,黄芪多糖溶液涂层 06 需要运用黄芪多糖和塑化剂的混合液体材料涂层 3-10 遍并通过暴露在碳化二亚胺蒸汽中交联

而成。

[0018] 图2演示一Y字形黄芪多糖溶液涂层的人工血管假体12,血管假体12包括主管状结构体14和两个分枝管状体16。主管状结构体14和分枝管状体16由涤纶针织或机织而成的基质18构成,基质18内侧绒面覆盖有黄芪多糖溶液涂层20,需要运用黄芪多糖溶液涂层3-10遍。

[0019] 依据本发明多孔隙结构的人工血管假体基质由涤纶通过针织或机织而成最优。通常通过涤纶机织编织而成的人工血管假体渗水率范围在 $357.9 \pm 20.4 \text{ ml} / \text{min} \cdot \text{cm}^2$ 。交联黄芪多糖溶液的方法是将黄芪多糖和塑化剂的混合液均匀涂在人工血管假体基质内,去除多余的涂层材料并放置干燥后暴露于炭化二亚胺蒸汽中交联,后在干燥箱内干燥脱水。按照本发明制备的黄芪多糖溶液涂层的人工血管的渗水率(单位: $\text{ml} / \text{min} \cdot \text{cm}^2$)接近于零。通常通过涤纶基质编织而成的人工血管假体植入到实验动物体内,在6小时内人工血管假体上血管组织基本不生长。通过本发明制成的含有黄芪多糖涂层的人工血管假体植入实验动物体内,6小时后人工血管假体上血管组织有明显生长。

[0020] 以下实例将说明黄芪多糖从植物黄芪中提取和纯化以及根据发明制备黄芪多糖溶液涂层人工血管假体的过程。列举实例的目的是阐述专利而不是来限制它的范围。

[0021] 实例1:黄芪多糖提取方法

[0022] 把黄芪在磨粉机中磨成粗细均匀的粉末状,然后取100g黄芪粉末加入适量蒸馏水溶解搅拌形成溶液,后将溶液在 70°C 恒温中回流提取3次,每次提取3h,加纯化水量40ml和95%乙醇至终浓度90%进行醇沉静置4h,收集沉淀物。收集到的沉淀物在干燥箱中干燥24h后形成粉末状黄芪多糖,此时所得黄芪多糖原粉浓度为70-80%(重量百分比),最后加入适当的蒸馏水调配成实验所需的浓度。

[0023] 实例2:黄芪多糖溶液涂层人工血管

[0024] 将含有黄芪多糖(按照实例1从黄芪中提取)浓度为 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的黄芪多糖混合液注满50ml的注射器内,该黄芪多糖混合液含有20%的阿拉伯胶和蒸馏水,粘度为30000-37000厘泊。注射器与人工血管假体一端相连,黄芪多糖混合液被推注入人工血管腔并使涂层液均匀涂布在管腔内壁,多余的黄芪多糖混合液在人工血管假体另外一端流出。涂层后人工血管在50摄氏度的干燥箱中干燥1小时,涂层干燥需要反复操作3-10次。

[0025] 涂层3-10次后,使人工血管暴露于炭化二亚胺蒸汽中交联交联后置于50摄氏度干燥箱中干燥24小时。

[0026] 实例3:涂层前后人工血管假体血液渗透率比较

[0027] 按照实例2的方法制备的黄芪多糖溶液涂层的人工血管检测如下,随机取10根直径为8mm,长度为10cm涂层后的合成机织人工血管并与储血器相连,在120mmHg压力下,使肝素化的血液在人工血管内通过,收集渗漏的血液并计量(单位: $\text{ml} / \text{min} \cdot \text{cm}^2$)。检测结果10根人工血管的血液渗出率分别为:0.10,0.05,0.01,0.04,0.05,0.01,0.0,0.01,0.03,0.02,平均血液渗出率为 $0.032 \text{ ml} / \text{min} \cdot \text{cm}^2$,接近于零。

[0028] 为与未涂层的机织人工血管比较,选取未涂层的人工血管重复上述实验操作,测得平均血液渗出率为 $30.1 \text{ ml} / \text{min} \cdot \text{cm}^2$ 。

[0029] 实例4:涂层次数前后人工血管假体渗水率比较

[0030] 人工血管经过黄芪多糖混合液涂层3次后渗水率降至6%以下,涂层10次后渗水

率降至 1% 以下。标准的渗水率实验测定为在 120mmHg 的水柱压力下通过 2.44cm^2 面积的圆孔, 将人工血管假体的样品固定在圆孔上 1min, 收集并且测定渗水量。每个样品分别测定数次, 测定结果如下表示: 渗水率 = $\text{ml} / (\text{min} * \text{cm}^2)$ 。机织人工血管的渗水率为 $600\text{ml} / \text{min} * \text{cm}^2$ 经过不同次数涂层后的渗水率。

[0031] 变化如下:

[0032]

涂层次数 (单位: 次)	渗水率 (单位: $\text{ml} / \text{min} * \text{cm}^2$)
0	600
1	345
2	121
3	35
4	29
5	23
6	19
7	13
8	10
9	5
10	5

[0033] 在上述实验的每一次涂层使用的黄芪多糖溶液均从黄芪按照实例 1 描述提取, 涂层方法均按照实例 2 描述操作。结果如附图 3 所示。结果黄芪多糖涂层后的人工血管渗水率大幅下降, 接近于零。

[0034] 与未涂层的人工血管相比, 黄芪多糖溶液涂层的人工血管不仅降低了渗水率, 而且促进血管组织生长。以下的实例证明与对照组相比黄芪多糖溶液涂层人工血管假体显著的促进血管组织生长。

[0035] 实例 5: 涂层前后人工血管上血管组织生长比较实验 (体内实验)

[0036] 黄芪多糖涂层人工血管假体体内 (实验用新西兰大白兔) 实验如下。动物术前称重安定, 后用浓度为 20% 的乌拉坦 $3\text{ml} / \text{kg}$ 静脉麻醉。每个动物植入人工血管前经静脉给予 $100\text{ug} / \text{kg}$ 肝素避免血管内血栓形成。腹部正中切口, 游离约肾动脉开口以下 1cm 的腹主动脉 3-6cm, 以主动脉阻断钳上下阻断并切除 1-2 腹主动脉, 以 6-0 Prolene 线采用端端吻合植入黄芪多糖涂层血管假体, 术毕以鱼精蛋白中和肝素 (1 : 1) 防止术后出血。术中给予抗生素头孢唑啉 100mg 静推, 术后相同剂量肌注 3 天, 处死前常规喂养。

[0037] 按照以上述操作重复为 5 只实验动物进行手术。并分别在 6 小时、1 天、1 周、1 个月、3 个月共 5 个时间点取出体内的黄芪多糖涂层人工血管进行组织学切片, 并按以下方式评估人工血管上血管组织的生长情况。

[0038] 按预定时间取出移植物, 纵行切开血管假体, 以 PBS 液细心冲洗, 拍摄照片观察血管外形, 显微镜分析血管假体近端吻合口、血管中段和远端吻合口约 1cm 长的标本。标本用 2% 的甲醛固定 2h, 冷冻干燥后石蜡块包埋, $100\mu\text{m}$ 厚度切片, 固定在玻片上后以苏木精-伊红染色, 染色标本的愈合特征通过光学显微镜观察炎症, 异物巨细胞反应, 内膜纤维化的程度。简单说将反应程度分为三个等级, 以参数从 0 到 2 表示相应的等级, 炎症的等级依据移植血管周围浆细胞, 淋巴细胞和多形核细胞的多少进行估计, 0= 无到轻度; 1= 轻度到中度; 2= 中度到重度。异物巨细胞反应则依据多核巨细胞和组织细胞 (巨嗜细胞) 在血管组织周围的情况进行估计: 0 = 极轻微的反应从中线延伸到移植物不到 $1 / 3$ 的厚度, 1= 异物

反应从中线到达移植物达 2 / 3 的厚度 ;2 二异物反应达到整个移植物壁的厚度” 血管假体纤维化的分析依据内膜表面纤维化的程度 :0 = 绝大部分的纤维蛋白和红细胞 ;1= 一些成纤维细胞和纤维蛋白 ;2= 绝大部分是成纤维细胞和胶原。血管假体内壁的新内膜形成通过光学显微镜和扫描电子显微镜观察评价。

[0039] 具体结果如下 :

[0040]

人工血管涂层	植入时间	炎症反应	异物反应	新内膜的形成	内皮样细胞生成
黄芪多糖	6h	1	0	0	+
	1d	1	0	1	+
	1w	2	0	1	+
	1m	2	0	1	+
	3m	0	0	1	+

[0041] 为与未涂层的机织人工血管比较,选取未涂层的人工血管重复上述实验操作。

[0042] 具体结果如下 :

[0043]

人工血管涂层	植入时间	炎症反应	异物反应	新内膜的形成	内皮样细胞生成
黄芪多糖	6h	0	0	0	-
	1d	0	0	0	-
	1w	1	0	0	+
	1m	0	0	1	+
	3m	0	0	1	+

[0044] 基于上述实验结果,黄芪多糖涂层的涤纶人工血管显著促进血管组织生长,并且显著多于未预凝组,这可能与黄芪多糖可促进血管组织生长有关。

[0045] 实例 6 :不同浓度黄芪多糖促进人脐静脉血管内皮细胞实验 (体外实验)

[0046] 人脐静脉血管内皮细胞增殖实验如下。取对数生长期细胞,常规消化制成细胞悬液。重悬细胞,以约 1×10^4 个细胞每 200 μ g 接种于 96 孔板。24h 后,待细胞贴壁后分别给予生物膜 4 处理,并设置空白培养液组作为比色时的空白对照,每个浓度设置 3 个复孔。继续培养 24h。每孔加入 CCK820LL,置 5% CO₂ 孵箱继续培养 24h。用酶标仪检测 450nm 处的光密度值 (OD 值)。

[0047] 黄芪多糖不同浓度对细胞增殖的影响:黄芪多糖浓度分别为 0、10、20、40、80、120Lg / ml 处理人脐静脉血管内皮细胞 24 小时后加入 CCK820LL,37e,1h 后 490nm 检测其 OD 值结果。重复 3 次 (n=3) 取均值与标准差。黄芪多糖浓度在 20ug / ml 时促进细胞生长作用最明显,此后随着浓度的升高,促生长的作用逐渐降低,但均显著高于控制组 (P<0.01);黄芪多糖在 20ug / ml 时内皮细胞增殖率几乎达到控制组 2 倍,且显著高于其他各组 (P<0.01)。

[0048] 具体结果如图 5 所示。

[0049]

[0050]

[0051] 综上所述实例,黄芪多糖和塑化剂的混合溶液涂层合成机织具多孔隙结构的人工

血管假体免除了手术过程中的预凝血操作,同时提供了理想的基质便于血管组织的侵入和包裹生长。合成的针织或机织涤纶人工血管按照本发明使用黄芪多糖溶液涂层后使其柔软有弹性具备好的操作性。

[0052] 由此依据以上阐述的方法操作,本发明目的能客观有效实现。但在不背离本发明精神和范围情况下,上述的操作具体步骤和某些条款可以有一定改变,因此上述实例描述和附图描述所涉及的方法和使用的某些物质材料是用来演示阐述发明,而不应该理解为限制发明所涵盖的范围。

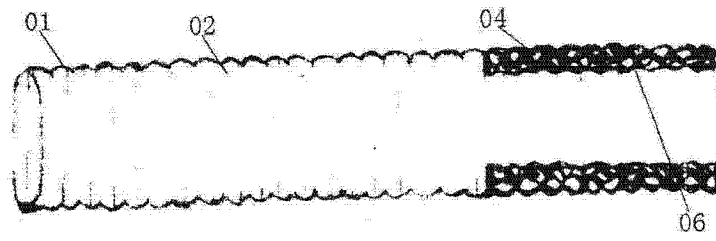


图 1

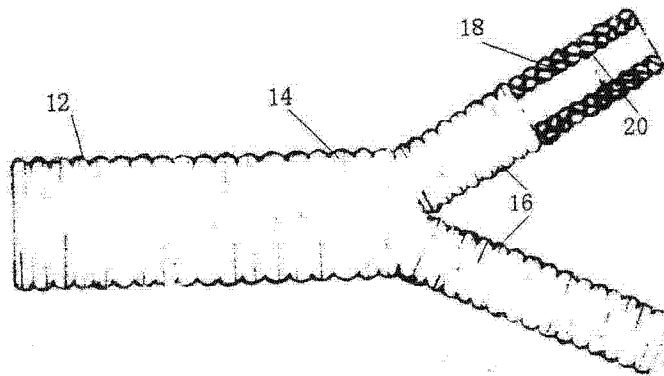


图 2

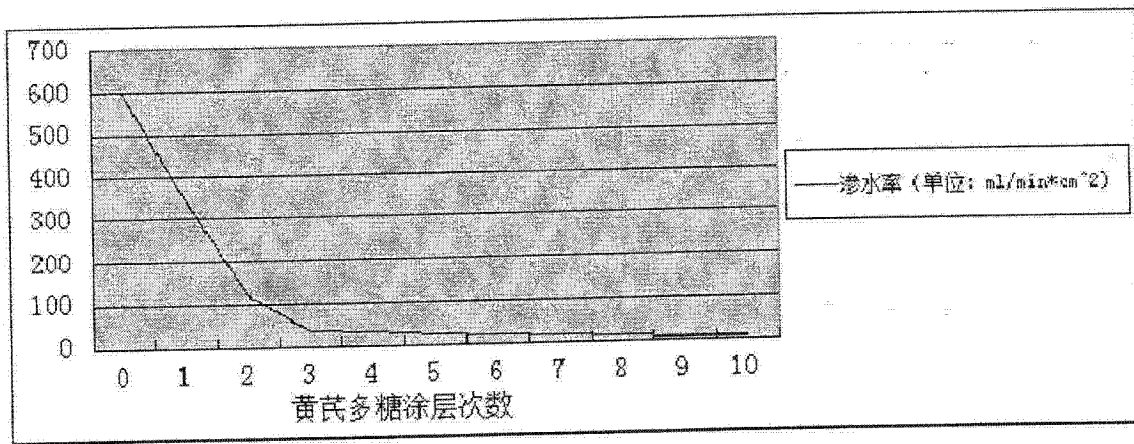


图 3

人工血管涂层	植入时间	炎症反应	异物反应	新内膜的形成	内皮样细胞生成
黄芪多糖	6h	1	0	0	+
	1d	1	0	1	+
	1w	2	0	1	+
	1m	2	0	1	+
	3m	0	0	1	+

注：“+”表示有内皮细胞生成；“-”表示无内皮细胞生成。

图 4

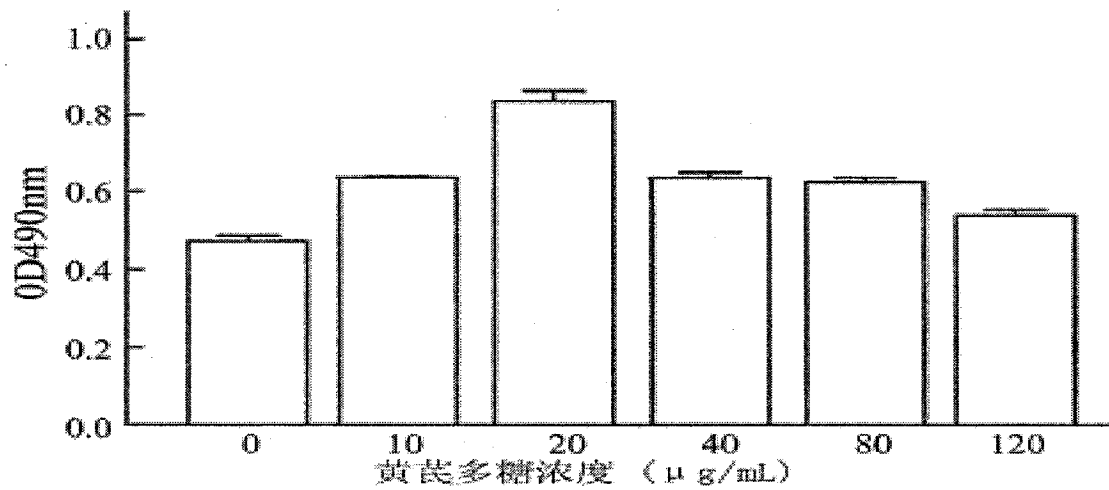


图 5