

• 论著 •

新型地塞米松-肝素双涂层支架在小型猪动脉损伤模型中预防支架内再狭窄的实验研究

丁付燕 吕志前 王瑾晔 李 涛 曹 勇 邹榕江 张 伟 郭清奎

【摘要】 目的:评价新型植物源蛋白包载的地塞米松-肝素双涂层支架在小型猪血管损伤模型中近期抑制支架内再狭窄的有效性和安全性。 方法:32 只小型猪随机分入 A 组(裸支架组)、B 组(玉米醇溶蛋白 zein 涂层支架组)、C 组(肝素涂层支架组)、D 组(地塞米松-肝素双涂层支架组)。各组均包括 4 周观察终点的猪 3 只和 12 周观察终点的猪 5 只。每只猪于双侧股动脉各置入同种支架 1 枚。至观察终点时复查血管造影并处死取材,通过形态学方法观察内膜增生及炎症情况。 结果:4 周时,各组血管损伤平均积分分别为 2.10 ± 0.58 、 2.23 ± 0.52 、 2.33 ± 0.57 和 2.25 ± 0.64 ($P > 0.05$),损伤相近。管腔面积分别为 (2.68 ± 1.28) 、 (2.59 ± 1.31) 、 (2.85 ± 0.86) 和 $(3.21 \pm 1.09) \text{mm}^2$ ($P < 0.05$),D 组最大。平均内膜厚度分别为 (295 ± 138) 、 (309 ± 79) 、 (245 ± 101) 、 $(103 \pm 64) \mu\text{m}$ ($P < 0.05$),D 组最小。炎症积分 D 组较其他 3 组明显降低 ($P < 0.05$)。12 周时各组内膜增生均较前加重,D 组管腔面积及新生内膜增生仍优于另外 3 组,其他各指标差异均无统计学意义。 结论:采用植物源蛋白包载的地塞米松-肝素双涂层支架可以有效而安全地抑制健康小型猪支架置入术后 4 周和 12 周时的内膜增生,预防支架内再狭窄。

【关键词】 支架;药物涂层;地塞米松;肝素;再狭窄

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.01.015

Preventive effect of a novel dexamethasone-heparin coated stent on restenosis in a porcine artery injury model DING Fu-yan¹, LÜ Zhi-qian¹, Wang Jin-ye², LI Tao¹, CAO Yong¹, ZOU Rong-jiang¹, ZHANG Wei¹, GUO Qing-kui¹. 1. Department of Cardiothoracic Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240, China

【Abstract】 **Objective:** To evaluate the efficacy and safety of a novel corn-protein-zein coated dexamethasone-heparin-eluting stent in preventing in-stent restenosis in a porcine artery injury model.

Methods: Thirty two mini-pigs were randomly divided into group A (bare stent group), group B (corn-protein-zein coated stent group), group C (heparin coated stent group) and group D (dexamethasone heparin double coated stent group). Each group contained 3 pigs for 4-week follow-up and 5 pigs for 12-week follow-up. Each pig was implanted two same kinds of stents in the bilateral-femoral artery. Animal underwent angiographic study and histomorphometric analysis at 4 and 12 weeks. **Results:** At 4th week, mean injury scores were similar in the four groups (2.10 ± 0.58 , 2.23 ± 0.52 , 2.33 ± 0.57 and 2.25 ± 0.64 , respectively, $P > 0.05$). Group D had the largest luminal area [$3.21 \pm 1.09 \text{mm}^2$, $P < 0.05$] and the least neointimal thickness [$103 \pm 64 \mu\text{m}$, $P < 0.05$] among all the groups, while there were no statistical differences among groups A, B and C in luminal area [$2.68 \pm 1.28 \text{mm}^2$, $2.59 \pm$

基金项目:上海市科委基金资助项目(074107061)

作者单位:200233 上海交通大学医学院附属市六医院心胸外科(丁付燕、吕志前、李 涛、曹 勇、邹榕江、张 伟、郭清奎);200240 上海交大学生命科学与技术学院(王瑾晔)

通信作者:吕志前,Email:luzhiqian@gmail.com

1.31) mm², and (2.85 ± 0.86) mm², respectively] and neointimal thickness [(295 ± 138) μm, (309 ± 79) μm, and (245 ± 101) μm, respectively]. The inflammation scores in group D were significantly smaller than those in Group A, B and C ($P < 0.05$), no statistical differences existed among other groups. At 12th week, the neointimal proliferation was progressing in all groups, but group D still had a clear advantage in luminal area and neointimal thickness. **Conclusion:** The dexamethasone-heparin coated stent could effectively and safely inhibit neointimal proliferation and prevent in-stent restenosis 4 weeks and 12 weeks after implantation in a porcine artery injury model.

【Key words】 Stent; Drug-coated; Dexamethasone; Heparin; Restenosis

药物洗脱支架(drug-eluting stent, DES)的应用是冠心病介入治疗发展的里程碑之一。通过携带抗炎、抗凝及抗增生药物,抑制局部平滑肌增殖,DES显著降低了支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)的发生率^[1]。然而,DES涂层药物延迟血管损伤反应和抑制平滑肌细胞增殖的同时,也抑制正常内皮细胞再生,导致血管内皮化延迟。另外,永久性残留的非降解涂层可在支架局部造成持续的炎症刺激,均增加支架术后迟发性血栓形成的风险^[2,3]。因此,筛选安全可降解的涂层材料和有效的涂层药物以研发新一代药物洗脱支架显得尤为迫切。

本课题组与中科院上海有机化学研究所合作,采用一种植物源性玉米醇溶蛋白 zein 为基质,制备地塞米松-肝素双微球涂层支架,并观察支架置入健康小型猪血管模型后 4 周和 12 周的内膜增生及炎症反应情况,探讨其作为一种新型 DES 的安全性及有效性,希望在达到抗炎抗血栓效应预防血管 ISR 形成的同时,实现内皮细胞完全修复,进而为该领域引入一种安全有效的药物洗脱支架。

1 材料与方法

1.1 药物涂层支架的制备

316L 不锈钢金属裸支架,规格均为 3.5 mm × 18 mm,由上海微创医疗器材公司提供,涂层支架由中科院上海有机所制备。应用玉米醇溶蛋白 zein 为涂层材料,采取特殊工艺将其制成包埋肝素和(或)地塞米松的蛋白/药物微球涂层支架,载药量约为 160 μg/枚,扫描电镜显示涂层厚度约 5~10 μm,体外试验显示 70 d 时涂层药物基本完全洗脱。涂层支架预装于球囊导管上,环氧乙烷消毒备用。

1.2 实验动物与分组

健康实验用小型猪 32 只,由上海交通大学农学院实验动物中心提供,雌雄不限,5~7 个月龄,体重(19.1 ± 2.4)kg,随机分入 4 组。A 组:裸支架组;B 组:玉米醇溶蛋白 zein 涂层支架组;C 组:玉米醇溶

蛋白 zein 肝素涂层支架组;D 组:地塞米松-肝素双涂层支架组(地塞米松在内,肝素在外)。各组均包括 4 周观察终点的猪 3 只和 12 周观察终点的猪 5 只。实验期间饲以普通谷物商品饲料和洁净水,动物使用及研究方案遵照相应规章进行。

1.3 动脉损伤模型制备及支架置入

术前 3 d 起至观察终点处死,所有动物喂服阿司匹林 100 mg/d,氯吡格雷 75 mg/d。氯胺酮 10 mg/kg 和阿托品 0.5 mg 肌注行基础麻醉,继以戊巴比妥钠 1 mg/kg 静滴维持,支架置入全程予心电图及血流动力学监护。钝性分离显露,穿刺颈动脉,置入 6 F 动脉鞘,予肝素 200 IU/kg。腹主动脉远端及股动脉造影,选择支架:动脉(直径)比为 1.1~1.2:1 血管段置入支架,送入支架球囊用 12 atm 大气压 30 s 单次扩张血管,形成动脉损伤模型并释放。置入后再次行血管造影,观察管腔通畅和管壁损伤情况。每只猪双侧股动脉各置入同种支架 1 枚。术后 3 d 予低分子肝素 250 IU/kg,每日 2 次;青霉素 160 万 IU,每日 2 次。

1.4 病理组织形态学观察

观察终点当日复查血管造影,评估支架段血管。过度麻醉处死动物,取出带支架血管。(1)选取支架段 1.0 cm × 0.5 cm 血管壁,2.5%戊二醛固定 2~3 h,1%锇酸固定 2h,脱水临界点干燥,离子溅射镀膜。扫描电镜(日本 JEOL-6380LV)观察内皮细胞愈合及炎症细胞浸润情况。(2)剩余血管以 10%多聚甲醛固定,包埋,切片(德国 Leica SP1600 切片机),HE 染色。OLYMPUS 显微镜和 MIQAS 微图像定量分析系统形态学观察,测定支架段血管切片新生内膜厚度、面积、炎症积分及损伤积分。损伤积分评估标准:内弹力板完整为 0 分;内弹力板断裂为 1 分;内弹力板和中膜断裂为 2 分;外弹力板断裂为 3 分^[4]。炎症积分评估标准:无内膜炎症为 0 分;散在炎症细胞为 1 分;25%~50%血管周径内支架被炎症细胞包绕 50%为 2 分;25%~50%血

管周径内支架点被炎症细胞完全包绕为 3 分。

1.5 统计学处理

由 SPSS 16.0 统计软件进行处理,两组间计量数据比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 支架置入情况

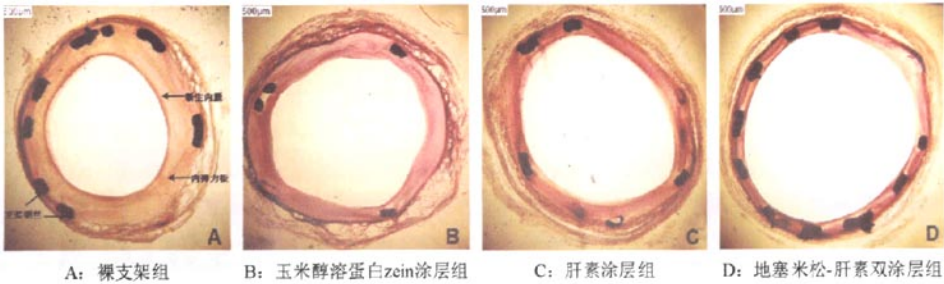
动物麻醉、置入及血管造影过程顺利,64 枚支架均成功置入,术后即刻血管造影示血管通畅。随访期间动物均存活,处死时血管造影各组相关动脉通畅,取出支架段血管大体观未见闭塞,血栓等情况。

2.2 光镜下形态学测量结果

4 周时,仅 A 组部分支架可见管腔内少量血栓

形成,其余各组均未见血栓形成。损伤积分评估各组,差异无显著性(*P*>0.05)。炎症积分 A 组和 B 组相近,C 组轻于前 A 组和 B 组,但未达统计学意义,D 组显著优于其他 3 组(*P*<0.05)。D 组平均新生内膜厚度、内膜面积及管腔面积均显著优于 A、B、C 组,A、B、C 组间无统计学差异。

12 周时,各组反应内膜增生的指标均有所加重,管腔面积减小,但各组较 4 周时的对应指标无显著差异。4 组中 D 组在平均新生内膜厚度、内膜面积、管腔面积及炎症积分方面仍有显著优势(见图 1、表 1)。



注:D 组 12 周时内膜增生明显较轻

图 1 12 周时各组支架段血管病理学切片观察(HE 染色 ×40)

表 1 各组支架置入术后血管组织形态学参数比较

支架组别	管腔面积(mm ²)	新生内膜厚度(μm)	新生内膜面积(mm ²)	炎症积分	损伤积分
4 周					
A 组(n=6)	2.68±1.28	295±138	2.47±1.35	1.85±0.46	2.10±0.58
B 组(n=6)	2.59±1.31	309±79	2.54±1.09	1.81±0.54	2.23±0.52
C 组(n=6)	2.85±0.86	245±101	2.16±1.35	1.68±0.56	2.33±0.57
D 组(n=6)	3.21±1.09*	103±64*	1.42±0.63*	1.03±0.43*	2.25±0.64
12 周					
A 组(n=10)	1.76±0.79	326±117	2.74±0.94	1.59±0.38	1.97±0.47
B 组(n=10)	1.53±0.64	341±143	3.15±1.14	1.61±0.41	2.03±0.43
C 组(n=10)	2.18±1.03	271±147	2.43±0.97	1.35±0.54	2.01±0.50
D 组(n=10)	2.58±0.33*	147±106*	1.86±0.48*	0.98±0.41	2.11±0.42

注:D 组与其他 3 组比较, * *P*<0.05

2.3 电镜扫描结果

4 周及 12 周时,A 组,B 组及 C 组支架段血管可见不同程度的内皮细胞排列紊乱,部分血管管腔内支架丝裸露,修复不完全。D 组支架间隙血管内皮细胞排列整齐,仅有少量的脂质和红细胞黏附,炎症细胞少见,未见形成血栓,支架处内皮覆盖良好。

3 讨论

玉米醇溶蛋白 zein 是一种主要的谷物储存蛋白,由一个二硫键连接的异二聚体构成,相对分子质量为 44 000,因其能溶于乙醇而得名,在体内可被胰蛋白酶(trypsin)或胶原酶(collagenase)消化,其自身及其降解产物生物相容性良好,应用前景广阔。Sun 等^[5]将其制成颗粒状微球(Pzein)或片状

薄膜(Fzein)结构,与聚乳酸(PLA),聚羟基丁酸(PHB)及胶原等材料比较,发现其具有优良的生物相容性和降解性。Wang 等^[6]将其包载肝素,制成直径数百微米大小的微球,在体外实验中能促进人脐带静脉内皮细胞(HUVECs)的生长,凝血酶时间实验证实有较好抗凝血性能。

炎症反应和继发性血栓形成是导致支架术后发生 ISR 的两个重要因素^[7, 8]。地塞米松和肝素分别是临床常用的甾体类抗炎药和抗血栓药。本实验以生物可降解的玉米醇溶蛋白 zein 为载体包埋地塞米松和(或)肝素制成相应的 DES,并将其植入健康小型猪血管损伤模型,观察其对 ISR 的预防作用。其中,在地塞米松-肝素双因子控释支架中,地塞米松在近管壁侧,肝素在近管腔侧,两者以玉米醇溶蛋白 zein 为基质结合于支架,并使包埋药物随其缓慢降解而逐步释放。

本实验结果显示,在小型猪血管损伤模型中,随访 4 周时,各组血管新生内膜平均厚度,内膜面积及管腔面积均以 D 组最具优势,无支架内血栓发生,提示其预防 ISR 作用与双因子控释支架洗脱药物抗炎反应,抗细胞增生及抗血栓活性有关。另外,治疗组炎症反应较轻,内皮细胞排列整齐,上皮修复良好,说明玉米醇溶蛋白及其降解产物细胞相容性较好。随访 12 周时,与其他组相比, D 组对 ISR 发生的抑制明显。可能机制是随着玉米醇溶蛋白 zein 基质降解,双因子涂层持续释放局部高浓度的地塞米松和肝素,两者在支架局部实现了持续性抗炎和抗栓效应的叠加。一方面,地塞米松通过阻断炎症介质释放、抑制炎症因子表达及诱导炎症细胞凋亡等机制发挥抗炎抗增生作用;另一方面,控释肝素通过增强抗凝血酶Ⅲ和蛋白 C,抑制血小板的黏附等途径发挥抗血栓作用,防止急性或亚急性血栓的形成。

另外,在本实验在 4 周及 12 周时, C 组对内膜增生和血栓形成的抑制作用优于 A 组与 B 组,这可

能是肝素涂层抗血栓效应和抗炎活性的体现。然而,该组仍有明显的内膜增生,且 3 组间无显著差异,这也说明地塞米松-肝素双因子控释支架可能在多个靶点抑制血管内膜过度增生和急性或亚急性血栓形成,预防术后 ISR 的发生。

总之,以植物源玉米醇溶蛋白 zein 包载的地塞米松-肝素双因子洗脱支架在健康小型猪血管损伤模型中,可以显著抑制支架术后 4 周和 12 周的内膜增生,防止血栓形成,生物相容性良好,有较好的临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] Kraitzer A, Kloog Y, Zilberman M. Approaches for prevention of restenosis[J]. J Biomed Mater Res B App Biomater, 2008, 85(2): 583-603.
- [2] Finn AV, Nakazawa G, Joner M, et al. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(7): 1500-1510.
- [3] Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, et al. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden[J]. N Engl J Med, 2007, 356(10): 1009-1019.
- [4] Cilingiroglu M, Elliott J, Patel D, et al. Long-term effects of novel biolimus eluting DEVAX AXCESS plus nitinol self-expanding stent in a porcine coronary model[J]. Cathet Cardiovasc Interv, 2006, 68(2): 271-279.
- [5] Sun QS, Dong J, Lin ZX, et al. Comparison of cytocompatibility of zein film with other biomaterials and its degradability in vitro [J]. Biopolymers, 2005, 78(5): 268-274.
- [6] Wang HJ, Lin ZX, Liu XM, et al. Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility[J]. J Control Release, 2005, 105(1-2): 120-131.
- [7] Weintraub WS. The pathophysiology and burden of restenosis[J]. Am J Cardiol, 2007, 100(5A): 3K-9K.
- [8] Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(1): 193-202.

(收稿:2010-05-18 修回:2010-07-01)

(本文编辑:丁媛媛)