

# As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CD133 抗体双面涂层药物洗脱支架的动物实验研究

马建军 高学忠 黄明远 张素勤 吴连拼

**【摘要】** 目的:初步探讨 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CD133 抗体双面涂层药物洗脱支架在动物体内的治疗作用。 方法:60 只中华小型猪非高脂饮食喂养 4 周,随机分为球囊损伤组、假手术组和双面涂层支架组,造模后继续喂养 4 周,行冠状动脉光学相干断层成像(OCT)后处死动物,取心肌组织行免疫组化检测。 结果:OCT 图像显示,球囊损伤组冠状动脉斑块明显扩大,内膜增厚,纤维帽厚度明显增加;与球囊损伤组相比,双面涂层支架组斑块明显缩小,内膜增厚不明显,纤维帽厚度无明显增加;假手术组冠状动脉基本正常。双面涂层支架组冠状动脉的内膜/中膜面积比和厚度比低于球囊损伤组,但仍高于假手术组( $P < 0.05$ )。免疫组化结果表明,球囊损伤组心肌 Bax 和 Bcl-22 的表达明显高于假手术组,双面涂层支架组 Bax 和 Bcl-22 的表达明显低于球囊损伤组( $P$  均  $< 0.01$ ),而与假手术组无明显差异。 结论:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CD133 抗体双面药物涂层支架能显著抑制冠状动脉内膜增殖,抑制心肌凋亡。

**【关键词】** 药物洗脱支架;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;CD133 抗体

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.05.017

**Animal study of a double coated drug-eluting stent of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CD133 antibody** MA Jian-jun<sup>1</sup>, GAO Xue-zhong<sup>1</sup>, HUANG Ming-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Su-qin<sup>2</sup>, WU Lian-pin<sup>2</sup>. 1. Department of Cardiovascular, First Hospital of Aksu Prefecture, Xinjiang Uygur Autonomous Region 843000, China; 2. Department of Cardiovascular, Second Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effect of a double coated drug-eluting stent of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CD133 antibody. **Methods:** A total of 60 China miniature pigs were feeded with non-fat diet for 4 weeks, then randomly divided into 3 groups: balloon injury group, sham group and stent implantation group. After relative treatment, pigs were raised for another 4 weeks. All animals were sacrificed after optical coherence tomography (OCT) examination and cardiac tissue was subjected to immunohistology analysis. **Results:** It was showed by OCT that coronary plaque enlarged, and endothelium and fibrous cap thickened in balloon injury group, but vascular lesions in stent implantation group were significantly reduced. The coronary intima / media thickness ratio and area ratio in stent implantation group was lower than those in balloon injury group, but higher than those in sham group ( $P < 0.05$ ). The protein expression of Bax and Bcl-22 in balloon injury group was significantly higher than those in sham group and stent implantation group ( $P < 0.01$ ). But there were no significant differences between sham group and stent implantation group. **Conclusion:** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CD133 antibody double coated drug-eluting stent significantly inhibits intimal proliferation and reduces myocardial apoptosis.

**【Key words】** Drug-eluting stent; As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; CD133 antibody

作者单位:843000 新疆维吾尔自治区,阿克苏地区第一人民医院心内科(马建军,高学忠);325000 浙江,温州医科大学附属第二医院心内科(黄明远,张素勤,吴连拼)

通信作者:吴连拼,Email: wzwlp@sina.com

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)经历了由单纯经皮腔血管成形术(PTCA)到冠状动脉内支架置入术及相关技术的发展,其中,冠状动脉内支架置入术作为 PCI 的代表性技术被国内外指南所推荐<sup>[1-3]</sup>。冠状动脉内支架也从裸金属支架(BMS)发展为多种类型的药物洗脱支架(DES)。冠状动脉内支架置入术解决了单纯 PTCA 急性血管闭塞的难题,使再狭窄率由 PTCA 时代的 30%~58%,降低到 DES 时代的 5%~10%<sup>[4]</sup>。DES 可抑制血管平滑肌细胞增生、迁移,降低再狭窄率,但因其同时也抑制内皮细胞对损伤血管段的修复,影响支架置入部位血管的再内皮化<sup>[5]</sup>,造成晚期支架内血栓形成。支架内血栓形成病情凶险,死亡率高(约 40%)。我国每年 DES 置入患者已超过 30 万<sup>[4]</sup>,并以 30%的速度逐年增长。研制既能防止支架内血栓形成,又降低再狭窄发生率的功能性 DES 是临床的迫切需求。

本研究利用球囊损伤建立急性心肌损伤动物模型,于损伤冠状动脉内置入自行设计的管壁层含  $\text{As}_2\text{O}_3$ 、血管腔面含 CD133 抗体的支架,旨在初步探讨该支架的治疗作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

60 例中华小型猪来自温州医科大学实验动物中心,SPF 级。新型支架由上海爱普生医疗器械有限公司友情提供。免疫组化试剂购自上海世易生物科技有限公司。

### 1.2 急性心肌损伤动物模型的建立

小型猪经普通非高脂饲料饲养 4 周后,于造模前禁食 10 h,禁水 4 h。给予戊巴比妥钠 1 mg/kg 腹腔注射麻醉,直视下分离并穿刺右股动脉,置入 6F 动脉鞘管,鞘内一次性注入普通肝素 100 U/kg 抗凝。X 线透视下沿鞘送入 6F JL4.0 指引导管至左冠状动脉主干开口。沿指引导管将指引导丝送至前降支远端,后沿导丝送入光学相干断层成像(OCT)专用阻断球囊(直径 2.0 mm)至前降支中段,以 2 个大气压扩张球囊阻断冠状动脉前降支,持续时间 600 s。阻断同时给予肝素化生理盐水进行灌洗。如阻断过程中出现心室颤动则予非同步直流电 200 J 进行除颤复律。

### 1.3 实验分组及处理

将 60 只参与研究的中华小型猪进行编号,应用 Excel 软件 RAND 公式产生随机数,将实验动物平

均分为 3 组。

(1)球囊损伤组:非高脂饮食喂养 4 周后,进行球囊损伤。

(2)假手术组:非高脂饮食喂养 4 周后,进行分离显露股动脉及 OCT 等手术操作,但不对前降支进行球囊损伤。

(3)双面涂层支架组:非高脂饮食喂养 4 周后,进行球囊损伤,操作完毕撤回球囊后,于损伤冠状动脉内置入  $\text{As}_2\text{O}_3$ /CD133 双面涂层支架(10 个大气压扩张释放)。

所有操作结束后,缝合伤口,继续饲养,同时给予实验动物生理盐水腹腔注射,每日 2 次,共 4 周。4 周后 3 组动物均进行 OCT 检查,处死动物,取前壁心肌组织。

### 1.4 观察指标

1.4.1 OCT 观察 观察冠状动脉斑块性质、纤维帽的厚度,同时测定内膜及中膜的厚度、面积,计算内膜/中膜的厚度比和面积比。

1.4.2 Bax 和 Bcl-22 的免疫组织化学染色 将心肌组织标本经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,以 2  $\mu\text{m}$  层厚连续切片。取上述各组连续切片各 1 张,常规脱蜡至水,严格按照试剂盒说明书进行免疫组化后续操作。中性树胶封闭镜检。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,设置阴性对照。镜下蛋白阳性表现为棕色,呈颗粒状弥漫性分布。数码显微照相采集图像,每张切片随机选取 5 个高倍视野,应用 Image Pro Plus 图像分析系统测定切片各视野阳性点面积总和及累积吸光度值,以平均吸光度值表示 Bax 及 Bcl-22 蛋白阳性表达强度。

### 1.5 统计学分析

计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,两样本均数的比较采用单因素方差分析,多个样本均数间的多重比较采用 SNK- $q$  检验。采用 SPSS18.0 软件进行统计分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OCT 观察

球囊损伤组冠状动脉斑块明显扩大,内膜增厚,纤维帽厚度明显增加;与球囊损伤组相比,双面涂层支架组斑块明显缩小,内膜增厚不明显,纤维帽厚度无明显增加;假手术组冠状动脉基本正常(见图 1)。双面涂层支架组的内膜/中膜面积比和厚度比低于球囊损伤组,但仍高于假手术组( $P<0.05$ ,见表 1)。

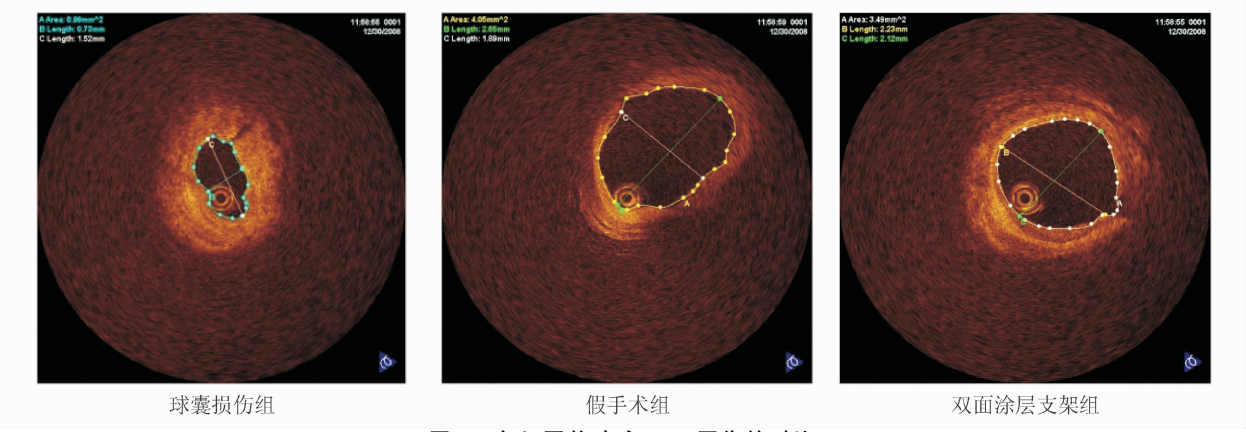


图 1 各组冠状动脉 OCT 图像的对比

表 1 各组冠状动脉内膜/中膜厚度比和面积比

	内膜/中膜厚度	内膜/中膜面积
球囊损伤组	2.12 ± 0.74	2.23 ± 0.72
假手术组	1.52 ± 0.81 <sup>(1)</sup>	1.89 ± 0.74 <sup>(1)</sup>
双面涂层支架组	1.74 ± 0.66 <sup>(1)(2)</sup>	2.01 ± 0.56 <sup>(1)(2)</sup>

注：与球囊损伤组相比，<sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ ；与假手术组相比，<sup>(2)</sup>  $P < 0.05$

2.2 凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-22 的表达

免疫组化结果表明，球囊损伤组 Bax 和 Bcl-22 的表达明显高于假手术组，双面涂层支架组 Bax 和 Bcl-22 的表达明显低于球囊损伤组 ( $P$  均  $< 0.01$ )，而与假手术组无明显差异 (见表 2)。

表 2 各组心肌组织 Bax 和 Bcl-22 表达强度

	Bax	Bcl-22
球囊损伤组	74.4 ± 6.9	64.0 ± 7.2
假手术组	13.2 ± 5.1 <sup>(1)</sup>	17.8 ± 4.8 <sup>(1)</sup>
双面涂层支架组	21.2 ± 5.3 <sup>(1)</sup>	21.7 ± 5.6 <sup>(1)</sup>

注：与球囊损伤组相比，<sup>(1)</sup>  $P < 0.01$

3 讨论

DES 的结构包括金属支架、聚合物及溶解于聚合物中的药物。目前经过批准应用于临床的 DES 药物有西罗莫司、紫杉醇、依维莫司等，药物溶解于聚合物后通过缓慢释放作用于支架黏附的血管壁，抑制平滑肌增殖、迁移，从而防止支架置入后再狭窄的发生。

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是 FDA 批准的治疗急性早幼粒细胞白血病的药物。体外研究表明，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可抑制细胞生长周期及诱导细胞凋亡。在兔颈动脉损伤模型中腹腔内注射 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可引起 Bcl-2 表达下调、Bax 表达上调，导致平滑肌细胞凋亡。国内研究者设计了

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 涂层支架并与紫杉醇、西罗莫司等涂层支架进行了比较，发现它们在预防支架内再狭窄发生率方面效果相似。

DES 中的药物在抑制平滑肌增殖的同时，也抑制了内皮细胞对损伤血管段的修复，影响支架置入部位血管的再内皮化。DES 导致晚期支架内血栓的主要原因因为内皮化不全。

人体外周血中广泛存在多潜能内皮祖细胞，其中 CD34<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2)<sup>+</sup> 的内皮祖细胞可定向分化为内皮细胞。利用支架捕获这些内皮祖细胞可促进损伤内皮的修复。近年来，一种新型支架——Genous 支架，其表面有 CD34 抗体涂层，可捕获循环中的内皮祖细胞，加速支架段血管的内皮化过程，从而抑制远期支架内血栓形成。这种支架在动物实验和临床试验中均显示出了良好的效果，而且在仅使用双联抗血小板治疗 1 个月的情况下并未增加晚期支架内血栓事件的发生率<sup>[6-10]</sup>。TRIAS-HR 研究比较了内皮祖细胞捕获支架和传统 DES 置入术后 1 年的主要终点事件，内皮祖细胞捕获支架组靶血管再狭窄率较传统 DES 组高，但是晚期支架血栓发生率低<sup>[11]</sup>。van Beusekom 等<sup>[12]</sup> 将不同支架置入猪冠状动脉进行疗效对比，发现内皮捕获支架组血管内皮化加快，但并未抑制新生内膜增厚。

由于 CD34 也表达在成熟脱落的内皮细胞上，特异性较差，分化能力不足。因此 Genous 支架存在以下局限性：(1) 捕获的内皮祖细胞过于成熟，分化作用有限；(2) 抗原的特异性低，血管中脱落的内皮细胞也可被捕获；(3) 没有同时采用抑制平滑肌细胞增殖的药物。对 CD133 的研究证实，在体外纯化的 CD133<sup>+</sup> 细胞能够分化成内皮细胞，并且

CD133 是一个高度保守的抗原,它只表达在未成熟的内皮祖细胞,未成熟的内皮祖细胞具有较强的分化能力。因此,捕获 CD133<sup>+</sup> 内皮祖细胞的支架可能在加强内皮愈合和功能恢复上会有更好的效果。

鉴于 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 CD133 抗体抑制平滑肌细胞增殖、修复血管内皮的功能,我们设计了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CD133 抗体复合双面涂层支架。本研究初步探讨这种双面涂层支架的治疗作用,证明该支架可以抑制损伤处血管内膜增生,减少心肌梗死。该型支架设计思路可行,但缺乏与传统 DES 的对比实验。今后我们将着重探讨这种支架促进内皮修复和抑制平滑肌增殖的双重作用,并与 DES 对比分析,以期为临床提供更好的支架选择。

### 参 考 文 献

- [1] Fihn SD, Gardin JM, Abrams J, et al. 2012 ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines, and the American College of Physicians, American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons [J]. Circulation. 2012, 126 (25): e354-e471.
- [2] American College of Emergency Physicians; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, O'Gara PT, Kushner FG, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(4): e78-e140.
- [3] Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg PG, James SK, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation [J]. Eur Heart J, 2012, 33(20): 2569-2619.
- [4] 潘春仰,邱建平,沈卫峰. 冠状动脉药物洗脱支架术后再狭窄研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(6): 341-344.
- [5] Buja LM. Vascular responses to percutaneous coronary intervention with bare-metal stents and drug-eluting stents: A perspective based on insights from pathological and clinical studies[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57(11): 1323-1326.
- [6] Nakazawa G, Granada JF, Alviar CL, et al. Anti-CD34 antibodies immobilized on the surface of sirolimus-eluting stents enhance stent endothelialization[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2010, 3(1): 68-75.
- [7] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(10): 1574-1579.
- [8] Co M, Tay E, Lee CH, et al. Use of endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate- to long-term clinical follow-up [J]. Am Heart J, 2008, 155(1): 128-132.
- [9] Cassese S, Galasso G, Sciahbasi A, et al. Antiplatelet the Rapy after Genous EPC-capturing coronary stenT implantation: the ARGENTO study: a prospective, multicenter registry [J]. Int J Cardiol, 2013, 167(3): 757-761.
- [10] Lee YP, Tay E, Lee CH, et al. Endothelial progenitor cell capture stent implantation in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction: one year follow-up[J]. EuroIntervention, 2010, 5(6): 698-702.
- [11] Klomp M, Beijk MA, Varma C, et al. 1-year outcome of TRIAS HR (TRI-stent adjudication study-high risk of restenosis) a multicenter, randomized trial comparing genous endothelial progenitor cell capturing stents with drug-eluting stents [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2011, 4(8): 896-904.
- [12] van Beusekom HM, Ertas G, Sorop O, et al. The Genous<sup>TM</sup> endothelial progenitor cell capture stent accelerates stent re-endothelialization but does not affect intimal hyperplasia in porcine coronary arteries [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2012, 79(2): 231-242.

(收稿:2014-07-01 修回:2014-09-05)

(本文编辑:梁英超)