

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01324

层层自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜对支架血栓形成的影响

于文¹, 蒋金法¹, 孟晟², 金惠根³, 秦永文⁴, 徐文俊¹, 钟伟², 刘宗军^{3*}

1. 同济大学附属同济医院心内科, 上海 200065
2. 复旦大学高分子科学系, 上海 200433
3. 上海中医药大学附属普陀医院心内科, 上海 200062
4. 第二军医大学长海医院心内科, 上海 200433

[摘要] **目的:** 观察层层自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜对支架血栓形成的影响。**方法:** 通过逐层自组装的方式将壳聚糖和肝素逐层结合在 316L 不锈钢槽内, 制成不同层数的涂层膜, 以凝固法测定健康人血液在聚合物膜和不锈钢上作用 2 h 后的部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT) 和凝血酶时间 (TT), 并检测其抗凝血功能的稳定性。制备壳聚糖/肝素复合涂层膜支架, 研究复合涂层膜支架在猪动静脉分流血栓模型中对支架血栓形成的影响。**结果:** 各组复合涂层膜 APTT 和 TT 均较 316L 不锈钢组极显著延长 ($P < 0.01$), 并且 APTT 和 TT 延长和复合涂层膜层数增加相关。复合涂层膜在 2 周内上述凝血功能无显著差异 ($P > 0.05$)。在猪动静脉分流血栓模型中, 复合膜涂布的金属支架形成的血栓重量极显著低于 316L 裸支架 ($P < 0.001$)。**结论:** 层层自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜具有极显著的抗支架血栓作用, 而且具有良好的稳定性。

[关键词] 壳聚糖; 肝素; 自组装; 血栓形成; 支架

[中图分类号] R 541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1324-04

Effects of composite Chitosan/Heparin coated membrane through a layer by layer self-assemble technique on stent thrombosis

YU Wen^{1*}, JIANG Jin-fa¹, MENG Sheng², JIN Hui-gen³, QIN Yong-wen⁴, XU Wen-jun¹, ZHONG Wei², LIU Zong-jun^{3*}

1. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China
2. Department of Macromolecule Science, Fudan University, Shanghai 200433
3. Department of Cardiology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062
4. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of the composite chitosan/heparin coated membrane through a layer-by-layer self-assemble technique on stent thrombosis. **Methods:** The composite chitosan/heparin coated membrane, which was assembled through a layer-by-layer technique, was attached to the inside surface of cylinder made from 316L stainless steel flake to form membranes of different layers of chitosan/heparin. The activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) of the whole blood samples of healthy controls were examined by clotting method; and the stability of its anticoagulation effect was also examined. The influence of the prepared composite chitosan/heparin coated membrane on coronary stent thrombosis was investigated using swine model of arteriovenous shunt thrombus. **Results:** The APTT and TT were significantly longer in the composite coated membrane group compared with those of 316L stainless steel group ($P < 0.01$). Moreover, the prolongation of APTT and TT was correlated with the increase of coated layers. The anticoagulant function of chitosan/heparin coated membrane was stable for two weeks ($P > 0.05$). The weight of thrombus was significantly lower in the coated stent group than that in 316L stainless steel group ($P < 0.001$). **Conclusion:** The composite chitosan/heparin coated membrane made by layer-by-layer self-assemble has effective and stable anti-thrombotic function.

[KEY WORDS] chitosan; heparin; self-assemble; thrombosis; stents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1324-1327]

药物涂层支架 (DES) 显著降低了冠脉支架再狭窄率, 但是近年来许多研究表明, DES 植入后可导致

[收稿日期] 2008-05-07 **[接受日期]** 2008-07-01

[作者简介] 于文, 硕士生, 主治医师, 现在上海中医药大学附属普陀医院麻醉科, 上海 200062. E-mail: yuw73@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-62572723-8133, E-mail: ljz72@126.com

支架血栓尤其是支架晚期血栓的发生^[1-3], 尽管双重抗血小板治疗可显著减少支架内血栓的发生, 但也可能增加一些出血性疾病的发生率。支架涂层材料是导致支架内皮化延迟、血栓形成的重要因素^[3-5], 因此研制具有优良生物相容性的支架涂层以促进冠脉支架内皮的早期修复和增强支架局部抗栓作用可能是有效的解决途径^[6]。

壳聚糖是自然界中存在的天然阳离子聚合物, 已有研究表明壳聚糖具有优良的促进血管内皮细胞生长的作用^[7-8]。肝素是一种天然的阴离子聚合物, 是临床中抗凝作用确切、应用广泛的抗凝剂, 临床试验表明肝素涂层支架可抑制亚急性支架内血栓形成^[9-10]。壳聚糖和肝素是静电自组装非常合适的配对材料, 我们应用生物大分子自组装方法将这两种含有相反电荷的大分子材料通过静电作用结合在支架表面, 观察其对支架血栓形成的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料 壳聚糖, 上海自由人国际贸易有限公司(脱乙酰度 78.6%, 粘度 90 000 Pa·s); 肝素: 江苏万邦生化医药股份有限公司, 批号: 0603110。

1.2 自组装方法制备壳聚糖/肝素复合涂层膜 将经表面处理, 带有正电荷的 316L 不锈钢槽在肝素溶液中浸泡, 然后取出用水漂洗干净, 再浸入壳聚糖溶液, 取出后漂洗, 再浸入肝素溶液, 如此反复, 得到所需层数的壳聚糖/肝素复合涂层修饰的不锈钢样品。用 OCA15 静态接触角分析仪测定接触角并用 KSV QCM-Z500 石英微天平来在线跟踪观测层层自组装结构的形成过程。

1.3 壳聚糖/肝素复合涂层膜支架的制备 将 316L 不锈钢裸支架浸泡在 20% NaOH 溶液中充分清洗, 再用蒸馏水洗净, 干燥; 后将支架浸泡在 20 ml 1% APTES 乙醇溶液中, 并在溶液中加入 1 滴 1% HCl 溶液, 超声反应 2 h, 将支架取出用无水乙醇清洗 3 次, 干燥; 先将上述经表面处理后的支架浸泡在 0.1% 肝素钠水溶液中, 1 min 后取出, 用蒸馏水洗净, 再将支架浸泡在 0.1% 壳聚糖溶液中, 1 min 后取出, 用蒸馏水洗净, 反复上述过程 10 次, 用扫描电子显微镜观察复合涂层膜支架的形态变化。

1.4 实验分组 (1) 316L 不锈钢片组, 以 316L 不锈钢片做成的直径为 3.5 cm 的圆柱形凹槽; (2) 自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜 (C/H) 组, 在直径为 3.5 cm 不锈钢槽内表面涂以自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜, 分别制备层数为 3、5、8、10 的涂层膜, 根据复合膜的层数分为 C/H3、C/H5、C/H8、C/H10

四组。

1.5 体外抗凝血功能及其稳定性的检测 以凝固法(散射光比浊), 用型号 sysmex CA-1500 全自动凝血功能检测仪测定。抽取健康成人全血, 迅速置于加入 0.2 ml 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝剂的抗凝管中, 然后倒入上述各组的底部, 作用 2 h, 1 000×g 离心 15 min, 取血浆, 上机测部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT) 和凝血酶时间 (TT)。每组重复 6 次。

稳定性的检测: 将自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜浸泡在 pH 7.4 的 PBS 中, 置于振荡床上, 分别于在第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天时检测上述凝血指标。每组重复 6 次。

1.6 动静脉分流血栓模型制备 取健康广西小型雄性猪 1 只, 清洁级, 体质量 30 kg, 以氯胺酮 (5 mg/kg) 和地西洋 (0.5 mg/kg) 皮下注射用于基础麻醉, 再用戊巴比妥钠 (25 mg/kg) 静脉麻醉, 常规气管插管。分离右侧股动静脉, 直视下穿刺股动静脉, 结扎远心端, 均置入 8F 动脉鞘管, 以肝素生理盐水冲刷鞘管。

将壳聚糖和肝素自组装在尺寸为 3.0 mm×18 mm (直径×长度) 316 L 不锈钢裸支架 (BMS) 表面, 干燥后称重。将此支架和裸支架置于一直径 3.0 mm 的橡胶管道中, 管道的两端分别与植于猪股动静脉的鞘管连接, 使血液流以 120 ml/min 流经此管道 60 min, 取下以生理盐水冲刷 3 次, 小心取出支架, 干燥后称重。经处理后电子显微镜下观察支架表面血栓形成的情况, 每组重复样本数 6 个。

1.7 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析, 二组间比较用 q 检验。统计均用 SPSS 11.0 软件包分析。以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜的理化性能 不锈钢表面水接触角大约在 64° 左右, 涂覆了肝素/壳聚糖层层自组装膜后, 随着组装层数的增加, 其水接触角依次阶梯状减小, 在达到 10 层厚度时, 其水接触角降低至 30° 以下, 亲水性得到大大提升。

通过石英微天平在线跟踪观测, 可以清楚地观察到石英晶体传感器表面层层自组装结构的形成过程。每次向样品室中注入壳聚糖或肝素水溶液时, 均能观察到共振频率的突越性变化。

自组装壳聚糖/肝素复合膜涂布 10 层的金属支架在 PBS 中用 12 个大气压 (1 个大气压 = 10⁵ kPa) 扩

张 15 s。用扫描电子显微镜检测,放大 27 倍可见支架表面光滑,无变形,无开裂;放大 100 倍可见支架扩张后涂层膜贴壁完全,不存在脱落或撕裂现象,且涂层膜非常薄(图 1)。

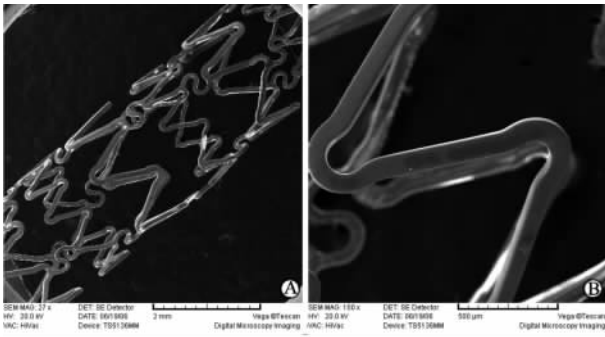


图 1 10 层壳聚糖/肝素复合涂层膜支架扫描电镜照片
Fig 1 Images of chitosan/heparin coated stent with 10 layers by scanning electron microscope
Original magnification: ×27(A), ×100(B)

2.2 自组装壳聚糖/肝素复合涂层膜体外对凝血功能影响及稳定性 与不锈钢组比较,各组复合涂层膜测定 APTT 和 TT 均显著延长($P < 0.01$),并且 APTT、TT 延长和 C/H 层数增加相关。而凝血酶原时间(PT)仅在 C/H8 和 C/H10 组较不锈钢组显著延长($P < 0.01$,图 2)。通过对凝血功能的检测发现 8 层复合涂层膜和 10 层复合涂层膜对凝血功能的影响无显著差异($P > 0.05$),故选用 8 层的复合涂层膜测定稳定性。在流动的 PBS 中浸泡 1、3、7 和 14 d 后其上述凝血功能无显著差异($P > 0.05$,图 3)。

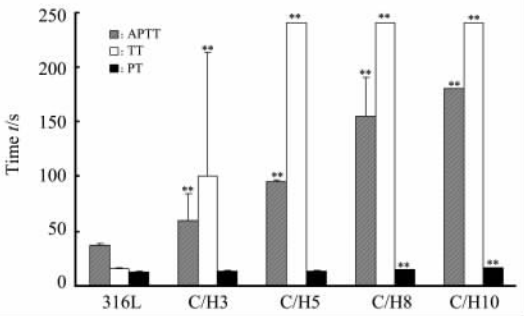


图 2 壳聚糖/肝素复合涂层膜对凝血功能影响
Fig 2 Influence of chitosan/heparin(C/H) coatings with 3,5,8 and 10 layers on blood coagulation function

APTT: Activated partial thromboplastin time; TT: Thrombin time; PT: Prothrombin time; * $P < 0.01$ vs 316L group; $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 壳聚糖/肝素复合涂层膜在猪动静脉分流血栓模型中对血栓形成的作用 在猪动静脉分流血栓模

型中,自组装壳聚糖/肝素复合膜涂布 10 层的金属支架(316L 不锈钢支架)和裸支架形成的血栓重量分别为 (3.0 ± 0.9) mg 和 (0.8 ± 0.4) mg,复合涂层膜支架形成的血栓极显著低于裸支架($P < 0.001$)。扫描电镜显示壳聚糖/肝素复合膜涂布的金属支架表面仅有少量的血栓,而裸支架表面布满血栓(图 4)。

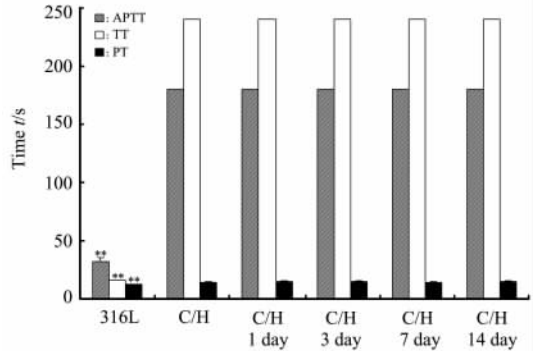


图 3 8 层壳聚糖/肝素复合涂层膜对凝血功能的影响
Fig 3 Influence of chitosan/heparin(C/H) coatings with 8 layers soaked in PBS for different days on blood coagulation function
** $P < 0.01$ vs other groups; $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

有大量研究报道,以壳聚糖为代表的天然多糖等带有正电荷的高分子材料具有良好的生物相容性,将它们涂在材料的表面,具有加速材料表面内皮化的作用^[6-8,11],但是这些材料往往是水溶性的,在血管中容易流失。而以肝素为代表的聚阴离子材料有很好的抗凝血性能,但是它们也是水溶性的,也存在流失的问题。

层层自组装(layer by layer self-assembly)是一种新颖的高分子间连接技术,它利用不同种类高分子间的静电引力或氢键作用等特殊的作用力,形成 2 种或多种聚合物单分子层的层层叠加,所得的薄膜厚度极小(一般在几十个纳米)并兼具有各组分原本的一定功能性^[11]。我们将可促内皮化的带正电荷的壳聚糖与可抗凝血的带负电荷的肝素通过聚电解质层层自组装的方法组成复合涂层。实验表明:(1)壳聚糖/肝素复合膜涂层支架具有极显著的抗血栓作用;(2)壳聚糖/肝素复合涂层膜具有良好的稳定性。这种壳聚糖/肝素大分子复合物相对于单独的壳聚糖和肝素而言,由于两组分子间的静电相互作用,克服了它们共同具有的易于流失、强度低的缺陷,相对于已有的通过共价键结合的肝素涂层,可以更好地保存肝素的天然构象和抗凝活性,使之具有抗栓作用。

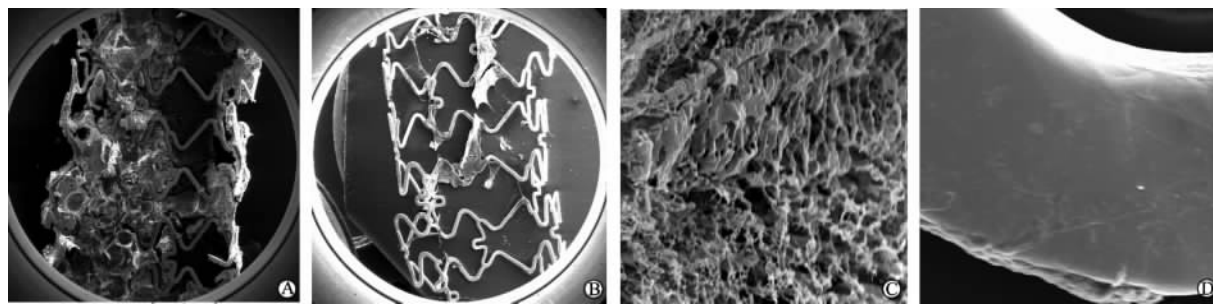


图 4 10 层壳聚糖/肝素复合涂层膜支架与裸支架表面血栓的扫描电镜照片

Fig 4 Images of thrombus on bare metal stent(BMS) and chitosan/heparin(C/H) coated stent with 10 layers by scanning electron microscope

A, C; BMS; B, D; C/H10. Original magnification: $\times 16$ (A, B); $\times 1\ 000$ (C, D)

现已临床应用的两种 DES 所使用的聚合物材料均为合成高分子材料[Cypher 支架使用聚甲基丙烯酸正丁酯/聚醋酸乙烯酯(PBMA/PEVA); Taxus 支架使用苯乙烯-异丁烯-苯乙烯共聚物(SIBS)], 包括现在已广泛应用于药物控制释放和组织工程等的乙交酯-丙交酯共聚物(PLGA)、聚己内酯(PCL)等可降解合成高分子材料, 根据文献^[12]以及我们课题组的研究经验^[11], 这些材料本身也不具备抗凝血活性, 相反相对于血管内皮细胞而言, 这些外来的异物都具有引发血栓的可能性; 而且这些材料本身都不利于细胞的黏附和生长, 存在引发炎症反应的可能性。即使是金属裸支架也存在着异物诱发血栓的问题, 曾经有肝素涂层支架的报道, 但是并没有被临床所接受^[13]。其主要原因可能在于: (1) 肝素被共价结合在金属支架表面后, 由于其构象受到限制, 可能造成抗凝血活性降低; (2) 用于固定肝素的涂层聚合物仍然存在生物相容性的问题, 既没有促进内皮愈合效果, 对再狭窄也没有明显贡献。

[参考文献]

[1] Rodriguez A E, Maree A O, Mieres J, Berrocal D, Grinfeld L, Fernandez-Pereira C, et al. Late loss of early benefit from drug-eluting stents when compared with bare-metal stents and coronary artery bypass surgery: 3 years follow-up of the ERACI III registry[J]. *Eur Heart J*, 2007, 28: 2118-2125.

[2] Lagerqvist B, James S K, Stenestrand U, Lindbäck J, Nilsson T, Wallentin L, et al. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1009-1019.

[3] Ong A T, McFadden E P, Regar E, de Jaegere P P, van Domburg R T, Serruys P W. Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents[J]. *Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 2088-2092.

[4] Sandhu G, Doyle B, Singh R, Bell M, Bresnahan J, Mathew V,

et al. Frequency, etiology, treatment, and outcomes of drug-eluting stent thrombosis during one year of follow-up[J]. *Am J Cardiol*, 2007, 99: 465-469.

[5] Iakovou I, Schmidt T, Bonizzi E, Ge L, Sangiorgi G M, Stankovic G, et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents[J]. *JAMA*, 2005, 293: 2126-2130.

[6] Zhu Y B, Gao C Y, Liu X, He T, Shen J. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10 (1-2): 53-61.

[7] 刘宗军, 孟 晟, 秦永文, 钟 伟, 金惠根, 于文, 等. 壳聚糖和磷脂化壳聚糖涂层膜对血管内皮细胞生长和血液相容性的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 19-22.

[8] Meng S, Liu Z J, Zhong W, Wang Q H, Du Q G. Phosphorylcholine modified chitosan: appetent and safe material for cells [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70: 82-88.

[9] Gupta V, Aravamuthan B R, Baskerville S, Smith S K, Gupta V, Lauer M A, et al. Reduction of subacute stent thrombosis (SAT) using heparin-coated stents in a large-scale, real world registry[J]. *Invasive Cardiol*, 2004, 16: 304-310.

[10] Lee Y K, Park J H, Moon H T, Lee D Y, Yun J H, Byun Y. The short-term effects on restenosis and thrombosis of echinomyacin-eluting stents topcoated with a hydrophobic heparin-containing polymer[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 1523-1530.

[11] Lü D, Meng S, Zhong W, Du Q, Gong L, Liu J, et al. Immobilization of biomacromolecules on poly-L-lactide surface via a layer-by-layer method for the improving of its cytocompatibility to bone marrow stromal cells[J]. *Chin Sci Bull*, 2005, 50: 2809-2816.

[12] van der Giessen W J, Lincoff A M, Schwartz R S, van Beusekom H M, Serruys P W, Holmes D R Jr, et al. Maked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and non-biodegradable polymers in porcine coronary arteries[J]. *Circulation*, 1996, 94: 1690-1697.

[13] Mehran R, Nikolsky E, Camenzind E, Zelizko M, Kranjec I, Seabra Gomes R, et al. An Internet-based registry examining the efficacy of heparin coating in patients undergoing coronary stent implantation[J]. *Am Heart J*, 2005, 150: 1171-1176.

[本文编辑] 尹 茶