

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01245

丝裂霉素 C 涂层胆道支架的制作

肖宏生^{1,2}, 张明明¹, 胡冰^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438

2. 南阳医学高等专科学校第一附属医院消化内科, 南阳 473058

[摘要] **目的** 制作一种带有丝裂霉素 C(MMC)涂层的胆道支架, 观察带药支架药物释放的规律。**方法** 将 MMC 和聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)粉末以 1% 的带药浓度溶于两者的共同溶剂四氢呋喃中, 并将 6Fr 胆道引流管浸泡于上述溶剂中, 10 min 后取出, 真空烘干, 常温避光保存。称量并计算支架 MMC 载药量。将 MMC 涂层支架放入 8 ml 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4)中, 置于 37℃ 的恒温摇床中持续浸泡 24 h, 然后换新鲜的 PBS 继续浸泡, 重复浸泡 30 d。对第 1~30 天留取的浸出液进行色谱分析, 计算 MMC 在浸出液中的质量浓度。**结果** 称量测得每根支架上 MMC 的载药量为 $(216.20 \pm 2.04) \mu\text{g}$, 单位面积的载药量为 $(0.732 \pm 0.007) \mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。MMC 均能从支架表面持续释放, 第 1 天的洗脱浓度为 $(1.81 \pm 0.06) \mu\text{g}/\text{ml}$, 第 2 天为 $(1.24 \pm 0.04) \mu\text{g}/\text{ml}$, 之后波动在 $0.61 \sim 0.84 \mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 第 21 天后开始略降低, 第 30 天为 $(0.51 \pm 0.01) \mu\text{g}/\text{ml}$ 。**结论** 用 PLGA 作为药物载体能成功制备 MMC 涂层胆道支架, 体外研究表明该药物涂层支架可持续稳定释放 MMC 超过 30 d。

[关键词] 药物洗脱支架; 丝裂霉素 C; 聚乳酸; 药物缓释

[中图分类号] R 608 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1245-04

Preparation of mitomycin C-eluting stent for biliary tract

XIAO Hong-sheng^{1,2}, ZHANG Ming-ming¹, HU Bing^{1*}

1. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473058, Henan, China

[Abstract] **Objective** To prepare a mitomycin C (MMC)-eluting stent for biliary tract, and to observe the drug delivery from the stent. **Methods** The mixed powder of MMC and polylactic glycolic acid (PLGA) was dissolved with their common solvent tetrahydrofuran (THF), with a drug concentration of 1%. The 6Fr biliary stent was soaked in the above solution for 10 min, and then was subjected to vacuum drying and was stored at room temperature. Then MMC-eluting stent was weighed and the MMC load was calculated. The MMC-eluting stents were soaked in 8 ml phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and placed in a shaker at a constant temperature of 37℃ for 24 h soaking; then fresh PBS was changed every day for 30 days. The leaching solutions of the 1-30 days were subjected to chromatographic analysis to determine the concentrations of MMC. **Results** MMC load on each stent was $(216.20 \pm 2.04) \mu\text{g}$, with the load per unit area being $(0.732 \pm 0.007) \mu\text{g}/\text{mm}^2$. MMC could be released from the stent surface in a sustainable manner. The elution concentration of MMC was $(1.81 \pm 0.06) \mu\text{g}/\text{ml}$ on first day and $(1.24 \pm 0.04) \mu\text{g}/\text{ml}$ on the second day; then it fluctuated within $0.61 \sim 0.84 \mu\text{g}/\text{ml}$. The concentration of MMC began to decrease from the 21st day, and it was $(0.51 \pm 0.01) \mu\text{g}/\text{ml}$ on the 30th day. **Conclusion** MMC-eluting biliary stents can be successfully prepared using polylactic acid as a drug carrier. *In vitro* study shows that the drug-eluting stents can sustainably and stably release MMC for over 30 days.

[Key words] drug-eluting stents; mitomycin C; polylactic glycolic acid; drug sustained-release

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11): 1245-1248]

经内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)支架植入术治疗

胆管良性狭窄因创伤小、并发症少,已成为胆管良性狭窄治疗的一种常规方法。药物涂层支架(drug-e-

[收稿日期] 2012-05-17

[接受日期] 2012-09-06

[基金项目] 上海市科委课题(114119a6600). Supported by Project of Science and Technology Commission of Shanghai (114119a6600).

[作者简介] 肖宏生, 硕士, 住院医师. E-mail: quietrich@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875221, E-mail: drhubing@yahoo.cn

luting stent, DES)的研制是当今生物材料工程的一大热点,目的在于使支架上负载特定药物并持续释放,起到有效抑制组织增生及炎症反应从而防止管腔再狭窄的作用。胆道良性狭窄多为成纤维细胞增殖所引起^[1]。丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)能通过解聚细胞的 DNA,阻碍其复制,抑制细胞的有丝分裂^[2],具有抑制胶原沉积和成纤维细胞增殖的作用^[3]。本研究选择 MMC 作为负载药物,聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)作为药物载体,拟研发一种可用于治疗胆道良性狭窄的新型药物涂层胆道支架。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 聚(DL-乳酸-羟基乙酸)共聚物 50/50(PLGA 50/50)由山东医疗器械研究所提供,四氢呋喃(THF)购自国药集团化学试剂有限公司,MMC 购自 Sigma 公司。胆道引流管为上海辛葇医疗器械有限公司产品,电子天平为上海良平仪器仪表有限公司产品,真空干燥箱为湛鑫仪器设备有限公司产品,Agilent 1100 型液相色谱分析仪为 Agilent 公司产品。

1.2 药物涂层支架的制作 MMC 涂层材料配方: 10 mg MMC 粉末 + 990 mg PLGA 50/50 + 20 ml THF。将 PLGA 50/50 研磨成细小颗粒,按上述比例与 MMC 粉末溶于装有 20 ml THF 的烧杯中,轻轻摇晃使其充分溶解。将已经灭菌处理的胆道引流管剪成长度为 47 mm 支架主体,并将其逐一浸泡在上述溶液中,10 min 后取出,置于真空烘干箱经 30℃、-0.1 MPa 下烘干至衡质量。称量支架,计算支架中所含 MMC 的质量。对照组支架为无 MMC 的涂层支架,涂层材料为 990 mg PLGA 50/50 + 20 ml THF,制作方法同上。

1.3 体外药物释放实验 采用高效液相色谱法(HPLC)测定药物浓度。色谱条件:分析柱为 ODS column(160 mm × 5 mm, 5 μm);流动相为水:甲醇 = 75:25(体积分数),流速为 1 ml/min,紫外波长 365 nm 检测 MMC;控制室温在 25℃。实验数据用 Agilent 1100 二维液相工作站处理,以峰面积定量。

用 PBS (pH 7.4)将 MMC 稀释为系列标准液,质量浓度为 50、25、12.5、10、6.25、5、2.5、1、0.5 μg/ml。系列标准液配好后取样,以 1 ml 分装至试管中备用。用 SPSS 16.0 统计软件包将 MMC 标准液各浓度(x)与其在 365 nm 处的紫外分光峰面积(y)进行相关分析,拟合得 MMC 标准液方程: $y = 3.124 +$

$52.474x + 0.061x^2 (R^2 = 1.000)$ 。

随机抽取 5 支 MMC 涂层支架放入盛有 8 ml PBS(pH 7.4)的离心管中,置于 37℃、100 r/min 的恒温摇床中持续浸泡 24 h,换用新鲜的 PBS 继续浸泡,重复上述步骤,直至 30 d。分别留取 30 d 内的浸出液,-4℃存放。检测第 1、2、4、6、8、10、12、15、18、21、24、27、30 天留取的浸出液在 365 nm 处的紫外分光峰面积,代入方程计算 MMC 质量浓度。用 SPSS 16.0 统计软件包绘制支架释药曲线。

2 结果

2.1 MMC 涂层支架外观及载药量 涂层支架(图 1A、1B)与裸支架(图 1C)相比,表面可见反光涂层。裸支架平均质量为(174.79 ± 0.52) mg (n = 10),MMC 涂层支架质量为(196.41 ± 0.38) mg (n = 10),计算得 MMC 载药量为(216.20 ± 2.04) μg,单位面积载药量为(0.732 ± 0.007) μg/mm²;对照组裸支架平均质量为(173.19 ± 0.52) mg (n = 10),无 MMC 涂层支架质量为(196.42 ± 0.40) mg (n = 10)。

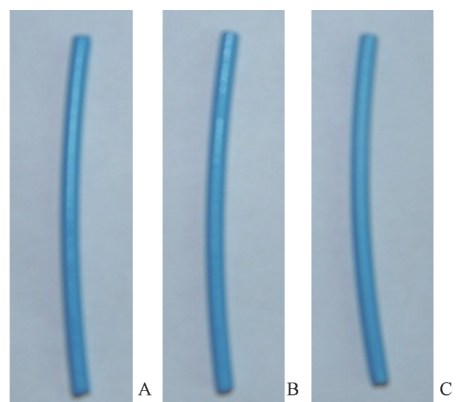


图 1 3 种支架的外观

Fig 1 Appearance of the 3 kinds of stents

A: The drug-eluting stent; B: The eluting stent without drug; C: The bare stent. It is clear that A and B have reflective coated surface

2.2 体外释放实验结果 MMC 涂层支架中 MMC 均能扩散至 PBS 中,以 5 支 MMC 涂层支架不同时间浸出液的 MMC 质量浓度平均值绘制的体外释放曲线(图 2),可见 MMC 在第 1 天和第 2 天释放浓度较高,第 1 天的洗脱浓度为(1.81 ± 0.06) μg/ml,第 2 天为(1.24 ± 0.04) μg/ml;随后趋于平稳状态,波动在 0.61~0.84 μg/ml;至第 21 天开始 MMC 释放浓度有所下降,但是仍旧保持在成纤维细胞 50% 抑制率(ID₅₀)的质量浓度(0.010 471 3 μg/ml^[4])之上;

第 30 天为 $(0.51 \pm 0.01) \mu\text{g/ml}$ 。MMC 涂层支架在 PBS 中浸泡 30 d, 共累积释放 MMC 184.72 μg , 占支架中所含 MMC 总量 (216.2 μg) 的 85.4% (图 3); 日平均释放 6.07 μg 。说明 MMC 涂层支架药物释放量比较平稳, 具有明显的缓释作用。

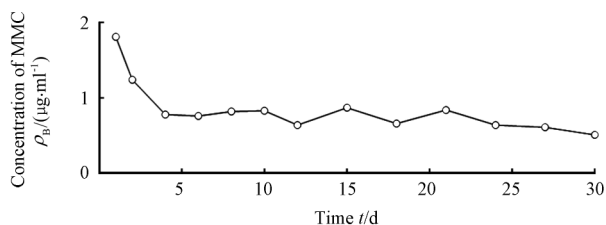


图 2 MMC 支架体外不同时间释放曲线

Fig 2 *In vitro* release curve of MMC-eluting stents at different time points

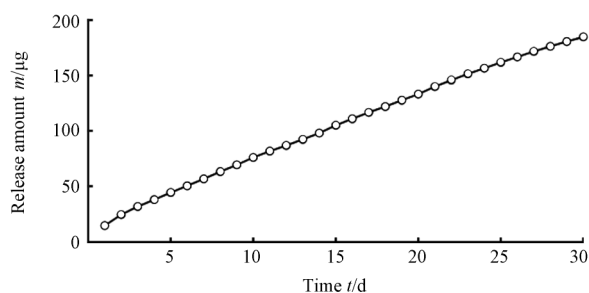


图 3 MMC 支架体外累积释放曲线

Fig 3 Cumulative release curve of MMC-eluting stents *in vitro*

3 讨论

药物涂层支架由裸支架和载药层两部分构成, 设计开发的关键在于载药层的制备。本研究选择 MMC 作为负载药物, PLGA 作为药物载体, 研制了一种用于治疗胆道良性狭窄的新型药物涂层胆道支架。

良性胆管狭窄突出表现为胆道瘢痕性挛缩和管腔狭窄, 胆管损伤修复过程中成纤维细胞增殖、细胞外基质过度沉积、病理性瘢痕形成是导致良性胆管狭窄的重要原因^[1]。因此我们选择具有抑制细胞有丝分裂特性的 MMC 作为治疗胆管良性狭窄的支架负载药物。MMC 最早发现于 1956 年, 它通过解聚细胞的 DNA 并阻碍其复制, 从而抑制细胞 (包括肿瘤细胞、成纤维细胞等) 的有丝分裂, 具有抑制瘢痕胶原沉积和成纤维细胞增殖的作用^[2-3]。

PLGA 作为药物控释载体已被广泛应用于许多药物^[5]。PLGA 作为药物载体时, 随着在体内的降

解, 其结构变得疏松, 内含药物从中溶解, 扩散的阻力减小, 药物释放速度加快。当药物释放速度的加快刚好与含药量的减少所引起的释药速度变慢一致时, 就实现了药物的长期衡量释放^[6-7]。PLGA 被用作一些稳定性差、半衰期短、易降解及不良反应多的药物缓释剂的载体, 减少了给药次数和给药量, 提高了环境中的药物有效浓度, 减少了药物的不良反应, 特别是对肝、肾的毒性^[8-10]。PLGA 不仅具有良好的物理机械性能, 还可通过相对分子质量及相对分子质量分布的调节以适应不同需要^[11-14]。我们选择 PLGA 50/50 作为药物载体。

我们所研制的 MMC 涂层支架从外观上可见支架表面有涂层存在 (反光层), 称量药物涂层支架和裸支架的质量差证实支架表面有涂层附着。在随后的体外药物释放实验中, 发现 MMC 在第 1 天和第 2 天释放浓度较高, 随后趋于平稳状态, 至第 21 天开始 MMC 释放浓度有所下降, 但是仍旧保持在成纤维细胞 50% 抑制率的质量浓度之上, 这进一步证实了涂层中含有一定量的 MMC。该支架在前 2 d 的释放量相对较高可能与支架涂层表面附着的 MMC 快速释放入 PBS 中有关^[15-16], 之后伴随着 PLGA 50/50 的降解, MMC 维持着缓慢平稳释放。PLGA 50/50 体外降解时间为 42 d 左右, 如果想延长降解时间, 可提高 PLGA 的相对分子质量, 或增加共聚物中乳酸-羟基乙酸的含量, 比如 PLGA 70/30 等^[17]。

我们用 PLGA 作为药物载体成功制备了 MMC 涂层胆道支架, 体外研究表明该药物涂层支架可持续稳定释放 MMC 超过 30 d。但由于体外实验采用的是 8 ml 的 PBS 浸泡, 这与体内的胆汁排泄方式有一定的不同, 成人每日胆汁分泌量约 800~1 000 ml, 且呈流动性, 这使得该支架在植入胆道后释放的药物有效浓度可能降低, 能否有效抑制成纤维细胞增殖还需进一步动物实验研究。

(志谢 衷心感谢上海理工大学食品与医疗器械研究所对本研究提供的帮助!)

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 耿智敏, 向国安, 韩庆, 刘效恭, 苏宝山, 刘青光, 等. 良性胆管狭窄形成机制的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 10: 618-620.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京: 中国

医药科技出版社,2010:241-242.

[3] Roh J L, Koo B S, Yoon Y H, Rha K S, Park C I. Effect of topical mitomycin C on the healing of surgical and laser wounds: a hint on clinical application[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 133:851-856.

[4] 陈毓东,王映芬,莫百军. 丝裂霉素 C 抗人翼状胬肉成纤维细胞增殖的实验研究[J]. *眼科研究*, 2001, 19:39-41.

[5] Wang X, Venkatraman S S, Boey F Y, Loo J S, Tan L P. Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix[J]. *Biomaterials*, 2006, 27:5588-5595.

[6] Fu X, Ping Q, Gao Y. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour *in vitro* of huperzine A-PLGA microspheres[J]. *J Microencapsul*, 2005, 22:705-714.

[7] Le Corre P, Rytting J H, Gajan V, Chevanne F, Le Verge R. *In vitro* controlled release kinetics of local anaesthetics from poly(D, L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres[J]. *J Microencapsul*, 1997, 14:243-255.

[8] Wang L, Venkatraman S, Kleiner L. Drug release from injectable depots two different *in vitro* mechanisms[J]. *J Contr Rel*, 2004, 99:207-216.

[9] 张海龙,高玲美,邵洪伟. 聚乳酸载药微球的制备及应用研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2010, 25:158-160.

[10] 张文龙,王勇,鲍玉成,章津津. 组织工程及缓释体系中聚乳酸类医用材料的应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15:503-506.

[11] 曹燕琳,尹静波,颜世峰. 生物可降解聚乳酸的改性及其应用研究进展[J]. *高分子通报*, 2006, 19:90-97.

[12] Bertram J P, Jay S M, Hynes S R, Robinson R, Criscione J M, Lavik E B. Functionalized poly(lactic-co-glycolic acid) enhances drug delivery and provides chemical moieties for surface engineering while preserving biocompatibility[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5:2860-2871.

[13] Giovagnoli S, Blasi P, Ricci M, Rossi C. Biodegradable microspheres as carriers for native superoxide dismutase and catalase delivery[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2004, 5:e51.

[14] Gref R, Quellec P, Sanchez A, Calvo P, Dellacherie E, Alonso M J. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001, 51:111-118.

[15] Pires N M, van der Hoeven B L, de Vries M R, Havekes L M, van Vlijmen B J, Hennink W E, et al. Local perivascular delivery of anti-restenotic agents from a drug-eluting poly(epsilon-caprolactone) stent cuff[J]. *Biomaterials*, 2005, 26:5386-5394.

[16] Ma X, Oyamada S, Gao F, Wu T, Robich M P, Wu H, et al. Paclitaxel/sirolimus combination coated drug-eluting stent: *in vitro* and *in vivo* drug release studies[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2011, 54:807-811.

[17] Peng Y, Ang M, Foo S, Lee W S, Ma Z, Venkatraman S S, et al. Biocompatibility and biodegradation studies of subconjunctival implants in rabbit eyes[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e22507.

[本文编辑] 孙岩

· 书 讯 ·

《MEEK 微型皮片移植技术的临床应用》已出版

《MEEK 微型皮片移植技术的临床应用》由葛绳德、赵成跃主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0454-4,16开,彩印,定价:48.00元。

《MEEK 微型皮片移植技术的临床应用》一书由烧伤外科的多位专家执笔,从 MEEK 微型皮片移植技术的发展演变、临床应用、疗效对比、术后护理等多个角度,进行了深入浅出地阐述,具有较高的临床实用价值。目前,整形外科、创伤外科和肿瘤外科也已逐步采用该技术进行治疗工作。

《MEEK 微型皮片移植技术的临床应用》适合相关的临床医生和研究人员等学习参考。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.cn>