

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01323

· 论 著 ·

壳聚糖/肝素西罗莫司药物洗脱支架对猪冠状动脉血栓形成及早期快速内皮化的作用

郜俊清, 金惠根, 严鹏勇, 张文全, 武前福, 刘宗军*

上海市普陀区中心医院心内科, 上海 200062

[摘要] **目的** 将壳聚糖/肝素涂层膜应用于西罗莫司药物洗脱支架(DES),明确壳聚糖/肝素西罗莫司DES对猪冠状动脉血栓形成及早期快速内皮化的作用。**方法** 将壳聚糖/肝素层层自组装涂层膜应用于西罗莫司DES,并采用非对称涂抹方式使支架血液面为壳聚糖/肝素涂层,而支架血管壁面为聚乳酸(PLA)-西罗莫司。实验分为裸金属支架(BMS)组、壳聚糖/肝素支架组、西罗莫司DES组和壳聚糖/肝素西罗莫司DES组,采用动静脉分流模型和高负荷血栓模型验证壳聚糖/肝素西罗莫司DES的抗血栓作用;采用为期1周的猪冠状动脉球囊损伤动物实验观察壳聚糖/肝素西罗莫司DES对早期内皮化的作用。**结果** 在动静脉分流模型中,壳聚糖/肝素西罗莫司DES和壳聚糖/肝素支架表面未形成血栓,而BMS和西罗莫司DES表面覆满血栓;在高负荷血栓模型中,壳聚糖/肝素西罗莫司DES和壳聚糖/肝素支架在6h内未出现支架内血栓,而BMS和西罗莫司DES分别在(59.0±8.5)min和(67.0±7.8)min时出现支架血栓,差异有统计学意义($P<0.01$)。在猪冠状动脉球囊损伤动物模型中,壳聚糖/肝素西罗莫司DES和壳聚糖/肝素支架置入7d后内皮覆盖率分别为(82.7±16.4)%和(80.7±14.1)%,高于BMS和西罗莫司DES[分别为(64.3±11.0)%和(59.8±8.4)%], $P<0.01$ 。**结论** 壳聚糖/肝素涂层西罗莫司DES具有较好的抗血栓作用,且能够在早期促进支架内皮化。

[关键词] 药物洗脱支架;层层自组装;壳聚糖;肝素;内皮化;血栓形成

[中图分类号] R 543 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1323-05

Chitosan/heparin sirolimus drug-eluting stent system improves anticoagulation and promotes early re-endothelialization in porcine coronary artery

GAO Jun-qing, JIN Hui-gen, YAN Peng-yong, ZHANG Wen-quan, WU Qian-fu, LIU Zong-jun*

Department of Cardiology, Central Hospital of Shanghai Putuo District, Shanghai 200062, China

[Abstract] **Objective** To construct a sirolimus loaded drug-eluting stent (DES) using chitosan/heparin coating membrane and to explore its effect on anticoagulation and early re-endothelialization in porcine coronary artery. **Methods** Chitosan/heparin layer-by-layer self-assembly coating was applied to sirolimus DES, and the asymmetric applicator was used to allow for the stent blood surface to be chitosan/heparin coated and the stent vascular surface to be polylactic acid (PLA)-sirolimus. The experiment was divided into bare metal stent (BMS) group, chitosan/heparin stent group, sirolimus DES group and chitosan/heparin sirolimus DES group. The anticoagulation effect of chitosan/heparin sirolimus DES was tested by arteriovenous shunt model and high load thrombosis model. The effect of chitosan/heparin sirolimus DES on early re-endothelialization was tested by 1-week long balloon injury to porcine coronary artery. **Results** No thrombus was found on the surfaces of chitosan/heparin sirolimus DES and chitosan/heparin stent in the arteriovenous shunt model, while the surfaces of BMS and sirolimus DES were covered with thrombus. No stent thrombosis was found in the high load thrombosis model test of chitosan/heparin sirolimus DES and chitosan/heparin stent within 6 hours, and stent thrombosis was found in BMS at (59.0±8.5) min and in sirolimus DES at (67.0±7.8) min ($P<0.01$). The early re-endothelialization test showed endothelial coverage rates of chitosan/heparin sirolimus DES and chitosan/heparin stent after 7 d implantation were (82.7±16.4)% and (80.7±14.1)%, significantly higher than those of BMS and sirolimus DES [(64.3±11.0)% and (59.8±8.4)%], respectively; $P<0.01$. **Conclusion** Chitosan/heparin-coated-sirolimus DES has satisfactory anticoagulation property and it can accelerate early re-endothelialization.

[收稿日期] 2013-05-07

[接受日期] 2013-07-28

[基金项目] 上海市医学重点专科建设项目(05-II 026),上海市普陀区科委基金. Supported by Key Medical Program of Shanghai (05-II 026) and Fund from Science and Technology Commission of Putuo District, Shanghai.

[作者简介] 郜俊清, 硕士, 住院医师. E-mail: kevingjq@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-62572723-8133, E-mail: ldj72@126.com

[Key words] drug-eluting stents; layer-by-layer self-assembly; chitosan; heparin; endothelialization; thrombosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1323-1327]

药物洗脱支架(drug-eluting stent, DES)可显著降低冠状动脉介入治疗再狭窄率的发生,但是支架晚期血栓形成、支架内皮化不良是经皮冠状动脉介入术的突出问题^[1-3]。有研究表明,DES置入后可出现支架内血栓、聚合物高敏反应、支架贴壁不良、动脉瘤等并发症^[4-6],而支架内血栓尤其是晚期支架内血栓是DES最严重的并发症^[1],已引起国内外学者的高度重视。研究显示,目前临床应用的主要DES[如西罗莫司(又名雷帕霉素)DES和紫杉醇DES]在置入血管后存在支架内皮化延迟,并可能是晚期支架内血栓形成的主要原因^[7-10]。目前改善DES早期内皮化的方法仍主要是DES涂层膜的改性及所载物质的选择^[11-13]。我们课题组在前期研究中成功地将壳聚糖/肝素层层自组装涂层膜应用于裸金属支架(bare metal stent, BMS)表面,并表现出较强的抗血栓及促进早期内皮化作用^[14]。本研究进一步通过将壳聚糖/肝素层层自组装涂层膜应用于西罗莫司DES,以期研制出一种具备抗血栓及促进早期内皮化作用的安全、有效的DES。

1 材料和方法

1.1 壳聚糖/肝素西罗莫司DES的制备 将316L不锈钢冠状动脉BMS(规格18 mm×2.5 mm~3 mm,中国微创医疗器械有限公司提供)常温下沉浸在乙醇/水(1:1)中作用4 h以除去油性污垢,之后用去离子水清洗,30℃减压烘干24 h。清洗后的BMS常温下沉浸在3-氨基丙基三乙氧基硅烷乙醇溶液(购自比利时Acros Organics公司)中作用4 h,后用去离子水清洗,50℃常压烘干。

将经上述处理的支架置入0.01 mol/L HCl中2 h,再用大量的水冲洗。然后将支架浸泡在0.1%肝素钠盐水溶液(购自高能物理研究化工有限公司)15 min,后用纯净水冲洗。随后将肝素支架置入0.2%乙酸与0.1%壳聚糖(购自美国Sigma公司)混合溶液中15 min,再次进行漂洗。反复进行上述涂层沉积,最终获得一个稳定的通过静电吸引作用相结合的复合膜。最后将壳聚糖/肝素支架于30℃减压烘干48 h。

将聚乳酸(PLA)与西罗莫司按1:1比例混合,

采用滚涂法均匀涂抹于壳聚糖/肝素支架外表面,每个支架上西罗莫司含量为90 μg,制备成非对称型壳聚糖/肝素西罗莫司DES(血液面为壳聚糖/肝素涂层,血管壁面为PLA-西罗莫司),最后于30℃减压烘干48 h。

1.2 实验动物 广西小香猪44只,体质量(25±3) kg,购自上海动物管理中心。所有动物均进行常规饲料喂养,除用于高血栓负荷模型的实验猪未经阿司匹林及氯吡格雷抗血栓处理外,其余均给予每日300 mg阿司匹林及150 mg氯吡格雷抗血小板聚集。实验动物于实验前一夜禁食,用0.5 mg/kg氯胺酮及0.5 mg/kg地西洋诱导麻醉,气管插管保持气道通畅,采用戊巴比妥钠溶液进行静脉麻醉。所有动物实验均经上海中医药大学动物保护利用委员会批准。

1.3 壳聚糖/肝素西罗莫司DES的抗血栓作用观察

1.3.1 动静脉分流模型 该实验使用12只小香猪,随机分为4组,每组3只,采用动静脉分流模型评价壳聚糖/肝素西罗莫司DES的抗血栓作用。无菌条件下,分离猪股动脉及股静脉,用消毒后的皮管(30 cm×3 mm)连接动静脉,形成动脉静脉循环,将壳聚糖/肝素西罗莫司DES、壳聚糖/肝素支架、西罗莫司DES(中国微创医疗器械有限公司提供)及BMS于皮管内扩张,进行血液灌流。血流控制在90 mL/min,灌流时间60 min,割开管道,取出支架,干燥后进行称重和光镜下比较,每种支架重复3个样本。

1.3.2 高血栓负荷模型 该实验使用12只小香猪,随机分为4组,每组3只,将壳聚糖/肝素西罗莫司DES、壳聚糖/肝素支架、西罗莫司DES及BMS置入猪冠状动脉后,根据心电图ST段变化及每相隔10 min进行的冠状动脉造影,观察比较不同支架形成血栓的时间,每种支架重复3个样本。

1.4 壳聚糖/肝素西罗莫司DES对早期内皮化作用观察 该实验使用16只小香猪(随机分为4组,每组4只)制作猪冠状动脉球囊损伤模型。从猪股动脉途径进行冠状动脉造影,通过定量冠状动脉造影选取冠状动脉直径为2.5~3.5 mm的血管。随机选取支架,用0.014英寸(1英寸=2.54 cm)导丝将支架置入冠状动脉进行球囊扩张,扩张压力平均

为 12 atm (1 atm = 101.3 kPa), 扩张 8 s, 扩张直径: 血管直径 = 1.1 : 1。缓慢撤出球囊后, 重复冠状动脉造影, 然后缓慢撤出导管, 进行股动脉修复, 缝合皮肤。所有实验猪术后每日服用 300 mg 阿司匹林及 150 mg 氯吡格雷进行抗血小板聚集治疗。1 周后复查冠状动脉造影, 每种支架重复 5 个样本。

冠状动脉支架于第 7 天时取出, 每个支架被平均切成 3 段。一段经 10% 缓冲甲醛溶液固定后, 硬树脂包埋, 硬组织切片 (德国莱卡公司) 切片, 行 H-E 染色, 根据 H-E 染色结果测定血管面积及进行组织学分析。一段经 1% 戊二醛溶液固定, 冷冻干燥后, 采用扫描电子显微镜 (型号: TS 5136 MM, 捷克 Tescan 公司) 观察支架内皮化情况。另一段用免疫组化固定液 (购自碧云天生物技术有限公司) 固定, 通过 CD31 免疫荧光抗体 (购自美国 Abcam 公司) 进行免疫组化, 采用激光共聚焦显微镜 (购自德国 Leica 公司) 观察冠状动脉支架, 并用 Image-Pro Plus 6.0 软件定量分析内皮覆盖情况。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的比较采用方差分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 动静脉分流实验结果 在动静脉分流模型中, 血液灌注时间为 60 min, 每根皮管内置入不同的支架 3 个, 结果可见所有的 BMS 在 60 min 内均出现支架内血流堵塞, 而所有的壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 管腔内仍保持通畅。取出支架, 用 PBS 轻柔冲洗支架, 50℃ 常压烘干, 可见 BMS、西罗莫司 DES 表面覆满血栓, 而壳聚糖/肝素支架西罗莫司 DES 与壳聚糖/肝素支架表面基本无血栓 (图 1)。支架内血栓称重后, 壳聚糖/肝素西罗莫司 DES、壳聚糖/肝素支架、BMS、西罗莫司 DES 血栓质量 (mg) 分别为 0.40 ± 0.11 、 0.46 ± 0.06 、 9.49 ± 2.75 、 8.79 ± 1.16 mg, 后 2 种支架内血栓平均质量与前 2 种比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 高血栓负荷动物实验结果 本实验所用小香猪均未进行阿司匹林和氯吡格雷抗血小板处理, 术中给予 5 000 U 肝素后, 在猪冠状动脉分别置入壳聚糖/肝素西罗莫司 DES、壳聚糖/肝素支架、西罗莫司 DES 及 BMS, 冠状动脉造影结果显示 BMS 平均在

(59.0 ± 8.5) min 时出现支架血栓 (图 2), 西罗莫司 DES 平均在 (67.0 ± 7.8) min 时出现支架血栓, 而壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 与壳聚糖/肝素支架在 6 h 内未出现支架血栓。BMS 及西罗莫司 DES 出现支架血栓时间与壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 及壳聚糖/肝素支架比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



图 1 动静脉分流模型中不同支架内血栓外观比较

Fig 1 Comparison of stent thrombosis

of different stents in arteriovenous shunt model

A: Chitosan/heparin sirolimus drug-eluting stent; B: Chitosan/heparin layer-by-layer self-assembly coating stent; C: Bare metal stent; D: Sirolimus drug-eluting stent



图 2 BMS 出现支架内血栓

Fig 2 Thrombosis in bare metal stent (BMS)

Arrow indicates thrombosis

2.3 猪球囊损伤实验结果 在置入支架后的第 7 天, 复查冠状动脉造影, 结果显示各种支架均无支架内再狭窄发生, 处死实验猪, 取出支架并平均分成 3 段。一段横断面切片经 H-E 染色后, 可观察到壳聚糖/肝素西罗莫司 DES、壳聚糖/肝素支架、西罗莫司 DES 及 BMS 均无狭窄发生, 也无明显内皮剥脱现象 (图 3)。另取一段经 1% 戊二醛溶液固定后, 扫描电镜下可观察到 BMS 表面已经内皮化, 但 1 000 倍扫描电镜下可见内皮细胞呈圆形生长, 而壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 与壳聚糖/肝素支架表面已经完全内皮化, 1 000 倍扫描电镜下可见内皮细胞呈梭形顺血

流方向生长(图 4)。再取一段冠状动脉支架,将支架浸泡于专用免疫组化固定液中,剪开并平铺支架,用 CD31 抗体对支架进行免疫荧光染色。结果显示壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 平均内皮覆盖率为(82.7±16.4)%;壳聚糖/肝素支架平均内皮覆盖率为(80.7±14.1)%,BMS

平均内皮覆盖率为(64.3±11.0)%,而西罗莫司 DES 平均内皮覆盖率为(59.8±8.4)%。BMS 及西罗莫司 DES 内皮覆盖率低于壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 及壳聚糖/肝素支架,差异有统计学意义($P<0.01$)。免疫荧光染色激光共聚焦显微镜下观察见图 5。

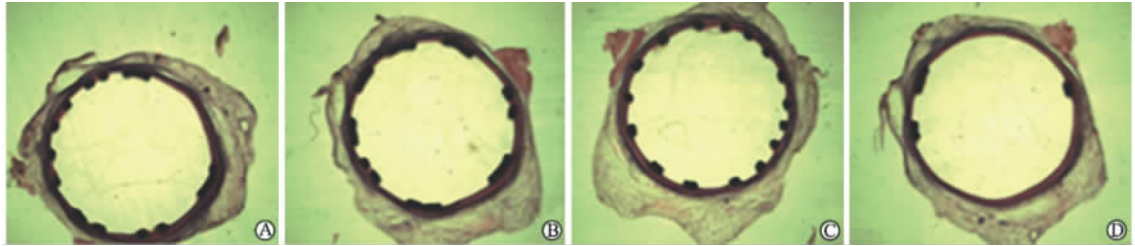


图 3 4 种冠状动脉支架置入 7 d 的病理切片比较

Fig 3 Comparison of pathological findings between 4 kinds of coronary artery stents 7 days after implantation

A: Chitosan/heparin sirolimus drug-eluting stent; B: Chitosan/heparin layer-by-layer self-assembly coating stent; C: Bare metal stent; D: Sirolimus drug-eluting stent. Original magnification: $\times 40$

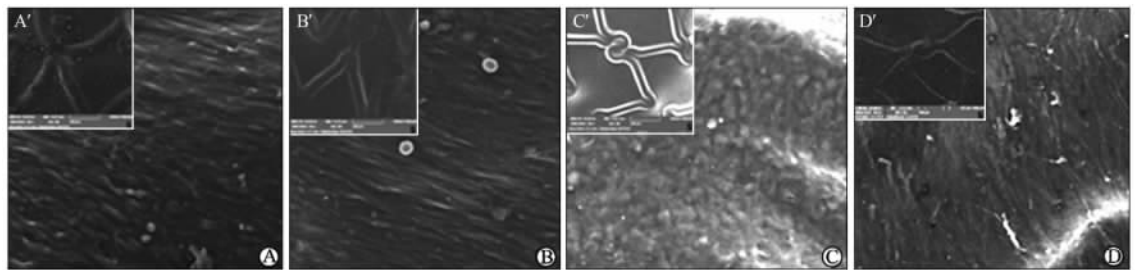


图 4 扫描电镜下观察支架置入 7 d 后支架内皮生长情况

Fig 4 Endothelial growth on the stents under scanning electron microscope 7 days after implantation

A: Chitosan/heparin sirolimus drug-eluting stent; B: Chitosan/heparin layer-by-layer self-assembly coating stent; C: Bare metal stent; D: Sirolimus drug-eluting stent. A', B', C', D': The magnifications of A, B, C and D, respectively. Original magnification: $\times 100$ (A, B, C, D); $\times 1\ 000$ (A', B', C', D')

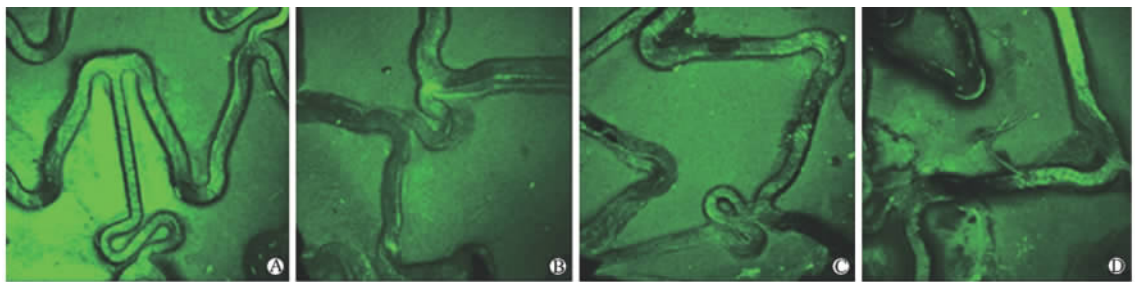


图 5 激光共聚焦显微镜下观察支架置入 7 d 后支架内皮 CD31 表达

Fig 5 Endothelial CD31 expression under laser scanning confocal microscope 7 days after implantation

A: Chitosan/heparin sirolimus drug-eluting stent; B: Chitosan/heparin layer-by-layer self-assembly coating stent; C: Bare metal stent; D: Sirolimus drug-eluting stent. Original magnification: $\times 40$

3 讨论

在本次研究中,我们首次采用支架双面不对称涂层法将壳聚糖/肝素涂层膜应用于西罗莫司 DES,通过涂层膜对于内皮的“高亲和力”,达到早期促进内皮化、抗血栓生成的效果。支架的内皮修复是血管修复的关键一步,支架表面内皮早期迁移修复可

以有效降低血栓的形成。

壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 应用于体外动静脉分流模型及高负荷体内血栓模型实验结果提示具有壳聚糖涂层的支架具有较强的抗血栓作用。目前随着糖尿病患者的不断增加,临床的冠状动脉病变更为复杂,支架抗血栓变得尤为重要,尤其是对于血糖控制不好、心肌梗死等高血栓负荷患者。我们的支

架通过肝素与壳聚糖静电力结合,保留了原有的肝素活性,不同于以往的通过化学键结合而破坏肝素活性的肝素支架。

在 1 周的整体动物模型实验中,4 种支架均未出现再狭窄,且没有明显的炎症改变,而让人感到高兴的是,壳聚糖/肝素西罗莫司 DES 与壳聚糖/肝素涂层支架在 1 周时就已经几乎完全内皮化,在扫描电镜及激光共聚焦检测 CD31 表达中得到相似结果。早期快速内皮化不仅能够降低血栓事件的发生,而且也具有早期抗狭窄的作用。目前 DES 主张术后至少 1 年双联抗血小板药物治疗,若药物支架置入后能够早期内皮化,即可减少双联抗血小板药物的用量,从而降低可能存在的出血并发症发生的风险^[1-2]。壳聚糖被证明能够促进血管内皮生长,且在体内降解产物没有二氧化碳等酸性物质,不会在局部产生组织炎症反应,具有良好的生物相容性,可以降低动脉瘤及支架贴壁不良的发生率^[15]。

层层自组装壳聚糖/肝素涂层膜已广泛应用于医学生物学的多个领域,我们课题组在以往的研究中,首次将该涂层膜应用于 BMS,发现其具备强大的抗血栓及促内皮化效果^[14]。本次课题组进一步将该涂层膜应用于西罗莫司 DES,在确保 DES 良好药物释放的同时,保留涂层膜强大的抗血栓及促内皮化的效果,结果显示该药物支架有较好的治疗作用,具有良好潜在的临床价值和临床应用前景。

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] Brodie B, Pokharel Y, Fleishman N, Bensimhon A, Kissling G, Hansen C, et al. Very late stent thrombosis after primary percutaneous coronary intervention with bare-metal and drug-eluting stents for ST-segment elevation myocardial infarction: a 15-year single-center experience[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2011, 4: 30-38.

[2] Blich M, Zeidan-Shwiri T, Petcherski S, Oshero A, Hammerman H. Incidence, predictors and outcome of drug-eluting stent thrombosis in real-world practice [J]. J Invasive Cardiol, 2010, 22: 461-464.

[3] Chrissoheris M P, Mruthyunjayanna V, Donohue T J. Late thrombosis of drug-eluting stents after discontinuation of clopidogrel: report of two cases and review of the literature[J]. Conn Med, 2006, 70: 485-490.

[4] Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi G M, Stankovic G, et al. Incidence, predictors, and out-

come of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents[J]. JAMA, 2005, 293: 2126-2130.

- [5] 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]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45: 2088-2092.
- [6] McFadden E P, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong A T, Kinnaird T, et al. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy[J]. Lancet, 2004, 364: 1519-1521.
- [7] Virmani R, Kolodgie F D, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? [J]. Heart, 2003, 89: 133-138.
- [8] Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? [J]. Circulation, 2004, 109: 701-705.
- [9] Joner M, Finn A V, Farb A, Mont E K, Kolodgie F D, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48: 193-202.
- [10] Oyabu J, Ueda Y, Ogasawara N, Okada K, Hirayama A, Kodama K. Angioscopic evaluation of neointima coverage: sirolimus drug-eluting stent versus bare metal stent [J]. Am Heart J, 2006, 152: 1168-1174.
- [11] Jia H, Liu H, Kong J, Hou J, Wu J, Zhang M, et al. A novel polymer-free paclitaxel-eluting stent with a nanoporous surface for rapid endothelialization and inhibition of intimal hyperplasia: comparison with a polymer-based sirolimus-eluting stent and bare metal stent in a porcine model [J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 98: 629-637.
- [12] Nakazawa G, Granada J F, Alviar C L, Tellez A, Kaluza G L, Guilhermier M Y, et al. Anti-CD34 antibodies immobilized on the surface of sirolimus-eluting stents enhance stent endothelialization [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2010, 3: 68-75.
- [13] Larsen K, Cheng C, Tempel D, Parker S, Yazdani S, den Dekker W K, et al. Capture of circulatory endothelial progenitor cells and accelerated re-endothelialization of a bio-engineered stent in human *ex vivo* shunt and rabbit denudation model [J]. Eur Heart J, 2012, 33: 120-128.
- [14] Meng S, Liu Z, Shen L, Guo Z, Chou L L, Zhong W, et al. The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system [J]. Biomaterials, 2009, 30: 2276-2283.
- [15] 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.