

Study on China-made peripheral arterial eluting stent: in vivo experiment

FENG Bo¹, SHI Qiang¹, XIA Yong-hui¹, LIANG Song-nian¹, HUANG Ying-ying², QI Min¹, XU Ke^{1*}

(1. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. College of Material, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the plasticity, visibility, positioning accuracy and features of inhibition of in-stent restenosis in the china-made peripheral arterial sirolimus-heparin eluting stent. **Methods** Twelve sirolimus-heparin eluting stents, 8 sirolimus eluting stents and 8 bare stents were implanted into peripheral arteries of 14 dogs, which were accepted strictly anticoagulation. Seven dogs were killed after 30 days, another 7 dogs were killed after 60 days. The plasticity, visibility, radial force, position features of sirolimus-heparin eluting stents were investigated, and in-stent thrombosis, in-stent diameter, reference segment diameter, late loss of lumina and in-stent restenosis rate of the eluting stent were evaluated mainly. **Results** The whole 28 stents were successfully implanted into dogs' peripheral arteries without complication. The stents had satisfactory plasticity, good visibility and accurate position. The concentration of sirolimus was 1.79—2.22 ng/ml immediately after stent implantation, and was 0.4 ng/ml at 7 days and was continuously releasing about 12 weeks. The imaging following up indicated no thrombosis and intimal hyperplasy at 30 days. Sixty days later, 2 sirolimus stents occurred obstruction due to obvious thrombosis; 1 sirolimus-heparin stent and 3 bare stent occurred intimal hyperplasy. One stent was found hollow in the segment proximate to sirolimus-heparin stent. There were differences in in-stent diameter among sirolimus-heparin stent, sirolimus stent and bare stent, and the difference had statistical significance ($F=0.049$, $P<0.05$). There were differences in in-stent diameter late loss among sirolimus-heparin stent, sirolimus stent and bare stent, and the difference had statistical significance ($F=0.047$, $P<0.05$). **Conclusion** The china-made peripheral sirolimus-heparin eluting stent had good plasticity and visibility to X-ray. There's no recovery and skip during implantation. The sirolimus-heparin eluting stent of peripheral artery could provide a strong radial force and efficiency of anticoagulation. In-stent restenosis and thrombosis was reduced to the least degree.

[Key words] Stents; Peripheral artery; Sirolimus; Heparin; Animal experimentation

国产外周动脉洗脱支架的动物实验研究

冯 博¹, 石 强¹, 夏永辉¹, 梁松年¹, 黄莹莹², 齐 民², 徐 克^{1*}

(1. 中国医科大学附属第一医院放射科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 大连理工大学材料学院, 辽宁 大连 116023)

[摘 要] **目的** 通过动物实验研究, 探讨国产雷帕霉素-肝素洗脱支架(DES)的顺应性、可视性、定位准确性及预防再狭窄性能。 **方法** 实验支架 28 枚(12 枚雷帕霉素-肝素洗脱支架, 8 枚雷帕霉素洗脱支架, 8 枚裸支架)分别置入 14 条犬中。严格抗凝后, 7 只犬 30 天造影观察后处死, 另 7 只犬 60 天造影观察后处死。分别观察支架顺应性、可视性、定位准确性; 测定支架体内药代动力学特点; 测量支架段直径, 参考节段内直径, 晚期丢失, 血栓形成, 支架内再狭窄率, 参考节段内再狭窄率。结果进行统计分析。 **结果** 28 枚支架位置良好, 无移位、脱落。雷帕霉素-肝素 DES 支架具有良好的顺应性, X 线下可视性较强, 定位准确。雷帕霉素-肝素 DES 释放时即刻雷帕霉素药物浓度在 1.79~2.22 ng/ml 之间, 7 天左右达到 0.4 ng/ml, 可持续释放 12 周左右。7 只犬术后 30 天造影, 显示支架管腔通畅, 无血栓形成或管腔狭窄发生。7 只犬术后 60 天造影, 显示 2 枚雷帕霉素支架血栓性闭塞, 1 枚雷帕霉素-肝素 DES 支架和 3 枚裸支架不同程度狭窄, 1 枚雷帕霉素-肝素 DES 近端可见血管轻度凹陷。雷帕霉素-肝素支架与雷帕霉素支架、裸支架支架段直径间有差别, 差别有统计学意义($F=0.049$, $P<0.05$)。雷帕霉素-肝素支架与雷帕霉素支架、裸支架间支架段直径晚期丢失有差别, 差别有统计学意义($F=0.047$, $P<0.05$)。 **结论** 国产雷帕霉素-肝素洗脱支架具有良好的顺应性, X 线下可视性较强, 标记清楚, 释放时无明显回

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470521)。

[作者简介] 冯博(1966—), 男, 沈阳人, 博士, 副教授。研究方向: 介入放射学。E-mail: fb6772@sina.com

[通讯作者] 徐克, 中国医科大学附属第一医院放射科, 110001。E-mail: xuke@cmuimaging.com

[收稿日期] 2007-09-21 **[修回日期]** 2007-10-14

缩或前跳;国产雷帕霉素-肝素洗脱支架具有一定的抗凝性能及预防再狭窄能力。

【关键词】 支架;外周动脉;雷帕霉素;肝素;动物实验

【中图分类号】 R815;R543.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003-3289(2007)12-1753-04

药物洗脱支架(drug-eluting stent, DES)的应用大大降低了再狭窄率。目前国内外外周动脉 DES 研究尚少,技术尚不成熟^[1-3];而且,DES 普遍存在的“内皮化延迟”现象引起的血栓形成严重影响了 DES 的中远期疗效^[4,5]。我们课题组成研制出具有“抑制内膜增生”和“预防血栓形成”双重作用的国产外周雷帕霉素-肝素药物 DES,并进行了动物实验研究,以观察国产洗脱支架植入过程中的技术性能、支架的影像学及体内药代动力学特点,为进一步实现洗脱支架的国产化提供可靠的理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及支架

1.1.1 实验动物 杂种犬 14 只(体重 20~30 公斤),由中国医科大学实验动物部提供。

1.1.2 实验支架及其输送器 实验用支架共 28 枚。其中,雷帕霉素-肝素支架 12 枚(图 1),雷帕霉素支架 8 枚,裸支架 8 枚。规格:6.0 mm×30 mm。雷帕霉素药物剂量:1.518~1.608 mg,肝素药物剂量:2.102~2.219 mg。输送系统:采用自制预装机将支架装进 6F,120 mm 长的 PTFE 材料制备的推送器中。

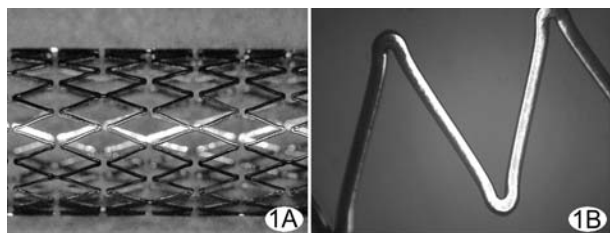


图 1 国产外周动脉雷帕霉素-肝素洗脱支架

1.2 实验器械及设备 6F 动脉鞘、5F 猪尾导管、动脉夹、手术丝线等。中国医科大学实验动物部血管造影机。沈阳药科大学药物代谢测量仪(TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联质谱仪等)。

1.3 实验分组 4 枚雷帕霉素-肝素支架与 4 枚裸支架,4 枚雷帕霉素支架与 4 枚裸支架,4 枚雷帕霉素-肝素支架与 4 枚雷帕霉素支架,1 枚雷帕霉素-肝素支架与 1 枚雷帕霉素-肝素支架,分别放置于 13 只犬中,左右髂动脉各 1 枚。另外 2 枚雷帕霉素-肝素支架交叠放置于 1 只犬腹主动脉中。

1.4 麻醉 肌注速眠新 5 ml,10%苯巴比妥 10 ml(可按公斤体重适量补充)。

1.5 支架放置 右腹股沟区暴露股动脉,直视下行股动脉前壁 Sledinger 穿刺,成功后植入 6F 动脉鞘管。猪尾导管造影,测量髂动脉或腹主动脉直径。然后分别置入支架于双侧髂动脉或腹主动脉。术后采用纤维外科血管缝合技术,将 2 mm 穿刺点横向缝合 3~4 针,确认无活动出血后,逐层缝合皮下

组织及皮肤。

1.6 抗凝 支架放置时推注低分子肝素 2000 U。术后抵克力得 200 mg/d 一次口服,阿司匹林 150 mg/d 一次口服。

1.7 体内药代动力学研究 8 只犬(雷帕霉素-肝素支架 6 只,雷帕霉素支架 2 只)分别于术后 10 min、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、14 d、21 d,采取静脉血。肝素管中保存。药代动力学分析。

1.8 影像学研究 7 只犬 30 天造影观察后处死,7 只犬 60 天造影观察后处死。实验观察内容:①支架输送的性能:顺应性,可视性,定位准确性。②急性血栓形成(支架置入后<30 天)、亚急性或延迟血栓形成(支架置入后≥30 天)。③支架段直径(mm)。④参考节段内直径(mm);支架两端加 5 mm。⑤支架段直径晚期丢失(mm)。⑥参考节段直径晚期丢失(mm)。⑦支架内再狭窄率(%),参考节段内再狭窄率(%);管腔直径≥50%为再狭窄。

1.9 数据采集与统计学处理 采用 SPSS 10.0 单因素方差分析及 SNK 检验。

2 结果

2.1 全部实验动物置入过程顺利,14 只犬顺利置入 28 枚支架,健康存活。全部 28 枚支架位置良好,无移位,脱落,不张等发生。

2.2 支架具有良好的顺应性,顺利通过髂动脉分叉部。X 线下可视性较强,标记清楚。释放过程中,支架近端几乎无短缩,远端短缩<4 mm(图 2)。

2.3 雷帕霉素-肝素 DES 释放时即刻药物浓度在 1.79~2.22 ng/ml 之间,雷帕霉素 7 天左右达到较平缓状态,浓度达 0.4 ng/ml,20 天时仍可检测,可持续释放 3 个月。

2.4 造影结果 7 只犬术后 30 天造影:全部支架管腔通畅,无血栓形成或管腔狭窄发生(图 3)。7 只犬术后 60 天造影:2 枚雷帕霉素支架血栓性闭塞;1 枚雷帕霉素-肝素 DES 支架和 3 枚裸支架内膜不同程度增生;1 枚雷帕霉素-肝素 DES 近端可见血管轻度凹陷(图 4、5)。雷帕霉素支架血栓形成发生率为 50%(2/4);雷帕霉素支架内再狭窄率为 50%(2/4)。

2.5 统计学结果

2.5.1 支架置入 30 天时,雷帕霉素-肝素支架、雷帕霉素支架和裸支架各项指标均无统计学差异。支架置入 60 天时,雷帕霉素-肝素支架、雷帕霉素支架、裸支架支架段直径间差别有统计学意义($F=0.049, P<0.05$)。经 SNK 检验,雷帕霉素-肝素支架与雷帕霉素支架、裸支架间有差别,差别有统计学意义;裸支架与雷帕霉素支架差别无统计学意义。雷帕霉素-肝素支架、雷帕霉素支架、裸支架支架段直径间晚期丢失差别有统计学意义($F=0.047, P<0.05$);经 SNK 检验,雷帕霉素-肝素支架与雷帕霉素支架、裸支架间有差别,差别有统计学意义;裸支架与雷帕霉素支架差别无统计学意义。

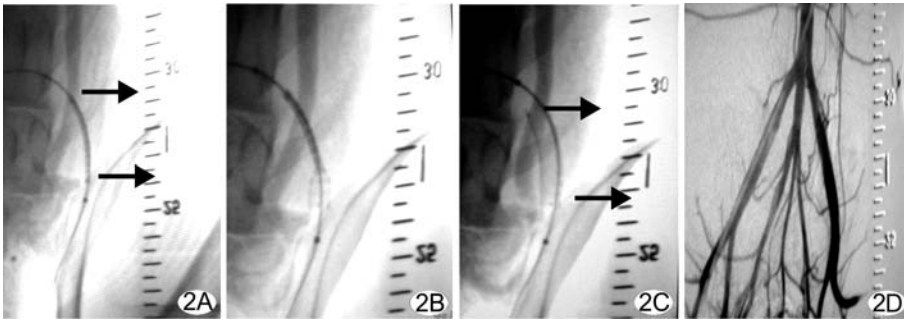


图2 国产外周动脉雷帕霉素-肝素洗脱支架的释放过程。在支架释放过程中,支架近端几乎无短缩,远端短缩 $<4\text{ mm}$,定位具有较强的准确性

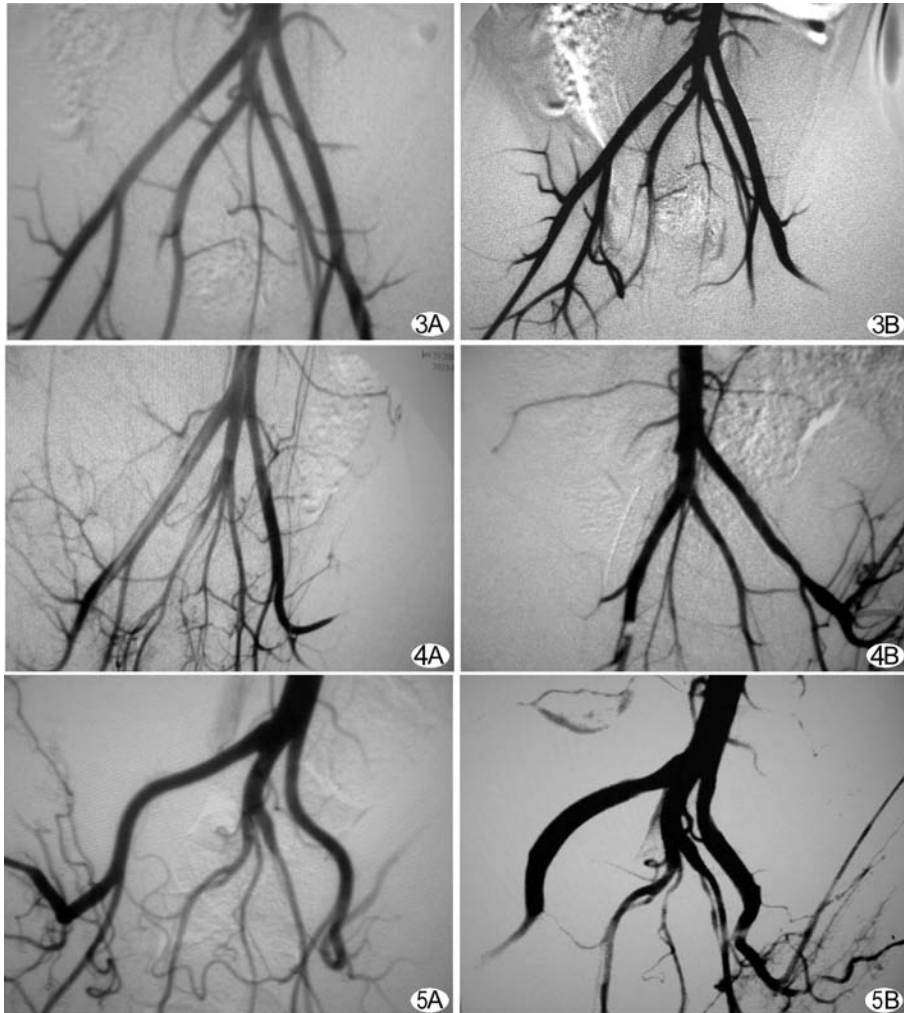


图3 支架置入30天后DSA复查 A. 支架置入前DSA,显示髂动脉血流通畅; B. 支架置入30天后DSA复查影像。左侧髂动脉置入的雷帕霉素-肝素及右侧髂动脉置入的雷帕霉素支架内血流通畅
图4 支架置入60天后雷帕霉素支架血栓形成 A. 图示支架置入前DSA,显示髂动脉血流通畅; B. 为支架置入60天后DSA复查影像。左侧髂动脉置入的裸支架出现狭窄,右侧髂动脉置入的雷帕霉素支架出现血栓性闭塞
图5 支架置入60天后雷帕霉素-肝素支架通畅 A. 支架置入前DSA,显示髂动脉血流通畅; B. 支架置入60天后DSA复查影像。左侧髂动脉置入的雷帕霉素-肝素支架,右侧髂动脉置入的为裸支架

3 讨论

国产外周动脉雷帕霉素-肝素洗脱支架是适合外周血管血流动力学特点设计的专用支架,采用雷帕霉素和肝素双层涂层,具有抑制内膜增生和防止血栓形成的双重作用(具体研

发实验见另文)。本文仅就国产洗脱支架的动物实验影像学及体内药代动力学特点加以论述。

实验中我们采用犬为实验动物,因为犬的纤溶系统更接近人类,而且较慢的再次内皮化过程也接近人类。实验共分三组,雷帕霉素-肝素洗脱支架与雷帕霉素洗脱支架和裸支架进行比较。通过与裸支架的比较,可考察雷帕霉素-肝素洗脱支架抑制内膜增生的作用;而通过与雷帕霉素支架的比较,可考察雷帕霉素-肝素洗脱支架预防血栓形成的作用。实验中,雷帕霉素支架药物剂量为 $180\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$,肝素药物剂量为 $0.25\text{ mg}/\text{cm}^2$ 。文献报道,一般雷帕霉素支架药物剂量为 $90\sim140\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$,最大药物剂量可达 $180\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [6]。考虑到外周支架管腔直径较大,血流冲刷力强,因此药物量较大。一般肝素支架剂量为 $0.5\sim1.0\text{ mg}/\text{cm}^2$ [7],本研究中由于载体承受力有限,仅能承载约 $0.25\text{ mg}/\text{cm}^2$ 的药物剂量。承载更多的肝素是我们下一步要解决的问题。

早期雷帕霉素支架有药物快速释放和缓速释放型支架,快速释放是在15天内释放完毕,而缓速释放型药物30天时释放约80%。经多年的临床对照研究,目前认为缓速释放型支架疗效优于快速释放型,而且临床应用雷帕霉素支架也多为缓速释放型支架[8]。本研究中,药物释放曲线呈缓慢释放,肝素约50天左右释放完毕,雷帕霉素持续时间约12周(具体研发实验见另文)。在支架置入体内后雷帕霉素即刻药物浓度在 $1.79\sim2.22\text{ ng}/\text{ml}$ 之间,逐渐衰减,与相关报道($0.9\sim2.6\text{ ng}/\text{ml}$)相类似。在肾移植患者,雷帕霉素血液浓度可以长期保持在 $8.0\sim17.0\text{ ng}/\text{ml}$ 之间,因此支架药物剂量是安全的[1]。

实验中,支架具有较好的顺应性、可视性及径向张力。支架在 30° 动脉分叉处也能顺利通过,全部支架张开

良好,无移位、脱落与不张等发生。释放过程中,支架近端几乎无短缩,远端短缩也 $<4\text{ mm}$,定位具有较强的准确性。另外,外周血管由于运动性较强,支架容易发生断裂,而本研究中未见支架断裂发生[1]。

随访 60 天时,两枚支架发生血栓闭塞。均为雷帕霉素支架。影像学显示支架内完全闭塞,符合支架血栓形成改变。血栓形成是目前阻碍 DES 进一步发展的一大难题^[9-11]。Bern-Rotterdam 研究指出 DES 血栓危险长期存在,该研究分析了 2002—2005 年 Bern 和 Rotterdam 的多个注册实验中(8146 例患者)血栓事件,随访 3 年,造影显示血栓发生率为 2.9%^[12]。近年来,众多学者致力于探索血栓形成发生机制并积极加以解决。研究表明,金属支架置入后,机体会对损伤的内膜进行反应性修复,发生血小板黏附、活化、聚集,纤维蛋白沉积及血栓形成。血栓栓子吸附炎性细胞如巨噬细胞和淋巴细胞聚集,这些炎性细胞刺激各种生长因子和细胞因子的产生,激活休眠的平滑肌增生并迁移到内膜,并在支架腔面修补内膜。同时,来自损伤内膜周围的成熟内皮细胞(endothelial cells, ECS)和来自骨髓源性不成熟的循环内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCS)共同参与修复血管内皮(EPCS 可随即分化成内皮样细胞),完成血管内皮化过程。但 DES 置入后,DES 携带的抗平滑肌细胞增殖药物在抑制内膜过度增生的同时,却有强烈的抑制骨髓源性 EPCS 和 ECS 的作用,严重阻碍了损伤内皮的自然愈合过程,导致“内皮化延迟”。在此期间,血管因内皮化延迟而不能在支架表面形成正常的内皮包覆,造成亚急性或慢性血栓形成^[13,14]。我们推测本研究中雷帕霉素支架血栓形成可能与上述因素有关。

本研究中,雷帕霉素-肝素 DES 未见血栓形成发生。肝素涂层支架具有良好的抗凝效果已经得到普遍认同。本支架同时携带雷帕霉素和肝素,肝素释放时间为 50 天左右。因此我们认为在相同抗凝条件的情况下,支架内肝素缓慢释放能够预防急性及亚急性血栓形成。延长肝素释放时间及进一步检验雷帕霉素-肝素 DES 的抗凝效果,尚待进一步研究。

本研究中,1 枚 SRL+HEP 支架近端均可见血管狭窄性变化。但只是支架进端轻度凹陷,不影响血流动力学,并不完全符合 DES 的“边缘效应”改变^[15]。“边缘效应”是 DES 常见的狭窄改变,支架内内膜增生的抑制有支架中间部位强于边缘部位的倾向,即支架内内膜增生量有从支架中段向支架两端逐渐增加的趋势。雷帕霉素 DES“边缘效应”通常为局灶性改变,好发于支架近端。推测原因可能与支架远端有更有效的药物效应有关。本研究中,支架近端改变可能是“边缘效应”的早期改变,也可能是由于支架直径较大刺激增生有关。

在 30~60 天随访中,除 1 枚雷帕霉素-肝素支架出现轻度内膜增厚外,全部雷帕霉素-肝素支架管腔通畅,无狭窄和血栓形成发生。在支架置入 60 天时,雷帕霉素-肝素支架(5.883 ± 0.1329) mm 和雷帕霉素支架(2.9500 ± 3.4073)在支架段直径上差别有统计学意义($F=4.002, P<0.049$)。此结果初步表明,国产雷帕霉素-肝素洗脱支架具有一定的预防血栓形成及抗再狭窄能力。

【参考文献】

[1] Duda SH, Pusich B, Richter G, et al. Sirolimus eluting stents for the treatment of obstructive superficial femoral artery disease: six-month results[J]. *Circulation*, 2002, 106(12):1505-1509.

[2] Duda SH, Bosiers M, Lammer J, et al. Sirolimus-eluting versus bare nitinol stent for obstructive superficial femoral artery disease: the SIROCCO II trial[J]. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 2005, 16(3):331-338.

[3] Feng B, Xia YH, Huang YY, et al. Pharmacodynamics of China-made sirolimus-poly(lactide) peripheral arterial eluting stent membrane: in vitro experimental[J]. *Chin Med J*, 2007, 87(10):701-705.

冯博,夏永辉,黄莹莹,等. 国产外周动脉洗脱支架药膜制备及体外药代动力学研究[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(10):701-705.

[4] Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, et al. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(10):1020-1029.

[5] Jaffe R, Strauss BH. Late and very late thrombosis of drug-eluting stents: evolving concepts and perspectives [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(2):119-127.

[6] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(23):1773-1780.

[7] Haude M, Konorza TF, Kalnins U, et al. Heparin-coated stent placement for the treatment of stenoses in small coronary arteries of symptomatic patients [J]. *Circulation*, 2003, 107(9):1265-1270.

[8] Schampaert E, Cohen EA, Schlüter M, et al. The candian study of the sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (C-SIRUS)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(6):1110-1115.

[9] FDA advises physicians of adverse events associated with Cordis Cypher coronary stents. US Food and Drug Administration Public Health Web Notification, 2003, T03-T71.

[10] Virmani R, Guagliumi G, Farb A, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious[J]? *Circulation*, 2004, 109(6):701-705.

[11] Karvouni E, Korovesis S, Katritsis DG. Very late thrombosis after implantation of sirolimus eluting stent [J]. *Heart*, 2005, 91(6):45.

[12] Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institution cohort study[J]. *Lancet*, 2007, 369(9562):667-678.

[13] Fukuda D, Sata M, Tanaka K, et al. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells[J]. *Circulation*, 2005, 111(7):926-931.

[14] Shen L, Ge JP. Puzzle or hope? Are endothelial progenitor cell capture stents the next potential treatment for restenosis[J]. *Molecular Cardiology of China*, 2006, 6(3):184-187.

沈雳,葛均波. 内皮祖细胞捕获支架的困惑与希望[J]. *中华分子心脏病学杂志*, 2006, 6(3):184-187.

[15] Fajadet J, Wijns W, Laarman GJ, et al. Randomized, double-blind, multicenter study of the Endeavor zotarolimus-eluting phosphorylcholine-encapsulated stent for treatment of native coronary artery lesions: clinical and angiographic results of the ENDEAVOR II trial[J]. *Circulation*, 2006, 114(8):798-806.