

生物大分子药物洗脱冠状动脉支架

张超, 宋存先, 孙洪范, 马桂蕾

(中国医学科学院 北京协和医学院 生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津市 300192)

[关键词] 药物洗脱支架; 再狭窄; 血栓; 内皮化; 生物大分子; 基因递送

[摘要] 生物大分子药物洗脱支架是指载有核酸、抗体、酶、细胞因子等活性生物大分子的冠状动脉支架。生物大分子可针对再狭窄的分子机制, 作用于指定环节的特定靶点, 具有高度特异性, 因此生物大分子药物洗脱支架可望成为解决支架内再狭窄和晚期血栓的根本途径。文章就目前生物大分子药物洗脱支架国内外最新研究进展作一综述。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

Biomacromolecule-eluting Stent for Coronary Artery Disease

ZHANG Chao, SONG Cun-Xian, SUN Hong-Fan, and MA Gui-Lei

(The Tianjin Key Laboratory of Biomaterials, Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

[KEY WORDS] Drug-eluting Stent; In-stent Restenosis; Thrombosis; Endothelialization; Biomacromolecule; Gene Delivery

[ABSTRACT] As with drug-eluting stents (DES), biomacromolecule-eluting stents can deliver biologically active agents such as nucleic acid, antibody, enzyme and cell factor. Biological active agents can selectively act at specific target location through molecular mechanism of coronary artery restenosis. This seems to be a promising treatment strategy for preventing in-stent restenosis (ISR) while simultaneously reducing the risk of stent thrombosis. This article reviews recent developments in biomacromolecule-eluting stents.

区别于目前临床应用的药物洗脱支架, 生物大分子药物洗脱支架是指载有核酸、抗体、酶、细胞因子等生物大分子的冠状动脉支架。经皮冠状动脉支架置入术是临床冠心病血运重建的重要手段, 早期的裸金属支架植入后 3~6 个月内有 20%~40% 的再狭窄发生率, 支架内再狭窄 (in-stent restenosis, ISR) 严重限制了冠状动脉介入治疗的发展。2002 年药物洗脱支架 (drug-eluting stent, DES) 在临床应用后, 使心血管病的治疗发生了划时代的进步, ISR 发病率降至 10% 以下, 极大地提高了介入治疗的效果, 冠状动脉介入治疗进入蓬勃发展时期^[1,2]。然而随着适应证不断拓展, 植入时间的延长, DES 的长期安全性问题日渐显现。研究表明 DES 存在晚

发血栓问题, 尽管发生率很低, 但造成严重后果^[3,4]。支架段血管的快速再内皮化是降低 ISR 和避免血栓的关键, 研究和开发选择性抑制平滑肌细胞增殖, 同时促进血管内皮愈合的药物洗脱支架, 理所当然成为新一代 DES 的研究重点。随着对再狭窄形成机制的深入研究和分子生物学技术的进展, 基因、抗体、生长因子等生物活性大分子显示出小分子药物无可比拟的优越性, 这些生物大分子针对再狭窄的分子机制, 作用于指定环节的特定靶点, 具有高度特异性, 因此生物大分子药物洗脱支架可望成为解决 ISR 和晚期血栓的根本途径^[5]。这方面的研究进展介绍如下。

[收稿日期] 2012-02-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (50830106, 50903093)

[作者简介] 张超, 研究实习员, 研究方向为心血管支架基因治疗运载体系, E-mail 为 gongchengsuo@126.com。通讯作者马桂蕾, 博士, 副研究员, 研究方向为生物材料与药物缓控释研究, E-mail 为 bmemgl@126.com。

1 诱导和促进快速内皮化的支架

1.1 内皮祖细胞捕获支架^[6,7]

主要是指携带 CD34 抗体包被的支架,旨在捕获内皮祖细胞以促进、加速内皮的覆盖。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)来源于骨髓,是血管内皮细胞的前体细胞,参加局部组织的修复和分化为成熟的内皮细胞。CD34 抗体是特异性内皮祖细胞捕获抗体。将 CD34 抗体预先结合在白蛋白或聚多糖涂层的 316L 支架上,在体内可主动识别和捕获循环系统的内皮祖细胞,内皮祖细胞在支架表面迅速分化成活性内皮细胞,从而促进和加速内皮的修复。临床前研究证明支架植入后可快速诱导血管内皮再生,避免了炎性细胞和巨噬细胞的黏附,从而切断导致新生内膜增生的诱因,显示出良好的安全性及可行性。但临床研究发现由于个体血液中内皮祖细胞水平的差异,很难使每个受试者均达到理想的内皮再生速度,其有效性严重依赖于个体的内皮祖细胞水平。此外,由于 CD34 抗体对细胞识别的特异性有限,其它的骨髓干细胞如平滑肌祖细胞,也可能被捕获,还有可能加速内膜增生。因此 CD34 抗体支架的设计理念虽然很好,还需要继续完善和改进,才能在临床应用中达到预期的降低再狭窄的效果。

1.2 释放血管内皮生长因子的支架^[8,9]

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是内皮细胞特异性有丝分裂原,能促进血管内皮细胞的分裂与增殖,使细胞质钙聚集,诱导血管生成。VEGF 在众多可促进内皮细胞生长的活性因子中,被首选用于抗再狭窄的治疗,原因在于 VEGF 不但能促进血管内皮化,还能诱导前列腺环素和一氧化氮(NO)的释放,这两种物质均是平滑肌细胞主要生长环节的抑制剂。体外细胞培养试验显示 VEGF 洗脱支架可加速人脐静脉内皮细胞的生长,有报道称吸附 VEGF 的支架植入兔髂动脉 28 天后,显著加速了血管内皮的再生,降低了新生内膜的增生。但另有报道认为体内试验未观察到明显抑制再狭窄的作用。支架上药物的负载量受限于支架的表面容量,从而限制了药物剂量和作用时间,此外蛋白分子在体内很容易被分解失活。有报道用一种热敏性聚合物将 VEGF 包埋在支架上,提高了 VEGF 装载容量和有效性。最近用生物可降解聚合物材料作为载体制备载 VEGF 微球包埋在支架上,同样可提高 VEGF 装载容量和有效

性^[10]。适当剪切的低分子量重组蛋白片段具有与 VEGF 相当的生物活性,同时比大分子蛋白更稳定,例如 VEGF121 和 VEGF165,这些低分子量重组蛋白片段有可能进一步改进 VEGF 支架的药物传输效果。

1.3 其它促进内皮化的支架设计

一种由 Ang-Gly-Asp 序列组成的环状 RGD 肽(cyclic arginine-glycine-aspartic peptide, cRGD)能特异性识别内皮细胞膜上高表达的整合素(integrin),将这种 cRGD 结合在冠状动脉支架的蛋白涂层上,能高效捕获 EPSC,在猪冠状动脉试验中表现出明显促进血管再内皮化以及降低 ISR 的效果^[11]。

用氧化铁磁性微球与内皮细胞共同培养,在细胞胞浆中的磁性体具有对磁场的感应性,利用磁性细胞对磁场的定位特性,设计了一种新型的磁性冠状动脉支架,动物体内试验结果证明支架的磁场力的确可使带有磁性微球的内皮细胞在支架段血管壁黏附和定位,内皮细胞能够快速富集在磁性支架上^[12,13]。

2 抗血栓支架

蛋白 C 和蛋白 S 在维持抗凝血和止血的正常平衡中起重要作用,局部给予这类蛋白有可能抑制支架植入后的血栓形成,在纤维素涂层的支架上通过浸渍吸附方法携带蛋白 C,植入球囊损伤的兔髂动脉模型血管中,显著抑制了晚期血栓的形成^[14]。

天然肝素用于血液接触性医用装置抗凝血已有很长历史,将肝素共价键结合在金属支架表面形成致密的肝素覆盖。表面固定化的肝素可与血液循环中的抗凝因子Ⅲ作用,从而防止在支架黏附血栓。肝素化的支架在动物试验中均不同程度减少了支架内血栓的形成。肝素还能选择性地抑制平滑肌细胞中蛋白激酶 C 依赖性细胞周期路径;此外肝素通过与细胞受体、生长因子、黏性分子等相互作用,阻止平滑肌细胞的迁移和增殖。由于这些作用需要肝素可溶和游离态,才能主动识别细胞因子并进入细胞内起作用,因而释放肝素的洗脱支架比肝素键合支架更适用于选择性抑制平滑肌细胞的迁移和增殖。将肝素和聚阳离子聚合物通过静电层层组装的方式组合在冠状动脉支架上,植入动物体内后肝素能成功地从支架上缓慢释放,还可以设计合适的组装层数控制支架上肝素的负载量^[15-17]。

低分子肝素(2~9 kDa)与普通肝素(大约 15 kDa)相比,具有半衰期较长、稳定性好、有广泛来源

等优点,此外由于分子量小,很容易就能达到高装载量,因此低分子肝素洗脱支架应该比普通肝素洗脱支架抗血栓的功效更好。低分子肝素洗脱支架的最大优点是较小的剂量就能达到需要的效果,同时避免产生全身毒性。典型的方法是将低分子肝素包在脂质体(liposome)中,再吸附到聚四氟乙烯涂层的支架上,通过适当选择脂质体的磷脂类型、配比等因素调控低分子肝素的释放速度。

3 基因洗脱支架

较之单纯药物治疗,基因治疗具有作用机制明确、特异性强、毒副作用少、起效快的优点。通过将目的基因转移至病变血管并表达基因产物,可在支架植入的第一时间抑制平滑肌细胞的增殖和血栓形成^[18]。

冠状动脉局部转基因防治再狭窄的可行性在很多动物实验得到证实,如何将目的基因成功输送至病变血管并高效转染是基因治疗的关键技术之一。早期的再狭窄基因治疗采用球囊导管将基因送到冠状动脉内,常见的有双球囊导管、多孔球囊导管、隧道球囊导管、水凝胶包被球囊、离子电渗导管和微注射导管等。用导管导入药物溶液时必须短暂阻断冠状动脉血流,基因载体与血管细胞接触时间很短,血循环恢复后绝大部分基因随着循环系统转移至其他部位,因而导管输送系统的应用受到限制,基于导管的基因输送方式已渐被淘汰。以支架为平台的基因传输独具很多优越性,是非常理想的心血管内局部定位基因输送方式,其优越性包括:无需阻断冠状动脉血流;可有效地将外源性基因运送至靶血管局部;基因与靶细胞有足够多的接触机会和足够长的接触时间,因此有望达到较高的转染效率;基因不向全身扩散,避免非靶组织被动转染;可使用低基因剂量在局部发挥治疗作用等。

最初的基因洗脱支架延续了传统药物洗脱支架的结构,将基因吸附或包埋在支架的聚合物涂层上。美国食品药品监督管理局批准了一系列可用于人体的生物可降解聚合物如聚乳酸、聚乙醇酸、聚己内酯以及生物源大分子如白蛋白、胶原、明胶、肝素、透明脂酸等作为支架涂层材料。不同的研究小组采用不同的细胞系、不同的动物模型、不同的基因转染载体(Vector)包括病毒载体、非病毒载体及裸质粒基因,应用不同的报告基因或目的基因,报道了各自的研究结果。所有这些不同的方法和策略均得出一个共同的结论:无可置疑的有效性。

在这些研究中,除使用报告基因证明基因从支架上洗脱和对细胞和组织的转染外,也有大量研究应用目的基因在动物模型试验中有效抑制了新生内膜增生和再狭窄。目前文献报道的基因洗脱支架的设计策略,归纳起来主要是以下几类:通过聚合物涂层将基因载体吸附或包埋在支架上;将基因载体直接包埋在可降解聚合物支架的主体内;将基因载体离子键结合在无聚合物涂层的支架上等^[18-22]。

尽管在体外细胞试验和动物模型体内试验中取得众多鼓舞人心的结果,但迄今基因洗脱支架还没有临床应用的报道,还有许多问题有待解决,例如支架植入过程中基因过早被洗脱、流失,导致病灶局部转染效率不高和非靶器官被动转染;非降解高分子聚合物在体内长期存留导致的炎症反应、纤维素沉积、内皮化延迟以及晚期支架内血栓。近年来,无聚合物涂层和非物理方式结合的基因洗脱支架,取得了很多有创意的新进展,包括先通过化学键、离子键或络合键直接在金属支架上锚定(anchor)一些具有反应活性的化学基团,然后再结合基因;用静电层层组装技术包载基因等新的设计策略。下面将重点介绍这类支架的最新研究进展。

3.1 双磷酸烷基酯功能化的基因洗脱金属支架^[23,24]

美国费城儿童医院 Levy 研究小组采用功能化双磷酸烷基酯对金属支架改性,直接在金属裸支架上结合基因。双磷酸基与不锈钢表面的金属氧化物之间能形成强亲和力的络合键,从而在金属表面形成一个致密的双磷酸烷基酯的单分子层,烷基分子上预先功能化使其带有氨基活性基因,从而在支架表面形成大量可化学修饰的位点,通过这些活性反应位点可使生物大分子药物很方便地结合在金属支架上。这种功能化双磷酸烷基酯改性冠状动脉支架,可用于结合抗脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)抗体、抗腺病毒抗体等特异性抗体,再通过免疫亲和作用使质粒 DNA 或病毒载体 DNA 锚定在支架上,植入体内后抗体与金属基体的链接键被酶解或水解,释放出抗体-质粒 DNA 复合转染载体或抗体-病毒转染载体。应用这种设计原理制备的负载报告基因和治疗基因的基因洗脱支架,在细胞和动物模型试验中实现了局部高效基因转染。特别是携带了编码一氧化氮合酶(iNOS)基因的支架在大鼠颈动脉植入后,表现出显著地抑制再狭窄的疗效。

3.2 磷酸胆碱涂层支架

磷酸胆碱涂层(phosphocholine, PC)的支架生物

相容性和血液相容性非常好,美国雅培实验室(Abbott)最近临床试用的新一代药物洗脱支架(商品名 ENDEAVOR)就是用 PC 作为涂层^[25]。在基因洗脱支架的研究中,也有将编码 VEGF 的质粒 DNA 用同样的方法吸附到 PC 涂层支架上,每个支架上可吸附 200 μg 的 VEGF2 质粒 DNA,该支架植入兔髂动脉显示出显著抑制平滑肌细胞增殖的功效,同时没有发现晚期炎症反应^[26]。但由于基因是简单吸附在 PC 涂层上的,因此在体内传输和支架扩张过程中基因快速被洗脱,无法在局部维持有效的基因剂量,同时还会导致基因全身扩散,该方法还需要进一步研究和改进。

3.3 静电层层组装的基因洗脱支架^[27,28]

静电层层组装技术应用于支架上装载质粒 DNA 的优越性在于可通过多层组装控制 DNA 的装载容量,多层静电组装膜还能够保护 DNA 不被体内无处不在的核酸酶分解。将编码绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的质粒与正电性聚 β -氨基酸酯层层组装到支架上,在非洲绿猴肾细胞系(COS-7)培养实验中显示出局部高效的 GFP 转染。这种多层组装技术是独特优越性的支架-基因结合工艺。

3.4 化学和免疫双重偶联的基因洗脱支架^[29-31]

针对物理吸附基因存在基因携带量不足、结合不稳定、基因过早流失导致转染效率不高的缺点,美国费城儿童医院 Levy 小组,采用双官能偶联剂 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)代丙酸酯(N-succinimidyl 3-(2-pyridylthio) propionate, SPDP)将特异性抗腺病毒六位体片断以化学键结合在胶原涂层的支架上,再将含报告基因的腺病毒载体免疫偶联在固定了抗体的支架上,动物体内实现了血管内局部定位、高效的基因转染。中国医学科学院生物医学工程研究所与 Levy 小组合作,通过化学偶联抗 DNA 抗体,将质粒 DNA 连接在胶原涂层支架上,极大地提高了质粒基因的结合稳定性,解决了单纯物理吸附导致的基因过早被洗脱和携带基因量不足等问题,同时避免使用病毒载体带来的不安全隐患,实现了局部定位地向血管内病灶组织投递有效剂量的质粒 DNA。该方法还可在支架上同时装载多种基因实现联合基因治疗。

4 展 望

冠心病是一种危害人类健康和生命的常见病。支架置入是当前治疗冠心病的主要手段之一,控制

血栓危险和减少支架内再狭窄,开发更加安全有效的支架,进一步提高介入治疗的预后效果,是广大医生和患者迫切的期望,也是生物医学工程科技工作者义不容辞的历史使命。寻找更合理有效的药物组合、更理想的支架载体和工艺、更安全有效的传输途径仍然是进一步研究的重点,多种作用机制或有协同作用的联合药物洗脱支架有望成为临床应用的突破点。我们相信,随着一系列技术革新和突破,通过大动物实验对体内效果和安全性验证,生物大分子药物洗脱支架将有望成为新一代冠状动脉支架用于防治 IRS 和其它潜在的血管疾病的临床治疗。

[参考文献]

- [1] Butt M, Connolly D, Lip GY. Drug-eluting stents: a comprehensive appraisal [J]. *Future Cardiol*, 2009; 5(2): 141-157.
- [2] Martin DM, Boyle FJ. Drug-eluting stents for coronary artery disease: a review [J]. *Med Eng & Phys*, 2011, 33(2): 148-163.
- [3] Lüscher TF, Steffel J, Eberli FR, et al. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications [J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 1051-058.
- [4] Al-Dehneh A, Virk H, Alkhoury Y, et al. Drug-eluting stent thrombosis 1659 days after stent deployment: case report and literature review [J]. *Tex Heart Inst J*, 2010, 37(3): 343-346.
- [5] Hironobu T, Didier L, David WG. Delivery of large biopharmaceuticals from cardiovascular stents: a review [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(11): 3281-293.
- [6] Beijik MA, Klomp M, van Geloven N, et al. Two-year follow-up of the Genous™ endothelial progenitor cell capturing stent versus the Taxus Liberté stent in patients with de novo coronary artery lesions with a high-risk of restenosis: a randomized, single-center, pilot study [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2011, 78(2): 189-195.
- [7] Klomp M, Beijik MA, Damman P, et al. Three-year clinical follow-up of an unselected patient population treated with the genous endothelial progenitor cell capturing stent [J]. *J Interv Cardiol*, 2011, 24(5): 442-449.
- [8] Swanson N, Hogrefe K, Javed Q, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents: in vivo effects on thrombosis, endothelialization and intimal hyperplasia [J]. *J Invasive Cardiol*, 2003, 15(12): 688-692.
- [9] Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, et al. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis [J]. *Circula-*

- tion, 2004, 110(1): 36-45.
- [10] Xu H, Nguyen KT, Brilakis ES, et al. Enhanced endothelialization of a new stent polymer through surface enhancement and incorporation of growth factor-delivering microparticles [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, 5(4): 519-527.
- [11] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(9): 1 786-795.
- [12] Pislaru SV, Harbuzariu A, Gulati R, et al. Magnetically targeted endothelial cell localization in stented vessels [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(9): 1 839-845.
- [13] Polyak B, Fishbein I, Chorny M, et al. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 698-703.
- [14] Foo RS, Gershlick AH, Hogrefe K, et al. Inhibition of platelet thrombosis using an activated protein C-loaded stent: in vitro and in vivo results [J]. *Thromb Haemost*, 2000, 83(3): 496-502.
- [15] 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): 1 265-270.
- [16] Liu XC, Zhao J, Wang Y, et al. Heparin- and basic fibroblast growth factor-incorporated stent: a new promising method for myocardial revascularization [J]. *J Surg Res*, 2010, 164(2): 204-213.
- [17] Koromila G, Michanetzis GP, Missirlis YF, et al. Heparin incorporating liposomes as a delivery system of heparin from PET-covered metallic stents: effect on haemocompatibility [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(12): 2 525-533.
- [18] Gaffney MM, Hynes SO, Barry F, et al. Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(2): 175-188.
- [19] Sharif F, Daly K, Crowley J, et al. Current status of catheter- and stent-based gene therapy [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64: 208-216.
- [20] Fishbein I, Chorny M, Levy RJ. Site-specific gene therapy for cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, 13(2): 203-213.
- [21] Lei L, Guo SR, Chen WL, et al. Stent as a platform for drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8(6): 813-831.
- [22] Klugherz BD, Jones PL, Cui X, et al. Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1 181-184.
- [23] Fishbein I, Alferiev IS, Nyanguile O, et al. Bisphosphonate-mediated gene vector delivery from the metal surfaces of stents [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 159-164.
- [24] 王勇, 俞玫, 张琳华, 等. 双磷酸改性血管支架作为基因载体的研究[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2012, 35(1): 3-7.
- [25] Carter AJ. Mycophenolic acid-eluting stent and the ABC's of stent-based immunosuppressive therapies for the prevention of restenosis [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005, 66(4): 496-498.
- [26] Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, et al. Local gene transfer of pVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis [J]. *Circulation*, 2004, 110: 36-45.
- [27] Yamauchi F, Koyamatsu Y, Kato K, et al. Layer-by-layer assembly of cationic lipid and plasmid DNA onto gold surface for stent-assisted gene transfer [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(18): 3 497-504.
- [28] Jewell CM, Zhang JT, Fredin NJ, et al. Release of plasmid DNA from intravascular stents coated with ultrathin multilayered polyelectrolyte films [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(9): 2 483-491.
- [29] Klugherz BD, Song C, DeFelice S, et al. Gene delivery to pig coronary arteries from stents carrying antibody-tethered adenovirus [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(3): 443-454.
- [30] Jin X, Mei L, Song CX, et al. Anti-DNA antibody modified coronary stent for site-specific plasmid DNA delivery [J]. *J Gene Med*, 2008, 10(4): 421-429.
- [31] Zhang LH, Luo T, Zhang C, et al. Anti-DNA antibody modified coronary stent for plasmid gene delivery: results obtained from a porcine coronary stent model [J]. *J Gene Med*, 2011, 13(1): 37-45.

(此文编辑 许雪梅)