

# 功能性药物洗脱支架对冠状动脉介入治疗后 内膜增生及 TFPI-2 的影响

高学忠<sup>1</sup>, 阿米娜·马合木提<sup>1</sup>, 黄隐青<sup>2</sup>, 张鑫<sup>2</sup>, 黄明远<sup>2</sup>, 吴连拼<sup>2</sup>

(1. 阿克苏地区第一人民医院心内科, 新疆阿克苏 843000; 2. 温州医科大学附属第二医院心内科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 支架; 内皮修复; 三氧化二砷; CD133<sup>+</sup> 抗体; TFPI-2

[摘要] **目的** 探讨新型双面复合药物涂层支架体内抑制血管平滑肌细胞增殖及促进内皮修复的作用。**方法** 65 只中华小型猪非高脂饮食喂养 4 周, 随机分为假手术组、球囊损伤 + 双面涂层支架植入组和球囊损伤组, 造模后继续喂养 4 周, 抽血检查血浆 TFPI-2 水平, 行冠状动脉 OCT 检查后处死并取冠状动脉血管组织行分子生物学检测。**结果** OCT 图像可见球囊损伤组斑块明显扩大, 内膜增厚, 纤维帽厚度明显增加, 假手术组基本正常, 支架植入组居中; 内膜/中膜面积比球囊损伤组( $2.23 \pm 0.72$ ), 支架植入组( $2.01 \pm 0.56$ ) 稍高于假手术组( $1.89 \pm 0.27$ ); 内膜/中膜厚度比分别为球囊损伤组( $2.12 \pm 0.74$ ), 支架植入组( $1.74 \pm 0.66$ ) 与假手术组( $1.52 \pm 0.47$ )。支架植入组较球囊损伤组下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。假手术组、支架植入组、球囊损伤组三组血浆 TIFI-2 水平分别为  $135.2 \pm 22.6 \mu\text{g/L}$ 、 $127.2 \pm 23.4 \mu\text{g/L}$  和  $52.4 \pm 22.6 \mu\text{g/L}$ ; 前两组基本相仿, 但球囊损伤组明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。假手术组、支架植入组、球囊损伤三组 TIFI-2 与  $\beta\text{-actin}$  比值分别为  $2.45 \pm 0.22$ 、 $2.22 \pm 0.26$ 、 $1.27 \pm 0.33$ 、TFPI-2 在正常动脉血管组织中较少表达, 支架植入组表达水平与假手术组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ), 而球囊损伤组则表达明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 双面药物涂层支架较球囊损伤组比较能降低血管内膜增生; 同时促进冠状动脉内膜表达 TFPI-2, 血浆 TFPI-2 水平升高, 进而可能减少支架内血栓的形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Effect of Functional Drug-eluting Stent on Intimal Hyperplasia and TFPI-2 After PCI

GAO Xue-Zhong<sup>1</sup>, AMINA · ahemuti<sup>1</sup>, HUANG Yin-Qing<sup>2</sup>, ZHANG Xin<sup>2</sup>, HUANG Ming-Yuan<sup>2</sup>, and WU Lian-Pin<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiovascular, First Hospital of Aksu Prefecture, Aksu, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 843000, China; 2. Department of Cardiovascular, The Second Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[KEY WORDS] Stent; Endothelium Repair;  $\text{As}_2\text{O}_3$ ; CD133<sup>+</sup> Antibody; TFPI-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the efficacy of the double coated compound drug-eluting stent of  $\text{As}_2\text{O}_3$  and CD133<sup>+</sup> antibody to repair vascular endothelium and prevent smooth muscle cell proliferation. **Methods** 65 China miniature pigs were fed with no-fat diet for 4 weeks, then divided into 3 groups: sham group, stent implantation group, balloon injury group. Four weeks later, coronary evaluating with OCT was performed, the plasma TFPI-2 level was checked and coronary artery tissue was used for immunohistology analysis. **Results** The OCT images showed that the coronary plaque enlarged significantly, endothelium and fibrous cap obviously thickened in balloon injury group, and the sham group was normal, the group B was found between the two. The coronary intima/media thickness ratio was  $2.12 \pm 0.74$  in balloon group,  $1.74 \pm 0.66$  in stent implantation group and  $1.52 \pm 0.47$  in sham group. Intima/media area ratio was  $2.23 \pm 0.72$  in balloon group,  $2.01 \pm 0.56$  in stent implantation group and  $1.89 \pm 0.27$  in sham group. The plasma TFPI-2 level: sham group, stent implantation group, balloon injury group was  $135.2 \pm 22.6 \mu\text{g/L}$ ,  $127.2 \pm 23.4 \mu\text{g/L}$ ,  $52.4 \pm 22.6$

[收稿日期] 2014-07-15

[基金项目] 中国医师协会阳光心血管研究基金(SCRFCMDA201316)资助; 浙江省自然科学基金(LY14H020006)资助

[作者简介] 高学忠, 副主任医师, 研究方向为冠心病的介入治疗, E-mail 为 1187263152@qq.com。阿米娜·马合木提, 副主任医师, 研究方向为冠心病的介入治疗。通讯作者吴连拼, 硕士, 主任医师, 研究方向为冠心病的基础研究及介入治疗, E-mail 为 wzwlp@sina.com。

$\mu\text{g/L}$  respectively; The sham group and stent implantation group were similar, but the balloon injury group were significantly decreased, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). Western blot results: TIFI-2 and  $\beta$ -actin ratio of group sham group, stent implantation group, ballon injury group were  $2.45 \pm 0.22$ ,  $2.22 \pm 0.26$ ,  $1.27 \pm 0.33$  respectively; TFPI-2 in normal arterial tissues expressed less; The expression level of TFPI-2 in double coated compound drug-eluting stent and sham group were similar with no significant difference ( $P > 0.05$ ). Balloon injury group expression was significantly decreased, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The double coated compound drug-eluting stent could promote the endothelium to produce TPF1-2, enhance the plasma TFPI-2 level, and then reduce the formation of stent thrombosis in possible. Otherwise, it could decrease in-stent intimal hyperplasia.

冠心病已成为危害人类健康最常见、最严重的疾病之一。介入治疗并植入药物洗脱支架是治疗冠心病的有效手段。但是存在着下面的问题:抑制内膜增殖的同时也抑制了内皮的增生,使支架处血管的内皮覆盖延迟,导致支架内血栓形成,此外,需长期服用抗凝药,易导致药物的副作用,并且增加了医疗费用。所以开发既促进血管内皮损伤愈合,防止血栓形成,又减少内膜增生防止再狭窄的功能性药物洗脱支架是解决问题的关键<sup>[1]</sup>。

本实验自行设计药物洗脱支架,支架基质为多聚物并加入甲基丙稀酸,支架的管壁层含  $\text{As}_2\text{O}_3$  而血管腔面含 CD133<sup>+</sup> 抗体。该支架旨在同时利用二者之长处,一方面可以抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移诱导凋亡,另一方面通过诱捕血液循环中的内皮祖细胞加快支架表面内皮化,预防支架内再狭窄及晚期支架血栓,改善患者预后。在动物实验研究中,我们观察了促进内皮修复的功能性药物洗脱支架对内膜/中膜面和厚度及 TEPI-2 水平的影响,以了解这种支架的影响特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的建立

采用 65 例中华小型猪,建立急性心肌损伤模型。普通非高脂饲料饲养 4 周;每只  $130 \sim 150 \text{ g/d}$ , 自由饮水,喂养 4 周。球囊损伤后再饲养 4 周。球囊损伤及支架植入:试验猪试验前一日 22:00 喂食后禁食 10 h,禁饮 4 h。次日上午按戊巴比妥钠  $1 \text{ mg/kg}$  腹腔注射进行麻醉。分离并穿刺右股动脉,置入 6F 动脉鞘管,鞘内注入普通肝素抗凝(按  $100 \text{ U/kg}$  计算)。透视下沿鞘送入 6F JL4.0 指引导管至猪左主干开口。沿指引导管送指引导丝至前降支远端,沿导丝送入 OCT 阻断球囊(直径  $2.0 \text{ mm}$ )至前降支中段,以  $2 \text{ atm}$ (大气压)扩张球囊对冠状动脉前降支进行阻断,持续时间 600 s。阻断同时给予肝素化生理盐水进行灌洗。阻断过程中若出现室颤则予非同步直流电  $200 \text{ J}$  进行除颤治疗。撤回

球囊,植入专门制备的双面涂层支架,  $10 \text{ atm}$  扩张释放,撤回试验器械,缝合伤口。继续喂养 4 周。4 周后进行冠状动脉 OCT 检查。

### 1.2 实验分组

将参与研究的中华小型猪模型随机编号,共 60 只实验动物,按随机原则分成 3 组,每组各 20 只。球囊损伤组:采用非高脂饮食 4 周的基础上,运用球囊损伤,球囊损伤后再饲养 4 周。假手术组:采用非高脂饮食喂养 4 周,后进行分显露离股动脉及 OCT 等手术操作,但不对前降支进行球囊损伤。双面涂层支架组:非高脂饮食 + 球囊损伤 + 给予双面支架涂层植入( $10 \text{ atm}$  扩张释放)。4 周后 OCT 检查后处死研究动物,取血,分离血浆并检测由浆 TFPI-2 水平,取冠状动脉血管组织行分子生物学检测。

### 1.3 观察指标

采用光学相关断层成像(OCT)观察内皮以及斑块,测定内膜及中膜的面积,并计算内膜/中膜的厚度比,内膜/中膜的面积比。应用酶标比色法检测血浆 TFPI-2 水平。应用 Western blot 方法检测冠状动脉 TFPT-2 的表达情况。将实验动物冠状动脉血管组织剪碎、研磨并制备匀浆,聚丙烯酰胺凝胶电泳后湿转法电转至硝酸纤维素膜,分别加入一抗、二抗,再进行化学发光,采用计算机图片分析系统分析图片,以  $\beta$ -actin 蛋白的表达为内参照,显示实验动物冠状动脉 TFPT-2 的相对表达水平。以上生物制剂购自晶美生物工程有限公司。

### 1.4 统计学处理

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析检验,两组之间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 光学相关断层成像(OCT)观察内皮以及斑块

包括斑块性质、纤维帽的厚度以及巨噬细胞含量,同时测定内膜及中膜的面积,并计算内膜/中膜的厚度比,内膜/中膜面积比(图 1;表 1)。可见支

架植入组内膜增生较球囊损伤组减少,差异有统计 学意义( $P < 0.05$ )。

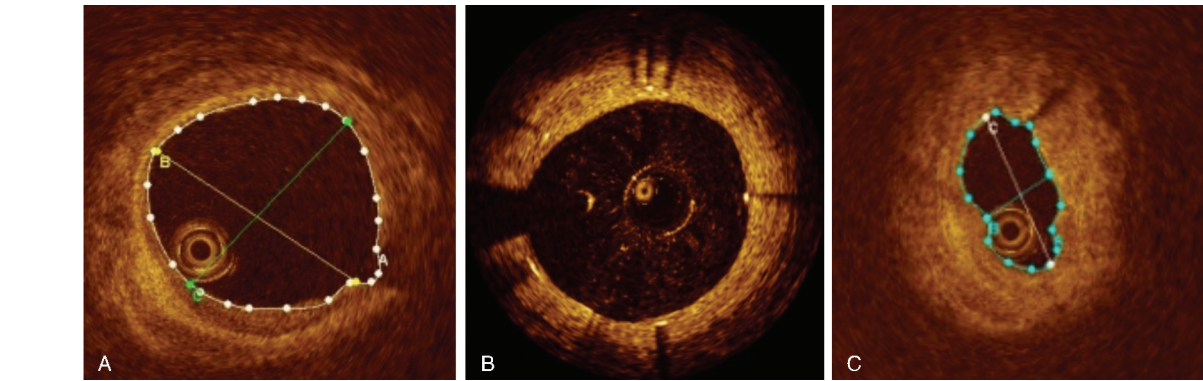


图 1. 各组的 OCT 图像对比 A 为假手术组,B 为双面涂层支架组,C 为球囊损伤组。球囊损伤组斑块明显扩大,内膜增厚,纤维帽厚度明显增加,而假手术组则基本正常,双面涂层支架组居中。

Figure 1. The contrast of OCT image

表 1. 各组内膜/中膜厚度比、内膜/中膜面积比

Table 1. The coronary intima/media thickness ratio intima/media area ratio in three groups

分 组	内膜/ 中膜厚度比	内膜/ 中膜面积比
假手术组	1.52 ± 0.47 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.27 <sup>a</sup>
支架植入组	1.74 ± 0.66 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.56 <sup>a</sup>
球囊损伤组	2.12 ± 0.74	2.23 ± 0.72

a 为  $P < 0.05$ ,与球囊损伤组比较。

2.2 血浆 TFPI-2 水平

假手术组、支架植入组、球囊损伤组 3 组血浆 TIFI-2 水平分别为  $135.2 \pm 22.6 \mu\text{g/L}$ ,  $127.2 \pm 23.4 \mu\text{g/L}$  和  $52.4 \pm 22.6 \mu\text{g/L}$ ,实验动物血浆 TFPI-2 水平以球囊损伤组下降最为明显,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

2.3 冠状动脉 TFPI-2 蛋白表达

假手术组、支架植入组、球囊损伤组 TIFI-2 与  $\beta$ -actin 比值分别为  $1.22 \pm 0.26$ 、 $1.27 \pm 0.33$ 、 $2.45 \pm 0.22$ ,TFPI-2 在正常动脉血管组织中较少表达,双面支架组表达水平与假手术组基本相仿,两者比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),而球囊损伤组表达明显升高 ( $P < 0.01$ ;图 2)。

3 讨 论

目前药物涂层支架(DES)的研制主要用于预防支架术后的再狭窄,其结构包括金属支架、聚合物及溶解于聚合物中的药物<sup>[2]</sup>。但研究证实药物支

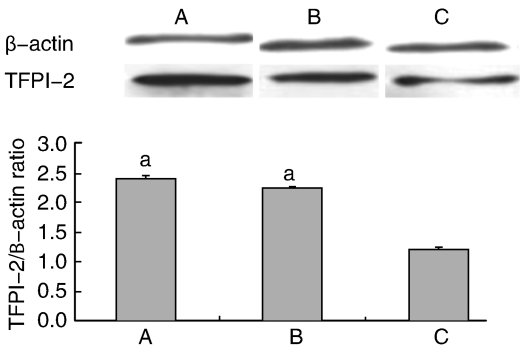


图 2. 冠状动脉 TFPI-2 的表达 A 为假手术组,B 为支架植入组,C 为球囊损伤组。a 为  $P < 0.01$ ,与球囊损伤组比较。

Figure 2. Coronary artery expression of TFPI-2 in different group

架的使用将带来冠状动脉事件的增加,尤其是血栓事件的增加<sup>[3-4]</sup>。这样看目前的 DES 所释放的药物仍存在许多不足之处,需要研究发展新型的 DES 来预防支架内再狭窄。

三氧化二砷( $\text{As}_2\text{O}_3$ )作为经 FDA 批准的治疗急性早幼粒细胞白血病的药物<sup>[5]</sup>,近年来的临床试验证实其在治疗恶性肿瘤领域同样有着显著的效果<sup>[6-7]</sup>。研究表明  $\text{As}_2\text{O}_3$  在体外实验中通过抑制细胞生长周期及诱导细胞凋亡减少其数量,在兔颈动脉损伤模型中发现腹腔内注射  $\text{As}_2\text{O}_3$  引起 BCL-2 基因的下调同时上调 BAX 基因的表达导致平滑肌细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。国内的研究者们也在不同动物模型上得到了同样结果, $\text{As}_2\text{O}_3$  涂层支架在预防支架内再狭窄上与紫杉醇、西罗莫司等涂层支架有着同样的效果<sup>[9-10]</sup>。

DES 的广泛使用的同时也带来了一定的问题, 支架内血栓形成即成为心血管介入时代不得不面对的难题。随着 DES 晚期支架血栓事件的相继报道, 甚至于在支架植入 12 个月后发生的极晚期支架血栓, 使得这一不良事件越发引起专家学者们的重视<sup>[11]</sup>, 其原因在于支架植入血管部位的在内皮化不全。动物研究证明形态和功能不同的内皮祖细胞可以从外周血单个核细胞中培养生长。CD133 抗原阳性内皮祖细胞可以从外周血的单个核细胞分离, 在支持内皮分化的培养基中培养的<sup>[12]</sup>。最近的研究表明带有 CD133 抗原的内皮祖细胞具有更好的分化潜能、表达及分化特异的特点<sup>[13]</sup>, 捕获 CD133 抗原阳性的内皮祖细胞支架可能会有更好的效果, 本实验设计的支架能即为捕获 CD133 抗原阳性内皮祖细胞, 加强内皮的愈合和功能恢复。

鉴于  $As_2O_3$  和 CD133<sup>+</sup> 抗体分别在抑制平滑肌细胞增殖、捕获内皮祖细胞进而修复血管内皮的功能, 我们设计了  $As_2O_3$ -CD133<sup>+</sup> 抗体复合药物涂层支架, 且使  $As_2O_3$  和 CD133<sup>+</sup> 抗体分别分布于支架的管壁面和管腔面, 最大程度趋利避害。本研究表明双面药物涂层支架能显著减少内膜/中膜的厚度比, 提示该支架降低支架内内膜增生; 且增加血管内膜的厚度和面积, 即促进血管内膜修复。

TFPI-2 是一种蛋白酶抑制因子, 与体内血栓形成有一定的相关<sup>[14]</sup>。血浆 TFPI-2 可抑制过度表达的组织因子的活性, 从而抑制了血栓的形成。从本研究结果看我们设计的  $As_2O_3$ -CD133<sup>+</sup> 抗体复合药物涂层支架, 能增加冠状动脉内 TFPI-2 的表达; 与球囊损伤组比较, 血浆 TFPI-2 的水平升高, 进而提示该支架降低了支架内血栓的形成的可能。

本实验通过动物体内实验初步证实了  $As_2O_3$ -CD133<sup>+</sup> 抗体双面涂层复合药物涂层支架同时降低 PCI 术后血管再狭窄率和 DES 植入后的冠状动脉及血浆 TFPI-2 的变化, 但缺乏与传统 DES 的对比实验。 $As_2O_3$ -CD133<sup>+</sup> 抗体双面涂层复合药物支架进一步应用尚需多方面的实验及临床研究。

#### [参考文献]

- [1] Fihn SD, Gardin JM, Abrams J, et al. 2012 ACC/AHA/ACP/AATS guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guide-

lines, and the american college of physicians, american association for thoracic surgery, preventive cardiovascular nurses association, society for cardiovascular angiography and interventions, and society of thoracic surgeons[J]. Circulation, 2012, 126: e354-471.

- [2] 杨蕾, 王丽娟. 冠状动脉支架内再狭窄的相关性因素分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(05): 449-551.
- [3] 梁祥文, 李平, 甘剑挺, 等. 冠状动脉支架置入后再狭窄危险因素 Logistic 回归分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 21(3): 283-286.
- [4] 陈欣, 苑飞, 周玉杰, 等. 采用光学相干断层成像技术评价海利欧斯雷帕霉素洗脱支架术 9 个月后内膜覆盖情况[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 17(4): 287-290.
- [5] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) in the treatment of acute promyelocytic leukemia:  $As_2O_3$  induces nb4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of pml-rar alpha/pml proteins[J]. Blood, 1996, 88: 1 052-061.
- [6] Diaz Z, Colombo M, Mann KK, et al. Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in apl and other malignant cell lines[J]. Blood, 2005, 105: 1 237-245.
- [7] Zhao Z, Huang C, Wang J, et al. Effect of arsenic trioxide on inhibition of restenosis after rabbit vascular injury and its mechanism [J]. Chinese medical journal[J]. 2012, 115: 1 608-614.
- [8] Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: Strut coverage as a marker of endothelialization[J]. Circulation, 2013, 115: 2 435-441.
- [9] Buja LM. Vascular responses to percutaneous coronary intervention with bare-metal stents and drug-eluting stents: A perspective based on insights from pathological and clinical studies[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 57: 1 323-326.
- [10] Brodie B, Pokharel Y, Fleishman N, 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, Cardiovas Interv, 2011, 4: 30-38.
- [11] Otsuka F, Nakano M, Ladich E, et al. Pathologic etiologies of late and very late stent thrombosis following first-generation drug-eluting stent placement[J]. Thrombosis, 2012, 2012: 608 593.
- [12] Nakazawa G, Granada JF, Alviar CL, et al. Anti-cd34 antibodies immobilized on the surface of sirolimus-eluting stents enhance stent endothelialization[J]. JACC, Cardiovas Interv, 2010, 3: 68-75.
- [13] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J]. Blood, 2000, 95: 3 106-112.
- [14] Zhao B, Luo X, Shi H, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is downregulated by ox-LDL and inhibits ox-LDL induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration [J]. Thromb Res, 2011, 128(2): 179-185.

(此文编辑 李小玲)