

## 心肌内生物可降解性药物缓释支架制备

吕 丰<sup>1</sup>, 刘天军<sup>1</sup>, 赵 健<sup>2</sup>, 刘晓程<sup>2</sup>, 宋存先<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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生物医学材料重点实验室, 天津 300192

<sup>2</sup>泰达国际心血管病医院心外科, 天津 300457

通信作者: 刘天军 电话/传真: 022-87893236, 电子邮件: liutianjun@hotmail.com

**摘要:** **目的** 制备心肌内生物可降解性药物缓释支架, 评估其对透室壁性心肌血管重建术 (TMR) 后心肌孔道的作用效果。 **方法** 以聚己内酯 (PCL) 为材料, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为模型药物, 以聚乳酸-聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 为药物载体, 制备成生物可降解性药物缓释支架。采用考马斯亮蓝试剂法对支架上 BSA 含量及体外释放量进行测定, 万能材料测定仪测定支架的力学性能, 核磁共振对支架的材料结构进行表征。制备猪慢性心肌局部缺血模型, 在体评估该支架在 TMR 后对心肌孔道的作用效果。 **结果** 该支架 BSA 吸附量为 13.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  支架, 30 d 后 BSA 释放量达 95%, 支架压缩 80% 时承受的应力为 1.7 MPa, 在 TMR 后可保持心肌孔道通畅。 **结论** 成功制备心肌内生物可降解性药物缓释支架, 能承受心肌压力并达到缓慢控制释放药物的效果, 可维持 TMR 后的心肌孔道通畅, 具有广泛的临床应用前景。

**关键词:** 生物可降解性药物缓释支架; 牛血清白蛋白; 聚己内酯; 聚乳酸-聚乙醇酸共聚物; 透室壁性心肌血管重建术

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2008)05-0578-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2008.05.015

## Preparation of a Biodegradable Drug-eluting Stent in Myocardium Channel

LÜ Feng<sup>1</sup>, LIU Tian-jun<sup>1</sup>, ZHAO Jian<sup>2</sup>, LIU Xiao-cheng<sup>2</sup>, SONG Cun-xian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tianjin Key Laboratory of Biomaterial Research, Institute of Biomedical Engineering, CAMS and PUMC, Tianjin 300192, China

<sup>2</sup> Department of Cardiovascular Surgery, TEDA International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China

Corresponding author: LIU Tian-jun Tel/Fax: 022-87893236, E-mail: liutianjun@hotmail.com

**ABSTRACT: Objective** To prepare a biodegradable drug-eluting stent in myocardium channel and evaluate its effect on myocardium channel after transmyocardial revascularization (TMR). **Methods** A biodegradable drug-eluting stent was prepared using poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), bovine serum albumin (BSA), and poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) as material of stent, model protein drug, and drug carrier respectively. The amount of BSA in stent and *in vitro* released BSA of stent were determined by the Coomassie brilliant blue assay. The mechanical strength of stent was tested by universal material testing machines. The material and structure of stent was characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The effect of stent on myocardium channel after TMR was evaluated *in vivo* by a standard animal model of chronic myocardial ischemia in miniswine. **Results** The stent could carry 13.1  $\mu\text{g}$  BSA per mg of stent and the stent could release about 95% of BSA after 30 days. The stent diminished 80% of initial scale under the stress of 1.7 Mpa. It

also kept the myocardium channel patency after TMR. **Conclusions** A biodegradable drug-eluting stent in myocardium channel was successfully prepared. It can sustain the pressure from the heart and achieve the controlled release of drug. The stent can ensure the myocardium channel patency after TMR.

**Key words:** biodegradable drug-eluting stent; bovine serum albumin; poly ( $\epsilon$ -caprolactone); poly (D, L-lactide-co-glycolide); transmyocardial revascularization

*Acta Acad Med Sin*, 2008,30(5):578-582

透室壁性心肌血管重建术 (transmyocardial revascularization, TMR) 是一项治疗顽固性心绞痛的新型外科技术, 其利用激光或机械方法进行透室壁性心肌打孔, 可减轻心绞痛, 提高缺血心肌灌注, 改善心功能<sup>[1-3]</sup>。然而研究显示, TMR 后透室壁性心肌血管通道不能保持长时间通畅, 容易闭合, 从而直接影响血流灌注效果<sup>[4]</sup>, 因此需要采用支架保持 TMR 通道开放, 促进血流灌注。在介入医学中, 金属支架被广泛应用于临床中, 但由于金属支架的不可降解性, 其永久存在将会引发损伤部位的免疫反应, 远期疗效并不理想, 而且随着时间的推移金属材料逐渐老化, 在体液中被腐蚀释放出金属离子, 对机体产生不良影响。生物可降解性聚合物支架能够在一定时间内保持支架的支撑性能, 随后可降解为无毒物质<sup>[5-7]</sup>, 当其完成支撑作用后, 可被组织完全吸收, 副作用较少, 同时其力学性能和降解时间还可通过聚合度和制备过程来控制, 因此较金属支架更具优势, 在临床上较大的应用前景。本研究制备了一种新型生物可降解性药物缓释支架, 初步评估了其对 TMR 后心肌孔道的作用效果。

## 材料和方法

**材料** 聚乳酸-聚乙醇酸共聚物 [poly (D, L-lactide-co-glycolide), PLGA; 聚乳酸: 聚乙醇酸 = 50/50 (mol %), Mw = 45 000] 购自中国科学院成都有机化学研究所; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA; 98% ~ 99%, 相对分子质量 67 000) 购自美国 Sigma 公司; 己内酯单体 (99.9%) 购自美国 Aldrich 公司; 普郎尼克 F68 (Mw = 8 300, 含 80% 聚氧乙烯和 20% 聚氧丙烯) 购自德国 BASF 公司; 实验用中国小型猪, 猪龄 3 ~ 4 个月, 体重 12 ~ 15 kg, 购自北京琉璃科兴实验动物养殖中心, 标准饲料喂养; 其他试剂均为国产分析纯。

**仪器** 螺杆挤出机 (SJ-400/20, 上海轻工业机械公司), 扫描电镜 (XL30ESEM, 荷兰 Philips 公

司), 核磁共振谱仪 (Mercury, 美国 Varian 公司), 紫外-可见分光光度计 (Spectramax, 美国 Molecular Devices 公司), 万能材料测试仪 (MS00-10KN, 英国 Testometric 公司), 恒温摇床 (HQL, 中国科学院武汉科学仪器厂), 微型电钻 (CT-800, 广东华仑电子工具公司)。

**PCL/F68 聚合物支架制备** 采用己内酯单体开环聚合制备聚己内酯 [poly ( $\epsilon$ -caprolactone), PCL], 参照文献 [8] 合成 PCL/F68 共聚物。将 PCL/F68 共聚物通过熔融挤出制备成外径 3.0 mm, 内径 2.6 mm 的空心管, 真空干燥后切割成长度为 1 cm 的管状支架。

**药物释放支架制备** 将 3 mg BSA 溶于 200  $\mu$ l 蒸馏水, 10 mg PLGA 溶于 400  $\mu$ l 丙酮, 然后将两种溶液混合后通过振荡形成水包油型乳液。将 PCL/F68 支架浸入该乳液中一段时间后取出, 常温干燥即得 PLGA 包埋 BSA 的药物缓释支架。另将 PCL/F68 支架直接浸入 15 mg/ml 的 BSA 溶液中通过物理吸附制备的药物支架作为对照。

**支架上 BSA 含量测定** 通过采用考马斯亮蓝试剂法测定支架上 BSA 含量: 首先将支架溶入  $\text{CHCl}_3$ , 然后用蒸馏水萃取多次, 合并水相溶液, 加入浓度为 0.01% 考马斯亮蓝试剂, 通过紫外-可见分光光度计测定 595 nm 处吸光值来测定水相里 BSA 含量 (一定范围内该吸光值与 BSA 浓度成正比)。

**支架上 BSA 体外释放测试** 将支架放入含有 3 ml 0.1 mol/L 缓冲溶液试管中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中 130 r/min 振荡一定时间后置换 BSA 溶液。采用考马斯亮蓝试剂法测定该 BSA 溶液释放量, 每次释放实验重复 3 次。

**支架形貌与性能表征检测** 采用扫描电镜观察支架表面及其断面, 万能材料测定仪测定支架力学性能, 核磁共振谱对支架材料结构进行表征。

**支架动物实验评估** 参照文献 [9] 建立猪慢性心肌局部缺血模型: (1) 经肌肉注射 0.25 mg/kg 甲苯噻嗪和 2 mg 阿托品, 静脉注射 10 mg/kg 硫戊巴比妥

钠 (2.5%), 气管插管, 接呼吸机辅助呼吸, 再注射 0.5% 异氟烷和 1 mg/kg 利多卡因。(2) 取胸骨正中切口, 打开胸腔及心包, 暴露心脏, 直视下在左心室前壁用微型钻 (直径 3 mm) 进行心肌打孔, 实验组为穿透心壁后迅速将制备的支架放入心肌孔道内, 并于管道外口处结扎固定; 对照组为心肌打孔后未放入支架。(3) 关闭胸腔, 缝合, 静脉注射肝素, 待其恢复, 于术后 6 周处死, 取出心肌组织及支架分析表征。

## 结 果

**支架的表面形貌** 扫描电镜观察结果显示, 初始 PCL/F68 支架表面非常光滑 (图 1A), 经过丙酮/水溶液刻蚀后, 表面呈现多孔结构 (图 1B), 当 PLGA/BSA 溶液填充微孔后, 可以看到一些微球在支架表面, 同时看不到原有的微孔 (图 1C)。

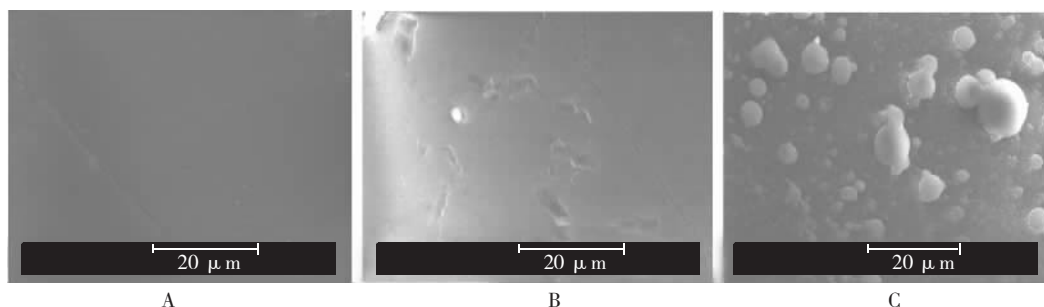


图 1 支架表面形貌的扫描电镜照片

Fig 1 Scan electron microscopic photos of the morphologies of stent surfaces

A. PCL/F68 支架; B. 丙酮处理后的多孔支架; C. 药物支架

A. PCL/F68 stents; B. porous stents after acetone corrosion; C. stents with PLGA-loading bovine serum albumin

**支架上 BSA 含量测定结果** 考马斯亮蓝试剂法测定结果显示, 通过 PLGA 包埋 BSA 后填充到支架微孔方法的 BSA 吸附量为 13.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  支架, 高于 PCL/F68 支架物理吸附 BSA 方法的 1.8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  支架。

**支架上 BSA 体外释放结果** 支架上 BSA 的体外释放研究结果显示, 大约 50% 的 BSA 在第 1 天释放, 随后 BSA 保持持续稳定释放, 30 d 后 BSA 释放量达 95% (图 2)。

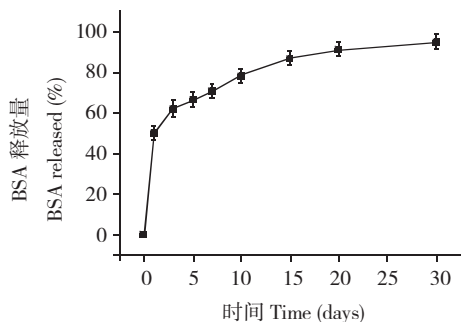


图 2 支架上牛血清白蛋白体外释放曲线

Fig 2 *In vitro* bovine serum albumin release curve

**支架力学性能测试结果** 力学性能测试结果显示, 支架压缩 80% 时, 其承受的应力为 1.7MPa (图 3)。

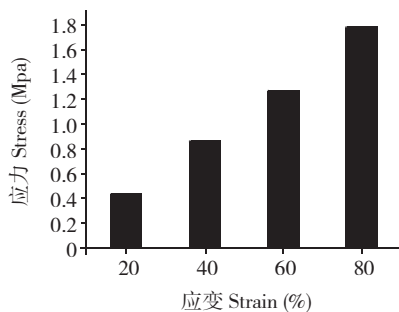


图 3 支架的应力-应变关系曲线图

Fig 3 Stress-strain curve of the stent

**动物实验结果** 共有 15 只小型猪入选, 其中 1 只因麻醉过深死亡, 2 只在术后发生心力衰竭治疗无效死亡, 其余 12 只随机分为实验组和对照组, 每组 6 只, 每只动物 TMR 打孔 2 个。结果显示, 实验组的 12 个 TMR 心肌孔道全部保持通畅, 而对照组 TMR 心肌通道均闭合。扫描电镜观察结果显示, 实验组动物含有支架的心肌 TMR 通道仍保持通畅, 双层复合支架结构已破坏, 外层药物载体层完全降解, 仅剩内层 PCL 结构层, 同时支架可保持原有形状, 部分支架与心肌组织结合紧密, 支架周围心肌局部缺血得到改善 (图 4)。对心肌管道内取出的支架碎片进行的核磁共振谱检测结果显示, PCL/PLGA 支架具

有两种材料的特征峰，而支架植入体内 6 周仅剩 PCL 材料特征，PLGA 层完全降解，药物也已经释放

完全 (图 5)。

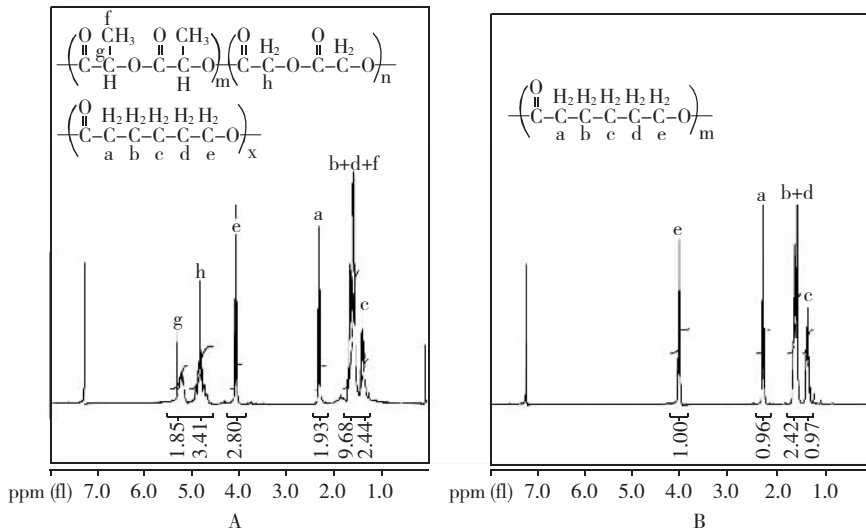


图 5 支架的核磁共振谱检测结果

Fig 5 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of stent

A. PCL/PLGA 支架; B. 体内作用 6 周后的支架

A. PCL/PLGA stent; B. stent taken out from myocardium after 6 weeks

## 讨 论

生物可降解性药物缓释支架在血管、胆管和食管内的应用已有广泛研究<sup>[10-13]</sup>，但由于心肌内支架研究较少，而其他用途的支架也不能完全满足心肌血运重建的需要，因此应该针对心肌血运重建的需要进行专门设计。本研究选用具有较好力学性能的半结晶性聚合物 PCL 作为支架材料，采用熔融挤出方法制备支架结构层，通过挤出定型过程中的拉伸作用使支架有一定取向，而 PCL 在室温下就可以结晶，进而赋予支架较好的力学性能。由于该材料玻璃化温度较低，可以使支架保持一定弹性，提高支架抗疲劳能力，且降解时间相对缓慢，故使支架降解一段时间后还可以保持支撑能力。本研究在猪慢性心肌局部缺血模型中应用该支架的初步结果显示，应用 6 周后该支架仍能保持 TMR 孔道通畅，且支架未变形，能够继续起到支撑作用。

蛋白类药物在心肌局部缺血治疗中具有较好的作用，如血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子等生长因子，均能刺激血管再生，改善组织血液灌注，其与 TMR 结合能促进动脉血管生成，有助于局部心肌功能的修复<sup>[14-16]</sup>。但是生长因子在血

液循环中的半衰期很短，靶向定位差，难以发挥长久持续的促血管生成作用，而全身性大量应用又会引起血压下降和潜在的促肿瘤诱变等不良副作用。因此，实现局部定向、高效缓释是蛋白类药物得以推广于临床的关键。如果把缓释释蛋白类药物的支架应用到 TMR 中将有利于心肌缺血性疾病的治疗。本研究选用 PLGA 作为药物缓释载体，以白蛋白为模型药物，评估了该类药物支架的性能。结果显示，该材料在 1~2 个月可以降解，能够缓慢释放药物超过 30 d，而且可以控制支架载药量，同时具有一定的力学性能，提示该支架具有较好的临床可行性。

综上所述，本研究成功制备了 PCL/PLGA 药物缓释支架，该支架能够承受心肌压力，具有一定力学强度，可持续释放药物达 30 d 以上，达到缓慢释放的目的，并保持 TMR 孔道通畅，可提高心肌血运重建效果，在心肌缺血性疾病治疗中发挥一定作用，是一种比较有应用前景的药物释放支架。

(本文图 4 见插图第 4 页)

## 参 考 文 献

- [1] Pelletier MP, Giaid A, Sivaraman S, et al. Angiogenesis and growth factor expression in a model of transmural

- revascularization [J]. *Ann Thorac Surg*, 1998, 66(11): 12-18.
- [2] Hughes GC, Biswas SS, Yin BL, *et al.* A comparison of mechanical and laser transmyocardial revascularization for induction of angiogenesis and arteriogenesis in chronically ischemic myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(7):1220-1228.
- [3] Aaberge L, Nordstrand K, Dragsund M, *et al.* Transmyocardial revascularization with CO<sub>2</sub> laser in patients with refractory angina pectoris [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35(5):1170-1177.
- [4] Chu VF, Giaid A, Kuang JQ, *et al.* Angiogenesis in transmyocardial revascularization: comparison of laser versus mechanical punctures [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(8):301-308.
- [5] Isotalo T, Talja M, Valimaa T, *et al.* A bioabsorbable self-expandable, self-reinforced poly-L-lactic acid urethral stent for recurrent urethral strictures; long-term results [J]. *J Endourol*, 2002, 16(10):759-762.
- [6] Venkatraman SS, Tan LP, Joso JF. Biodegradable stents with elastic memory [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(8): 1573-1578.
- [7] Alimaaa V, Laaksovirta S, Tammela TL. Viscoelastic memory and self-expansion of self-reinforced bioabsorbable stents [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(17):3575-3582.
- [8] Sun HF, Mei L, Song CX, *et al.* The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9):1735-1740.
- [9] Horvath KA, Lu CY, Robert E, *et al.* Improvement of myocardial contractility in a porcine model of chronic ischemia using a combined transmyocardial revascularization and gene therapy approach [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 129(5):1071-1077.
- [10] Zilberman M, Eberhart RC. Drug-eluting bioresorbable stents for various applications [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8:153-180.
- [11] Vogt F, Stein A, Rettemeier G, *et al.* Long-term assessment of a novel biodegradable paclitaxel-eluting coronary poly-lactide stent [J]. *Eur Heart J*, 2004, 25(15):1330-1340.
- [12] Venkatraman SS, Tan LP, Vinalia T, *et al.* Collapse pressures of biodegradable stents [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(12):2105-2111.
- [13] Wang XT, Venkatraman SS, Boey FY, *et al.* Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(32):5588-5595.
- [14] Heilmanna CA, Attmanna T, Samson P. Transmyocardial laser revascularization combined with vascular endothelial growth factor121 (VEGF121) gene therapy for chronic myocardial ischemia [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 23(1):74-80.
- [15] Attmanna T, Heilmannb C, Siepe M. Transgenic and transmural revascularization; regional myocardial tissue pressure during chronic ischemia [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2004, 3(1):138-144.
- [16] Semmelweis ER, Maisch B, Moosdorf R, *et al.* Vascular endothelial growth factor-1 gene transfer effect of angiogenesis in transmyocardial laser revascularization treated porcine myocardium [J]. *Int J Cardiol*, 2004, 95(1):S70-S72.

(2008-04-03 收稿)