文章编号:1000-5404(2008)10-0935-03

论著

地塞米松血管内支架的涂层制备及体外缓释实验研究

陈勇鹏[1,3],王贵学[3],陈 琰[2],晋献春[1],侯延斌[3],罗来龙[3],孙大贵[4] (第三军医大学新桥医院:[1]中医科,[2]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;重庆大学:[3]生物工程学院,[4]化学化工学院,重庆 400044)

摘 要:目的 制备地塞米松血管内支架的涂层,观察体外缓释特性。**方法** 采用喷涂、浸涂两种方法制备支架,以高效液相色谱仪检测载药量,并进行体外药物缓释测定。**结果** 喷涂支架的载药量为(24.26±5.23) μg,浸涂4 d的载药量为(93.15±7.83) μg。浸涂4 d的支架,药物缓慢释放,15 d时释放84%。**结论** 制备的支架具有明显的缓释作用。

关键词: 地塞米松;支架;体外研究;缓释
中图法分类号: R944.9;R969;R977.11 **文献标识码:** A

Coating for dexamethasone-eluting intravascular stent and its drug sustained release *in vitro*

CHEN Yong-peng[1,3], WANG Gui-xue[3], CHEN Yan[2], JIN Xian-chun[1], HOU Yan-bin[3], LUO Lai-long[3], SUN Da-gui[4] ([1]Department of Traditional Chinese Medicine, [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [3]College of Bioengineering, [4]College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To prepare the coating of dexamethasone-eluting intravascular stent and observe the features of its delayed release *in vitro*. Methods Spray painting and dipping coating were used respectively to prepare stent coating, and then high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the drug loading. The stents prepared by dipping coating were set in a flow of 50 ml PBS buffer at a velocity of 20 ml/min, and 0.5 ml buffer was collected at 6 h and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 d respectively with another 0.5 ml fresh PBS being added immediately. The drug content of the 0.5 ml buffer was detected by HPLC for drug sustained release *in vitro*. Results The drug loading of stents prepared by spray painting was (24.26±5.23) μg, while that stents prepared by dipping coating for 4 d was (93.15±7.83) μg. Drugs were released slowly and the release rate reached 84% at 15 d. Conclusion The dipping coating-prepared stents have evident effect of sustained release.

Key words: dexamethasone; stents; *in vitro*; sustained release

冠心病是导致人类死亡的重要原因之一,其发病率和死亡率快速增加。据卫生部通报,1991-2000年我国40~64岁人群的冠心病病死率高于美国。支架植入术以患者痛苦小、术后恢复快等优点,已成为冠心病介入治疗的首选方法。我国在2005年对冠状动脉支架年需求在10万支以上,市场规模约为50亿元,到2008年后预计需求将达30万支。药物洗脱支架在病变局部释放药物,不引起全身的药物毒性反应[1],成为介入性心脏病学中的第3个里程碑[2]。目前支架上使用的抗狭窄药物大都难溶于水,地塞米松几乎不溶于水,这一特性有利于药物的释放。地塞米松通过抑制术后血管局部炎症反应,降低支架术后再狭窄率。本研究通过喷涂、浸涂两种方法制备地塞米松洗脱性血管内支架,并进行体外药物缓释测定,为进一步的支架置入动物体内及人体内研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

地塞米松(DXM)购自Sigma公司,纯度≥98%,左旋聚乳

基金项目:国际科技合作重点项目(2004DFA06400);第三军医大学中青年基金(06XG030);重庆市科技攻关项目(2006AA5014-3);重庆市发改委产业化前期项目(2005-1006)
Supported by the Key Program of Internaltional Sci & Tech Cooperation Projects (2004DFA06400), the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University for Young Scholars (06XG030), the Sci & Tech Project of Chongqing (2006AA5014-3) and the Industrialization Project of Chongqing Development and Reform Commission (2005-1006)

作者简介:陈勇鹏,男,四川省岳池县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事血管内支架方面的研究。电话:(023)68774649
通信作者:王贵学,电话:(023) 65112675,E-mail: wanggx@cqu.edu.cn

收稿日期:2007-10-30;修回日期:2007-12-18

酸(PLLA,相对分子质量 250 000)购自 Sigma 公司,316 L 冠状动脉裸支架购自北京美中双和医疗器械有限公司,高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC, Agilent1100 型)购自 Agilent 公司,恒流泵购自保定兰格恒流泵有限公司,电子天平购自沈阳龙腾电子有限公司,电热鼓风干燥箱购自重庆银河试验仪器有限公司,超声雾化血管支架喷涂装置自制(国家发明专利申请号:200610054046.7,公开号:CN1827178),流动腔装置自制(专利号:ZL 200620163943.7)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件及标准曲线建立 高效液相色谱仪测定时的色谱条件:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈 - 水(4∶6)为流动相,将双蒸水及流动相用 0.22 μm 的滤膜过滤,检测波长为 240 nm。建立标准曲线:精密量取地塞米松 2 mg 于 25 ml 量瓶中,用甲醇稀释并定容,配制成药物浓度分别为 0.01、0.05、0.2、1、5、10、15、20 、25 μg/ml 的一系列溶液,0.22 μm 滤膜过滤。按上述色谱条件进样 20 μl,记录峰面积。以地塞米松的峰面积 A 对其浓度 C(μg/ml)进行回归,得到回归方程,求出线性关系良好的地塞米松浓度范围。HPLC 表明,DXM 在此色谱条件下,峰形良好,其标准曲线方程为:$y = 48.095x + 11.962$,$r^2 = 0.999\ 7$,线性范围为 0.2 ~ 25 μg/ml。

1.2.2 涂层制备

1.2.2.1 喷涂 以三氯甲烷为溶剂制备含 PLLA 及地塞米松的溶液,采用超声雾化血管支架喷涂装置将该溶液喷涂到支架上,喷涂后的支架干燥 12 h。然后喷涂 PLLA 溶液,干燥 12 h。分别用 5 ml 四氢呋喃以摇瓶法洗脱支架,取支架的洗脱液在高效液相色谱仪上测定药物浓度。

1.2.2.2 浸涂 将地塞米松溶于三氯甲烷中,再加入PLLA,地塞米松与 PLLA 比例为 2∶1。将支架放入涂层溶液中,再放于以 80 r/min 旋转的空气浴振荡器上进行浸涂,分别于浸涂 1、2、3、4、5 d 时取出,干燥 12 h。干燥完毕后,再喷涂 1 层 PLLA。

1.2.3 体外药物缓释测定 在 37 ℃条件下,将支架放置在流动腔中,浸入 50 ml pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,调节恒流泵,以 20 ml/min 的速度洗脱支架。在第 6 小时和第 1、2、4、6、8、10、12、15 天时取缓冲液 0.5 ml,并以新鲜缓冲液补充。按照文献[3]方法,以乙腈 - 水(4∶6)为流动相,检测波长为 240 nm,用 HPLC 测得不同时间点的缓冲液中的药物浓度。最后将体外缓释实验后的支架,用四氢呋喃洗脱,得出初始载药量,求出不同阶段的药物释放比例,作出体外缓释曲线。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件,对浸涂支架的载药量及体外药物释放进行单因素方差分析,对喷涂支架及浸涂支架的载药量比较采用成组设计资料两均数间 t 检验。

2 结果

2.1 喷涂

用 5 ml 四氢呋喃洗脱喷涂的支架,以 HPLC 测定洗脱液的药物浓度,测得喷涂支架的载药量为(24.26 ± 5.23)μg。

2.2 浸涂

同 2.1 法测定药物浓度,测得浸涂 1、2、3、4、5 d 的支架载药量分别为(41.77 ± 7.25)、(67.64 ± 6.45)、(84.71 ± 4.20)、(93.15 ± 7.83)、(95.38 ± 7.94)μg。与浸涂 1 d 比较,2、3、4、5 d 的载药量增加;与浸涂 2 d 比较,4、5 d 的载药量增加。浸涂的载药量高于喷涂($P < 0.01$)。以浸涂 4 d 的支架进行体外药物缓释。

2.3 体外药物缓释测定

在 9 个预定时间点测得的药物释放量分别为(11.53 ± 4.27)、(15.85 ± 1.57)、(25.53 ± 4.08)、(40.68 ± 3.85)、(53.45 ± 8.75)、(70.96 ± 5.63)、(88.58 ± 6.59)、(92.25 ± 11.50)、(97.83 ± 10.75)μg,支架剩余药量为(18.05 ± 2.49)μg。经统计学分析,各时间点药物释放量差异有统计学意义($P < 0.05$),第 6 小时时,出现暴释情况,释放总药量的 9.75%,第 1 天释放 13%,以后缓慢释放,15 d 时释放 84%。见图 1、2。

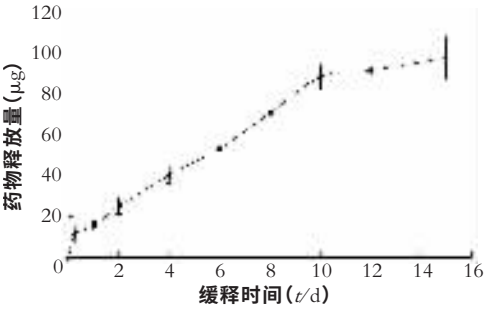


图 1 体外药物释放量

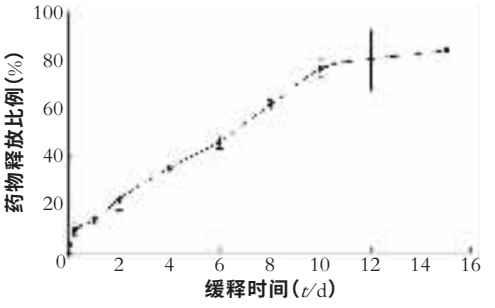


图 2 体外药物释放百分比

3 讨论

药物洗脱支架是目前冠心病血管狭窄的常用介入治疗方法。Yoon 等[4]发现地塞米松既能抑制淋巴细胞的炎症反应,又能抑制平滑肌细胞的增殖。王建波等[5]发现地塞米松以浓度依赖模式抑制大鼠平滑肌细胞的增殖细胞核抗原的基因表达,从而抑制平滑肌细胞的增殖。可见,地塞米松涂层预防支架内再狭窄的机制除了抑制炎症反应外,还能减少血管新生内膜增生,抑制平滑肌细胞的增殖。

本实验采用中国药典 2005 年版的 HPLC 检测条件,发现标准曲线的线性回归良好。利用载气携带超声雾化的气溶胶雾滴喷涂在旋转的支架表面,该喷涂降低了支架表面的粗糙度,形成均匀药物涂层。药物浸涂实验发现随着吸附时间的增加,支架载药量也增加,到第 4 天时,载药量基本稳定。从喷涂与浸涂的载

药量来看,前者为(24.26 ± 5.23) μg,后者浸涂 4 d 的药量为(93.15 ± 7.83) μg,浸涂的载药量高于喷涂,故选用浸涂 4 d 的方案来制备支架并进行体外药物释放测定。在体外药物缓释测定中,采用自制的流动腔装置,该装置模拟置入支架的血管,使支架上的药物缓释检测进一步优化。结果表明,第 6 小时时,出现暴释情况,可能与药物的扩散有关,以后缓慢释放,药物释放到 15 d 时,仍剩余 16%,表明支架具有药物缓释作用。该缓释作用使药物主冠状动脉局部范围内缓慢释放,对病变局部缓慢提供长期的药物,从而抑制细胞过度增殖,防治支架内再狭窄,达到有效治疗冠心病的目的。

参考文献:

[1] Sousa J E, Serruys P W, Costa M A. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part I[J]. Circulation, 2003, 107(17): 2274 - 2279.

[2] Saia F, Marzocchi A, Serruys P W. Drug-eluting stents. The third revolution in percutaneous coronary intervention[J]. Ital Heart J, 2005, 6(4): 289 - 303.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2005 年版:二部[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 184.

[4] Yoon J J, Kim J H, Park T G. Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method [J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2323 - 2329.

[5] 王建波, 杨建勇, 陈　伟, 等. 地塞米松对血管内支架介入术后再狭窄作用的实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16(3): 194 - 197.

(编辑　龙　亮)

(上接 934 页)



图 1　DSA 显示大脑后动脉动脉瘤
图 2　大脑后动脉动脉瘤三维重建

3　讨论

目前,颅内 DSA 血管造影检查被公认为颅内血管性疾病诊断的金标准。常规 DSA 正侧位影像中,由于患者颅内血管痉挛致载瘤动脉或动脉瘤充盈不够或血管走行重叠、成角及投照角度选择不当等原因,往往造成部分血管显示不清[2]。应用旋转 DSA 和血管三维重建成像技术可以通过一次旋转投照获得满意的三维血管影像,非常清晰地显示瘤颈及动脉瘤与载瘤动脉的关系,并可减少患者的辐射剂量和造影剂的用量,减少患者检查时间[3]。

旋转 DSA 的技术的特点是通过一次注射对比剂,即可从多角度观察血管形态,在回放时可分别得到相应角度的减影图像,清晰地显示血管解剖学的结构和形态[4,5]。技术操作的关键是在确保患者头部保持不动的状态下,正确选择旋转角度、起始位置及方向、对比剂注射参数。根据病变血管位置、大小及走行方向,将旋转角度设为 0 ~ 180°,并确定旋转起始位置及方向,一般选择正位、侧位、冠状位、斜位等。对比剂的注射参数设置主要注意对比剂充盈时间与旋转角度需相匹配,使采集图像过程中始终保持动脉血管内充满对比剂。另外,还可根据情况应用滤线装置,减少饱和状伪影对影像的影响,并且尽可能地缩小管球与影像增强器的距离,提高影像质量,减少 X 线辐射量。

图像后处理时选用 VR、RSD、MIP 等方法进行重建。SSD 可形象清晰地显示血管的形态;MIP 对细小血管显示较好,尤其为水平走行的优于 SSD;VR 可以移动、旋转、放大,还可以切除图像中不需要的结构及边缘锐化等相应的处理,清楚显示所有血管及动脉瘤的形态大小;RAYSUM 法通过滤掉血管内造影剂成分,以透明方式显示血管壁病变如血管粥样硬化、斑块等,还可以通过其他功能如曲面矫正、血管拉直、自动定位功能及血管测量等进行诊断治疗。

在 6 例未成功中有 4 例因注入造影剂后患者出现心情烦躁,患者不合作从而导致造影时所显示的图像模糊不清无法明确诊断治疗;有 2 例因有颈部血管狭窄和斑块使导管无法进入病变部位从而导致病变部位无法明确显示因而造影失败。因此在造影中应注意即使患者出现有过敏反应时应及时作出相应的处理,待病情稳定后在继续检查,遇有狭窄和斑块的病变时应在一端作非选择性造影,即使不能很好的显示远端的血管,但也可以大概了解一些血管的情况以避免出现对患者的延误诊断和治疗。

总之,旋转 DSA 比常规 DSA 提供了更丰富的影像资料,有助于分析复杂的血管解剖结构,为血管性病变的诊断和治疗提供了最佳投照角度,减少了额外的 DSA 造影次数及造影剂用量,节省了检查和治疗时间,提高了诊治的安全性。

关键词: 旋转数字减影血管造影;三维重建;颅内血管造影
中图法分类号: R739　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 薛玉富, 何泽清, 陈明煌, 等. 旋转 DSA 结合 Automap 在颅内动脉瘤成像中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2199 - 2200.

[2] 向贤宏, 周　石, 于广计, 等. 三维 DSA 与常规 DSA 诊断颅内动脉瘤的比较[J]. 贵州医药, 2006, 30(11): 993 - 996.

[3] 曹玉梅. 旋转 DSA 诊断颅内动脉瘤的临床价值[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(6): 810 - 811.

[4] Kojima A, Yamaguchi N, Okui S. Three dimensional digital subtraction angiography imaging of a ruptured aneurysm on the anterior communicating artery[J]. Surg Neurol, 2002, 58(1): 49 - 52.

[5] 黄文诺, 吴勇健, 陈　明. 旋转 DSA 技术在脑血管造影中的应用[J]. 临床放射学杂志, 2002, 21(4): 326 - 327.

(编辑　龙　亮)