

西罗莫司涂层气管支架在气管狭窄动物模型中的应用

李宗明, 张全会, 韩新巍, 焦德超, 任克伟, 路慧彬

【摘要】 目的:探讨西罗莫司涂层气管支架抑制气管狭窄动物模型肉芽组织增生的有效性。**方法:**选用 2.5~3.0 kg 新西兰大耳白兔 36 只,分成对照组($n=18$ 只),置入普通镍钛合金裸支架,实验组($n=18$ 只),置入西罗莫司涂层镍钛合金裸支架;每组内根据处死时间分为 1 个月组、2 个月组和 3 个月组,各 6 只。采用气管切开联合毛刷破坏粘膜法制作气管狭窄动物模型。镍钛合金裸支架 36 枚,其中 18 枚浸涂以 PLGA 为载体的西罗莫司涂层,并进行体外药物缓释实验。透视下行气管支架置入,分别于支架置入后的 1 个月、2 个月和 3 个月复查胸部 CT 了解气管狭窄情况,并处死相应组别的兔子,于支架上下两端取标本行 HE 染色病理检查比较两组气管粘膜增生情况。**结果:**制作气管狭窄模型过程中 1 只死于麻醉过深,2 只在模型制作后 3 d 因严重气管粘膜充血水肿死亡,其余 33 只气管狭窄模型制作成功,补做 3 只均成功,狭窄程度 50%~85%。所有气管狭窄模型均一次性成功置入气管支架。术后 1 个月、2 个月和 3 个月复查胸部 CT 显示对照组支架上下缘均有不同程度的肉芽组织增生,以支架上缘为著,最狭窄处平均狭窄程度分别为 $(81.6\pm 2.8)\%$ 、 $(66.4\pm 1.6)\%$ 和 $(78.2\pm 2.3)\%$ 。实验组肉芽组织增生明显较轻,最狭窄处平均狭窄程度分别为 $(61.68\pm 2.3)\%$ 、 $(45.23\pm 4.5)\%$ 和 $(50.97\pm 3.8)\%$ 。处死实验兔于支架上下缘取标本行病理检查见药物涂层支架组织纤维素增生和胶原蛋白沉积程度较轻。**结论:**西罗莫司涂层可有效抑制镍钛合金支架置入后的肉芽组织增生,降低支架置入后再狭窄程度。

【关键词】 气管; 支架; 西罗莫司; 药物涂层支架; 肉芽组织; 模型, 动物; 体层摄影术, X 线计算机

【中图分类号】 R322.33; R618; R916.4; R329; R-33; R814.42 **【文献标识码】** A

【文章编号】 1000-0313(2021)06-0717-05

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2021.06.005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Preliminary application of sirolimus-coated tracheal stent in tracheal models of tracheal stenosis LI

Zong-ming, ZHANG Quan-hui, HAN Xin-wei, et al. Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effectiveness of sirolimus coated tracheal stent in inhibiting granulation tissue proliferation in tracheal stenosis animal models. **Methods:** Thirty-six New Zealand white rabbits (2.5~3.0kg) were selected and divided into control group ($n=18$) and experimental group ($n=18$). The bare nickel-titanium alloy stents and sirolimus-coated bare nickel-titanium alloy stents were implanted respectively. According to the time of execution, each group was divided into 1 month group, 2 months group and 3 months group, with 6 rabbits in each group. Tracheotomy combined with brush destroying mucosa was used to make animal model of tracheal stenosis. Thirty-six bare nickel-titanium alloy scaffolds, 18 of which were dipped with sirolimus coatings supported on PLGA, were conducted in vitro drug release experiments. The tracheal stent was implanted under fluoroscopy. The tracheal stenosis was observed by chest CT in 1 month, 2 months and 3 months after stent implantation before execution. The specimens were taken from the upper and lower ends of stent for HE staining and pathological examination to compare the tracheal mucosal hyperplasia of the two groups. **Results:** During the process of making tracheal stenosis models, one died of too deep anesthesia and two died of severe tracheal mucosal congestion and edema three days after making the model. The other 33 tracheal stenosis models were successfully made, and three more were successful, with the de-

作者单位: 450052 郑州, 郑州大学第一附属医院介入科

作者简介: 李宗明(1986-), 男, 河南虞城县人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事非血管腔道疾病的介入治疗与研究工作。

通信作者: 韩新巍, E-mail: hanxinwei2006@163.com

基金项目: 河南省科技攻关计划项目/省部共建青年项目(SB201902005)

gree of stenosis ranging from 50% to 85%. All tracheal stenosis models were successfully implanted with tracheal stents at one time. Chest CT scans at 1 month, 2 months and 3 months after operation showed that there were different degrees of granulation tissue proliferation in the upper and lower edges of the stent in the control group. The average stenosis degree at the upper edge of the stent was $(81.6 \pm 2.8)\%$, $(66.4 \pm 1.6)\%$ and $(78.2 \pm 2.3)\%$ respectively. In the experimental group, the proliferation of granulation tissue was significantly lighter, and the average degree of stenosis at the most narrow sites were $(61.68 \pm 2.3)\%$, $(45.23 \pm 4.5)\%$ and $(50.97 \pm 3.8)\%$ respectively. Pathological examination showed that the degree of cellulose proliferation and collagen deposition in the drug-coated stent group was slightly lower than that in the control group. **Conclusion:** Sirolimus coating can effectively inhibit the proliferation of granulation tissue and reduce the degree of restenosis after stent implantation.

【Key words】 Trachea; Stents; Sirolimus; Drug-coated stents; Granulation tissue; Models, animal; Tomography, X-ray computed

自 1891 年 Bond 用一根 T 形塑料管治疗气管狭窄获得了成功以来,气道支架在气道狭窄治疗方面取得了长足进步,尤其是在恶性气道狭窄治疗方面已被临床公认为是一种快速有效的急救手段。目前临床上常用支架主要有镍钛记忆合金支架和硅酮支架,在良性气道狭窄治疗方面暴露出了局限性,支架磨损气道粘膜导致炎性修复,肉芽组织过度增生导致气道再狭窄,严重影响支架治疗效果。

有学者^[1,2]尝试气管镜下于肉芽组织增生处局部多点单次注射抗增殖药物,也有学者^[3,4]尝试在支架表面涂抹抗增殖药物,但由于药量小,释放快,作用时间短,没能有效抑制肉芽组织的增生。本课题首先制作气管狭窄动物模型,尝试在气管支架表面涂抹缓慢降解的药物涂层,逐渐释放抗增殖药物,起到长时间抑制肉芽组织增生的效果。

材料与方法

1. 对象

选用 2.5~3.0 kg 新西兰大耳白兔 36 只,雌雄不限,分成对照组($n=18$ 只),置入普通镍钛合金裸支架,实验组($n=18$ 只),置入西罗莫司涂层镍钛合金裸支架;每组内根据处死时间分为 1 个月组、2 个月组和 3 个月组,各 6 只。

2. 方法

气管狭窄动物模型建立:0.5 mL 速眠新肌肉注射麻醉,将实验兔固定在实验台上,备皮、消毒、铺巾,逐层切开皮肤、皮下肌肉,暴露出颈部气管,气管软骨环间切开气管约 1 cm,通过切口送入毛刷(图 1a)于切口下 1 cm 环形破坏气管粘膜(图 1b),缝合气管切口,并逐层缝合皮下组织和皮肤,消毒包扎。术后 3d 内耳缘静脉注射美洛西林注射液。1 个月后复查胸部 CT(图 1c),建立兔气管狭窄动物模型。

药物涂层支架制备:实验仪器及器械:电热鼓风干燥箱、电子天平、超声波清洗器、恒温孵箱、红外光谱仪、扫描电子显微镜。

试剂:聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactic acid-glycolic acid copolymer, PLGA)(75:25, $M_r=10000$)、西罗莫司原料药、甲醇、二氯甲烷。

支架:镍钛合金裸支架,管状,8 mm×20 mm 型号。支架清洗:将镍钛合金支架置入于有机溶剂二氯甲烷中浸泡 2h 后取出,置于通风橱内 2h,待二氯甲烷完全挥发后将支架置于超声波清洗器中清洗 20 min 去除支架表面杂质,烤箱中 50℃ 烤干备用。

制备药物涂层支架:配制西罗莫司与 PLGA 质量比 1:10 的浸涂液,以二氯甲烷为溶剂配制 2.5% PLGA 溶液 13 mL,精确称量西罗莫司,以甲醇为溶剂配制西罗莫司的甲醇溶液 7 mL,之后将两种溶液混合。将清洗过的镍钛合金支架置于溶液中浸涂 20 min,然后将支架置于 40℃ 烤箱中烘烤 4h 使溶剂充分挥发,按上述操作再次浸涂 20 min 后取出烘干,将支架压入支架输送器后环氧乙烷消毒备用。

红外光谱仪检测:配制 PLGA-西罗莫司浸涂液,使溶剂挥发后制成 PLGA-西罗莫司药膜样本。利用红外光谱仪分别检测西罗莫司,PLGA 及 PLGA-西罗莫司药膜样本,通过检测 PLGA 与西罗莫司是否在支架制备过程中发生化学反应。

扫描电镜观察:取制备好的气管药物涂层支架及从输送器中推送出的药物涂层支架各一个,常规喷金后行扫描电镜检测,观察支架表面涂层情况。

3. 涂层支架药物的体外缓释实验

实验仪器:Agilent1200 高效液相色谱仪、1200 DAD 检测器、电子天平(梅特勒,Newclassic)、KH-250B 超声波清洗器、ST16R 低温离心机。

试剂:二水合磷酸二氢钠(北京化工厂,批号

20100512, 分析纯)、十二水合磷酸氢二钠(北京化工厂, 批号 20170106, 分析纯)、甲醇(北京百灵威科技有限公司, 批号 L170T96, 色谱纯)、乙腈(上海霍启书尔贸易有限公司, 批号 Q70A1H, 色谱纯)、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(北京百灵威科技有限公司, 批号 LM70T82, 纯度: 98.5%)。

萃取液: ① 0.01M PBS 溶液: 准确称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.441 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.368 g, 加入 1 L 水溶解; ② 0.02% BHT 乙腈溶液: 精密称取 BHT 100 mg 至 500 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 混匀; ③ 取 0.01M PBS 溶液 650 mL 和 0.02% BHT

乙腈溶液 350 mL 摇匀, 即得萃取液。

支架处理: 将药物涂层支架至 10 mL 棕色瓶中, 加适量支架萃取液覆盖支架, 超声 (240W) 20 min 取样, 用萃取液定容至刻度, 混匀, 取适量提取溶液转移至离心管中, 23755 g 离心 10 min, 取上清液 200 μL 至进样衬管中。

质控溶液: 取精密称取 9.93 mg 至 100 mL 棕色量瓶中, 加入萃取液溶解后稀释至刻度, 混匀。精密量取上述溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶, 萃取液稀释至刻度 (10, 萃取液稀释); 精密量取上述溶液 5~10 mL 量瓶

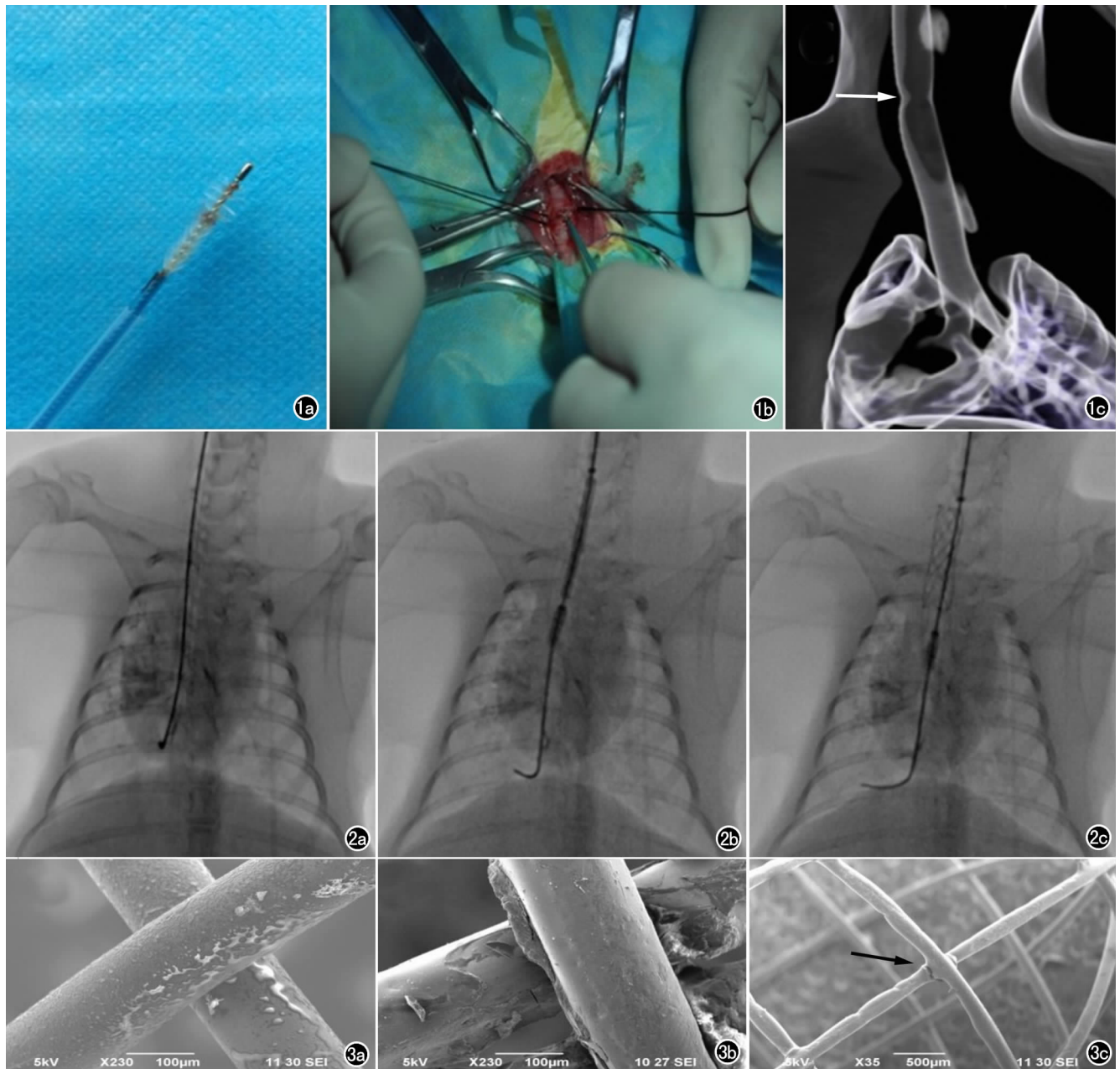


图 1 a) 用于破坏气管粘膜的毛刷; b) 气管环间切开气管, 毛刷破坏气管粘膜; c) 胸部 CT 扫描气道重建显示气管中部狭窄(箭)。 图 2 a) 导管进入右下叶支气管内; b) 沿导丝送入支架及其输送系统; c) 准确定位支架于气管狭窄处, 释放支架。 图 3 支架涂层后扫描电镜扫描。a) 支架金属丝表面浸涂均匀药膜; b) 支架折叠再展开后支架金属丝表面药物部分脱落; c) 支架金属丝交汇处药膜不均匀(箭)。

中,萃取液稀释至刻度(5 瓶中/mL),精密量取 5,精密量取液溶液 3~10 mL 量瓶中,萃取液稀释至刻度(1.5,萃/mL)。将 10 将,萃取液稀、50 将,萃取液、1.5,萃取液稀释对照品溶液滤过,取滤液至棕色液相小瓶。样品测定:将上述药物支架预处理液及质控溶液进样色谱纯法分析。

4. 支架置入

肌肉注射速眠新 0.5 mL 麻醉气管狭窄的动物模型。将实验兔固定于 DSA 检查床上,头偏向右侧,置入开口器,通过口腔送入 5F 单弯造影导管和 0.035 inch 亲水膜导丝,两者配合经口腔,咽喉部进入气管,并越过气管狭窄处进入一侧主支气管(图 2a),退出导管,沿导丝送入气管支架及其输送系统(图 2b),准确定位支架于狭窄处,释放支架(图 2c),退出支架输送系统,给予肌肉注射麻醉苏醒剂鹿醒宁 0.5 mL。

5. 实验兔的处死及标本留取

对照组和实验组分别于支架置入后 1 个月、2 个月和 3 个月复查胸部 CT 后处死相应组别的实验兔,观察肉芽组织增生情况,并于支架上缘和下缘处取气管粘膜行 HE 染色病理检查。

6. 统计分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据的统计学分析。组间单因素比较采用 *t* 检验,检验水准定位 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 有统计学意义。

结 果

1. 气管狭窄动脉制备

在制作气管狭窄模型过程中 1 只(1/36)死于麻醉过深,2 只(2/36)在模型制作后 3d 左右因严重气管粘膜充血水肿死亡,其余 33 只(33/36)气管狭窄模型制作成功,补做 33 只均成功,狭窄程度 50%~85%。

2. 药物涂层支架制备

扫描电镜扫描发现支架折叠及展开后 PLGA-西罗莫司药膜有部分脱落,支架金属交汇处药膜涂层不均匀(图 3)。药膜制备过程中药物和载体没有发生化学反应。

支架涂层前后称重:药物涂层前对支架进行超声波清洗称重,西罗莫司涂层后再次进行称重,发现支架平均增重约 0.37 mg(表 1)。

3. 涂层支架药物体外缓释情况

利用建立的方法测定了 9 个支架在 240W 超声 20 min 条件下释放情况,结果显示雷帕霉素涂层

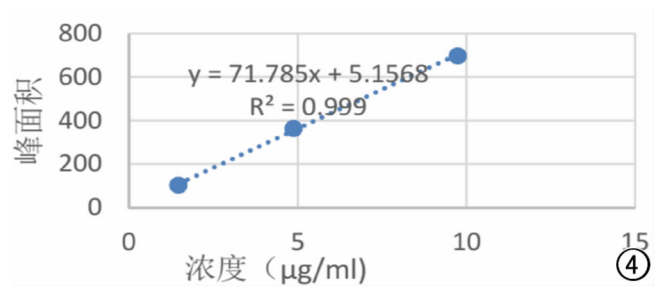


图 4 雷帕霉素涂层支架释放液测定标准曲线。

表 1 镍钛合金支架(8mm×20mm)载药情况			
序号	涂层前支架重 (mg)	涂层后支架重 (mg)	增重 (mg)
1	65.82	66.07	0.25
2	66.00	66.35	0.35
3	68.03	68.51	0.48
4	65.82	66.25	0.43
5	67.17	67.51	0.34

表 2 在体外释放条件下释放液中雷帕霉素含量	
No.	释放量 μg
T1	56.44
T2	72.21
T3	64.25
T4	60.91
T5	67.98
T6	42.07
T7	72.36
T8	90.27
T9	43.40

支架体外释放良好,能够实现缓慢释放,防止排异反应的目的(表 2、图 4)。

4. 气管支架置入

所有气管狭窄模型均一次性成功置入气管支架,支架置入术中及术后未出现窒息、出血、气管穿孔等并发症。

5. 支架置入后气管再狭窄

两组气管支架处均有不同程度的肉芽组织增生,

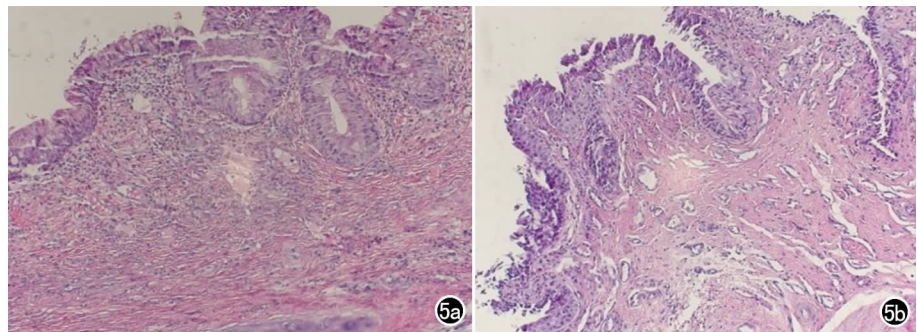


图 5 a) 单纯镍钛合金支架组气管粘膜内大量纤维素增生,胶原蛋白沉积,伴有大量炎性细胞浸润(HE,×40); b) 药物涂层支架置入后 1 个月,实验兔支架上缘气道粘膜标本光镜检查显示少量纤维素增生,伴有炎性细胞浸润(HE,×40)。

表 3 镍钛合金支架和药物涂层支架置入后气道再狭窄的程度

	对照组	实验组	<i>t</i>	<i>P</i>
1 个月	(81.58±3.04)%	(61.68±2.53)%	12.313	<0.01
2 个月	(66.40±1.73)%	(45.23±4.95)%	9.891	<0.01
3 个月	(78.22±2.53)%	(50.97±4.18)%	13.655	<0.01

以支架上缘为著。在 3 个实验节点时,实验组气管狭窄程度均轻于对照组且差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

6. 支架置入后气管粘膜改变两组实验兔死后分别于支架上下缘处取气管粘膜,HE 染色后观察发现单纯镍钛合金支架组气管粘膜内大量纤维素增生,胶原蛋白沉积,伴有大量炎性细胞浸润(图 5a)。而西罗莫司涂层支架组纤维素增生,胶原蛋白沉积明显减少(图 5b)。

讨 论

1891 年 Bong^[5]首次采用气管切开后置入 T 管方法治疗声门下气管狭窄。Montgomery^[6]1965 年发明了 T 型管气管支架。Dumon^[7]1987 年发明 Dumon 硅酮支架,硅酮支架大大提高了支架生物相容性,但是置入困难,需要全麻下借助硬质支气管镜才能完成,硅酮支架管壁较厚,占据了较大的气管内空间,而且支架移位和痰液储留发生率较高。1989 年 Simonds^[8]发明了镍钛合金自膨式气管支架,具有形状记忆特性,且支架移位和痰液储留发生率较低,一直沿用至今,并且衍生出许多不同形状气道支架用于满足临床需求。但是由于支架置入后气道粘膜肉芽组织增生导致气道再狭窄等问题长期困扰着临床医生^[9]。

国内外学者尝试在支架表面添加抗增殖药物。Choong 等^[10]在气道支架表面涂覆丝裂霉素(mitomycin,MMC),并且进行了相关动物实验发现 MMC 涂层可以减轻气道支架置入后肉芽组织增生且作用大小和 MMC 的剂量呈正相关。Choong 等^[11]又首次报道了紫杉醇涂层气道支架动物实验结果显示支架置入后 1 周、1 个月、2 个月和 3 个月时,实验组(置入紫杉醇涂层气道支架)气道通畅率为 100%、96%、76% 和 65%,而对照组(置入未载药气道支架)气道通畅率分别为 10%、0%、0% 和 0%。Shin 等^[12]发明激素涂层支架(地塞米松-聚胺酯气道支架),研究发现地塞米松涂层支架可有效抑制肉芽组织增生。

本研究首先采用西罗莫司涂层,西罗莫司是一种大环内脂类抗生素,属于细胞增殖抑制剂,可有效抑制细胞增殖且没有明显细胞毒性。选用 PLGA 为载体,通过 PLGA 的缓慢释放达到药物缓释的效果。通过红外光谱仪检测发现 PLGA 和西罗莫司在制备浸涂液时没有发生化学反应,扫描电镜检测发现浸涂液可

均匀的涂覆在支架金属丝表面。实验兔气道狭窄动物模型真实的还原了气管狭窄的病理生理环境。将未载药的镍钛合金裸支架和 PLGA 载西罗莫司涂层气道支架分别置入气管狭窄模型兔气管内发现药物涂层支架组气道再狭窄的程度明显轻于单纯支架组。

本研究结果证明 PLGA 载西罗莫司涂层气道支架可有效抑制气道支架置入后气道粘膜肉芽组织增生,降低气道再狭窄程度。但仍存在一些不足,包括载药量较低、无法多次给药以及药物释放速度和规律不明确等问题,需进一步研究。

参考文献:

[1] 王婷,张杰. 药物抑制气道支架植入后肉芽组织增生的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2009,29(22):1388-1392.

[2] 陈楠,张杰,徐敏,等. 丝裂霉素 C 及紫杉醇对人胚肺成纤维细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(9):655-660.

[3] 魏宁,陈启鸿,徐浩,等. 通气导管辅助下 125I 支架植入治疗恶性气道狭窄[J]. 中国介入影像与治疗学,2017,14(6):327-330.

[4] 耿玉梅,陈正贤. 气道药物洗脱支架的研究现状及进展[J]. 国际呼吸杂志,2015,35(13):1029-1032.

[5] 田媛,黄沁,敖国昆,等. 置入倒 Y 形气道内支架治疗复发性多发软骨炎气管软化[J]. 中国介入影像与治疗学,2010,7(5):539-542.

[6] Cooper JD. Use of silicone tubes in the management of complex airway problems[J]. Thorac Surg Clin,2018,28(3):441-447.

[7] Oki M,Saka H,Nakahata M,et al. Silicone Y-stent placement for a secondary right carina[J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg,2017,29(4):563-565.

[8] Xiong XF,Xu L,et al. Fan LL, long-term follow-up of self-expandable metallic stents in benign tracheobronchial stenosis:a retrospective study[J]. BMC Pulm Med,2019,19(1):33.

[9] 李宗明,路慧彬,任克伟,等. 双倒 Y 型气道覆膜内支架治疗胸腔胃-右主支气管瘘的疗效观察[J]. 实用放射学杂志,2016,32(10):1586-1589.

[10] Hoong CK,Haddad FJ,Gee EY,et al. Feasibility and safety of airway bypass stent placement and influence of topical mitomycin C on stent patency[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2005,129(3):632-638.

[11] Choong CK,Phan L,Massetti P,et al. Prolongation of patency of airway bypass stents with use of drug-eluting stents[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2006,131(1):60-64.

[12] Shin JH,Song HY,Seo TS,et al. Influence of a dexamethasone-eluting covered stent on tissue reaction:an experimental study in a canine bronchial model[J]. Eur Radiol,2005,15(5):1241-1249.