

## ·实验研究 Experimental research·

## 药物洗脱球囊抑制下肢动脉狭窄性病变的实验研究

张文俐, 杜 润, 朱政斌, 朱劲舟, 应 晨, 刘慧竹, 张瑞岩

**【摘要】 目的** 探讨新型药物洗脱球囊(DEB)在下肢动脉狭窄性病变(PAD)中可能具有的抑制管腔丢失、减少内膜增生作用。**方法** 以雄性新西兰纯种兔(体重 2.5 ~ 3.0 kg)为实验对象,于兔腹主动脉近心端及远心端各植入 Mustang 裸支架 1 枚,模拟 PAD 模型,并分别用裸球囊(PTA 组)及药物洗脱球囊(DEB 组)在血管支架段行后扩张,术后 28 d 处死动物,收集腹主动脉支架标本,塑料包埋并行 Masson 染色,比较各组内膜增生程度,同时行 DEB 药物(紫杉醇)靶点  $\beta$ -微管蛋白免疫组化检测。**结果** 形态学上,与 PTA 组比较,DEB 组内膜增生及管腔狭窄率明显下降。同时  $\beta$ -微管蛋白免疫组化检测显示,与 PTA 组相比,DEB 组血管内膜  $\beta$ -微管蛋白表达量显著增加。**结论** 动物实验初步显示,DEB 具有潜在有效地抑制管腔丢失、减少内膜增生作用,初步证实该新型 DEB 的优良性能,提示该新型 DEB 远期应用于临床治疗 PAD 的潜在可能性。

**【关键词】** 下肢动脉狭窄性病变; 药物洗脱球囊; 紫杉醇; 内膜增生

中图分类号:R543.5 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2014)-05-0423-04

**The inhibition effect of novel drug-eluting balloon on obstructive peripheral arterial disease of lower extremity: an experimental study in rabbit models** ZHANG Wen-li, DU Run, ZHU Zheng-bin, ZHU Jin-zhou, YING Chen, LIU Hui-zhu, ZHANG Rui-yan. Department of Cardiology, Affiliated Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Corresponding author: ZHANG Rui-yan, E-mail: zhangruiyan@263.net

**【Abstract】 Objective** To investigate the possible inhibition effect of a domestic novel drug-eluting balloon(DEB), such as controlling the vascular stenosis and reducing the intimal hyperplasia, on obstructive peripheral arterial disease (PAD) of lower extremity. **Methods** Male New Zealand rabbits (weighted 2.5 – 3.0 kg) were used for this study. Mustang bare metal stents (BMS) were separately implanted at both the proximal and distal site of abdominal aorta to establish the PAD models in rabbits. Bare balloon (PTA group) or drug-eluting balloon (DEB group) was separately used to dilate the stent segment of the aorta. The animals were sacrificed 28 days after the treatment. The aorta stent specimens were collected and sent for pathologic examination. Using Masson staining method the degree of intimal hyperplasia was estimated and the expression level of paclitaxel-targeted  $\beta$ -tubulin was determined with immunohistochemical method. The results were compared between the two groups. **Results** Morphologically, both the degree of intimal hyperplasia and the vascular stenosis rate in DEB group were significantly lower than those in PTA group. Meanwhile, immunohistochemical examination of paclitaxel-targeted  $\beta$ -tubulin indicated that its expression level in DEB group was obviously higher than that in PTA group. **Conclusion** This experimental study indicates that the domestic novel DEB has potential inhibition effect in respect of controlling the loss of lumen as well as reducing the intimal hyperplasia. This novel DEB carries excellent property, suggesting the possibility to use DEB in clinical treatment of PAD. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 423-426)

**【Key words】** obstructive arterial disease of lower extremity; drug-eluting balloon; paclitaxel; intimal hyperplasia

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2014.05.014

作者单位: 200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院心内科

通信作者: 张瑞岩 E-mail: zhangruiyan@263.net

下肢动脉狭窄性病变(PAD)主要分为动脉栓塞

和血栓形成两类,主要原因多为动脉粥样硬化引起,常导致下肢血液供需不足、疼痛、下肢无脉、间歇性跛行等症状,严重者可导致重症肢体缺血,面临截肢风险,需要及早进行治疗<sup>[1]</sup>。随着人们饮食结构的改变和人口老龄化,PAD 的发病率呈上升趋势,尤其是伴有糖尿病的患者,远端血管病变更为常见,严重影响了患者的健康和生活水平<sup>[2-3]</sup>。

血管介入治疗以其创伤小、并发症少、恢复快,现已成为临床医师治疗 PAD 的首选方法<sup>[4]</sup>。介入治疗的发展经历了经腔内血管成形术、裸支架成形术(BMS)、药物涂层支架成形术(DES)、粥样斑块旋切术、经皮机械血栓消融等过程。但由于 PAD 具有病变弥漫,血管迂曲等特点,限制了以上技术的应用<sup>[1]</sup>。

球囊扩张方法相对简单,操作时间短,一次可治疗多支动脉狭窄或 1 支动脉多处狭窄,且较少受动脉管径和部位的限制,大小动脉、关节弯曲处、动脉分叉处、长段狭窄都可施行球囊扩张治疗。但鉴于一些病变血管壁回弹力高、管壁硬度大等原因,下肢动脉狭窄单纯球囊扩张 1 年后再狭窄率高达 32%<sup>[5]</sup>。为克服球囊扩张成形术后靶病变血管的高再狭窄发生率,药物涂层球囊(DEB)导管系统成为研究热点。国外关于 DEB 对 PAD 治疗作用的研究已取得令人满意的结果,并已有成型商品在临床应用。

目前,国内尚无治疗 PAD 的 DEB 产品问世。本研究依托微创医疗(上海)器械有限公司成熟的生产与研发体系,自主开发新型紫杉醇涂层球囊(DEB)系统,并研究其对 PAD 的治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物用药与分组

采用雄性新西兰大白兔 5 只,体重 2.5 ~ 3.0 kg,正常饲料喂养 7 d。术前 3 d 至术后 7 d 每天给予阿司匹林 100 mg 和噻氯匹定 500 mg 灌胃;术后 7 d 每天给予阿司匹林 100 mg 灌胃,直到动物处死。采用随机信封法,将实验分为 PTA 及 DEB 处理组,于兔腹主动脉近心端及远心端各植入 Mustang 裸支架(微创医疗器械(上海)有限公司)1 枚,并分别用 PTA 及 DEB 球囊(2.0 mm × 18 mm)行后扩张。

### 1.2 方法

1.2.1 手术操作 所有动脉造影、支架植入以及球囊扩张均在血管造影机下完成(INNOVA2100,GE,USA)。实验兔用 2.5%戊巴比妥钠 1 ml/kg 行耳缘静

脉注射麻醉后,置于动物台上,消毒,铺巾,外科学方法暴露右侧下肢股动脉,18 G 穿刺针穿刺后引入 0.014 英寸指引钢丝(Runthrough, Terumo, Tokyo, Japan),按照支架直径:血管直径 1.1 : 1 比例植入 Mustang 裸支架,释放压力 12 ~ 18 atm;送入球囊导管系统,以球囊直径:血管直径 1.1 ~ 1.2 : 1 比例,16 ~ 18 atm 扩张球囊使之与血管壁紧密接触并持续 2 min,释放压力维持 1 min,再次相同压力扩张球囊 1 次,维持 1 min;最后撤出球囊,局部创口 3/0 针线缝合。

1.2.2 标本制备和形态学观察 于术后 4 周按照实验计划处死动物,取其支架覆盖段血管置于 4% 甲醛溶液中固定。首先取部分血管用于 Masson 大体染色,标本行丙酮脱水,甲基丙烯酸甲酯包埋,硬组织切片机切片(EXAKT 公司 德国)、打磨,Masson 染色,Zeiss 显微镜下观察内膜增生情况。利用 AxioVision 4.7(Carl Zeiss MicroImaging 德国)图像分析软件将 10 倍物镜下的血管横切面图像,拼接成完整的血管腔,逐步测算血管腔面积、内弹力膜截面积,得出新生内膜面积及管腔狭窄百分比,并测量血管横截面每枚支架片段外侧至血管腔面的距离,取平均值得出新生内膜厚度。同时参照经典文献对血管损伤程度及管壁炎性指数进行评分。损伤评分如下:① 每枚支架片段贴于血管中膜;② 每枚支架片段浸入血管中膜,但未穿透;③ 每枚支架片段穿透血管中膜;最终取总分的平均值。炎性评分标准如下:0 分:每枚支架片段周围无炎性细胞;1 分:每枚支架片段周围有少量炎性细胞浸润;2 分:每枚支架片段周围有中量炎性细胞浸润;3 分:每枚支架片段周围有大量炎性细胞浸润;4 分:支架片段周围存在肉芽肿,最终取总分平均值。

1.2.3 免疫组化检测 另取部分血管行紫杉醇作用靶点  $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tublin)免疫组化检测。标本纵向剪开后,于显微镜下用微型手术器械小心分离其中支架部分,注意不要损伤内膜组织。血管标本常规乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,并制成 5  $\mu$ m 厚切片,65℃烤片过夜。石蜡切片常规脱蜡至水后,3%  $H_2O_2$  中浸泡 8 min 以消除内源性过氧化物酶活性,枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中微波炉加热 10 min 行抗原热修复,缓慢冷却至室温,PBS 清洗 2 次,5% BSA 封闭液室温 20 min 以封闭非特异性抗原,滴加 1 : 200 稀释的  $\beta$ -tublin 一抗,37℃孵育 1 h,PBS 清洗 2 min,连续 3 次,后滴加生物素化二抗,37℃孵育 20 min,PBS 冲洗 2 min,连续 3 次,再滴加

SABC, 37℃ 孵育 20 min, PBS 清洗 5 min, 连续 4 次, 最后 DAB 显色 5 min, 自来水充分冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。镜下细胞膜显示为棕黄色为阳性细胞, 并用 Image Pro-Plus (IPP) 软件统计阳性细胞所占比率。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用 *T* 检验。所有指标用均数 ± 标准差表示, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

4 周中实验动物全部存活至终点, 无不良事件发生。

### 2.1 靶血管形态学变化

对各组标本行 Masson 大体染色发现, Mustang 裸支架植入伴不同球囊扩张后 4 周, PTA 组内膜增生及管腔狭窄均较明显, 考虑为支架植入术后的再狭窄效应。与 PTA 组比较, DEB 组内膜增生及管腔狭窄率明显下降; 管壁炎性反应评分方面, 各组之间炎性反应评分趋向一致 (图 1, 表 1)。

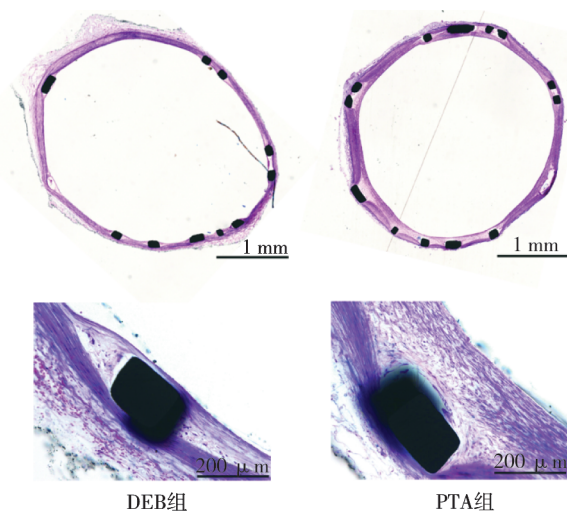


图 1 裸支架植入伴不同球囊扩张后 4 周血管标本 Masson 大体染色结果

表 1 不同球囊处理组各种测量值比较

参数	DEB 组 (n = 5)	PTA 组 (n = 5)
创伤指数	1.54 ± 0.12	1.52 ± 0.15
平均管腔面积/mm <sup>2</sup>	8.14 ± 0.30	6.96 ± 0.49
平均内弹力膜面积/mm <sup>2</sup>	8.63 ± 0.13	8.56 ± 0.23
平均内膜面积/mm <sup>2</sup>	0.49 ± 0.18	1.60 ± 0.29
平均内膜厚度/mm	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.01
狭窄面积/%	0.06 ± 0.02	0.19 ± 0.04
炎性反应评分	0.96 ± 0.16	0.97 ± 0.21

注: DEB = 药物洗脱球囊, PTA = 经皮腔内血管成形术

### 2.2 β-微管蛋白(β-tublin)检测

对各组血管标本行紫杉醇作用靶点 β-微管蛋

白(β-tublin)免疫组化检测, 结果发现, 与 PTA 组相比较, DEB 组血管内膜 β-tublin 表达量显著增加, 提示紫杉醇经球囊扩张后有效滞留于血管内膜并发挥生物学作用 (图 2)。

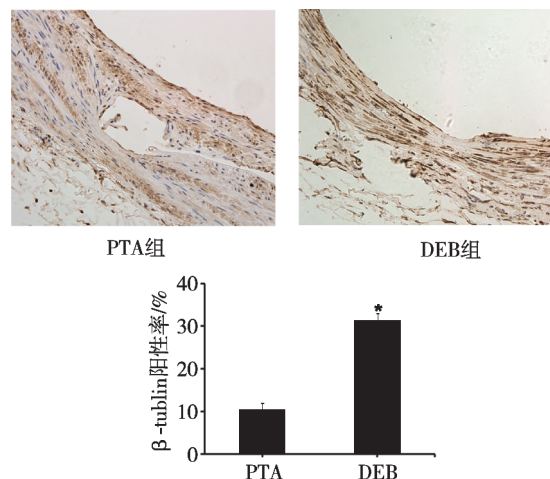


图 2 裸支架植入伴不同球囊扩张后 4 周血管壁 β-微管蛋白(β-tublin)免疫组化检测结果

## 3 讨论

DEB 治疗动脉狭窄性病变的作用机制类似于药物涂层支架, 都是通过携带药物抑制内膜增生。目前最常用的药物是紫杉醇, 可通过抑制微管蛋白聚集, 阻断细胞有丝分裂过程, 从而达到抑制细胞增生的作用<sup>[6-7]</sup>。传统观念认为, 动脉狭窄性病变是一个慢性过程, 必须通过局部药物的持续性释放方可有效预防再狭窄。然而, 后续体外实验显示, 将加入亲脂性紫杉醇的对比剂与培养的血管平滑肌细胞进行共孵育, 即使短暂的 3 min 培养即可完全抑制血管平滑肌增生, 并且时间可达 2 周<sup>[8]</sup>。随后的动物实验也发现, 术中使用加入紫杉醇的对比剂以及紫杉醇包被球囊 (扩张 1 min), 即可使得血管壁中紫杉醇的浓度达到抗细胞增殖的浓度 (使超过 90% 药物进入血流), 从而显著降低再狭窄的发生, 这种效果甚至好于药物涂层支架, 这可能是由于支架本身的结构即可造成血管损伤反应, 而球囊表面的光滑既避免了操作本身带来的损伤, 又保证了药物平稳均匀释放和接触<sup>[9]</sup>。

正是基于上述研究结果, 关于 DEB 的研发得到了长足的发展。DEB 治疗 PAD 亦是基于以下理论: ① 脂溶性的紫杉醇能迅速被血管组织摄取达到血药浓度, 抗增殖药物的持续释放对抑制再狭窄的炎性反应进程来说并非必要, 可减少血栓形成<sup>[10]</sup>; ② 药物短期暴露即可明显阻断早期的增生启动因子; ③ 紫杉醇涂层球囊采用了特殊的载体——对比剂



溶液或尿素或纳米技术,避免了药物涂层支架表面的聚合物载体(polymer)对内皮细胞修复和愈合过程的抑制,起到抑制血管平滑肌细胞增殖而促进内皮细胞修复的功能。本研究显示 DEB 处理组血管壁上 $\beta$ -微管蛋白表达量显著增高,再次说明 DEB 可通过其携带药物紫杉醇达到抑制血管内膜增生的作用。

国外关于 DEB 的临床研究显示,DEB 在治疗小动脉(血管直径为 2 ~ 8 mm 或更小)狭窄时,其术后再次狭窄发生率为 5.5%,显著低于裸球囊治疗的 31%的血管再狭窄发生率<sup>[11-12]</sup>。更深入的研究显示,DEB 可减少血管壁细胞的生长,裸球囊治疗的血管增生厚度为 0.3 ~ 0.75 mm,而 DEB 治疗的血管增生厚度为 0.2 mm 或更少,血管增生厚度的降低最终导致主要不良血管事件的发生率减少<sup>[6]</sup>。2009 年 1 月 InVatec 公司的外周球囊新产品 IN.PACT Amphirion 紫杉醇洗脱球囊导管在欧洲批准上市,其是首个专用于治疗膝部以下(BTK)动脉粥样硬化的 DEB。

目前国内尚无治疗 PAD 的 DEB 产品问世。本研究依托微创医疗(上海)器械有限公司成熟的生产与研发体系,自主开发治疗 PAD 的 DEB 系统。本次动物研究初步显示该新型 DEB 对 PAD 具有较好的治疗作用,但尚需临床实验为其提供更多的科学依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] 颜荣华,肖恩华. 下肢动脉闭塞性疾病的血管内介入治疗进展[J]. 介入放射学杂志, 2005, 14: 205 - 209.
- [2] 秦永林,邓 钢,郭金和,等. 长球囊治疗重症下肢动脉缺血性病变的近期疗效观察[J]. 介入放射学杂志, 2008, 17: 323 - 327.
- [3] Toursarkissian B, D'ayala M, Stefanidis D, et al. Angiographic scoring of vascular occlusive disease in the diabetic foot: relevance to bypass graft patency and limb salvage [J]. J Vasc Surg, 2002, 35: 494 - 500.
- [4] Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, et al. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial[J]. Lancet, 2005, 366: 1925 - 1934.
- [5] Soder HK, Manninen HI, Jaakkola P, et al. Prospective trial of infrapopliteal artery balloon angioplasty for critical limb ischemia: angiographic and clinical results [J]. JVIR, 2000, 11: 1021 - 1031.
- [6] De Labriolle A, Pakala R, Bonello L, et al. Paclitaxel-eluting balloon: from bench to bed [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2009, 73: 643 - 652.
- [7] Pósa A, Nyolczas N, Hemetsberger R, et al. Optimization of drug-eluting balloon use for safety and efficacy: evaluation of the 2nd Generation paclitaxel-eluting DIOR-balloon in porcine coronary arteries[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2010, 76: 395 - 403.
- [8] Scheinert D, Scheinert S, Sax J, et al. Prevalence and clinical impact of stent fractures after femoropopliteal stenting [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45: 312 - 315.
- [9] Bosiers M, Scheinert D, Peeters P, et al. Randomized comparison of everolimus-eluting versus bare-metal stents in patients with critical limb ischemia and infrapopliteal arterial occlusive disease[J]. J Vasc Surg, 2012, 55: 390 - 398.
- [10] 姚 康,葛均波. 药物涂层球囊现状及评价 [J]. 疑难病杂志, 2008, 7: 129 - 130.
- [11] Werk M, Langner S, Reinkensmeier B, et al. Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries: paclitaxel-coated versus uncoated balloon: femoral paclitaxel randomized pilot trial [J]. Circulation, 2008, 118: 1358 - 1365.
- [12] Scheller B, Hehrlein C, Bocks W, et al. Two year follow-up after treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter [J]. Clin Res Cardiol, 2008, 97: 773 - 781.

(收稿日期:2013-09-15)

(本文编辑:侯虹鲁)