

• 实验研究 Experimental research •

镁合金支架植入兔腹主动脉后血管内膜免疫组化及血清镁离子浓度观察

彭志清, 陈 亮, 丁 健, 王征宇, 刘 强, 王永利

【摘要】 目的 观察新型可降解镁合金支架(MPM)植入兔腹主动脉后降解过程中血管内膜免疫组化及血清镁离子浓度变化。**方法** 24只新西兰大白兔随机分为4组,每组6只。24枚MPM支架分别植入每组兔左肾动脉水平下约1cm处。术后30、60、90、180d作主动脉造影及测定血清镁离子浓度,并分离支架段血管行免疫组化,检测增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞。采用SPSS 20.0软件对实验数据进行分析。**结果** 24只实验兔在植入支架后随访期间存活良好,PCNA阳性细胞和血清镁离子浓度逐渐升高直至90d,后逐渐下降,180d时趋于稳定。整个支架降解过程腹主动脉通畅。**结论** 从细胞水平进一步证实,MPM支架可长时间满足血管正性重塑需要,能有效预防血管再狭窄。支架降解过程中未改变兔血清镁离子浓度,未产生明显毒性反应。

【关键词】 可降解镁合金支架;腹主动脉;免疫组化;血清镁离子浓度

中图分类号:R692.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2018)-06-0554-04

The observation of immunohistochemistry of vascular intima and the serum magnesium ion concentration in experimental rabbits after implantation of biodegradable magnesium alloy stent in the abdominal aorta PENG Zhiqing, CHEN Liang, DING Jian, WANG Zhengyu, LIU Qiang, WANG Yongli. Department of Interventional Radiology, South Branch of Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China

Corresponding author: WANG Yongli, E-mail: yongliwang2008@163.com

【Abstract】 Objective To observe the immunohistochemistry of vascular intima and the serum magnesium ion concentration in experimental rabbits after implantation of MPM stent (a newly-developed biodegradable magnesium alloy stent) in the abdominal aorta. **Methods** A total of 24 New Zealand white rabbits were randomly and equally divided into four groups with 6 rabbits in each group: 30 d group, 60 d group, 90 d group and 180 d group. A total of 24 MPM stents were respectively implanted into the abdominal aorta of each rabbit at the level of about one centimeter below the left renal artery. At 30, 60, 90 and 180 days after stent implantation, aortography with DSA and testing of serum magnesium ion concentration were performed, and the stenting segment of aorta was removed and sent for immunohistochemical examination to detect PCNA-positive cells. The experimental results were analyzed with software of SPSS20.0. **Results** During the follow-up period after stent implantation, all the 24 experimental rabbits were well survival, the number of PCNA-positive cells and serum magnesium ion concentration gradually rose up until 90 days, then they declined gradually, and at 180 days they became stable. The abdominal aorta remained unobstructed during the whole process of degradation. **Conclusion** The results of this study further confirm that on the basis of cellular level MPM stent can meet the long-term needs of positive vascular remodeling, therefore, vascular restenosis can be effectively prevented. Moreover, the degradation process of MPM stent will not change the serum magnesium ion concentration or produce obvious toxic reactions. (J Intervent Radiol, 2018,

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.06.013

基金项目: 上海市科委医学引导类项目(124119b1200)、上海市卫生局科研项目(20124175)

作者单位: 201499 上海交通大学附属第六人民医院南院介入科(彭志清、陈 亮、王征宇、刘 强、王永利); 浙江省嘉兴市第一医院放射科(丁 健)

通信作者: 王永利 E-mail: yongliwang2008@163.com

27: 554-557)

【Key words】 biodegradable magnesium alloy stent; abdominal aorta; immunohistochemistry; serum magnesium ion concentration

支架内再狭窄(ISR)的主要原因是血管成形术后支架长时间刺激血管壁^[1],于是可降解材料成为研究热点,具优良特性的镁合金支架受到临床广泛关注。但可降解镁合金支架仍存在有效作用时间不足、组成合金未完全达到无毒性反应、塑性能力差等缺陷。本中心联合上海微创医疗器械有限公司共同研究开发出一种新型可降解镁合金金属支架——MPM。前期研究显示 MPM 支架体外测试参数较优,兔体内观察表明支架植入后血管内膜逐渐增生,90 d 时达峰值,支架完全降解时间为 182 d,整个过程血管通畅,可满足血管正性重塑^[2-4]。本研究从细胞水平观察血管内膜增生特点,了解是否与前期研究情况相符,并针对镁降解过快的主要毒性反应,检测了血清镁离子水平。

1 材料与方法

1.1 实验器材

取体重(2.2±0.2) kg 健康新西兰大白兔 24 只,雌雄不限。根据 MPM 支架植入后处死实验兔不同时间点,随机分为 30 d 组(组 1)、60 d 组(组 2)、90 d 组(组 3)和 180 d 组(组 4),每组 6 只(分别植入支架 1 枚,处死当日采血、复查造影),分别标记。

MPM 支架由上海微创医疗器械公司自主设计,主要镁金属中添加其它无毒或低毒性合金,激光镂空而成,为 By-Pass 型球囊扩张支架,完全扩张后长度为 23 mm,外径为 3 mm^[3]。其它器材包括 AXIOM Artis dTA 型 DSA 机(德国 Siemens 公司)、4 F 穿刺系统(日本 Terumo 公司)、0.018 英寸微导丝(美国 ev3 公司)、TP1020 型半自动脱水机、EG1150 型全自动石蜡包埋机、RM2235 型全自动石蜡切片机(德国 Leica 公司)、Eclipse 50i 型显微镜、H500S 图像处理软件、Image-Pro Plus 7.0 版图像分析软件(日本 Nikon 公司)、-20℃低温冰箱(中国海尔公司)。

1.2 实验方法

支架植入前实验兔标记、称重,术前 3 d 给予阿司匹林(10 mg/kg)及氯吡格雷(10 mg/kg)口服。术时消毒,耳缘静脉留置针抽血并麻醉、固定,右下股动脉搏动最强处切开、钝性分离,暴露出股动脉;改良 Seldinger 技术穿刺成功后,引入 4 F 导管鞘作造影,经微导丝送入 MPM 支架(支架在 DSA 下不

显影,通过观察支架两端金属标记点确定支架位置),至球囊近心端标记点到达左肾动脉下约 1 cm 处停止,扩张、释放球囊支架;造影无异常后,退出血管鞘,结扎远心端股动脉,缝合皮下等组织。

术后 3 d 静脉注入青霉素 G 钠(80 万 U/d)。术后阿司匹林(10 mg/kg)和氯吡格雷(10 mg/kg)连续口服 28 d,随后长期口服阿司匹林(5 mg/kg)。

术后 30 d,取组 1 动物,耳缘静脉留置针抽血,造影复查,推入过量气体至死,解剖并取出支架段血管,冲洗后 4%甲醛液中固定 24 h。组 2、组 3、组 4 动物分别于 60 d、90 d、180 d 时间节点作上述处理。将标本置于乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中溶解未降解支架,后再作脱水、去脂、包埋处理。每件血管标本近、中、远 3 段 6 个切片测量数值,均取平均值;切片厚度 4 μm,行免疫组化;高倍光学显微镜观察各组免疫组化标本,寻找增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞,染色为黄色或含有黄色细胞核的细胞为目标细胞。PCNA 仅存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内,其与细胞 DNA 合成关系密切,在细胞增殖启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标。检测各标本切缘区域内阳性面积及阳性区域积分光密度(IOD),计算各组平均光密度(OD)(OD=IOD/阳性面积),以示阳性细胞占比。

VITRO 生化分析仪检测各组兔静脉血镁离子水平,对比分析每组术前及术后及组间同节点血清镁离子浓度变化。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对测定 PCNA 的阳性细胞、血清镁浓度分别作单因素方差分析、重复测量数据方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

术后即刻血管造影显示,实验兔无支架内急性血栓形成,无穿孔、血管撕裂等。各组各时间节点复查造影时腹主动脉均通畅,支架段血管无狭窄,无血栓、溃疡或动脉瘤等征象。

高倍光学显微镜观察发现,血管标本中膜、内膜大量细胞核内有棕黄色颗粒或弥漫性棕黄色细胞,细胞质无染色,染色细胞分布不均匀,呈“不规则梭形”,各组标本 PCNA 阳性细胞占比存在差异

(图 1)。组 1、组 2、组 3、组 4 平均 OD 值分别为 $(0.005\ 12 \pm 0.000\ 8)$ 、 $(0.007\ 12 \pm 0.001\ 4)$ 、 $(0.009\ 68 \pm 0.001\ 0)$ 、 $(0.006\ 58 \pm 0.001\ 1)$ ，组 3 与组 1、组 2、组

4 差异有显著统计学意义 ($P_{13}=0.007$, $P_{23}=0.001$, $P_{43}<0.000\ 1$)，组 1、组 2、组 4 间差异无统计学意义 ($P_{12}=0.548$, $P_{14}=0.980$, $P_{24}=0.865$)。

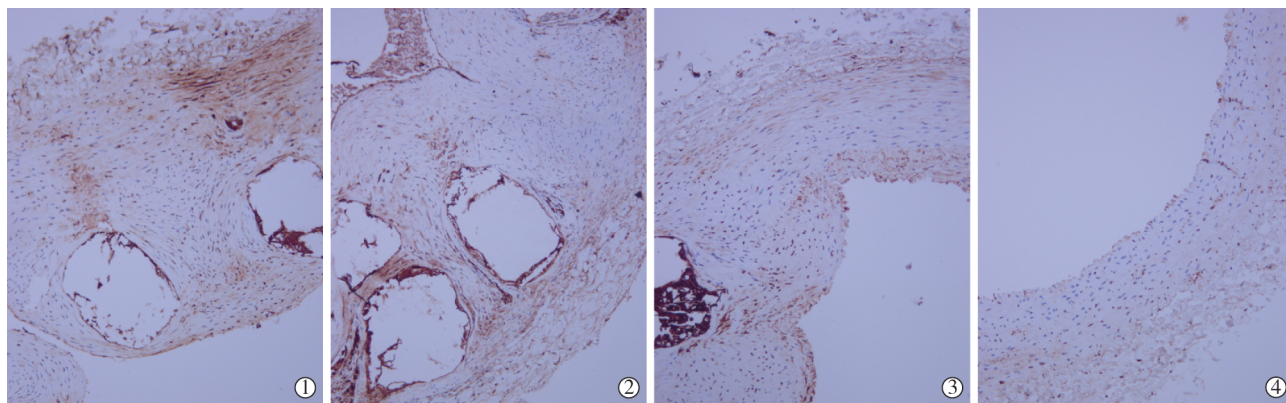


图 1 支架降解过程中各组标本免疫组化染色结果

血清镁离子浓度检测及对比分析显示，各组术前、术后及组间同节点血清镁离子浓度差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (表 1)，表明各组动物在支架植入前及降解过程中未产生过多血清镁离子，未对实验兔产生不良反应。

表 1 各组支架植入术前及术后血清镁离子浓度变化

组别	mmol/L, $\bar{x} \pm s$				
	术前	术后 30 d	术后 60 d	术后 90 d	术后 180 d
组 1	1.15±0.08	1.14±0.09	—	—	—
组 2	1.16±0.08	1.12±0.11	1.15±0.07	—	—
组 3	1.17±0.07	1.14±0.10	1.14±0.11	1.16±0.09	—
组 4	1.16±0.10	1.13±0.14	1.15±0.09	1.17±0.09	1.15±0.10

3 讨论

经腔内支架植入术 (PTS) 自 1987 年 Sigwart 等^[5]报道临床应用以来，已成为治疗血管狭窄病变的有效方法。存在的主要问题为 ISR。相关文献数据表明，PTS 术后 ISR 发生概率较高，术后 6~12 个月最为严重。Morino 等^[6]在一项关于金属裸支架植入患者冠状动脉临床研究中发现，术后 218 d 时 ISR 发生率达 31.9%。相关研究表明，目前对 ISR 机制尚不明确，但普遍认为其主要原因为血管弹性回缩、血管内膜损伤、支架内血栓形成、血管内膜及平滑肌增生^[7]。随着术中操作精细化及抗血小板药物应用合理化，部分 ISR 尤其是急性 ISR 问题得到了有效解决。然而支架在血管内长期存留引起的血管慢性损伤及内膜下平滑肌细胞增生问题仍存在，从而引起 ISR。研究显示支架植入后在“必要时间”内提供足够支撑，其后支架存在已无必要^[2,8-9]。因此，生物可降解支架应运而生。镁合金具优良特性，成为研究热点，但目前多数生物可降解镁合金支架在降

解时间上仍不够理想。

MPM 支架前期实验研究中，通过直接观察各时间节点支架支杆降解数及血管内膜增生面积显示支架逐渐降解，术后 3 个月达峰值，6 个月基本完全降解；术后存在一定程度的内膜增生与管腔狭窄，第 3 个月时达高峰，后期血管内膜发生正性重塑，但全程血管内血流通畅，未见明显影响^[2-4,10]。前期研究从“宏观”层面直接观察实验结果，表明 MPM 可降解镁合金支架在体外各参数、降解时间、内膜增生上较优，可有效预防 ISR。为进一步明确 MPM 支架性能，为临床应用提供更多参考依据，本研究对内膜增生免疫组化作进一步实验，结果表明支架植入后平均 OD 值逐渐增大，降解 90 d 时达峰值，之后减小并于 180 d 时基本稳定，全程管腔通畅，从而在“细胞水平”进一步证实前期研究结论。

前期研究主要集中于支架降解过程中主要矛盾点，其它相对次要点极易忽略，如镁降解过快相关毒性反应。镁金属虽有诸多优良特性，但积聚过多也会对机体产生毒性反应，血清镁过高可能引起呼吸抑制、血压剧降和心脏骤停等致死反应。临床上，高镁血症会引起疲乏、腱反射消失和血压下降等，浓度明显增高则会嗜睡和昏迷，甚至心搏骤停等。因此，有必要控制血清镁浓度。某种程度上，减慢镁合金支架降解时间是降低体内镁离子浓度的重要途径。减慢降解速度既是评价镁合金支架性质之要素，也是对机体保护性措施。目前主要通过加入一些其它元素，如锌 (Zn)、锰 (Mn)、铝 (Al) 和稀土 (RE) 等降低降解速度，另有表面处理改变支架表面结构及表面覆盖人工合成聚合物涂层等方法。本研

究所用 MPM 支架由激光镂刻而成,含多种 RE 元素,一定程度上减慢了降解速度,预防支架降解过程中血清镁离子浓度过高。本研究各实验组术前、术后及组间同节点血清镁浓度对比分析显示,血清镁离子浓度差异均无统计学意义($P>0.05$),表明各组实验兔在支架植入前及降解过程中未产生过多血清镁离子及其毒性反应。这可能与机体自身调节有关。这进一步证实,MPM 支架可安全、有效地避免 ISR 发生。

[参 考 文 献]

- [1] Tamai H, Igaki K, Tsuji T, et al. A biodegradable poly-L-lactic acid coronary stent in the porcine coronary artery[J]. J Interv Cardiol, 1999, 12: 443-450.
- [2] 陈 亮. 可降解镁合金支架-MPM 植入兔腹主动脉后降解的研究[D]. 南方医科大学, 2016.
- [3] 陈 亮, 丁 健, 王永利, 等. 镁合金支架植入兔腹主动脉后

- 降解时间及血管内膜增生观察[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 454-457.
- [4] 陈 亮, 丁 健, 王永利, 等. 镁合金支架植入兔腹主动脉后降解时间观察[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 994-997.
- [5] Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, et al. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty [J]. N Eng J Med, 1987, 316: 701-706.
- [6] Morino T, Kobayashi Y, Fujimoto Y, et al. Bare metal stent restenosis is benign clinical entity in Japanese patients[J]. Int Heart J, 2010, 51: 227-230.
- [7] 刘灵芝, 侯翠红, 刘恒亮. 冠脉内支架植入术后再狭窄的影响因素分析[J]. 郑州大学学报·医学版, 2005, 40: 533-535.
- [8] 尹铁英, 王亚洲, 王贵学. 血管支架内再狭窄机制的研究现状[A]. 第一届全国介入医学工程学术会议论文集[C]; 2007.
- [9] 卢 旺, 刘建民. 支架植入后再狭窄防治的研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2003, 12: 230-232.
- [10] 丁 健. 可降解镁合金支架-MPM 置入兔腹主动脉后的实验研究[D]. 苏州大学, 2014.

(收稿日期:2017-07-28)

(本文编辑:边 佑)

·消 息·

2017 年度林贵-刘子江优秀介入论文奖获奖名单

2017 年度林贵-刘子江优秀介入论文奖在南京正大天晴制药有限公司支持下,经过本人申请,编辑部初审,邀请国内各介入专业专家评审,共评选出优秀论文 7 篇,其中一等奖 1 篇,二等奖 2 篇,三等奖 4 篇。现将名单公布如下。

一等奖(1 篇)

余天柱等. 血管内近程放疗与序贯三维适形放疗治疗门静脉主干癌栓的疗效对比

二等奖(2 篇)

李海波等. 无水乙醇联合组织胶硬化栓塞儿童高回流静脉畸形临床疗效分析

黄 蔚等. 3D 打印共面模板在胰腺癌 ^{125}I 粒子植入治疗中的初步应用

三等奖(4 篇)

李 燕等. 下肢深静脉血栓溶栓治疗中两种气囊压力带辅助应用的对照研究

曹 军等. 经皮胃造瘘术治疗肌萎缩侧索硬化症吞咽困难 51 例

牛传强等. 经皮无水乙醇栓塞治疗儿童足部动静脉畸形 11 例

鄂亚军等. 颅内动脉瘤血管内介入栓塞术中再次破裂出血紧急处置