

医用 316L 不锈钢支架表面磁性膜对血管内皮化的影响

胡 涛^{1,2,3}, 于振涛¹, 周 廉¹, 介万奇², 周景昱³, 王海昌³

(1. 西北有色金属研究院, 陕西 西安 710016)

(2. 西北工业大学, 陕西 西安 710049)

(3. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032)

摘 要: 研究了表面磁性膜医用 316L 不锈钢支架对血管内皮化的影响。通过体外内皮细胞培养和支架粘附内皮细胞的实验来观察体外支架内皮化的情况; 并通过动物体内支架植入实验观察评价血管内皮覆盖及血小板粘附及激活情况。结果表明: 表面磁性膜支架在体外可以促进内皮细胞的粘附、增殖, 支架植入后在体内可以促进血管内皮再生, 加速支架内皮化, 同时抑制血小板粘附及激活。

关键词: 血管内皮化; 磁性薄膜; 316L 不锈钢支架

中图分类号: TG 146.2⁺3; TG113.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2009)09-1552-04

血管内皮细胞 (EC) 粘附、移行、增殖, 在介入生物材料表面上生长并将其覆盖的过程称为内皮化, 快速和完全内皮化是影响介入治疗成功的重要因素^[1]。心血管介入生物材料表面的内皮化一直是各国学者的关注热点, 加强生物材料表面的内皮化的基础研究将为其临床应用效果的改善提供技术方法上的支持^[2]。

近年来的研究表明^[3], 冠脉介入治疗 (PCI) 术后支架表面 EC 再生修复的速度对再狭窄 (RS) 的程度起着关键作用, 加速 EC 的粘附、移行、增殖、修复是防治 RS 的有效措施。在前期的研究中发现磁场可以促进 EC 粘附、移行、修复、增殖, 改善内皮细胞功能, 具有抑制血管支架内 RS 的细胞生物学基础^[4,5]; 在国际上首次成功制备出表面磁性膜支架, 支架的磁场强度可达 5×10^{-4} T, 有效磁场持续时间可达 6 个月, 体外实验具有良好的细胞、血液、组织相容性^[6,7]。本研究通过对 EC 在表面磁性膜支架和普通裸支架上体外的生长粘附情况, 及表面磁性膜支架和普通裸支架置入动物体内后不同时刻的支架内血管内皮形态的观察, 了解表面磁性膜支架对 PCI 术后血管内皮化和血小板激活的影响, 评价其有效性和安全性。

1 实 验

1.1 体外实验

(1) 人脐静脉内皮细胞培养

取第四军医大学妇产科剖腹产术中无菌脐带, 进行原代细胞分离和培养, 用含 10% 小牛血清 DMEM 培养液培养传代, 倒置显微镜观察细胞形态。经免疫荧光法检测, 细胞 VIII 因子相关抗原染色阳性, 从而证实为内皮细胞。在 CO₂ 培养箱中静置培养。

(2) EC 粘附率检测

人脐静脉内皮细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 将细胞接种于无菌试管中, 四格法计数细胞数目 (A), 分别加入钴-60 射线消毒灭菌的无菌表面磁性膜支架和普通裸支架, 每隔 15 min 旋转支架一次, 旋转 1 h, 再静置 1 h。计数培养液中的细胞数目 (B), (A-B) 即为粘附到支架上的细胞数目, 分别计算其粘附率:

$$(A-B)/A \times 100\%$$

(3) EC 生长情况观察

人脐静脉内皮细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^5 /mL, 置于无菌试管中, 分别将钴-60 射线消毒灭菌的无菌表面磁性膜支架和普通裸支架浸入细胞悬液中, 试管倾斜放置 CO₂ 培养箱中 2 h, 每 15 min 旋转支架一次, 然后将支架转入 6 孔培养板中, 加入含 10% 小牛血清 DMEM 细

收稿日期: 2009-03-25

基金项目: 国家自然科学基金(30470486); 中国博士后科学基金面上资助金(20070410383); 中国博士后科学基金特别资助金(200801439)

作者简介: 胡 涛, 男, 1974 年生, 博士后, 副教授, 第四军医大学西京医院心内科, 陕西 西安 710032, 电话: 029-84775183, E-mail: hutao74@fmmu.edu.cn; 通讯作者: 王海昌, 教授, 电话: 029-84773469

胞培养液, 72 h 后倒置显微镜观察两种支架表面 EC 生长情况。

1.2 动物体内植入实验

(1) 动物

选取纯种新西兰大白兔 30 只, 雌雄不限, 重 3.0~3.5 kg, 由第四军医大学西京医院动物中心提供。

(2) 围手术期用药

术前 72 h 开始, 每天 25 mg 阿司匹林口服; 术后每天肌内注射青霉素 80 万单位和皮下注射肝素 1000 单位, 连续 3d, 并给予每天 25 mg 阿司匹林口服直到处死。

(3) 支架植入

仰卧位固定、常规麻醉、消毒、铺巾。钝性分离出左颈总动脉, 结扎其远心端(尽量靠近头侧), 再用动脉夹将动脉的近心端夹住, 以控制血流。在紧靠头端结扎的稍下方轻轻托起分离动脉段, 并用眼科剪在动脉上作一个约 45°切口, 直接插入 6F 动脉导管鞘。固定鞘管经 6F 鞘管送入 J 型导丝至腹主动脉, 轻柔送入 JR4 指引导管至腹主动脉分叉上方进行左、右髂动脉造影, 送入导引钢丝至左右髂动脉, 沿导引钢丝将带支架球囊送至髂动脉的近端, 0.6~0.8 MPa 大气压扩张释放支架, 球囊和动脉的直径比例为(1.1~1.2):1。每只兔两侧髂动脉随机各放一个裸支架和磁性支架。支架采用手捏法附在 2.5 mm 的球囊上, 支架的植入采用双盲法。

(4) 标本处理

分别在术后 1 月、3 月进行血管造影后在麻醉下解剖并暴露手术相关血管段, 结扎手术相关血管段的近端, 并以肝素盐水、福尔马林冲洗血管腔后取下手术相关血管段, 标记后选部分血管段福尔马林固定按常规方法进行扫描电镜(SEM)观察。

2 结果

人脐静脉 EC 在倒置显微镜下呈典型“卵石样”生长(图 1)。EC 在表面磁性膜支架表面的粘附率为(66.7±3.4)%, 而在裸支架表面的粘附率仅为(39.7±2.1)%, 差异显著($P < 0.05$)。倒置显微镜下观察 72 h 后 EC 完全覆盖表面磁性膜支架表面, 使支架内皮化(图 2); 而 EC 仅覆盖约 60%普通裸支架表面(图 3)。

术中动物死亡 4 只(麻醉意外 1 只, 心包填塞 2 只, 支架脱落紧急处死 1 只), 术后动物死亡 3 只(均在 24 h 内), 均立即补做实验。1 月、3 月血管造影见所有实验动物植入表面磁性膜支架及普通裸支架的血管段、支架的近端及远端均无血栓形成, 血流通畅(图 4)。

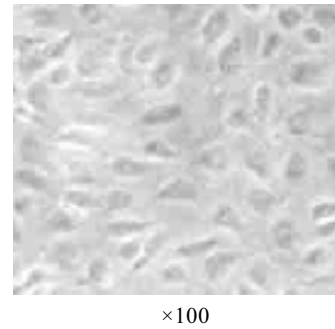


图 1 人脐静脉内皮细胞

Fig.1 Human umbilical vein endothelium cell



图 2 内皮化的表面磁性膜支架

Fig.2 Endothelialized magnetic stent

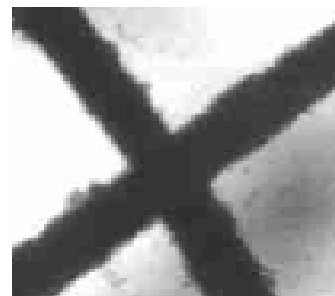


图 3 60%内皮化的普通裸支架

Fig.3 60% endothelialized bare-metal stent



图 4 兔髂动脉血管造影

Fig.4 Arteria iliaca angiography of rabbit

SEM 观察分析支架植入术后 1 个月血管段内皮覆盖情况(如图 5 所示)。可见, 表面磁性膜支架血管段内皮覆盖完整, 内皮表面附有少量的红细胞, EC 排列整齐, 无血小板黏附聚集及血小板激活的征象。普通裸支架血管段内皮覆盖不完全, 内皮表面附有大量的红细胞和少量的白细胞和血小板。部分支架暴露, 有一定量的血小板黏附于内皮, 且部分血小板伸出伪足, 提示有血小板激活(图 6)。

SEM 观察两组支架植入后 3 个月的内皮覆盖情况(如图 7, 图 8 所示)。可见, 普通裸支架内皮与表面磁性膜支架内皮覆盖均较完全, 内皮上均无血小板黏附。表

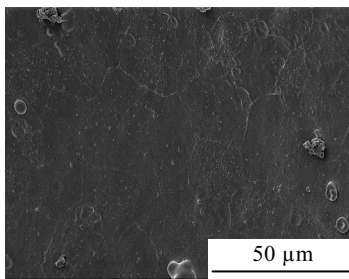


图 5 表面磁性膜支架血管段 1 个月的 SEM 照片

Fig.5 SEM on blood vessel section of magnetic stent (1 month)

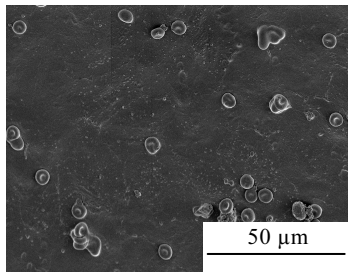


图 6 裸支架血管段 1 个月的 SEM 照片

Fig.6 SEM consequence on blood vessel section of bare stent (1 month)

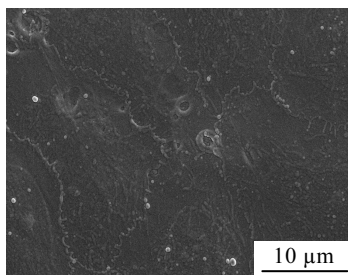


图 7 表面磁性膜支架血管段 3 个月的 SEM 照片

Fig.7 SEM consequence on blood vessel section of magnetic stent (3 month)

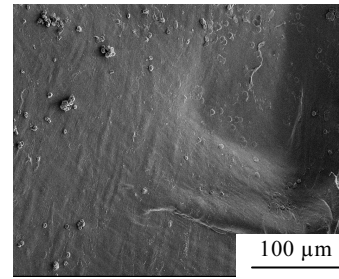


图 8 裸支架血管段 3 个月的 SEM 照片

Fig.8 SEM consequence on blood vessel section of bare stent (3 month)

面磁性膜支架可见明显的内皮细胞和内皮突起, 并无血小板凝聚; 但裸支架内皮下可见清晰的支架走行, 部分在标本处理烘干时内皮损伤, 提示新生内皮较薄。说明表面磁性膜支架与普通裸支架相比可以促进实验动物支架植入后的血管内皮再生, 加速支架表面内皮化。

3 讨论

支架的应用显著降低 PCI 术后再狭窄 (RS) 的发生率, 取得令人瞩目的效果, 使 PCI 术向前跨进一大步, 但也逐渐暴露出其不足和弊病, 其中最主要是植入血管后不能达到快速和完全的内皮化, 从而导致血小板激活和血栓形成。因此, 严重影响着 PCI 术的疗效, 进而制约着 PCI 治疗的推广^[8]。理论上在支架材料表面种植、培养 EC 再植入体内是内皮化的最理想途径, 但直接把 EC 种植在高分子生物材料表面不仅细胞增殖慢, 内皮细胞功能减弱而且短时间内还容易从生物材料表面脱落下来并且 EC 来源有限。尽管近 10 年来人们进行了多方面的尝试和努力, 如通过运用新技术对材料进行优化, 增强 EC 的粘附能力^[9]; 寻找 EC 的有效来源(如内皮祖细胞)^[10]; 以及应用基因工程技术对 EC 进行基因修饰, 增强其粘附、增殖能力等方法, 但效果均不理想, 目前仍处于研究阶段, 寻找一种新的有效的解决内皮化问题的方法势在必行。

在前期的基础研究发现磁场对内皮化具有良好的促进作用, 因此设想对支架材料表面进行改性, 赋予其一定的磁性可能对内皮化起着重要的作用。本研究结果显示, 体外 EC 在表面磁性膜支架上的粘附、增殖能力显著增强, 内皮化速度加快; 植入动物体内后 1 个月, 裸支架植入的血管段内皮覆盖不完全, 部分支架暴露, 有一定量的血小板黏附于内皮, 且部分血小板伸出伪足, 提示有血小板激活, 而表面磁性膜支架植入的血管段内皮覆盖较裸支架完整, EC 排列整

齐, 无血小板黏附聚集及血小板激活的征象。3个月时, 两组支架置入的血管腔内皮覆盖均完整, 内皮排列整齐, 已无血小板黏附、聚集。但可以观察到裸支架的内皮下支架轮廓较明显, 部分在处理标本时发生裂伤, 提示内皮较薄, 此时尽管内皮覆盖已经完整, 但可能与术前及表面磁性膜支架组在结构和功能上仍然有一定差异。

4 结 论

1) 表面磁性膜支架与普通裸支架相比在体外可以促进 EC 的粘附、增殖, 在体内可以促进动物支架置入后的血管内皮再生, 加速支架内皮化。

2) 表面磁性膜支架大约 1 个月即可实现完全内皮化, 并且抑制血小板黏附聚集及血小板激活, 有助于解决支架材料内皮化及致血栓形成性问题。

参考文献 References

- [1] Zhao F H, Chen Y D, Jin Z N *et al.* *Med Hypotheses*[J], 2008, 70(3): 512
 [2] Brammer K S, Oh S, Gallagher J O *et al.* *Nano Lett*[J], 2008, 8(3): 786

- [3] Ward M R, Stewart D J, Kutryk M J. *Catheter Cardiovasc Interv*[J], 2007, 70(7): 983
 [4] Hu Tao, Lian Zhou, Wanqi Jie *et al.* *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*[J], 2007, 11(48): 9805
 [5] Hu Tao(胡涛), Lü Anlin(吕安林), Jia Guoliang(贾国良). *Chinese Journal of Physical Therapy*(中华理疗杂志)[J], 2001, 24(6):328
 [6] Yang Zhijun(杨治军), Yu Zhentao(于振涛), Zhou Lian(周廉). *Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2007, 36(11): 1960
 [7] Li Zhengxian(李争显), Zhang Yuefei(张跃飞), Wang Baoyun(王宝云). *Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2007, 36(12): 2152
 [8] De Luca G, Suryapranata H, Marino P. *Prog Cardiovasc Dis*[J], 2008, 50(5): 352
 [9] Prasad C K, Muraleedharan C V, Krishnan L K. *Biomed Mater Res A*[J], 2007, 80(3): 644
 [10] Rotmans J I, Heyligers J M, Stroes E S *et al.* *Can J Cardiol*[J], 2006, 22 (13): 1113

The Effect of Superficial Magnetic Films of 316L Medical Steel Stents on Endothelialization

Hu Tao^{1,2,3}, Yu Zhentao¹, Zhou Lian¹, Jie Wanqi², Zhou Jingyu³, Wang Haichang³

(1. Northwest Institute for Nonferrous Metal Research, Xi'an 710016, China)

(2. Northwest Industrial University, Xi'an 710049, China)

(3. Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: The effect of superficial magnetic film on vascular endothelialization for the 316L medical stainless steel stent was investigated in this study. The in vitro endothelial response of human umbilical vein endothelium cell (HUVECs) was investigated on the superficial magnetic film 316L medical stainless steel stent vs bare-metal stent surface; as well as the re-endothelialization and platelet adhesion reaction of superficial magnetic film 316L medical stainless steel stent vs bare-metal stent were evaluated with SEM after animal models implantation for 1 month and 3 months. The consequence indicates that the superficial magnetic film 316L medical stainless steel stent can increase the adhesion and proliferation of HUVECs in vitro, and promote the regeneration of vas endothelialization after implantation in vivo, as well as speed the stent endothelialization and inhibit the platelet adhesion reaction and activation, simultaneously.

Key words: endothelialization; magnetic film; 316L stainless steel stent

Biography: Hu Tao, Postdoctor, Associate Professor, Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710016, P. R. China, Tel: 0086-29-84775183; E-mail: hutao74@fmmu.edu.cn; Corresponding Author: Wang Haichang, Professor, Tel: 0086-29-84773469