

一种治疗胆总管结石新型药物洗脱复合金属支架的制备及表征

高强¹, 黄超², 孙彬彬¹, 陈维明¹, 王静¹, 宛新建², 莫秀梅^{1,3}

- 5 (1. 东华大学 化学化工与生物工程学院 上海 201620 ;
2. 上海交通大学医学院 附属第一人民医院消化内科 上海 201600 ;
3. 山东国际生物科技园发展有限公司 烟台 264670)

摘要: 以 EDTA&SC 为负载药物, 以 PCL 为药物载体, 采用表面浸涂法制备了一种用于胆
10 总管结石治疗的新型药物洗脱复合金属支架并对其药物载入形式, 径向受力, 体外药物释放
和体外溶石进行研究。研究结果表明, 浸涂法制备的药物洗脱复合金属支架涂层表面呈白色,
光滑平整并且支架内腔畅通; 光学显微镜照片, SEM 照片和 XRD 图谱表明, EDTA 呈晶体
15 颗粒形式均匀分散在涂层内部, SC 则呈无定型状态存在; 径向压缩力学结果显示, 支架回
弹性良好, 径向受力不会改变支架的截面积; 此外, 体外的药物释放实验和溶石实验表明,
制备的药物洗脱复合金属支架药物释放时间超过 28 天并且在第 28 天结石质量减少 33.3%,
显示出良好的体外溶石效果。该支架有望应用于胆总管结石疾病的治疗。

关键词: 复合材料; PCL; EDTA&SC; 胆结石; 支架

中图分类号: TQ31

20 Fabrication and characterization of a novel drug-eluting composite metal stent for CBD stone

GAO Qiang¹, HUANG Chao², SUN Binbin¹, CHEN Weiming¹, WANG Jing¹, WAN
Xinjian², MO Xiumei^{1,3}

- 25 (1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, DongHua University,
Shanghai, 201620;
2. Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong
University, School of Medicine, Shanghai, 201600;
3. Shandong International Biotechnology Park Development Co., Ltd, Yantai, 264670)

Abstract: A novel drug-eluting composite metal stent coated with PCL layer in which loaded
30 EDTA&SC was fabricated for CBD stone by the way of surface coating and studies on
EDTA&SC existing form in coating layer, radial mechanical properties, drug release and gallstone
dissolution in vitro test were carried out in this paper. Results showed that this novel drug-eluting
composite metal stent prepared by surface coating possessed a white smooth surface and
35 unobstructed lumen; as shown in the optical image, SEM image and XRD spectrum, uniformly
dispersed EDTA particles seen clearly was crystal state in the coating layer, but SC was
amorphous state; radial compression mechanical properties proved perfect resilience and
unchanged cross-section after removing the radical force; besides, drug release time of this novel
drug-eluting composite metal stent was over 28 days and the mass of gallstone reduced by 33.3%
40 in vitro. This novel drug-eluting composite metal stent has potential application for CBD stone
treatment.

Key words: Composite material; PCL; EDTA&SC; Gallstone; Stent

基金项目: 国家自然科学基金, 面上项目 (81470904)

作者简介: 高强 (1990-至今), 男, 生物医学工程专业硕士研究生, 主要研究方向为载药静电纺丝纳米纤维在生物医药方面的相关应用

通信联系人: 莫秀梅 (1961-至今), 女, 教授、博士生导师, 主要从事于生物材料与组织工程方面研究. E-mail: xmm@dhu.edu.cn

0 引言

目前,胆总管(common bile duct,CBD)结石在世界范围内是一种发病率很高的胆道疾病。随着内镜下逆行性胰胆管造影(Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography, ERCP)技术发展,经内镜行胆总管取石已成为其主要治疗手段。但是,手术治疗创伤大,且常出现腹腔感染、胆漏等多种并发症^[1,2]。因而,对于许多难治性结石疾病,ERCP术下胆总管药物洗脱支架置入是目前治疗难治性胆总管结石的新方法。药物洗脱支架负载特定药物,具有药物释放稳定、释药速率可控等特点,广泛应用于生物医学工程的各个领域^[3-5],是当今研究的热点。聚己内酯是一种生物相容性良好的高分子材料,常用于制备组织工程支架和药物缓释载体。乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA)一种常用的螯合剂,可以螯合胆结石中的钙、镁等金属离子,胆酸钠(Sodium Cholate, SC)则能溶解胆结石中所含的胆固醇成分。已有研究表明,口服灌注EDTA和SC对胆结石具有一定的溶解作用,但是溶石效果较差^[3,6-10]。本研究以EDTA和SC为负载药物,以聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)为药物载体,通过表面浸图的方法制备了一种新型药物洗脱复合金属支架用于胆总管结石的治疗。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

PCL从Sigma试剂公司采购,EDTA购自国药集团化学试剂有限公司,SC购自百灵威科技有限公司,镍钛合金金属支架由南京微创医学科技股份有限公司提供,六氟异丙醇(1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol, HFIP)购于上海达瑞精细化学品有限公司。胆结石由上海交通大学附属第一人民医院提供。

1.2 药物洗脱复合金属支架的制备

图1为药物洗脱复合金属支架的制备过程原理图。简而言之,1g PCL溶于10mL HFIP制备出10% (w/V)的PCL聚合物溶液,然后在聚合物溶液中加入1g药物(EDTA和SC摩尔比为1:1),磁力搅拌器搅拌均匀,浸涂之前超声震荡10min去除气泡。将镍钛合金金属支架浸入混有药物的聚合物溶液,取出放入通风橱晾干,然后再次浸涂,重复上述操作数次。制备的支架的相关参数见表1。

表1 药物洗脱复合支架相关参数

Tab. 1 Relevant parameters of drug-eluting composite metal stent

支架类型	载药量	支架涂层成分	涂层厚度
未加涂 PCL 涂层载药支架	50%	PCL/EDTA&SC	0.475±0.0472
加涂 PCL 涂层载药支架*		PCL/EDTA&SC+PCL	0.565±0.0342
PCL 涂层支架	0	PCL	0.402±0.0271

*即在晾干后的药物洗脱复合金属支架表面再涂一层PCL,目的是减弱药物突释现象。

在上述涂层制备好的药物洗脱复合金属支架表面进行静电纺丝制备涂层的保护层,防止其使用过程中涂层碎落。纺丝液为上述10% PCL溶液,推进泵推进速率2mL/h,电压10kV,

75 接受距离 15cm, 接收支架的转速为 100r/min。

1.3 药物洗脱复合金属支架的表征

药物在聚合物中分散形式用光学显微镜 (LSCM, Carl Zeiss LSM 700, Germany) 和扫描电子显微镜 (SEM, Hitachi TM-100, Japan) 观察。将混有药物的聚合物溶液均匀涂抹在载玻片上, 通风橱晾干后使用光学显微镜进行观察。将晾干后的图层剪下一小块置于电镜台上, 80 在 8mA 电流强度下喷金处理 2 次, 每次 10s, 然后进行 SEM 观察。

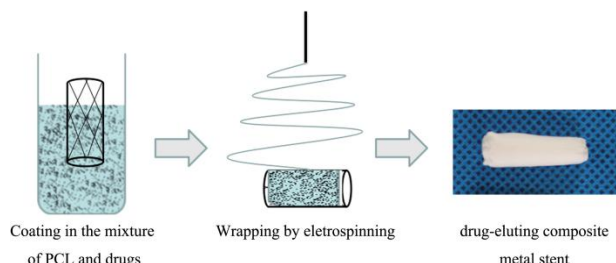


图 1 药物洗脱复合金属支架的制备过程图

Fig 1 Fabricated process of drug-eluting composite metal stent

采用 X 射线衍射技术 (X-ray diffraction, XRD) 进一步表征药物的存在形态。将样品剪 85 碎放入测试仪 (D/max-2550 PC, 日本) 进行测试, 2 θ 角测量范围为 5 $^{\circ}$ ~90 $^{\circ}$ 。

采用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和热重分析图谱 (TGA) 对支架涂层进行成分分析。每个样品使用 FTIR 分析仪 (Nicolet 6700, Thermo Fisher, USA) 波长扫描范围为 4000 - 500 cm^{-1} 。TGA 的测试条件: 5mg 样品放入 TGA 测试仪 (TG 209 F1, Germany) 内, 在氮气氛围保护下从 50 $^{\circ}\text{C}$ 升温到 600 $^{\circ}\text{C}$ 进行测试, 升温速率为 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 然后自然冷却到室温。

90 支架的力学性能使用材料力学测试仪 (Instron 5969 testing system) 室温下进行压缩测试, 压缩速率为 10mm/min, 循环压缩 10 次。

1.4 体外药物释放实验

药物洗脱复合金属支架放入 10mL 离心管中, 加入 5mL PBS (pH 7.4), 然后将离心管放入恒温震荡培养箱内 (120rpm, 37 $^{\circ}\text{C}$)。在预设时间点 (1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 95 14d, 21d, 28d) 每次取样 1mL, 然后重新补加 1mL 新鲜 PBS 维持缓释液体积不变。缓释液中药物的含量采用高效液相色谱测定, 然后计算出释放的药物的总量。

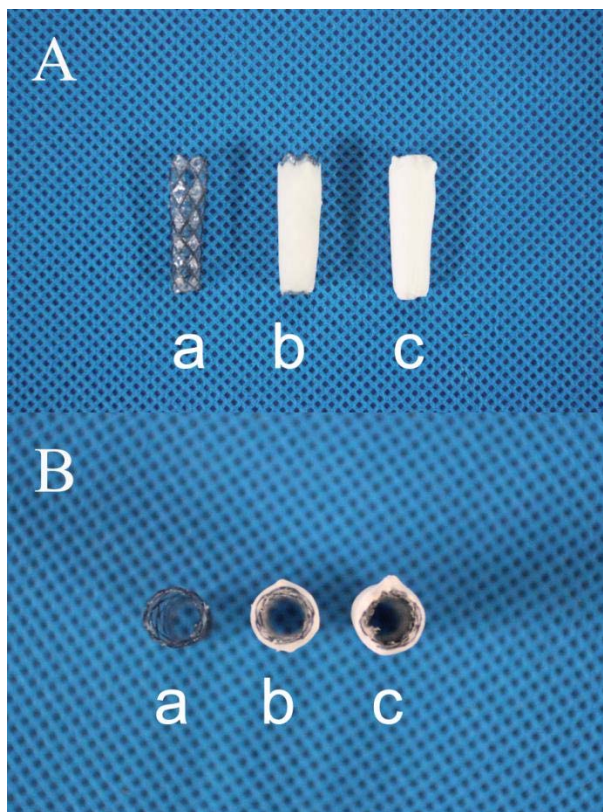
1.5 体外溶石实验

药物洗脱复合金属支架和 296.6 \pm 7.1mg 胆结石放入 10mL 离心管中, 加入 5mL PBS (pH 7.4), 然后将离心管放入恒温震荡培养箱内 (120rpm, 37 $^{\circ}\text{C}$)。在预设时间点 (1d, 2d, 100 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 14d, 21d, 28d) 对结石质量进行质量测量并观察结石的溶解情况。

2 结果与讨论

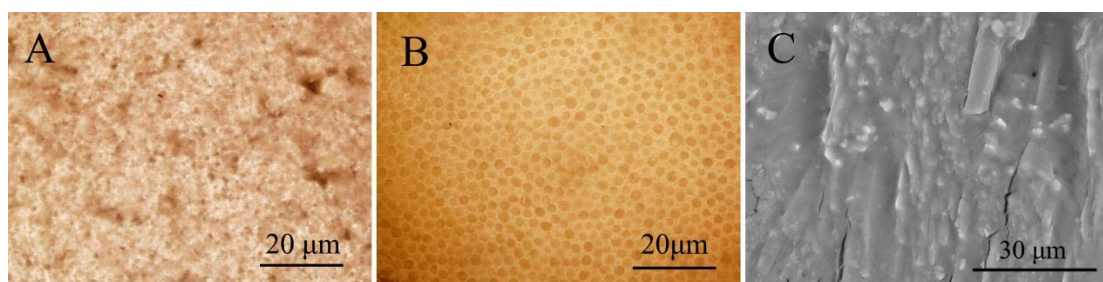
从图 2 可以看出, 制备的药物洗脱复合金属支架涂层由于 EDTA&SC 的混入呈白色, 涂层表面光滑平整, 管腔内部通畅且支架内径并未随着涂层溶剂挥发而缩小。图 3A 为纯 PCL 涂层的光学照片, 对比图 3A, 从加入 EDTA&SC 的聚合物混合溶液涂层 (图 3B) 中可看到 105 许多微小的晶体颗粒均匀分布在涂层中。这些颗粒就是聚合物混合溶液中的 EDTA 晶体。EDTA 不溶于 HPIF, 在溶液中只能以晶体形式存在。由于 SC 可以与 HPIF 互溶, 所以我们不能从图 3B 中找到 SC 存在的证据。此外, 从 SEM 图片 (图 3C) 中我们可以看到, 在涂层的

表明具有许多凸起的颗粒，这也证明了EDTA在涂层中以晶体颗粒形式存在。XRD图谱进一步说明了EDTA&SC的存在形式。从图4中可以看出，与纯的PCL涂层相比，载有EDTA&SC的涂层在10.98°，18.00°，25.96°和29.1°（红色箭头处）均有加强峰出现，这些峰与晶体形式存在的EDTA的峰位置一致，从而证明了EDTA在涂层中以晶体形式存在。但是，我们在载有EDTA&SC的涂层中并不能看到SC的特征峰存在，这也就是说溶于HPIF的SC以无定型的形式存在。



115 图2 三种支架数码图片(a 裸金属支架 b浸涂后的药物洗脱支架 c 包裹静电纺保护层的完整药物洗脱复合支架)

Fig 2 Digital images of three types of stent (a Naked metal stent b Drug-eluting stent after coating c Drug-eluting composite metal stent wrapped by eletrospinning film)



120 图3 A 纯PCL涂层光学图片 B 含EDTA&SC混合涂层光学图片 C 含EDTA&SC涂层SEM图片

Fig 3 A Optical image of PCL coated layer B Optical image of PCL coated layer with EDTA&SC C SEM image of PCL coated layer with EDTA&SC

图5A为PCL、EDTA、SC和载药涂层的FTIR图谱。EDTA分子中存在O=S=O和-OH集团，对应地峰分别出现在1180cm⁻¹和3200cm⁻¹到3500cm⁻¹处，从图5A可以看出，由于EDTA加入，载药涂层的红外光谱中在1180cm⁻¹和3200cm⁻¹到3500cm⁻¹处也有增强峰出现，

这就证明了载药涂层中含有 EDTA。但是，由于 SC 与 PCL 和 EDTA 官能团重叠，所以红外图谱并不能直接证明 SC 存在与否。图 5B 为 PCL、EDTA、SC 和载药涂层的 TGA 图谱。从图 5B 可以看出，纯的 PCL 开始发生热分解温度为 389 °C，但是随着 EDTA&SC 的加入，混合涂层的热分解温度降低，为 338 °C，则可能是由于 EDTA 所引起，因为 EDTA 开始发生分解的温度低于 PCL 开始分解温度。从图中可以看出，纯的 PCL 在 432 °C 完全分解，而混合涂层在温度达到 471 °C 才基本完全分解，而此温度则是 SC 完全分解的温度，由此证明了混合涂层中含有 SC。

130

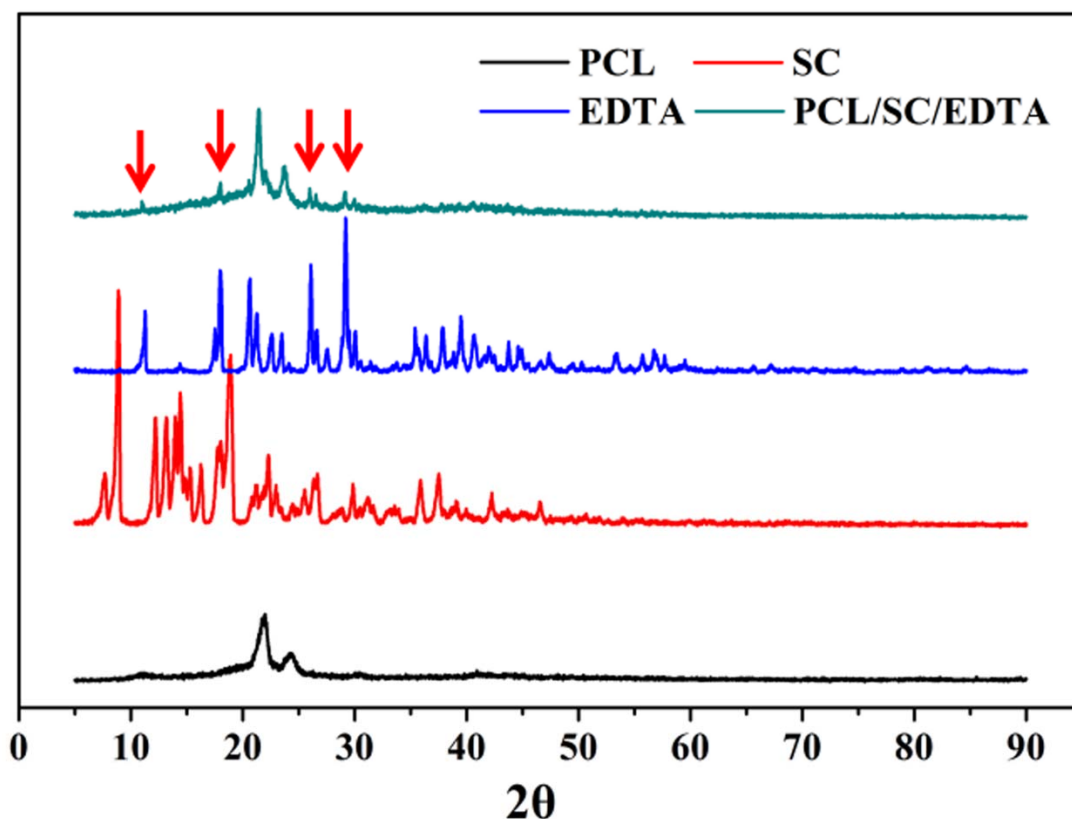


图 4 PCL, SC, EDTA和含EDTA&SC混合涂层XRD图谱

Fig 4 XRD spectrum of PCL, SC, EDTA and PCL coated layer with EDTA&SC

135

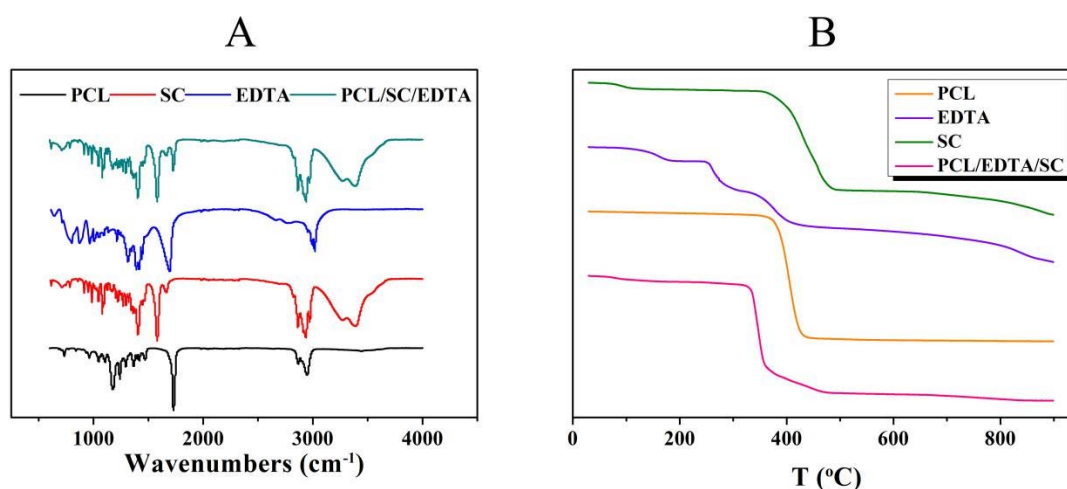
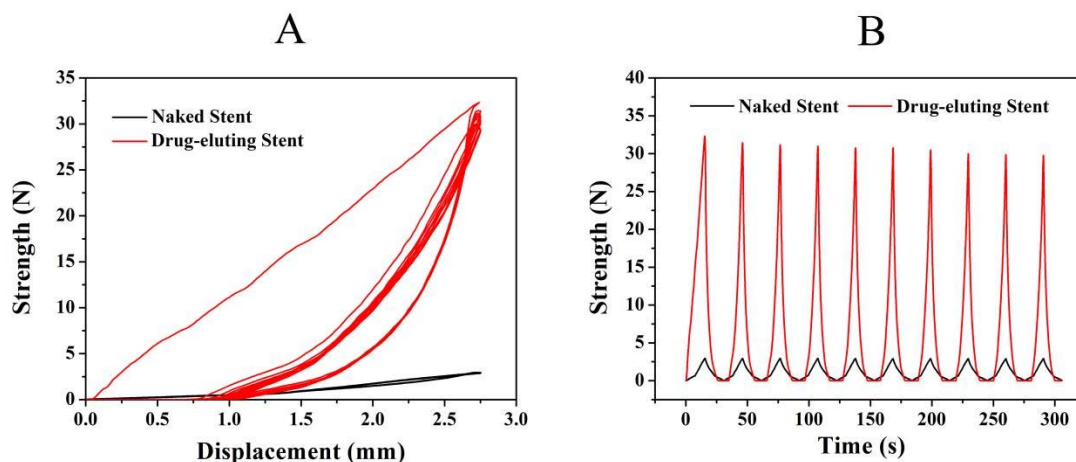


图 5 PCL, SC, EDTA和含EDTA&SC混合涂层FTIR (A) 图谱和TGA图谱(B)

Fig 5 FTIR spectrum (A) and TGA spectrum (B) of PCL, SC, EDTA and PCL coated layer with EDTA&SC

140 图 6 为药物洗脱复合金属支架的压缩力学性能图。图 6A 为裸支架和药物洗脱复合金属支架的 10 次循环压缩力学图, 药物洗脱复合金属支架在第一压缩之后产生 0.75mm 的位移损失, 之后 9 次循环则不再产生位移损失。而在我们的实际观察中, 这种位移损失不会改变管腔的截面积, 所以并不会影响管腔的导流功能。图 6A 为 10 次压缩循环的受力图, 由于涂层的存在, 支架径向所承受的最大压力平均为 $30.741 \pm 0.779\text{N}$, 远远大于裸支架所能承受的最大压力 $2.924 \pm 0.021\text{N}$ 。



145

图 6 裸金属支架和药物洗脱复合金属支架 10 次压缩循环图 (A 力-位移 B 力-时间)

Fig 6 10 times compressive mechanical property (A Strength-Displacement B Strength-Time)

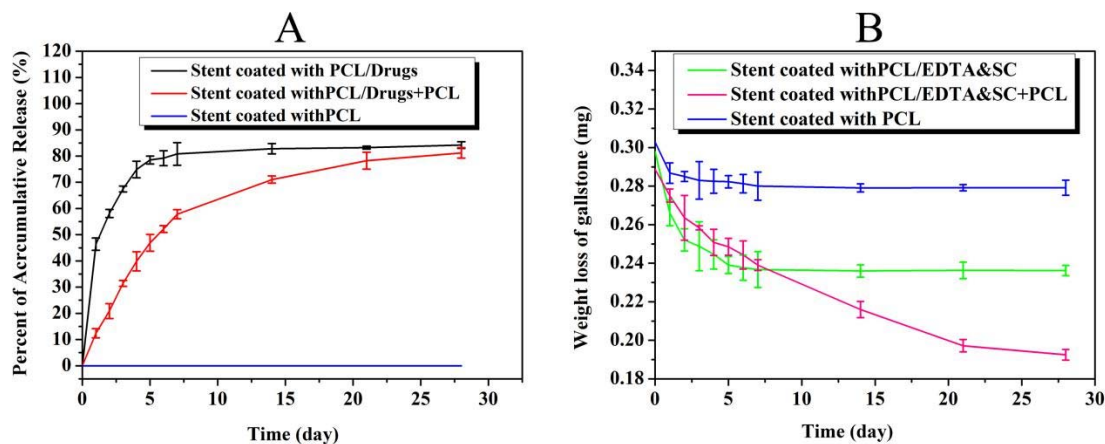


图 7 体外药物释放曲线 (A) 和体外溶石曲线 (B)

150

Fig 7 Drug release curve (A) and gallstone dissolution curve (B) in vitro test

155 图 7 为药物洗脱复合金属支架体外药物释放曲线。从图 7A 中可看出, 未加涂 PCL 的药物洗脱复合金属支架药物的突释现象严重, 第一天释放了药物总量的 $46.4 \pm 2.4\%$, 在第五天是已经释放了 $78.5 \pm 1.5\%$, 并不能很好实现长期缓释效果。而经过加涂 PCL 处理的药物洗脱复合金属支架释放相对平稳缓慢, 七天释放量为 $57.8 \pm 1.8\%$, 直到第 28 天, 药物还在缓慢释放。药物的缓慢释放可增加药物与结石接触时间, 有利于结石的溶解。从胆结石的质量损失曲线图 (图 7B) 中可以看出, PCL/EDTA&SC+PCL 组的结石质量持续减少, 到第 28 天结石的质量减少了 33.3%。而 PCL/EDTA&SC 组结石到第 28 天只减少了 20.7%。从图中我们也可看出, 结石质量减少只发生在前七天, 这可能是药物洗脱复合金属支架的药物释放完全所致。在没有药物的 PCL 组, 结石的质量只在第一天有少量减少, 这可能是由于结石表面附

160 着的某些离子溶解于PBS.

3 结论

我们成功制备了一种可溶解胆结石的新型药物洗脱复合金属支架。在支架的载药涂层中, EDTA&SC的含量为涂层质量的 50%, 且制备得到的药物洗脱复合金属支架涂层呈白色, 表面光滑平整, 支架内腔通畅。光学显微镜照片, SEM照片和XRD图谱显示EDTA在涂层中
165 成晶体形式存在, 而SC溶于HPIF而呈无定型状态。此外, FTIR图谱和TGA图谱证明了载药
涂层中含有PCL、EDTA、SC, 表明EDTA&SC成功负载在涂层中。由于载药涂层的存在,
药物洗脱复合金属支架的径向压缩承受力显著增大到 $30.741\pm 0.779\text{N}$, 而裸金属支架仅仅为
 $2.924\pm 0.021\text{N}$ 。此外, 当药物洗脱复合金属支架受到径向压力后, 支架恢复性良好, 截面积
并不发生改变。体外药物缓释效果良好, 药物持续释放超过 28 天。在体外溶石实验中, 在
170 第 28 天时, 放入的胆结石质量减少了 33.3%, 溶石效果显著。本研究为该支架的临床应用
铺平了道路, 有望为胆结石疾病的治疗提供一条新的途径。

[参考文献] (References)

- [1] Yasuda I, Itoi T. Recent advances in endoscopic management of difficult bile duct stones[J]. *Dig Endosc*, 2013; 25(4): 376-85.
- 175 [2] Kim JH, Yang MJ, Hwang JC, Yoo BM. Endoscopic papillary large balloon dilation for the removal of bile duct stones[J]. *World J Gastroenterol*, 2013; 19(46): 8580-8594.
- [3] Shah T. Drug-eluting stents in malignant biliary obstruction: where do we stand?[J]. *Dig Dis Sci*, 2013; 58(3): 610-2.
- [4] Ding F, Lu Z, Zou R, Zhang Y, Guo Q, Li S, Yang J. Evaluation of a novel paclitaxel eluting stent with a bio-absorbable polymeric surface coating in the porcine artery injury model[J]. *Acta Cardiol*, 2011; 66(6): 765-772.
- 180 [5] Sousa J E, Serruys P W, Costa M A. New Frontiers in Cardiology Drug-Eluting Stents: Part I[J]. *Circulation*, 2003, 107(17):2274-9.
- [6] Noda A, Ibuki E, Izumi J, Hamano K, Ota M, Maekawa M. Oral litholysis therapy for endoscopically unretrievable obstructive pancreatic stones[J]. *Pancreas*, 2005; 30(4): 385-7.
- 185 [7] Klueppelberg U, Baumgaertel H, Schusdzarra V, Swobodnik W. Dissolution of bile duct stones by a hydrophilized glyceromonooctanoic-bile-acid-EDTA emulsion[J]. *Klin Wochenschr*, 1991; 69(2): 76-82.
- [8] Esch O, Spinosa J C, Hamilton R L, et al. Acute effects of topical methyl tert-butyl ether or ethyl propionate on gallbladder histology in animals: A comparison of two solvents for contact dissolution of cholesterol gallstones[J]. *Hepatology*, 1992, 16(4):984-91.
- 190 [9] Han J, Moon J H, Koo H C, et al. Effect of Biliary Stenting Combined With Ursodeoxycholic Acid and Terpene Treatment on Retained Common Bile Duct Stones in Elderly Patients: A Multicenter Study[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2009, 104(10):2418-21.
- [10] Williams EJ; Green J; Beekingham I; Parks R; Martin D; Lombard M; British Society of Gastroenterology. Guidelines on the management of common bile duct stones (CBDS)[J]. *Gut*, 2008, 57(7):1004-1021.
- 195