

## 大鼠胸主动脉内皮剥脱术后内皮素的释放反应

北京医科大学第一临床医学院 刘勃 陈健 林静 朱国英 汪丽惠  
北京医科大学心肺内分泌研究室 凌世长 唐朝枢

**摘要** 本工作在大鼠胸主动脉球囊损伤模型上观察了术后内皮再生和内膜增生及其与管壁内皮素释放之间的关系,结果表明大鼠胸主动脉内皮剥脱术后不同时期管壁内皮素的释放均成倍增加,去除内皮后假手术组大鼠血管孵育液中不能检测到内皮素免疫活性,但实验组大鼠血管孵育液中内皮素免疫活性仍较高。凝血酶(4u/ml)可促进术后内皮素的进一步释放。本工作首次证明,非内皮源性内皮素释放多是导致大鼠胸主动脉内皮剥脱术后内皮素增加的主要原因。

**关键词** 内皮剥脱术; 内皮素; 内膜增生

内膜增生是经皮腔内血管成形术(Percutaneous Transluminal Angioplasty, PTA)后再狭窄(Resterosis, Rs)的重要病理特征,其机制尚未完全阐明,似与PTA术后内皮剥脱有密切关系<sup>①</sup>。内皮素(Endothelin, ET)主要由血管内皮细胞产生,为迄今所知最强的缩血管活性多肽,同时它还是血管平滑肌细胞(VSMC)的促有丝分裂剂<sup>②-④</sup>。有报道PTA术后病人血浆ET水平显著增加,但其病理生理学意义尚不清楚<sup>⑤</sup>。本工作在大鼠胸主动脉球囊内皮剥脱模型上,观察了术后不同时期管壁ET的释放反应以及凝血酶对ET释放的影响,以探讨ET与PTA术后内膜增生之间的关系。

### 1 材料和方法

本工作选用成年雄性Wistar大鼠,体重300~320g。术前禁食12小时,自由饮水,按Barmgartner<sup>⑥</sup>法行胸主动脉内皮剥脱术。5%戊巴比妥麻醉(30mg/kg, ip),采用改良2F Fogarty球囊导管,经左侧颈总动脉送至膈肌下0.5cm,以生理盐水充盈球囊并回拉至动脉切开处。反复三次后将血管结扎。术后大鼠分笼喂养,喂普通饲料,自由饮水。

**1.1 病理学检查:**分别于术后即刻、3天、10天和21天选取两只大鼠,20%乌拉坦麻醉(5ml/kg, ip),静注Evan's兰(60mg/kg),1小时后经左心室逆行插管至升主动脉,生理压(100mmHg)下用1%戊二醛和4%福尔马林液原位灌注20分钟。取出胸主动脉,再于上述固定液中固定12-16小时,经HE染色行光镜检查。

**2.2 ET释放反应:**选用300~320g雄性Wistar大鼠,随机分成四组,即假手术组、术后3天组、10天组和21天组,各组再根据是否去内皮和是否加凝血酶分成四组,每组5例动物。参照Boulanger法<sup>⑦</sup>孵育血管条,分别于术后3天、10天和21天摘取大鼠胸主动脉(10cm<sup>2</sup>)置于2ml内含0.01%牛血清蛋白(Sigma Co)的Krebs-Ringer液溶液成份(mM):NaCl118.3, KCl4.7, CaCl<sub>2</sub>2.5, MgCl<sub>2</sub>1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1.2, NaHCO<sub>3</sub>25.0, Glucose11.1, pH=7.4)中,于恒温振荡水浴中孵育4小时(通以95%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>,温度37℃)。去内皮组动物血管孵育前在体外Krebs-Ringer液中以无菌棉签将内皮轻轻擦去,凝血酶组动物血管则在内含4u/ml凝血酶(Sigma Co)的上述溶液中孵育。

以常规放射免疫分析方法测定孵育液中ET的放免活性(ET-ir)。ET放免药盒购自美国Peninsular Lab, ET-ir的特异性与ET-1有100%交叉反应,与ET-2、ET-3有7%交叉反应,而与 $\alpha$ -心钠素、脑钠素、血管紧张素以及血管活性肠肽等均无交叉反应。所有样品测定均在同一次完成,药盒最低检测值为5pg/100ul或100pg/cm<sup>2</sup>,将ET-ir换算成每cm<sup>2</sup>血管释放的ET-ir量。

所有结果均以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,组间差异用方差分析和两两比较的q检验。

### 2 结果

内皮剥脱术后即刻Evan's兰染色可见胸主动脉全部兰染,光镜和扫描电镜观察可见胸主动脉内

皮全部剥脱(图 2A)。术后 3 天,光镜检查可见内皮细胞开始增生,但内膜无增厚(图 1B)。扫描电镜观察可见大部分血管皮内细胞缺失,内皮下结缔组织暴露,内皮细胞自胸肋间动脉开口处向胸主动脉放射状生长(图 2B)。术后 10 天,光镜检查可见管壁内膜轻度增厚,内膜内可见 VSMC 增生(图 1C)。扫描电镜观察可见再生内皮细胞增加,变长、肥大(图 2C)。术后 21 天,光镜检查可见内膜明显增厚(图 1D),扫描电镜观察仍有部分内皮细胞呈片样缺失(图 2D)。

假手术组动物血管内皮细胞完整时孵育后可检测到 ET-ir,但去内皮后则无 ET-ir。与假手术组相比,术后 3,10,21 天不去内皮时管壁 ET-ir 分泌量分别增加 1.4 和 3 倍( $P$  均  $< 0.01$ )。而且术后不同时期去内皮后孵育液 ET-ir 水平仍较高。与假手术组相比,ET-ir 分别增加 7,11 和 6 倍( $P$  均  $< 0.01$ )(图 3)。由此可以得出术后 3、10 和 21 天再生内皮细胞所分泌 ET-ir 占全部分泌量的百分数(不去内皮 ET-ir - 去内皮 ET-ir / 不去内皮 ET-ir  $\times 100\%$ )分别为 14.03%、45.6%和 62.84%(图 4)。

凝血酶可刺激不去内皮时各组血管条 ET-ir 释放,但对去内皮时假手术组大鼠血管条无明显影响( $P > 0.05$ )。与不加凝血酶组相比,术后 3、10 和 21 天不去内皮加入凝血酶后 ET-ir 分别增加 55%( $P < 0.01$ )、29.14%( $P < 0.01$ )和 31.95%( $P < 0.05$ )(图 5)。去内皮加入凝血酶后 ET-ir 分别增加 41.34%、31.02%和 31.95%( $P$  均  $< 0.05$ )(图 6)。

### 3 讨论

八十年代以来,随着技术和方法的改进,PTCA 这项治疗冠心病的新技术以其成功率高(95%)而得到普及和推广。然而 PTCA 术后较高的再狭窄发生率(13%~47%)系该技术发展的主要障碍。目前 RS 的发生机制尚不清楚,可能与 PTCA 术后内皮剥脱、中层平滑肌细胞受牵张等有关。RS 病变血管的病理学检查提示,中层 VSMC 向内膜迁移和增生以至内膜增厚是 RS 的主要病理特征。然而这种内膜增生的机制目前尚未完全阐明,可能与血小板、淋巴细胞和单核巨噬细胞粘附和聚集、生长因子尤其是生长促进因子和抑制因子平衡失调和血流动力学改变(切应力)等有关<sup>①</sup>。

ET 主要由血管内皮细胞产生,为迄今所知最强的缩血管活性肽。近年来研究发现,除血管内皮细胞外,平滑肌细胞、单核-巨噬细胞、成纤维细胞等亦可产生 ET<sup>②</sup>。它除具有强烈的血管收缩作用外,还可能通过旁分泌或自分泌方式促进 VSMC 增生。在许多心血管疾病如心绞痛、心肌梗塞、心肌缺血一再灌注和心衰中具有重要的发病学意义<sup>③</sup>。Tahara 等<sup>④</sup>发现,PTA 术后病人血浆 ET-ir 水平显著增加,但其机制尚不清楚。Lerman 等<sup>⑤</sup>通过对高度动脉粥样硬化病变的免疫组织化学研究,发现病变动脉全层均有 ET 免疫反应阳性颗粒。但这种变化系内皮细胞分泌 ET 平滑肌细胞“胞饮”,还是平滑肌细胞本身分泌 ET 所致尚不清楚。本工作在大鼠胸主动脉球囊损伤模型上观察术后不同时期内皮再生和内膜增生及其与管壁 ET-ir 释放量之间的关系,发现大鼠胸主动脉内皮剥脱术后不同时期管壁 ET-ir 分泌量均增加,其中术后 10 天时最为明显。正常大鼠血管去内皮后 ET-ir 水平低于检测范围,但术后血管去内皮后 ET-ir 仍较高,亦符合上述规律,提示内皮剥脱术后非内皮源性 ET 产生增加。有关这种变化的机制目前尚不清楚。Clowes 等<sup>⑥</sup>通过对大鼠颈总动脉损伤后细胞增殖动力学的研究发现,血管损伤后中层平滑肌细胞增生 48 小时达最大,而内膜平滑肌细胞增生则在 96 小时达高峰。术后 2 周内膜平滑肌数目恒定。本实验结果与上述报道相近,同时还发现动脉损伤后 ET-ir 释放规律与细胞增殖关系甚为密切,即早期平滑肌细胞增生活跃时 ET-ir 释放增多;中期(约 2 周)平滑肌数目达高峰时 ET-ir 释放也最多。因此,动脉损伤后平滑肌细胞增生活跃,原癌基因表达增加,生长因子特别是生长抑制因子如内皮细胞衍化一氧化氮(endothelium-derived nitric oxide)分泌减少可能是导致 ET-ir 分泌增多的主要原因<sup>⑦</sup>,但有待于进一步研究。

本实验还观察到凝血酶可促进动脉损伤后 ET 的释放。由于 PTA 术后血小板粘附和聚集,血栓形成,凝血酶大量释放,可进一步促进 ET 的释放,从而使内膜增生明显。因此,早期拮抗或抑制 ET 的生物活性,同时抑制血小板粘附和聚集或血栓形成,对于 PTA 术后 RS 的防治具有重要的临床意义。

## 参考文献

1. Karas SP, Santoin EC, Gravanis MB. Restenosis following coronary angioplasty. *Clin Cardiol* 1991; 14 : 791~801
2. 唐朝枢, 谢选珠, 汤健. 内皮素(Endothelin). *北京医科大学学报* 1989; 21 : 163~164
3. Bobik A, Grooms A, Millar JA, et al. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 258(cell physiol 27) : c408—c415
4. Tahara A, Kohno M, Yanagi S, et al. Circulating immunoreactive endothelin in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Metabolism* 1991; 40(12) : 1235~1237
5. Baumgartner HR, Studer A. Folgen des gefasskatheterism us am normo and hyper cholesterinaemischen kaninchen. *Pathol Microbiol (Basel)*, 1966; 29 : 393
6. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta, inhibition by endothelium — derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85 : 587~590
7. Resink TJ, Hahn AWA, Scott—Burden T, et al. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human Smooth muscle cells. *Bio Chem Biophys Res Commun* 1990; 168 : 1303~1310
8. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325 : 997~1001
9. Clowes AW, Beidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49(3) : 327~333

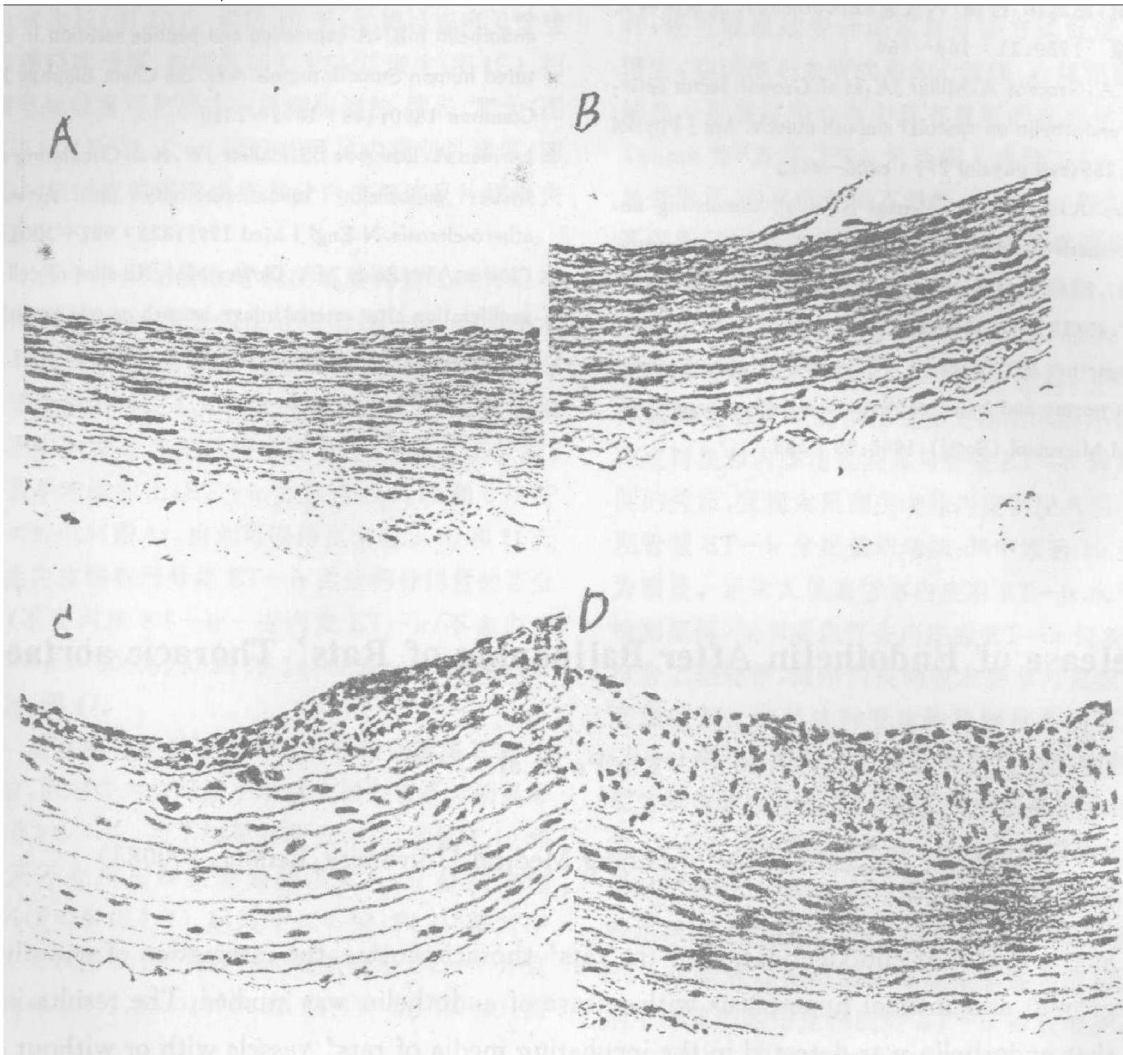
## Release of Endothelin After Ballooning of Rats' Thoracic aortae

Liu Pu, et al

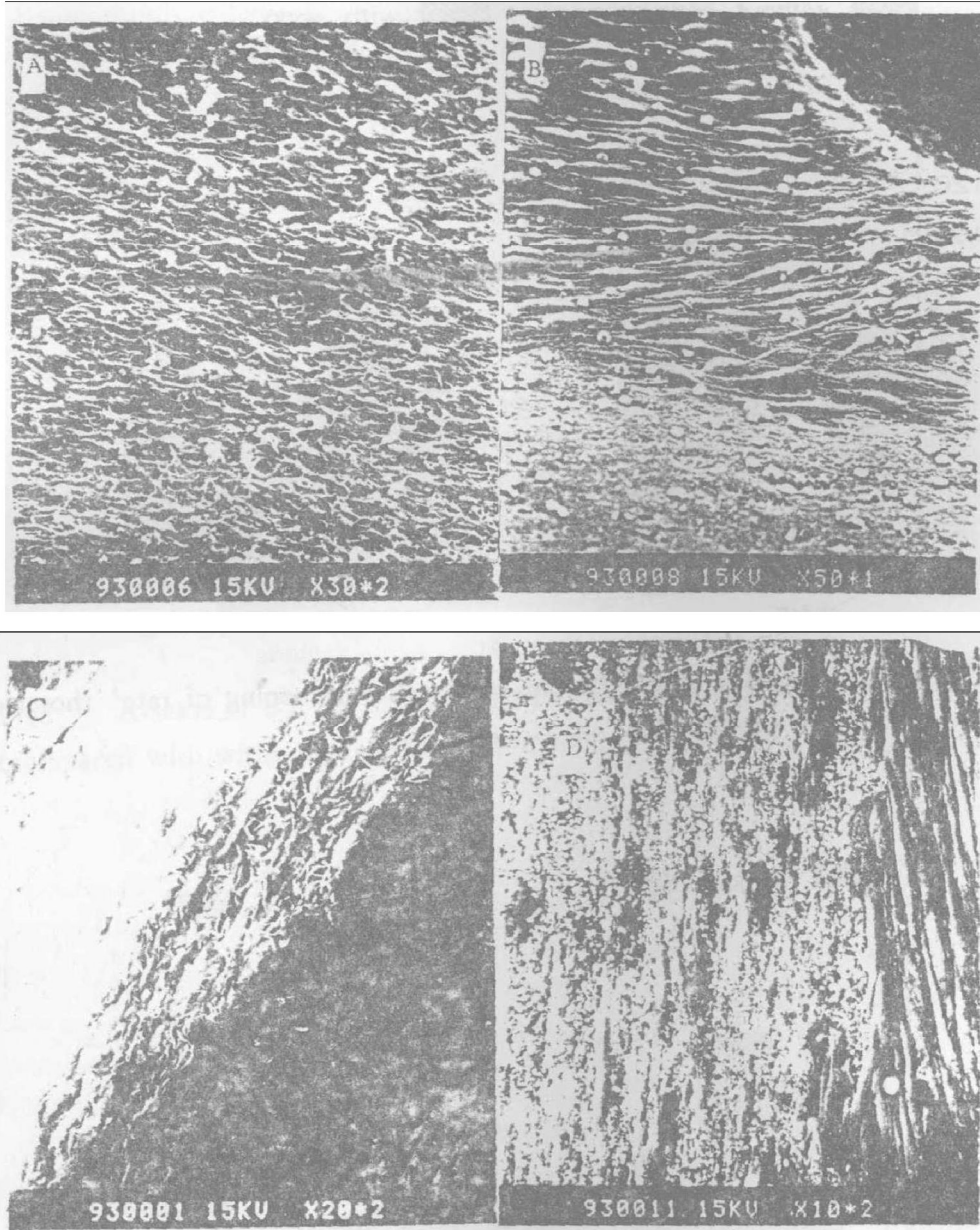
(The First Clinical College of Beijing Medical University, Beijing, 100083)

On the model of endodenudation of the rats' thoracic aortae, the interaction of endothelium regrowth and intimal hyperplasia with release of endothelin was studied. The results indicated that endothelin was detected in the incubating media of rats' vessels with or without endothelium after procedure, but not in those without endothelium in sham control. In preparations with endothelium or those without it, thrombin (4u/ml) stimulated the release of the peptide after endodenudation. Thus, we concluded that the increase of non—endothelium derived endothelin release is the major course of increased endothelin release after ballooning of rats' thoracic aortae.

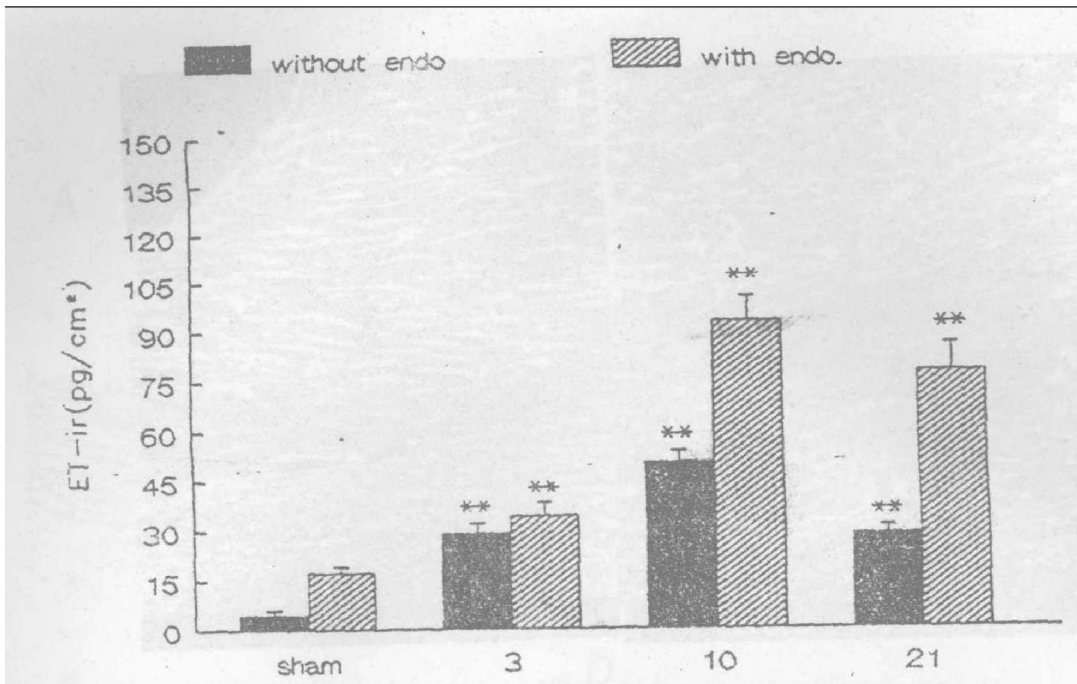
**Key Words** endodenudation; endothelin; intimal hyperplasia



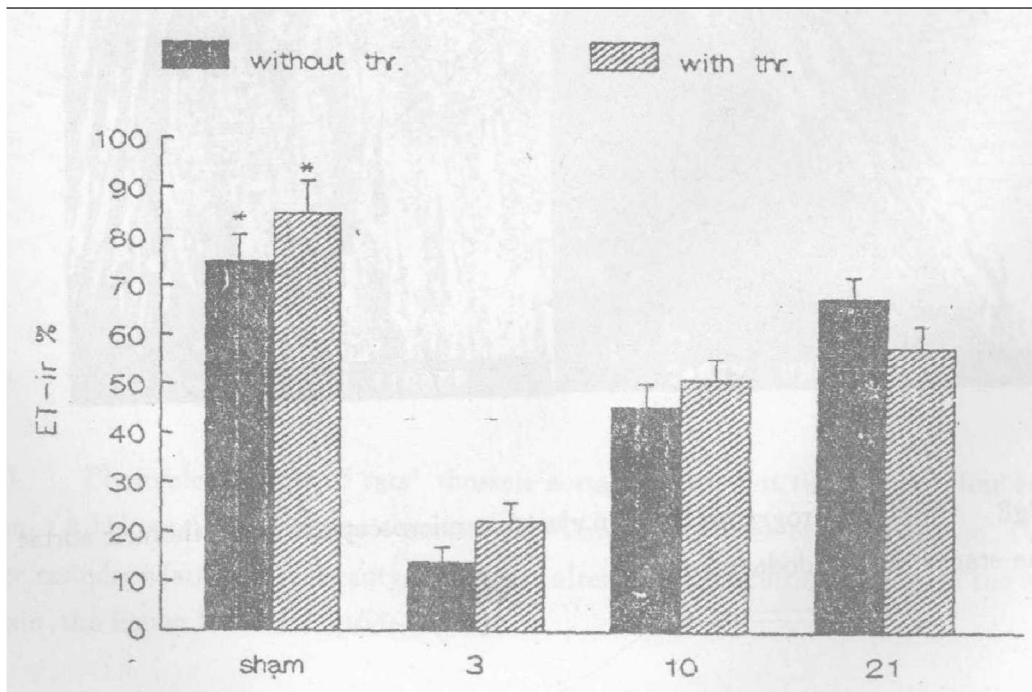
**Fig1** Photomicrographs of rats' thoracic aortae at different time stages after endodenudation. (A) Normal rats' thoracic aortae. (B) Three days after endodenudation. (C) Ten days after endodenudation. (D) Twenty-one days after endodenudation (Refer to the article) H. E. stain, the lumen is on the upside  $\times 360$



**Fig2** Photomicrographs by scan electrom microscopy of rats' thoracic aortae at different time stages after endodenudation .

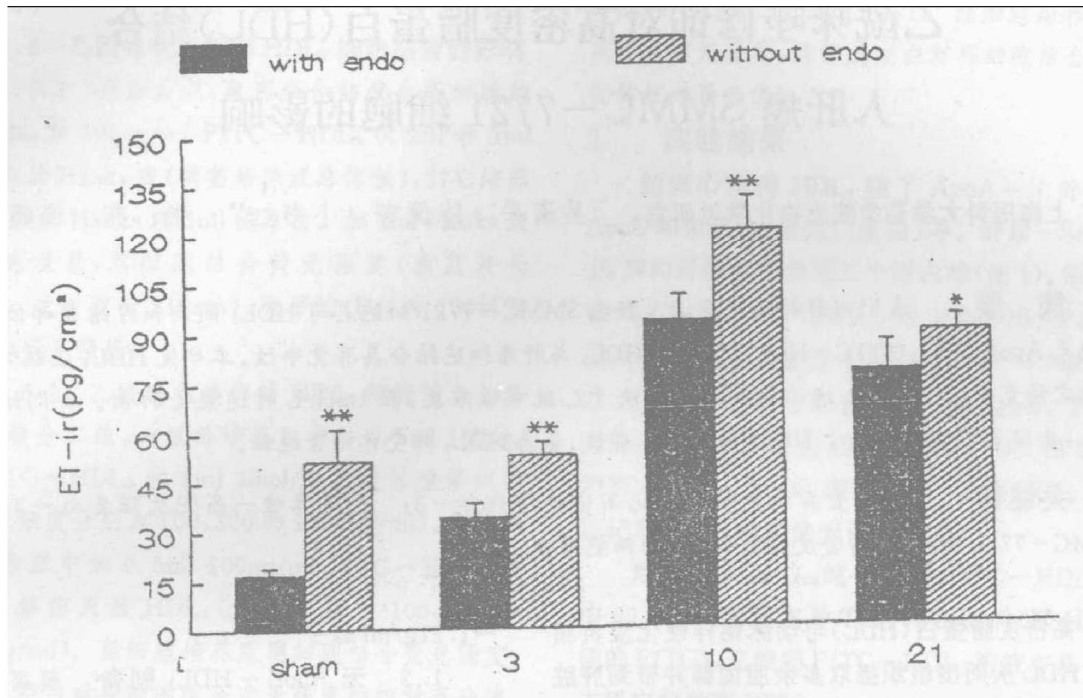


**Fig3** Release of ET-ir at different stages after ballooning of rats' thoracicaortae. (compared with sham \* \* P<0. 01)

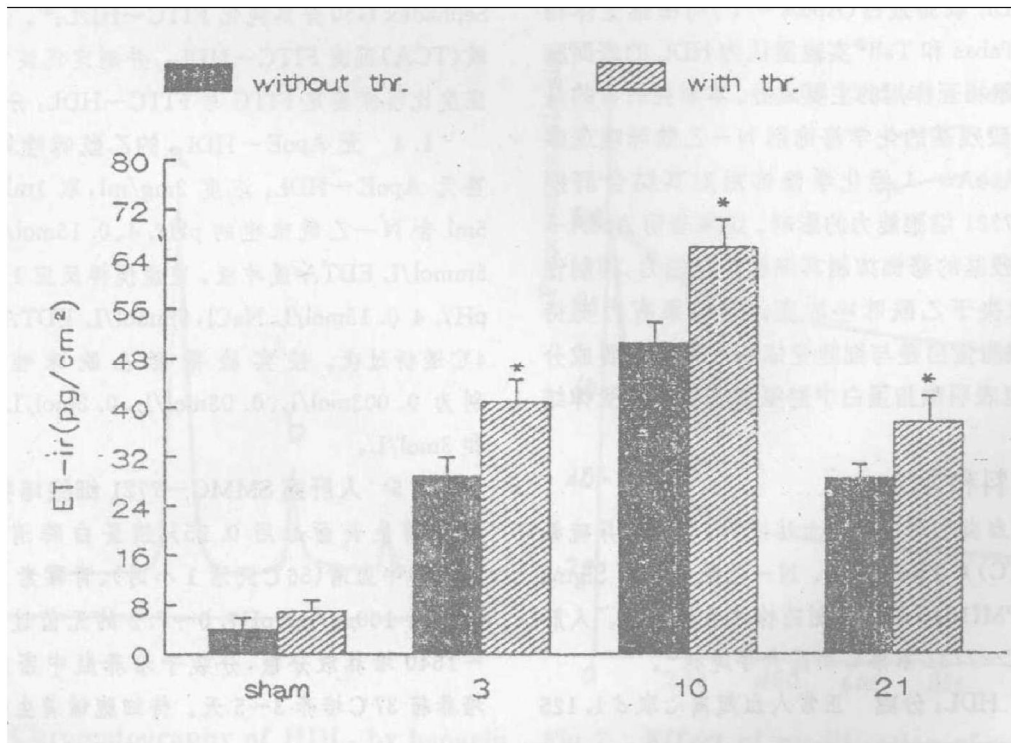


**Fig4** Percentage release of ET-ir produced by endothelium at different stages after ballooning of rats' thoracic aortae (compared with Exper \* P<0. 05)





**Fig5** Release of ET-ir stimulated by thrombin at different stages after endodenudation (compared with without thrombin; \* P<0.05; \* \* P<0.01)



**Fig6** Release of ET-ir without endo, stimulated by thrombin at different stages after endodenudation (compared with "without thrombin"; \* P<0.05; \* \* P<0.01)