

血管损伤致平滑肌细胞增殖的兔耳动脉狭窄模型及应用

苗华全 崔瑞耀 Israel Vlodavsky^① Shmuel Banai^① Louis Pertz^① S David Gertz^①

(青岛大学医学院病理生理学教研室, 青岛 266021)

Application and Model of Arterial Stenosis with Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Injuring Vascula in Rabbit Ear

MIAO Hua-Quan, CUI Rui-Yao, Israel Vlodavsky, Shmuel Banai, Louis Pertz and S David Gertz
(Department of Pathophysiology, Medical College, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China)

ABSTRACT Endothelial injury and thrombosis are essential events initiating restenosis after ballooning angioplasty. An arterial stenosis model was established in New Zealand rabbits by external crushing of the ear central artery. Vascular endothelial growth factor and hirudin were injected subcutaneously in the vicinity of and retrograde, intra-arterially distal to the crushing sites. The cross-sectional percentage of stenosis, calculated by measuring the areas of the patent lumen and neointima on sections with the most prominent smooth muscle cell hyperplasia, was compared between the study group and control group. No significant difference was found ($P > 0.05$). The failure of the treatment was discussed.

KEY WORDS Model, Arterial stenosis; Smooth muscle cell proliferation; Rabbit ear; Vascula injuring

摘要 为研究经皮冠状动脉腔内成形术后血管再狭窄的发生机理,本文选用新西兰家兔耳中央动脉,以物理性创伤诱发出血管壁平滑肌细胞增殖,从而造成实验性动脉管腔狭窄模型。利用该模型观察了血管内皮细胞生长因子和水蛭素联合应用对动脉再狭窄的影

响。结果发现该模型血管狭窄程度、平滑肌细胞增殖、内膜增生及血栓形成等均与在体动脉再狭窄的病理改变一致。内皮细胞生长因子与水蛭素联合运用能防止血栓形成,但对平滑肌细胞增殖无影响。

关键词 动脉狭窄模型;平滑肌细胞增殖;兔耳;血管损伤

经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)可以有效地缓解冠心病患者的心肌缺血状况。但是,经PTCA后有30%~40%的患者出现冠状动脉再狭窄(restenosis)^[1]。现已证实,动脉壁平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖并向内膜迁移是造成再狭窄的主要原因^[1,2]。目前,多数学者认为:血管内皮细胞受损及血栓形成过程中所释放的生长因子是刺激SMC增殖、迁移的关键因素^[1~4]。为应用血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与水蛭素(hirudin)来探讨实验性动脉狭窄的发生机理,我们选用血管损伤致平滑肌细胞增殖的兔耳中央动脉狭窄模型,获得较理想的效果。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备

选取雄性健康的新西兰家兔18只,体重3.5~4.0 kg,实验组8只,对照组10只。按Banai法^[5]以氟胺酮(44 mg·kg⁻¹)肌肉注射麻醉动物,并以利多卡因阻断双侧耳根神经,以止血钳夹住双侧耳中央动脉并持续30 min,创伤范围以聚乙烯板定为10 mm直径。术后,动物均单独喂养。

1.2 实验动物治疗

对实验组动物在钳夹兔耳中央动脉前5 min和术后1天、2天、3天,于距创伤边缘5 mm处皮下注射天然水蛭素(233 ATU),术后第4~14天期间,每天于距

① 以色列国希伯来大学医学院。

创伤处 40 mm 处进行向耳中央动脉内注射水蛭素 (133 ATU); 同时, 在水后 16 h、36 h 及 60 h 向动脉内注射重组 VEGF(由 Dr. G. Neufeld 赠)。对照组以生理盐水代替注入的水蛭素和 VEGF 溶液, 其他处理方式均同实验组。

1.3 标本的处理

创伤后第 14 天处死动物, 取下兔耳以 10% 福尔马林固定 72 h。将损伤处切成宽约 1 mm 长条。常规石蜡包埋, 进行连续切片(5~6 μm 厚), 以 Movat 法^[6]染色。双盲法观察每个损伤处动脉的连续切片, 选出 SMC 增殖最显著的切面进行图像分析。

在 Olympus BH-2 显微镜下观察切片, 将图象投影于 CUE-2 图像分析仪(Galai Production Ltd, 以色列国)。测量指标有: ①外弹力膜所围的腔面积(EEL); ②内弹力膜所围的腔面积(IEL); ③动脉管腔面积, 即内皮细胞所围的腔面积(Lumen)。

计算: ①动脉中膜面积 $M = EEL - IEL$; ②新内膜面积 $N = IEL - Lumen$; ③横切面上动脉管腔狭窄百分数 $= (Lumen / IEL) \times 100\%$ 。所有结果均以平均数 ± 标准差表示, 并在 Macintosh 计算机上用 Statwork 程序进行正态分布检验、Wilcoxon 检验。

2 结果

2.1 手术区肉眼观察

按 Banai 法对兔耳中央施加物理压力, 压力解除后兔耳未见明显变化。

2.2 创伤后耳动脉的组织学变化

未受到压力的动脉内皮细胞与内弹力膜之间的间隙甚窄, 光镜下辨为一体(Figure 1)。

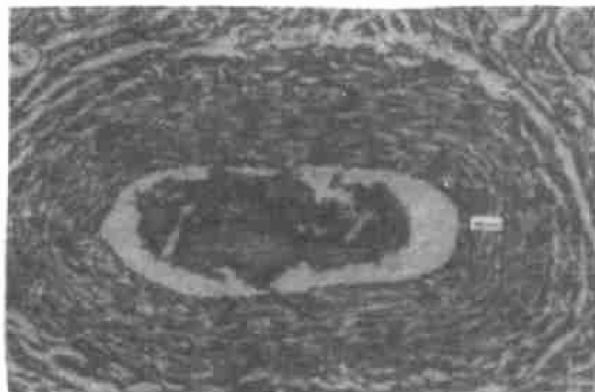


Figure 1. Morphology of the non-injured ear central artery in rabbit. Stained with movat, ×40.

物理压迫(钳夹)兔耳中央动脉后 14 天者, 可见动脉 SMC 增殖显著, 致使内皮细胞与内

弹力膜之间的距离增大而形成新内膜(Figure 2)。

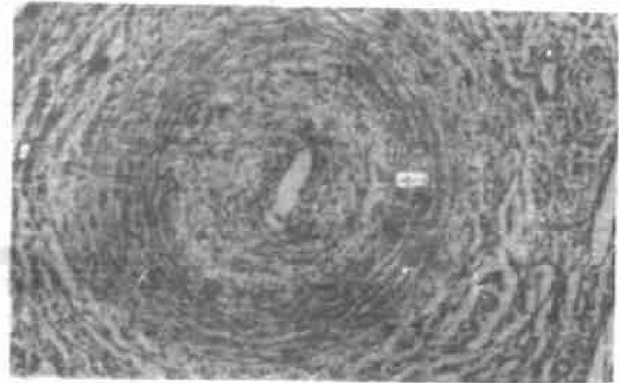


Figure 2. Morphology change of the injured ear central artery in rabbit (first). Stained with movat, ×40.

本模型的新内膜主要由 SMC 组成, 可见到内弹力膜断裂及 SMC 跨越内弹力膜而示迁移现象(Figure 3)。在新内膜中, 偶尔见到“空泡状结构”(Figure 4)。

组织学观察还发现, 在所有两组动物的动脉各层细胞周围可见到均质、蓝染的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成份。蓝染的 ECM 成份在新内膜显著增多(Figure 4)。

对照组中还可可见管腔内有血栓形成。血栓附着于由增殖的平滑肌细胞形成的新内膜上, 并发生极化、再通。

2.3 血管内皮生长因子与水蛭素的联合治疗

实验组与对照组比较, 由 SMC 增殖所形成的新内膜面积、新内膜面积/中膜面积比值均无差异($P > 0.05$, Table); 实验组动物横切面狭窄百分数($55.9 \pm 26\%$)虽高于对照组($43.9 \pm 28\%$), 但无统计学意义($P > 0.05$), 提示 VEGF 和水蛭素不能抑制 SMC 的增殖。

对照组中(20%)可见血栓形成, 但实验组未发现血栓形成。

3 讨论

本工作通过给新西兰家兔耳中央动脉以物理压力造成实验性动脉狭窄, 其病理变化主要有 SMC 增殖、迁移, 形成新内膜。而 PTCA 后动脉再狭窄的主要病理变化也以 SMC 增殖、迁移并形成新内膜为主。因此, 我们所制备的血



Figure 3. Morphology change of the injured ear central artery in rabbit (second). Stained with movat, $\times 100$.

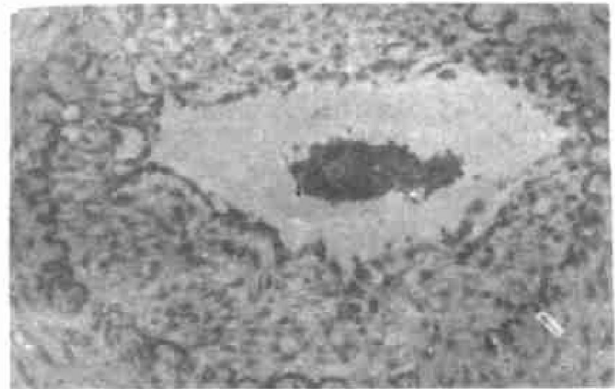


Figure 4. Morphology change of the injured ear central artery in rabbit (third). Stained with movat, $\times 100$.

Table. Efficacy of the combined therapy by vascular endothelial growth factor and hirudin on experimental arterial stenosis.

Group	the cross-sectional percentage of stenosis	lumen areas ($\times 10 \mu\text{m}^2$)	neointima areas ($\times 10 \mu\text{m}^2$)	neointima area/area of medio-membrane
control	43.90 \pm 28.30	57.24 \pm 31.27	51.9 \pm 44.35	0.32 \pm 0.26
experiment	55.94 \pm 26.35*	35.23 \pm 19.37*	50.70 \pm 32.12*	0.32 \pm 0.21*

* $P > 0.05$ compared with control group.

管损伤诱发平滑肌细胞增殖的兔耳模型可以在进行初步的 PTCA 之后动脉再狭窄机理的研究。经皮冠状动脉腔内成形术后动脉再狭窄时 SMC 的增殖、迁移是由多种因素引起的。其中刺激细胞、尤其是来源于中胚层细胞的生长因子起着非常重要的作用^[1-4]。正常状态下,生长因子储存于细胞内或血管基底膜中。在受到物理性创伤时,如血管成形术和施加压力等,生长因子即被释放出来,继而刺激血管内皮细胞的生长并覆盖于创伤面,同时,生长因子还强烈刺激 SMC 增殖、迁移。在这内皮细胞受损所导致的血栓形成病理过程中,所产生的凝血酶(thrombin)也是多种细胞,尤其是 SMC 生长的强烈刺激结果,这些细胞并有趋化作用^[7]。现已知 VEGF 可促血管内皮细胞生长^[4];而水蛭素又是凝血酶的极强拮抗剂^[7]。本工作联合应用生长因子和水蛭素防治实验性动脉狭窄,结果显示:VEGF 水蛭素联合应用于物理性创伤动物,对血管横切面狭窄百分数、管腔面积、新

内膜面积、新内膜/中膜比值均无抑制作用。分析防治无效的原因可能是,①动脉再狭窄是一个复杂的病理过程,单考虑其中一两种因素是难以获得明显效果的,②本工作采用 VEGF 与水蛭素的剂量效应尚待进一步研究,③本工作采用皮下和动脉内注射的给药方式虽有利于靶细胞对药物的吸收,但注射本身造成的创伤也可促使生长因子大量释放,从而引起新内膜的形成,④目前,研究动脉再狭窄的动物模型有多种,除本模型外,尚有大鼠动脉扩张术、大鼠动脉内皮细胞剥脱等,后几种模型虽能较好地模拟 PTCA,但均不如本模型简便、实用^[4]。不论哪种模型目前尚很难根据实验对象确定创伤的力度。所以,施加压力过强、时间过久,以致 SMC 过度增殖也可能是治疗失效的原因之一。

本研究发现,物理性创伤部位与周围区相比,动脉各层均易见蓝染之 ECM。而且新内膜区 ECM 显著增多。Vlodavsky 等^[8]证明,ECM 中储存大量的生长因子,它们多结合成蛋白聚

糖,如硫酸肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)。ECM 虽然由细胞产生,其含量的显著增多不仅象征 SMC 生长活跃,而且也是 SMC 增殖显著并迁移的基础。

作者观察动脉新内膜,偶见“空泡状结构”。进行形态学分析,与微小的毛细血管结构非常相似。纵观文献,动脉再狭窄与血管新生(angiogenesis)的分子生物学基础大致相同。都是由促进血管内皮细胞或/和平滑肌细胞产生的各种生长因子所调节的。因此,再狭窄与血管新生可能是同步发生的。另外,这种血管新生很可能与再狭窄的新内膜甚至动脉粥样硬化斑块内炎性细胞浸润有关,但这需要进一步研究证明。

参考文献

1 Shirohani M, Yui Y, Kawai C. Restenosis after coronary angioplasty; pathogenesis of neointimal thickening initiated

by endothelial loss. *Endothelium*, 1993, 1(1): 5.
2 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362: 801.
3 Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michael R, et al. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor; implication for the control of angiogenesis. *J Cell Biochem*, 1991, 45(1): 167
4 Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biochem*, 1992, 267(16): 10 931.
5 Banai S, Shou M, Correa R, et al. Rabbit ear model of injury-induced arterial smooth muscle cell proliferation; Kinetics, reproducibility, and implications. *Circ Res*, 1991, 69(3): 748.
6 Movat H. Demonstration of all connective tissue elements in a single section. *Arch Path Lab Med*, 1955, 60(2): 289.
7 Bar-shavit R, Benezra M, Sabbah V, et al. Thrombin as a multifunctional protein; induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 6(1): 123.

(本文 1994-09-13 收到,1994-11-28 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅲ)

限制片段长度多态性	restriction fragment length polymorphism, RFLP
胆固醇酯转运蛋白	cholesterol ester transfer protein, CETP
家族性高胆固醇血症	familial hypercholesterolemia, FHC
家族性载脂蛋白 B ₁₀₀ 缺陷症	familial defective apolipoprotein B ₁₀₀ , FDAB
视网膜动脉硬化	retinal arteriosclerosis, RAS
脑动脉硬化	encephalic arteriosclerosis, EAS
脂蛋白加工蛋白	lipoprotein-processing protein, LPP
脂蛋白运输蛋白	lipoprotein transport protein, LTP
脂蛋白运输基因	lipoprotein transport gene, LTG
蛋白聚糖	proteoglycan, PG
硫酸肝素	heparan sulfate, HS
硫酸软骨素	chondroitin sulfate, CS
硫酸软骨素 B(硫酸皮肤素)	dermatan sulfate, DS
富血小板血浆	platelet rich plasma, PRP
糖基化胰岛素	glycosylated insulin, GI
嗜苏丹病变	sudanophilic lesion, SL
增殖细胞核抗原	proliferative cell nuclear antigen, PCNA

(胡必利编写)