

## 氟伐他汀对兔髂动脉内皮剥脱后增生内膜的影响及其作用机制的探讨

李东宝<sup>1</sup>, 沈潞华<sup>2</sup>, 谢苗荣<sup>2</sup>, 陈 晖<sup>2</sup>

(1. 山东省滨州地区中心医院心内科, 山东省滨州市 251700; 2. 北京友谊医院心内科, 北京市 100050)

[主题词] 氟伐他汀; 肌, 平滑, 血管; 细胞凋亡

[摘要] 为探讨氟伐他汀对内膜增厚的影响及其与细胞增殖、细胞凋亡的关系, 将雄性新西兰白兔 56 只随机分为用药组和非用药组, 用高胆固醇饮食和球囊导管剥脱内皮造成动脉粥样样内皮损伤, 分别在剥脱后 1、2、4 和 8 w 处死动物并取髂动脉, 用常规 HE 染色、免疫组织化学染色、原位细胞凋亡检测和计算机图像分析方法, 观察氟伐他汀对动脉新生内膜厚度和内膜/中膜厚度比、平滑肌细胞增殖和细胞凋亡的影响。结果发现, 用药组的新生内膜厚度和内膜/中膜厚度比明显薄于非用药组 ( $P < 0.01$ ), PCNA 阳性细胞率及 Actin 含量均明显少于非用药组 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率随用药时间延长而逐渐增高, 且各时间点均高于非用药组 ( $P < 0.05$ )。以上提示, 氟伐他汀能有效抑制血管内膜过度增生, 可能与其抑制平滑肌细胞增殖并可促进细胞凋亡有关。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

### Serial Experimental Research of Fluvastatin on Cell Proliferation and Apoptosis in Rabbit Iliac Artery after Endothelial Denudation

LI Dong- Bao<sup>1</sup>, SHEN Lu- Hua<sup>2</sup>, XIE Miao- Rong<sup>2</sup>, and CHEN Hui<sup>2</sup>

(1. Binzhou Center Hospital, Binzhou 251700; 2. Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100050, China)

MeSH Fluvastatin; Muscle, Smooth, Vascular; Apoptosis

**ABSTRACT** **Aim** The aims was to investigate the effects of Fluvastatin on intimal thickening and the relationship between vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation, apoptosis and intimal thickening. **Methods** 56 Rabbits were randomized into two groups: treatment group, non- treatment group. The atherosclerotic lesions were established with high cholesterol diets and iliac artery endothelial denudation. The animals were killed and iliac arteries were removed at 1, 2, 4, 8 w respectively.

With HE staining, immunohistochemical staining and in situ cell death detection, we observed the effects of fluvastatin on the thickness of intima and intima/media, and the proliferation of VSMCs and cell apoptosis in neointima and media. **Results**

The thickness of neointima and I/M were thinner in treatment group than in non- treatment group. Percentages of PCNA- positive cells and the content of actin in the intima of treatment group was lower than that of non- treatment group. Percentages of apoptosis in treatment group increased with the time and was higher than that of non- treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclur-**

**sion** Fluvastatin inhibit excessive thickening of vascular intima effectively, which may partly be related to its inhibiting the proliferation of VSMCs and promoting the apoptosis of cells.

经皮穿刺冠状动脉腔内成形术后的再狭窄与动脉粥样硬化过程都具有平滑肌细胞增殖为主的内膜增厚, 平滑肌细胞过度增殖和凋亡不足已成为动脉粥样硬化和再狭窄发生发展过程中最明显的特征, 因此抑制细胞增殖和促进细胞凋亡被认为是防

止动脉粥样硬化和再狭窄的有效途径。人们发现他汀类药物不仅可明显降低胆固醇, 而且可直接抑制平滑肌细胞增殖和促进细胞凋亡。氟伐他汀是人工合成的 3- 羟基- 3- 甲基- 戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 本文对其抑制血管平滑肌细胞增殖和促进细胞凋亡的作用进行了研究。

[作者简介] 李东宝, 男, 汉, 1970 年出生, 山东省惠民县人, 主治医师, 医学硕士, 现从事心血管内科专业, 研究动脉粥样硬化的病因及其发病机制, 偏重于血脂代谢异常的研究。沈潞华, 女, 上海人, 教授, 博士研究生导师。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物模型和标本制备

2.0~2.5 kg 雄性新西兰白兔 56 只, 随机均分为用药组( 髂动脉内皮剥脱+ 高脂饲料+ 氟伐他汀) 和非用药组( 髂动脉内皮剥脱+ 高脂饲料)。高脂饲料由 1.5 g 胆固醇+ 7 g 鸡蛋黄组成, 氟伐他汀( 诺华公司提供) 用量为 10 mg/(kg·d) ( 为人体每公斤体重用量的 20 倍), 动脉内皮剥脱术前一周开始喂养至实验结束。用球囊导管剥脱兔髂动脉内皮, 术后第 1、2、4 和 8 周末各处处死 7 只兔子, 快速取损伤侧髂动脉制作电镜标本并用 10% 中性福尔马林液固定, 常规制成蜡块。

## 1.2 免疫组织化学染色

单克隆 PCNA 一抗(PC- 10 zymid 公司产品) 和 Actin 一抗(HHF- 35 zymid 公司产品) 稀释度分别为 1: 100 和 1: 60。PCNA 和 Actin 的阳性对照标本取人乳腺癌病理切片, 阴性对照用蒸馏水取代一抗。

## 1.3 原位凋亡细胞检测

按原位细胞凋亡检测试剂盒( Boehringer Mannheim 公司产品) 说明操作, 阴性对照不用 TUNEL 反应液, 阳性对照为人乳腺癌组织切片。

## 1.4 血管内膜和中膜厚度的计算方法

将氟伐他汀用药组、非用药组各时间点的动脉切片共 56 张输入 MPIAS- 500 多媒体彩色病理图像分析系统( 同济医科大学清平影像工程公司生产), 测量内膜、中膜厚度。所取线段以与内外弹力板垂直为准, 且取内膜的最大厚度, 每张切片取 6 个视野测定, 取平均值。

## 1.5 免疫组织化学染色定量方法

用 MPIAS- 500 多媒体彩色病理图像分析系统( 同济医科大学清平影像工程公司生产) 测定 Actin

单位平均光密度, 取平均值。各组各时间点取 7 张切片, 每张切片随机选 6 个视野, 分别计数每个视野中血管内膜细胞数和 PCNA 及 TUNEL 阳性细胞数, 求百分数, 取平均值。

## 1.6 统计学方法

用 SPSS 统计软件, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组之间差异用双侧  $t$  检验, 多组间差异比较用  $F$  检验, 两两比较  $q$  检验。

# 2 结果

## 2.1 氟伐他汀对兔髂动脉内膜、中膜厚度的影响

非用药组兔髂动脉内膜厚度及 I/M 随术后时间延长而逐渐增大, 且在各时间点均大于用药组 ( $P < 0.05$ )。非用药组 I/M 是用药组的 1~3 倍( 表 1, Table 1)。

## 2.2 氟伐他汀对平滑肌细胞增殖的影响

内膜 PCNA 细胞阳染率在非用药组明显多于用药组 ( $P < 0.05$ )。用药组和非用药组内膜细胞的阳染率在术后 2 周达最高峰, 术后 8 周时明显降低。

Actin 免疫组织化学染色结果显示, 非用药组的阳染细胞在内膜中膜处排列紊乱, 强度及密度明显高于用药组 ( $P < 0.05$ ); 用药组和非用药组阳染细胞含量在术后 4 周时达最高( 表 1, Table 1)。

## 2.3 氟伐他汀对细胞凋亡的影响

用药组凋亡细胞率随用药时间延长而逐渐增加, 而非用药组细胞凋亡率在术后 4 周达高峰, 术后 8 周时明显减少, 但仍高于术后 1 周。用药组细胞凋亡率明显高于非用药组( 表 1, Table 1)。

表 1. 用药组、非用药组内膜厚度、PCNA 阳性细胞百分比、Actin 含量单位平均光密度和细胞凋亡百分比的比较

Table 1. The comparison of thickness of intima, percentages of PCNA- positive cells, the contents of Actin, percentages of apoptosis in the treatment group and non- treatment group ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Time (w)	Thickness of intima (mm)	I/M	Percentages of PCNA- positive cell	Contents of Actin	Percentages of apoptosis
treatment	1	48.32 ± 10.63 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.09 <sup>a</sup>	32.73 ± 5.44 <sup>b</sup>	4.14 ± 0.52 <sup>a</sup>	41.55 ± 6.6 <sup>b</sup>
	2	165.52 ± 8.55 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.06 <sup>a</sup>	37.5 ± 5.95 <sup>b</sup>	4.96 ± 0.34 <sup>a</sup>	47.14 ± 5.22 <sup>b</sup>
	3	229.66 ± 50.7 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.13 <sup>a</sup>	30.17 ± 5.16 <sup>b</sup>	5.53 ± 0.82 <sup>a</sup>	51.47 ± 4.78 <sup>b</sup>
	4	186.3 ± 13.44 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.12 <sup>a</sup>	25.84 ± 3.68 <sup>b</sup>	4.17 ± 0.34 <sup>a</sup>	54.10 ± 4.32 <sup>b</sup>
non-treatment	1	151.63 ± 18.57	1.05 ± 0.09	39.15 ± 4.17	5.42 ± 0.36	34.57 ± 3.84
	2	234.1 ± 8.78	1.24 ± 0.04	44.99 ± 3.4	6.65 ± 0.57	41.04 ± 3.96
	3	345.63 ± 34.0	1.75 ± 0.14	36.60 ± 4.16	7.50 ± 0.58	45.34 ± 4.4
	4	7477.50 ± 91.67	2.83 ± 0.83	31.21 ± 3.49	6.07 ± 0.69	40.970 ± 7.8

a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ , compared with non- treatment group.

## 2.4 电镜观察凋亡细胞的特征

电镜下可找到早期的凋亡平滑肌细胞,但未见凋亡小体。早期凋亡的平滑肌细胞表现为皱缩,胞浆浓缩,肌丝密集,电子密度增高;胞核固缩,体积缩小;异染色质浓聚呈块状并聚集在核膜周边,电子密度增高明显,细胞器完整。

## 2.5 作用时间对细胞凋亡和增殖的影响

非用药组细胞凋亡率在 4 周达最高,但与 2 周

时相比无统计学差异,而 PCNA 阳性细胞率在 2 周达最大,以后逐减少;凋亡/增殖比(T/P)由 1 周时的 0.88 到 8 周时的 1.3。用药组内膜细胞凋亡率随用药时间的增加而增加,到 8 周时达最高;而 PCNA 阳性细胞率在 2 周时达高峰,以后逐渐减少,凋亡/增殖比(T/P)由 1 周时的 1.2 到 8 周时的 2.1(表 2, Table 2)。

表 2. 氟伐他汀作用不同时间对动脉壁内膜细胞凋亡率和增殖率的影响

Table 2. The comparison of percentages of cell apoptosis and proliferation of arterial neointima in different time( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Time(w)	Apoptosis(A, %)	PCNA positive cell(P, %)	A/P
treatment	1	41.55 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>	32.73 $\pm$ 5.44	1.27
	2	47.14 $\pm$ 5.22	37.5 $\pm$ 5.95 <sup>a</sup>	1.26
	4	51.47 $\pm$ 4.78	30.17 $\pm$ 5.16	1.68
	8	54.10 $\pm$ 4.32	25.84 $\pm$ 3.68	2.10
non-treatment	1	34.57 $\pm$ 3.84	39.15 $\pm$ 4.71	0.88
	2	41.04 $\pm$ 3.96	44.99 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	0.91
	3	45.34 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	36.60 $\pm$ 4.16	1.24
	4	40.97 $\pm$ 7.86	31.21 $\pm$ 3.49	1.31

a:  $P < 0.05$ , compared with the other three groups, b:  $P < 0.05$ , compared with 1 w group.

## 3 讨论

大量的临床研究证明<sup>[1]</sup>:他汀类药物可有效降低胆固醇及升高高密度脂蛋白,同时其具有重要的非降脂作用如改善内皮功能,延缓经皮腔内冠状动脉成形术后的再狭窄等。动脉壁损伤后,其组织病理学最显著特征是血管平滑肌细胞大量的迁移和增殖,新生内膜形成并且明显增厚,动脉管腔逐渐变窄。本实验结果显示氟伐他汀可明显抑制内膜增厚,从而减少管腔狭窄。研究资料显示<sup>[2]</sup>,大多数平滑肌细胞在球囊损伤后 2~3 天进入生长周期,由收缩型转变为合成型。细胞大量增殖在 1 周内完成。内膜中血管平滑肌细胞总数在损伤后 2 周达顶峰,而内膜增厚在 8 周达高峰。这是因为损伤后前 2 周的增厚是由于平滑肌细胞进入内膜并增殖,以后进一步增厚则是由于细胞体积增大、细胞外基质和结缔组织合成和聚集的结果。

本实验中,非用药组髂动脉切片 Actin 免疫组织化学染色均表明增生内膜存在大量血管平滑肌细胞分布,内膜损伤后 1 周,血管平滑肌细胞开始增殖,4 周时增殖最明显,以后增殖减少,但 8 周时仍高于 1 周。电镜观察和 HE 染色均证明存在血管平滑肌细胞的迁移和形态转化。而氟伐他汀用药组的动脉切

片 Actin 免疫组织化学染色发现内膜中血管平滑肌细胞含量及合成分泌型明显少于非用药组。提示氟伐他汀能抑制血管平滑肌细胞增殖且该作用可能是部分通过阻遏血管平滑肌细胞迁移与表型改变而实现的。

本实验 PCNA 免疫组织化学染色发现,非用药组在术后 2 周内内膜中的血管平滑肌细胞处于最旺盛的增殖阶段,以后的增殖在较高的水平持续一段时间后下降,术后 8 周时明显减少,可能由于胞外基质和结缔组织的大量分泌以及脂质沉积,血管平滑肌细胞吞噬大量脂质后变成泡沫细胞或凋亡,而使血管平滑肌细胞增殖能力降低,其表现为 PCNA 阳染细胞率减少。

近年来的实验研究指出<sup>[3]</sup>,细胞凋亡可能是动脉粥样硬化病变中细胞死亡的重要方式,是调节内皮损伤后所致内膜增厚演变过程中的一个重要机制。平滑肌细胞凋亡失调和凋亡小体清除不足可能是加剧动脉粥样硬化发展的重要因素。在动脉粥样硬化早期,由于一些生长因子的调节,病变部位较少见到凋亡细胞<sup>[4]</sup>,到晚期时,大量脂质和胞外基质在斑块内堆积,把斑块内细胞间隔开,生长因子的作用不能很好的发挥,细胞便不断地发生凋亡<sup>[5]</sup>。本研究说明在动脉粥样硬化形成过程中,随着高脂血症

时间的延长,细胞凋亡也会增加,在内皮损伤后 2~4 周达最高峰,随后以较高的凋亡率维持一段时间。而以往资料报道<sup>[6,7]</sup>,单纯内皮损伤而无高脂饮食的兔和鼠模型中,增生内膜中细胞凋亡率均在术后 1 周或 2 周达峰值,以后逐渐降至正常水平。故考虑可能是粥样斑块形成后脂质的沉积阻断了生长因子的作用或高血脂的持续刺激,使细胞凋亡处于较高的水平。实验证实<sup>[8]</sup>他汀类降脂药可引起平滑肌细胞凋亡。本研究发现氟伐他汀可明显促进血管平滑肌细胞的凋亡,且随作用时间延长,其促凋亡作用也越强。

实验资料表明<sup>[9]</sup>,动脉粥样硬化斑块的发生发展取决于细胞凋亡和细胞增殖的相对平衡。细胞凋亡和细胞增殖在动脉粥样硬化发生发展中的平衡程度随病变进展有所变化<sup>[10]</sup>。本研究发现内皮损伤后至 2 周左右细胞增殖明显增加,可能超过细胞凋亡,使细胞数目增加,内膜中膜增厚,管腔狭窄。术后 2 周后,细胞凋亡增多,而细胞增殖明显减少,理论上应出现内膜变薄,但是由于大量凋亡细胞被巨噬细胞吞噬后清除不足以及大量平滑肌细胞和巨噬细胞来源的泡沫细胞在病变局部聚集,同时有大量弹力纤维和胶原纤维的支撑,因此在病变的后期内膜反而增厚。在用药组中,凋亡率/增殖率比由 1 周时的 1.2 到 8 周时的 2.1,且不同时间点用药组凋亡/增殖比明显高于非用药组,也提示氟伐他汀是通过抑细胞增殖和促细胞凋亡的双重机制而抑制动脉粥样硬化的发生发展的。

## 参考文献

- [1] 贺爱珍,胡迎富,丁须,等. 氟伐他汀钠降脂疗效观察[J]. 临床心血管病杂志, 2001, 17(1): 37
- [2] Takagi M, Ueda M, Kasayuki N, et al. Pathological findings after intraarterial stenting in WHHL rabbits and normal rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 1994, 109: 6
- [3] Bochaton P, Gabboani F, Redard M, et al. Apoptosis participates in cellularly regulation during rat aortic intimal thickening [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1 059- 064
- [4] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1995, 92: 1 355- 374
- [5] Wei JC, Bruno D, Wolfgang S, et al. The role of Fas/Apo1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions [J]. *Atherosclerosis*, 1997, 131: 177- 186
- [6] 郭远林,任江华,宋长杰,等. 家兔颈总动脉内膜剥脱术后细胞凋亡与增殖的动态研究[J]. 中国介入心脏病学杂志, 1998, 6(3): 143- 145
- [7] Malok N, Francis SE, Hott CM, et al. Apoptosis and proliferation after porcine coronary angioplasty [J]. *Circulation*, 1998, 98: 1 657- 665
- [8] Baetta R, Donetti E, Compato C. Proapoptotic effect of atrovastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells [J]. *Pharmacological Research*, 1997, 36(2): 115- 121
- [9] 邹飞雁,杨和平,涂玉林. 动脉粥样硬化时平滑肌细胞凋亡的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(1): 75- 79
- [10] Alvarez RJ, Gips SJ, Moldovan N, et al. 17- Estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237: 372- 381

(此文 2000- 09- 20 收到, 2001- 04- 17 修回)

(此文编辑 朱雯霞)

## 重要更正

我刊 2001 年第 1 期第 74 页“细胞外质的蛋白多糖与腹主动脉瘤”一文中的左栏倒数第 5 行“特殊基质”后,应加上“中,并能产生一种膨胀力,通过压力弹性来抵销胶原的弹性回缩力及血压的切力,从而维持血管于一定的充盈状态。④亮氨酸富集的小蛋白多糖,包括 decorin、biglycan、lumican,主要存在于细胞间,他们沿胶原原纤维排列,调节它们的排列与直径。其中 biglycan 亦能粘合  $\beta$  转化生长因子并控制其生物活性,也能抑制血管壁中胶原比重最大的 iv 型胶原原纤维形成,从而控制基质沉积和组织。④作为基底膜组份的蛋白多糖,主要为 perlecan,嵌插于基底膜,可引起阴离子通透障碍,同时也能粘合生长因子并调节其活性。细胞膜/生物膜表面的蛋白多糖,包括 syndecan- 1、fibroglycan、N- syndecan,可能为 ECM 及某些生长因子受体,并能粘合凝血酶、细胞因子及脂蛋白等。”一段。此事因交接时疏忽产生,特向作者及读者致歉。

编辑部