

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-01-0016-03

全反式维甲酸对大鼠腹主动脉球囊损伤后 新生内膜形成和内皮再生的影响

党书毅¹, 王家宁², 王卫民², 黄永章², 张群林¹

(郧阳医学院 1. 附属太和医院心内科, 2. 分子生物学研究所, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 维甲酸; 血管内膜; 内皮, 血管; 大鼠

[摘要] 为研究全反式维甲酸对球囊损伤的大鼠腹主动脉内皮再生和新生内膜形成的影响, 制作球囊损伤的大鼠腹主动脉剥脱模型, 将 12 只血管损伤的 Wistar 大鼠随机分为两组, 对照组 ($n=6$) 腹腔内注射脂肪乳剂 (1 mL/d), 全反式维甲酸组 ($n=6$) 腹腔内注射溶解于脂肪乳剂的全反式维甲酸 [$4 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$], 球囊损伤 14 天后, 采用原位灌注固定取材, 染色, 进行组织学观察和形态学分析。结果显示, 全反式维甲酸组球囊损伤血管段的内皮再生面积大于对照组, 而新生内膜形成面积小于对照组。结果提示, 全反式维甲酸具有促进损伤血管内皮再生和抑制新生内膜形成的作用。

[中图分类号] R364.33

[文献标识码] A

Effect of All-Trans Retinoic Acid on Reendothelialization and Neointima Formation in Rat's Abdominal Artery with Balloon Withdrawal Injury

DANG Shu-Yi, WANG Jia-Ning, WANG Wei-Ming, HUANG Yong-Zhang, and ZHANG Qun-Lin

(Department of Cardiology, Taihe Hospital, Yunyang Medical College; 2. Institute of Molecular Biology, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

[MeSH] Tretinoin; Tunica Intima; Endothelium, Vascular; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on reendothelialization and neointima formation in the rat's abdominal artery after balloon withdrawal injury. **Methods** The rat denuded abdominal artery model with balloon withdrawal injury was performed. Twelve wistar rats were randomly assigned to control group (intraperitoneal injection of 1 mL/d intralipid) and ATRA group [intraperitoneal injection of $4 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ATRA] dissolved in intralipid. After fourteen days balloon withdrawal injury in the situ perfusion fixation was performed with 10% formalin and the specimens were obtained. Histologic observations and morphometric analysis were made. **Results** Reendothelialization area of arterial balloon injury increased in ATRA group compared with that in control group, while Neointima area is smaller in ATRA group than in control group.

Conclusion ATRA has accelerated reendothelialization and inhibited neointima formation of injured vessels.

血管内膜增生在经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后再狭窄的形成中起着重要作用。球囊损伤动脉后导致血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖、迁移, 促进细胞外基质堆积, 最终引起新生内膜形成^[1]。大量研究表明, 内皮细胞可以调节 VSMC 的生长, 抑制新生内膜的形成^[2~3]。全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 是维生素 A 类衍生物, 它可以抑制 VSMC 增殖^[4], 促进内皮细胞增殖^[5]。近

年研究认为, ATRA 可以减少新生内膜斑块形成, 促进损伤动脉产生有益的血管重塑^[6]。本实验观察了 ATRA 对动脉损伤后新生内膜形成和内皮再生的影响, 对 ATRA 在防治 PTCA 术后再狭窄发生过程中可能具有的重要作用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 动物

350~400 g 雄性 Wistar 大鼠由郧阳医学院动物中心提供。

1.2 药品和器械

ATRA 购自 Sigma 公司, 脂肪乳剂 (intralipid) 购自本院药剂科, 2F 球囊导管购自美国 Baxter Healthcare Corporation, 全自动摄像系统 (日本 PM-10AD Olympus), 计算机图像分析系统 (德国 Lecia-Q500IW), 试

[收稿日期] 2001-06-13 [修回日期] 2001-09-25

[基金项目] 湖北省科委基金 (991B28) 资助。

[作者简介] 党书毅, 男, 1968 年出生, 湖北省郧县人, 内科学心血管专业, 主治医师, 在读硕士研究生, 现从事心脏介入治疗及再狭窄防治研究。王家宁, 男, 1967 年出生, 湖北省房县人, 副教授, 博士研究生, 主要从事冠心病再狭窄的防治研究。王卫民, 女, 1968 年出生, 湖北省宜昌市人, 主治医师, 医学学士, 主要从事分子生物学实验研究工作。

剂为国产分析纯。

1.3 全反式维甲酸的配制

二甲基亚砜(DMSO)溶解 ATRA, 配制为 75 g/L。使用时用 70% 脂肪乳剂、25% 生理盐水及 5% 乙醇溶液, 配制为 1.6 g/L。每天腹腔注射 1 mL, 则每只动物的每天 ATRA 用量约为 4 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 。

1.4 大鼠腹主动脉球囊损伤模型的制作

Wistar 大鼠用戊巴比妥钠(30 $\mu\text{g}/\text{g}$)腹腔注射麻醉,待肌肉完全松弛后,固定于操作台上,取颈部正中切口,钝性分离左颈总动脉,近端系一活结,远端用眼科剪剪一小口,用探针指引 2F 球囊导管沿左颈总动脉送至腹主动脉远端,腹腔注射肝素 0.1 u/g,注入 0.3 mL 空气充盈球囊,回拉球囊至颈总动脉活结处,回抽球囊内空气,再送至腹主动脉远端,如此反复抽拉 5 次,剥脱损伤腹主动脉内皮^[7]。

1.5 实验分组

将 12 只腹主动脉损伤的 Wistar 大鼠随机分为两组: 对照组($n=6$)单纯腹腔注射脂肪乳剂(1 mL/d); ④ATRA 组($n=6$)腹腔注射脂肪乳剂和 ATRA[4 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$], 每天一次, 14 天后在大鼠处死前 30 min 由尾静脉注入 0.5% 伊文思蓝 0.5 mL, 然后进行原位灌注固定,横膈下 1 cm 内为取材血管。

1.6 新生内膜形成和内皮再生的观察

进行固定的损伤血管段,经石蜡包埋、切片,苏木素—伊红染色,光镜下观察新生内膜形成情况并照相。将取材后的损伤血管段纵向剖开固定于玻片上,剥脱面积为获得的动脉片段的总表面积,内皮再生面积为肉眼观察到的没有被伊文思蓝染色的面积。照相后肉眼对比观察。

1.7 内膜增生和内皮再生的形态学测定

经苏木素—伊红染色的石蜡切片、伊文思蓝染色的损伤血管段,分别由计算机图像分析仪测定新生内膜面积、中膜面积,损伤血管段总面积及内皮再生面积,计算新生内膜面积与中膜面积之比、总面积与内皮再生面积之比。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 t 检验。

2 结果

2.1 全反式维甲酸对新生内膜形成的影响

形态学观察显示,ATRA 组新生内膜较对照组相比明显减少,对照组血管内膜厚度明显增加(图 1, Figure 1)。计算机图像分析仪测定结果显示,ATRA 组新生内膜面积、新生内膜面积与中膜面积之比与

对照组相比显著减少,而两组中膜面积相比无显著性差异(表 1, Table 1)。

表 1. 全反式维甲酸对球囊损伤后新生内膜形成的影响。

Table 1. Effect of ATRA on neointimal formation after balloon injury ($\bar{x} \pm s$, $n=6$).

Index	ATRA group	Control group
Intimal area (mm^2)	0.0494 $\pm$ 0.01 ^b	0.1176 $\pm$ 0.02
Medial area (mm^2)	0.2766 $\pm$ 0.02	0.2639 $\pm$ 0.05
The area ratio of intimal to medial (%)	0.2800 $\pm$ 0.05 ^a	0.5400 $\pm$ 0.10

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.001$, compared with control group.

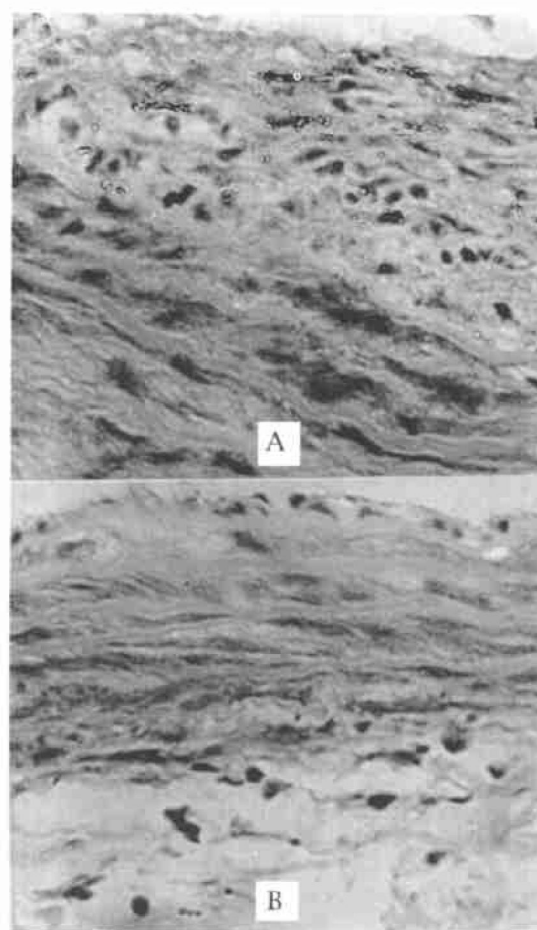


图 1. 全反式维甲酸对球囊损伤后新生内膜形成的影响。

Figure 1. Effect of all-trans retinoic acid on neointima formation after balloon injured ($\times 400$). A: Control group; B: ATRA group.

2.2 全反式维甲酸对血管损伤后内皮再生的影响

肉眼观察显示,ATRA 组损伤血管段的伊文思蓝染色区域明显小于对照组(图 2, Figure 2)。计算机图像分析仪测定结果显示,ATRA 组与对照组损伤血管段的总面积相比无显著性差异,但 ATRA 组内皮再生

面积、内皮再生面积与总面积之比均明显大于对照组。

表 2. 全反式维甲酸对球囊损伤后内皮再生的影响。

Table 2. Effect of ATRA on endothelial regeneration after balloon injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Index	ATRA group	Control group
Total area (mm^2)	246.0 $\pm$ 6.9	254.0 $\pm$ 4.2
Regenerated area (mm^2)	192.6 $\pm$ 7.8 ^a	171.4 $\pm$ 5.6
The area ratio of regenerated to total (%)	78.8 $\pm$ 2.4 ^a	66.0 $\pm$ 3.2

a: $P < 0.05$, compared with Control group.

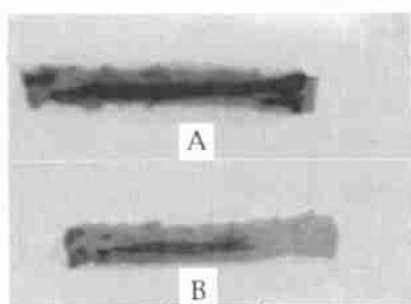


图 2. 全反式维甲酸对球囊损伤血管后内皮再生的影响。

Figure 2. Effect of all-trans retinoic acid on endothelial regeneration in the balloon injured vessel.

3 讨论

本研究发现, ATRA 可以促进损伤后的血管内皮再生, 同时减少新生内膜的形成, 提示 ATRA 对球囊损伤后的血管正常内皮功能的重新建立和抑制新生内膜的形成具有有益的作用。

血管内皮是介于循环血液与血管平滑肌之间的生理屏障, 是许多心血管激素酶激活及失活的部位。同时, 内皮细胞可以释放大血管活性物质(如一氧化氮、前列环素)等来调节血管的收缩和舒张。PTCA 术后血管内皮受损, 随即发生的内皮功能失调, 可引起血管内皮依赖性舒张受限, 血小板聚集性增强, 平滑肌细胞增殖等, 最终导致损伤血管的阻塞, 因此内皮再生的程度, 内皮功能是否能重新建立直接影响着 PTCA 术后再狭窄的发生。目前, 不少研究证实 ATRA 在诱导血管内皮功能和生成活性中的作用^[8]。对内皮细胞增殖和迁移性的影响, 既有认为 ATRA 是激动剂^[5], 也有认为是抑制剂^[9]。本研究结果显示, ATRA 具有促进球囊损伤的大鼠腹主动脉内皮再生的作用, 对 ATRA 促进内皮再生的机制还不是很清楚, 目前推测是 ATRA 和一些生长因子如血管内生长

因子和碱性纤维母细胞生长因子之间相互作用后, 内皮细胞再生才可能被促进。

血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖和迁移在 PTCA 术后再狭窄的发生和发展中起着关键性作用。很多研究都集中在抑制 VSMC 增殖, 但是临床试验研究几乎没有取得令人鼓舞的成功。近来, 研究认为 ATRA 能够影响在体 VSMC 的增殖、迁移和分化, 减少由于血管损伤后导致的新生内膜的形成。本研究结果证实了 ATRA 具有抑制新生内膜形成的作用, 对于 ATRA 减少新生内膜形成的机制推测有以下几种可能: ATRA 抑制 VSMC 的有丝分裂^[7]; ④ ATRA 抑制了与 VSMC 迁移有关的 AP-1 依赖性旁路^[10]; ⑤ ATRA 还可能调节几种凋亡基因, 包括 Bcl-2, 导致 VSMC 凋亡的发生^[11]。

全反式维甲酸(ATRA)促进大鼠腹主动脉损伤后内皮再生和抑制新生内膜形成的作用使我们对 PTCA 术后再狭窄的药物防治性治疗看到了希望, 但在临床使用上的有效性尚须进一步探索。

[致谢] 感谢邵阳医学院组织胚胎学教研室郭青萍老师在病理切片制作上所给予的帮助。

[参考文献]

- [1] Robert S, Schwartz MD. Pathophysiology of Restenosis: Interaction of thrombosis hyperplasia and/or remodeling. *Am J Cardiol*, 1998, **81**(7A): 14E-17E
- [2] Asahara J, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*, 1995, **91**: 2793-801
- [3] Maurice T, Bauters C, Auffray JL, et al. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*, 1996, **93**: 18-22
- [4] Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, et al. Retinoid receptor expression and all-trans-retinoic acid mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 1996, **93**: 1886-895
- [5] Braunhut SJ, Palomares M. Modulation of endothelial cell shape and growth by retinoids. *Arterioscler Res*, 1991, **41**: 47-62
- [6] Miano JM, Kelly LA, Artacho CA, et al. All-trans retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric remodeling of the rat carotid artery after balloon withdrawal injury. *Circulation*, 1998, **98**: 1219-227
- [7] Lee CW, Park SJ, Park SW, et al. All-trans retinoic acid attenuates formation with acceleration of reendothelialization in balloon-injured rat aorta. *Korean Med Sci*, 2000, **15**: 31-36
- [8] Ishii H, Horie S, Kizaki K, et al. Retinoic acid counteracts both the downregulation of thrombomodulin and the induction of tissue factor in cultured human endothelial cells exposed to tumor necrosis factor. *Blood*, 1992, **80**: 2556-562
- [9] Oikawa T, Hirohata K, Nakamura O, et al. A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Lett*, 1989, **48**: 157-162
- [10] James TW, Wagner R, White LA, et al. Induction of collagenase and stromelysin gene expression by mechanical injury in a vascular smooth muscle-derived cell line. *Cell Physiol*, 1993, **157**: 426-437
- [11] Nagy L, Thomazy VA, Chandraratna R, et al. Retinoid-regulated expression of bcl-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human and apoptosis of human myeloid leukemia(HL-60) cells. *Leuk Res*, 1996, **20**: 499-505

(此文编辑 文玉珊)