

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-04-0288-03

## 损伤动脉外膜重塑和成纤维细胞表型的变化

聂如琼, 王景峰, 伍卫, 薛迎生, 张旭明

(中山大学附属第二医院心内科, 广东省广州市 510120)

[主题词] 外膜; 血管重塑; 再狭窄; 成纤维细胞

[摘要] 观察兔腹主动脉损伤后血管外膜及外膜细胞增殖和表型特征的变化, 采用病理形态学、计算机图像分析、免疫组织化学和透射电镜方法观察兔腹主动脉损伤后血管外膜和外膜细胞的变化。结果发现, 球囊损伤后 3 天、7 天、14 天和 28 天血管外膜厚度均显著增加。外膜细胞密度在损伤后 3 天开始增加, 7 天显著增加。外膜细胞增殖指数在损伤后 3 天达到高峰, 7 天仍显著增高。外膜细胞的  $\alpha$ actin 染色反应在损伤后 3 天由阴性转为弱阳性, 7 天和 14 天呈强阳性。损伤后 7 天和 14 天外膜细胞大量微丝和粗面内质网明显扩张, 呈现出肌成纤维细胞的特征。结果提示, 动脉损伤后早期血管外膜显著增厚, 外膜细胞增殖活跃, 成纤维细胞逐渐转化为肌成纤维细胞, 伴有收缩蛋白合成增加, 这些变化在病理性血管重塑中发挥重要作用。

[中图分类号] R331.32

[文献标识码] A

### Adventitial Remodeling and Fibroblast Phenotype Modulation after Arterial Injury

NIE Ru-Qiong, WANG Jing-Feng, WU Wei, XUE Ying-Sheng, and ZHANG Xu-Ming

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510120, China)

[MeSH] Adventitia; Remodeling; Restenosis; Fibroblasts

[ABSTRACT] **Aim** To assess the response of adventitia and adventitial cells after arterial injury. **Methods** Newzealand rabbits underwent balloon injury to the abdominal artery by over-sized angioplasty balloon. Adventitial changes were characterized by histochemistry, morphometry, immunohistochemistry and transmission electron microscope. **Results** Adventitial thickness significantly increased at all time points comparing with normal vessels. Cell density reached the maximum level at 7 d, whereas at 14 d, the cell density reverted toward the baseline. Meanwhile, the cell proliferation index rapidly increased at 3 d and 7 d respectively, and it reduced to normal level at 14 d. At 7 and 14 days after injury, The adventitia exhibited weakly positive staining for actin at 3 days, and strongly positive at 7 and 14 days. Adventitial cells displayed numerous actin microfilaments and marked dilated rough endoplasmic reticulum at 7 and 14 days after injury. **Conclusions** This study demonstrated the involvement of the adventitia in vascular repair process. The hypercellularity of the adventitial layer, proliferation fibroblast, and modulation of their phenotype to myofibroblast are associated with the thickness of adventitia.

冠状动脉介入治疗是通过机械作用使狭窄的动脉管腔扩张, 以减轻心肌缺血。同时, 球囊扩张也造成动脉壁损伤, 引起再狭窄, 严重影响远期疗效。近年来, 实验和临床研究认为血管重塑与再狭窄的关系密切, 但机理尚不明确。有研究提出血管外膜收缩可能参与病理性血管重塑<sup>[1]</sup>。本文拟观察兔腹主动脉损伤后外膜及外膜细胞增殖和表型特征的变化, 以阐明血管外膜在血管修复过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型

[收稿日期] 2002-01-30 [修回日期] 2002-06-19

[基金项目] 广东省自然科学基金团队项目(2000年)资助。

[作者简介] 聂如琼, 男, 1968年10月出生, 湖南衡阳人, 讲师, 医学博士, 研究方向为冠心病介入治疗。王景峰, 男, 1963年3月出生, 安徽界首人, 教授, 副院长, 医学博士, 研究方向为冠心病介入治疗和人工心脏起搏。伍卫, 女, 1957年10月出生, 广东台山人, 医学博士, 教授, 内科主任, 研究方向为心律失常与人工心脏起搏。

健康纯种成年新西兰兔 35 只, 体重 2.5~3.0 kg, 由中山大学动物实验中心提供。25 mg/kg 氯氨酮和 12.5 mg/kg 氯丙嗪肌肉注射麻醉。切开右股动脉, 行腹主动脉球囊损伤, 插入深度为 15 cm, 球囊直径 3.5 mm, 6~8 个大气压充盈球囊, 反复 3 次, 每次 60 s, 间隔 1 min, 术后即刻通过耳缘静脉注射肝素钠 500 IU, 术后 2 天肌肉注射庆大霉素  $4 \times 10^4$  u 预防感染, 并每天服阿司匹林 100 mg。分别于手术前及术后 3 天、7 天、14 天和 28 天处死动物。

### 1.2 标本制备和病理染色

取材时用球囊标记腹主动脉损伤部位, 细心分离血管, 靶血管用 PBS 液冲洗后, 10% 甲醛固定, 切为 2~3 mm 的血管段, 固定 5 h 后, 石蜡包埋。标本连续切片, 切片厚度 5  $\mu$ m, 脱蜡后分别进行 HE 染色、弹力纤维染色和免疫组织化学染色。

### 1.3 图像分析

血管外膜以外弹力板的中膜面为内界, 血管外

脂肪层为外界。采用计算机图像分析系统(Kiltron IBAS)进行血管图像分析,分别测定内膜厚度、中膜厚度和外膜厚度,分别测量3次,取其平均值。血管外膜细胞密度用每平方米细胞数表示。

#### 1.4 免疫组织化学染色

使用 Ultrasensitive™ S-P 免疫组织化学试剂盒(Maxim 公司)。组织切片脱蜡后与 0.6% 过氧化氢孵育 30 min, PBS 液洗浴, 室温下与单克隆抗体孵育 1 h。使用以下单抗: 鼠 PC10 单抗(Maxim 公司)标记增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 观察细胞增殖水平; 鼠 IA4 单抗(Maxim 公司)用于识别  $\alpha$ -actin; 鼠 DE-R-11 单抗(Maxim 公司)用于识别 desmin; 鼠 D33 单抗(Maxim 公司)用于识别 vimentin。PBS 洗浴后, 室温下与生物素标记的二抗孵育 1 h, DAB 染色, 苏木精复染。阴性对照为免疫血清。采用计算机图像分析系统计数血管外膜细胞总数和 PCNA 染色阳性细胞数, 细胞增殖指数用 PCNA 染色阳性细胞百分比表示。

#### 1.5 透射电镜检测

部分血管标本采用 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗 3 次, 梯度酒精脱水后, 环氧树脂渗透包埋, 60℃ 高温聚合 2~3 天, 用 LEICA 超薄切片片机切片, 厚度 500 埃。醋酸铀、枸橼酸铅双重染色, 透射电镜(H-600, Toshiba)观察和记录血管外膜成纤维细胞的结构变化。

#### 1.6 统计学分析

计量资料用均数 ± 标准差表示, 运用单因素 ANOVA 分析,  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 血管外膜厚度变化

与非损伤组比较, 损伤后 3 天、7 天、14 天和 28 天血管外膜厚度均显著增加, 其中以 7 天最为明显(表 1, Table 1)。

表 1. 兔腹主动脉损伤后血管各层厚度变化。

Table 1. The changes of vessel thickness after abdominal artery injury in rabbits ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ ,  $\mu\text{m}$ ).

Groups	Adventitia	Media	Intima
Control	210 ± 32	233 ± 24	10 ± 7
Injured 3 d	652 ± 44 <sup>b</sup>	210 ± 28	80 ± 10 <sup>a</sup>
Injured 7 d	688 ± 32 <sup>b</sup>	241 ± 26	245 ± 30 <sup>b</sup>
Injured 14 d	667 ± 28 <sup>b</sup>	226 ± 27	492 ± 45 <sup>b</sup>
Injured 28 d	587 ± 33 <sup>a</sup>	223 ± 36	920 ± 57 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.2 血管外膜细胞增殖情况

与非损伤组比较, 血管外膜细胞密度在损伤后 3 天开始增加, 7 天显著增加, 14 天和 28 天无显著差异。PCNA 染色显示, 血管外膜细胞增殖指数在损伤后 3 天达到高峰, 7 天仍显著增高。损伤后 14 天和 28 天时增殖指数与非损伤组无显著差异(表 2, Table 2)。

表 2. 兔腹主动脉损伤后外膜细胞增殖情况。

Table 2. The changes of the cell proliferation in adventitia after abdominal artery injury in rabbits ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ ).

Groups	Cell density ( $\times 10^6$ cell/m <sup>2</sup> )	Proliferation index (%)
Control	2.89 ± 0.29	2.8 ± 0.7
Injured 3 d	6.76 ± 0.48 <sup>a</sup>	44.2 ± 5.6 <sup>a</sup>
Injured 7 d	7.22 ± 0.26 <sup>a</sup>	34.8 ± 7.4 <sup>a</sup>
Injured 14 d	3.56 ± 0.34	5.6 ± 1.2
Injured 28 d	2.87 ± 0.27	3.2 ± 0.9

a:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.3 血管外膜细胞表型的变化

非损伤组兔腹主动脉外膜细胞仅表现为 vimentin 染色阳性, 而中膜细胞对 3 种单抗均呈阳性反应。动脉损伤后外膜细胞  $\alpha$ -actin 染色反应在损伤后 3 天呈弱阳性, 7 天和 14 天呈强阳性改变(图 1, Figure 1), desmin 和 vimentin 染色未出现明显变化。

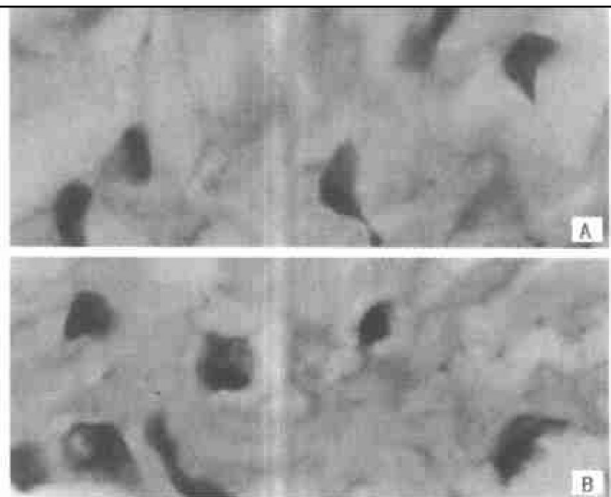


图 1. 兔腹主动脉损伤后外膜细胞  $\alpha$ -actin 染色变化。

Figure 1. The changes of  $\alpha$ -actin staining in adventitia after abdominal artery injury in rabbits (LM  $\times 1000$ ). A: Injured 7 d; B: Injured 14 d.

### 2.4 血管外膜细胞超微结构的变化

非损伤组兔腹主动脉外膜细胞多表现出典型成纤维细胞的特征: 扩张的粗面内质网和缺乏微丝成

分。而在损伤后 7 天和 14 天外膜细胞出现大量的微丝和粗面内质网明显扩张, 呈现出肌成纤维细胞的特征(图 2, Figure 2)。

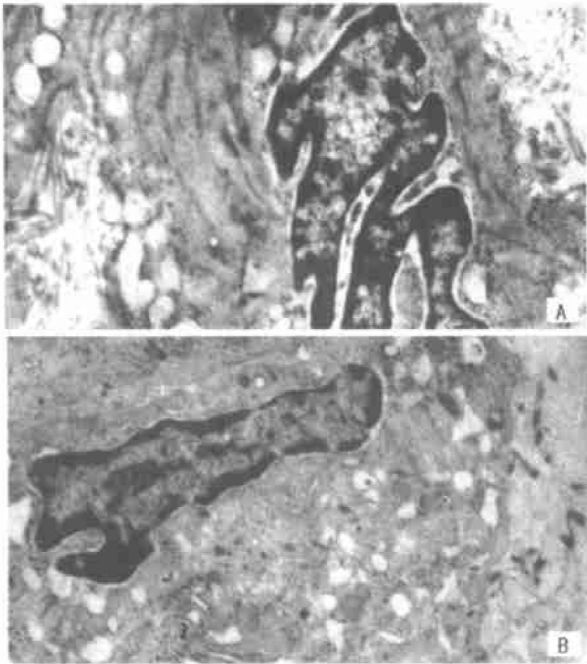


图 2. 兔腹主动脉损伤后外膜细胞超微结构变化。

**Figure 2. The ultrastructural changes of adventitia cells after abdominal artery injury in rabbits (TEM × 6000).** A: Injured 7 d; B: Injured 14 d.

### 3 讨论

动脉损伤后反应与组织创伤修复过程有许多相似之处, 两者均有组织连续性的破坏, 从而诱导一系列的病理生理变化, 使一些细胞改变表型和功能状态, 以适应微环境的变化, 参与组织修复<sup>[2]</sup>。有关研究认为动脉损伤后早期的增殖细胞主要为中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)<sup>[3]</sup>, 但是, 本研究结果显示血管外膜比中膜更早出现变化。血管外膜细胞增殖在损伤后第 3 天达到高峰, 而此时中膜 SMC 增殖尚不活跃。免疫组织化学显示, 非损伤段腹主动脉外膜细胞  $\alpha$  actin 和 desmin 染色阴性, 而 vimentin 染色<sup>[4]</sup> 阳性。 $\alpha$  actin 和 desmin 为 SMC 的特征性标记物, 两者均为阴性, 意味着外膜细胞为非 SMC, 同时透射电镜的观察显示外膜细胞具有典型的成纤维细胞特征。因此, 结合免疫组织化学和超微结构特征, 我们认为非损伤组兔腹主动脉外膜细胞成分主要为成纤维细胞。

本研究结果显示, 动脉损伤后外膜细胞 vimentin 染色持续阳性, desmin 染色持续阴性, 而 desmin 是高分化 SMC 的标记物, vimentin 是成纤维细胞的特征标记物, 意味着动脉损伤后外膜细胞仍保持了成纤

维细胞的表型特点, 而非典型的 SMC, 此点得到了透射电镜的证实。但是, 动脉损伤后血管外膜细胞  $\alpha$  actin 染色发生了变化, 第 3 天为弱阳性, 第 7 天和第 14 天为强阳性。透射电镜也观察到动脉损伤后外膜细胞的超微结构变化, 损伤后 7~14 天外膜细胞呈现出肌成纤维细胞的特征。综合上述观察结果, 动脉损伤后外膜成纤维细胞显示了向肌成纤维细胞转化的特征。肌成纤维细胞是一类在多种因素作用下, 诱导  $\alpha$  actin 表达的特殊成纤维细胞, 具有成纤维细胞的超微结构特征, 如明显扩张的粗面内质网, 同时在细胞周边出现大量的微肌丝。本研究观察到动脉损伤后外膜细胞表型改变特点与肿瘤形成和坏死心肌修复等过程中出现的肌成纤维细胞基本一致<sup>[5,6]</sup>。血管内超声研究发现外膜收缩是晚期血管直径丧失的主要原因, 在实验性血管成形术后 4 天即出现显著的外膜增厚, 在 7~28 日间形成病理性血管重塑<sup>[7,8]</sup>。在成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的过程中, 常伴有多种生理功能如胶原合成增加和组织退缩等与疤痕形成有关的变化。根据现有资料, 我们可以推测, 在血管损伤后, 外膜结构和成分发生了序列变化, 早期出现细胞增殖, 细胞转型为肌成纤维细胞, 收缩蛋白的合成增加, 后期外膜胶原重塑, 形成胶原丰富的疤痕组织。而外膜增厚和疤痕收缩构成病理性血管重塑的基础。

### [参考文献]

- [1] van Lankeren W, Gussenhoven EJ, Honkoop J, et al. Plaque area increase and vascular remodeling contribute to lumen area change after percutaneous transluminal angioplasty of the femoropopliteal artery: an intravascular ultrasound study. *J Vasc Surg*, 1999, **29**: 430-441
- [2] Badid C, Mounier N, Costa AM, et al. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring. *Histol Histopathol*, 2000, **15**: 269-80
- [3] Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Cir Res*, 1985, **56**: 139-145
- [4] Franke WW, Schmid E, Osborn M, et al. Different intermediate sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Sci USA*, 1978, **75**: 5 034-038
- [5] Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Kotliansky VE, et al. The origin of myofibroblasts in breast cancer, recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 859-873
- [6] Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML, et al. Myofibroblasts in reper-fused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain. *Cardiovasc Res*, 2000, **48**: 89-100
- [7] De Smet B, De Kleijij D, Hanemaaijer R, et al. Metalloproteinase inhibition reduces constrictive arterial remodeling after balloon angioplasty: a study in the atherosclerotic Yucatan micropig. *Circulation*, 2000, **101**: 2 962-967
- [8] Maeng M, Olesen PG, Emmertsen NC, et al. Time course of vascular remodeling, formation of neointima and formation of neoadventitia after angioplasty in a porcine model. *Coron Artery Dis*, 2001, **12**: 285-293

(此文编辑 文玉珊)