

Fas 配体基因对大鼠颈动脉球囊损伤后血管重塑的影响

陶红¹, 陈立东¹, 黄从新², 张群林¹

(1. 鄖阳医学院附属太和医院心内科, 湖北省十堰市 44200; 2. 武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 病理学; Fas 配体基因对血管重塑的影响; Verhoeff 氏铁苏木清染色法; 球囊损伤; 腔面积; 外弹力膜面积; 内膜面积

[摘要] 研究 Fas 配体基因对大鼠颈动脉球囊损伤后血管重塑的影响, 制作大鼠颈动脉球囊损伤模型, 将 12 只颈动脉球囊损伤的 SD 大鼠随机分为两组: 对照组 ($n=6$) 颈动脉内转染 Ad β gal; Fas 配体组 ($n=6$) 颈动脉内转染 AdFas 配体。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。结果发现, Fas 配体明显增加损伤血管的腔面积和外弹力膜面积, 减少损伤血管的内膜面积, 而且内膜面积/外弹力膜面积之比也明显减少。结果提示, Fas 配体具有有益的血管重塑作用。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

经腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 和经皮血管介入治疗是目前治疗冠心病安全、有效的方法, 它可降低冠心病心脏事件的发生率和死亡率, 但术后 3~6 个月内再狭窄率高达 30%~50%^[1, 2], 严重地影响了其远期疗效。研究表明, PTCA 术后血管内皮损伤诱导的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 大量增殖^[3], 引起血管重塑是 PTCA 术后再狭窄发生的主要机制^[4, 5]。因此, 抑制 VSMC 增殖, 促进血管有益的重塑是预防 PTCA 术后再狭窄的主要环节。Fas 配体 (Fas ligand, Fas L) 是促凋亡基因, 能够促使 VSMC 凋亡, 抑制细胞增殖^[6], 本研究在大鼠颈动脉球囊损伤模型上, 观察 Fas L 对动脉血管损伤后血管重塑的影响, 以探讨 Fas L 在预防 PTCA 术后再狭窄发生过程中可能具有的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

pHCMVSP1A (为 E1 区序列缺陷的人血清 5 型腺病毒基因组, 相对分子质量为 6 797 bp) 和 pJM17 (为人血清 5 型腺病毒基因组全长序列, 相对分子质量为 40.3 kb) 由中国军事医学科学院吴祖泽院士惠赠, pcDNA3-1Fas L 由美国 Walsh 教授惠赠, AdVE1C-MVFas L (AdFas L) 和 AdVE1CMV β gal (Ad β gal) 重组

腺病毒上清由鄖阳医学院附属太和医院生命研究所惠赠。293 细胞由中国军事医学科学院吴祖泽教授惠赠, X-gal 购自 Sigma 公司, 抗 Fas L 单抗购自北京中山公司, SD 雄性大鼠由华中科技大学同济医学院提供, 2.0 F Fogarty 球囊导管购自 Baxter 公司。

1.2 模型制作

雄性 SD 大鼠, 体重 450 ± 50 g, 腹腔注射戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉, 取颈部正中切口, 从颈外静脉注射肝素 100 u/kg, 在左颈总动脉近心端用无创性血管夹暂时阻断血流, 从颈外动脉处行动脉切开术, 将 2.0 F Fogarty 导管从切口插入至颈总动脉约 1.5 cm, 以 0.1 mL 空气充盈球囊, 来回抽动 3 次以剥脱内膜^[6]。

1.3 实验分组

将 12 只颈动脉球囊损伤的 SD 大鼠随机分为两组: 对照组 ($n=6$): 颈动脉内转染浓度为 1×10^{15} pfu/L 的 Ad β gal 病毒上清; ④Fas L 组 ($n=6$): 颈动脉内转染浓度为 1×10^{15} pfu/L 的 AdFas L 病毒上清, 局部注射至损伤的血管节段内, 使病毒上清在局部作用 20 min, 结扎颈外动脉, 去除血管夹, 恢复血流, 缝合颈部伤口。14 天后处死大鼠, 采用原位灌注固定取材。

1.4 形态学测定

损伤血管节段的石蜡切片经 Verhoeff 氏铁苏木清染色法 (又称弹力纤维染色) 染色, 分别由计算机图像分析仪测定内膜面积 (intimal area, IA)、腔面积 (lumen area, LA)、内弹力膜 (internal elastic lamina, IEL) 面积、外弹力膜 (external elastic lamina, EEL) 面积, 计算内膜面积和外弹力膜面积之比。

1.5 统计学分析

[收稿日期] 2002-07-23

[修回日期] 2003-04-21

[作者简介] 陶红, 女, 1967 年出生, 湖北省襄樊市人, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生, 从事冠心病的基础研究及临床治疗。陈立东, 男, 1969 年出生, 湖北省房县人, 主治医师, 在读硕士研究生, 主要从事心血管疾病急症的临床研究。黄从新, 男, 1951 年出生, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的介入治疗及再狭窄的防治研究。

以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 t 检验进行统计学分析。

2 结果

Fas L 组腔面积、外弹力膜面积均明显大于对照组, 内膜面积、内膜面积与外弹力膜面积之比明显小于对照组, 而 Fas L 组内弹力膜面积与对照组相比无明显差异(表 1, Table 1)。

表 1. Fas 配体对球囊损伤后血管重塑的影响

指 标	Fas 配体组	对照组
内膜面积 (mm^2)	0.032 ± 0.005^b	0.100 ± 0.015
腔面积 (mm^2)	0.842 ± 0.070^a	0.662 ± 0.042
内弹力膜面积 (mm^2)	0.724 ± 0.075	0.624 ± 0.052
外弹力膜面积 (mm^2)	1.021 ± 0.065^a	0.882 ± 0.072
IA/EEL 面积比	0.032 ± 0.003^a	0.127 ± 0.021

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.001$, 与对照组比较。

3 讨论

血管损伤反应是参与动脉粥样硬化和血管再狭窄形成的共同机制, 在动物血管再狭窄模型中, 经历了 4 个相互交错的阶段^[7], 即炎症细胞浸润、血栓形成、血管平滑肌细胞增殖, 最后是基质形成。VSMC 增殖是其主要的病理变化^[8]。

近年来通过计量组织学和血管内超声法测量内弹力膜所包围的面积的改变发现, PTCA 术后血管重塑在再狭窄的发生中可能具有重要作用。目前认为再狭窄不仅是一个对球囊损伤所致内膜增生的过程, 而且也是一个对球囊损伤和内膜增生再塑形的过程。血管塑形的结果包括整个血管横截面积增加所致的代偿性血管增粗和整个血管面积减少所致的慢性回缩^[9]。目前对血管重塑在再狭窄发生中的作用尚无定论, 但是倾向于认为 PTCA 术后是否再狭窄取决于内膜增生和血管重塑的平衡状态所决定的, 而不仅仅是内膜增生所引起的。血管损伤后发生一系列复杂的生物学反应过程相互作用, 发生了不利于血管结构的重塑, 而引起动脉血管不同程度的狭窄^[10]。PTCA 后损伤区域整个血管面积的改变将对再狭窄的形成有促进作用, 即可发生不利的或消极的血管重塑, 其主要表现为损伤血管的腔面积和外弹力膜面积的减低。

Fas L 基因转染可用重组腺病毒染法, 这种方法是目前心血管系统基因治疗应用最多的转基因技术, 转染用 E1 缺陷型腺病毒作为载体, 腺病毒基因

组为线性, 双链 DNA, 长约 36 kbp, 基因产物的整合区为 E1-E4 和 L1-L5, 主要优点有: 携带的 DNA 片段大, 可达 3 kbp; ④滴度高; ④可转染增殖细胞, 也可转染非增殖细胞; 转染效率较高($> 90\%$), 且相对稳定; 腺病毒 DNA 在核内, 不与宿主 DNA 整合, 不引起宿主 DNA 突变, 用腺病毒作为载体后转染率明显上升。对于创伤后的内皮细胞和平滑肌细胞病毒的转染效率更高, 这是由于创伤后的平滑肌细胞核活跃和 DNA 复制出现了平滑肌细胞的分裂增殖。目的基因在体表达时间较短, 通常为 7~14 天, 28 天后消失, 可能是宿主细胞溶解的结果。总之, 用腺病毒介导 Fas L 基因转染是一种更为理想的转基因方法, 是近年来载体发展的总趋势。

本研究结果发现, Fas L 明显增加损伤血管的腔面积和外弹力膜面积, 减少损伤血管的内膜面积, 而且内膜面积/外弹力膜面积之比也明显减少^[11], 提示 Fas L 促进有益的血管重塑, 推测是通过对 VSMC 的活性迁移、增殖的调节。Fas L 可促 VSMC 凋亡^[6], 抑制其迁移、增殖, 从而引起有益的血管重塑。Fas L 对血管有益的作用为防治 PTCA 术后再狭窄的基因治疗提供了新的途径, 但对人类 PTCA 术的再狭窄尚需深化研究, 本研究所提示的基因遏止实验动物 PTCA 术血管再狭窄的结果为血管再狭窄的基因治疗提供了有益的实验依据。

[参考文献]

- [1] Fischman D, Leon M, Bain D, et al. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary disease. *N Engl J Med*, 1994, **331**: 496-501
- [2] 韦立新. 经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的病理学机制. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 1-3
- [3] 李玉光, 盛小光, 宋卉, 等. 糖尿病兔动脉损伤后内膜增生的机制. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 226-228
- [4] Robert S, Schwartz MD. Pathophysiology of restenosis: Interaction of thrombosis hyperplasia and/or remodeling. *Am J Cardiol*, 1998, **81** (TA): 14E-17E
- [5] O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, et al. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy. *Circ Res*, 1993, **73**: 223
- [6] Sata M, Perlman H, Murure DA, et al. Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointimal formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 1213-1217
- [7] Editorial. Possible uses of gene therapy in reduce coronary restenosis. *Heart*, 1997, **78**: 426-428
- [8] Faxon DP, Sanborn TA, Haudenschild CC. Mechanism of angioplasty and its relation to restenosis. *Am J Cardiol*, 1987, **60**: 58-98
- [9] Glagov S. Intimal hyperplasia, vascular remodeling, and the restenosis problem. *Circulation*, 1994, **89**: 2888
- [10] Wiegman PJ, Barry, Mepheron JA, et al. All trans retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit: a favorable effect on vessel remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 89-95
- [11] Zempo N, Kenagy RD, Bendeck M, et al. Matrix metalloproteinases of vascular wall cell are increased in balloon injured rat carotid artery. *J Vasc Surg*, 1994, **20**: 209-214

(此文编辑 文玉珊)