

^{32}P 对兔自体移植静脉内膜增生和狭窄的预防作用

朱海龙, 张卫达, 杨景学, 崔勤, 陈文生

(中国人民解放军第四军医大学西京医院心血管外科中心, 陕西省西安市 710032)

[关键词] 放射医学; ^{32}P 照射对自体移植静脉内膜增生和狭窄的预防; 免疫组织化学染色; 内皮, 血管; 肌, 平滑, 血管; 增殖细胞核抗原; 兔[摘要] 为观察不同剂量 ^{32}P 照射对兔自体移植静脉内膜增生和狭窄的预防作用,用苏木精-伊红染色、增殖细胞核抗原免疫组织化学染色、计算机图像分析和透射电镜等观察自体移植静脉在 ^{32}P (每平方米 2、4、8、16 μCi)照射下内膜面积、平滑肌细胞增殖和管腔相对丧失率。结果发现,16 μCi 照射组无明显新生内膜形成,但细胞大量坏死,血管壁结构破坏严重;8 μCi 照射组少量新生内膜形成,血管壁结构完整,内膜面积、平滑肌细胞增殖指数和管腔相对丧失率明显低于对照组;4 μCi 照射组和 2 μCi 照射组上述指标与对照组无明显差别。结果提示低剂量 ^{32}P 照射可有效抑制自体移植静脉内膜增生和狭窄,本模型的适宜剂量为 8 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ 。

[中图分类号] R817

[文献标识码] A

^{32}P Preventing Intimal Hyperplasia and Stenosis of Autologous Vein Grafts in Rabbit Model

ZHU Hai-Long, ZHANG Wei-Da, YANG Jing-Xue, Cui Qin, and Chen Wen-Sheng

(Center of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xian, Shaanxi 710032, China)

[KEY WORDS] Intimal Membrane, Vascular; Muscle, Smooth, Vascular; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Rabbit; Nuclear Radiology; Stenosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the inhibitory effect of different doses ^{32}P radiation on the neointimal hyperplasia and stenosis of autologous vein graft. **Methods** Thirty rabbits underwent ^{32}P radiotherapy with different doses of 2, 4, 8, 16 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$.

HE staining, proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical method and computer imaging analysis technique were performed. The neointimal area, the smooth muscle cell (SMC) proliferation index and vessel cavities lost rate were analyzed.

Results No neointima was observed in 16 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ group, but necrosis of most vessel wall cells occurred and the vessels were injured seriously. Thin neointima was formed in 8 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ group. The neointimal area, SMC proliferation index and cavities lost rate were less than in the control group. There was no significant difference in the parameters between the 2 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ group, 4 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ group and control group. **Conclusion** Low-dose ^{32}P radiation could effectively inhibit the neointimal hyperplasia and restenosis of autologous vein grafts, and the suitable dose was 8 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ in this model.

血管旁路术是冠状动脉再血管化的主要方法之一,大隐静脉是主要血管桥来源之一,但移植后易发生狭窄,严重影响了其远期疗效。发生狭窄的主要原因是平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖引起的内膜过度增厚,目前尚未发现理想的预防措施。低剂量放射性同位素照射在预防经皮动脉或冠状动脉成形术后内膜增生和再狭窄方面取得了可喜效果^[1],但在自体移植静脉的作用研究尚少,比如对剂量选择、照射方式和副作用等都了解不多。

1 材料和方法

[收稿日期] 2002-08-04

[修回日期] 2002-12-15

[作者简介] 朱海龙,男,1966年出生,博士,主治医师,讲师,研究方向为冠状动脉血管桥狭窄的预防;E-mail: zhlzlb@yahoo.com.cn。张卫达,男,1958年出生,硕士,主任医师,副教授,研究方向为冠心病的外科治疗。杨景学,男,1939年出生,主任医师,教授,博士研究生导师。

1.1 模型制作

新西兰白兔 30 只,体重 2.2~2.5 kg,雌雄不拘,3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉(35 mg/kg)。颈正中切口约 2.5 cm,分离左侧颈外静脉,取静脉桥长度约 3.0 cm,用生理盐水(含肝素 5 ku/L,罂粟碱 0.6 g/L)冲洗管腔,并置于同样液体中常温保存。分离左侧颈总动脉,按文献[2]方法将倒转的颈外静脉与颈动脉吻合。将 ^{32}P 胶体均匀浸于无菌明胶薄膜上,包绕在血管桥外。缝合伤口,送动物实验中心饲养。

1.2 分组

动物随机分为对照组和每平方米 2、4、8、16 μCi ^{32}P 照射组,共 5 组,每组 6 只。对照组移植静脉以浸有生理盐水的明胶薄膜包绕。麻醉状态下分别于术后 4 周取血管桥。

1.3 标本处理和染色

一部分静脉按电镜标本要求固定、脱水、包埋、超薄切片,进行透射电镜观察;另一部分以4%多聚甲醛加压冲洗,使其直径维持在取标本前水平。然后常规固定、石蜡包埋、切片(厚4 μm),常规苏木精—伊红染色。

1.4 增殖细胞核抗原免疫组织化学染色

按链酶亲合素—生物素复合物法进行(试剂盒为博士德公司产品):切片常规脱蜡,双氧水封闭,修复液修复,滴加经5%羊血清1:100稀释的一抗(美国Dako公司产品),4℃过夜,复温,加生物素化二抗,37℃孵育60 min,加链酶亲合素—生物素复合物,37℃孵育60 min,显色,苏木精复染,脱水、透明,封片。

1.5 内膜细胞增殖指数计算

每份标本随机选取内膜4个不同部位,计数每个高倍镜视野下细胞总数及增殖细胞核抗原阳性细胞数,取平均值计算细胞增殖指数,细胞增殖指数=增殖细胞核抗原阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.6 图像分析及管腔相对丧失率计算

随机选取每只动物血管桥远、中、近3个不同平面的3张切片,照像后在照片上用计算机图像自动分析系统分别测血管腔周长、外弹力膜周长、内膜及中膜面积。以血管腔周长推算血管腔面积,公式为:血管腔面积=血管腔周长²/4π;管腔相对丧失率=(1-管腔面积/外弹力膜以内面积)×100%。

1.7 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 大体标本观察

有3条静脉桥闭塞(16 μCi照射组2条,2 μCi照射组1条),原因是血栓形成。

2.2 光镜下组织形态学观察

对照组、2 μCi照射组和4 μCi照射组血管桥内皮细胞完全修复,内膜增生明显,血管壁结构紊乱。8 μCi照射组内皮细胞基本修复,仅少量内膜增生,血管壁结构完整。16 μCi照射组无内膜增生,细胞几乎全部坏死,仅存少量内皮细胞,管腔可见少量纤维蛋白沉积,血管壁正常结构消失。各组内膜面积、管腔面积及管腔相对丧失率见表1(Table 1)。

2.3 透射电镜超微结构观察

16 μCi照射组血管壁内皮细胞、SMC很少,细胞体积较小,细胞器欠丰富,周围仅见少量不成熟的胶

原纤维。8 μCi照射组内皮细胞形态正常,SMC密度相对较高,细胞大小与对照组大致相同,细胞器较丰富,周围的胶原纤维较少、纤细。对照组、2 μCi照射组和4 μCi照射组内皮细胞、SMC形态正常,但密度明显增高,体积增大,细胞器丰富,细胞外胶原纤维较多。

表1. 各组血管腔面积、膜面积和管腔丧失率

Table 1. Area of cavity and neointima and lost rate of cavity of vein graft ($\bar{x} \pm s$)

分 组	管腔面积(mm ²)	内膜面积(mm ²)	丧失率(%)
对照组	10.18±0.62	0.59±0.15	9.67±1.44
16 μCi组	11.08±0.91	0	0.37±0.06 ^b
8 μCi组	11.14±0.91	0.17±0.05 ^b	3.67±0.41 ^b
4 μCi组	10.43±0.87	0.42±0.09 ^a	8.67±0.92
2 μCi组	10.09±0.81	0.65±0.14	10.97±1.24

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.4 平滑肌细胞增殖情况观察

随着照射剂量减低,增殖细胞核抗原阳性细胞逐渐增多,内膜SMC增殖逐渐活跃,细胞增殖指数逐渐增高(表2, Table 2)。

表2. 各组内膜平滑肌细胞增殖指数

Table 2. Proliferation index of smooth muscle cell in neointima ($\bar{x} \pm s$)

分 组	增殖指数
对照组	40.6% ±8.9%
16 μCi组	0
8 μCi组	17.4% ±3.7% ^a
4 μCi组	26.5% ±8.1%
2 μCi组	41.7% ±8.5%

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

预防自体移植静脉内膜增生和狭窄尚无有效方法,通常采用的药物治疗只对提高近期通畅率有益,远期效果不佳;光动力学疗法,临床应用副作用较大^[3];基因治疗虽前景广阔,但临床应用还有许多问题尚未解决^[4];放射线照射则显示了良好的预防效果,近来受到了广泛重视。

放射性核素的电离辐射能作用于核酸蛋白质,影响细胞分裂增殖的各个环节和时期。低剂量放射治疗在治疗术后瘢痕形成和纤维组织增生等方面已经证实临床疗效确切,在抑制动脉扩张后再狭窄方面已进行了广泛的实验和临床研究,疗效明显且未

发现放射血管病或心肌损伤等副作用^[5]。

目前应用较多的放射线为 γ 射线和 β 射线。我们选择 ^{32}P 是基于其有以下优点: 能发射纯 β 射线; β 射线电离密度大、射程短, 2 mm 深处的组织能吸收 90% 的能量; ^{32}P 半衰期 14.3 d, 与自体移植静脉内膜增生高峰时相一致; 使用简单, 勿需特别防护。

3.1 ^{32}P 照射对自体移植静脉内皮细胞修复的影响

放射线照射虽可以抑制内皮细胞增殖, 但内皮细胞对 SMC 增殖的抑制作用并不受影响^[6]。Kotzerke 等^[7]对动脉 SMC 和内皮细胞的研究还显示, 内皮细胞对放射性核素的敏感性低于 SMC。本研究支持以上结果, 16 μCi 照射组血管壁 SMC 几乎全部坏死, 而内皮细胞仍有一定程度修复, 随放射性活度降低, 8 μCi 照射组内皮细胞基本修复, 超微结构表现与对照组相似, 4 μCi 照射组和 2 μCi 照射组对内皮细胞修复基本无影响。说明治疗剂量 β 射线对内皮细胞修复有一定抑制作用, 但影响不大, 而低于治疗剂量的照射对内皮细胞修复基本无影响。

3.2 ^{32}P 照射对自体移植静脉平滑肌细胞增殖和管腔丧失的作用

同位素照射可增加细胞周期抑制因子 P 21 和 P 53 表达, 使细胞增殖周期延迟^[8], 还可能增加细胞凋亡, 从而抑制 SMC 增殖, SMC 存活和增殖能力与受照射剂量成反比^[9]。我们观察到, 随着 ^{32}P 放射性活度的增高, 内膜面积和细胞增殖指数逐渐下降, 管腔面积逐渐增大, 管腔相对丧失率逐渐降低, 但 16 μCi 照射组血管壁细胞大量死亡, 血管壁结构破坏。8 μCi 照射组 SMC 少量增殖, 形成薄的新生内膜, 血管壁结构基本完整, 管腔也明显比对照组大, 管腔相对丧失率明显降低。4 μCi 照射组对抑制细胞增殖也有一定作用, 但作用较弱。2 μCi 照射组内膜面积、细胞增殖指数和管腔相对丧失率接近对照组, 说明 2 μCi 照射对自体移植静脉的内膜增生和狭窄没有明显作用。Cottin 等^[10]发现同位素照射可使细胞外胶原合成减少, 参与血管重塑, 我们通过透射电镜也观察到类似现象。另外, 结合以往研究, 我们注意到自体移植静脉外包绕明胶薄膜后 SMC 增殖指数、内膜面积和管腔丧失率等各项指标较单纯移植组高, 我们认为这是由于载体与组织的相容性较差, 对 SMC 增殖有刺激作用, 因此自体移植静脉外同位素

持续照射治疗的载体尚需进一步改进。

3.3 放射治疗的副作用

16 μCi 照射组内皮细胞修复明显受影响, 血管壁细胞大量死亡, 血管壁正常结构丧失, 还可使血管桥通畅率下降, 本实验 3 条闭塞的血管桥中有 2 条发生于 16 μCi 照射组, 可能与血管的过度放射性损伤有关。我们以前的研究也发现照射剂量过高会发生血管壁瘤样扩张, 可能是血管壁大量细胞坏死, 血管壁正常结构受损的结果。其它学者在损伤动脉放射治疗研究中也发现, 过高剂量的照射还可引起假性动脉瘤和纤维瘢痕形成^[11]。因此, 选择合适的剂量是同位素照射治疗能否成功的关键。

总之, 一定剂量 ^{32}P 照射可明显抑制自体静脉移植后 4 周内膜 SMC 增殖和狭窄。本实验的适宜剂量为 8 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ 。剂量过高会引起血管桥急性闭塞, 正常结构丧失; 剂量过低又没有明显抑制作用, 达不到预防效果。

[参考文献]

- [1] 毛家亮, 黄定九. 血管内放射治疗预防血管成形术后再狭窄. 国外医学·心血管病分册, 1998, 25 (3): 146-148
- [2] 朱海龙, 杨景学, 张卫达, 崔勤, 陈文生. 实验性自体移植静脉内膜增生模型的建立. 第四军医大学学报, 2000, 21 (5): 589-591
- [3] 关澄宇, 刘凡光, 顾瑛, 周宏妍. 光动力疗法在动脉粥样硬化治疗中的应用. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (1): 72-74
- [4] 李拥军, 管珩, 王宗立. 血管再狭窄的基因治疗. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (1): 77-81
- [5] Liemann DD, Boettcher HD, Kollath J, Schopohl B, Strassmann G, Strecker EP, et al. Prophylactic endovascular radiotherapy to prevent intima hyperplasia after stent implantation in femoral popliteal arteries. *Cardiovasc Intervent Rad*, 1994, 17 (1): 12-16
- [6] de Crom R, Wulf P, van Nimwegen H, Kutryk MJ, Visser P, van der Kamp A, et al. Irradiated versus nonirradiated endothelial cells: effect on proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Interv Radiol*, 2001, 12 (7): 855-861
- [7] Kotzerke J, Gertler R, Buchmann I, Baur R, Hombach V, Norbert Reske, et al. Different radiosensitivity of smooth muscle cells and endothelial cells in vitro as demonstrated by irradiation from aRe-188 filled balloon catheter. *Atherosclerosis*, 2000, 152 (1): 35-42
- [8] Scott NA, Crocker IR, Yin Q, Sorescu D, Wilcox JN, Griendling KK. Inhibition of vascular cell growth by X-ray irradiation: comparison with gamma radiation and mechanism of action. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50 (2): 485-493
- [9] Waksman RW, Rodriguez JC, Robinson KA, Cipolla GD, Crocker IR, Scott NA, et al. Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis, and vascular remodeling after Balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*, 1997, 96 (11): 1944-952
- [10] Cottin Y, Kollum M, Chan RC, Kim H, Bhargava B, Vodovot ZY, et al. Differential remodeling after balloon overstretch injury and either beta or gamma intracoronary radiation of porcine coronary arteries. *Cardiovasc Radiat Med*, 2001, 2 (2): 75-82

(此文编辑 曾学清)