

³² 磷血管内照射、舒降之和波立维联用预防血管再狭窄

陈浩¹, 李虹², 肖传实²

(1. 石家庄市第一医院急诊科, 河北省石家庄市 050011; 2. 山西医科大学附属第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 药理学; ³²磷血管内照射、舒降之和波立维联用抑制再狭窄; 免疫组织化学法; 再狭窄; 基质金属蛋白酶 2; 增殖细胞核抗原; 兔

[摘要] 目的 观察动脉粥样硬化新西兰白兔髂动脉球囊损伤后³²磷血管内照射、波立维和舒降之联用对损伤部位再狭窄的影响。方法 复制新西兰白兔动脉粥样硬化狭窄模型, 各时间点处死动物, 免疫组织化学法检测基质金属蛋白酶 2、增殖细胞核抗原和 α 肌动蛋白水平, 并进行定量统计分析。结果 联合组较单纯组各时间点管腔面积明显增大, 新生内膜面积明显减少 ($P < 0.05$); 各时间点基质金属蛋白酶 2、增殖细胞核抗原和 α 肌动蛋白表达依次明显降低, 联合组表达最低 ($P < 0.05$)。结论 ³²磷血管内照射、波立维和舒降之联用对血管平滑肌细胞增殖有一定抑制作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Experimental Study of Endovascular Irradiation Associated with Simvastatin and Clopidogrel on Restenosis after Interveneional Therapy

CHEN Hao¹, LI Hong², and XIAO Chuanshi²

(1. Department of Emergency, the First Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011; 2. Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[KEY WORDS] Restenosis; Endovascular Irradiation; Matrix Metalloproteinase 2; Proliferation Cell Nuclear Antigen; Balloon Injury; Immunohistochemistry Method; Rabbits

[ABSTRACT] Aim To evaluate the effects of endovascular irradiation associated with simvastatin and clopidogrel on restenosis after interveneional therapy. Methods 72 male New Zealand white rabbits were studied. Except those in normal control group, other rabbits were made into atherosclerosis and restenosis models. Immunohistochemistry method was used to detect the data expressed in the vascular. The expression were analyzed by image analysis. All these collected data were analyzed using factorial ANOVA. Results At each time point, the lumen area was larger and the neointima area was smaller in associated group than in other groups ($P < 0.05$). The expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), proliferation cell nuclear antigen (PCNA), α SM actin in the vascular in the iliac arteries of associated group is the least ($P < 0.05$).

Conclusion ³²P irradiation associated with simvastatin and clopidogrel has the effect of preventing restenosis after balloon injury.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)是一个广泛应用的治疗冠状动脉疾病的有效手段。然而,成形术后的血管再狭窄严重限制了其远期成功率。近几年来国外已经证实了血管内放射治疗对血管介入后再狭窄治疗的有效性和安全性。然而,它本身有一些不足如:晚期血栓形成、边缘效应和内皮化延迟等。本实验将血管内照射、调脂药与抗血小板药联用,并与单用血管内照射和单用药物治疗进行对比,探讨血管内照射、调脂药与抗血小板药联用预防再狭窄的效果及机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组

纯种新西兰白兔 72 只(山西省农科院畜研所实验兔厂),雄性,体重 2.0~2.5 kg,4~6 月龄。随机分为正常对照组(6 只)、单纯损伤组(16 只)、药物组(波立维+舒降之)(16 只)、照射组(17 只)和联合组(照射+波立维+舒降之)(17 只)。除正常对照组外,其余 4 组均制备动脉粥样硬化狭窄模型。

1.2 动物模型的复制

除正常对照组外的白兔 66 只,以高胆固醇及高脂肪混合饲料(1%胆固醇、5%猪油和 94%普通饲料)喂养 6 周。手术建立模型,20%乌拉坦(4~5 mL/kg)静脉麻醉,经右侧股动脉用球囊导管对右侧髂动脉进行扩张拉伤以期损伤内膜。对血管行球囊扩张术,球囊直径与髂动脉直径之比为 1.1~1.3:1,球囊膨胀 3 次,每次 2 min,间隔 30 s,压力 6~8 个大

[收稿日期] 2004-06-14 [修回日期] 2005-01-03

[作者简介] 陈浩,硕士研究生,主治医师,主要研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 chen hao196@eyou.com。通讯作者肖传实,主任医师,博士研究生导师,主要研究方向为冠心病的诊断与治疗。

气压。照射组和联合组沿导丝推进灌注球囊管于目标血管,充分抽气后注入 ^{32}P 液体(中国科学院原子能研究所制备,初始活度 16.94 ci/L , $T_{1/2}=14$ 天,每日衰变为 4.7%),使照射处血管累计吸收剂量为 24 Gy ,照射时间依剂量计算(由山西医科大学第二医院核医学科张宝牛大夫计算),结扎动脉。术中和术后各予肝素 200 单位注射。青霉素 80 万单位/天,肌注 3 天,之后予普通饮食,不限制活动。药物组和联合组动物损伤后即以波立维 50 mg 、舒降之 15 mg 灌胃,之后每日一次与食同服。

1.3 标本获取与检测

分别于术后 14 天、 28 天和 56 天处死动物,每一时间点 $5\sim 6$ 只。用 20% 乌拉坦静脉麻醉,以 4% 福尔马林原位生理灌注 15 min ,然后取目标血管段(右侧髂动脉),放入 4% 福尔马林液标本瓶中固定, 24 h 后石蜡包埋,制成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 切片,分别进行HE染色和免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织化学法

增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和 α 肌动蛋白(α actin)试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司,免疫组织化学法均严格按说明书用SABC免疫组织化学染色程序进行操作。

1.5 计算机图像分析

每张切片随机取 5 个视野,用BI-2000图像分析系统分别测量管腔面积、新生内膜面积和新生内膜最大厚度;并测定血管壁MMP-2、PCNA和 α actin阳性细胞的比例(阳性细胞/总细胞数)。

1.6 统计学处理

以SAS8.0软件包进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差表示,统计学分析用两因素析因设计的方差分析、单因素方差分析进行检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性, $P<0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 形态学观察

14 天时,单纯损伤组与正常对照组比较,新生内膜增生非常显著,且新生内膜细胞排列紊乱。透射电镜下可见部分平滑肌细胞表型转变(收缩/静止型的平滑肌细胞转变为缺乏收缩蛋白的合成分泌型平滑肌细胞):细胞核变圆,肌丝减少,胞质出现大量内质网和高尔基,证明成功建立模型。 56 天时,联

合组与其他 3 组比较新生内膜面积明显减少,管腔面积明显增大($P<0.01$);药物组、照射组和联合组两两比较,差异有非常显著性($P<0.01$)(表1, Table1)。

表1. 56天时血管测量分析显示单纯组、药物组、照射组和联合组之间管腔面积、新生内膜面积及最大厚度的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1. Image analyses of intima thickness, intima and whole vessel area of injured artery of different groups at 56 days

分 组	新生内膜面积 (mm^2)	管腔面积 (mm^2)	新生内膜最大厚度 (μm)
单纯组	6.92 ± 0.02	0.03 ± 0.05	272.57 ± 4.71
药物组	6.24 ± 0.26^b	0.28 ± 0.09^b	244.53 ± 3.23^{ab}
照射组	3.91 ± 0.22^b	2.10 ± 0.23^b	147.92 ± 3.21^{ab}
联合组	3.42 ± 0.29^{ab}	2.72 ± 0.17^{ab}	137.85 ± 1.27^{ab}

a: $P<0.01$, 与单纯组、药物组和照射组比较。b: $P<0.01$, 药物组、照射组和联合组两两比较。

2.2 血管壁基质金属蛋白酶2、增殖细胞核抗原和 α 肌动蛋白阳性细胞的表达

血管壁中膜PCNA阳性细胞的表达析因方差分析结果发现:时间和分组这两因素不存在交互作用。 14 天和 28 天时,联合组、药物组、照射组与单纯组比较PCNA阳性细胞表达明显降低($P<0.01$),这三组两两比较 $P<0.05$ 。 56 天时联合组、照射组与单纯组比较表达明显降低($P<0.01$),而药物组与单纯组比较差异无显著性($P>0.05$);联合组与照射组、药物组比较表达明显降低($P<0.05$),而照射组与药物组比较差异无显著性($P>0.05$)。

基质金属蛋白酶2阳性细胞的表达析因方差分析结果发现:时间和分组两因素有交互作用,固定时间因素每一组在 3 个时间点均有差异($P<0.01$),固定分组因素 14 天和 28 天时 4 组之间差异有显著性($P<0.01$);第 56 天时 4 组之间差异无显著性($P>0.05$)。MMP-2表达阳性细胞百分比第 14 天和 28 天时联合组与其他组比较明显降低($P<0.05$),药物组与照射组比较差异无显著性($P>0.05$)。 56 天时,中膜几乎无MMP-2表达,只有联合组与单纯组比较表达明显降低($P<0.05$)。

14 天和 28 天时血管壁 α 肌动蛋白主要在中膜表达。 56 天时 α 肌动蛋白主要表达在外膜,药物组、照射组和联合组均较单纯组表达减少($P<0.05$)。联合组、药物组和照射组两两比较均 $P<0.05$,中膜几乎无表达(图1, Figure 1)(表2, Table 2)。

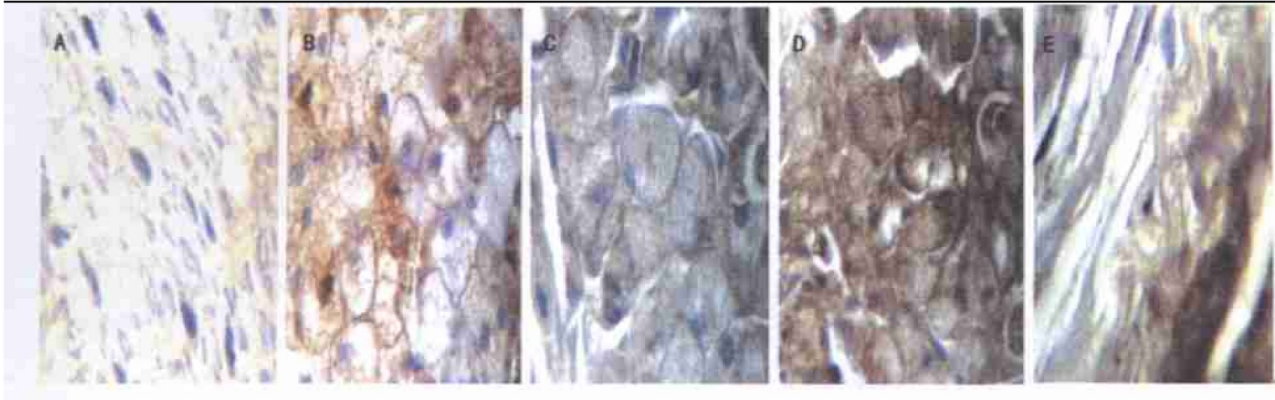


图 1. 球囊损伤后增殖细胞核抗原、基质金属蛋白酶 2 和 α 平滑肌肌动蛋白的表达 A 为中膜细胞 PCNA 阴性表达, B 为中膜细胞 PCNA 阳性表达, C 为中膜 MMP-2 阴性表达, D 为中膜 MMP-2 阳性表达, E 为 56 天时外膜 α -SM actin 强表达而中膜几无表达。

Figure 1. Expression of PCNA, MMP-2, α -SM actin in different days after operation

表 2. 各组血管壁基质金属蛋白酶 2、增殖细胞核抗原和 α 肌动蛋白阳性细胞的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. PCNA, MMP-2, α -SM actin expression in rabbits injured artery at different days

分 组	PCNA	MMP-2	α 肌动蛋白
单纯组 14 天	40.84% \pm 12.51%	45.74% \pm 11.35%	
28 天	34.90% \pm 0.87%	44.60% \pm 7.18%	
56 天	27.40% \pm 4.23%	2.94% \pm 0.32%	51.34% \pm 1.45%
药物组 14 天	31.03% \pm 1.23% ^{ab}	34.93% \pm 2.13%	
28 天	26.59% \pm 2.05% ^{ab}	28.37% \pm 4.62%	
56 天	21.97% \pm 1.59%	2.50% \pm 0.31%	41.78% \pm 1.42% ^{bc}
照射组 14 天	22.23% \pm 1.38% ^{ab}	29.14% \pm 2.54%	
28 天	22.71% \pm 3.48% ^{ab}	28.43% \pm 6.47%	
56 天	16.46% \pm 2.50% ^a	2.43% \pm 0.29%	32.47% \pm 1.19% ^{bc}
联合组 14 天	13.64% \pm 0.47% ^{ab}	18.03% \pm 10.22% ^d	
28 天	14.67% \pm 3.78% ^{ab}	17.96% \pm 10.38% ^d	
56 天	10.50% \pm 6.08% ^{ac}	1.64% \pm 0.95% ^e	21.96% \pm 12.57% ^{bc}

a: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, 与同时时间点单纯组比较。b: $P < 0.05$, 联合组、药物组和照射组同时时间点两两比较。c: $P < 0.05$, 与照射组和药物组比较。d: $P < 0.05$, 与同时时间点其他组比较。

3 讨论

经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的主要机制为血管平滑肌细胞增殖及迁移所致的内膜过度增生、局部血栓形成、细胞外基质形成、早期血管弹性回缩及晚期血管负性重塑^[1]。一系列血管内超声研究已明确再狭窄的自然过程,介入治疗后适当的动脉重构在早期出现(1 个月内),而病理性重构发生在晚期(1~ 6 个月内)^[2]。

本研究发现,第 14 天、28 天和 56 天时联合组较其他组的管腔面积明显增加,新生内膜最大厚度明显减少,与血管壁增殖细胞核抗原(PCNA 阳性细胞)的表达基本一致,说明在预防再狭窄的干预措施中,联合组效果最好。MMP-2 在第 14 天和 28 天有表

达,56 天时 MMP-2 显著降低,在血管壁几乎无表达,这与一些学者研究一致,而另一些学者认为 MMP-2 在 14 天时就几乎无表达。基质金属蛋白酶 2 是基质金属蛋白酶家族中的一种,主要水解变性胶原及基膜的主要成分Ⅲ型胶原,是由损伤的平滑肌细胞分泌的。近来研究表明,明胶酶能持续降解间质的纤维类胶原^[3,4],在细胞外基质胶原重塑过程中具有重要作用^[5]。血管损伤后,血管平滑肌细胞增殖及从中膜向内膜的迁移是动脉再狭窄发展过程中的主要环节,而由平滑肌细胞产生的 MMP 对细胞外基质的降解促进了平滑肌细胞的迁移。术后的第一周,胶原降解及合成增加是早期血管重塑的重要特征,能有效降解胶原 MMP 的表达及活性增高^[6]。PCNA 阳性细胞主要是血管平滑肌细胞,³²P 血管内照射和药物治疗可能通过抑制血管平滑肌细胞增殖使 MMP-2 分泌减少,从而抑制血管平滑肌细胞迁移和细胞外基质胶原重塑。贾光宏等^[7]实验研究表明:射线能抑制平滑肌细胞增殖,使细胞停滞于 G₀G₁ 期,S 期合成减少,并能诱导细胞凋亡。药物组降低 MMP 的机制可能通过他汀类药物对血管平滑肌细胞的影响来降低 MMP 的表达,Corsini 等^[8]培养人和鼠平滑肌细胞发现,加入辛伐他汀和氟伐他汀可影响平滑肌细胞增殖。

本研究观察到 14 天、28 天时 α 肌动蛋白在血管中膜持续表达;56 天时 α 肌动蛋白在中膜几乎无表达,但是在外膜强表达。成纤维细胞在生理情况下不表达 α 肌动蛋白,在某些刺激因子如肝素、肿瘤坏死因子作用下发生表型改变,表达 α 肌动蛋白转变为肌成纤维细胞。提示外膜大量的 α 肌动蛋白阳性细胞及外膜纤维化可能参与了血管重塑的过程。

Wilcox 等^[9]证明外膜 α 肌动蛋白阳性细胞为肌成纤维细胞,它是一种特殊的成纤维细胞,动脉损伤后发生细胞表型转化,导致外膜纤维化。Scott 等^[10]认为外膜纤维化可能是与临床再狭窄有关的几何重塑的根本原因,损伤动脉外膜中肌成纤维细胞出现和这些细胞的收缩蛋白上调,从血管外侧收缩引起血管直径缩小,导致血管重塑过程。这些结果支持本实验的结论。本研究表明³²P 血管内照射、波立维和舒降之联用与单纯药物、单纯照射比较,其效果最好。其可能机制为:血管内照射、药物联用有正协同作;抗血小板药物波立维(氯吡格雷)可以明显抑制 ADP、花生四烯酸及胶原诱导的血小板聚集,明显延长损伤血管内膜的实验性动脉血栓形成时间。血管成形术后再狭窄是一个多因素、多环节的复杂过程,单纯依靠一种方式来预防,必然顾此失彼,达不到满意的效果。血管内照射同药物联用来防止再狭窄,两者在作用靶点上互补或相互促进,在临床上可能会收到比较满意的结果。本实验的不足之处是:实验周期比较短,没有达到 6 个月到 1 年的时间,无法阐明再狭窄晚期的机制及观测³²P、波立维、舒降之联用是否能有效预防血管介入术后晚期再狭窄的形成、是否存在“后期赶上”现象。

[参考文献]

- [1] 顾永明,魏盟,张昀昀,潘晔生,葛兆莺,金立仁. 水飞蓟宾对实验兔球囊血管损伤后内膜增生的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(6): 526-528
- [2] 陈在嘉,高润霖主编. 《冠心病》. 北京:人民卫生出版社, 2002; 706
- [3] Okada Y, Nara K, Kawamura K. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/ type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*, 1995, 72: 311-322
- [4] Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase 2 is an interstitial collagenase: inhibitor free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the special 3/4 and 1/4 length fragments. *J Biol Chem*, 1995, 270: 5 872-876
- [5] Kahari VM, Saarialho-Kerr U. Matrix metalloproteinase in skin. *Exp Dermatol*, 1997, 6: 199-213
- [6] Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, Chisholm RJ. In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty in jury and the role of matrix metalloproteinase. *Circ Res*, 1996, 79: 541-550
- [7] 贾光宏,马业新,于世英. 射线照射对平滑肌细胞增殖及凋亡的影响. 中华放射医学与防护杂志, 2000, 20(6): 399
- [8] Corsini A, Mazzotti M, Raiteri M, Soma MR, Gabbiani G, Fumagalli R, et al. Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation. In vitro studies with inhibitors of HMG-CoA reductase. *Atherosclerosis*, 1993, 101: 117-125
- [9] Wilcox JN, Waksman R, King SB, Scott NA. The role of the adventitia in the arterial response to angioplasty: the effect of intravascular radiation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 1996, 36(4): 789-796
- [10] Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*, 1996, 94: 2 178-187

(此文编辑 朱雯霞)

《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类)一览表(2003 年度)

口腔正畸学
昆明医学院学报
立体定向和功能神经外科杂志
临床超声医学杂志
临床儿科杂志
临床耳鼻咽喉科杂志
临床放射学杂志
临床肝胆病杂志
临床骨科杂志
临床检验杂志
临床精神医学杂志
临床口腔医学杂志
临床麻醉学杂志
临床泌尿外科杂志
临床内科杂志
临床皮肤科杂志
临床神经病学杂志

临床神经电生理学杂志
临床外科杂志
临床消化病杂志
临床心电学杂志
临床心血管病杂志
临床血液学杂志
临床与实验病理学杂志
免疫学杂志
内科急危重症杂志
南方护理学报
南京医科大学学报
南京中医药大学学报
脑与神经疾病杂志
青岛大学医学院学报
人类学学报
山东大学学报医学版
山东医药