

局部应用雷帕霉素在预防移植静脉再狭窄中的作用

范 萌, 谷天祥, 姜春力, 李 卓

(中国医科大学附属第一临床学院心脏外科, 辽宁省沈阳市 110011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 雷帕霉素; 移植静脉; 再狭窄; 免疫组织化学染色法; 内膜增生; 平滑肌细胞增殖

[摘要] 目的 探讨局部应用雷帕霉素对移植静脉内膜增生及平滑肌细胞增殖的抑制作用。方法 30只Wistar大鼠随机分为对照组和雷帕霉素干预组,建立大鼠颈外静脉与颈内动脉间移植模型,干预组将200 μg雷帕霉素应用到移植静脉周围,对照组只移植静脉不给予雷帕霉素,于术后4周提取移植静脉,进行形态学分析测定内膜和中膜厚度及内膜中膜厚度比,行bcl-2和bax免疫组织化学染色测定新生内膜阳性细胞百分比。结果 形态学分析可见雷帕霉素组平均静脉内膜厚度为 $13.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$,较对照组 $36.4 \pm 1.6 \mu\text{m}$ 明显降低($P < 0.05$)。雷帕霉素组平均中膜厚度为 $53.4 \pm 2.2 \mu\text{m}$,对照组为 $76.2 \pm 2.6 \mu\text{m}$,雷帕霉素组内膜中膜厚度比为 0.258 ± 0.031 ,显著低于对照组 0.478 ± 0.015 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色提示应用雷帕霉素后bcl-2阳性率为 $16.6\% \pm 2.2\%$,明显低于对照组 $51.3\% \pm 3.4\%$,雷帕霉素组bax阳性率为 $63.3\% \pm 3.2\%$,而对照组阳性率为 $16.3\% \pm 1.3\%$,说明雷帕霉素可以抑制bcl-2蛋白的表达,增强bax蛋白的表达。结论 在移植静脉周围局部应用雷帕霉素可以减少静脉移植术后再狭窄的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Local Application of Rapamycin Inhibiting Restenosis in Experimental Vein Graft

FAN Meng, GU Tian Xiang, JIANG Chun-Li, and LI Zhuo

(Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Rapamycin; Vein Graft; Intimal Hyperplasia; Restenosis; Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation; Immunohistochemical Analysis

[ABSTRACT] **Aim** To examine the effect of rapamycin on reducing neointima formation and the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) after local application of rapamycin in a mouse model of vein graft. **Methods** Vein graft model was established in 30 Wistar mice which were randomly divided into two groups: rapamycin group and control group. In the rapamycin group, 200 μg of rapamycin was applied locally. The control group did not receive local treatment. Graft veins were harvested 4 weeks later and underwent morphometric analysis as well as immunohistochemical analysis. **Results** Morphometric analysis indicate that the thickness of neointima in rapamycin group is obviously less than that in control group ($13.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$ vs $36.4 \pm 1.6 \mu\text{m}$, $P < 0.05$). Immunohistochemical analysis shows that the reduction of bcl-2 positive cells in vascular smooth muscle of rapamycin group was $16.6\% \pm 2.2\%$ vs $51.3\% \pm 3.4\%$ ($P < 0.05$) and the decreased amount of bax positive cell was $63.3\% \pm 3.2\%$ vs $16.3\% \pm 1.3\%$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Local application of rapamycin can inhibits restenosis in experimental vein graft.

即使在冠状动脉搭桥手术中动脉是比较理想的移植血管,但是大隐静脉取材方便并有足够的长度,故至今大隐静脉仍是使用最多的移植血管。随着搭桥手术的逐渐开展,术后静脉桥血管平滑肌细胞过度增殖和内膜增生引发再狭窄越来越引起人们的注意,为此进行了很多研究试图解决再狭窄问题,在冠状动脉成形术中,雷帕霉素已经应用到人体冠

状动脉涂层支架上,并取得了一定的疗效^[1,2]。本实验拟探讨在移植静脉表面局部应用雷帕霉素,观察其对静脉平滑肌细胞增殖及内膜增生的作用,为提高静脉移植物的中远期通畅率探求可行性方案。

1 材料和方法

1.1 静脉移植动物模型的建立

成年雄性Wistar大鼠30只,由中国医科大学动物实验室提供,随机分为对照组和雷帕霉素干预组。所有大鼠放入一可密闭容器中,迅速放入一枚蘸有乙醚的医用棉签,闭合容器约5~10 s,大鼠麻醉后取出,腹腔注射10%水合氯醛加强麻醉(100 mg/

[收稿日期] 2006-07-06 [修回日期] 2006-11-30

[作者简介] 范萌,硕士研究生,主治医师,研究方向为冠状动脉外科基础与临床,E-mail为fanmeng74@sina.com。谷天祥,教授,博士研究生导师,研究方向为房颤、冠状动脉外科基础与临床。姜春力,博士研究生,主治医师,研究方向为冠状动脉外科基础与临床,E-mail为jiangchunli@hotmail.com。

kg), 取颈部正中切口, 纵行剪开皮肤, 游离右侧颈外静脉约 1 cm, 分支用 7-0 线结扎, 切断, 生理盐水浸泡备用, 切断右侧胸锁乳突肌, 游离颈内动脉, 两端上动脉夹止血, 中间切断, 将备用静脉两端倒置, 用 8-0 血管缝合线行静动脉端端吻合, 放松动脉夹, 见移植静脉充盈, 两端动脉血流通畅, 搏动良好, 无出血。雷帕霉素组经雷帕霉素(购自福建科瑞药业有限公司)处理后, 3-0 线连续缝合皮肤, 术毕。

1.2 雷帕霉素的应用

抽取 1 mL 生物蛋白胶(广州倍特生物技术有限公司制造)的主体胶内加入 2 mg 雷帕霉素, 轻度震荡, 约 2 min 后雷帕霉素完全溶解在主体胶内, 1 mL 注射针抽取 0.1 mL(即 200 μ g 雷帕霉素), 另一 1 mL 注射针抽取 0.1 mL 催化剂, 将两者同时注射在移植静脉的周围间隙, 两者混合后立即形成一种胶状物, 包绕在静脉周围。对照组做静脉移植后单纯给予生物蛋白胶, 不给予雷帕霉素。

1.3 大鼠术后处理以及取材

雷帕霉素组及对照组大鼠术后即放入鼠笼中单独喂养, 喂养条件和术前相同。两组大鼠均分别在术后 4 周取材, 麻醉后由原切口进入, 分离移植血管周围组织后取出移植静脉, 立即放入 10% 甲醛溶液中, 经过固定、程序脱水、石蜡包埋, 制成蜡块备用。

1.4 形态学测定及免疫组织化学测定

移植静脉连续切成 4 μ m 切片, 行 HE 染色, 显微镜下观察内膜和中膜厚度及内膜中膜厚度比, 取平均值作为标准数值。免疫组织化学染色方法为常规 SP 法, 选术后 2 周的移植静脉切片行免疫组织化学分析, 分别以兔抗鼠 bcl-2 和 bax 蛋白单克隆抗体作为一抗(购自武汉博士德公司), 经过脱蜡至水、灭活、抗原修复、免疫组织化学染色、复染、脱水、封片等过程制成切片, 在显微镜下观察显色情况。免疫组织化学结果判定: bcl-2 和 bax 均主要以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性, 每个标本随机选出 4 个不同高倍视野观察 bcl-2 和 bax 阳性细胞百分数, 并记数平均值作为标准数值。

1.5 统计学处理

内膜和中膜厚度及内膜中膜厚度比取平均值和标准差进行组间 *t* 检验, 免疫组织化学检查结果行卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组移植静脉内膜增生的比较

30 只大鼠均顺利完成手术, 在术后 3 周时雷帕

霉素组及对照组各有 1 只大鼠死亡, 两组比较差异无显著性。共有 28 个标本参与了研究, 其中对照组及雷帕霉素组 HE 染色静脉各 4 根, bcl-2 和 bax 免疫组织化学染色静脉各 5 根共 4 组。结果发现, 雷帕霉素组平均静脉内膜厚度较对照组明显降低 ($P < 0.05$), 雷帕霉素组平均中膜厚度较对照组无统计学差异, 雷帕霉素组内膜中膜厚度比显著低于对照组 ($P < 0.05$) (表 1, 图 1)。

表 1. 雷帕霉素组和对照组移植静脉内膜中膜厚度的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	内膜厚度 (μ m)	中膜厚度 (μ m)	内膜中膜厚度比
对照组	36.4 \pm 1.6	76.2 \pm 2.6	0.478 \pm 0.015
雷帕霉素组	13.8 \pm 0.6 ^a	53.4 \pm 2.2	0.258 \pm 0.031 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

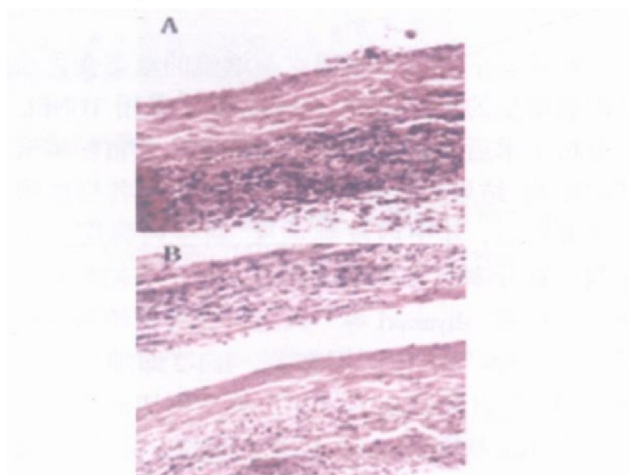


图 1. 两组移植静脉在术后 4 周时的 HE 染色结果 A 为对照组, B 为雷帕霉素组。

2.2 各组 bcl-2 和 bax 表达的比较

将对照组及雷帕霉素组病理切片进行免疫组织化学测定分析, 每个切片随机观察 4 个高倍视野, 计算阳性率(图 2)。应用雷帕霉素后 bcl-2 阳性率明显低于对照组 ($P < 0.05$), 说明雷帕霉素可以抑制 bcl-2 蛋白的表达。雷帕霉素组 bax 阳性率明显高于对照组 ($P < 0.05$), 说明雷帕霉素可以增强 bax 蛋白的表达(表 2)。

表 2. 静脉移植术后第 4 周时各组 bcl-2 和 bax 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	bcl-2 阳性百分数	bax 阳性百分数
对照组	51.3% \pm 3.4%	16.3% \pm 1.3%
雷帕霉素组	16.6% \pm 2.2% ^a	63.3% \pm 3.2% ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

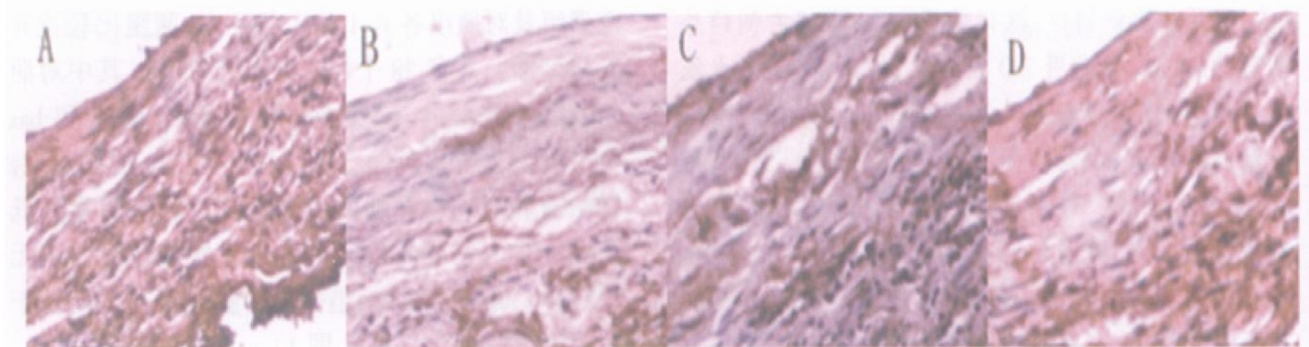


图2. 静脉移植术后4周各组 bcl-2 和 bax 免疫组织化学染色结果

A 为对照组 bcl-2, B 为雷帕霉素组 bcl-2, C 为对照组 bax, D 为雷帕霉素组 bax。

3 讨论

上述研究表明,局部应用雷帕霉素可以在一定时间内抑制移植静脉的内膜增生,从而降低血管移植术后的再狭窄发生率。

血管壁平滑肌细胞凋亡与增殖的动态变化是血管内膜增生的重要原因。Roque 等^[3]采用 TUNEL 方法分析了术后血管壁平滑肌细胞凋亡及雷帕霉素对其的影响,结果显示雷帕霉素组 28 天时各层细胞凋亡显著增加,其中内皮细胞层、新生内膜层和中膜层凋亡百分率明显高于对照组。对于雷帕霉素促进凋亡的机制,Miyazaki 等^[4]认为可能与雷帕霉素阻止了 bcl-2 的诱导活化作用有关。bcl-2 即细胞凋亡抑制基因,是目前发现的与凋亡关系密切的原癌基因之一^[5],bax 基因是 bcl-2 基因家族的一员,其产物是一种与 bcl-2 同源的相关蛋白,能拮抗后者的生物学活性。bax 的主要作用是加速细胞凋亡,并与 bcl-2 一起调节细胞凋亡^[6]。在本实验中我们发现,应用雷帕霉素可以使细胞中 bcl-2 含量明显减少,bax 含量明显增加,从而抑制血管平滑肌细胞的增殖,并且减少内膜增生。

雷帕霉素预防血管损伤后再狭窄存在全身给药和局部给药,局部给药有诸多优势,Klugherz 等^[7]将雷帕霉素涂层的 crossflex 支架放入猪冠脉,研究其局部及全身药代动力学,结果发现,28 天内涂层药物向管壁内持续释放,而血药浓度于两天后即低于检测下限水平。表明局部给药是比较理想的途径。

以往对于雷帕霉素抗血管再狭窄的研究往往局

限于动脉内成型术即支架置入后对动脉内膜的影响^[8],本实验选用移植静脉作为观察对象,针对临床中冠状动脉搭桥手术多选用大隐静脉作为血管桥的实际情况,并选用生物蛋白胶作为雷帕霉素的载体,为探求其临床可行性提供了一定的参考。雷帕霉素是具有良好的应用前景的抗再狭窄形成的药物,但仍有许多实质性问题有待解决。如雷帕霉素对内皮的影响、局部应用的安全有效剂量和时间窗、雷帕霉素代谢衰减后血管平滑肌细胞增殖是否存在反跳现象等。相信随着相关研究的逐层深入,雷帕霉素将会更好地服务于冠心病患者。

[参考文献]

- [1] Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cellcycle[J]. *Circulation*, 1999, **99**: 2 164-170
- [2] Kahan BD. Rapamycin, personal algorithms for use based on 250 treated renal allograft recipients[J]. *Transplant Proc*, 1998, **30**: 2 185-188
- [3] Roque M, Cordorcardo C, Fuster V. Modulation of apoptosis, proliferation, and p27 expression in a porcine coronary angioplasty model[J]. *Atherosclerosis*, 1999, **153**: 315-322
- [4] Miyazaki T, Liu Z, Kawahara A. Three distinct IL-2 signaling pathway mediated by bcl-2, c-myc, and Ick cooperate in hematopoietic cell proliferation[J]. *Cell*, 1995, **81**: 223-231
- [5] Ji HB, Zhai QW, Liu XY, Zheng ZC. Transcription regulation of bcl-2 gene[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2000, **32** (2): 95-99
- [6] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in a poptosis[J]. *Genes Dev*, 1999, **13** (15): 1 899-911
- [7] Klugherz BD, Lianos G, Liecuallen W. Twenty eight day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent[J]. *Coron Artery Dis*, 2002, **13**: 183-188
- [8] 李玉光, 许端敏, 闫纯英, 石永英, 陈畅, 卢成志. 雷帕霉素对球囊损伤后血管平滑肌细胞表型及内膜增生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 414-416

(此文编辑 朱雯霞)