

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-08-0622-04

局部应用前列腺素 E1 对兔颈动脉损伤后内膜增生的影响

万圣云, 吴忠寅

(安徽医科大学附属第一医院血管外科, 安徽省合肥市 230022)

[关键词] 外科学; 医用蛋白胶; 颈动脉; 血管内膜增生; 再狭窄; 前列腺素 E1; 局部应用

[摘要] 目的 观察局部应用医用胶携带前列腺素 E1, 对兔颈总动脉损伤后内膜增生的影响。方法 将 40 只兔随机分成假手术组、对照组、前列腺素 E1 组、医用胶组, 每组各 10 只, 球囊导管法损伤右侧颈总动脉内膜, 术后 2 周切取损伤血管, 通过形态学观察和免疫组织化学检查, 了解内膜增生和平滑肌细胞增殖情况。结果 前列腺素 E1 组血管内膜面积、管腔狭窄率、增殖的平滑肌细胞数等指标均较对照组显著减少 ($P < 0.01$), 而医用胶组无明显效果 ($P > 0.05$)。结论 医用胶携带前列腺素 E1 局部用于血管外膜可有效抑制血管损伤后内膜的增生, 对防治动脉手术后管腔再狭窄有潜在的应用价值。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

Effect of Local Application of Prostaglandin E1 on Intimal Hyperplasia of Rabbit's Injured Carotid Artery

WAN Sheng-Yun, and WU Zhong-Yin.

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

[KEY WORDS] Fibrin Glue; Carotid Artery; Tunica Intima Hyperplasia; Restenosis; Prostaglandin E1; Local Application

[ABSTRACT] **Aim** In order to investigate the effect of local application of prostaglandin E1 (PGE1)-loaded fibrin glue on intimal hyperplasia after balloon-induced injury to common carotid artery in rabbits. **Methods** Forty healthy male white rabbits were randomly divided into four groups: control group, PGE1 group, fibrin glue group and normal group. Each group had 10 rabbits. The right common carotid artery endothelial was denuded with balloon catheter, and the intima was injured. Two weeks after intervention, the models were sacrificed and defined segments were sectioned and measured by means of morphology and immunohistochemistry. The images were digitalized by computer video analysis system. Meanwhile the phenotypes of the vascular smooth muscle cells were observed with electron microscope. **Results** The intimal areas, the degree of the vascular stricture, the expression of PCNA in smooth muscle cells and the number of synthetic smooth muscle cells in PGE1 group decreased significantly compared with the control group (all $P < 0.01$). No significant deviation was found between control group and fibrin glue group ($P > 0.05$). **Conclusions** PGE1 can significantly suppress the intimal hyperplasia and inhibit smooth muscle cells proliferation in injured arterial by local fibrin glue. Thus, PGE1 may have potentially clinical prospect in prevention and treatment of restenosis after angioplasty.

目前动脉内膜切除术、血管成形支架置入术是临床上治疗颈动脉狭窄和闭塞性疾病的主要方法, 但 25%~50% 的再狭窄率严重影响了远期疗效^[1], 导致术后并发多种缺血性脑血管病。研究证实, 前列腺素 E1 (prostaglandin E1, PGE1) 具有抑制血小板聚集和活化、防止动脉粥样硬化形成等作用^[2]。本实验将 PGE1 溶于医用蛋白胶中, 喷涂于血管外膜, 使其缓慢释放发挥作用, 从形态学方面观察其对血

管内膜增生和血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖的影响, 并用免疫组织化学方法对损伤血管进行增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达检测, 为血管成形术后再次狭窄方面的外科研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性日本大耳白家兔 40 只, 体重 2.5~3.0 kg (安徽医科大学动物科); UV-8452A 型紫外分光光度计 (美国惠普); 光学显微镜 (Olympus 公司); 日产 JEM-1230 型透射电镜; Olympus BX-60 型计算机图象

[收稿日期] 2006-12-13

[修回日期] 2007-08-08

[作者简介] 万圣云, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为血管外科, 联系电话为 13956013063, E-mail 为 wshy63@sina.com。吴忠寅, 硕士研究生, 医师, 研究方向为血管外科, 联系电话为 13856989958, E-mail 为 wuzhongyin227@sina.com。

分析仪;PCNA 抗体及免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物制品有限公司);注射用前列腺素 E1(重庆药友制药有限公司);医用蛋白胶(哈尔滨瀚邦医疗科技有限公司)。

1.2 前列腺素 E1 的体外释放实验

在前期的医用胶携带 PGE1 的释放实验中,用紫外分光光度法^[3]成功绘制出 PGE1 的释放曲线(图 1),PGE1 可从医用胶中释放,前 5 天的释放量达 70% 以上,从释放曲线可以看出 PGE1 在医用胶中的缓释效果有良好的稳定性和时效性,可见医用胶携带 PGE1 作用于血管外膜的给药途径可行。

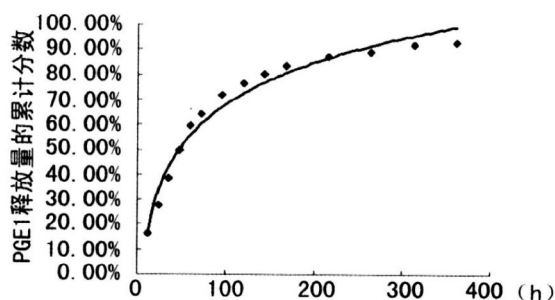


图 1. 体外控释曲线

1.3 动物模型制备

将医用胶主胶与催化剂分别以各自的溶解液溶解,将 PGE1 溶液量取等量的两份分别与主胶和催化剂混合,备用。

40 只兔随机分成假手术组、对照组、PGE1 组、医用胶组,每组 10 只。家兔用戊巴比妥钠 30 mg/kg 全身麻醉,正中切开皮肤,逐层分离,显露右侧颈总动脉并游离出颈外动脉,自颈外动脉穿刺进入导丝,沿导丝送球囊导管进颈总动脉入主动脉弓,高压注射器注入生理盐水充盈球囊至 6 个大气压,机械拖拉球囊至颈总动脉分叉处,抽出生理盐水至负压,再送入球囊加压,如此重复操作 3 次,每次约 30 s,剥脱动脉内膜。结扎颈外动脉,缝合切口。术中 0.1 u/g 肝素抗凝,术后青霉素 80 万单位肌注,标准饲料喂养。PGE1 组在损伤动脉外膜涂布含有 PGE1 的医用胶,覆盖血管。医用胶组在损伤血管外膜涂布医用胶。对照组只进行球囊导管损伤手术。假手术组仅分离和结扎颈外动脉。

1.4 标本采集

建模 2 周后,实验动物全麻下分离颈总动脉,剪取损伤的血管中段约 1 cm,10% 中性福尔马林溶液固定备光镜观察和免疫组织化学检查。

1.5 检查项目

组织学观察:石蜡切片行 HE 染色,100 倍和 200

倍光镜下观察血管内膜增生和平滑肌细胞增殖情况。用计算机图像分析仪测量血管内膜面积、中膜面积、管腔面积和管腔狭窄率,其中狭窄率=内膜面积/(内膜面积+管腔面积)×100%。PCNA 检查:石蜡切片常规脱蜡,灭活内源性酶,微波抗原修复,血清封闭,加 PCNA 抗体于 4℃ 过夜,次日滴加二抗,ABC 法染色,DAB 显色,中性树脂封片。PBS 代替一抗做为阴性对照。细胞核呈棕黄色为阳性细胞。400 倍光镜下计数 8 个视野内的细胞总数和阳性细胞数,比较各组的 PCNA 阳性率。

1.6 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 形态学观察

假手术组:光镜下家兔颈总动脉壁分为内膜、中膜和外膜,内膜和中膜、中膜和外膜分别以内、外弹力板为界。假手术组血管内膜平整、光滑,管腔面被覆的单层内皮细胞连续,无平滑肌细胞存在,内膜面积近似为零。中膜的主要成分是 VSMC(图 2A)。对照组:光镜下内膜明显增厚,多为平滑肌细胞,分数层呈环形排列,内皮细胞排列密集,有内弹力板断裂、消失现象,内膜增生导致管腔狭窄(图 2B)。PGE1 组:光镜下内膜轻度增厚,少见平滑肌细胞,1~3 层内皮细胞表面光滑、排列规则,内弹力板平整连续(图 2C)。医用胶组:此组与对照组在光镜下观察均无显著区别,表明医用胶对于血管内膜增生无明显作用。

2.2 增生指标分析

利用计算机图像分析仪测量血管内膜面积、中膜面积、管腔面积、管腔狭窄率(表 1)。可见 PGE1 组的血管内膜面积、管腔狭窄率较对照组和医用胶组均有明显降低,管腔面积则明显增大,差异有显著性($P < 0.01$),而中膜面积各组之间差异均无显著性($P > 0.05$)。医用胶组和对照组上述指标差异无显著性($P > 0.05$)。说明前列腺素 E1 局部应用可明显抑制兔颈总动脉损伤后内膜增生和平滑肌细胞增殖,而对中膜无明显作用。

2.3 免疫组织化学增殖细胞核抗原检查

可见黄染的 PCNA 阳性细胞多位于血管内膜,PGE1 组 PCNA 阳性表达显著低于对照组和医用胶组,而对照组和医用胶组之间差异无显著性(图 3,表 2)。

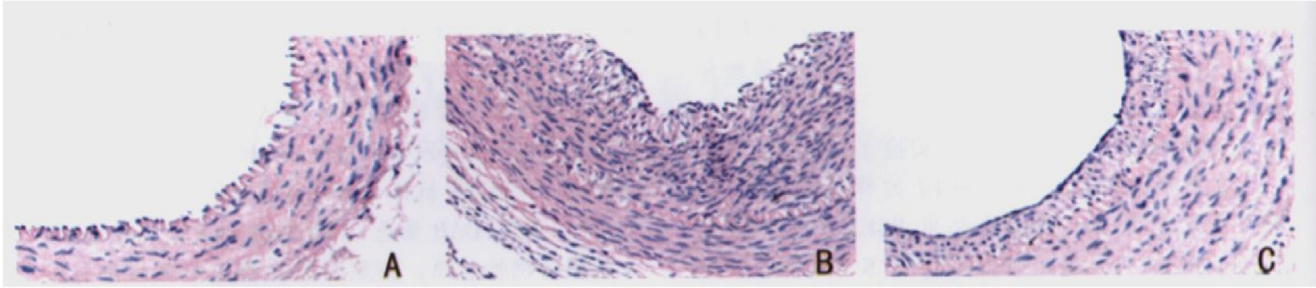


图 2. 各组光镜下 HE 染色(× 200) A 为假手术组, B 为对照组, C 为 PGE1 组。

表 1. 各组实验家兔损伤血管增值指标的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分 组	管腔面积 (mm ²)	内膜面积 (mm ²)	中膜面积 (mm ²)	管腔狭窄率
假手术组	0.276 ± 0.015	0	0.235 ± 0.038	0
对照组	0.197 ± 0.010	0.089 ± 0.019	0.253 ± 0.040	30.86% ± 3.73%
PGE1 组	0.227 ± 0.021 ^a	0.043 ± 0.008 ^a	0.269 ± 0.038	15.83% ± 1.56% ^a
医用胶组	0.201 ± 0.024	0.095 ± 0.013	0.244 ± 0.034	32.06% ± 3.10%

a 为 $P < 0.01$, 与对照组和医用胶组比较。

表 2. 各组增殖细胞核抗原阳性表达细胞比较

分 组	PCNA
假手术组	2.11% ± 0.18%
对照组	41.53% ± 4.51%
PGE1 组	25.20% ± 3.92% ^a
医用胶组	38.9% ± 3.67%

a 为 $P < 0.01$, 与对照组和医用胶组比较。

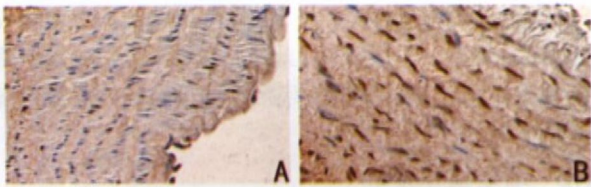


图 3. 增殖细胞核抗原组免疫组织化学结果 (× 400) A 为 PGE1 组, B 为对照组。

3 讨论

各种颈动脉成形术后较高的再狭窄率严重影响了手术的临床效果,原因在于术后血管内膜增生,其中 VSMC 的移行和增殖为再狭窄的病理基础。VSMC 可改变细胞表型,合成型 VSMC 具有增殖和迁移能力,能够分泌多种生长因子和细胞因子,成人 VSMC 主要为收缩型,无增殖能力。内皮细胞损伤,血小板聚集,血小板与损伤的内皮细胞共同分泌多种因子,促使损伤局部的 VSMC 穿过内弹力层移行至内膜,移行的 VSMC 的胞质丰富,合成代谢旺盛, VSMC 由收缩型转化为合成型,引起 VSMC 过度增

殖,导致血管内膜增生^[4]。同时,损伤局部血栓形成、血栓机化和外膜的炎症反应亦是造成再狭窄的原因。目前临床上对于远期的此类再狭窄缺乏有效的治疗方法。

本研究发现,医用蛋白胶携载 PGE1 的缓释效果良好,这可能由于凝胶的纤细的网架状结构形成“贮药库”,凝胶囊壁具有半透膜样性质,药物可依靠浓度差在一定的时间内缓慢渗出。此外,血管外膜给药可使局部药物浓度维持在较高水平,药物易达中膜,并通过血管滋养管到达内膜。同时,血管内弹力板上存在许多小孔, VSMC 的突起可穿过小孔到达血管内皮细胞下^[5]。目前证实分子质量小于 1 000 的小分子物质可通过该部位, PGE1 分子质量仅为 354.49,故可通过小孔到达内皮细胞而发挥作用。由此可见,用医用胶携载药物局部用于血管外膜,药物可持续稳定地作用于血管内膜,是一种理想的给药途径。

前列腺素 E1(PGE1)具有保护血管内皮细胞、抑制 VSMC 的增殖、减少细胞因子的产生、抑制血小板聚集和活化作用。其机制是:抑制血栓素 A2 的释放,调整血中前列环素/血栓素 A2 比值,稳定血小板的细胞膜,抑制血小板聚集。④降低血脂,提高 VSMC 内环磷腺苷水平,抑制动脉粥样硬化斑块形成。④促进钙离子外流,通过调节细胞内钙稳定而保护线粒体功能及细胞膜,减少毒性氧自由基的产生及其对血管内皮细胞的损伤。通过对中性粒细胞的趋化聚集、颗粒酶的释放及氧自由基的产生等的抑制作用减轻损伤局部的炎症反应。研究表明,静脉注射 PGE1 有助于减轻或预防冠状动脉成形术后狭窄;并可改善闭塞性动脉硬化症患者血管内皮功能。

本实验在动脉内膜增生的高峰期即术后 2 周取材,以血管管腔面积、管腔狭窄率、内膜面积、PCNA 阳性率等指标了解血管狭窄的程度。其中 PCNA 是一种存在于细胞核内的核糖蛋白,与 DNA 的复制和

分裂密切相关。正常 VSMC 绝大多数无 PCNA 阳性表达,而在增殖的细胞中 PCNA 表达明显变化。检测其在 VSMC 中的表达可作为评价细胞增殖状态的一个指标。通过对各实验组标本的观察比较:医用胶组和对照组内膜明显增厚,管腔狭窄,增生细胞多为平滑肌细胞,而 PGE1 组内膜轻度增厚,少有平滑肌细胞向内膜迁移;同时 PGE1 组 PCNA 阳性率均显著低于对照组和医用胶组。医用胶组和对照组各指标差异无显著性。可见 PGE1 起主要的治疗作用且治疗效果满意。

综上所述, PGE1 有助于减轻动脉损伤后再狭窄,其作用可能与 PGE1 的抑制血小板聚集、减轻局部炎症反应和保护损伤的内皮细胞有关,但其具体机制尚有待进一步研究。以医用蛋白胶为载体,以

PGE1 为治疗药物,在血管手术时喷涂于损伤的动脉血管局部,可有效地抑制内膜增生而预防术后血管再狭窄,有望成为一种新型的药物辅助治疗方案。

[参考文献]

- [1] Kazmierski MK. III Kliniki Kardiologii Slaskiej Akademii Medycznej w Katowicach [J]. *Wiad Lek*, 2003, **56** (5-6): 260-265.
 - [2] Matsui K, Ikeda U, Murakami Y, Yoshioka T, Shimada K. Intravenous prostaglandin E1 reduces monocyte chemoattractant protein 1 levels in peripheral arterial obstructive disease [J]. *Am Heart J*, 2003, **145** (2): 330-333.
 - [3] 尹翠娟,李显林,高书文. 紫外分光光度法测定注射用前列腺素 E1 的含量[J]. *中国药品标准*, 2005, **6** (1): 11-12.
 - [4] 胡维诚. 外膜是血管病变的积极参与者[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (1): 1-3.
 - [5] Campbell GR, Uehara Y, Mark G, Burnstock G. Fine structure of smooth muscle cells growth in tissue culture [J]. *J Cell Biol*, 1971, **49** (1): 21-34.
- (此文编辑 李小玲)

•读者•作者•编者•

我刊报道的疾病和诊治方法

- | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 肥胖症 | 9.4 动脉硬化性闭塞症 | 15 脑动脉硬化症 |
| 2 小儿肥胖病 | 9.5 动脉硬化性周围动脉缺血 | 16 动脉硬化性精神病 |
| 3 原发性高脂蛋白血症 | 10 高血压病 | 17 其他缺血性脑血管疾病 |
| 4 高脂血症 | 11 周围血管疾病 | 18 粥样栓塞性肾病 |
| 5 原发性肺动脉高压症 | 11.1 血栓闭塞性脉管炎 | 19 肾动脉血栓形成或栓塞 |
| 6 早老症 | 11.2 雷诺综合征 | 20 糖尿病合并心血管疾病 |
| 6.1 弥散性动脉粥样硬化 | 11.3 手足紫绀症 | 20.1 糖尿病并发冠心病 |
| 6.2 冠状动脉栓塞 | 11.4 急性动脉栓塞 | 20.2 糖尿病性心肌梗死 |
| 7 冠状动脉粥样硬化性心脏病 | 11.5 肢端动脉痉挛病 | 20.3 糖尿病并发血管病变 |
| 7.1 原发性心跳骤停 | 12 伯格氏病 | 21 代谢综合征 |
| 7.2 心绞痛 | 13 短暂性脑缺血发作 | 22 血管疾病的影像学诊断 |
| 7.3 心肌梗死 | 13.1 黑矇 | 23 血管疾病的手术疗法 |
| 7.4 冠状动脉性心力衰竭 | 13.2 视野异常 | 23.1 动脉旁路移植术 |
| 7.5 缺血性心律失常 | 14 脑梗死 | 23.2 动脉内膜切除术 |
| 8 急性冠状动脉综合征 | 14.1 脑血栓形成 | 23.3 激光心肌内血管重建术 |
| 9 动脉硬化症 | 14.2 脑血管栓塞 | 23.4 经皮腔内血管成形术 |
| 9.1 颈动脉硬化症 | 14.3 腔隙性脑梗死 | 23.5 其它血管手术 |
| 9.2 肾动脉硬化 | 14.4 多发梗死性痴呆 | 24 血管疾病的基因疗法 |
| 9.3 动脉硬化性主动脉瘤 | | |

(胡必利编写)