

苯妥英钠对大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生的影响

白谊涵¹, 李玉明², 周欣², 姚旻³, 李贺², 庞伟²

(1. 中国人民解放军武警总医院南三科, 北京市 100039; 2. 中国人民解放军武警医学院附属医院心血管病研究所, 天津市 300162; 3. 中国人民解放军武警天津总队医院, 天津市 300162)

[关键词] 内科学; 苯妥英钠; 球囊损伤; 内膜增生; 再狭窄; 细胞外基质

[摘要] 目的 研究苯妥英钠促进创伤修复的特殊药理学作用在大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜修复过程中的影响。方法 采用大鼠颈总动脉内膜球囊损伤模型, 术后大鼠分为苯妥英钠组和损伤组。术后 28 天处死大鼠, 取双侧颈总动脉, 石蜡包埋、切片后进行血管病理学染色分析。结果 术后 28 天, 苯妥英钠组内膜面积($0.154 \pm 0.018 \text{ mm}^2$ 比 $0.204 \pm 0.054 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$)、内膜/中膜面积比(1.70 ± 0.08 比 2.26 ± 0.46 , $P < 0.01$)、再狭窄率($59.5\% \pm 3.2\%$ 比 $75.9\% \pm 13.3\%$, $P < 0.01$)均小于损伤组, 管腔面积($0.106 \pm 0.024 \text{ mm}^2$ 比 $0.063 \pm 0.034 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$)大于损伤组; 内膜细胞密度($72.18 \pm 20.08/\text{cm}^2$ 比 $84.85 \pm 10.77/\text{cm}^2$, $P < 0.05$)、增殖细胞核抗原阳性细胞数(9.89 ± 7.63 个/200 倍视野比 23.03 ± 13.95 个/200 倍视野, $P < 0.01$)和 α -平滑肌肌动蛋白阳性细胞数(30.91 ± 20.05 /200 倍视野比 61.81 ± 16.57 个/200 倍视野, $P < 0.01$)均小于损伤组; 新生内膜中有少量胶原组织增生, 但组间血管胶原面积和密度均无统计学差异($P > 0.05$)。结论 大鼠颈总动脉球囊损伤后 28 天, 苯妥英钠可以抑制损伤血管内膜增生过程中的细胞增生, 促进细胞外基质合成, 对血管损伤后内膜增生和管腔狭窄具有抑制作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Phenytoin on Neointima Formation After Balloon Injury in Rat Carotid Artery

BAI Yi-Han¹, LI Yu-Ming², ZHOU Xin², YAO Min³, LI He², and PANG Wei²

(1. General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162; 3. Tianjin Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

[KEY WORDS] Phenytoin; Balloon Injury; Neointima; Restenosis; Extracellular Matrix

[ABSTRACT] Aim To investigate the special pharmacological effect of phenytoin on the healing process after balloon injury in rat carotid artery. Methods Study was performed on rat model of balloon injury in common carotid artery. Rats survived from successful operation were divided into phenytoin group and injury group. On the 28th day after operation, rats were anesthetized, then the left carotids and the corresponding part of the right carotids were separated, embedded with paraffin, sectioned into 5 μm and stained. Results On the 28th day after operation, the intima area ($0.154 \pm 0.018 \text{ mm}^2$ vs $0.204 \pm 0.054 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$), intima/media area (1.70 ± 0.08 vs 2.26 ± 0.46 , $P < 0.01$) and the rate of restenosis ($59.5\% \pm 3.2\%$ vs $75.9\% \pm 13.3\%$, $P < 0.01$) in phenytoin group were all less than those in injury group, while lumen area ($0.106 \pm 0.024 \text{ mm}^2$ vs $0.063 \pm 0.034 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$) was larger than that in injury group, cell density in intima ($72.18 \pm 20.08/\text{cm}^2$ vs $84.85 \pm 10.77/\text{cm}^2$, $P < 0.05$), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cell counting (9.89 ± 7.63 per 200 magnification vs 23.03 ± 13.95 per 200 magnification, $P < 0.01$) and α -smooth muscle actin positive cell counting (30.91 ± 20.05 per 200 magnification vs 61.81 ± 16.57 per 200 magnification, $P < 0.01$) were all smaller than those in injury group; under polarized light, collagen could be visualized deposite in intima, but there were no statistic difference in collagen area and density ($P > 0.05$).

Conclusion 28 days after vascular injury, phenytoin can decrease the cell number in neointima and promote the synthesis of extracellular matrix which result in diminished neointima thickening.

经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary interventions, PCI) 是目前治疗冠状动脉粥样硬化性血管狭窄的有效手段, 但却造成血管壁机械损伤, 最终导致管腔狭窄, 从而影响了 PCI 的治疗效果。苯

妥英钠是常用的抗癫痫药和 Ib 类抗心律失常药, 自应用之初人们发现该药可以引起牙龈增生, 提示苯妥英钠可以促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成。研究表明血管损伤后再狭窄部位以胶原为主的 ECM 含量明显低于未发生狭窄的部位^[1]。这些研究提示我们: 苯妥英钠能否通过促进 ECM 的增生而减少 PCI 术后再狭窄? 因此, 本实验旨在探讨苯妥英钠促进创伤修复的特殊药理学作用在血管损伤后内膜增生修复中的作用。

[收稿日期] 2007-03-26 [修回日期] 2007-09-25

[作者简介] 白谊涵, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化及血管重塑, E-mail 为 yihanbai@gmail.com。通讯作者李玉明, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为高血压及冠心病的基础与临床, E-mail 为 cardiolab@gmail.com。周欣, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为心血管系统的细胞外基质的重塑。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性 Wistar 大鼠, 体重 300~350 g 之间, 来自军事科学院实验动物中心。适应性喂养 1 周后, 左侧颈总动脉行球囊损伤术, 右侧行假手术。术后大鼠分为苯妥英钠组和损伤组。

1.2 主要实验器材及材料

2F Fogarty 动脉血栓切割球囊 (Edwards Lifesciences), Nikon E600POL 偏振光显微镜、Pixera Pro 150ES CCD 摄像头及图像采集卡和 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件 (Media Cybernetics)。

1.3 动物模型的建立及给药

大鼠称重, 腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg), 麻醉后腹面向上固定于手术操作台上。颈部正中切口, 以止血钳分离皮下组织, 钝性分离颈部肌肉群, 暴露左侧颈总动脉及颈外动脉、颈内动脉分叉部分, 钝性分离动脉血管。用动脉夹分别夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉、颈外动脉的远心端, 暂时阻断血流, 行颈外动脉切口。将 2F Fogarty 动脉血栓切割球囊经颈外动脉切口插入颈总动脉, 向主动脉弓方向插入约 20 mm, 向球囊内注射生理盐水, 使球囊膨胀至回拉时有轻微阻力, 然后旋转向后拉至分叉部位, 抽空球囊里的液体, 重复 3 次, 撤出球囊, 结扎颈外动脉, 撤除动脉夹恢复血流。右侧颈总动脉行假手术: 分离右侧颈总动脉至与左侧相同的程度, 不切开颈外动脉, 也不插入球囊。缝合颈部切口, 肌注青霉素 (20 万 U/kg), 标记大鼠, 放回鼠笼。

苯妥英钠组大鼠通过每天饮水给予苯妥英钠, 每周根据大鼠的体重变化和饮水量的改变调整给药浓度, 使每只大鼠每天的给药剂量达到 100 mg/kg (之前的研究发现此剂量在大鼠可以促进牙龈组织^[2]及梗死心肌组织^[3]中 ECM 的合成)。损伤组大鼠不给予苯妥英钠。术后大鼠均自由饮水。

1.4 标本的采集

各组大鼠均于术后 28 天处死。大鼠称重后腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg), 麻醉后用 PBS 经腹主动脉灌注后, 取下左侧颈总动脉的损伤段及右侧对应部位的颈总动脉 (假手术组)。置于 4% 多聚甲醛中固定 12 h 后, 脱水、透明、石蜡包埋和切片。切片厚度为 5 μ m, 每隔 100 μ m 取一张切片, 进行 HE、维多利亚蓝、苦味酸天狼猩红及免疫组织化学染色, 每种染色取 3 张切片进行分析。

1.5 图像分析方法与观察指标

在普通光镜下 (苦味酸天狼猩红染色切片在偏

振光镜下) 固定各种光学参数, 对标本进行扫描, 以 TIFF 格式存入电脑; 用 Image Pro Plus 4.5 软件进行图像分析。(1) 通过血管维多利亚蓝染色计算: 内膜面积、中膜面积、内膜和中膜面积比 (intima area/media area, IA/MA)、管腔面积、外弹力膜周长及再狭窄率, 再狭窄率 = 内膜面积 / (内膜面积 + 管腔面积) \times 100%。(2) 通过血管 HE 染色计算血管内膜细胞密度 (内膜细胞核数量 / 内膜面积)。(3) 通过苦味酸天狼猩红染色—偏振光法分析, 计算血管内膜胶原面积: 在 40 倍视野偏振光光镜下, 固定显微镜的各项光学常数, 对损伤血管进行扫描, 图像以 TIFF 格式存入电脑; ④在 Image Pro Plus 4.5 环境下打开一幅图像, 将图像色彩由 RGB 模式 (Red, Green, Blue) 转化成 HIS 模式 (Hue, Intensity, Saturation), 将原图像分割成只含 iv 型胶原的红色和橙黄色区域和只含 ④型胶原的绿色区域的新图; ④将图像转化为 Gray Scale 8 形式的灰阶图像, 对灰阶图像进行 Histogram 分析, 得出胶原总面积 (用像素数表示)。胶原密度 = 内膜胶原面积 / 内膜面积。(4) 通过免疫组织化学分析计算内膜 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 阳性细胞数: 在 200 倍视野普通光镜下, 对损伤血管内膜选取 8~10 个视野进行扫描, 图像以 TIFF 格式存入电脑; 在 Image Pro Plus 4.5 环境下打开一幅图像, 采用 HIS 图像模式对阳性区域进行色彩分割; 利用软件中的 Count and Size 功能自动计算出阳性细胞的数量。

1.6 统计学处理

所有数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对两组数据进行方差齐性检验, 组间比较在方差齐时用 LSD-*t* 检验, 方差不齐时采用 Tamhane 检验。

2 结果

2.1 病理切片观察

术后 28 天, 假手术组血管无新生内膜增生; 损伤组血管内膜增厚, 管腔变窄; 苯妥英钠组内膜厚度明显小于损伤组, 管腔面积大于损伤组 (图 1)。增生内膜中细胞数量增多, 周围以 ECM 成分填充, 其中有少量胶原组织沉积, 以 ④型胶原为主 (图 2)。

2.2 血管内膜增生指标和重构指标分析

术后 28 天, 各组损伤血管中膜面积无明显差异 ($P > 0.05$), 苯妥英钠组内膜面积和 IA/MA 明显小于损伤组 ($P < 0.01$), 管腔面积明显大于损伤组 ($P < 0.01$), 再狭窄率低于损伤组 ($P < 0.01$, 表 1)。

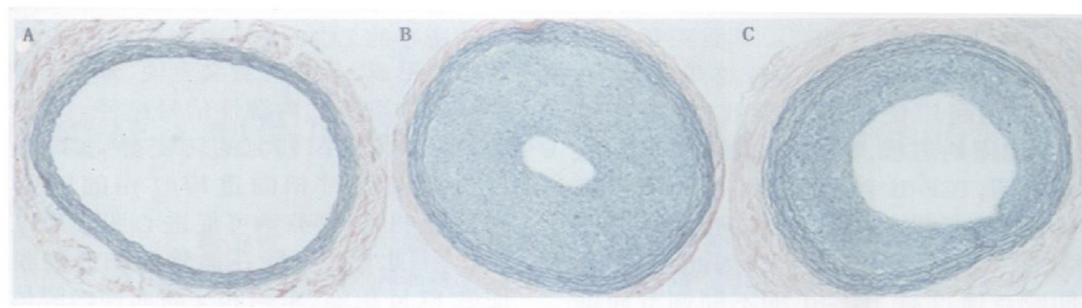


图 1. 术后 28 天血管弹力膜染色(维多利亚蓝, $\times 40$) A 为假手术组, B 为损伤组, C 为苯妥英钠组。

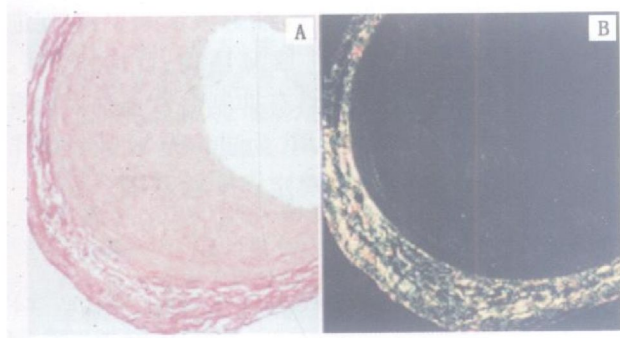


图 2. 术后 28 天损伤血管苦味酸天狼猩红染色 ($\times 40$) A 为普通光显微镜下观察, 内膜中红色区域为胶原沉积区域; B 为偏振光显微镜下观察, 内膜中绿色区域为 α 型胶原沉积的区域。

表 1. 术后 28 天两组血管内膜增生指标和重构指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

参 数	损伤组	苯妥英钠组
内膜面积 (mm^2)	0.204 ± 0.054	0.154 ± 0.018^a
中膜面积 (mm^2)	0.089 ± 0.009	0.090 ± 0.010
IA/MA	2.26 ± 0.46	1.70 ± 0.08^a
外弹力膜周长 (mm)	2.098 ± 0.139	2.052 ± 0.186
管腔面积 (mm^2)	0.063 ± 0.034	0.106 ± 0.024^a
再狭窄率	$75.9\% \pm 13.3\%$	$59.5\% \pm 3.2\%^a$

a 为 $P < 0.01$, 与损伤组比较。

2.3 血管内膜胶原面积和密度

术后 28 天, 在偏振光显微镜下观察发现血管新生内膜中有少量胶原组织增生, 主要以 α 型胶原为主, iv型胶原含量极少, 在有些血管甚至缺失。损伤组与苯妥英钠组血管内膜胶原总面积 (1493.2 ± 1566.3 像素/ μm^2 比 943.5 ± 659.0 像素/ μm^2) 和密度 ($0.76\% \pm 0.79\%$ 比 $0.70\% \pm 0.63\%$) 差别均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 血管内膜细胞密度

术后 28 天, 苯妥英钠组血管内膜细胞密度小于损伤组 ($72.18 \pm 20.08/\text{cm}^2$ 比 $84.85 \pm 10.77/\text{cm}^2$, $P < 0.05$), 同时 PCNA (9.89 ± 7.63 个/200 倍视野比 23.03 ± 13.95 个/200 倍视野) 和 α SMA 阳性细胞数

(30.91 ± 20.05 个/200 倍视野比 61.81 ± 16.57 个/200 倍视野) 亦均小于损伤组 ($P < 0.01$, 图 3)。苯妥英钠组内膜细胞密度降低, 因此细胞外基质成分相对增多。

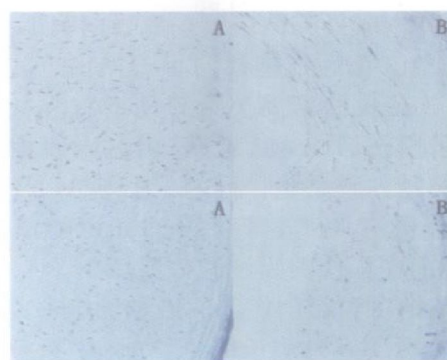


图 3. 术后 28 天损伤血管增殖细胞核抗原(上)和 α 平滑肌肌动蛋白(下)免疫组织化学染色 ($\times 100$) A 为损伤组, B 为苯妥英钠组。

3 讨论

本实验结果表明, 术后 28 天苯妥英钠可以抑制损伤血管内膜的细胞增生, 促进 ECM 的合成, 对血管损伤后的内膜增生和管腔狭窄具有抑制作用。那么, 苯妥英钠抑制血管损伤后内膜增生的作用是如何实现的呢?

有研究^[4]表明, 血管内皮剥脱可以引起损伤血管内膜血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖, 但是再内皮化后, 增生停止。从而说明再生的内皮细胞可以抑制内膜 VSMC 增殖。研究^[5]表明, 苯妥英钠用于表皮溃疡、烧伤或其它伤口表面可以加速伤口愈合, 加速表皮的迁移和血管生成。因此, 苯妥英钠可能通过促进血管损伤后的再内皮化而抑制 VSMC 增殖。

苯妥英钠可使创伤部位的转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的表达发生改变, 且具有时间依赖性, 在损伤修复的早期注射苯妥英

钠 1 h 后即可促进 TGF- β 的表达^[6]。苯妥英钠可激活创伤部位巨噬细胞和成纤维细胞分泌 TGF- β ^[7]。TGF- β 1 在许多细胞起广泛的生物学效应,可调节 ECM 的合成、细胞周期进程、凋亡、分化和迁移。与其它生长因子不同,TGF- β 1 对血管损伤后内膜增生和动脉粥样硬化的影响非常复杂,具有环境特异性、细胞表型特异性^[8]和时间特异性^[9]。因此,苯妥英钠可能在不同时点通过对 TGF- β 1 的不同调节而抑制损伤血管内膜增生,但具体机制需进一步探讨。

基因芯片研究^[6]表明,苯妥英钠可促进基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 的表达,而 MMP-1 可促进 VSMC 迁移,并激活 MMP-2。MMP-1 和 MMP-2 激活协同 MMP-9 可增加某些凋亡调节因子的蛋白酶活性,从而促进 VSMC 凋亡。

本实验中,苯妥英钠组损伤血管内膜细胞计数、PCNA 和 α SMA 阳性细胞数均小于损伤组。通过上述分析,可初步推断苯妥英钠可能通过多种机制共同抑制血管损伤后 VSMC 增殖,引起内膜中细胞数量减少而抑制内膜增生。同时,细胞凋亡与内膜细胞密度的降低有关^[10],苯妥英钠亦可能通过促进 VSMC 凋亡而使损伤内膜细胞数量减少。

苯妥英钠可引起创伤部位巨噬细胞和成纤维细胞增加^[2,11],分泌多种生长因子,如血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 和 TGF- β 1 等,促进创伤部位新生血管形成和 ECM 沉积;亦可促进肌成纤维细胞(myofibroblast) 的增生^[6],合成大量的胶原和氨基葡聚糖;促进与 ECM 和粘附反应相关的一些整合素分子、层粘连蛋白及纤维连接蛋白的表达,使 ECM 沉积增加^[7]。这些与本实验结果相符,血管损伤后 28 天,苯妥英钠组血管内膜细胞密度降低,而 ECM 成分相对增多。

研究^[1]表明,在兔球囊损伤模型中,再狭窄血管中以胶原为主的 ECM 含量明显低于无再狭窄血管。ECM 成分相对增多,而血管内膜增生反而减少,考虑与 ECM 沉积后的压缩、重构和交联增加有关。血管损伤后 2~12 周,内膜增生主要以 ECM 的合成和聚集为主。因此后期的血管内膜厚度可能主要取决于 ECM 的重构。本实验中,血管损伤后 28 天,ECM 成分相对增多,而血管新生内膜面积、IA/MA 及再狭窄率均小于损伤组,管腔面积大于损伤组,亦可能与 ECM 的重构有关。因此,ECM 合成增加并不意味着内膜不断增厚和管腔狭窄。另有研究^[11]表明,苯妥

英钠诱导的 ECM 成分增多伴随肌成纤维细胞增加及瘢痕形成,从某种意义上说,苯妥英钠可能模拟创伤修复中重构的内源性信号途径。肌成纤维细胞的增加与晚期组织修复的转变有关,与组织伤口愈合过程从炎症时相向重构时相的转变有关^[3]。研究^[12]表明,苯妥英钠可促进心肌梗死区胶原组织的交联,因此它有可能在血管损伤后内膜增生的后期促进 ECM 压缩、重构和交联而使内膜体积减小。

综上所述,血管损伤后 28 天苯妥英钠对内膜增生的抑制作用主要表现在: ①抑制损伤血管内膜细胞增生或促进细胞凋亡,引起细胞数量减少;②促进 ECM 合成和沉积,晚期促进 ECM 压缩、重构和交联。本研究结果提示苯妥英钠具有抑制血管损伤后内膜增生和改善管腔狭窄的作用,为进一步对其具体作用机制的探讨和临床应用奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] Coats WD Jr, Whittaker P, Cheung DT, Currier JW, Bo Han, Faxon DP. Collagen content is significantly lower in restenotic versus nonrestenotic vessels after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit model [J]. *Circulation*, 1997, **95** (5): 1 293-300.
- [2] Dill RE, Lacopino AM. Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth [J]. *J Periodontol*, 1997, **68** (4): 375-380.
- [3] 周欣, 李玉明, 姬文婕, 徐鹏霄, 庞伟, 齐刚. 苯妥英钠促进心肌梗死后组织修复过程的实验研究[J]. *中华心血管杂志*, 2004, **32** (4): 68-73.
- [4] Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury [J]. *Arteriosclerosis*, 1990, **10** (6): 1 082-087.
- [5] Dill RE, Miller EK, Weil T, Lesley S, Farmer GR, Lacopino AM. Phenytoin increases gene expression for platelet-derived growth factor B chain in macrophages and monocytes [J]. *J Periodontol*, 1993, **64** (3): 169-173.
- [6] Swamy SM, Tan P, Zhu YZ, Lu J, Achuth HN, Mochhala S. Role of phenytoin in wound healing: microarray analysis of early transcriptional responses in human dermal fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314** (3): 661-666.
- [7] Nakade O, Baylink DJ, Lau KH. Phenytoin at micromolar concentrations is an osteogenic agent for human mandible-derived bone cells in vitro [J]. *J Dent Res*, 1995, **74** (1): 331-337.
- [8] Otsuka G, Agah R, Frutkin AD, Wight TN, Dichek DA. Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor 1-dependent pathways [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (4): 737-743.
- [9] Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu CB, Dong G, Woodward RN, et al. Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (12): 6 983-988.
- [10] Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture [J]. *Circ Res*, 2000, **87** (3): 184-188.
- [11] Dill RE, Davis WL, Zimmermann ER. Quantitation of phagocytic cells in phenytoin-induced connective tissue proliferation in the rat [J]. *J Periodontol*, 1988, **59** (3): 190-197.
- [12] Zhou X, Li YM, Ji WJ, Jiang TM, Sun XN, Zhu Y, et al. Phenytoin can accelerate the healing process after experimental myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2006, **107** (1): 21-29.

(此文编辑 许雪梅)