

# 几丁聚糖对大鼠颈动脉球囊损伤术后血管内膜增生的影响

李主生<sup>1</sup>, 王金林<sup>2,3</sup>, 谭小进<sup>3</sup>

(1. 耒阳市人民医院, 湖南省耒阳市 421800; 2. 深圳市职业病防治院, 广东省深圳市;

3. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 几丁聚糖;  $\alpha$  肌动蛋白; 血管内皮生长因子; 再内皮化

[摘要] 目的 研究几丁聚糖对大鼠颈动脉球囊损伤术后再狭窄的影响, 并探讨其机制。方法 60 只 SD 大鼠分为几丁聚糖组和模型组各 30 只。复制大鼠颈动脉球囊损伤模型。几丁聚糖组在术前 1 周即开始每天一次灌胃几丁聚糖 2 g, 并在术后继续给予至处死; 模型组只建立模型但不予以任何处理。分别于手术后即刻(0 d)、7 d、14 d、28 d 和 35 d, 每组各处死大鼠 6 只。光镜下观察血管内膜损伤; 运用图形分析系统检测增殖的内膜面积;  $\alpha$  肌动蛋白免疫组织化学检测增殖内膜细胞的性质, 血管内皮生长因子免疫组织化学标记血管内皮细胞明确损伤后血管内皮修复情况。结果 模型复制成功 53 例, 几丁聚糖组 28 例, 模型组 25 例。手术后即刻见血管内膜完全剥脱, 部分可见平滑肌细胞断裂。手术后 7 d 可见内膜增生。模型组血管内膜在第 28 天增生达高峰, 几丁聚糖组内膜增生在术后 14 d 达到高峰。几丁聚糖组与模型组比较内膜增生程度差异有显著性( $P$  均 $<0.05$ )。 $\alpha$  肌动蛋白检测结果显示增殖的内膜细胞为血管平滑肌细胞。血管内皮生长因子检测结果显示几丁聚糖组在手术后 14 d 血管完全再内皮化, 而模型组手术后 28 d 才完全再内皮化。结论 几丁聚糖能预防大鼠颈动脉球囊损伤术后再狭窄, 其机制可能与几丁聚糖促进血管再内皮化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effect of Chitosan on the Endothelial Regeneration and Neointimal Proliferation After Arterial Balloon Angioplasty in Rat

LI Zhur Sheng, WANG Jin Lin, and TAN Xiao Jin

(The People's Hospital of Leiyang City, Leiyang 421800, China)

[KEY WORDS] Chitosan;  $\alpha$ -Actin; Vascular Endothelial Growth Factor; Reendothelialization

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of chitosan on the endothelial regeneration and neointimal proliferation after balloon angioplasty of right carotid artery in rat. Methods Endothelial denudation of artery in rat were performed with 2F balloon catheter. 50 SD rats were randomly divided into the model group and the chitosan group. Artery were harvested on 0 d, 7 d, 14 d, 28 d and 35 d after the injury, respectively. The reendothelialization and the neointimal hyperplasia were observed cross sections stained with hematoxylin eosin from the injured segments processed for histological and morphological study by computer-assisted picture analysis system. Results Chitosan enhanced the reendothelialization of the injured arterial determined vascular endothelial growth factor (VEGF) staining. The absolute reendothelialization was observed on 14 d in chitosan group but on 28 d in the model group. Intimal hyperplasia and lumen stenosis can be seen on the 7 d after injury. At the 28th day the intimal thicken reached at a peak. In the chitosan group the intimal thicken reached at a peak at the 14th day. There were significant difference of neointimal in the chitosan group and the model group on the 14th day, 28th day and 35th day.

Conclusions Chitosan is effective on intimal hyperplasia and lumen stenosis after arterial injury by inhibiting neointimal proliferation which is related to the reendothelialization.

目前经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal catheter angioplasty, PTCA)和支架置入已成为治疗冠心病的重要手段,但是介入治疗后的再狭窄一直是困扰医学界的一大难题。冠状动脉血管成形术后 6 个月内再狭窄发生率高达 30%~

50%<sup>[1]</sup>。目前普遍认为再狭窄是血管对抗损伤的一种异常修复反应,表现为过度的组织增生。以雷帕霉素为代表的药物洗脱支架的应用使再狭窄率低于 5%,但由于雷帕霉素在抑制血管内膜增生的同时也抑制了血管内皮细胞的增殖和血管的再内皮化,导致血管延迟愈合,是迟发血栓形成的主要原因<sup>[2]</sup>。因此找到一种既能抑制血管内膜增生又能促进血管内皮细胞生理性修复的支架涂层药物成了近年来研究的热点。本实验采用几丁聚糖灌胃的方法研究几丁聚糖能否预防大鼠颈动脉球囊损伤术后再狭窄,

[收稿日期] 2007-11-26

[修回日期] 2008-03-20

[作者简介] 李主生,副主任医师,主要研究方向为冠心病防治。王金林,硕士研究生,主治医师, E-mail 为 wangjinlin168@yahoo.com.cn。通讯作者谭小进,教授,硕士研究生导师,主要研究方向为冠心病介入治疗。

观察了大鼠颈动脉球囊损伤术后血管内膜的增生情况及血管内皮细胞的修复。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

$\alpha$ -Actin 单克隆抗体和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体均为美国 NeoMarkres 公司产品; DAB 显色试剂盒及即用型第二代免疫组织化学 Elivison™ plus 广谱试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; 几丁聚糖为美国 Sigma 公司产品。医用净化工作台 SW-CU-2Fb 型(苏州泰安空气技术有限公司), PTCA 球囊 2.5 mm × 20 mm(美国波士顿), 冠状动脉 0.36 mm PT 导丝(美国强生公司), 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

### 1.2 动物分组与给药处理

雄性 Sprague-Dawley 大鼠(体重 400~500 g) 60 只, 由南华大学实验动物部提供。将 60 只大鼠随机分为几丁聚糖组和模型组, 每组各 30 只。所有实验动物适应性喂养 2 周, 模型组给予普通饲料喂养, 几丁聚糖组在给予普通饲料喂养的基础上每天给予几丁聚糖 2 g 灌胃一次, 并于模型建立后继续每天给予几丁聚糖 2 g 灌胃一次直至处死。模型组模型建立后仍然给予普通饲料喂养。

### 1.3 模型复制

向大鼠腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠注射液(1 mL/kg), 待大鼠完全麻醉后将其固定在大鼠固定器上。尾静脉注射肝素 100 u/kg, 常规消毒大鼠颈前皮肤, 在颈前做一正中切口, 切口长 3.5~4 cm。在右侧气管旁找到右颈总动脉, 用血管分离棒沿肌丝方向钝性分离出右颈总动脉, 用眼科剪分离出与右颈总动脉伴行的迷走神经和交感神经。其近心端和远心端各穿一 4 号丝线待用。在右胸锁乳突肌乳突端找到右颈外、颈内动脉分叉处。靠近分叉处用血管分离棒轻轻分离颈外动脉, 其近心端和远心端各穿一 4 号丝线待用。双结结扎颈外动脉远端。轻轻提拉颈外动脉近心端预先穿好的丝线暂时阻断血流, 用三角缝针逆行在血管表面刺一小孔, 用无齿镊将小孔轻轻扩大。缓慢置入导丝并插至膈肌水平。PTCA 球囊导管沿导丝插入颈总动脉约 3 cm, 在直视下观察球囊的插入深度, 肝素生理盐水充盈球囊, 缓慢回抽球囊至动脉分叉处, 反复 3 次剥脱内膜。结扎颈外动脉近段, 查看颈总动脉和颈内动脉搏动良好。切口用甲硝唑注射液反复冲洗, 逐层缝合皮下

组织与皮肤。术后肌肉注射头孢噻肟钠 0.1 g 每日一次共 3 d 预防感染。

### 1.4 病理学分析及免疫组织化学检测

分别于术后 0 d、7 d、14 d、28 d 和 35 d 取材。向大鼠腹腔内注射过量的 3% 戊巴比妥钠注射液, 取出损伤部位的右颈总动脉约 2 cm 长, 将取出的标本置入 PBS 缓冲液反复冲洗后置入 10% 甲醛溶液中固定 24 h。50%、70%、85% 和 95% 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后行病理切片。每个标本均匀间断切片 8 张, 切片厚度 4  $\mu$ m。4 张行苏木精(Hematoxylin)和伊红(Eosin)染色, 另 4 张行免疫组织化学染色。在倒置显微镜下观察血管内膜增生情况, 以内弹力板和外弹力板为标准区分内膜、中膜和外膜。利用江苏捷达图象分析软件测量内膜面积。 $\alpha$ -Actin 单克隆抗体和 VEGF 单克隆抗体检测血管内膜增生细胞的性质及血管内膜再内皮化情况, 具体操作方法及评判标准参照厂家提供的说明书进行。

## 2 结果

模型复制成功 53 例, 几丁聚糖组 28 例, 模型组 25 例。光镜下见正常大鼠颈动脉内膜为单层内皮细胞, 中膜一般由 4~5 层环行排列呈波浪状的弹性膜和平滑肌细胞组成, 外膜由结缔组织组成(图 1A)。球囊损伤后即刻, 可见动脉内皮剥脱, 个别处内弹力板破裂, 内弹力板由正常时的波浪状变平坦, 失去弹性(图 1B)。模型组损伤 7 d 后可见新生内膜形成并增厚, 第 14 天内膜继续增厚, 损伤后 28 d 内膜增生达高峰, 管腔严重狭窄(图 1C); 而几丁聚糖组损伤后 14 d 内膜增生达高峰(图 1D)。 $\alpha$ -Actin 免疫组织化学检测发现血管内膜增生的细胞为血管平滑肌细胞(图 2)。VEGF 免疫组织化学检测发现模型组在术后 28 d 血管完全再内皮化(图 2), 而几丁聚糖组在手术后 14 d 血管完全再内皮化。与模型组比较, 几丁聚糖组增生的内膜面积在术后 14 d、28 d 和 35 d 时差异均有显著性( $P < 0.001$ , 表 1)。

表 1. 不同时间点血管内膜面积的变化( $\text{mm}^2$ )

	模型组	几丁聚糖组
术后 7 d	0.034 $\pm$ 0.009	0.034 $\pm$ 0.007
术后 14 d	0.105 $\pm$ 0.008	0.102 $\pm$ 0.013 <sup>ab</sup>
术后 28 d	0.203 $\pm$ 0.008 <sup>c</sup>	0.106 $\pm$ 0.068 <sup>a</sup>
术后 35 d	0.201 $\pm$ 0.007	0.084 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与模型组相同时间点比较; b 为  $P < 0.001$ , 与本组术后 7 d 比较; c 为  $P < 0.001$ , 与本组术后 7 d 和 14 d 比较。

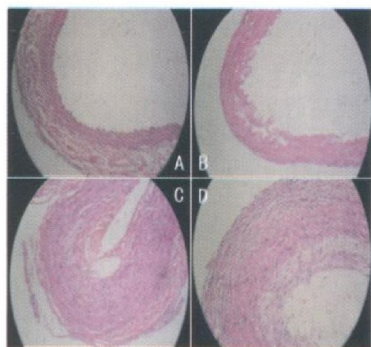


图 1. HE 染色结果 A 为正常血管内膜 ( $\times 200$ ), B 为模型组术后即刻 ( $\times 200$ ), C 为模型组术后 28 d ( $\times 100$ ), D 为几丁聚糖组术后 14 d ( $\times 100$ )。

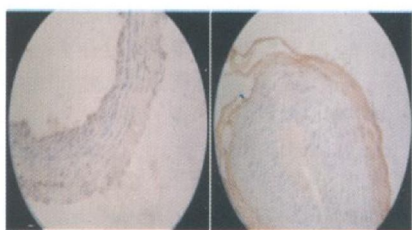


图 2. 模型组术后 28 d  $\alpha$ -Actin(左)和血管内皮生长因子(右)免疫组织化学检测结果 ( $\times 200$ )

### 3 讨论

目前以 PTCA 和支架置入为代表的经皮冠状动脉介入治疗已成为治疗冠心病的重要手段,但是介入治疗后的再狭窄一直是困扰医学界的一大难题,也是近年来研究的热点。目前普遍认为再狭窄是血管对抗损伤的一种异常修复反应,表现为过度的组织增生。其机制主要在三个方面:术后血管的收缩重构、局部的炎症与血栓形成以及血管内膜增生<sup>[3]</sup>。以雷帕霉素药物洗脱支架为代表的药物洗脱支架的应用使再狭窄发生率有明显的下降,但是也带来了新的问题。雷帕霉素主要的作用机制是抑制血管内膜的增生,但是这种抑制作用是非选择性的,它在抑制血管内膜增生的同时也抑制了血管内皮细胞的增殖和血管的再内皮化,是迟发性血栓形成的主要原因。Christian Spaulding 等<sup>[4]</sup>研究了雷帕霉素药物洗脱支架的安全性,结果表明在植入支架 4 年后,植入雷帕霉素药物洗脱支架病人的生存率为 93.9%,而裸支架组病人的生存率为 94.6%。这使得药物洗脱支架的应用受到了质疑。血管内皮细胞是一层连续覆盖于整个血管腔表面的扁平细胞,具有许多重要的生理功能,是血液与血管壁和组织之间的物理

化学屏障。血管成形术及支架植入术不可避免地导致血管内皮细胞损伤,受损的内皮细胞一氧化氮和前列环素分泌减少,炎症细胞浸润,抗血小板聚集和抗血栓形成的作用减弱,血管的舒缩功能失调,局部的炎症发生和血栓的形成使得血管内皮细胞的屏障作用消失,抗增殖作用减弱,血管平滑肌细胞在内皮缺失的部位移行和过度增殖,从而导致血管再狭窄的发生<sup>[5]</sup>。几丁聚糖是高分子匀聚糖,巨大的分子结构中,每一个单位的分子都具有正电子氨基和负离子羟基,形成静电整合场,其分子结构单元是 2-氨基葡萄糖,与人体组织相容性好,无毒,可吸收,不会引起免疫性排斥。几丁聚糖具有抑制纤维细胞生长、阻止和促进上皮细胞生长及使损伤组织生理性愈合的特性,已经广泛应用于外科手术切口缝合、关节和人造皮肤等<sup>[6]</sup>。汤朝辉等<sup>[7]</sup>研究证实几丁聚糖能使血管内皮细胞的生长周期中 S 期和 G2 期比例增加,表明几丁聚糖可通过提高进入细胞周期数目来促进细胞的增殖。本实验发现给予几丁聚糖干预后血管内膜的增生明显被抑制,与模型组比,几丁聚糖组内膜增生在术后 14 d、28 d 和 35 d 均显著下降,模型组内膜增生在术后 28 d 达高峰,而几丁聚糖组在术后 14 d 就已达高峰,提示几丁聚糖对损伤后血管内膜的增生有明显抑制作用。通过免疫组织化学分析证实增生的细胞为血管平滑肌细胞,模型组血管内膜在术后 28 d 完全再内皮化,但是几丁聚糖干预治疗后血管内膜在术后 14 d 即完全再内皮化,并且血管内膜的增生被明显抑制,由此可以证实几丁聚糖可通过促进血管内膜的再内皮化而抑制血管内膜的增生,可以起到预防再狭窄的作用。

### [参考文献]

- [1] Pan CJ, Wang J, Huang N. Recent progress in in-stent restenosis [J]. *Chin J Biomed Eng (Chin)*, 2004, 23 (2): 152.
- [2] Michael Joner, Finn AV, Andrew Farb, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans delayed healing and late thrombotic risk [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48: 193-202.
- [3] Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, et al. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1991, 17: 758-769.
- [4] Christian Spaulding, Joost Daemen, Eric Boersma, et al. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents [J]. *NEJM*, 2007, 356: 989-997.
- [5] Amir Lerman. Restenosis another "dysfunction" of the endothelium [J]. *Circulation*, 2005, 111: 8-10.
- [6] 王明民, 侯希敏, 郭永强. 几丁聚糖影响肌腱愈合的实验研究及临床应用技术[J]. *中国创伤杂志*, 2001, 17: 138-139.
- [7] 汤朝辉, 侯春林, 顾其胜. 几丁聚糖和透明质酸钠对血管内皮细胞增殖的影响[J]. *上海生物医学工程*, 2002, 23 (2): 11-14.

(此文编辑 胡必利, 许雪梅)