

腹主动脉瘤发病中平滑肌细胞增殖与凋亡的关系

吴建秋, 景在平

(第二军医大学附属长海医院血管外科, 上海 200433)

[主题词] 主动脉瘤, 腹; 疾病模型, 动物; 细胞周期

[摘要] 探讨在腹主动脉瘤形成过程中细胞周期调控下的细胞增殖与死亡的关系。选取豚鼠—大鼠异种移植腹主动脉瘤模型, 以平滑肌细胞 α -肌动蛋白、增殖细胞核抗原抗体免疫组织化学检测和原位末端 DNA 标记法分别作为血管平滑肌细胞定性定位、细胞增殖与凋亡分析方法, 利用计算机图像分析技术动态观测术后 1、2、3、4 周阳性细胞灰度值和百分比。结果发现, 1~2 周, 移植腹主动脉直径已有中度扩张, 细胞增殖指数大于细胞凋亡指数; 3~4 周, 移植瘤呈显著扩张, 细胞凋亡指数大于细胞增殖指数; 移植组血管平滑肌细胞凋亡与移植动脉直径呈现显著正相关。证明细胞增殖和凋亡贯穿于腹主动脉损伤重构的全过程, 两者平衡失调导致了腹主动脉瘤的形成和发展。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

Relation between Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Apoptosis during Abdominal Aortic Aneurysm Formation

WU Jian-Qiu, and JING Zai-Ping

(Department of Vascular Surgery, Changhai Hospital, Secend Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[MeSH] Aortic Aneurysm, Abdominal; Disease Model, Animal; Cell Cycle

[ABSTRACT] **Aim** To assess the corelation between vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis, under the regulation of cell cycle, during abdominal aortic aneurysm formation and development. **Methods** Guinea pig-SD rat abdominal aorta xenografts were used as experimental model. Immunohistochemistry and in situ end-labeling of DNA fragments determined vascular smooth muscle cell and their proliferation and apoptosis. Cell proliferation and apoptosis index were counted with the use of computer-generated image analysis at 1, 2, 3, 4 week after transplantation. **Results** Graft dilation, during 1-2 weeks, were moderate, but marked in the later 2 weeks in comparison to the controls. Vascular smooth muscle cell proliferation proceeds apoptosis by 2 weeks, and shifts to the contrary in another 2 weeks. The abdominal aortic diameter had a significant correlation with increasing vascular smooth muscle cell apoptosis in xenograft. **Conclusion** vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis is connected with abdominal aortic structure damage and remodeling, whose imbalance contributes to abdominal aortic aneurysm formation and development.

在血管重构过程中, 细胞增殖和凋亡对维持细胞与细胞外基质间的平衡起着重要的作用。腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA) 是血管损伤重构的典型, 生理状态下的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖与凋亡之间的动态平衡必然受到破坏。VSMC 凋亡在 AAA 发病中的作用已得到肯定^[1]。本研究采用一种新型 AAA 大鼠模型^[2,3], 初步探讨 VSMC 增殖与凋亡在 AAA 发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

供体与受体分别为豚鼠和 SD 大鼠, 雄性, 350~

400 g, 购自上海必凯实验动物公司, 无特殊病原体级饲养于本校东方肝胆医院实验动物中心。移植前后普通饮食, 未用免疫抑制剂及抗生素等治疗。供体移植瘤为肾下腹主动脉 1 cm, 正位替换受体同部位主动脉, 无扭曲。腹主动脉阻断时间控制在 50 min 内, 最短为 30 min。复通后移植瘤及远端吻合口以下主动脉血流通畅, 充盈度好。按移植类型分组:

实验组: 豚鼠—SD 大鼠腹主动脉异种移植; ④对照组: 同批 SD 大鼠自体腹主动脉离断后复位。每组 15 只, 共 3 批。

1.2 标本收集与处理

第 1、2 批分别于术后 1、2、3、4 周, 取 3 只活存受体, 第 3 批于第 4 周取活存受体, 剖腹用游标卡尺观测移植瘤外径及通畅情况。然后分别于移植瘤吻合口上下各 5 mm 夹闭主动脉, 10% 福尔马林 11.97 kPa 灌注 30 min, 切取该段移植瘤石蜡包埋, 连续 5 μ m 切片, -20℃保存备用。

[收稿日期] 2002-01-22 [修回日期] 2002-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金(39770721)资助。

[作者简介] 吴建秋, 女, 1970 年出生, 医学博士, 主要从事主动 0 脉瘤发病机制的研究; E-mail: jianqiu_wu@yahoo.com。

1.3 原位末端 DNA 标记及免疫组织化学检测

免疫组织化学检测采用常规 ABC 法, 羊抗大鼠平滑肌细胞 α -肌动蛋白多克隆抗体、小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原 (proliferous cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体购自 Dako 公司 (稀释度 1: 25~ 1: 50)。TUNEL 试剂盒购自 Dako 公司。各指标检测严格按照试剂盒说明书操作, 相邻连续切片进行平滑肌细胞、增殖细胞及凋亡细胞的定性定位。

1.4 计算机图像分析

连续切片经上述标记后不进行常规苏木素衬染, 于光镜下放大 400 倍, 经计算机图像分析系统 (主要包括 CA6300 彩色图像卡、通用颗粒图像分析系统软件及德国莱卡 QWin 彩色图像分析软件) 随机选取 10 个视野, 检测阳性染色平均光密度和阳性细胞百分比 (阳性细胞核数占视野中所有细胞核总数的百分比), 分别计算细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI) 或增殖指数 (proliferous index, PI) (AI 或 PI = 平均光密度 \times 阳性细胞百分比 \times 100)。同时进行测量移植物内外径。

1.5 统计学分析

各计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 10.0 软件进行方差分析, 两组变量的关系用直线回归分析。

2 结果

2.1 形态学观察

大体形态: 术后 4 周内每周进行大体观测。

移植物在位通畅, 在异种移植组, 所有移植物直径随时间逐渐增大, 至 4 周末, 平均直径为移植前 (1.68 \pm 0.37 mm) 的 5~ 6 倍。剖视腔内无血栓, 吻合口无狭窄。在第 4 周, 分别于第 25 及第 27 天 2 只扩张的移植物发生破裂。在对照组, 直径不增大或狭窄。

④组织形态: 术后 1~ 4 周 HE 切片。在实验组, 移植物于 2 周后明显扩张。外膜炎性细胞浸润逐渐加重, 至 4 周末部分炎性细胞侵犯中膜外层。中膜逐渐变薄, 内膜呈现不同程度增厚, 且不均匀, 内外膜厚度比例倒置。对照组有轻度内膜增生, 以吻合口较重, 但内外径无明显改变。④计算机图像分析测量结果见表 1, 尽管出现内外膜厚度变化, 但实验组内外径较对照组显著增大 ($P < 0.01$)。

2.2 细胞增殖与凋亡指数

见表 1。利用免疫组织化学方法, 对 α -肌动蛋白阳性平滑肌细胞进行定性定位后, 相邻切片 PCNA 阳性细胞于 2 周前明显增加 (图 1c), 自 4 周才出现减少, 但仍较术前明显增高; 增殖细胞主要位于内膜, 部分位于中膜内侧。2 周内, 实验组 TUNEL 阳性细胞较对照组增高, 但增加的比率低于增殖细胞, 自 3 周后呈逐渐增大趋势, 4 周末, 凋亡细胞贯穿血管 (瘤) 壁 (图 1b), 无特异性解剖分布, 纵向分布也均匀。超微结构进一步证实了 VSMC 凋亡细胞特征, 包括核压缩、核碎片, 严重者出现胞浆压缩, 呈典型环形 (图 1a)。VSMC 凋亡与移植物外径间呈显著正相关 ($r = 0.75, P < 0.001$), 见图 2。

表 1. 腹主动脉移植后 1~ 4 周移植植物形态定量特征。

Table 1. Morphologic characteristics of abdominal aortic 1-4 week after xenograft ($\bar{x} \pm s$).

| Groups | Intra- diameter (mm) | Extra- diameter (mm) | Proliferous index (PI) | Apoptosis index (AI) | PI/AI |
|-------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Control | 1.23 \pm 0.47 | 1.30 \pm 0.52 | 1.33 \pm 0.74 | 2.37 \pm 0.68 | 0.56 \pm 0.11 |
| Exp 1 week | 1.85 \pm 1.38 | 2.70 \pm 1.54 | 25.58 \pm 9.71 | 8.86 \pm 3.15 | 2.88 \pm 0.37 |
| Exp 2 weeks | 3.27 \pm 0.66 | 5.42 \pm 2.66 | 40.10 \pm 9.20 | 11.52 \pm 5.06 | 3.48 \pm 0.42 |
| Exp 3 weeks | 4.54 \pm 2.01 | 6.09 \pm 2.15 | 35.87 \pm 4.59 | 16.68 \pm 2.90 | 2.15 \pm 0.20 |
| Exp 4 weeks | 6.52 \pm 0.25 ^a | 8.14 \pm 2.61 ^a | 8.24 \pm 4.33 | 19.65 \pm 8.31 ^a | 0.42 \pm 0.29 |

a: $P < 0.01$, compared with control group; Exp: experiment group.

3 讨论

豚鼠-SD 大鼠肾下腹主动脉异种移植是目前较理想的 AAA 模型, 它能模拟人体 AAA 主要病理特征, 已成功应用于基质金属蛋白酶抑制剂等对 AAA 治疗作用的研究^[1]。细胞凋亡和细胞增殖都

属于细胞周期事件, 贯穿于血管的发育、正常结构功能维持以及损伤的全过程。作为腹主动脉中膜最主要组份, VSMC 除了自身的收缩功能外, 能支配细胞外基质纤维的排列与组装, 还通过合成细胞外基质中结构与非结构蛋白来保证主动脉壁的粘弹性和抗

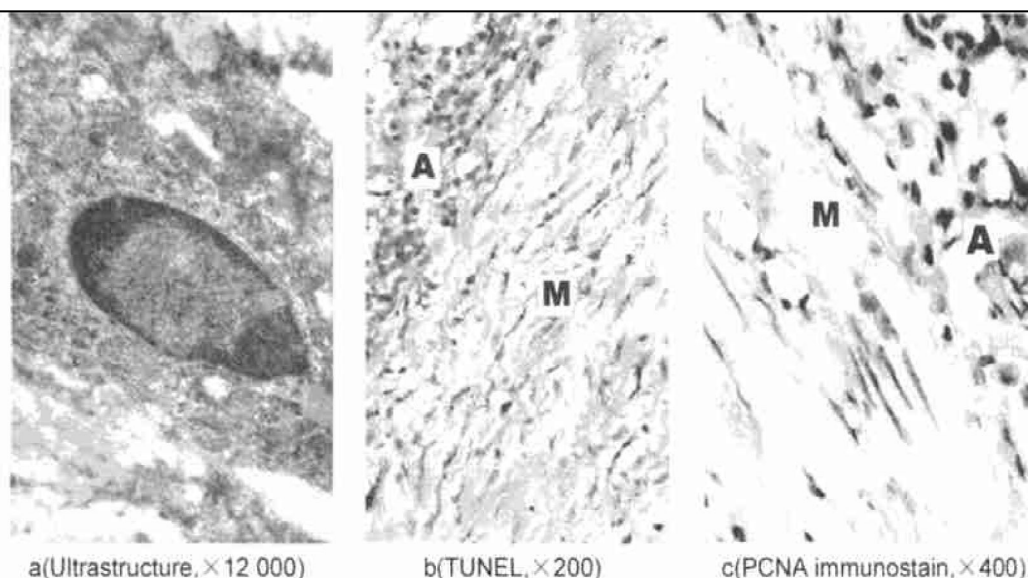


图 1. 术后 4 周移植 AAA 中膜 VSMC 凋亡与增殖.

Figure 1. Medial VSMC apoptosis and proliferation in xenografted AAA postoperative 4 weeks. A: adventitia; M: media.

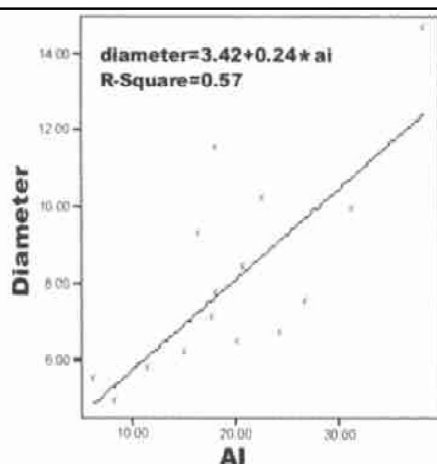


图 2. 术后 4 周移植 AAA VSMC 凋亡与移植体外径的关系.

Figure 2. Relationship between VSMC apoptosis and extra diameter in xenografted AAA postoperative 4 weeks.

压性; 因此 VSMC 丢失是主动脉壁结构受损不可忽视的因素。细胞凋亡与血管的形态发生及其动态平衡密切相关, AAA 为血管损伤重构的一个典型, 并且 VSMC 凋亡在 AAA 发病中的作用已得到肯定^[3]。本实验证实了 VSMC 增殖与凋亡的共存, 并随着移植动脉壁的进一步损伤与修复, 两者水平逐步由量变发展到质变。在腹主动脉损伤初期, VSMC 增殖为主, 以保证移植主动脉的完整性和抗压性, 因而移植植物形态上无显著变化; 随着损伤的加重, VSMC 凋亡跃为主体, 其密度也明显降低, 尤其在 2 例 AAA 破裂者, VSMC 这种代谢动力学变化已经超出细胞本身, 导致细胞外基质及细胞因子代谢明显紊乱, 以

致损伤的腹主动脉已不能耐受强大的血流冲击力, 从而被动地渐进性扩张以致破裂。因此, 与其他许多疾病相似, AAA 病理过程中细胞凋亡与增殖存在着一种动态平衡, 这种比较研究比单一因素的研究更有意义。

AAA 中 VSMC 明显减少可能原因如下: 与 VSMC 生长调节相关的自分泌活性介质的产生发生改变, 可能为有丝分裂原表达降低或自分泌抑制剂产生增高所致。④VSMC 对有丝分裂原敏感性减少。⑤减少的细胞外基质不足以支持 VSMC 生长。由于各种蛋白酶如基质金属蛋白酶等活性增高, 细胞外基质降解增强, VSMC 生长重要的依赖作用减弱。调节细胞周期的途径发生内源性改变。AAA 体内 p53 及 p21 等在 VSMC 增多, 这些蛋白可引起 VSMC 在 G₀/G₁ 期阻滞而发生提前衰老。VSMC 复制潜能耗竭^[4]。在动脉瘤组织, 尤其是早期阶段, 中膜 VSMC 暴露于多种促进生长刺激的环境中, 包括来源于动脉硬化的内膜以及与慢性炎症反应相关的苏氨酸有丝分裂原。另外, 随着腹主动脉壁的扩张, VSMC 可能也受到机械牵张力作用, 体外研究已证实这种机械力能促进 VSMC 生长及基质的产生^[5], 因而 VSMC 因这种牵张力过度而增殖分裂, 终于在瘤壁损伤达到修补时, VSMC 达到它的增殖能力极限; 或者在动脉瘤早期形成阶段, 可能由于 VSMC 增殖、分化受阻或提前的衰老与死亡限制了 VSMC 的补偿功能, 尤其是结构性基质蛋白的产生。因此, VSMC 变化也反映了 AAA 的重要演变, 包括中

膜进一步破坏以及主动脉壁渐进性扩张与破裂。

应该认识以下问题: 血管损伤重构中, VSMC 必定经历成熟与幼稚表型(或称合成型与收缩型)的动态转变, 以适应不同病理状态下的功能需要。AAA 壁幼稚型 VSMC(如以非肌球蛋白重链表达为主)的研究可能有助于 VSMC 确切定量, 从而进一步明确 VSMC 在 AAA 形成中的作用。④AAA 组织 VSMC 凋亡增加已有许多研究报道, 但这种凋亡往往和其他一种或多种细胞凋亡共存, 如免疫炎症性细胞除了产生一些细胞毒性物质诱导 VSMC 凋亡外, 这些细胞本身也发生这种自杀现象——一种免疫细胞自限过程的潜在机制, 两种凋亡间相互作用的研究可能更能揭示该病发生发展的全貌。

总之, VSMC 增殖与凋亡的发生有助于腹主动脉结构损伤重构, 两者平衡失调使得修复后的腹主

动脉在细胞和基质水平均不能满足正常生理需要, 从而导致 AAA 形成和发展。

[参考文献]

- [1] Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation*, 1999, **99** (1): 96-104
- [2] 吴建秋, 景在平. 两种实验性腹主动脉瘤大鼠模型的比较. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 277-280
- [3] Allaire E, Fough R, Clowes M, et al. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest*, 1998, **102**: 1413-420
- [4] Liao S, Curci JA, Kelley BJ, et al. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res*, 2000, **92**(1): 85-95
- [5] Birukov KG, Bardy N, Lehoux S, et al. Intraluminal pressure is essential for the maintenance of smooth muscle caldesmon and filamin content in aortic organ culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**(6): 922-927

(此文编辑 曾学清)

•会议消息•

ISHR 中国会议第三轮通知

国际心脏研究会(ISHR)中国分会第七届暨中国病理生理学会心血管专业委员会第十届学术会议定于2002年11月1~5日在广州大厦召开(地址:广州市北京路374号, Tel: 83189888)。大会将安排20多名国内、外知名的心血管临床专家和基础研究科学家作专题报告, 内容涵盖心血管研究领域的多个前沿、热点问题, 十分精彩, 欢迎临床大夫和基础研究工作者踊跃参加。本次会议已获准为国家继续医学教育项目(项目编号: 2002-03-01024), 参会者均可获得国家级继续医学教育I类学分10分。现将有关事项通知如下:

1、会议学术议程: 11月1日正式报到(下午15:00~17:00卫星会议, 17:00~21:30开幕式及欢迎晚宴), 11月2日特邀报告, 11月3日专题报告, 11月4日优秀论文竞选及分组交流(18:00~20:00颁奖晚会)。壁报展(Poster)贯穿整个会议。其它议程详见报道资料。

2、会议注册: 会务费正常600元(10月15日之后或者报道时注册增加100元, 下同), 在读硕士、博士研究生500元(凭学生证优惠)。资料费50元, 论文摘要发表费100元(超过1500字的综述200元)。注册方式采用网上填写回执: www.e-5413.com。

3、会议官方语言为中文, 英语为辅助性语言。会议规模控制在600人左右, 请及早注册, 特殊情况可与会务组联系。会务组设在广东省心血管病研究所内, 地址: 510080广州市东川路96号英东楼306室; 联系电话: (20) 83827812 转 1317, Fax: (20) 83875453, E-mail: ishr2002@yahoo.com.cn

国际心脏研究会(ISHR)中国分会
中国病理生理学会心血管专业委员会