

[文章编号] 1007-3949(2010)18-04-0279-04

• 实验研究 •

雷帕霉素对大鼠移植心脏血管平滑肌细胞表型及内膜增生的影响

胡名松¹, 胡建国², 郑宝石²

(1. 南华大学附属第二医院胸心外科, 湖南省衡阳市 421001, 2. 中南大学湘雅二医院胸心外科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 雷帕霉素; 大鼠; 心脏移植; 血管平滑肌细胞; 血管平滑肌激动蛋白 α ; 内膜增生; 电镜

[摘要] 目的 探讨雷帕霉素对大鼠移植心脏血管平滑肌细胞表型及内膜增生的影响。方法 建立大鼠腹腔内心脏移植模型。实验分为 4 组, 每组 8 只, 正常心脏组: 取未经任何处理的 Wistar 大鼠心脏作为空白对照; 同系移植组: 供体、受体均为 Wistar 大鼠, 以标准鼠食喂养。异系移植取 Wistar 大鼠作供体, SD 大鼠作受体, 分为以下两组, 环孢霉素组: 术后给予环孢霉素 A 10 mg/(kg·d), 皮下注射; 雷帕霉素组: 术后用雷帕霉素 1.25 mg/(kg·d) 灌胃。移植 60 天后取移植心脏进行电镜观察、形态学观察和用免疫组织化学法分析移植心脏冠状血管平滑肌激动蛋白 α 的表达情况。结果 正常心脏组和同系移植组移植心脏未见明显冠状血管狭窄。环孢霉素组管腔狭窄程度最明显, 雷帕霉素组血管狭窄程度最轻。正常心脏组和同系移植组血管内膜、心肌细胞及心肌间质均未见血管平滑肌激动蛋白 α 表达。心脏移植 60 天后, 环孢霉素组移植心脏血管内膜大量血管平滑肌激动蛋白 α 表达, 心肌细胞亦有血管平滑肌激动蛋白 α 表达。雷帕霉素组移植心脏血管内膜血管平滑肌激动蛋白 α 表达较少。很少有血管平滑肌激动蛋白 α 表达于心肌间质。各组之间移植心脏血管内膜组织中血管平滑肌激动蛋白 α 表达差异有显著性。正常心脏组及同系移植组电镜下血管平滑肌细胞呈收缩表型, 环孢霉素组可见血管平滑肌细胞呈合成表型, 雷帕霉素组见大部分血管平滑肌细胞呈收缩表型。结论 雷帕霉素可以抑制大鼠移植心脏血管病变过程中血管平滑肌细胞表型的变化, 减轻新生内膜的增生程度。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Rapamycin on Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cell and Arterial Intimal Hyperplasia in Rat Cardiac Allograft

HU Ming-Song, HU Jian-Guo, and ZHENG Bao-Shi

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Rapamycin; Rats; Cardiac Transplantation; Vascular Smooth Muscle Cell; Vascular Smooth Muscle α -actin; Neointimal Proliferation; Electron Microscope

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of rapamycin on phenotype of VSMC and intimal hyperplasia in rat cardiac allograft. **Methods** Heterotopic heart transplantation models were established. The experimental rats were divided into four groups. Normal hearts of wistar rats served as controls. In isograft group, hearts from wistar rats were heterotopically transplanted to wistar rats with no immunosuppressant administration. In allograft group, hearts from wistar rats were heterotopically transplanted to SD rats. Cyclosporine A group had Cyclosporine A, 10 mg/(kg·d), administration subcutaneously. Rapamycin group had rapamycin, 1.25 mg/(kg·d), administration by oral intubation after cardiac transplantation. All of the animals were killed at 60 day after transplantation. Phenotype of VSMC was observed with electron microscope. Coronary artery were analyzed for intimal area. Immunohistochemistry method was used for analyzing the expression of VSM α -actin in the cardiac allograft. **Results** In normal hearts and isografts, the vascular intimal thickness were lower than those in the allografts. Compared with cyclosporine treated allografts, the vessel disease in Rapamycin treated allografts decreased significantly 60 days after transplantation ($P < 0.01$). In normal hearts and isografts, VSM α -actin was only localized in media. Electron microscope showed VSMC were contractile. VSM α -actin was found in the proliferative vascular intima in Cyclosporine A treated allografts and electron microscope showed most of VSMC changed from contractile to synthetic. It was abundant in the proliferative vascular intima 60 days after transplantation in Cyclosporine A treated allografts while decreased in Rapamycin treated allografts and electron microscope showed the morphologic characteristic of VSMC changed from synthetic to contractile. **Conclusion** Rapamycin can influence the phenotype transform of VSMC, and reduce the degree of neointimal hyperplasia of transplanted cardiac in rat.

[收稿日期] 2009-12-10

[修回日期] 2010-04-03

[作者简介] 胡名松, 副主任医师, 博士, 硕士研究生导师, 湖南省胸心血管外科学会青年委员, 主要从事冠心病、瓣膜病、各种普胸外科疾病的研究, E-mail为 humingsong1973@hotmail.com。胡建国, 教授, 博士研究生导师, 湖南省心血管病研究所所长, 主要从事冠心病、冠心病、心脏移植方面临床与实验研究。郑宝石, 教授, 硕士研究生导师, 现在广西医科大学附属第一医院心外科工作, 主要从事冠心病和心脏移植研究。

移植心脏血管病 (cardiac allograft vasculopathy, CAV) 是导致心脏移植功能丧失的主要原因^[1]。其发病机制尚不清楚, 目前认为是各种免疫和非免疫因素共同介导的内皮激活, 触发血管内膜增生和平滑肌细胞迁移、增殖的结果。雷帕霉素是一种新型的强效免疫抑制剂, 同时具有极好的抑制血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 和新生内膜过度增殖的作用^[2-4]。雷帕霉素对大鼠移植心脏血管平滑肌细胞表型的影响目前尚未见报道。本实验拟通过大鼠异位心脏移植模型, 探讨雷帕霉素对大鼠移植心脏血管平滑肌激动蛋白 α (vascular smooth muscle α -actin, VSM α -actin) 表达、超微结构及内膜增生的影响。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

供体近交系 Wistar 大鼠 40 只、受体 SD 大鼠 16 只分别由中国科学院北京实验动物中心和中南大学湘雅二医院实验动物部提供。均为雄性, 鼠龄 8~10 周, 体重 200~250 g。实验分为 4 组, 每组 4 只, 正常心脏组: 取未经任何处理的 Wistar 大鼠心脏作为空白对照。同系移植组, 供、受体均为 Wistar 大鼠, 以标准鼠食喂养。异系移植为取 Wistar 大鼠作供体, SD 大鼠作受体建立腹部异位心脏移植模型, 分为以下 2 组, 环孢霉素组: 术后给予环孢霉素 A 10 mg/(kg·d), 皮下注射。雷帕霉素组, 术后用雷帕霉素 1.25 mg/(kg·d) 灌胃^[2]。

1.2 动物模型的建立

参照文献[5]的大鼠腹腔异位心脏移植方法建立模型, 并进行改进^[6]。供、受体动物均采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射 (40~50 mg/kg) 麻醉。供心植入受体腹部, 供心主动脉与受体腹主动脉、供心主肺动脉与受体下腔静脉行端侧吻合。每日通过触诊受体腹部监测移植心脏搏动, 研究终点为移植后 60 天时移植物仍有功能。

1.3 标本处理及检测方法

移植后 60 天取移植心脏, 垂直心脏纵轴将心室肌切开, 留取前室间沟处冠状血管分布较密集的部分置入 10% 中性福尔马林液固定, 脱水后, 石蜡包埋, 制成 3 μ m 切片。行 Van Gieson 染色以研究血管形态学变化。采用 Mias system 4.1 医学图像分析管理系统分析血管狭窄程度, 血管狭窄指数 = 血管内膜面积/(管腔的面积 + 内膜面积) \times 100%^[7]。做电镜检查的心肌组织标本置于 2.5% 戊二醛溶液

固定, PBS 漂洗后, 切成 0.5~1 mm³ 大小组织块, 锇酸后固定, 丙酮酸梯度脱水, 环氧树脂包埋后行超薄切片。铅-铀双重染色后, 用日产 H-800 型透射电镜 (\times 8000) 观察血管平滑肌细胞超微结构的改变。采用 SP 法行免疫组织化学染色, 以观察 VSM α -actin 在血管各层的分布情况, 有心肌表达者, 采用 Mias system 4.1 医学图像分析管理系统分析计算 VSM α -actin 阳性表达 (细胞被染成棕色) 所占面积^[8]。

1.4 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.0 统计软件处理, 采用 *t* 检验, 单因素方差分析等方法对数据进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 移植心脏血管病变情况

正常心脏组和同系移植组移植心脏未见明显冠状血管狭窄。在异系移植组中, 心脏移植 60 天后, 以环孢霉素 A 治疗组管腔狭窄程度最明显, 甚至有部分小动脉闭塞, 与其他各组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。雷帕霉素组血管狭窄程度最轻, 虽然有一定程度的血管狭窄, 但其狭窄程度不及环孢霉素治疗组, 两组间差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 移植 60 天后大鼠心脏冠状动脉狭窄程度 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	血管狭窄指数
正常心脏组	8	0.09% \pm 0.02%
同系移植组	8	13.12% \pm 0.72% ^a
环孢霉素组	8	62.45% \pm 8.12% ^{ab}
雷帕霉素组	8	28.91% \pm 3.24% ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与正常心脏组比较; b 为 $P < 0.05$, 与同系移植组比较; c 为 $P < 0.01$, 与环孢霉素组比较。

2.2 移植心脏血管内膜血管平滑肌激动蛋白 α 的表达

各实验组心脏血管中层平滑肌细胞均呈阳性染色。正常心脏组和同系移植组血管内膜、心肌细胞及心肌间质均未见 VSM α -actin 表达。心脏移植后 60 天, 环孢霉素治疗组移植心脏血管内膜大量 VSM α -actin 表达, 心肌细胞亦有 VSM α -actin 表达, 但其并非均一表达, 而是呈灶性表达于被其它非反应性肌束包围的单一肌原纤维束或几个相邻的肌原纤维束。雷帕霉素组移植心脏血管内膜 VSM α -actin 表达较少。很少有 VSM α -actin 表达于心肌间质。各组之间移植心脏血管内膜组织中 VSM α -actin 表达情况见表 2。

2 3 电镜表现

正常心脏组及同系移植组电镜下血管平滑肌细胞呈收缩表型,胞体规则呈长梭形,胞浆肌丝成分丰富,粗面内质网、线粒体和高尔基体少;环孢霉素组可见 VSMC 呈合成型, VSMC 胞体较大,细胞轮廓不规则,胞核大,胞浆内见大量线粒体及粗面内质网,高尔基体发达,肌丝成分少,并可观察到中膜 VSMC 穿越内弹力膜小幢向内膜迁移现象;雷帕霉素组 VSMC 胞浆内线粒体及粗面内质网明显减少,肌丝较多(图 1)。

表 2 各组之间移植心脏血管内膜组织中血管平滑肌激动蛋白 α 表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	血管平滑肌激动蛋白 α 表达面积
正常心脏组	8	0
同系移植组	8	0.07% \pm 0.01% ^a
环孢霉素组	8	21.21% \pm 1.28% ^{ab}
雷帕霉素组	8	8.43% \pm 1.02% ^{abc}

a为 $P < 0.01$, 与正常心脏比较; b为 $P < 0.05$ 与同系移植组比较; c 为 $P < 0.01$ 与环孢霉素组比较。

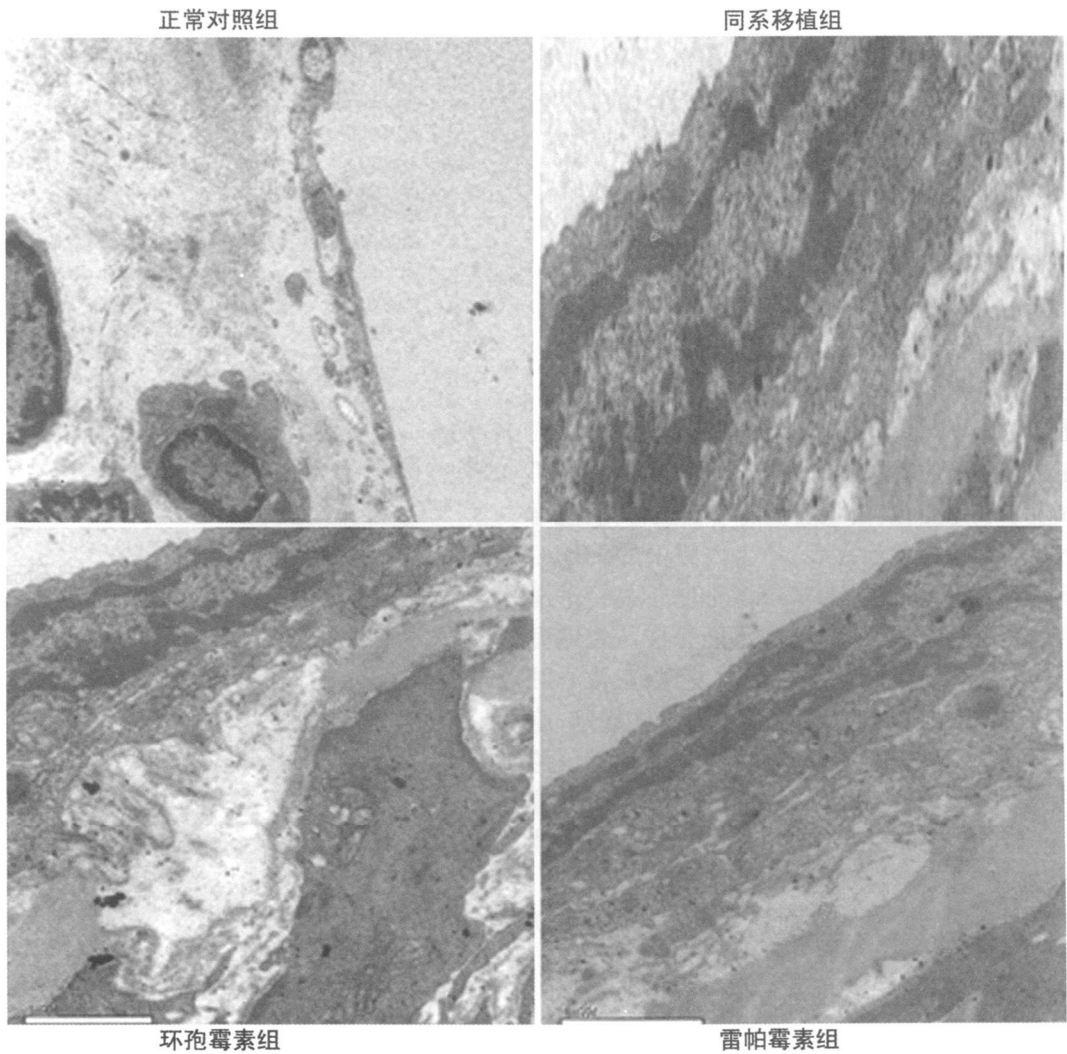


图 1. 正常心脏组及同系移植组血管平滑肌细胞电镜图 ($\times 8000$)

3 讨论

雷帕霉素是 20 世纪 70 年代中期从放线菌目潜水镜样链霉菌中分离获得的一种亲脂性大环内酯类抗生素,易通过细胞膜,具有强免疫抑制和抗炎作

用。近年研究发现雷帕霉素具有强力的抗平滑肌细胞增殖作用^[2]及抑制平滑肌祖细胞分化、增殖及迁移能力^[9-10]。雷帕霉素可抑制颈动脉^[11]、冠状动脉^[12]腹主动脉^[3]球囊血管成形术后的血管内膜增

生。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^[13-15]。

本实验研究发现,心脏移植后 60 天,环孢霉素组大鼠移植心脏血管已有很明显的内膜增厚、管腔狭窄,甚至有的小动脉管腔闭塞。雷帕霉素组移植心脏血管内膜增生及管腔狭窄程度明显轻于环孢霉素组。表明雷帕霉素具有抑制移植心脏血管内膜增生和平滑肌细胞增殖作用。

有研究表明,雷帕霉素可以抑制球囊损伤后腹主动脉平滑肌细胞表型的改变,减轻新生内膜的增生程度^[3],但雷帕霉素对移植心脏血管平滑肌细胞表型的影响目前尚未见文献报道。正常情况下 VSMC 处于安静状态,呈收缩表型。心脏移植后,由于免疫因素和非免疫因素的作用,中膜 VSMC 被激活,转变为合成表型,分泌多种细胞因子,由中膜向内膜迁移、增殖,导致新生内膜形成,管腔狭窄。VSM α -actin 的特异性单克隆抗体 (mAbA4) 特异性表达于平滑肌细胞,对心肌和骨骼肌无反应^[8]。本实验发现,正常心脏和同系移植组移植心脏血管无明显狭窄,内膜无明显增厚, VSM α -actin 定位于血管中层,异系移植组中环孢霉素组血管明显狭窄,内膜增生,新内膜形成, VSM α -actin 在新生内膜中大量表达,而血管中层 VSM α -actin 表达减轻,从而证实了在心脏移植的动脉硬化发生过程中血管平滑肌细胞发生了表型变化,由收缩型向增殖型转化,呈增殖状态。用雷帕霉素治疗后,新生内膜中的 VSM α -actin 表达明显减少,说明雷帕霉素抑制了血管平滑肌细胞的表型变化,平滑肌细胞不能完成从收缩型向合成型的转化。从超微结构可以发现,正常心脏及同系移植组心脏血管 VSMC 表现为胞体规则,胞浆肌丝丰富,粗面内质网、线粒体、高尔基体等分泌性细胞器少,呈收缩表型。异系移植心脏血管 VSMC 胞体增大、不规则,胞浆肌丝成分少,细胞器多,为合成表型。雷帕霉素组 VSMC 可见较多肌丝,游离核糖体和粗面内质网比合成表型的 VSMC 有所

减少,介于收缩表型和合成表型之间。本实验表明雷帕霉素可以通过抑制 VSMC 表型的转变来减轻大鼠移植心脏血管内膜的增生程度。

[参考文献]

- [1] Hertz MI, Taylor DO, Trubock EP, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: nine -teenth official report [J]. *J Heart Lung Transplant*. 2008; **21**: 950-970.
- [2] Poon M, Badion JJ, Fuster V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality [J]. *Lancet*. 2007; **359**(9306): 619-622.
- [3] 李玉光, 许端敏, 闫纯英, 等. 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.
- [4] Raichlin E, and Kushwaha SS. Proliferation signal inhibitors and cardiac allograft vasculopathy [J]. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; **13**(5): 543-550.
- [5] Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rat [J]. *J Thoracic Cardiol Surg*. 1969; **57**(2): 225.
- [6] 张明奎, 胡建国, 杨进福, 等. 大鼠异位心脏移植术的改进及并发症原因分析 [J]. *湖南医科大学学报*, 2003; **28**(2): 194-198.
- [7] Armstrong AT, Strauch AR, Starling RC, et al. Morphometric analysis of neointimal formation in murine cardiac allografts [J]. *Transplant*. 1997; **63**(7): 941-947.
- [8] Subramanian SV, Orosz CG, Strauch AR. Vascular smooth muscle α -actin expression as an indicator of parenchymal cell reprogramming in cardiac allograft [J]. *Transplant*. 1998; **65**(12): 1652-656.
- [9] 张 坡, 黄 岚, 朱光旭, 等. 雷帕霉素对大鼠骨髓源平滑肌祖细胞增殖及分化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14**(11): 930-932.
- [10] Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments [J]. *Circulation*. 2008; **117**(16): 2131-141.
- [11] Morris RE, Cao W, Huang X, et al. Rapamycin (Sirolimus) inhibits vascular smooth muscle DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells [J]. *Transplant Proc*. 2005; **27**(1): 430-431.
- [12] Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle [J]. *Circulation*. 2005; **99**(16): 2164-170.
- [13] 范 萌, 谷天祥, 姜春力, 等. 局部应用雷帕霉素在预防移植静脉再狭窄中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14**(11): 956-958.
- [14] Delgado JE, Mani N, Segovia J, et al. The use of proliferation signal inhibitors in the prevention and treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation [J]. *Transplant Rev*. 2009; **23**(2): 69-79.
- [15] Wang SS. Treatment and prophylaxis of cardiac allograft vasculopathy [J]. *Transplant Proc*. 2008; **40**(8): 2609-610.

(此文编辑 李小玲)