

[文章编号] 1007-3949(2021)29-02-0129-06

· 实验研究 ·

动静脉瘘所致的高剪切力减轻支架置入术导致的新生内膜增生

刘崇栋, 陈锋

(南昌大学第二附属医院血管外科, 江西省南昌市 330000)

[关键词] 内膜增生; 支架; 剪切力; 动静脉瘘

[摘要] **目的** 研究动静脉瘘(AVF)所致的高剪切力(WSS)对动脉支架植入术后内膜增生(NIH)的影响。**方法** 将36只雄性新西兰大白兔随机分为3组,每组12只。支架组:右颈总动脉(CCA)植入支架;支架+动静脉瘘(AVF)组:右CCA植入支架并行右颈AVF;对照组:未行处理。21天后,取支架段CCA标本用于组织学染色和蛋白质表达分析。**结果** 支架组支架段CCA内WSS维持在基线水平的43.2%~48.9%。支架+AVF组WSS逐渐增加到超过基线水平86%。支架+AVF组NIH较支架组减轻(新生内膜面积:0.19 mm²比0.87 mm²;新生内膜/中膜面积比值:0.18比1.13)。Western blot结果显示,支架+AVF组内皮型一氧化氮合酶(eNOS)水平明显高于支架组,增殖细胞核抗原(PCNA)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(p-p38)和磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)水平明显低于支架组。**结论** AVF所致的高WSS减轻了支架植入术后的NIH,其潜在的机制可能与调节eNOS、VCAM-1、p38和JNK的表达和激活有关。

[中图分类号] R54;R654.4

[文献标识码] A

High wall shear stress caused by arterio-venous fistula reduces neointimal hyperplasia induced by stent implantation

LIU Chongdong, CHEN Feng

(Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, China)

[KEY WORDS] neointimal hyperplasia; stent; wall shear stress; arterio-venous fistula

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of high wall shear stress (WSS) caused by arterio-venous fistula (AVF) on neointimal hyperplasia (NIH) after stent implantation. **Methods** 36 male New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups with 12 rabbits in each group: stent group; right common carotid artery (CCA) stent implantation; stent+arterio-venous fistula (AVF) group; right CCA stent implantation and right carotid AVF; control group; no treatment. After 21 days, CCA specimen of stent segment was taken for histological staining and protein expression analysis. **Results** In stent segment CCA, WSS was maintained at 43.2%-48.9% of baseline in stent group, and WSS gradually increased to 86% above baseline level in stent+AVF group. NIH in stent+AVF group was less than that in stent group (neointimal area; 0.19 mm² vs. 0.87 mm²; neointima-to-media area ratio; 0.18 vs. 1.13). Western blot results showed that the level of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the stent+AVF group was significantly higher than that in the stent group, while the levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38) and phosphorylated c-Jun NH₂-terminal protein kinase (p-JNK) in the stent+AVF group were significantly lower than those in the stent group. **Conclusion** High WSS induced by AVF can reduce NIH after stent implantation, and its potential mechanism may be related to the regulation of eNOS, VCAM-1, p38 and JNK expression and activation.

[收稿日期] 2020-01-10

[修回日期] 2020-03-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81460083、81860094);江西省科技厅自然科学基金资助项目(20142BAB215034、20141BBG70032、20152ACB21026)

[作者简介] 刘崇栋,硕士研究生,研究方向为周围血管病,E-mail为550456206@qq.com。通信作者陈锋,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为周围血管病,E-mail为cf970422@126.com。

动脉支架植入术成功地缓解动脉粥样硬化狭窄,保证动脉血流通畅,但支架内再狭窄严重地影响了其远期疗效^[1-3]。支架内再狭窄的机制尚不完全清楚,但支架动脉内剪切力(wall shear stress, WSS)的改变被认为是促进内膜增生(neointimal hyperplasia, NIH)的潜在诱导因子^[2,4]。WSS是指流动的血液在血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)表面上的摩擦力。研究表明WSS与NIH之间存在相关性^[2,4],特别是有些研究表明WSS与NIH之间存在负相关性^[4,5]。低WSS会促进支架植入后动脉NIH^[6-8]。而具有层流的高WSS具有抗炎、抗增殖、抗凋亡、抗血栓形成作用,可以抑制NIH^[6,9]。本研究通过动静脉瘘(arterio-venous fistula, AVF)来增加兔支架段颈总动脉(common carotid artery, CCA)内的WSS,以减轻支架段动脉内NIH,并探讨其潜在的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验分组

雄性新西兰大白兔36只,体质量2.5~3.5 kg,根据处理方式分为3组,每组12只:(1)支架植入术组(简称支架组):右CCA植入支架;(2)支架+AVF组:右CCA植入支架并行右颈动静脉瘘;(3)对照组:未行处理。

1.2 动物模型

(1)AVF模型:兔耳缘静脉注射戊巴比妥钠(3%,30 mg/kg)、肝素钠(100 IU/kg)。麻醉成功后,右颈做纵向切口,分离暴露右颈动脉和颈外静脉,颈内动脉与颈外静脉间行4 mm的侧-侧吻合,建立颈动脉静脉瘘。(2)支架植入模型:将裸支架系统(直径2.5 mm,长度12 mm;乐普医疗公司,中国)从切开的右颈外动脉插入至颈总动脉,扩张球囊(12 atm,30 s),支架放置到位后,球囊放气并缓慢取出。

术后3周,用致死剂量的戊巴比妥钠处死动物。重新暴露右CCA,收集支架段CCA标本,用于组织学分析和蛋白质表达分析。实验期间,所有大白兔均每日肌注环丙沙星(10 mg/kg)3天防止感染,并在饮用水中加入阿司匹林(20 mg/d)以防止血栓形成。

1.3 血流动力学监测

每3天使用彩色多普勒超声系统(Phillips,美国)监测植入支架的通畅性。直到收集标本,所有的支架均保持通畅。所有动物在3个时间点(术

前、术后立即、术后第21天)测量支架段CCA的腔内直径(lumen diameter, LD)和收缩期峰值流速(peak systolic velocity, PSV)。根据以下公式计算WSS强度(τ ; dyne/cm²): $\tau = 4\mu V/LD^{[10]}$;其中 μ 为血液黏度(0.03泊),V为收缩期峰值流速。

1.4 组织学分析

支架段CCA做硬组织切片。10%中性缓冲甲醛固定,梯度乙醇脱水,用甲基丙烯酸乙二醇酯包埋,钨刀片(Exakt公司,德国)切割,并行苏木精和伊红(HE)染色。测量支架段动脉的新生内膜面积和中膜面积,并计算内膜/中膜面积比。用Image-Pro Plus软件(Media Cybernetics公司,美国)进行形态学分析。

1.5 电子显微镜观察

支架段CCA纵向切开,用2.5%戊二醛固定12 h,梯度乙醇脱水,临界点干燥,最后用扫描电子显微镜观察。

1.6 蛋白表达分析

支架段CCA进行蛋白质表达分析。小心地从CCA标本取出支架。用蛋白提取试剂盒(碧云天公司,中国)提取总蛋白,使用增强型BCA蛋白测定试剂盒(碧云天公司,中国)进行蛋白定量,以每孔50 μ g样品上样到8%~12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳泳道中,然后湿转到二氟化树脂膜上(Millipore公司,美国)。用含有5%牛血清白蛋白和0.1% Tween 20的Tris缓冲盐水(TBS)封闭二氟化树脂膜2 h后,将膜与小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(Abcam公司)、小鼠抗c-Jun氨基末端激酶(c-Jun NH₂-terminal protein kinase, JNK)(CST公司)、小鼠抗磷酸化JNK(p-JNK)(CST公司)、兔抗p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38)(CST公司)、兔抗磷酸化p38(p-p38)(CST公司)、兔抗内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)(Abcam公司)、小鼠抗血管细胞黏附分子1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)(Abcam公司)、小鼠抗 β -actin(Abcam公司)抗体过夜。洗涤后,将膜与耦联辣根过氧化酶的二抗孵育1 h。使用增强的化学发光Western blot检测试剂(碧云天公司,中国)检测条带。使用Image-Pro Plus软件定量条带的光密度, β -actin为内参蛋白。

1.7 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的参数通过 t 检验比较,3组之间的参数通过单因素方差分析,然

后进行 Tukey 事后检验比较。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学改变

如表 1 所示,在支架组中,由于支架的植入导致 LD 增加 [(1.89 ± 0.05) mm 增至 (2.41 ± 0.02) mm], PSV 降低 [(22.0 ± 1.1) cm/s 降至 (12.2 ± 0.5) cm/s], WSS 降低至基线水平的 43.2% [(14.1

± 0.8) dyne/cm² 降至 (6.1 ± 0.3) dyne/cm²]。随后 3 周, WSS 仍保持较低水平 [(6.9 ± 0.3) dyne/cm²], 为基线水平的 48.9%。

在支架+AVF 组中,尽管植入的支架使血管的 LD 增大 [(1.87 ± 0.04) mm 增至 (2.43 ± 0.02) mm], 但由于 AVF 引起的 PSV 升高 [(21.4 ± 0.8) cm/s 增至 (27.8 ± 0.8) cm/s], WSS 仍保持在基线水平 [(13.7 ± 0.4) dyne/cm²]。随后 3 周,随着 PSV [(52.8 ± 1.3) cm/s] 的进一步增加, WSS 增至超过基线水平 86% [(25.7 ± 0.7) dyne/cm²]。

表 1. CCA 血流动力学参数
Table 1. Hemodynamic parameters of CCA

分组	时间	LD/mm	PSV/(cm/s)	WSS/(dyne/cm ²)
对照组	0 天	1.83 ± 0.05	21.4 ± 0.9	14.2 ± 0.7
	21 天	1.90 ± 0.04	22.1 ± 0.7	14.1 ± 0.7
支架组	术前	1.89 ± 0.05	22.0 ± 1.1	14.1 ± 0.8
	术后立即	2.41 ± 0.02 ^{ab}	12.2 ± 0.5 ^{ab}	6.1 ± 0.3 ^{ab}
	术后 21 天	2.35 ± 0.02 ^{ab}	13.5 ± 0.5 ^{ab}	6.9 ± 0.3 ^{ab}
支架+AVF 组	术前	1.87 ± 0.04	21.4 ± 0.8	13.8 ± 0.7
	术后立即	2.43 ± 0.02 ^{ab}	27.8 ± 0.8 ^{ab}	13.7 ± 0.4 ^{abc}
	术后 21 天	2.47 ± 0.09 ^b	52.8 ± 1.3 ^{abc}	25.7 ± 0.7 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组 21 天比较; b 为 $P < 0.01$, 与支架组术前比较; c 为 $P < 0.01$, 与支架组术后 21 天比较。

2.2 电子显微镜扫描

如图 1 所示,支架组支架段动脉表面的 VEC 排

列不规则,而支架+AVF 组 VEC 与动脉血流方向平行排列。

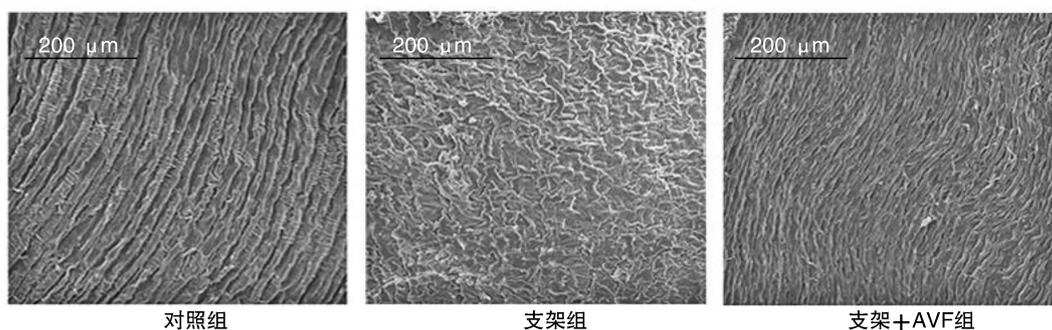


图 1. 电子显微镜扫描图

Figure 1. Scanning image of electron microscope

2.3 新生内膜增生

如图 2A 所示,支架段 CCA 组织学分析表明,支架组形成了明显的 NIH,而支架+AVF 组 NIH 相对较轻。如图 2B 和 2C 所示,定量分析表明,支架+AVF 组 NIH 较支架组减轻(新生内膜面积:0.19 mm² 比 0.87 mm²; 新生内膜/中膜面积比值:0.18 比 1.13)。

2.4 支架段 CCA 的蛋白表达

如图 3 所示,蛋白质表达分析表明支架组 eNOS 水平显著低于对照组,PCNA、VCAM-1、p-p38 和 p-JNK 水平显著高于对照组。支架+AVF 组 eNOS 水平明显高于支架组,PCNA、VCAM-1、p-p38 和 p-JNK 水平明显低于支架组。

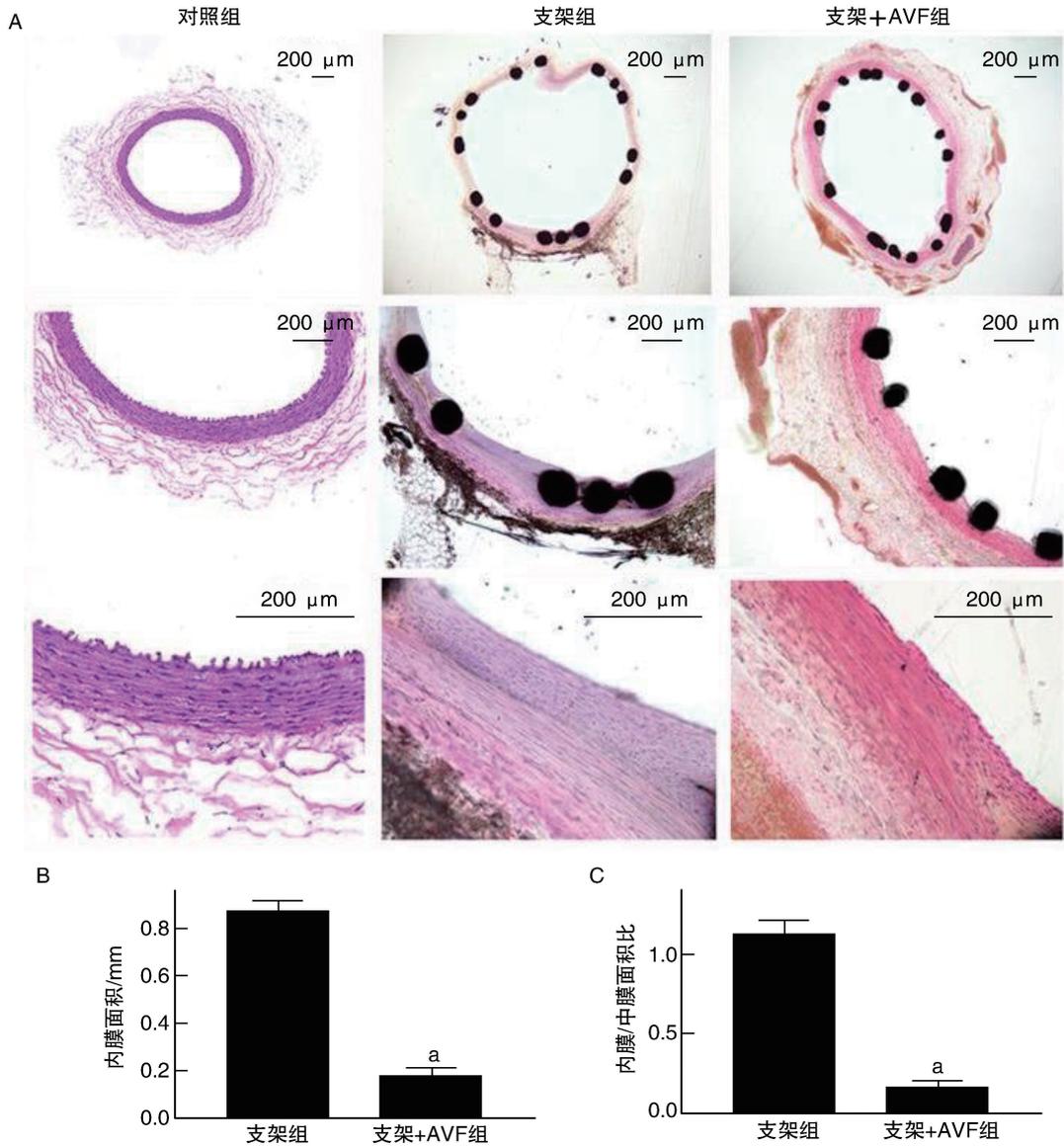


图 2. 组织学分析

a 为 $P < 0.05$, 与支架组比较。

Figure 2. Histological analysis

3 讨论

该研究表明:(1) 支架+AVF 组与支架组相比, AVF 使支架段动脉内的 WSS 增加。(2) AVF 所致的高 WSS 可以抑制支架植入所致的 NIH;(3) 与 NIH 减轻相伴随的是 eNOS 蛋白表达的增加,而 PC-NA、VCAM-1、p-p38 和 p-JNK 蛋白表达的降低。

众所周知,动脉内植入的支架直径要比动脉内径要大。尽管支架过大可以通过损伤动脉而引起 NIH,但也可以通过增加横断面积、降低血流速度并最终导致支架段动脉内 WSS 的降低来促进 NIH^[11]。Sick 等^[11]的临床研究指出,支架过大超过 10% 就会导致明显 NIH。也有研究表明,支架植入

术后 WSS 与 NIH 之间存在负相关^[4]。

在本研究中,支架组 WSS 降低至基线水平的 43.2%,这是由于植入过大的支架导致 LD 的增加和 PSV 的降低。随后 3 周内,WSS 仍保持较低水平,并且出现明显 NIH。因此,支架植入引起的低 WSS 导致明显的 NIH。在支架+AVF 组中,尽管植入支架过大而使 LD 增加,但因为 AVF 引起 PSV 升高,WSS 仍可维持在基线水平。在随后的 3 周,因为 PSV 的进一步增加,WSS 在基线水平上继续增加了 86%。因 AVF 引起的 PSV 持续增加导致 WSS 的持续增加,减轻了 NIH 的形成。因此,AVF 导致的高 WSS 可减轻支架段动脉的 NIH。

除了 WSS 的流体力学因素外,固体力学因素也

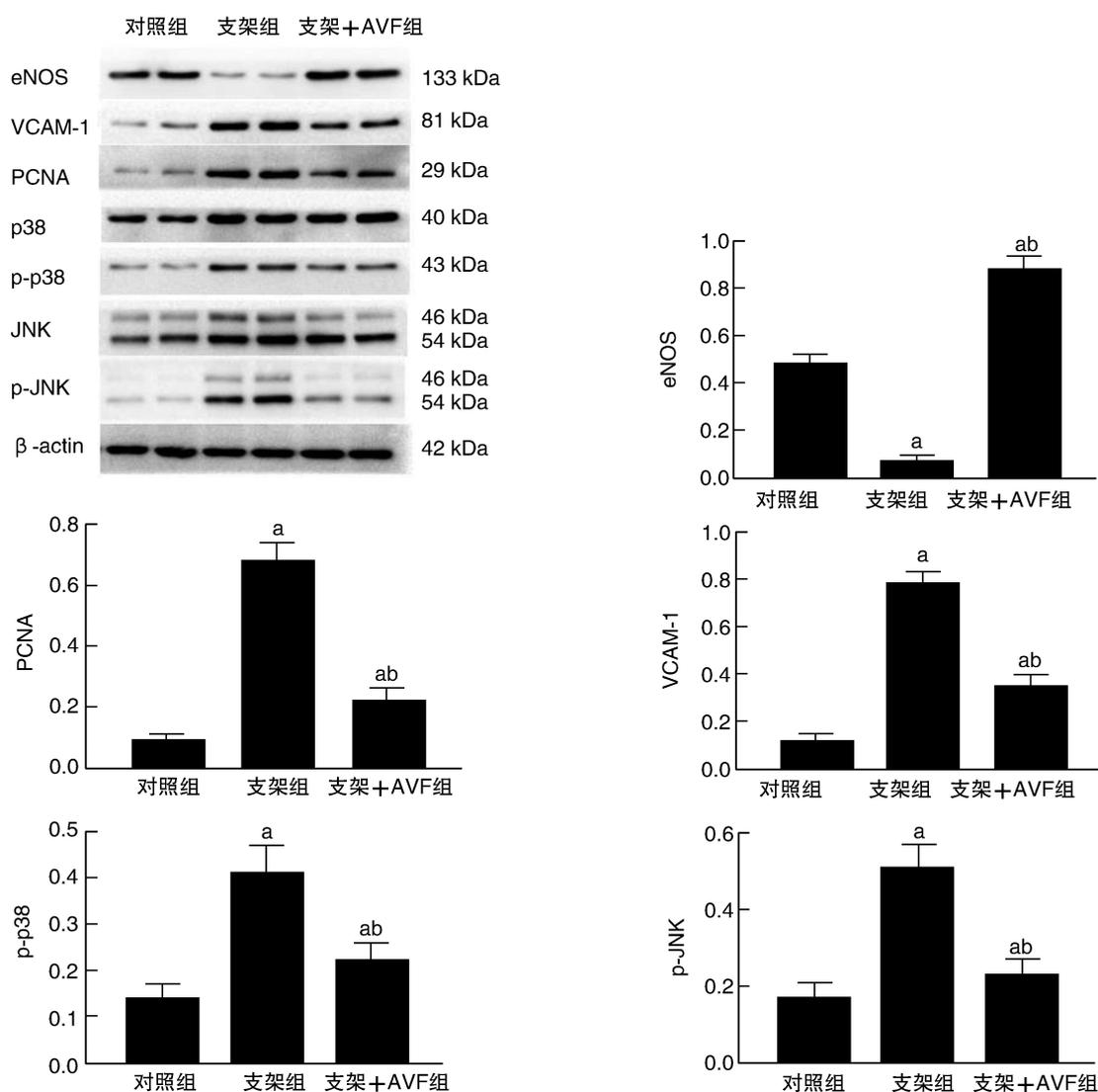


图 3. Western blot 检测 eNOS、PCNA、VCAM-1、p-p38 和 p-JNK 的蛋白表达

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与支架组比较。

Figure 3. The protein expressions of eNOS, PCNA, VCAM-1, p-p38 and p-JNK detected by Western blot

可以影响 NIH 的程度。支架过大可在动脉壁产生较高的周向剪切力 (circumferential wall stress, CWS)^[5]。已有研究表明组织内压力和 CWS 的改变可以刺激细胞增殖和血管重塑^[12]。CWS 是炎症反应的诱发因素, 促进动脉粥样硬化的形成^[13-14]。支架对血管的支撑作用会导致较高的 CWS, 从而导致血管损伤和炎症, 最终促进了 NIH 的形成^[5]。Timmins 等^[15]的临床研究表明 CWS 促进支架段股动脉的 NIH。CWS 和 NIH 之间存在明显的线性关系^[5]。

如果不考虑支架对 CCA 的扩张作用, 由于 AVF 可以导致供血动脉扩张, 支架+AVF 组 CCA 的直径会变得比支架组大。支架+AVF 组的支架过大程度相对于支架组较小, CWS 低于支架组。因此, 与支架组相比, 支架+AVF 组 CWS 诱导的 NIH 较轻。

本研究发现在支架+AVF 组, 伴随着较轻的 NIH, VCAM-1、p-p38 和 p-JNK 的蛋白表达降低; VCAM-1、p38 和 JNK 参与了 NIH 的形成过程^[2,16-17]。VEC 可以表达促炎因子, 如 VCAM-1。JNK 和 p38 的活性磷酸化形式可以诱导 VCAM-1 表达并提高 VCAM-1 mRNA 的稳定性。丝裂原活化的蛋白激酶磷酸酶 1 (MKP-1) 可以通过脱磷酸基团使 p38 和 JNK 失活^[2,16]。高 WSS 促进 MKP-1 的表达, 从而抑制 p38、JNK 和下游转录因子的激活, 以及抑制 VCAM-1 表达^[2,16]。高 WSS 通过促进 VEC 持续表达 MKP-1 来抑制 p38 和 JNK 的活性, 从而抑制动脉炎症^[2]。高 WSS 还通过阻断蛋白激酶 C 的裂解而削弱 JNK 活性^[16,18-19]。因此, 由 AVF 引起的高 WSS 通过调控 VCAM-1、p-p38 和 p-JNK 的表达和活

化来抑制支架段动脉的 NIH。

在本研究中,相比支架组,支架+AVF 组中支架段 CCA 表达的 eNOS 蛋白水平较高。eNOS 主要由 VEC 表达,它能催化一氧化氮(nitric oxide, NO)的产生。NO 作为有效的血管扩张剂,也可以抑制血小板和白细胞的活化,抑制平滑肌细胞的增殖和迁移,从而减轻 NIH^[20-21]。WSS 的急性增加可导致快速产生大量 NO,这在血管舒张中起关键作用。而由于 WSS 持续增加诱导慢性产生的 NO 可作为抗动脉粥样硬化和抗炎分子^[22]。剪切力响应元件位于 eNOS 基因的启动子区域,eNOS 作为一种机械感应传导的偶联,可通过结合 NO 长期调控血流动力学。研究发现,NO 合成酶或其信号通路的缺陷可以促进 NIH^[23]。相反,由 eNOS 基因转移或 NO 供体递送引起的局部 NO 产生增加,可以抑制动脉损伤后 NIH^[24]。因此 AVF 所致的高 WSS 显著提高了 eNOS 蛋白的表达,进而抑制 NIH。

综上所述,AVF 所致的高 WSS 可以减轻支架植入后的 NIH,其潜在机制可能与调控 eNOS、VCAM-1、p38 和 JNK 的表达和活化有关。

支架术后 NIH 继而支架狭窄是下肢动脉硬化闭塞症支架置入术远期疗效差最主要的原因,动静脉瘘形成高剪切力可以减轻支架术后 NIH。若缺血下肢动脉狭窄,在近端人为制造动静脉瘘,血流增加,形成高剪切力,具有一定的临床应用价值及可行性。

[参考文献]

- [1] 张承圣, 谢锐, 文飞. 下肢动脉粥样硬化闭塞支架后再狭窄研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(5): 525-530.
- [2] Chaabane C, Otsuka F, Virmani R, et al. Biological responses in stented arteries[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(2): 353-363.
- [3] Ho KJ, Owens CD. Diagnosis, classification, and treatment of femoropopliteal artery in-stent restenosis[J]. J Vasc Surg, 2017, 65(2): 545-557.
- [4] Koskinas KC, Chatzizisis YS, Antoniadis AP, et al. Role of endothelial shear stress in stent restenosis and thrombosis: pathophysiologic mechanisms and implications for clinical translation[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(15): 1337-1349.
- [5] Chen HY, Sinha AK, Choy JS, et al. Mis-sizing of stent promotes intimal hyperplasia; impact of endothelial shear and intramural stress[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(6): H2254-H2263.
- [6] LaDisa Jr JF, Olson LE, Molthen RC, et al. Alterations in wall shear stress predict sites of neointimal hyperplasia after stent implantation in rabbit iliac arteries[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(5): H2465-H2475.
- [7] Wentzel JJ, Krams R, Schuurbiers JC, et al. Relationship between neointimal thickness and shear stress after wallstent implantation in human coronary arteries[J]. Circulation, 2001, 103(13): 1740-1745.
- [8] Thondapu V, Tenekecioglu E, Poon E, et al. Endothelial shear stress 5 years after implantation of a coronary bioresorbable scaffold

[J]. Eur Heart J, 2018, 39(18): 1602-1609.

- [9] Carlier SG, van Damme LC, Blommerde CP, et al. Augmentation of wall shear stress inhibits neointimal hyperplasia after stent implantation: inhibition through reduction of inflammation? [J]. Circulation, 2003, 107(21): 2741-2746.
- [10] Gnasso A, Carallo C, Irace C, et al. Association between intima-media thickness and wall shear stress in common carotid arteries in healthy male subjects[J]. Circulation, 1996, 94(12): 3257-3262.
- [11] Sick P, Huttl T, Niebauer J, et al. Influence of residual stenosis after percutaneous coronary intervention with stent implantation on development of restenosis and stent thrombosis[J]. Am J Cardiol, 2003, 91(2): 148-153.
- [12] Garasic JM, Edelman ER, Squire JC, et al. Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury [J]. Circulation, 2000, 101(7): 812-818.
- [13] 邱菊辉, 王贵学, 雷道希. 血流动力学与动脉粥样硬化斑块的稳定性及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(6): 495-497.
- [14] Thubrikar MJ, Baker JW, Nolan SP. Inhibition of atherosclerosis associated with reduction of arterial intramural stress in rabbits[J]. Arteriosclerosis, 1988, 8(4): 410-420.
- [15] Timmins LH, Miller MW, Clubb FJ, et al. Increased artery wall stress post-stenting leads to greater intimal thickening[J]. Lab Invest, 2011, 91(6): 955-967.
- [16] Warboys CM, Amini N, de Luca A, et al. The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques[J]. F1000 Med Rep, 2011, 3: 5.
- [17] Zhang JY, Lei L, Shang J, et al. Local application of paeonol prevents early restenosis: a study with a rabbit vein graft model[J]. J Surg Res, 2017, 212: 278-287.
- [18] Garin G, Abe J, Mohan A, et al. Flow antagonizes TNF-alpha signaling in endothelial cells by inhibiting caspase-dependent PKC zeta processing[J]. Circ Res, 2007, 101(1): 97-105.
- [19] Magid R, Davies PF. Endothelial protein kinase C isoform identity and differential activity of PKC zeta in an athero-susceptible region of porcine aorta[J]. Circ Res, 2005, 97(5): 443-449.
- [20] Gesele P, Momi S, Guglielmini G. Nitric oxide-enhancing or -releasing agents as antithrombotic drugs [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 166: 300-312.
- [21] Gao Y, Gao CY, Zhu P, et al. Ginsenoside Re inhibits vascular neointimal hyperplasia in balloon-injured carotid arteries through activating the eNOS/NO/cGMP pathway in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1091-1097.
- [22] Klein-Nulend J, Helfrich MH, Sterck JG, et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250(1): 108-114.
- [23] Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits[J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(5): 753-759.
- [24] Kaul S, Cercek B, Rengstrom J, et al. Polymeric-based perivascular delivery of a nitric oxide donor inhibits intimal thickening after balloon denudation arterial injury: role of nuclear factor-kappa B [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(2): 493-501.

(此文编辑 曾学清)