

• 研究报告 •

缬沙坦对兔动脉成形术后血管内膜增生及内皮细胞
血管性假血友病因子表达的影响

刘亚军 卢辉和 张莉 盛臻强 王毅 管耘园

【关键词】 I 型血管紧张素 II 受体拮抗剂; 缬沙坦; 血管成形术; 再狭窄; 血管性假血友病因子; 内皮细胞

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)已成为冠心病治疗的主要手段之一。PCI造成血管内皮剥脱,剥脱后邻近的内皮细胞向该区域移行、增殖,以初步覆盖剥脱区,达到再内皮化,剥脱区内皮的修复程度与再狭窄形成密切相关。内皮细胞损伤的面积决定新生内膜的增厚程度,损伤后内皮层再生速度的快慢对新生内膜增厚程度起着关键作用。本研究通过观察缬沙坦对兔腹主动脉球囊成形术后血管内膜增殖和内皮细胞血管性假血友病因子(vWF)表达的影响,以期进一步探讨 I 型血管紧张素 II 受体(AT1R)拮抗剂治疗血管再狭窄的机制。

1 材料与方法

1.1 动脉粥样硬化模型的制备:选用雄性新西兰大白兔 24 只(由南通大学实验动物中心提供),体重(2.0 ± 0.5)kg,单笼、恒温适应性饲养 1 周后,按随机数字表法分成 3 组,每组 8 只。对照组以普通饲料饲养 12 周,不加任何处理;模型组和缬沙坦组给予高胆固醇饲料 80 g/d,喂养 4 周后行腹主动脉内膜剥脱术。用质量分数为 3%的异戊巴比妥 30 mg/kg 静脉麻醉,数字减影血管造影术(DSA)引导下右股动脉插入 4F forgarty 球囊导管(美国 Baxter Healthcare 公司产品)至膈肌处,压力泵注入优维显充盈球囊(压力 6 atm, 1 atm = 101.325 kPa),缓慢回拉导管到动脉切口处,反复 3 次,剥脱血管内皮。结扎血管,缝合切口,继续予高胆固醇饮食。

1.2 腹主动脉球囊成形术的实施:继续高胆固醇饮食 4 周后行腹主动脉球囊成

形术。用 3%的异戊巴比妥 30 mg/kg 行静脉麻醉,在 DSA 引导下插入左股动脉 4F forgarty 球囊导管,于狭窄部位行腔内血管成型术,反复 3 次,每次 30 s,间隔 1 min,结扎血管,缝合切口。模型组继续普通饲料饲养 4 周,缬沙坦组给予普通饲料 + 缬沙坦 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 喂养 4 周。

1.3 组织形态学分析:于 12 周末切取所需腹主动脉(不超过 1 cm 大小)置于体积分数为 10%的甲醛溶液中过夜,固定后行组织修整、洗涤,乙醇逐级脱水,二甲苯置换出组织块中的乙醇,石蜡包埋,将包有组织的蜡块用切片机制成厚度为 4 μm 的薄片,苏木素-伊红(HE)染色,封片,光镜下观察。用 LEICA 全自动图像分析系统进行图像分析,计算血管腔内膜和中膜的厚度及面积。

1.4 免疫组化分析:采用过氧化物酶标记的链霉菌卵素法(SP),内皮细胞 vWF 免疫组化试剂盒为美国 Zymed 公司产品。免疫组化阳性颗粒呈棕黄色或棕黑色颗粒,分布在细胞胞质中。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,操作按试剂盒说明书进行。用全自动图像分析系统随机计算每张切片上 5 个 400 倍物镜视野中阳性细胞数(P)及观察细胞总数(A),计算阳性细胞百分率(阳性细胞百分率 = $P/A \times 100\%$)。

1.5 统计学方法:使用 SPSS10.0 统计软件,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学改变

2.1.1 大体标本:对照组腹主动脉内膜光滑,无斑块形成;模型组腹主动脉管壁有大量黄白色脂样物向管腔凸出,并连成片状;而缬沙坦组斑块明显减少。

2.1.2 光镜结果(彩色插图 1):对照组腹主动脉内膜光滑,内弹力膜表面仅覆盖一层内皮细胞,内皮下有极少量结缔组织,无平滑肌细胞(SMC);中膜

SMC 呈梭形,环绕管腔排列,表现为收缩型 SMC 特点。模型组腹主动脉内膜、中膜明显增厚,管腔明显狭窄,内含大量泡沫细胞及不定形坏死物质;内膜下出现大量 SMC 增生,增生的 SMC 排列紊乱,为典型的分泌型细胞,细胞周围有较多胶原纤维。缬沙坦组腹主动脉内膜、中膜有不同程度增厚,管腔狭窄,较多的中膜 SMC 迁移至内膜下增生,但增生及狭窄程度较模型组明显减轻。

2.1.3 3 组腹主动脉内膜、中膜的厚度及面积(表 1):与模型组比较,缬沙坦组腹主动脉内膜、中膜厚度明显变薄,内膜、中膜面积明显缩小(P 均 < 0.01)。

2.2 免疫组化结果分析(彩色插图 2, 表 1):vWF 阳性表达的细胞表现为细胞质呈棕黄色。与模型组比较,缬沙坦组 vWF 阳性表达率明显增多($P < 0.01$),且缬沙坦组新生内皮细胞排列整齐、完整,而模型组新生内皮细胞排列紊乱、不完整。

3 讨论

正常血管内皮细胞具有限制炎症反应、防止血管内凝血系统激活和血栓形成等重要的生理功能。结构完整、功能正常的内皮细胞既发挥屏障作用,阻断血管活性物质对 SMC 的刺激,同时又分泌肝素样物质,抑制 SMC 迁移、增殖和分泌。内皮细胞小面积损伤可迅速修复,SMC 增殖反应轻,不产生内膜增厚;内皮细胞大面积损伤时细胞难以很快修复,SMC 增殖反应明显而持久,可产生较为严重的内膜增厚和再狭窄^[1]。

PCI 不可避免会损伤内皮细胞,内皮细胞的损伤使分泌抑制 SMC 增殖的肝素样物质减少,一氧化氮(NO)、前列环素(PGI₂)分泌减少,内皮素(ET)分泌增加,同时内皮细胞对血管中层 SMC 的接触抑制丧失,导致 SMC 大量增殖,新生内膜增厚,出现再狭窄^[2]。Meurice 等^[3]研究显示,促进损伤部位内皮细胞再生,恢复内膜完整,是有效防止再狭窄

基金项目:江苏省南通市社会发展科技计划项目(S40012)

作者单位:226001 江苏省南通市中医院(刘亚军);226001 江苏省南通大学第二附属医院心内科(卢辉和,张莉,盛臻强,王毅,管耘园)

作者简介:刘亚军(1966-),男(汉族),江苏省人,硕士研究生,主治医师。

表 1 缬沙坦对兔血管球囊成形术后内膜、中膜增生及 vWF 阳性率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	内膜厚度(μm)	中膜厚度(μm)	内膜面积(μm^2)	中膜面积(μm^2)	vWF 阳性率(%)
对照组	8	20.16 $\pm$ 4.17	132.73 $\pm$ 16.53	11 987.19 $\pm$ 2 924.28	91 001.52 $\pm$ 8 598.18	47.01 $\pm$ 34.34
模型组	8	486.70 $\pm$ 11.79*	134.04 $\pm$ 21.41	280 733.60 $\pm$ 45 061.81*	92 183.82 $\pm$ 8 137.30	68.75 $\pm$ 3.00*
缬沙坦组	8	211.34 $\pm$ 16.54*#	76.38 $\pm$ 9.13*#	93 166.39 $\pm$ 12 155.15*#	55 128.48 $\pm$ 11 887.73*#	88.25 $\pm$ 2.88*#

注:与对照组比较;* $P < 0.01$;与模型组比较;# $P < 0.01$

的关键。

vWF 是一种由内皮细胞合成的糖蛋白,其分子质量为 270 ku,表达细胞为内皮细胞。本研究中采用 vWF 标记内皮细胞,通过观察 vWF 的表达情况,探讨缬沙坦在球囊成形术后血管内膜增生及内皮细胞的变化。结果发现,缬沙坦组较模型组内膜厚度减少 56.58%,内膜面积减少 66.81%,进一步证实了缬沙坦能有效防治球囊扩张成形术后血管的再狭窄。缬沙坦组 vWF 阳性表达亦较模型组明显增多,且缬沙坦组新生内皮细胞排列整齐、完整,而模型组新生内皮细胞排列紊乱、不完整,说明缬沙坦可以促进血管成形术后血管内皮的增生、修复,保持血管内皮的完整性,从而发挥抑制血管再狭窄的作用。

AT1R 拮抗剂缬沙坦具有促进血管 SMC 凋亡作用,但却起着促进血管内皮细胞增生作用。Levy^[4]认为,血管紧张素 I (Ang I)可致类上皮样细胞而非梭形细胞的凋亡,且凋亡由 AT1R 而非 I 型血管紧张素 II 受体(AT2R)所介导,Ang I 介导血管 SMC 凋亡依赖细胞表面不同而有所差异,因而导致血管紧张素受体拮抗剂对血管内皮细胞及血管 SMC 产生相反的作用。Watanabe 等^[5]研究发现,AT1R 拮抗剂氯沙坦的代谢产物 EXP3179 通过活化血管内皮细胞

生长因子受体 2/磷脂酰次黄嘌呤核苷激酶-3/蛋白激酶 B(VEGFR2/PI3K/Akt)途径,促进内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的磷酸化,抑制导致内皮细胞死亡的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。国内研究表明,AT1R 拮抗剂替米沙坦能上调血管紧张素转换酶-2(ACE2)的蛋白及基因表达,ACE2 水解 Ang I 后产生 Ang-(1-7),后者具有抑制内皮细胞凋亡作用^[6-8]。

综上所述,本研究中发现,AT1R 拮抗剂缬沙坦能促进血管内皮细胞增生,保持内皮增生后完整性。这一现象为临床治疗提供了一个新的思路,通过应用促进内皮细胞愈合的药物,可以有效防治血管成形术后血管再狭窄的发生。

参考文献:

- 1 Fonseca F A, Izar M C, Fuster V, et al. Chronic endothelial dysfunction after oversized coronary balloon angioplasty in pigs: a 12-week follow-up of coronary vaso reactivity in vivo and in vitro [J]. Atherosclerosis, 2001, 154(1): 61-69.
- 2 Schwartz R S, Holmes D R Jr, Topol E J. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms [J]. J Am Coll Cardiol, 1992, 20(5): 1284-1293.
- 3 Meurice T, Vallet B, Bauters C, et al. Role of endothelial cells in restenosis after

coronary angioplasty [J]. Fundam Clin Pharmacol, 1996, 10(3): 234-242.

- 4 Levy B I. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system [J]. Circulation, 2004, 109(1): 8-13.
- 5 Watanabe T, Suzuki J, Yamawaki H, et al. Losartan metabolite EXP3179 activates akt and endothelial nitric oxide synthase via vascular endothelial growth factor receptor-2 in endothelial Cells: angiotensin II type 1 receptor independent effects of EXP3179 [J]. Circulation, 2005, 112(12): 1798-1805.
- 6 王立军, 马虹, 廖新学, 等. 替米沙坦对血管内皮细胞血管紧张素转换酶-2 表达的调节作用研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(4): 224-228.
- 7 何建桂, 黄艺仪, 马虹, 等. 血管紧张素-(1-7)对压力负荷增高大鼠心肌胶原网络重塑的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(9): 523-526.
- 8 Morawietz H. Beyond blood pressure: endothelial protection against hypercholesterolemia by angiotensin II type-1 receptor blockade [J]. Hypertension, 2005, 45(2): 185-186.

(收稿日期: 2007-01-10)

修回日期: 2007-09-14)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

胃生长激素释放激素能抑制脓毒症时交感神经的活性

以往的研究显示,去甲肾上腺素(NE)通过激活 α_2 -肾上腺素能受体使致炎细胞因子释放增加。因此,美国学者提出通过调节交感神经系统的功能是治疗脓毒症的新方法。研究者发现一种新型的胃肽类衍生物——胃生长激素释放激素(Ghrelin),脓毒症时其浓度显著降低,静脉给予此物质可降低致炎细胞因子水平而减轻脏器损伤。现在仍不知道在脓毒症时 Ghrelin 是否是通过中枢胃生长激素释放激素受体(GHSR-1 α)抑制交感神经的兴奋性。对雄性大鼠进行盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症模型,在 CLP 前 30 min 经静脉注射(IV)或脑室内注射(ICV)Ghrelin。结果显示:CLP 后 2 h, IV 组动物 NE 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平明显降低,表明脓毒症时给予 Ghrelin 可以部分抑制 TNF- α 的效应。给予 GHSR-1 α 阻滞剂——P 物质在正常动物能明显增加 NE 和 TNF- α 水平。减少 Ghrelin 的 ICV 给药量,CLP 后 2 h 时能显著增高循环中 NE 水平。脑室内注射神经肽(NPY)1 受体拮抗剂或 GHSR-1 α 阻滞剂可以完全阻滞 Ghrelin 对 NE 的抑制作用,但 Ghrelin 对 TNF- α 的下调作用是通过局部作用实现的。因此, Ghrelin 的交感神经抑制作用是通过依赖中枢 GHSR-1 α (包括 NPY1 受体)途径介导的,脓毒症时 Ghrelin 对 TNF- α 的抑制作用是对交感神经局部作用的结果。

吴静, 编译自《Am J Physiol Endocrinol Metab》, 2007-10-02(电子版); 胡森, 审核

强力霉素预处理减轻在体大鼠心肌缺血/再灌注损伤及基质金属蛋白酶-1/9的表达

(正文见679页)



A: Sham组; B: I/R组; C: 预处理组

图4 各组心肌I/R损伤大鼠心肌组织MMP-1蛋白阳性表达(免疫组化, ×40)

Figure 4 Positive expression of MMP-1 in myocardium of rats after I/R in each group(immunohistochemistry, ×40)



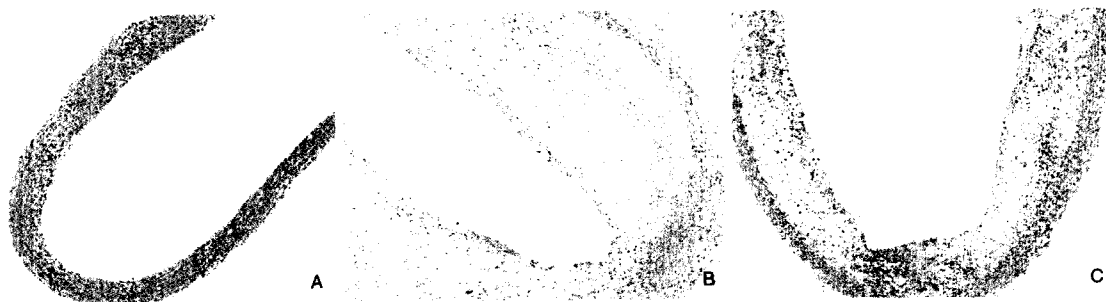
A: Sham组; B: I/R组; C: 预处理组

图5 各组心肌I/R损伤大鼠心肌组织MMP-9蛋白阳性表达(免疫组化, ×40)

Figure 5 Positive expression of MMP-9 in myocardium of rats after I/R in each group(immunohistochemistry, ×40)

缬沙坦对兔动脉成形术后血管内膜增生及内皮细胞血管性假血友病因子表达的影响

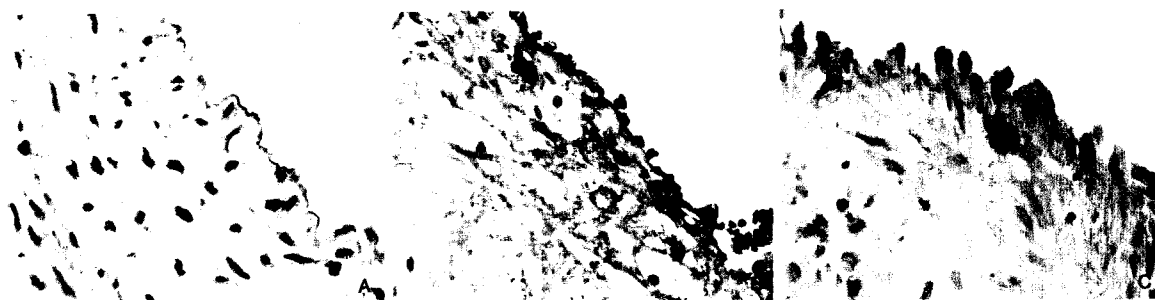
(正文见695页)



A: 对照组; B: 模型组; C: 缬沙坦组

图1 各组兔腹主动脉组织形态学观察(HE, ×40)

Figure 1 Pathologic and morphologic analysis of abdominal aorta of rabbits in each group(HE, ×40)



A: 对照组; B: 模型组; C: 缬沙坦组

图2 各组兔内皮细胞vWF阳性表达(SP, ×400)

Figure 2 Positive expression of vWF of endothelial cell of rabbits in each group(SP, ×400)

641: m