

血管紧张素转化酶与血管成形术后再狭窄的关系

蒋利 陈万春 金立仁

(上海市第六人民医院心内科, 上海 200233)

Correlation between Tissue Angiotensin Converting Enzyme and Restenosis after Experimental Angioplasty

JIANG Li, CHEN Wan-Chun and JIN Li-Ren
(Division of Cardiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT

Aim To study the relation between vascular angiotensin converting enzyme (ACE) activity and intimal hyperplasia in rabbit restenotic model and the effects of different doses of benazepril.

Methods Angioplasty was performed in the left artery of 28 New Zealand white rabbits. Benazepril was administrated to treatment groups in low-dose ($n=9$, 1 mg/kg) and high-dose ($n=9$, 10 mg/kg) respectively. All animals were sacrificed 2 weeks after angioplasty. The vascular morphometry included intimal and medial areas, thus ratio of intimal area to medial area. Serum and vascular ACE activities were determined by fluorimetric assay.

Results The vascular ACE activity of angioplasty subgroup was 2.7 times higher than that of the non-angioplasty subgroup ($P<0.01$). The high-dose benazepril significantly reduced the vascular ACE activity and intimal area, compared with angioplasty subgroup ($P<0.01$). But the low-dose benazepril only moderately inhibited the vascular ACE activity (24% down, $P<0.05$), and the intimal area did not alter significantly. The significant positive correlation was displayed between vascular ACE activity and intimal area ($r=0.708$, $P<0.01$).

Conclusion The excessive expression of vascular ACE may play a potential role in restenosis. The

high-dose benazepril could inhibited intimal hyperplasia by suppressing vascular tissue ACE.

KEY WORDS Restenosis; Angiotensin converting enzyme, tissue; Benazepril

摘要 为探讨组织血管紧张素转化酶在兔血管成形术后内膜增生中的作用及苯那普利对其的影响,建立了兔血管再狭窄模型,每天用 1 mg/kg 和 10 mg/kg 的苯那普利饲养后进行 HE 染色、免疫组织化学分析、生物化学分析和酶活性测定。结果发现手术组组织血管紧张素转化酶活性显著增高 ($P<0.01$), 内膜损伤面积与组织血管紧张素转化酶活性呈非常显著相关 ($r=0.708$, $P<0.01$); 大剂量组组织血管紧张素转化酶活性下降 59%, 内膜损伤面积减少 43% ($P<0.01$); 小剂量组组织血管紧张素转化酶活性轻度下降 ($P<0.05$), 内膜损伤面积无显著变化。提示血管组织血管紧张素转化酶过度表达可能在再狭窄形成过程中起重要作用, 大剂量苯那普利可以通过抑制血管组织血管紧张素转化酶以减少内膜增生。

关键词 再狭窄; 血管紧张素转化酶, 组织; 苯那普利

再狭窄是制约冠状动脉成形术应用的主要障碍。尽管再狭窄的确切机制尚不清楚, 但内膜增生是其形成重要因素之一。已有研究表明西拉普利(cilazapril)能抑制鼠动脉损伤后新生内膜增生^[1], 提示血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)可以预防再狭窄。与动物实验相反, MERCATOR 和 MARCATOR 结果显示抗高血压剂量的西拉普利不能预防 PTCA 术后的再狭窄^[2,3], 推测小剂量 ACEI 不能有效地抑制组织血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE), 因而不能减少组织血管紧张素 I, 后者是强烈的促细胞增殖因子, 促进血管平

滑肌细胞迁移、增生。为证实这一假设,我们通过常规饲料喂养的兔主动脉血管再狭窄模型研究组织 ACE 与再狭窄的关系,并应用新一代组织 ACEI—苯那普利(benazepril)作为药物干预,寻找预防再狭窄的药物。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

由 Strauss 报道^[4]的模型改进。28 只成年雄性新西兰白兔,体重 2.3~3.1 kg,戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后,暴露双侧股动脉,在左侧股动脉逆行插入 3F 球囊成形导管(Cordis 公司,球囊长 20 mm,直径 2.5 mm)至腹主动脉,加压至 5 个大气压,缓慢回撤至切口处,重复 2 次,结扎血管,闭合切口,12 周后血管狭窄形成。在狭窄形成处施行血管成形术,过程同第一次血管损伤,但不作牵拉。实验期间给予常规饲料喂养。

1.2 实验分组

将实验分为四组:①对照组白兔 10 只,其未手术的右侧髂动脉作为对照组血管,予常规饲养;②手术组白兔 10 只,其经手术的左侧髂动脉作为手术组血管,常规饲养;③小剂量组白兔 9 只,于第 2 次血管成形术前 7 天开始在饲料中拌入 1 mg/kg 苯那普利(Ciba-Geigy 公司提供)饲养;④大剂量组白兔 9 只,以 10 mg/kg 苯那普利拌入饲料同上组饲养。

1.3 病理形态学和免疫组织化学检测

于血管成形术后 14 天处死动物,取血管固定、包埋、切片,作苏木素-伊红(hematoxylin-eosin) Masson 胶原、Verhoeff 弹力纤维染色,光镜下观察。选择 Verhoeff 染色切片,使用计算机图像分析系统(MRI 400,同济医科大学太阳公司)分别计算血管内膜、中膜面积及其比值。血管平滑肌细胞 actin 染色采用免疫组织化学技术,应用 SP 法,单克隆抗体及试剂盒购自福建迈新公司,操作程序按试剂盒操作说明书进行。

1.4 生物化学分析

参考 Friedland-Silverstein 方法^[5],用荧光光度法测定血管组织和血清 ACE 活性。酶活性单位(U)为每分钟 mmol/L(血清 ACE)和每分钟 mmol/g(组织 ACE)。Hippuryl-His-Leu、His-Leu 及邻二甲苯购自 Sigma 公司,荧光光度计系 Shimadzu RF 540 型。

1.5 统计分析

数据以均数±标准误表示,多组比较用方差分析,两组比较用 q 检验;两因素相关分析用直线回归。

2 结果

2.1 组织病理学分析

从图 1(Figure 1)可见手术组血管内膜撕裂,血小板聚积,部分夹层形成,内膜大量细胞增殖,免疫组织化学分析显示以 actin 阳性细胞居多,说明以平滑肌细胞增殖为主。Masson 和 Verhoeff 染色见大量胶原和弹力纤维成分,说明细胞外基质参与内膜增生。部分血管内膜见大量泡沫细胞形成(图 2),多为 actin 阳性细胞,提示泡沫细胞主要来源于平滑肌细胞。所有标本均未见钙化形成。大剂量组明显抑制内膜增生,而小剂量组则无明显变化。

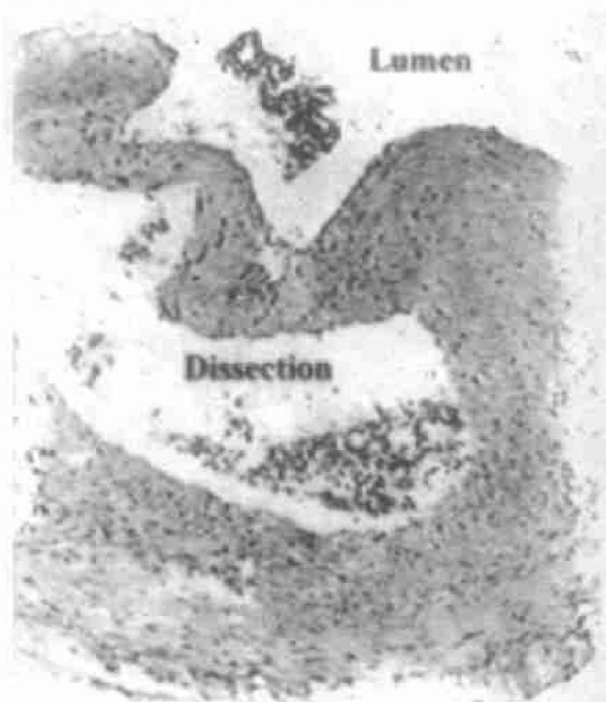


Figure 1. Focal intramural hemorrhage, and dissection seen immediately after angioplasty (HE staining, original magnification $\times 40$).

2.2 血管形态学

从附表(Table)可见,手术组内膜损伤面积是对照组的 2.5 倍。与手术组相比,大剂量苯那普利组内膜损伤面积和内膜与中膜面积比均减少($P < 0.01$),小剂量组无明显变化。

2.3 血管紧张素转化酶活性

如图 3(Figure 3)所示,手术组血管组织 ACE 活性是对照组的 2.7 倍。与手术组相比,

大剂量组组织 ACE 活性下降 59% ($P < 0.01$), 小剂量组则下降 24% ($P < 0.05$); 用药一周后, 这两组血清 ACE 活性分别下降 92% 和 87% ($P < 0.01$), 继续用药, 则下降趋势不明显; 对照组血管成形术前后 ACE 活性无明显变化(图 4,

Figure 4)。图 5 和图 6(Figure 5 and Figure 6) 显示, 内膜损伤面积与组织 ACE 活性呈非常显著性正相关 ($r = 0.708, P < 0.01$), 与血清 ACE 活性呈显著性正相关 ($r = 0.412, P < 0.05$)。



Figure 2. Fibrocellular intima with foam cells 2 weeks after angioplasty (H.E. staining, digital magnification $\times 400$).

Table. Comparisons of intimal and medial area, intimal/medial area 2 weeks after angioplasty ($10^5 \mu m^2$).

Treatment	Intimal area	Medial area	Intimal/medial (%)
Angioplasty	2.71 ± 0.33	4.31 ± 0.45	60.8 ± 6.58
Non-angioplasty	1.19 ± 0.22	4.68 ± 0.41	28.0 ± 6.63
Low-dose	2.31 ± 0.22	4.42 ± 0.17	52.5 ± 5.69
High-dose	$1.54 \pm 0.20^*$	4.74 ± 0.28	$31.6 \pm 5.07^*$

*, $P < 0.01$, compared with angioplasty group.

3 讨论

尽管再狭窄的研究进展很多, 但其机制依然不清, 原因之一是尚无满意的动物模型模拟人类再狭窄病理过程。目前常用高胆固醇饲养的兔再狭窄模型, 此模型的血清胆固醇较正常水平升高十几倍, 导致大量胆固醇沉积, 且内膜含有大量吞噬细胞 ($> 50\%$), 与人类血管成形术后再狭窄病理变化相差很多^[6,7]。本实验选用

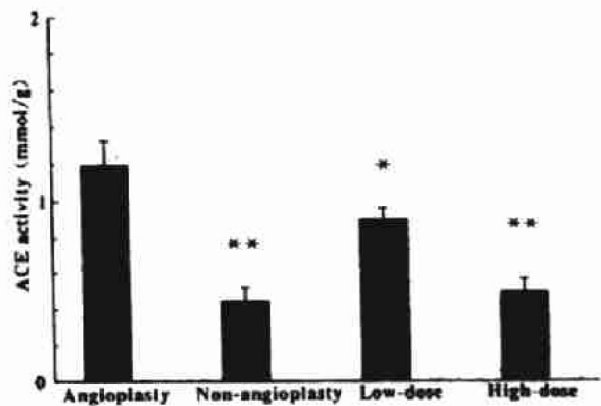


Figure 3. Comparisons of tissue ACE activity among groups. * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, compared with angioplasty subgroup.

二次损伤常规饲养兔再狭窄模型, 具有以下特点: ①血管成形术后内膜增生的病理形态与人类再狭窄相似, 包括平滑肌细胞增殖、泡沫细

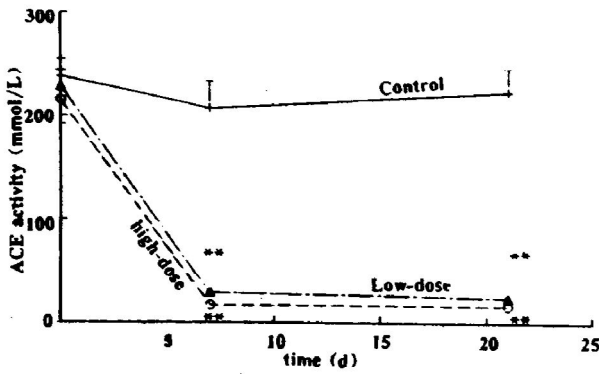


Figure 4. Change of serum ACE activity in each group. Angioplasty was performed 7 days after administration. *: $P < 0.01$, compared with the ACE activity at 7 days before angioplasty.

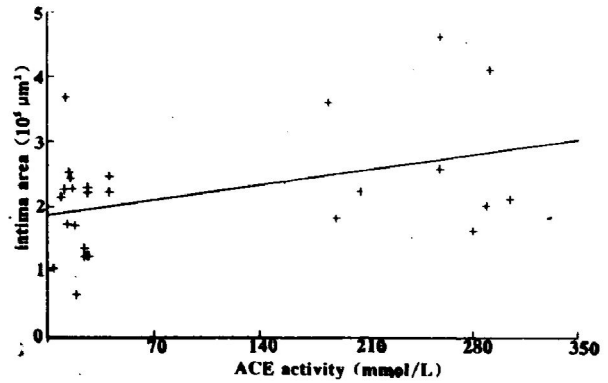


Figure 6. Correlation of intimal area and serum ACE activity after angioplasty ($n = 28$, including vessel segments subjected to angioplasty with or without drug intervention).

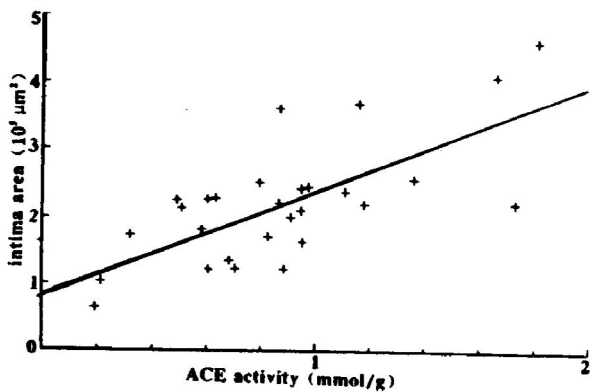


Figure 5. Correlation of intimal area and tissue ACE activity after angioplasty ($n = 28$, including vessel segments subjected to angioplasty with or without drug intervention).

胞形成和细胞外基质(胶原、弹力纤维)增生;②血管成形术后见内膜撕裂、血小板聚积、夹层形成,类似临床冠状动脉成形术的病理变化^[8]。因此,本模型能较好地模拟人类再狭窄过程,但病变仍缺乏钙化、中央脂质池等人类动脉粥样硬化的典型特点。

已有研究表明球囊损伤后鼠动脉 ACE 活性增加,提示组织 ACE 过度表达可能在新生内膜形成过程中起潜在的作用^[9],但鼠动脉损伤模型不能很好地模仿人类再狭窄的过程。本实

验显示,球囊血管成形术后常规饲料喂养的兔再狭窄模型血管组织 ACE 活性显著升高,而血清 ACE 活性无显著变化;相关分析显示内膜增生与血管组织 ACE 活性呈非常显著性相关,进一步说明组织 ACE 可能在再狭窄中起重要的作用。此假设也在转基因鼠中得到证明,Morishita 等^[10]报告鼠动脉转入人 ACE 基因后血管壁 DNA 合成增加,血管壁增厚。

Fabris 等^[11]报道苯那普利同喹那普利(quinapril)类似,在已知的 ACEI 中组织 ACE 抑制作用最强。我们的实验表明,大剂量苯那普利可以显著抑制组织 ACE,减少血管成形术后兔动脉内膜增生;小剂量苯那普利能轻度抑制组织 ACE,但不能减少血管内膜增生,而两组用药一周血清 ACE 活性抑制即达 90%左右。此结果为临床西拉普利防治再狭窄的失败提供一种解释,即 ACEI 预防再狭窄需达抑制组织 ACE 的剂量。结合其它实验结果,提示高效的组织 ACEI 在防治血管成形术后再狭窄方面有一定作用。

参考文献

1 Powell JS, Clozel JP, Muller RK, et al. Inhibitors of an-

- giotensin converting enzyme prevent myointima proliferation after vascular injury. *Science*, 1989, **245**: 186~188.
- 2 The multicenter european research trial with cilazapril after angioplasty to prevent transluminal coronary obstruction and restenosis (MERCATOR) study group. Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? *Circulation*, 1992, **86**: 100~110.
 - 3 Faxon DP. Effect of high dose angiotensin converting enzyme inhibition on restenosis; final results of the MARCATOR study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. *J Am Coll Cardiol*, 1995, **25**: 262~269.
 - 4 Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, et al. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res*, 1994, **75**: 650~658.
 - 5 Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol*, 1976, **66**: 416~424.
 - 6 Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1992, **19**: 418~432.
 - 7 Stadius ML, Rowan R, Fleischauer JF, et al. Time course and cellular characteristics of iliac artery response to acute balloon injury; an angiographic, morphometric and immunocytochemical analysis in the cholesterol-fed New Zealand white rabbit. *Arterioscler Thromb*, 1992, **12**: 267~273.
 - 8 Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, et al. Retenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty; pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol*, 1991, **17**: 433~439.
 - 9 Rakugi H, Kim Dk, Krieger JE, et al. Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury; possible role in restenosis. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 339~346.
 - 10 Morishita R, Gibbons GH, Ellision KE, et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy; in vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 978~984.
 - 11 Fabris B, Yamada H, Cubela R, et al. Characterization of cardiac angiotensin converting enzyme (ACE) and in vivo inhibition following oral quinapril. *Br J Pharmacol*, 1990, **100**: 651~655.
- (1997-04-08 收到, 1997-08-21 修回)