

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

李玉光, 许端敏, 闫纯英, 石永英, 陈 畅, 卢成志

(汕头大学医学院附属第一医院心内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 病理学与病理生理学; 雷帕霉素; 电镜; 血管平滑肌细胞; 内膜增生; 球囊损伤; 大鼠

[摘要] 目的 建立大鼠腹主动脉球囊损伤模型, 研究雷帕霉素对血管平滑肌细胞表型和内膜增生的影响。方法 26 只大鼠随机分为假手术组、球囊损伤组、羧甲基纤维素钠组和雷帕霉素组。雷帕霉素组行腹主动脉球囊损伤术前 3 天开始每天肌肉注射雷帕霉素 0.5 mg/kg, 术后连续 14 天每天肌肉注射雷帕霉素 0.25 mg/kg。球囊损伤 14 天后进行电镜观察、组织学观察和形态学分析。结果 假手术组电镜下血管平滑肌细胞呈收缩表型, 球囊损伤后血管平滑肌细胞呈合成表型, 雷帕霉素干预后血管平滑肌细胞电镜下表现介于两者之间。术后 14 天雷帕霉素组新生内膜面积比羧甲基纤维素钠组减少 36.4% ($0.14 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ 比 $0.23 \pm 0.06 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$), 内膜/中膜比减少 28.9% ($17.7\% \pm 3.37\%$ 比 $28.86\% \pm 10.25\%$, $P < 0.01$)。结论 以上提示雷帕霉素可以抑制血管平滑肌细胞表型的改变, 减轻球囊损伤后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 Post Balloon Injury in Rat

LI Yu-Guang, XU Duan-Min, YAN Chun-Ying, SHI Yong-Ying, CHEN Chang, and LU Cheng-Zhi

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

[KEY WORDS] Rapamycin; Electron Microscope; Vascular Smooth Muscle Cell; Neointimal Proliferation; Balloon Injury; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of rapamycin on phenotype of vascular smooth muscle cell (VSMC) and intimal hyperplasia in a rat model of restenosis post balloon injury. **Methods** Twenty-six healthy adult male rats were randomly divided into four groups: sham group ($n = 2$), balloon group ($n = 8$): received balloon injury only, cellulose group ($n = 8$) received the vehicle solution, and rapamycin group ($n = 8$) intramuscular administration of rapamycin (suspended in solution containing 0.2% sodium carboxymethyl cellulose) started 3 days before injury at a dose of 0.5 mg/kg and continued for 14 days at a dose of 0.25 mg/kg. Phenotype of VSMC was observed with electron microscope. Abdominal aortas were analyzed for intimal area, mean intimal thickness, media area and intimal/media area ratio. **Results** Electron microscope showed the morphologic characteristics of VSMC changed from contractile to synthetic after balloon injury. VSMC showed less organelles and more myofibrilment when exposed to rapamycin. Neointimal area and intimal/media area ratio 14 days after injury showed a 36.4% and 28.9% reduce in the animals receiving rapamycin compared with those receiving cellulose respectively ($0.14 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ vs $0.23 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ and $17.70\% \pm 3.37\%$ vs $28.86\% \pm 10.25\%$, respectively, $P < 0.01$). **Conclusion** Rapamycin can influence the phenotype transform of VSMC, and reduce the degree of neointimal hyperplasia.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 表型转变、细胞增殖、迁移导致内膜增厚和管腔狭窄是血管成形术和支架植入术后的主要病理改变^[1,2]。动物实验和临床研究表明新型免疫抑制剂雷帕霉素 (rapamycin) 能抑制血管损伤后 VSMC 增殖、迁移, 减轻再狭窄的发生^[3-6]。但是雷帕霉素对

VSMC 表型的影响目前尚未见报道。本实验在建立大鼠腹主动脉球囊损伤模型的基础上, 应用雷帕霉素进行干预, 观察雷帕霉素对大鼠动脉损伤后 VSMC 超微结构和内膜增生的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组

健康成年雄性 SD 大鼠 (清洁级) 26 只, 体重 $250 \pm 50 \text{ g}$, 购于上海西普尔必凯公司, 实验动物合格证书号: 沪动合字 152 号。随机分为 4 组: ①假手术组 2 只, 不进行药物干预和插入导管; ②球囊损伤组 8

[收稿日期] 2004-06-10 [修回日期] 2005-05-05

[基金项目] 广东省卫生厅科研基金项目 (A2002438)

[作者简介] 李玉光, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的介入治疗和心脏电生理研究。许端敏, 硕士, 副主任医师, 主要从事冠心病的临床与基础研究, 联系电话为 0754-8258290-3482, E-mail 为 xudianmin@yahoo.com.cn。闫纯英, 主任医师, 主要从事冠心病的介入治疗。

只,单纯行腹主动脉球囊损伤术;羧甲基纤维素钠组 8 只,行腹主动脉球囊损伤术,术前术后肌肉注射羧甲基纤维素钠作为对照;雷帕霉素组 8 只,行腹主动脉球囊损伤术,术前 3 天开始每天肌肉注射雷帕霉素 0.5 mg/kg (溶于 0.2% 羧甲基纤维素钠溶液中),术后连续 14 天每天肌肉注射雷帕霉素 0.25 mg/kg^[3]。普通饲料喂养,饮水不限。雷帕霉素由福建微生物技术研究所提供。

1.2 动脉损伤模型的建立

利用 PTCA 导管制作大鼠腹主动脉球囊损伤模型。大鼠以 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)经腹腔麻醉,仰卧手术台固定。取颈部正中切口,暴露左颈总动脉,在导丝的指引下将 2F(2.5 mm × 20 mm)球囊导管自左颈总动脉插至腹主动脉下端,注入肝素盐水约 0.2 mL 充盈球囊,保持压力为 6 ATM,扩张 30 s,回拉导管至切口处,回缩球囊,间歇 60 s,再将球囊导管送入,重复 3 次,撤出球囊,结扎左颈总动脉,缝合切口。术中全身肝素化(100 U/kg),术后每天青霉素 40 万单位腹腔注射,共 3 天。

1.3 电镜观察

术后 14 天各组随机选取动物 1 只行电镜检查。切 1 mm² 大小血管用 2.5% 戊二醛(2 mL)40℃固定,0.1 mmol/L 磷酸缓冲液浸洗 30 s,1% 四氧化锇固定,0.1 mmol/L 磷酸缓冲液浸洗,然后用体积分数为 30%、50%、70%、90% 和 100% 乙醇梯度脱水,环氧丙烷置换,Epon812 包埋(环氧树脂)。超薄切片机切片,切片厚度 50~70 nm。铅、铀染色,日本产

H300 透射电子显微镜观察、拍照。

1.4 常规病理检查

各组其余动物于术后 14 天处死,取损伤血管段,经石蜡包埋、切片,苏木素—伊红(HE)染色及弹力纤维染色,以计算机图像分析系统测量血管内膜面积、内膜平均厚度和中膜面积,计算内膜/中膜面积比。内膜厚度为内膜最厚处至内弹力板的垂直距离。新生内膜面积=内弹力板面积-血管腔面积,中膜面积=外弹力板面积-内弹力板面积。

1.5 统计学处理

运用 SPSS10.0 统计软件处理实验数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)并作样本均数两两比较的 q 检验。

2 结果

2.1 雷帕霉素对血管平滑肌细胞表型的影响

假手术组电镜下 VSMC 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;球囊损伤组和羧甲基纤维素钠组术后 14 天可见 VSMC 呈合成表型,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。雷帕霉素组术后 14 天 VSMC 胞浆内线粒体及粗面内质网比羧甲基纤维素钠组明显减少,肌丝较多(图 1, Figure 1)。

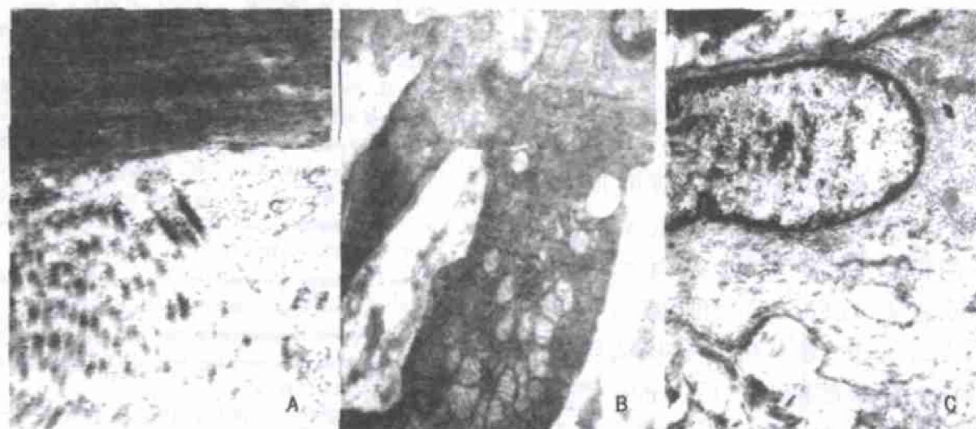


图 1. 血管平滑肌细胞显微结构 A 为假手术组($\times 15\,000$),B 为羧甲基纤维素钠组($\times 15\,000$),C 为雷帕霉素组($\times 10\,000$)。

Figure 1. Microstructure of vascular smooth muscle cell

2.2 雷帕霉素对动脉损伤后新生内膜形成的影响

假手术组腹主动脉管壁厚度均一,内膜由单层

内皮细胞构成,中膜 VSMC 呈梭形,排列方向一致。球囊损伤组和羧甲基纤维素钠组球囊损伤术后 14

天内膜增厚显著,增厚的内膜以细胞成分为主,细胞排列紊乱,内弹力层模糊,提示所建立大鼠腹主动脉球囊损伤模型成功。雷帕霉素组病理变化相似,但内膜厚度减少(图2, Figure 2)。与羧甲基纤维素钠组比较,术后14天雷帕霉素组新生内膜面积减少36.4% ($0.14 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ 比 $0.23 \pm 0.06 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$), 内膜/中膜比减少28.9% ($17.7\% \pm 3.37\%$ 比 $28.86\% \pm 10.25\%$, $P < 0.01$) (表1, Table 1)。

表1. 各组动脉损伤后内膜增生的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of intimal hyperplasia ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	内膜面积 (mm^2)	内膜平均厚度 (μm)	内膜/中膜比
球囊损伤组	7	0.24 ± 0.05	20.23 ± 2.69	$29.76\% \pm 5.35\%$
羧甲基纤维素钠组	7	0.23 ± 0.06	20.10 ± 3.43	$28.86\% \pm 10.25\%$
雷帕霉素组	7	0.14 ± 0.03^a	15.87 ± 2.17	$17.70\% \pm 3.37\%^a$

a: $P < 0.01$, 与羧甲基纤维素钠组比较。

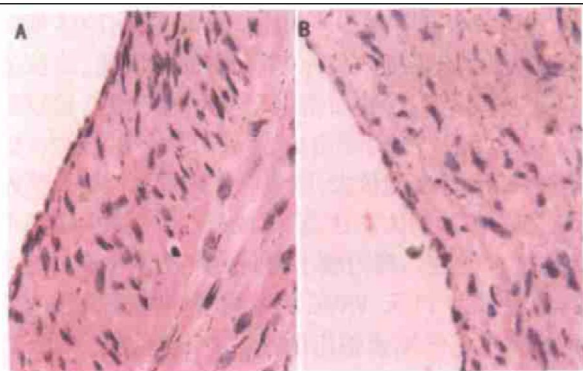


图2. 大鼠腹主动脉球囊损伤后14天(A)和雷帕霉素干预后14天(B) HE染色($\times 400$)

Figure 2. 14 days after balloon injury and rapamycin treatment (HE $\times 400$)

3 讨 论

雷帕霉素是1975年加拿大Ayerst研究所从Easter岛土壤吸水链球菌分离出来的一种由31元环组成的三烯大环内酯类药物,亦称为西罗莫司(sirolimus),结构与他克莫司(FK506)相似,具有抗真菌及免疫抑制的作用。Gallo等^[3]在猪冠状动脉成形术模型上观察到雷帕霉素能抑制术后VSMC增殖和迁移,减轻内膜增生的程度。近几年来雷帕霉素的局部用药也得到长足发展。国内外临床研究显示雷帕霉素洗脱支架能有效地减少再狭窄的发生^[4-6]。本实验形态学结果显示假手术组大鼠腹主动脉内膜由单层内皮细胞构成,中膜VSMC呈梭形,排列方向一致。球囊损伤组和羧甲基纤维素钠组球囊损伤术后14天内膜增厚显著,增厚的内膜以细胞成分为主,

细胞排列紊乱,内弹力层模糊。雷帕霉素组的病理变化相似,但术后14天内膜面积比羧甲基纤维素钠组减少36.4% ($P < 0.01$), 内膜/中膜面积比减少28.9% ($P < 0.01$)。羧甲基纤维素钠组内膜增生程度则与相应的球囊损伤组(术后14天内膜面积为 $0.24 \pm 0.05 \text{ mm}^2$) 相近。结果表明雷帕霉素对大鼠动脉损伤后新生内膜形成有明显抑制作用。

但雷帕霉素对VSMC表型的影响目前尚未见报道。本实验观察到假手术组未损伤动脉VSMC呈收缩表型,电镜下表现为胞体规则,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。球囊损伤后VSMC激活,转化为合成表型,胞体增大、不规则,胞浆肌丝成分少,细胞器多。雷帕霉素干预下,VSMC的显微结构表现介于收缩表型和合成表型之间,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。结果显示雷帕霉素可以抑制VSMC表型的转变。

研究表明,正常情况下VSMC处于安静状态,呈收缩表型,动脉损伤后,中膜VSMC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^[7,8]。本实验表明雷帕霉素可以通过抑制VSMC表型的转变来减轻内膜增生程度,是一种具有良好前景的药物。但作为一种免疫抑制剂,其安全性还需要进一步的观察。

[参考文献]

- [1] 党书毅,王家宁,王卫民,黄永章,张群林. 全反式维甲酸对大鼠腹主动脉球囊损伤后新生内膜形成和内皮再生的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (1): 16-18
- [2] 周俊,陆国平,戚文航. 核因子 κB 的反义和诱骗性寡核苷酸对大鼠球囊损伤后血管狭窄和新生内膜形成的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (4): 314-318
- [3] Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*, 1999, 99: 2 164-170
- [4] Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation*, 2001, 104 (17): 2 007-011
- [5] Lemos PA, Serruys PW, van Domburg RT, Saia Fm, Arampatzis CA, Hoye A, et al. Unrestricted utilization of sirolimus-eluting stents compared with conventional bare stent implantation in the "real world": the rapamycin-eluting stent evaluated at rotterdam cardiology hospital (RESEARCH) registry. *Circulation*, 2004, 109 (2): 190-195
- [6] SinorSIRIUS研究组. 国人应用雷帕霉素药物洗脱支架预防再狭窄的初步经验-SinorSIRIUS临床试验. 中华心血管病杂志, 2003, 31 (11): 814-817
- [7] 刘颖,李建军,李庚山,张玉平,王晶,夏玲,等. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管内膜增生及核因子 κB 活性的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (2): 131-134
- [8] 李永秋,徐明,姚绍鑫,张志勇. 实验性家兔颈动脉球囊扩张动脉狭窄动物模型的建立. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (3): 263-266

(此文编辑 朱雯霞)