

# 兔动脉损伤后血管外膜及其细胞增殖活性的变化

聂如琼, 王景峰, 伍卫, 薛迎生, 张旭明

(中山医科大学孙逸仙纪念医院心内科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】动态观察兔实验性腹主动脉损伤后血管外膜及其细胞增殖活性的变化, 以评价血管外膜及其细胞增殖在再狭窄中的作用。【方法】成年新西兰兔行髂动脉球囊拉伤后, 采用血管病理形态学和免疫组化染色方法, 观察术后 1 d、3 d、7 d、14 d 和 28 d 血管外膜厚度、细胞密度和增生指数的变化。【结果】球囊拉伤后 3 d、7 d、14 d 和 28 d, 血管外膜厚度均显著增加, 7 d、14 d 分别为  $(688 \pm 32) \mu\text{m}$ 、 $(667 \pm 28) \mu\text{m}$ ; 细胞密度在球囊拉伤后 3 d 开始增加至  $(6760 \pm 476)/\text{mm}^2$ , 7 d 达到  $(7218 \pm 256)/\text{mm}^2$ , 14 d 回到基线水准; 细胞增生指数 3 d 达到  $44.2\% \pm 5.6\%$ , 7 d 达到  $34.8\% \pm 7.4\%$ , 14 d 回到基线水准。【结论】血管外膜在血管损伤修复过程中具有一定作用, 外膜细胞增殖可能参与血管再狭窄的形成。

**关键词:** 血管成形术; 血管外膜; 再狭窄; 细胞增殖; 兔

中图分类号: R331.32; R543.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)03-0194-03

**Changes of Vascular Adventitia and Cell Proliferation After Arterial Injury in Rabbits** NIE Ru-qiong, WANG Jing-feng, WU Wei, XUE Ying-sheng, ZHANG Xu-ming. (Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

**Abstract** 【Objective】To investigate the changes of vascular adventitia and cell proliferation after arterial injury in rabbits. 【Methods】Angioplasty were Performed on rabbits abdominal artery by balloon dilatation. The materials were harvested on 1 d, 3 d, 7 d, 14 d and 28 d after operation. The thickness, cell density and cell proliferation of adventitia were investigated by histomorphometrical and immunohistochemical approach. 【Results】The thickness of adventitia significantly increased on 3 d, 7 d, 14 d and 28 d after operation, and reached to  $(688 \pm 32) \mu\text{m}$  and  $(667 \pm 28) \mu\text{m}$  at 7 d and 14 d respectively. Cell density reached to  $(6760 \pm 476)/\text{mm}^2$  on 3 d, and reached to  $(7218 \pm 256)/\text{mm}^2$  on 7 d. Whereas on 14 d, the cell density reverted toward the baseline. Meanwhile, the cell proliferation index reached to  $44.2\% \pm 5.6\%$  and  $34.8\% \pm 7.4\%$  on 3 d and 7 d respectively, and it reduced to normal level on 14 d. 【Conclusion】Adventitia plays an role in the process of vascular repairment after arterial injury, and cell proliferation of adventitia may participate in vascular restenosis.

**Key words:** angioplasty; adventitia; restenosis; cell proliferation; rabbits

经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)是目前常用的冠心病介入治疗方法,能明显缓解临床症状,改善预后。然而,术后 3 个月再狭窄发生率达  $20\% \sim 30\%$ ,严重影响远期疗效。早期认为新生内膜增殖是再狭窄的重要病理机制。然而,近来的实验和临床研究对此提出疑问,研究认为几何构型改变,即血管重塑对 PTCA 远期腔径丧失具有更重要的作用,而病理性血管重塑与血管外膜增厚、收缩有密切关系<sup>[1,2]</sup>。因此,我们在兔实验性腹主动脉损伤后,动态观察血管外膜及其细胞增殖活性的变化,阐明血管外膜在再狭窄形成中的作用。

## 1 材料与方

### 1.1 动物模型

健康纯种成年新西兰兔 30 只,体质量  $2.5 \sim 3.0 \text{ kg}$ ,由中山医科大学动物实验中心提供。实验时间 2000 年 10 月至 2001 年 7 月。实验动物随机分为正常对照组和球囊拉伤组。其中正常对照组 5 只,球囊拉伤组 25 只,球囊拉伤组再分为 5 个亚组,每个观察时点各 5 只。氯胺酮( $25 \text{ mg/kg}$ )和氯丙嗪( $12.5 \text{ mg/kg}$ )肌肉注射麻醉后,正常对照组行假手术,即切开右股动脉,插入球囊,但不进行球囊拉伤。球囊拉伤组切开右股动脉,行腹主动脉球囊拉伤,球囊直径  $3.5 \text{ mm}$ ,8 个大气压充盈球囊,回拉  $10 \text{ mm}$ ,反复 3 次,每次  $30 \text{ s}$ ,间隔  $1 \text{ min}$ ,术后即刻通过耳缘静脉注射肝素钠  $500 \text{ U}$  并注射庆大霉素  $8 \text{ 万 U}$  预防感染。

收稿日期: 2001-08-17

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(2000年度)

作者简介: 聂如琼(1968-),男,湖南衡阳人,在职博士,主治医师,张旭明,导师。

## 1.2 标本制备

正常对照组术后即刻处死,球囊拉伤组术后1 d、3 d、7 d、14 d和28 d分别处死。麻醉后,分离腹主动脉,近端逆行插入4F动脉鞘管,左股动脉插管引流,通过耳缘静脉注射戊巴比妥钠(75 mg/kg)处死动物,冲洗管腔内血液,100 mL/L中性甲醛恒压灌注,切取靶血管段,40 mL/L多聚甲醛固定,石蜡包埋,组织切片,每份标本非连续切片4张,间隔3 mm,切片厚度5  $\mu$ m。采用HE染色。

## 1.3 免疫组化标记增殖细胞

组织切片于6 mL/L过氧化氢孵育30 min, PBS液洗浴,室温下与单克隆抗体孵育1 h。使用鼠PC10单抗(1:100, Maxim公司)标记增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclei antigen, PCNA); PBS洗浴后,室温下与生物素标记的二抗孵育1 h, DAB染色,苏木精复染。

## 1.4 观察指标

光镜下计数血管外膜单位面积内总细胞核数量和PCNA阳性细胞核数量,细胞密度以每平方毫米的细胞总数表示,增生指数为PCNA阳性细胞占所有细胞的百分比。

## 1.5 血管图像分析

用计算机图像分析系统(Kilontron IBAS)进行血管图像分析。血管外膜以外弹力板的中膜面为内界,血管外脂肪层为外界。分别测定内膜厚度和中膜厚度,以及最大和最小的外膜厚度。以上数据分别测量3次,取其平均值。

## 1.6 统计学分析

计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,数据处理采用SPSS10.0软件包,运用单因素ANOVA分析, $P < 0.05$ 统计学上认为具有显著性差异。

# 2 结果

## 2.1 血管外膜厚度变化

正常对照组动脉血管外膜厚度为(210 $\pm$ 32)  $\mu$ m(图1A)。球囊拉伤后3 d(图1B)、7 d、14 d和28 d,腹主动脉血管外膜厚度显著增加(表1),而且以中膜损伤程度严重处,外膜增厚程度最为明显,损伤较轻或无损伤处,外膜增厚程度轻或无增厚;同时,球囊拉伤后各个时点血管中膜厚度无显著变化;显著内膜增厚发生在球囊拉伤14 d以后。本研究显示,兔腹主动脉球囊拉伤后,血管外膜增厚出现时间和高峰时间明显早于内膜变化。

表1 动脉损伤后血管各层厚度变化

Group	n	Thickness of adventitia	Thickness of media	Thickness of intima
Control	5	210 $\pm$ 32	233 $\pm$ 24	10 $\pm$ 7
Injured 1 d	5	229 $\pm$ 10	211 $\pm$ 22	30 $\pm$ 9
Injured 3 d	5	652 $\pm$ 44 <sup>1)</sup>	210 $\pm$ 28	80 $\pm$ 10 <sup>2)</sup>
Injured 7 d	5	688 $\pm$ 32 <sup>1)</sup>	241 $\pm$ 26	245 $\pm$ 30 <sup>1)</sup>
Injured 14 d	5	667 $\pm$ 28 <sup>1)</sup>	226 $\pm$ 27	492 $\pm$ 45 <sup>1)</sup>
Injured 28 d	5	587 $\pm$ 33 <sup>2)</sup>	223 $\pm$ 36	920 $\pm$ 57 <sup>1)</sup>

Compared with control group, 1)  $P < 0.01$ , 2)  $P < 0.05$

## 2.2 血管外膜细胞增殖情况

血管外膜细胞密度在球囊拉伤后3 d开始增加,7 d显著增加,14 d回到基线水准。血管外膜细胞密度在3 d、7 d显著增加,14、28 d基本回到基线水平。细胞密度增加与细胞增殖情况有一定的相关性。PCNA染色显示,血管外膜细胞增生指数3 d达到高峰,7 d显著增加,14 d和28 d回到基线水平(表2)。

表2 动脉损伤后血管外膜细胞增生情况

Group	n	Cell density (cell/mm <sup>2</sup> )	Proliferation index (%)
Control	5	2 885 $\pm$ 298	2.8 $\pm$ 0.7
Injured 1 d	5	3 246 $\pm$ 213	11.2 $\pm$ 1.4
Injured 3 d	5	6 760 $\pm$ 476 <sup>1)</sup>	44.2 $\pm$ 5.6 <sup>1)</sup>
Injured 7 d	5	7 218 $\pm$ 256 <sup>1)</sup>	34.8 $\pm$ 7.4 <sup>1)</sup>
Injured 14 d	5	3 563 $\pm$ 342	5.6 $\pm$ 1.2
Injured 28 d	5	2 872 $\pm$ 272	3.2 $\pm$ 0.9

Compared with control group, 1)  $P < 0.01$

# 3 讨论

一般认为,再狭窄是动脉损伤后血管过度修复反应的表现,与损伤程度呈正相关。有研究观察到冠状动脉内球囊扩张引起的损伤,不仅涉及血管内膜和中层,也累及血管外膜,并发现血管外膜在损伤修复过程中具有一定作用,可能参与再狭窄的形成<sup>3)</sup>。由此提出再狭窄的血管重塑机制。

血管重塑是血管壁为适应血管腔内血流动力学环境变化而产生的病理生理现象,包括适应性血

管重塑和病理性血管重塑<sup>[4,5]</sup>。病理性血管重塑定义为随着粥样硬化病变的进展,动脉失去扩张能力,甚至呈现收缩状态<sup>[1]</sup>。Mintz等<sup>[2]</sup>观察到病理性血管重塑发生于PTCA术后1个月至6个月之间,与再狭窄的发病高峰期相同,并认为75%的血管腔径丧失源于病理性血管重塑,血管内超声亦发现PTCA术后出现血管外膜收缩,血管横截面积降低。

血管重塑成为关注焦点,但其机制尚不明确。PCNA是一种核内蛋白质,在静止期细胞中含量极少,G1晚期开始增加,相关研究证实支架植入后血管壁PCNA表达上调,可作为评价细胞增殖状态的指标<sup>[6]</sup>。本研究采用免疫组化技术标记PCNA,观察到动脉损伤后早期即出现血管外膜细胞增殖活性的升高和细胞数量的增加,血管外膜厚度亦显著增加,提示血管外膜改变在血管修复过程可能起到始动环节的作用。Libby等<sup>[7]</sup>发现动脉损伤后24h开始血管外膜细胞摄取BrdU(5-溴-2-脱氧尿嘧啶)增多,提示DNA合成增加,细胞增殖活跃,免疫组化染色显示增殖细胞为非平滑肌细胞。因此,可以设想,如果PTCA术中损伤动脉壁,撕裂中膜,甚至暴露外膜,通过内皮细胞或其它细胞释放各种细胞因子、趋化因子和生长因子,促使外膜细胞增殖,并通过一定机制使细胞外基质和收缩蛋白合成增加,致血管外膜增厚并收缩,构成病理性血管重塑

的可能机制。

本研究显示:血管外膜在血管修复过程中起着一定作用,外膜细胞的增殖、分化和迁徙可能参与血管再狭窄的形成,但主要细胞是否来源和动态变化尚有待于进一步研究。

(本文图1见封4 Fig.1 Shown in back cover)

参考文献:

- [1] Glagov S, Weisenberg E, Zarins C K, *et al.* Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316(22): 1371.
- [2] Mintz G S, Popma J J, Pichard A D, *et al.* Arterial remodeling after coronary angioplasty: A serial intravascular ultrasound study [J]. *Circulation*, 1996, 94(1): 35.
- [3] Lansky A J, Mintz G S, Popma J J, *et al.* Remodeling after directional coronary atherectomy: A serial angiographic and intravascular ultrasound analysis from the optimal atherectomy restenosis study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32(2): 329.
- [4] Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, *et al.* Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy [J]. *Circulation*, 1997, 96(2): 475.
- [5] Tardif J C, Cote G, Lesperance J, *et al.* Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(6): 365.
- [6] 刘英梅,张旭明,伍卫,等. 支架植入对兔血管平滑肌细胞PCNA和Cyclin E表达及细胞凋亡的影响[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(3): 180.
- [7] Libby P, Tanaka H. The molecular bases of restenosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1997, 40(2): 97.

(编辑 刘清海)

(上接第175页 from page 175)

参考文献:

- [1] Ikehara S, Good R A, Nakamura T, *et al.* Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(12): 2483.
- [2] Jacobs P, Vincent M D, Martell R W. Prolonged remission of severe refractory rheumatoid arthritis following allogeneic bone marrow transplant [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1986, 1(1): 237.
- [3] Marmont A M. Stem cell transplantation for severe autoimmune disease: progress and problems [J]. *Haematologica*, 1998, 83(8): 733.
- [4] Ikehara S. Bone marrow transplantation for autoimmune disease [J]. *Acta Haematol*, 1998, 99(3): 116.

- [5] Khoufi I, Lee M S, Palmer L, *et al.* Transplant-lite using fludarabine-cyclophosphamide and allogeneic stem cell transplantation for low grade lymphoma [J]. *Blood*, 1999, 94(3): 1553.
- [6] Thomas E D. Bone marrow transplantation for malignant disease [J]. *J Clin Oncol*, 1983, 1(1): 517.
- [7] Storb R, Yu C, Sandmaier B, *et al.* Mixed hematopoietic chimerism after hematopoietic stem cell allografts [J]. *Transplantation Proceedings*, 1999, 31(2): 677.
- [8] Keever C A, Small T N, Flomenberg N, *et al.* Immune reconstitution following bone marrow transplantation; comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts [J]. *Blood*, 1989, 73(6): 1340.

(编辑 黄小延)

## 成人骨髓间质干细胞基本生物学特性 (正文见第 170 页)

Basic Biological Characteristics of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells

(Text in page 170)

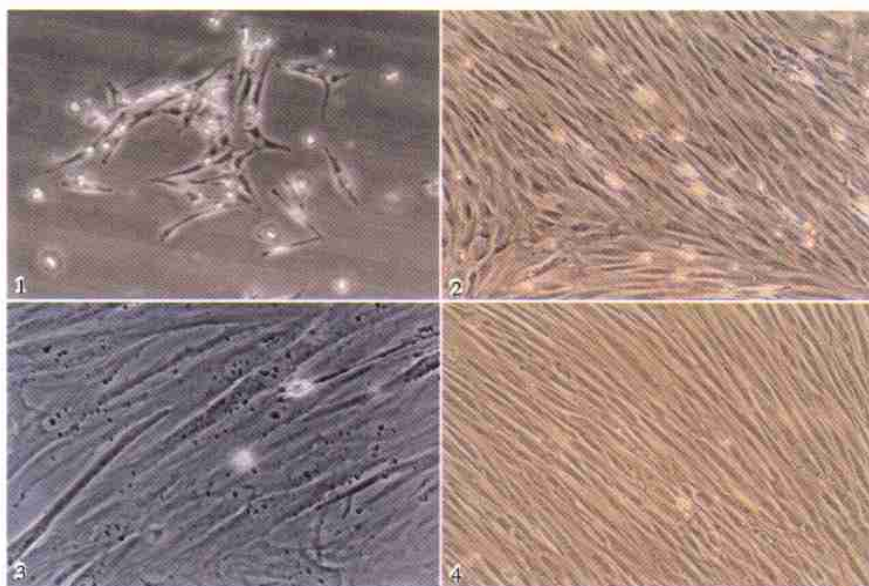


图 1 72 h 换液后的贴壁细胞

图 2 接近融合的原代 hMSC

图 3 H-DMEM 培养的 P5 代 hMSC

图 4 L-DMEM 培养的 P5 代 hMSC

Fig. 1 Primary mesenchymal stem cells were cultured at 72 h after plating ( $\times 40$ )

Fig. 2 Primary mesenchymal stem cells reach to confluence at 15 days after plating ( $\times 40$ )

Fig. 3 P5 Mesenchymal stem cells cultured with H-DMEM ( $\times 100$ )

Fig. 4 P5 Mesenchymal stem cells cultured with L-DMEM ( $\times 40$ )

## 兔动脉损伤后血管外膜及其细胞增殖活性的变化 (正文见第 194 页)

Changes of Vascular Adventitia and Cell Proliferation After Arterial Injury in Rabbits (Text in page 194)

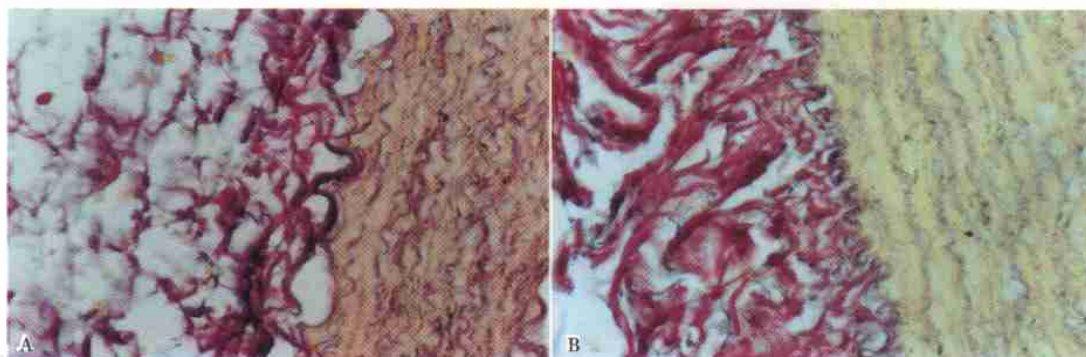


图 1 动脉损伤后血管外膜厚度

Fig. 1 Thickness of vessel adventitia after arterial injury ( $\times 20$ )

A: Control group; B: 3 d after arterial injury