

¹⁰³Pd 放射性核素支架抑制损伤血管平滑肌细胞增殖的实验研究

刘英梅, 张旭明, 伍卫, 王景峰, 陈筱潮

(中山大学附属第二医院心内科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】采用兔腹主动脉损伤致再狭窄的动物模型, 探讨钯-¹⁰³(¹⁰³Pd)放射性核素支架对损伤血管中膜平滑肌细胞增殖的影响。【方法】选用雄性新西兰兔 50 只, 随机分为普通支架组及核素支架组, 设正常对照。分别于术后 3、7、14、28 及 56 d 取材, 进行病理形态学、透射电镜、免疫组化(增殖细胞核抗原 PCNA、细胞周期素蛋白 Cyclin E)及原位杂交(C-myc mRNA)实验观察。【结果】①光镜下发现, 核素支架组管腔狭窄程度明显低于普通支架组, 术后第 56 天最显著($P < 0.01$); ②透射电镜显示, 术后 3~28 d, 核素支架组中膜血管平滑肌细胞增殖明显低于普通支架组, 7 d 时达峰, 为 $13.78\% \pm 0.64\%$ vs $19.53\% \pm 0.44\%$ ($P < 0.01$); ③免疫组化显示, 术后 3~28 d 核素支架组 PCNA 及 Cyclin E 表达均低于普通支架组, 7 d 为表达高峰, PCNA 为 $16.35\% \pm 0.79\%$ vs $24.36\% \pm 0.55\%$, Cyclin E 为 $14.78\% \pm 1.07\%$ vs $22.65\% \pm 1.00\%$ ($P < 0.01$); ④对 C-myc mRNA 进行原位杂交显示, 术后 3~28 d 核素支架组的表达明显低于普通支架组, 7 d 达峰值, 为 $17.48\% \pm 0.53\%$ vs $25.34\% \pm 0.87\%$ ($P < 0.01$); ⑤ C-myc mRNA 与 PCNA 相关性分析提示二者呈明显正相关($P < 0.01$)。【结论】¹⁰³Pd 放射性核素支架通过抑制损伤血管中膜平滑肌细胞的增殖, 降低再狭窄的程度, 从而减少再狭窄的发生率。

关键词:放射性同位素; 支架; 增殖; 肌, 平滑; 血管

中图分类号: R541.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2003)02-0113-04

Experiment Study on the Proliferation-inhibiting Effect of ¹⁰³Pd Radioactive Injured Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Ying-mei, ZHANG Xu-ming, WU Wei, WANG Jing-feng, CHEN Xiao-chao

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510120)

Abstract: 【Objective】By establishing restenosis animal model of rabbits' abdominal arteries, to evaluate the proliferation-inhibiting effect of ¹⁰³Pd radioactive stent on injured media vascular smooth muscle cells. 【Methods】Fifty male New Zealand rabbits were randomized into stent group and ¹⁰³Pd stent group. Control group was set up. The materials were harvested on day 3, 7, 14, 28 and 56 after operation and the following investigation were carried out, including pathomorphology, transmission electron microscopy (TEM), immunohistochemistry and in situ hybridization studies. 【Results】① The severity of the stenosis in ¹⁰³Pd stent group was less severe than that of stent group. It was most obvious on 56th day ($P < 0.01$). ② TEM analysis showed that the vascular smooth muscle cells' proliferation of ¹⁰³Pd stent group was much lower than that of stent group from day 3 to day 28. The peak day was on 7th day, $13.78\% \pm 0.64\%$ vs $19.53\% \pm 0.44\%$ ($P < 0.01$). ③ The expression of PCNA and Cyclin E of ¹⁰³Pd stent group was lower than that of stent group from day 3 to day 28. It was more obvious on 7th day. PCNA was $16.35\% \pm 0.79\%$ vs $24.36\% \pm 0.55\%$. Cyclin E was $14.78\% \pm 1.07\%$ vs $22.65\% \pm 1.00\%$ ($P < 0.01$). ④ In situ hybridization showed that the expression of C-myc mRNA of ¹⁰³Pd stent

收稿日期: 2002-09-04

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助项目(98-1-087)

作者简介: 刘英梅(1970-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 讲师; 张旭明, 导师。

group was much lower than that of stent group. The lowest expression was on 3rd day, $17.48\% \pm 0.53\%$ vs $25.34\% \pm 0.87\%$ ($P < 0.01$). ⑤ Linear correlation analysis showed that there was significant positive correlation between the expression of C-myc mRNA and PCNA ($P < 0.01$). 【Conclusion】¹⁰³Pd radioactive stent inhibits the proliferation of injured media vascular smooth muscle cells. It relieves the severity of restenosis and decreases the occurrence of restenosis.

Key words: radioisotope; stent; proliferation; muscle, smooth, vascular

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(2): 113 ~ 116]

冠状动脉内支架的植入已广泛应用于冠心病的治疗,但术后 20%~30% 的再狭窄发生率成为亟待解决的问题。近年来,药物涂层支架的发展取得了一定进展,所用药物包括雷帕霉素(rapamycin)、taxol、肝素、磷脂酰胆碱(PC)及一氧化氮等。前二者在抑制平滑肌细胞增殖的同时,使血管内皮修复延迟,增加血栓形成机会,存在血管壁坏死和动脉瘤形成的隐患。肝素在体内降解快,效果有限。磷脂酰胆碱临床评价显示再狭窄率与一般普通支架相差无几。一氧化氮被认为疗效较显著,但正确评价尚有赖于大样本的临床试验。放射性核素因其强有力的抗增殖作用而受到学者们的关注。以往研究较多针对 β 射线 ^{32}P 放射性核素支架,且主要集中在新生内膜的变化方面。我们在 1998 年 10 月至 2001 年 3 月间,首次应用 ^{103}Pd 放射性核素支架预防再狭窄,旨在通过建立兔血管损伤致再狭窄的模型,观察 ^{103}Pd 放射性核素支架对中膜血管平滑肌细胞增殖的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备

选择雄性新西兰大白兔 50 只,随机分为普通支架组(stent group)及 ^{103}Pd 放射性核素支架组(^{103}Pd stent group),每组 25 只,各组按取材时间不同,随机分为 5 个亚组,每个亚组各 5 只,以每只兔相邻部位的正常腹主动脉作为对照(对照组)。实验前 1 周开始高脂饮食喂养,直至术后处死。

1.2 ^{103}Pd 放射性核素支架的制作

采用德国 JoMed 公司生产的 (3.5~5.0) mm × 8.0 mm 不锈钢裸支架,由中国科学院原子能研究院核素研究所协助完成。用化学电镀方法使支架表面电镀薄层放射性核素 ^{103}Pd ,根据电镀液所含核素 ^{103}Pd 的浓度控制电镀于支架表面上核素的量。本实验所用每个 ^{103}Pd 放射性核素支架的放射性活度均为 9.25 MBq。

1.3 支架植入

将动物麻醉后,经右股动脉沿导引钢丝逆行插入 PTCA 球囊导管 (4.0 mm × 10.0 mm) 至腹主动脉内,维持球囊压力 $8.01 \times 10^{-4}\text{GPa}$,缓慢回拉球囊导管 10 mm 损伤血管,释放压力,每隔 1 min 重复上述损伤过程,共 3 次。之后普通支架组将 8 mm 裸支架(德国 JoMed 公司)嵌在 3.5 mm × 10.0 mm 球囊上沿导引钢丝送入腹主动脉,球囊压力 $8.01 \times 10^{-4}\text{GPa}$,持续 20 s,释放支架。核素支架组则植入 ^{103}Pd 放射性核素支架,之后回撤球囊及其它器械,缝合伤口,经耳缘静脉推注肝素 1.25 mg/kg 抗凝,青霉素 0.48 g 预防感染。

1.4 标本采集

分别于术后 3~56 d 取材,100 mg/L 氯化钾 3~5 mL 处死动物,沿腹主动脉插入动脉鞘管,经右股动脉插管引流,灌注 30~50 mL 肝素生理盐水冲洗。取支架植入处血管 2.0 cm 及邻近正常血管 1.0 cm,分为四段,一段置于 100 mL/L 甲醛溶液中进行病理形态学研究;一段置于 25 mL/L 戊二醛和 20 mg/L 多聚甲醛液用于电镜观察;一段置于 100 mL/L 中性甲醛缓冲溶液,用于免疫组化研究;一段置于 40 mg/L 多聚甲醛/PBS (0.1 mol/L) 用于原位杂交。

1.5 指标观察

1.5.1 病理形态学检测 将 100 mL/L 甲醛固定的标本石蜡包埋后切片,进行 HE 染色和弹力纤维染色。用光镜及计算机图像分析系统测定管腔狭窄程度。

1.5.2 透射电镜检测 取上述 25 mL/L 戊二醛和 20 mg/L 多聚甲醛前固定的标本,用 10 mL/L 锇酸后固定,脱水,环氧树脂包埋、切片、染色。透射电镜 H-600 观察拍片,每个标本计数 200 个细胞,计算增殖的平滑肌细胞阳性率。

1.5.3 免疫组化检测 将 100 mL/L 中性甲醛缓冲溶液固定后的标本行石蜡包埋、切片,采用 LSAB 法对 PCNA(1:50)、Cyclin E(1:50)(DAKO 公司)进

行免疫组化染色,DAB显色。设阳性及阴性对照。光镜下观察拍片,阳性细胞在胞核呈棕褐色,每个标本观察8个高倍镜视野,计数血管中膜阳性细胞占观察细胞总数的百分比。

1.5.4 原位杂交检测 C-myc mRNA 的表达 按照 C-myc 原位杂交试剂盒(BOSTER)说明进行操作。DAB显色,苏木素复染。光镜下观察拍片,阳性细胞在胞核呈棕褐色,每个标本观察8个高倍镜视野,计数中膜血管平滑肌细胞中阳性细胞占观察细胞总数的百分比。

1.6 统计学处理

计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,多组数据比较采用方差分析,用SPSS 10.0统计软件进行统计学处理,取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 病理形态学检测结果

结果(见表1,正号表示比原来狭窄,负号表示扩张)发现,术后3~7d核素支架组和普通支架组管腔狭窄程度较接近。但从术后14d起,直到术后

表1 光镜下兔腹主动脉的狭窄程度

Table 1 Stenosis rates of rabbits' abdominal arteries by light Microscopy (%)

t/d	Stent	^{103}Pd -stent
3	-6.12 $\pm$ 1.27	-4.82 $\pm$ 1.05
7	-3.38 $\pm$ 0.92	-1.94 $\pm$ 0.88
14	4.57 $\pm$ 1.21	-1.27 $\pm$ 0.46 ¹⁾
28	19.58 $\pm$ 2.44	1.07 $\pm$ 0.03 ¹⁾
56	39.85 $\pm$ 3.26	18.27 $\pm$ 2.91 ¹⁾

1) Compared with stent group, $P < 0.05$

56d,核素支架组管腔面积明显扩大,狭窄程度明显低于普通支架组,存在统计学差异。

2.2 透射电镜检测结果

与正常血管相比,普通支架组和核素支架组内膜与中膜均出现合成型平滑肌细胞,说明仍存在中膜平滑肌细胞增殖及向内膜下迁移的现象。可看到处在增殖状态的合成型平滑肌细胞形态异常,不规则,细胞排列紊乱,细胞核大,染色质变淡,细胞器丰富,有较多的线粒体和内质网。增殖的平滑肌细胞阳性率结果见表2,可见,与正常血管相比,普通支架组和核素支架组均出现平滑肌细胞增殖,7d时达高峰,而核素支架组平滑肌细胞增殖在术后3~28d却比普通支架组明显减少,存在统计学差异。术后56d,3组间无显著性差异。

表2 电镜下兔腹主动脉中膜平滑肌细胞的增殖

Table 2 Proliferation in media vascular smooth muscle cells of rabbits' abdominal arteries by transmission electron microscopy(%)

t/d	Control	Stent	^{103}Pd -stent
3	2.39 $\pm$ 0.32	11.44 $\pm$ 0.52 ¹⁾	8.02 $\pm$ 0.39 ^{1),2)}
7	2.57 $\pm$ 0.51	19.53 $\pm$ 0.44 ^{1),3)}	13.78 $\pm$ 0.64 ^{1),2),3)}
14	2.47 $\pm$ 0.20	13.28 $\pm$ 0.55 ¹⁾	10.34 $\pm$ 0.60 ^{1),2)}
28	2.54 $\pm$ 0.36	8.52 $\pm$ 0.47 ¹⁾	6.22 $\pm$ 0.52 ^{1),2)}
56	2.49 $\pm$ 0.31	2.74 $\pm$ 0.34	2.57 $\pm$ 0.34

1) Compared with control group, $P < 0.01$. 2) Compared with stent group, $P < 0.01$. 3) Compared with all other days groups, $P < 0.01$

2.3 PCNA、Cyclin E 与 C-myc mRNA 的表达及其相关性分析

免疫组化结果见表3,可见与正常对照组比较,普通支架组和核素支架组兔腹主动脉中膜平滑

表3 兔腹主动脉中膜平滑肌细胞 PCNA 和 CyclinE 的表达

Table 3 The expression of PCNA and Cyclin E in media vascular smooth muscle cells of rabbits' abdominal arteries (%)

t/d	PCNA			Cyclin E		
	Control	Stent	^{103}Pd -stent	Control	Stent	^{103}Pd -stent
3	3.06 $\pm$ 0.40	14.24 $\pm$ 0.65 ¹⁾	11.82 $\pm$ 0.63 ^{1),2)}	3.00 $\pm$ 0.26	16.24 $\pm$ 0.65 ¹⁾	10.30 $\pm$ 0.56 ^{1),2)}
7	3.16 $\pm$ 0.62	24.36 $\pm$ 0.55 ^{1),3)}	16.35 $\pm$ 0.79 ^{1),2),3)}	3.11 $\pm$ 0.61	22.65 $\pm$ 1.00 ^{1),3)}	14.78 $\pm$ 1.07 ^{1),2),3)}
14	3.15 $\pm$ 0.44	16.56 $\pm$ 0.68 ¹⁾	12.55 $\pm$ 0.60 ^{1),2)}	3.06 $\pm$ 0.40	14.90 $\pm$ 1.06 ¹⁾	11.08 $\pm$ 0.77 ^{1),2)}
28	3.04 $\pm$ 0.25	10.60 $\pm$ 0.57 ¹⁾	6.79 $\pm$ 0.64 ^{1),2)}	2.97 $\pm$ 0.41	9.64 $\pm$ 0.48 ¹⁾	5.49 $\pm$ 0.85 ^{1),2)}
56	2.93 $\pm$ 0.37	3.37 $\pm$ 0.42	2.70 $\pm$ 0.30	2.78 $\pm$ 0.36	3.30 $\pm$ 0.33	2.64 $\pm$ 0.29

1) Compared with control group, $P < 0.01$. 2) Compared with stent group, $P < 0.01$. 3) The 7th day group compared with all other days groups, $P < 0.01$

肌细胞中 PCNA 和 Cyclin E 的表达在术后第 3 天至 28 d 均有增加,术后 7 d 达峰 ($P < 0.01$)。而核素支架组的表达却较普通支架组减少,存在明显统计学差异。至术后 56 d,3 组间无明显差别。

经原位杂交测定的 C-myc mRNA 的表达结果与表 3 类似,术后 3 d 至 28 d,普通支架组和核素支架组 C-myc mRNA 的表达均较对照组增加,而核素支架组的表达却较普通支架组减少,存在明显统计学差异。术后第 7 天为增殖高峰,术后第 56 天 3 组间无明显差异。

采用直线相关分析发现,术后 3 ~ 28 d PCNA 阳性率与 C-myc mRNA 表达阳性率呈明显正相关,普通支架组相关系数为 0.914 ($P < 0.01$),核素支架组相关系数为 0.902 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 放射性核素在血管再狭窄防治中的应用

放射性核素对分裂增生的细胞具有很强的杀伤作用。近几年研究发现,对预防主要由新生内膜增生引起的支架内再狭窄有很好的疗效。根据放射源不同,分为 γ 射线、 β 射线、X 射线等。 β 射线穿透力弱,安全性高,但存在“边缘效应”^[1]。 γ 射线穿透力强,剂量分布均匀,无“边缘效应”,但需要特殊防护^[2]。目前研究主要采用 3 种照射方式:血管外照射、血管内照射及放射性核素支架,其中放射性核素支架运用最多的是 ^{32}P 放射性核素支架。再狭窄的同位素支架介入研究 (IRIS) IA 和 IB 是两个初期的临床试验,研究 ^{32}P 放射性核素支架的可行性,结果证实 ^{32}P 放射性核素支架是安全有效的,病人再狭窄的发生率减少^[3]。

本研究选用的 ^{103}Pd 是低能量的 γ 射线源,能量范围是 20 ~ 30 keV,半衰期 17 d,它具有高剂量率、短半衰期、短照射范围的特点。只需用厚度 1 cm 的聚乙烯塑料盒包装即可完全达到防辐射的作用。在 20 世纪 90 年代初, ^{103}Pd 在临床投入使用,主要用于前列腺癌的治疗,疗效已得到证实。

3.2 ^{103}Pd 对平滑肌细胞增殖的影响

以往研究主要集中在释放 β 射线的 ^{32}P 放射性核素支架,本研究应用释放 γ 射线的 ^{103}Pd 放射性核素支架探讨了中膜平滑肌细胞增殖的影响,以前尚未见报道。光镜下已证实, ^{103}Pd 核素支架组在术后 14 ~ 56 d,管腔狭窄程度明显低于普通支架组。通过透射电镜观察,发现核素支架组与普通支

架组均表现中膜平滑肌细胞排列紊乱,但核素支架组合成型的平滑肌细胞数量较普通支架组减少,术后 3 ~ 28 d 均存在显著性差异。PCNA 和 Cyclin E 是反映细胞增殖状态的两个指标,在实验中发现,术后 3 ~ 28 d,核素支架组 PCNA 和 Cyclin E 的阳性率明显低于普通支架组。由此可见, ^{103}Pd 放射性核素支架在减少中膜平滑肌细胞增殖的过程中起了关键作用。

目前认为,C-myc 基因属即刻早期基因,受多种有丝分裂原刺激后,常呈快速诱导方式表达。C-myc 基因表达是促进血管平滑肌细胞表型转变及增殖,加速新生内膜形成的重要原因^[4]。本研究发现, ^{103}Pd 核素支架与普通支架比较,能明显抑制 C-myc 基因的表达,且 C-myc 基因表达与 PCNA 表达呈明显正相关,提示 ^{32}P 放射性核素通过抑制 C-myc mRNA 的表达,抑制中膜平滑肌细胞的增殖,减少再狭窄发生率。

本研究应用 γ 射线 ^{103}Pd 放射性核素支架,与以往研究集中在新生内膜不同,重点观察了中膜血管平滑肌细胞的增殖变化,同时发现原癌基因 C-myc 的表达与 PCNA 呈正相关。 ^{103}Pd 放射性核素支架通过抑制中膜血管平滑肌细胞增殖,从而减少再狭窄的发生,为今后预防再狭窄提供实验依据。

参考文献:

- [1] Serruys P W, Kay I P. I like the candy, I hate the wrapper: the ^{32}P radioactive stent[J]. *Circulation*, 2000, 101 (1): 3.
- [2] Kotzerke J, Hanke H, Hoher M. Endovascular brachytherapy for the prevention of restenosis after angioplasty[J]. *Eur J Nucl Med*, 2000, 27 (2): 223.
- [3] Fischell T A, Carter A J, Foster M, *et al.* Lessons from the feasibility radioactive (IRIS) stent trials[A]. In: Waksman R, ed. *Vascular brachytherapy[M]*. 2nd ed. Armonk, NY: Futura Publishing Co, 1999. 475 ~ 481.
- [4] Lansky A J, Popma J J, Colombo A, *et al.* Follow-up angiographic comparison of the low dose vs high dose phosphorus-32 radioactive isostent: results from expanded IRIS and Milan Dose A Studies[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 33(4): 17A.
- [5] Shi Y, Fard A, Galeo A, *et al.* Transcatheter delivery of C-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury[J]. *Circulation*, 1994, 90 (2): 944.

(编辑 刘清海)