

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

刘英梅, 张旭明, 伍 卫, 周颖玲

(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】观察支架植入后对血管中膜平滑肌细胞增殖和凋亡的影响, 探讨支架植入后再狭窄的发生机制。【方法】将雄性新西兰兔 50 只随机分为球囊组和支架组, 设正常对照。分别于术后第 3、7、14、28、56 天取材研究: ①用免疫组化检测血管中膜平滑肌细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)和细胞周期蛋白 E(Cyclin E)的表达; ②用 TUNEL 染色法测定血管中膜平滑肌细胞的凋亡。【结果】与对照组比较, 支架组和球囊组 PCNA、Cyclin E 表达及细胞凋亡均有显著增加。支架组与球囊组比较, ①PCNA 和 Cyclin E 表达明显增加, 术后第 7 天, 支架组和球囊组 PCNA 阳性率为 $24.36\% \pm 0.55\%$ vs $18.74\% \pm 1.09\%$ ($P < 0.01$), Cyclin E 阳性率为 $22.65\% \pm 1.00\%$ vs $17.68\% \pm 1.10\%$ ($P < 0.01$); ②支架组血管中膜平滑肌细胞的凋亡也较球囊组显著增加, 最大凋亡率在术后第 7 天, $12.46\% \pm 1.13\%$ vs $5.54\% \pm 0.53\%$ ($P < 0.01$); ③PCNA 和 Cyclin E 的阳性率与平滑肌细胞凋亡阳性率的比值, 球囊组大于支架组。【结论】支架组较球囊组导致明显的平滑肌细胞增殖, 同时也导致更显著的平滑肌细胞凋亡, 使支架植入后再狭窄的程度减轻。

关键词: 支架; 肌, 平滑; 增殖细胞核抗原; 细胞周期蛋白 E

中图分类号: R541.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0180-04

Effect of Stent Implantation on the Expression of PCNA and Cyclin E and Apoptosis in Rabbit Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Ying-mei, ZHANG Xu-ming, WU Wei, ZHOU Ying-ling

(Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To evaluate the impact of stent implantation on proliferation and apoptosis in media vascular smooth muscle cells and to explore the mechanism of restenosis after stent implantation.【Methods】Fifty male New Zealand rabbits were randomized into balloon group and stent group. Control group were set up. The materials were harvested on 3, 7, 14, 28 and 56 day after operation and the following investigation were carried out. ① Assessing the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cyclin E of media smooth muscle cells with immunohistochemistry; ② Analyzing apoptosis of media smooth muscle cells by TUNEL technique.【Results】The expressions of PCNA, Cyclin E and apoptosis in stent and balloon groups were markedly increased compared to control groups. ① Stent group induced significant increased expression of PCNA and Cyclin E in the media smooth muscle cells compared to balloon group. On day 7, the positive rates of PCNA and Cyclin E were $24.36 \pm 0.55\%$ vs $18.74 \pm 1.09\%$ ($P < 0.01$) and $22.65 \pm 1.00\%$ vs $17.68 \pm 1.10\%$ ($P < 0.01$) respectively; ② Stent group induced much more significant apoptosis than balloon group. The highest rate of apoptosis appeared on day 7: $12.46 \pm 1.13\%$ vs $5.54 \pm 0.53\%$ ($P < 0.01$); ③ By calculating the ratio of positive rates of PCNA to apoptosis and Cyclin E to apoptosis respectively, the ratio of balloon

收稿日期: 2000-11-03

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助课题(98-1-087)

作者简介: 刘英梅(1970-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 博士生, 医师。

group was higher than that of stent group.【Conclusion】 Stent group induces augmented proliferation and much more significant apoptosis of media smooth muscle cells compared to balloon group. It shows that the severity of restenosis is relieved after stent implantation.

Key words: stents; muscle, smooth; proliferating cell nuclear antigen (PCNA); cyclin E

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄是一个棘手问题。冠状动脉内支架植入虽使再狭窄有所改善,但仍有一定程度再狭窄发生。以往对支架内再狭窄的研究主要集中在新生内膜的病理形态学变化方面,认为新生内膜增生与再狭窄发生密切相关,对血管中膜平滑肌细胞的影响尚鲜见报道。我们通过研究支架植入后兔血管中膜平滑肌细胞 PCNA 和 Cyclin E 表达及细胞凋亡,探讨支架植入后再狭窄的发生机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型的制备

1.1.1 动物分组及喂养 雄性新西兰白兔 50 只,随机分为单纯球囊拉伤组(球囊组)和球囊拉伤后支架植入组(支架组),每组 25 只,按照取材时间(第 3、7、14、28、56 天),再随机分为 5 个亚组,每组 5 只。以每只动物的邻近正常腹主动脉作为对照(对照组)。实验前 1 周开始予高脂饮食,喂养 1 周后进行单纯球囊拉伤或球囊拉伤后支架植入,术后继续喂养相同的高脂饮食,直至处死。

1.1.2 单纯球囊扩张拉伤 麻醉动物后,经右股动脉逆行插入 PTCA 导引钢丝及球囊导管(3.0 mm×10.0 mm)于腹主动脉内,同时经耳缘静脉注入肝素 1.25 mg/kg。通过压力泵向球囊内注入肝素生理盐水,维持压力 8.01×10^{-4} GPa (8 atm),并缓慢回拉球囊 10 mm,抽出球囊内液体使压力为零。每隔 1 min 重复上述拉伤过程 1 次,共 3 次。退出球囊导管,结扎股动脉并缝合伤口。通过耳缘静脉静注青霉素 0.48 g 预防感染,术后继续高脂饮食喂养。

1.1.3 支架植入 麻醉及拉伤动物的步骤同上,之后沿导引钢丝插入 4F 静脉鞘管,沿导引钢丝插入 Medtronic Wictor 3.5 mm×20.0 mm 支架,使支架位于血管拉伤处。通过压力泵向球囊内注入肝素生理盐水,维持压力 8.01×10^{-4} GPa (8 atm)并持续 20 s,释放支架后,抽出球囊内液体,使压力为

零,退出球囊导管、导丝和静脉鞘管,结扎股动脉并缝合伤口。其余步骤同上。

1.2 取材

两组动物分别在术后第 3、7、14、28、56 天取材。麻醉后行腹腔切开,分离腹主动脉,从近端逆行插入 4F 动脉鞘管,右股动脉插管引流,同时经耳缘静脉注射 100 mg/L 氯化钾 3~5 mL 处死动物。通过鞘管灌注肝素生理盐水 30~50 mL,冲洗掉管腔内血液。取腹主动脉拉伤或支架植入处血管 20 mm,分 2 段,均置于 100 mg/L 中性福尔马林液缓冲。

1.3 平滑肌细胞中 PCNA 和 Cyclin E 的检测

标本石蜡包埋,切片,用 LSAB 法检测。一抗鼠抗人 PCNA(1:50)、鼠抗人 Cyclin E(1:50)、试剂盒 LSAB(K0675)均由 DAKO 公司提供。用 DAB 显色,光镜下观察拍片,阳性细胞呈棕褐色。每个标本观察 8 个高倍镜视野,计数阳性细胞数占总观察细胞数的百分比。

1.4 平滑肌细胞凋亡的检测

用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)染色法^[1]检测。与上述免疫组化切片同时进行,每个标本取相邻部位的连续切片。in situ apoptosis detection kit (S7101)由美国 Oncor 公司生产,蛋白酶 K 为 Sigma 公司生产。DAB 显色,在光镜下观察拍片,凋亡细胞呈棕褐色。每个标本观察 8 个高倍镜视野,计数凋亡细胞占总观察细胞数的百分比。

1.5 统计

计量资料以均数±标准差表示,两组数据比较采用 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 平滑肌细胞中 PCNA 和 Cyclin E 表达

免疫组化染色见图 1A~B。从表 1 可以看出,球囊组和支架组 PCNA 和 Cyclin E 的表达在术后第 3 天开始升高,第 7 天达高峰,各时间点间均存在统计学差异,之后逐渐下降,第 56 天回到正常。

球囊组和支架组与对照组比较, PCNA 及 Cyclin E 的表达在术后第 3 天至 28 天均有增加, 具统计学差异。从术后第 3 天开始, 支架组较球囊组 PCNA

及 Cyclin E 的表达也明显增加, 第 7 天达高峰, 且两组之间存在统计学差异, 这种差异一直持续到术后第 28 天。

表 1 兔腹主动脉中膜平滑肌细胞 PCNA 和 Cyclin E 的表达

Table 1 The expressions of PCNA and Cyclin E in media Smooth muscle cells of rabbits' abdominal arteries (%)

	PCNA			Cyclin E		
	Control	Balloon	Stent	Control	Balloon	Stent
3 th d	2.93±0.37	11.94±1.16	14.24±0.65	2.78±0.36	10.69±0.86	16.24±0.65
7 th d	3.16±0.62	18.74±1.09	24.36±0.55	3.11±0.61	17.68±1.10	22.65±1.00
14 th d	3.04±0.25	15.07±1.07	16.56±0.68	3.00±0.26	12.58±0.99	14.90±1.06
28 th d	3.15±0.44	8.76±0.69	10.60±0.57	3.06±0.40	7.53±0.72	9.64±0.48
56 th d	3.06±0.40	3.12±0.48	3.37±0.42	2.97±0.41	2.87±0.49	3.30±0.33

On day 7: Balloon and stent groups compared with control groups, $P < 0.01$; Stent group compared with balloon group, $P < 0.01$; The 7th day group compared with all other days groups, $P < 0.01$

2.2 平滑肌细胞的凋亡

平滑肌细胞的凋亡见图 1C~D, 从表 2 可以看出, 球囊组与支架组平滑肌细胞的凋亡均于术后第 3 天增加, 第 7 天时为高峰, 与各时间点均存在差异。球囊组在术后第 3 天至第 7 天较对照组增加, 支架组在术后第 3 天至第 28 天又较对照组及球囊组明显增加, 高峰在第 7 天, 它们之间均存在统计学差异。术后第 56 天, 对照组、球囊组及支架组间无统计学差异。

2.3 PCNA、Cyclin E 与细胞凋亡阳性率的比值

从表 3 可以看出, 球囊组和支架组 P:A 及 C:A 的值在术后第 3 天至 28 天均大于 1, 术后第 56 天接近 1, 存在统计学差异。而术后第 3 天至 28 天球囊组的比值在同一时间点均大于支架组, 且两组间存在统计学差异。术后第 56 天, 球囊组与支架组无统计学差异。

表 2 兔腹主动脉中膜平滑肌细胞的凋亡

Table 2 Apoptosis in media smooth muscle cells of rabbits' abdominal arteries (%)

	Control	Balloon	Stent
3th d	2.71±0.37	4.29±0.53	8.68±0.53
7th d	3.10±0.62	5.54±0.53	12.42±1.13
14 th d	2.99±0.25	3.13±0.30	7.55±0.48
28 th d	3.08±0.49	2.74±0.23	5.44±0.39
56 th d	2.98±0.38	2.85±0.43	3.01±0.48

On day 7: Balloon and stent groups compared with control groups, $P < 0.01$; Stent group compared with balloon group, $P < 0.01$; The 7th day group compared with all other days groups, $P < 0.01$

3 讨论

大量研究证实, 球囊拉伤可以通过平滑肌细胞

表 3 兔腹主动脉中膜平滑肌细胞 PCNA/Apoptosis 和 Cyclin E/Apoptosis 的比率

Table 3 PCNA/Apoptosis (P:A) ratio and Cyclin E/Apoptosis (C:A) ratio in media SMCs of abdominal arteries in rabbits

	r (P:A)		r (C:A)	
	Balloon	Stent	Balloon	Stent
3 th d	2.82±0.49	1.65±0.12	2.52±0.40	1.88±0.13
7 th d	3.41±0.46	1.98±0.22	3.22±0.42	1.84±0.23
14 th d	4.85±0.622	2.21±0.22	4.31±0.57	1.99±0.26
28 th d	3.22±0.36	1.96±0.22	2.77±0.37	1.78±0.20
56 th d	1.11±0.23 ²⁾	1.13±0.05	1.02±0.22	1.11±0.10

Stent group compared with balloon group, $P < 0.01$; The 56th day group compared with all other days groups, $P < 0.01$

的增殖和迁移导致明显的新生内膜增生。血管内支架植入减少再狭窄的发生^[1]。但研究显示, 支架植入与单纯球囊拉伤相比导致更明显的新生内膜增生, 并发现新生内膜中有显著的平滑肌细胞增殖^[2]。

本研究发现在兔腹主动脉中膜平滑肌细胞中同样存在平滑肌细胞增殖。PCNA 是一种核内蛋白质, 在静止期细胞中含量很少, G₁ 晚期开始增加, S 期达高峰^[3]。Cyclin E 在 G₁/S 期表达达高峰, Cyclin E 过度表达可促进细胞分裂增殖^[4]。由此可见, PCNA 和 Cyclin E 可作为评价细胞增殖状态的指标。本实验发现支架组中膜平滑肌细胞中 PCNA 和 Cyclin E 表达明显高于球囊组。有学者认为, 支架植入导致更多的新生内膜增生是由于血管对持续性的金属植入物产生的异物反应, 包括支架表面血栓沉积和炎症反应, 涉及启动平滑肌细胞增殖的因子^[5,6]。我们的研究提示支架植入同样也引起中膜平滑肌细胞过度增殖。

既然支架植入导致更多新生内膜及中膜增生, 为何支架植入又能减少再狭窄发生呢? 以往学者们认为, 支架植入对血管壁起机械性支撑作用, 阻止了血管的弹性回缩, 保持着一个较大的管腔。尽管支架内有明显内膜增生, 但最终管腔面积仍明显比球囊扩张增大^[2]。

近几年的研究发现, 单纯球囊拉伤和支架植入均可发现新生内膜中有细胞凋亡存在, 且支架植入导致更多细胞凋亡发生。Kollum M 等^[7]用兔的再狭窄模型研究支架植入与球囊扩张对兔血管壁细胞凋亡的影响。经 TUNEL 法显示, 支架植入导致更多新生内膜及中膜 SMC 凋亡, 且术后 1 周时凋亡最明显。Han 等^[8]的研究也发现球囊扩张后细胞凋亡数较低, 最大凋亡率出现在术后 1 周。本研究通过 TUNEL 法研究了中膜平滑肌细胞凋亡情况, 进一步证实了这一结果, 支架组的平滑肌细胞凋亡均高于球囊组, 而球囊组则一直保持着较低凋亡水平。

研究 P:A 和 C:A 的比值评价增殖与凋亡过程的变化趋势发现, 球囊组增殖与凋亡的比值明显超过支架组, 提示支架组由于凋亡相对增加使再狭窄

程度小于球囊组。

本实验通过对兔再狭窄模型的研究发现, 在单纯球囊拉伤及支架植入后均可导致中膜平滑肌细胞增殖和凋亡发生, 且支架植入较单纯球囊拉伤产生较多的平滑肌细胞增殖和更为显著的 SMC 凋亡。支架植入后增殖与凋亡比率明显低于单纯球囊拉伤, 即支架植入减少了再狭窄程度。这一结果也提示增加平滑肌细胞凋亡, 可能减少再狭窄发生, 为今后预防再狭窄提供更多的实验依据。

(本文图 1 见插页 2)

参考文献:

- [1] Fischman D L, Leon M B, Baim D S, *et al.* A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(8): 496.
- [2] Karas S P, Gravanis M B, Santoian E C, *et al.* Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1992, 20(2): 467.
- [3] Mathews M B, Bernstein R M, Franza B R, *et al.* Identify of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin[J]. *Nature*, 1984, 309 (5966): 374.
- [4] Pines J. Cyclins and Cyclin-dependent kinases: a biochemical view[J]. *Biochem J*, 1995, 308(Pt3): 697.
- [5] Hanke H, Kamenz J, Hassenstein S, *et al.* Prolonged proliferation response of smooth muscle cells after experimental intravascular stenting[J]. *Eur Heart J*, 1995, 16 (6): 785.
- [6] Best P J M, Hasdai D, Sangiorgi G, *et al.* Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(1): 14.
- [7] Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R, *et al.* Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17 (11): 2383.
- [8] Han D K, Haudenschild C C, Hong H K, *et al.* Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(2): 267.

(编辑 黄小延)

人血管内皮生长因子的克隆表达及活性鉴定 (正文见第 177 页)

Cloning, Expression and Activity Detection of Vascular Endothelial Growth Factor (Text in page 177)



图 2 转染 pAdtrack CMV - VEGF165 的 293 细胞
Fig. 2 The picture of 293 cells transfected with pAdtrack-CMV - VEGF165 glowing green fluorescence

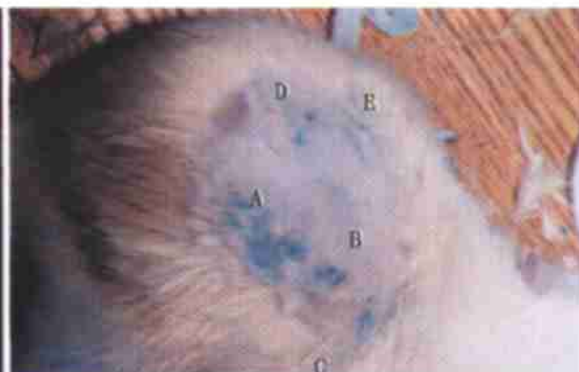


图 5 VEGF 165 蛋白活性的检测
Fig. 5 Detection of bioactivity of of VEGF165 with Miles test A, B, C: 100 μ L, 50 μ L and 25 μ L culture supernatant from 293 cell transfected pAdtrackCMV - VEGF165 respectively; D: 100 μ L culture supernatant from 293 cell; E: 100 μ L normal saline

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 (正文见第 180 页)

Effect of Stent Implantation on the Expression of PCNA and Cyclin E and Apoptosis in Rabbit Vascular Smooth Muscle Cells (Text in page 180)

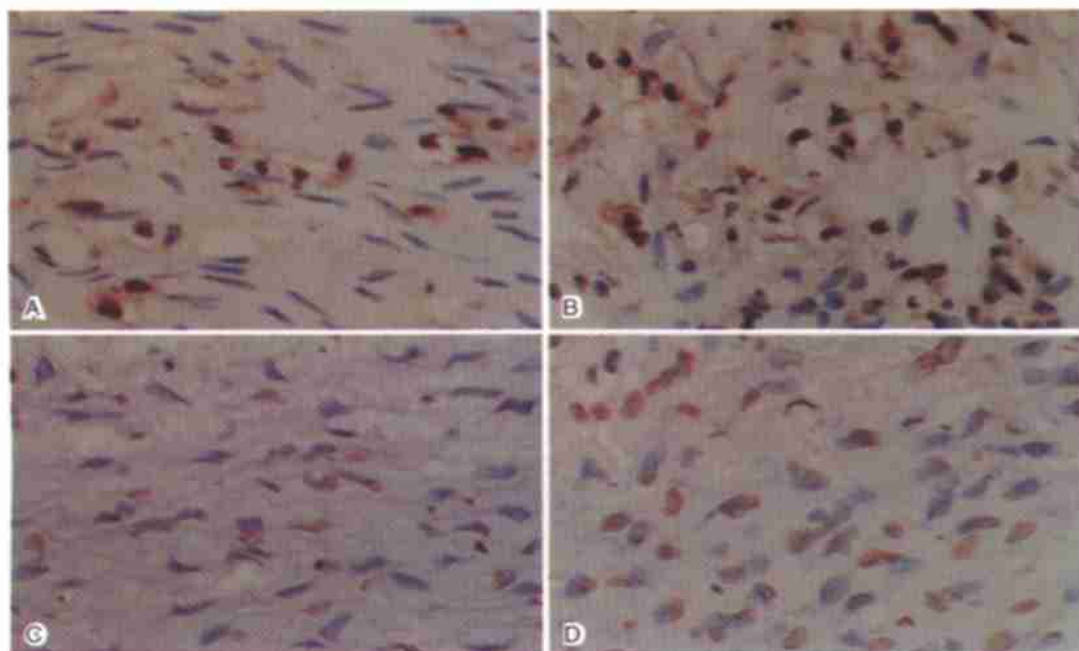


图 1 术后第 7 天球囊组和支架组中膜平滑肌细胞增殖与凋亡的表达
Fig. 1 The expression of proliferation and apoptosis in media smooth muscle cells of balloon group and stent group on 7th day
A: The expression of PCNA in balloon group (LSAB \times 400); B: The expression of PCNA in stent group (LSAB \times 400); C: Apoptosis in balloon group (TUNEL \times 400); D: Apoptosis in stent group (TUNEL \times 400)