论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1456-03

导管致小鼠颈总动脉血管损伤病变的实验研究

罗高兴,吴 军,陈希炜,程文广,张小容 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 应用小鼠颈总动脉血管内膜损伤模型,观察并在体显示导管所致血管损伤病变情况。方法 通过在小鼠左颈总动脉中插入并旋转导管导线造成血管损伤。于伤后 1、3、4 周行血管组织切片,HE 染色对比观察损伤后血管内膜及中层等厚度及面积变化。并行免疫组化染色观察血管损伤后 αVβ3 分子表达及 Ki67 阳性细胞数的变化。最后在不同血管损伤程度动物,注射可与 αVβ3 分子特异性结合的^{111}In-RP478,2.5 h 后分离出损伤及对照血管,检测其放射自显影强度。结果 颈总动脉损伤后,血管内膜增生,出现大量新生内膜。新生内膜中有大量 αVβ3 表达。血管中层明显变厚。在血管中层及新生内膜中有大量 Ki67 阳性细胞。放射自显影发现,损伤侧显影强度明显高于对照侧,对比系数与损伤程度成正比。结论 以 αVβ3 为靶分子的同位素显影可能为检测血管病变提供帮助。

关键词:血管损伤;αVβ3;Ki67;放射自显影
中图法分类号:R322.12;R540.46;R654.302 文献标识码:A

Detection of catheter induced carotid artery injury in mice

LUO Gao-xing, WU Jun, CHEN Xi-wei, CHENG Wen-guang, ZHANG Xiao-rong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe and detect catheter induced blood vessel injury by establishing the mouse model. Methods Catheter guidewire was inserted and turned around in left common carotid artery to induce vascular injury in mice. After 1, 3, 4 weeks, the injured vessel was sectioned, the pathological changes of vessel was checked by HE stain, and the expression of αVβ3 and Ki67 positive cells in the sections were detected by immunohistochemical stain. ^{111}In-RP478, a specific small ligand for αVβ3 was injected into injured mice to separate the injured vessel from the non-injured vessel 2.5 h later, and their autoradiography was measured. Results Neointima in the injured left common carotid was shown up and the media thickened significantly after injury. Expression of αVβ3, mainly in neointima, were increased after injury and a lot of Ki67 positive cells were found in neointima and media of the injured vessel. Intensity of injured autography was much higher than that of control. The intensity ratio of injured left common carotid artery to non-injured was in positive relationship with the degree of injury. Conclusion Catheter could induce vascular injury, and RP478 could be a good tracer for the injured vessel.

Key words: blood vessel injury; αVβ3; Ki67; autography

随着介入治疗及重症监护等的蓬勃开展,因导管所致血管内膜损伤越来越引起人们的重视[1,2]。如何尽早发现并诊断血管内膜损伤是我们必须尽快解决的问题。本研究在导管致小鼠颈总动脉血管内膜损伤模型中,观察损伤后血管病变、αV 及 β3 分子表达,以及血管中增生细胞量等的变化,并在体应用可与 αVβ3 靶分子特异性结合的同位素^{111}In 标记的 RP478,旨在以放射自显影技术初步对比观察不同程度损伤血管显影情况。

作者简介:罗高兴,男,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事烧伤与创伤修复、移植免疫等方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68752688,E-mail:logxw@yahoo.com
通信作者:吴 军,电话:(023)68752688,E-mail:junwupro@cta.cq.cn
收稿日期:2007-10-31;修回日期:2008-01-02

1 材料与方法

1.1 主要试剂

导管导线(购自 Boston Scientific 公司,0.014 英寸 MA,USA),羊抗鼠 αV 单抗及羊抗鼠 β3 单抗均购自 BD 公司(NJ,USA),兔抗 Ki67 单抗购自 epitomics 公司(CA,USA),^{111}In-RP478 获自 Bristol-Myers Squibb 公司(NY,USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 血管内膜的致伤 6~8 周龄 apoE$^{-/-}$小鼠麻醉后,

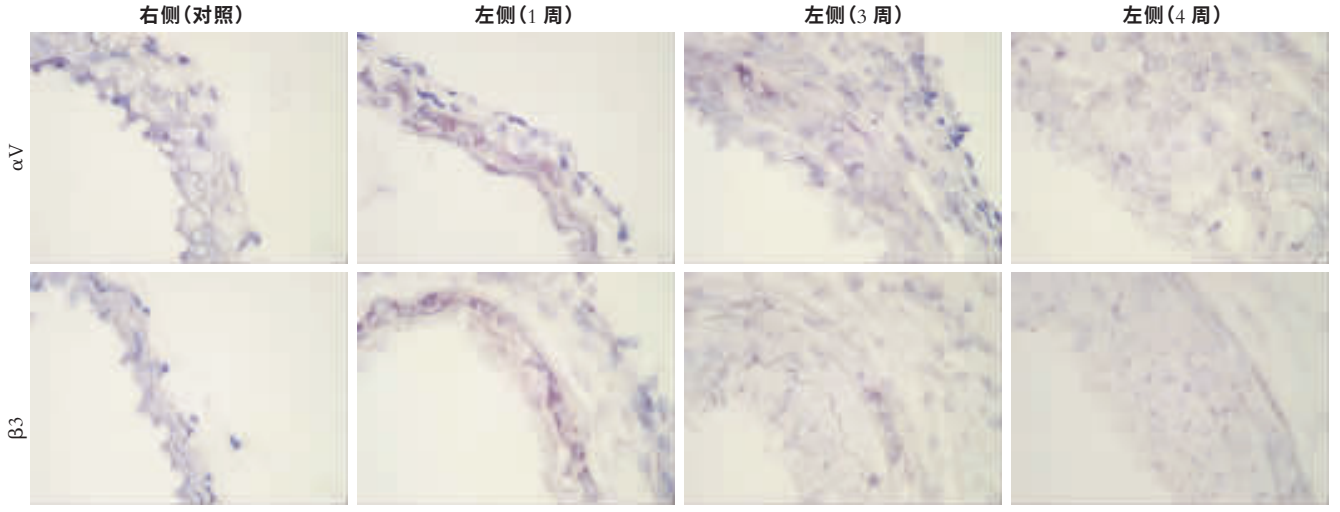


图 1　导管损伤左侧小鼠颈总动脉后血管 αVβ3 的表达　(SABC ×400)

于手术显微镜下无菌暴露双侧颈总动脉,以动脉血管夹钳夹动脉近心侧后,应用直径为 0.014 英寸的导管导线(catheter guidewire)插入左侧动脉远心侧约 1 cm,顺时针旋转 6 次,造成血管内膜损伤。以未损伤右侧为自身对照。去除血管夹、彻底止血、关闭切口后单笼饲养。

1.2.2　损伤血管内膜的组织学检查　　于致伤后 1、3、4 周各放血活杀小鼠,应用含 3% 多聚甲醛 PBS 经心脏灌注固定,每组 3 只动物。取出双侧颈总动脉,OCT 包埋后行血管横向冰冻切片。进行 HE 染色,应用影像学软件分析血管内膜、中层等的厚度及面积变化。并分别以工作浓度为 1∶1 000 的羊抗鼠 αV 单克隆抗体及工作浓度为 1∶2 000 的羊抗鼠 β3 单克隆抗体行免疫组化染色,观察 αVβ3 分子的表达情况;以工作浓度为 1∶2 000 的兔抗 Ki67 单抗免疫组化染色,观察切片中增殖细胞(Ki67 阳性细胞)数量的变化。

1.2.3　血管内膜病变的在体观察　　同 1.2.2 将小鼠左颈总动脉致不同致伤程度(导管插入后分别旋转 1、3、6 次)损伤。伤后 1 周将致伤小鼠麻醉后,开腹后经下腔静脉插入 PE10 导管,注射 0.2 ml ^{111}In-RP478(放射强度为 7.4 MBq),2.5 h 后,活杀小鼠。以 5 ml 冷 PBS 经心脏灌注后,取出双侧颈总动脉,应用 Kodak 胶片于 4 ℃暗室曝光 72 h 后冲洗。将胶片扫描后进行半定量分析。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 6.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　受损血管的病理学检查

导管旋转致伤后,颈总动脉血管内膜增生,管腔内可见大量新生内膜(neointima);血管中层变厚,二者共同导致管腔变窄。增生内膜和血管中层的面积及厚度均随伤后时间延长而逐渐增加。与对照组比较,伤后第 1 周差异有统计学意义($P < 0.05$),于伤后第 3 周达高峰($P < 0.01$)。伤后第 1 周与第 3 周比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。随后均维持在一较高水平,伤后第 3 周与第 4 周比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1　导管损伤小鼠颈总动脉后血管管壁厚度及面积变化($\bar{x} \pm s$)

伤后时间	厚度(μm)		面积(μm²)	
	新生内膜	中膜	新生内膜	中膜
对照侧	–	10.4 ± 2.2	–	15 089 ± 4 027
伤后 1 周(左侧)	–	22.9 ± 11.9[a]	–	35 567 ± 11 156[a]
伤后 3 周(左侧)	64.7 ± 28.1[b]	39.2 ± 10.2[b]	64 667 ± 18 778[b]	41 400 ± 9 667[b]
伤后 4 周(左侧)	76.0 ± 16.7[b]	44.6 ± 3.3[b]	68 233 ± 16 222[b]	55 733 ± 10 578[b]

– :无明显发现;a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与对照组比较

2.2　血管受损后 αVβ3 分子的表达

免疫组织化学检查示,无损伤对照血管仅有微量 αV 及 β3 分子表达,而血管损伤后二者表达均明显增加,且主要表达于新生血管内膜。并可见该两种分子的表达均于伤后第 1 周达高峰,随后逐渐下降,但于伤后第 4 周仍可见明显表达。见图 1。

2.3　损伤血管 Ki67 的表达

伤后血管 Ki67 染色显示,损伤血管内增殖细胞增多,其主要分布于新生血管内膜及血管中层(图 2)。半定量显示,其在伤后第 1 周即明显增多($P < 0.01$),由对照组的几乎无分裂增殖细胞升至 18.6%;于伤后第 3 周(22.9%)进一步增多,达到高峰;但于伤后第 4 周却明显较前减少,降至 4.9%。

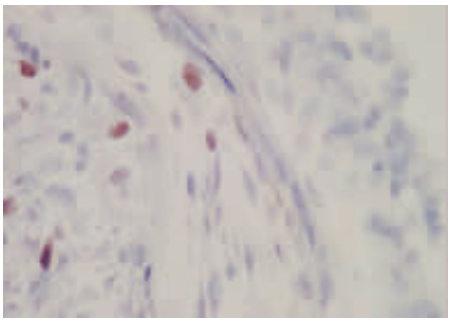


图 2　损伤 3 周后颈总动脉壁中 Ki67 表达免疫组化观察　(SABC ×400)

2.4　在体显示 αVβ3 分子表达

在体通过同位素自显影显示,损伤血管放射自显影强度随

损伤程度加重而增强。尤其是与未损伤侧血管显影强度的对比系数随损伤加剧而显著增强，仅旋转损伤 1 次时对比系数已达成 2.2，与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。并发现对比系数随损伤程度加重而进一步增加，当旋转 6 次时，其对比系数高达 9.6，与旋转 1、3 次（对比系数为 4.1）损伤组相比差异有统计学意义（$P<0.01$）。

3 讨论

随着介入治疗、造影及重症监护的广泛开展，由于导管在血管内反复插入所致血管内膜损伤越来越受到人们的重视。现在还没有一种方便、可靠的方法早期检查、诊断导管所至血管损伤病变情况[1,2]。本研究在小鼠左颈总动脉中插入细钢丝模拟临床上导管所致血管内膜损伤。实验结果提示，损伤后血管不仅出现大量的新生内膜，而血管中层也明显增厚。

Ki67 是一种核抗原，仅表达处于 S_1、M、S_2 细胞周期中的细胞，而在静息期（S_0 期）无表达，所以人们可通过其特异性染色来反映组织中细胞增生增殖情况[3,4]。血管损伤后，管壁内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞，以及移位侵入的淋巴细胞均可发现增生增殖，以修复损伤血管。我们研究发现，导管致颈总动脉损伤后，早期（伤后 1 周）在损伤血管的新生内膜及中层出现大量 Ki67 阳性细胞。随后阳性细胞数进一步增加，于伤后 3 周达高峰，但到伤后 4 周阳性细胞数却有所减少，这可能与修复完成、细胞增生逐渐停止等有关。

增生的内膜及增厚的血管使血管管腔逐渐变窄，但血管外膜变化并不明显，且在实验中我们并没有发现血栓形成现象。管腔变窄后必将引起血液流变学变化，甚至会影响远侧的血液供应，而造成进一步的损害，所以在导管置入，尤其是旋转导管时，应尽可能地避免血管内膜损伤。导管所致的损伤与患者情况、术中操作者的熟练程度、导管质量等密切相关。在实际操作中，我们应加强术者的培训，并尽可能地选用质量好的导管，以最大程度减轻对患者血管的损伤。

免疫组织化学检查显示，导管所致血管损伤后，在新生内膜有大量 αVβ3 表达，并主要分布于新生内膜。αVβ3 是一种黏附分子，是近年来备受人们关注的整合素中的一种，刺激或活化后的内皮细胞、血小板等均可表达该分子。研究表明它在血小板、淋巴细胞、巨噬细胞等黏附与移位、基质的重塑等病理过程中起着极其重要的作用[5,6]。实验证实，血管损伤或发生其他病变后均有大量 αVβ3 分子表达。在肿瘤及发生风湿变病的组织中，其血管亦发现有大量的 αVβ3 分子表达。有学者将它作为一种靶分子，用于诊断甚至治疗肿瘤及心血管系统疾病等[6-8]。

RP478 是 Bristol-Myers Squibb 公司从合成库（combinatorial library）中筛选出来的一种与 αVβ3 分子具有高亲合力且特异性结合的小分子。它与人 αVβ3 结合的 IC_{50} 为 0.5 μmol/L，而与鼠 αVβ3 亲合力更高，其 IC_{50} 低至 0.01 μmol/L，而与其他分子如 αVβ5、αⅡbβ3 等相关分子的结合时 IC_{50} 可超过 10 μmol/L。故我们可用它来在体检查 αVβ3 的表达，从而有可能将来用于临床心血管疾病及肿瘤等的诊断及病情判定[9]。我们的实验结果显示，损伤血管可表达大量 αVβ3 分子，所以我们希望可应用同位素 ^{111}In 标记的 RP478 来显示血管病变情况。我们研究表明，血管损伤后其结合的 RP478 明显增多，与未损伤侧血管显影强度的对比系数显著增高，并且其放射自显影量随损伤程度加剧（导线旋转次数增加）而显著增强，仅旋转 1 次时对比系数已达成 2.2，当旋转 6 次时，其对比系数高达 9.6。由此提示 RP478 可开发成一种较理想的血管病变显影剂。

参考文献：

[1] Teichgraber U K, Gebauer B, Benter T, *et al*. Central venous access catheters: radiological management of complications [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2003, 26(4): 321-333.

[2] Noordeloos A M, Soullie T, Duckers H J, *et al*. Promoting vascular regeneration as an alternative to conventional angioplasty-based intervention [J]. Endothelium, 2006, 13(6): 431-439.

[3] Schonherr A, Bayer M, Bocking A. Diagnostic and prognostic value of Ki67 proliferation fraction in serous effusions [J]. Cell Oncol, 2004, 26(1-2): 57-62.

[4] Mumbuc S, Karakok M, Baglam T, *et al*. Immunohistochemical analysis of PCNA, Ki67 and p53 in nasal polyposis and sinonasal inverted papillomas [J]. J Int Med Res, 2007, 35(2): 237-241.

[5] Kokubo T, Uchida H, Choi E T. Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia [J]. J Vasc Surg, 2007, 45 (Suppl A): A33-A38.

[6] Mousa S A. Vitronectin receptors in vascular disorders [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2002, 3(8): 1191-1195.

[7] Sajid M, Stouffer G A. The role of alpha(v)beta3 integrins in vascular healing [J]. Thromb Haemost, 2002, 87(2): 187-193.

[8] Wilder R L. Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(Suppl 2): ii96-ii99.

[9] Harris T D, Kalogeropoulos S, Nguyen T, *et al*. Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin alpha v beta 3 receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2003, 18(4): 627-641.

（编辑 王 红）