维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0396-04

大鼠颈动脉再狭窄模型的建立及其病理机制的初步研究

蒲庆华，时 德，赵 渝
（重庆医科大学临床学院血管外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：建立再狭窄动物模型，研究再狭窄的发生规律及病理机制。方法：模拟临床PTCA过程，造成大鼠颈动脉扩张损伤，在此基础上系统地观测术后不同时相点内膜、中膜的增生以及细胞增殖的动态变化规律，并应用透射电镜对术后不同时期血管壁的超微结构、平滑肌细胞（VSMC）的功能状态进行了动态观测。结果：损伤后动脉壁新生内膜于术后14～28天增厚达高峰；损伤动脉壁细胞大量增殖，中膜、内膜增殖指数分别于术后4天、9天达到峰值；增生动脉壁内膜及中膜的大部分细胞α-actin染色阳性，而CD68染色阴性；损伤早期平滑肌细胞胞浆中肌丝成分明显减少，细胞器明显增多。结论：损伤动脉因新内膜过度增生导致管腔狭窄。VSMC的转型、增殖、迁移和分泌胞外基质是动脉过度增生的病理基础。

【关键词】再狭窄；动脉成形术；血管平滑肌；大鼠
【中国图书分类法分类号】R654 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-01-09

Model establishment and pathogenetic study of arterial restenosis in rats

PU Qinghua, et al
(Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To establish an arterial restenotic model, and to study the pathogenesis of restenosis after angioplasty. *Methods*: The balloon catheter injury was performed on left common carotidartery of rat by imitating the process of angioplasty. The process of neointimal and media hyperplasia was observed and the proliferation index of vascular smooth muscle cell (VSMC) at different time after operation was measured. The change of phenotype of VSMC in injured arteries was also surveyed with electron microscope. *Results*: Arterial neointima hyperplasia occurred after injury and reached to summit at 14 to 28 d. Cell proliferation attained a maximum at 4 day in the media (43.92%) and at 9day in the intima (63.98%). Immunostain of CD68 was negative whereas α-actin was mostly positive in the neointimal and medial cells. Ultrastructurally, the bulk of cytoplasm of VSMCs was filled with organelles with scattered myofilaments peripherally located. *Conclusion*:Neointima hyperplasia occurs after balloon injury and results in lumen stenosis. VSMC phenotype transformation, proliferation, migration, and extracellular matrix production are the key celllaur processes in this lesion.

【Key words】Restenosis; Angioplasty; Vascular smooth muscle cell; Rat

动脉损伤后新内膜过度增生进而导致血管管腔狭窄，是临床上的一个棘手问题，对该病理生理过程的研究已积累了较多的资料，但不同的研究小组由于选取的实验动物不同，手术方法上的差异等原因，报道的结果也有差异[1,2]。为更好地认识内膜增生病理过程并进一步深入研究其发生、发展的影响因素，本文以健康雄性Wistar大鼠为实验对象，成功地建立了颈动脉气囊导管损伤的动脉再狭窄模型，并在术后多个时相点系统地观测了损伤动脉过度增生以及修复的病理过程，为更深入地研究其病理生理机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性Wistar大鼠42只，体重350～450g，购自第三军医大学创伤外科研究所。

1.2 主要试剂及器材

①抗增殖细胞核抗原（Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA）单抗（福建迈新）；②抗α-Smooth Muscle Actin 单抗（Sigma）；③抗CD68单抗（福建迈新）④免疫组化SP试剂盒（福建迈新）；⑤DAB（北京中山）；⑥伊文氏蓝（Sigma）；⑦2F Fogarty气囊导管（Baxter）；⑧Tiger 920图像分析系统（重庆大学信息工程公司）；⑨H-600透射

作者介绍：蒲庆华（1969-），男，主治医师，博士，
主要研究方向：血管外科。
基金项目：研究经费由重庆市卫生局科学基金资助（99-2005）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

电镜（日本Hitche）。

1.3 动物模型的建立

术前动物禁食12h，2%戊巴比妥钠40mg/Kg腹腔注射麻醉。沿颈前正中线切开皮肤，在颈前三角区暴露左颈总动脉及颈内外动脉。自颈外动脉向近心端插入气囊导管至颈总动脉起始部，球囊充水0.1ml，自远心端慢速回拉至颈内外动脉分叉处，重复共三次，完成后结扎颈外动脉。

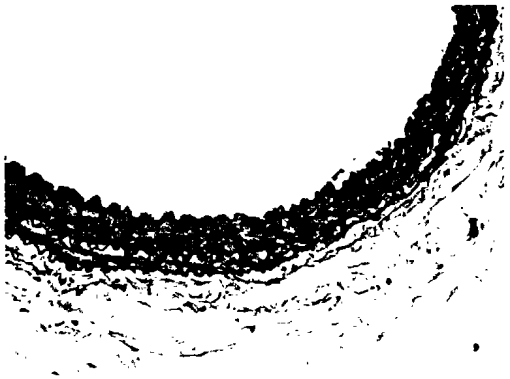
1.4 取材

术后1、4、9、14、28、56、84天分批取材，每时相点例数如表1。首先经尾静脉注射5%Evan's blue-生理盐水标记无内皮覆盖的血管（出现蓝染）[3]。30min后用4%多聚甲醛以13.3kPa压强行灌注固定。解剖并游离左右侧颈总动脉，切

表1 术后不同时相点内膜、中膜PCNA阳性率(%)

	对照	1d	4d	9d	14d	28d	56d
中膜	-	8.68 ± 2.26	43.92 ± 10.20a	16.10 ± 3.20b	5.25 ± 2.42c	0.05 ± 0.04	-
内膜	-	-	-	63.98 ± 9.45*	11.10 ± 3.20△	1.69 ± 0.79	-
N	5	5	5	5	10	7	5

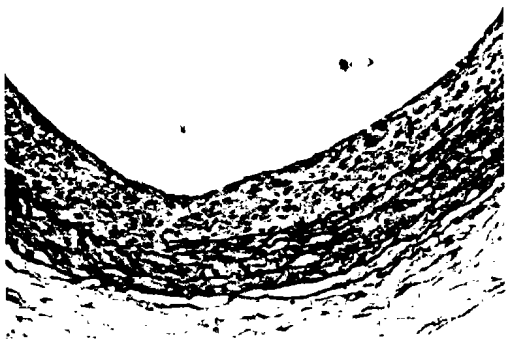
与术后第1天相比，a $P<0.01$；与术后第4天相比，b $P<0.01$；与术后第9天相比，c $P<0.01$；与术后14天相比，*$P<0.01$；与术后28天相比，△$P<0.01$。



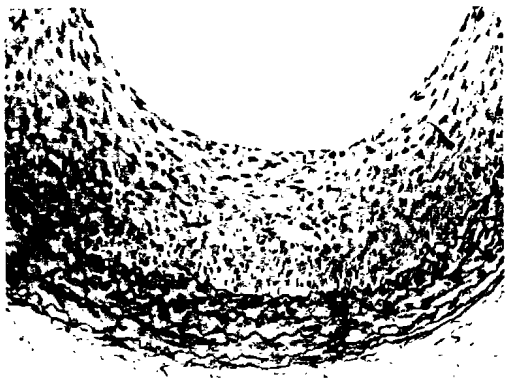
A：正常大鼠颈动脉，内膜由一层内皮构成



B：术后第4天，中膜明显增厚，细胞数增多



C：术后9天，血管壁新内膜形成，可见其内有多量细胞及丰富基质



D：术后14天，内膜明显增厚，基质大量累积

图1 术后不同时间中膜、内膜增生的动态观测 （HE×200）

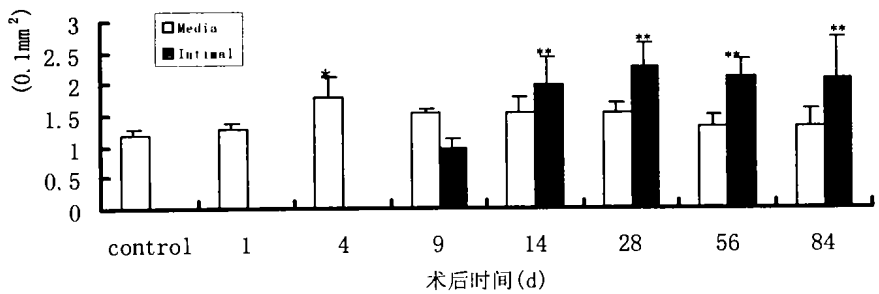


图2 损伤血管乏内皮区内膜、中膜面积的动态变化

* 与对照及术后1天、56天、84天比较，$P<0.05$；** 与术后9天比较 $P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

取左颈总动脉中段蓝染区，右侧取中段为对照，共同行低温石蜡垂直定向包埋，以5μm厚度切片，常规HE染色。

1.5 动脉壁内膜面积、中膜面积的测量

按照组织学划分，内弹力膜以内为血管内膜，内、外弹力膜之间为中膜。在5×物镜下将完整的血管横切面HE染色图像摄入计算机图像分析系统中，首先进行图像编辑，用鼠标准确地勾出外弹力膜、内弹力膜以及管腔的轮廓，逐步测算内膜、中膜面积，随机选取动脉蓝染段3个切面分析，取平均值。

1.6 免疫组织化学法标记平滑肌细胞、单核-巨噬细胞以及增殖细胞

分别以抗-actin、抗CD68、抗PCNA抗体进行免疫组化染色标记VSMC、单核-巨噬细胞及增殖细胞，采用SP法进行免疫组织化学染色。

1.7 内膜、中膜增殖指数的测定

采用计算机图像分析系统，测定内膜及中膜细胞总数及相应区域PCNA染色阳性细胞数，计算内膜、中膜增殖细胞阳性率，即为该区域细胞增殖指数（PCNA Index）。

1.8 统计学处理

数据用统计软件包SPSS 10.0进行方差分析处理，并进一步做多个均数的两两比较。

2 结 果

2.1 术后动脉壁增生的动态观测

各时相点损伤动脉壁增生情况见图1。光镜下，正常大鼠颈动脉内膜仅见单层内皮细胞，球囊导管扩张造成动脉内皮剥脱，中膜近腔面部分细胞坏死。随时间推移，损伤动脉壁内细胞数量增多、胞外基质累积增加，从而造成动脉壁逐渐增厚。术后第4天，中膜增厚达高峰，之后逐渐退缩，术后56天已接近于正常。新生内膜于术后4～9天开始形成，随时间延长逐渐增厚，术后14～28天内膜面积达峰值，此后内膜有缩小趋势，但差异不显著（与术后28天相比，$P>0.05$）（图2）。

2.2 不同时相点动脉内皮缺失区细胞增殖情况的观测

术后第1天，中膜残余VSMC出现增殖，术后第4天中膜增殖指数达高峰。术后9～14天，新生内膜中可见大量PCNA阳性细胞，主要分布于近血管腔面（图3），阳性率分别为64%和11%。术后28天内膜PCNA阳性细胞明显减少，增殖指数降至1.7%，之后PCNA阳性细胞不再能被检出(表1)。此外，损伤后外膜亦有明显增生表现，术后1～14天，外膜细胞数逐渐增多，同时可见大量PCNA阳性细胞，基质与正常相比更为致密，术后9天之后外膜增生停止，细胞数量逐渐减少。

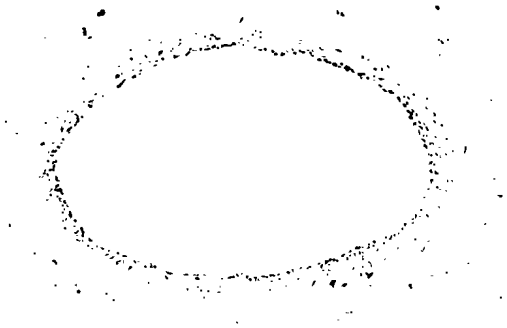


图3 术后14天，增生内膜近血管腔面可见较多PCNA染色阳性细胞（SP×100）

2.3 术后动脉壁细胞种类鉴定

术后各时相点增生动脉壁行α-Actin免疫组化染色，内膜及中膜细胞均呈阳性反应，提示增生动脉壁内细胞组成主要是平滑肌细胞（图4）。内膜及中膜CD68染色阴性，外膜可见少量阳性细胞。HE染色光镜观察未见多形核粒细胞。

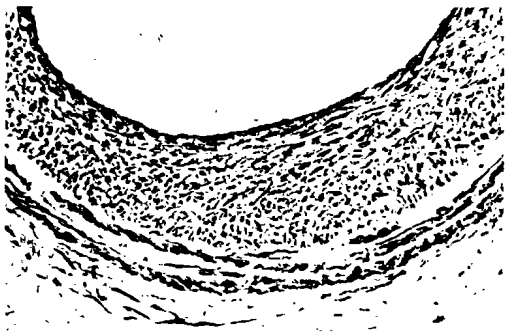


图4 增生内膜及中膜细胞α-Actin染色阳性。（SP×200）

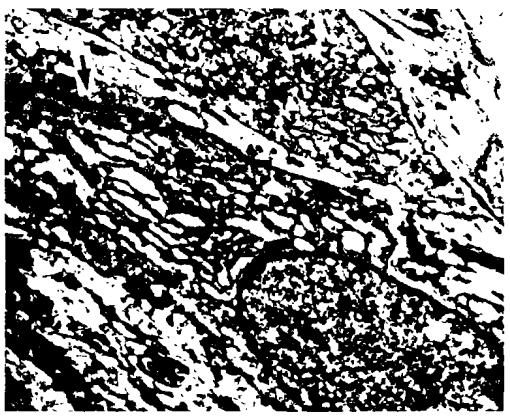


图5 动脉损伤后第9天增生内膜平滑肌细胞胞核常染色质增多，胞内含大量粗面内质网、高尔基体及线粒体，肌丝成分明显减少，仅在靠质膜周围呈不连续状分布（箭头），提示细胞蛋白质合成功能活跃。（×8000）

2.4 术后不同时相点电镜超微结构的观测

正常VSMC呈长梭形，细胞体积小，胞核染色质浓集，胞浆中主要为大量的肌丝成分，细胞主要

维普资讯 http://www.cqvip.com

执行收缩功能，细胞器含量较少，呈“收缩表型”。动脉损伤后VSMC表型发生明显改变，细胞胞体明显增大，胞核异染色质明显减少，常染色质增加，可见肥大核仁，胞浆中肌丝成分由大面积的粗面内质网、高尔基体、线粒体等细胞器所取代，靠近质膜周围可见菲薄且不连续的少量肌丝成分，细胞表现为合成功能旺盛，说明已向“合成表型”转变（图5）。随着时间的推移，动脉壁内VSMC胞体变小，核电子密度增加，胞浆中肌丝含量增多，细胞器明显减少，细胞逐渐恢复为收缩表型。

3 讨 论

制备各种稳定而有代表性的动物模型，是深入认识疾病发病机制的重要工具。目前再狭窄常用的动物模型制作方法是通过模拟PTCA过程，造成大、中动脉扩张性损伤，之后进一步出现内膜增生、血管狭窄的病理变化[4]。本研究选用大鼠为实验对象，动物为封闭群大鼠，个体差异小，实验结果重复性好，且易于饲养，是目前研究再狭窄较为常用的动物。进行大鼠颈动脉气囊导管损伤手术，经过反复摸索我们体会到，只要手术方法正确，手法得当，实验的成功率可相当高。

本研究通过建立大鼠颈总动脉球囊导管损伤模型，对动脉损伤后不同时期血管的增生、修复进行了系统观察。从动脉壁的增生过程来看，损伤后中膜、新生内膜厚度分别于术后4天、28天达到高峰。临床患者PTCA术后再狭窄发生时间主要在3～6月[5,6]，其中发生在1月内的占13%，4个月内者占53%，1年后仅占3.4%[7]。这一规律与在大鼠动物模型上观察到的内膜增生具有相同的趋势，即内膜增生在术后早期就已达到高峰，这也提示若在患者接受PTCA后在早期（术后3~5月）积极给予抑制内膜增生的防治措施，可能对控制再狭窄有较大帮助。

在实验中观察到，血管壁中膜及内膜的增生过程与VSMC的表型转变密切相关，损伤后动脉VSMC迅速发生改变，表现为细胞肌丝成分减少，细胞器含量明显增多，表明细胞由“收缩表型”转变为蛋白质合成功能活跃的“合成表型”，从而为创伤修复做好了准备。在此基础上，细胞在局部多种活化刺激因素的作用下大量增殖，至损伤晚期，血管壁内稳态恢复，VSMC功能也逐渐转为静止，细胞由合成型转变为收缩型，此时内膜增生亦随之趋于停止。

在对增生动脉壁细胞成分的鉴定中发现，在增生各期的内膜及中膜中，其细胞成分较为单一，主要为-actin染色阳性的血管平滑肌细胞，无单核-巨噬细胞及中性粒细胞浸润。这就说明损伤的动脉壁局部发生的不是一个组织损伤后由炎症细胞介导的一般炎症反应，而是一个SMC过度增殖造成的一个过度增生性病变。那么，是什么因素触发了SMC的这一转变，又是什么因素存在于局部持续作用，可能是理解再狭窄发生机制的核心问题。

综上，在动物模型中观测到，损伤动脉内膜增生主要由动脉壁内的细胞显著增加，胞外基质明显增多造成的。血管壁内的细胞组成主要是平滑肌细胞。电镜观察证实，动脉损伤后VSMC发生的最初的变化是细胞表型的转变——由功能相对静止的收缩型转变为功能活跃的合成型VSMC，并在局部多种刺激因素的存在下，出现增殖和迁移。这些VSMC在血管内膜及中膜中聚集、增殖，并分泌多种细胞基质成分，是形成再狭窄的重要原因。

参 考 文 献

[1] Malik N, Francis SE, Holt CM, et al. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty [J]. Circulation, 1998; 98(16): 1657-1665.

[2] Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, et al. Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction [J]. J Vasc Surg, 1998; 27(1): 96-106; discussion, 106-108.

[3] Hamon M, Lecluse E, Monassier JP, et al. Pharmacological approaches to the prevention of restenosis after coronary angioplasty [J]. Drugs Aging, 1998; 13(4): 291-301

[4] Geary RL, Williams JK, Golden D, et al. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis (a nonhuman primate model of restenosis) [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996; 16(1):34-43.

[5] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. Nature, 1990;362(6423): 801-809.

[6] Kitazume H, Kubo I, Iwama T, et al. Long-term angiographic follow-up of lesions patent 6 months after percutaneous coronary angioplasty [J]. Am Heart J, 1995;129 (3): 441-444.

[7] Cercek B, Sharifi B, Barath P,et al. Growth factors in pathogenesis of coronary arterial restenosis [J]. Am J Cardiol, 1991;68(12):24C-33C.