DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.027

论著

文章编号:1000-5404(2000)03-0268-04

平滑肌细胞凋亡对血管球囊损伤后内膜增殖的影响

王 耿,何国祥,迟路湘,景 涛,王海东 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要 目的:探讨血管球囊损伤后内膜增殖的机制。方法:采用电镜、末端脱氧核苷酸转移酶介导的三磷酸脱氧尿嘧啶缺口末端标记法(TUNEL)和免疫组织化学技术检测球囊损伤后血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡及新生内膜面积的变化。结果:球囊损伤后血管壁增生,球囊损伤后第3天,血管中层出现凋亡的平滑肌细胞(SMC);损伤后第7天,新生内膜形成,内膜和中层SMC凋亡率最高,凋亡的SMC主要分布在内膜层,以后逐渐降低;至损伤后第28天,仅内膜层有少量凋亡的SMC;血管紧张素Ⅱ1型受体(AT_1R)拮抗剂Irbesartan显著增加SMC凋亡和抑制内膜增生。结论:VSMC凋亡不足是球囊损伤后血管内膜增生的机制之一。

关键词 血管平滑肌;细胞凋亡;血管内膜
中图法分类号 R543;R363.11 文献标识码 A

Effects of apoptosis of vascular smooth muscle cells on intima hyperplasia after balloon injury

WANG Geng, HE Guo-xiang, CHI Lu-xiang, JIN Tao, WANG Hai-dong (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of intima hyperplasia after balloon injury of a vessel. Methods: The percentage of apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and the area of neointima were determined with electron microscopy, TUNEL and immunohistochemical assay. Results: After balloon injury, the vascular wall was thickened. On the 3rd day after injury, apoptosis of VSMCs appeared in the vascular media and neointima was formed on the 7th day. On that day, apoptosis of VSMCs in the vascular intima and media reached the peak. The apoptotic VSMCs distributed mainly in the intima. Then the number of apoptotic VSMCs gradually decreased and there were a few apoptotic cells in the intima on the 28th day after balloon injury. Irbesartan, an antagonist of angiotension Ⅱ subtype Ⅰ, significantly increased apoptosis of VSMCs and suppressed the proliferation of intima. Conclusion: Insufficient apoptosis of VSMCs is the important mechanism of intima hyperplasia after balloon injury of the vessels.

Key words vascular smooth muscle; apoptosis; vascular intima

以往认为经皮血管成形术再狭窄(RS)的发生机制主要与血管平滑肌细胞(VSMC)由血管中层向内膜迁移、增殖,导致血管内膜增生有关。近年在RS病灶中发现凋亡的VSMC和凋亡小体[1~3],说明VSMC凋亡也可能影响RS的形成。本实验采用大鼠髂动脉球囊损伤模型,应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的三磷酸脱氧尿嘧啶缺口末端标记法(TUNEL)、免疫组织化学技术和药物干预,对血管球囊损伤后内膜面积和VSMC凋亡的变化进行检测,探讨VSMC凋亡对内膜增生的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鼠抗人α-平滑肌肌动蛋白(SMα-actin)单克隆抗体(福建迈新生物技术公司),免疫组化SP试剂盒(北京中山公司进口分装),TUNEL试剂盒(德国宝灵曼公司),Irbesartan(SR47436,法国Sanofi研究所Dr Chapiron惠赠)。

1.2 动物模型及分组

动物模型参考Clowes法[4]。1%戊巴比妥钠腹腔麻醉,经右侧股动脉远端逆行插入2F球囊导管至腹主动脉下端,向球囊内注入生理盐水,回拉有轻度阻力,反复牵拉导管3次,使右侧髂总动脉内皮剥脱,结扎右侧股动脉。假手术组动物除不插入球囊导管外,其余步骤同上。将动物随机分为:假手术组、术后第3、7、14、28天组、手术+Irbesartan组(30 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),每组8只动物。手术+Irbesartan组于术前6 d开始给药,药物

作者简介:王 耿(1969.5),男,重庆市南川人,硕士,住院医师,主要从事冠心病方面的研究。电话:(023)68754000—73107

收稿日期:1999-10-30;修回日期:2000-01-25

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加入饮水中, 术后 14 d 取材。

1.3　方法

1.3.1　常规病理染色和 TUNEL 染色　　1% 戊巴比妥钠麻醉后, 迅速打开腹腔, 分离、剪下右侧髂总动脉, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 常规脱水、浸蜡、包埋, 5 μm 连续切片, 分别行 HE、Verhoeff 铁苏木素染色和 TUNEL 染色。Verhoeff 铁苏木素染色切片通过彩色图像分析系统(Leica MD20 型德国)处理, 以内弹力纤维和外弹力纤维为界, 分别测量内膜面积和中层面积。TUNEL 染色的切片经 DAB 显色, 苏木素复染, 同时作不加末端脱氧核苷酸转移酶, 其它条件均相同的阴性对照。镜下记数着色细胞数和未着色细胞数, 计算阳性细胞占同类细胞数的百分比。每只动物观察 3 张切片, 间隔约 15 mm, 3 个数值求平均值。

1.3.2　电镜观察　　在光镜取材处剪长 2 mm、宽 1 mm 小长条髂总动脉, 置于 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中预固定 2 h 后, 再以 1% 锇酸固定 2 h, 逐级丙酮脱水, 环氧树脂 618 包埋, 醋酸铀-柠檬酸铅双重染色, LKB-Ⅲ型超薄切片机切片, JEX-2000 型透射电镜观察、照相记录。

1.3.3　SM α-actin 免疫组化染色　　采用 SP 法。同时以不加一抗而其他条件均相同的为阴性对照。

1.4　统计学处理

所测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析。

2　结果

2.1　球囊损伤后血管壁增生过程

假手术组血管内膜仅为一层扁平的内皮细胞, 中层为呈梭形的平滑肌细胞; 球囊损伤后第 3 天, 血管中层增厚, 细胞数增多, 与假手术组比较面积显著增加($P < 0.01$), 尚未形成新生内膜, 无内皮新生; 损伤后第 7 天, 新生内膜形成, 有 4~6 层细胞; 至损伤后第 14 天, 内膜层显著增厚, 有 8~10 层以上细胞; 损伤后第 28 天, 内膜层继续增厚, 管腔显著减小。从损伤后第 3 天至第 28 天, 血管中层面积虽有增加趋势, 但差异不显著($P > 0.05$)。血管紧张素Ⅱ1 型受体(AT1R)拮抗剂 Irbesartan 使内膜增生明显减轻($P < 0.01$), 但中层面积无显著改变($P > 0.05$), 见表 1。

表 1　球囊损伤后血管中层及内膜面积变化($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 10^4 μm²)

Tab 1　Change of vascular media and intima area after balloon injury($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 10^4 μm²)

	Media	Intima area
Sham	5.49 ± 0.42	< 0.01
3 d	8.17 ± 0.61※	
7 d	8.27 ± 0.40※	4.08 ± 0.53
14 d	8.44 ± 0.61※	8.25 ± 0.76▲
28 d	8.78 ± 0.76※	10.85 ± 1.04☆
Irbesartan	7.84 ± 0.64	3.36 ± 0.29☆

※: $P < 0.01$ *vs* sham; ▲: $P < 0.01$ *vs* 7 d

☆: $P < 0.01$ *vs* 14 d

2.2　VSMC 的鉴定及球囊损伤后 VSMC 凋亡的变化

2.2.1　VSMC 的鉴定　　免疫组化染色显示, 血管中层大部分细胞和增殖的内膜层所有细胞胞浆内 SMα-actin 染色均呈黄色片状阳性着色, 阴性对照未见着色。

2.2.2　VSMC 凋亡的变化规律

2.2.2.1　电镜观察　　假手术组血管中层细胞胞膜光滑, 大多数细胞胞浆内含丰富的肌丝、致密体, 细胞器较少, 细胞核呈椭圆形, 核膜光滑, 核中染色质散在分布, 即正常的收缩型 VSMC。球囊损伤后 2 周内, 在血管内膜和中层可见大量细胞胞浆中细胞器丰富, 粗面内质网、高尔基器、线粒体较多, 细胞核染色质丰富, 有基膜和少量的致密体, 缺乏肌丝, 即合成型 VSMC; 还可见数量不等的 VSMC 胞核形状不规则, 核染色质边集, 核固缩、断裂, 胞浆凝集、空泡化, 肌丝和致密体减少, 细胞膜完整、出芽, 凋亡小体形成, 周围无炎性细胞浸润, 即凋亡的 VSMC, 见图 1、2。术后第 7 天内膜层凋亡的 VSMC 最多, 术后第 28 天仅靠近腔面的内膜层有少量凋亡的 VSMC。

2.2.2.2　TUNEL 染色　　假手术组血管 TUNEL 染色未见阳性着色; 球囊损伤后第 3 天, 血管中层可见胞核呈棕黄色阳性着色的 VSMC 散在分布, 约占细胞总数的 7.71%; 损伤后第 7 天, 见图 3, 血管中层 TUNEL 阳性细胞数增多($P < 0.05$), 内膜层可见大量 TUNEL 阳性细胞; 损伤后第 14 天, 血管中层和内膜层 TUNEL 阳性细胞率比损伤后第 7 天减少, 尤以内膜层明显($P < 0.01$); 损伤后 28 d, 仅见少量 TUNEL 阳性细胞位于血管内膜。Irbesartan 使血管内膜 VSMC 凋亡显著增加($P < 0.01$), 见表 2。

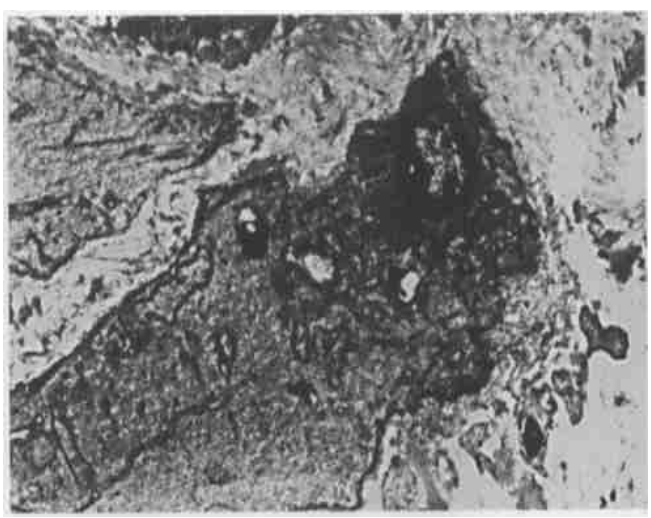


图 1　凋亡的血管平滑肌细胞, 胞膜完整, 胞浆内肌丝减少, 空泡形成, 细胞器集于核周围, 核固缩、断裂。细胞周围可见有膜包绕的凋亡小体　(TEM× 6 000)

Fig 1　Electron microscope showed apoptotic cells and some apoptotic bodies surrounding them. The apoptotic cells were charaterized with intact membrane, squeezed cell organs around nuclei, pyknotic or fragmented nuclei and condensed and vacuolized cytoplasm　(TEM× 6 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

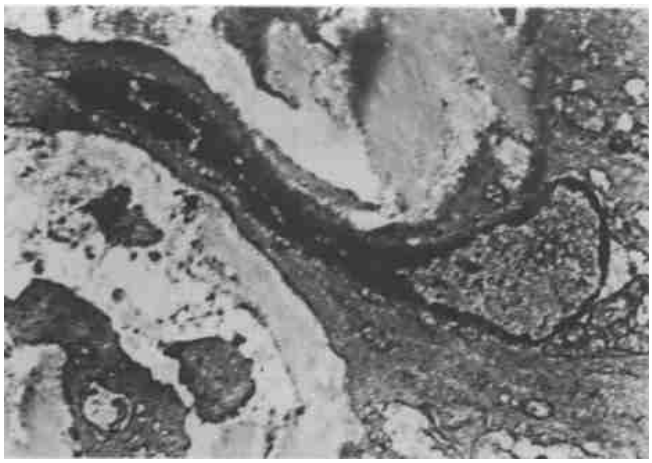


图2 凋亡的血管平滑肌细胞，胞膜完整、出芽（TEM× 12 000）

Fig 2 Electron microscope showed apoptotic vascular smooth muscle cell characterized with intact membrane and budding （TEM× 12 000）

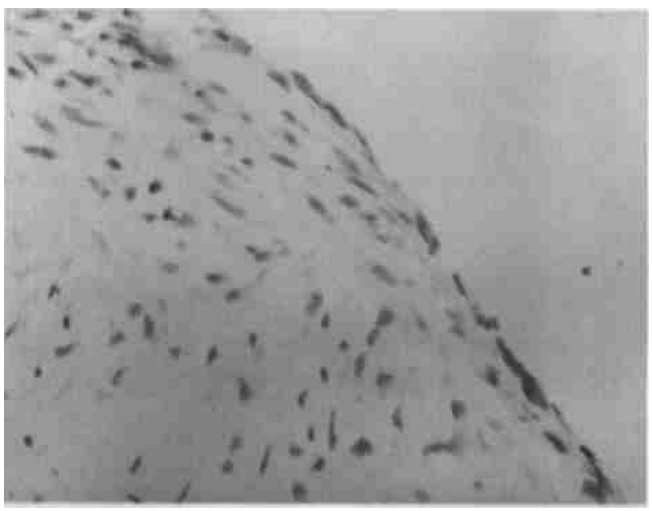


图3 球囊损伤后第7天，血管内膜层可见大量 **TUNEL** 阳性细胞 （TUNEL× 400）

Fig 3 TUNEL staining showed a lot of TUNEL-positive cells in vascular neointima in 7 days after balloon injury （TUNEL× 400）

表2 球囊损伤后血管壁中 TUNEL 阳性细胞率(%)的变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 2 Percentage of TUNEL-positive cells in artery at various time points after balloon injury ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

	Media	Intia
Sham	0	0
3 d	7.71 ± 1.37	
7 d	9.76 ± 1.60△	41.02 ± 3.70
14 d	8.05 ± 0.50▲	17.94 ± 1.52▲
28 d	0	5.05 ± 0.32☆
Irbesartan	10.09 ± 1.52☆	53.23 ± 5.02☆

△: $P<0.05$ *vs* 3 d; ☆: $P<0.01$ *vs* 14 d

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* 7 d

3 讨论

3.1 VSMC 的鉴定

电镜下 VSMC 内可见肌丝，致密体和基膜，致密体和肌膜为区分 VSMC 与成纤维细胞的特定结构。本实验发现血管球囊损伤后，所有内膜细胞和大多数中层细胞均具有上述特征。另外，SMα-actin 是 VSMC 的特异性抗体，它不与成纤维细胞、单核细胞等反应，本实验通过免疫组化染色发现，所有的内膜细胞和大多数中层细胞 SMα-actin 均呈阳性反应，因此可确定属 VSMC。

3.2 球囊损伤后VSMC凋亡的意义

血管成形术后 RS 的发生机制，以前认为主要与 VSMC 由血管中层向内膜迁移、增殖，导致血管内膜增生有关。Clowes 等[4] 用大鼠颈动脉球囊损伤模型发现球囊损伤后 VSMC 的增殖活性直到术后 12 周还保持较高水平(3.8%)，这样水平的增殖可导致细胞数目36%的增长，但从术后 2 周至 12 周颈动脉总的平滑肌(SMC)数没有改变，作者推测在该模型中肯定存在血管壁部分细胞的死亡。

本实验通过电镜观察发现，在假手术组血管中层 VSMC 均为正常的收缩型 VSMC，球囊损伤后 2 周内在内膜和中层发现除收缩型和大量合成型 VSMC 外，还可见数量不等的凋亡 VSMC 和凋亡小体。TUNEL 染色在假手术组血管无阳性着色，TUNEL 阳性细胞在球囊损伤后第 3 天血管中层出现，损伤后第 7 天血管内膜和中层 TUNEL 阳性细胞率达高峰，以后逐渐减少，至损伤后 4 周仅血管内膜有少量 TUNEL 阳性细胞。我们的实验说明血管球囊损伤后新生内膜和中层增生的过程有 VSMC 凋亡参与。Clowes 所推测的细胞死亡为 VSMC 凋亡而并非坏死，聚集于新生内膜的细胞应是迁移、增殖和凋亡的细胞的总和。我们实验观察到的 VSMC 凋亡率高于 Bothaton-Piallat 等[5] 在大鼠胸主动脉球囊损伤模型上观察到的 VSMC 凋亡率，而与 Han 等[6] 在大鼠髂动脉球囊损伤模型的观察结果相近，其中的差异可能与实验大鼠年龄、损伤程度和部位不同有关。Isner 等[1] 通过电镜观察和 TUNEL 法在外周和冠状动脉血管成形术后 RS 病灶中也观察到凋亡的 VSMC，从临床上证明了 VSMC 凋亡是 RS 的病理特征之一。

本实验发现，球囊损伤后各时相点血管内膜和中层 VSMC 凋亡率均低于文献报道的 VSMC 增殖率[4,6]，并且随内膜增生加重，VSMC 凋亡率呈下降趋势；结合 Bauriedel 等[2,7] 在人类外周和冠状动脉粥样

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

硬化及 RS 病灶中观察到的凋亡小体密度与内膜细胞数量呈负相关的现象, 说明 VSMC 凋亡不足或下调是球囊损伤后血管内膜增生的一个原因。我们应用 AT1R 拮抗剂 Irbesartan 增加 VSMC 凋亡率后, 血管内膜增生显著减轻, 从另一方面也说明了这个问题。这也提示采用一定措施使 VSMC 凋亡率升高到与其增殖水平相适应时, 血管内膜增生就会减轻或被抑制, 为临床防治 RS 提供了一个途径。目前, 国外一些实验室正在用转基因的方法以试图达到这一目的[8~10]。AT 1R 拮抗剂 Irbesartan 不仅减轻血管紧张素II促 VSMC 增殖的作用还增加 VSMC 凋亡率, 从而使血管内膜增生减轻, 说明血管紧张素II通过 AT 1R 介导的生物学作用对 RS 形成中的血管内膜增生具有重要意义。

参考文献

[1] Isner J M, Kearney M, Bortman S, *et al*. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis[J]. Circulation, 1995, 91(11): 2 703—2 711.

[2] Bauriedel G, Schluckebier S, Welsch U, *et al*. Incidence and localization of apoptosis bodies in human arteriosclerosis lesion[J]. Z Kardiol, 1996, 85(4): 509—518.

[3] Kearmey M, Pieczek A, Haley L, *et al*. Histopathology of instent restenosis in patiens with peripheral artery disease[J]. Circulation, 1997, 95(8): 1 988—2 002.

[4] Clowes A W, Reidy M A, Clowes M M. Kinetics of cellular proliferation after aterial injury. I: smooth muscle growth in the absence of endothelium[J]. Lab Invest, 1983, 49(3): 327—333.

[5] Bochaton-piallat M L, Gabbiani F, Redard M, *et al*. Apoptosis participates in cellularing regulation during rat aortic intimal thickening[J]. Am J Pathol, 1995, 146(4): 1 059—1 064.

[6] Han D K, Haudenschild C C, Hong M K, *et al*. Evidance for apoptosis in human atherogenesis and in rat vascular injury model[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 267—277.

[7] Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, *et al*. Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(3): 1 132—1 139.

[8] Iwashina M, Shichiri M, Marumo F, *et al*. Transfection of inducible nitric oxide synthase gene causes apoptosis in vascular smooth muscle cels[J]. Circulation, 1998, 98(4): 1 212—1 218.

[9] Johnson T M, Epstein S E, Finkel T. Apoptosis in vascular disease: opportunities for genetic therapeutic intervention[J]. Semin Interv cardiol, 1996, 1(1): 195-202.

[10] Sata M, Perlman H, Muruve D A, *et al*. Fas ligand transfer to the vessel wall inhibitor neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(3): 1 213—1 217.

(编辑　郭建秀)

(上接 264 页)

当确认应进行 X 线刀治疗的患者, 在 CT 定位时, 根据靶区部位在体模架上选好病人头部固定的数据, 随后让患者双手上抬, 并固定于头架上。若特殊患者手不能上举时, 也可将手放在体侧, 但这种情况在选择治疗弧度时, 应注意计算上肢的受照剂量。当治疗胸、上腹部病人, 如肺、食道癌等, 应清楚地记录腹带数据, 并在体表上作一标记, 由此来保证重复定位的准确性。除此之外, 还应用定位架在患者皮肤上定出相应的重复治疗标记。因此, 技术员在固定体位的操作时应特别注意。

2　体部 X 线刀治疗的质量控制要点

为了保证治疗计划的准确实施和重复精度, 除了保证机器工作的稳定性和靶区剂量分布的稳定性之外, 消除人为因素导致的误差尤为重要。我们的操作经验总结于下: ① 重复治疗时, 患者头部固定数据必须与 CT 定位数据一致。② 体表 6 点为数据的重复一致极为重要。若在体表上制定的 6 个标记分别为 A、B、C、D、E、F 时, 其中的 A、C 两点可能因患者手臂的上抬幅度不同而产生变化, 应及时调整; 又因腹带对 D、E、F 3 点有一定影响, 应该在腹带上、下各作一个标记。通过这些操作可以较准确地实现体表六点的重复一致。③ 负压袋是根据不同的个体一次性定位, 应注意检查负压袋是否存在气体的泄漏现象。在负压袋上的姓名应与患者的姓名一致。④ 在 X、Y、Z 轴坐标系中确定出的定位数据应准确可靠。在治疗中, 必须由两个或两个以上的操作人员核查。为了靶区的准确性, 对两个以上的靶点, 应该特别注意体表六点定位的重复。因为在第一靶区治疗后, 患者可能出现不自主的移动, 采用这样的方法可以有效地保证定位精度。⑤ 治疗时, 应注意协助患者保持平静的呼吸状态。对咳嗽的患者, 在治疗前 20 min 口服一定剂量的止咳药, 以防止因咳嗽而影响靶区的准确性。⑥ 准直器的选择是根据病变的大小来选定的, 若安置有误, 将造成靶区受照射剂量不足, 甚至遗漏计划中的治疗区域, 伤及正常组织。因而应特别认真地检查核对。⑦ 为了避免机架转动碰撞治疗床而产生的误差, 在第 1 次治疗时, 旋转机架应选择床的边缘作为起始角度。⑧ 治疗前应由两个以上的操作者核查靶点、剂量等相关数据, 力求避免任何失误。

3　结论

通过上述方法及质量控制中具体的操作要点的实施, 从 1998 年 1 月至今, 我们取得了较好的效果。这是我们工作中的经验与教训的总结, 只有对上述各要点严格要求, 认真执行; 体部 X 线刀治疗实施全方位质量控制, 将会达到治疗准确、提高疗效的目的。

关键词　体部 X 线刀治疗; 定位摆位质量控制
中图法分类号　R730. 55　　文献标识码　B

参考文献

[1] 肖建平, 苗延俊, 徐国镇, 等. X 线立体定向治疗头颈部肿瘤 30 例初探[J]. 中华放射肿瘤杂志, 1996, 5(2): 125—126.

(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net