DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.016

Irbesartan对内皮剥脱后血管平滑肌细胞增生的影响

程训民* 何国祥 王国超 (第三军医大学附属西南医院心血管内科) 重庆, 630038

提 要 目的: 观察新的非肽类血管紧张素II的1型(AT1)受体拮抗剂对血管平滑肌细胞(VSMC)增生的影响。方法: 大鼠髂动脉球囊内皮剥脱术后VSMC过度增生模型,采用^{3}H-TdR和^{3}H-Leu掺入,免疫组化染色检测VSMC中增殖细胞核抗原(PCNA)表达及图象分析血管壁形态学变化的方法。结果: Irbesartan显著减少^{3}H-TdR和^{3}H-Leu的掺入量,减少新生内膜面积和PCNA阳性细胞数。结论: Irbesartan能抑制大鼠球囊内皮损伤后VSMC增生,可能是防治血管成行术后再狭窄的有效药物。

关键词 Irbesartan;肌,平滑,血管;受体,血管紧张素II
中图法分类号 R543

经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)是治疗冠心病的有效方法之一,然而术后半年内再狭窄发生率达30%~50%。再狭窄的主要原因为血管内皮损伤后,中层血管平滑肌细胞(VSMC)向内膜下迁移和增生,发生机理尚未阐明,临床亦缺乏防治再狭窄的有效措施。近来研究表明肾素-血管紧张素系统(RAS)参与了VSMC增生的调节[1]。本实验旨在观察新的非肽类血管紧张素II的I型(AT1)受体拮抗剂Irbesartan对大鼠髂总动脉内皮损伤后内膜增生的影响,以探讨AT1受体拮抗剂防治血管成形术后再狭窄的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Irbesartan由法国Sanofi研究中心提供,^{3}H-TdR和^{3}H-Leu均为中国科学院上海核技术开发公司产品,放射比活性分别为151和2035 GBq/mmol, RPMI 1640培养基和α平滑肌肌动蛋白单克隆抗体均为美国Sigma公司产品,增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体为丹麦Dako公司产品。免疫组化ABC试剂盒购自华美公司,其它试剂为国产分析纯。

1.2 大鼠球囊导管脱内皮损伤模型[2]

选用500 g~550 g雄性Wistar大鼠,随机分为剥脱组、治疗组和假手术组。剥脱组: 用1%戊巴比妥钠麻醉动物,分离出股动脉,经股动脉远端插入2F球囊导管至髂总动脉,注入生理盐水扩张球囊,反复牵拉导管3次,剥脱髂总动脉内皮(经伊文思蓝染色证实); 治疗组: 手术同剥脱组,二组分别于术前1天至术后14 d食管内喂饲Irbesartan 30 mg·kg^{-1}·d^{-1}或蒸馏水; 假手术组: 除不插入球囊导管外,其余操作同剥脱组。

1.3 髂总动脉^{3}H-TdR和^{3}H-Leu掺入

术后3 d断头处死,迅速摘取髂总动脉,置生理盐水中洗净血液,去除血管周围的结缔组织,纵行剪开后,放置1.5 ml RPMI 1640培养基的孵育液中,再各加入^{3}H-TdR或^{3}H-Leu 18.5 kBq,在通有95% O_2、5% CO的振荡器上,37℃孵育24 h,取出组织用冰PBS缓冲液冲洗3次,滤纸吸干称重,放入闪烁瓶中,经甲酸消化后在液体闪烁计数仪上测定^{3}H放射活性。

1.4 组织学检查

术后14 d,动物麻醉后放血处死,原位灌注(13.3 kPa灌注压)10%福尔马林液后,摘取髂总动脉,石蜡包埋,4μm切片,进行HE染色, Verhoeff铁苏木素染色,α-平滑肌肌动蛋白和PCNA免疫组化染色,免疫组化染色采用ABC法[3]。DAB H_2O_2显色,苏木素复染。每例动物观察3张切片,间隔24μm,图像分析仪测定内膜面积、中层面积、新生内膜中细胞密度和PCNA阳性细胞数。

1.5 统计学处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验进行显著性分析。

2 结果

光镜检查示内皮剥脱后中层和内膜层有大量增生细胞,胞核大小不一,排列紊乱,α-平滑肌肌动蛋白免疫组化染色阳性。内皮损伤后3 d ^{3}H-TdR和^{3}H-Leu掺入增加。损伤后14 d,内膜明显增厚,中层、内膜面积增加,并见有大量PCNA阳性细胞。Irbesartan治疗组VSMC增生明显受抑制,损伤后3 d ^{3}H-TdR和^{3}H-Leu掺入减少,损伤后第14天和剥脱组比较,新生内膜面积减少60%, PCNA阳性细胞数减少69%,见附表、附图。

* 程训民,男,32岁,硕士研究生

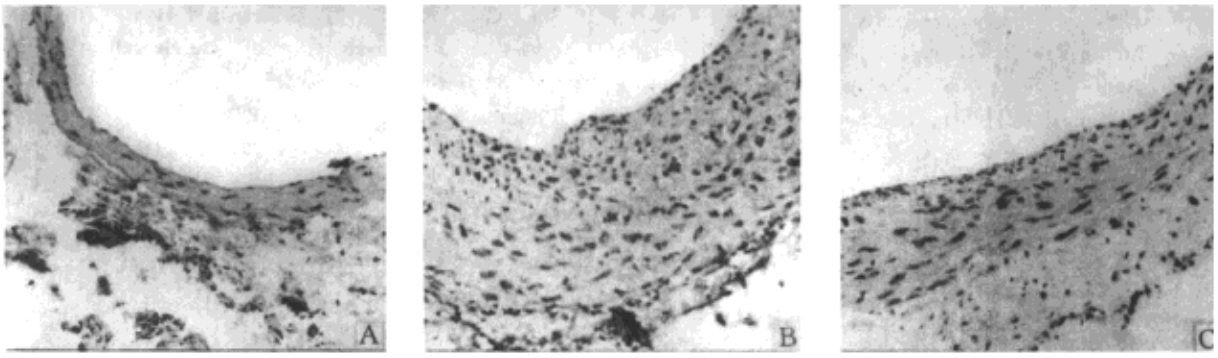
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

附表　**Irbesartan**对髂动脉球囊内皮剥脱诱导的 **VSMC**增生的影响 (n= 8)

Tab　The effect of Irbesartan on VSMC proliferation in the iliac artery denuded by balloon catheter (n= 8)

Group	3 days after deudation		14 days after denudation			
	^{3}H-TdR (c/min)/mg^{-1}ww	^{3}H-Leu (c/min)/mg^{-1}ww	Intima area (ρ_A/10$^4\mu$m^2)	Media area (ρ_A/10$^4\mu$m^2)	Cell desity (ρ_A/100(cells)$^{-1}$ mm^2)	PCNA-positive (cells/section)
Sham operation	262.4± 27.4	687.3± 74.0	< 0.10	6.26± 0.42	——	0- 1
Denudation	3576.7± 364.7*	2952.8± 209.5*	7.12± 0.52	9.17± 0.48*	98± 4.1	334± 32
Irbesartan	1098.9± 112.6△	1021.4± 127.3△	2.92± 0.34△	8.05± 0.38△	103± 5.6	104± 25△

*: P < 0.01 *vs* sham operation group; △: P < 0.01 *vs* denudation group



附图　**Irbesartan**抑制大鼠髂动脉内皮剥脱后 **14 d**血管平滑肌细胞增生

A:未损伤; B:损伤,蒸馏水治疗; C:损伤, Irbesartan治疗　(HE× 200)

Fig　Irbesartan inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells 14 d after balloon denudation of rat iliae artery

A: uninjwed, sham operation; B: vehicle-treated, injured; C: Irbesartan treated, injured　(HE× 200)

3　讨论

分子生物学研究表明 VSMC存在组织 RAS.血管脱内皮损伤后,尽管血液中肾素-血管紧张素转换酶(ACE)无明显变化,但损伤的血管壁中血管紧张素原、ACE合成增多, ACE抑制剂可抑制内膜增厚,表明局部 RAS参与内皮损伤后 VSMC的迁移和增生[4]。血管紧张素II 对 VSMC具有生长激素样作用,可刺激 VSMC的蛋白和 DNA合成增加,促进细胞分裂,此作用主要通过 AT1受体介导[5]。脱内皮损伤后 VSMC表型发生改变,由静止型转化为分泌型。Corria等[6]发现分泌型 VSMC中 AT1受体表达较静止型 VSMC增加 3~ 4倍。Viswanathan等[7]利用放射自显影显示大鼠颈动脉脱内皮损伤后增生的 VSMC中 AT1受体表达增多,提示血管紧张素II 通过与 AT1受体结合参与了血管内皮损伤后内膜增生。Irbesartan是一种新的非肽类、选择性 AT1受体拮抗剂,与 AT1受体的亲合力较 Losartan高 10倍[8]。本实验观察到 Irbesartan能有效地抑制内皮剥脱后 VSMC的增殖,表现为减少损伤后 3天^{3}H-TdR掺入(反映 DNA合成和细胞分裂)和^{3}H-Leu掺入(反映蛋白质合成)的增加程度,减低损伤后 14天中层和新生内膜面积,管壁中 PCNA阳性细胞减少(反映处于 G$_1$后期和 S期的细胞)。Irbesartan对新生内膜中细胞密度影响不大,细胞密度在一定程度上反映了细胞合成和分泌细胞外基质的多少,因此提示 Irbesartan对 VSMC合成、分泌细胞外基质无明显作用。AT$_1$受体拮抗剂抑制内皮损伤后内膜增生的机制是通过竞争性地与 AT1受体结合,抑制血管紧素II 诱导的 VSMC内原癌基因 c-fos, c-jun, c-myc的 mRNA表达和血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)的 mRNA表达,从而抑制 VSMC的迁移和增殖[9,10]。AT$_1$受体拮抗剂因直接作用于血管紧张素II 受体,抑制 RAS的作用优于 ACE抑制剂。本实验结果显示 Irbesartan能有效地抑制内皮损伤后内膜增殖,提示 Irbesartan可能对防治血管成型术后再狭窄具有潜在的临床意义,值得进一步探讨。

参考文献

1　Fingerle J, Muller R M K, Kuhn H *et al*. Mechanism of inhibition of neointimal formation by the angiotensin converting enzyme inhibitor Cilazapril. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995; 15(4): 1945

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

2 Clowes A W, Reidy M A, Clowes M M. Mechanisms of stenosis after arterial injury. Lab Invest, 1983; 49(3): 208
3 蔡文琴,王泊云 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994: 121~123
4 Weber H, Taylor D, Molloy T L. Angiotensin Ⅱ induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. J Clin Invest, 1995; 93(6): 788
5 Kleef E M, Fingerle J, Daemen M J A P. Angiotensin Ⅱ-induced progression of neointimal thickening in the balloon-injured rat carotid artery is AT_1 receptor mediated. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996; 16: 857
6 Corria C, Andre P, Shott C *et al*. ANGⅡ receptor expression and function during phenotypic modulation of the rat aortic smooth muscle cells. Am J Physiol, 1994; 266: H631
7 Viswanathan M, Seltzer A, Saavedra J M. Heterogeneous expression of angiotensin Ⅱ AT_1 receptors in neointima of rat carotid artery and aorta after balloon catheter injury. Peptides, 1994; 15: 1205
8 Nisato D, Cazaubon C, Iacour C *et al*. Pharmacological properties of SR_{47436}, a nonpeptide angiotensin Ⅱ receptor antagonist. Br J Pharmacol, 1992; 105: 84p
9 Kim S, Kawamura M, Wanibuchi H *et al*. Angiotensin Ⅱ type 1 receptor blockade inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. Circulation, 1995; 92: 88
10 Sung C P, Arleth A J, Strorer B L *et al*. Angiotensin type-1 receptors mediate smooth muscle cell proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Thera, 1994; 271: 429

(收稿: 1996-11-12;修回: 1997-03-28)
(编辑 冷怀明)

Effects of Irbesartan on proliferation of vascular smooth muscle after balloon denudation

Cheng Xunmin, He Guoxiang, Wang Guochao (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To observe the effects of Irbesartan, a new type 1 receptor antagonist of nonpeptic angiotensin II, on vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods**: After the model of VSMC was established by balloon catheter denudation in the common iliac artery in rats, ^{3}H-thymidine and ^{3}H-leucine incorporation were used and the expression of proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) determined with ABC immunohistochemistry. Meanwhile, the morphological changes of the injured vascular wall were observed with image analysis. **Results**: Irebesartan significantly reduced ^{3}H-thymidine and ^{3}H-leucine incorporation, neointimal thickening and the number of PCNA-positive cells in the injured vascular wall. **Conclusion**: Irbesartan may inhibit VSMC proliferation after the balloon injury of the iliac artery in rats and therefore it might be used in preventing formation of stenosis after angioplasty in human being.

Key words Irbesartan; musle; smooth; vascular; receptor; angiotensin

(上接227页)

积液的肾盂和扩张的输尿管做出推理判断,行其它检查进一步确诊。如果结石卡在输尿管第三狭窄处,通常肾盂和输尿管可扩张并积液,也可以不伴有扩张和积液,仅在充盈的膀胱三角区输尿管开口处见扩张的输尿管及结石强回声光团伴声影卡在其中。所以,怀疑有肾结石时一定不能忽略膀胱处的检查。胆道蛔虫,若在胆囊内显示有管状透声区并有蠕动,若蛔虫在胆道内表现为胆管扩张,其内可见两条线样平行强回声带,中间可见长条样低回声,可见其蠕动,胆囊未见异常。

(4)急性狭窄。常见于脏器或肿瘤的扭转。如卵巢囊肿蒂扭转,可于下腹部扫查到囊性肿物的存在。部分还可出现盆腔、腹腔积液。

综上所述,超声检查为大多数急腹症的病因诊断及鉴别诊断提供了较为客观的依据。目前已成为临床医生及急性腹痛病人最易于接受的一种影像检查方法[3]。

关键词 急腹症 /诊断; B超声检查
中图法分类号 R445.1

参考文献

1 Mckenney M G, Martin L, lentz K *et al*. 1000 Consecutive ultrasounds for blunt abdominal trauma. J Trauma, 1996, 40(4): 607
2 周永昌,郭万学主编.超声医学.北京:科学技术文献出版社,第二版 1996: 653~655
3 Heller M, Crocco T, Patterxon J *et al*. Emergency ultrasound services as perceived by directors of radiology and emergency departments. Am J Emerg Med, 1995, 13(4): 430

(收稿: 1996-12-15;修回: 1997-01-25)
(编辑 冷怀明)

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