

· 实验研究 Experiment research ·

机械损伤加自体血清对 VSMC 生长及其自分泌 PDGF 的影响

牛焕章, 卢 勤, 安艳丽, 潘 猛, 滕皋军

【摘要】 目的 探讨在机械损伤和自体血清刺激后, 血管平滑肌细胞(VSMC)生长情况及其自分泌血小板衍生生长因子(PDGF)的量随时间的变化关系。方法 模拟 PTA 术后体内环境建立体外 SMC 的细胞模型。ELISA 法测定各上清液样本 PDGF 的浓度, MTT 法检测各组细胞的生长和增殖情况。结果 自体血清并部分自体机械损伤刺激后, 实验组 SMC 的 MTT 值一直保持增加态势, 至第 5 天达高峰, 而对照组于第 3 天即达峰值, 实验组 PDGF 的自分泌量逐渐升高, 至第 4、5 天达峰值, 比对照组峰值高出近一倍。结论 兔 VSMC 在自体血清和机械损伤刺激下, 生长增殖能力更强, 自分泌的 PDGF 会逐渐升高, 至第 4~5 天达高峰, 该模型可大致模拟体内情况。

【关键词】 血管平滑肌细胞; 再狭窄; 血小板衍生生长因子

中图分类号: R540.4 文献标识码: B 文章编号: 1008-794X(2006)02-0097-04

Expression of PDGF and growth of VSMC after mechanical injury and exposure to autologous serum NIU

Huan-zhang, LU Qin, AN Yan-li, PAN Meng, TENG Gao-jun. Department of Radiology, Zhongda Hospital, Dongnan University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the growth and expression of PDGF of VSMCs in response to stimulation of autologous serum and mechanical injury. **Methods** An vitro model simulating the condition as possible as that after PTA. PDGF of every medium sample from every group was detected by ELISA, and the values of MTT of every cellular sample was measured by MTT to show the growth and proliferation of every group. **Results** After stimulation by autologous serum and mechanical injury, SMCs of the experimental group showed the value of MTT increasing, but SMCs in control group reached on 3rd day. At the same time, the expression of PDGF also increased gradually, obtaining peak gradually up to peak on day 4/5 nearly 2.0-fold as much as that of SMCs in the control group. **Conclusions** After on the 5th day, stimulation with autologous serum and mechanical injury, VSMCs of rabbit showed the stronger ability of growth/proliferation, and autocrine of PDGF also increased gradually, reaching peak on 4-5 d, probably simulating to those in vivo. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 97-100)

【Key words】 VSMCs; Restenosis; PDGFs

经皮经腔血管成形术(PTA)为众多血管疾病患者解除了痛苦,但其术后 6~12 个月平均 30%~40% 的再狭窄(restenosis)率^[1-3]却一直困扰着临床医师。再狭窄的机制主要是血管局部损伤后,血管平滑肌细胞(VSMC)从中膜向新生内膜的迁移和增殖,并伴随着炎症反应和大量细胞外基质的增生、沉

积^[1,4-7]。Wilcox^[8]研究发现创伤局部管壁生长因子的合成对控制 VSMC 的增殖起重要作用。在再狭窄的基础研究中,人们发现血小板衍生生长因子(PDGF)是一种较重要的再狭窄启动因子,而且是一种强烈的有丝分裂原和趋化因子^[9-11]。本研究尝试模拟 PTA 术后体内环境,对 VSMC 的生长和自分泌 PDGF 的情况进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 动物及材料

新西兰成年兔由本校动物中心提供;F-12/DMEM 混合培养基干粉(高糖型)和胎牛血清(FBS)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300094),江苏省自然科学基金(BK200507),东南大学大学生科研训练计划(SRTP)(54302008)

作者单位 210009 南京,东南大学附属中大医院放射科(牛焕章、卢勤、安艳丽、滕皋军);基础医学院微生物与免疫系(潘猛)

通讯作者:牛焕章

均购自美国 GIBCO 公司 ;兔 PDGF ELISA 试剂盒购自 RapidBio Lab(CA USA)。细胞培养板(6 孔和 96 孔)为 Orange Scientific 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 自体血清的制备 取成年新西兰大白兔 3 只 经耳缘静脉注入洁净空气约 20 ml 致死。迅速消毒并打开胸腹腔 ,经心脏和门静脉取血 25 ~ 30 ml。离心(4000 r/min 20 min)后取得血清 ,针孔滤器(0.22 μ m)过滤后 - 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

1.2.2 建立体外细胞系 取兔胸主动脉约 3 cm ,分离出 SMC 后用组织块法进行原代培养 ,DMEM 培养液含 20% FBS ,培养瓶置于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的培养箱。

1.2.3 用免疫组化法鉴定 SMC。

1.2.4 将第 3 代 SMC 混合并调至约 8×10^4 细胞/ml ,分二组进行培养 ,分别接种 12 块 6 孔培养板上 : A 组 :自体血清刺激 + 部分机械损伤刺激组 ,按原代培养方法培养至细胞 60% ~ 70% 融合时 ,取自体血清 56 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 配制含 20% 自体血清的 DMEM 培养液 ,每孔加入该培养液 1.5 ml。随后以直径 5 mm 的软塑料管在各孔中间作“十”字状轻压 ,持续约 5 s。24 h 后 ,培养液更换成含 2% 自体血清的 DMEM 培养液 ,以后每 24 h 换液一次 ,换液前 ,每组各一孔取样 ,取其上清 400 μ l 置入 eppendorf 管放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱待测。然后进行细胞计数 ,用计数板计数 ,重复 3 次 ,取均值。

B 组 :对照组 ,A 组培养液更换成含 2% 自体血清的 DMEM 培养液之前 ,按原代培养方法培养 ,之后 ,与 A 组同步更换为含 2% FBS 的 DMEM 培养液 ,余与 A 组相同。

1.2.5 各组取完上清样品后用 ELISA 法测定 PDGF 的浓度。

1.2.6 用 MTT 法检测各组细胞的生长和增殖情况。用 96 孔培养板按上述分组方式进行分组 ,分别于施加因素后 2、3、4、5 和 7 d 用 MTT 法检测。酶联免疫检测仪为美国 Bio. Rab. 公司生产。

1.3 统计学处理

所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示 ,两两样本均数比较用 *t* 检验。

2 结果

传代细胞爬片后用免疫组化法进行鉴定 ,结果证实为 SMC(图 1) ,细胞模型的建立如图 2 所示。模型建立后 A、B 组的细胞生长情况如图 3 所示。

血清刺激并部分自体机械损伤刺激后 ,A 组 SMC 的 MTT 值在前 5 d 一直保持增长态势 ,至第 5 天达高峰。空白对照 B 组于第 3 天达峰值 ,然后 MTT 值逐渐下降(图 4)。A 组 SMC 在施加因素后 ,PDGF 的自分泌量逐渐升高(图 5) ,至第 4、5 天达峰值(209.35 ± 7.73)pg/ 5×10^5 细胞 ,B 组 SMC 自分泌的 PDGF 量同时期内于第 3、4 天达峰值(114.00 ± 10.12)pg/ 5×10^5 细胞 ,两者峰值相差近一倍。

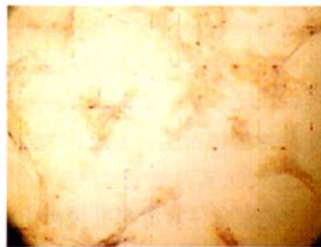


图 1 SMC 免疫组化鉴定



图 2 SMC 损伤模型

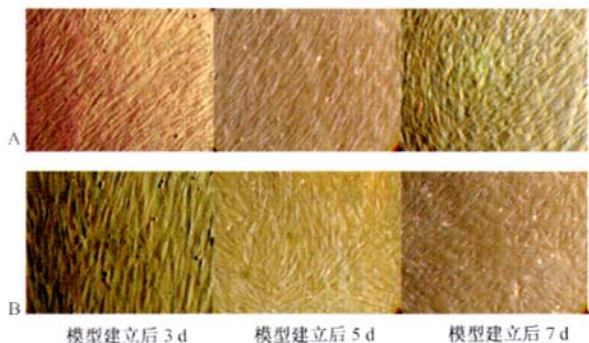
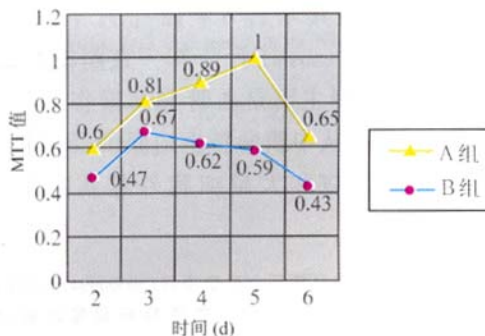


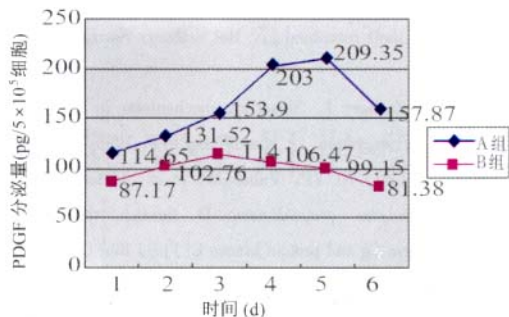
图 3 模型建立后 A、B 组细胞的生长情况($\times 200$)

* A 组所示为未损伤区域细胞



在机械损伤并自体血清刺激后 ,除了第 3 天两组 MTT 值配对 *t* 检验 *P* = 0.238 外 ,其余各天均显示 *P* < 0.05

图 4 A 组和 B 组的 MTT 生长曲线



在机械损伤并自体血清刺激后 1~6 d 内,两组 SMC 自分泌的 PDGF 量,配对 *t* 检验均显示 $P < 0.05$

图 5 A 组和 B 组 SMC 自分泌 PDGF 的量与时间的关系曲线

3 讨论

在 PTA 术后,内膜 SMC 增殖的先决条件是内膜和中膜 SMC 的损伤^[1],其后中膜局部会暴露于自身的血清,血清中含有许多已知和未知的细胞因子与生长因子,这些因子对损伤的修复起着重要作用^[8],本研究通过对即将融合的兔 SMC 部分机械损伤,并用较高浓度的自体血清刺激来模拟术中情况;其后,用低浓度自体血清培养,既部分模拟了术后的体内环境,又可用于检测培养的 SMC 大致自分泌的 PDGF 量。

PDGF 是 sis 原癌基因的表达产物^[12],可刺激多种细胞分裂和增殖,如成纤维细胞、VSMC 等。PDGF 不仅来源于血小板,SMC、内皮细胞和单核巨噬细胞都能分泌 PDGF^[1,13-15]。PDGF 的作用机制是与 PDGF 同其受体结合后激活:磷脂酰肌醇 3 激酶(PI₃K)途径、Ras 途径、磷脂酶激活途径以及 Ca²⁺ 途径等细胞信号转导通路,继而激活与细胞分裂有关的各种转录调节因子的合成^[16,17]。已有人用 PDGF 的反义 RNA 进行 PTA 后局部灌注,或用非特异单核苷酸和其他小分子物质干扰 PDGF 的表达,并都取得了不同程度的疗效^[6,18-20]。

Walker 等^[21]曾调查了正常中膜 VSMC 和损伤后新生内膜 VSMC 自分泌 PDGF 的量,认为后者分泌 PDGF 的量是前者的近 5 倍。日本学者 Uchida 等^[22]通过原位杂交和免疫组化方式对球囊扩张损伤的兔股动脉进行了动态分析,结果表明,内膜 SMC 内 PDGF-B 链的 mRNA 及其蛋白的表达均明显升高,至第 7 天达高峰(最高达 7 倍);而 PDGF-A 链升高了 1.5 倍。我们的实验表明,VSMC 在局部损伤和自体血清刺激后,PDGF 的自分泌量逐渐升高,至第 4、5 天达峰值,且分泌量增加近一倍。但是,即使除去免疫组化的精度问题,这些变化仍与 7 倍有较大差距,这可能与 SMC 对 PDGF 的内分泌^[23]和后来 SMC 的

遗传表型变异有关,有资料表明血管损伤 7 d 后,即可在新生内膜发现增殖的 SMC^[24]。在我们的实验中,第 6 天 PDGF 的分泌量即明显下降,可能与细胞的体外培养产生接触抑制有关。我们还观察到,A 组的细胞一般在第 5~6 天会有部分死亡,但 PDGF 的分泌量却在下降,因此,细胞的自然死亡与机械损伤造成的细胞死亡,对 SMC 分泌 PDGF 的影响可能并不一样。Calara 等^[23]在研究 FGF 对 PDGF 的影响关系时,也做了体外 SMC 损伤模型,当时用的是胎牛血清,他们发现受损伤后死亡的细胞释放 bFGF 不但促进 SMC 的 DNA 合成,还可增加 PDGF-A 链的 mRNA 的水平。最近,Millette 等^[25]的研究结果显示 PDGF-B 可诱导 bFGF 的释放及其受体的激活,并促进 SMC 的增殖,并认为内源性 bFGF 可调节 PDGF-B 链的活性。

在我们的这次实验中,我们发现对照组的 MTT 生长曲线和 PDGF 分泌量的曲线是一致的,但实验组中,两者的曲线不太一致。第 2~3 天的 MTT 值有一个较明显的增加,但 PDGF 的增加量似乎并不明显。这个阶段可能与自体血清以及损伤细胞释放 bFGF 有关,第 4~5 天的变化可能主要与 bFGF 和 PDGF 的相互作用有关。

我们在预实验中还发现,实验组的 SMC 比对照组细胞有更强的增殖能力,且能存活较长时间。这可能与自体血清和机械损伤刺激 SMC 发生遗传表型改变有关。

总之,兔 VSMC 在自体血清和机械损伤刺激下,生长增殖能力更强,自分泌的 PDGF 会逐渐升高,至第 4~5 天达高峰,较接近体内观察结果,该模型能够大致模拟体内情况。不过,体内环境更加复杂,如 PDGF 的旁分泌、血流因素以及整个体内大的细胞因子网络调控变化的影响,均是不能完全模拟的影响因素,该模型有待进一步完善。另外,若能够将 SMC 和血管内皮细胞共培养来检测,我们认为会更有意义。

[参考文献]

- [1] Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, et al. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF [J]. Science, 1991, 253: 1129-1132.
- [2] Nagasaki K, Matsumoto K, Kaneda M, et al. Effects of preinjury administration of corticosteroids on pseudointimal hyperplasia and cytokine response in a rat model of balloon aortic injury [J]. World J Surg, 2004, 28: 910-916.
- [3] Wyttenbach R, Gallino A, Alerei M, et al. Effects of percutaneous

- transluminal angioplasty and endovascular brachytherapy on vascular remodeling of human femoropopliteal artery by noninvasive magnetic resonance imaging[J]. *Circulation* , 2004 , 110 : 1156-1161 .
- [4] Bauriedel G , Kandolf R , Welsch U , et al . Mechanisms of restenosis after angioplasty[J]. *Zeitschrift fur Kardiologie* , 1994 , 83 Suppl 4 : 31-41 .
- [5] Kopp CW , Holzenbein T , Steiner S , et al . Inhibition of restenosis by tissue factor pathway inhibitor : in vivo and in vitro evidence for suppressed monocyte chemoattraction and reduced gelatinolytic activity[J]. *Blood* , 2004 , 103 : 1653-1661 .
- [6] Nili N , Cheema AN , Giordano FJ , et al . Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function : potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty[J]. *Am J Pathol* , 2003 , 163 : 869-878 .
- [7] Bernard S , Buetow , Kristen A , et al . Chimera analysis supports a predominant role of PDGFR β in promoting smooth-muscle cell chemotaxis after arterial injury[J]. *Am J Pathol* , 2003 , 163 : 979-984 .
- [8] Wilcox JN . Molecular biology : insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention[J]. *Am J Cardiol* , 1993 , 72 : 88E-95E .
- [9] Heldin CH , Westermark B . Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor[J]. *Physiol Rev* , 1999 , 79 : 1283 .
- [10] Li X , Tjwa M , Moons L , et al . Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors[J]. *J Clin Invest* , 2005 , 115 : 118-127 .
- [11] Kamimura M , Bea F , Akizawa T , et al . Platelet-derived growth factor induces tissue factor expression in vascular smooth muscle cells via activation of Egr-1[J]. *Hypertension* , 2004 , 44 : 944-951 .
- [12] Fredriksson L , Li H , Eriksson U . The PDGF family : four gene products form five dimeric isoforms[J]. *Cytokine Growth Factor Rev* , 2004 , 15 : 197-204 .
- [13] Libby P , Warner SJ , Salomon RN , et al . Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle from human atheroma[J]. *N Engl J Med* , 1988 , 318 : 1493-1498 .
- [14] Ross R . The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s[J]. *Nature* , 1993 , 362 : 801-809 .
- [15] Raines EW . Handbook of experimental pharmacology : Peptide growth factors and their receptors[J]. Hei delberg : Springer-verlag , 1990 . 173-626 .
- [16] Abedi H , Zachary I . Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration[J]. *Cardiovasc Res* , 1995 , 30 : 544-556 .
- [17] Johan Van Lint , Ni YP , Valius M , et al . Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase C γ and protein kinase C δ [J]. *J Biol Chem* , 1998 , 273 : 7038-7043 .
- [18] 衣为民 季 军 , 令文萍 , 等 . 反义寡核苷酸抑制兔血管平滑肌细胞增殖和血小板源性生长因子 β mRNA 的表达[J]. *中国介入心脏病学杂志* , 2004 , 12 : 309-311 .
- [19] Lee M , Simon AD , Stein CA , et al . Antisense strategies to inhibit restenosis[J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Development* , 1999 , 9 : 487-492 .
- [20] Reidy MA , Silver M . Endothelial regeneration , VIII : lack of intimal proliferation of after defined injury to rat aorta[J]. *Am J Pathol* , 1985 , 118 : 173-177 .
- [21] Walker LN , Bowen-pope DF , Ross R , et al . Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1986 , 83 : 7311-7315 .
- [22] Uchida K , Sasahara M , Morigami N , et al . Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries[J]. *Atherosclerosis* , 1996 , 124 : 9-23 .
- [23] Calara F , Ameli S , Hultgardh Nilsson A , et al . Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells : potential role of FGF and PDGF [J]. *Arteriosclerosis , Thromb Vasc Biol* , 1996 , 16 : 187-193 .
- [24] Scott NA , Cipolla GD , Ross CE , et al . Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries[J]. *Circulation* 1996 , 93 : 2178-2187 .
- [25] Millette E , Rauch BH , Detawe O , et al . Platelet-derived growth factor-BB-induced human smooth muscle cell proliferation depends on basic FGF release and FGFR-1 activation[J]. *Circ Res* , 2005 , 96 : 172-179 .

(收稿日期 : 2005-07-12)

作者: 牛焕章, 卢勤, 安艳丽, 潘猛, 滕皋军, NIU Huan-zhang, LU Qin, AN Yan-li, PAN Meng, TENG Gao-jun

作者单位: 牛焕章, 卢勤, 安艳丽, 滕皋军, NIU Huan-zhang, LU Qin, AN Yan-li, TENG Gao-jun(210009, 南京, 东南大学附属中大医院放射科), 潘猛, PAN Meng(210009, 南京, 东南大学基础医学院微生物与免疫系)

刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC PKU**

英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY

年, 卷(期): 2006, 15(2)

被引用次数: 0次

参考文献(25条)

1. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF 1991

2. Nagasaki K, Matsumoto K, Kaneda M Effects of preinjury administration of corticosteroids on pseudointimal hyperplasia and cytokine response in a rat model of balloon aortic injury 2004

3. Wyttenbach R, Gallino A, Alerci M Effects of percutaneous transluminal angioplasty and endovascular brachytherapy on vascular remodeling of human femoropopliteal artery by noninvasive magnetic resonance imaging 2004

4. Bauriedel G, Kandolf R, Welsch U Mechanisms of restenosis after angioplasty 1994(zk)

5. Kopp CW, Holzenbein T, Steiner S Inhibition of restenosis by tissue factor pathway inhibitor: in vivo and in vitro evidence for suppressed monocyte chemoattraction and reduced gelatinolytic activity 2004

6. Nili N, Cheema AN, Giordano FJ Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty 2003

7. Bernard S, Buetow, Kristen A Chimera analysis supports a predominant role of PDGFRβ in promoting smooth-muscle cell chemotaxis after arterial injury 2003

8. Wilcox JN Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention 1993

9. Heldin CH, Westermark B Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor 1999

10. Li X, Tjwa M, Moons L Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors 2005

11. Kamimura M, Bea F, Akizawa T Platelet-derived growth factor induces tissue factor expression in vascular smooth muscle cells via activation of Egr-1 2004

12. Fredriksson L, Li H, Eriksson U The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms 2004

13. Libby P, Warner SJ, Salomon RN Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle from human atheroma 1988

14. Ross R The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s 1993

15. Raines EW Handbook of experimental pharmacology: Peptide growth factors and their receptors 1990

16. Abedi H, Zachary I Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration 1995

17. Johan Van Lint, Ni YP, Valius M Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase Cγ and protein kinase C 1998

18. [衣为民, 季军, 令文萍 反义寡核苷酸抑制兔血管平滑肌细胞增殖和血小板源性生长因子 \$\beta\$ mRNA 的表达](#) [期刊论文] - [中国介入心脏病学杂志](#) 2004

19. [Lee M, Simon AD, Stein CA Antisense strategies to inhibit restenosis](#) 1999

20. [Reidy MA, Silver M Endothelial regeneration, VII: lack of intimal proliferation of after defined injury to rat aorta](#) 1985

21. [Walker LN, Bowen-pope DF, Ross R Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury](#) 1986

22. [Uchida K, Sasahara M, Morigami N Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries](#) 1996

23. [Calara F, Ameli S, Hultgardh Nilsson A Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells: potential role of FGF and PDGF](#) 1996

24. [Scott NA, Cipolla GD, Ross CE Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries](#) 1996

25. [Millette E, Rauch BH, Detawe O Platelet-derived growth factor-BB-induced human smooth muscle cell proliferation depends on basic FGF release and FGFR-1 activation](#) 2005

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [唐波, 何国祥 TGF- \$\beta\$ 、血管平滑肌细胞与血管成形术后再狭窄 - 重庆医学](#) 2004, 33 (6)
转化生长因子 β (TGF- β) 是一组多功能的多肽类生长因子, 几乎体内的每个细胞都产生 TGF- β 并存在受体. 研究证实 TGF- β 家族的一些成员参与多种疾病的发生. TGF- β 对细胞的增殖与分化、细胞外基质的合成、血管的生成、细胞凋亡均起重要的调节作用. 冠状动脉介入治疗后再狭窄的发生中, 血管平滑肌细胞 (VSMC) 及细胞外基质 (ECM) 的功能异常是最重要的因素之一, TGF- β 在其中的作用渐受关注. 血管成形术后 TGF- β 影响血管平滑肌细胞功能及细胞外基质的代谢, 可能参与再狭窄的发生.

2. 学位论文 [戴强 C-myc 反义寡核苷酸防治 PTCA 术后再狭窄的体外实验研究](#) 1998
目的: 探讨 c-myc 反义寡核苷酸局部给药防治再狭窄的机制, 了解 c-myc 反义寡核苷酸在细胞和分子水平的作用机制. 为此, 该研究 (1) 建立血管平滑肌细胞体外增殖实验模型; (2) 应用标记的 c-myc 反义寡核苷酸, 观察 c-myc 反义寡核苷酸在细胞内的摄入与定位; (3) 观察 c-myc 反义寡核苷酸对细胞增殖, 细胞周期和 c-myc 基因表达的影响等指标标记的反义寡核苷酸探讨 c-myc 反义寡核苷酸对血管平滑肌增殖的抑制作用; (4) 观察 c-myc 反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞凋亡的诱导作用; (5) 利用各管细胞条件培养技术, 进一步观察 c-myc 反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞旁分泌环路调节的影响. 研究小结: PTCA 术后再狭窄是介入性心脏病学的重要课题, 血管平滑肌细胞的增殖和基质分泌是再狭窄发生和发展的中心环节. 许多原癌基因在血管平滑肌细胞增殖中起关键性的调节作用. 因此, 通过局部给药导入反义寡核苷酸, 以抑制血管平滑肌细胞的增殖, 是 PTCA 术后再狭窄防治研究中的重要思路之一. 其中, 针对 c-myc 基因的反义寡核苷酸已被证明可抑制多种正常和肿瘤细胞的增殖. 研究人员的实验结果证明 ① 疏代修饰的 c-myc 反义寡核苷酸在体外培养中可以经胞饮作用进入平滑肌细胞并到达核内; ② 通过物异性封闭平滑肌细胞的 c-myc 基因表达产生明显的增殖抑制作用. 这种抑制作用随剂量和时间的增加而增强; ③ c-myc 反义寡核苷酸可诱导平滑肌细胞凋亡; ④ c-myc 反义寡核苷酸可干扰再狭窄局部增殖型血管平滑肌的旁分泌环路, 抑制平滑肌增殖, 研究人员的实验研究提示: c-myc 反义寡核苷酸在血管壁中抑制血管平滑肌细胞可能存在多个作用途径, 其综合生物学效应均有利于临床上抑制血管平滑肌细胞增殖和防治再狭窄的目的. 因此, c-myc 反义寡核苷酸有望一种有应用前景的局部给药的防治再狭窄基因药物.

3. 期刊论文 [邱志兵, CHEN Xin, 万松, QIU Zhi-Bing, CHEN Xin, WAN Song 猪静脉桥血管重建中平滑肌细胞和成纤维细胞表型转化 - 中国动脉硬化杂志](#) 2008, 16 (7)
目的 动态观察静脉桥再狭窄动物模型中血管平滑肌细胞和外膜成纤维细胞表型转化和增殖活性的变化, 评价血管平滑肌细胞和外膜成纤维细胞表型转化及增殖迁移对血管重塑的影响. 方法 建立猪静脉桥再狭窄模型, 采用血管病理形态学和免疫组织化学方法, 观察术后 7、14 和 30 d 血管重塑及血管壁中增殖细胞核抗原、平滑肌 α 肌动蛋白和骨桥蛋白表达变化. 结果 ① 术后 7 d 新生内膜形成并逐渐增厚, 于术后 30 d 达最大; 内弹力板围绕面积于术后 7 d 逐渐减小, 术后 30 d 管腔面积最小 ($P < 0.05$); 重塑指数和外弹力板围绕面积术后 7 d 稍有增大, 其后不断减小, 术后 14-30 d 明显减小 ($P < 0.05$). ② 增殖细胞核抗原染色发现, 血管外膜成纤维细胞和血管平滑肌细胞增殖指数术后 7 d 显著增加, 术后 14 d 增殖细胞核抗原阳性表达达高峰, 术后 30 d 回到基线水准. ③ 平滑肌 α 肌动蛋白染色发现, 术后 7 d 中膜阳性面积减少, 外膜和内膜中出现阳性表达; 术后 14 d 中膜血管平滑肌细胞阳性表达显著减少, 外膜成纤维细胞和内膜中阳性表达显著增加; 术后 30 d 中膜血管平滑肌细胞阳性表达恢复, 外膜阳性表达较术后 14 d 和 7 d 明显减少, 内膜阳性表达较术后 14 d 变化不明显. ④ 骨桥蛋白染色发现, 术后 7 d 中膜血管平滑肌细胞阳性表达明显; 术后 14 d 中膜血管平滑肌细胞阳性表达较术后 7 d 减少, 而内膜中血管平滑肌细胞阳性表达显著增加且达高峰; 术后 30 d 中膜血管平滑肌细胞有少部分阳性表达, 内膜中血管平滑肌细胞阳性表达较术后 14 d 减少; 外膜在术后各时间点均呈阴性表达. 结论 血管平滑肌细胞和成纤维细胞的表型转化和增殖活性改变对血管重塑起重要作用, 参与并促进了血管桥再狭窄的发生过程.

4. 学位论文 [周晓莉 罗格列酮对血管再狭窄的影响及其机制研究](#) 2006
背景和目的
PCI 术后再狭窄的预防和治疗问题是心血管领域的研究热点和难点. 再狭窄的实质是局部血管损伤后的一种过度修复反应, 其中血管中膜层平滑肌细胞大量增殖并迁移至内膜及随后细胞外基质的积累是再狭窄的关键环节. 本研究旨在探讨 PPAR- γ 的合成型配体罗格列酮对体外血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响; 探讨罗格列酮对球囊损伤大鼠颈动脉再狭窄模型中新生内膜形成的影响, 并进一步分析其可能涉及的分子机制, 为 PCI 术后再狭窄的防治提供一条新的思路.
方法
1. 运用改良组织贴块法进行大鼠主动脉平滑肌细胞原代培养并传代, 综合应用自然纯化、机械刮除、差异贴壁三种方法纯化细胞, 根据细胞形态学特点和 Q-actin 免疫细胞化学染色进行细胞鉴定;
2. 以第五代纯化平滑肌细胞作为实验材料, 分别应用 MTT 法检测细胞增殖活性、流式细胞仪分析细胞周期分布、免疫细胞化学染色法检测细胞核内 PCNA 的表达, 从而从三个方面反应不同浓度 ($1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$) 的罗格列酮对 PDGF-BB 或 bFGF 诱导的平滑肌细胞增殖的影响;

3. 以第五代纯化平滑肌细胞作为实验材料,运用改良Boyden趋化小室测试不同浓度(1~10umol / L)的罗格列酮对PDGF-BB和bFGF诱导的平滑肌细胞迁移的影响;

4. 采用气囊血管内膜剥脱法建立大鼠颈总动脉再狭窄模型,应用免疫组化染色法观察PPAR-γ受体在血管中的表达变化;

5. 建立动物模型后于不同时间点(7d~28d)取材,HE染色,应用病理图象分析软件计算内膜与中膜的厚度比(I / M)、内膜与中膜的面积比(IA / MA),观察罗格列酮(3mg / kg · d,术前7d至术后相应时间点)对血管损伤后新生内膜形成的影响;

6. 建立动物模型后于不同时间点(1d~28d)取材,分别应用RT-PCR法和Western-blot法检测c-Fos、P27kip1、MMP-2、TIMP-2的mRNA和蛋白质的表达,观察这4个指标在血管损伤后不同时间点的动态变化,并探讨罗格列酮对它们表达的影响。

结果

1. 原代培养中约90%的组织块接种存活,培养细胞呈典型的“谷峰状”生长,经平滑肌细胞特异的Q-actin免疫化学染色后,培养细胞的胞浆着色呈阳性反应,5天左右平滑肌细胞纯度达98%以上;

2. PDGF-BB(20ng / ml)或bFGF(20ng / ml)可诱导血管平滑肌细胞的增殖,促进G0 / G1期细胞向S期细胞转化,增加细胞核内PCNA的表达,全部P<0.0001;而应用罗格列酮预处理30~45min后,可明显抑制细胞的增殖,阻止细胞由G0 / G1期向S期转化,抑制核内PCNA的表达,并且在1~10umol / L的浓度范围内,其抑制作用呈明显的剂量依赖关系,全部P<0.0001;

3. PDGF-BB(20ng/ml)或bFGF(20ng/ml)可诱导血管平滑肌细胞的迁移,P<0.0001,而应用罗格列酮预处理30~45min后,可明显抑制细胞的迁移,并且在1~10umol / L的浓度范围内呈明显的剂量依赖关系,全部P<0.0001;

4. 成功建立大鼠左颈总动脉再狭窄模型,正常血管中中层中有少量PPAR-γ受体的表达,血管损伤后其表达增加,新生内膜中也可见大量PPAR-γ的表达;

5. 气囊损伤后7d可见血管内膜增生、新生内膜形成,随着时间的延长(7d~28d),内膜增生更加明显,后时间点的I / M值和IA / MA值较前时间点组显著增加,全部P<0.0001;罗格列酮(3mg / kg · d)能够抑制气囊损伤后血管内膜的增生、新生内膜形成,所有对应时间点上,各给药组的I / M和IA / MA值较未给药组均有显著减少,全部P<0.0001;

6. ①血管损伤后c-Fos的mRNA和蛋白质的表达呈一个动态变化过程,二者的趋势基本一致。正常血管(假手术组)中c-Fos的表达很少,损伤1d后表达开始增加,7d左右达高峰,7d后降至最低点,7d后表达逐渐下降,所有P<0.0001,而术后28d组的比值较对照组仍有升高,P<0.05;罗格列酮处理后对假手术组c-Fos的Mrna和蛋白质的表达影响不大,P=0.9363(Mrna)、P=0.9343(蛋白质),但可明显下调血管损伤后c-Fos的表达,在相对应的时间点上,罗格列酮各处理组的OD比值较未给药组明显降低,P<0.0001;

②血管损伤后P27kip1的Mrna和蛋白质的表达呈一个动态变化过程,二者的趋势基本一致。正常血管(假手术组)中本身就存在P27kip1的基础表达,损伤1d后表达开始下降,7d后降至最低点,损伤后14d至28d,P27kip1的表达逐渐上升,但较对照组仍有明显降低,所有P<0.0001;罗格列酮处理后可明显上调假手术组和各血管损伤组的P27kip1的Mrna和蛋白质的表达,在相对应的时间点上,罗格列酮各处理组的OD比值较未给药组明显增加,P<0.0001;

③血管损伤后MMP-2的Mrna和蛋白质的表达呈一个动态变化过程,二者的趋势基本一致。正常血管(假手术组)中有少量MMP-2的表达,损伤1d后表达升高,7d左右达高峰,损伤后14d至21d,MMP-2的表达逐渐下降,但较对照组仍有明显升高,所有P<0.0001;而损伤后28d组Mrna的表达与对照组相比反而降低,P<0.001,蛋白质的表达较对照组仍有升高,P<0.05;罗格列酮处理后可明显下调假手术组和各血管损伤组的MMP-2的Mrna和蛋白质的表达,在相对应的时间点上,罗格列酮各处理组的OD比值较未给药组明显降低,所有P<0.01;

④血管损伤后TIMP-2的Mrna和蛋白质的表达呈一个动态变化过程,二者的趋势基本一致。正常血管(假手术组)中有少量TIMP-2的表达,损伤1d后表达略有升高,其中Mrna的比值与假手术组相比无明显差异,P=0.1052,而蛋白质的OD比值较假手术组增加,P<0.0001;损伤4d后表达继续升高,7d左右达高峰,损伤后14d至28d,TIMP-2的表达逐渐下降,但较对照组仍有明显升高,所有P<0.0001;其中28d组与21d组相比,仅略有下降,28d组Mrna的OD比值与21d组相比无明显差异,P=0.1709,而蛋白质的OD比值较21d组减少,P<0.0001;罗格列酮处理后对假手术组和各血管损伤组的TIMP-2的Mrna和蛋白质的表达无明显影响,P=0.0679(Mrna)、P=0.2504(蛋白质)。

结论

1. 罗格列酮能够在体外抑制PDGF-BB或Bfgf诱导的血管平滑肌细胞的增殖,阻止细胞由G0 / G1期向S期的转化,抑制细胞核内PCNA的表达,并且在1~10umol / L的浓度范围内呈明显的剂量依赖关系。

2. 罗格列酮能够在体外抑制PDGF-BB或Bfgf诱导的血管平滑肌细胞的迁移,并且在1~10umol / L的浓度范围内呈明显的剂量依赖关系。

3. 罗格列酮(3mg / kg · d)能够抑制大鼠颈总动脉粥样硬化损伤后新生内膜的形成,减轻再狭窄的发生。其涉及的分子机制可能是:血管损伤后PPAR-γ的表达增加,PPAR-γ与配体罗格列酮结合后被激活,参与调控c-Fos、P27kip、MMP-2等多种靶基因的转录表达,使c-Fos的表达减少,P27kip1的表达上调,从而阻止细胞由G1期向S期转化,抑制平滑肌细胞的增殖;同时使MMP-2的表达下调,MMP-2 / TIMP-2的比值降低,使ECM降解减少,从而抑制平滑肌细胞的迁移。

5. 期刊论文 [索伟.郭燕梅.高月明.肖红雨.SUO Wei.GUO Yan-mei.GAO Yue-ming.XIAO Hong-yu 脉冲磁场对颈动脉内膜切除术后再狭窄及血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达的影响-中华物理医学与康复杂志2010,32\(3\)](#)

目的 观察不同强度脉冲磁场对颈动脉粥样硬化家兔模型颈动脉内膜切除术(CEA)后再狭窄(CRS)及血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达的影响.方法 家兔50只,使用干燥气体损伤结合高脂饲料喂养,制作家兔颈动脉粥样硬化模型.高脂饲料喂养2个月后进行CEA手术.术后将实验动物分为对照组和2个治疗组(0.6 T治疗组和1.0 T治疗组).2个治疗组分别采用磁感应强度为0.6 T和1.0 T的脉冲电磁场进行治疗.CEA术后1,2及3个月对病变血管进行组织形态学分析,并使用免疫组化方法 观察血管平滑肌细胞MMP-2表达的变化.结果 组织形态学分析示,CEA术后,0.6 T治疗组和1.0 T治疗组在总管腔面积、斑块面积、斑块厚度和狭窄程度方面均低于对照组(P<0.05),且1.0 T治疗组较0.6 T治疗组降低程度更显著;术后2~3个月,0.6 T治疗组和1.0 T治疗组MMP-2的表达水平低于对照组(P<0.01),1.0 T治疗组表达水平低于0.6 T治疗组(P<0.05).结论 较强强度脉冲磁场能抑制CEA术后再狭窄颈动脉内膜MMP-2的表达,MMP-2表达的降低可能是脉冲磁场防治CEA术后CRS的机制之一.

6. 学位论文 [杨东伟 白藜芦醇对球囊损伤血管PAPP-A表达影响及机制研究 2009](#)

第一章:PAPP-A在大鼠颈动脉球囊损伤后的表达及白藜芦醇干预作用

目的:制作大鼠颈动脉球囊损伤模型,观察大鼠颈总动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞(VSMCs)增生反应,血浆TNF-α水平的改变,血管壁表达PAPP-A水平及其与血管内膜增厚的关系,以及白藜芦醇(Resveratrol, Res)对其的影响,为临床血管成形术后再狭窄的预防和治疗提供新的思路。

方法:72只Wistar大鼠随机分为假手术组(shame group),手术组(operation group)和干预组(intervention group),每组各24只。干预组于手术前一周及术后灌胃白藜芦醇50mg/kg/天,余两组用等量生理盐水。采用颈中切口,假手术组单行血管分离,手术组及干预组行颈总动脉球囊损伤术。术后1、7和14天,每组各处死大鼠8只。经左室抽血5ml,静止后离心3000转/分,10min,离心后获得的血浆置于-20℃冰箱备用。随后剪开右心室,经左心室用4%多聚甲醛灌注,采用颈中切口取出左颈总动脉1.5cm左右,放入4%甲醛液中固定24小时,常规制成蜡块;拟行RT-PCR颈动脉标本直接获取后迅速放入冻存管中,转移到液氮中保存备用。观察颈总动脉形态学变化并进行形态学参数测量:外、内弹力板包绕面积、管腔面积,中膜面积并计算新生内膜面积、新生内膜面积/中膜面积比值(IA/MA)、及管腔狭窄指数(管腔面积/内弹力板包绕面积),并进行统计学分析;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆TNF-α水平,免疫组织化学检测血管壁增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测血管管壁中妊娠相关血浆蛋白-A(PAPP-A)的表达水平。

结果:

1.1天时,光镜下假手术组血管内皮细胞和内弹力板完整,手术组及干预组血管内皮细胞消失,有时内弹力板撕裂。7天时时,手术组及干预组可见明显的内膜增生,增生的血管平滑肌细胞排列比较紊乱,进入管腔,使管腔面积减小;14d时,手术组及干预组内膜增生进一步加重,程度不一,增生细胞排列明显紊乱,使管腔明显狭窄。

2.血管形态学参数的结果:与假手术组比手术组和干预组7和14d时,外、内弹力板包绕面积,中膜面积无显著差异(P>0.05)。管腔面积、IA/MA、管腔狭窄指数有显著改变(P<0.01);7天及14天时与手术组比较,干预组管腔面积(LA)扩大(P<0.01),新生内膜面积/中膜面积(IA/MA)显著减小,管腔狭窄指标显著减小(P<0.01);

3.血浆TNF-α水平:对照组血浆中TNF-α在1天、7天及14天时间的变化差异性不显著,无统计学意义(P>0.05)。手术组血浆中TNF-α在1天时刻达高峰(P<0.01),7天时有显著降低,但仍然较对照组明显升高(P<0.01),14天时恢复正常水平;干预组血浆中TNF-α水平在1天时显著升高,但较手术组显著降低(P<0.01),7天时较手术组显著降低(P<0.01),和正常组无显著差异(P>0.05)。14天时,血浆TNF-α水平较7天时进一步降低

($P=0.025$)和正常水平无显著区别($P>0.05$)。

4. 血管壁PCNA表达:假手术组血管内膜未见明显PCNA阳性表达,中膜可见少量表达,手术组与药物治疗组中1d中膜可见少量PCNA表达,7d时血管中膜、新生内膜可见大量表达,手术组较干预组显著增多($P<0.01$);14d时两组中膜、新生内膜表达减少;与手术组比较干预组PCNA阳性表达较手术组显著减少($P<0.01$)。

5. 血管壁PAPP-A mRNA的表达:假手术组低水平表达PAPP-A mRNA,损伤7d后,手术组PAPP-A mRNA有明显表达且较干预组显著升高(23.63 ± 0.49 VS 12.88 ± 0.43 , $P<0.01$),损伤14d后手术组及干预组血管壁中PAPP-AmRNA表达量进一步增加,与药物治疗组比较手术组的PAPP-AmRNA表达量显著升高(42.62 ± 0.59 VS 29.69 ± 0.36 , $P<0.01$)。

结论:

1. 单纯球囊拉伤建立大鼠颈总动脉内膜增生模型方便、可靠。
2. 血浆中TNF- α 、血管壁组织PAPP-AmRNA,PCNA在球囊损伤后2周内血管壁有-显著表达,在急性损伤期内的水平与血管壁的增生程度相关。
3. 白藜芦醇能显著降低血浆TNF- α 水平,抑制血管壁PAPP-AmRNA,PCNA的表达、能减轻新生血管内膜的增生,扩大管腔面积。

第二章:TNF- α 对VSMCs PAPP-A表达、细胞周期影响及白藜芦醇干预作用

目的:采用复合胶原酶解法进行大鼠胸主动脉平滑肌细胞的原代培养,为心血管疾病血管平滑肌细胞的体外研究提供简单,高纯度的原代细胞培养方法;观察肿瘤坏死因子- α (TNF- α)对大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)妊娠相关蛋白-A(PAPP-A)mRNA的表达、细胞周期及增殖活力的影响,及白藜芦醇(Res)的干预作用,探讨白藜芦醇抗血管平滑肌增殖的可能作用机制。为临床研究抗血管成形后再狭窄的治疗靶点选择提供理论依据。

方法:采用Wistar大鼠腹主动脉,利用复合胶原酶解法进行大鼠胸主动脉平滑肌细胞的原代培养,利用细胞形态学及平滑肌细胞 α -actin染色,鉴定血管平滑肌细胞的纯度;将细胞传代到4~6代后行干预实验:(一)1)将细胞分组:空白对照组单纯给予10%的DMEM培养基;TNF- α 刺激组TNF- α 刺激组以10ng/mL浓度刺激1、4、8、24h,2)将细胞分组:空白对照组单纯给予10%的DMEM培养基;TNF- α 刺激组以10~1,100,101,102 ng/mL浓度的TNF- α 刺激VSMCs8h。观察不同浓度的TNF- α 对PAPP-A mRNA表达的影响。3)将细胞分组:空白对照组单纯给予10%的DMEM培养基;TNF- α 刺激组以10ng/mL的TNF- α 浓度刺激;白藜芦醇干预组用不同浓度(10~8~10 $^{-4}$ mol/L)的白藜芦醇预处理6h后,再用10 ng/mL TNF- α 刺激8h。观察白藜芦醇对TNF- α 诱导血管平滑肌细胞PAPP-AmRNA表达的影响。(二)1)将细胞分为空白对照组、TNF- α 刺激组(10~1~10210ng/mL)、白藜芦醇组(10~8~10 $^{-4}$ mol/L)、白藜芦醇干预组(10~8~10 $^{-4}$ mol/LRes+10ngTNF- α)作用24h,观察TNF- α 、Res对血管平滑肌细胞细胞周期的影响及白藜芦醇对TNF- α 影响细胞周期的干预作用。(三)将细胞分为空白对照组、TNF- α 刺激组及白藜芦醇干预组(10~8~10 $^{-4}$ mol/LRes+10ng/mL TNF- α)作用4天,MMT法检测细胞的增殖活力,观察TNF- α 对细胞增殖活力的影响及白藜芦醇的干预作用。

结果:

1. 0.2% I型胶原酶和0.2% II型胶原酶混合能充分裂解动脉血管,细胞受损伤较轻,接种成功率高;一周左右细胞就能生长到进行细胞传代的亚融合状态。再次进行传代的时间大约是3~5天。传代后大约90%的细胞可重新贴壁生长。传代后的细胞更多的表现为“峰-谷”样生长方式;第3代爬片SMC的免疫组化显示血管平滑肌的纯度可达到96%以上。
2. 在不同时间段内TNF- α 对血管平滑肌细胞表达PAPP-AmRNA的影响:血管平滑肌细胞在1h时PAPP-AmRNA即有显著增加($P<0.01$),在8小时PAPP-AmRNA表达量达到高峰,并与各组间亦有显著差异($P<0.01$)。
3. 不同浓度的TNF- α 对血管平滑肌细胞表达PAPP-AmRNA表达的影响:基础状态下,血管平滑肌细胞PAPP-AmRNA无明显表达,在10~1ng/mL时PAPP-AmRNA显著表达($P=0.016$),并呈剂量依赖性表达增加,并在10ng/mL达到高峰,组间比亦有显著差异($P<0.01$)。
4. 白藜芦醇对TNF- α 影响平滑肌细胞PAPP-AmRNA表达的干预实验:在10~8mol/L浓度时对TNF- α 诱导的血管平滑肌PAPP-A的表达无显著影响($P=0.148$),在10~6、10~4mol/L浓度范围内,白藜芦醇浓度依赖性的显著抑制TNF- α 诱导的血管平滑肌PAPP-AmRNA的表达($P<0.01$)。
5. 不同浓度的TNF- α 对血管平滑肌细胞周期的作用:10~1ng/mL浓度的TNF- α 对细胞周期无显著影响,与空白组比较($P>0.05$);在100~102ng/mL的浓度范围内TNF- α 使细胞S期、G2/M期数目百分比增加,G0/G1期数目百分比降低,与空白组比较有显著性差异($P<0.01$),并在TNF- α 10ng/mL时达到最高。

结论:

1. 复合胶原酶解法进行大鼠胸主动脉平滑肌细胞的原代培养是一种简单,高纯度的原代细胞培养方法。
2. TNF- α 呈时间、浓度依赖性的刺激血管平滑肌细胞PAPP-AmRNA表达增加;在一定浓度范围内白藜芦醇能显著抑制TNF- α 刺激血管平滑肌细胞PAPP-AmRNA表达增加。
3. TNF- α 呈时间、浓度依赖性的刺激血管平滑肌细胞进入分裂、增殖(S,G2/M)期的数目增多,静止期G0/G1期细胞数目减少,增加细胞的增殖活力;在一定浓度范围内白藜芦醇能显著抑制平滑肌细胞进入S、G2/M期的细胞数,G0/G1期细胞数显著增多,同时抑制细胞的增殖能力。

7. 期刊论文 [陈丽, 邓勇志, Chen Li, Deng Yong-zhi SM22 \$\alpha\$ 启动子及增强子应用于冠状动脉旁路移植血管防治再狭窄的效应 -中国组织工程研究与临床康复2010, 14\(5\)](#)

背景:大隐静脉是冠状动脉旁路移植术最常用的血管材料,但移植血管新生内膜增生和随后发生的粥样硬化所致的移植血管狭窄严重影响远期疗效。目的:综合分析移植血管狭窄的病理生理及其机制,平滑肌细胞特异性SM22 α 启动子、SMHC增强子的构建和应用等。方法:以SM22 α promoter, SMHC enhancer, stenosis, Pi3K, RNaI/RNA interference为检索词,检索PubMed数据库、HighWire数据库和CNKI数据库(1981-01/2009-10)。文献检索语种限制为英文和中文。纳入与移植血管狭窄,血管平滑肌特异性SM22 α 启动子及其增强子相关的文献。排除综述文献,重复研究类文献。以血管平滑肌细胞的增殖和凋亡,移植血管新生内膜的增生情况,以及移植血管血栓形成的程度为评价指标。结果与结论:计算机初得到8730篇文献,根据纳入排除标准,对SM22 α 启动子及移植血管狭窄进行分析。冠状动脉旁路移植后新生内膜增生和血栓形成严重影响远期疗效。PI3K-Akt-mTOR信号通路是调节细胞增殖、迁移和生存的关键通路。局部shRNA干扰靶向沉默Pik3cb可下调PI3K信号通路,有效防治移植血管新生内膜增生。采用血管平滑肌细胞特异性SM22 α 启动子构建靶向大鼠Pik3cb基因的干扰RNA真核表达载体,既可抑制新生内膜增生,又可防治血栓的形成。利用血管平滑肌细胞特异性的SM22 α 基因,将SM22 α 启动子/增强子应用于移植血管,为防治移植血管狭窄和血栓形成提供新的思路。

8. 学位论文 [陈星 雷公藤对动脉损伤后血管平滑肌细胞过度增殖抑制的实验研究 1997](#)

经皮冠脉成形术后30~40%的再狭窄率是制约该项技术进一步发展的重要因素,目前许多研究已证实,动脉损伤诱发的血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖是再狭窄形成的主要病理特征,同时伴有损伤处的炎症反应即炎性和免疫细胞的浸润。雷公藤在中国做为药用已有几十年的历史,该药物具有抑制免疫、抗炎及抑制肿瘤等功效,这些为将该药物用于防治再狭窄形成的病理过程提供了理论依据。该研究首先将雷公藤多甙用于不同种属动物(新西兰兔与大鼠)的实验性动脉损伤模型,通过常规病理切片染色和包括Masson、天狼星红-苦味酸胶原纤维特殊染色,免疫组织化学染色观察,雷公藤用药组动脉管腔明显大于非用药组($P<0.05$)、同时管壁的内膜与中膜面积明显小于非用药组($P<0.01$, $p<0.05$);并且管壁VSMC数目和胶原纤维分布也明显地少于非用药组。通过细胞学和分子生物学实验进一步探讨了雷公藤抑制VSMC增殖的可能途径。

9. 期刊论文 [田泽君, 叶丹, 汪家瑞, Tian Zejun, Ye Dan, Wang Jiarui HSV-tk基因对实验性血管成形后再狭窄的抑制作用 -首都医科大学学报1999, 20\(2\)](#)

为探讨转染单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因联合ganciclovir(GCV)治疗方案用于治疗冠状动脉成形后再狭窄的可行性,构建了携带HSV-tk基因的复制缺陷型逆转录病毒,利用该病毒将HSV-tk基因转染至体外培养的血管平滑肌细胞(VSMC)和大鼠腹主动脉再狭窄模型的损伤动脉中,并均给予GCV,分别观察上述处理对VSMC的增殖和新生内膜的形成是否有抑制作用。结果:该方案使培养的VSMC增殖受抑制,抑制程度对GCV有剂量依赖关系;既往在恶性肿瘤中发现的旁观者效应,在培养的VSMC中也存在。同时,该方案使大鼠腹主动脉再狭窄模型的新生内膜面积减少,但单纯转染HSV-tk基因或单纯应用GCV无论在体外还是在体内均无上述抑制作用。提示本基因治疗方案对人类冠脉成形后再狭窄有治疗价值。

10. 期刊论文 [王志刚, 雷泽华, 时德, 乔正荣, WANG Zhi-gang, LEI Ze-hua, SHI De, QIAO Zheng-rong 低强度微波辐射对兔颅外动脉损伤后再狭窄的影响 -中国普外基础与临床杂志2005, 12\(6\)](#)

目的探讨低强度微波(LIM)辐射对血管再狭窄病理过程的影响,以评价LIM辐射防治再狭窄的可能性。方法健康雄性新西兰大白兔48只,随机分为2组。应用Fogarty导管损伤兔颅外动脉(EIA)内膜,建立再狭窄动物模型。辐射组采用2450 MHz微波,功率分别为2、5和10 mW/cm²,局部照射EIA(1 h/d)。分别于术

后3、7、14及28 d 取材.采用HE和EF染色,观察EIA形态学改变及内膜面积、中膜面积及管腔狭窄率;TUNEL标记法检测细胞凋亡;TEM观察血管平滑肌细胞(VSMC)表型及超微结构.结果 LIM微波辐射后,再狭窄早期炎症反应受到抑制,附壁血栓减少,各时间点VSMC的增殖、迁移被抑制,内膜面积和管腔狭窄率显著低于对照组($P<0.01$).细胞凋亡率在术后3 d各组间差异无统计学意义($P>0.05$),其余时间点,辐射组显著高于对照组($P<0.01$),其中5 mW/cm²者细胞凋亡率明显高于其他各组($P<0.01$).TEM观察到对照组大量合成型VSMC术后14 d达(93.50±3.45)%,辐射组VSMC以收缩型为主,大量成纤维细胞和IVSMC呈凋亡的形态学改变.结论 LIM辐射能显著抑制再狭窄病理过程中的早期炎症反应和VSMC的增殖、迁移,促进细胞凋亡,有效抑制再狭窄的发生、发展.LIM辐射存在量效关系和功率窗效应,功率强度为5 mW/cm²时对再狭窄的效应最强.

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200602011.aspx

授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: 9f6ca671-e05e-4070-81ba-9e1f00007945

下载时间: 2010年10月30日