

·实验研究 Experimental research·

小肠黏膜下层促进经皮血管腔内支架植入术后内皮化的实验研究

李景雷, 王晓白, 乔宏宇, 张红, 张艳, 洪晓涛

【摘要】 目的 探讨小肠黏膜下层 (SIS) 促进支架表面内皮化在预防经皮血管腔内支架植入术 (PTS) 后再狭窄的价值。方法 14 头猪经颈动脉球囊过度扩张双侧髂动脉后, 随机选取一侧髂动脉植入裸支架 (bare stent, BS), 对侧髂动脉植入 SIS 覆膜支架 (SCS)。于 4、8、12 周分别对 4、5、5 头猪进行造影复查, 并处死, 对支架段标本行病理组织学及扫描电镜观察。结果 14 头猪 (28 支髂动脉) 共成功植入 14 枚 BS 及 14 枚 SCS 支架。复查造影示, 8 周时 SCS 组和 BS 组各有 1 支动脉闭塞, 其余 26 枚支架均通畅, 4、8、12 周时 SCS 组再狭窄率与 BS 组比较差异均无统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组化示 4、8、12 周时 SCS 组增殖细胞核抗原阳性细胞平均百分率均明显低于 BS 组 ($P < 0.05$); 电镜见 SCS 组新生内膜内皮细胞数均高于 BS 组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 SIS 具有促进内皮细胞再生及支架表面内皮化的作用, 可间接抑制血管平滑肌细胞增殖, 并促进成型平滑肌细胞向收缩型转变的作用。

【关键词】 再狭窄; 小肠黏膜下层; 内皮细胞; 经皮血管腔内支架植入术; 动物实验

中图分类号: R543.5 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X (2013)-05-0403-06

The promotion effect of small intestinal submucous layer on the endothelial regeneration of percutaneously-inserted stent surface; an experimental study in swine Li Jing-lei, WANG Xiao-bai, QIAO Hong-yu, ZHANG Hong, ZHANG Yan, HONG Xiao-tao. Department of Radiology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: WANG Xiao-bai, E-mail: xiaobaiwang@163.com

【Abstract】 Objective To explore the promotion effect of small intestinal submucosa (SIS) on the endothelial regeneration of vascular stent surface that was percutaneously-inserted in experimental swine, and to discuss its clinical value in preventing restenosis of the stent. **Methods** Fourteen domestic swine were used for this study. Via the carotid access the bilateral iliac arterial catheterization was performed in all animals. After excessive balloon dilatation of bilateral iliac arteries, bare stent (BS) was implanted in randomly-selected one iliac artery, while SIS-eluting stent was placed in the iliac artery on the opposite side. The animals were separately re-examined with angiography at 4 weeks ($n = 4$), 8 weeks ($n = 5$) and 12 weeks ($n = 5$) after the treatment. After the angiography the animals were sacrificed. The specimens carrying stent were collected and sent for histopathological and electron-microscopic studies. The results were analyzed and compared between the SIS-eluting stent group and the BS group. **Results** Implantation of 14 SIS-eluting stents and 14 BS stents was successfully accomplished in 28 iliac arteries of the 14 pigs. Follow-up angiography showed that one iliac artery was occluded in both SIS-eluting stent group and BS group at 8 weeks after the treatment, and all the remaining 26 stents were patent. At 4, 8 and 12 weeks after the treatment, no statistically significant difference in restenosis rate existed between the SIS-eluting stent group and the BS group ($P > 0.05$). Immunohistochemistry study revealed that mean percentage of the cells with positive proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of the SIS-eluting stent group at 4, 8 and 12 weeks after

the treatment was significantly lower than that of the BS group ($P < 0.05$). Electron-microscopic study revealed that the number of intimal endothelial cells of the SIS-eluting stent group was significantly larger than that of the BS group

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.05.013

作者单位: 510080 广东省人民医院放射科 广东省医学科学院(李景雷);暨南大学附属第一医院介入与血管科(王晓白、乔宏宇、张红、张艳、洪晓涛)

通信作者: 王晓白 E-mail: xiaobaiwang@163.com

($P < 0.05$). **Conclusion** SIS does have the function of promoting the regeneration of endothelium as well as speeding up the endothelialization of stent surface. It can indirectly inhibit the proliferation of vessel smooth muscle cells and promote the transformation of synthetic smooth muscle cells to contractive ones. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 403-408)

【Key words】 restenosis; small intestinal submucosa; endothelial cell; percutaneous endovascular stent implantation; animal experiment

经皮血管腔内支架植入术(percutaneous transluminal stenting,PTS) 是治疗血管狭窄和闭塞的常用方法之一,但术后支架内再狭窄(restenosis,RS)影响其远期疗效,并制约其临床应用。目前,尽管药物洗脱支架因释放抗血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)增生药物而显著降低RS率,但其同时可抑制内皮细胞(endothelial cell,EC)增生而延长支架表面内皮化,晚期血栓发生率较高,并增加死亡和心肌梗死等不良反应^[1-4]。因此,如何解决RS仍是心血管疾病研究的热点和方向之一。本研究利用小肠黏膜下层(small intestinal submucosa,SIS)促进EC再生的作用,在普通家猪髂动脉建立RS模型,通过病理组织学研究SIS促进PTS术后支架表面内皮化、降低RS的生物学效应,为临床防治RS提供实验依据及理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及材料

3月龄健康长白系普通家猪14头,雌雄各半,购自广州市白云新市石马实验动物场,体重25~28kg,平均 (26.9 ± 1.0) kg。6~30mm单丝编织网络型镍钛记忆合金支架裸支架(bare stent,BS)由北京市有研亿金新材料股份有限公司提供。猪SIS由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室提供。将干燥SIS剪成20mm×30mm块覆于6~30mmBS外面,SIS光滑面面向支架腔内,用10/0血管缝合线将SIS间断缝合并固定在支架上,其中一端固定,另一端开放不固定,支架两端无裸露区,即SIS覆膜支架(SIS covered stent,SCS,图1)。将14枚BS和SCS手工放入9F输送器内行气体消毒。

1.2 实验方法

1.2.1 建立模型 ① 采用氯胺酮(200mg)、地西洋(20mg)、阿托品(1.0mg)及3%戊巴比妥钠(初次剂量5ml,视麻醉状态加量,每次3ml,总量不超过20~30mg/kg)联合麻醉,肌内注射头孢唑林2.0g预防感染,经耳缘静脉给予肝素5000u行肝素化。



图1 SCS覆膜支架(左)和BS支架(右)

② 外科分离右颈内动脉,直视下穿刺、置入4F造影导管行双侧髂动脉造影并测量髂动脉直径;随机选取一侧髂动脉,采用6~40mm球囊过度扩张(手推对比剂,压力10~12atm,每次持续10s,扩张2次)后植入6~30mmBS或SCS。③ 对侧髂动脉重复上述步骤植入SCS或BS,并再次造影观察支架位置及通畅情况。④ 术毕结扎颈动脉穿刺点远、近端,关闭切口,肌内注射先锋V2.0g,不予预防性抗凝药物。

1.2.2 复查造影 分别于术后4、8和12周分别对4、5和5头猪复查造影,观察支架位置及通畅情况,利用DSA机(LCV-PLUS,GE)软件测量血管直径及RS率。

1.2.3 病理标本制作 所有实验动物复查造影后采用过量戊巴比妥钠(50mg/kg)处死。外科分离并获取支架段髂动脉标本(包括两端正常血管各2cm),肝素盐水冲洗干净后,用剪刀快速将标本分为7部分(图2),肉眼观察后分别放入2.5%戊二醛溶液和4%甲醛溶液中固定后分别行扫描电镜(SEM)及病理组织形态学(HE及免疫组化染色)观察。



注:②~⑥为支架部分;①、⑦为正常血管部分;①、②、④、⑥、⑦为光镜观察;③、⑤为电镜观察

图 2 血管标本模式图

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。测得值以均数 ± 标准差表示。各时间点、实验组与对照组之间相关变量值行两独立样本 *t* 检验或单因素方差分析。以 α = 0.05 为显著性水准。

2 结果

2.1 模型建立

14 头普通家猪 28 支髂动脉成功植入 28 枚支

架(BS 和 SCS 支架各 14 枚),技术成功率为 100%;术后造影无一头发生急性闭塞,SCS 组 SIS 铺展良好。饲养过程中所有动物饮食、活动正常,无一头死亡。

2.2 复查造影

28 枚支架无一移位,8 周时,BS 组和 SCS 组各有 1 支动脉闭塞,其余 26 支动脉均通畅。各时间点 BS 组和 SCS 组支架内 RS 率见表 1(不含闭塞标本,以下相同)。4、8、12 周时,SCS 组平均腔内直径均低于 BS 组,RS 率均略高于 BS 组,但组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。随时间延长,BS 组及 SCS 组 RS 率均增加,但 4、8 和 12 周时,组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 BS 组和 SCS 组支架内平均直径与再狭窄率 (x̄ ± s)

组别	4 周(n = 4)		8 周(n = 4)		12 周(n = 5)		平均 RS(%)
	直径(mm)	RS(%)	直径(mm)	RS(%)	直径(mm)	RS(%)	
BS	4.0 ± 0.2	7.8 ± 3.0	3.7 ± 0.1	18.0 ± 1.8	3.3 ± 0.4	24.8 ± 4.5	17.5 ± 8.0
SCS	3.8 ± 0.1	11.8 ± 2.8	3.5 ± 0.2	24.3 ± 4.9	3.1 ± 0.3	31.8 ± 8.0	23.3 ± 10.2
<i>P</i> 值	0.114	0.096	0.166	0.053	0.411	0.126	0.117

注:RS = 再狭窄率

2.3 大体标本

8 周时,SCS 和 BS 组各有 1 支动脉闭塞,支架内充满白色新生组织,但 SCS 组支架内新生组织较 BS 组疏松。其余 26 枚支架段血管壁增厚,弹性及顺应性下降,腔内面均覆盖一层白色新生内膜,其表面光滑、完整,无断裂及脱落,无附壁血栓,支架段血管与正常血管间交界明显。BS 组及 SCS 组新生内膜情况及支架轮廓见表 2。

表 2 BS 组和 SCS 组大体标本比较(不含闭塞标本)

组别	4 周		8 周		12 周	
	NI 颜色	NI 厚度	支架轮廓	NI 颜色	NI 厚度	支架轮廓
BS	淡黄色	较厚	模糊	灰白色	厚	不可见
SCS	白色	薄而透亮	清晰	白色	厚	隐约可见

注:NI = 新生内膜

2.4 病理学检测结果

2.4.1 HE 染色 8 周时 SCS 和 BS 组各有 1 支动脉闭塞,支架内新生组织与血管壁组织界限不清,主要由 VSMC、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、新生毛细血管以及炎症细胞等组成。其余 26 份标本,支架腔内面均覆盖新生内膜,其中 1 枚 BS、2 枚 SCS 腔内新生内膜呈偏心性增生,横断面呈椭圆形;其余标本同心性增生,横断面呈圆形(图 3)。新生内膜主要为单层 EC、VSMC、ECM 以及散在的单核-巨噬细胞等炎症细胞。

2.4.2 免疫组化法检测增殖细胞核抗原(PCNA) VSMC 细胞核内出现棕黄色颗粒状或弥

漫性着色,胞质无着色,即 PCNA 染色阳性。本实验所有标本新生内膜中均有部分 VSMC 染色阳性,且阳性细胞分布不均匀,VSMC 层中阳性细胞数少,形态趋向“纺锤形”或“长梭形”,其占同类细胞数比例较低;ECM 层阳性细胞杂乱分布,但阳性细胞数占同类细胞的比例较细胞层高;4、8 和 12 周时,SCS 组计数每高倍镜下(× 400)PCNA 阳性细胞占同类细胞的平均百分率均明显低于 BS 组(*P* < 0.05,表 3),且排列较一致、规整,成熟度较高(图 4)。单因素方差分析(*q* 检验)示 4、8、12 周时,SCS 组与 BS 组相比,差异无统计学意义(*P* = 0.062);而 BS 组 8 周时 PCNA 阳性细胞占同类细胞的百分率明显高于 4、12 周时,差异有统计学意义(*P* = 0.008),但 12 周与 4 周相比差异无统计学意义(*P* = 0.861)。

2.5 电镜观察结果

26 枚支架新生内膜表面 EC 覆盖完全,无裸露区及 EC 脱落和附壁血栓。SCS 组 EC 排列较 BS 组规整、紧密,排列方向较 BS 组更接近血流方向,细胞间隙较 BS 组小;另外 SCS 组 EC 形态、大小相对一致,较 BS 组接近正常 EC,EC 核较 BS 组细胞核圆隆、饱满。计数每 4 000 倍视野下单位面积新生内膜表面 EC 数,4、8 和 12 周时 SCS 组均明显高于 BS 组(*P* < 0.05),见表 4 和图 5。

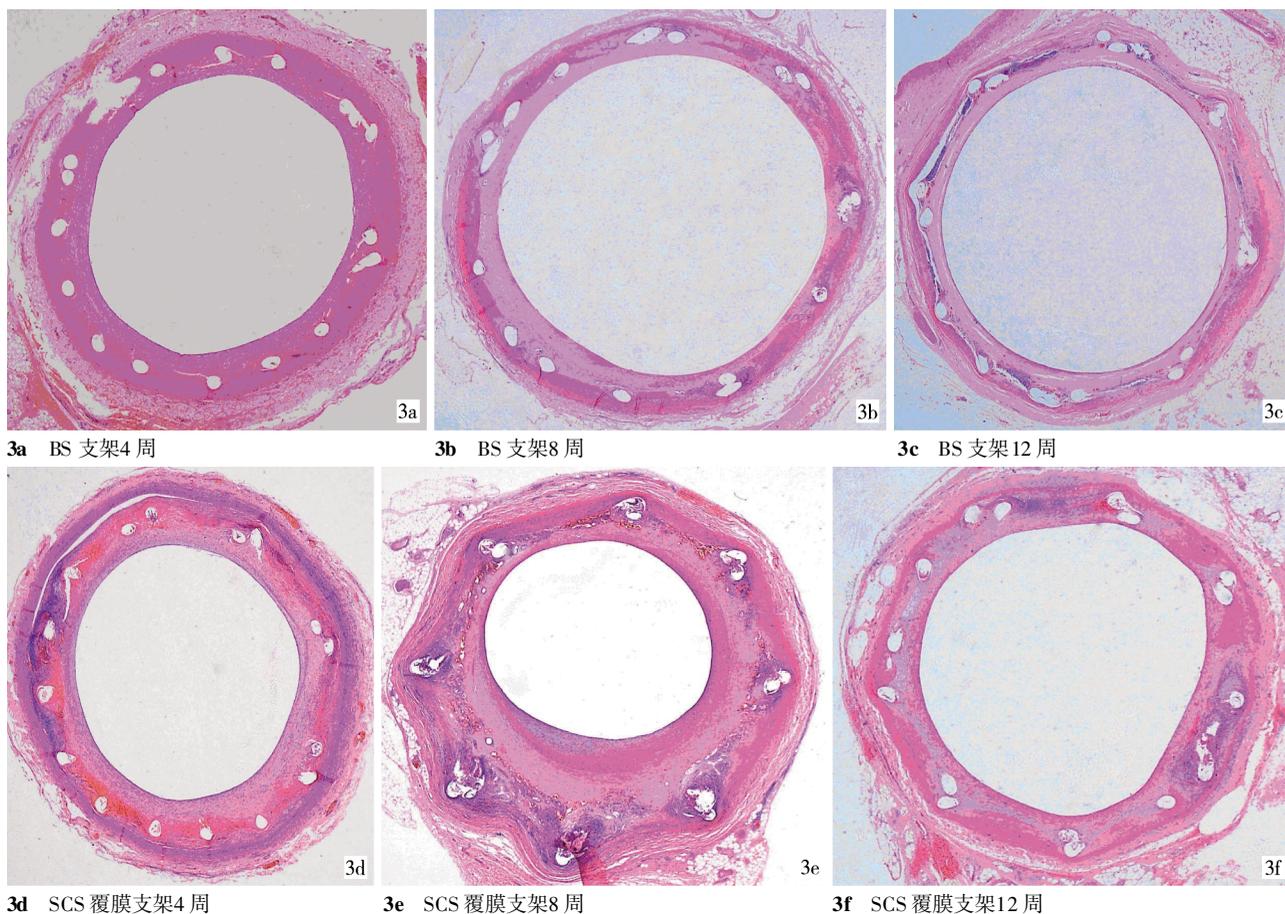


图 3 支架腔内面覆盖新生内膜(HE, 1.5 × 10)

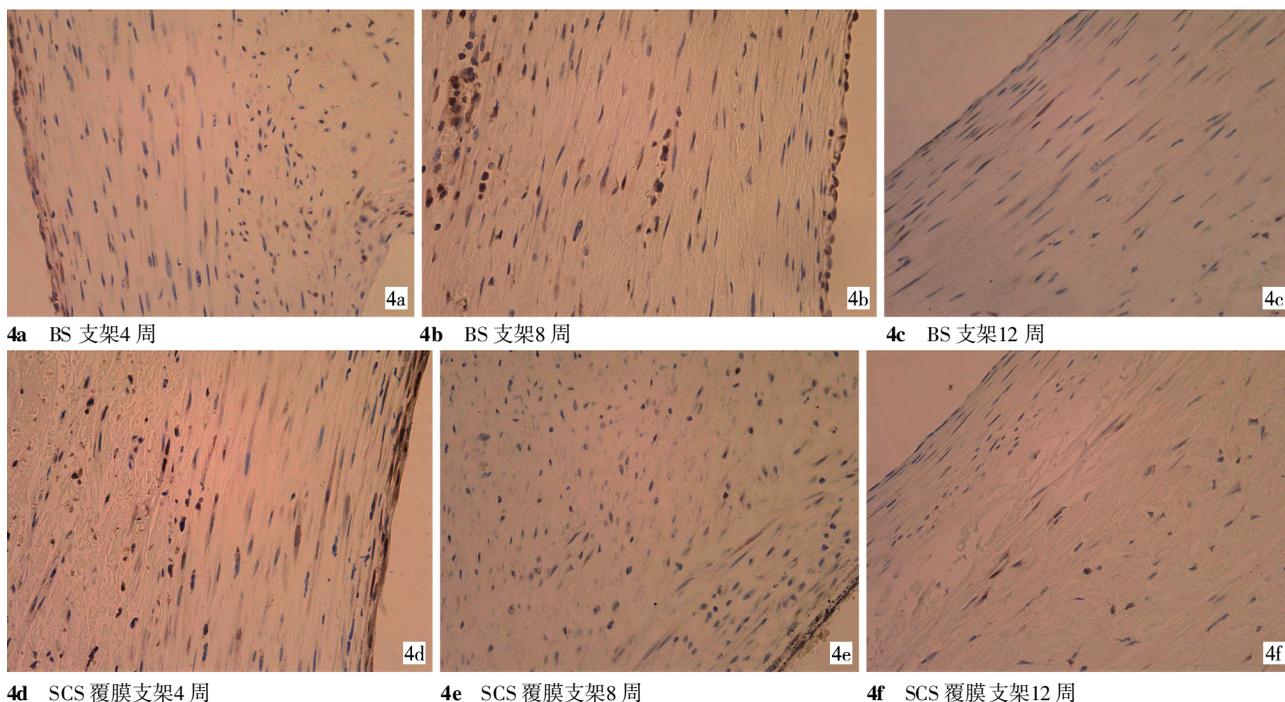


图 4 细胞核内呈棕黄色颗粒状或弥漫性着色提示增殖细胞核抗原阳性(免疫组化, × 400)

3 讨论

RS 是动脉损伤后愈合反应的过度激活, 是血

管重建过程转变成失控的病理学反应。EC 损伤是 RS 的始动因素, 其再生修复是影响 RS 发生的关键因素, 新生内膜增生最终以 EC 的完全再生而告结

表 3 BS 组和 SCS 组新生内膜内 VSMC PCNA 阳性百分率比较

组别	VSMC PCNA 阳性率(%)			平均 PCNA
	4 周	8 周	12 周	
BS	18.3 ± 3.0	25.3 ± 2.3	20.2 ± 2.4	21.2 ± 3.8
SCS	12.0 ± 2.2	16.0 ± 3.7	11.6 ± 3.2	13.0 ± 3.1
P 值	0.014	0.005	0.001	0.001

表 4 BS 组和 SCS 组新生内膜表面覆盖 EC 数

组别	EC 数		
	4 周(n = 4)	8 周(n = 4)	12 周(n = 5)
BS	9.0 ± 0.8	18.5 ± 1.9	32.0 ± 3.5
SCS	12.8 ± 1.3	23.3 ± 3.1	38.4 ± 1.3
P 值	0.002	0.040	0.014

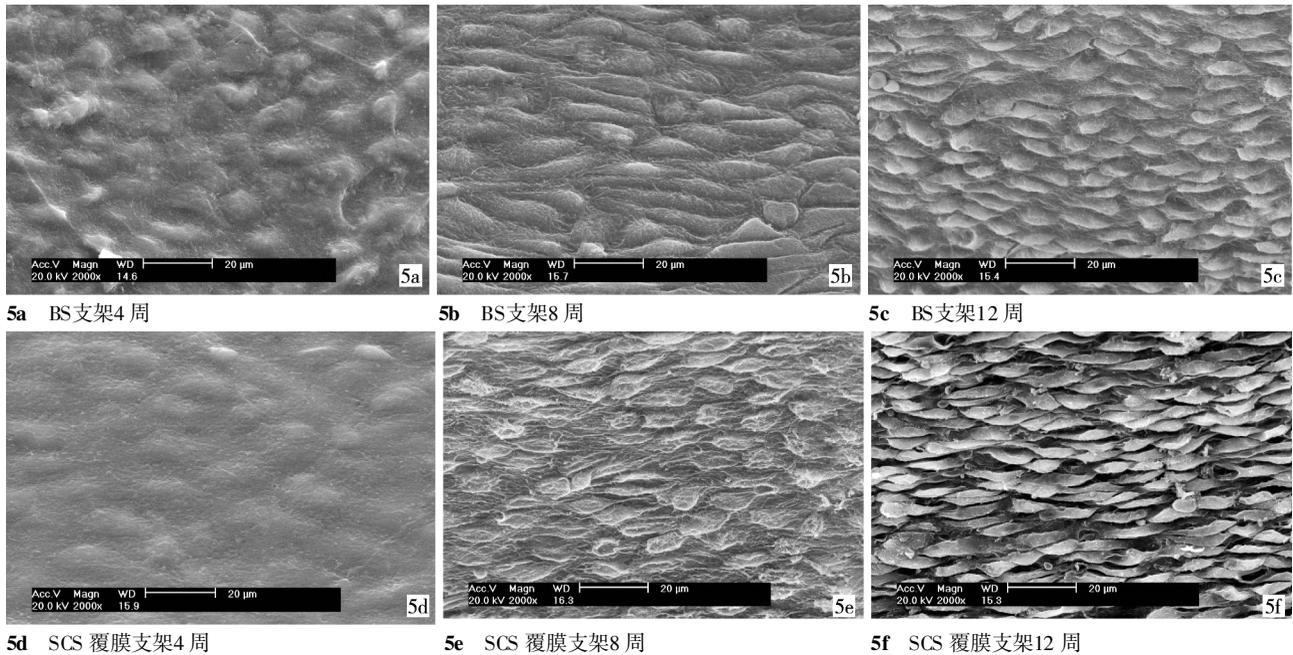


图 5 电镜下见新生内膜表面覆盖 EC 数

束。因此加快支架表面内皮化有利于降低支架内血栓发生率，并可抑制 VSMC 的增生和迁移而降低 RS 率。Losordo 等^[5]将如何促进恢复 EC 的功能及完整性作为预防 RS 的新策略。SIS 是不含细胞的 ECM，具有良好的生物相容性、顺应性，且免疫排斥性低，渗透性能较符合生理，并具备聚集组织内细胞，支撑组织结构和调节细胞表型的功能，同时可定位、传送特定宿主细胞和生物活性因子到所需部位，以及调整构建基质三维结构，为细胞生长、繁殖、分化提供近似体内组织发育的 ECM 支架条件^[6]。有文献报道 SIS 具有促进 EC 增生、提高 EC 功能的作用^[7]。本实验即采用体内组织工程技术，建立 RS 动物模型，研究 SIS 促进支架表面内皮化的可行性和有效性，寻找有效的早期恢复内皮结构完整的方法，为寻得最佳综合性预防 RS 方法提供实验依据和理论基础。

SIS 自身结构特点和生物学特性几乎满足理想体内组织工程生物材料应该具有的所有条件，目前被认为是最有可能实现体内完全再生性修复的生物材料，FDA 已批准 SIS 用于临床多种组织的修复^[8-9]。SIS 天然的三维空间结构可诱导细胞浸润，刺

激血管生成和宿主细胞的长入和分化，产生的再生组织在结构和功能上与原有组织相似，即部位特异性组织再生^[10]。另外，SIS 的主要成分 I、III 纤维胶原蛋白可诱导 EC 增生，且仅增生融合成单层，而纤维素连接蛋白和 FGF-2、VEGF 等可刺激 EC 的增殖和迁移，并促进 EC 的分化^[11-12]。本实验结果表明，SCS 组新生 EC 及细胞核的形态、大小均优于 BS 组，且 EC 排列更紧密。4、8 和 12 周时 SCS 组支架表面新生内膜单位面积 EC 数明显高于 BS 组，组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示 SIS 能促进 PTA 术后 EC 再生修复，缩短支架表面内皮化的时间，也再次证实了 SIS 的成分、结构及部位特异的组织再生能力在促进内皮修复的过程中发挥着重要的作用。此外，SIS 可为血液中内皮祖细胞提供附着、生长、分化的空间，并促进内皮祖细胞转化为 EC，这也可能是 SCS 组支架表面内皮化程度优于 BS 组的另一个原因之一，但其具体机制尚需进一步研究。

另一方面，本实验结果显示 SCS 组和 BS 组新生内膜中均有不同程度的 VSMC 增生，越靠近内皮，VSMC 排列越紧密、规则，且随时间变化这种趋

势更明显,尤其是 SCS 组,且每高倍镜下 SCS 组 PCNA 阳性细胞占同类细胞的百分比低于 BS 组,即 SCS 组新生内膜中合成型 VSMC 低于 BS 组,而收缩型 VSMC 高于 BS 组,均提示 SIS 具有促进 VSMC 转型的作用,有利于抑制内膜过度增生;且 VSMC 细胞核由椭圆形、纺锤形逐渐变为梭形、长条形,亦提示 VSMC 逐渐由合成型转变为收缩型。其原因可能与以下方面有关:①“接触抑制”,即与组织损伤、表皮完全再生后肉芽组织或瘢痕组织不会过度增生的原理相同;②内皮细胞功能恢复,发挥屏障功能以及分泌相关生长因子和细胞因子,作用于 VSMC;③SIS 中 FGF-2、TGF- β 和 VEGF 等活性物质的作用。本实验中,12 周时 SCS 组及 BS 组新生 EC 最成熟、完整,相应合成型 VSMC 百分比最低,尤其 SCS 组,亦可支持前两个原因。

综上所述,SIS 具有促进内皮化、加快内皮功能恢复的作用;支架表面早期内皮化能够抑制 VSMC 增殖迁移,并加快合成型 SMC 向收缩型转变;单纯 SIS 不能完全解决 RS 问题,必须联合其他预防 RS 方法。

[参 考 文 献]

- [1] 武晓静,黄 岚,黄晋军,等.紫杉醇对培养的兔血管平滑肌细胞和内皮细胞增生与迁移的影响及其相互关系[J].中华心血管病杂志,2004,32:626-630.
- [2] 张 琳,张瑞岩,朱政斌,等.国产雷帕霉素洗脱支架和裸支架植入后血管再内皮化实验研究[J].介入放射学杂志,2009,18:616-619.
- [3] Wenaweser P, Daemen J, Zwahlen M, et al. Incidence and correlates of drug-eluting stent thrombosis in routine clinical practice. 4-year results from a large 2-institutional cohort study. [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52: 1134 - 1140.
- [4] Kimura T, Morimoto T, Nakagawa Y, et al. Very late stent thrombosis and late target lesion revascularization after sirolimus-eluting stent implantation: five-year outcome of the J-Cypher Registry[J]. Circulation, 2012, 125: 584 - 591.
- [5] Losordo DW, Isner JM, Diaz-Sandoval LJ. Endothelial recovery: the next target in restenosis prevention [J]. Circulation, 2003, 107: 2635 - 2637.
- [6] Grimes M, Pembroke JT, Mcgloughlin T. The effect of choice of sterilisation method on the biocompatibility and biodegradability of SIS (small intestinal submucosa)[J]. Biomed Mater Eng, 2005, 15: 65 - 71.
- [7] Badylak SF. Xenogenic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction [J]. Transpl Immunol, 2004, 12: 367 - 377.
- [8] 岑石强,李万里,黄富国,等.小肠黏膜下层复合上皮细胞及成肌细胞构建组织工程食管管的初步研究[J].中国修复重建外科杂志,2006,20:1040-1043.
- [9] Le Visage C, Yang SH, Kadakia L, et al. Small intestinal submucosa as a potential bioscaffold for intervertebral disc regeneration [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31: 2423 - 2430.
- [10] Hodde JP, Record RD, Liang HA, et al. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix [J]. Endothelium, 2001, 8: 11 - 24.
- [11] Mcdevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 67: 637 - 640.
- [12] 宋振强,王润秀,林 源,等.表皮生长因子诱导糖尿病难愈性创面成纤维细胞增殖的对照观察[J].中国临床康复,2006,10:74-75,78.

(收稿日期:2012-11-15)

(本文编辑:侯虹鲁)