

• 实验研究 Experimental research •

辛伐他汀对兔股动脉球囊损伤后内膜增生和平滑肌细胞增殖的影响

梁刚柱, 张福先, 刘 勇

【摘要】目的 评价辛伐他汀对兔股动脉球囊损伤后血管狭窄和平滑肌细胞增殖的影响。**方法** 将 24 只雄性新西兰兔随机分为假手术组、动脉狭窄模型组和辛伐他汀组, 每组 8 只。除假手术组外, 其余两组行股动脉球囊损伤, 辛伐他汀组给予辛伐他汀灌胃干预。术后第 14 天处死实验兔, 取出血管标本, 处理后行 HE 染色观察组织病理变化。计算机病理图像分析系统测量动脉管腔、内弹力层、外弹力层围绕面积, 计算内膜、中膜面积和内膜/中膜面积比值, 免疫组化法检测动脉壁增殖细胞核抗原(PCNA)表达, 观察平滑肌细胞增殖情况。**结果** 与动脉狭窄模型组相比, 辛伐他汀组血管管腔面积增加, 但差异无统计学意义($P = 0.057$), 新生内膜面积显著减少($P = 0.006$), 内膜/中膜面积比值降低, 但差异无统计学意义($P = 0.16$), 血管壁 PCNA 的阳性表达指数显著降低($P = 0.003$)。**结论** 辛伐他汀可以显著抑制兔股动脉球囊损伤后内膜增生和平滑肌细胞增殖。

【关键词】 股动脉; 球囊损伤; 辛伐他汀; 动物实验

中图分类号: R543.5 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2014)-01-0050-04

The effects of simvastatin on intimal hyperplasia and vascular smooth muscle cell proliferation of balloon-injured femoral artery in experimental rabbits LIANG Gang-zhu, ZHANG Fu-xian, LIU Yong. Department of Vascular Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Corresponding author: ZHANG Fu-xian, E-mail: zhangfuxian@yahoo.com

【Abstract】Objective To evaluate the effects of simvastatin on vascular stenosis and vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation of balloon-injured femoral artery in experimental rabbits. **Methods** A total of 24 male New Zealand white rabbits were randomly and equally divided into three groups: the sham group ($n = 8$), the artery stenosis model group ($n = 8$) and the simvastatin group ($n = 8$). Femoral artery stenosis was induced by injuries with balloon in both the model group and the simvastatin group, except for the sham group. The rabbits in simvastatin group were fed with simvastatin. The rabbits were sacrificed on the 14th day after operation, and the femoral arteries were removed and sent for the pathological examination. The internal elastic lamina, external elastic lamina and luminal areas were measured. Then the areas of intima, media and the intima-to-media ratio were calculated. In order to observe the proliferation of VSMC, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression of arterial wall was tested and observed by immunohistochemistry method. **Results** In comparison with the model group, the average luminal area of the simvastatin group was increased although the difference was not statistically significant ($P = 0.057$). The area of intima of simvastatin group was decreased ($P = 0.006$), and the intima-to-media ratio was notably decreased, but the difference was of no statistic significance ($P = 0.16$). The PCNA expression of arterial wall was remarkably decreased ($P = 0.003$). **Conclusion** Simvastatin can effectively inhibit the intimal hyperplasia and the vascular smooth muscle cell proliferation of balloon-injured femoral artery in experimental rabbits. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 50-53)

【Key words】 femoral artery; balloon injury; simvastatin; animal experiment

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2014.01.014

作者单位: 100038 北京 首都医科大学附属北京世纪坛

医院血管外科(梁刚柱、张福先), 超声科(刘 勇)

通信作者: 张福先 E-mail: zhangfuxian@yahoo.com

目前,经皮腔内血管成形术(percutaneous transluminal angioplasty, PTA)是治疗外周动脉硬化闭塞症(peripheral arterial occlusive disease, PAOD)的有效方法。但是术后管腔再狭窄影响了其远期疗效,有报道显示下肢动脉 PTA 术后 1 年再狭窄率达 40% ~ 60%^[1-2]。PTA 后血管内皮细胞损伤和脱落,诱发血管平滑肌细胞(VSMC)大量增殖并向内膜迁移引起内膜增生以及血管重构,是 PTA 术后再狭窄的主要病理机制^[3]。既往研究表明他汀类药物在动脉系统中有不依赖其降脂作用的促动脉内皮修复和预防动脉粥样硬化、预防动脉血栓形成的作用^[4-5],但对他汀类药物在预防外周动脉 PTA 术后再狭窄的作用研究较少^[6]。我们通过建立兔股动脉球囊损伤模型,观察辛伐他汀对该模型血管管腔狭窄程度、内膜增生程度以及 VSMC 增殖的影响,探讨其在防止 PTA 术后血管再狭窄形成中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用体重 2.5 ~ 3.5 kg 的雄性新西兰兔 24 只(购自北京维通利华实验动物有限公司),分笼饲养。将 24 只兔随机分为假手术组、动脉狭窄模型组和辛伐他汀组,每组 8 只。辛伐他汀组给予辛伐他汀粉剂与蒸馏水配成的溶液,以 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,假手术组和模型组给予等量蒸馏水灌胃。三组均喂养至 2 周末取材。

1.2 建立血管损伤动物模型

用 5% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉后,解剖暴露兔右侧股动脉远端达腓动脉,在腓动脉远端结扎,阻断近端,之间作一长约 0.5 cm 的切口,向近端送入 3 F Forgarty 球囊导管达腓动脉,深入约 10 cm,向球囊内注入生理盐水,维持压力,缓慢回拉球囊至平切口处,回抽球囊内液体维持负压,再将导管送至原处,重复上述过程 5 次,使血管内皮充分剥脱。退出导管,缝合切口。术后每天肌注青霉素 80 万 u,连续 3 d。假手术组不插入球囊,余步骤同上。

1.3 检测方法

于术后第 14 天处死动物,小心取出模型段血管(球囊损伤的股动脉全程),迅速置于 4% 多聚甲醛中固定,然后取材,逐级脱水、石蜡包埋。

1.3.1 血管管腔病理形态学检测 将石蜡包埋标本 $5 \mu\text{m}$ 厚切片用苏木精-伊红(HE)染色后摄像,用 MiE V2.0 图像分析系统分别测量管腔面积、内

弹力层围绕面积和外弹力层围绕面积,以毫米²(mm²)表示。通过以上测定结果,计算新生内膜面积、中膜面积以及新生内膜/中膜面积比值,每次测量 3 次,取平均值。具体计算方法如下:新生内膜面积 = 内弹力层围绕面积 - 管腔面积;中膜面积 = 外弹力层围绕面积 - 内弹力层围绕面积;新生内膜/中膜面积比值 = 新生内膜面积/中膜面积。

1.3.2 免疫组化检测增殖细胞核抗原(PCNA)表达 将石蜡包埋标本于不同切面切 3 张 $5 \mu\text{m}$ 厚切片,置于载玻片(均经 APES 防脱片处理)上,抗 PCNA 抗体为 I 抗,阳性对照用人乳腺癌切片,阴性对照用 PBS 缓冲液代替 I 抗,进行免疫组化染色。PCNA 表达评定方法:PCNA 阳性细胞的胞核染成棕黄色,高倍镜(200 倍)采集图像,利用图文分析系统随机测量每张切片中 3 个视野,计数内膜细胞中阳性细胞数,计算 PCNA 阳性细胞百分率,取其均值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组血管管腔形态、面积比较

光镜下,假手术组右侧股动脉内弹力层内侧为一层蓝染的内皮细胞覆盖,内弹力层完整,呈卷曲“城墙状”,动脉壁各层结构完整,中膜 VSMC 呈梭型,排列整齐,分布均匀,外弹力层完整。动脉狭窄模型组内膜增生严重,向腔内呈丘状隆起,可见大量 VSMC 排列紊乱,内弹力层轻度拉伸,形态不规则。与动脉狭窄模型组相比,辛伐他汀组内膜增生程度较轻,管腔较光滑,内膜中 VSMC 均较少,见图 1。

与动脉狭窄模型组相比,辛伐他汀组血管管腔面积增加,但差异无统计学意义($P = 0.057$,表 1)。

与动脉狭窄模型组相比,辛伐他汀组血管管腔面积、内弹力层围绕面积和外弹力层围绕面积无明显增加(表 1)。

与动脉狭窄模型组相比,辛伐他汀组新生内膜面积减少,差异有统计学意义($P = 0.006$),内膜/中膜面积比值减小,但差异无统计学意义($P = 0.16$),见表 1。

2.2 免疫组化染色形态学观察 PCNA 表达

镜下观察,PCNA 阳性细胞的胞核染成棕黄色。

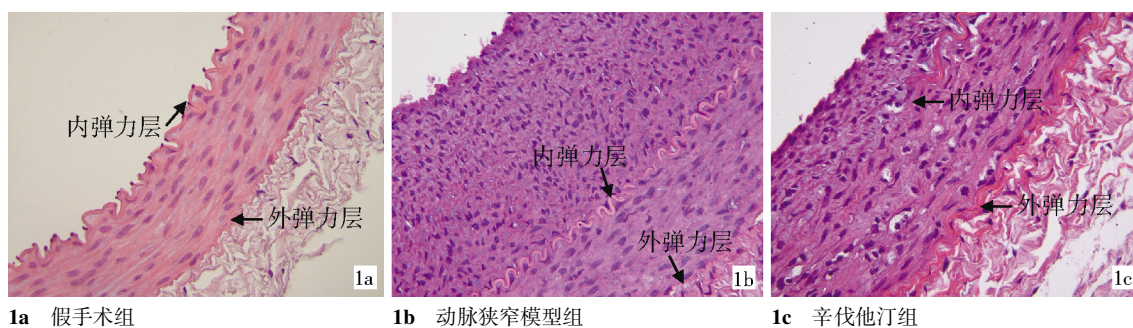


图 1 三组血管管腔形态(HE,×200)

表 1 三组血管管腔面积、内/外弹力层围绕面积、新生内膜面积、中膜面积、内膜/中膜面积比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	管腔面积(mm ²)	内弹力层围绕面积(mm ²)	外弹力层围绕面积(mm ²)	新生内膜面积(mm ²)	中膜面积(mm ²)	内膜/中膜面积比值
假手术组(n=8)	1.06 ± 0.16	1.06 ± 0.16	1.69 ± 0.14	—	0.63 ± 0.1	—
动脉狭窄模型组(n=8)	0.58 ± 0.12	1.09 ± 0.13	1.75 ± 0.15	0.51 ± 0.06	0.66 ± 0.08	0.78 ± 0.11
辛伐他汀组(n=8)	0.73 ± 0.17	1.08 ± 0.15	1.71 ± 0.14	0.35 ± 0.13 ^a	0.63 ± 0.15	0.63 ± 0.41

与动脉狭窄模型组比较, ^a $P < 0.05$

正常动脉管壁 PCNA 表达极少或无表达。各实验组 PCNA 阳性细胞主要聚集在新生内膜, 中膜表达极少或无表达。

2.2.1 PCNA 阳性指数比较 与假手术组相比, 动脉狭窄模型组与辛伐他汀组新生内膜中 VSMC 细

胞有不同程度的 PCNA 表达, 辛伐他汀组 PCNA 阳性细胞指数 (17.25 ± 6.88) 小于动脉狭窄模型组 (33.78 ± 7.87), 差异有统计学意义 ($P = 0.003$), 见图 2。

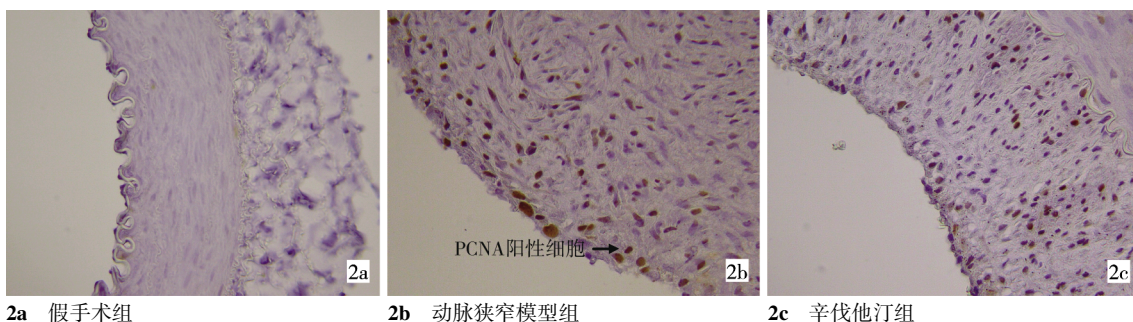


图 2 三组 PCNA 表达(免疫组化,×200)

3 讨论

目前, 抗血小板药物是预防 PTA 术后再狭窄的主要手段, 其机制在于抗血小板药物可以抑制血小板活化引起的内膜增生, ACCP 指南第 9 版推荐外周动脉 PTA 术后长期使用阿司匹林或氯吡格雷预防再狭窄^[7]。虽然, 抗血小板药物可以降低再狭窄的发生, 但是再狭窄依然是制约 PTA 治疗效果的瓶颈。PTA 术后再狭窄的机制复杂, 涉及血管内皮细胞损伤、VSMC 增殖和迁移及血管重构等多个方面。在血管损伤局部, 活化的血小板、炎性细胞产生很多促细胞分裂剂和细胞因子, 刺激中膜 VSMC 增殖、迁移及表型转变, 分泌细胞外基质, 胶原沉积, 导致内膜增生, 发生管腔再狭窄^[3]。

既往研究发现, 他汀类药物除降低血胆固醇

外, 还具有抗炎、改善内皮功能及舒张血管降压、抑制血管平滑肌的迁移和增生、抑制血小板聚集及抗凝等作用^[4-5,8-10], 提示其在预防 PTA 术后再狭窄中有潜在的应用前景。Kappert 等^[11]发现他汀类药物可以增加大鼠颈动脉球囊损伤后血管腔面积, 但是新生内膜面积、内膜/中膜面积比值与模型组相比差异无统计学意义。van der Harst 等^[12]在大鼠主动脉内植入支架, 喂养瑞舒伐他汀的实验组大鼠主动脉新生内膜面积较对照组减少 23% [$(0.66 \pm 0.06) \text{mm}^2$ 比 $(0.51 \pm 0.02) \text{mm}^2$, $P < 0.05$], 并证实其机制与瑞舒伐他汀保护内皮功能有关。Preusch 等^[13]从 PTA 术后血管重构角度研究他汀类药物在抑制内膜增生中的作用, 发现在球囊扩张损伤颈动脉大鼠模型中瑞舒伐他汀可以显著抑制内膜增生, 但该机制与瑞舒伐他汀对细胞基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表

达的影响无关。翟国君等^[14]发现,他汀类药物可以减少犬静脉人工血管桥内膜增生。Lin 等^[15]研究发现,辛伐他汀可以抑制兔肿瘤坏死因子- α 诱导的白细胞介素-18 的表达,抑制兔主动脉 VSMC 增殖。Janardhanan 等^[16]研究发现,辛伐他汀可以降低动静脉瘘术后血管内皮生长因子-A(VEGF-A)和MMP-9 的基因表达,抑制血管内膜增生和血管重构。赵钢等^[17]研究发现,载有他汀类药物的纳米粒子涂层支架可抑制支架内再狭窄。以上研究提示他汀类药物确实可以抑制 PTA 术后的内膜增生,其机制涉及内皮功能的保护、抑制血管重构、抑制 VSMC 增殖等内膜增生的多个环节。本研究发现球囊损伤血管后,动脉狭窄模型组内膜增生明显,给予辛伐他汀干预后,新生内膜面积明显减少,提示辛伐他汀可有效抑制球囊损伤后 VSMC 增殖和内膜增生。本研究从 VSMC 增殖角度研究其相关机制,选用 PCNA 的表达观察 VSMC 增殖情况。PCNA 的高表达提示细胞内 DNA 合成反应旺盛,是 S 期细胞的良好标志物,是评价细胞增生的良好指标。本研究发动脉狭窄模型组新生内膜 VSMC 中 PCNA 呈高表达,而辛伐他汀组中 PCNA 阳性指数减少,提示他汀类药物可以通过抑制 VSMC 增殖抑制 PTA 术后的内膜增生。本实验改进了目前常用的兔颈动脉球囊损伤模型,采用兔股动脉球囊损伤狭窄模型,在球囊损伤股动脉全程后,结扎腘动脉,其流出道由隐动脉代偿,临床上更接近于下肢动脉病变流出道少的特点。

本研究结果证实他汀类药物可以抑制兔股动脉球囊损伤后的 VSMC 增殖和内膜增生,提示他汀类药物对于下肢动脉 PTA 术后再狭窄的防治具有潜在的临床应用前景,但其在预防外周动脉 PTA 术后再狭窄中的具体机制还需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, et al. Restenosis after femoropopliteal PTA and elective stent implantation: predictive value of monocyte counts[J]. J Endovasc Ther, 2003, 10: 557 - 565.
- [2] Siracuse JJ, Giles KA, Pomposelli FB, et al. Results for primary bypass versus primary angioplasty/stent for intermittent claudication due to superficial femoral artery occlusive disease[J]. J Vasc Surg, 2012, 55: 1001 - 1007.
- [3] Schwartz RS, Henry TD. Pathophysiology of coronary artery restenosis[J]. Rev Cardiovasc Med, 2002, 3(suppl 5): S4 - S9.
- [4] Owens CD. Statins and other agents for vascular inflammation[J]. J Vasc Surg, 2012, 56: 1799 - 1806.
- [5] Antonopoulos AS, Margaritis M, Shirodaria C, et al. Translating the effects of statins: from redox regulation to suppression of vascular wall inflammation [J]. Thromb Haemost, 2012, 108: 840 - 848.
- [6] Ali FN, Carman TL. Medical management for chronic atherosclerotic peripheral arterial disease[J]. Drugs, 2012, 72: 2073 - 2085.
- [7] Alonso-Coello P, Bellmunt S, McGorrian C, et al. Antithrombotic therapy in peripheral artery disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence - Based Clinical Practice Guidelines [J]. Chest, 2012, 141: e669S - e690S.
- [8] Korybalska K, Kawka E, Breborowicz A, et al. Atorvastatin does not impair endothelial cell wound healing in an in vitro model of vascular injury[J]. J Physiol Pharmacol, 2012, 63: 389 - 395.
- [9] Ewa D, Michael HD. A review of lipid management in primary and secondary prevention[J]. J Cardiopulm Rehabil Prev, 2009, 29: 2 - 12.
- [10] Zhou Q, Liao JK. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15: 467 - 478.
- [11] Kappert K, Leppänen O, Paulsson J, et al. Highly active antiretroviral therapy attenuates re-endothelialization and alters neointima formation in the rat carotid artery after balloon injury [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006, 43: 383 - 392.
- [12] van der Harst P, Groenewegen HC, Roks AJ, et al. Rosuvastatin attenuates angiotensin II - induced neointimal formation after stent implantation in the rat [J]. Coron Artery Dis, 2008, 19: 47 - 53.
- [13] Preusch MR, Vanakaris A, Bea F, et al. Rosuvastatin reduces neointima formation in a rat model of balloon injury [J]. Eur J Med Res, 2010, 15: 461 - 467.
- [14] 翟国君, 姚伟娟, 贾子昌, 等. 静脉人工血管桥内膜增生的形态学特征及洛伐他汀的干预作用[J]. 北京大学学报: 医学版, 2012, 44: 783 - 787.
- [15] Lin YC, Chiang CH, Chang LT, et al. Simvastatin attenuates the additive effects of TNF- α and IL-18 on the connexin 43 up-regulation and over-proliferation of cultured aortic smooth muscle cells[J]. Cytokine, 2013, 62: 341 - 351.
- [16] Janardhanan R, Yang B, Vohra P, et al. Simvastatin reduces venous stenosis formation in a murine hemodialysis vascular access model[J]. Kidney Int, 2013, 84: 338 - 352.
- [17] 赵 钢, 朱 伟, 陆志刚, 等. 载有匹伐他汀的纳米涂层支架的研究[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 486 - 491.

(收稿日期:2013-07-02)

(本文编辑:侯虹鲁)