

人造血管外支架抑制高胆固醇血症兔移植静脉远期粥样硬化

罗俊辉, 邹良建*, 纪广玉

(第二军医大学长海医院胸心外科, 解放军胸心外科研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究人造血管外支架在高胆固醇血症内环境下对移植静脉的远期粥样硬化的抑制作用及其可能机制。 **方法:** 15只新西兰大白兔, 建立高胆固醇血症模型后将双侧颈静脉端-端吻合于同侧颈总动脉上, 随机分配一侧移植静脉加用静脉外支架(实验组), 另一侧不加外支架(对照组)。术后12周行超声检查了解血流动力学情况后取下移植静脉, 测量其中膜厚度、面积及脂质沉积情况; 免疫组化法检测 VCAM-1 阳性细胞分布情况, 扫描电镜检查了解内皮细胞重塑情况。 **结果:** 超声检测提示支架组静脉血流为层流, 对照组为涡流; 支架组内中膜厚度及面积较对照组显著降低 ($P < 0.01$); 泡沫细胞明显减少, 脂质沉积减轻, 未见粥样硬化斑块; 支架组内中膜层内 VCAM-1 阳性细胞率较对照组明显减低, 差异显著 ($P < 0.01$); 扫描电镜提示支架组内皮细胞排列整齐、紧密, 大小一致, 对照组内皮细胞排列紊乱, 间隙大, 大小不一致。 **结论:** 人造血管外支架可改善静脉血流动力学, 促进内皮细胞良性重塑, 减轻脂质沉积及中膜平滑肌细胞增殖, 减少泡沫细胞生成, 最终抑制高胆固醇血症内环境下移植静脉远期粥样硬化。

[关键词] 移植静脉; 高胆固醇血症; 粥样硬化; 外支架; 内皮细胞

[中图分类号] R 654 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1209-05

External stent inhibits long-term atherosclerosis of autologous vein graft in hypercholesterolemic rabbits

LUO Jun-hui, ZOU Liang-jian*, JI Guang-yu (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, PLA Institute of Cardiothoracic Surgery, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the long-term inhibitory effect of external stent on atherosclerosis of autologous vein graft in hypercholesterolemic rabbit and the possible mechanism. **Methods:** Hypercholesterolemic model was established in 15 rabbits and their bilateral jugular veins were anastomosed with bilateral carotid arteries. One jugular vein graft was stented with a polytetrafluoroethylene tube (external stent group) and the other receiving no stenting served as control (unstented group). Ultrasound was used to evaluate the haemodynamics 12 weeks after operation. The grafts were harvested to examine the thickness and area of intima and media, the deposition of lipid in the vessel wall, and the distribution of VCAM-1 positive cells. Scanning electron microscope (SEM) was used to evaluate the regeneration of endothelium. **Results:** Ultrasound results showed that the stent group was laminar blood flow and the control group had vortex flow. The thickness and areas of intima and media were significantly lower in the stent group than in the control group ($P < 0.01$); the foam cells and deposition of lipid in the vein wall were significantly less in the stent group ($P < 0.01$). No atherosclerosis plaque was founded in the stent group. VCAM-1 positive cells in the control group were significantly more than those in the stent group ($P < 0.01$). SEM showed that the endothelia were orderly, closely, and evenly arranged in the stent group; while those in the control group were in disorder, with larger gaps and different sizes. **Conclusion:** External stent can improve hemodynamics of vein graft, accelerate endothelium remodeling and reduce the deposition of lipid; it can also inhibit vein graft smooth muscle hyperplasia, and reduce foam cells in vein graft, indicating that external stent can inhibit the atherosclerosis of vein grafts in a long run.

[KEY WORDS] vein graft; hypercholesterolemia; atherosclerosis; external stent; endothelial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1209-1213]

冠状动脉旁路移植手术是治疗冠心病的主要方法之一, 其中静脉桥的使用占 50% 以上, 但静脉桥最大的缺点是术后易发生狭窄和闭塞, 其中约有 70%~85% 是由于静脉壁的远期粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 斑块的形成引起的^[1]。导致移植静脉 (vein graft, VG) AS 形成的主要因素之一就是高胆固醇血症^[2]。临床上许多冠心病患者合并高胆固醇血症, 因此, 如何减轻 VG 在高胆固醇内环境下的远期 AS 形成就显得尤为重要。以往研究表明在静脉

外放置支架可减轻高胆固醇血症内环境下 VG 早期的狭窄^[3-4], 那么其是否具有远期的保护作用呢? 本

[基金项目] 军队“十五”医药卫生科研基金重点资助项目 (01Z063), Supported by Medical and Pharmacological Grant of 10th Five-year Plan of PLA(01Z063).

[作者简介] 罗俊辉, 博士生, 主治医师。

E-mail: ljhzf241@163.com

* Corresponding author. E-mail: zoulj2007@163.com

研究通过建立高胆固醇血症兔动静脉吻合模型来研究外支架对高胆固醇血症内环境下的VG的远期作用,为外支架在临床上的可能应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与材料 外支架采用膨体多聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE, 上海塑料研究所制作)人造血管,内径4 mm,壁厚0.5 mm,长25 mm,75%乙醇消毒后备用。健康新西兰大白兔15只(第二军医大学实验动物中心),雌雄不拘,体质量1.5~2.2 kg。

1.2 动物模型的制备及分组 所有兔均在给予普通饮食的基础上,每日喂饲含2%胆固醇、10%鸡蛋黄粉、1%猪油的颗粒饲料40 g。喂饲4周后行动静脉吻合手术。手术过程:3%戊巴比妥钠静脉全麻(15~25 mg/kg),麻醉成功后经颈部正中切口,分离并取下兔双侧颈外静脉,离断双侧颈动脉,利用显微缝合技术将所取静脉端-端吻合到同侧颈动脉上,按随机原则,一侧血管加用外支架(实验组),对侧血管不加外支架(对照组)。两组均先吻合近心端,不同之处为外支架组在近心端吻合完毕后先将PTFE人造血管套在静脉外,再吻合远心端。操作过程中遵循无损伤技术原则。吻合完毕后测静脉外径约4 mm,人造血管刚好包裹住静脉。术后连续3 d肌注青霉素80万U,2次/d,皮下注射肝素1 mg/kg,2次/d。术后次日即开始给予高胆固醇饮食至术后第12周。

1.3 血清总胆固醇(TC)的检测 所有兔分别在进入实验的当天、手术当天、术后第4、8、12周从耳缘静脉抽血检测TC(奥林巴斯AU1000全自动生化仪)。

1.4 血管超声检测 术后第12周行血管超声检查,检测血管形态、通畅度、有无粥样硬化斑块、血流动力学情况。

1.5 标本的获取及制备 术后第12周采集血管标本。经原切口将吻合好的静脉及部分颈动脉仔细游离,两端结扎后将静脉取下。取下的血管经100 cmH₂O(1 cmH₂O=0.098 kPa)压力用4%多聚甲醛灌注固定10 min,然后切取0.3 cm使用4%多聚甲醛低温固定24 h,送扫描电镜检查。其余标本经10%中性甲醛固定24 h。取0.5 cm血管行冰冻切片,剩余标本行石蜡包埋。

1.6 组织切片及图像分析 冰冻切片行油红“O”染色观察静脉壁的脂质沉积及粥样斑块的形成情况。普通石蜡切片行H-E染色,观察血管形态及泡沫细胞;每个样本取2张切片,每个切片取上、下、

左、右4个点,使用LEICA Qwin (Leica Imaging system Ltd, England) 计算机图像分析系统,测量内膜、中膜厚度、面积,最后取平均值。

1.7 血管细胞黏附分子1(VCAM-1)的检测 石蜡切片经常规脱蜡至水后,应用EnVision法行VCAM-1的免疫组化染色。一抗采用抗兔VCAM-1单克隆抗体(武汉博士德公司出品,1:200稀释),DAB显色,苏木精衬染,封片后在显微镜下观察。不加一抗做空白对照。结果判定:VCAM-1阳性表达为细胞膜及细胞质内有棕黄色颗粒,表达程度采用0~4个“+”分级。200倍显微镜视野下,每个标本取两张切片,每张切片取5个视野,观察VCAM-1阳性细胞数,取其平均数。0个“+”表示无阳性细胞,平均数1~10个为“+”,平均数11~20个为“++”,平均数21~30个为“+++”,平均数大于30个为“++++”。

1.8 扫描电镜观察 样本经多聚甲醛低温固定后充分漂洗,锇酸后固定,梯度乙醇脱水,浸透,Eiko-IB-5镀膜仪样品表面铂金镀膜, Tescan Vega TS5136型扫描电镜观察、摄片。

1.9 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.5软件进行组间配对 t 检验及Wilcoxon符号秩检验。

2 结果

2.1 模型构建情况 术中1只兔子因麻醉低血压死亡,其余14只存活。28支桥静脉中有2支堵塞,1支为加外支架组,1支为未加外支架组,分属2只兔子,因实验为配对设计,经剔除后2组各余下12支静脉进入后续实验。

2.2 TC测定结果 兔基础TC为(1.98±0.52) mmol/L,在喂养高胆固醇饮食4周后即提高到(50.98±10.27) mmol/L,与基础值相比有显著性的差异($P<0.01$),并在其后12周内保持在一个较稳定的水平。

2.3 血管超声结果 支架组静脉内膜较光滑,管径均匀,血流基本为层流,未见粥样硬化斑块,周围的PTFE人造血管的图像为高回声。对照组静脉明显扩张,扩张程度不一,可见增厚的内中膜,静脉内膜不光滑,有血栓形成,3只静脉上有可疑粥样硬化斑块,血流进入VG后,主要表现为涡流(图1)。

2.4 形态学观察 两组静脉均可见内中膜的增厚,支架组内中膜增生较均匀,对照组内中膜增生不均匀。测量VG内中膜厚度及各层面积,对照组的内中膜厚度及面积均大于实验组,两者有显著性差异($P<0.01$)(表1)。

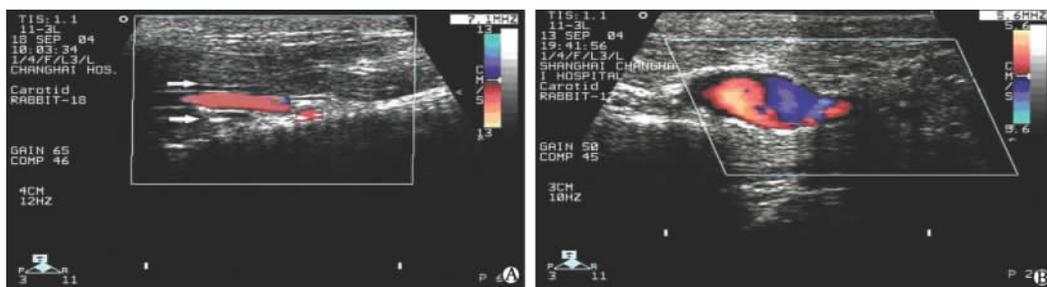


图 1 移植静脉的彩超

Fig 1 Ultrasound of vein graft

A: Stented group; B: Control group. Arrows showing PTFE stent

表 1 各组静脉各层平均厚度及面积比较

Tab 1 Thickness and areas of intimal and medial layers of vein grafts

(n=12, $\bar{x} \pm s$)

Group	Intimal thickness (l/ μ m)	Medial thickness (l/ μ m)	Intimal area (A/ mm^2)	Medial area (A/ mm^2)
Control vein	133.89 \pm 16.2	132.72 \pm 17.2	1.35 \pm 0.12	1.44 \pm 0.21
Stented vein	65.15 \pm 19.8**	66.60 \pm 17.9**	0.63 \pm 0.19**	0.67 \pm 0.19**

** P<0.01 vs control vein

2.5 泡沫细胞及脂质沉积 两组均可见泡沫细胞生成,对照组明显多于支架组;两组均有脂质沉积,对照组脂质沉积较支架组明显加重;对照组有粥样

硬化纤维斑块形成,但未见有胆固醇结晶及钙化;支架组未见粥样硬化斑块(图 2)。

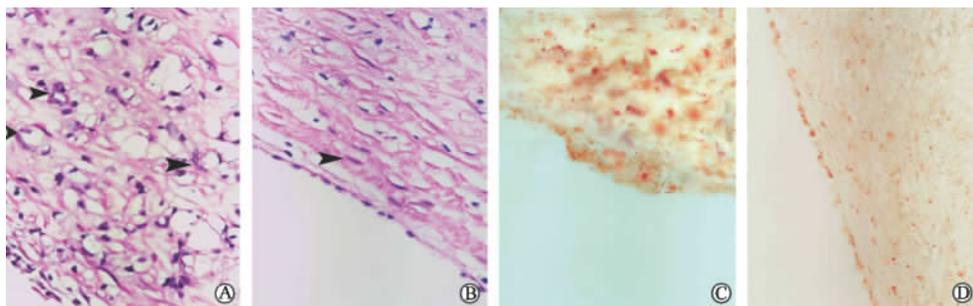


图 2 移植静脉管壁的泡沫细胞和脂质沉积

Fig 2 Foam cells and deposition of lipid in vein graft vessel-wall($\times 400$)

A, C: Control group, atherosclerosis was found; B, D: Stented group. Arrows showing foam cells. A, B: H-E staining; C, D: Oil red "O" staining

2.6 VCAM-1 免疫组化染色 两组内中膜均有 VCAM-1 阳性细胞出现,内皮细胞基本上全为 VCAM-1 阳性细胞(图 3)。支架组的平均分级为 1.56 \pm 0.29,而对照组的平均分级为 2.79 \pm 0.55,两组间有显著性差异(Wilcoxon 符号秩检验, n=11, T=66, P<0.01)。空白对照未见棕黄色染色的细胞。

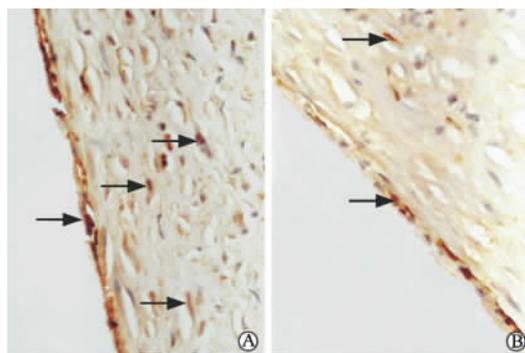


图 3 移植静脉的 VCAM-1 免疫组化染色

Fig 3 VCAM-1 staining of vein grafts(EnVision, $\times 400$)

A: Control group; B: Stented group. Arrows showing VCAM-1 positive cells

2.7 扫描电镜结果 两组静脉均再内皮化,对照组内皮细胞增生的大小不一,较短粗,细胞间的缝隙较大,排列紊乱,部分区域内皮层脱落。支架组内皮细胞增生大小较一致,细胞较细长,细胞间的缝隙小,沿同一方向整齐排列,内皮层完整(图 4)。

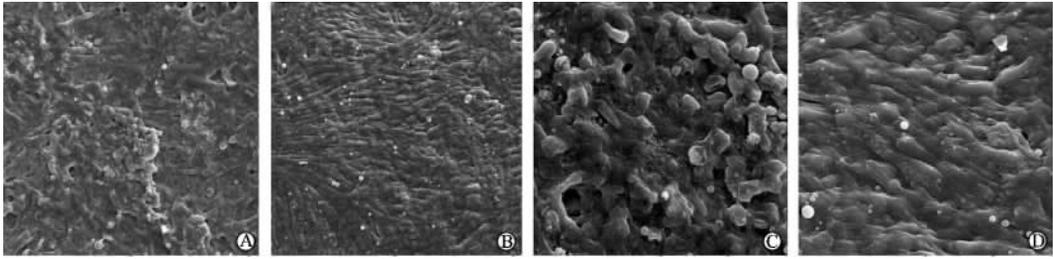


图4 移植静脉内皮层的扫描电镜结果

Fig 4 Endothelial layer of vein grafts by SEM

A,C: Control group; B,D: Stented group. A,B: $\times 700$; C,D: $\times 2\ 000$

3 讨论

静脉移植术后晚期移植失败的最主要原因是管壁 AS 的形成。既往实验证明外支架对高胆固醇血症内环境下的 VG 早期具有保护作用^[3], 并指出作为外支架的材料应具有生物相容性好、具有一定强度、具有较大孔隙率、非限制性等特点。本实验所用外支架为 PTFE 人造血管, 符合以上要求。要研究外支架是否减轻了 VG 的 AS 损伤, 首先应建立 AS 模型, 其次应有判断移植静脉的 AS 损伤程度的标准。本实验选用新西兰大白兔作为建模对象, 因其高胆固醇血症容易形成, 并可在给予高脂饮食 12 周后能确定产生 AS 损伤^[5]。相比动脉的粥样硬化斑块, VG 的 AS 损伤在病理上表现为更多的泡沫细胞生成、不均匀的脂质沉积及更多的巨噬细胞/单核细胞的浸润, 同时其进程也更快^[6], 移植静脉 AS 损伤的严重程度可以通过其泡沫细胞的多少及脂质沉积的程度来判断。

本研究表明外支架减少了 VG 的泡沫细胞产生及脂质沉积, 说明其减轻了 VG 的远期 AS 损伤, 通过观察对比, 我们认为这种作用与静脉内皮细胞 (endothelial cell, EC) 形态及功能密切相关。EC 具有许多重要的作用, 其损伤及功能下降被公认为是血管壁 AS 发病机制的一个早期始动环节^[7]。未加用外支架的 VG 内皮再生不良, 内皮之间的间隙较大, 排列紊乱, 内皮较疏松, 血浆脂蛋白容易通过再生内皮的间隙进入中膜层, 刺激平滑肌细胞增生和向内膜游移; 部分 VG 甚至有内皮脱落, 直接造成内中膜平滑肌细胞与血液的接触。中膜的平滑肌细胞在受到脂质的刺激后发生表型改变表达 VCAM-1。VCAM-1 在 AS 的形成中占据重要的地位^[8], 其可以介导单核细胞与血管壁上的细胞发生黏附, 单核

细胞通过内皮间隙进入内膜下形成巨噬细胞, 而单核细胞分泌的细胞因子进一步刺激平滑肌细胞的增生及表达 VCAM-1 等黏附因子, 这种正反馈作用最终会导致局部的单核-巨噬细胞及平滑肌细胞的富集并吞噬大量沉积在内中膜中的脂质形成泡沫细胞^[9]。外支架则可以促进内皮的良性重塑。静脉移植入动脉后, EC 出现再生及重构, 再生 EC 的形态与排列与血管所受应力密切相关, 其中血管切应力对其起主要作用。切应力是血流经过 EC 时, 在 EC 表面与血流方向一致的切线方向的作用力, 主要影响血管内皮层的重构, 使内皮拉长, 极性与血流方向一致, 细胞骨架结构和细胞间连接也随着切应力发生重塑^[10-11]。除对 EC 起作用外, 切应力对平滑肌细胞也有影响, 低切应力可以促进平滑肌细胞的迁移及增生^[12]。切应力尚无法活体测量, 其大小与血管内径成反比, 并与血流方式 (层流或涡流) 密切相关^[13], 同样的压力下, 层流时的切应力高, 而涡流时切应力低。一般来说, 较高的切应力有利于血管的畅通。彩超结果表明外支架限制了 VG 的过度扩张, VG 管径较均匀, 血流动力学得到改善, 血流基本为层流, 发生涡流的区域少, 静脉所受切应力高, 因此 EC 再生及重构完全, 形态及功能良好, 减轻了脂质沉积, 内中膜平滑肌细胞的增殖、迁移及表达 VCAM-1 均降低, 同时单核细胞浸润减少, 泡沫细胞产生减少, 从而减轻了 VG 的 AS 损伤。

外支架可以减轻 VG 在高胆固醇血症内环境下的 AS 损伤的发生, 增加 VG 的远期通畅率, 是一种极具前景的治疗策略。当前对血管外支架的研究还处于实验阶段, 没有真正的应用于临床, 但随着其对移植静脉保护作用及其机制的研究的进一步深入, 我们有理由相信它在临床上将发挥重要的作用。

[参考文献]

- [1] Douglas J S Jr. Percutaneous approaches to recurrent myocardial ischemia in patients with prior surgical revascularization [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 1994, 6: 98-108.
- [2] Motwani J G, Topol E J. Aortocoronary saphenous vein graft disease pathogenesis, predisposition, and prevention [J]. *Circulation*, 1998, 97: 916-931.
- [3] Lardnoye J H, de Vriesm R, Grimbergen J M, et al. Inhibition of accelerated atherosclerosis in vein grafts by placement of external stent in apoE * 3-Leiden transgenic mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 1433-1438.
- [4] Jeremy J Y, Bulbulia R, Johnson J L, et al. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 127: 1766-1772.
- [5] Madhumathi B G, Venkataranganna M V, Gopumadhavan S, et al. Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand white rabbits [J]. *Indian J Exp Biol*, 2006, 44: 203-208.
- [6] Fitzgibbon G M, Kafka H P, Leach A J, et al. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28: 616-626.
- [7] McLenachan J M, Williams J K, Fish R D, et al. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1991, 84: 1273-1278.
- [8] Pei H, Wang Y, Miyoshi T, et al. Direct evidence for a crucial role of the arterial wall in control of atherosclerosis susceptibility [J]. *Circulation*, 2006, 114: 2382-2389.
- [9] 陈灏珠. 动脉粥样硬化 [M] // 叶任高, 陆再英 主编. 内科学. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 263-272.
- [10] Noria S, Xu F, McCue S, et al. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphologic changes to endothelial cells exposed to shear stress [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164: 1211-1223.
- [11] McCue S, Dajnowiec D, Xu F, et al. Shear stress regulates forward and reverse planar cell polarity of vascular endothelium *in vivo* and *in vitro* [J]. *Circulat Res*, 2006, 98: 939-946.
- [12] Goldman J, Zhong L, Liu S Q. Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H928-H938.
- [13] 覃开榕, 姜宗来. 一种确定均匀动脉壁面切应力的非线性方法 [J]. *力学学报*, 2005, 37: 225-231.
- [收稿日期] 2007-04-13 [修回日期] 2007-10-19
[本文编辑] 曹 静

• 消 息 •

《中国现代医生》杂志 2008 年征稿征订启事

《中国现代医生》杂志是卫生部主管, 中国医学科学院主办的国家级综合性医药卫生期刊, 系中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库、维普数据库, 解放军医学图书馆 cmcc/cmci 收录的医学、药学专业学术刊物。

本刊为旬刊, 每月 8 日、18 日、28 日各出版 1 期, 为国际标准 16 开本, 每期 162 页, 国内外公开发行。国内刊号: CN11-5603/R, 国际刊号 ISSN1673-9701, 邮发代号 80-611。每册定价 10 元。全年订价 360 元。

《中国现代医生》杂志主要设有: 博硕士专栏、论著、临床研究、药物临床、临床护理、医学影像、卫生研究、中医中药、综述、医学检验、病例报告、经验交流、工作探讨、仪器设备、社区卫生、医院管理、医药教育、健康教育、政策解读等栏目。是广大医院、医药科研机构、大中专院校、医药行政管理部门等人员开阔视野、掌握医学新进展、交流经验、探讨和提高学术水平的良师益友, 是广大医药工作者发表医药学术论文的园地。

杂志社地址: 北京市朝阳区甘露园南里一区 33 号 A 座 165 室; 邮编: 100025

订刊电话: 010-51398203 投稿热线: 010-51398206

网址: www.zgxdys.com 投稿信箱: zgxdys001@163.com