

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00509

## 血管内皮生长因子在血管外支架预防移植静脉再狭窄中的作用

余咏潮<sup>1</sup>, 赵学维<sup>2\*</sup>, 徐志飞<sup>2</sup>, 何金<sup>3</sup>, 周俊<sup>2</sup>

1. 第二军医大学长海医院外科学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长征医院胸心外科, 上海 200003

3. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

**[摘要]** **目的:** 研究血管内皮生长因子(VEGF)在血管外支架预防移植静脉再狭窄中的作用及不同管径材料外支架的作用效果。**方法:** 通过动物实验获得外支架干预下的移植静脉及其对照标本, 用免疫组化及形态学方法对标本中的 VEGF、增殖细胞核抗原(PCNA)及滋养血管的表达进行检测、分析。**结果:** 与对照组相比, 外支架干预的移植静脉组中膜 VEGF 含量显著降低( $P<0.05$ ), 而外膜 VEGF 含量显著增高( $P<0.05$ ), 中膜 PCNA 含量显著降低( $P<0.05$ ), 外膜滋养血管密度显著增高( $P<0.05$ )。**结论:** 血管外支架可有效促进 VEGF 向外膜聚集, 减少其在中膜、内膜聚集, 进而促进滋养血管的生长, 减少中膜增生, 减轻再狭窄。

**[关键词]** 血管内皮生长因子类; 移植静脉; 血管外支架; 血管移植闭塞

**[中图分类号]** R 654.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0509-04

### Role of vascular endothelial growth factor in vein sheath prevention of arterial bypass graft stricture

YU Yong-chao<sup>1</sup>, ZHAO Xue-wei<sup>2\*</sup>, XU Zhi-fei<sup>2</sup>, HE Jin<sup>3</sup>, ZHOU Jun<sup>2</sup>

1. Teaching and Research Division of Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

3. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the role of vascular endothelial growth factor(VEGF) in vein sheath prevention of arterial bypass graft stricture and the efficacies of vein sheath of different diameters. **Methods:** The vein grafts and their specimens were obtained *via* animal experiment of sheath intervention. Immunohistochemistry method was used to examine the expression of VEGF and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the status of nutrient vessel in the specimens, so as to investigate the function of VEGF. **Results:** Compared with the control group, the vein sheath intervention group had significantly lower VEGF content in the media ( $P<0.05$ ) and higher content in the adventitia ( $P<0.05$ ); it also had lower PCNA content in the media ( $P<0.05$ ) and increased blood vessel density in the adventitia ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Vein sheath can effectively increase the distribution of VEGF in the adventitia and decrease its distribution in the media and intima, thus promoting the growth of nutrient blood vessels and decreasing media hyperplasia and re-stenosis.

**[KEY WORDS]** vascular endothelial growth factors; vein grafts; vein sheath; vascular graft occlusion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):509-512]

自体静脉移植是治疗动脉粥样硬化等血管阻塞疾病的主要手段之一, 尽管目前的手术技术已经较为成熟, 手术器械也有了很大改进, 但是术后移植静脉的长期通畅率仍不尽如人意, 其中主要的原因在于移植静脉内膜和中膜的增厚及随之而来的血管粥样硬化。血管外支架能对静脉桥路重塑及增厚产生较为明显的抑制作用, 从而提高其远期通畅率。血管外支架预防移植静脉再狭窄的机制很复杂, 有很

多因素参与其中, 而血管内皮生长因子(VEGF)作为一种细胞因子也在其中发挥了重要作用。VEGF 是一种特异性地直接作用于血管内皮细胞、促进新生血管形成并能增强毛细血管通透性的细胞因子<sup>[1]</sup>。

2007年3月至2008年1月, 我们使用具有良好强度和弹性的医用可降解性奈维补片作为血管外支架, 建立了血管外支架自体静脉移植模型, 并观察了 VEGF 在外支架减轻内膜和中膜增生过程中的作

**[收稿日期]** 2008-09-05 **[接受日期]** 2009-01-11

**[作者简介]** 余咏潮, 硕士, 住院医师, E-mail: yuyongchao-8356@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885702, E-mail: zhaoxw@sh163.com

用,旨在深入了解血管外支架预防移植静脉再狭窄的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 可降解材料采用奈维补片[可吸收性聚乙醇酸(PGA)修补材料,商品名 NEOVEIL,日本郡是有限公司生产],规格为普通型(100 mm×100 mm×0.5 mm)和薄层型(100 mm×50 mm×0.15 mm)两种。非可降解材料使用上海契斯特医疗科技公司生产的涤纶材料补片(50 mm×50 mm×0.5 mm)。3种补片材料经环氧乙烷消毒后在手术中根据实验犬移植静脉具体口径剪裁,然后用7-0缝合线缝合形成外套管(血管外支架)。

1.2 实验动物及分组 健康草犬24只,雌雄不限,体质量15 kg左右。随机分为对照组(A组)和B、C、D三个实验组,各6只。A组静脉移植后不加外套管;B组移植静脉后外套非限制性普通可降解材料(奈维)外支架;C组移植静脉后外套非限制性薄层可降解材料(奈维)外支架;D组移植静脉后外套非限制性非可降解材料(涤纶)外支架。每组各分为2个亚组,每亚组3只,分别在术后第4、6周取标本。

1.3 手术方法 实验动物采用戊巴比妥钠静脉麻醉,仰卧位固定于手术台。从腹股沟始,沿股动脉内侧纵形切开皮肤,分离、结扎股静脉,切取中间约6 cm长静脉段,标明近心端及远心端,放入含肝素100 U/ml、罂粟碱10 mg/ml的生理盐水中浸泡。分离股动脉约8 cm,结扎分支,两端以无损伤血管夹阻断血流,切除动脉2~3 cm。将切取的静脉调转以后以7-0丙烯线端-端吻合,每条静脉移植后保持同一伸长比。一侧静脉在完成一端的吻合后,将外套管套入移植静脉后再吻合另一端,对照组为单纯移植,不加外套管。术后行抗炎、抗凝处理。

1.4 免疫组化方法检测 VEGF 和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达 按组别分别于术后第4周、6周处死动物,取出移植静脉,置中性甲醛溶液低温灌注固定24 h。石蜡包埋,5 μm厚连续切片,免疫组化方法检测移植静脉中膜、外膜 VEGF 及中膜 PCNA 表达。两者均采用染色指数法计算阳性结果,在100倍显微镜下随机选取5个高倍视野,计算细胞中阳性细胞百分数。阳性细胞百分数0~5%计0分,5%~25%计1分,26%~50%计2分,51%~75%计3分,76%以上计4分;染色强度计算方法:细胞不着色计0分,(+)计1分,(++)计2分,(+++计3分。两者乘积即为染色指数。

1.5 移植静脉滋养血管密度 100倍显微镜下随机

选取5个高倍视野,计算血管横截面滋养血管切面数值。

1.6 统计学处理 数据分析采用SPSS 11.01统计软件,采用处理非参数数据的秩变换组间比较检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般情况 实验犬全部存活,四组进食与活动情况相似,顺利取得血管标本。对照组大体观察见移植静脉与周围组织疏松粘连,移植静脉膨胀明显;镜下观察见移植静脉管径增大,内膜和中膜明显增厚,且厚度不均。实验组大体观察见外支架网管被周围新生组织紧密包裹,新生组织长入并填充网管与静脉壁之间;镜下见内膜和中膜增厚。外支架与静脉壁之间纤维组织增生,形成了新生外膜;新生外膜与原外膜无明显界限,富含新生的小血管和毛细血管,并伸入到增生的中膜。

2.2 免疫组化检测 VEGF 的表达 由100倍光学显微镜观察可见对照组 VEGF 阳性细胞主要位于中膜,而实验组 VEGF 阳性细胞主要位于外膜(图1)。A、B、C、D四组分别于术后第4、6周取得标本,每组标本分别采用染色指数法计算血管中膜和内膜 VEGF 阳性结果,共分16个组别。取得数据后采用非参数秩变换组间比较。结果见表1,可知组间存在显著差异( $P=0.000 < 0.05$ )。进一步组间两两比较可知,A、B、C、D每组内术后第4、6周间未见显著差异,A组与B、C、D组间存在显著差异。B、C组间未见显著差异,B、C组与D组间存在显著差异( $P < 0.05$ )。提示外支架可改变 VEGF 在血管中的分布,促进 VEGF 向外膜聚集,减少其在中膜、内膜聚集。两组可降解材料外支架较涤纶材料外支架可更好地促进 VEGF 向外膜聚集。

2.3 免疫组化检测 PCNA 的表达 PCNA 阳性细胞主要分布在移植静脉壁的新生内膜和中膜。A、B、C、D四组分别于术后第4、6周取得标本,共分8个组别,由100倍光学显微镜观察可见对照组染色较实验组明显(图1),采用染色指数法计算阳性结果,取得数据后采用非参数秩变换组间比较,结果见表1,可知组间存在显著差异( $P=0.000 < 0.05$ ),进一步组间两两比较可知:A、B、C、D每组内术后第4、6周间未见显著差异,A组与B、C、D间存在显著差异( $P < 0.05$ ),B组与C组未见显著差异,但与D组存在显著差异( $P < 0.05$ )。提示外支架组可显著降低 PCNA 阳性细胞率,两组可降解材料外支架较涤纶材料外支架可更好地降低 PCNA 阳性细胞率。

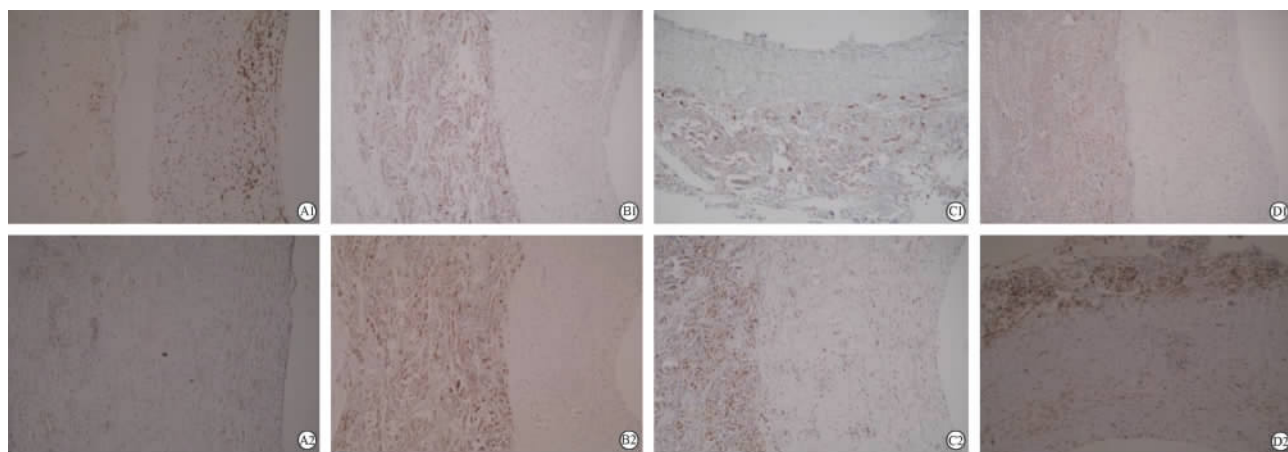


图 1 免疫组化检测各组 VEGF 和 PCNA 的表达

Fig 1 Expression of VEGF and PCNA in 4 groups (Immunohistochemistry)

A1-D1: VEGF; A2-D2: PCNA; A1, A2: Control group, without vein sheath; B1, B2: Group B, with thin PGA vein sheath; C1, C2: Group C, with normal PGA vein sheath; D1, D2: Group D, with terylene vein sheath. Original magnification:  $\times 100$

表 1 VEGF 和 PCNA 表达组间等级资料非参数检验结果

Tab 1 Non-parametric statistics results of rank data of VEGF and PCNA expression

	VEGF					PCNA				
	Sum of squares	df	Mean Square	F	P	Sum of squares	df	Mean Square	F	P
Between groups	6 220 859	15	414 723. 933	75. 952	0. 000	491 291. 517	7	70 184. 502	31. 761	0. 000
Within groups	2 533 603	464	5 460. 351			512 664. 983	232	2 209. 763		
Total	8 754 462	479				1 003 956. 500	239			

2.4 滋养血管密度 A、B、C、D 四组分别于术后第 4、6 周取得标本, 共分为 8 个组别。可见实验组由外膜向中膜出现大量滋养血管(图 2)管, 而对照组滋养血管数量很少。

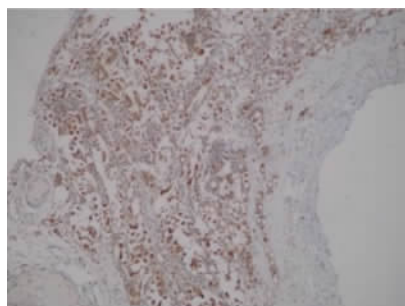


图 2 常规 PGA 外支架组可见大量的滋养血管由外膜伸入中膜

Fig 2 Routine PGA vein sheath obviously promoted nutrient vessel growth

Original magnification:  $\times 100$

对血管横截面滋养血管密度采用非参数秩变换组间比较, 其整体结果见表 2, 可知组间存在显著差异( $P=0.000$ )。进一步行组间两两比较可知: A、B、C、D 每组内术后第 4、6 周间未见显著差异, A 组与 B、C、D 组间存在统计学差异( $P<0.05$ ), B 组与 C

组未见显著差异但与 D 组存在统计学差异( $P<0.05$ )。提示外支架组可显著促进滋养血管的生长, 两组可降解材料外支架较涤纶材料外支架可更好地促进滋养血管的生长。

表 2 滋养血管密度组间等级资料非参数检验结果

Tab 2 Non-parametric statistics results of rank data of nutrient vessel's density

	Sum of squares	df	Mean square	F	P
Between groups	1 396 587	8	174 573. 363	187. 584	0. 000
Within groups	242 897. 1	261	930. 640		
Total	1 639 484. 1	269			

### 3 讨论

自体静脉是血管旁路转流术最常用、也是疗效最佳的移植材料。但静脉移植术后早期(移植后 30 d)静脉阻塞率达 5%~20%; 在晚期(移植后 2 年以上), 下肢动脉重建后的 5 年累积阻塞率高达 30%。这主要是由于血管内膜增生及粥样硬化导致的再狭窄所致, 血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖与移行是导致其病理改变的关键<sup>[2]</sup>。在桥血管周围放置血管外支架可减轻血管新生内中膜增生, 防止静脉桥

粥样硬化的发生,提高静脉桥的远期通畅率。血管外支架预防移植静脉再狭窄的机制很复杂,有很多因素参与其中,而 VEGF 作为一种细胞因子也在其中发挥了重要作用<sup>[3-5]</sup>。VEGF 又称血管通透因子,是目前所知作用最强的促血管内皮生长的细胞因子,主要生物学功能是促进血管形成、增加血管通透性、增加组织因子的产生<sup>[1]</sup>。

应用假体材料血管外支架后,所有外支架都会形成炎症反应,它们能导致炎症细胞及免疫细胞在其周围聚集,这些细胞释放出一系列能够影响移植静脉平滑肌细胞(VSMC)增殖迁移、新内膜形成及滋养血管再生的物质<sup>[6]</sup>。而这些释放出的化学物质,特别是各种细胞因子(如 VEGF 等)和白三烯,可能形成一种化学引诱物梯度,进而引起 VSMC 向外支架方向迁移,而不是向内膜方向移动,从而抑制了新内膜的形成<sup>[7]</sup>。事实上,平滑肌细胞及内皮细胞大量地聚集到了支架内,而且巨噬细胞和巨细胞释放大量 VEGF 及其他细胞因子促进了血管的生成和微血管的修复<sup>[8]</sup>。相似的,在被植入可降解盘的大鼠体内,也观察到了继发于炎症细胞聚集的血管再生<sup>[9]</sup>。

本实验发现,外支架组的血管 VEGF 聚集于血管外膜,促进了移植静脉滋养血管的生长。而对照组的血管,VEGF 聚集于血管内膜和中膜,促进了中膜、内膜增厚。证明了外支架导致的炎症反应促使了 VEGF 由中膜、内膜向外膜转移。3 组实验组之间,可降解材料的外支架较涤纶外支架能更好地趋化 VEGF,促进滋养血管生长。考虑原因可能有两点:(1)可降解材料降解就是一个慢性炎症反应过程,因而可降解材料较涤纶材料导致更强的炎症反应,趋化 VEGF 的能力更强,因而也能更好地促进滋养血管的生长;(2)本实验中可降解材料为大孔径材料,滋养血管生长能够形成完整的回路,因而能够更好地生长,而涤纶材料上没有孔径,滋养血管不能形成回路,因而生长不如可降解材料组好<sup>[10-11]</sup>。

静脉移植手术,吻合口处损伤可引起吻合口处内膜炎症反应,进而导致内膜增厚及管腔狭窄。研究<sup>[12-13]</sup>表明,VEGF 可以修复损伤的血管内膜,抑制内膜增厚。1996 年 Asahara 等<sup>[12]</sup>通过导管将 phVEGF165 基因转染至被球囊损伤的兔股动脉中,证实其能促进损伤股动脉内皮再生,抑制内膜增厚。Van-Belle 等<sup>[13]</sup>通过水凝胶球囊将 phVEGF165 基因转染至经球囊损伤并放置金属支架的兔股动脉中,可加速再内皮化,钝化金属支架,减少由内膜增厚所致支架血栓形成和阻塞。但同时也有研究<sup>[14]</sup>表明,VEGF 可以刺激 VSMC 增生,导致中膜的增

厚。本实验的对照组血管中膜分布大量 VEGF,同时 VSMC 增殖情况也异常活跃(PCNA 高表达),而实验组的血管中膜 VEGF 低表达,VSMC 增殖也被抑制(PCNA 低表达)。因而,我们能否控制 VEGF 在不同部位的化学梯度,从而发挥其良性作用,抑制不良反应,还需要更进一步的深入研究来证实。

## [参考文献]

- [1] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis[J]. *Kid Int*, 1999, 56: 794-814.
- [2] Zargham R. Preventing restenosis after angioplasty: a multi-stage approach[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114: 257-264.
- [3] Noria S, Xu F, McCue S, Jones M, Gotlieb A I, Langille B L. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164: 1211-1223.
- [4] McCue S, Dajnowicz D, Xu F, Zhang M, Jackson M R, Langille B L. Shear stress regulates forward and reverse planar cell polarity of vascular endothelium *in vivo* and *in vitro* [J]. *Circ Res*, 2006, 98: 939-946.
- [5] 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.
- [6] Rosch R, Junge K, Schachtrupp A, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Mesh implants in hernia repair: inflammatory cell response in a rat model [J]. *Eur Surg Res*, 2003, 35: 161-166.
- [7] Kontio R, Ruuttila P, Lindroos L, Suuronen R, Salo A, Lindqvist C, et al. Biodegradable polydioxanone and poly(L/D) lactide implants: an experimental study on peri-implant tissue response[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2005, 34: 766-776.
- [8] Boyle J J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3: 63-68.
- [9] van Amerongen M J, Molema G, Plantinga J, Moorlag H, van Luyn M J. Neovascularization and vascular markers in a foreign body reaction to subcutaneously implanted degradable biomaterial in mice [J]. *Angiogenesis*, 2002, 5: 173-180.
- [10] Dashwood M R, Anand R, Loesch A, Souza D S. Hypothesis: a potential role for the vasa vasorum in the maintenance of vein graft patency[J]. *Angiology*, 2004, 55: 385-395.
- [11] Muzaffar S, Shukla N, Angelini G D, Jeremy J Y. Acute hypoxia simultaneously induces the expression of gp91phox and endothelial nitric oxide synthase in the porcine pulmonary artery [J]. *Thorax*, 2005, 60: 305-313.
- [12] Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, et al. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer [J]. *Circulation*, 1996, 94: 3291-3302.
- [13] Van-Belle E, Tio F O, Chen D, Maillard L, Chen D, Kearney M, et al. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 29: 1371-1379.
- [14] Cardús A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernández E, Valdivielso J M. 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway[J]. *Kidney Int*, 2006, 69: 1377-1384.