

• 基础研究 •

缬沙坦对兔自体移植静脉内膜增生及基质金属蛋白酶-2、组织基质金属蛋白酶抑制剂-2 表达的影响

仲崇俊 蒋庚西

【摘要】 目的 观察缬沙坦对兔颈部自体移植静脉内膜增生、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、组织基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)表达的影响,探讨 AT₁ 受体拮抗剂干预移植静脉再狭窄的作用和机制。方法 雄性新西兰大白兔 20 只行颈部自体静脉移植手术,对照组予普通饲料饲养,缬沙坦组予普通饲料+缬沙坦 10mg/(kg·d)饲养。4 周后取出静脉移植行血管形态学检查;图像分析系统计算血管腔内膜的厚度、面积及中膜的厚度、面积;免疫组织化学方法检测 MMP-2、TIMP-2 表达情况。结果 对比对照组,缬沙坦组移植静脉新生内膜厚度及面积明显降低,MMP-2 表达降低,TIMP-2 表达增加。结论 缬沙坦可以抑制兔自体移植静脉新生内膜的形成,其机制可能与抑制内膜 MMP-2 表达、促进 TIMP-2 表达有关。

【关键词】 血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂;移植,自体;静脉;基质金属蛋白酶 2;组织基质金属蛋白酶抑制剂 2

Effect of valsartan on intima hyperplasia and expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in rabbit autologous vein graft

ZHONG Chongjun, JIANG Gengxi

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the Second Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of valsartan on intimal hyperplasia, the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in neointima, and to explain its mechanism of preventing stenosis in rabbit autologous vein grafts. Methods Twenty male New Zealand rabbits were randomly divided into control group and treatment group with 10 in each. The rabbits underwent the operation of grafting external jugular veins into carotid arteries. The control group was fed with common feed, whereas the treatment group was fed with an admixture of valsartan 10mg/(kg·d) and common feed. Four weeks after the operation, the grafted veins were taken out for pathomorphologic examination. Thickness and area of the intima and media of the vein were calculated with image analyzer system, and expression of MMP-2, TIMP-2 in veins were examined with immunohistochemistry reagent kits. Results Compared with the control group, the neointimal thickness and area were reduced in the treatment group. In the treatment group, the expression of MMP-2 was significantly lower while the expression of TIMP-2 was significantly higher than those in the control group. Conclusion Valsartan has remarkable inhibiting effects on intimal hyperplasia in rabbit autologous vein grafts. The mechanism may be related with the decrease in level of MMP-2 and the increase in level of TIMP-2 in vein grafts.

【Key words】 angiotensin II type 1 receptor antagonists; graftings, autologous; vein; matrix metalloproteinase 2; tissue inhibitor of metalloproteinase 2

收稿日期:2007-10-08

基金项目:南通市社会发展计划资助项目(NoS2005023)

作者单位:226001 南通市,南通大学第二附属医院心胸外科

作者简介:仲崇俊,男,1962 年 11 月生,江苏海安人,医学学士,主任医师,副院长兼心胸外科主任

通讯作者:仲崇俊, Tel:0513-85858558, E-mail: zhongcjnt@sina.com.

大隐静脉是冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass graft, CABG)的重要材料,但移植静脉再狭窄病变发生率高,严重影响手术远期疗效。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是肾素-血管紧张素系统中最重要活性物质,与存在于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的血管紧张素Ⅰ型受体(AT₁受体)结合,可促进平滑肌细胞增殖、迁移、血管外基质聚积,引起移植物的再狭窄^[1]。缬沙坦作为 AT₁受体拮抗剂可在受体水平阻断 AngⅡ的生物学作用,本研究探讨缬沙坦对移植静脉的干预作用,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 新西兰大白兔 20 只(南通大学实验动物中心提供),体重(2.5±0.5)kg,微生物控制级别为Ⅰ级,普通环境中饲养,自由饮水。随机分成 2 组,每组 10 只:(1)对照组予自体静脉移植手术,普通饲料饲养;(2)缬沙坦组在对照组自体静脉移植手术的基础上,予普通饲料+缬沙坦 10mg/(kg·d)喂养。两组均饲养 4 周。

1.2 建立自体静脉移植模型 兔手术前禁食、禁水 4h,建立耳缘静脉通道,予 3% 异戊巴比妥按 30mg/kg 行静脉麻醉。仰卧位固定,颈部备皮,颈前正中纵行切口,游离、切取颈外静脉一段 30~35mm,肝素-生理盐水冲洗、浸泡。游离右侧颈总动脉,耳缘静脉内注射 1% 肝素 1ml/kg,使其肝素化,阻断颈总动脉近、远段,切除对应长度,静脉倒置,采用 8-0 锦纶单丝线作端-端间断吻合,约 8~10 针,两端吻合完成后开放动脉夹排气,确定静脉桥通畅、无出血后,逐层缝合切口。送回单笼喂养,术后 3d 每日耳缘静脉注射 1% 肝素 1ml/kg 防治血栓,注射青霉素 80 万单位预防感染。手术次日及取标本当日行血管彩色多普勒检查,证实静脉桥通畅。

1.3 取材、切片与基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、组织基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)检测 术后 4 周,再予 3% 异戊巴比妥静脉麻醉,游离静脉移植植物,快速、准确切取所需移植植物组织,置入 10% 甲醛中固定 24h,组织修整、洗涤,乙醇逐级脱水,二甲苯置换出组织块中乙醇,石蜡包埋,将包有组织的蜡块用切片机切成厚度 4μm 的薄片,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin)染色,封片,光镜观察。用 Olympus BX50 生物显微镜和北航医学图像分析系统进行图像分析,计算血管腔内膜的厚度、面积及中膜的厚度、面积。用 S-P 法进行 MMP-2 和 TIMP-2

免疫组织化学检查,试剂盒购自 Neo Markers 公司,免疫组化阳性反应为棕黄色或棕褐色颗粒分布在细胞浆中。在 Olympus BX50 显微镜和北航医学图像分析系统上随机计算 5 个 400 倍视野中阳性细胞数占观察细胞总数的百分率。

1.4 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 STATA7.0 软件包处理,组间样本均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物情况 实验过程中动物无死亡,术后切口无感染,两组移植静脉无闭塞。

2.2 HE 染色切片计算机图像分析 (1)病理形态学观察:肉眼可见对照组移植植物管壁增厚,缬沙坦组管壁增厚不明显。光镜下,对照组移植植物内膜明显增厚,管腔缩小,内膜下出现大量平滑肌细胞增殖,增殖的平滑肌细胞排列紊乱,呈典型的分泌表型,细胞周围有较多的胶原纤维,中膜稍有增厚;缬沙坦组内膜增厚较对照组减弱,中膜平滑肌细胞向内膜下迁移、增殖较对照组明显减轻,中膜增厚不明显(图 1)。(2)移植静脉管壁内膜、中膜厚度及面积改变:对照组与缬沙坦组内膜厚度分别为(107.50±12.73)μm、(41.34±14.53)μm,差异具有统计学意义($P < 0.01$);内膜面积分别为(1.03±0.04)μm²、(0.53±0.02)μm²,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。对照组与缬沙坦组静脉移植植物中膜厚度分别为(115.04±15.42)μm、(103.38±11.13)μm,差异不具有统计学意义($P > 0.05$);中膜面积分别为(1.09±0.05)μm²、(1.05±0.03)μm²,差异不具有统计学意义($P > 0.05$;表 1)。

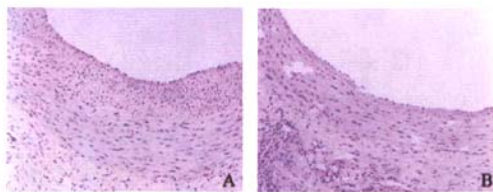


图 1 组织形态学观察(HE, ×100) A 对照组, B 治疗组

表 1 两组移植静脉内膜厚度、面积和中膜厚度、面积比较

分组	内膜厚度 (μm)	内膜面积 (cm ²)	中膜厚度 (μm)	中膜面积 (cm ²)
对照组	107.50±12.73	1.03±0.04	115.04±15.42	1.09±0.05
缬沙坦组	41.34±14.53*	0.53±0.02*	103.38±11.13	1.05±0.03

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

2.3 MMP-2、TIMP-2 免疫组织化学染色切片计算

机图像分析 MMP-2、TIMP-2 阳性表达的细胞均表现为细胞浆呈棕黄色染色的细胞,主要集中在新生内膜。对照组与缬沙坦组的 MMP-2 阳性表达率分别为 $(62.48 \pm 4.72)\%$ 、 $(45.46 \pm 4.79)\%$,TIMP-2 表达率分别为 $(48.31 \pm 4.87)\%$ 、 $(65.04 \pm 4.59)\%$,与对照组比较,缬沙坦组 MMP-2 的表达降低,而 TIMP-2 的表达增强,组间差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.01$),见表 2,图 2、3。

表 2 两组移植静脉 MMP-2、TIMP-2 阳性表达率比较

分组	MMP-2 阳性表达 (%)	TIMP-2 阳性表达 (%)
对照组	62.48 ± 4.72	48.31 ± 4.87
缬沙坦组	$45.46 \pm 4.79^*$	$65.04 \pm 4.59^*$

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

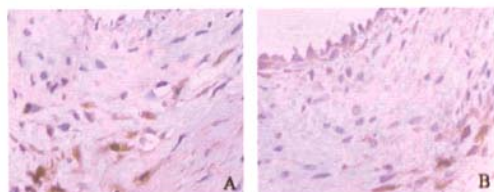


图 2 MMP-2 免疫组织化学分析(SP, ×400) A 对照组, B 治疗组

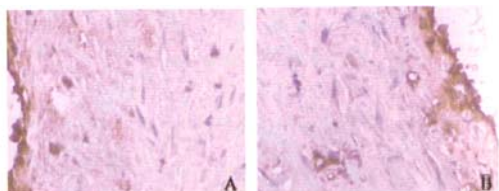


图 3 TIMP-2 免疫组织化学分析(SP, ×400) A 对照组, B 治疗组

3 讨论

CABG 后,静脉移植物的再狭窄严重地影响了手术疗效。目前认为,中膜平滑肌细胞向内膜下移行、增殖及表型改变、大量分泌血管外基质,是移植物流再狭窄的主要病理基础^[2]。本实验设计使用 AT₁ 受体拮抗剂缬沙坦在受体水平阻止 Ang II 与受体的结合,以阻断不同来源的 Ang II 效应,减轻血管内膜增生。研究发现,缬沙坦组兔颈部移植静脉内膜厚度及内膜面积均较对照组明显减少,组间差异具有统计学意义,中膜厚度及中膜面积两组间差异不具有统计学意义。表明自体静脉移植术后,静脉内膜增生是移植物流失效的主要原因,而缬沙坦能有效抑制移植物流的内膜增生。

在移植静脉再狭窄过程中,中膜平滑肌细胞迁移增殖必须突破基底膜、内弹力膜及其他血管外基质成分等组成的物理屏障才能完成。MMPs 是一族对基底膜及血管外基质有特异降解和转换作用的

锌依赖性蛋白水解酶,其中 MMP-2 又称 72-KD IV 型胶原酶明胶酶 A (gelatinase A),酶原由 VSMC 分泌、裂解、激活后,主要作用于构成基底膜的 IV 型胶原^[3]。基因敲除实验证实,MMP-2 降解、断裂基底膜及内弹力膜,从而促进平滑肌细胞迁移^[4],利用合成的 MMPs 抑制剂和 MMPs 抗体能明显降低平滑肌细胞迁移能力,减轻内膜增生^[5]。TIMPs 是一个多基因家族的编码蛋白,基本功能是特异性抑制 MMPs 活性。TIMP-2 与活化的 MMP-2 形成复合物,能有效抑制 MMP-2 的胶原分解活性及明胶活性,从而抑制基底膜和血管外基质被分解,限制细胞的局部生长和移动。给大鼠主动脉转染含有人 TIMP-2 的腺病毒载体,造成中膜 TIMP-2 mRNA 和蛋白的高表达,发现 MMP2 活性受抑制,平滑肌细胞迁移能力降低,新生内膜面积明显减少^[6]。

本实验中,对照组与缬沙坦组的 MMP-2 阳性表达率分别为 $(62.48 \pm 4.72)\%$ 、 $(45.46 \pm 4.79)\%$,TIMP-2 表达率分别为 $(48.31 \pm 4.87)\%$ 、 $(65.04 \pm 4.59)\%$ 。与对照组比较,缬沙坦组 MMP-2 的表达降低,而 TIMP-2 表达明显增多,两组差异均具有统计学意义。表明缬沙坦可能通过抑制 MMP-2 表达、促进 TIMP-2 表达来抑制移植静脉 SMCs 迁移、增殖。已有研究证实,对高脂饮食后新西兰白兔动脉粥样硬化模型予洛沙坦进行干预,发现治疗组动脉内膜狭窄面积明显减少,且 MMP-1 表达明显减少,而 TIMP-2 在内膜中聚集表达^[7]。建立大鼠动脉粥样硬化模型,并给予洛沙坦干预,发现洛沙坦组 MMP-2、MMP-9 的活性及表达水平降低,说明洛沙坦具有抑制 MMP-2、MMP-9 的作用^[8]。对颈动脉斑块患者进行颈动脉内膜切除术前 4 个月给予伊贝沙坦 300mg/d 或氯噻酮 50mg/d,术后斑块检查发现,伊贝沙坦组 MMP-2、MMP-9 表达和 VSMC 均明显减少^[9]。本研究结果与以上结果相符。

AT₁ 受体拮抗剂临床试验 Val-REST 试验与 Valvace 试验均已证实缬沙坦对支架术后再狭窄的防治作用,而且其效果优于血管紧张素转换酶抑制剂^[10,11]。本实验为临床验证缬沙坦对移植静脉再狭窄的干预作用提供了依据,对相关患者的初步观察也显示了令人鼓舞的结果。缬沙坦抑制移植静脉内膜增生的机制可能与抑制 MMP-2 表达、促进 TIMP-2 表达有关,对于其中具体的分子生物学机制,尚需进一步的研究。

(下转第 419 页)

参考文献

- [1] Braunwald E. Unstable angina; an etiologic approach to management. *Circulation*, 1998, 98:2219-2222.
- [2] A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association. Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction.
- [3] Armstrong PW, Fu Y, Chang WC, et al. Acute coronary syndromes in the GUSTO-II b trial; prognostic insights and impact of recurrent ischemia. The GUSTO-II b investigators. *Circulation*, 1998, 98, 1860-1868.
- [4] Foley RN, Parfrey PS, Samak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9(Suppl 12):s16-s23.
- [5] Jurlander B, Farhi ER, Banas JJ, et al. Coronary angiographic findings and troponin T in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 2000, 85:810-814.
- [6] Dangas G, Mehran R, Wallenstein, et al. Correlation of angiographic morphology and clinic presentation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 29:519-525.
- [7] Okamoto K, Takano M, Sakai S, et al. Elevated troponin T levels and lesion characteristics in Non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Circulation*, 2004, 109:465-470.

(上接第 403 页)

参考文献

- [1] Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Cir Res*, 1999, 84, 695-703.
- [2] Lau GT, Lowe HC, Kritharides L. Cardiac saphenous vein bypass graft disease. *Semin Vasc Med*, 2004, 4, 153-159.
- [3] Li ZH, Froehlich J, Galis ZS, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension*, 1999, 33, 116-123.
- [4] Kuzuya M, Kanda S, Sasaki T, et al. Deficiency of gelatinase suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*, 2003, 108, 1375-1381.
- [5] Rotmans JI, Velema E, Verhagen HJ, et al. Matrix metalloproteinase inhibition reduces intimal hyperplasia in a porcine arteriovenous-graft model. *J Vasc Surg*, 2004, 39, 432-439.
- [6] Cheng L, Mantile G, Pauly R, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness *in vitro* and modulates neointimal development *in vivo*. *Circulation*, 1998, 98, 2195-2201.
- [7] Chen H, Li D, Mehta JL. Modulation of matrix metalloproteinase-1, its tissue inhibitor, and nuclear factor-kappa B by losartan in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39, 332-339.
- [8] Liang C, Wu ZG, Ding J, et al. Losartan inhibited expression of matrix metalloproteinases in rat atherosclerotic lesions and angiotensin II-stimulated macrophages. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25:1426-1432.
- [9] Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, et al. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E₂-dependent matrix metalloproteinase activity. *Circulation*, 2004, 109, 1482-1488.
- [10] Peters S, Gotting B, Trummel M, et al. Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions; the VAL-PREST trial. *J Invasive Cardiol*, 2001, 13:93-97.
- [11] Peters S, Trummel M, Meyners W. Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation—results of the VALVACE trial. *Int J Cardiol*, 2005, 98:331-335.