

· 基础研究 ·

外加低压稳恒直流电场对兔腹主动脉球囊损伤后血管新生内膜增生的影响

刘志涛, 张 萍, 何国祥*, 刘建平

(第三军医大学西南医院心血管内科, 重庆 400038)

【摘要】目的 探讨外加低压稳恒直流电场对血管损伤后新生内膜增生的影响。**方法** 健康日本大耳白兔 65 只, 随机分为正常对照组、假手术组以及实验组, 其中实验组分为 3.0V、4.0V 两个亚组。建立兔腹主动脉球囊损伤模型后, 在兔腹主动脉两侧腰大肌内埋植一对铂电极, 实验组给予电刺激 (3.0V/cm 或 4.0V/cm, 30min/d)。于术后 1 周、2 周及 4 周留取血管标本, HE 染色观察血管新生内膜增生情况, 天狼猩红染色及 Western blot 观察血管损伤后 型、 型胶原蛋白的表达。**结果** 血管内膜损伤后 1 周, 实验组与假手术组之间内/中膜面积比无显著差异。血管内膜损伤后 2 周及 4 周, 3.0V 实验亚组和 4.0V 实验亚组内/中膜面积比显著低于假手术组 ($P < 0.01$)。3.0V 和 4.0V 实验亚组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。天狼猩红染色显示术后 4 周, 3.0V 实验亚组和 4.0V 实验亚组的血管新生内膜中 型、 型胶原蛋白的表达低于假手术组。Western blot 结果显示术后 4 周, 实验组 型、 型胶原蛋白的表达与假手术组相比, 差异无统计学意义。**结论** 适宜的外加稳恒直流电场抑制血管损伤后新生内膜的增生, 同时抑制新生内膜 型、 型胶原蛋白的表达, 但对血管壁总 型、 型胶原蛋白表达无影响。

【关键词】 电场; 新生内膜增生; 胶原; 球囊损伤

【中图分类号】 R543

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00115

Effects of low-voltage steady direct current electric fields on neointimal hyperplasia after abdominal aorta balloon injury in the rabbit model

LIU Zhitao, ZHANG Ping, HE Guoxiang*, LIU Jianping

(Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects and mechanisms of steady direct current (DC) electric fields (EFs) on neointimal hyperplasia after abdominal aorta balloon injury in rabbit model. **Methods** A total of 65 healthy Japanese white rabbits were randomly divided into control group, sham-operation group and experiment group. The experiment group was further divided into 3.0V group and 4.0V group, in which corresponding interventions of DC EFs were applied. The abdominal aorta balloon injury models were firstly established, and then the electrodes were implanted into the bilateral psoas major muscle in sham-operation and experiment groups. The rabbits were sacrificed after 1, 2 and 4 weeks, and the vascular specimens were collected. Neointimal hyperplasia was observed using HE staining. Expressions of type-I and type- collagen were detected by sirius red staining and Western blot. **Results** There was no difference in the tunica intima/media ratio between sham-operation group and experiment group at 1 week post-operatively. Two weeks and four weeks after the balloon injury, the tunica intima/media ratios in the 3.0V and 4.0V groups were smaller than those in control group ($P < 0.01$), but there was no significant difference between 3.0V and 4.0V groups ($P > 0.05$). Sirius red staining showed that the expressions of type-I and type- collagen protein in the neointimal of 3.0V and 4.0V groups were lower than those in control group. Western blot showed that there was no significant difference in type-I and type- collagen expression between experiment group and sham-operation group at 4 weeks after the operations. **Conclusion** Application of steady DC EFs can inhibit neointimal hyperplasia and reduce collagen expression after the abdominal aorta balloon injury in rabbit model. Steady DC EFs inhibits type-I and type- collagen expression in new formed neointima, but not in the vascular wall.

【Key words】 electric fields; neointimal hyperplasia; collagen; balloon injury

经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 治疗术对动脉的损伤会引起一系

列的变化, 导致靶病变处血管新生内膜形成及增生, 造成再狭窄 (restenosis, RS)。血管平滑肌细胞

(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的增殖和迁移是RS的主要病理机制^[1]。组织损伤后伤口及其附近上皮存在的损伤电流场源是一种稳恒直流电场,部分离体实验也发现,外加电场可以影响内皮细胞和VSMCs的增殖、迁移以及细胞的排列^[2]。本研究探讨外加稳恒直流电场对兔腹主动脉球囊损伤后新生内膜增生的影响及其意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康日本大耳白兔 65 只,雌雄不限,体质量(1.98 ± 0.23) kg,由第三军医大学实验动物中心提供。动物实验依照第三军医大学动物实验委员会许可的协议进行。随机分为正常对照组($n=5$)、假手术组($n=24$)及实验组($n=36$)。假手术组与实验组手术过程完全相同,也埋置电极但不给予电场刺激。假手术组及实验组分别观察至术后1天、1周、2周以及4周,实验组根据施加电场强度不同分为3.0V/cm和4.0V/cm两个亚组,术后第2天开始电治疗。

1.2 主要试剂、材料和仪器

HE染色;天狼猩红购自海泛柯生物科技有限公司;鼠抗兔型胶原单克隆抗体购自Abcam公司;鼠抗兔型胶原单克隆抗体购自Calbiochem公司;GAPDH(V-18)购自Santa Cruz公司;WYJ数字显示高精度直流稳压电源购自上海山杰科技有限公司;Western blot凝胶成像系统购自Bio-Rad公司;显微镜下图像应用Olympus BX51显微图像采集系统采集;图像分析均使用Image Pro Plus 6.0图像分析软件;Western blot结果分析使用Quangtity One软件。自制铂电极(电极直径0.40mm,长20mm,导线长约30cm)。

1.3 动物模型构建

兔经耳缘静脉注射3%戊巴比妥1ml/kg麻醉。分离兔右侧股动脉约2~3cm长,纵向逐层切开下腹壁暴露腹腔,显示腹主动脉下段与髂总动脉分叉处。从股动脉插入带有PTCA导丝支持的2.5mm×20.0mm PTCA球囊,推送至腹主动脉下段,使球囊头端距离腹主动脉分叉处5.0cm。球囊加压至12标准大气压(atmospheric pressure, atm)后,回拉球囊直至髂总动脉分叉处,然后释放压力。以上过程共3次,每次间隔时间1min。术毕,撤出球囊导管,结扎股动脉近端。将两针状铂电极分别插入兔腹主动脉

两侧腰大肌缝扎固定,保持两电极平行,电极距离腹主动脉约1cm,电极下端与腹主动脉与髂动脉分叉处持平。将两电极导线通过皮下隧道引至兔颈后,缝扎固定于体外。庆大霉素溶液冲洗腹腔后,逐层缝合皮下及皮肤,青霉素400 000U肌肉注射3d。

1.4 血管新生内膜增生的观察

将10%中性甲醛固定的血管组织常规石蜡包埋,切片,HE染色后显微镜下观察,通过计算机图像分析软件Image Pro Plus 6.0分析内膜、中膜面积,计算内膜/中膜面积比值。

1.5 天狼猩红染色

将石蜡包埋的血管组织切片,用天狼猩红染色,在暗视野条件下,偏振光显微镜观察。天狼猩红染色后,胶原纤维呈现不同的折光性和颜色,I型胶原纤维紧密排列,显示很强的双折光性,为黄色或红色的纤维。II型胶原纤维有弱的双折光性,为各种不同颜色的疏松网状。III型胶原纤维显示弱的双折光性,呈绿色的细纤维。

1.6 Western blot 测定血管组织 I 型、III 型胶原蛋白表达

血管组织中总蛋白提取后,蛋白质定量绘制标准曲线,测定样品浓度,灌制10%SDS-PAGE,上样量为30μg, Bio-Rad公司Mini系电泳槽进行电泳,转至PVDF膜,加入一抗、二抗等系列操作后用凝胶扫描成像系统扫描成像,并用Quantity One-4.4.0图像分析软件进行分析,蛋白表达量以“目的蛋白/GAPDH”的光密度比值表示。

1.7 统计学处理

所有计量资料数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS11.5软件行单因素方差分析,*L.S.D-t*检验及*Dunnett-t*检验作为验后多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

本研究65只动物中,1只动物死于腹腔感染,1只死于肠梗阻,1只无明显原因死亡,将这3只动物剔除。其余兔健康存活,纳入研究。

2.2 外加电场对血管损伤后内/中膜面积比值的影响

HE染色后光镜下观察可见,假手术组正常动脉内膜仅见单层内皮细胞,内皮层下未见有中膜

VSMCs 潜入。球囊损伤 1d 后, 动脉内皮剥脱, 管腔内表面尚无增殖的 VSMCs。内膜损伤后 1 周, 新生内膜形成并逐渐增厚, 其中可见较多增殖的 VSMCs, 分布不均, 排列紊乱, 内/中膜面积比为 $(8.43 \pm 1.39)\%$ 。内膜损伤 2 周后, 新生内膜厚度明显增加, 最厚处约为中膜厚度的 1/2, 内/中膜面积比为 $(20.88 \pm 1.84)\%$ 。损伤后 4 周, 新生内膜继续增厚, 最厚处约等于中膜厚度, 内/中膜面积比为 $(46.92 \pm 5.79)\%$ 。在 3.0V 电场干预组, 内膜损伤后 1 周、2 周及 4 周内/中膜面积比分别为 $(8.28 \pm 1.31)\%$, $(16.12 \pm 2.65)\%$, 及 $(28.07 \pm 3.63)\%$, 与对照组相比显著减小 ($P < 0.01$)。在 4.0V 电场干预组, 内膜损伤后 1 周、2 周及 4 周内/中膜面积比分别为 $(7.93 \pm 1.76)\%$, $(14.80 \pm 1.51)\%$ 及 $(27.58 \pm 4.27)\%$, 也明显小于假手术组 ($P < 0.01$), 但与 3.0V 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 1, 图 2)。

2.3 外加电场对血管损伤后 I 型、III 型胶原的影响

天狼猩红染色后偏振光纤维镜下观察, 可见各组血管壁内较丰富橙黄色 I 型胶原, 主要分布于外膜, 仅有少量绿色 III 型胶原表达。术后 1 周, 各组新生内膜已形成, 但内膜中未见橙黄色和绿色条纹。术后 2 周, 新生内膜厚度明显增加, 内膜中可见少许橙黄色条纹, 在电场干预 3.0V、4.0V 组新生内膜厚度小于对照组, 内膜中未见橙黄色条纹; 术后 4 周, 新生内膜继续增厚, 新生内膜中可见较多的橙黄色斑条纹, 并有少许绿色细条纹夹杂其中, 在电场干预 3.0V、4.0V 组, 新生内膜厚度小于假手术组, 新生内膜中的橙黄色斑条纹较对照组显著减少 (图 3, 图 4)。Western blot 结果显示, 在术后 4 周, 无论是 3.0V 还是 4.0V 实验亚组, 其 I、III 型胶原蛋白的表达与假手术组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 5, 图 6)。

3 讨论

血管损伤后的内膜增生是一个复杂的过程。内皮细胞损伤诱导血栓形成, 血栓形成后的 24h 内, VSMCs 即开始增生。正常内皮细胞产生很多因子如前列环素和硫酸类肝素等, 这些物质抑制 VSMCs 增殖^[3]。损伤的内皮细胞产生硫酸类肝素量减少, 同时由内皮细胞产生的其他抑制 VSMCs 增殖的因子如一氧化氮的产量亦降低, 而死亡或损伤的内皮细胞和 VSMCs 释放许多促增殖物质, 刺激 VSMCs 增殖^[4]。因此, 血管壁损伤后降低了抑制性生长因子的产量而增加了刺激性生长因子的表达量, 使其平衡向有利于 VSMCs

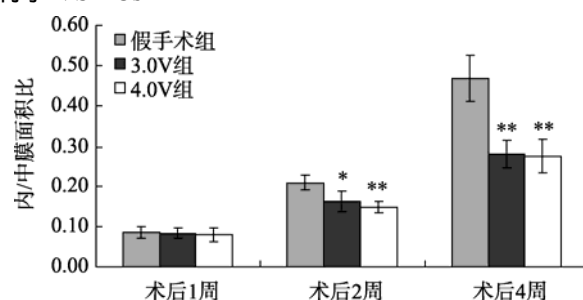


图 1 各组不同时间点内/中膜面积比
Figure 1 Ratio of the tunica intima area to media area of the neointima
与同时点与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

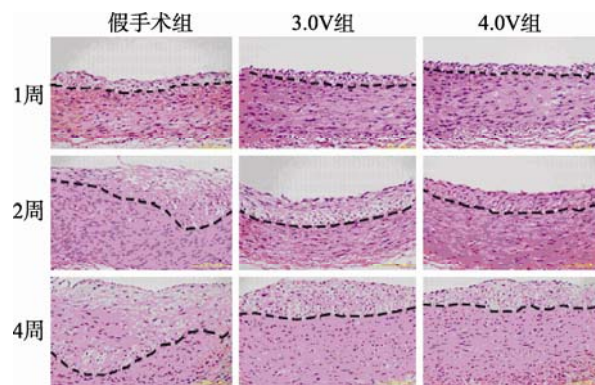


图2 各组不同时相点新生内膜增生情况
Figure 2 Neointimal formation of the abdominal aorta after balloon injury operation in different groups (HE×100)

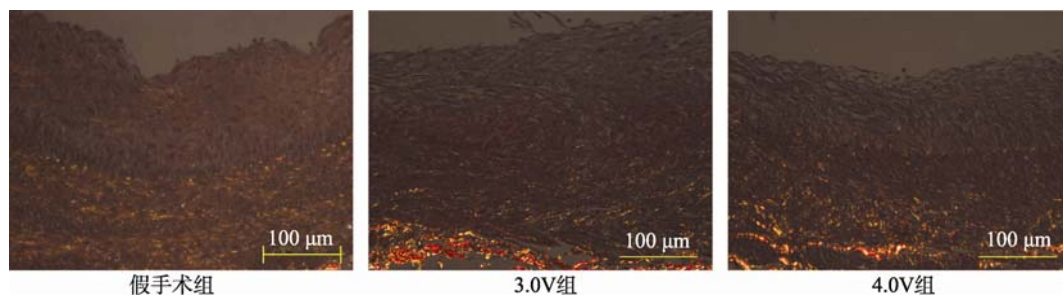


图 3 天狼猩红染色术后 4 周各组间内膜 I 型胶原比较
Figure 3 Expressions of type-I collagens in different groups at 4 weeks after surgery (Sirius red dye staining)

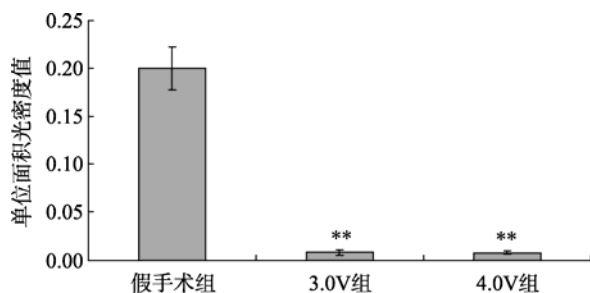


图 4 术后 4 周各组间内膜 Ⅰ型胶原单位面积光密度值比较

Figure 4 Absorbance value of type-I collagens in different groups at 4 weeks after surgery
与假手术组比较, ** $P < 0.01$

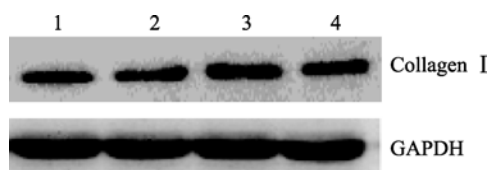


图 5 Western blot 检测血管 Ⅰ型胶原蛋白的表达

Figure 5 Expression of type-I collagens detected by western blot
1: 正常对照组; 2: 假手术组 4 周; 3: 3.0V 组 4 周; 4: 4.0V 组 4 周

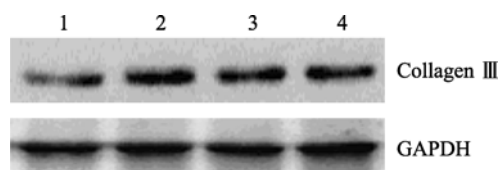


图 6 Western blot 检测血管 Ⅲ型胶原蛋白的表达

Figure 6 Expression of type-III collagens detected by western blot
1: 正常对照组; 2: 假手术组 4 周; 3: 3.0V 组 4 周; 4: 4.0V 组 4 周

增殖的方向移动。新生内膜的最终形成是 VSMCs 通过增殖聚集, 持续性迁移或者是两者的结果, 同样也是大量细胞外基质合成的结果。VSMCs 聚集过程和细胞外基质产生紧密联系, 刺激 VSMCs 增殖的相同因子, 同时也增加细胞外基质的含量^[3]。

唐波等^[5]的研究发现, 在外加直流电场的作用下, VSMCs 向电场阴极面作定向迁移, 迁移速度也明显增加, 电场作用下 VSMCs 的定向迁移是与细胞生长相关的一种主动行为, 而不是在电场作用下的一种被动的泳动。Azadniv 等^[6]的研究也发现, 外加电场可以抑制体外培养的哺乳动物细胞的增殖。以上研究均表明, 外加电场可以影响 VSMCs 的增殖和迁移。本研究中发现, 球囊损伤后 2 周及 4 周, 新生内膜厚度显著增加; 3.0V 及 4.0V 实验亚组内皮损伤后 2 周及 4 周的内/中膜面积比均显著小于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但不同实验亚组间相比, 差异无统计学意义。这表明外加一定强度范围的稳恒直流电场可以抑制新生内膜的形成。

目前的研究表明, 细胞外基质的重建, 尤其胶

原纤维的重建 (Ⅰ型、Ⅲ型胶原) 与 VSMCs 迁移和增生有密切的关系, 血管内膜损伤后增生的细胞外基质主要来自于中膜的 VSMCs 和外膜活化后的肌成纤维细胞, 细胞外基质是 VSMCs 增殖所必需的。Abid 等^[7]的研究显示, 自发性高血压大鼠 VSMCs 增殖的同时, Ⅰ型胶原 mRNA 的表达增加, VSMCs 增殖伴细胞外基质的分泌。血管细胞外基质是维持血管壁结构完整和功能正常的必要保证, 正常动脉血管中的胶原以 Ⅰ型、Ⅲ型和 Ⅱ型为主, 主要由 VSMCs 合成分泌^[8]。

我们的研究发现, 天狼猩红染色后偏振光显微镜下观察, 正常血管壁内的胶原以 Ⅰ型胶原为主, 主要分布于外膜, 少量 Ⅲ型胶原夹杂其中, 明显少于 Ⅰ型胶原。术后 1 周, 各组新生内膜已形成, 但内膜中均未见 Ⅲ型胶原。术后 2 周, 新生内膜厚度明显增加, 内膜中可见少许 Ⅰ型胶原, 在 3.0V、4.0V 实验亚组新生内膜厚度小于对照组, 内膜中未见 Ⅲ型胶原; 术后 4 周, 新生内膜继续增厚, 新生内膜中可见较多的 Ⅰ型胶原, 并有 Ⅲ型胶原夹杂其中; 3.0V 和 4.0V 实验亚组新生内膜厚度小于对照组, 新生内膜中的 Ⅰ型胶原明显少于对照组。3.0V 和 4.0V 亚组之间内膜胶原含量未见差异。这表明外加电场在抑制新生内膜形成的同时也抑制了细胞外基质的分泌。Western blot 结果显示, 在术后 4 周, 3.0V 亚组、4.0V 亚组 Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白的表达与对照组相比, 差异亦无统计学意义, 3.0V 亚组、4.0V 亚组

Ⅰ型胶原蛋白的表达与对照组相比, 差异无统计学意义, 表明电场干预没有改变血管壁总的胶原蛋白含量, 这可能是因为血管壁总胶原蛋白主要由血管外膜胶原蛋白组成, 血管内膜内的胶原蛋白含量变化对血管总胶原蛋白含量的变化无明显影响。

既往有研究发现, 外加电场可以促进新生内膜增生, 从而形成管腔的狭窄, 这一作用甚至被人们用来制作血管损伤模型^[9]。但在这些研究中产生血管损伤作用的电场均为高频脉冲电场, 刺激电流均高于 1mA, 并且刺激电极与血管外膜紧密接触, 而我们采用的是低压稳恒直流电场, 刺激电极置于腰大肌内, 不与血管直接接触, 经过血管的电流极小。这可能是本研究中血管产生不同效应的主要原因。

总之, 外加适宜的低压稳恒电场可以抑制血管损伤后新生内膜的形成, 同时抑制血管内膜 Ⅰ型胶原蛋白的生成, 这可能有助于改善血管损伤后内皮依赖性舒张功能。

【参考文献】

- [1] Slavin L, Chhabra A, Tobis JM. Drug-eluting stents: preventing restenosis[J]. *Cardiol Rev*, 2007, 15(1): 1-12.
 - [2] 唐波, 何国祥. 电场对细胞生物学行为的影响[J]. *国外医学心血管疾病分册*, 2003, 30(6): 350-353.
 - [3] Sottirurai VS, Yao JST, Batson RC, *et al.* Distal anastomotic intimal hyperplasia: histopathologic character and biogenesis[J]. *Ann Vasc Surg*, 1989, 3(1): 26-33.
 - [4] Kairuz EM, Barber MN, Anderson CR, *et al.* C-type natriuretic peptide (CNP) suppresses plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) *in vivo*[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3): 574-582.
 - [5] 唐波, 何国祥, 刘建平, 等. 电场干预对血管平滑肌细胞形态和细胞骨架的影响[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(21): 70-72.
 - [6] Azadniv M, Miller MW, Cox C, *et al.* On the mechanism of a 60-Hz electric field induced growth reduction of mammalian cells *in vitro*[J]. *Radiat Environ Biophys*, 1993, 32(1): 73.
 - [7] Abid MR, Yano K, Guo S, *et al.* Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(33): 29864-29873.
 - [8] 杜瑶瑶, 王宪, 孔炜. 细胞外基质、基质水解酶与血管钙化[J]. *生理科学进展*, 2008, 39(3): 203-208.
 - [9] Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, *et al.* Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice[J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(2): 761-776.
- (编辑: 王雪萍)

· 消 息 ·

诚征广告

《中华老年多器官疾病杂志》是由中国人民解放军总医院主管、中国人民解放军总医院老年心血管病研究所和中国科技出版传媒股份有限公司主办、国内外公开发行的医学学术期刊, 主要交流老年心血管疾病, 尤其是老年心血管疾病合并其他疾病、老年两个以上器官疾病以及其他老年多发疾病的诊治经验与教训。刊登内容包括心血管系统、呼吸系统、神经系统、内分泌系统、肾脏系统、消化系统、骨骼系统等各个方面疾病, 涉及临床和基础研究等诸多领域, 为从事老年医学及其相关疾病专业的医疗、科研及教学人员必读的刊物。

过去的几年, 本刊以严谨的态度、诚实的信誉赢得了厂商和读者的信赖, 与许多公司建立了良好的长期合作关系。

《中华老年多器官疾病杂志》真诚欢迎国内外厂商来此发布药物、产品、技术和服务信息。我刊除彩色四封外, 还有精美彩色、黑白插页供选择。

需要刊登广告的客户, 可电话告知您的传真, 我们会立即将报价单传真给您, 洽商确定版位后, 将与您签订正式的刊登合同。

地址: 100853 北京市复兴路 28 号, 解放军总医院老年心血管病研究所

100088 北京市西城区德胜门外大街 83 号德胜国际中心 B 座 301 室, 中国科技出版传媒股份有限公司

电话: 010-66936756/59790736-8087

E-mail: zhlnsqg@mode301.cn