

文章编号:1005-6947(2005)07-0542-02

· 简要论著 ·

ET-1, cmy-c 在自体静脉移植血管内膜增殖表达意义

刘喜才¹, 宋清斌², 张灿刚¹, 袁辉刚¹

(1. 辽宁省本溪市中心医院 普通外科, 辽宁 本溪 117000; 2 中国医科大学附属第一医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:为观察内皮素、cmy-c 在自体移植静脉术后内膜增生中的相互作用,探讨移植静脉术后再狭窄的机制。笔者应用免疫组化技术观察内皮素、cmy-c 在自体移植静脉术后内膜增生中的表达。结果表明移植静脉术后早期,内皮素 1(ET-1)在平滑肌细胞出现阳性表达,术后 1 周开始增多,到术后 2 周达高峰,4 周开始减少,而 cmy-c 亦在同时期表达,1 周后逐渐呈高表达,在移植静脉术后 2 周后表达逐渐减少,二者与增殖细胞核抗原(PCNA)表达呈一致性改变。ET-1, cmy-c 术后 1~2 周表达与早期表达有显著差异($P < 0.05$), ET-1 与 cmy-c 呈正相关($r = 0.36$)。提示在血管移植术后 ET-1 与 cmy-c 之间存在调控作用,即 ET-1 可以激活 cmy-c,使静止期 SMC 进入增殖期,产生血管平滑肌细胞(SMC)过度增殖,同时表明 ET-1 可能是 cmy-c 等早期应答基因持续增殖一个重要原因,这也为今后应用 ET-1 抑制剂加反义 cmy-c 抑制内膜增殖提供了一定的理论依据。

关键词:移植, 自体; 静脉移植; 血管内膜增殖, 内皮素; cmyc

中图分类号: R617; R322.12 **文献标识码:** B

本研究通过建立自体静脉移植模型,观察内皮素、cmy-c 在自体移植静脉术后内膜增生中的作用,探讨其在移植静脉术后再狭窄的意义。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 大鼠 80 只,雌雄不拘,体重(230 ± 50)g,由中国医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂和仪器

(1)小鼠抗大鼠 c-myc 抗体、小鼠 SP 免疫组织化学染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。(2)增殖细胞核抗原(PCNA)抗体购自英国 Calbiochem 公司。(3) α -actin 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。(4)内皮素 1(ET-1)抗体由日本滋贺医科大学赞助提供。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立和标本的收集 大鼠按 20% 水合氯醛 2 mL/kg 行腹腔注射麻醉,在显微手

术镜下行无菌显微外科手术操作。取大鼠右颈部切口长约 1 cm,暴露右颈静脉,游离并切取该静脉长约 0.4 cm,置于装有肝素盐水的培养皿中,轻轻搅拌,以去除静脉内的血液备用。取大鼠腹正中切口长约 3 cm,暴露肾下腹主动脉游离腹主动脉约 1 cm,注意勿损伤下腔静脉,在充分游离的腹主动脉远近端各置阻断夹以阻断血流,于阻断中部切断动脉,肝素盐水冲洗动脉管腔,用 9-0 血管缝合线将备用的静脉端端吻合移植于腹主动脉两断端间,每个吻合口缝 8~10 针。吻合完毕后,先放开远端动脉夹,再放开近端动脉夹。如有漏血可在局部覆以无菌纱布片刻,必要时行漏血处加针修补。根据血管充盈情况、远端勒血试验确定血管是否通畅。确认通畅及无出血后,关闭腹腔。术后大鼠于耳缘做切口标记,分笼饲养。大鼠成模后随机分成 10 组,每组 10 只,分别手术后 6, 24, 72, 1 周, 10d, 2, 3, 4, 6, 8 周切取移植静脉及相连动脉远近端 0.2cm。肝素盐水冲洗后备用。

1.3.2 标本制备及检测项目 将切取静脉分别置于 10% 福尔马林液固定,24h 之内将福尔马林溶液固定的标本制成 4 μ m 厚石蜡切片,分别行 HE 染色、 α -actin 染色、PCNA 及 ET-1、cmy-c 免疫组织化

收稿日期:2004-07-29; 修订日期:2004-11-23。

作者简介:刘喜才(1966-),男,辽宁本溪人,辽宁省本溪市中心医院副主任医师,硕士,主要从事血管方面的研究。

通讯作者:刘喜才 电话:0414-8666056。

学染色。免疫组织化学方法采用链菌素抗生物素蛋白-过氧化酶法(SP法)。检测步骤按试剂盒说明。

1.3.3 结果判定 ET-1, α -actin 染色均定位于胞浆, PCNA, cmy-c 染色定位于胞核, 每张切片随机选取10个高倍视野, 每个视野观察100个细胞, 计数阳性细胞百分数, 阳性细胞数 < 10% 为阳性, 记为(-); 阳性细胞数 10% ~ < 50% 为阳性, 记为(+); 阳性细胞 \geq 50% 为强阳性, 记为(++).

1.4 统计学分析

实验结果采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 移植血管中 ET-1, PCNA, α -actin 的表达

2.1.1 α -Actin 的表达 α -actin 在平滑肌细胞胞浆中表达, 为弥漫性棕黄色沉淀, 本实验移植静脉表达阳性率为 31.3% (25/80), 强阳性率为 28.8% (23/80)。

2.1.2 ET-1 表达 ET-1 主要在血管内皮细胞及平滑肌细胞胞浆中表达, 呈棕黄色颗粒, 术后早期(6~72h)移植静脉即有 ET-1 阳性表达的平滑肌细胞出现, 于术后1周开始明显增多, 至术后10d至2周达到高峰, 4周以后逐渐减少。

2.1.3 ET-1 表达与 PCNA 表达的相关性 本组结果表明 ET-1 表达与 PCNA 表达密切相关 ($P < 0.05$), 说明 ET-1 具有促进移植血管内皮及平滑细胞增生的作用(表1)。

表1 ET-1 表达与 PCNA 表达的相关性

指标	ET-1(-)	ET-1(+)	ET-1(++)
PCNA(-)	35 [†]	8	6
PCNA(+)	8	14 [†]	2
PCNA(++)	5	5	13 [†]

注: [†]ET-1 与 PCNA 表达密切程度 ($P < 0.05$)

2.1.4 cmy-c 蛋白表达 移植后 6, 24, 48h cmy-c 蛋白表达逐渐增加, 移植1周达高峰, 2周时开始降低(表2)。

表2 移植静脉(吻合口)cmy-c 蛋白表达

时间	例数	cmy-c
6h	5	4.23 \pm 1.12
24h	5	9.23 \pm 1.23
48h	5	9.38 \pm 3.23
1周	5	16.29 \pm 6.78
2周	5	10.21 \pm 4.39
4周	5	6.26 \pm 2.01

3 讨论

ET-1 是目前已知的最强血管收缩剂, 同时亦是一种强大的血管平滑肌细胞生长和增殖多肽^[1~2], 而早期应答基因 cmy-c 表达蛋白作为一个获能因子, 是 DNA 合成所必须的。Miano^[3] 等研究认为, 早期应答基因的诱导表达与细胞从 G0 到 G1 期的转化, 并维持细胞增殖密切相关^[4~5]。

本实验用免疫组化方法检测移植血管平滑的细胞 α -actin 的表达, 目的是观察 ET-1, PCNA 阳性细胞是否为平滑肌细胞, 用以识别平滑的细胞。实验结果表明移植血管 ET-1, PCNA 主要在平滑肌细胞表达, 证实平滑肌细胞增殖是血管内膜增生的核心, 本研究结果表明移植静脉术后早期, ET-1 在平滑肌细胞出现阳性表达, 术后1周开始增多, 到术后2周达高峰, 4周开始减少, 而 cmy-c 亦在同时期表达, 1周后逐渐呈高表达, 在移植静脉术后2周后表达逐渐减少, 两者与 PCNA 表达呈一致性改变。ET-1, cmy-c 术后1~2周表达与早期表达(72h)有显著差异 ($P < 0.05$), ET-1 与 cmy-c 呈正相关 ($r = 0.36$) 表明在血管移植术后 ET-1 与 cmy-c 之间存在调控作用即 ET-1 可以激活 cmy-c, 使静止期 SMC 进入增殖期, 产生 SMC 过度增殖, 同时表明 ET-1 可能是 cmy-c 等早期应答基因持续增殖一个重要原因, 这也为今后应用 ET-1 抑制剂加反义 cmy-c 抑制内膜增殖提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 徐为, 沈士刚. 内皮素-1 与梗阻性黄疸大鼠应激性关系的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(7): 508-510.
- [2] 杨文军, 雷正明. 一氧化氮、内皮素-1 和肝筛在鼠淤胆性肝纤维化中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(10): 600-604.
- [3] Miano JM, Vlastic N, Tota RR, *et al.* Immediate early gene activation in aortic rat smooth muscle cells following vascular injury: relationship to in vivo growth factor expression and DNA synthesis [J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11(2): 1410.
- [4] Riabowol KT, Vosetka RJ, Ziff EB, *et al.* Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(3): 1670-1676.
- [5] Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: a review [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1995, 9(1): 7-18.