

文章编号:1005-6947(2008)06-0570-04

· 基础研究 ·

# 内源性内皮素转化酶在自体移植静脉术后的动态变化

刘喜财<sup>1</sup>, 宋清斌<sup>2</sup>, 张灿刚<sup>1</sup>

(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临床医学院 血管外科, 辽宁 沈阳 110053)

**摘要:**目的 探讨 ET-1 及内源性 ECE 对自体静脉移植术后内膜增生的作用。方法 通过建立自体静脉移植模型, 采用 RT-PCR 和免疫组织化学方法, 从 mRNA 水平和蛋白质水平分析 ECE 和 ET-1 在移植静脉的表达及影响。结果 移植术后 6 h, 吻合口处中膜即出现 PCNA 阳性平滑肌细胞, 并随着时间推移逐渐增高, 在 1~2 周左右达到高峰。2 周后, 中膜 PCNA 阳性 SMC 开始逐渐减少, 于术后 8 周趋于平稳。随着移植术后时间的推移, ET-1 的表达与 ECE 的表达逐渐增高, 手术后 1~2 周达到高峰, 2 周后表达逐渐下降, 于 8 周左右趋于平衡, ET-1 与 ECE 密切相关 ( $r = 0.975$ )。结论 静脉内膜增生病理过程的发生时间和变化规律与 ET-1 和 ECE 表达的动态变化过程吻合, 提示 ECE 参与移植静脉内膜的增殖过程。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(6): 570-573]

**关键词:** 静脉移植, 自体; 血管内膜, 增生; 血管平滑肌细胞; ET-1; ECE; 免疫组织化学; RT-PCR  
**中图分类号:** R 654.4 **文献标识码:** A

## Dynamic effect of endothelin-converting enzyme on intimal hyperplasia after venous autograft

LIU Xicai<sup>1</sup>, SONG qingbin<sup>2</sup>, ZHANG Cangang<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, the Central Hospital of Benxi City, Benxi, Liaoning 170000, China;

2. Department of Vascular Surger, the First Clinical College, China Medical University, Shenyang 110053, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effect of ET-1 and ECE on endothelial proliferation of autografted vein. **Methods** An animal model of the autogenous vein graft was established in 80 Wistar rats. The expression of ECE and ET-1 gene was determined by RT-PCR and immunohistological method to test the mRNA and protein expression level respectively. **Results** PCNA positive smooth muscle cells appeared 6 hours after transplantation, increased with time, and reached a peak at 1 to 2 weeks. After 2 weeks, PCNA positive SMC in the tunica media began to decline and recovered to the 6 hour level at 8 weeks after the operation. mRNA of ECE increased with the time after the operation, reached a peak after 1-2 weeks, declined afterwards, and became stable at around 8 weeks. Expression change of ET1 was similar to the change of ECE, reached the peak after 1-2 weeks and was stable after 8 weeks ( $r = 0.975$ ). **Conclusions** The time and pattern of change of the pathologic process of intimal hyperplasia are in agreement with the expression of ET-1 and ECE, and suggests that ECE is involved in the process of intimal hyperplasia of vein graft.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6): 570-573]

**Key words:** Veins Transplantation, Autologous; Tunica Intima, Hyperplasia; Smooth Muscle Cell; Endothelin-1; Endothelin Converting Enzyme; Immunohistochemistry; RT-PCR

**CLC number:** R 654.4

**Document code:** A

收稿日期: 2008-01-24; 修订日期: 2008-04-26。

作者简介: 刘喜财, 男, 辽宁省本溪市中心医院主任医师, 主要从事血管外科方面的研究。

通讯作者: 刘喜财 E-mail: lxc2896056@163.com

ECE 是一类以锌为辅基的肽酶,广泛存在于内皮细胞和一些分泌细胞内,主要沿细胞膜成簇排列<sup>[1-6]</sup>,大量实验表明 ECE 与 ET-1 的生物学活性密切相关,笔者通过建立自体静脉移植模型,观察内源性内皮素转化酶(ECE)在自体移植静脉术后的动态变化,探讨移植静脉术后再狭窄的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及材料

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。总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 为 GIBCO BRL 公司产品; cDNA 双链合成试剂盒(Universal RiboClone Cdna Synthesis System)为 Promega 公司产品; DNase I (RNase-free)为 Takara 公司产品;多聚酶链反应(PCR)扩增试剂为 Gene 公司产品;GAPOH 内对照引物购自上海生工生物工程公司。GAPDH 内对照引物根据 Fort 等<sup>[1]</sup>报告的大鼠组织的 GAPDH mRNA 序列设计合成。引物序列:上游引物为 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GGG-3';下游引物为 5'-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3';扩增片段长度为 443 bp。ECE 引物根据 Shimada 等<sup>[2]</sup>发表的大鼠组织的 ECE mRNA 序列设计合成。引物序列:上游引物为 5'-TGA CCA GCT CCA TCC TAA ACT CC-3';下游引物为 5'-GGT CTC AAA ATC CAG GAT CCT GC-3';扩增片段长度为 618 bp。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立和标本的收集 Wistar 大鼠(230 ± 50) g,用 2 mL/kg 20% 水合氯醛行大鼠腹腔注射麻醉后,在显微手术镜下取大鼠右颈部切口长约 1 cm,切取右颈静脉约 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;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;9-0 血管缝合线,将备用的静脉端吻合移植于腹主动脉,每个吻合口 8 ~ 10 针。关闭腹腔。术后大鼠于耳缘做切口标记,分笼饲养。将 80 只术后大鼠随机分成 10 组,每组 8 只。分别于手术后 6, 24, 72 h, 1 周, 10 d, 2, 3, 4, 6, 8 周切取移植静脉及远近端 0.2 cm 相连的腹主动脉,肝素盐水冲洗后备用。

1.2.2 内皮素-1(ET-1)表达的检测 切取静脉

分别置于 10% 福尔马林溶液固定和液氮冷冻固定。24 h 之内将福尔马林固定的标本制成 4 μm 厚石蜡切片,分别行 HE 染色、α-actin 染色,增殖细胞核抗原(PCNA)及内皮素 1(ET-1)免疫组织化学免疫组化染色;将液氮固定的移植静脉段经组织匀浆后行逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR),检测 ET-1 的表达情况。

1.2.3 RT-PCR 方法检测 ET-1 和 ECE 提取总 RNA 后,以 DNase I 消化,行 RT-PCR 扩增[以(GAPDH)为内对照进行 PCR 扩增]及反转录(cDNA 第一链合成),电泳取 10 μL RT-PCR 扩增产物加 2 μL 6 × 上样缓冲液,经 1% 琼脂糖凝胶 80 V 电压电泳 50 min,于凝胶成像系统 GDS800 上自动成像。应用凝胶成像及分析系统 GDS800 GelWorks 1D Advanced 软件进行定量分析。

1.2.4 结果判定 ET-1, α-Actin 染色均定位于胞浆,PCNA 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,阴性细胞数 < 10% 为阴性,记为(-);阳性细胞数 < 50% 为阳性,记为(+);阳性细胞 ≥ 50% 为强阳性,记为(++)。检测移植血管平滑肌细胞 α-Actin 的表达,目的是观察 ET-1 和 PCNA 阳性细胞是否为平滑肌细胞。

### 1.3 统计学处理

采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。直线相关分析 ECE 与 ET-1 相关性。应用计算机分析软件包,主要为生物电泳凝胶成像及扫描分析软件(Grab-IT 2.0 和 UVP Gelworks ID advanced version 2.5 软件包),用以分析 ECE RT-PCR 结果。

## 2 结果

### 2.1 ECE 基因 RT-PCR 检测结果

同一泳道中目的基因的表达量普遍高于内对照 GAPDH 产量,移植血管术后 7 d, 10 d, 2 周目的基因的表达产量高于移植血管术后其他时点(图 1)。

### 2.2 ECE, ET-1 基因定量分析结果

ECE 基因的表达产量在血管移植术后 24 h 即有所增加,7 d 至 3 周表达产量明显增加并达到高峰,3 周后开始下降,4 ~ 8 周基本恢复正常。ECE 和 ET-1 基因定量在时段与时点的结果经统计学分析,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 1-2) (图 2)。直线相关分析 ECE 与 ET-1 相关性,  $r = 0.975, P < 0.05$ 。

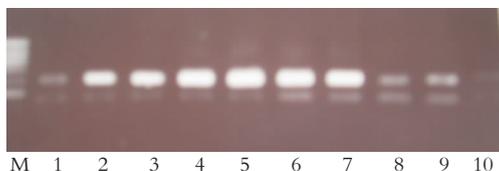


图1 ECE 基因 RT-PCR 结果 M:100 bp DNA LadderLane; 1~10 分别为移植血管术后 6,24 h,3,7,10 d,2,3,4,6,8 周

表1 ECE 基因定量分析结果 单位(bp)

术后不同时间	ECE 基因	GAPDH	ECE/GAPDH 值
6 h	174	145	1.2
24 h	452	156	2.9
3 d	726	177	4.1
7 d	1 149 <sup>1)</sup>	169	6.8
10 d	1 510 <sup>1)</sup>	182	8.3
2 周	1 714 <sup>1)</sup>	217	7.9
3 周	1 352 <sup>1)</sup>	208	6.5
4 周	608	196	3.1
6 周	382	201	1.9
8 周	180	164	1.1

注:1)术后 7,10 d,2,3 周基因的表达产量高于移植血管术后其他时点差异具有显著性( $P < 0.05$ )

表2 ET-1 定量分析结果 单位(bp)

术后不同时间	ET-1 基因	GAPDH	ECE/GAPDH 比值
6 h	182	793	0.23
1 d	266	542	0.49
3 d	458	819	0.56
7 d	548 <sup>1)</sup>	615	0.89
10 d	1037 <sup>1)</sup>	857	1.21
2 周	833 <sup>1)</sup>	764	1.09
3 周	778 <sup>1)</sup>	905	0.86
4 周	665	892	0.75
6 周	510	880	0.58
8 周	271	874	0.31

注:1)术后 7,10 d,2,3 周基因的表达产量高于移植血管术后其他时点差异具有显著性( $P < 0.05$ )

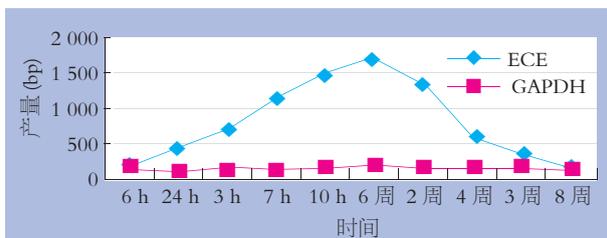


图2 ECE 基因定量分析结果

## 2.3 移植静脉内膜增生情况

移植后 6 h,吻合口处可见内膜的损伤和内弹力板的破坏,移植后 2 d 平滑肌细胞(SMC)开始增多,管壁开始增厚。移植后 7 d,吻合口处的内膜厚度逐渐增加,达到高峰,2 周后趋于平稳。 $\alpha$ -Actin 在平滑肌细胞胞浆中表达,为弥漫性棕黄色沉淀,阳性率为 31.3% (25/80),强阳性率为 28.8% (23/80)。移植后 6 h,移植静脉即可出现 PCNA 阳性的平滑肌细胞;术后 3 d,移植静脉可见较多的 PCNA 阳性细胞;PCNA 阳性平滑肌细胞在移植后 10 h 达到最高峰,此时无论中膜还是内膜均可见增多的 PCNA 阳性平滑肌细胞;术后 6 周至 8 周趋于平稳。

## 3 讨论

目前已发现有组织蛋白酶 D 样蛋白酶、中性蛋白酶和金属蛋白酶 3 种 ECE。ECE 具有外切酶活性,可以特异性地作用于 ET-1 的前体——大内皮素(big endothelin)含有 38 个氨基酸的前体形式,通过对其 C 末端进行特殊的蛋白加工过程。即对 C 末端 32~37 氨基酸残基进行蛋白水解过程,使其成为有活性的 ET-1 并分泌至细胞外,发挥生物学活性。大量实验表明 ECE 与 ET-1 的生物学活性密切相关,是 ET-1 发挥生物功能的重要调节因素。

本研究发现,在 mRNA 水平,随移植术后时间的推移,ECE 和 ET-1 的表达逐渐增高,即从术后 24 h 即开始出现增高,以后逐渐增高的趋势,于 7 d 开始逐渐进入高峰期。直至 3 周开始下降,4~8 周基本恢复正常。 $\alpha$ -Actin 在平滑肌细胞胞浆中表达为弥漫性棕黄色沉淀,本实验结果显示阳性率为 31.3% (25/80),强阳性率为 28.8% (23/80),表明移植血管 ET-1 和 PCNA 主要在平滑肌细胞表达,血管平滑肌细胞增殖是血管内膜增生的核心。移植后 6 h,移植静脉即可出现 PCNA 阳性的平滑肌细胞,术后 3 d,移植静脉可见较多的 PCNA 阳性细胞;PCNA 阳性平滑肌细胞在移植后 10 d 达到最高峰,此时无论中膜还是内膜均可见增多的 PCNA 阳性平滑肌细胞;术后 6 周至 8 周趋于平稳。ECE 基因的表达产量 7 d 至 3 周高于移植血管术后其他时点,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。表明 ECE 参与移植静脉内膜增生的过程,ET-1 与 ECE 密切相关( $r = 0.975$ )。关于 ECE 确切的作用机制,如何应用其抑制剂及其在防治移植静脉狭窄中的地位,则尚待进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] Fort P, Marty L, Piechaczyk M, *et al.* Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family [J]. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13 (5): 1431 - 1442.
- [2] Shimada K, Takahashi M, Tanzwa K, Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cell [J]. *J Biol Chem*. 1994, 269 (6): 18275 - 18278.
- [3] Takahashi M, Fukuda K, Shimada K, *et al.* Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells [J]. *Biochem J*, 1995, 311 (pt2): 657 - 665.
- [4] Okada K, Takana J, Arai Y, *et al.* Importance of the c-terminal region of big endothelin-1 for specific conversion by phosphoranodon-sensitive endothelia courting enzyme [J]. *Biochem Biophys Res Common*, 1991, 180 (2): 1019 - 1023.
- [5] Gomazkov OA. Endothelin-converting enzyme: its functional aspect [J]. *Biochemistry (Mose)*, 1998, 63 (2): 124 - 132.
- [6] 刘喜财,宋清斌,张灿刚,等. ET-1, emy-c 在自体静脉移植血管内膜增殖表达意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (7): 540 - 541.

文章编号:1005-6947(2008)06-0573-01

## · 病案报告 ·

## 异位甲状腺腺瘤误诊为甲状舌管囊肿 1 例

黎万余, 张玉平

(贵州省德江县人民医院 外科, 贵州 德江 565200)

**关键词:** 甲状腺肿瘤; 异位; 甲状舌管囊肿; 误诊; 病例报告

**中图分类号:** R 736.1

**文献标识码:** D

**患者** 女, 10岁。因颈前无痛性肿物 10年, 于 2007年 4月 11日入某院。体查: 颈前甲状软骨上方可扪及一约 3.5 cm × 1.5 cm 大小包块, 质硬, 表面光滑, 边界清, 与皮肤无粘连, 无明显压痛, 蒂小, 随吞咽上下运动。颈部 B 超所见: 颈部探及一个稍强回声团块, 约 36 mm × 11 mm, 较光滑, 回声均匀, 未见液性暗区, 边界清楚 (无描述甲状腺情况)。入院诊断: 甲状舌骨囊肿。完善术前准备, 在全麻气管插管下行颈部肿物切除术, 术中见肿物似甲状腺组织, 遂再向下分离至环状软骨及第一、二气管环两侧均未找到甲状腺组织, 考虑为异位甲状腺肿瘤, 用电刀将肿瘤及部份甲状腺切除, 保留约三分之一的甲状腺组织。术后予抗炎、换药治疗术口愈合。术后甲状腺功能检查: 促甲状腺素 (TSH) 2.52 mU/L, 三碘甲状腺原氨酸 (T3) 1.38 nmol/L, 甲状腺素 (T4) 90.54 nmol/L, 游离 T3 (PT3)

6.90 nmol/L, 游离 T4 (PT4) 11.28 nmol/L。术后甲状腺彩超检查: 在正常甲状腺部位未探及甲状腺组织团块。

**讨论** 异位甲状腺属于胚胎发育畸形, 在胚胎发育初期, 甲状腺即从第一、二腮弓间, 咽底壁正中之内胚层组织内陷形成甲状腺囊, 并逐渐在舌根部形成一簇实体细胞, 随胚胎的发育, 此甲状腺小簇向下延伸到气管与甲状软骨的前方部位, 而残留 1 导管与根部相连, 叫甲状舌管。正常情况下, 此导管在胚胎发育 5~6 周时即封闭消失, 甲状腺位于颈部喉及气管的前下方, 腺体呈蝶形, 分左、右两侧叶和峡部, 双侧叶沿喉的两侧上达甲状软骨中部, 下达第 6 气管软骨环水平, 峡部位于第 2~4 气管软骨环前方, 甲状腺在向下伸展过程中, 可停留在任何部位, 如舌咽部舌内、舌下、喉前、气管、食管胸腔内, 甚至可移位于鼻旁窦、软腭、腹腔卵巢, 形成异位甲状腺。异位甲状腺在正常部位甲状腺缺如者称迷走甲状腺, 正常部位有甲状腺, 另外部位还有甲状腺组织者, 称额外甲状腺 (江之洪。异位甲状腺误切除致甲状腺功能减退症 [J]. *临床误诊误治*, 2003, 16 (5): 377.), 本例属于迷走甲状腺。

肿瘤在临床上偶见。如果外科医师不警惕此种情况存在的可能, 未意识到它是仅有的甲状腺组织, 而全部切除这种甲状腺, 这种患者将需要永久的甲状腺激素来替代疗法。本例根据术中发现修改了手术方案, 没有误切是值得庆幸的。

由于颈部异位甲状腺及其肿瘤与先天性甲状舌管囊肿的临床特征有许多相似之处, 而后者发病更为常见, 因而极易误诊为先天性甲状舌管囊肿。本例因颈前肿物就诊。临床医生重视不够, 未做甲状腺特异性检查就贸然手术, 结果误诊。虽然, 术中修改了手术方案, 未误切造成灾难性后果, 但是, 增加了术中手术操作 (向下分离切口检查原位甲状腺解剖部位) 和手术难度, 加重了患者的手术负担 (创伤), 仍应吸取教训。

本例提示: 对颈前无痛性肿物的诊断不能贸然定论, 对可疑病例应根据医院条件完善抽吸细胞学、B 超、放射性核素<sup>99m</sup>Tc 扫描 (ECT)、CT 或 MRI 等检查。排除异位甲状腺后再行手术。否则, 对颈部肿物手术, 如类似腺样体, 术中必须行冷冻切片病理检查和或探查原位甲状腺解剖部位是否有甲状腺组织存在, 并根据探查结果再决定手术方案, 如属迷走甲状腺就不能做全切除。

**收稿日期:** 2008-05-04。

**作者简介:** 黎万余, 男, 贵州省德江县人民医院主治医师, 主要从事外科临床方面的研究。

**通讯作者:** 黎万余 E-mail: 332667993@163.com

异位甲状腺 (迷走甲状腺) 及其