

心脏移植后冠状血管病发生与细胞凋亡的实验研究

邵孟平¹ 吴清玉²

(1. 复旦大学附属中山医院心外科, 上海 200032; 2. 北京阜外心血管病医院心外科, 北京 100037)

摘要 目的: 检测心脏移植后冠状血管病变标本中细胞凋亡的发生, 确定凋亡机制在移植后冠状血管病发生中的作用。方法: 建立心脏移植后冠状血管病模型, 检测细胞凋亡的发生, 探讨细胞凋亡的发生规律及细胞凋亡与移植后冠状血管病的关系。结果: 实验组和对照组心肌可见凋亡细胞, 但无显著差异。血管壁中未见到凋亡细胞。结论: 凋亡发生与组织内细胞成分多少有关, 心肌内细胞凋亡的发生率高于血管壁组织。

关键词 冠状血管病 凋亡 心脏移植 大鼠

Apoptosis in Cardiac Allograft Vasculopathy after Heterotopic Heart Transplantation in Rat

Shao Mengping¹ Wu Qingyu² (1. Department of Cardiovascular Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032; 2. Department of Cardiovascular, Fuwai Hospital of Cardiovascular Disease, Beijing 100377)

Abstract Objective: To investigate the prevalence of apoptosis in cardiac allograft vasculopathy after heterotopic heart transplantation in rat. **Methods:** Setting up cardiac allograft vasculopathy model in rat and Detecting apoptosis of diseased coronary vessels, using in situ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL). **Results:** Apoptosis were detected in myocardium of CAV model, not in diseased vessel walls. **Conclusion:** The prevalence of apoptosis is depend on cell component among tissues, the incidence is higher in myocardium than in blood vessel walls.

Key Words Cardiac allograft vasculopathy Apoptosis Heart Transplantation Rat

心脏移植后冠状血管病(cardiac allograft vasculopathy, CAV)是影响心脏移植远期疗效的主要因素^[1]。目前尚无有效治疗手段。CAV的发病机制仍不清楚, 研究^[1]发现, 血管内膜增生性病变, 与血管平滑肌细胞增殖密切相关。心脏移植后血管平滑肌细胞呈活跃的增生状态^[2]。凋亡是机体清除多余组织的一种方式, 细胞增殖的同时, 多伴有细胞凋亡^[3]。冠状血管内膜增生性病变时凋亡的发生率差异很大, 凋亡与增殖的关系也不明确^[4]。

为此, 我们应用大鼠同种异位心脏移植模型, 复制出CAV病变, 探讨移植后冠状血管病的发生发展中, 血管壁细胞凋亡的发生规律及细胞凋亡与移植后冠状血管病的关系。

1 资料与方法

1.1 动物模型及手术方法 实验用Lewis大鼠20只及F344大鼠40只, 均为雄性, 购自中国医学科学院动物所, 标准鼠食喂养。实验组以Lewis大鼠为供体, F344大鼠为受体, 共20对, 采用改良Ono术

式^[5], 将Lewis大鼠心脏移植于F344大鼠腹腔。对照组供、受体均为F344大鼠, 10对, 采用相同术式进行心脏移植。12周后处死, 取出腹腔移植心脏, 进行检测。

1.2 大鼠心肌标本切片制备及病理观察 取左室中段横断面心肌组织, 10%中性福尔马林固定。常规病理切片(厚度4 μ m), HE染色及弹力纤维染色。多聚赖氨酸为防脱片剂(购自北京中山生物技术有限公司)。光镜下观察并计算血管内膜增生程度。

1.3 凋亡细胞的检测 切片脱蜡后, 运用细胞凋亡原位检测技术(试剂盒购自北京医科大学分子病理室), 进行染色, 并以甲基绿复染, 风干。蛋白甘油封片。光镜观察。每张切片任选3~5个视野, 数100个细胞中凋亡细胞数目, 计算凋亡发生率。

1.4 统计学处理 各项数值以均数 \pm 标准差表示, 资料应用SPSS8.0进行检验, $P < 0.05$ 为存在显著差异。

2 结果

膜向心性肥厚, 内弹力层完整, 内膜增生血管与正常血管并存, 符合移植后冠状血管病之病理表现, 血管腔面积减少 $58 \pm 23.4\%$, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。

细胞凋亡检测发现: 实验组心脏心内膜及心外膜周围可见较多凋亡细胞, 坏死心肌周围凋亡细胞更多见。血管壁中未见到凋亡细胞, 对照组心肌可见少量凋亡细胞, 血管壁中未见到凋亡细胞。

3 讨 论

心脏移植治疗终末期心脏病已取得巨大成功, CAV 是影响心脏移植远期疗效的主要因素^[9]。移植心脏之冠状动脉和冠状静脉均可受累, 表现为血管内膜向心性增生肥厚, 内弹力层完整, 血管壁钙化少见。病变多起自血管远端, 小血管由于内膜增生而首先闭塞, 形成小的卫星状梗死。由远及近, 最后整根血管全部闭塞。移植心脏供血不足, 导致移植失败^[7]。患者无心绞痛症状, 多表现为心律失常、心力衰竭或猝死^[6]。在存活 1 年、2 年及 4 年的患者中, CAV 的发病率分别为 11% 、 22% 和 45% ^[8]。常规治疗方法如: 冠状动脉搭桥术或经皮冠状动脉成形术, 疗效不佳, 唯一治疗手段是心脏再移植。但再次心脏移植效果差, 因而绝大多数移植中心不主张 CAV 患者二次心脏移植^[5]。

血管内膜增生, 是移植后冠状血管病的主要表现, 多种因素可促使移植后冠状血管内膜增厚, 没有一种防治措施能完全消除如此多的致病因素的影响, 因此近年的研究多致力于发现众多治病因素作用的共同途径。我们利用大鼠同种异位心脏移植模型, 观察到典型冠状血管内膜的增殖改变, 为移植后冠状血管病的发生和防治提供了研究平台。

实验表明: 血管内膜增生并不仅由血管内皮细胞增生所致, 血管中层平滑肌细胞起主要作用, 故称之为肌内膜增生^[1] (myointimal hyperplasia)。多数研究者倾向于将移植后冠状血管病看做是血管平滑肌细胞异常增生的结果。因此, 研究平滑肌细胞的特性及分裂增殖反应, 可能为防治移植后冠状血管病提供思路。

血管平滑肌细胞的增殖一启动, 就不断发展并强化。如何干预阻断这一增殖过程, 一直是研究的焦点。凋亡是体内一种生理过程, 机体通过调节凋亡与增殖间的平衡关系, 来调节机体内细胞数量。通过凋亡清除体内过多或有缺陷的细胞, 在细胞发育和调节方面发挥重要作用。凋亡发生率过高或过低都会引发病理状态。Isner^[9] 在研究血管成形后再狭

窄的病例中发现: 所有病变血管组织标本中, 65% 发现了凋亡现象, 凋亡发生率较高的组织往往是增殖旺盛的组织。因而认为: 凋亡发生率取决于组织增殖旺盛程度。增殖组织中细胞成分的多少也影响凋亡的发生, 动脉粥样硬化组织中, 细胞增殖不明显, 病变主要由胶原组织和细胞外基质构成, 细胞成分少, 因而凋亡发生率低; 而血管成形后再狭窄时, 细胞增殖明显, 病变中细胞成份多, 凋亡发生率高。上述结论得到动物实验结果证实^[10], 人体血管标本研究也得到证实^[11]。我们在移植后冠状血管病标本中观察到典型的血管内膜增殖性改变, 却未观察到血管壁细胞凋亡现象, 而移植心脏心肌内可见较多凋亡细胞, 坏死心肌周围, 凋亡细胞更多见。原因可能是: 心肌组织内细胞成分多, 较易检测到凋亡细胞, 血管壁多由胶原组织和细胞外基质构成, 细胞成分少, 因而不易检测到凋亡。另外, 我们采集的多是终末期冠状血管病标本, 血管壁细胞增殖不旺盛, 故难以检测到凋亡。

参考文献

- 1 Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, et al. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 6: 369.
- 2 Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*, 1986, 58: 427.
- 3 Bennett MR, Evan GL, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon- γ , heparin and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res*, 1994, 74: 525.
- 4 Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1B-converting enzyme. *Am J Pathol*, 1995, 147: 251.
- 5 邵孟平, 吴清玉, 阮英卯. 大鼠心脏移植后冠状血管病模型的建立. *中国循环杂志*, 2002, 117: 395~396.
- 6 Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: sixteenth official report—1999. *J Heart Lung Transplant*, 1999, 18: 611.
- 7 Johnson DE, Gao SZ, Schroeder JS, et al. The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant*, 1989, 8: 349.
- 8 Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR, et al. Heart transplant coronary artery disease detected by angiography: a multi-institutional study. *J Heart Lung Transplant*, 1996, 15: S39~46.
- 9 Isner JM, Keamey M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis? *Circulation*, 1995, 91: 2703.
- 10 Ohno T, Gordon D, San H, et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*, 1994, 265: 781.
- 11 Nabuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol*, 1991, 17: 433.