

血管内皮生长因子对兔腹主动脉支架植入后血管内皮功能的影响研究*

苗建波,安少波,徐 雷,张晓蕾,胡喜田,吴志红,都 伟[△]

(石家庄市第一医院心血管内科 050011)

[摘要] **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)对新西兰兔腹主动脉支架植入后血管内皮功能的影响。**方法** 选取健康雄性新西兰白兔 35 只,建立高脂血症动物模型,处死 5 只分析组织学形态,将剩余 30 只随机分为裸金属支架组与裸金属支架+VEGF 组,各 15 只。两组新西兰兔均应用腹主动脉支架植入术治疗,选用裸金属支架,其中裸金属支架+VEGF 组加用 VEGF。流式细胞检测外周血内皮祖细胞(EPC)水平,电镜下观察血管内皮化程度。比较两组 EPC 水平与损伤血管再内皮化速率。**结果** 裸金属支架+VEGF 组 EPC 水平明显高于裸金属支架组,差异有统计学意义($P<0.05$);且裸金属支架+VEGF 组损伤血管再内皮化速率明显高于裸金属支架组。**结论** VEGF 能够提升 EPC 水平,促进血管内皮新生,加快损伤血管再内皮化速率。

[关键词] 腹主动脉支架植入术;血管内皮生长因子;内皮,血管**[中图分类号]** R453.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)29-3739-04

Effect of vascular endothelial growth factor on vascular endothelial function after abdominal aortic stent implantation in rabbits*

MIAO Jianbo, AN Shaobo, XU Lei, ZHANG Xiaolei, HU Xitian, WU Zhihong, DU Wei[△]

(Department of Cardiovascular Medicine, Shijiazhuang First Hospital,

Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on vascular endothelial function in New Zealand rabbits after abdominal aortic stent implantation. **Methods** A total of 35 healthy male New Zealand rabbits were selected to establish hyperlipidemia models, and 5 of them were sacrificed to analysing their histological patterns. The other 30 rabbits were randomly divided into the bare metal stent (BMS) group and the BMS+VEGF group, 15 cases in each group. Two groups of New Zealand rabbits were treated with abdominal aortic stent. BMS were used, and VEGF was added to the BMS+VEGF group. The level of peripheral blood endothelial progenitor cell (EPC) was detected by using flow cytometry, and the degree of endothelialization was observed under electronic speculum. The level of EPC and the re-endothelialization rate of injured blood vessels were compared between the two groups. **Results** The level of EPC in the BMS+VEGF group was significantly higher than that in the BMS group, there was statistically significant difference ($P<0.05$); and the re-endothelialization rate of injured blood vessels in the BMS+VEGF group was higher than that in the BMS group. **Conclusion** VEGF could increase the level of EPC, promote the regeneration of vascular endothelium, and accelerate the re-endothelialization rate of injured blood vessels.

[Key words] abdominal aorta stent implantation; vascular endothelial growth factor; endothelium, vascular

冠状动脉介入术的发展与广泛应用显著改善了冠心病患者总体预后与生活质量,但术后发生的支架内血栓(stent thrombosis, ST)形成仍是困扰临床的重要难题^[1]。药物涂层支架的应用使支架内再狭窄发生率明显降低,而 ST 形成并未明显减少。目前,临床认为 ST 形成的主要机制在于药物涂层支架导致血管再内皮化延迟。因此,加快血管内皮化有利于恢复血管功能,预防 ST 形成。既往观点认为,受损血管边缘内皮细胞迁移、增生是完成血管再内皮化的主要途

径^[2]。而现代医学显示,起源于骨髓的干细胞或内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)经血管损伤激活后,迁移至损伤血管区域,参与血管再内皮化^[3]。有研究表明,粒细胞集落刺激因子能够激活 EPC,促进血管再内皮化,但其促炎作用较强,在安全性方面欠缺^[4]。血管内皮生长因子(VEGF)亦可通过刺激骨髓作用,激活 EPC,从而促进血管再内皮化,防止术后 ST 形成,同时 VEGF 促炎作用较弱,安全性较高。本研究通过设计随机对照实验,观察 VEGF 对新西兰兔

腹主动脉支架植入后血管内皮再生速率及血管内皮功能的恢复,旨在为减少支架植入术后 ST 形成等并发症的发生提供新的靶点与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康新西兰白兔 35 只,雄性,年龄 4~6 个月,体质量 2.5~3.0 kg,购自四川动物养殖中心。

1.1.2 实验仪器与试剂 苦味酸固定液:将 1.2 g 苦味酸加至 100 mL 蒸馏水内,使溶液形成饱和状态;改良苏木精染液:苏木精 0.25 g、硫酸铝钾 0.5 g、碘酸钠 25 mg、冰醋酸 1 mL、甘油 15 mL、无水乙醇 2 mL、蒸馏水 33 mL;1% 盐酸-乙醇分化液:45.5 mL 70% 乙醇、0.5 mL 浓盐酸;促蓝液:硫酸镁与碳酸氢铵分别 2.00、0.35 g,蒸馏水 100 mL。恒温箱、二氧化碳(CO₂)培养箱、酶标仪、光学显微镜、天平等。

1.1.3 实验饲料 高脂饲料,含 15% 蛋黄粉、0.5% 胆固醇、5% 猪油、79.5% 普通饲料。

1.2 方法

1.2.1 建立高脂血症动物模型 分笼饲养新西兰兔,观察 7 d 后,抽取兔静脉血,检测总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白等各项血脂指标,完成各项测定后,开始喂养高脂饲料,持续喂养 3 周,剔除高脂饲料中胆固醇,继续喂养至 6 周后,复查血脂水平。

1.2.2 组织形态学分析 处死新西兰兔 5 只,取其腹主动脉切片观察脂质沉积与动脉硬化程度。将腹主动脉置于苦味酸饱和溶液中固定,采用乙醇脱水,二甲苯透明、石蜡包埋,制作石蜡块,连续切片,行苏木精-伊红(HE)染色,经光学显微镜观察动脉粥样硬化斑块。

1.2.3 实验动物分组 采用随机数字表法将余下 30 只新西兰兔分为两组:裸金属支架组、裸金属支架+VEGF 组,各 15 只。

1.2.4 支架植入 两组实验动物均植入裸金属支架,在动物导管室进行所有操作,确保无菌操作流程。术前 3 d 开始喂服阿司匹林(山西新宝源制药有限公司,批号:国药准字 H14020945),25 mg/d;氯吡格雷(深圳信立泰药业股份有限公司,批号:国药准字 H20000542),75 mg/d。经兔耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥(上海新亚药业有限公司,批号:国药准字 H31021725)1 mL/kg,麻醉完成后,将兔固定于操作台上,将其腿部毛褪去。应用聚维酮碘与 75% 乙醇脱碘消毒腿部皮肤,于消毒区域铺巾,铺巾范围小于消毒区域,作为手术视野。抽取 2 mL 利多卡因(紫光古汉集团衡阳制药有限公司,批号:国药准字 H43021924),局部浸润麻醉。将兔腿部皮肤切开,逐层分离,显露右股动脉,行穿刺针穿刺,见回血喷射后,置入导引钢丝,并于腹主动脉内送入 6 F 引导管。经引导管予以 100 U/kg 肝素钠,透视条件下,钢丝进入腹主动脉,注意避开肾动脉分叉,沿钢丝进入造影

导管,做腹主动脉造影,测量血管直径,确定目标血管,造影结束后将造影导管撤出。采用 3.5 mm 直径的球囊携带支架植入腹主动脉,球囊支架与血管直径比为 1.1~1.2:1.0。将球囊充盈至 8 atm,维持 10 s,待支架与血管壁完全贴合后,将球囊撤出,造影观察血管,血管通畅,无影像学异常后,将造影管与鞘管退出,严格止血、逐层缝合伤口,用碘酒消毒皮肤。兔清醒后,送至笼内继续饲养。术后常规肌肉注射 800 kU 青霉素(天津华津制药有限公司,批号:国药准字 H12021258),2 次/天,共注射 3 d。

1.2.5 应用 VEGF 裸金属支架+VEGF 组植入支架后,即刻经导管予以 40 μg VEGF121,随后于术后第 2~9、16~23、31~38 天,经皮下应用 VEGF121,1 μg/d。裸金属支架组注射等剂量与频率的生理盐水。

1.2.6 检测外周血 EPC 所有实验动物手术前均经耳缘静脉取 2 mL 静脉血,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用密度梯度离心法将单个核细胞分离,收集细胞 1×10⁶ 个重悬于 100 μL 磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,加至流式管内,同时加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD34 与藻红蛋白(PE)标记的 CD45 各 20 μL,用于同型对照。另一流式管内,加抗凝血 100 μL、FITC 标记的 IgG₁ 20 μL、PE 标记的 IgG₁ 20 μL。4 °C 下避光孵育,洗涤,根据说明书要求上机,流式检测外周血中 CD34⁺/CD45⁺ 的 EPC 百分率,计数 EPC。

1.2.7 检测血管再内皮化速率 分别于术后 15、30、60 d,由各组中随机选出新西兰兔 5 只,将其处死。取支架覆盖段腹主动脉,包括相邻上下血管段 5 mm,横向剪开支架植入段血管,平均分为两段,其中一段以 4% 多聚甲醛固定,行脱水、透明、石蜡包埋处理,随后进行 HE 染色,对内膜增生程度进行观察;另一段采用 2% 戊二醛溶液浸泡、固定,应用梯度乙醇脱水,经临界点干燥与镀膜,在电镜下扫描观察血管内皮化程度,测算内皮覆盖率。

1.3 观察指标 比较两组术后 1、7、14、28 d EPC 数量与术后 15、30、60 d 损伤血管再内皮化速率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

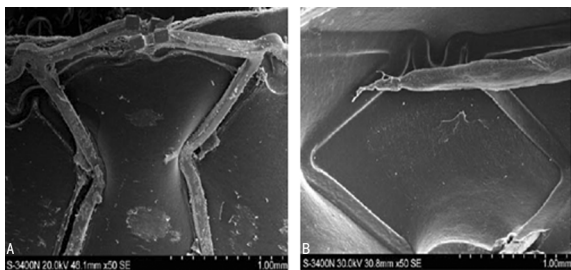
2.1 EPC 数量比较 两组术后 13 d,均出现 2 只新西兰兔死亡,15 d 时处死 5 只用于检测血管再内皮化速率。裸金属支架+VEGF 组各时段 EPC 数量均明显高于裸金属支架组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 损伤血管再内皮化速率 15 d 后,两组均出现明显的血管再内皮化,其中裸金属支架+VEGF 组基本完成内皮化;30 d 后,两组内皮化完成,但裸金属支架组细胞形态仍与正常内皮存在较大差异,裸金属支架+VEGF 组细胞变长,已接近于正常内皮层形态;60 d 后,裸金属支架表面完全覆盖,但存在纤维状结

构。裸金属支架+VEGF 组血管内支架表面未出现变化,提示支架植入 30 d 后内膜损伤过程在已完成,见图 1~3。

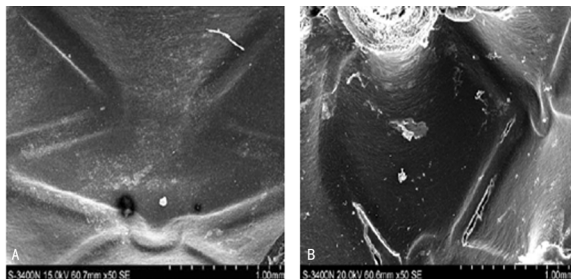
表 1 两组 EPC 数量比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	1 d(n=15)	7 d(n=15)	14 d(n=13)	28 d(n=8)
裸金属支架组	10.30±2.01	12.09±1.59	14.85±1.86	15.03±3.71
裸金属支架+VEGF 组	16.88±2.33	17.56±2.24	18.28±2.06	19.17±3.69
t	8.282	7.712	4.456	41.491
P	0.000	0.000	0.000	0.001



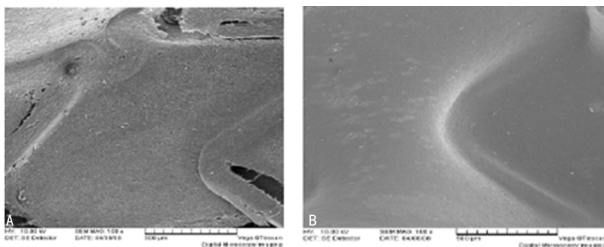
A: 裸金属支架组; B: 裸金属支架+VEGF 组

图 1 术后 15 d 两组损伤血管再内皮化程度($\times 50$)



A: 裸金属支架组; B: 裸金属支架+VEGF 组

图 2 术后 30 d 两组损伤血管再内皮化程度($\times 50$)



A: 裸金属支架组; B: 裸金属支架+VEGF 组

图 3 术后 60 d 两组损伤血管再内皮化程度($\times 50$)

3 讨论

EPC 在冠状动脉支架植入引起的血管损伤修复中的作用报道较少,既往有报道患者行冠状动脉血管成形术后,内皮细胞数量在外周循环中明显增多,内皮细胞集落形成在 24 h 内增加 2~3 倍^[5]。另外,单纯行冠状动脉造影而未实施冠状动脉支架植入术患者内皮细胞集落形成单位无明显变化,提示内皮细胞集落形成与血管损伤具有一定关系^[5]。以往动物实验中发现,洛伐他汀与辛伐他汀能够激活血管损伤后 EPC,促进再内皮化,缓解内膜增生,但有研究提出,仅有特殊的干细胞可促进再内皮化^[6]。同时多数研

究表明,粒细胞集落刺激因子能够激活 EPC,提高再内皮化速率,抑制内膜增生,但研究的缺陷在于动物模型血管损伤仅由介入导管所致,尚未植入支架,故无法显示支架植入后再内皮化程度^[7]。而在以狗为实验对象的研究中,主动脉移植术后应用粒细胞集落刺激因子在促进再内皮化的同时,内膜增生十分明显,加之粒细胞集落刺激因子促炎作用显著,其临床应用安全性受到普遍质疑^[8]。

本研究选取新西兰兔腹主动脉支架植入模型作为观察对象,结果发现,裸金属支架+VEGF 组术后 EPC 数量明显多于裸金属支架组,且损伤血管再内皮化速率明显大于裸金属支架组,提示 VEGF 在支架植入术后有助于促进 EPC 活化,加快损伤血管再内皮化速率,从而改善血流动力学。VEGF 主要分泌于血管内皮细胞,是内皮细胞生长与分化不可缺少的因子,其不仅参与胚胎血管形成,在修复血管生理性损伤、促进病理性血管新生中同样扮演着重要角色^[9-11]。冠状动脉支架植入术是治疗冠心病的主要手段,能够有效开通狭窄或闭塞动脉,但该术式面临的问题是支架植入后,粥样硬化斑块受压缩而破裂,造成血管内皮损伤,基底膜显露,进而引起血小板聚集,诱发血栓形成^[12]。另外,血管内皮损伤可增加多种细胞因子的分泌,导致血管平滑肌细胞过度增殖,造成术后支架内再狭窄。因此,及时修复血管内皮损伤对预防冠状动脉支架植入术后支架内再狭窄十分关键^[13]。由于冠状动脉支架植入术损伤血管内皮细胞,导致 EPC 快速增殖、迁移,其中 EPC 主要见于骨髓,是多能细胞的一种,在人胚胎血管生成、出生后血管新生及内皮损伤修复等过程中均有参与,当机体出现损伤信号时,EPC 在损伤信号的诱导下迁移至损伤局部,并逐渐分化为成熟的血管内皮细胞,促进血管新生与修复^[14-15]。VEGF 由成熟血管内皮细胞经旁分泌机制分泌,而 VEGF 亦可通过促进 EPC 增殖分化,加速内皮生长与修复。VEGF 促内皮细胞分裂、增殖的特点如下:(1) VEGF 能够通过肝素结合位点与硫酸肝素结合,达到延长自身作用时间的效果;(2) 血管内皮细胞与 VEGF 二者间可形成正反馈效应,进而增强 VEGF 作用^[16];(3) VEGF 可通过阻止肿瘤坏死因子 α 等因子的产生,抑制自身凋亡,从而延长作用时间,实现高效的修复内皮细胞功能。故高水平 VEGF 可显著加快再内皮化过程,促进内皮细胞屏障功能的恢复,预防血栓形成^[17];此外,VEGF 可对抗超氧化物等多种有害物质,抑制内皮细胞过度增生,避免或减少术后再狭窄形成。

综上所述,裸金属支架联合 VEGF 可明显增加 EPC 水平,促进损伤血管再内皮化,有利于局部组织血流灌注,减轻机体组织损伤。

参考文献

[1] 刘征,于卫国,张蕾,等.经皮冠状动脉介入治疗术后支架

- 内再狭窄的多因素 Logistic 回归分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2016, 8(3): 317-319.
- [2] 陈洪涛, 侯文华, 苗永国, 等. 阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者冠脉介入术后炎症因子和血管内皮功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(17): 1992-1995.
- [3] 陈曦, 张先兵, 李勋, 等. 内皮祖细胞修复血管损伤的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2015, 18(11): 908-911.
- [4] 史建军, 曹敏, 张刚利, 等. 重组人粒细胞集落刺激因子诱导急性脑梗死大鼠神经血管再生的研究[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(9): 1263-1265.
- [5] 许振业, 柳景华, 王韶屏, 等. 经皮冠状动脉介入治疗对内皮功能影响的研究进展[J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35(7): 584-587.
- [6] 陈洪涛, 苗永国, 侯文华, 等. 负剂量阿托伐他汀对 ACS 行 PCI 治疗患者心肌灌注、炎症因子及血管内皮功能的影响[J]. 安徽医药, 2014, 18(12): 2375-2377.
- [7] 白丽萍, 赵志红, 陈冲, 等. 正常成人粒细胞集落刺激因子动员外周血内皮祖细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(32): 5190-5196.
- [8] BONDARENKO N A, POVESHCHENKO O V, LYKOV A P, et al. Study of cytokine profile of cultured "early" and "late" endothelial progenitor cells in peripheral blood of chronic heart failure patients after mobilization course with granulocyte colony-stimulating factor[J]. Bull Exp Biol Med, 2015, 160(2): 249-251.
- [9] ZHANG R, PAN X, XIAO L. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) under hypoxia in placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy and its clinically pathological significance[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11475-11479.
- [10] KOH S H, LIANG A C, Takahashi Y, et al. Differential effects of isoxazole-9 on neural stem/progenitor cells, oligodendrocyte precursor cells, and endothelial progenitor cells[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138724.
- [11] 孟繁军, 展倩丽. 通脉养心丸治疗冠心病心绞痛临床疗效及其对血管内皮功能的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24(5): 84-86.
- [12] 项顺阳. 氯沙坦对冠心病患者 EPCs 的动员作用及其改善血管内皮功能的机制[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(7): 106-107, 115.
- [13] 周学才. ST 段抬高性急性心肌梗死患者循环血管内皮祖细胞与血管内皮生长因子及心功能的关系及意义[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(3): 329-331.
- [14] 崔春便, 王敬, 程华. 冠心舒通胶囊对冠心病支架植入术后心绞痛患者血管内皮功能的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(6): 1108-1110.
- [15] 周江, 郭靖涛, 王福华, 等. 血管内皮生长因子与急性心肌梗死介入治疗后再狭窄研究进展[J]. 河北医学, 2014, 20(12): 2138-2141.
- [16] 李雅琪, 程亚辉, 刘蓉. 冠心病单支病变经皮冠状动脉介入治疗围术期血清血管内皮生长因子的变化[J]. 心脑血管病防治, 2015, 15(5): 411-411, 414.
- [17] 王超, 王蓓蕾, 张黎明. 血管内皮生长因子介导的血管新生疗法在心血管疾病中的研究进展[J]. 中国心血管病研究, 2016, 14(10): 868-871.

(收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-06-21)

(上接第 3738 页)

- [4] 章俊, 向晓红, 梁秀洁, 等. 晚期氧化蛋白产物调节人肾小管上皮细胞自噬的研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(25): 3480-3483.
- [5] EDDY A A. Progression in chronic kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2005, 12(4): 353-365.
- [6] ASANUMA K, TANIDA I, SHIRATO I, et al. MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis[J]. FASEB J, 2003, 17(9): 1165-1167.
- [7] FANG L, ZHOU Y, CAO H, et al. Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60546.
- [8] SUZUKI C, ISAKA Y, TAKABATAKE Y, et al. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(1): 100-106.
- [9] HUANG C, LIN M Z, CHENG D, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys through inhibiting autophagic flux[J]. Lab Invest, 2014, 94(3): 309-320.
- [10] LIU W J, LUO M N, TAN J, et al. Autophagy activation reduces renal tubular injury induced by urinary proteins[J]. Autophagy, 2014, 10(2): 243-256.
- [11] LIU W J, SHEN T T, CHEN R H, et al. Autophagy-lysosome pathway in renal tubular epithelial cells is disrupted by advanced glycation end products in diabetic nephropathy[J]. J Biol Chem, 2015, 290(33): 20499-20510.
- [12] LIN C H, CHENG Y C, NICOL C J, et al. Activation of AMPK is neuroprotective in the oxidative stress by advanced glycosylation end products in human neural stem cells[J]. Exp Cell Res, 2017, 359(2): 367-373.
- [13] GREGOR M F, HOTAMISLIGIL G S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease[J]. J Lipid Res, 2007, 48(9): 1905-1914.
- [14] XIE F, WU D, HUANG S F, et al. The endoplasmic reticulum stress-autophagy pathway is involved in apelin-13-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(12): 1589-1600.

(收稿日期: 2018-05-11 修回日期: 2018-06-21)