

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0121- 03

• 实验研究 •

雌二醇抑制大鼠动脉损伤后内膜增生

赵智深, 黄从新, 江洪, 杨波, 李庚山, 王滕, 王晶

(湖北医科大学附属第一医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 雌二醇; 增殖, 内膜; 肌, 平滑; 内皮损伤; 颈动脉

[摘要] 为探讨雌二醇对去势大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生的影响, 选择 8- 10 周 S- D 大鼠, 雌性、雄性各 21 只, 各分三组: 非去势对照组 ($n=7$)、去势对照组 ($n=7$) 和实验组 ($n=7$, 去势+ 雌二醇)。腹腔注射雌二醇三天后, 以 2.0F 经皮腔内冠状动脉成形术球囊损伤左颈总动脉。动脉损伤两周后处死大鼠, 测量内膜面积、内膜面积与中膜面积的比值。结果发现, 雄性实验组内膜面积 ($0.072 \pm 0.020 \text{ mm}^2$)、内膜面积与中膜面积的比值 (0.533 ± 0.037) 均显著小于非去势对照组 ($0.110 \pm 0.018 \text{ mm}^2$ 和 0.740 ± 0.051 , P 均 < 0.01) 和去势对照组 ($0.098 \pm 0.014 \text{ mm}^2$ 和 0.701 ± 0.040 , P 均 < 0.05)。雌性实验组内膜面积 ($0.061 \pm 0.015 \text{ mm}^2$)、内膜面积与中膜面积比值 (0.525 ± 0.030) 均显著小于去势对照组 ($0.101 \pm 0.018 \text{ mm}^2$ 和 0.710 ± 0.031 , P 均 < 0.01), 但与非去势对照组 ($0.078 \pm 0.012 \text{ mm}^2$ 和 0.619 ± 0.041) 差异不显著 (P 均 > 0.05)。提示雌二醇能抑制去势大鼠动脉损伤后内膜增生。

[中图分类号] R364.3

[文献标识码] A

Effect of Estradiol on Inhibition Neointimal Proliferation after Rat Carotid Artery Injury

ZHAO Zhi- Shen, HUANG Cong- Xin, JIANG Hong, YANG Bo, LI Geng- Shan, WANG Teng, and WANG Jing

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Hubei Medical University, Wuhan 430060, China)

MeSH Estradiol; Proliferation, Neointimal; Muscle, Smooth; Endothelial Injury; Carotid Artery

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of estradiol on inhibition of neointimal proliferation after rat carotid artery balloon injury. **Methods** Eight- ten week- old S- D rats were divided into intact control group ($n=7$), gonadectomized control group ($n=7$) and estradiol ($n=7$, gonadectomization) group in each sex. Left carotid artery was not injured with 2.0F PTCA balloon until estradiol had been injected for three days. Rats were killed after injury two weeks later. Neointimal areas, ratios of intimal areas and media areas were measured with computer. **Results** Neointimal areas and ratios of intimal areas and media areas in male in estradiol group were significantly less than those in intact control group (all $P < 0.01$), and in gonadectomized control group (all $P < 0.05$). Those in female, in estradiol group were less than those in gonadectomized control group evidently (all $P < 0.01$), were also similar to those in intact control group (all $P > 0.05$). **Conclusion** Estradiol inhibited neointimal proliferation after the gonadectomized rat carotid artery balloon injury.

20 世纪 30 年代, 国外学者流行病学调查和临床观察发现, 在 40~ 60 岁之间动脉硬化症和冠心病的男性发病率显著高于女性, 认为是其它原因所致, 而没有意识到雌激素的作用。随后另一些学者对育龄期切除双侧卵巢的女性观察发现, 雌激素替代治疗者冠心病发病率要比无替代治疗者低得多, Stamler 等证实, 雌激素能够抑制高胆固醇喂养鸡动脉粥样硬化的发展。这些资料引起人们对雌激素的兴趣, 研究发现雌激素对女性心血管系统有保护作用, 通过降低血脂和脂蛋白, 升高高密度脂蛋白胆固醇, 改

善内皮细胞功能等作用, 但其确切机理仍不甚明了。冠状动脉狭窄经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 治疗, 为冠心病患者带来非手术治疗的希望, 但术后再狭窄发生率高一直是 PTCA 的难题。本实验目的是观察雌二醇对去势大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生的影响, 为临床使用雌激素降低 PTCA 术后再狭窄进行有益的探索。

1 材料和方法

1.1 动物分组

8~ 10 周 S- D 大鼠 (湖北医科大学动物室提供) 雌性和雄性各 21 只, 雄鼠平均体重为 341 ± 20

[基金项目] 湖北省九五攻关项目 (项目批准号 962P1101)

[作者简介] 赵智深, 男, 1963 年出生, 在读博士研究生。黄从新, 博士研究生导师, 中华医学会心理生理和心脏起搏学会副主任。江洪, 博士, 教授。以上均从事心脏病介入治疗及研究工作。

g, 雌鼠为 240 ± 17 g。雌鼠和雄鼠各分为三组: 非去势对照组 ($n=7$)、去势对照组 ($n=7$) 和雌二醇组 ($n=7$, 去势+雌二醇)。标准颗粒饲料及饮水不受限制。

1.2 材料

雌二醇注射液系上海第九制药厂生产, 批号 890902111。图像经 HJPAS-1000 高清晰度彩色病理图文处理系统处理。

1.3 去势手术

腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液 $40 \mu\text{g/g}$ 麻醉后进行去势手术。

1.4 实施药物

雌二醇组在去势术后 3 天(雄性)或 4 天(雌性), 腹腔注射雌二醇 $20 \mu\text{g/g} \cdot \text{d}$ 至处死。雌鼠雌二醇组较雄鼠迟一天使用, 目的是尽量消除内源性雌激素的影响。

1.5 球囊损伤动脉内膜

参照文献[1]方法并有改进, 从左颈外动脉插入 2.0F PTCA 球囊导管至胸主动脉, 注入 0.9% 氯化钠溶液 0.2 mL, 使球囊充分膨胀, 退球囊至左颈总动脉分叉处, 回抽氯化钠溶液, 再送球囊至胸主动脉, 反复三次后基本将内膜完全剥脱, 以右侧血管为对照。血管损伤时间: 非去势对照组在分组当日, 雄性去势对照组在去势后 3 天, 雌二醇组在注射雌二醇后 4 天, 雌性去势对照组在去势后 4 天(雌性去势术创伤大, 故晚一天)。

1.6 形态学检查

动脉损伤后 2 周处死动物, 取出两侧颈总动脉, 0.9% 氯化钠溶液冲洗血管, 10% 福尔马林溶液固定 24 h, 石蜡包埋切片, HE 染色。测量内膜面积(内弹力板面积-管腔面积)和中膜面积(外弹力板面积-内弹力板面积)。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较应用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

实验结束前有 3 只大鼠死亡, 雌性去势对照组 1 只, 雌性雌二醇组 2 只。

2.1 雄鼠各组血管壁增殖情况

由表 1 (Table 1) 可知, 雌二醇组内膜面积较非去势对照组减少 30% ($P < 0.01$), 较去势对照组也减少 ($P < 0.05$)。雌二醇组内膜面积和中膜面积的比值与非去势对照组相比差异非常显著 ($P < 0.$

01), 与去势对照组相比也有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 雌鼠各组血管壁增殖情况

由表 2 (Table 2) 可知, 雌二醇组内膜面积比去势对照组减少 40% ($P < 0.01$), 但与非去势对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。雌二醇组内膜面积和中膜面积的比值比去势对照组和非去势对照组相比均减小 (P 均 < 0.05)。

表 1. 雄鼠左颈总动脉内膜面积、内膜面积/中膜面积的比值。

Table 1. Left carotid artery intimal areas, ratios of intima area and media area in male rats ($\bar{x} \pm s$, $n=7$, mm^2).

Groups	Intima areas	Area ratio of intima and media
Intact control	0.110 ± 0.018	0.740 ± 0.051
Gonadectomized control	0.098 ± 0.014^a	0.701 ± 0.040
Estradiol	0.072 ± 0.020^{bc}	0.533 ± 0.037^{bc}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with intact control group; b: $P < 0.05$, compared with gonadectomized control group.

表 2. 雌鼠左颈总动脉内膜面积、内膜面积/中膜面积的比值。

Table 2. Left carotid artery intimal areas, ratios of intima areas and media areas in female rats ($\bar{x} \pm s$, mm^2).

Groups	<i>n</i>	Intima areas	Area ratio of intima and media
Intact control	7	0.078 ± 0.012	0.619 ± 0.041
Gonadectomized control	6	0.101 ± 0.018^a	0.710 ± 0.031^a
Estradiol	5	0.061 ± 0.015^b	0.525 ± 0.030^b

a: $P < 0.05$, compared with intact control group; b: $P < 0.01$, compared with gonadectomized control group.

2.3 形态学分析

切片上可见对照血管内膜细胞呈单层, 内弹力板连续, 中膜平滑肌较薄, 外弹力板与外膜相连。而实验血管内膜明显增厚, 内弹力板不连续, 中膜平滑肌也增厚, 但排列较整齐, 外弹力板无明显变化。球囊剥脱内皮不均匀, 内膜增殖厚度也不一致。因此, 一般以面积来表示增厚程度。血管损伤后, 内膜面积与中膜面积的比值反映二者增生程度的相对关系。

3 讨论

球囊损伤局限在动脉内膜, 损伤后经过细胞因子、酶、原癌基因的放大作用, 引起局部平滑肌 (smooth muscle cell, SMC) 迁移、增殖, 弹力纤维及胶原合成增加, 造成内膜及中膜增厚, 最终导致管腔狭

窄。韦立新^[2]认为,在损伤修复过程中,新生的内膜或中膜组织过度增生以及同时伴随的细胞外基质形成,是造成再狭窄的主要病理基础;再狭窄并不取决于增生组织的绝对量,而是取决于所得管腔面积与所失管腔面积之比。内膜面积与中膜面积比值的大小也影响管腔面积。

本实验结果表明,雌二醇对去势大鼠血管损伤后抑制内膜增生 30%~40%,与 Chen 等^[1]结果相近,但我们发现雄激素对内膜增生有促进作用。Akishita 等^[3]应用雌二醇 2 周对大鼠血压、血脂无明显影响,说明雌激素抑制内膜增生可能与血脂无关,因为血脂升高可诱发 SMC 增殖^[4]。还证实内皮素-1 含量升高可诱发 c-fos 原癌基因表达,促进 SMC DNA 合成增加;而雌二醇可降低内皮素-1 含量,最终使 SMC 增殖受抑制^[5]。Song 等^[6]证实雌二醇可使 SMC 从收缩型转变为增殖型的时间延长。吴赛珠等^[7]报告雌二醇抑制兔主动脉³H-TdR 掺入量。Tourneau 等^[8]发现血管损伤后 SMC 产生的细胞外基质蛋白构成了新内膜体积的大部分,以及在内膜增厚的再狭窄区域 SMC 含有丰富的细胞外基质。Moreno 等^[9]比较糖尿病和非糖尿病患者 PTCA 后再狭窄斑块组织学特点,发现糖尿病患者病灶中细胞过量(hypercellular)的百分比小于非糖尿病患者(19.6%比 44.5%, $P < 0.05$),但胶原组织比非糖尿病患者丰富(77.9%比 53.4%, $P < 0.05$),认为非糖尿病患者再狭窄病灶以细胞增殖为主。Chen 等^[1]发现雌鼠组血管损伤后 c-myc mRNA 水平明显低于雄鼠组,且出现的时间比雄鼠迟。c-myc 几乎在各种细胞中均有表达,属于立早反应基因,在调节细胞增生和分化中起重要作用;c-myc mRNA 和蛋白质在 DNA 合成前期达到高峰,多种生长因子刺激下,c-myc 在细胞周期中保持高水平。易光辉等^[10]也发现血管损伤后立早基因和癌相关基因表达产物可能参与管壁细胞增殖和凋亡。Li 等^[11]证实雌激素通过调控 SMC 释放多种生长因子,而抑制动脉损伤后血管外膜成纤维细胞向中膜迁移。综合上述资料,雌二醇可使一些原癌基因表达减弱,抑制 SMC DNA 合成及 SMC 转型的时间延长,抑制胶原产生,从而抑制内膜及中膜增生,最终管腔狭窄程度减轻。

虽然雌二醇抑制血管损伤后内膜增生,但抑制程度不完全,表明有其它一些不受雌激素调控的因素参与内膜增生。Jenkins 等^[12]发现,损伤后早期膜金属蛋白酶-2 活性升高,随后主要局限在内膜增生部位。该酶为 Ⅲ型胶原酶,其活性升高有利于 SMC 穿过基底膜进入内膜。该结果可以部分解释雌

二醇抑制内膜增生不完全。

本研究结果提示,雌二醇对老年女性再狭窄可能有一定的效果,因为再狭窄的产生首先是在动脉粥样硬化的基础上,其次是内膜损伤,第三是再狭窄的机理并不完全等同于动物实验。另外,雌激素长期应用增加患肿瘤的危险性,只有深入了解雌二醇的作用机理,才能对雌二醇防治再狭窄作出正确评价。

参考文献

- [1] Chen SJ, Li H, Durand J, et al. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery [J]. *Circulation*, 1996, **93**: 577-584
- [2] 韦立新. 经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的病理学机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 1-3
- [3] Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, et al. Estrogen inhibits cuffs-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **130**: 1-10
- [4] 周晓霞, 苏佩清, 杨鹤梅, 等. 三七总皂甙对人高血脂诱发的胎儿血清平滑肌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 43-45
- [5] Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, et al. Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **125**: 27-38
- [6] Song J, Wan Y, Rolfe BE, et al. Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **140**: 97-104
- [7] 吴赛珠, 冯力, 胡友军, 等. 17- β 雌二醇对雌兔腹主动脉损伤后内膜增生的抑制作用 [J]. *第一军医大学学报*, 1998, **18**: 35-36
- [8] Tourneau TL, Van Belle E, Corseaux D, et al. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **33**: 876-882
- [9] Moreno PR, Fllon JT, Murcia AM, et al. Tissue characteristics of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty in diabetic patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **34**: 1045-1049
- [10] 易光辉, 韦立新, 盖鲁粤, 等. 球囊损伤后猪粥样硬化动脉壁原癌蛋白表达的时相 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**: 27-31
- [11] Li G, Chen YF, Greene GL, et al. Estrogen inhibits vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 639-645
- [12] Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, et al. Increased expression of membranetype matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries [J]. *Circulation*, 1998, **97**: 82-90

(此文 1999-11-08 收到, 2000-05-16 修回)

(此文编辑 文玉珊)