

·学科进展与展望·

我国血管外科基础研究概貌

谭 最* 董尔丹[†] 陈德杰* 叶鑫生[†]

(* 武汉大学中南医院血管外科, 武汉 430071; [†] 国家自然科学基金委员会生命科学部, 北京 100085)

[摘 要] 本文总结了“九五”期间国家自然科学基金资助血管外科基础研究的情况, 以及血管外科在缺血性疾病、再狭窄形成和预防、腹主动脉瘤形成和门脉高压症等方面的基础研究成果和进展。

[关键词] 血管外科, 实验研究

本文就“九五”期间国家自然科学基金资助血管外科疾病的有关研究项目及研究进展做一概述和分析。

“九五”期间在血管外科研究方面共投入 141 万元, 共有 7 个单位获得资助, 其中获资助金额前 5 名的单位依次为上海第二医科大学、第二军医大学、中山医科大学、重庆医科大学、北京医科大学。取得的成绩主要集中在缺血性疾病的诊治、血管再狭窄形成机理和防治、腹主动脉瘤形成机理、腹主动脉瘤腔内隔绝术材料国产化研究和门脉高压症等, 现分述如下。

1 缺血性疾病的诊治研究

随着饮食结构变化和人口老龄化, 以动脉硬化闭塞症(ASO)为主的缺血性疾病已成为威胁人类健康的主要疾病之一。鉴于现有临床方法对严重缺血性疾病疗效的缺憾, 人们正借助于细胞和分子生物学方法来研究治疗这种疾病。如将体外构建的重组大肠杆菌质粒 pSV-VEGF₁₆₅ 1mg 分 5 点注射于兔后肢缺血动脉模型缺血肌群, 发现缺血肢体毛细血管密度和毛细血管数/肌肉数比值显著增加, 认为这种方法能显著增加缺血肢体毛细血管形成。另据报道, 建立家兔动脉缺血模型后经动脉内导管注射不同剂量的重组人血管生长素(rhANG), 分别作肢体血压测定, 动脉造影, 放射性核素血流测定及计算肢体肌肉毛细血管密度, 发现家兔动脉内注射 rhANG 治疗缺血, 在用药(20—40 μ g)后可观察到明显的促

血管再生作用, 此作用随 rhANG 的剂量增大而明显。

2 血管吻合术后再狭窄形成机理的研究与防治

2.1 形成机理

血管外科手术远期疗效欠佳的主要原因是血管再狭窄。血管内膜过度增生(VIH)是动脉重建手术后 2—24 个月内发生狭窄或者闭塞的主要原因。血管损伤后平滑肌细胞(SMC)增生与某些原癌基因表达密切相关。经研究证实, 早期应答基因 C-myc 在移植血管表达异常增多, C-myc 基因异常表达可能是 SMC 增殖从而导致移植血管内膜增生的始动基因。应用免疫组化及原位杂交方法检测不同时期移植静脉 SMC 中 C-myc 基因表达情况, 发现 C-myc mRNA 于术后 2—6 小时明显增高, 同时发现移植血管 SMC 中增殖细胞核抗原(PCNA)、C-myc 蛋白表达于术后一周达高峰。因此 C-myc 蛋白与 PCNA 表达变化相一致, C-myc 基因是移植静脉 SMC 增殖的始动基因之一, 它可诱导静止 SMC 进入增殖周期并调节 SMC 增殖。组织型纤溶酶原激活物(t-PA)是由血管内皮细胞合成并分泌的一种丝氨酸蛋白酶, 同时具有促进纤溶酶原转化为纤溶酶和诱导细胞外基质释放及胶原酶原激活为胶原酶的作用, t-PA 在血管移植术后再狭窄的发生发展过程中的作用尚有争议。检测大隐静脉(HSV)组织培养液中 t-PA 的活性变化, 发现血管移植术后早期, 移植静脉的低 t-PA

本文于 2003 年 2 月 27 日收到。

活性水平与吻合口血栓形成相关,中晚期的 t-PA 活性升高与血管平滑肌细胞的迁移及内膜增生等相关。不同浓度的纤维蛋白原(FG)对移植静脉内膜增生的作用是不同的,在血管移植术中取正常人 HSV 行体外培养,在培养液中施加不同浓度的 FG,观察不同浓度的 FG 对 VIH 的影响,发现血管移植术后局部 FG 的高浓度可导致狭窄和闭塞,低浓度的 FG 对 VIH 无明显影响,提示临床上降纤治疗对再狭窄可能有一定的防治作用。对 HSV 组织培养液的进一步研究还发现,高浓度 FG 导致再狭窄和闭塞的机制可能是使 t-PA 活性在培养 HSV 早期时进一步降低,而对培养晚期 t-PA 活性无明显影响。血管平滑肌细胞增生是血管内膜增生的中心环节。以免右颈外静脉间置于同侧颈总动脉为模型,在不同时间点取移植段静脉在透射电镜下观察其增生情况,发现兔自体静脉移植后 7 天中膜平滑肌细胞开始增生并游至内膜参与形成新生内膜,2 周左右达到高峰,提示此时为通过抑制平滑肌细胞增生来抑制 VIH 的最佳时机^[1]。血管吻合可造成内皮剥脱、血管中膜损伤,再内皮化的速度和范围可通过调节中膜血管平滑肌细胞(SMC)的增殖、迁移和细胞外基质(ECM)的合成来影响 VIH。目前的研究表明转化生长因子 β_1 (TGF β_1)可使 ECM 发生积聚,而 VEGF 具有特异的促进内皮细胞增殖及强烈的血管通透作用。TGF β_1 蛋白在静脉移植术后 24 小时出现表达,在一周以内主要位于中膜的 SMC,二周时在内膜、中膜均有 TGF β_1 表达,阳性细胞比例达到最高峰。同时在自体静脉移植后 24 小时,SMC 中 VEGF 开始增多,2 周时达到高峰,这表明 VEGF 和 TGF β_1 的表达高峰与 SMC 内膜增殖的活跃期一致,二者可能相互作用,协同参与移植静脉的内膜增生^[2]。

2.2 再狭窄的预防

药物防治 VIH 有一定疗效,如血管紧张素转换酶抑制剂和钙离子拮抗剂通过抑制 VSMC 增殖和迁移而抑制 VIH;一氧化氮(NO)的底物赖氨酸产生 NO,促进内皮修复而抑制 VIH。血管损伤后平滑肌细胞增殖与某些原癌基因表达密切相关,故某些学者利用对原癌基因抑制的药物来防止 VIH。通过建立大鼠自体静脉移植模型,于术前术后应用不同剂量放线菌素 D,发现高剂量组 C-myc mRNA 的表达较对照组明显减少,移植血管内膜增殖明显受抑制,提示高剂量放线菌素 D 对 C-myc 早期应答基因表达及内膜增殖有抑制作用。光动力疗法主要有传统的光体外辐射疗法和血管腔内激光辐射疗法,后者更

适合腔内血管外科的发展。光动力疗法研究主要集中在研究无毒高效光敏剂和均匀辐射的激光光纤以及恰当的局部辐射途径。据报道以犬颈总动脉切断后再吻合为模型,吻合术中给予光敏剂(P_{SD}-007)灌注加血管腔内激光照射,证实吻合口截面积缩窄程度明显减轻,电镜下吻合口内膜连续,皱壁细小,排列较整齐,血液成份沉积少。认为血管吻合过程中应用腔内光动力疗法能显著降低血管吻合口内膜增生的形成。受到 β 射线杀死肿瘤细胞及抑制瘢痕组织的启发,有学者采用血管内应用 β 射线照射预防血管再狭窄,其近距离生物效应好,短时间照射即可获得高效率,且穿透力弱,无辐射损害。据报道建立大鼠自体静脉移植模型,用³²P 将移植前静脉段于体外直接照射内膜,发现术后照射组移植静脉段内膜的平均厚度明显低于对照组,照射组 VSMC 增殖较对照组明显被抑制。含 β 射线的软性血管外模型(SEM)具有显著抑制移植血管 SMC 增殖的作用,同时发现其对于早中期(1—4 周)移植血管内膜增生亦具有显著的抑制作用^[3]。

基因治疗是研究的重点,其疗效主要取决于靶基因、载体系统和基因导入途径的选择。各种反义基因治疗有三类:一是反义原癌基因如反义 C-myc, C-myb, C-ras。医用生物蛋白胶携带反义寡核苷酸 C-myc 局部用于静脉移植植物外膜能显著防止其内膜增生,有效防止血管狭窄。将大鼠自体移植静脉外周涂以加有反义 C-myc 寡聚脱氧核苷酸(ODN)的 F₁₂₇凝胶,发现反义 C-myc ODN 对移植静脉内膜增生有抑制作用^[4];二是各种反义细胞周期调节基因包括反义 cdc2, cdk2 和增殖细胞核抗原(PCNA),阻断 PCNA 基因的表达可抑制 VSMC 的增殖与移行,但不会导致细胞的死亡。应用 PCNA 反义技术,可成功抑制其基因表达;三是各种反义细胞因子基因。单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)是目前公认的主要调节单核巨噬细胞粘附及迁移进入血管壁的物质, MCP-1 持续高表达在移植血管早期的炎症细胞浸润、新生内膜增殖中起着重要的始动作用。我国学者将反义 MCP-1 基因通过局部定位转染的方法转染至兔移植静脉段,发现移植静脉自身 MCP-1 mRNA 的表达受到明显抑制,内膜增生程度显著减轻。反义 MCP-1 转基因表达成功的抑制了 MCP-1 在移植静脉中的表达,从而为临床寻找防治血管再狭窄的方案提供了新思路^[5]。应用理想的载体,将目的基因导入血管,并安全、忠实和长效表达,是基因治疗的关键技术。基因转移方法包括病毒方法和非病毒

方法两大类。构建 P₅₃腺相关病毒(AAV)增强型质粒表达载体,通过阳离子脂质体介导导入 VSMC,PCR可证实有外源性 P₅₃ cDNA 的整合,并表达出相应的 mRNA 和蛋白质,证明构建的 P₅₃ AAV 增强型表达质粒可作为基因治疗的载体,VSMC 可作为心血管疾病治疗的靶细胞。基因导入体内的途径可分为直接体内法和离体法,直接体内法的应用进展较大。将反义药物溶于生物蛋白胶中,再将胶直接涂于血管外膜,使反义药物持续释放,可达到理想的抑制血管内膜增生的效果^[6]。基因缝线技术是近年来发展的新技术,将在荧光标记的核酸溶液中泡过的缝线直接行兔颈总动脉吻合,证实保护薇桥缝线可较大量携带反义基因片段,于血管吻合时直接将反义基因转移至吻合口并缓慢释放。

3 腹主动脉瘤形成机理的研究

腹主动脉瘤(AAA)的形成与动脉粥样硬化相关,其机制主要为缺乏营养血管,裸露的平滑肌细胞激活胶原酶使大量胶原蛋白降解以及血液中的致硬化因子与管壁接触时间延长。腹主动脉瘤具有家族遗传倾向,第16号常染色体和X染色体上某些基因的缺失可造成动脉壁内弹力蛋白和胶原蛋白降解过多而形成动脉瘤。1994年Newman等人发现在腹主动脉瘤患者当中,与锌有关的基质金属酶MMP-1和MMP-9的活性均增高^[7]。我国学者采用MMP-1和MMP-9的mRNA探针在20例AAA组织切片上行原位杂交试验,发现MMP-1和MMP-9在巨噬细胞、平滑肌细胞和淋巴细胞均有表达,其中巨噬细胞的基质金属蛋白酶类(MMPs)表达强烈。认为MMPs在AAA的形成和扩张过程中发挥重要作用,而炎性细胞是产生MMPs的主要来源,并影响间质细胞MMPs表达^[8]。

4 腹主动脉瘤腔内隔绝术材料国产化研究

与传统腹主动脉重建手术相比,微创腔内隔绝术的优点是手术失血量、术后呼吸支持时间、ICU监护时间、住院时间均明显减少,严重并发症的发病率降低,其安全性和微创性已被认可。腹主动脉瘤腔内隔绝术无论是从设备开发还是技术方法等方面,国内外都还处于探索阶段,我国的专业工作者也正在积极研制开发国产化技术设备。腹主动脉瘤腔内修复术的复合体可分为三类:管型、分叉型和单臂型^[9]。据报道以单根镍钛记忆合金丝编织而成Z型网状支架,6-0锦纶无损伤缝合线结扎各个连接

点,形成支架框架,将支架套入对应口径的超薄人造血管中,形成完整的移植物。制作好犬腹主动脉瘤模型一个月后行腔内隔绝术,10例动脉瘤模型手术成功9例,未见移位、内漏等并发症发生。另据报道用国产单根镍钛记忆合金丝编织成网状管型支架,外套以与其直径相匹配的国产真丝涤纶交织人造血管,两端用6-0锦纶无损伤缝合线固定,支架两端各留0.5mm裸露,制成喇叭状支架-移植物,在X线透视下经股动脉置入犬腹主动脉瘤模型内,置入成功率为95%,6个月后管腔保持通顺率为79%^[10]。

5 门静脉高压症的研究

门静脉高压症以高血流动力学为特征,目前研究较多的是高血流动力学状态的机制。以往的研究发现,肝硬化门静脉高压患者肝组织中的 α_1 肾上腺受体(α_1 AR)数量减少。应用RT-PCR检测乙型肝炎后肝硬化肝组织中 α_1 AR亚型mRNA的表达,结果显示肝硬化组织 α_1 a-AR和 α_1 b-AR亚型的mRNA显著下降,说明肝硬化时 α_1 a-和 α_1 b-AR基因转录的减少是 α_1 AR蛋白减少的重要原因^[11]。受体蛋白减少可能会对肾上腺素、去甲肾上腺素的效应产生影响,有利于门静脉高压症的形成和维持。一氧化氮(NO)也是高动力循环重要的介质。将NO生物合成抑制剂左旋单甲基精氨酸(L-NMMA)注入制备成功的鼠门静脉高压模型,结果显示L-NMMA能逆转门静脉高压鼠的高血流动力学状态,说明NO是门静脉高压症中产生高动力循环的重要介质。动脉对内源性血管收缩物质如去甲肾上腺素(NE)的低反应在门脉高压症的高动力循环中起作用。动脉低反应的产生可能与过量生成的内源性血管舒张物质有关,但钾离子通道的开放与低反应的关系不太清楚,通过观察肝前型门静脉高压症(PVS)大鼠离体肠系膜小动脉对NE的反应以及钾离子通道阻断剂对NE的反应,发现PVS鼠血管对NE反应降低,应用钾离子通道阻滞剂后PVS鼠血管对NE的低反应仍然存在,从而认为单一类型的K⁺通道开放并不是门静脉高压时鼠动脉对NE低反应的主要原因。

如何降低食管静脉曲张的发生以及断流术后食管静脉曲张的再形成,是门静脉高压症治疗领域的焦点之一。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是近年来研究较多的血管生成因子之一,在新生血管形成中有重要作用。应用免疫组化检测bFGF在食管中的表达,发现bFGF在门静脉高压时显著增高,并与断流术前、术后食管静脉曲张的形成有关^[12]。

参 考 文 献

- [1] 曲乐丰,景在平.兔自体静脉移植物的中膜平滑肌细胞超微结构变化.第二军医大学学报,1999,20:848—850.
- [2] 胡海地,冯勇. TGF β_1 、VEGF在自体静脉移植中的表达状况及意义.中华外科杂志,2000,38:861—863.
- [3] 钱济光,钱兆奇.含 β 射线的软性血管外模型对移植血管内膜增生及平滑肌增殖的抑制作用.中华医学杂志,1999,79:19—21.
- [4] 王淳.反义c-myc寡核苷酸对大鼠自体移植静脉内膜增生的影响.中华实验外科杂志,2000,17:323—325.
- [5] 李拥军,管珩.反义单核细胞趋化蛋白-1基因抑制静脉内膜增殖的实验研究.中华外科杂志,2001,39:718—720.
- [6] 曲乐丰,景在平.医用生物蛋白胶携载反义寡核苷酸的实验研究.第二军医大学学报,2001,22:598—599.
- [7] Newman K M, Jean-Claude J, Li H et al. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. J. Vasc. Surg., 1994,20(5):814—20.
- [8] 张健,王新文.基质金属蛋白酶在腹主动脉瘤组织中表达.中华实验外科杂志,1999,16:26—27.
- [9] 张强,段志泉.应用跨肾动脉支架人工血管腔内修复术治疗腹主动脉瘤.中国医科大学学报,2000,29:53—54.
- [10] 张云,张纪蔚.自制国产化支架-移植腔内治疗腹主动脉瘤实验研究.中华实验外科杂志,2001,18:216—217.
- [11] 陈雷,朱继业.肝硬化门静脉高压症患者肝组织 α_1 肾上腺素受体亚型的mRNA表达.中华实验外科杂志,2000,17:138—140.
- [12] 徐洪,陈治平.门静脉高压鼠断流术前食管中碱性成纤维细胞生长因子的表达.中华实验外科杂志,2002,19:259—261.

OVERVIEW OF THE BASIC RESEARCH ON VASCULAR SURGERY IN CHINA

Tan Zui* Dong Erdan† Chen Dejie* Ye Xincheng†

(* Department of Vascular Surgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071;

† Department of Life Sciences, NSFC, Beijing 100085)

Abstract This paper sums up the fundamental research projects on Vascular Surgery supported by National Natural Science Foundation of China from 1996 to 2000, and presents the experimental results and advances in the aspects of ischemia disease, the formation mechanism and prevention of restenosis, the development of abdominal aorta aneurysm and portal hypertension.

Key words Vascular Surgery, experimental research

·资料·信息·

“十五”第二批国家自然科学基金重大项目受理申请工作启动

国家自然科学基金委员会根据国家经济、社会、科技发展的需要,重点选择具有前瞻性、基础性、战略性的重大科学问题,组织实施国家自然科学基金重大项目。目前,“十五”第二批重大项目申请指南已经发布。

有关重大项目立项领域如下:

- (1)核技术在分子水平上研究典型环境污染物的毒理
- (2)与人类健康相关的蛋白质结构和医学成像的同步辐射研究
- (3)分子固体材料的控制合成及功能性质研究
- (4)聚合物凝聚态的多尺度连贯研究
- (5)大型水利工程对重要生物资源长期生态学效应研究

- (6)免疫识别相关的结构信息的研究
- (7)大豆优异基因资源发掘及其基因组研究
- (8)上层海洋-低层大气生物地球化学与物理过程耦合
- (9)深部岩体力学基础研究与应用
- (10)新一代光学频标物理及技术的基础研究
- (11)超高密度、高速光-磁混合数字信息储存研究
- (12)正负电子对撞物理的系统研究
- (13)未来移动通信系统基础理论与技术研究
- (14)非规范知识处理的基础理论及关键技术研究

(计划局 供稿)