

文章编号:1005-6947(2008)06-0556-04

· 基础研究 ·

腹主动脉人工血管置换术后放疗对人工血管内膜的影响

颜京强¹, 舒畅¹, 周晓², 万恒¹

(1. 中南大学湘雅二医院 血管外科, 湖南 长沙 410011; 2. 湖南省肿瘤医院 头颈外科, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察腹主动脉人工血管置换术后 35 Gy 体外分割放疗对人工血管通畅率、内膜增生及血管内皮细胞(VEC)覆盖的影响。方法 对 20 只犬行腹主动脉膨体聚四氟乙烯(ePTFE)人工血管置换术。术后动物分成对照组和放疗组,每组 10 只。两组均于术后 4, 8 周采集标本,行 HE 染色,增殖细胞核抗原(PCNA)及分化抗原簇 34(CD34)免疫组化检测。结果 两组术后各有 1 例人工血管内血栓形成,通畅率均为 90.0%。术后 4 周,放疗组和对照组人工血管内膜形成完整,内膜厚度和 PCNA 表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),VEC 覆盖均不完全;术后 8 周,放疗组内膜厚度较对照组明显变薄($P < 0.05$),对照组人工血管近端、中间、远端 3 处内膜厚度分别为 $(72.30 \pm 9.15) \mu\text{m}$, $(40.46 \pm 7.75) \mu\text{m}$ 和 $(98.06 \pm 6.90) \mu\text{m}$, 放疗组人工血管近端、中间、远端 3 处内膜厚度分别为 $(37.67 \pm 6.77) \mu\text{m}$, $(21.16 \pm 4.98) \mu\text{m}$ 和 $(56.64 \pm 5.13) \mu\text{m}$, PCNA 表达减少($P < 0.05$);VEC 均覆盖完整。结论 腹主动脉人工血管术置换后 35 Gy 体外分割放疗不影响移植人工血管通畅率,对内膜 VEC 的覆盖亦无明显影响,但可抑制人工血管内膜增生和 PCNA 的表达。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(6): 556-559]

关键词: 主动脉, 腹; 人工血管; 血管内膜; 放射疗法; 增殖细胞核抗原; CD34/抗原

中图分类号: R 654.4

文献标识码: A

Effect of radiotherapy on neointima of prosthetic vascular graft after prosthetic vessel replacement of abdominal aorta

YAN Jingqiang¹, SHU Chang¹, ZHOU Xiao², WAN Heng¹

(1. Department of Vascular Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2. Department of Head and Neck Surgery, Hunan Province Cancer Hospital, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To observe the effect of external segmental irradiation at a total dose of 35 Gy after prosthetic vessel replacement of abdominal aorta on the patency rate, the neointima proliferation and the covering of vascular endothelial cell of the vascular graft. **Methods** Prosthetic vessel replacement of abdominal aorta with ePTFE vascular graft was done in 20 mistus dogs, which were divided into control group and radiotherapy group, 10 dogs respectively. The specimen in each group were harvested at 4 weeks and 8 weeks after surgery. H-E staining, immunohistochemistry test of PCNA and CD34 were done. **Results** There was 1 case in each group with thrombosis in prosthetic vascular graft, and the patency rate was 90% in each group. Four weeks after surgery, the neointima of prosthetic vascular graft was formed completely in each group, and the intimal thickness or the PCNA expression had no statistically difference ($P > 0.05$) between the radiotherapy and control groups, and the coverage of vascular endothelial cell was incomplete in

收稿日期: 2008-01-21; 修订日期: 2008-04-28。

作者简介: 颜京强, 男, 中南大学湘雅二医院血管外科硕士研究生, 主要从事动脉疾病方面的研究。

通讯作者: 舒畅 E-mail: changshu01@yahoo.com

each group; 8 weeks after surgery, the intimal thickness of radiotherapy group was statistically thinner than that of control group ($P < 0.05$), and the intimal thickness of vascular graft in control group at the proximal, middle, and distal segment was: $(72.30 \pm 9.15) \mu\text{m}$, $(40.46 \pm 7.75) \mu\text{m}$ and $(98.06 \pm 6.90) \mu\text{m}$ respectively, and that in radiotherapy group was: $(37.67 \pm 6.77) \mu\text{m}$, $(21.16 \pm 4.98) \mu\text{m}$ and $(56.64 \pm 5.13) \mu\text{m}$ respectively. The PCNA expression was statistically less in radiotherapy group than that in control group ($P < 0.05$). The vascular endothelial cell coverage was complete in each group.

Conclusions The external segmental radiotherapy at a total dose of 35 Gy after prosthetic vessel replacement of abdominal aorta does not affect the patency rate of prosthetic vascular graft, and not significantly affect the vascular endothelial cell coverage, but it can inhibit the neointima proliferation and PCNA expression.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6): 556 - 559]

Key words: Aortic Aneurysm, Abdomen; Blood Vessel Prosthesis; Tunica Intima; Radiotherapy; Proliferating Cell Nuclear Antigen; CD34/antigens

CLC number: R 654.4

Document code: A

此前本课题组已证实 28Gy, 35Gy 和 44Gy 3种剂量体外分割放疗均可抑制兔颈动脉自体静脉移植吻合口处的内膜增生,但 44Gy 能引起血管壁部分纤维化、坏死,35Gy 等效于 70Gy 的临床常规肿瘤治疗剂量^[1]。本实验通过建立犬腹主动脉人工血管置换模型,对人工血管施行 35Gy 的体外分割放疗,旨在探索术后放疗对人工血管通畅率及其内膜的影响,为肿瘤根治切除人工血管置换术患者术后能否接受放疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及材料

杂种犬 20 只,雌雄不限,体重 $(12 \pm 0.5) \text{kg}$, 随机分为 4 组 ($n = 5$), 即 4 周放疗组, 4 周对照组, 8 周放疗组及 8 周对照组。各组均行腹主动脉人工血管置换术。人工血管为直径 6 mm 的膨体聚四氟乙烯 (ePTFE) 人工血管 (Gore-Tex)。医用电子直线加速器为 ELEKTA Precise 5 745。抗 CD34 多克隆抗体及 DAB 显色试剂盒, 购于武汉博士德公司。抗 PCNA 多克隆抗体及试剂盒, 为美国 ZYMED 生产。

1.2 实验方法

1.2.1 手术步骤 3% 戊巴比妥钠肌内注射全麻 (30mg/kg) 后, 取下腹正中切口, 游离肾下段腹主动脉, 静脉肝素化 (0.5mg/kg) 5 min 后, 用无损伤血管钳阻断肾下腹主动脉近远端, 切除动脉 1.5 cm; 以相同长度 ePTFE 血管置换, 6 - 0 锦纶线连续缝合 (图 1)。银夹标上下端记吻合口以便放疗定位。腹主动脉阻断时间 30 ~ 40 min。

1.2.2 术中术后处理 术中静脉滴注青霉素

160 万 U。术后肌内注射青霉素 160 万 U、庆大霉素 8 万 U, 每日 1 次, 共 3 d; 术后皮下注射肝素钠 $1 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 7 d; 术后第 5 天起, 口服华法林 1.25mg/d 。术后第 2 周起行放疗, 每日用 X 线 7Gy, 照射区域为人工血管及临接吻合口上下方 1 cm 的腹主动脉, 自右向左倾斜照射避开脊髓, 连续 5 d, 对照组不予照射。

1.2.3 标本采集 于术后 4 周和 8 周进行。沿原切口进腹, 游离人工血管及临接上下各 0.5 cm 腹主动脉, 快速取下, 置 10% 甲醛溶液中固定。观察人工血管通畅情况, 作 HE 染色, 免疫组化检测分化抗原簇 34 (CD34) 及增殖细胞核抗原 (PCNA)。

1.3 观察指标及其测定方法

1.3.1 人工血管内膜厚度 切取近、远端距吻合口 1 mm 及中间 3 处人工血管, 中间处环切, 近、远端处纵切。中间处取 4 个对称点, 近、远端处取 2 个对称点, 测量厚度求平均值。

1.3.2 PCNA 检测 操作按试剂盒说明进行。细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为 PCNA 阳性细胞。PCNA 阳性颗粒相对面积及光密度比的测量采用 Image-pro Plus (IPP) 软件进行。

1.3.3 CD34 观察 操作按试剂盒说明进行。细胞浆出现棕黄色颗粒者为 VEC。观察人工血管内膜表面 VEC 覆盖是否完整。

1.4 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用两独立样本 t 检验; 同组内均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。全部数据采用 SPSS14.0 处理。

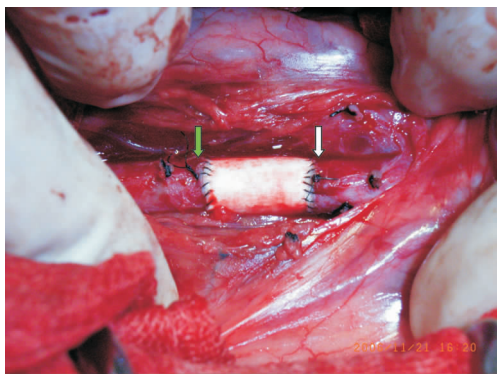


图1 人工血管重建术后照片 白箭头:近端吻合口;
绿箭头:远端吻合口

2 结果

2.1 两组人工血管通畅率

实验犬腹主动脉人工血管置换术后均存活,放疗区域皮肤均未见异常,放疗前后无明显差别,

两组血管吻合口愈合均佳。对照组有1例人工血管外壁无组织黏附包裹,放疗组和对照组各1例人工血管内血栓形成,人工血管通畅率均为90.0%。

2.2 两组人工血管内膜厚度

4周时两组人工血管内膜已完整形成,主要成分为机化的纤维组织,并可见炎性细胞及梭形核细胞,但内膜表面VEC不完全覆盖(图2),两组无明显差别。8周时两组内膜均完整(图3-4),表面均已被VEC完全覆盖(图5),内膜下可见较多平滑肌细胞(SMC)和纤维胶原组织,有炎性细胞浸润。放疗组内膜厚度与对照组比较,4周时放疗组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);8周放疗组较对照组明显减少($P < 0.05$),其中远端处极显著减少($P < 0.01$)。各组中间处较近、远端减少,近端较远端减少(均 $P < 0.05$)(表1)。

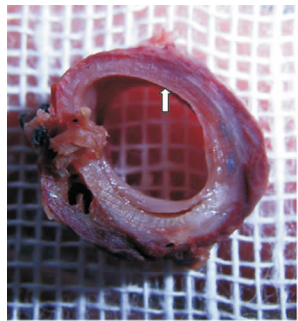


图2 8周对照组人工血管横断面 白箭头:人工血管内膜

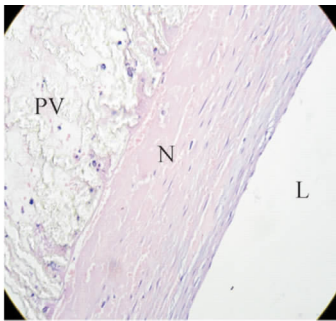


图3 8周对照组内膜 HE 染色($\times 400$) PV:人工血管; N:内膜; L:管腔

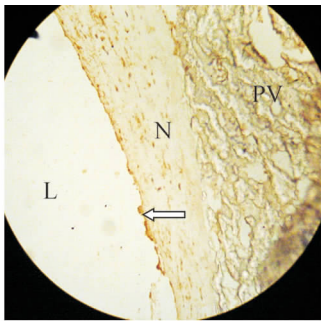


图4 4周 VEC 覆盖不全免疫组化法($\times 400$) PV:人工血管; L:管腔; N:内膜; 白箭头:阳性细胞

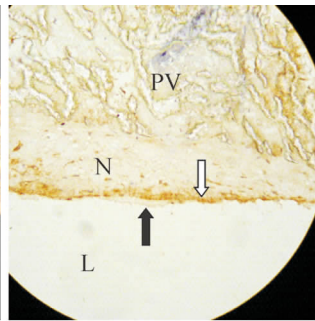


图5 8周 VEC 覆盖完全免疫组化法($\times 400$) 黑箭头:附壁血栓; 白箭头:阳性比较低; PV:人工血管; N:内膜; L:管腔

表1 人工血管内膜厚度($\mu\text{m}, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	近端	中间	远端
4周 对照	5	32.50 \pm 5.76	12.87 \pm 3.22	53.93 \pm 7.94 ³⁾
4周 放疗	5	27.30 \pm 4.92	11.76 \pm 3.99	46.86 \pm 5.01 ³⁾
8周 对照	5	72.30 \pm 9.15 ¹⁾	40.46 \pm 7.75 ¹⁾	98.06 \pm 6.90 ^{2),3)}
8周 放疗	5	37.67 \pm 6.77	21.16 \pm 4.98	56.64 \pm 5.13 ³⁾

注:与放疗组比较,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; 3)与近端中间比较, $P < 0.05$

表2 PCNA 阳性表达区相对面积($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	近端	中间	远端
4周 对照	5	5.09 \pm 0.46	2.68 \pm 0.85	7.37 \pm 0.91 ³⁾
4周 放疗	5	3.40 \pm 0.85	1.93 \pm 0.56	5.06 \pm 0.36 ³⁾
8周 对照	5	6.76 \pm 0.70 ¹⁾	3.61 \pm 0.64 ¹⁾	9.90 \pm 0.96 ^{2),3)}
8周 放疗	5	4.50 \pm 0.76	2.37 \pm 0.50	6.48 \pm 0.51 ³⁾

注:与放疗组比较,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; 3)与中间近端比较, $P < 0.01$

2.3 两组的 PCNA 的表达

4周时放疗组的 PCNA 阳性表达区相对面积和光密度比与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),8周放疗组较8周对照组的表达减低($P < 0.05$);各组中间处表达最低,远端处表达最高($P < 0.01$)(表2-3)。

表3 PCNA 阳性表达区相对光密度比($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	近端	中间	远端
4周 对照	5	1.57 \pm 0.36	0.56 \pm 0.12	2.67 \pm 0.38 ³⁾
4周 放疗	5	1.12 \pm 0.25	0.36 \pm 0.05	1.50 \pm 0.35 ³⁾
8周 对照	5	2.26 \pm 0.39 ¹⁾	0.85 \pm 0.13 ¹⁾	4.26 \pm 0.41 ^{2),3)}
8周 放疗	5	1.67 \pm 0.33	0.53 \pm 0.10	2.74 \pm 0.30 ³⁾

注:与放疗组比较,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; 3)与中间近端比较, $P < 0.01$

3 讨论

本研究采用与临床常规分割放疗剂量(70 Gy)相等效的实验剂量(7 Gy × 5),对人工血管施行体外分割放疗,在放疗时间和剂量上均模拟临床放疗情况。

对照组1例人工血管无组织包裹,光镜下证实此例人工血管内膜厚度较同组其他例薄。提示人工血管包裹组织来源的VEC和SMC,可通过网孔向管腔内生长,这是人工血管内膜细胞3个可能来源之一^[2-3],而术后早期炎症反应及血流动力学改变^[4]则对VEC的覆盖起负性影响^[5]。

本研究结果示,术后放疗对人工血管通畅率无影响(均90.0%),对内膜厚度在4周时无明显影响($P > 0.05$),8周时有显著抑制作用($P < 0.05$)。近年有报道^[6]称,转染survivin反义寡脱氧核苷酸可通过抑制survivin的基因及蛋白产物表达以抑制移植血管内膜增生,而放疗抑制内膜增生的抑制作用可能与其不同,术后第2周放疗,可抑制SMC移行和增殖^[7],但此时已有大量SMC向人工血管内迁移、增殖^[8],其对内膜的抑制则主要通过诱导SMC由合成型转向收缩型实现。合成型SMC合成分泌细胞外基质分泌旺盛^[9],故细胞类型转化亦可抑制内膜增生,而术后4周放疗组内膜厚度减少不明显,术后8周则较对照组显著减少,可能与放疗对SMC的抑制效应需较长时间的累计才能表现出统计学差异有关。

术后放疗对人工血管VEC覆盖无明显影响,可能与VEC对辐射的耐受性大^[10]有关。亦有报道^[11]认为照射后VEC附着、分化功能受抑制,但照射后VEC的迁移功能未受损害,足以补偿VEC的丢失,而术后8周VEC完整覆盖与课题组早期研究相一致^[12]。

腹主动脉人工血管置换术后35 Gy的体外分割放疗不影响人工血管通畅率,对人工血管吻合口愈合无影响,并可抑制内膜增生,且其临床等效剂量有肿瘤细胞杀伤作用,故本研究有很好的临床参考价值。

参考文献:

- [1] 周晓,单振锋,舒畅,等. 术后放疗时血管移植吻合的影响[A]. 第四届中国肿瘤学术大会暨第五届海峡两岸学术会议论文集[C]. 天津:2006. 900-901.
- [2] Kouchi Y, Onuki Y, Wu MH, *et al.* Apparent blood stream origin of endothelial and smooth muscle cells in the neointima of long, impervious carotid-femoral grafts in the dog [J]. *Ann Vasc Surg*, 1998, 12(1): 46-54.
- [3] Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, *et al.* Increase in circulating endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair [J]. *Heart Vessels*, 2004, 19(3): 107-110.
- [4] 刘晟,舒畅. 兔动脉壁剪切力改变对MMP-2表达及动脉瘤形成的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(6): 565-569.
- [5] 罗涛,张强,张建,等. 早期炎症反应对移植静脉中外源基因表达效率的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(5): 349-353.
- [6] 杨军,胡新华,刘程伟,等. 转染survivin反义寡脱氧核苷酸对移植血管内膜增生的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(01): 32-36.
- [7] Fareh J, Martel R, Kermani P, *et al.* Cellular effects of beta-particle delivery on vascular smooth muscle cells and endothelial cells: a dose-response study [J]. *Circulation*, 1999, 99(11): 1477-1484.
- [8] Gajdusek CM, Tian H, London S, *et al.* Gamma radiation effect on vascular smooth muscle cells in culture [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, 36(4): 821-828.
- [9] 余波,薛光华,乐竹琴,等. 大鼠自体静脉移植后内膜增生与细胞外基质堆积的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 1997, 14(5): 267-268.
- [10] Vodovotz Y, Waksman R, Kim WH, *et al.* Effects of intracoronary radiation on thrombosis after balloon overstretch injury in the porcine model [J]. *Circulation*, 1999, 100(25): 2527-2533.
- [11] O'Connor MM, Mayberg MR. Effects of radiation on cerebral vasculature: a review [J]. *Neurosurgery*, 2000, 46(1): 138-151.
- [12] 舒畅,汪忠镐,吕新生,等. 腹主动脉瘤腔内治疗的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2000, 9(2): 135-138.