

## ·实验研究 Experiment research·

## 血管成形术后外膜细胞表型转化和迁移的实验研究

王永利, 贺能树, 张家兴, 司同国, 范海伦, 葛夕洪, 徐 锐

**【摘要】 目的** 观察和分析血管成形术后血管外膜成纤维细胞表型转化和外膜细胞向血管内膜的迁移。**方法** 改良导丝法损伤 24 只大鼠颈总动脉 (CCA), 制作血管再狭窄模型; 采用 5-溴-2 尿苷嘧啶 (BrDU) 标记增殖和迁移的成纤维细胞, 以免疫组化, BrDU 单染结合  $\alpha$ -肌动蛋白 ( $\alpha$ -actin) 复染, 光镜、扫描电镜和图像分析仪观察和分析损伤后 3、7、14 和 28 d, 血管外、中和内膜上与 BrDU 结合的成纤维细胞的动态分布。**结果** 1. 免疫组化染色: BrDU 结合的外膜成纤维细胞在术后第 3 天外膜上分布较多, 至第 7 天达到峰值并表达  $\alpha$ -actin, 成纤维细胞发生表型转化成为成肌纤维细胞, 细胞外基质 (ECM) 沉积; 第 14 天, 外膜上阳性细胞数下降, 中膜和内膜上数量显著上升, 内膜增厚, 管腔狭窄; 第 28 天, 外膜、中膜和内膜阳性细胞数量回归到基线, 但内膜 ECM 沉积较多, 内膜仍增厚, 管腔狭窄。不同时间点, 血管三层结构内阳性细胞数比较均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。2. 电镜观察: 血管成形术后, 成纤维细胞胞质饱满, 粗面内质网发达, 表面分泌颗粒丰富, 合成大量微丝束, 转化为成肌纤维细胞; 第 7 和 14 天, 成肌纤维细胞形成宽大的伪足, 分别伸向血管外弹力板窗孔和内弹力板窗孔, 细胞呈腔内方向迁移趋势。**结论** 血管成形术后血管外膜成纤维细胞发生表型转化, 合成分泌  $\alpha$ -actin; 外膜成纤维细胞转化为成肌纤维细胞, 向血管内膜迁移、增殖, 成为新生内膜的细胞成分; 外膜细胞和血管再狭窄有关。

**【关键词】** 血管成形术; 血管外膜; 成肌纤维细胞; 表型; 迁移

中图分类号: R622.4 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2006)-07-0424-06

**Phenotype change and migration of adventitial fibroblasts during postangioplasty** WANG Yong-li, HE Neng-shu, ZHANG Jia-xing, SI Tong-guo, FAN Hai-lun, GE Xie-hong, XU Rui. *Interventional Imaging Center, The Tenth People's Hospital Affiliated to Shanghai Tongji University, Shanghai 200072, China.*

**【Abstract】 Objective** To verify fibroblasts translocation from adventitia into neointima by labeling adventitia cells with bromodeoxyuridine (BrDU) after angioplasty, and to explore the relationship of adventitial fibroblast with restenosis. **Methods** Vascular restenosis model was created by injured intima of common carotid artery (CCA) of mouse with guidewire, adventitial fibroblasts were labeled with BrDU, and dynamic distribution of myofibroblasts in adventitia, media and neointima was observed at different times (3 d, 7 d, 14 d and 28 d) by means of single/double-label immunohistochemistry, light microscope, electronic microscope and image analysis system. **Results** 1. Immunohistochemistry: More adventitial fibroblasts combined with BrDU could be found in adventitia on the 3rd day of postangioplasty, and the number of this kind of cells reached the peak on 7th day, and at the same time fibroblasts changed their phenotypes and became myofibroblasts, which produced  $\alpha$ -actin and extracellular matrix (ECM). On 14th day, the number of the positive cells decreased in adventitia, increased in media and neointima associated with intima thickening; on 28th day, while the number of fibroblasts labeled by BrDU returned to the basic-line in adventitia, media and intima, nevertheless, intima thickening and vascular stenosis and intimal ELM precipitation were still present. There were significant differences in the number of fibroblasts labeled with BrDU located in three layers of artery ( $P < 0.05$ ). 2. Electronic microscope: After angioplasty, the plasm of fibroblasts became rich, mitochondrious and increase of Golgi apparatus; and the amount of rough endoplasmic reticulus rose with more secretory granules,

作者单位: 200072 上海同济大学附属第十人民医院介入影像中心 (王永利、张家兴); 天津医科大学总医院 (贺能树、司同国、范海伦、葛夕洪、徐 锐)

通讯作者: 王永利

together with a great amount of collagen synthesized forming the microfilaments; on days of 7th and 14th, the wide pseudopodia of myofibroblasts could be found extending into the windows on the external elastic lamina (ELL) and the internal elastic lamina (ILL); and showing the tendency of cellular migration. **Conclusions** Adventitial fibroblasts change their phenotype in postangioplasty and become myofibroblasts, which can synthesize  $\alpha$ -actin, and translocate into the neointima. The adventitial fibroblasts are correlated with the postangioplasty restenosis. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 424-429)

**【Key words】** Angioplasty; Adventitia; Myofibroblasty; Phenotype; Migration

血管外膜细胞在血管成形术后的再狭窄中的作用一直未受重视,直到上世纪 90 年代中、后期才陆续有实验报道<sup>[1]</sup>。动脉损伤(包括血管成形术和血管内支架植入)后,血管外膜参与了血管病理性的修复或再狭窄的形成。为数不多的实验指出,血管成形术后的再狭窄细胞迁移机制中,除现有的血管中膜血管平滑肌细胞(VSMC)迁移理论外,可能还存在血管外膜细胞迁移理论,即血管损伤后,血管外膜成纤维细胞由外膜经中膜向内膜迁移,新生内膜下增殖的细胞不仅是 VSMC,还有来源于外膜的发生表型转化后的成肌纤维细胞(myofibroblast)。但是血管外膜细胞迁移理论目前尚有争议。个别实验得出相反的结论,未发现血管外膜上的成纤维细胞向血管中膜迁移<sup>[2]</sup>。甚至有人认为,在血管的外膜上存在干细胞池。血管损伤后,细胞产生胚胎发育时的回忆反应。非肌性细胞(外膜的干细胞)转化为成肌纤维细胞,再进一步,可能转变为 VSMC<sup>[3]</sup>。本实验从细胞形态学和细胞的蛋白表达等方面对血管外膜细胞的表型变化、迁移进行了观察和分析,以期对血管成形术后血管再狭窄过程中,细胞迁移机制学说有进一步认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠颈总动脉(CCA)血管成形术后再狭窄模型制备

改良导丝法再狭窄模型制作:选取 SD 雄性大鼠 24 只,体重 250 ~ 300 g,随机分成 4 组。10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉,采用金属导丝损伤大鼠 CCA 制备再狭窄模型,即沿大鼠颈中线切开皮肤,逐层分离皮下组织,分别暴露两侧 CCA 和颈外动脉(ECA),经一侧 ECA 切口向 CCA 送入直径 0.038 英寸金属导丝,来回抽送 3、4 次,扩张、损伤血管内膜和血管壁全层,其作用机制类似于球囊和血管内支架的血管成形术机制。CCA 损伤侧作为实验组,另一侧 CCA 空置,作为对照组。分别观察 3、7、14 和 28 d 4 个时间点的血管细胞改变。

### 1.2 抗原标记物的配制和标记途径

5-溴-2 尿苷嘧啶(BrDU)参与增殖细胞的 DNA 合成,整合到外膜增殖细胞后,采用免疫组化方法可对外膜成肌纤维细胞进行标识。其配制方法:首先将 BrDU 粉末溶解于 PBS 溶液中,浓度为 25% (0.25 mg/ml),再将 pluronic 生物胶粉末按 2.5% 浓度(2.5 mg/ml)加入上述溶液里。BrDU 给予途径:将损伤后的动脉和对照侧动脉用无菌生理盐水清洗后,棉签吸干组织间的液体,再将上述混合溶液,每次使用前充分振荡混匀,抽吸 0.2 ml 于模型制成后,即刻均匀浸涂双侧 CCA。

### 1.3 标本置备

常规石蜡包埋的组织标本做成 5  $\mu$ m 的连续切片,贴附于经防脱片剂 APES 预处理的载玻片上,捞片后置烤箱 58 ~ 60℃,30 ~ 60 min,以使切片紧密黏附,冷却到室温后保存备用。

### 1.4 BrDU 免疫组化、BrDU 及 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin)双重免疫组化染色

采用免疫组化常规操作,对上述标本滴加 BrDU 单克隆抗体,染色后的标本再滴加  $\alpha$ -actin 单克隆抗体进行双重免疫组化染色。BrDU 及 BrDU 单克隆抗体购自 Sigma Chemical 公司。 $\alpha$ -actin 单克隆抗体、ABC 检测药盒和 DAB 显色试剂盒均来源于武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.5 免疫组化结果判定

BrDU 单染色结果判断:胞核呈棕黄色的细胞为 BrDU 阳性细胞。BrDU 和  $\alpha$ -actin 双重染色结果判断:BrDU 着色部位为细胞核,显色为深蓝色。 $\alpha$ -actin 着色部位为胞质,呈棕色。胞核深蓝色、胞质呈棕色的细胞,为复染阳性细胞。

### 1.6 BrDU 阳性细胞的计数

由 2 名实验者各自在高倍视野光镜下,在血管壁 4 个方位上选取 4 个视野,计数血管外膜、中膜和内膜上 BrDU 阳性细胞量,取两者的均值。BrDU 阳性细胞总数为三层结构的阳性细胞均数和。阳性细胞所占比例,为每层阳性细胞数占血管全层阳性

细胞百分比。分析该比例,便于研究 BrDU 阳性细胞在血管不同结构内的动态变化。

1.7 电镜观察

取 1 mm<sup>3</sup> 的组织块,先在 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液配制的 2.5% 的戊二醛溶液中固定 1 h,逐级脱水、包埋、切片,醋酸双轴染色。使用瑞典 LKBV 超薄切片机,日本日立 H-7500 型透射电镜观察血管各结构层成肌纤维细胞的形态改变。

1.8 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件做统计学处理,分别采用 *t* 检验和方差分析。*P* < 0.05 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 免疫组化染色观察

2.1.1 BrDU 免疫组化染色观察 光镜高倍视野下观察:血管成形术后 3 d,血管外膜细胞增多,可见较多的细胞核呈棕黄色的增殖细胞,实验组 BrDU 染色细胞数目较对照组多(对照组外膜上几乎未见

棕黄色胞核的增殖细胞)。中膜内散在极少胞核呈棕黄色的增殖细胞。近管腔侧的中膜未见棕黄色胞核的增殖细胞。管腔内皮剥脱,新生内膜尚未形成;血管成形术后 7 d,与 3 d 时比较,血管外膜细胞数增加显著,细胞核呈棕黄色的增殖细胞也显著增多。中膜内可见稍多胞核呈棕黄色的增殖细胞,多数散在分布于外弹力板附近。新生内膜可见少量胞核呈棕黄色的较小的新生内膜细胞;血管成形术后 14 d,较之于 3、7 d 时,血管外膜细胞数明显减少,胞核呈棕黄色的增殖细胞也减少,中膜可见大量细胞核呈棕黄色的增殖细胞,较厚的新生内膜中可见大量细胞核呈棕黄色的增殖细胞;血管成形术后 28 d,与 3、7、14 d 时比较,血管外膜细胞较少,呈长梭形,无细胞核呈棕黄色的增殖细胞,实验组外膜的表现近似于对照侧血管外膜。中膜增厚,偶见细胞核呈棕黄色的增殖细胞。较厚的新生内膜中可见少量细胞核呈棕黄色的增殖细胞(图 2.A~D)。

光镜高倍视野下,不同观察时间点上,分析血管的各结构层,可以发现,实验组呈棕黄色胞核的 BrDU 阳性细胞数量均有显著变化。外膜、中膜和内膜的细胞阳性数量分别在 7 和 14 d 时,呈现单峰样改变。各结构层上阳性细胞数的峰值交替出现,在时间上呈先后次序。实验后 3 和 28 d 时,外膜、中膜和内膜的阳性细胞数量近似于对照组,在这 2 个时间点上,胞核呈棕黄色的 BrDU 阳性增殖细胞数,几乎趋向于零。

2.1.2 BrDU 与  $\alpha$ -actin 双重免疫组化染色 7 d

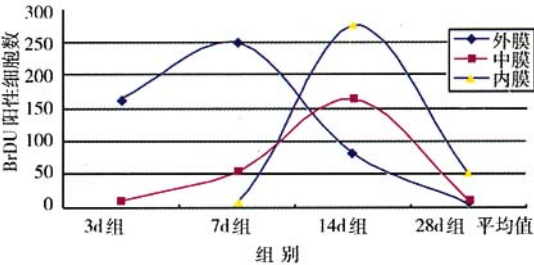
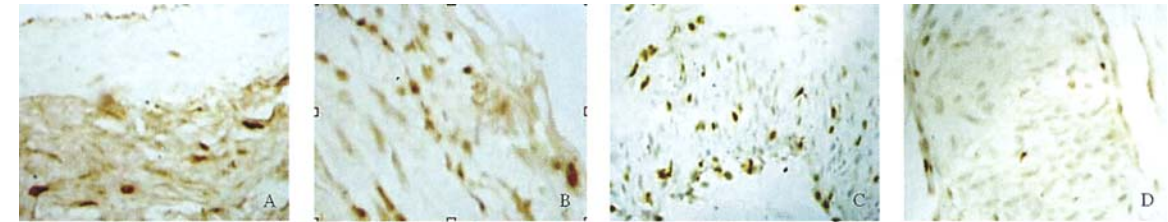


图 1 不同时间点血管各层 BrDU 阳性细胞数改变趋势图

表 1 不同时间点血管各层 BrDU 阳性细胞数结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

部位	3 d	7 d	14 d	28 d	对照组
外膜	161.3 ± 52.8	247.2 ± 33.72	80.0 ± 9.34	4.3 ± 1.97*	2.1 ± 2.99*
中膜	8.8 ± 4.96*	52.8 ± 25.20	164.3 ± 28.39	8.2 ± 4.79*	1.3 ± 8944*
内膜	00 ± 00^	165.3 ± 2.86^	274.5 ± 53.69	45.5 ± 13.78	1.0 ± 2.56^

注:\* 单因素方差分析多组比较;\*外膜除 28 d 组、对照组间比较 *P* = 0.98, 各组间比较 *P* < 0.01;\*中膜除 3、28 d 组、对照组间比较 *P* = 0.92 各组间比较 *P* < 0.01;^内膜除 3、7 d 组、对照组间比较 *P* = 0.94, 各组间比较 *P* < 0.01



A: 成形术后 3 d, 血管外膜少量增殖成纤维细胞和 BrDU 结合呈棕色; B: 术后 7 d, 外膜见大量 BrDU 阳性细胞, 中膜可见少量阳性细胞; C: 术后 14 d, 内膜增厚, BrDU 阳性细胞增多, 多数胞核淡染; D: 术后 28 d, 内膜增厚略有减少, 阳性细胞几乎消失 (× 400)

图 2 血管成形术后免疫组化显示 BrDU 阳性细胞动态变化

组,血管外膜细胞较多,中膜增厚、新生内膜较少;14 d 组,内膜显著增厚,故实验选取 7 d 和 14 d 组标本,行 BrDU 与  $\alpha$ -actin 双重染色(又称复染)。其中 BrDU 为细胞核染色,呈蓝色, $\alpha$ -actin 为胞质染色,呈棕色。结果显示,第 7 天,血管外膜 BrDU 阳性细胞, $\alpha$ -actin 也呈阳性,表明血管外膜增殖细胞也表达  $\alpha$ -actin,复染阳性细胞聚集于外弹力板邻近区域;第 14 天,外膜复染阳性细胞显著减少时,新生内膜的阳性细胞却显著增多(图 3)。

## 2.2 电镜观察结果

3 d 组:正常对照组大鼠 CCA 动脉透射电镜下,外膜的成纤维细胞处于成熟表型。细胞、胞核呈长梭形,细胞少有足样突起,胞质偏少。动脉损伤后表现为:外膜见梭形成纤维细胞及胶原纤维增多,细胞足样突起增多;7 d 组:中膜内见大小和形态不一细胞,胞核不规则,呈类梭形,为成肌纤维细胞,细胞周围形成大小不等突起,突起数量增多,形成板状伪足,伸向外弹力板,且穿过外弹力板窗孔,细胞呈外膜向中膜迁移趋势;14 d 组:内膜明显增厚,见梭形和卵圆形成肌纤维细胞,细胞生长长轴与内弹力板垂直,成肌纤维细胞超微结构改变类似于 7

d 组的变化,但在动脉固有结构层内的分布有差别,14 d 组,以中膜及内膜细胞数量居多,此外,内弹力板上,窗孔增大。中膜内,成肌纤维细胞形成多个突起,板状伪足向内弹力板窗孔伸出,细胞呈内膜迁移趋势(图 4);28 d 组:动脉各层中的成肌纤维细胞逆转为成纤维细胞。表现为:细胞核变小,核质变少,核仁小而明显,细胞质含量减少,吞饮小泡数量下降,板状伪足基本消失。

## 3 讨论

### 3.1 血管成形术后与血管再狭窄相关的外膜细胞类型、属性。

在哺乳动物和人,血管外膜中主要存在着成纤维细胞。据研究认为,动脉损伤后,成纤维细胞参与了血管修复。血管成形术后早期,血管外膜甚至中膜上出现的增殖细胞,其形态肥大呈梭形,近似于 VSMC,但功能上有别于成纤维细胞<sup>[4]</sup>。外膜的非肌性细胞具有高度的黏附性、增殖和胶原合成能力等特征。因此,一些学者认为,外膜上这种非肌性细胞可能来源于成纤维细胞,故称之为成肌纤维细胞,但是对成肌纤维细胞来源和属性有不同的看法。免

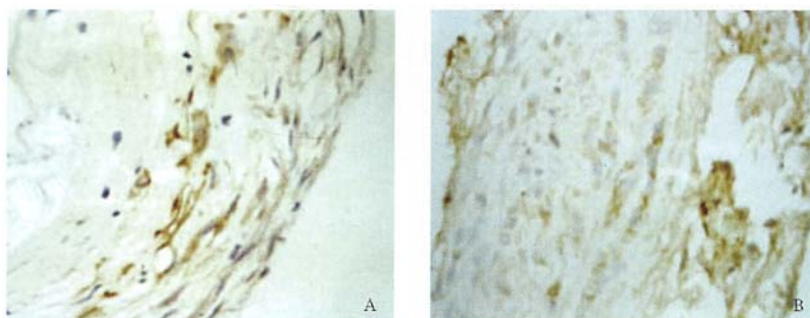


图 3 复合免疫组化显示不同时间血管内成肌纤维细胞迁移和表型转化  
A: 术后 7 d, BrDU 和  $\alpha$ -actin 复染, 成纤维细胞核呈蓝色、胞质棕色, 复染阳性细胞聚集于外弹力板附近; B: 术后 14 d, 内膜可见复染阳性的细胞 ( $\times 400$ )

图 3 复合免疫组化显示不同时间血管内成肌纤维细胞迁移和表型转化

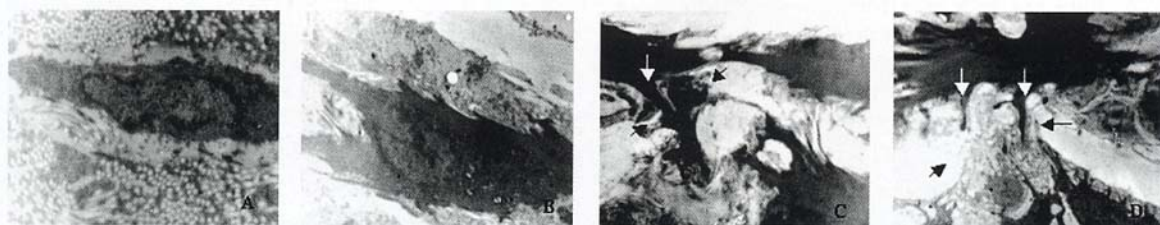


图 4 扫描电镜显示 PTA 后成纤维细胞的形态改变和细胞迁移趋势  
A: 正常血管外膜成纤维细胞处于收缩表型, 细胞、胞核呈长梭形, 少有足样突起 ( $\times 15\ 000$ ); B: 术后 7 d: 外膜成肌纤维细胞周围形成大小不等突起, 突起数量增多 ( $\times 7000$ ); C: 术后 7 d, 血管外膜成肌纤维细胞形成大量突起, 板状伪足(白箭)穿过外弹力板窗孔(黑箭间), 细胞呈外膜向中膜迁移趋势 ( $\times 10\ 000$ ); D: 术后 14 d, 内弹力板窗孔增大, 中膜内成肌纤维细胞形成多个突起, 板状伪足向内弹力板窗孔伸出(同 C), 细胞呈中膜向内膜迁移趋势 ( $\times 10\ 000$ )

图 4 扫描电镜显示 PTA 后成纤维细胞的形态改变和细胞迁移趋势

疫组化显示其合成分泌的物质是  $\alpha$ -actin。该蛋白以往被视为肌性细胞特异性的表达物,也就是说,具有合成分泌  $\alpha$ -actin 的梭形细胞即可认为是肌细胞(muscular cell, MC)。因此,血管上的成肌纤维细胞曾经是 VSMC 在不同环境下的另一称谓<sup>[5]</sup>。但是,Skalli 等<sup>[6]</sup>认为它们很可能来源成纤维细胞。采用抗结蛋白(desmin)或波形蛋白(vimentin)抗体或抗同族异型的各种肌动蛋白抗体,研究人的正常和病理组织中的成肌纤维细胞,发现一般成肌纤维细胞含波形蛋白和胞质肌动蛋白,故认为这些成肌纤维细胞来源于成纤维细胞。病理组织如纤维瘤病的成肌纤维细胞却表现多样性,其中有的仅含波形蛋白(V型),有的含有波形蛋白和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(VA型)。虽然细胞骨架的组分有这些不同的表型,但它们均含波形蛋白,故这些细胞可能来源于同一类细胞,即成纤维细胞,但由于某种刺激诱导作用,使它们表现出平滑肌的细胞骨架蛋白<sup>[2]</sup>。由此可见,正常状态下成纤维细胞仅表达波形蛋白,不表达  $\alpha$ -actin 或结蛋白。动脉损伤后外膜成纤维细胞表达  $\alpha$ -actin,细胞形态发生变化。Scott 等<sup>[1]</sup>对外膜和中膜上这些形态变化细胞,从免疫组化角度给予了明确定义:不能表达结蛋白和 h-钙调结合蛋白(高分化 VSMC 的标记物),也不能表达平滑肌细胞肌球蛋白(myosin),但具有可诱导表达  $\alpha$ -actin 这一特性的细胞,称为成肌纤维细胞。这表明成肌纤维细胞和 VSMC 不是同一属性的细胞。但因成纤维细胞和成肌纤维细胞均能表达波形蛋白,两者具有共源性,后者由前者转化而来。本实验通过电镜下观察到血管外膜成肌纤维细胞内生成大量的胶原束,形态与成纤维细胞相似,细胞形成多个突起,区别于 VSMC,免疫组化显示肌动蛋白表达。从形态学和免疫组化检测角度可以推断,成肌纤维细胞来源于表型转化后的成纤维细胞。

### 3.2 外膜的细胞表型转化

多数学者认为血管成形术后,细胞增殖最早发生于血管中膜个别区域的 VSMC。VSMC 在血管内皮损伤后 24 ~ 48 h 内开始增殖,7 ~ 14 d 后出现增殖高峰,增殖峰值位于血管中膜。血管成形术后,血管中层的 VSMC 自身发生再调整,由收缩和静止型的 VSMC 转变为缺乏收缩蛋白的合成和分泌型。形态上为星形,细胞内细胞器数量增加。功能上缺乏收缩力,但移行、增殖和分泌能力增强。再狭窄形成过程中,VSMC 大约在动脉损伤 2 周后,表型发生再逆转,由合成表型回复到 VSMC 的收缩表型,约

在血管损伤 4 ~ 6 个月 VSMC 处于相对静止状态,再狭窄基本形成<sup>[9]</sup>。本实验结果与上述文献报道相反。光镜下血管成形术后的早期(3 ~ 7 d),血管外膜的细胞首先发生明显改变,出现大量短梭形成肌纤维细胞,胞核肥大,胞质丰满,细胞处于增殖态。分析血管全层 BrDU 阳性细胞数可知,细胞增殖的第一个高峰位于血管外膜。这与 Scott 等<sup>[1]</sup>报道的实验结果相似,即血管成形术后的细胞增殖最早发生在外膜,外膜细胞增殖比中膜更显著。不同于多数文献认为的细胞增殖的第一波始发于血管中膜。免疫组化复染结果显示,动脉损伤后第 7 天,BrDU 阳性的成肌纤维细胞开始表达  $\alpha$ -actin。表型转化后的成肌纤维细胞靠近外弹力板。其表达特征一直延续至第 14 天增厚的新生内膜上。第 28 天,内膜和外膜上  $\alpha$ -actin 的表达几乎消失,说明成肌纤维细胞在血管成形术后期,迁移至新生内膜后丧失表达特征,恢复为成纤维细胞。Wilcox 等<sup>[3]</sup>也认为增殖的外膜细胞在损伤后的初始阶段, $\alpha$ -肌动蛋白为阴性,在术后的第 14 天发生表型变化, $\alpha$ -肌动蛋白为阳性。本实验观察到,成纤维细胞发生表型转化和表达  $\alpha$ -actin 的时间与前者有明显差别。实验结果证实了目前少数文献报道的结论,即动脉损伤后,血管外膜的成纤维细胞发生了表型转变<sup>[7]</sup>。外膜成纤维细胞表型转变类似于中膜的 VSMC 在血管成形术后由收缩表型向合成表型的转化。成纤维细胞转变为成肌纤维细胞,成肌纤维细胞具备了增殖、合成、分泌和迁移的完整能力,特征性标志为该细胞表达  $\alpha$ -actin。由此可见,无论是血管中膜 VSMC 还是外膜成纤维细胞,在血管成形术后,细胞均出现了“返祖”现象,即细胞表型原始化<sup>[7]</sup>,这是成纤维细胞和 VSMC 两类细胞共有的特征,这也同样成为外膜细胞增殖、迁移的前提条件。本实验中,电镜下观察到成肌纤维细胞内的线粒体丰富,高尔基体发达,粗面内质网及其上的颗粒增多,这表明细胞转型后具有了合成和分泌功能。

### 3.3 外膜细胞的迁移

增殖的血管外膜细胞是否向内膜迁移,文献尚有不同看法<sup>[8]</sup>。本研究表明,增殖的血管外膜细胞向内膜迁移,是形成新生内膜的重要来源。首先,术后第 3 天,外膜细胞构成了增殖细胞的主体。第 7 天,外膜上阳性细胞到达峰值,分布在血管近外弹力板区域,中膜阳性细胞开始增多。第 14 天,外膜阳性细胞数下降,中膜和内膜阳性细胞数明显增多,出现阳性细胞数的双峰值,内膜的增厚达到最大程



度。第 28 天,无论是血管的外膜、中膜还是新生内膜,BrDU 染色阳性的细胞数均显著下降,外膜和中膜阳性细胞数趋近于零。分析血管三层结构 BrDU 染色阳性细胞数的增殖曲线趋势图可以发现,细胞数的增量在时相和空间上存在峰值顺延、交替出现的现象,即中膜和新生内膜的阳性细胞增加出现在外膜的阳性细胞下降之后。对此较合理的解释是血管外膜的成肌纤维细胞向中膜和内膜发生了迁移。Scott 等结果和本实验类似。以 BrDU 混合液直接一次性浸涂 CCA,使成肌纤维细胞的标记更直接有效。然而本实验需要解释的是:动脉损伤后即刻给予 BrDU 仅标记外膜细胞,此后不再追加标记物,7~14 d 新生内膜中出现的 BrDU 阳性细胞来源于何处?对此作者认为血管外膜标记物 BrDU 阳性的增殖细胞,从血管外膜向内膜发生连续迁移性分布,这一观点得到其他类似研究结果的支持<sup>[9]</sup>。其次,高倍光镜下,增厚的新生内膜中大量的 BrDU 阳性细胞形态表现为短梭状,胞质饱满,与中膜的长梭形 VSMC 比较,两者在形态上有差异,前者形态学改变更接近血管外膜的成肌纤维细胞。一些学者的研究也支持本实验结果:体外控制 VSMC 激活后,刺激血管外膜,可诱导出具典型特征的外膜成纤维细胞迁移<sup>[10]</sup>。采用逆转录病毒颗粒携带  $\beta$ -乳糖( $\beta$ -galactosidase LacZ)报告基因,转导外膜成纤维细胞。将原代细胞种植到大鼠 CCA 外膜,使其表达 LacZ。通过 LacZ 的 mRNA 原位杂交监测成肌纤维细胞。结果在损伤血管内膜发现 LacZ 表达。新生内膜中 LacZ 阳性成纤维细胞的外形与采用 BrDU 间接标记法追踪外膜细胞的实验结果相一致,表明新生内膜包含外膜来源的细胞成分<sup>[11]</sup>。此外,本研究同样观察到 Scott 等<sup>[1]</sup>实验中的现象,血管外膜、中膜及内膜,从 3~28 d,BrDU 染色阳性的细胞胞核染色逐渐变淡,表明自血管损伤后 3 d 与 BrDU 结合的外膜成肌纤维细胞,在新生内膜上经历了分裂、复制、增殖,因此在其子代细胞中丢失了标记性的 DNA。这些实验结果提示:增殖的外膜细胞从外膜穿越外弹力板,成为新生内膜的细胞主体。其三,电镜观察的结果显示,第 7 天血管外膜成肌纤维细胞形成板状伪足,伸向外弹力板,穿过外弹力板窗孔,细胞呈外膜向中膜迁移趋势。同样第 14 天在血管

中膜见内弹力板上弹力板窗孔增大。成肌纤维细胞形成多突起的板状伪足,向内弹力板窗伸出,细胞呈内膜迁移趋势。

综上所述,血管成形术后,血管再狭窄的形成过程中,血管外膜成纤维细胞发生了表型转化和迁移,迁移到新生内膜中的成肌纤维细胞参与了血管再狭窄的形成。

#### [参考文献]

- [1] Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries [J]. *Circulation*, 1996, 93: 2178 - 2187.
- [2] Hecto DL, Jeremy D O, Kathy KG, et al. Adventitial cells do not contribute to neointimal mass after balloon angioplasty of the rat common carotid artery[J]. *Circulation*, 2001, 104: 1591 - 1593.
- [3] Wilcox JN, Scott NA. Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis[J]. *Int. J Cardiol*, 1996, 54, Suppl: S21 - S35.
- [4] 王永利,李明华. 血管发生学与 PTA 后血管壁细胞来源[J]. 介入放射学杂志, 2006, 15: 76 - 79.
- [5] Sachin P, Yi Shi, Rodica Niculescu, et al. Characteristics of coronary smooth muscle cells and adventitial fibroblasts [J]. *Circulation*, 2000, 101: 524.
- [6] Skalli O, Darby I, Gabbiani G. Smooth muscle actin is transiently expressed in by myofibroblasts during experimental wound healing[J]. *Lab Invest*, 1990, 63: 21 - 29.
- [7] Shi Y, O'Brien JE, Fard A, et al. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries[J]. *Circulation*, 1996, 94: 1655 - 1664.
- [8] Guterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function[J]. *AJP-Heart Circ Physiol*, 1999, 277: 1265 - 1272.
- [9] Wang Z, Newman WH. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization[J]. *J Surg Res*, 2003, 111: 261 - 266.
- [10] Wexberg P, Muck K, Windberger U, et al. Adventitial response to intravascular brachytherapy in a rabbit model of restenosis[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2004, 116: 190 - 195.
- [11] Guohong Li, Chen SJ, Oparil S, et al. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after ballooninjury of rat carotid arteries[J]. *Circulation*, 2000, 101: 1362.

(收稿日期:2005-11-23)