

## ·实验研究 Experimental research·

## 西罗莫司局部缓释对成形术后血管壁 PAI-1 及 t-PA 表达的影响

鄂亚军, 贺能树, 范海伦

**【摘要】目的** 探讨西罗莫司局部缓释对成形术后血管壁纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)及组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)表达的影响。**方法** 建立大鼠颈动脉损伤模型, Wistar 雄性大鼠 30 只, 分为实验组(20 只)及对照组(10 只)。西罗莫司采取外膜给药, 以 pluronic F-127 为药物释放载体, 给药浓度分为高浓度组 600  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  及低浓度组 300  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , 应用免疫组化检测西罗莫司局部缓释对血管壁 PAI-1 及 t-PA 表达的影响。**结果** 损伤后 15 及 30 d, 西罗莫司高、低浓度实验组均促进新生内膜中 PAI-1 的表达( $P < 0.05$ ), 对中膜 PAI-1 表达的影响除高浓度 15 d 组与对照相比无统计学差异( $P > 0.05$ )外, 其余各组均高于对照组( $P < 0.05$ )。损伤后 15 及 30 d, 西罗莫司实验组新生内膜 t-PA 的表达低于对照组( $P < 0.05$ ), 而中膜 t-PA 的表达高浓度 15 d 及 30 d 组低于对照组( $P < 0.05$ ), 低浓度组与对照组相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。**结论** 西罗莫司局部缓释在抑制新生内膜增殖的同时亦造成局部 PAI-1 的高表达及 t-PA 的较低表达, 两者表达的失衡可能成为晚期血栓形成的重要原因。

**【关键词】** 西罗莫司; 局部缓释; 纤溶酶原激活物抑制剂 1; 组织型纤溶酶原激活剂

中图分类号: R543 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2011)-11-0885-05

**The effect of local sustained delivery of sirolimus on the vascular PAI-1 and t-PA expression after angioplasty** E Ya-jun, HE Neng-shu, FAN Hai-lun. Department of Interventional Radiology, the Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China

Corresponding author: HE Neng-shu, E-mail: eyj7681@yahoo.com.cn

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of local sustained delivery of sirolimus on the vascular inhibitor of plasminogen activator-1 (PAI-1) and tissue type plasminogen activator (t-PA) expression after angioplasty. **Methods** Experimental common carotid artery injury model was established in the rats. A total of 30 male Wistar rats were divided into experimental group ( $n = 20$ ) and control group ( $n = 10$ ). Adventitial administration of drug was applied. Pluronic F-127 gel containing sirolimus was administered to the exposed adventitial surface of injured carotid artery. The experimental group was divided into high concentration (600  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) sub-group and low concentration (300  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) sub-group according to the concentration of sirolimus delivered. The effect of local sustained delivery of sirolimus on vascular PAI-1 and t-PA expression after percutaneous angioplasty was evaluated by immunohistochemistry. **Results** Compared to control group, 15 and 30 days after injury local sustained delivery of sirolimus in both high concentration and low concentration sub-groups the expression of the PAI-1 in neointima was significantly enhanced ( $P < 0.05$ ), and the expression of PAI-1 in media was increased in all experimental groups ( $P < 0.05$ ) except that no significant difference was found in high concentration sub-group 15 days after injury ( $P > 0.05$ ). At 15 and 30 days after injury, the expression of t-PA in neointima was decreased in both high and low concentration sub-groups ( $P < 0.05$ ), and the expression of t-PA in media was significantly decreased in high concentration sub-group ( $P < 0.05$ ) while on significant difference could be detected in low concentration sub-group. **Conclusion** Local sustained delivery of sirolimus can induce the high expression of PAI-1 and low expression of t-PA in neointima although it inhibits the proliferation of neointima in the same time, and the imbalanced expression of t-PA and PAI-1 may probably play an important role in the late formation of thrombosis after the placement of drug-eluting stent. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 885-889)

**【Key words】** sirolimus; local sustained delivery; inhibitor of plasminogen activator-1; tissue type plasminogen activator

作者单位: 071000 河北保定 河北大学附属医院介入治疗科(鄂亚军); 天津医科大学总医院放射科(贺能树、范海伦)  
通信作者: 贺能树 E-mail: eyj7681@yahoo.com.cn

药物洗脱支架(drug-eluting stent, DES)以其特殊聚合物基质为释放载体,通过对抗增殖药物的局部缓慢持续释放有效降低了血管成形术(PTA)后再狭窄率<sup>[1-3]</sup>。自从 2002 年最早的药物洗脱支架在欧洲被运用于临床,各种新型支架,尤其是西罗莫司洗脱支架(sirolimus-eluting stent, SES)进展迅速。近来,DES 置入后晚期血栓形成事件的发生等引发了对其安全性的关注<sup>[4-8]</sup>。有学者通过体外研究发现西罗莫司可使血管内皮细胞 PAI-1 的表达发生转录水平的上调,为 DES 晚期血栓形成机制提供了一个新的病理生理学假说<sup>[9]</sup>,但亦有学者通过对西罗莫司预防肾移植后排异反应的相关研究提出西罗莫司降低肾间质纤维化及肾小球硬化的主要介质 PAI-1 的表达<sup>[10]</sup>。本研究通过动物实验检测 DES 常用的抗增殖药物西罗莫司局部缓释对血管成形术后血管壁 PAI-1 及 t-PA 表达的影响,对 DES 置入后局部血栓微环境的变化进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物、分组及药物配制 常规饲养 Wistar 雄性大鼠(中国科学院放射研究所实验中心提供,体重 300 ~ 350 g)30 只,分为实验组(20 只)及对照组(10 只)。实验组应用 30%(W/V)的 pluronic F-127 胶(美国 Sigma 公司,制备完成后 4℃冰箱保存 24 h 备用)将西罗莫司原药粉剂(华北制药集团公司)稀释成(600 μg/100 μl)高浓度组及(300 μg/100 μl)低浓度组,对照组仅给予不含药物的 pluronic F-127 胶,观察时间点为 15 及 30 d,其中每一实验组或对照组每一时间点 5 只大鼠。

### 1.1.2 免疫组化染色主要试剂

PAI-1 及 t-PA 一抗工作液购自美国 Santa Cruz 公司;DAB kit 由美国 Labvision 公司生产,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司分装。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠颈动脉损伤模型制作、给药方式及取材 大鼠颈动脉损伤模型制作参考 Clowes 等<sup>[11]</sup>和王永利等<sup>[12]</sup>方法:10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠仰卧固定、消毒,沿中线逐层切开组织,暴露并分离任一侧颈总动脉分叉(颈总动脉暴露段长度 ≥ 1.5 cm),将颈外动脉向远端分离 1 cm 左右。动脉夹控制颈总动脉、颈内动脉血流,结扎颈外动脉远端,在颈外动脉近心端作一横切口。在显微手术用镊子引导下,经切口将普通穿

刺用短导丝(0.038 英寸)硬头推送入颈总动脉,送入 3 ~ 4 cm 后轻轻回撤,来回抽送 3 ~ 4 次,直至明显产生阻力,撤出导丝,迅速恢复颈动脉血流,结扎颈外动脉。应用 1 ml 注射器(18 G 钝针头)将预先配置的 pluronic F-127 胶 100 μl 与药物混合液均匀涂抹于长 1.5 cm 暴露损伤段颈总动脉外膜(经试验测定 1.5 cm 暴露段涂药量约为 100 μl)。对照组采用相同的方法仅给予 100 μl pluronic F-127(不含药物)。给药完成后,逐层缝合伤口,常规饲养。

1.2.2 取材、标本制作 分别在损伤后 15、30 d 以 4%多聚甲醛行原位灌注固定取材,经常规脱水、透明、浸蜡、包埋等程序制成蜡块,切片厚度为 5 μm,行 HE 染色及免疫组化染色。

1.2.3 标本组织图像分析 采用北京航空航天大学 CMIA2000 型多功能病理图像分析系统对组织切片进行测量及分析。PAI-1 及 t-PA 免疫组化阳性反应部位均在胞质,为棕黄色或棕褐色颗粒,围绕在蓝色细胞核周围。选择阳性细胞分布较为密集区域,采用人机交互方式计数 3 个阳性细胞分布最密集区域的阳性细胞数,并计算阳性细胞比率(阳性细胞数/该视野细胞总数),计算其平均值。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS13.0 for windows 统计软件包。根据实验要求,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验、单因素方差分析(one-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

对照组 PAI-1 的表达主要在中膜,从损伤后 15、30 d 持续表达,新生内膜中有少量表达,外膜中未见阳性细胞(表 1,图 1)。损伤后 15 及 30 d,西罗莫司高、低浓度组新生内膜中均可见明显的 PAI-1 表达,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),对中膜 PAI-1 表达的影响除高浓度 15 d 组与对照相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )外,其余各组均高于对照组( $P < 0.05$ ,表 1,图 1)。损伤后 15 及 30 d,对照组 t-PA 在新生内膜中呈中等程度表达,并且主要集中在内膜游离缘,中膜有少量表达,外膜可见少量散在阳性细胞(表 2,图 2)。与对照组相比,西罗莫司实验组新生内膜中 t-PA 的表达低于对照组( $P < 0.05$ ),中膜 t-PA 的表达在高浓度 15、30 d 组低于对照组( $P < 0.05$ ),而在低浓度组虽从数值上低于对照组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 2,图 2)。

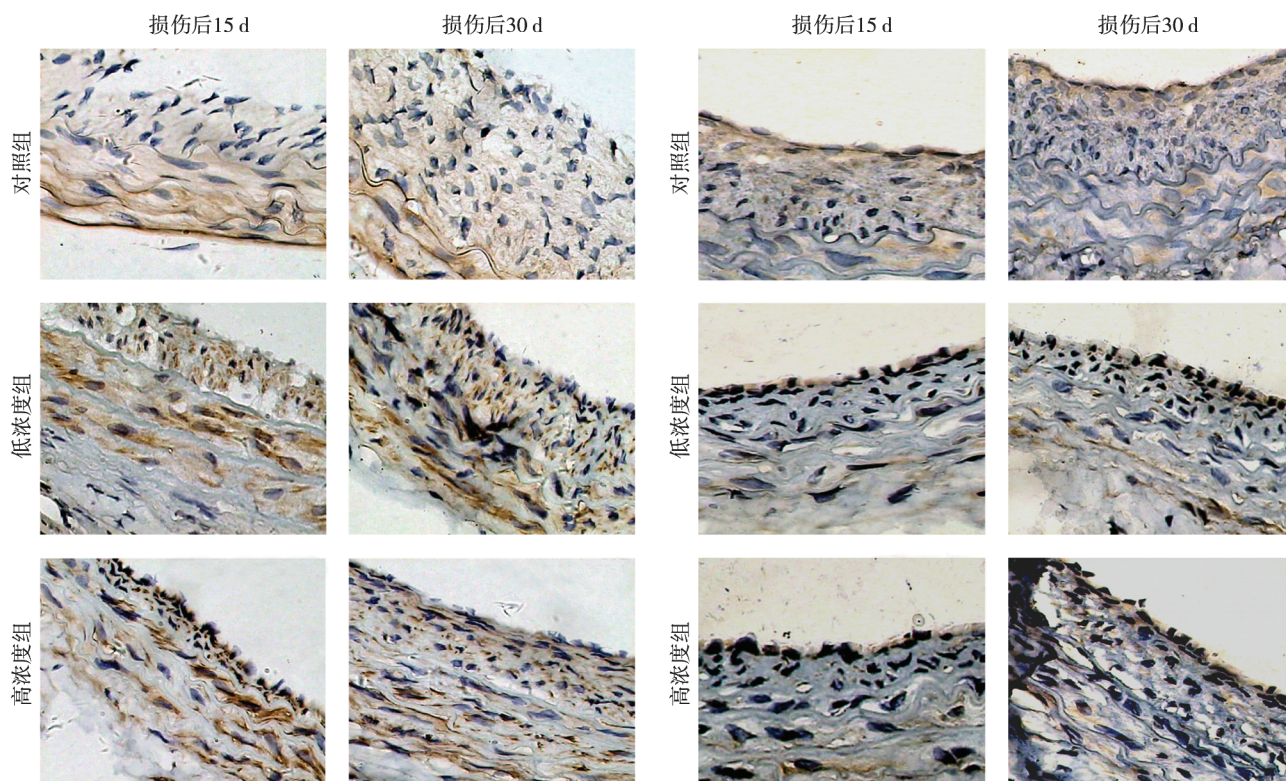


图 1 损伤后 15、30 d 血管壁 PAI-1 表达比较(免疫组化染色,  $\times 400$ )

图 2 损伤后 15、30 d 血管壁 t-PA 表达比较(免疫组化染色,  $\times 400$ )

表 1 损伤后 15、30 d 血管壁 PAI-1 表达比较

分 组	内 膜		中 膜		外 膜	
	阳性细胞数 <sup>b</sup>	比率	阳性细胞数 <sup>b</sup>	比率	阳性细胞数 <sup>b</sup>	比率
对照组						
15 d	21.20 $\pm$ 3.85	0.42 $\pm$ 0.07	13.80 $\pm$ 2.41	0.39 $\pm$ 0.11	0	0
30 d	9.80 $\pm$ 2.17	0.16 $\pm$ 0.05	20.50 $\pm$ 4.50	0.45 $\pm$ 0.07	0	0
低浓度组						
15 d	20.06 $\pm$ 4.67	0.57 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	22.10 $\pm$ 2.56	0.65 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0	0
30 d	24.40 $\pm$ 6.74	0.73 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	21.70 $\pm$ 5.26	0.69 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0	0
高浓度组						
15 d	11.40 $\pm$ 4.25	0.63 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	19.70 $\pm$ 4.04	0.54 $\pm$ 0.12	0	0
30 d	15.10 $\pm$ 1.67	0.72 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	23.50 $\pm$ 6.23	0.62 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0	0

a: 与对照组比  $P < 0.05$ ; b: 阳性细胞数指视野所见

表 2 损伤后 15、30 d 血管壁 t-PA 表达比较

分 组	内 膜		中 膜		外 膜	
	阳性细胞数 <sup>b</sup>	比率	阳性细胞数 <sup>b</sup>	比率	阳性细胞数 <sup>b</sup>	比率
对照组						
15 d	30.80 $\pm$ 3.70	0.45 $\pm$ 0.07	18.80 $\pm$ 3.09	0.47 $\pm$ 0.08	1.90 $\pm$ 0.82	0.16 $\pm$ 0.11
30 d	44.90 $\pm$ 5.28	0.61 $\pm$ 0.03	13.10 $\pm$ 10.44	0.37 $\pm$ 0.17	1.80 $\pm$ 0.45	0.12 $\pm$ 0.04
低浓度组						
15 d	11.30 $\pm$ 2.73	0.23 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 3.54	0.32 $\pm$ 0.14	0	0
30 d	20.80 $\pm$ 4.55	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	5.30 $\pm$ 2.84	0.28 $\pm$ 0.13	0	0
高浓度组						
15 d	12.20 $\pm$ 1.72	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	6.20 $\pm$ 3.63	0.21 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0	0
30 d	12.20 $\pm$ 2.77	0.20 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	4.20 $\pm$ 1.44	0.19 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0	0

a: 与对照组比  $P < 0.05$ ; b: 阳性细胞数指视野所见



### 3 讨论

本实验通过对大鼠颈动脉损伤模型的研究发现西罗莫司局部缓释在抑制靶血管新生内膜增殖的同时亦导致局部 PAI-1 的高表达及 t-PA 的低表达,即局部血栓形成微环境稳态出现失衡,这与相应的体外研究结果一致。Muldowney 等<sup>[9]</sup>采用基因微阵列技术检测西罗莫司与紫杉醇对血管内皮细胞及平滑肌细胞基因表达谱的影响发现,对于冠状动脉及脐静脉血管内皮细胞,西罗莫司干预组 PAI-1 mRNA 的表达及 PAI-1 分泌出现一致性显著增加,并且 t-PA mRNA 及 t-PA 分泌出现显著性下调。纤维蛋白溶解途径受血管内皮细胞释放的 t-PA 及其丝氨酸蛋白酶抑制剂 PAI-1 的控制。有研究发现冠状动脉内血栓形成与这一纤维蛋白溶解途径调节失衡有关<sup>[13-14]</sup>,而尸检资料进一步证实纤维蛋白的持续沉积是 DES 晚期血栓形成的重要危险因素<sup>[15]</sup>。因此,本研究及上述体外研究结果可能为 DES 晚期血栓形成机制提供了一个新的病理生理学假说,即抗增殖药物本身在抑制新生内膜增殖的同时亦具有局部血栓形成效应。

传统观点认为抗增殖药物(如西罗莫司)非特异性的作用于损伤后血管壁,导致内皮化延迟或不全内皮化是 DES 置入后晚期血栓形成并发症的主要原因。但是当前有证据显示,损伤后血管内皮化主要由血液中的骨髓源性内皮祖细胞来完成<sup>[16]</sup>,此结果使得抗增殖药物抑制邻近内皮细胞增殖进而造成损伤局部内皮化延迟这一理论受到挑战。与之相对应,本实验通过对西罗莫司局部缓释后靶血管壁血栓形成微环境的研究可能为 DES 晚期血栓形成机制的阐述提供了一个新的观点。虽然已有研究显示西罗莫司能够通过阻断 E2F (E2F 是 PAI-1 基因表达的抑制物)促进 PAI-1 的表达<sup>[17-19]</sup>,但是亦有学者在肾移植后排异反应的相关研究中发现西罗莫司降低肾间质纤维化及肾小球硬化的主要介质 PAI-1 的表达<sup>[10]</sup>。因此,西罗莫司对损伤后靶血管壁 PAI-1 及 t-PA 表达影响的具体机制还有待于进一步深入研究。

值得注意的是本研究所采用的外膜给药方式有别于血管内 DES 支架表面涂层药物的实际释放模式,但是有研究显示应用 pluronic F-127 胶作为药物释放载体进行血管外膜涂抹可以有效地模拟血管内支架的药物释放过程,而且应用 pluronic F-127 作为药物释放载体外膜给药已被一部分学者应用于对某些药物的模拟实验研究<sup>[1,19-20]</sup>;首先,DES

支架植入后,由于支架体的扩张逐渐深入血管壁,再加上大鼠颈总动脉壁较薄,外膜给药与药物在深入血管壁的支架释放从距离上看是相近的。其次,紫杉醇的亲脂性使其很容易穿透血管壁细胞,引起药物在动脉壁内的慢性滞留。再次,pluronic F-127 作为药物释放载体可以达到对药物的控制性释放或缓释,有研究显示药物在局部组织内的较高浓度释放至少可持续 2 周以上,而 DES 植入后 80% 的抗增殖药物在最初 30 d 释放。不可否认本研究具有一定的局限性:首先,由于实验条件的限制没有对靶血管壁进行药物浓度监测,实验中西罗莫司的使用参考了 DES 的实际应用剂量及浓度,但当前的研究结果不能代表或反映 DES 对人体的变化。其次,DES 置入后局部血栓形成微环境的变化复杂,单靠对于 PAI-1 及 t-PA 的检测难以对其进行全面的评估。再次,本研究中药物浓度选取过高,没能得出药物作用与浓度或剂量的相关性。

### [参考文献]

- [1] Slavin L, Chhabra A, Tobis JM. Drug-eluting stents: preventing restenosis[J]. *Cardiol Rev*, 2007, 15: 1 - 12.
- [2] Stone GW, Ellis SG, Cox DA. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 221 - 231.
- [3] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349: 1315 - 1323.
- [4] 韩 健, 郭富强. 经皮腔内血管成形术后再狭窄的炎症预测因子[J]. *介入放射学杂志*, 2009, 18: 876 - 879.
- [5] 张 琳, 张瑞岩. 药物洗脱支架术后再内皮化延迟与晚期血栓形成[J]. *国际心血管病杂志*, 2009, 36: 91 - 93, 97.
- [6] Shuchman M. Trading restenosis for thrombosis? New questions about drug-eluting stents[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355: 1949 - 1952.
- [7] Maisel WH. Unanswered questions--drug-eluting stents and the risk of late thrombosis[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 981 - 984.
- [8] Bucalo R, Capranzano P, Conti G, et al. Sirolimus versus paclitaxel-eluting stents in small coronary vessels: long-term outcomes from a single-center registry [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2010, 11: 365 - 368.
- [9] Muldowney JA 3rd, Stringham JR, Levy SE, et al. Antiproliferative agents alter vascular plasminogen activator inhibitor-1 expression: a potential prothrombotic mechanism of drug-eluting stents[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 400 - 406.
- [10] Pontrelli P, Rossini M, Infante B, et al. Rapamycin inhibits PAI-1 expression and reduces interstitial fibrosis and glomerulosclerosis in chronic allograft nephropathy [J]. *Transplantation*,



- 2008, 85: 125 - 134.
- [11] Clowes AW, Reidy M, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury[J]. Lab Invest, 1983, 49: 208 - 215.
- [12] 王永利, 贺能树, 张家兴, 等. 血管成形术后外膜细胞表型转化和迁移的实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2006, 15: 424 - 429.
- [13] Lang NN, Newby DE. Emerging thrombotic effects of drug eluting stents[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 261 - 262.
- [14] Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states[J]. N Engl J Med, 1999, 340: 1555 - 1564.
- [15] Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48: 193 - 202.
- [16] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization[J]. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14: 318 - 322.
- [17] Bruemmer D, Yin F, Liu J, et al. Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303: 251 - 258.
- [18] Koziczak M, Müller H, Helin K, et al. E2F1-mediated transcriptional inhibition of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene[J]. Eur J Biochem, 2001, 268: 4969 - 4978.
- [19] Lim Y, Kim TJ, Jin YR, et al. Eptothilone B inhibits neointimal formation after rat carotid injury through the regulation of cell cycle-related proteins[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321: 648 - 655.
- [20] Ishizaka N, Taguchi J, Kimura Y, et al. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery[J]. Atherosclerosis, 1999, 142: 41 - 46.

(收稿日期:2011-06-16)

## ·消 息·

## 《实用放射学杂志》2012 年征订启事

《实用放射学杂志》是国内外公开发行的医学影像学学术期刊,创刊于 1985 年,月刊。中国标准连续出版物号:ISSN 1002-1671 CN 61-1107/R。本刊坚持以学术性为前提,注重理论与实践相结合,学术性与实用性相结合,面向基层,突出实用的办刊宗旨,全面报道 X 线、计算机 X 线摄影(CR)、数字 X 线摄影(DR)、DSA、CT、MRI、介入放射学、影像技术学等方面的新知识、新成果,是医学影像学发展和学术交流的良好平台。本刊为中国期刊方阵双效期刊,中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库收录期刊,《中文核心期刊要目总览》收录期刊,中国科技期刊精品数据库收录期刊,万方数据数字化期刊全文数据库收录期刊,美国《剑桥科学文摘》收录期刊,美国《化学文摘》收录期刊,美国《乌利希期刊指南》收录期刊,《日本科学技术振兴机构数据库》收录期刊,波兰《哥白尼索引》收录期刊,WHO 西太平洋地区医学索引来源期刊。

主要栏目:中枢神经放射学、头颈部放射学、胸部放射学、腹部放射学、骨骼肌肉放射学、泌尿生殖放射学、血管放射学、乳腺放射学、小儿放射学、介入放射学、影像技术学、实验研究、综述、计算机在医学影像学中的应用、继续教育、讲座、短篇论著、经验交流、读片窗、病例报道等。本刊载文信息量大、内容新颖、实用性强,对临床工作指导意义大,读者对象主要为从事医疗、教学及科研的广大医学影像学工作者。

本刊为月刊,大 16 开本,彩色印刷。每册 12 元,全年 144 元。订户可随时到当地邮局订阅,邮发代号:52-93;也可向本刊编辑部直接订阅,免邮寄费。

编辑部地址:陕西省西安市环城南路西段 20 号海联大厦 605 室

邮编:710068

联系电话:029-82122004

传 真:029-82122003

网 址:www.syfsxzz.com.cn

电子信箱:syfsxzz@sina.com