

· 基础研究 ·

脉冲磁场对颈动脉内膜切除术后狭窄及血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶表达的影响

索伟 郭燕梅 高月明 肖红雨

【摘要】目的 观察不同强度脉冲磁场对颈动脉粥样硬化家兔模型颈动脉内膜切除术(CEA)后再狭窄(CRS)及血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达的影响。**方法** 家兔 50 只,使用干燥气体损伤结合高脂饲料喂养,制作家兔颈动脉粥样硬化模型。高脂饲料喂养 2 个月后行 CEA 手术。术后将实验动物分为对照组和 2 个治疗组(0.6 T 治疗组和 1.0 T 治疗组)。2 个治疗组分别采用磁感应强度为 0.6 T 和 1.0 T 的脉冲电磁场进行治疗。CEA 术后 1、2 及 3 个月对病变血管进行组织形态学分析,并使用免疫组化方法观察血管平滑肌细胞 MMP-2 表达的变化。**结果** 组织形态学分析示,CEA 术后,0.6 T 治疗组和 1.0 T 治疗组在总管腔面积、斑块面积、斑块厚度和狭窄程度方面均低于对照组($P < 0.05$),且 1.0 T 治疗组较 0.6 T 治疗组降低程度更显著;术后 2~3 个月,0.6 T 治疗组和 1.0 T 治疗组 MMP-2 的表达水平低于对照组($P < 0.01$),1.0 T 治疗组表达水平低于 0.6 T 治疗组($P < 0.05$)。**结论** 较强强度脉冲磁场能抑制 CEA 术后狭窄颈动脉内膜 MMP-2 的表达,MMP-2 表达的降低可能是脉冲磁场防治 CEA 术后 CRS 的机制之一。

【关键词】 颈动脉再狭窄; 脉冲磁场; 血管平滑肌细胞; 基质金属蛋白酶-2

The effects of a pulsed magnetic field on carotid restenosis and the expression of matrix metalloproteinase-2 in vascular smooth muscle cells SUO Wei, GUO Yan-mei, GAO Yue-ming, XIAO Hong-yu. Department of Physiotherapy, The General Hospital of the PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of pulsed magnetic fields of different intensity on carotid restenosis (CRS), post carotid endarterectomy (CEA) and the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** An animal model of carotid atherosclerosis was established in 50 New Zealand rabbits by using air-drying lesions combined with high fat feed. After two months, the rabbits were treated with bilateral CEA, and then divided randomly into 3 groups. Two of the groups were treated with either 0.6 or 1.0 T pulsed magnetic fields, while the third group served as an untreated blank control. Changes in the pathology of the tunica intima were observed 1, 2 and 3 months after the CEA using morphologic analysis, and the expression of MMP-2 in the VSMC was determined using immunohistochemistry. **Results** The histological analysis showed that the total luminal area, plaque area, the maximum plaque thickness and the proportion of stenosis in the treated groups were all significantly lower, on average, than in the control group. At all three time points the average improvements in the 1.0 T group were significantly greater than in the 0.6 T group. The average expression of MMP-2 in the treated groups was significantly lower than in the control group, especially in the 1.0 T group. **Conclusions** Pulsed magnetic field therapy positively influences CRS and the expression of MMP-2 in VSMC. Reduced MMP-2 expression might be one of the mechanisms through which pulsed magnetic fields prevent or lessen carotid restenosis post CEA.

【Key words】 Carotid restenosis; Pulsed magnetic fields; Vascular smooth muscle cells; Matrix metalloproteinase-2

颈动脉内膜切除术(carotid endarterectomy, CEA)能有效预防脑卒中的发生。在术后早期,由于手术缺陷、抗凝治疗不足等原因易发生颈动脉血栓形成和闭塞。而发生于术后数月或数年的以内膜改变为主要机制的颈动脉再狭窄(carotid restenosis, CRS),可能使患

者重新出现症状或血管闭塞。据统计,临床有意义的 CRS 发生率为 10%~15%,出现严重 CRS 者约为 4.5%、3.2% 的患者需要再次手术^[1]。在术后 CRS 的发生过程中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的迁移、增殖是关键因素。近年发现,VSMC 合成分泌的基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)可特异性降解动脉壁基底膜的主要成分 IV 型胶原,对 VSMC 穿过基底膜屏障迁移至内

膜及新生内膜的增生和血管重塑方面都起着重要作用^[2-4]。

磁场作为一种物理因子,作用于生物体能引起生物体内一系列生物物理学效应。研究显示,磁场能抑制成纤维细胞、VSMC 的生成,以及胶原等细胞间质成分的合成和分泌,对 VSMC 的迁移和增殖具有抑制作用^[5-6]。本研究采用不同强度脉冲磁场作用于 CEA 术后动物模型,观察脉冲磁场对防治 CRS 及 VSMC 分泌 MMP-2 的影响,从而为探讨脉冲磁场预防 CEA 术后再狭窄提供一定的理论依据。

材料和方法

一、实验动物及动物模型制作

新西兰家兔 50 只,体重为 3.42~3.88 kg,雌雄不限(购自军事医学科学院实验动物中心)。用干燥气体损伤结合高脂饲料喂养 2 个月制作双侧颈动脉粥样硬化模型。肌注复方氯胺酮(0.1 ml/kg 体重)麻醉,常规固定、消毒,取动物颈部正中切口切开皮肤、皮下组织,剪开颈阔肌,游离双侧颈总动脉。剪开动脉鞘,将颈动脉与迷走神经分离,孤立颈总动脉长约 10 mm,26-G 静脉输液针向孤立的颈总动脉注入干燥气体,转子气体流量计控制流速为 120 ml/min,持续充气 15 min。预定流量的干燥气体持续流经管腔,造成血管内膜损伤。压迫止血,缝合皮下组织及切口。术后肌注青霉素 20 万 U/d,注射 3 d。术后高脂饲料喂养。高胆固醇饲料组成:标准兔饲料配方 + 2% 胆固醇 + 6% 花生油混匀并制成小颗粒饲料。

高脂饲料喂养后 2 个月,行 CEA 手术。将实验动物麻醉后暴露双侧颈总动脉,剪开动脉鞘,分离颈总动脉与迷走神经。游离出病变动脉,做纵行切口,分离、切除粥样斑块。术后肌注青霉素 20 万 U/d,注射 3 d。

喂养中 2 只实验动物腹泄死亡,1 只麻醉不全,手术中失血过多死亡,实际纳入统计分析的动物为 47 只。

二、实验动物分组和脉冲磁场治疗

MC-B 型脉冲磁场治疗仪,输出频率 40 Hz。将实验动物分为对照组 16 只、0.6 T 治疗组 15 只和 1.0 T 治疗组 16 只。0.6 T 治疗组和 1.0 T 治疗组于术后 24 h 进行脉冲磁场治疗。将磁极的 N 极和 S 极对置于颈两侧手术部位,输出的磁感应强度分别为 0.6 T 和 1.0 T,治疗时间 20 min,1 次/d。对照组动物不进行干预。所有实验动物术后单笼喂养,常规兔饲料喂养。

三、组织形态学观察

在 CEA 术后 1、2 和 3 个月分别对 3 组动物进行

原位灌注取材。深麻醉后,开胸,用 4% 多聚甲醛溶液进行灌注固定,完整取出所需血管节段,10% 中性甲醛固定,常规脱水、透明、石蜡包埋,制作厚 5 μ m 石蜡切片。

常规苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色,图像分析系统显微镜下观察组织形态变化。

Verhoeff-Van Gieson (VG) 染色:石蜡切片脱蜡至水,VG 染色液中染色 20 min,冲洗,95% 酒精去除背景,复染 1 min,脱水、透明、封片。图像分析系统显微镜观察颈动脉形态学变化。染色结果判定:细胞核——灰、黑色;弹力纤维——黑色;胶原纤维——红色;平滑肌——黄色。

四、免疫组化染色

石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 孵育 10 min,微波炉抗原修复 10 min,10% 正常山羊血清封闭 10 min。依次滴加一抗(1:100~200 稀释),生物素化二抗(1:100 稀释),辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(1:1000 稀释),中间用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗,每次 5 min,重复 2 次。最后用 DAB 显色剂显色 10 min,苏木素衬染,常规脱水、封片。

五、统计学分析

图像资料采用 Countpixel 1.0 版软件进行数据分析,免疫组化资料采用 Image-Pro Plus 5.0 版软件进行分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、形态学分析

CEA 术后 1~3 个月,HE 染色和 VG 染色可见内膜中新生毛细血管,大量成纤维细胞、VSMC 细胞增殖,胶原纤维增生、部分发生玻璃样变性,以淋巴细胞为主的炎细胞浸润。随着术后时间延长,血管内膜结缔组织增生明显,管腔狭窄。病理测量分析结果显示,CEA 术后 1 个月,在颈动脉总管腔面积、残余管腔面积、斑块最大厚度、斑块面积和血管的狭窄程度上,1.0 T 治疗组都显著低于对照组和 0.6 T 治疗组。0.6 T 治疗组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后 2 个月,除管腔残余面积指标外,2 个治疗组的形态学分析数值均低于对照组,0.6 T 治疗组与 1.0 T 治疗组相比,1.0 T 治疗组低于 0.6 T 治疗组,差异有统计学意义。术后 3 个月,2 个治疗组组织形态学分析数值仍低于对照组,1.0 T 治疗组在斑块最大厚度、斑块面积和狭窄程度上低于 0.6 T 治疗组,见表 1。

表 1 3 组动物 CEA 术后 1,2,3 个月颈动脉组织形态学比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	总管腔面积 (mm ²)	残余管腔面积 (mm ²)	斑块最大厚度 (mm)	斑块面积 (mm ²)	狭窄程度 (%)
对照组	16					
术后 1 个月		3.81 ± 0.17	1.33 ± 0.16	0.52 ± 0.14	1.58 ± 0.13	63.86 ± 12.25
术后 2 个月		4.16 ± 0.36	1.62 ± 0.27	0.45 ± 0.14	2.04 ± 0.13	61.62 ± 15.36
术后 3 个月		3.66 ± 0.11	1.41 ± 0.14	0.42 ± 0.07	2.15 ± 0.15	62.13 ± 7.10
0.6 T 治疗组	15					
术后 1 个月		3.75 ± 0.15 ^d	1.30 ± 0.26 ^c	0.45 ± 0.13 ^c	1.47 ± 0.32 ^c	62.52 ± 10.67 ^c
术后 2 个月		3.82 ± 0.27 ^{bc}	1.66 ± 0.31	0.31 ± 0.04 ^b	1.68 ± 0.17 ^b	59.10 ± 14.81 ^{ac}
术后 3 个月		3.38 ± 0.41 ^b	1.59 ± 0.17 ^b	0.29 ± 0.07 ^{ac}	1.65 ± 0.21 ^{bd}	55.82 ± 13.09 ^{bd}
1.0 T 治疗组	16					
术后 1 个月		2.81 ± 0.21 ^b	1.27 ± 0.24 ^b	0.31 ± 0.08 ^a	1.25 ± 0.14 ^a	41.88 ± 7.63 ^b
术后 2 个月		3.22 ± 0.18 ^a	1.65 ± 0.16	0.29 ± 0.06 ^b	1.32 ± 0.08 ^b	50.51 ± 12.97 ^b
术后 3 个月		3.27 ± 0.75 ^b	1.73 ± 0.36 ^b	0.23 ± 0.14 ^b	1.37 ± 0.18 ^b	46.24 ± 19.66 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与1.0 T治疗组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

二、免疫组化检测结果

MMP-2 在 VSMC、单核细胞、泡沫细胞中有阳性表达。CEA 术后 1~3 个月,对照组 MMP-2 的表达水平无显著变化,2 个治疗组的表达有随时间延长逐渐降低的趋势。术后 1 个月,2 个治疗组与对照组相比,MMP-2 的表达水平差异无统计学意义。术后 2~3 个月,2 个治疗组的表达水平显著低于对照组,且 1.0 T 治疗组的表达低于 0.6 T 治疗组,差异有统计学意义,见表 2。

表 2 3 组动物 CEA 术后 MMP-2 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月
对照组	16	35.22 ± 4.10	33.54 ± 3.62	31.38 ± 6.52
0.6 T 治疗组	15	37.09 ± 6.99	28.46 ± 3.18 ^{ab}	21.88 ± 4.87 ^{ab}
1.0 T 治疗组	16	39.90 ± 6.06	21.86 ± 4.55 ^a	15.37 ± 2.43 ^a

注:与对照组同期比较,^a $P < 0.01$;与 1.0 T 治疗组同期比较,^b $P < 0.01$

讨 论

CEA 术后再狭窄的发生是血管损伤反应与新生内膜增生及血管重塑的过程,以血管内膜的改变为主要机制。CEA 手术切除了血管内膜,使中膜直接暴露于血液,而内皮细胞的损伤、胶原的暴露、血小板的黏附等均可造成局部血栓形成。CEA 术后 VSMC 向内膜下迁移、增殖,大量细胞外基质的生成、血管内膜增厚、新生内膜增生是最终导致 CRS 的主要原因。颈动脉粥样硬化复发是引起 CEA 术后再狭窄的另一个重要原因。一般术后 2 年内的病变,主要源于内膜的增厚,而 2 年后的病变,主要源于动脉粥样硬化复发。单纯内膜纤维增厚或单纯粥样硬化转变为二者并存的复合斑块的改变,贯穿于 CRS 形成的全过程^[7]。对 CEA 术后出现 CRS,目前尚无有效的预防和治疗手段。

既往的研究表明,磁场可以显著抑制 VSMC 的迁

移和增殖,对血管内皮细胞的凋亡和黏附分子的表达也有一定影响^[8]。本研究结果显示,在 CEA 术后采用 2 种不同强度的脉冲磁场治疗,血管腔的残余面积、斑块的厚度、斑块面积等组织形态学方面,2 个治疗组都较对照组有显著降低,血管狭窄程度明显减轻,且磁场对 CRS 的抑制程度有随治疗的磁场强度增大而增强的趋势。

适当强度的磁场可能影响 CRS 产生的诸多因素。一方面磁场抑制 VSMC 向内膜下迁移、增殖,抑制新生小血管的生成,降低胶原的沉积,抑制内膜的增厚和纤维化;同时磁场作用还能加速红细胞等血液有形成分的旋转,防止胆固醇沉淀,抑制血小板活化、黏附和聚积,从而抑制血栓的形成,提高血管弹性,防止粥样硬化的形成^[9]。基于磁场对 VSMC 迁移和增殖的抑制作用,磁场治疗可以成为临床上抑制和预防 CEA 术后 CRS 的有效手段。

MMP 家族是一组重要的蛋白水解酶,与 VSMC 迁移和增殖密切相关。主要功能为消化细胞外基质的各种成分,与血管的重构有关。MMP-2 是基质金属蛋白酶家族的重要成员,可由 VSMC 以无活性的酶原形式分泌,被裂解掉 80 个氨基酸而激活成有活性的 MMP-2。MMP-2 具有多种降解活性,可降解完整的 IV 型基底膜胶原以及 V 型、VII 型和 X 型胶原,对变性的 I 型和 III 型胶原也具有降解作用,是降解胶原的主要酶,在胶原代谢中起重要作用^[10]。血管壁中的主要成分是 I、III、IV、V 和 VI 型胶原,分别在 CRS 中起不同的作用。环绕 VSMC 与内皮细胞成为 VSMC 迁移屏障的主要是 IV 型胶原;而在间隙以致密的纤维形式存在的主要是 I、III 型胶原,是再狭窄增厚内膜的主要成分^[11]。

MMP-2 对 VSMC 穿过细胞外基质进行迁移和增殖非常重要。MMP-2 通过分解内弹力层,使血中脂质渗入增加,促进中膜平滑肌细胞向内膜下迁移,促进粥样

硬化斑块形成。研究表明,在血管损伤后早期均可见 MMP-2 表达的增高^[12]。因此利用药物、物理及化学因素干预以降低 MMP-2 的活性,可以作为预防和治疗动脉粥样硬化、CRS 的有效办法。本研究结果显示,在 MMP-2 的表达方面,2 种强度的磁场对 MMP-2 的表达均有抑制作用,随着磁场强度的增大,抑制作用有增强的趋势。因此,一定强度脉冲磁场能抑制颈动脉内膜 MMP-2 的表达,MMP-2 表达的降低可能是脉冲磁场防治 CEA 术后 CRS 的机制之一。但目前的研究只提供了部分理论上的可能性,尚需进一步临床证实。

参 考 文 献

- [1] LaMuraglia GM, Brewster DC, Moncure AC, et al. Carotid endarterectomy at the millennium: what interventional therapy must match. *Ann Surg*, 2004, 240:535-544.
- [2] Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al. Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty. *Atherosclerosis*, 2002, 161:185-192.
- [3] Johnson JL, Fritsche-Danielson R, Behrendt M, et al. Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovasc Res*, 2006, 71:586-595.
- [4] Collin B, Busseuil D, Korandji C, et al. Short-term atorvastatin treatment does not modify neointimal morphology but reduce MMP-2 expression in norm oholesterole-sterolemic rabbit stented arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47:428-436.
- [5] 胡涛,贾国良,王海昌,等. 低频电磁场对大鼠主动脉平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 91-94.
- [6] 程何祥,周良,王海昌,等. 恒磁场对血管紧张素 II 作用下血管平滑肌细胞 VCAM-1 分泌与表达的抑制作用. *解放军医学杂志*, 2005, 9:810-812.
- [7] Stoney RJ, String ST. Recurrent carotid stenosis. *Surgery*, 1976, 80: 705-710.
- [8] 程何祥,周廉,徐可为,等. 恒磁场对内皮细胞凋亡、黏附分子表达及其与单核细胞黏附率的影响. *中国病理生理杂志*, 2006, 22: 1917-1921.
- [9] Kazakova RT, Badakva AM. Effect of isolated and combined effect of a constant magnetic field and antiorthostatic hypokinesia in rats. *Kosm Biol Arikosm Med*, 1991, 25:48-49.
- [10] Augé N, Maupas-Schwalm F, Elbaz M, et al. Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin / ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 2004, 110:571-578.
- [11] Kanda S, Kuzuya M, Ramos MA, et al. Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20:998-1005.
- [12] Feldman LJ, Mazighi M, Scheuble A, et al. Different expression of matrix metalloproteinase after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation*, 2001, 103:3117-3122.

(修回日期:2009-04-08)

(本文编辑:松 明)

· 外刊文献摘要 ·

残疾人运动干预研究:我们已知的和有待努力的方向

(Exercise intervention research on persons with disabilities: what we know and where we need to go)

Rimmer JH, Chen MD, McCubbin JA, Drum C, Peterson J

Am J Phys Med Rehabil, 2010, 89(3):249-263

本文的目的是综合回顾对躯体和认知障碍患者进行运动干预的有关文献。通过电子检索查出自 1986 年至 2006 年所发表的该类研究文章。在所查到的 80 篇躯体活动/运动干预的文献中,只有 32 篇是随机对照试验,另有 16 篇非随机对照研究和 32 篇非随机非对照研究。这些文献报道的运动训练模式有多种,包括有氧训练(26%)、肌力训练(25%)和有氧训练联合肌力训练(23%),但没有采用相同的运动训练强度对所涉及的 11 个残疾人群中的任何一个进行交叉研究。几乎有一半的研究针对的是脑卒中(20%)、多发性硬化(15%)和智力残疾者(13%),而针对其他残疾人群的研究明显较少。现有的关于运动和残疾的文献范围极广,但对任何一种特定残疾人群而言,都只有非常有限的适用价值。还需要进行设计严密的研究,以收集新的关于运动与残疾方面的证据。对于关键性的健康结局指标(例如疼痛/疲劳感减少,心肺功能的改善),研究中要确定精确的治疗剂量特征。为了强化研究设计和提高研究结果的适用面,有必要对低发生率疾患患者进行多中心试验研究。