

TSG-6 在大鼠静脉桥血管增生中的表达及意义

张 彪, 张成鑫, 龚文辉, 许金国, 葛圣林

摘要 目的 观察肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6(TSG-6)在大鼠移植静脉壁中的表达,探讨其作用及可能的机制,为临床治疗移植后血管再狭窄提供新方向和理论依据。**方法** 采用袖套法将大鼠自体颈外静脉移植入同侧颈动脉制作血管移植模型,实验分为假手术组、支架组和非支架组。术后12周切除移植静脉,应用苏木精-伊红观察移植静脉内膜、中膜、外膜增生情况,采用计算机图像分析系统测量和计算各膜厚度;应用Western blot检测移植静脉壁内TSG-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白介素(IL)-1的表达。**结果** 假手术组和支架组的TSG-6、TNF- α 和IL-1表达水平、移植静脉内膜增生程度均显著低于非支架组($P < 0.05$)。**结论** TSG-6在大鼠静脉桥血管中表达明显升高,并与TNF- α 、IL-1炎症因子表达呈正相关性;外支架可能通过抑制移植静脉的炎症反应而限制移植血管壁增生。

关键词 TSG-6; 桥血管; 血管外支架; 内膜增生

中图分类号 R 654; R 541.4; R 617

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1160-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.013

临床上冠状动脉旁路移植通常使用大隐静脉作为手术中的桥血管^[1],然而移植的静脉桥血管术后1年通畅率即降低到80%^[2],术后10年通畅率仅有40%~50%^[3]。为研究静脉桥狭窄的原因,该研究以大鼠自体颈外静脉-颈总动脉间置入(改良cuff法吻合)动物模型为基础,观察肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6(tumor necrosis factor alpha-stimulated gene-6, TSG-6)在大鼠移植静脉壁中的表达,探讨其作用及可能的机制,为临床治疗移植后血管再狭窄提供新的方向和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 显微外科器械一套(上海医疗器械厂);7-0和8-0显微外科缝合线(上海强生医疗器

材有限公司);自制cuff管(20G静脉留置穿刺针外鞘管,直径1.1 mm,美国BD公司);立式手术显微镜(型号: SXP-4C,上海医光仪器有限公司);大鼠TSG-6抗体、兔鼠双抗免疫组化DAB试剂盒(Envision™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, 兔/鼠)(上海基因科技公司);Axio Vision显微镜摄像及分析系统由安徽医科大学基础医学院提供。

1.2 实验动物分组 SPF级SD大鼠30只,雌雄不拘,270~330 g,安徽省实验动物中心供应。实验动物随机分成3组,即假手术组、支架组和非支架组,每组10只。室温(24±2)℃,饮水不限,自由摄食,适应环境1周后进行静脉移植手术。

1.3 改良cuff法模型建立 10%水合氯醛按0.3 ml/100 g体重腹腔注射麻醉。取仰卧位,常规备皮,消毒,铺巾。取右侧胸锁乳突肌前切口,长约3 cm,切开皮肤及皮下组织,钝性分离。腹腔注射肝素20 U/100 g,采用“no touch”技术游离颈外静脉约2.0 cm。将颈外静脉分支两端结扎,近心端离断,以125 U/ml肝素生理盐水轻柔冲洗管腔后,置于0.03%罂粟碱水中备用。于同侧游离颈总动脉,操作过程中打开动脉鞘,分离颈总动脉长约3.0 cm。微血管夹阻断颈总动脉近、远心端,8-0滑线全层上下对称缝过颈总动脉两针(间隔1 mm)做牵引线后,从两针之间剪断动脉;20号深静脉留置针外鞘管剪取约3 mm,自制成cuff管,通过牵引线牵引动脉近心端游离缘穿过鞘管,用显微镊轻轻夹持动脉游离缘,使颈总动脉外翻到自制套管上,由助手以镊子夹持固定。取备用静脉逆转后套于外翻动脉,8-0线结扎固定;此时对支架保护组大鼠,自制直径1.5 mm聚氯乙烯套管套在桥血管外(长约8 mm);同法,进行远心端动脉套管法吻合后,先开放远心端排气,再开放近心端,观察静脉桥充盈程度和搏动情况,检查静脉桥血管无出血,滴40万单位青霉素氯化钠液,预防感染。手术时间平均约50 min。假手术组单纯分离颈外静脉,原位保留待取材。术后3 d青霉素按80万U/kg肌肉注射,阿司匹林片100mg/d加入食物中,预防血栓形成,术后第2、8周分别行经皮血管彩超检查了解桥血管血流情况。

2017-04-26 接收

基金项目: 安徽省科技厅重点科研资助项目(编号: 1301043025)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心脏外科,合肥 230022

作者简介: 张 彪,男,硕士研究生;

葛圣林,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-

mail: aydgs1@sina.com

1.4 取材 手术后12周,经原颈部切口取出静脉桥血管。取桥血管长约1.0 cm,取下标本分两部分,一份立即置于-80℃冰箱里冷冻,另一份以10%多聚甲醛固定后石蜡包埋做病理切片。

1.5 管壁测量 标本常规石蜡包埋、切片5 μm, HE染色,光镜观察。内皮细胞和内弹力膜之间的部分定义为内膜,内、外弹力膜之间的部分定义为中层,余为外膜。用管腔边界及内、外弹力膜作为界限来计算新内膜、中层和外膜的厚度。每个标本取3张切片,计算得出均值。以KS400图像分析系统进行定量图像分析。

1.6 TSG-6 蛋白检测 Western blot法检测标本中TSG-6蛋白。提取1.4中置于-80℃冰箱的组织蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。制备12%分离胶、5%浓缩胶,计算上样量。结束电泳后将聚丙烯酰胺分离出的蛋白质转印到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭。经TBST清洗,TSG-6(1:500),白介素(interleukin,IL)-1(1:200),肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF)-α(1:200),GAPDH(1:1000)抗体4℃孵育过夜。次日,TBST清洗后,二抗室温孵育1.5 h。TBST清洗,ECL显色。以GAPDH作为内参,运用BioImaging Systems进行灰度值测定,定量计算TSG-6、IL-1、TNF-α的相对表达量。蛋白相对定量=目的蛋白灰度值/同标本GAPDH内参灰度值,重复3次,取平均值。

1.7 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行处理,符合正态性分布检验,各组定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间采用 t 检验,3组间均数比较采用ANOVA及两两比较的 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 彩超血流测量 超声显示93.3%的静脉桥血流通畅,搏动明显,其收缩期峰值流速达到15 cm/

s。与大鼠对侧正常颈动脉相比差异无显著性意义。见图1。

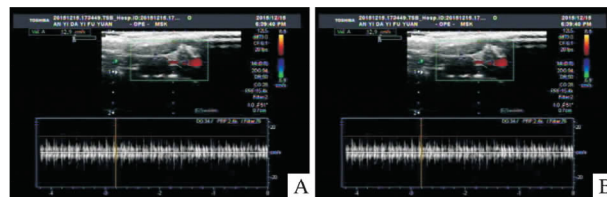


图1 大鼠颈部动脉血管彩超

A: 术前; B: 术后

2.2 血管厚度分层定量 3组血管壁厚度数据分布具有正态性,方差分析比较3组血管内膜、中层和外膜厚度,提示各组之间差异有统计学意义($P < 0.001$),非支架保护组与支架保护组相比较,内膜、中层、外膜增生分别达到1.5倍、1.7倍和1.8倍。见表1。

表1 移植静脉壁中内膜、中层和外膜的厚度测量 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

血管壁 (μm)	假手术组	支架组	非支架组	F值	P值
内膜	6.1 ± 1.7	18.2 ± 1.1*	28.2 ± 2.2*#	414.2	0.000
中膜	16.3 ± 1.3	24.3 ± 1.8*	42.3 ± 2.5*#	474.5	0.000
外膜	12.2 ± 1.2	20.3 ± 1.7*	38.2 ± 1.2*#	900.1	0.000

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与支架组比较: # $P < 0.01$

HE染色显示,非支架保护组与支架保护组相比,血管壁各层增生明显,以中层为著,细胞及组织染色清楚,其中细胞核呈蓝色,软骨基质、钙盐颗粒呈深蓝色,黏液呈灰蓝色,胶原纤维呈淡粉红色,弹力纤维呈亮粉红色,血管壁三层界限清晰。见图2。

2.3 Western blot 检测 TSG-6 TSG-6在假手术组中(正常管壁)的表达比支架保护组和非支架保护组中表达低($P < 0.001$); TSG-6在假手术组中表达低于支架保护组($P < 0.05$),在支架保护组中表达低于非支架保护组($P < 0.001$)。见图3。

2.4 炎症相关因子检测 以GAPDH为内参,经检

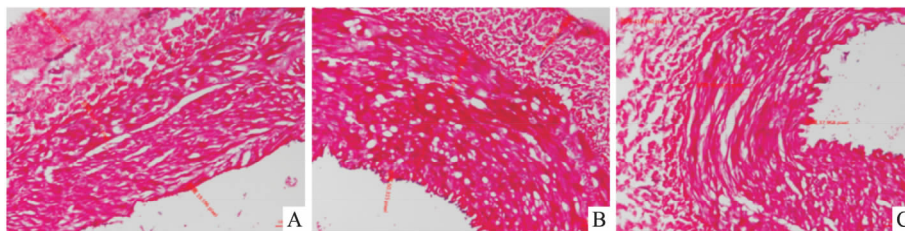


图2 桥血管壁 HE 染色 ×200

A: 假手术组; B: 支架保护组; C: 非支架保护组

测, TNF- α 、IL-1 在假手术组中(正常管壁)的表达比支架组和非支架组中表达低($P < 0.01$)。见图 4。

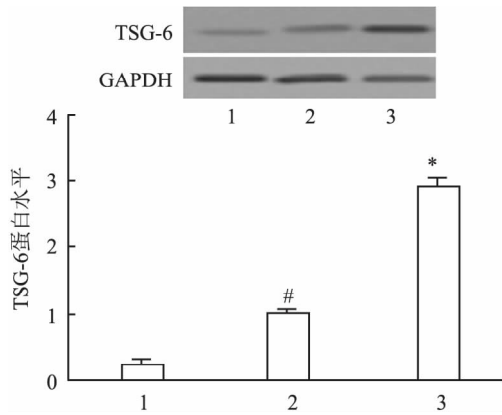


图3 Western blot 法分析 TSG-6 蛋白表达

1: 假手术组; 2: 支架组; 3: 非支架组; 与假手术组比较: # $P < 0.01$; 与支架组比较: * $P < 0.01$

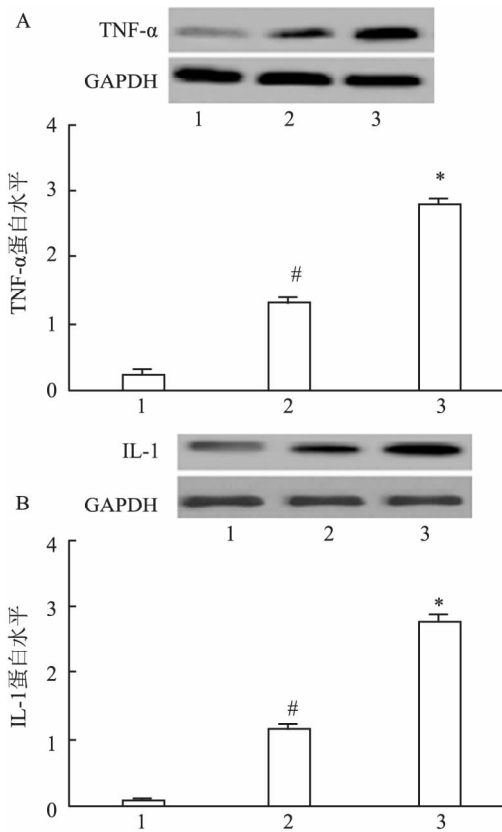


图4 Western blot 法分析 TNF- α 、IL-1 蛋白表达

A: TNF- α ; B: IL-1; 1: 假手术组; 2: 支架组; 3: 非支架组; 与假手术组比较: # $P < 0.01$; 与支架组比较: * $P < 0.01$

3 讨论

目前冠心病的治疗手段有药物治疗、介入治疗和外科治疗。而外科治疗冠心病的方法主要指的是

冠状动脉旁路移植术, 是国际上公认的治疗冠心病最有效的方法。临床上冠状动脉旁路移植通常使用的大隐静脉作为手术中的桥血管^[1], 然而移植的静脉桥血管术后远期通畅率不佳。为减少临床和实验中的静脉桥血栓性堵塞, 目前多采用药物控制血压、血糖、调节血脂以及抗血小板治疗, 避免手术准备和移植过程中对静脉桥血管壁的损伤等措施。然而这些都不能完全解决静脉桥血管壁细胞的过度增生及血管的狭窄^[4], 这就使得研究静脉桥狭窄的机制, 及如何提高桥血管远期通畅率成为国内外研究的热点。

本研究以大鼠自体颈外静脉-颈总动脉间置入(改良 cuff 法吻合)动物模型为基础, 观察移植静脉桥血管内膜、中层、外膜的增生的情况, 并检测血管中 TSG-6 等炎症因子的表达。本研究首次显示在大鼠移植静脉中有 TSG-6 明确表达, 并且与 TNF- α 、IL-1 炎症因子的表达和活性具有一致性。移植后大鼠桥血管内 TSG-6 及促炎症因子 TNF- α 、IL-1 的表达较正常血管壁中显著增多, TSG-6 的表达量与血管内膜中层增生呈正相关性, 且外源性支架可能通过抑制炎症反应而限制桥血管增生。

TSG-6 基因是 Lee et al^[5] 在筛选 TNF- α 干预的人纤维细胞 cDNA 表达文库时首次发现的一个新基因, 被推测是一个受 TNF- α 等炎症因子调节的基因。随着对 TSG-6 基因功能研究的深入, 已证实该基因是一个保护性的炎症反应基因, 参与多种炎症性疾病, 发挥抗炎及细胞外基质重塑等作用^[6-7]。例如, 在研究角膜炎、关节炎、瘢痕组织的实验中显示, 通过抑制 TSG-6 基因的表达, 进而减少炎症因子的表达、聚集, 达到控制组织增生的治疗的作用。TSG-6 蛋白通过与 TNF- α 、IL-1、IL-6、透明质酸、硫酸软骨素、肝素、血小板反应蛋白-1、穿透素 3 和金属蛋白酶-9 等发挥抗炎及细胞外基质重塑等作用^[8-10]。

目前移植静脉桥血管远期通畅率仍较低, 究其原因主要是静脉血管在动脉化的过程中其发生内膜、中层适应性增生, 血管逐步呈现向心性增厚。血管壁各层在 TNF- α 、IL-1 等多种促炎症因子刺激下, 血管腔逐步狭窄, 甚至发生闭塞不通^[11-13]。炎症因子参与、促成了桥血管的再狭窄, 通过控制炎症反应, 减少桥血管近期的血栓形成、抑制细胞内、中、外膜的增生和血管壁结构重塑, 可达到治疗桥血管再狭窄的目的^[14]。本研究显示, TSG-6 及促炎症因子 TNF- α 、IL-1 在大鼠静脉桥狭窄中起到关键性作用, 利用

TSG-6 抑制炎症因子的释放和表达的作用,一定程度上可能防治静脉桥血管再狭窄,为临床防治桥血管再狭窄提供新的治疗选择,将有重要的临床意义和价值。

本研究尚存在一定的局限性,比如 TSG-6 的来源细胞尚需进一步检测,其作用机制是否与其它炎症因子相关,外支架防治静脉桥狭窄的具体机制等也将进一步研究。同时,由于研究所选取的样本量较少,还需要进一步增加样本量,定位、定量分析 TSG-6 基因的蛋白表达与血管平滑肌细胞增生之间的关系。

参考文献

- [1] Hayward P A, Gordon I R, Hare D L, et al. Comparable patencies of the radial artery and right internal thoracic artery or saphenous vein beyond 5 years: results from the radial artery patency and clinical outcomes trial [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 139(1): 60-5.
- [2] Meirson T, Orion E, Avrahami I. Numerical analysis of venous external scaffolding technology for saphenous vein grafts [J]. J Biomech, 2015, 48(10): 2090-5.
- [3] 柴守栋,顾承雄. 血流剪切力对静脉桥血管再狭窄影响的研究进展 [J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35(6): 495-7.
- [4] Yu P, Nguyen B T, Tao M, et al. Diet-induced obesity drives negative mouse vein graft wall remodeling [J]. J Vasc Surg, 2014, 59(6): 1670-6.
- [5] Lee T H, Wisniewski H G, Vilecek J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44 [J]. J Cell Biol, 1992, 116(2): 545-57.
- [6] Búrdos T, Kamath R V, Mikecz K, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- α -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis [J]. Am J Pathol, 2001, 159(5): 1711-21.
- [7] Hu J, Wan S. External support in preventing vein graft failure [J]. Asian Cardiovasc Thorac, 2012, 20(5): 615-22.
- [8] Foskett A M, Bazhanov N, Ti X, et al. Phase-directed therapy: TSG-6 targeted to early inflammation improves bleomycin-injured lungs [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(2): L120-31.
- [9] Guo P, Zhang S Z, He H, et al. TSG-6 controls transcription and activation of matrix metalloproteinase 1 in conjunctivochalasis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(3): 1372-80.
- [10] 洪学哲,李小静,马莉. TSG-6 与炎症反应 [J]. 安徽医学, 2012, 33(2): 240-1.
- [11] 叶岩,张成鑫,张士兵,等. miR-145 对大鼠静脉桥血管内膜增生的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(7): 917-22.
- [12] 张苑,刘其强. 炎症因子与颈动脉斑块稳定性的相关性研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2012, 20(6): 981-2.
- [13] Beltran S R, Svoboda K K, Kerns D G, et al. Anti-inflammatory protein tumor necrosis factor- α -stimulated protein 6 (TSG-6) promotes early gingival wound healing: an *in vivo* study [J]. J Periodontol, 2015, 86(1): 62-72.
- [14] 刘盛华. 熊果酸抑制 NF- κ B 活化防治大鼠静脉再狭窄的实验研究 [D]. 广州:南方医科大学, 2015.

The expression and significance of TSG-6 in rat vein graft hyperplasia

Zhang Biao, Zhang Chengxin, Gong Wenhui, et al

(Dept of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the expression of tumor necrosis factor alpha-stimulated gene-6 (TSG-6) in the rat transplanted vein graft, and to explore its action and possible mechanism to provide a new direction and theoretical basis for the clinical treatment of vascular restenosis after vein transplantation. **Methods** The vascular graft model was made by cuff technique, in which the autograft of the external jugular vein of the rat was transplanted into the ipsilateral carotid artery. The experiment was divided into three groups: sham operation group, stent group and non-stent group. Then the grafts were removed 12 weeks postoperatively. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the proliferation of mesenteric vein, medial and adventitial vein. The thickness of the grafts was measured and analyzed by immunohistochemistry with computer image analysis system. Western blot was used to detect TSG-6, TNF- α and IL-1. **Results** The expression of TSG-6, TNF- α and IL-1 in the sham operation group and the stent group were significantly lower than those in the non-stent group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of TSG-6 in vein grafts of rats is significantly increased and correlated with the expression of TNF- α and IL-1. The external stent may inhibit the proliferation of transplanted vascular wall by inhibiting the inflammatory reaction of graft vein.

Key words TSG-6; vein graft; vascular stent; intimal hyperplasia