

高度怀疑 DVT 的可能,可进一步行血管超声检查,必要时行下肢深静脉造影检查。

参考文献

- 1 Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, *et al.* Prevention of venous thromboembolism; American College of Chest Physicians Evidence – Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition) [J]. Chest, 2008, 133 (Suppl 6): S381 – S453
- 2 Tan M, van Rooden CJ, Westerbeek RE, *et al.* Diagnostic management of clinically suspected acute deep vein thrombosis [J]. Br J Haematol, 2009, 146 (4): 347 – 360
- 3 Heim SW, Scheetman JM, Siadat MS, *et al.* D – dimer testing for deep venous thrombosis; a metaanalysis [J]. Clin Chem, 2004, 50 (7): 1136 – 1147
- 4 Wells PS, Anderson DR, Rodger M, *et al.* Evaluation of D – dimer in the diagnosis of suspected deep vein thrombosis [J]. N Engl J Med, 2003, 349 (13): 1227 – 1235
- 5 Willemin WA, Kone W, Waser G, *et al.* Usefulness of the D – dimer/fibrinogen ratio to predict deep venous thrombosis [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3 (2): 385 – 387
- 6 Kueher N, Kohler HP, Dornhofer T, *et al.* Accuracy of D – dimer/fibrinogen ratio to predict pulmonary embolism; a prospective diagnostic study [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1 (4): 708 – 713
- 7 Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases [J]. Radiology, 1983, 148 (3): 839 – 843
- 8 Bounameaux H, Perrier A, Righini M. Diagnosis of venous thromboembolism; an update [J]. Vase Med, 2010, 15 (5): 399 – 406
- 9 Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis [J]. Lancet, 2012, 379 (9828): 1835 – 1846
- 10 Siragusa S. D – dimer testing: advantages and limitations in emergency medicine for managing acute venous thromboembolism [J]. Intern Emerg Med, 2007, 2 (1): 70 – 71
- 11 Vlieg AVH, Rosendaal FR. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1 (12): 2677 – 2678
- 12 Palla A, Pazzagli M, Manganelli D, *et al.* Clinical, anamnestic and coagulation data in patients with suspected or confirmed pulmonary embolism [J]. Respiration, 1994, 61 (2): 93 – 98
- 13 Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, *et al.* Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism; the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE) [J]. Am J Med, 2002, 113 (8): 636 – 642
- 14 Yukizawa Y, Inaba Y, Watanabe S, *et al.* Association between venous thromboembolism and plasma levels of both soluble fibrin and plasminogen – activator inhibitor 1 in 170 patients undergoing total hip arthroplasty [J]. Acta Orthop, 2012, 83 (1): 14 – 21
- 15 Watanabe H, Madoiwa S, Sekiya H, *et al.* Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement [J]. Thromb Res, 2011, 128 (6): 137 – 143
- 16 Rafee A, Herliker D, Gilbert R, *et al.* D – Dimer in the diagnosis of deep vein thrombosis following total hip and knee replacement; a prospective study [J]. Ann R Coll Surg Engl, 2008, 90 (2): 123 – 126
- 17 Wells PS, Anderson DR, Bormanis J, *et al.* Value of assessment of pretest probability of deep vein thrombosis in clinical management [J]. Lancet, 1997, 350 (9094): 1795 – 1798

(收稿日期: 2013 – 07 – 17)

(修回日期: 2013 – 07 – 29)

DAPT 对大鼠自体移植静脉桥狭窄的抑制作用

肖永光 毛志福 龚 丹

摘 要 **目的** 观察 DAPT 对大鼠自体移植静脉桥狭窄的抑制作用。**方法** 成年 Wistar 大鼠随机分为实验组、对照组和安慰剂组, 每组 12 只。所有大鼠分离并切取 0.5cm 长颈外静脉, 移植到自体同侧颈总动脉中。分别于术后第 1 天、第 4 天和第 7 天取各组动物各 4 只, 完整取下移植静脉桥, 常规石蜡包埋, 切片行 HE 及 PCNA 和 TUNEL 免疫组化染色, 计算静脉桥中膜增生的厚度和平滑肌细胞 PCNA 和 TUNEL 阳性指数, 并用 Western blot 检测 SM22 和 SM MHC 变化。**结果** 移植后第 7 天实验组静脉桥中膜厚度和 PCNA 阳性指数比对照组和安慰剂组明显较小 ($P < 0.05$), 但实验组凋亡程度明显高于安慰剂组。Western blot 显示静脉桥移植后 SM22 和 SM MHC 表达明显降低, syndecan – 1 表达降低, 但 DAPT 能够促使其表达回复。**结论** DAPT 能够缓解静脉桥狭窄, 并对移植静脉内平滑肌细胞增生有抑制作用。

关键词 静脉桥 DAPT 狭窄

DAPT Inhibits Autogeneic Vein Graft Model in Rats. Xiao Yongguang, Mao Zhifu, Gong Dan. Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To discuss if DAPT inhibits autogeneic vein graft model. **Methods** Thirty – six adult rats used in this study were divided into three groups ($n = 12$ for each group). The autogenous jugular vein of all rats was grafted into the carotid artery by micro-

surgery. After the operation, rats in each group were fed in the same way. The control group do nothing. In experiment and placebo group, DAPT and DMSO were administrated to rats by a daily subcutaneous dose of 10mg per kg body weight respectively from day 0 to day 7 post operation. In placebo, at 1days, 4days and 7days after grafting, the grafted from four of each groups vessel were taken out. **Results** Intimal hyperplasia (IH) and anti - proliferating cell nuclear antibody (PCNA) index of smooth muscle cell (SMC) of vein graft in experiment group were lower than those in control and placebo group. And the TUNEL index of smooth muscle cell (SMC) and SM22 and SM MHC in IH of experiment group were higher than those of control group. **Conclusion** DAPT can ameliorate the stricture of the vein graft model.

Key words Vein graft model; DAPT; Stenosis

自体静脉桥多用于动脉狭窄和冠心病的外科治疗,从而使缺血远端重获丰富血供,但静脉桥建立后常因管壁增厚和管腔狭窄,导致远端血供重新受到影响,严重者甚至需要再次手术治疗。造成这种结果的主要原因是血管壁中膜平滑肌细胞(vSMCs)增生及发生细胞表型的改变,并分泌的大量细胞外基质的堆积^[1]。因而如何抑制血管平滑肌细胞增生和减少细胞外基质生成成为缓解静脉桥狭窄的关键。

有研究表明,Notch 通路在血管平滑肌细胞增生过程中起到重要作用,DAPT 作为 γ 分泌酶抑制剂,能够阻断 Notch 通路,能够抑制血管平滑肌细胞增生,并阻止血管平滑肌细胞表型发生变化^[2]。我们拟探讨 DAPT 对静脉桥的抑制作用。

材料与方法

1. 实验分组:成年 Wistar 大鼠(武汉大学医学院动物实验中心提供),体重 200~250g,雌雄不限。随机分为对照组(control)、实验组(DAPT)和安慰剂组(DMSO),每组 12 只。

2. 自体静脉桥移植:各组实验动物均用 4% 戊巴比妥钠(30mg/kg)尾静脉注射麻醉,并按 1.5mg/kg 剂量注入肝素抗凝。左颈部备皮后颈部皮肤切开,游离左颈总动脉和颈外静脉。剪取长约 0.5cm 血管桥,在 20 倍手术显微镜下,用 11-0 医用无损线将动脉两断端分别与静脉桥行端端吻合。吻合完毕见静脉桥立刻明显扩张、触之可及震颤,表示静脉桥通畅。术毕依层缝合,关闭切口。置大鼠于室温,自然清醒。术毕每日触摸颈部,静脉桥处可及震颤。

3. 术后处理:对照组术后不做任何处理;实验组每只每日皮下注射 DAPT 10mg/kg;安慰剂组每只每日皮下注射安慰剂二甲亚砷(DMSO)10mg/kg。术后 3 组动物均常规饲养。实验第 1 部分观察 DAPT 对静脉桥狭窄发生的影响,治疗从术后第 1 天开始;实验第 2 部分观察 DAPT 对静脉桥狭窄发展的影响,治疗从术后第 4 天开始。

4. 标本采集和处理:术后两组动物常规饲养,手术当天及术后第 1、4 及 7 天随机抽取两组动物各 4 只,用上述相同方法麻醉后沿原切口切开,游离静脉桥,清除静脉壁外附着组织,阻断两端吻合处,向腔内注入适量 10% 甲醛溶液,10min 后切取移植静脉桥进行常规病理切片,HE 染色及 TUNEL 免疫组化染色。实验动物均放血处死。

5. 观察指标:①在显微镜下,以内弹力膜为界,测量 10mm

长静脉桥中膜平均厚度;②计算静脉桥中膜平滑肌细胞核 PCNA 染色阳性指数(PCNA 指数 = PCNA 阳性细胞/视野下 100 个细胞 $\times 100\%$);③计算静脉桥中膜平滑肌细胞核 TUNEL 染色阳性指数(凋亡指数 = TUNEL 阳性细胞/视野下 100 个细胞 $\times 100\%$);④取移植血管,裂解细胞制成蛋白液后,行 Western blot,分析 SM22 和 SM MHC 以及 myocardin 的蛋白浓度变化。

6. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。定量数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DAPT 能够明显抑制静脉桥的发生和发展:3 组各 12 只大鼠均成功移植自体静脉桥。观察结果显示两组移植静脉桥均有不同程度增厚,且有随移植时间而增加的趋势(图 1)。移植后第 7 天实验组静脉桥中膜厚度比对照组和安慰剂组明显较小($P < 0.05$,图 1),结果表明 DAPT 对静脉桥狭窄的发生有明显的抑制作用。同时 PCNA 指数显示移植后第 7 天实验组静脉桥血管平滑肌细胞增生程度明显低于对照组和安慰剂组($P < 0.05$,图 2)。但实验组凋亡程度明显高于安慰剂组($P < 0.05$,图 3)。在静脉桥形成后,DAPT 能明显抑制静脉桥平滑肌细胞增生的进一步发展(图 2)。与对照组相比,两组间有显著差异($P < 0.05$,图 4)。

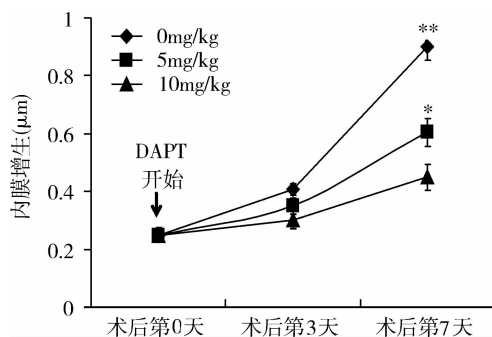


图 1 3 组中膜厚度比较

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. DAPT 能够抑制血管平滑肌细胞的表型变化: Western blot 显示静脉桥移植后收缩型蛋白 SM22 和

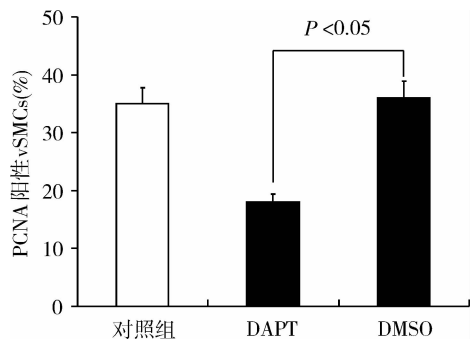


图2 3组PCNA阳性指数比较

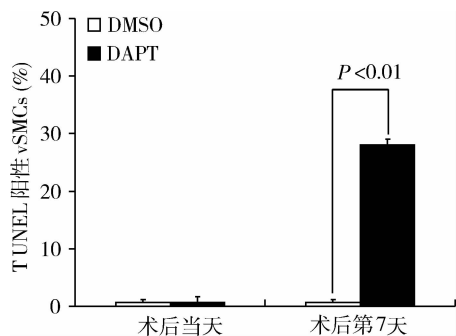
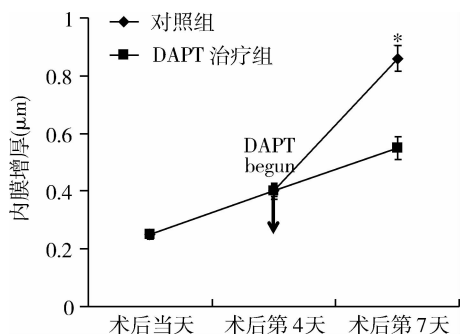


图3 两组凋亡程度比较

图4 DAPT能够明显抑制静脉桥狭窄的发展
与对照组比较,* $P < 0.05$

SM MHC 表达明显降低,合成型蛋白 syndecan-1 表达增加,而但 DAPT 能够促使其表达回复。说明静脉桥中的细胞表型发生变化,细胞由收缩型转变为合成型(图 5),而这种细胞表型蛋白的变化是由 myocardin 的表达变化所引起的(图 6)。

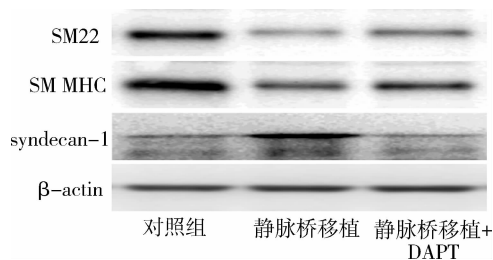
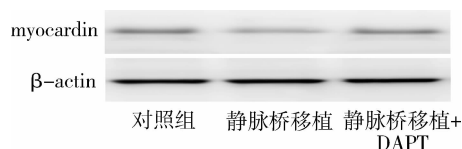
图5 WB显示SM22和SM MHC以及
syndecan表达情况

图6 WB显示myocardin表达情况

讨 论

有研究表明静脉桥发生狭窄的主要原因是血管壁中膜平滑肌样细胞增生且细胞表型发生变化,并分泌大量细胞外基质在血管壁内堆积,从而形成移植桥血管管腔狭窄,导致闭塞^[3,4]。DAPT 为作为 γ 分泌酶抑制剂,能够阻断 Notch 通路。有研究表明 Notch 通路是一个高度保守的通路,在调控血管平滑肌细胞增生方面起到重要作用。本实验结果显示实验组静脉桥狭窄明显缓解,表明 DAPT 能够有效抑制静脉桥狭窄发生。本实验结果还显示血管平滑肌细胞 PCNA 阳性指数明显降低,提示血管平滑肌细胞增生程度明显被抑制,表明 DAPT 能够通过阻断 Notch 通路,影响血管平滑肌细胞的增生,从而达到抑制静脉桥内膜增厚的目的。本实验结果也显示实验组静脉桥血管平滑肌细胞 PCNA 阳性指数降低的同时, TUNEL 阳性指数也较高,可见 DAPT 引起桥静脉管腔狭窄明显缓解的主要原因除了血管平滑肌细胞增生减少外,也能够引起其凋亡增加^[5]。

为了研究 DAPT 对静脉桥血管平滑肌细胞表型变化的影响,我们研究了血管平滑肌细胞标志蛋白 SM22 和 SM MHC 的变化。Western blot 结果显示与正常静脉相比,静脉桥移植后 SM22 和 SM MHC 表达明显降低, syndecan-1 表达增加,但 DAPT 能够促使其表达回复。这说明 DAPT 能够在一定程度上抑制血管平滑肌细胞表型发生变化,从而抑制蛋白质合成,减少细胞外基质的堆积,从而起到缓解静脉狭窄的作用,而这种变化主要是由于 myocardin 的表达所引起。

参考文献

- Hindnavis V, Cho SH, Goldberg S. Saphenous vein graft intervention: a review[J]. J Invasive Cardiol, 2012, 24(2): 64-71
- Li X, Zhang X, Leathers R, et al. Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. Nat Med, 2009, 15(11): 1289-1297
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. Physiol Rev, 2004, 84(3): 767-801
- Yuan SM, Jing H. A reappraisal of saphenous vein grafting[J]. Ann Saudi Med, 2011, 31(1): 62-71
- Parang P, Arora R. Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention[J]. Can J Cardiol, 2009, 25(2): e57-62

(收稿日期:2013-05-02)

(修回日期:2013-05-13)