

猪冠状动脉侧支循环生成的免疫组化研究*

孟祥博¹ 励建安^{1,2} 陆晓¹ 黄澎¹ 吴涛¹ 邱峰¹ 高晶¹

摘要 目的:探讨免疫组化法分析猪冠状动脉侧支循环生成的可行性,为冠心病康复的机制研究奠定方法学基础。**方法:**健康成年小型猪45只,建立可控性心肌缺血动物模型,分别设立假手术组、缺血组和运动组。缺血组予以单纯冠状动脉水囊充气诱发的短暂缺血,运动组除行缺血刺激外再给予平板有氧训练,共持续8周。实验终点时取冠状动脉钝缘支支配区心肌组织行心肌毛细血管密度测定:①常规HE染色后镜检计数;②免疫组化分析Ⅷ因子相关抗原标记并镜检计数。对两种方法检测毛细血管密度的重复性进行检验。**结果:**HE染色与免疫组化均显示运动组心肌缺血区毛细血管密度明显高于单纯缺血组($P<0.01$)及假手术组($P<0.01$),缺血组明显高于假手术组($P<0.01$)。免疫组化检测的毛细血管密度显著高于HE检测($P<0.05$)。两种方法的结果有较好的重复性($P>0.05$),均与冠状动脉侧支血流量(CCBF)正相关,但免疫组化检测结果与CCBF相关系数显著高于HE($P<0.05$)。**结论:**免疫组化可以准确有效地量化分析猪冠状动脉侧支血管状态。

关键词 免疫组化;侧支循环;毛细血管密度;运动训练;缺血

中图分类号:R493.R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2008)-04-0309-04

Immunohistochemical analysis of coronary collateral circulation development in pigs/MENG Xiangbo, LI Jian'an, LU Xiao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(4):309-312

Abstract Objective:To study the feasibility of applying immunohistochemical analysis in coronary collateral circulation development in mini pigs, which will be a methodological foundation in mechanism of cardiac rehabilitation. **Method:** An animal model of controllable myocardial ischemia was established in 45 mini pigs. The animals were equally divided into four groups, which were the sham-operated group (SO), sedentary ischemic group (SI) and exercise training group (ET). Repeated transient myocardial ischemia was induced by inflation of balloon constrictor or aerobic exercise training for 8 weeks. The myocardium attributed to the oblique marginal artery was finally sampled at the end point of the study for measurement of capillary density (CD). The methods of the measurement were H.E. staining and immunohistochemical assay labeled by Factor VIII-RA. The reproductivity of the two methods for CD analysis was studied. **Result:** Both methods demonstrated significant increase of myocardial CD in ET group, and it was significantly higher than SI($P<0.01$) and SO($P<0.01$). Furthermore, the myocardial CD in SI was also higher than SO ($P<0.01$). The CD analyzed by immunohistochemistry was higher than HE ($P<0.05$). The reproducibility between HE staining and immunohistochemical assay was excellent($P>0.05$). Coronary collateral blood flow (CCBF) was positively correlated with CD analyzed by both methods. The correlation coefficient between immunohistochemical assay and CCBF was significantly higher than H.E. staining ($P<0.05$). **Conclusion:** Immunohistochemical analysis is an accurate and reliable method for quantitative analysis of the coronary collateral circulation development in mini pig.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key words immunohistochemical analysis; collateral circulation; capillary density; exercise training; ischemia

冠心病是常见的心血管疾病。运动训练对冠状动脉侧支循环生成的影响是心脏康复研究的焦点之一。本课题组对缺血和运动促进冠状动脉侧支循环生成进行了系列研究,取得了积极的成果。

免疫组织化学是一种利用标记的抗体与抗原的特异性结合对组织或细胞内某种物质进行定性、定位或半定量检测的技术。国外已有研究使用免疫组化方法成功标记鼠肿瘤内血管和兔胫骨生物材料移植植物内血管^[1-2]。Chu等^[3]对冠脉狭窄猪模型进行激

光血运重建术治疗后,用免疫组化的方法也成功标记出新生血管,证实免疫组化是一种标记新生血管特异、高效、敏感的方法。目前免疫组化方法虽已被

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370687)

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京广州路300号,210029

2 通讯作者:励建安(南京医科大学第一附属医院康复医学科,210029)

作者简介:孟祥博,男,硕士研究生

收稿日期:2007-12-19

广泛应用于兔和鼠等小动物的形态学研究,但少见用于大动物的相关研究中。姜笃银等^[4]用免疫组化方法检测猪与人皮肤通用抗原标志,结果显示兔抗人Ⅷ因子多克隆抗体可以成功标记出猪的皮肤血管。本课题组前期研究曾试图采用免疫组化的方法对兔侧支循环生成进行半定量研究,但未获得成功^[5],遂采用 HE 染色的方法镜下检测侧支血管密度。然而 Himeno 等^[6]在对肝细胞肝癌的研究中发现管径小的微动脉常在 HE 染色中被忽略,究其原因可能与缺乏特异性观察指标有关。

为了提高侧支循环形态学研究的可靠性,本研究在国内首次尝试应用免疫组织化学的手段对可控性心肌缺血小型猪的冠脉侧支新生血管予以标识,并从结果重复性以及血流量的相关性角度比较免疫组化和 HE 染色对毛细血管形态研究的区别。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年巴马小型猪 45 只,体重 23.7±4.0kg,由上海市农业科学院提供。

1.2 模型制作

采用本系列课题组的心肌缺血模型^[7]:采用静脉麻醉,取左侧胸壁第 4 肋间切口进胸。游离钝缘支近心端约 1cm,将水囊缩窄器卡在血管上,水囊导管头端固定在心脏表面。导管尾部由钢针引导穿过皮下后在胸侧壁穿出,自制背心保护导管末端。

1.3 实验分组

模型制作成功 24 只,随机分为缺血组、运动组和假手术组各 8 只。

1.4 训练方案

缺血组于术后 4 周行缺血刺激:在无应激状态下通过水囊加压和撤压给予 2min/次、2 次/天的缺血刺激^[8],两次缺血刺激间隔 15min,5 次/周,共 8 周。运动组除行缺血刺激外,每天给予中等强度附加可诱发短时心肌缺血的间断性高强度活动平板训练 30min,共 8 周。

假手术组除不进行缺血刺激外,其余操作均同缺血组。

1.5 标本采集

实验终止时,予以氯胺酮 400mg 肌注,行胸骨正中切口迅速开胸,取出心脏,从钝缘支水囊缩窄器下方 1cm 处(图 1,见前置彩色插页 5)取该支血管支配区心肌^[9],并置于 4%多聚甲醛中固定。

1.6 组织学检查

取缺血区心肌行常规石蜡包埋,每个石蜡标本

做连续两张 4μm 切片,分别行 HE 染色及免疫组化染色。

1.6.1 HE 染色:①将石蜡切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗:二甲苯(I)5min→二甲苯(II)5min→100%乙醇 2min→95%乙醇 1min→80%乙醇 1min→75%乙醇 1min→蒸馏水洗 2min。②染色:对于上述处理好的样品,浸入苏木素染色液 5min→自来水中冲洗 10min,洗去多余的染色液→0.1%盐酸乙醇分化 30s(提插数下)→自来水浸泡 15min→伊红染色液染色 30s。③常规脱水、透明、封片:95%乙醇(I)1min→95%乙醇(II)1min→100%乙醇(I)1min→100%乙醇(II)1min→二甲苯(I)1min→二甲苯(II)1min→中性树脂封固。

将切片置于镜下观察靶血管支配区心内膜、心外膜下心肌有无坏死和血管栓塞。每张切片于高倍镜下随机选择 5 个视野进行毛细血管计数取平均值。毛细血管判断标准:数个血管内皮细胞围成管腔或单细胞管腔作为一个毛细血管计数单位。

1.6.2 免疫组化染色(参考 Kammerer 和 Zhang 等方法^[10-11]):①将石蜡切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗:同 HE 染色。②抗原修复:将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH=6.0)的容器中。将容器置微波炉内加热,使容器内液体温度保持在 92—98℃之间并持续 20min 行微波抗原修复。③染色:从微波炉内取出容器,室温冷却 30min→取出切片,在组织上滴加 3%H₂O₂ 室温孵育 15min,以消除内源性过氧化物酶的活性→蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5min×3 次。取出切片,在组织上滴加 1:100 稀释的兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体^[9](DAKO 公司),室温下孵育 1h→PBS 冲洗,5min×3 次→在组织上滴加 envision 试剂盒(DAKO 公司)中的二抗室温孵育 30min→PBS 冲洗,5min×3 次。在组织上滴加 DAB 显色剂,室温孵育 5min→显色完全后,蒸馏水冲洗终止显色→滴加苏木素复染 30s,自来水冲洗→0.1%盐酸乙醇分化 30s(提插数下),自来水浸泡 15min。④常规脱水、透明、中性树脂封片:同 HE 染色。将切片置于显微镜下观察视野内Ⅷ因子阳性染色的新生毛细血管情况。计数方法:高倍镜下每张切片随机选 5 个视野,计算 5 个视野内毛细血管平均数。毛细血管判断标准为:染成棕色的数个内皮细胞围成的窦状、条索状管腔或无管状结构的数个或单个内皮细胞。

1.6.3 数据的重复性检测:①观察者间测量差异的检验:由两位有经验的病理观察者分别对 HE 和免疫组化染色后切片进行毛细血管计数,比较两观察

者间的测量差异。②观察者自身测量差异检验:同一病理观察者前后两次对 HE 和免疫组化染色后切片进行毛细血管计数,比较两次测量间的差异。

1.7 统计学分析

所有数据均以均数±标准差表示,经 SPSS12.0 软件检验呈正态性分布且方差齐性。同种方法得出的毛细血管密度组内采用配对 *t* 检验,两组间采用成组数据 *t* 检验,各组间采用单因素方差分析。不同观察者和同一观察者前后两次用 HE 和免疫组化两种方法分别检测出的毛细血管密度采用自身配对设计 *t* 检验。Pearson 相关分析冠状动脉侧支血流量 (coronary collateral blood flow,CCBF) 分别与 HE 和免疫组化两种方法测得的钝缘支支配区心肌毛细血管密度之间关系,两者相关系数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 组织学检测

2.1.1 HE 高倍镜观察: 各组均未见心肌变性坏死灶及血栓形成。各组实验终点钝缘支支配区毛细血管密度比较见表 1—2。运动组毛细血管密度明显高于缺血组 ($P < 0.01$) 及假手术组 ($P < 0.01$), 缺血组亦高于假手术组 ($P < 0.01$)。

表 1 两观察者为缺血区毛细血管计数的比较

| | (根/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$) | | |
|---------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 假手术组 | 缺血组 | 运动组 |
| HE 染色 | | | |
| 观察者 1 | 1.48±0.49 | 4.10±0.76 ^① | 7.95±1.00 ^{①②} |
| 观察者 2 | 1.53±0.49 | 4.00±0.80 ^① | 8.03±1.01 ^{①②} |
| 免疫组化染色 | | | |
| 观察者 1 | 1.60±0.45 | 4.55±0.67 ^① | 9.42±0.95 ^{①②} |
| 观察者 2 | 1.63±0.46 | 4.50±0.75 ^① | 9.35±0.97 ^{①②} |

①与假手术组比较 $P < 0.01$; ②与单纯缺血组比较 $P < 0.01$

表 2 同一观察者为缺血区毛细血管计数的比较

| | (根/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$) | | |
|---------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 假手术组 | 缺血组 | 运动组 |
| HE 染色 | | | |
| 第一次 | 1.50±0.51 | 4.05±0.83 ^① | 7.88±1.05 ^{①②} |
| 第二次 | 1.53±0.45 | 4.05±0.75 ^① | 8.05±1.06 ^{①②} |
| 免疫组化染色 | | | |
| 第一次 | 1.60±0.44 | 4.53±0.67 ^① | 9.33±0.90 ^{①②} |
| 第二次 | 1.58±0.43 | 4.40±0.66 ^① | 9.38±0.98 ^{①②} |

①与假手术组比较 $P < 0.01$; ②与单纯缺血组比较 $P < 0.01$

2.1.2 免疫组化 VIII 因子染色: 各组实验终点毛细血管密度比较见表 1—2。运动组毛细血管密度明显高于缺血组 ($P < 0.01$) 及假手术组 ($P < 0.01$), 缺血组亦高于假手术组 ($P < 0.01$)。

2.1.3 HE 和免疫组化的比较: 图 2 示(见前置彩色插页 5)心肌缺血区形态学染色。免疫组化检测出的钝缘支支配区心肌毛细血管密度均显著高于 HE 检测结果 ($P < 0.05$)。

2.2 观察结果的重复性

两观察者和同一观察者前后两次用 HE 方法或用免疫组化方法检测的结果之间均未显示明显的差别 ($P > 0.05$)。

2.3 毛细血管密度与血流的关系

图 3 示不同组心肌 CCBF 与心肌毛细血管密度之间的关系, 发现 HE 检测结果与 CCBF 的相关性 ($r_1 = 0.803, P < 0.05$) 低于免疫组化检测结果与之相关性 ($r_2 = 0.874, P < 0.05$), 两相关系数差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

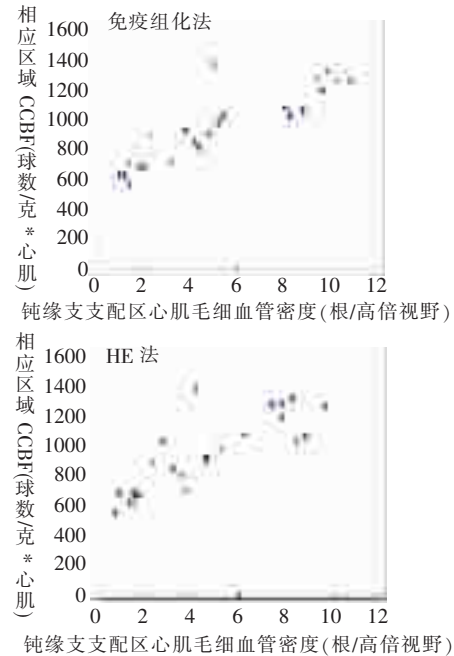


图 3 CCBF 与心肌毛细血管密度之间的相关关系

3 讨论

运动训练是冠心病康复的核心内容。而中心效应,即通过适当的运动训练促进心肌侧支循环生成,尚未得到公认。国内外动物实验发现,冠状动脉狭窄后进行运动训练可促进侧支循环生成^[12-13],而运动训练不能促进无冠状动脉狭窄者的侧支循环生成^[14],提示运动可能诱发短暂亚临床状态的可逆性缺血来促进侧支循环生成。

3.1 研究设计

3.1.1 研究手段: HE 染色镜下毛细血管计数是一种经典的观察方法。20 世纪 70 年代,Feinstein 等^[15]对肺癌组织常规 HE 染色切片研究发现,不同观察者对同一组织切片,甚至同一观察者自身前后对同一切片观察后也可能得出不同结论,因此作者认为 HE 染色法因缺乏特异性而可能干扰诊断结果。同时,HE 染色较难识别闭合的毛细血管^[16]。而免疫组化方法可通过特异性抗体标识血管内皮细胞,识别开放和闭合的毛细血管从而可准确计算毛细血管数

目,具有特异性强、敏感度高及客观可靠的特点,多年来该方法在国外已被广泛应用,但在国内有关采用免疫组化方法显示可控性心肌缺血后新生侧支血管生成尚未见报道。

本实验采用的 Envision 法利用葡聚糖多聚体复合物技术增强了信号扩大系统,将其他免疫组化方法如 LSAB、SABC 法的二抗和三抗分别合成改为一次孵育,从而使该方法具有更高的敏感性和简便性。Sabattini 等^[7]同时使用多种方法对同一种标本的 53 种抗原进行检测,发现在切片染色达到相同强度和阳性率的前提下,Envision 法所需一抗稀释度是其他几种方法的 2 到 5 倍,证明 Envision 法具有极高的敏感性。同时,当一抗为多克隆抗体时,高稀释度还可大幅减少抗原抗体的非特异性结合机会、降低切片背景染色。Nishishita 等^[8]通过细胞移植的方法在小鼠后肢缺血模型中行血管新生治疗后,用 Envision 法亦可清晰显示新生血管。因此,本实验采用 Envision 法对冠脉侧支血管进行免疫组化分析。

3.1.2 观察指标:第Ⅷ因子相关抗原(vWF)是由血管内皮细胞所合成、储存和释放的一种糖蛋白。它释放入血液后不仅可参与血小板的生理止血过程,而且还可与凝血因子Ⅷ形成非共价化合物,在局部发挥有效的凝血作用,也是血管内皮细胞特异标记物之一^[9]。vWF 和其抗体结合后通过免疫组化染色使血管显示为棕黄色的圈状结构。vWF 的表达使得微小血管甚至尚未形成管腔的新生内皮细胞均有较强染色,且背景清晰,从而可以在光镜下直接观察心肌缺血区毛细血管的分布情况。为了将新生侧支及闭合毛细血管囊括在内,本研究将无管腔结构的数个或单个血管内皮细胞也算一个毛细血管计数在内。

3.2 结果分析

本实验用 HE 和免疫组化的方法检测缺血区心肌新生毛细血管数目,结果表明这两种检测方法均可成功显示猪冠状动脉侧支血管;而同一观察者免疫组化检测结果均显著高于 HE 检测结果,说明免疫组化较 HE 显示猪冠状动脉侧支血管的敏感性更高。短暂反复间断性缺血可促进小型猪的毛细血管新生,而在缺血的基础上采取运动的方式更加有益于毛细血管新生。

本研究有关两观察者和同一观察者前后两次使用两种方法检测毛细血管密度,结果并无统计学差异,表明所得数据可靠,有较好的可重复性,也证明了在免疫组化方法未成功时,HE 方法仍可作为一种有效并可信的方法观察毛细血管。但是免疫组化的方式更加有利于减少观测误差。

本课题组前期曾试图用抗人的Ⅷ因子相关抗原、CD34 和 CD31 标记家兔血管内皮细胞,但未能取得成功^[6]。结合本次实验的经验及文献分析其原因可能为:①种属特异性。目前市场上尚无抗兔和猪的第Ⅷ因子相关抗原抗体,只能采用与之有交叉反应的一抗。②一抗种类。过去使用的一抗为单克隆抗体,由于单抗只能识别单个抗原表位,虽特异性较高,但如所需识别的抗原表位与相对应单抗交叉反应较小,则会显著影响实验结果。姜笃银等^[4]发现鼠抗人的Ⅷ因子相关抗原、CD31、CD34 单克隆抗体未能标记出猪血管内皮细胞。有鉴于此,本实验选用多克隆抗体,可同时识别多个抗原表位,从而避免以上因素影响。

本研究对可控性缺血与同期测得的 CCBF 之间关系进行了观察,结果显示,CCBF 与使用 HE 和免疫组化两种方法检测出的钝缘支支配区心肌毛细血管密度均存在正相关性,从而从血流动力学方面对本实验结果予以深层次印证。免疫组化结果与 CCBF 相关性较 HE 结果与之相关性更好,再次证明免疫组化比 HE 在检测毛细血管方面更可取。

3.3 研究意义及局限性

本研究采用免疫组化的方法观测冠状动脉侧支循环的形态,改善了该方向的系列研究的方法学,为今后深入研究运动、缺血和心肌侧支循环形成的规律奠定了重要的方法学基础。如能采用三维显微形态学的研究作为对照,将有利于加强本方法学的结论。此外由于本组实验动物为猪,其结果不能类推到其他类型实验动物。

参考文献

- [1] Tanaka T, Furukawa T, Fujieda S, et al. Double-tracer autoradiography with Cu-ATSM/FDG and immunohistochemical interpretation in four different mouse implanted tumor models[J]. Nucl Med Biol, 2006, 33(6):743—750.
- [2] Henno S, Lambotte JC, Glez D, et al. Characterisation and quantification of angiogenesis in beta-tricalcium phosphate implants by immunohistochemistry and transmission electron microscopy[J]. Biomaterials, 2003, 24(19):3173—3181.
- [3] Chu V, Kuang J, McGinn A, et al. Angiogenic response induced by mechanical transmural myocardial revascularization [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 118(5):849—856.
- [4] 姜笃银,付小兵,周兵,等.免疫组化方法检测猪和人皮肤通用抗原标志[J].实验动物科学与管理,2003,20(3):11—14.
- [5] 王元会,励建安,顾劲扬,等.心肌周缺血频率对冠状动脉侧支循环生成的影响 [J].中华物理医学与康复杂志,2006,28(1):5—9.
- [6] Himeno H, Enzan H, Saibara T, et al. Hitherto unrecognized

(下转 316 页)