

淫羊藿苷对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增生 和平滑肌细胞凋亡的影响

高爱社^{1*}, 苗丽²

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 河南武警总队医院, 郑州 450052)

[摘要] 目的: 研究淫羊藿苷对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增生和平滑肌细胞凋亡的影响。方法: 大鼠 44 只随机分为正常对照组 8 只, 淫羊藿苷 60 mg·kg⁻¹组、淫羊藿苷 120 mg·kg⁻¹组和模型组各 12 只。后 3 组建立鼠颈动脉球囊损伤术后狭窄模型, 淫羊藿苷组术前 6 d 开始 ig 至实验结束; 模型组以等体积生理盐水 ig。术后 14 d 和 28 d 分批处死动物。取各组动物颈动脉损伤段, 常规制片, HE 染色, 采用计算机图像分析系统测量内膜面积和中膜面积, 并计算新生内膜/中膜面积比(I/M); 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的三磷酸脱氧尿 缺口末端标记法(TUNEL)检测平滑肌细胞凋亡。结果: 给药两组术后 14, 28 d, 损伤部位血管内膜、中膜面积明显小于模型组, 差异非常显著($P < 0.01$); 球囊损伤后 14, 28 d, 各手术组新生内膜区均出现明显的凋亡细胞, 其中淫羊藿苷组较模型组细胞凋亡率显著增高($P < 0.01$), 结论: 淫羊藿苷可能通过促进平滑肌细胞的凋亡而减轻球囊损伤后新生内膜的增生。

[关键词] 淫羊藿苷; 新生内膜; 血管平滑肌细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0163-03

Effect of Icarin on Intimal Proliferation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell after Vascular Injury in Rats

GAO Ai-she^{1*}, MIAO Li²

(1. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Hena College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Department of Cardiology, Henan Army Police Forced Hospital, Zhengzhou 450052, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Icarin (ICA) on intimal proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell after vascular injury in rat. **Method:** Forty-four rats were randomly divided into 4 groups: natural group, model group and ICA 60, 120 mg·kg⁻¹ group. Rat model of carotid restenosis induced by balloon injury was established. Rats of ICA group were treated with drugs for 2 or 4 weeks. Then the neointimal area (IA), medial area (MA), and neointimal area(IA)/medial area(MA) were analyzed by computerized digitizer system. TUNEL method was used to detected the apoptosis in the artery. **Result:** At each time point, the lumen area was larger and the neointima area was smaller in all the treated groups compared with that in model group ($P < 0.01$). The expression of vascular smooth muscle cell apoptosis in the vascular in all the treated groups was increased, that of the model group (2 w, 4 w) being the lowest ($P < 0.01$). **Conclusion:** ICA can effectively repress neointimal proliferation after vascular injury, The effect may be associated with its action of promoting apoptosis of vascular smooth muscle cells.

[Key words] Icarin; neointima; vascular smooth muscle cell; apoptosis

[收稿日期] 2010-06-13

[基金项目] 河南省教育厅自然科学基金项目(2007310005)

[通讯作者] * 高爱社, 硕士, 副教授, 主要从事中药防治心血管疾病及机制的研究, Tel: 13903860113, E-mail: gaoaishe@126.com

经皮冠状动脉介入(PCI)术已广泛用于冠状动脉狭窄的治疗,但是,PCI术后的再狭窄率严重影响了其远期疗效。再狭窄的突出病理改变是血管内膜增生,对新生内膜增生的发生机制及防治研究已成为攻破再狭窄的突破口,同时寻求新的经济有效药物也成为再狭窄防治研究的热点^[1]。淫羊藿具有补肾阴、强筋骨、祛风湿等多种功效。淫羊藿含有多种有效成分。淫羊藿苷是淫羊藿主要活性成分之一^[2],具有促进免疫功能、抗肿瘤、增强心血管功能等作用。研究表明,淫羊藿苷对损伤的内皮细胞具有保护作用^[3]。也可抑制体外培养的平滑肌细胞增生,提示淫羊藿苷可能对内膜的增生具有抑制作用。本研究利用大鼠颈动脉内膜损伤再狭窄模型观察淫羊藿苷对动脉损伤后内膜增生的作用以及对平滑肌细胞凋亡的影响,探讨该成分在抗再狭窄中的作用。

1 材料与方

1.1 药物及仪器 淫羊藿苷,纯度>98%,由中国药品生物制品检定所提供。凋亡试剂盒购自武汉博士德公司;2.0F PTCA 球囊导管(球囊大小 2 mm × 10 mm)、导引钢丝和压力泵购自美国 CORDIS 公司;图像分析系统,美国 Image proplus 4.5;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 模型复制与分组给药 成年雄性 SD 大鼠由郑州大学实验动物中心提供,体重 300 ~350 g,合格证号 SCXK(豫)2005-0001。随机取正常组 8 只,其余 36 只随机分为模型组及淫羊藿苷高、低剂量组各 12 只。戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹ ip 麻醉大鼠,分离左颈总动脉和颈外、颈内动脉分叉处,用无创血管夹夹闭左颈总动脉近心端及颈内动脉,结扎颈外动脉远端,暂时阻断血流;在颈外动脉切 1 小口,将导引钢丝及直径 2.0 mm 的 2.0 F 球囊导管从切口插入左颈总动脉,导引钢丝尖端插至主动脉弓;以 1.5 atm 大气压(1 atm = 101.325 kPa)充盈球囊,来回抽动 3 次以剥脱内皮;撤出球囊及导引钢丝,结扎颈外动脉,恢复颈总动脉至颈内动脉血流,缝合切口。给药

组于术前 7 d 及术后连续 ig 淫羊藿苷 60, 120 mg·kg⁻¹,共给药 14 d 和 28 d;模型组术后予蒸馏水 ig, 3 mL/只。

1.3 取材、标本制备及形态学观察 术前处死 8 只正常大鼠,术后 14, 28 d 分批处死 6 只,取材检测指标。于术后 14 d 和 28 d,每组 6 只大鼠,腹腔麻醉,分离颈总动脉,剪下球囊损伤段 2 cm,放入 10% 甲醛固定,常规制片,HE 染色后光镜下观察血管内膜增生情况,计算机图像分析系统测量内膜面积和中膜面积,并计算内膜/中膜面积比(I/M)。

1.4 血管壁细胞凋亡检测 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 标记缺口末端标记(TdT-mediated dUTP end labeling; TUNEL)法标记细胞凋亡。按试剂盒说明书进行,以 PBS 缓冲液代替管 1(TdT),作阴性对照,显微镜下观察到细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞,每张切片于光镜下随机选 5 个无重叠视野作半定量测定,以阳性细胞率表示。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.0 软件进行统计,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学观察 用计算机图像分析系统检测各组动脉内膜和中膜面积,结果见表 1。正常组大鼠颈总动脉内腔面光滑,单层内皮细胞覆盖整个管腔,无新生内膜增生;在损伤后 14 d,模型组新生内膜明显,造成明显管腔狭窄,内膜可见平滑肌细胞增生,细胞间质少量堆积,内弹力板有不同程度破坏;淫羊藿苷组新生内膜增生程度较模型组明显减轻,高、低剂量组新生内膜面积无显著差异,其内膜/中膜面积比(I/M)较模型组显著降低($P < 0.01$)。由此可见,淫羊藿苷干预可以显著抑制大鼠颈总动脉内皮损伤后新生内膜的增生。

2.2 血管内皮损伤后血管壁中细胞凋亡的影响 正常组血管壁未检测到凋亡细胞;球囊损伤后 14 d,各手术组新生内膜区均出现明显的胞核呈棕黄色染

表 1 术后 2, 4 周各组大鼠颈总动脉新生内膜面积、内膜/中膜面积的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	术后 2 周			术后 4 周		
		IA/mm ²	MA/mm ²	I/M	IA/mm ²	MA/mm ²	I/M
正常	-	0	0	0	0	0	0
模型	-	0.33 ± 0.05	0.22 ± 0.06	1.49 ± 0.24	0.45 ± 0.05	0.23 ± 0.03	1.95 ± 0.31
淫羊藿苷	60	0.20 ± 0.02 ¹⁾	0.23 ± 0.04	0.87 ± 0.10 ¹⁾	0.26 ± 0.02 ¹⁾	0.25 ± 0.04	0.95 ± 0.11 ¹⁾
	120	0.19 ± 0.03 ¹⁾	0.22 ± 0.03	0.85 ± 0.12 ¹⁾	0.24 ± 0.03 ¹⁾	0.22 ± 0.03	1.08 ± 0.18 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

色的凋亡细胞,其中淫羊藿苷组较模型组细胞凋亡率显著增高($P < 0.01$),高、低剂量比较无显著性差异;至损伤后 28 d 时,各手术组新生内膜区凋亡细胞逐渐减少,用药组仍显著高于模型组($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组大鼠颈动脉新生内膜细胞凋亡率(均 \pm s, n=6) %

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	凋亡率	
		术后 14 d	术后 28 d
正常	-	0	0
模型	-	19.14 \pm 3.20	10.23 \pm 3.10
淫羊藿苷	60	25.62 \pm 2.67 ¹⁾	18.63 \pm 3.14 ¹⁾
	120	32.21 \pm 3.57 ¹⁾	20.14 \pm 2.36 ¹⁾

3 讨论

近年来研究认为血管内皮损伤后中膜平滑肌细胞(VSMC)的迁移、增生及细胞外基质的积聚是血管成形术后再狭窄(RS)的发生基础^[4]。同时有部分研究发现,在细胞增殖旺盛的新生内膜中亦有大量的细胞凋亡发生。Bauriedel 等在人类外周及冠状动脉粥样硬化和在狭窄病灶中观察到凋亡小体密度与内膜细胞数量呈负相关^[5-7];在动物实验中亦发现随内膜的增厚加重,细胞凋亡率呈下降趋势^[8],从而推测 VSMC 凋亡是调节内皮损伤所致内膜增厚的主要机制。因此认为细胞增殖和凋亡的动态平衡是维持细胞数稳定的主要因素,而在某些因素的作用下,这种平衡的丧失可能是 RS 发生的重要原因。动脉粥样硬化及 RS 病变中细胞凋亡的发生与调控机制尚未充分阐明。血管损伤后多种细胞活性因子及某些基因表达失调可能是 VSMC 增殖和凋亡的始动因素。因此如何抑制异常增殖、促进 VSMC 的凋亡和防止再狭窄的发生就成为心血管疾病研究的一个热点。

淫羊藿苷是从淫羊藿茎叶中提取的淫羊藿总黄酮中主要成分,传统医学认为淫羊藿具有补肾壮阳,祛风湿、强筋骨等功效,新近的研究表明其对心脑血管疾病有很高的应用价值。可通过促进 VSMC 凋亡而发挥抗动脉粥样硬化(AS)疗效^[9-10]。王伟^[11]等发现,淫羊藿苷可促进白介素-1 诱导增殖的 VSMC 凋亡,与葛根素合用,有明显的协同作用。沈晓君^[12]等在研究淫羊藿苷对同型半胱氨酸诱导的增殖 VSMC 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 基因表达的影响时,发现淫羊藿苷可通过上调内质网应激蛋白 GRP78 基因表达、放大内质网应激信号而启动细胞凋亡通路,诱导过度增殖的 VSMC 凋亡。根据本试

验通过在体血管形态测量分析,用药以后新生内膜面积减小,管腔增大,说明淫羊藿苷可以减轻大鼠颈动脉球囊损伤再狭窄模型中内膜增生的程度,进而减轻再狭窄程度。同时试验中发现淫羊藿苷干预后,血管新生内膜中平滑肌细胞凋亡率显著高于模型组,与新生内膜增生呈负相关,淫羊藿苷可能通过促进平滑肌细胞的凋亡,减轻新生内膜的增生。

[参考文献]

[1] Park S J, Shim W H, Ho D S, et al. Paclitaxel-elutingstent for the prevention of coronary restenosis[J]. N Engl J Med, 2003, 348: 1537.

[2] 叶丽卡,陈济民.淫羊藿的药理研究进展[J].中国中药杂志,2001,26(5):293.

[3] 吉瑞瑞,李付英,张雪静,等.淫羊藿苷对缺氧诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2005,25(6):525.

[4] Robert S, Schwatz N D. Pathophysiology of restenosis: Interaction of thrombosis hyperplasia and/or remodeling [J]. Am J Cardiol, 1998, 81(7A):14.

[5] Bauriedel G, Schluckebier S, Welsch U, et al. Incidence and localization of apoptosi bodies in human arteriosclerosis lesion[J]. Z Kardiol, 1996, 85(4):509.

[6] Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, et al. Apoptosis in restenosis versu stable-angina atherosclerosis: implications for pathogenesis of restenosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(3):1132.

[7] Durand E, Mallat Z, Addad F, et al. Time courses of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(18):1680.

[8] 王耿,何国祥,迟路湘,等.平滑肌细胞凋亡对血管球囊损伤后内增殖的影响[J].第三军医大学学报,2000,22(3):268.

[9] 于永红,胡昌兴,孟卫星.茵陈、赤芍、三棱、淫羊藿对家兔实验性动脉粥样硬化病灶的消退作用及原癌基因 C-myc、C-fos、V-sis 表达的影响[J].湖北民族学院学报:医学版,2001,18(2):4.

[10] 黄秀兰,周亚伟,王伟.淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展[J].中成药,2005,27(6):719.

[11] 王伟,张涛,赵明镜,等.5种中药黄酮对血管平滑肌细胞凋亡的交互作用[J].北京中医药大学学报,2000,23(4):18.

[12] 沈晓君,何航,淫羊藿苷对 HCY 诱导增殖血管平滑肌细胞葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 表达的影响[J].中国中药杂志,2009,34(15):8.

[责任编辑 何伟]