

化瘀通脉注射液对大鼠主动脉球囊损伤后内皮素-1、一氧化氮、黏附分子-1的影响

毛静远^{1*}, 张宇¹, 李谈¹, 李明², 王恒和¹, 王占武¹, 张玉辉², 庄婷怡², 张运¹
李红¹, 王强¹, 常延平¹, 张其梅¹, 吴慧轩¹

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 观察化瘀通脉注射液对大鼠主动脉球囊损伤后内皮素-1(ET-1)、一氧化氮(NO)、黏附分子-1(ICAM-1)的影响。方法: 大鼠96只, 随机分为3组: 化瘀通脉组、丹参组和生理盐水组。各组采用球囊内膜剥脱法复制大鼠主动脉内膜增殖动物模型, 每组自造模前1d开始, 分别静脉注射化瘀通脉注射液、丹参注射液和生理盐水, 于造模后第5、10、15、25d每组各随机选取8只大鼠取血, 检测各组血浆ET-1、NO、ICAM-1含量。结果: ET-1浓度在各组随时间的变化均有升高, 化瘀通脉组明显低于其余两组; 化瘀通脉组NO含量明显高于其余两组; 化瘀通脉组ICAM-1含量明显低于其余两组。结论: 化瘀通脉注射液具有降低血浆ET-1、ICAM-1及提高血浆NO水平的作用, 这可能是其抑制大鼠主动脉球囊损伤后内膜增殖的部分机制。

[关键词] 化瘀通脉注射液; 内膜增殖; 内皮素-1; 一氧化氮; 细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)04-0048-04

Effects of Huayutongmai Injection on Endothelin-1, Nitric Oxide, Intercellular Adhesion Molecule-1 of Rat Aorta after Balloon Injury

MAO Jing-yuan^{1*}, ZHANG Yu¹, LI Tan¹, LI Ming², WANG Heng-he¹, WANG Zhan-wu¹,
ZHANG Yu-hui², ZHUANG Ting-yi², ZHANG Yun¹, LI Hong¹, WANG Qiang¹,
CHANG Yan-ping¹, ZHANG Qi-mei¹, WU Hui-xuan¹

(1. The First Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *Huayutongmai* Injection on interrelated factors of rat aorta after balloon injury. **Methods:** Total 96 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: *Huayutongmai*, *Danshen* and normal saline ones, 32 rats in each. The rat model of intimal proliferation were copied by injuring aortic intima with self-made balloon. *Huayutongmai* Injection, *Danshen* Injection or normal saline was applied to the rats by intravenous routine from the day before operation to the day before samples taken. Eight rats in each group were randomly killed and blood samples were drawn at 5, 10, 15, 25 days after injury. The blood content of endothelin-1(ET-1), nitric oxide(NO), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) were determined. **Results:** Compared with other two groups, the ET-1 and ICAM-1 were decreased and NO was increased in *Huayutongmai* group significantly. **Conclusion:** *Huayutongmai* Injection has the function of inhibiting intimal proliferation of rat aorta after balloon injury. It could be related to lowering ET-1 and ICAM-1, and increasing NO in blood.

[收稿日期] 2006-09-01

[通讯作者] * 毛静远, (022) 27432325

[**Key words**] *Huayutongmai* Injeciton; intimal proliferation; endothelin-1; nitric oxide; intercellular adhesion molecule-1

经皮冠状动脉介入术 (Percutaneous Coronary Intervention, PCI) 是冠心病治疗的革命性进展^[1]。然而 PCI 术后仍有少数患者出现血管内再狭窄 (Restenosis, RS), 药物支架的应用大大降低了 RS 率, 但这一问题仍是影响远期效果的重要因素。内膜增殖在 RS 的发生中起着关键作用^[2], 其中内皮素-1 (ET-1)、一氧化氮 (NO)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)^[3~5] 是 RS 发生的重要因素。近年来, 中医药针对 RS 显示出其综合性防治的优势。本实验观察了化癥通脉注射液对大鼠主动脉内膜增殖过程中内皮素 (ET-1)、一氧化氮 (NO)、细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 的动态影响, 现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物 雄性 Wistar 大鼠 (中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 合格号 0049041) 96 只, 体重 (300~ 350) g。

1.2 药品与试剂 化癥通脉注射液 (天津中医药大学第一附属医院院内制剂, 由丹参、当归、川芎、鸡血藤按 1: 1: 1: 2 组成, 采用水煮梯度醇沉法制成, 为棕红色澄明液体, 规格为 50 mL/瓶, 内含生药 50 g, 其中丹参素不少于 0.02 mg/mL, 批准文号: 0605171); 丹参注射液 (正大青春宝药业有限公司, 10 mL/支, 国药准字: Z33020177); 4% 戊巴比妥钠溶液; 青霉素钠; 0.9% 生理盐水; 抑肽酶; 10% 福尔马林液; ET 放射免疫试剂盒 (解放军总医院科技开发中心放免所, 卫药准字 R-68 号); 50T NO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 2004106); 96T ICAM-1 试剂盒 (美国 Endogen 公司, 批号 20040418); 生理盐水 (中国大冢制药有限公司, 500 mL/袋, 国药准字: H12020010)。

1.3 仪器 BH6020 组合式放射免疫 γ 计数器 (北京仪器厂); 752 型紫外分光光度计 (上分仪器厂); 60 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 1575 型洗板机 (美国 Bio-Rad 公司)。真空采血管 (含 0.2 mL 2% EDTA)。

2 方法

2.1 内膜增殖模型复制 造模大鼠用 4% 戊巴比妥钠溶液, 按 0.1 mL/100 g 腹腔注射进行麻醉。动物麻醉后, 暴露并分离左颈总动脉, 结扎远心端, 近心端用动脉夹夹闭。在结扎区域靠近远心端剪一小口, 插入自制球囊导管, 待穿刺针全部送入后, 注入

生理盐水充盈球囊, 反复牵拉数次, 牵拉幅度约 1.5 cm~ 2 cm。抽出球囊内的生理盐水, 退出球囊导管, 结扎左颈总动脉, 伤口涂抹适量青霉素钠粉末, 缝合皮肤。

2.2 给药方案 各组均于造模前 1 d 开始经尾静脉给药, 直至标本留取前 1 d。化癥组予化癥通脉注射液 3 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 丹参组予丹参注射液 3 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 盐水组予生理盐水 3 mL·kg⁻¹·d⁻¹。

2.3 标本处理 于造模后的第 5, 10, 15, 25 d, 各组随机选取 8 只大鼠, 将大鼠麻醉后固定于手术台上, 于心尖搏动最明显处, 取 10 mL 一次性无菌注射器直接自左心室内取血 6 mL, 后分别置于 3 个含有 0.2 mL 2% EDTA 的真空采血管 (分别标注 ET-1、NO、ICAM-1) 中各 2 mL, 其中在标注 ET-1 的管中加入抑肽酶 40 μ L。将注入标本的真空采血管以 3 000 r/min (4 $^{\circ}$ C) 离心 10 min, 分离血清, 各注入分别标注 ET-1、NO、ICAM-1 的离心管中, 将待测 NO、ET-1 血清置于 - 20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存, 待测 ICAM-1 血浆置于 - 80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

2.4 检测方法 放射免疫法测 ET-1 浓度, 硝酸还原法测 NO 含量, 酶联免疫吸附法测定 ICAM-1 含量, 检测流程严格按说明书操作。

2.5 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间和组内不同时间点比较采用方差分析。

3 结果

3.1 化癥通脉注射液对大鼠主动脉球囊损伤后血浆 ET-1 水平的影响 见表 1。

表 1 各组 ET-1 浓度比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	5 d	10 d	15 d	25 d
盐水组	140.00 \pm 21.36	155.02 \pm 20.91	148.71 \pm 22.02	144.34 \pm 34.28
丹参组	136.35 \pm 28.96	139.42 \pm 26.84	161.54 \pm 26.79	176.31 \pm 31.29 ¹⁾
化癥组	99.857 \pm 14.20 ^{2, 4)}	128.57 \pm 15.03 ¹⁾	124.64 \pm 16.40 ³⁾	126.50 \pm 11.57 ⁴⁾

注: 组间比较, 与盐水组同时点比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与丹参组同时点比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01, 下同。

各组血浆 ET-1 浓度随时间延长均有不同程度升高。3 组间 ET-1 浓度在术后 5~ 10 d 呈盐水组 >

丹参组> 化癥组趋势, 15~ 25 d 呈丹参组> 盐水组> 化癥组趋势。化癥组术后各时间点 ET-1 浓度均低于其他两组。

3.2 化癥通脉注射液对大鼠主动脉球囊损伤后血浆 NO 水平的影响 见表 2。

表 2 各组 NO 浓度比较(μmol/L, $\bar{x} \pm s$, n= 8)

组别	5 d	10 d	15 d	25 d
盐水组	40.10 ± 9.12	40.86 ± 7.45	34.62 ± 13.34	31.33 ± 13.11
丹参组	33.83 ± 3.99	33.06 ± 6.47	36.96 ± 5.72	38.61 ± 15.29
化癥组	40.87 ± 10.56	37.75 ± 10.03	40.87 ± 13.36	57.27 ± 21.37 ^{2,3)}

各组血浆 NO 浓度在术后 5~ 10 d 时水平相当, 之后盐水组呈降低趋势, 25 d 时达本实验最低点; 丹参组呈弱升高趋势, 化癥组呈明显升高趋势, 25 d 时均达本实验最高点。15 d 后化癥组呈现出上升趋势, 25 d 时明显高于其它两组。

3.3 化癥通脉注射液对大鼠主动脉球囊损伤后血浆 ICAM-1 水平的影响 见有 3。

表 3 各组 ICAM-1 浓度比较(μg/L, $\bar{x} \pm s$, n= 8)

组别	5 d	10 d	15 d	25 d
盐水组	35.458 ± 7.137	29.395 ± 4.411	34.569 ± 11.306	47.214 ± 10.641
丹参组	29.394 ± 7.944	29.536 ± 29.536	32.278 ± 7.292	35.385 ± 5.381 ¹⁾
化癥组	27.323 ± 8.396	20.887 ± 7.953 ^{1,3)}	19.925 ± 8.441 ^{2,3)}	26.433 ± 11.772 ²⁾

术后随时间延长盐水组 ICAM-1 浓度呈升高趋势; 丹参组 ICAM-1 浓度呈缓慢增长趋势, 25 d 时明显低于盐水组; 化癥组 ICAM-1 浓度 5~ 25 d 间大致呈降低趋势, 25 d 时低于丹参组, 10~ 25 d 间显著低于盐水组。

4 讨论

PCI 术后 RS 的形成包括 3 个相对独立又相互联系的环节, 即血栓形成、内膜增生和血管重塑, 而其中内膜增殖占主导地位, 被认为是 RS 的重要病理机制²⁾。内膜增殖的发生和发展是一系列血管活性物质和细胞因子所介导的结果, 其中 ET-1³⁾ 和 ICAM-

1⁴⁾ 分泌增加及⁵⁾ 分泌减少是这一过程的重要环节。ET-1 是迄今为止人体内已知最强大的缩血管剂, 具有促细胞增殖和凋亡的生物学效应⁶⁾; ICAM-1 可增强白细胞与血管内皮间的粘附作用, 促进内膜增殖早期炎症的发生与发展⁷⁾。NO 具有强大的舒张血管作用, 能直接抑制血管平滑肌细胞增殖⁸⁾; NO 可抑制血小板黏附和血栓形成, 进而抑制多种血管生长因子的释放⁹⁾, 并可抑制 ICAM-1 的表达, 从而抑制 RS。本研究表明, 化癥通脉注射液可抑制 ET-1 分泌, 促进 NO 合成, 抑制 ICAM-1 表达, 其作用有优于丹参注射液趋势, 这可能是其发挥抑制内膜增殖作用的部分机制。

[参考文献]

- [1] 陈纪林. 药物洗脱支架在介入治疗中的最新进展和前景展望[J]. 中国循环杂志, 2003, 18(6): 403-404.
- [2] 周进科, 刘翠萍. 冠状动脉成形术后再狭窄机制及其对策研究[J]. 医学综述, 1996, 2(11): 591.
- [3] 秦玉明, 周爱卿, 贲晓明, 等. 主动脉球囊损伤大鼠血浆内皮素及胰岛素样生长因子-1 的动态改变[J]. 中国当代儿科杂志, 2000, 2(3): 162-165.
- [4] 姜开余, 顾震纶, 阮长耿. 丹参素对 CD11b、P-选择素、ICAM-1、VCAM-1 E-选择素表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(6): 682-685.
- [5] 贾国良, 吕安林, 王小燕, 等. 冠状动脉再狭窄的靶血管局部影响因素[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(2): 97-99.
- [6] Ruan yi GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology [J]. Pharmacol Rev, 1994, 46(3): 325-415.
- [7] 郭伟峰. 粘附分子在防治 PTCA 后再狭窄中的意义[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2002, 29(2): 94-97.
- [8] Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA. Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery [J]. Circ Res, 1990, 67: 61-67.
- [9] 李万冬, 马铃, 舒强, 等. 球囊导管损伤后早期动脉平滑肌细胞的增殖[J]. 中国医科大学学报, 2001, 30(6): 427-430.