

· 实验研究 ·

丹参防治实验性动脉再狭窄 及其机制的初步研究

周小明 陆再英 汪道文

内容提要 动脉再狭窄严重影响了经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)的远期疗效。为评价丹参用于防治再狭窄的可能性,本研究利用大鼠动脉再狭窄模型,观察了丹参对动脉去内皮后内膜增生的影响,并观察了丹参注射液对离体培养的兔动脉平滑肌细胞(SMC)增殖的影响。结果表明,丹参注射液在体外抑制培养的 SMC 增殖,在体内抑制动脉去内皮后的内膜增生,提示丹参有望成为防治再狭窄的有效药物。

关键词 丹参注射液 平滑肌细胞 再狭窄

Experimental Study of Salvia Miltiorrhiza on Prevention of Restenosis after Angioplasty ZHOU Xiao-ming, LU Zai-ying, WANG Dao-wen *Cardiology Department, Tong ji Hospital, Tong ji Medical University, Wuhan (430030)*

For evaluating the possibility of Salvia miltiorrhiza (SM) on the prevention of arterial restenosis after angioplasty, we investigated the effect of SM on the intimal thickening of air-injured carotid artery of rats. The results showed that the maximal intimal thickness of the injured arteries was much thinner in the treatment group than that in the control group, indicated that SM could prevent experimental restenosis in rat model. Furthermore, we examined the effect of SM on the proliferation of the isolated rabbit arterial smooth muscle cells (SMC) cultivated in vitro. The results showed that SM inhibited the ^3H -TdR take-up and proliferation of SMC in a dose-dependent manner. The study raised the possibility that SM could be used to prevent arterial restenosis after angioplasty.

Key words Salvia miltiorrhiza injection, smooth muscle cell, restenosis

经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)已成为治疗冠心病的一种重要手段^①。然而,约有 1/3 的手术成功者于术后 6 个月内出现冠脉再狭窄,严重影响了 PTCA 的远期疗效^②。迄今为止,尚无有效防治再狭窄的药物。本研究利用 Fishman 空气干燥法建立了大鼠的动脉损伤模型^③,观察了丹参注射液对动脉去内皮后内膜增生的影响,同时研究了丹参注射液对培养的兔动脉平滑肌细胞(SMC)增殖的影响,旨在探讨丹参用于防治再狭窄的可能性。

材料与方 法

1 动物及分组 月龄 4 个月左右、体重 250~300 g 的雄性 SD 大鼠 17 只,由同济医科大学

实验动物中心提供。将大鼠随机分为 2 组,对照组 10 只,丹参治疗组 7 只。治疗组从术前 2 日开始予 24 g/kg 体重的丹参注射液灌胃,用至术后 14 天。另取月龄 3 个月左右,体重 1.5 kg 左右的雄性大耳白兔 4 只(同济医科大学实验动物中心提供),在无菌条件下取出其胸主动脉用于动脉 SMC 培养。

2 主要试剂及仪器 丹参注射液每毫升含生药 1.5 g(常熟制药厂产品,批号 9208135,规格 2 ml/支),D₈₉₀₀培养基、M₁₉₉培养基、胎牛血清(FCS)、胰蛋白酶(均为 Gibco 产品),氚-胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR 购自上海原子能研究所),D-Hank's 液依方配制。JSM-J300 扫描电镜(JEOL 产品),SEM-IPS 图像分析系统(Kontron 产品),液体闪烁计数器(Beckman 产品)。

3 实验方法

同济医科大学附属同济医院心内科(武汉 430030)

3.1 丹参对大鼠颈动脉去内皮后内膜增生的影响 大鼠颈动脉去内皮动脉损伤模型的建立采用 Fishman 空气干燥法⁽³⁾。造模 12 h 后,在对照组中随机取 1 只动物麻醉,取其左、右两侧颈总动脉 1 cm 制作扫描电镜标本。在扫描电镜下放大 500 倍,并拍摄照片。术后 14 天,两组动物麻醉后,以生理盐水为灌洗液,采用经心灌注法生理压力(80 mmHg)全身灌注,流出液清亮后,换 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定 8 min,取两侧颈总动脉 1 cm 制作光镜切片,经弹力纤维染色(VG 法)⁽⁴⁾,在图像分析系统下测量动脉最大内膜、中膜厚度,分别求出治疗组与对照组的平均内膜、中膜厚度的均数及其标准差(未损伤侧动脉内膜厚度未测)。

3.2 丹参注射液对培养的兔胸主动脉 SMC 增殖的影响 兔胸主动脉 SMC 培养按赵三妹方法⁽⁵⁾,第 3~4 代细胞用于实验。将细胞用含 0.1%胰蛋白酶的 D-Hank's 液消化后(后同),用含 10%FCS 的 M₁₉₉ 培养液终止消化(后同),并用该培养液将细胞稀释成 7×10^4 个细胞/ml,种植于培养板中(1 ml/孔),置 5%CO₂ 培养箱培养 16 h 细胞附壁后,每孔分别加入丹参注射液 0.1 mg/ml、0.5 mg/ml、2.5 mg/ml 及 M₁₉₉ 培养液(对照组),各浓度组 3 孔,置培养箱继续培养 24 h、48 h、72 h 后,分别消化、计数,各孔计数 3 次,求出对照组及各浓度组的均数及其标准差。如上法细胞附壁培养 16 h 后,吸去培养液,用 D-Hank's 液清洗两次,换为无血清的 D₉₉₀₀ 培养液,同步化培养 24 h 后,吸去 D₉₉₀₀ 培养液,换为 10% FCS 的 M₁₉₉ 培养液,并加入上述浓度的药物及 M₁₉₉ 培养液(对照组, n=6),培养 18 h 后,各孔加入 ³H-TdR 0.5 μ ci,继续培养 6 h,以使 ³H-TdR 随细胞分裂而掺入新合成的 DNA 中,然后吸去培养液,用 D-Hank's 液清洗 2 次,加入 0.1 N NaOH 溶解细

胞,收集样本,用液体闪烁记数法测定放射性强度 cpm 值,求出各浓度组及对照组平均的 cpm 值及其标准差。

4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示,两均数比较采用 t 检验,组间比较采用方差分析及 q 检验。

结 果

1 术后 12 h 扫描电镜显示 未损伤侧血管内皮细胞完整,部分细胞核突向管腔,使管腔表面凹凸不平,管腔表面无血小板附着。损伤侧血管内皮细胞脱落,大量血小板附着。所见结果与 Fishman 观察结果一致⁽³⁾。

2 术后 14 天血管最大内膜、中膜厚度所测结果两组未损伤侧血管内皮细胞紧贴血管中膜内弹力层,内膜厚度无法测量、对照组损伤侧血管内膜显著增厚,其中膜亦增厚。丹参治疗组损伤侧血管内膜厚度、中膜厚度减轻,与对照组比较有显著性差异。结果见表 1。

3 丹参注射液对 SMC 增殖及 ³H-TdR 摄取的影响 各丹参注射液处理组与对照组相比,细胞数及 cpm 值均有显著性差异,且呈剂量依赖性。结果见表 2。

表 1 丹参治疗组与对照组动脉最大内膜、中膜厚度的比较 (μ m, $\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	ITmax		MTmax	
		未损伤侧	损伤侧	未损伤侧	损伤侧
对照	9	—	80.17 $\pm$ 23.49	36.05 $\pm$ 3.27	43.02 $\pm$ 5.61 Δ
丹参	7	—	15.22 $\pm$ 2.19**	36.22 $\pm$ 2.05	36.30 $\pm$ 3.79*

注:与对照组损伤侧比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与自身未损伤侧比较, $\Delta P < 0.05$;—为未测;ITmax 代表最大内膜厚度;MTmax 代表最大中膜厚度

表 2 丹参注射液对 SMC 增殖及 ³H-TdR 摄取的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	细胞计数 $\times 10^4$			cpm
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	
对照	6	7.93 $\pm$ 0.15	12.67 $\pm$ 1.53	25.00 $\pm$ 2.00	2301.75 $\pm$ 99.60
丹参 0.1 mg/ml	3	4.87 $\pm$ 0.15*	8.37 $\pm$ 0.13**	8.97 $\pm$ 0.25**	1702.00 $\pm$ 126.79**
0.5 mg/ml	3	3.53 $\pm$ 0.15*	7.03 $\pm$ 0.21**	8.03 $\pm$ 0.25**	1131.00 $\pm$ 48.15**
2.5 mg/ml	3	2.53 $\pm$ 0.21**	4.12 $\pm$ 0.17**	6.60 $\pm$ 0.36**	1020.50 $\pm$ 120.85**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

1 Fishman 空气干燥法动脉损伤模型⁽³⁾是以空气干燥法去动脉内皮,首先由 Fishman 创立并进行了系统的评价。该法只造成轻度中膜损伤,血流再通

12 h 后,干燥段动脉内皮完全脱落,随后血小板粘附,新生内皮生长。损伤后 2 周,内膜显著增厚,主要由 SMC、纤维和基质组成。本实验所得结果与上述观察结果基本一致。该法简便易行,先后由多人进行改进^(6,7),是一种公认的再狭窄制模方法⁽⁸⁾。

2 丹参抑制动脉损伤后内膜增生的机制探讨 PTCA 后再狭窄的形成机制尚未完全阐明。目前认为,内皮细胞的损伤及剥脱,血小板的粘附、聚集,多种促裂素的释放,作用于血管中膜 SMC,促其向内膜移行和过度增殖,导致内膜增厚是再狭窄形成的主要机制⁽⁹⁾。因此,再狭窄的形成是由多因素参与的复杂的生物学过程。多年来,国内外都进行了大量的临床和基础研究,旨在发现有效防治再狭窄的药物。但众多的试验药物可能都因作用机制单一,只能作用于再狭窄形成的某一个环节,先后被临床试验所否定。

中医学认为,丹参具有活血化瘀功效。多年来的研究证明,丹参具有抑制血小板、抗凝、钙拮抗⁽¹⁰⁾、抑制成纤维细胞增殖和分泌基质等⁽¹¹⁾多种药理作用,涉及再狭窄形成的多个环节,因此,它可能具有潜在的预防再狭窄作用。据此,本研究利用大鼠的动脉损伤模型,观察了丹参对大鼠颈动脉去内皮后内膜增厚的影响,结果证实丹参抑制内膜增厚,从而证实了上述的推测。于在体实验的基础上,我们进一步观察了丹参注射液对离体培养的 SMC 增殖的影响,以对丹参作用机制进行探讨。结果表明,丹参注射液呈剂量依赖性地抑制 SMC 对³H-TdR 的摄取,减少 DNA 合成,抑制 SMC 增殖。这可能是丹参抑制内膜增厚的部分机制。丹参的钙拮抗作用可影响血小板聚集、释放以及 SMC 的移行和增殖等生物过程⁽¹²⁾,从而抑制这些因素在再狭窄形成中所起的作用。另外,丹参的抗血小板、抗凝作用也可能是它降低内膜增生程度的部分机制。

总之,本研究结果表明,丹参注射液呈剂量依赖性地抑制培养的动脉 SMC 增殖,在体内抑制动脉去内皮后的内膜增厚,提示丹参有望成为预防 PTCA 后再狭窄的有效药物。

参 考 文 献

1. Gruentzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoper-

ative dilation of coronary artery stenosis: Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl Med* 1979; 301: 61—68.

2. Holmes DR Jr, Vliestra RE, Smith HC, et al. Restenosis after percutaneous transluminal angioplasty (PTCA): A report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol* 1984; 53(Suppl): 77c—81c.

3. Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest* 1975; 32: 339—351.

4. 杜卓民. 实用组织学技术. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 100—101.

5. 赵三妹, 夏人仪, 王宗立, 等. 动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用. *中华病理学杂志* 1987; 16: 260—261.

6. Ohnishi H, Yamaguchi K, Shimada S, et al. An evidence for "response to injury" hypothesis. *Life Sci* 1982; 31: 2595—2602.

7. Lundergan C, Foegh ML, Vargas R, et al. Inhibition of myointimal proliferation of the rat carotid artery by the peptide, angiopeptin and BIM 23034. *Atherosclerosis* 1989; 80: 49—55.

8. Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1991; 19: 418—432.

9. Liu MW, Roubin GS, King SB. Restenosis after coronary angioplasty: Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989; 79: 1374—1387.

10. 孟振行, 吴淑敏, 孙仁俊, 等. 丹参防治动脉粥样硬化的机制. *心肺血管病杂志* 1993; 12: 121—123.

11. 陈学忠, 孙文勇, 叶望云, 等. 川芎嗪、丹参对体外培养成纤维细胞的作用. *中西医结合杂志* 1987; 7(9): 547—548.

12. 卢坤平, 赵升皓, 王道生. 钙和钙调素与血管平滑肌细胞增殖. *中国药理学与毒理学杂志* 1988; 2: 166—169.

(收稿: 1995—10—04 修回: 1996—04—10)

欢迎订阅本刊《1996 年基础理论研究特集》

为了扩大学术交流, 提高理论水平, 应广大读者的要求, 并经上级有关部门批准, 本刊《1996 年基础理论研究特集》将于 8 月份出版。本特集共收入论文近 140 篇, 附有英文摘要, 约 70 余万字。本特集选题广泛, 内容丰富, 学术水平较高, 科学性较强, 集中反映了我国中西医结合基础理论研究领域近 1~2 年的最新进展。每册定价 38.00 元(另加邮费 3.8 元)。订阅办法: 可直接向本社汇款订购。本社地址: 北京西苑中国中西医结合杂志社(邮编: 100091)。开户银行: 北京工商银行海淀区办事处, 中国中西医结合杂志社。帐号: 046098-24 务请写清收刊者详细地址、姓名及所在地邮政编码, 注明“购 1996 年特集”。