

· 博士之窗 ·

赤芍防止高脂喂养兔颈总动脉球囊损伤术后血管狭窄的实验研究

朱慧民 祝彼得

摘要 目的 观察赤芍提取物对高脂喂养兔颈总动脉球囊损伤术后血管狭窄有无防止作用。方法 采用 Clowes 方法建立兔颈总动脉球囊损伤模型,并给予赤芍提取物。免疫组化染色测定兔颈动脉新生内膜成分、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及巨噬细胞表达;血管特殊染色观察 I 型胶原增生;图像分析系统测定新生内膜面积。结果 赤芍提取物可减少 PCNA 阳性细胞数,抑制 I 型胶原增生,减轻新生内膜形成。结论 赤芍对高脂喂养所致动脉粥样硬化兔颈总动脉球囊损伤术后再狭窄血管有显著防治作用。

关键词 再狭窄 赤芍;内膜增生 增殖细胞核抗原 防治

Experimental Study on Preventive Effect of Radix Paeoniae Rubra to Restenosis after Carotid Balloon Injury in High Fat-diet Rabbits ZHU Hui-min, ZHU Bi-de *Chengdu University of TCM, Chengdu (610075)*

Objective To observe the preventive effect of Radix Paeoniae Rubra (RPR) to restenosis after carotid balloon injury in rabbits. **Methods** The rabbit model of carotid balloon injury was established adopting Clowes method, and treated with extract of RPR. Component of new genesic intima and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and macrophage was determined by immunochemical stain. The collagen of type I was detected by special staining for blood vessels and the area of new genesic intima was measured by image assay system. **Results** RPR could remarkably decreased the PCNA positive expression and inhibit the proliferation of collagen type I and reduce the generating of new intima. **Conclusion** RPR has significant preventive effect on the restenosis after carotid balloon injury in high fat-diet induced atherosclerotic rabbits.

Key words restenosis, Radix Paeoniae Rubra, proliferation of intima, proliferating cell nuclear antigen, prevention and treatment

球囊损伤术后再狭窄(restenosis, RS)形成的关键是血管中层平滑肌细胞(VSMC)增殖向内膜下移行致新生内膜形成,细胞外基质沉积于动脉壁加剧再狭窄形成^[1,2]。防止 RS 的关键是抑制平滑肌细胞增殖及胶原增生。在体条件下赤芍是否能抑制球囊损伤后的 VSMC 增殖,并抑制胶原的产生未见报道。本实验通过高脂喂养兔建立颈动脉球囊损伤术模型,观察赤芍提取物对术后血管平滑肌细胞增生迁移发生内膜增生及 I 型胶原沉积的干预作用。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 成年健康新西兰大白兔 38 只,3 月龄,体重 2.3~3.0kg,由第三军医大学实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK 渝 20020003)。

1.2 药物 赤芍购自重庆桐君阁药业公司,经鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根,产于河北隆化县。赤芍提取物每毫升含生药 1g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所药局制剂。

1.3 试剂 胆固醇(日本进口);增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、抗 α -sm-actin 抗体、SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);抗 RAM-11 抗体(DAKO 公司);Prod(BDH 公司);Sirius rose BB(Fluka 公司);其他试剂均为进口或国产分

基金项目 四川省中医管理局专项资助项目(No. 200255)

作者单位 成都中医药大学(成都 610075)

通讯作者:朱慧民,博士,现在浙江省台州市中心医院(浙江 318000) ;Tel 0571-8571687 ;E-mail atbao@sina.com

万方数据

析纯。

2 方法

2.1 饲料配制 高脂饲料:基础饲料配方加入 2%胆固醇及 5%猪油。给药组:赤芍提取物加入高脂饲料,赤芍提取物高剂量(赤芍高剂量)组:75mL(含生药 75g)加入 1kg 饲料中;赤芍提取物低剂量(赤芍低剂量)组:25mL(含生药 25g)加入 1kg 饲料中。

2.2 实验分组 新西兰大白兔随机分成对照组(8 只)、胆固醇组(10 只)、赤芍高剂量组(10 只)、赤芍低剂量组(10 只);除对照组给予普通饲料外,其余 3 组均给予高脂饲料喂养 8 周。

2.3 模型建立 参照 Clowes^[3]方法加以改良。4 组兔 8 周后麻醉,颈前正中切口,游离颈总动脉长约 6cm,切开动脉插入球囊导管(2.0mm×20mm)约 5cm,向球囊内注入生理盐水使球囊扩张,牵拉并旋转导管,回抽生理盐水后重新注入导管,并牵拉旋转导管,重复上述过程共 3 次。拔出球囊导管,封闭切口,术后继续喂养。于 10 周末 A 组动物静脉取血后行血管取材,取颈总动脉损伤段血管,迅速浸泡于 4%多聚甲醛液中固定,行石蜡切片。

3 检测指标

3.1 血脂 10 周末取兔耳静脉血,分别按药盒说明书测定血清总胆固醇(TCH)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、载脂蛋白-B(Apo-B)水平。

3.2 病理学变化 切片作显示弹力纤维及胶原纤维的特殊血管染色,使用图像分析仪(Motic image advance 3.0 测定:颈动脉腔横截面积(LA)、内弹力层围绕面积(IELA)、外弹力层围绕面积(EELA)。计算:内膜增生面积=IELA-LA、中膜面积=EELA-IELA、内膜增生面积与中层面积比。切片作天狼猩红染色,偏光显微镜下观察胶原类型及分布,使用图像分

析仪测定 I 型胶原在其中的比例。

3.3 免疫组化染色分析 切片脱蜡入水,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,经抗原修复后加二抗同种动物正常血清封闭,依次加入一抗(抗 PCNA、 α -sm-actin、RAM-11 抗体)、生物素化二抗及链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物, DAB 显色,苏木素复染。胞浆内见棕黄色颗粒为 α -sm-actin、RAM-11 阳性,PCNA 以胞核黄染为阳性。细胞增殖指数:每个目标血管各取 2 张切片,通过图像分析仪,在高倍视野(×40 物镜)下统计阳性细胞的数目和总的细胞数目。计算每张切片 5 个高倍视野阳性细胞比率。

4 统计学方法 采用 Student's *t* 检验。

结 果

1 各组血脂水平比较 见表 1。与对照组比较,胆固醇组血脂水平明显改变,TCH 与 LDL 升高($P<0.01$);与胆固醇组比较,两赤芍组 TCH 与 LDL 显著性降低($P<0.01$)。

2 各组术后形态学比较 见表 2。球囊损伤各组血管内皮均有增生;与胆固醇组比较,两赤芍组内膜增生面积减少($P<0.01$),增生内膜面积/中膜面积比明显减少($P<0.01$, $P<0.05$)。

3 PCNA 免疫组化结果 见表 3。与胆固醇组比较,两赤芍组血管壁 3 层 PCNA 阳性细胞数均明显减少($P<0.01$)。

4 增生内膜成分 术后各组增生内膜成分主要为平滑肌细胞。巨噬细胞主要分布在外膜。与胆固醇组比较,两赤芍组外膜增生巨噬细胞成分减少。

5 胶原类型及分布 胆固醇组血管外膜胶原分布较为密集,主要以 I 型为主。与胆固醇组比较,两赤芍组外膜胶原分布稍稀疏,I 型及 III 型胶原均有分布。

表 1 各组血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TCH	TG	HDL	LDL	Apo-B
对照	8	4.75±2.07	1.09±0.57	0.29±0.35	1.87±2.78	1.62±1.09
胆固醇	7	40.01±2.60*	3.71±0.56	2.78±0.61	39.43±3.42*	0.15±0.05
赤芍高剂量	6	15.37±1.46 [△]	2.50±1.05	1.06±1.03	25.80±9.73 [△]	0.15±0.05
赤芍低剂量	8	21.50±2.39 [△]	2.69±2.19	0.80±1.38	19.88±6.25 [△]	0.20±0.06

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与胆固醇组比较,[△] $P<0.01$

表 2 球囊损伤术后各层面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	内膜增生面积 (mm ²)	中膜面积 (mm ²)	增生内膜面积/中膜面积 (%)
胆固醇	10	0.07±0.01	0.33±0.02	0.17±0.09
赤芍高剂量	10	0.04±0.01**	0.34±0.03	0.12±0.02**
赤芍低剂量	10	0.05±0.01**	0.34±0.03	0.15±0.03*

注:与胆固醇组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 3 各组阳性细胞率比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	内膜	中膜	外膜
胆固醇	10	71.00±5.21	84.33±3.14	51.50±3.45
赤芍高剂量	10	30.00±6.29*	43.33±4.13*	17.67±6.59*
赤芍低剂量	10	31.50±6.35*	44.50±9.23*	21.33±8.59*

注:与胆固醇组比较,* $P<0.01$

讨 论

实验采用造模方法是高脂喂养 8 周造成动脉粥样硬化病变后行球囊损伤术,这更切合行 PTCA 者多有动脉粥样硬化病变这一临床实际,且据大量研究表明,高脂血症与球囊损伤可协同刺激内膜增殖^[4]。

实验观察到高脂喂养兔颈总动脉内皮损伤后新生内膜形成,增生内膜细胞排列紧密,与内弹力层紧贴并与血管长轴垂直。免疫组化证实内膜增殖成分主要为血管平滑肌细胞。高脂喂养 8 周后在胆固醇组未作球囊损伤侧血管局部少许新生内膜形成,但其程度较内皮损伤侧轻,表明球囊损伤术后内膜增殖的原因主要是由球囊对内皮完整性的损伤导致,而高血脂可能在此过程中起加剧作用。

赤芍组反映内膜增殖程度的新生内膜面积与中膜面积比值有所降低。反映细胞增殖活性的重要生物学指标 PCNA 的阳性细胞数在内膜、中膜及外膜均明显减少,表明赤芍抑制在体条件下球囊损伤术后早期血管平滑肌细胞增殖,从而抑制新生内膜形成。

球囊损伤及高胆固醇血症均可加剧球囊损伤后的巨噬细胞浸润,进而加剧内皮功能不良及内膜增殖反应程度^[5]。我们观察到,球囊损伤后外膜中有大量单核巨噬细胞阳性着色,赤芍组阳性着色减少,故推测赤芍的抗再狭窄作用与其抑制巨噬细胞浸润有关。

动脉壁上细胞外基质大量合成、沉积和纤维化,加剧了再狭窄的发生和发展,其产生涉及内皮细胞、炎症细胞和平滑肌细胞之间的复杂关系。有研究显示血管损伤后平滑肌细胞、受损内皮细胞、炎症细胞和血小板均可产生转化生长因子- β (TGF),促使平滑肌细胞合成胶原蛋白和基质,成形术后细胞外基质成分的合成与分泌到第 4 周仍然显著增加,至第 12 周才逐渐降至

对照组水平^[6-7];在冠状动脉损伤后外膜及新生内膜可有大量 I 型胶原分布^[8]。本实验采用血管特殊染色方法观察到,球囊损伤后血管壁 I 型胶原纤维增生明显,赤芍组 I 型胶原增生较胆固醇脂组减少,提示赤芍对防止球囊损伤术后血管壁胶原沉积具一定作用。

参 考 文 献

- 1 Libby P, Tanaka H. The molecular bases of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 40(2):97.
- 2 Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 40(2):129.
- 3 Clowes AW, Reidy MA, Clows MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. smooth muscle cell growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49:327.
- 4 Stevens SL, Hilgarth K, Ryan US, et al. The synergistic effect of hypercholesterolemia and mechanical injury on intimal hyperplasia. *Ann Vasc Surg* 1992; 1(1):55—61.
- 5 Furukawa Y, Mastsumori A, Ohashi N, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 1999; 84:306—314.
- 6 Stauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, et al. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* 1994; 75(4):650—658.
- 7 Rekhter MD, O'Brien E, Shah N, et al. The importance of thrombus organization and stellate cell phenotype in collagen gene expression in human, coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *Cardiovasc Res* 1996; 33(3):496—502.
- 8 Shi Y, O'Brien JE Jr, Ala-Kokko L, et al. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* 1997; 95:997—1006.

(收稿 2002-12-26 修回 2004-04-02)

中国中医研究院第 12 期西医学习中医班招生

受国家中医药管理局委托,中国中医研究院第 12 期西医学习中医班(西苑医院班)近日开始招生(2004 年 9 月开学,学制两年)。该院系国家科研、医疗、教学基地,每年招收研究生、进修生、本科实习生等国内外各类学员几百名。该班系统讲授 15 门中医课程,在本院进行临床实习,培养从事中医、中西医结合工作骨干人才。课程考试和毕业实习合格者颁发中国中医研究院西医学习中医班毕业证书。凡西医院校毕业的医务人员均可报名参加。欲报名者请向西苑医院教育处函索招生简章。通讯处:北京市海淀区中国中医研究院西苑医院教育处,邮政编码:100091。电话:(010)62887973 或 62875599-6008,联系人:薛庆山。网址:www.xy-hospital.com