

消栓口服液对球囊扩张损伤的兔主动脉壁的影响

吴伟康 谢全锦 侯灿 何勤 李松

(中山医科大学病理生理学教研室, 广州 510089)

Effects of Xiao Shuan Oral Preparations on Aortic Wall by Balloon Dilation Lesion in Rabbits

WU Wei-Kang, XIE Quan-Jin, HOU Can, HE Qin and LI Song

(Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China)

ABSTRACT

Aim Study in effect of Xiao Shuan Oral Preparations on aortic wall by aortic dilation lesion.

Methods 20 New Zealand rabbits were dealt with operation of aortic balloon dilation. Administration of Xiao Shuan Oral Preparations, 6 times every week, 2.5 ml/kg every time.

Results ① After operation, the value of intimal thickness and ^3H -TdR incorporation of smooth muscle cell was lower in administration group than in control group ($P < 0.05$). ② There is a significant suppressing effect on platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mRNA expression of aortic endothelium in administration group after operation ($P < 0.05$).

Conclusions Experiments have shown effects of Xiao Shuan oral Preparations on suppressing pathological proliferation and PDGF receptor mRNA expression, decreasing aortic restenosis after aortic balloon dilation lesion.

KEY WORDS Xiao Shuan oral preparation, Aortic balloon dilation, Platelet derived growth factor

摘要 **目的** 探讨消栓口服液在主动脉球囊扩张损伤后对血管壁细胞的影响。**方法** 新西兰雄性兔 20 只均施行主动脉球囊扩张术, 消栓口服液灌服 2.5 ml/kg, 每周 6 次。**结果** ① 术后主动脉内膜厚度和平滑

肌细胞的 ^3H -脱氧胸苷掺入率, 用药组明显低于对照组 ($P < 0.05$)。② 术后主动脉内皮血小板源生长因子受体 mRNA 表达的组间比较, 显示用药组有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论** 消栓口服液可抑制主动脉球囊扩张术后血管壁的病理增生和具有减轻术后主动脉再狭窄的作用。

关键词 消栓口服液; 主动脉球囊扩张术; 血小板源生长因子

消栓口服液是清代王清任的名方补阳还五汤的浓缩剂型, 其补气活血, 行瘀散滞的疗效近年在防治心血管疾病的临床和基础研究方面受到广泛的关注, 其疗效的机理研究也已经起步^[1]。张华等^[2]报道, 用补阳还五汤治疗冠心病时患者血清脂过氧化物 (lipid peroxide, LPO)、载脂蛋白 B100 水平及脂过氧化物/超氧化物歧化酶、载脂蛋白 B100/A1 的比值明显降低, 而血清超氧化物歧化酶和载脂蛋白 A1 水平明显升高。这表明补阳还五汤抗脂质过氧化和调节载脂蛋白代谢是重要的治疗机制。由于血管壁的病理变化与脂质过氧化和载脂蛋白代谢相关, 补阳还五汤治疗球囊损伤后的血管再狭窄的设想符合这些同类研究的结果。球囊扩张损伤后的再狭窄, 一般认为其机理是类似动脉粥样硬化的损伤应答反应, 呈现病理性的细胞增殖和分化。当前对此类再狭窄的研究主要涉及血管内皮细胞、血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、平滑肌细胞以及巨噬细胞等生物学因素, 并认为球囊导管对血管扩张损伤可能通过这些生物因子的作用而引起内膜增生、内膜平滑肌细胞的增殖和灶性积聚。考虑到这些基本因素, 如果要防治血管再狭窄的细胞病理增殖, 寻找一种方剂能调控上述

生物因素的作用,就可最大限度地减轻血管壁扩张性损伤或有效地防治此类损伤后的血管再狭窄。消栓口服液作为补阳还五汤的浓缩剂型代表,本文以此剂型通过对平滑肌细胞增殖动态和内皮细胞 PDGF 受体基因表达等途径,进一步阐明该方剂防治主动脉球囊扩张损伤、抑制血管壁内膜细胞增殖来减轻血管再狭窄的作用机理。

1 材料和方法

实验采用雄性新西兰兔 20 只,兔龄 8.4 ± 0.5 周,体重 2.19 ± 0.18 kg,由中山医科大学实验动物中心提供。随机分组,用药组(消栓口服液,哈尔滨制药三厂,黑卫药准字[1990]0085 号),剂量为 2.5 ml/kg,每周 6 次灌服;对照组以生理盐水灌服。

1.1 主动脉球囊扩张术

仿临床经皮腔内冠状动脉成形术,以 11.4 g/mm² 的液压扩张 4 次,每次 5 秒。术后 7 天、30 天分别取手术部位(离开股动脉约 5 cm 处的胸主动脉部位)作实验数据测定,并分别统计处理。

1.2 主动脉平滑肌细胞的培养及 ³H-TdR 掺入量测定

以 1×10^4 /L 接种浓度,分别测定服药组和对照组不同间隔,即手术前后 96 小时的分组培养后再测定 ³H-TdR 掺入值。

1.3 主动脉内皮血小板源生长因子受体 mRNA 测定

以原位引物标记法测定主动脉内皮 PDGF 受体 mRNA 的表达。主要步骤为:分别切取实验和对照组动脉片段,常规石蜡切片;切片经湿房 60℃ 保温 30 min,再脱腊复水,经 PBS 等预处理后转入甲酰胺变性液,由室温增至 65℃,保温 10 min,然后转入缺口平移缓冲液中(NT),保温 30 min,其中换液一次。转入反应液,42℃ 保温 90 min 以上,反应液包括 $2 \mu\text{g}$ 引物,5 nmol dATP 和 dGTP,0.5 nmol dTTP,0.5 nmol dCTP,0.78 nmol Dig-11-dUTP,0.25 u RNA 抑制剂 0.5 u AMV 逆转录酶。反应液仍采用 NT 作为缓冲液,反应液总体积 20 μl ,引物原位标记反应后以 NBT 和 X-phosphate 显色,信号强度以强(++),中(++),弱(+)三种非参数计量进行,组间进行秩和检验。

2 结果

2.1 主动脉球囊扩张术后血管内膜厚度变化

经测定对照组扩张手术处的血管内膜厚度($78 \pm 48 \mu\text{m}$)明显大于用药组($15 \pm 5 \mu\text{m}$),二组间有显著性差异($t=3.47$, $P<0.05$, Table 1),此说明药物有效地降低内膜厚度。另一方面,此也为下述平滑肌和内皮细胞的增殖因子测定,提供了基本实验依据。

Table 1. Effect of Xiao Shaun oral preparations on intimal thickness after balloon catheter dilation lesion.

Experiment	cases	days	drug	control	t_1	P_1
nodilated	7	30	14.7 ± 5.2	78 ± 48	3.47	<0.05
dilated	7	30	14.6 ± 4.8	22 ± 19	1.02	>0.05
t_2			0.07	2.87		
P_2			>0.05	<0.05		

Note: t_1, P_1 from drug and control group

t_2, P_2 from dilated and no dilated group

2.2 主动脉平滑肌细胞 ³H-TdR 掺入值的组间比较

主动脉球囊扩张术后,对照组血清培养的平滑肌细胞 ³H-TdR 掺入率($7\ 960 \pm 2\ 803$ cpm),显著高于用药组血清培养的结果($4\ 110 \pm 1\ 977$ cpm)($t=2.97$, $P<0.05$)。二组间的显著差异表明消栓口服液确切的降低平滑肌细胞的 DNA 合成速率,抑制该类细胞的增殖(Table 2)。

Table 2. Comparison of H-TdR incorporation in aortic smooth muscle cells between before and after balloon catheter dilation lesion(cpm).

Groups	n	before	after
Control	7	$6\ 130 \pm 3\ 340$	$7\ 960 \pm 2\ 803^b$
Drug	7	$5\ 647 \pm 3\ 640$	$4\ 110 \pm 1\ 977^a$

a: $t=0.84$, $P=0.43$; b: $t=2.97$, $P=0.02$; from comparison of 7 days before and after operation

2.3 主动脉球囊扩张术后主动脉内皮血小板源生长因子受体 mRNA 的组间比较

实验兔在球囊扩张术后随机分为用药组和对照组。各组切取扩张处血管标本,分别以引物

原位标记法测定主动脉内皮 PDGF 受体 mRNA 的动态变化(Table 3)。实验兔经球囊扩张术损伤血管后,引物原位标记测定的结果表明:内皮 PDGF 受体 mRNA 呈现明显的浓度变化。经测定,PDGF 受体 mRNA 表达的阳性信号最早可在球囊扩张术后 4~5 h 被检测,一般在损伤边缘较易检测此阳性信号,一周左右此阳性信号呈现峰值,其后信号强度逐渐减弱。曾

在术后 60 余天仍测得较弱的阳性信号。为了分析消栓口服液的作用,实验着重测定球囊扩张术后 7 天各组的 PDGF 受体的 mRNA 信号强度(Figure)。结果表明,药物组的阳性信号与对照组相比有明显差异($P < 0.05$),再一次证明消栓口服液对 PDGF 受体 mRNA 的表达有抑制作用。

Table 3. Comparison of PDGF receptor mRNA expression with Xiao Shuan oral preparations after 7 days by balloon catheter dilation lesion in Aortic endothelium

Signal intensity A	cases (%)		put in order D	mean order E	control order F=C E
	drug B	control C			
+	4(40)	1(10)	1~5	(1+5)/2=3	3
++	5(50)	4(40)	6~14	(6+14)/2=10	40
+++	1(10)	5(50)	15~20	(15+20)/2=17.5	87.5
total	10(100)	10(100)			130.5

$U = 2.07, P < 0.05$

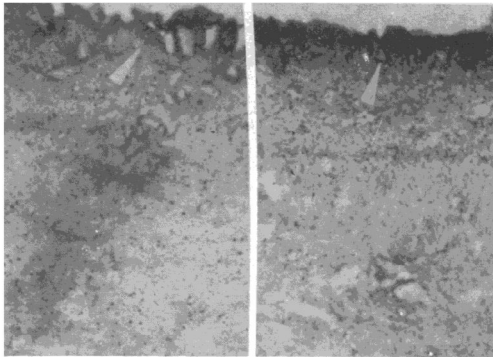


Figure. Effect of Xiao Shuan oral preparations on PDGF receptor mRNA expression of aortic endothelium after balloon catheter dilation lesion. Primer in Situ Labeling (PRINS), color development by NBT (Nitro-blue tetrazolium) and X-phosphate. Arrow indicates the degree of endothelial color development. Left: 7 Days administration after balloon catheter dilation lesion, PDGF receptor mRNA expression significantly decreased in aortic endothelium ($\times 400$). Right: In control group, PDGF receptor mRNA expression appeared strong positive reaction, 7 Days after balloon dilation lesion ($\times 400$).

3 讨论

本世纪七十年代 Ross 提出动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生机制的损伤反应学说,认为应该重视与 As 发生有密切相关的三种细胞或细胞产物,即血管内皮细胞、平滑肌细胞和血小板的研究^[3,4]。与 As 发生机制类似的主动脉球囊扩张损伤后的血管再狭窄,即可以从损伤反应的角度来探讨球囊扩张后的再狭窄机制。事实上,血管对损伤的反应,包括血小板沉着与附壁、血栓形成以及内皮细胞、平滑肌细胞的增殖等,都是在再狭窄发生中相互影响、不可分割的有机组成部分。近年由于分子生物学的突飞猛进,所谓损伤反应学说已有了崭新的内容,即球囊扩张损伤后的血管损伤可激发刺激细胞生长和分化的多肽及其相应的受体活性。尽管完全阐明这些多肽的调节机制还为时尚早,但已发现这些多肽在结构与功能方面类似一些逆转录原癌基因产物。其中较有代表性的即是血小板源生长因子,可专一的刺激间质细胞增殖和分化^[5~7]。本文和不久前国内李静等^[8]的研究报道,从不同方面证实血管受创后 PDGF 是血管壁病理反应的重要指标。我们观察到球囊扩张术后,兔主动脉内皮 PDGF 受体 mRNA 的表达增强,呈现典型的损伤反应。灌服消栓口服液后,主动脉内皮 PDGF 受体 mRNA 的表达明显地低于对照组,具有统计学差

异($P < 0.05$),也即服药组的血管损伤反应被抑制,包括血管内膜厚度减小、平滑肌细胞的 DNA 合成减缓。上述实验结果充分提示调节血管内皮 PDGF 受体的基因表达是消栓口服液临床疗效的重要分子机制。

参考文献

- 1 何薰延. 补阳还五汤治疗心脑血管病和疗效原理研究进展. 陕西中医, 1988, 9(8): 376~378.
 - 2 张华, 梁慕筠, 马志雄, 等. 补阳还五汤治疗冠心病的临床研究及其作用机制探讨. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4): 213~215.
 - 3 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis, an update. *N Engl J Med*, 1986, 314: 488~500.
 - 4 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362: 801~809.
 - 5 Linder V, Giachelli CM, Stephen M. A subpopulation of smooth muscle cells in injured rat arteries expresses platelet-derived growth factor-B chain mRNA. *Circ Res*, 1995, 76: 951~957.
 - 6 Linder V, Reidy MA. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression by large vessel endothelium in vivo. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1488~497.
 - 7 Sato N, Deitz JG, Kato J. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol*, 1993, 142: 1119~130.
 - 8 李静, 陈可冀, 张靖涛, 等. 血管通过实验性动脉粥样硬化家兔血管壁血小板衍生长因子 A、B 及 *c-myc* 基因表达的影响. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(1): 33~35.
- (1996-09-15 收到, 1996-12-02 修回)