

降钙素基因相关肽对大鼠主动脉内皮剥脱的保护作用

迪丽努尔·莎比托夫^① 王晓红 常英姿 张灵芝 姚兴海 唐朝枢

(北京医科大学心血管研究所, 北京 100083)

The Protective Role of Calcitonin Gene-Related Peptide on Balloon Denuded Injury of Rat Aorta

Di Li Nur, SHA BI TOU FU, WANG Xiao-Hong, CHANG Yin-Zi, ZHANG Lin-Zhi, YAO Xing-Hai and TANG Chao-Shu

(Institute of Cardiovascular Research, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT

Aim This work investigated the protective role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on balloon denuded injury of rat aorta.

Methods Perfusion of denuded arterial rings, determination of cGMP and endothelin (ET) with radioactive analysis

Results 2 weeks after denudation, the contents of plasma and aorta CGRP were increased. Exogenous CGRP (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iv) could significantly improve the relaxation of denuded aorta to acetyl choline, induce nitric oxide (NO) synthesis ($P < 0.01$), and inhibit the over proliferation of denuded intima ($P < 0.01$).

Conclusion Exogenous CGRP could prevent the restenosis of balloon denuded aorta through prompting the repairment of denuded endothelium, inhibiting the over proliferation of injured intima.

KEY WORDS Calcitonin gene-related peptide; Aorta endothelium denudation; Restenosis

摘要 为研究降钙素基因相关肽在防止动脉内膜损伤后平滑肌细胞增殖所致再狭窄中的作用机制,采用内皮剥脱、血管条灌流和放射免疫测定法测定了环磷一酸尿苷、降钙素基因相关肽和内皮素水平。结果发现,内皮剥脱后两周,血浆及主动脉组织降钙素基因相

关肽含量增加(前者对照组为 9.2 ± 1.7 , 去内皮组为 $14.1 \pm 2.0 \text{ ng/L}$; 后者对照组为 7.4 ± 1.4 , 去内皮组为 $12.2 \pm 2.0 \text{ ng/g}$)。应用外源性降钙素基因相关肽(25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)可明显改善损伤血管对乙酰胆碱的内皮依赖性舒张反应;促进去内皮血管壁一氧化氮的合成;增加主动脉组织内 cGMP 的含量(对照组 4.4 ± 0.5 , 去内皮组 2.0 ± 0.5 , 降钙素基因相关肽组 $3.3 \pm 0.5 \text{ ng/g}$; $P < 0.01$),减少内皮素的生成($P < 0.01$),抑制损伤部位的内膜过度增生($P < 0.01$)。提示外源性降钙素基因相关肽可通过促进内皮的修复、抑制内膜的过度增殖而防止剥脱血管的再狭窄。

关键词 降钙素基因相关肽; 主动脉内皮剥脱; 再狭窄

经皮冠状动脉腔内成形术是目前治疗冠心病的主要措施之一,但术后半年内 30%~50% 的病人发生再狭窄,其主要病理特征为血管内皮损伤和平滑肌细胞增殖。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是血管组织富含的扩血管活性肽。实验表明,它具有促进内皮细胞增殖和抑制平滑肌细胞增殖的作用^[1],降钙素基因相关肽对血管损伤修复的影响,目前尚未见报道。本实验在大鼠主动脉内皮球囊剥脱模型上观察血管组织降钙素基因相关肽含量的变化及其对损伤血管修复的影响,以探讨降钙素基因相关肽防治再狭窄的可能应用前景。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 大鼠由北京医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 降钙素基因相关肽和内皮素药盒,为美国 Phoenix Pharma Inc 产品。cGMP 放射免疫

测定药盒为上海中医药大学提供,去甲肾上腺素和乙酰胆碱为 Sigma 产品。余为市售分析纯产品。

1.1.3 主要仪器 UV-120-02 紫外分光光度计(日本),2107 液体闪烁计数仪(西安),电子分析天平(瑞士),TYPE3066PEN RECORDER(东京)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠主动脉内皮剥脱^[2,3] 体重 250~350 g 雄性 Wistar 大鼠,40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,经左侧颈总动脉插入自制 2F 球囊导管至腹主动脉,注入 0.1 ml 生理盐水扩张球囊,反复抽拉 3 次,剥脱主动脉内皮。

实验共分 4 组,剥脱早期组($n=5$)及晚期组($n=5$)分别于手术后第 3 和第 16 日处死动物取材测定。治疗组($n=5$)于手术后即刻从颈总动脉插管注入 25 $\mu\text{g/kg}$ CGRP 及术后第 3、5、7、10 和 13 天分别由尾静脉注射 CGRP(25 $\mu\text{g/kg}$),于术后 16 日处死动物取材测定。另取 5 只动物作为健康对照组,不进行手术操作。

1.2.2 降钙素基因相关肽的含量测定^[4,5] 取动物血浆及 25 mg 血管条制备匀浆,按药盒说明书测定 CGRP 的放射免疫活性。

1.2.3 主动脉血管反应性测定^[6] 取大鼠主动脉,剪成约 3 mm 长血管环,置于 37℃、95% O_2 -5% CO_2 的 Krebs-Henseleit(K-H)平衡液浴槽内,调节静止张力为 0.5 g,平衡和预激后,用 10^{-7} mol/L 去甲肾上腺素收缩血管达平台。分别加入不同浓度的 cGMP 或乙酰胆碱,经张力换能器在记录仪上记录其舒张血管反应。

1.2.4 血浆 NO_2^- 含量及血管组织 cGMP 含量测定

取大鼠血浆按 Freen 等^[7]方法测定 NO_2^- 含量,取约 25 mg 主动脉组织按药盒说明书用放射免疫法测定 cGMP 含量。

1.2.5 血浆内皮素测定和组织形态学检查 按药盒说明书进行血浆内皮素放射免疫测定^[8]。取主动脉组织,甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,在显微镜下观察血管形态变化,计算机进行图像分析(Sigma Scan 软件),计算内膜(intima, I)和中膜(media, M)面积的比率(I/M)。

1.2.6 统计学处理 实验结果以均值士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间显著性分析用 t 检验,两组以上用方差分析组间 q 检验。

2 结果

2.1 内皮剥脱术后降钙素基因相关肽含量

如表 1(Table 1)所示,术后 3 日血浆及血

管组织中 CGRP 的含量较对照组分别增加 63%($P<0.01$)和 89%($P<0.01$),持续到术后 16 日,分别较对照组高 53%($P<0.01$)和 65%($P<0.01$)。

2.2 内皮剥脱血管对降钙素基因相关肽的舒张反应

对照组主动脉血管对 CGRP 呈浓度依赖性的舒张反应,内皮剥脱早期(3 日)其反应明显减弱,浓度反应曲线明显右移; E_{max} 为 48.4 ± 11 , EC_{50} 为 6.3 ± 1.3 。术后 16 日(晚期组)对 CGRP 的反应接近对照组,结果见表 1(Table 1)和图 1(Figure 1)。

Table 1. The contents of CGRP in plasma and in arterial tissues after rat denuded aorta ($\bar{x} \pm s$).

Groups	plasma (ng/L)	arterial tissues (ng/g)	EC_{50} (10^{-8} mol/L)
Control	9.2 ± 1.7	7.4 ± 1.4	3.7 ± 1.7
Denuded(3d)	15.1 ± 2.0^c	14.0 ± 2.9^c	6.3 ± 1.1^c
Denuded(16d)	14.1 ± 2.0^c	12.2 ± 2.0^c	3.7 ± 1.1

$c: P<0.01$, compared with control group.

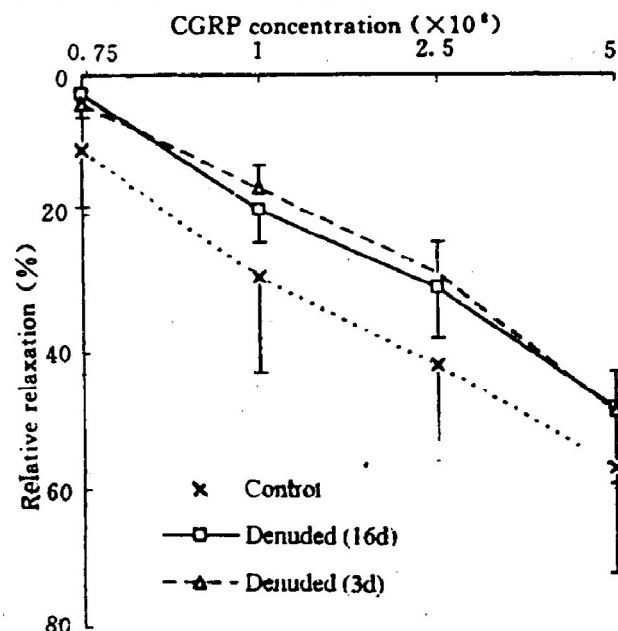


Figure 1. The relaxation of denuded aorta to CGRP.

2.3 降钙素基因相关肽对内皮剥脱的影响

如图 2(Figure 2)所示,剥脱 16 日的血管环对乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的舒张反应比对照组降低约 96%($P<0.01$), E_{max} 分别为 3.7 ± 2.2 和 86 ± 7 。CGRP 治疗组血管环对

ACh 舒张反应比未治疗的剥脱组(16 日)增强约 6 倍($P<0.01$), E_{\max} 分别为 26.8 ± 1.7 和 3.7 ± 2.1 。

如表 2(Table 2)所示, 内皮剥脱动物血浆 NO_2^- 含量较对照组显著减少, 血管 cGMP 含量降低, 血浆内皮素含量增加, 而且血管组织中膜

增厚, 内膜/中膜面积比值成倍增加。CGRP 治疗组其血浆 NO_2^- 和血管 cGMP 含量分别较剥脱组增加 42% 和 49% ($P<0.01$), 血浆内皮素值降低 30% ($P<0.01$), 内膜/中膜面积比值降低 80% ($P<0.01$)。上述观察值, 接近健康对照组水平。

Table 2. The protective role of CGRP on balloon denuded injuring of rat aorta ($\bar{x}\pm s$).

Groups	NO_2^- ($\mu\text{mol/L}$)	ET (ng/L)	cGMP (ng/g)	I/M
Control	6.1 ± 0.9	8.9 ± 2.9	4.4 ± 0.5	0.004 ± 0.007
Denuded	4.4 ± 1.0	13.1 ± 1.0	2.0 ± 0.5	0.369 ± 0.117
CGRP	6.6 ± 0.3^c	9.3 ± 1.2^c	3.3 ± 0.5^c	0.071 ± 0.022^c

CGRP: treated by calcitonin gene-related peptide (CGRP) after denudation. ET: endothelin. I/M: area ratio of intima and media. c: $P<0.01$, compared with denuded group.

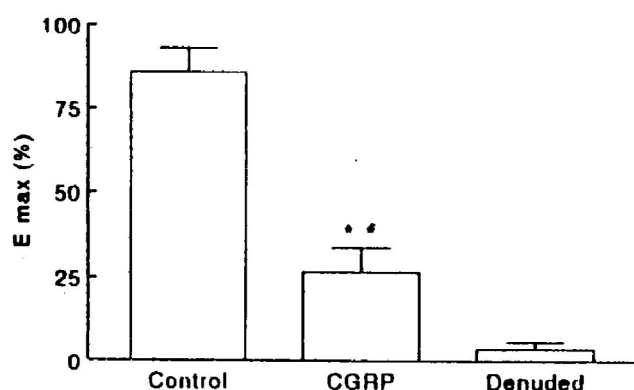


Figure 2. The maximum relaxation of rat denuded aorta to acetylcholine. ** $P<0.01$, compared with denuded group.

3 讨论

经皮冠状动脉腔内成形术后再狭窄的发病机理目前尚未明了, 其发病过程与内皮剥脱损伤后多种神经、体液和血管局部因子的调节紊乱有关^[9,10]。CGRP 是由支配血管的传入神经末梢分泌的活性多肽, 具有较强的扩张血管、抑制血小板聚集及内皮素生成、促进内皮修复及抑制平滑肌细胞增殖等多种生物学效应^[1,11,12], 是调节血管组织结构及功能的重要因子。本实验

观察到内皮剥脱术后血浆及血管壁组织中 CGRP 的含量显著增加并持续到术后 16 日, 仍较对照组高, 表明术后 2 周内内皮修复、新生内膜形成和 CGRP 含量增加均具有代偿性抗损伤意义。CGRP 舒张血管作用既可直接作用于血管平滑肌细胞上的受体, 增加 cGMP; 也可通过刺激内皮细胞产生一氧化氮 (nitric oxide, NO)^[13] 达到扩血管目的。本工作发现, 术后早期 (3 日) 血管对外源性 CGRP 扩血管反应显著降低, 以后逐渐恢复, 至 16 日接近对照组水平。

鉴于 CGRP 的生物学效应可能有益于损伤血管的修复, 我们应用外源性 CGRP 进行治疗, 发现 CGRP 可显著改善球囊拉伤血管的内皮依赖性舒张反应 (对 ACh 舒张反应), 减弱内皮源性舒张因子/一氧化氮系统的损伤, 表现为血浆 NO 终产物 NO_2^- 浓度升高, 血管 cGMP 含量增加。内皮素具有强烈的收缩血管、促进平滑肌细胞增殖作用。参考血管损伤后再狭窄的发病过程, CGRP 不仅有拮抗内皮素的生物学效应, 而且可抑制内皮素的合成和分泌^[16,17]。本实验用 CGRP 治疗结果提示 CGRP 能显著抑制内皮素的过量生成和新生内膜增厚。综合上述结果提示, 外源性 CGRP 增强体内代偿性抗损伤过程,

可能对经皮冠状动脉腔内成形术后再狭窄的发生具有一定的防治意义。

参考文献

- 1 姚兴海, 凌世长, 卫宏, 等. CGRP 对大鼠主动脉损伤后血管壁细胞增殖的影响. 中国药理学通报, 1994, 10(1): 21~23.
- 2 Clowes AM, Shwarta SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, 1985, 56: 139~145.
- 3 Daeman MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, et al. Angiotensin I induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*, 1991, 68: 450~456.
- 4 Etsu Suzuki, Yasunbu Hirata, Hiroaki Matsuoka, et al. Effect of atrial natriuretic peptide on endothelin-induced vasoconstriction and intracellular calcium mobilization. *J Hyperten*, 1991, 9(10): 927~934.
- 5 Xu D, Wang X, Wang TP, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, 1989, 10: 309~312.
- 6 Nielso KC, Owman C. Contratile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res*, 1971, 27: 33~42.
- 7 Green LG, Wangner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate nitrated [15CN]-nitrited in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, 126: 131~138.
- 8 石湘芸, 姚松涛, 杨晔(主编). 血管活性物质与临床. 北京: 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1993; 56~58.
- 9 Casscells W. Migration of smooth muscular and endothelial cell-critical events in restenosis. *Circulation*, 1992, 86: 723~729.
- 10 Lyons RM, Centry LE, Purchino AF, et al. Mechanism of activation of latent recombination transforming growth factor β by plasmin. *J Cell Biol*, 1990, 110: 1361~1367.
- 11 Grace GC, Dusting GJ, Kemp BE, et al. Endothelium and the vasodilator action of rat calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Br J Pharmac*, 1987, 91: 729~733.
- 12 Defandis FV. Coronary atherosclerosis: current therapeutic approaches and future trends. *Life Sci*, 1991, 49: 689~705.
- 13 韩启德, 王宪. CGRP 引起大鼠尾动脉舒张并使 cAMP 含量增加. 生理科学, 1989, 99: 28.
- 14 Masaaki K, Teruyuki Y, Norio T. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) relaxes porcine coronary arteries via cyclic AMP-dependent mechanisms but not activation of ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmac Exp Therap*, 1993, 265(1): 490.
- 15 谭敦勇, 张继峰, 牛大地, 等. 降钙素基因相关肽拮抗内皮素生物学效应的研究. 中国病理生理杂志, 1993, 9(5): 653~657.
- 16 谭敦勇, 张继峰, 赵东, 等. CGRP 对内皮素释放影响. 中国病理生理杂志, 1994, 10(5): 545.

(1997-04-07 收到, 1997-06-04 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅱ)

三磷酸脱氧胞苷	deoxycytidine triphosphate, dCTP
三磷酸脱氧胸苷	deoxythymidine triphosphate, dTTP
三磷酸吡啶核苷酸	triphosphopyridine nucleotide, TPN
辅酶 I	coenzyme I
还原型三磷酸吡啶核苷酸	reduced triphosphopyridine nucleotide, TPNH
主动脉收缩压	aortic systolic pressure, ASP
主动脉舒张压	aortic diastolic pressure, ADP
主动脉内径	aortic dimension, AD
主动脉后壁	aortic posterior wall, APW
主动脉前壁	aortic anterior wall, AAW
主动脉狭窄	aortic stenosis AS
主动脉硬化	aortiosclerosis, AS