

[文章编号] 1007-3949(2002)11-01-0041-03

• 实验研究 •

舒心益脉煎对气滞血瘀型大鼠动脉内膜损伤后 细胞凋亡及基因蛋白产物的影响

杨丁友, 朱庆磊, 吴兴利, 段学忠¹

(解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853; 1. 济南军区总医院中医科, 山东省济南市 250013)

[关键词] 病理生理学; 中药对大鼠动脉内膜增生的抑制作用; 免疫组织化学检测法; 舒心益脉煎; 血管内膜; 细胞凋亡; 大鼠

[摘要] 探讨气滞血瘀型大鼠胸主动脉内膜剥脱后内膜增生中, 舒心益脉煎对血管平滑肌细胞凋亡及相关基因 Fas 抗原和 Fas 配体的影响。将 58 只大鼠随机分为假手术组 10 只, 舒心益脉煎组和对照组各 24 只。后两组大鼠行胸主动脉内膜剥脱术, 舒心益脉煎组动物于术前 7 d 至术后 14 d 每日接受舒心益脉煎治疗。术后 14 d 处死动物, 用免疫组织化学法测定 Fas 抗原与 Fas 配体在血管中的表达, 原位末端标记法测定凋亡细胞。术后 14 d 血管新生内膜中有平滑肌细胞凋亡; 舒心益脉煎显著增加新生内膜中 Fas 抗原与 Fas 配体的表达, 增加血管平滑肌细胞凋亡, 减少新生内膜面积。说明舒心益脉煎可能通过 Fas 系统调节动脉血管内皮损伤修复过程中血管平滑肌细胞凋亡, 从而抑制新生内膜形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Shuxin Yimai Jian on the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells and Gene-protein Products after Injury of Thoracic Aorta Intima in Rats with Stagnancy of Qi and Blood Stasis

YANG Ding-You, ZHU Qing-Lei, WU Xing-Li, and DUAN Xue-Zhong¹

(Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 1. Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital of Jinan Military District, Jinan, Shandong 250013)

[KEY WORDS] Shuxin Yimai Jian; Tunica Intima; Apoptosis; Rats; Vascular Smooth Muscle Cell; Gene Protein

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Shuxin Yimai Jian (SXYMJ) on the apoptosis and the related gene Fas antigen and Fas ligand (FasL) of vascular balloon injury in thoracic aorta in rats with stagnancy of qi and blood stasis. **Methods** Fifty-eight rats were randomly divided into the sham group ($n=10$), SXYMJ group ($n=24$) and the control group ($n=24$). The thoracic aorta endothelium was denudated in the SXYMJ and control groups. SXYMJ was given from 7 days before operation to 14 days after operation in the SXYMJ group. Fas and FasL were detected by immunohistochemistry and the apoptotic cells were stained in situ by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling. **Results** Apoptotic cells could be detected in the smooth muscle cell (SMC) at the 14th day after operation. The expression of Fas and FasL in the neointima was increased by SXYMJ. The apoptosis of SMC was enhanced by SXYMJ, while the neointima area was attenuated. **Conclusion** SXYMJ probably regulates the apoptosis of SMC through Fas system and then inhibits the neointima hyperplasia.

我们运用理气活血法自拟舒心益脉煎 (shuxin yimai jian, SXYMJ), 采用气滞血瘀型大鼠胸主动脉球囊损伤模型, 对内膜增生过程中细胞凋亡及相关基因蛋白 Fas 抗原、Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 进行定量测定, 旨在探讨 SXYMJ 对气滞血瘀型大鼠动脉内膜损伤后再狭窄的防治机制。

[收稿日期] 2002-05-31

[修回日期] 2002-10-25

[作者简介] 杨丁友, 男, 1958 年出生, 山东省莘县人, 博士后, 副主任医师, 研究方向为中西医结合心血管内科。朱庆磊, 男, 1972 年生, 山东泗水县人, 博士, 助理研究员, 研究方向为心血管药理; E-mail: qlzhu@yahoo.com。吴兴利, 男, 1960 年出生, 山东平阴县人, 博士, 副主任医师, 研究方向为心血管内科。

1 材料与方法

1.1 动物分组、模型制备及给药方法

实验动物用 Wistar 大鼠 58 只, 均为雄性, 体重 480 ± 28 g, 由山东医科大学动物实验室提供。随机分为: 假手术组 10 只, 对照组和 SXYMJ 组各 24 只。肝郁气滞模型参考乔明琦大鼠肝气郁模型制作方法进行复制^[1], 即定时激惹 1 周。肝气郁模型制作成功后, 参考 Clowes 等^[2]的方法。所有大鼠以 5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 由颈部切开皮肤, 分离左颈总动脉。对照组和 SXYMJ 组大鼠从左颈总动脉插入自制 2F 球囊导管, 沿胸主动脉至膈肌水平, 向导管囊

内注入生理盐水约 0.1 mL, 使其充盈至回拉时有轻度阻力, 反复牵拉导管 4 次, 抽出生理盐水, 拔出球囊导管, 结扎左颈总动脉, 缝合创口, 常规饲养。假手术组不插入球囊导管, 其余步骤同上。

舒心益脉煎(SXYMJ) 组成: 香附 12 g, 玫瑰花 12 g, 前胡 12 g, 川芎 12 g, 丹参 15 g, 元胡 12 g。上述药物购自山东医药集团公司, 分别水煎 2 次, 合并滤液, 置 60℃水浴中浓缩, 调节药液浓度至每毫升含生药 1 g, 4℃保存备用。SXYMJ 组从术前 7 d 至术后 14 d 每日予 SXYMJ 药液 10 g/kg 灌胃。

1.2 取材及处理

术后 14 d, 所有大鼠用 5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 处死, 快速开胸。取胸主动脉段 2 cm 投于 10% 福尔马林固定液中, 然后脱水, 透明石蜡包埋。

1.3 形态学观察

病理切片 HE 染色。光镜下观察血管内膜情况, 用计算机图像分析系统测量大鼠胸主动脉段内膜面积、内膜覆盖率、内膜/中膜面积比。

1.4 免疫组织化学检测

石蜡切片用 ABC 法(卵白素-生物素-过氧化物酶法)检测血管壁增生内膜中 Fas 抗原和 FasL 的表达。Fas 抗体和 FasL 抗体均为 IgG 多克隆抗体, 滴度均用 1:100, 由北京中山生物技术有限公司提供(美国 Santa Crus 公司产品)。

1.5 凋亡细胞检测

石蜡组织连续切片用末端转移酶作催化酶, 将生物素标记的脱氧尿苷三磷酸作为底物连接于凋亡细胞中 DNA 片段的两端断裂钝端, 即采用脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记(terminal deoxyuridine triphosphate nick end labling, TUNEL) 法, 再用免疫组织化学检测链酶亲和素-过氧化物酶法放大标记信号, DAB 显色, 苏木素衬染。

1.6 结果判断标准

免疫组织化学染色: 阳性反应为黄至棕黄色颗粒, Fas 与 FasL 定位于胞膜及胞浆。计全部内膜中阳性细胞数, 阳性细胞数 < 25% 为阴性(-), 25% ~ 50% 为弱阳性(+), 50% ~ 75% 为中等阳性(##), > 75% 为强阳性(###)。

④细胞凋亡的观察: 计细胞核呈棕黄色的 TUNEL 阳性细胞数和内膜中的全部细胞数, 以两者百分比表示细胞凋亡率。

1.7 资料统计方法

采用 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 组织形态学观察

光镜下见假手术组大鼠胸主动脉内腔面光滑, 有内皮细胞, 内弹力层完整。对照组大鼠胸主动脉内腔面凹凸不平, 有内膜增生, 内弹力层附近的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC) 纵行排列, 呈一种向内膜方向生长趋势。SXYMJ 组大鼠血管仅有轻微内膜增生。

2.2 大鼠胸主动脉内、中膜测量分析

见表 1(Table 1)。

表 1. 大鼠主动脉内、中膜测量结果

Table 1. Determination of the tunica intima and media of thoracic aorta in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	内膜面积 (mm ²)	内膜覆盖率 (%)	内膜/中膜 面积比(%)
假手术组	10	0	0	0
对照组	24	0.225 ± 0.076	60.31 ± 11.58	30.89 ± 16.71
SXYMJ 组	24	0.128 ± 0.041 ^a	29.57 ± 18.20 ^a	16.04 ± 8.40 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 免疫组织化学检测结果

Fas 抗原、Fas 配体在假手术组大鼠血管壁中偶有阳性表达, 且多位于内皮细胞。在损伤血管中阳性细胞多表达于新生内膜, 中层表达极少; 从形态上看, Fas、FasL 表达于平滑肌细胞和淋巴细胞。SXYMJ 组新生内膜中 Fas 与 FasL 的表达均比对照组有显著性增强(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。见表 2(Table 2)。

表 2. 舒心益脉煎对主动脉增生内膜 Fas 抗原和 Fas 配体表达的影响

Table 2. Effect of Shuxin Yimai Jian on the expression of Fas and FasL in the aorta hyperplasia intima

结果	Fas		Fasl	
	对照组	SXYMJ 组	对照组	SXYMJ 组
-	10	4	10	4
+	9	6	5	3
##	4	9	7	8
###	1	5	2	9

2.4 新生内膜中细胞凋亡率

假手术组大鼠血管壁中未检测到凋亡细胞, 在损伤血管中凋亡细胞多位于增生内膜中, 多为增生的平滑肌细胞。SXYMJ 组细胞凋亡率(22.6% ± 1.

6%) 较对照组 (12.6% \pm 1.1%) 明显增高 ($P < 0.01$)。

3 讨论

中医学认为: 气行则血行, 气滞则血瘀, 瘀阻心络则胸痹、心痛。故理气活血、舒畅心脉, 令心气旷达, 肝气疏和, 则胸痹心痛即可蠲除。现代医学认为: 心理应激、情绪波动诱发心肌缺血, 常表现为心律失常。统计资料表明, 约 1/5 患者的心绞痛是以情绪波动为诱因的。其机制涉及交感—肾上腺髓质兴奋所引起的冠状动脉痉挛和心肌细胞电位的改变等^[2]。

我们观察到在器质性心脏病的基础上, 常因肝郁气滞而诱发心绞痛, 甚者发生心肌梗死。经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 是治疗此病的重要方法, 但术后约 30%~50% 患者发生再狭窄, 其主要原因为 VSMC 的过度增殖^[3]。而细胞凋亡参与调节血管增生性疾病如再狭窄与动脉粥样硬化的发展过程^[4]。因此, 调节细胞凋亡与增殖之间的平衡可能是治疗再狭窄的途径之一^[5]。VSMC 凋亡受许多基因的调控, Fas 及其配体在体内许多组织都有广泛表达, 因此调节细胞凋亡对组织细胞转化及组织平衡可能发挥着作用^[6]。本研究采用肝郁气滞型大鼠胸主动脉球囊损伤模型, 对内膜增生过程中细胞凋亡及相关基因蛋白 Fas 抗原、FasL 进行定量检测, 旨在探讨 SXYMJ 对气滞血瘀型内膜损伤大鼠 PTCA 术后再狭窄的防治机制及血管再狭窄中细胞凋亡的意义和其调节途径。SXYMJ 中的香附、玫瑰花、前胡、川芎、丹参、元胡, 现代药理研究证明多具有扩张冠状动脉、抗炎、抗凝、镇静、镇痛、降脂、改善微循环及调节代谢、免疫的作用。方中某些药物对 VSMC 增生相关基因表达的影响已有报道。如史载祥等^[7]利用原位杂交方法, 制备经皮动脉腔内成形术后家兔髂动脉、腹主动脉再狭窄模型, 观察了川芎嗪对 VSMC 增生相关基因表达的影响; 结果显示, 与未加药物再狭窄组相比, 川芎嗪组再狭窄部位 VSMC 的成纤维细胞生长因子 mRNA 和原癌基因 *c-myc* mRNA 阳性杂交信号表达明显减少, 但比正常组增加; 认为川芎嗪抑制内膜增生, 防治再狭窄形成的机理, 可能与调节再狭窄部位 VSMC 增生相关基因表达有密切关系。

Fas 抗原是肿瘤坏死因子受体超家族成员的 iv 型膜蛋白, 它作为一种重要的凋亡促进基因的蛋白

产物, 通过与其天然配体——FasL 相交联而开启细胞的死亡途径^[8]。Fas/FasL 被认为是与细胞凋亡密切相关的基因, 新近研究提示细胞膜表面 FasL 蛋白阳性的细胞可与 Fas 蛋白阳性的细胞相互作用, 将死亡信号传递给 Fas 蛋白阳性细胞并激活此细胞的凋亡程序而诱发细胞凋亡^[9]。本研究结果显示: 气滞血瘀型大鼠胸主动脉内膜剥脱后内膜增生中, 假手术组未发现有内膜增生, SXYMJ 组与对照组比较, 内膜增生面积、内膜覆盖率、内膜/中膜比值差异有显著性 ($P < 0.01$); 同时在 Fas、FasL 表达及细胞凋亡率中, 两组比较差异亦具有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。可见在血管内皮损伤修复时存在 VSMC 凋亡, SXYMJ 可使增生内膜中细胞凋亡率增高, 内膜增生程度减轻, 并促使 Fas 与 FasL 在新生内膜中表达上调, 后者可能是其促进 VSMC 凋亡的途径之一。提示 SXYMJ 可能通过 Fas 系统诱导 VSMC 凋亡, 通过调节细胞增生与凋亡之间的平衡以抑制内膜过度增生。

目前对 PTCA 术后再狭窄的治疗研究已深入到基因水平, 发现导入凋亡基因如 ICE^[10]能促进 VSMC 凋亡, 以起到防治再狭窄的作用。本研究提示, SXYMJ 对气滞血瘀型大鼠动脉内膜损伤, 确可在分子水平上参与调节细胞凋亡过程, 从而为理气活血法防治气滞血瘀型冠心病和 PTCA 术后再狭窄提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 乔明琦. 肝气逆、肝气郁两证客观指标实验研究. 山东中医学院学报, 1992, 3: 23-25
- [2] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*, 1983, 49: 327-333
- [3] 金惠铭. 病理生理学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 114-115
- [4] Bochaton P, Piali ML, Gabbiani F, Redard M, et al. Apoptosis participates in cellular regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1 059-064
- [5] Bauriedel G, Hutter R, Schluckebier S, et al. Decreased apoptosis as a pathogenic factor in intimal hyperplasia of human arteriosclerosis lesions. *Z Kardiol*, 1997, 86: 372-380
- [6] 赵卫红, 寿好长, 闫福岭. 细胞凋亡. 郑州: 河南医科大学出版社, 1997; 26-27
- [7] 史载祥, 杜金行. 血瘀证综合研究国际会议暨第4届全国活血化瘀研究学术会议纪要. 中国中西医结合杂志, 1995, 15 (12): 755-757
- [8] Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas ligand that induces apoptosis. *J Exp Med*, 1994, 179: 873-879
- [9] Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, et al. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 661-670
- [10] Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 1994, 76: 777-779

(此文编辑 曾学清)