

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0411-04

•实验研究•

茶多酚对兔颈总动脉血管成形术后再狭窄的影响

姜玉如¹, 尚小明¹, 纪征¹, 张志勇², 张文军³, 谭晓燕⁴

(河北医科大学附属唐山工人医院 1. 心内科, 2. 病理科, 3. 核医学科, 4. 心血管实验室; 河北省唐山市 063000)

[关键词] 内科学; 茶多酚防治血管成形术后再狭窄作用; 动物实验; 心血管疾病模型, 家兔; 颈总动脉; 血管平滑肌; 胶原; 纤溶酶原激活物

[摘要] 为探讨茶多酚对血管成形术后动脉中膜平滑肌增生及胶原增生的影响, 以及与组织型纤溶酶原激活物和血管紧张素 ① 活性改变的关系, 将雄性新西兰白兔 30 只随机分为对照组、低剂量茶多酚组和高剂量茶多酚组, 用球囊导管剥脱右颈总动脉内皮, 造成内皮及中膜损伤, 分别在术前、术后 3、7、11、14、22 和 28 d 采动脉血应用酶联免疫法测血浆组织型纤溶酶原激活物活性及放射免疫法测血管紧张素 ① 血清水平, 术后 28 d 处死动物并取右颈总动脉观察动脉中膜平滑肌和胶原增生程度。结果发现, 高剂量茶多酚组组织型纤溶酶原激活物血浆活性为 0.169 ± 0.067 IU/L, 低剂量茶多酚组为 0.141 ± 0.043 IU/L, 对照组为 0.126 ± 0.043 IU/L, 高剂量茶多酚组高于对照组和低剂量茶多酚组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。高剂量茶多酚组血管紧张素 ① 血清水平为 1229 ± 283 ng/L, 低剂量茶多酚组为 1302 ± 284 ng/L, 对照组为 1309 ± 263 ng/L, 三组动物术后血管紧张素 ① 血清水平比较差异无显著性。高剂量茶多酚组动脉中膜胶原含量为 $50.1\% + 5.82\%$ 、低剂量茶多酚组为 $56.7\% \pm 2.3\%$, 对照组为 $62.8\% \pm 2.1\%$, 高剂量茶多酚组低于对照组及低剂量茶多酚组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 低剂量茶多酚组低于对照组, 差异具有显著性 ($P < 0.001$)。高剂量茶多酚组中膜平滑肌细胞计数为 $0.022 \pm 0.006/\text{Hm}^2$, 低剂量茶多酚组为 $0.034 \pm 0.008/\text{Hm}^2$, 对照组为 $0.033 \pm 0.007/\text{Hm}^2$, 高剂量茶多酚组低于对照组及低剂量茶多酚组, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。结果提示, 高剂量茶多酚可提高血管成形术后血浆组织型纤溶酶原激活物活性, 对血管紧张素 ① 血清水平无显著性影响, 可抑制动脉中膜胶原及平滑肌细胞的增生, 这可能有助于减轻或预防动脉血管成形术后再狭窄。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Effect of Tea Polyphenols on Vascular Restenosis of Common Carotid Artery in Rabbits after Angioplasty

JIANG Yu-Ru¹, SHANG Xiao-Ming¹, JI Zheng¹, ZHANG Zhi-Yong², ZHANG Wei-Jun³, and TAN Xiao-Yan⁴

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Pathology, 3. Department of Nuclear Medicine, 4. Laboratory of Cardiology, Tangshan Worker's Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, China)

[KEY WORDS] Restenosis; Tea Polyphenols; Collagen; Plasminogen Activator; Muscle, Smooth, Vascular; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of tea polyphenols on proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and collagen in the arterial media, and its relationship with the changes of tissue-type plasminogen activator (tPA) and angiotensin ① (Ang ①). **Methods** 30 Rabbits were randomized into three groups: control group, low dose group, high dose group.

The right carotid artery endothelial was denuded by balloon catheter, the intima and the media were injured. The plasma level of tPA and Ang ① were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radio-immunosorbent assay respectively before the injury and 3, 7, 11, 14, 22, and 28 d after the injury. The animals were killed and carotid arteries were removed at the end of 4 weeks. With computer analysis of pathological graph, and the effects of tea pigment on the proliferation of VSMC and collagen in media.

Results The activity of plasma tPA in the high dose group is 0.169 ± 0.067 IU/L; and in the low dose group is 0.141 ± 0.043 IU/L, and in the control group is 0.126 ± 0.043 IU/L. The activity of plasma tPA in the high dose group increased significantly compared with the control group and the low dose group ($P < 0.05$). The serum level of Ang ① in the high dose group is 1229 ± 283 ng/L, and in the low dose group is 1302 ± 284 ng/L, and in the control group is 1309 ± 263 ng/L.

The serum level of Ang ① had no significant difference among the three groups. The content of collagen in media in the high dose group is $50.1\% \pm 5.8\%$, and in the low dose group is $56.7\% \pm 2.3\%$, and in the control group is $62.8\% \pm 2.1\%$.

The content of collagen in media in the high dose group decreased significantly compared with the control group and the low dose group ($P < 0.05$). The content of collagen in media in the low dose group decreased significantly compared with the control

[收稿日期] 2002-06-17

[修回日期] 2003-07-24

[作者简介] 姜玉如,男,1954年出生,河北省唐山市人,毕业于解放军第四军医大学,主任医师,研究方向为心血管疾病介入诊断与治疗。尚小明,男,1956年出生,毕业于河北医科大学,硕士学位,主任医师,河北医科大学教授,硕士及博士研究生导师,研究方向为心血管疾病介入诊断与治疗。纪征,男,1971年出生,河北省迁安市人,毕业于湖南医科大学,主治医师,硕士学位,研究方向为心血管疾病介入诊断与治疗。

group ($P < 0.001$). The quantity of VSMC in media in the high dose group is $0.022 \pm 0.006/\mu\text{m}^2$, and in the low dose group is $0.034 \pm 0.008/\mu\text{m}^2$, and in the control group is $0.033 \pm 0.007/\mu\text{m}^2$. The quantity of VSMCs in media in the high dose group decreased significantly compared with the control group and the low dose group ($P < 0.01$). **Conclusions** High dose tea polyphenols can elevate the activity of plasminogen activator (tPA), and inhibit the proliferation of VSMCs and collagen in media after angioplasty, but has no effect on the activity of plasminogen activator (Ang II). It may be helpful to diminish or prevent vascular restenosis after angioplasty.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)在冠心病临床治疗上取得了重大突破,并得到迅速普及和进一步的发展,但如何降低PTCA术后高达30%~50%再狭窄发生率,仍为困扰临床的难题之一。再狭窄病变特征为细胞外基质增生和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖,同时并存血管弹性回缩、局部血栓形成。血管再狭窄的发生与损伤后神经及内分泌的激活有密切关系,尤其与血管紧张素(ANG II) [1]、组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, tPA)等异常分泌相关,ANG II能促进VSMC的增殖和迁移[2],tPA与局部内膜损伤处血栓溶解及VSMC从中膜向内膜迁移相关[3]。研究发现,茶多酚具有降脂、抗凝、促进纤溶、抗氧化、降低血浆内皮素水平、防止实验性粥样斑块形成的作用[4,5],但其是否具有预防PTCA术后血管再狭窄的作用尚待探讨。本实验目的是观察茶多酚对兔右颈总动脉血管成形术后胶原、VSMC增殖及tPA和ANG II的影响,评价其临床预防PTCA术后再狭窄的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

组织型纤溶酶原激活物(tPA)试剂盒由上海太阳生物技术公司提供,ANG II试剂盒由天津九鼎生物技术公司提供,茶多酚由中国农业科学院杭州茶叶研究所中科公司提供,为98%茶多酚。新西兰大白兔由河北省实验动物中心提供。

1.2 动物模型制作

30只雄性新西兰大白兔,体重2.3~2.7 kg,随机分为对照组($n=10$)、低剂量茶多酚组($n=10$)和高剂量茶多酚组($n=10$)。参照Chen等[6]方法,用25%乌拉坦(1 g/kg)耳缘静脉注射,麻醉后剪开颈部正中皮肤,切口长约4~5 cm,逐层分离出颈总动脉及颈外动脉,结扎颈外动脉头端,穿刺颈外动脉,沿导丝送入2.5 mm球囊至主动脉弓,以高压注射器注入生理盐水充盈球囊,至6个大气压,机械拖拉球囊至颈总动脉分叉处,抽出盐水至负压,再送入球囊至主动脉弓,再次注入盐水至6个大气压,再次拖拉至颈总动脉分叉处,如此反复三次,剥脱兔右颈总

动脉内膜并损伤动脉中膜,术中0.1 u/g肝素抗凝,术后标准兔饲料喂养4周,药物组以生理盐水溶解茶多酚后灌胃,每天上午8时一次,药物剂量为低剂量茶多酚组100 mg/(kg·d)、高剂量茶多酚组800 mg/(kg·d),对照组以等量生理盐水灌胃,饮水不受限制。

1.3 组织型纤溶酶原激活物测定

术前30 min,术后3、7、11、14、22、28 d耳中动脉采血1 mL,抽血前动物不麻醉,由助手固定,采血后立即置于冰水中,并立即送至实验室离心,应用酶联免疫吸附法测定tPA血浆活性。

1.4 血管紧张素ANG II测定

于手术前30 min,术后3、7、11、14、22和28 d耳中动脉采血2 mL,抽血前动物不麻醉,由助手固定,采血后立即置于冰中,并立即送至实验室离心,放射免疫法测定ANG II血清水平。

1.5 病理标本制作

实验4周末,用25%乌拉坦(1 g/kg)耳缘静脉注射,剪开颈部正中皮肤,分离颈总动脉,剪取右颈总动脉分叉处至近心端2 cm,10%中性福尔马林溶液固定,取1 cm分成4段,石蜡包埋。常规横断面切片,片厚4 μm ,行HE和Masson's染色,用计算机病理图像分析系统(北京天健公司真彩色图像分析系统)测定中膜胶原含量(中膜胶原面积/中膜面积,求百分数)、中膜平滑肌细胞计数(单位中膜面积内的细胞数,单位为细胞数/ μm^2),每张切片取5个视野测定,取平均值。

1.6 统计学分析

用SPSS10.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各組间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 动物的一般情况

实验中大部分动物健康状况良好,术后所有动物均予青霉素抗感染3天。实验过程中,有4只动物死亡(对照组2只,低剂量茶多酚组1只,高剂量茶多酚组1只)。实验结束时共存活26只(对照组8只,低剂量茶多酚组9只,高剂量茶多酚组9只)。

2.2 茶多酚对血浆组织型纤溶酶原激活物活性和

血管紧张素 $\text{Ag} \oplus$ 血清水平的影响

三组动物术后血浆 tPA 活性均升高, 高剂量茶多酚组术后血浆 tPA 活性升高幅度较对照组大, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 也较低剂量茶多酚组大, 差

异显著 ($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。三组动物术后血清 Ang $\text{Ag} \oplus$ 水平均明显升高, 升高幅度组间差异无显著性(表 1, Table 1)。

表 1. 三组血浆组织型纤溶酶原激活物活性和血管紧张素 $\text{Ag} \oplus$ 血清水平的动态比较

Table 1. The comparison of the activity of tPA and Ag $\text{Ag} \oplus$ in three groups.

实验进程	血浆 tPA 活性(IU/L)			血清 Ang $\text{Ag} \oplus$ 水平(ng/L)		
	对照组	低剂量组	高剂量组	对照组	低剂量组	高剂量组
术前 30 min	0.077 \pm 0.021	0.078 \pm 0.021	0.082 \pm 0.020	901 \pm 259	887 \pm 239	907 \pm 219
术后 3 d	0.095 \pm 0.010	0.124 \pm 0.011 ^b	0.124 \pm 0.028 ^b	1 377 \pm 91	1174 \pm 70	1 248 \pm 213
术后 7 d	0.109 \pm 0.012	0.134 \pm 0.007 ^b	0.180 \pm 0.031 ^{bd}	1 306 \pm 276	1 459 \pm 41	1304 \pm 145 ^c
术后 11 d	0.153 \pm 0.047	0.155 \pm 0.039	0.163 \pm 0.051	1 291 \pm 120	1 287 \pm 285	910 \pm 109 ^{bc}
术后 15 d	0.124 \pm 0.016	0.129 \pm 0.041	0.237 \pm 0.086 ^{ac}	1 334 \pm 106	1 218 \pm 213	1 210 \pm 159
术后 22 d	0.159 \pm 0.087	0.170 \pm 0.019	0.229 \pm 0.044 ^{bc}	1 467 \pm 71	1 530 \pm 60 ^a	1447 \pm 51 ^c
术后 28 d	0.180 \pm 0.008	0.200 \pm 0.022	0.177 \pm 0.011 ^c	1 589 \pm 22	1 607 \pm 17	1 615 \pm 15 ^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$; d: $P < 0.01$, 与低剂量茶多酚组比较。

表 2. 三组动物动脉中膜胶原含量和平滑肌细胞计数的比较

Table 2. Comparison of collagen content and vascular smooth muscle cells count in media of the three groups

分 组	n	中膜胶原面积占中膜面积的比	平滑肌细胞计数
对照组	8	62.8% \pm 2.1%	0.033 \pm 0.007
低剂量组	9	56.7% \pm 2.3% ^b	0.034 \pm 0.008
高剂量组	9	50.1% \pm 5.8% ^{bc}	0.022 \pm 0.006 ^{bd}

b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$; d: $P < 0.01$, 与低剂量茶多酚组比较。

2.3 茶多酚对中膜胶原含量的影响

中膜胶原含量测定发现, 两个茶多酚组均明显低于对照组, 差异均非常显著 ($P < 0.01$), 高剂量茶多酚组亦低于低剂量茶多酚组, 差异显著 ($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。此结果说明茶多酚对血管中膜

胶原增生有抑制作用, 剂量加大, 抑制作用加强。

2.4 茶多酚对中膜平滑肌细胞增殖的影响

中膜平滑肌细胞计数发现, 高剂量茶多酚组低于低剂量茶多酚组和对照组, 差异非常显著 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2), 低剂量茶多酚组与对照组相比, 差异无显著性。此结果说明高剂量茶多酚对平滑肌细胞增殖有抑制作用。

2.5 光镜观察颈总动脉成形术后病理特征

对照组内膜增厚, 可见平滑肌细胞由中膜向内膜迁移, 内弹力板连续且厚度正常, 中膜轻度增厚, 外弹力板连续且厚度正常。低剂量茶多酚组内膜轻度增厚, 内弹力板连续且厚度正常, 中膜轻度增厚或变薄, 外弹力板连续且厚度正常。高剂量茶多酚组内膜轻度增厚, 内弹力板连续且厚度正常, 中膜轻度变薄, 外弹力板连续且厚度正常(图 1, Figure 1)。

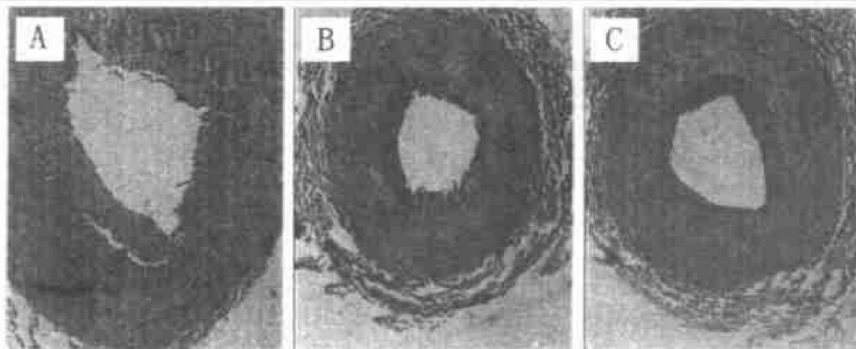


图 1. 各组动物颈总动脉横断面 HE 染色光镜观察结果($\times 40$) A 为对照组, B 为低剂量茶多酚组, C 为高剂量茶多酚组。

Figure 1. Photomicrograph of right common carotid artery section of rabbit with HE staining ($\times 40$)

3 讨论

大量的实验研究证明,PTCA 术后血管再狭窄的发生原因为血管平滑肌细胞大量的增殖和迁移,新生内膜增厚,与基质分布有关的血管重构,血小板聚集、粘附、血栓形成,多种生长因子和血管活性因子的释放,炎症反应及血管弹性回缩等,在损伤修复的过程中,新生的内膜及中膜组织过度增生以及同时伴随的细胞外基质形成,是造成再狭窄的主要病理基础^[7]。Ang Ⅱ于血管损伤后升高,作为一种强烈的有丝分裂原,在促进平滑肌细胞增生与迁移中发挥重要作用^[8],Ang Ⅱ可以使血管平滑肌细胞分泌转移生长因子 β 增加^[7],而且对产生细胞外基质蛋白有直接刺激作用^[8]。tPA 可抑制血栓形成,促进血栓溶解;细胞外基质降解是血管平滑肌细胞由中膜向内膜迁移的必要条件,tPA 活性升高,使纤溶酶及基质金属蛋白酶激活,导致胶原降解速度明显加快,为平滑肌细胞迁移创造条件^[3]。

茶多酚是绿茶中的主要活性成分,包括黄烷醇类、黄烷双醇、黄酮类和酚酸,其中黄烷醇类占茶多酚总量的 80%。研究表明黄烷醇和黄酮的平均摄入量与冠心病死亡率呈负相关^[11]。流行病学证据多支持黄烷醇对心血管病有预防作用^[12]。动物实验表明茶多酚可抑制兔动脉粥样硬化,使斑块面积明显减少^[13]。黄烷醇类是血管平滑肌细胞增殖的有效抑制因子^[5]。

本实验中,于 4 周末时,高剂量茶多酚组颈总动脉中膜胶原含量、平滑肌细胞计数均较对照组及低剂量茶多酚组减低,低剂量茶多酚组中膜胶原含量较对照组减低。提示茶多酚能抑制中膜血管平滑肌细胞增殖及胶原增生,该作用的具体机制尚需要进一步研究。

本实验中,术后 4 周内,三组动物术后 tPA 血浆活性均出现进行性升高,于 4 周末时仍高于术前水平,高剂量茶多酚组 tPA 血浆活性较对照组及低剂量茶多酚组升高。提示高剂量茶多酚能提高术后 tPA 血浆活性,激活纤溶酶原;同时,tPA 血浆活性增高又为平滑肌细胞迁移创造有利条件。但 tPA 这两种作用,何种占主导地位,以及 tPA 在影响平滑肌细胞迁移的各种细胞因子中所起作用的大小目前尚不清楚。

本实验中,三组动物于术后均出现 Ang Ⅱ血清水平升高,并于术后 1 周左右达到第一个峰值,此后逐渐下降,于术后第 2 周左右达谷底(仍明显高于术前),此后又逐渐升高,于 4 周末时仍处于上升通道,其值高于第一个峰值。虽然高剂量茶多酚组 Ang Ⅱ血清水平曲线位于对照组及低剂量茶多酚组之下,但组间差异无显著性。提示茶多酚不能有效抑制血管损伤后 Ang Ⅱ血清水平。

本实验发现,茶多酚可提高血管成形术后组织型纤溶酶原激活物活性,对血浆 Ang Ⅱ水平无显著性影响,可抑制动脉中膜胶原及平滑肌细胞的增殖,为临床减轻或预防动脉血管成形术后再狭窄开辟了一个新的治疗途径。实验不足之处在于,未对中膜胶原类型进一步分型研究,未对平滑肌细胞的型别进行进一步鉴别,如果对胶原及平滑肌细胞的测定采用免疫组织化学染色方法则更加具有说服力。

[参考文献]

- [1] Dzau VJ. Vascular rennin-angiotensin system and vascular protection. *J Cardiol Pharmacol*, 1993, **22** (Suppl 5): S1-S9
- [2] Stajarszy M, Gminski J. The role of DNA polymorphism in rennin-angiotensin system and the pathogenesis of cardiovascular disease. *Postepy Hig Med Dose*, 1997, **51**: 171-183
- [3] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 1995, **77**: 863-868
- [4] 万里,王申五,韩弛,陈君石. 茶色素对兔实验性动脉粥样硬化的预防作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (2): 131-133
- [5] Lu LH, Lee SS, Huang HC. Epigallocatechin suppression of proliferation of vascular smooth muscle cells: correlation with $c-jun$ and JNK. *Bri J Pharmacol*, 1998, **124**: 1 227-237
- [6] Chen SJ, Li H, Durand J, Oparil S, Chen YF. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation*, 1996, **93**: 577-584
- [7] 韦立新. 经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的病理学机制. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 1-3
- [8] Kohno M, Yokokawa, Kano H, Yasunari K, Minami M, Hanehira. Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin Ⅱ-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension*, 1997, **29** (6): 1 309-313
- [9] Gibbons GH, Pratt RE, Dzau CJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs Hyperplasia. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 456-461
- [10] Nagasawa K, Zimmermann R, Munkel B, Linz W, Scholkens B, Schaper J. Extracellular matrix deposition in hypertensive hearts: antifibrotic effects of ramipril. *Eur Heart J*, 1995, **16** (Suppl C): 33-37
- [11] Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, 1995, **155**: 381-386
- [12] Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, 1997, **349**: 699
- [13] Tijburg LBM, Wiseman SA, Meijer GW, ET AL. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterlaemic rabbits. *Atherosclerosis*, 1997, **235**: 37-47

(此文编辑 胡必利)