

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0526-03

水飞蓟宾对实验兔球囊血管损伤后内膜增生的影响

顾水明, 魏盟, 张昀昀, 潘晔生, 葛兆莺, 金立仁

(上海第六人民医院心内科, 上海市 200233)

[关键词] 药理学; 水飞蓟宾对血管内膜增生的影响; 免疫组织化学法; 球囊损伤; 血管再狭窄; 增殖细胞核抗原; 兔

[摘要] 探讨水飞蓟宾对兔球囊血管损伤后内膜增生的影响。将新西兰大白兔随机分为对照组($n=6$)、小剂量水飞蓟宾组[$n=8$, 20 mg/(kg·d)]、大剂量水飞蓟宾组[$n=8$, 40 mg/(kg·d)]。用球囊导管对实验兔行髂动脉损伤, 用药组于术前3 d分别用小剂量及大剂量水飞蓟宾, 术后28 d取病变血管染色并免疫组织化学检查, 以计算机图像分析系统分析血管内膜、中膜厚度和腔面积的变化, 计算内膜增生细胞核抗原增殖指数。结果发现, 小剂量水飞蓟宾对血管内膜和中膜厚度、腔面积、内膜增生细胞核抗原阳性细胞百分比无明显影响($P>0.05$); 大剂量水飞蓟宾使腔面积扩大、内膜厚度减少、内膜增生细胞核抗原阳性细胞百分比减少($P<0.05$)。提示水飞蓟宾能抑制血管内膜增生, 有可能用于防治再狭窄。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Silybin on Neointimal Proliferation of Rabbit Iliac Artery after Balloon Injury

GU Shu-Ming, WEI Meng, ZHANG Yun-Yun, PAN Ye-Sheng, GE Zhao-Ying, and JIN Li-Ren

(Department of Cardiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

[KEY WORDS] Balloon Injury; Blood Vessel Restenosis; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Rabbits; Silybin; Neointimal Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of silybin on neointimal proliferation of rabbits iliac artery after balloon injury.

Methods 22 rabbits were randomly separated into 3 groups including control group, low-dose treatment group and high-dose treatment group. Balloon catheter was used to induce injury to the iliac artery of rabbits in treatment group. Tranilast was given to the rabbits in low-dose treatment group [20 mg/(kg·d)] and high-dose treatment group [40 mg/(kg·d)] once a day from 3 days before operation to 28 days after operation, and then local vessel was harvested for pathological analysis and immunohistochemical staining. Automatic image analysis system was used to detect the changes of intimal thickness, medial thickness, luminal area, and the proliferation index of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Results** No significant difference was found between low-dose treatment group and control group in intimal thickness, medial thickness, luminal area and proliferation index of PCNA ($P>0.05$). The intimal thickness was decreased in high-dose treatment group compared with control group ($P<0.05$). The luminal area was significantly larger in high-dose treatment group than that in control group ($P<0.05$). The proliferation index of PCNA was significantly reduced in high-dose treatment group compared with control group ($P<0.05$).

Conclusions Silybin significantly inhibit neointimal hyperplasia and the drug may be used to prevent restenosis.

冠状动脉成形术后再狭窄是血管对球囊损伤的过度愈合反应, 其中心环节是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖致内膜增生^[1]。此外VSMC的凋亡及血管的重构也参与再狭窄形成^[2,3]。迄今, 未有理想药物能防治再狭窄的形成。水飞蓟宾是菊科植物水飞蓟中总黄酮水飞蓟素的主要成份, 具有保护肝细胞膜及降血脂等作用, 临床上主要用于肝炎治疗。研究表明, 水飞蓟宾对大

鼠心肌细胞膜上的钙通道活性具有明显抑制效应^[4], 对乳鼠心肌细胞凋亡也具有阻滞作用。本实验研究水飞蓟宾对兔髂动脉球囊损伤后内膜增生的影响, 旨在探讨其防治再狭窄的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验分组与用药

新西兰大白兔(上海医科大学放射医学研究所提供)22只, 体重2.0~2.5 kg, 雌雄不限。随机分为对照组($n=6$)、小剂量水飞蓟宾(上海黄山制药厂提供)组[$n=8$, 20 mg/(kg·d)]、大剂量水飞蓟宾组[$n=8$, 40 mg/(kg·d)]。用药组于内膜损伤前3 d开始用药, 1次/d, 持续至术后28 d。

[收稿日期] 2003-06-20

[修回日期] 2003-11-19

[作者简介] 顾水明, 男, 1964年出生, 江苏省苏州市人, 副主任医师, 副教授, 博士研究生; 主要研究方向为冠心病及心力衰竭; E-mail: shuiminggu@sina.com。魏盟, 男, 1957年出生, 陕西省人, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师; 主要研究方向为心血管病的介入治疗及心力衰竭。张昀昀, 女, 1947年出生, 上海市人, 主任医师, 教授; 主要研究方向为高血压及冠心病。

1.2 血管内膜损伤

以 3% 戊巴比妥钠按 1 ml/kg 经兔耳缘静脉注射麻醉,固定四肢及头部。于双后肢内侧剪毛,常规消毒皮肤。用手触摸股动脉搏动最明显部位,沿股动脉走行方向剪开皮肤及皮下组织,钝性分离股动脉,结扎远端,用线拉法阻断近端血流。在两线间的血管壁上剪一小切口,逆行插入球囊导管(导管直径 1.2 mm,球囊直径 2.5 mm,球囊长度 20 mm; Cordis 公司产品),插入深度为 10~ 15 cm。连接手推式压力注射器,向球囊内注入肝素生理盐水,使球囊膨胀,并维持 4~ 6 kPa。缓慢回拉导管直至切口处,抽空球囊内液体使压力降至零;再将导管送入,重复上述过程 3 次。退出导管,结扎动脉,缝合皮肤。

1.3 标本获取与检测

所有动物于血管内膜损伤后 28 d 处死。分离并剪下髂动脉,置于 10% 福尔马林中固定 24 h,常规石蜡包埋,制成 6 μm 厚的切片,分别 HE、胶原、弹力纤维染色后镜检。将病理切片图像输入计算机,采用 HPIAS-1000 病理图像分析系统(武汉清平影像技术有限公司生产)进行图像分析,计算血管腔面积、内膜及中膜厚度。

1.4 免疫组织化学染色

应用单克隆增殖细胞核抗原抗血清(Maxim 公司产品,SP 法)进行常规免疫组织化学染色。选取高倍视野,每张切片随机选 6 个视野,分别计数每个视野中血管内膜的细胞数和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 阳性细胞数,求出百分数,取平均值。

1.5 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组间比较采用方差分析,2 组间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 水飞蓟宾对血管内膜、中膜厚度及血管腔面积的影响

小剂量水飞蓟宾组内膜、中膜厚度及血管腔面积与对照组比较无明显差异;大剂量组血管内膜厚度减小,血管腔面积增大,而中膜厚度无明显变化(表 1, Table 1)。

2.2 水飞蓟宾对内膜增生细胞核抗原阳性细胞百分比的影响

小剂量水飞蓟宾组内膜 PCNA 阳性细胞百分比与对照组比较无明显差异(43.92% \pm 6.85% 比 46.31% \pm 8.57%, $P > 0.05$),大剂量组内膜 PCNA 阳

性细胞百分比比较对照组明显减少(23.89% \pm 7.38% 比 46.31% \pm 8.57%, $P < 0.05$)。

表 1. 水飞蓟宾对兔球囊血管损伤后内膜、中膜厚度及血管腔面积的影响

Table 1. Effect of silybin on intimal thickness, medial thickness and luminal area of rabbits iliac artery after balloon injury ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	内膜厚度 (μm)	中膜厚度 (μm)	管腔面积 ($\times 10^3 \mu m^2$)
对照组	6	167.32 \pm 26.43	184.45 \pm 25.38	8.34 \pm 9.29
小剂量水飞蓟宾组	8	158.41 \pm 36.25	178.32 \pm 43.16	12.43 \pm 7.86
大剂量水飞蓟宾组	8	121.31 \pm 39.53 ^a	171.26 \pm 56.59	71.23 \pm 16.75 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

经皮冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 和支架置入术施行以后,最突出的问题是术后 6 个月内在成形术部位发生再狭窄,这在某种程度上限制了其在临床上的应用。近些年来,对其发生机制及防治的研究一直是研究的热点^[5]。

大量研究发现,PTCA 后再狭窄的主要机制为 VSMC 增殖及迁移所致的新生内膜过度增生、局部血栓形成、细胞外基质形成、早期血管弹性回缩及晚期血管负性重塑。支架置入术能抑制血管弹性回缩和负性重塑,但不能解决刺激内膜过度增生的问题。药物涂层支架虽经初步临床应用使再狭窄率有所降低,但由于价格贵,远期疗效及安全性未确定,其应用前景尚不明朗。因而,继续寻找能抑制内膜增生的药物,对防治再狭窄具有重大意义。

本研究结果显示,小剂量水飞蓟宾[20 mg/(kg·d)]对血管内膜损伤后内膜、中膜厚度和腔面积、内膜 PCNA 阳性细胞百分比均无明显影响;大剂量水飞蓟宾[40 mg/(kg·d)]能抑制内膜增生,使腔面积增大,内膜 PCNA 阳性细胞百分比降低。提示大剂量水飞蓟宾能抑制内膜增生,有可能用于再狭窄的防治;小剂量水飞蓟宾则无明显作用,可能与剂量太小而不足以抑制内膜增生有关。有关水飞蓟宾这方面的研究,国内外尚未见相关报道。

水飞蓟宾抑制血管内膜增生的机制尚不清楚。资料证实水飞蓟宾对肝细胞膜有明显保护作用,对大鼠急性心肌梗死及再灌注损伤也有一定保护作用^[6],这与抑制心肌细胞跨膜钙内流从而抑制细胞凋亡有关。我们实验室已经观察到,水飞蓟宾对成

年大鼠分离心肌细胞质膜 Ca^{2+} 通道活性具有明显抑制效应,证实该药具有 Ca^{2+} 拮抗作用^[4]。

有人对再狭窄部位定向旋切标本进行了分析,结果表明再狭窄部位细胞凋亡百分比明显高于粥样硬化所致狭窄部位凋亡百分比,提示血管平滑肌细胞的凋亡参与再狭窄形成^[2]。细胞凋亡是调节内皮损伤所致内膜增厚演变的一个重要机制,细胞增殖活性越高,则伴随凋亡活性越高;球囊血管损伤后,由于细胞增殖程度大于凋亡程度,从而导致再狭窄的发生^[7]。已有研究表明,钙拮抗剂能抑制血管球囊损伤后胶原沉积^[8]及 VSMC 增殖,本研究也显示水飞蓟宾能抑制血管内膜细胞增殖。故由此推测,水飞蓟宾可能不平衡地抑制 VSMC 的增殖和凋亡,最终导致 VSMC 减少,同时能抑制胶原沉积等,从而抑制球囊血管损伤后的内膜增生。

水飞蓟宾临床应用无明显毒副作用,价格便宜。本研究初步结果显示,该药能抑制血管内膜增生,对防治再狭窄有一定的应用前景,但其确切作用及机

制有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Bailey SR. Coronary restenosis: a review of current insights and therapies. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2002, **55** (2): 265-271
- [2] Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res*, 2000, **87** (3): 184-188
- [3] Maeng M, Olesen PG, Emmertsen NC, Thorwest M, Nielsen TT, Kristensen BO. Time course of vascular remodeling, formation of neointima and formation of neo-adventitia after angioplasty in a porcine model. *Coron Artery Dis*, 2001, **12** (4): 285-293
- [4] 梁瑞康, 葛兆莺. 水飞蓟宾对成年大鼠分离的心肌细胞质膜 Ca^{2+} 通道活性的影响. *中国药理学杂志*, 1996, **31** (10): 594-596
- [5] Lim VY, Chan CN. Prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention: the continuing challenge. *Ann Acad Med Singapore*, 2002, **31** (1): 102-106
- [6] 陈红, 苏定冯, 张同华, 丁鸿钧, 杨友才, 陈思聪. 水飞蓟宾对麻醉大鼠急性心肌梗死及再灌注损伤的保护作用. *中国药理学学报*, 1992, **13** (1): 69-71
- [7] 李东宝, 沈璐华, 谢苗荣. 动脉粥样硬化和再狭窄中平滑肌细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 276-278
- [8] 张莹, 刘朝中, 江一清, 黄丛春, 王文清. 硝苯地平 and 依那普利对兔髂动脉球囊损伤后胶原增生的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (2): 137-139

(此文编辑 曾学清)