

[文章编号] 1007-3949(2004)12-01-0043-04

•实验研究•

复方花刺参粘多糖对髂动脉内皮剥脱家兔 内膜增生的影响及机制

朱宗涛, 蔡生业, 姚成芳, 王 丽, 王华亭, 张维东

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东省济南市 250062)

[关键词] 病理学与病理生理学; 复方花刺参粘多糖对兔内膜增生的抑制作用; 原位杂交检测; 复方花刺参粘多糖; 内膜增生; 细胞凋亡; 兔

[摘要] 为了观察复方花刺参粘多糖对动脉损伤家兔内膜增生的影响及其作用机制, 将雄性新西兰大白兔 37 只随机分为正常组、模型组、花刺参组和辛伐他汀组, 髂动脉损伤术后 6 周全部家兔处死, 取受损动脉, HE 染色观察动脉形态学改变并图像分析测量动脉内膜、中膜厚度, 原位杂交检测血小板源生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子 β_1 的表达, 免疫组织化学染色观察凋亡基因 bcl-2 和 bax 表达的改变。结果发现, 与模型组相比, 花刺参组和辛伐他汀组动脉内膜厚度及内膜中膜厚度比均明显减小 ($P < 0.01$), 血小板源生长因子及转化生长因子 β_1 的表达明显降低 ($P < 0.05$), bax 表达明显升高 ($P < 0.05$), 但 bcl-2 表达无明显差异; 花刺参组与辛伐他汀组之间各指标均无显著差异。结果提示, 复方花刺参粘多糖可有效减轻家兔髂动脉损伤血管内膜厚度和管腔狭窄, 其作用机理与抑制血管平滑肌细胞增殖和促进凋亡有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Stichopus Variegatus Compound on Cell Intima Hyperplasia of Rabbit Iliac Artery after Endothelium Denudation

ZHU Zong-Tao, CAI Sheng-Ye, YAO Cheng-Fang, WANG Li, WANG Hua-Ting, and ZHANG Wei-Dong

(Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[KEY WORDS] Stichopus Variegatus Compound; Neointimal Proliferation; Apoptosis; Rabbits; Growth Factor; Oncogenes

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Stichopus Variegatus Compound on cell intima hyperplasia of rabbit.

Methods Thirty seven male New Zealand rabbits were allocated randomly into 4 group: normal control group, model group, Stichopus group, Simvastatin group. All rabbits were killed after 6 weeks and iliac arteries were removed. With HE staining, we observed artery morphology alteration and measured the thickness of arterial intima and media. The expression of growth factor basic fibroblast growth factor (bFGF), transfer growth factor β_1 (TGF- β_1) and platelet derived growth factor (PDGF) were observed by hybridization in situ method. Apoptosis gene bcl-2 and bax were tested by immunohistochemistry staining. **Results** In comparison with model group, the thickness of intima and ratio of intima to media and the expression of PDGF and TGF- β_1 in treatment group notably decreased ($P < 0.01$, 0.01 , 0.05 , 0.05 , respectively). The expression of bax in treatment group were significantly higher than that in model group ($P < 0.05$). There were no differences between Simvastatin group and Stichopus group. **Conclusions** Stichopus Variegatus Compound can effectively relieve stenosis of lumen of blood vessel, which may partly attributed to its function of inhibiting the hyperplasia and promoting the apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC).

人们已发现, 辛伐他汀不仅可以有效降低胆固醇, 还能抑制平滑肌细胞增殖、促进凋亡。复方花刺参粘多糖是采用特殊工艺从海洋棘皮门动物花刺参结缔组织中提取的花刺参粘多糖^[1], 并与山楂、山药和灵芝等中药配伍组成的纯天然药物, 以往的实验证实有显著降低胆固醇及改善内皮功能作用。本实

验以辛伐他汀为对照, 通过对细胞增殖相关生长因子如血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和转化生长因子 β_1 (transfer growth factor, TGF- β_1) 及凋亡基因 bcl-2、bax 表达的检测, 观察复方花刺参粘多糖对血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖和凋亡过程的影响, 探讨其抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 及经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后再狭窄作用。

[收稿日期] 2003-06-09

[修回日期] 2003-12-25

[作者简介] 朱宗涛, 心血管内科硕士, 研究方向为冠心病的诊治, E-mail: zhuzongtao@163.com。蔡生业, 研究员, 硕士研究生导师, 从事动脉硬化的基础和临床研究, 发表论文 40 余篇。姚成芳, 研究员, 医学博士, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病分子生物学, 发表论文 30 余篇。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型建立

雄性新西兰大白兔 37 只, 随机分为 4 组: 正常对照组 ($n = 7$) 为假手术+ 普通饲料; 模型组 ($n = 10$) 为动脉内膜剥脱术+ 高脂饲料; 花刺参组 ($n = 10$) 为动脉内膜剥脱术+ 高脂饲料+ 复方花刺参粘多糖 [$0.5 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 灌胃, 复方花刺参粘多糖药品号为济药管制 (2000) FL007-58, 其中花刺参粘多糖含量为 10% 左右; 辛伐他汀组 ($n = 10$) 为动脉内膜剥脱术+ 高脂饲料+ 辛伐他汀 [$0.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 灌胃。高脂饲料 (胆固醇 2%, 猪油 3%, 蛋黄粉 3%, 普通饲料 92%) 喂养 1 周后行髂动脉球囊内膜剥脱术。经股动脉送入导引钢丝, 逆行插入 PTCA 球囊导管 ($2.75 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$), 插入深度约 10 cm, 向球囊内注入肝素生理盐水使其膨胀, 维持压力在 4~6 个标准大气压。缓慢回拉球囊平切口处, 回抽球囊内液体, 维持负压, 再将导管送至原位, 重复上述过程 3 次, 确保髂动脉局部内皮剥脱。退出导管后, 结扎股浅动脉, 依次缝合切口。假手术组不插入球囊导管, 余步骤同上。术后每日肌注青霉素 800 ku, 连续 3 天, 预防术后感染。除正常组外, 其余 3 组术后高脂喂养, 花刺参组和辛伐他汀组同时药物灌胃。

1.2 标本制备

球囊损伤后第 6 周处死全部家兔, 腹主动脉与髂动脉分支处以下 0.3 cm 取损伤侧髂动脉 1 cm, 置于 10% 中性福尔马林溶液浸泡固定, 逐级脱水, 石蜡包埋, 以 APES 防脱片处理, 制成 $4 \mu\text{m}$ 组织切片。

1.3 形态学观察及动脉内膜和中膜测定

病理切片行 HE 染色, 光镜下观察血管内膜增生情况。血管横截面内膜厚度及中膜平均厚度以 SEM-IPS 图像分析系统 (日本 SONY 公司生产) 测量, 每张切片分别测量 5 处, 取平均值。

1.4 原位杂交染色检测

利用原位杂交检测试剂盒 (武汉博士德生物工程公司提供), 采用链酶亲和素-生物素-酶复合物 (SABC) 法测定。以胃蛋白酶暴露 mRNA 核酸片段, 以地高辛为标记, 每张切片各加 20 μL 含寡核苷酸探针的原位杂交液及杂交探针稳定液, 滴加 SABC, 二氨基联苯胺 (DBA) 显色, 苏木素复染, 封片镜检。观测 PDGF、bFGF 及 TGF- β_1 mRNA 在髂动脉中的表达, 计算阳性细胞数占总细胞数的比率。

1.5 免疫组织化学染色检测

bcl-2 和 bax 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程公司提供) 稀释度 1:100, 以 PBS 缓冲液为阴性对

照, SABC 法 DAB 显色, 观测 bcl-2、bax 在髂动脉中的表达, 并计算阳性细胞数占总细胞数的比率。

1.6 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS10.0 软件做统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料各组间用方差分析, 两组之间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 实验动物情况

模型组、花刺参组和辛伐他汀组各死亡 1 只兔, 原因分别为感染、麻醉过度、胃管给药误入气管。

2.2 复方花刺参粘多糖对动脉病理形态的影响

光镜下显示, 正常组髂动脉内膜光滑, 无增厚, 内弹力板完整。模型组内膜增生严重, 内弹力膜不连续, 内膜增厚处向腔内呈丘状或扁平状隆起, 可见大量 VSMC 排列紊乱及大量泡沫细胞积聚。与模型组相比, 花刺参组和辛伐他汀组内膜增生程度均较轻, 内膜中 VSMC、泡沫细胞较少 (图 1, Figure 1)。

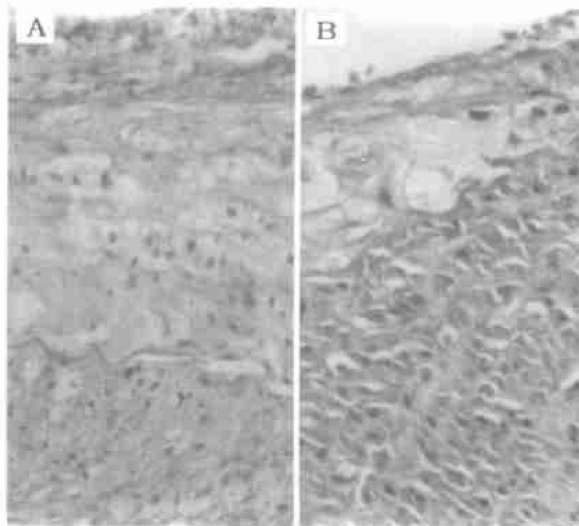


图 1. 模型组和花刺参组动脉形态 (HE 染色 $\times 400$) A 为模型组; B 为花刺参组。

Figure 1. Arterial form of model group and Stichopus group (HE $\times 400$)

2.3 复方花刺参粘多糖对内膜和中膜厚度的影响

花刺参组和辛伐他汀组内膜厚度及中膜厚度比较模型组明显减小 ($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。

2.4 复方花刺参粘多糖对生长因子表达的影响

正常组 PDGF 仅内膜微量表达。模型组内膜强烈表达, 中膜中度表达, 比正常组明显增多 ($P < 0.01$)。花刺参组及辛伐他汀组 PDGF 表达局限于内膜, 伴或不伴中膜轻微表达, 与模型组比较明显减少 ($P < 0.05$)。bFGF 在正常组内膜微量表达, 在模

型组内膜及中膜平滑肌均有表达,花刺参组及辛伐他汀组内膜、中膜轻度表达,但 4 组中的表达无明显差异($P > 0.05$)。模型组内膜及中膜 TGF- β_1 强烈表达,比正常组明显增多($P < 0.01$)。花刺参组及辛伐他汀组 TGF- β_1 表达比模型组明显减少($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。

表 1. 各组血管内膜和中膜厚度及内膜中膜厚度比的比较

Table 1. The comparison of thickness of intima and media and the ratio of intima to media ($\bar{x} \pm s$)

分 组	内膜厚度 (μm)	中膜厚度 (μm)	内膜/中膜
正常组		151.0 \pm 9.6 ^a	
模型组	400.7 \pm 50.6	176.4 \pm 16.8	2.29% \pm 0.36%
花刺参组	219.3 \pm 47.0 ^b	154.3 \pm 15.9	1.42% \pm 0.24% ^b
辛伐他汀组	208.6 \pm 35.7 ^b	148.6 \pm 14.3 ^a	1.41% \pm 0.28% ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组比较。

表 2. 复方花刺参粘多糖及辛伐他汀对生长因子表达的影响

Table 2. Effect of Stichopus and Simvastatin on the expression of growth factor

分 组	PDGF 表达 阳性率	bFGF 表达 阳性率	TGF- β_1 表达 阳性率
正常组	17.6% \pm 6.1% ^b	18.1% \pm 5.5%	14.0% \pm 3.8% ^b
模型组	28.2% \pm 7.7%	24.0% \pm 6.0	31.0% \pm 7.6%
花刺参组	22.1% \pm 5.1% ^a	21.9% \pm 6.9%	24.4% \pm 7.1% ^a
辛伐他汀组	20.9% \pm 5.0% ^a	22.4% \pm 7.6%	23.7% \pm 6.4% ^a

a: $P < 0.05$, 与模型组比较。

2.5 复方花刺参粘多糖对凋亡基因表达的影响

凋亡基因 bcl-2 在正常组内膜少量表达,模型组增多,中膜平滑肌也有表达。花刺参组及辛伐他汀组 bcl-2 表达较模型组有减弱趋势,但各组间无统计学差异。bax 在模型组表达轻微,用药组强于模型组($P < 0.05$),花刺参组内膜、中膜有较强表达,但与辛伐他汀组之间无明显差异(表 3, Table 3)。

表 3. 复方花刺参粘多糖及辛伐他汀对生长因子表达的影响

Table 3. The effect of Stichopus and Simvastatin on the expression of apoptosis gene

分 组	bcl-2 表达阳性率	bax 表达阳性率
正常组	12.1% \pm 4.9%	14.3% \pm 5.0%
模型组	17.2% \pm 7.0%	14.6% \pm 5.8%
花刺参组	13.4% \pm 5.5%	21.4% \pm 6.5% ^a
辛伐他汀组	12.6% \pm 4.4%	22.0% \pm 7.4% ^a

a: $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨论

近年来,人们发现他汀类药物除具有降低胆固醇及甘油三酯作用外,还能够抑制 SMC 增殖和迁移^[2]、减轻内膜增生与管腔狭窄,延缓 As 及再狭窄的发展。本研究进一步验证了辛伐他汀的作用,并同时证实花刺参具有类似的效果,抑制新生内膜增生,减少泡沫细胞的形成,保护内弹力层的完整性。复方花刺参粘多糖能显著减轻内膜增生及内膜中膜厚度比,减轻粥样斑块的发生和发展,作用效果与辛伐他汀无差别。

血管损伤局部可释放大量 PDGF,在已知的趋化物中,PDGF 诱导增殖和迁移的作用最强^[3],在细胞增殖转化、组织损伤修复及动脉硬化形成中起重要作用^[4]。本研究发现花刺参组及辛伐他汀组 PDGF 表达较模型组明显减少。证实了复方花刺参粘多糖的抗 As 作用,说明其作用至少部分是由对 PDGF 的抑制实现的。

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在血管损伤后血管内皮细胞的移行、VSMC 的增殖和迁移过程中发挥重要作用^[5,6]。Kennedy 等^[7]也研究发现,bFGF 能上调人的 VSMC 间质胶原酶的表达,促进细胞外基质的形成。有研究认为,bFGF 因作用时间及剂量不同呈双重作用。本实验未发现模型组 bFGF 表达升高,也未发现花刺参组及辛伐他汀组 bFGF 表达较模型组明显减少,可能与内膜损伤 6 周 bFGF 的合成高峰期已过及 bFGF 的双重作用有关。

转化生长因子(TGF) β_1 除具有促进 VSMC 迁移和增殖的作用。Durante 等^[8]发现,TGF- β_1 能够刺激精氨酸的转运及代谢,促进胶原蛋白前体脯氨酸的生成,从而促进胶原合成。Lindner 等^[9]证实 TGF- β_1 是动脉损伤后动脉外膜纤维化及血管重塑的重要调节因素。本实验利用原位杂交技术观测 TGF- β_1 mRNA 在血管中的表达,与模型组比较,花刺参组及辛伐他汀组 TGF- β_1 表达明显减少。证实了复方花刺参粘多糖对 TGF- β_1 表达有明显抑制作用,参与了其抗 As 的过程。

研究表明,细胞凋亡发生于血管重塑过程中^[10],在细胞增殖的过程中始终伴随着细胞凋亡,增殖与凋亡间的平衡状态密切关系到 As 发生发展与后果^[11]。

在各种细胞凋亡影响因素中,物理化学因素和多种细胞因子调节细胞凋亡的发生,bcl-2 及 bax 是调控细胞凋亡的重要基因。bcl-2 的增加可通过抑制凋亡而改变细胞周期活性^[12],bax 的增加可促进

细胞凋亡, bcl-2 与 bax 的比值对于细胞接受刺激信号后存活与否起关键性作用。近年研究证明, 他汀类药物具有促进 SMC 凋亡作用^[13]。本实验发现, 和辛伐他汀同样, 复方花刺参粘多糖对 bax 有明显的升高作用, 对 bcl-2 无显著的抑制作用。因此, 复方花刺参粘多糖使 bcl-2/bax 的比例降低, 促使细胞趋于凋亡。

从海洋棘皮门动物花刺参中提取的花刺参粘多糖, 主要含有己糖醛酸、岩藻糖、半乳糖、氨基己糖等单糖。花刺参具有“补肾益精”、“生百脉血”作用, “其性温补, 足敌人参”。山楂、山药和灵芝等中药亦具有降血脂、抗凝血作用。本实验证实复方花刺参粘多糖还能够有效地抑制损伤后的血管重塑, 减轻内膜增生及管腔狭窄, 其作用可能与抑制细胞增殖与促进凋亡有关。

[参考文献]

- [1] 孙怀玉. 花刺参中酸性粘多糖的提取及纯化研究. 山东中医药大学学报, 1999, 23: 145-146
- [2] Soma MR, Donetti E, Parolini C, et al. HMG-CoA reductase inhibitors in vivo

effects on carotid intimal thickening in normal cholesterelemic rabbits. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13: 571-578

- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362: 801-806
- [4] 杨国君, 张琪, 丁金凤. 动脉壁正常区与脂斑区血小板源生长因子及其受体基因表达的比较. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3: 283-286
- [5] 郭庆, 温进坤. 碱性纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞增殖的影响. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3: 5-8
- [6] 石英, 温进坤. 碱性成纤维细胞生长因子、新生小牛血清和肝素对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6: 189-192
- [7] Kennedy SH, Rouda S, Qin H. Basic FGF regulates interstitial collagenase gene expression in human smooth muscle cells. *J Cell Biochem*, 1997, 65: 32-41
- [8] Durante W, Liao L, Reyna SV. Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation*, 2001, 10: 1121-127
- [9] Lindner V. Vascular repair processes mediated by transforming growth factor-beta. *Z Kardiol*, 2001, 90: 17-22
- [10] Vonderleyx HE, Dzau VJ. Experimental approaches for gene therapy modification of vascular remodeling. *Z Kardiol*, 1995, 84: 791-797
- [11] Jeffrey M, Isner MD, Kearney BS, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 1995, 91: 2703-711
- [12] Perlman H, Sata M, Krasinski K, et al. Adenovirus encoded hammerhead ribozyme to Bcl-2 inhibits neointimal hyperplasia and induces vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 570-578
- [13] Baetta R, Donetti E, Compato C. Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacological research*, 1997, 36: 2115-121

(此文编辑 文玉珊)

•会议消息•

中国病理生理学会心血管专业委员会 第十一届学术会议征文通知

国际心脏研究会(ISHR)中国分会第八届暨中国病理生理学会心血管专业委员会第十一届学术会议拟于2004年9月18~21日在山东省威海市召开, 现将征文事项通知如下。

1 征文内容

未公开发表的关于心脑血管的基础研究、临床研究和疾病防治研究的原始研究论文、系列研究报告和阶段性研究快报。

2 交流形式

(16)特邀报告; 专题报告; 20.分组发言; (8)壁报; (5)青年优秀论文竞赛评选。

3 征文要求

3.1 研究论文请寄800~1000字的摘要, 包括目的、方法、结果、结论四大部分。

3.2 参与青年优秀论文竞选的须提交原始研究论文全文一式2份和摘要1份, 并附单位介绍信, 第一作者的年龄不超过40岁。

3.3 投稿者请汇款100元作为发表费, 未被采用者退款。

4 截稿日期

2004年5月30日。

5 征文投递及联系方式

5.1 E-mail地址: blsl30@tom.com; 联系电话: 010-66937577。

5.2 邮寄地址: 北京复兴路28号解放军总医院南六科南十六病室武强收, 邮编: 100853。