

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0159-03

• 实验研究 •

葛根素抑制家兔髂动脉球囊损伤后再狭窄

刘舒¹, 王绿娅², 王伟³, 吕树铮², 勇强², 石凤茹², 郭恒怡¹, 吴其夏¹

(1. 北京协和医科大学 中国医学科学院基础医学研究所病理生理学教研室, 北京市 100005;

2. 北京市安贞医院心肺血管疾病研究所, 北京市 100029; 3. 北京中医药大学中心实验室, 北京市 100029)

[关键词] 药理学; 葛根素抑制血管损伤后平滑肌细胞增殖; 计算机图像分析; 葛根素; 球囊损伤; 再狭窄; 平滑肌细胞

[摘要] 观察家兔髂动脉球囊损伤后葛根素抑制损伤部位平滑肌细胞增殖的药效。复制球囊损伤家兔髂动脉造成血管狭窄模型, 实验分为 50 mg/(kg·d) 葛根素治疗组、100 mg/(kg·d) 葛根素治疗组和手术对照组, 通过体外超声定期检测血管腔直径, 病理切片观察血管内膜和中膜面积。结果发现, 球囊损伤术后第 5 周 50 mg/(kg·d) 葛根素治疗组的血管直径(1.66 ± 0.41 mm) 和 100 mg/(kg·d) 葛根素治疗组的血管直径(1.59 ± 0.17 mm) 显著高于对照组(1.13 ± 0.43 mm)。病理切片结果发现 100 mg/(kg·d) 葛根素治疗组内膜/中膜面积比($36\% \pm 18\%$) 显著低于对照组($124\% \pm 64\%$)。结果提示, 葛根素对球囊损伤术后血管平滑肌细胞增殖有一定抑制作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Puerarin in Preventing Restenosis After Rabbit Iliac Artery Balloon Injury

LIU Shu¹, WANG Lu-Ya², WANG Wei², LU Shu-Zheng², YONG Qiang², SHI Feng-Ru², GUO Heng-Yi¹, and WU Qi-Xia¹

(1. Department of Pathophysiology, Peking Union Medical College, Beijing 100005; 2. Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Disease, Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029; 3. Beijing Chinese Medical and Chinese Medicine College, Beijing 100700; China)

[KEY WORDS] Puerarin; Balloon Injury; Restenosis; Smooth Muscle Cell; Intima; Media

[ABSTRACT] **Aim** To verify the puerarin anti-smooth muscle cell proliferation effect through treating rabbit artery balloon injury. **Methods** The rabbit iliac artery balloon injury model was duplicated, then treated with 50 mg/(kg·d), 100 mg/(kg·d) puerarin or without treatment. The diameter of iliac artery was measured by ultrasound equipment. The intima, media and blood vessel areas were measured by slide image analysis system. **Results** Five weeks after the operation, the 50 mg/(kg·d) treated group's iliac artery diameters (1.66 ± 0.41 mm) were wider than control group's (1.13 ± 0.43 mm), so did 100 mg/(kg·d) puerarin group's, and ratio of intima to media area of 100 mg/(kg·d) puerarin group was also lower than the control's.

Conclusion Puerarin has effect of preventing stenosis after balloon injury.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)术后再狭窄主要由下述三方面原因所造成: 损伤引起的平滑肌细胞过度增殖; 血管重塑(remodeling)所致的结构紊乱; 损伤部位血栓形成以及随之而来的血栓机化^[1]。安放支架和给与抗凝药物可以对后两者引起的再狭窄起到抑制作用, 但是平滑肌细胞过度增殖所造成的再狭窄仍是临床面临的棘手问题。葛根素是豆科植物野葛根干燥的提取物, 主要有效成分为 4, 7-二羟基 8-β-D 葡萄糖苷异黄酮。现代药理研究证明, 葛根素具有扩张血管、改善微循环, 并有抑制血小板聚集, 修复内皮细胞, 促进增殖的血管平滑肌细胞凋亡等药

理作用^[2-4]。本研究将从动物实验方面探讨葛根素抑制血管平滑肌细胞增殖的药理学作用。

1 材料与方法

1.1 葛根素

由西安禾烁植物化学工业公司提供, 经液相色谱检验葛根素纯度可达 98.3%。

1.2 动物分组

选用雄性新西兰大耳白兔 24 只(农科院动物繁育中心), 体重 2.5 ± 0.3 kg, 随机分为手术对照组、低葛根素治疗组和高葛根素治疗组, 普通饲料喂养。参考临床葛根素注射液用量于手术前 2 周每日腹腔注射, 低葛根素治疗组 50 mg/kg, 高葛根素治疗组 100 mg/kg, 直至术后 5 周实验结束。

1.3 动物模型的复制与血管外超声

利用全数字化高分辨力彩色超声诊断仪 Sequira 512(Acuson 公司)探查测量髂总动脉起始部远端

[收稿日期] 2003-09-23 [修回日期] 2004-03-01

[基金项目] 北京市科委重点实验室资助(953850700-4)项目

[作者简介] 刘舒, 博士研究生, 研究方向为黄酮类药物抑制平滑肌细胞增殖机制, E-mail 为 liushu3230@sina.com。王绿娅, 副研究员, 研究室主任, 研究方向为动脉硬化性疾病的发生发展机制, 本人通讯作者。王伟, 博士后, 研究员, 教授, 中心实验室副主任, 研究方向为中医药对动脉硬化性疾病的作用及其机制研究。

1cm 处的内径, 根据血管直径大小选用大于血管内径 1.2~ 1.5 倍直径的球囊导管 (Cordis 公司)。以 2.5% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 麻醉, 在无菌条件下分离切开股动脉, 经股动脉送球囊导管至手术侧髂总动脉, 然后一侧灌注球囊加至压力 8 个大气压, 每次 15 s, 3 次共 45 s, 中间间隔 15 s。术中 0.1 IU/g 肝素抗凝, 然后撤除球囊导管, 结扎手术侧动脉, 缝合皮肤。于手术前、手术后 2 周及实验结束时抽血, 取血清用酶法测定甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、转氨酶、尿素氮和丙二醛浓度 (试剂盒由中山公司提供)。

1.4 球囊损伤后髂动脉直径监测与病理学分析

髂动脉球囊导管损伤前、手术即刻及术后 1、2、3、4 和 5 周取材前应用二维超声探查血管内径。处死动物后自髂总动脉起始部起取 10 mm 标本, 放入福尔马林液中固定 24 h, 标本以石蜡包埋、连续切片, HE 染色, 弹力纤维 Weigert 加 Van Gieson 染色, 采用医学彩色图像计算机分析系统 SPOT Version 3 (Diagnostic Instrument 公司) 做图像分析, 测定 5 张切片管腔面积、内弹力板 (intimal elastic lamina, IEL) 围

绕面积、外弹力板 (external elastic lamina, EEL) 围绕面积, 取其平均值。以内弹力板围绕面积减管腔面积为内膜面积, 以外弹力板围绕面积减内弹力板围绕面积为中膜面积。

1.5 统计学方法

应用 SPSS10.0 软件包, 多组样本量的比较用方差分析。

2 结果

2.1 动物生物化学指标比较

血清转氨酶、尿素氮、丙二醛、TC 和 TG 浓度在手术前后及对照组与葛根素治疗组之间没有显著性差异。

2.2 髂动脉血管超声结果

对照组、低葛根素治疗组和高葛根素治疗组术前至术后 4 周血管直径都没有显著性差异, 术后 5 周低葛根素治疗组和高葛根素治疗组血管直径均显著大于对照组 (表 1, Table 1)。

表 1. 彩色超声检测各组髂动脉管腔直径

Table 1. Diameter of iliac artery of different groups detected by ultrasound ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, mm)

分 组	术 前	术后即刻	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周	术后 5 周
对照组	1.85 $\pm$ 0.26	2.03 $\pm$ 0.35	1.83 $\pm$ 0.20	1.53 $\pm$ 0.38	1.60 $\pm$ 0.32	1.34 $\pm$ 0.30	1.13 $\pm$ 0.43
50 mg/(kg·d) 葛根素	2.08 $\pm$ 0.26	1.84 $\pm$ 0.56	2.06 $\pm$ 0.18	1.72 $\pm$ 0.35	1.72 $\pm$ 0.26	1.68 $\pm$ 0.26	1.66 $\pm$ 0.41 ^a
100 mg/(kg·d) 葛根素	2.25 $\pm$ 0.40	2.44 $\pm$ 0.37	1.97 $\pm$ 0.21	1.89 $\pm$ 0.14	1.61 $\pm$ 0.20	1.56 $\pm$ 0.16	1.59 $\pm$ 0.17 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 病理结果及计算机彩色图像分析

HE 染色可见髂总动脉壁分为内膜、中膜和外膜, 三者分界清楚。内膜和中膜以呈波浪状的内弹力板为界, 内膜为单层内皮细胞及其基质, 中膜的主要成分是平滑肌细胞, 呈长梭形, 以管腔为中心同心圆排列, 中膜与外膜以外弹力板为界。球囊扩张侧血管均显示弥漫性内膜增厚, 对照组内膜增生组织

使管腔高度狭窄甚至完全闭塞, 增生内膜以增生的平滑肌细胞为主。另外, 细胞外的胶原和弹力纤维亦明显增加 (图 1, Figure 1)。计算机彩色图像分析 Weigert 加 Van Gieson 弹力纤维染色结果发现, 各组管腔面积、内膜面积与中膜面积无明显差异, 但高葛根素治疗组内膜面积与中膜面积之比显著低于对照组 ($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。

表 2. 图像分析各组手术部位血管中膜、内膜和管腔面积

Table 2. Image analyses of intima, media and whole vessel area of injured artery of different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, pixel)

分 组	管 腔	内膜面积	中膜面积	内膜与中膜面积比
对照组	1 0471 $\pm$ 1 135	3 158 $\pm$ 1 417	2 619 $\pm$ 337	124% $\pm$ 64%
50 mg/(kg·d) 葛根素	10 854 $\pm$ 231	1 274 $\pm$ 710	2 923 $\pm$ 887	49% $\pm$ 32%
100 mg/(kg·d) 葛根素	12 304 $\pm$ 628	1 401 $\pm$ 1 000	3 625 $\pm$ 1 030	36% $\pm$ 18% ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

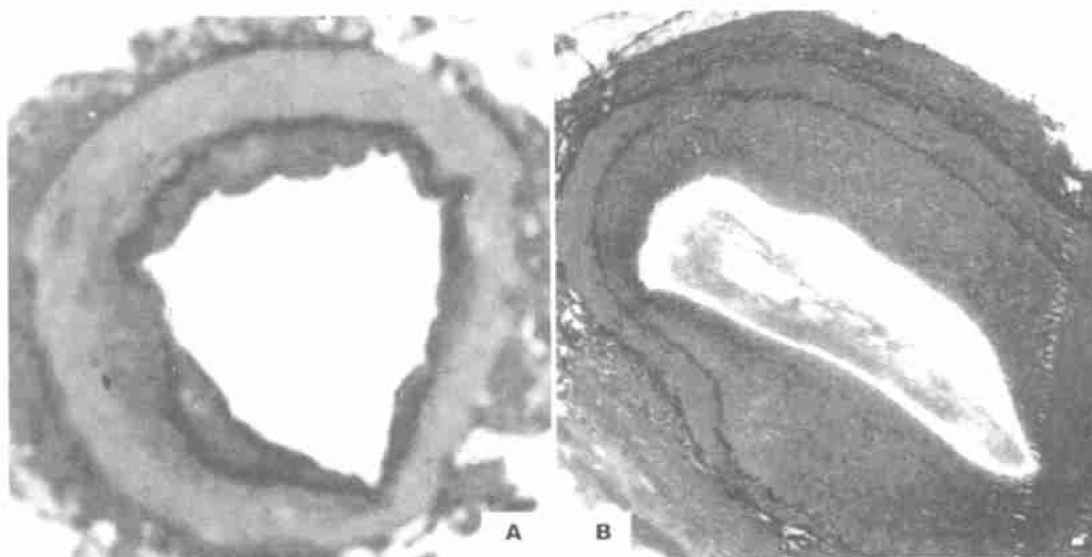


图 1. 髂动脉石蜡切片弹力纤维 Weigert 加 Van Gieson 染色 A 为高葛根素治疗组; B 为对照组。

Figure 1. Paraffin section of iliac artery stained by Weigert plus Van Gieson

3 讨论

约有 1/3 患者在成功实施 PTCA 后的 3~6 个月内形成再狭窄,严重影响远期疗效。研究证明在动物模型血管损伤部位同时存在增生和凋亡两种现象,凋亡指数在术后逐渐增高,增殖指数也呈类似的变化趋势,说明细胞凋亡与增生共同调节着损伤动脉壁的细胞数目^[5]。PTCA 术后再狭窄处动脉内膜存在大量增殖的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC),因而多数学者认为血管平滑肌细胞迁移至内膜异常增殖在再狭窄的过程中发挥着重要作用。

本实验中,葛根素治疗组与对照组转氨酶和尿素氮没有显著性差异,提示葛根素无明显肝肾损伤,而 TC、TG 和丙二醛水平无显著性差异提示实验动物饮食正常,排除饮食因素影响损伤后血管的重塑。超声检测发现,髂动脉血管直径个体差异较大,术前血管直径最高值为 2.9 mm,最低值为 1.6 mm。为了确保球囊损伤程度的一致性,我们根据血管直径的 1.2~1.5 倍选择球囊。实验第 5 周的病理切片发现各组间管腔面积和内膜面积无明显差异,但高葛根素治疗组内膜面积与中膜面积比明显低于对照组,提示葛根素可以抑制血管内膜增生。

目前的实验研究中,利用抑制血管平滑肌细胞增殖的某些药物可减轻血管成形术后再狭窄的程度。川芎嗪、穿心莲成分 API0134、蝙蝠葛碱、去纤酶 (尖吻蝮蛇毒制剂)、水蛭素和槲皮素等都被证实有抑制血管平滑肌细胞增殖的作用^[6]。目前有研究证

明葛根素具有诱导血管平滑肌细胞凋亡的作用^[4,7]。葛根素是含有苯并-γ-吡喃酮结构的异黄酮,许多异黄酮与雌二醇有着类似的苯环和 4 位羟基结构,被称作“植物雌激素”^[8]。有实验证明葛根素经水解去除糖苷后产生的大豆甾原也可以抑制主动脉内膜剥脱的家兔主动脉平滑肌细胞增殖^[9]。本实验证实葛根素确实有一定抑制平滑肌细胞增殖的作用,可为临床预防再狭窄提供借鉴。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] 岳红文, 胡文琴. 葛根及葛根素对心血管系统的药用价值. 中国中西医结合杂志, 1996, 16 (6): 382-384
- [3] 刘启功, 王琳, 陆再英, 李树生, 熊一力. 葛根素对心肌梗塞犬冠状动脉侧枝循环的影响. 中国中药杂志, 1999, 24 (5): 304-306
- [4] 王伟, 张涛, 赵明镜, 钟蓓, 吕希莹, 崔巍, 等. 5 种中药黄酮对血管平滑肌细胞凋亡的交互作用. 北京中医药大学学报, 2000, 23 (4): 18-21
- [5] Isner JM, Kearney M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 1995, 91 (7): 703-711
- [6] 徐浩, 史大卓, 陈可冀. 中药预防经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄研究进展. 中医杂志, 2000, 41 (9): 565-567
- [7] 王绿娅, 刘舒, 王伟, 荆涛, 吕燕宁, 杜兰平, 等. 葛根素能诱导血管平滑肌细胞凋亡部分相关基因差异表达. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10: 487-491
- [8] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor beta. *Endocrinology*, 1998, 139: 4252-263
- [9] Finking G, Wohlfrom M, Lenz C, et al. The phytoestrogens Genistein and Daidzein, and 17 beta-estradiol inhibit development of neointima in aortas from male and female rabbits in vitro after injury. *Coron Artery Dis*, 1999, 10: 607-615

(此文编辑 文玉珊)