

复方花刺参粘多糖对家兔血管成形术后 内皮功能及超微结构的影响

王华亭, 蔡生业, 姚成芳, 朱宗涛, 王 丽, 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] 药理学; 复方花刺参粘多糖; 血管成形术; 再狭窄; 内皮功能; 内膜增殖; 超微结构; 兔

[摘要] 为探讨复方花刺参粘多糖对成形术后血管内皮功能及超微结构的影响, 采用光镜、扫描和透射电镜及生物化学技术观察血管成形术后血浆内皮素、血清一氧化氮浓度及血管病理形态学变化。结果发现, 血管成形术后 4 周, 花刺参组和辛伐他汀组血浆内皮素浓度显著低于模型组, 血清一氧化氮浓度显著高于模型组。模型组成形术段内膜厚度明显高于花刺参组和辛伐他汀组, 管腔狭窄度明显高于花刺参组和辛伐他汀组。透射电镜观察, 模型组成形段血管平滑肌细胞胞体肥大而致密, 核明显增大, 胞浆内线粒体、高尔基体、粗面内质网明显增多, 游离核糖体增多, 细胞内肌丝含量减少, 呈“合成型”改变, 花刺参组和辛伐他汀组胞体及核相对较小, 胞浆内粗面内质网、高尔基体、线粒体较少, 而肌丝含量相对较多, 细胞分化程度较好, 呈“收缩型”改变。扫描电镜观察, 模型组血管内皮细胞排列紊乱, 细胞连接破坏, 有大量血小板和血液中沉积的蛋白颗粒粘附, 花刺参组和辛伐他汀组多数血管内皮细胞排列趋于正常, 细胞连接方式亦有所恢复, 只有极少数血小板附着。提示复方花刺参粘多糖具有抑制家兔血管成形术后内膜增生和保护内皮功能的作用。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

The Effects of Stichopus Variegates Compound on Endothelial Function and Ultrastructure of Rabbits after Transluminal Balloon Angioplasty of Iliac Atherosclerosis Model

WANG Hua-Ying¹, CAI Sheng-Ye², YAO Cheng-Fang², ZHU Zong-Tao², WANG Li², and ZHANG Wei-Dong

(1. Department of Cardiology, Center Hospital of Jinan, Clinical Medical College of Shandong University, Jinan 250013; 2. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, China)

[KEY WORDS] Stichopus Variegates Compound; Iliac Arterial Transluminal Balloon Angioplasty; Restenosis; Neointimal Proliferation; Endothelial Function; Ultrastructure; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of stichopus variegates compound on the iliac arterial endothelial function and ultrastructure of rabbits after transluminal balloon angioplasty (TBA) of iliac atherosclerosis model. **Methods** 50 purebred New Zealand rabbits were randomly divided into four groups: Stichopus, Simvastatin, model and normal group. Endothelium of iliac arteries in the front three groups were denuded by balloon catheter and fed with 2% cholesterol, 3% lard and 3% yolk mixed forage for six weeks, and then, atherosclerotic stenosis was showed by iliac angiography. Stichopus group [0.5 g/(kg·d)] and Simvastatin group [0.5 mg/(kg·d)] were fed by gastric canal in mouth cavity. At the same time NaCl solution (0.9%) were fed in model group. All the rabbits were fed in different cages and not limited drinking. After four weeks since TBA, blood was collected from left carotid artery to measure the changes of concentrations of endothelin (ET) and nitric oxide (NO). **Results** After four weeks since TBA, the concentrations of plasm ET in model groups were higher than the one in the Simvastatin and Stichopus groups, and the concentrations of serum NO decreased obviously; the concentrations of plasm ET in Stichopus groups had an increasing tendency compared with Simvastatin and normal groups. ④After four weeks since TBA, neointimal mean thickness of segment operated TBA in model groups increased significantly, compared with Simvastatin and Stichopus groups.

There were greater extent of lumen stenosis in model groups than the one in Simvastatin and Stichopus groups. ④Compared with model groups there were small vessel smooth muscle cell body and nucleus, less organelles and more myofilament contents, better cell differentiation, and less lipid droplet were phagocytosed in Simvastatin and Stichopus groups under the transmission electron microscope. There were less platelets adherence in Simvastatin and Stichopus groups under scanning electron microscope.

Conclusion Stichopus variegatus compound can significantly inhibit vessel smooth muscle cells proliferation, lessen neointimal thickness, enlarge luminal areas, decrease extent of lumen stenosis and protect endothelial function after iliac arterial transluminal angioplasty of rabbits.

[收稿日期] 2003-11-18

[修回日期] 2004-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金(30271674); 山东省自然科学基金(Y2002C43)资助

[作者简介] 王华亭, 医学硕士, 副主任医师, E-mail 为 wanghuating@medmail.com.cn。蔡生业, 研究员, 硕士研究生导师, 本文通讯作者, E-mail 为 shycail2@163.com.cn。姚成芳, 医学博士, 研究员, 硕士研究生导师。

我们以往的研究工作证实,具有明显降低大鼠血清总胆固醇和甘油三酯、降低血浆血栓素 B2 和前列腺素 E2 水平、升高 6-酮-前列腺素 F1 α 水平、降低血浆中纤维蛋白原含量以及抑制血小板聚集的作用,是降血脂、抗凝血、防血栓形成的有效药物^[2]。因此,本研究在此基础上,进一步探讨复方花刺参粘多糖对成形术后血管内皮功能的保护作用及其对超微结构的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

健康雄性新西兰纯种大白兔 50 只(由山东省农业科学院种兔养殖场提供),体重 2.5~3.5 kg。麻醉后消毒,沿右股动脉走向作一纵切口,钝性分离出股动脉,逆行插入球囊导管约 10 cm,注入盐水使其膨胀,缓慢回拉至切口处,回抽球囊内液体,再将导管送至原位,反复 3 次。结扎股动脉,依次缝合切口。术后肌注青霉素预防感染,高脂饲养 6 周后。再行髂动脉腔内血管成形术:在 X 线透视下逆行插入 5F 造影导管行腹主动脉-髂动脉造影,对局限性或弥漫性狭窄血管行球囊扩张术。然后退出球囊导管,再以相同条件重复动脉造影。确定扩张成功后,退出导管,结扎右颈总动脉,依次缝合切口。术后肌注青霉素预防感染。

1.2 实验分组

50 只新西兰家兔随机分为 4 组:对照组 8 只,花刺参组、辛伐他汀组和模型组各 14 只。血管成形术后改喂普通饲养,花刺参组和辛伐他汀组经胃管给复方花刺参粘多糖(由花刺参粘多糖、山楂、山药和灵芝等中药配伍组成)0.5 g/(kg·d)或辛伐他汀(美国默沙东药厂生产,批号 00039)0.5 mg/(kg·d),模型组给等量生理盐水。分笼喂养,自由饮水,直至术后 4 周。正常组 8 只仅给予普通饮食。

1.3 生物化学指标检测

各组动物于血管成形术后 4 周空腹左侧颈动脉同步取血。采用放射免疫法测定血浆内皮素,试剂盒购于解放军总医院科技开发中心放射免疫所。采用硝酸还原酶法测定血清一氧化氮,试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.4 动物解剖及取材

血管成形术后 4 周,全部兔在麻醉状态下沿腹部中线切开,分离出腹主动脉及双侧髂动脉,颈动脉放血处死动物,生理盐水灌注冲洗,取出损伤及正常兔未损伤髂动脉,置固定液中,送病理室制作标本。

1.5 光镜标本制作及测量

取损伤侧及对侧髂动脉各约 1 cm,10% 福尔马林固定 24 h,常规包埋、制片、染色, Olympus 光镜检查。用光镜切片,在 SEM-IPS 图象分析系统上分别测定动脉内膜、中膜平均厚度、内弹力膜以下面积及管腔截面积,内膜和中膜平均厚度以微米(μm)表示,以内弹力膜以下截面积表示原管腔面积,以(1-狭窄处管腔面积)/原管腔面积表示管腔狭窄度^[3]。测量采用单盲法,测量者为与本实验无关者。

1.6 透射电镜标本制作及观察

每组随机取 2 只家兔,取损伤侧及未损伤侧髂动脉约 0.5 cm,缓冲液冲洗后,用 2.5% 戊二醛固定 24 h,半薄切片定位,超薄切片制样,日立 H-800 型透射电镜(TEM)观察 SMC 的超微结构并拍照。

1.7 扫描电镜标本制作及观察

每组随机取 2 只家兔,取损伤侧及对侧髂动脉各 5 mm,用 2.5% 戊二醛及 1% 锇酸固定,日立 S-570 扫描电镜观察动脉内皮表面形态并拍照。

1.8 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS 软件做统计学处理,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间用方差分析和两两比较的 q 检验。

2 结果

2.1 实验动物情况

本实验共用新西兰家兔 50 只,其中 4 只髂动脉内膜剥脱术后未行血管成形术死亡,9 只血管成形术后死亡而退出实验,结果 37 只完成全部实验。

表 1. 四组内皮素浓度和一氧化氮浓度的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The changes of concentrations of ET and NO in the four groups

分 组	<i>n</i>	内皮素 (ng/L)	一氧化氮 ($\mu\text{mol/L}$)
正常组	8	75.6 \pm 9.7 ^a	106.4 \pm 18.0 ^a
模型组	8	114.9 \pm 24.9	37.5 \pm 12.8
花刺参组	11	83.3 \pm 11.4 ^a	95.6 \pm 8.6 ^a
辛伐他汀组	10	81.1 \pm 14.7 ^a	98.8 \pm 9.1 ^a

a: $P < 0.001$, 与模型组比较。

2.2 血浆内皮素和血清一氧化氮浓度的变化

血浆内皮素和血清一氧化氮浓度见表 1(Table 1)。血管成形术后 4 周,模型组与正常组相比血浆内皮素浓度明显升高($P < 0.001$);血清 NO 浓度明显降低($P < 0.001$);花刺参组和辛伐他汀组血浆内皮素浓度显著低于模型组($P < 0.001$);血清 NO 浓

度显著高于模型组 ($P < 0.001$); 血浆内皮素和血清 NO 浓度花刺参组与正常组和辛伐他汀组相比, 无统计学差异。

2.3 术后 4 周血管内膜中膜厚度及管腔狭窄度

术后 4 周血管内膜中膜厚度及管腔狭窄度的测量结果见表 2 (Table 2)。模型组血管成形术段内膜厚度明显高于花刺参组和辛伐他汀组 ($P < 0.001$); 中膜也有一定程度的增厚, 但无统计学差异。模型

组血管成形术段管腔截面积较花刺参组和辛伐他汀组明显减少 ($P < 0.001$); 模型组血管成形术段内弹力膜下面积与花刺参组和辛伐他汀组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。模型组血管成形术段管腔狭窄度明显高于花刺参组和辛伐他汀组 ($P < 0.001$); 辛伐他汀组血管成形术段内膜厚度及管腔狭窄度与花刺参组比较无统计学差异。

表 2. 三组血管内膜厚度和管腔狭窄度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The compare of neointimal thickness and extent of lumen stenosis in the three groups

分 组	<i>n</i>	内膜厚度 (μm)	中膜厚度 (μm)	管腔面积 (μm^2)	内弹力膜下面积 (μm^2)	管腔狭窄度
模型组	8	64.5 \pm 0.6	20.8 \pm 1.9	0.37 \pm 0.04	0.85 \pm 0.04	73.9% \pm 7.6%
花刺参组	11	27.8 \pm 2.6 ^a	19.7 \pm 1.7	0.64 \pm 0.06 ^a	0.86 \pm 0.04	40.5% \pm 7.3% ^a
辛伐他汀组	10	25.5 \pm 3.7 ^a	19.3 \pm 1.6	0.69 \pm 0.05 ^a	0.84 \pm 0.05	36.7% \pm 6.7% ^a

a: $P < 0.001$, 与模型组比较。



图 1. 髂动脉血管成形术 A 示右髂动脉弥漫性狭窄 90%, B 示球囊对狭窄部位进行扩张, C 示狭窄处扩张满意, 无线条狭窄。

Figure 1. Iliac arterial transluminal balloon angioplasty

2.4 成形术后 4 周的血管病理形态

家兔髂动脉内膜剥脱术及高脂饲养 6 周后, 全部动物血管造影均显示该动脉出现狭窄, 狭窄程度为 40%~90%, 血管成形术后管腔直径明显扩大, 残余狭窄 $< 10\%$ (图 1, Figure 1)。

2.4.1 光镜观察 血管成形术后 4 周光镜下 (图 2, Figure 2) 可见, 正常组髂动脉内膜平滑, 无增厚, 内膜下可见扁平状内皮细胞, 内弹力膜完整, SMC 核呈梭形。各组损伤侧动脉均有不同程度的内膜增厚, 管腔横截面积减少。增生的内膜主要是由 SMC、大量泡沫细胞、细胞外基质及少量的纤维结缔组织构成。模型组血管内膜增生严重, 内膜修复不完整, 内弹力膜不连续, 管腔内面不光滑, 多呈偏心性狭窄。内膜中可见大量 SMC 增殖及大量泡沫细胞积聚。中膜亦可见不规则增厚及有不同程度的 SMC

增殖及肌源性泡沫性细胞聚集。与模型组相比, 花刺参组和舒降之组内膜和中膜增生程度均较轻, 内膜中 SMC、泡沫细胞、纤维结缔组织较少, 内膜修复较完整, 管腔内面较为光滑, 管腔较大。

2.4.2 透射电镜观察 血管成形术后 4 周透射电镜下 (图 3, Figure 3) 可见, 正常组髂动脉 SMC 呈“收缩型”, 核呈梭形, 胞质含大量肌丝, 在核两端有部分内质网和线粒体。模型组血管成形段增生的 SMC 胞体肥大而致密, 核明显增大, 胞浆内线粒体、高尔基体、粗面内质网明显增多, 线粒体体积增大且富含嵴, 游离核糖体增多, 细胞内肌丝含量减少, 呈“合成型”改变, 胞内吞噬大量的脂滴。花刺参组和辛伐他汀组增生的 SMC 胞体及核相对较小, 胞浆内粗面内质网、高尔基体、线粒体较少, 而肌丝含量相对较多, 细胞分化程度较好, 接近“收缩型”SMC, 细

胞外基质也少。较少见到胞内吞噬的脂滴。辛伐他

汀组 SMC 胞浆内细胞器较花刺参组略有减少。

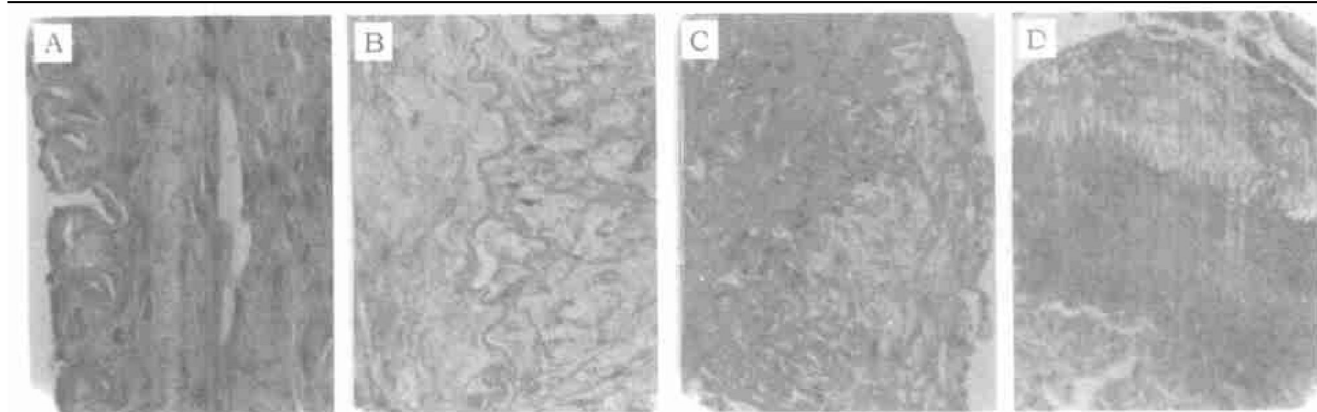


图 2. 各组髂动脉光学显微镜观察结果 A 为正常组 (HE × 400), B 为模型组 (HE × 400), C 为辛伐他汀组 (HE × 400), D 为花刺参组 (HE × 100)。

Figure 2. Light micrograph of iliac arterial wall

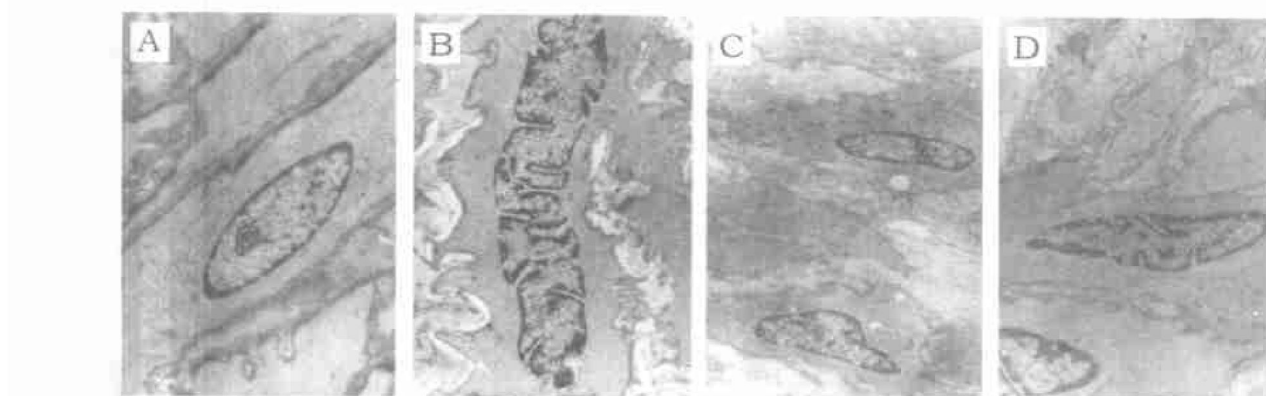


图 3. 各组髂动脉透射电镜观察结果 A 为正常组 (× 1 250), B 为模型组 (× 1 250), C 为辛伐他汀组 (× 1 250), D 为花刺参组 (× 1 250)。

Figure 3. The transmission electron micrograph of iliac arterial wall

2.4.3 扫描电镜观察 扫描电镜(图 4, Figure 4)发现,正常组内皮细胞呈长梭形,沿血管腔面走向一致,细胞间连接紧密,未见缺失,亦未见有附着物;模型组内皮细胞排列紊乱,细胞连接破坏,有的内皮细胞缺失成凹陷,有大量血小板和沉积的蛋白颗粒粘附;辛伐他汀组多数内皮细胞排列趋于正常,有的细胞连接已恢复,内皮细胞表面仍有少量纤维粘附;花刺参组内皮细胞排列趋于正常,细胞连接方式亦有所恢复,细胞形态呈“切迹”状,尚未恢复至梭形,只有极少数血小板附着。

3 讨论

内皮素与 NO 是一对均为血管内皮细胞产生的

血管活性物质,是影响 SMC 增殖及调节血管收缩与舒张的因子,维持其平衡,有利于保护和恢复内皮功能,抑制内膜增生,防止和延缓再狭窄的形成。Yan 等^[6]研究发现,在血管内皮剥脱后,血管很快恢复了抗血小板聚集、调节血管张力的功能,其原因可能与血管损伤后, NOS 表达代偿性增加有关。实验显示^[7], NO 可抑制 SMC 增殖和迁移,抑制细胞外基质的沉积。内皮素是由血管内皮细胞合成和分泌的一种内皮血管收缩因子,具有较强的血管收缩作用。还可促进 SMC 增殖、迁移和成纤维细胞的有丝分裂反应,从而促进动脉粥样硬化和再狭窄的形成。本实验表明长期服用复方花刺参粘多糖和辛伐他汀均能抑制血管成形术后引起的内皮素增加和 NO 下

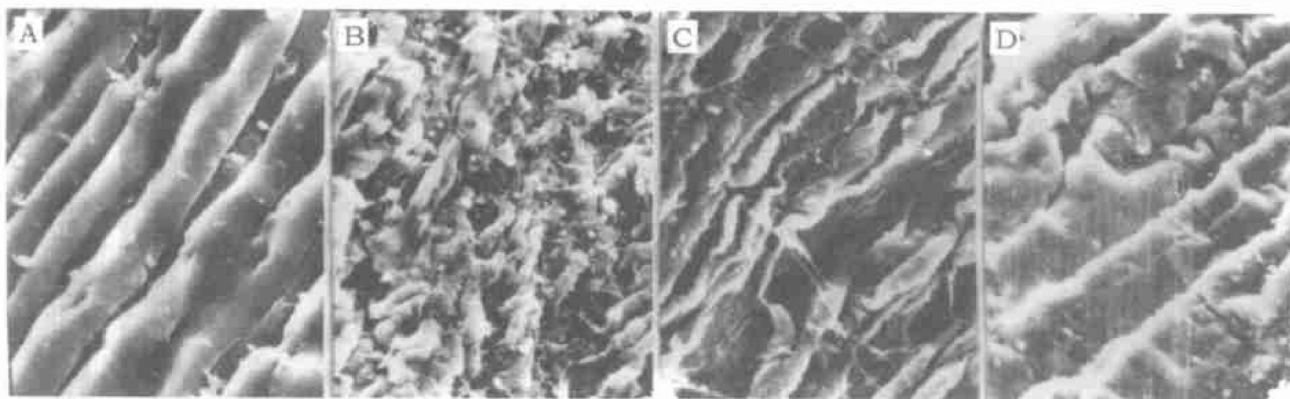


图 4. 各组髂动脉扫描电镜观察结果 A 为正常组 (SEM × 1000), B 为模型组 (SEM × 1000), C 为辛伐他汀组 (SEM × 1000), D 为花刺参组 (SEM × 1000)。

Figure 4. The scanning electron micrograph of iliac arterial wall

降,促进内皮细胞 NO 的合成与释放,可使机体持续保持较低的内皮素水平及相对较高的 NO 水平状态;扫描电镜观察亦发现,复方花刺参粘多糖和辛伐他汀具有防止血小板在胶原组织上附着的作用,能促进血管内皮细胞排列方向、细胞联接方式以及细胞形态的恢复,这对于预防和缓解血管痉挛,防止或降低再狭窄的发生有重要意义。

内膜增生是血管损伤后修复的普遍反应,研究证明在再狭窄的发生中起着关键的作用,尤其是在支架术后再狭窄的发生中起着决定性作用^[7]。本实验中,模型组血管成形段内膜厚度明显高于花刺参组和辛伐他汀组。模型组血管成形段管腔狭窄度明显高于花刺参组和辛伐他汀组;辛伐他汀组血管成形段内膜厚度及管腔狭窄度有低于花刺参组的趋势,但无统计学差异。文献[8]报道,再狭窄病变血管增厚内膜的主要成分是大量增殖的 SMC、泡沫细胞和以胶原纤维为主的结缔组织,与本实验结果大致相似。本实验光镜观察发现,各组损伤侧动脉均有不同程度的内膜增厚,管腔横截面积减少。增生的内膜主要是由 SMC、大量泡沫细胞、细胞外基质及少量的纤维结缔组织构成。模型组血管内膜增生严重,内膜修复不完整,内弹力膜不连续,管腔内面不光滑,多呈偏心性狭窄。花刺参组和舒降之组内膜和中膜增生程度均较轻,内膜中 SMC、泡沫细胞、纤维结缔组织较少,内膜修复较完整,管腔内面较为光滑,管腔较大。本实验透射电镜发现,模型组增殖的 SMC 胞体肥大而致密,核明显增大,胞浆内线粒体、高尔基体、粗面内质网明显增多,线粒体体积增大且富含嵴,游离核糖体增多,细胞内肌丝含量减少,呈“合成型”改变,胞内吞噬大量的脂滴。花刺参组和

辛伐他汀组增殖的 SMC 胞体及核相对较小,胞浆内粗面内质网、高尔基体、线粒体较少,而肌丝含量相对较多,细胞分化程度较好,接近“收缩型”,细胞外基质也少。较少见到胞内吞噬的脂滴。辛伐他汀组 SMC 胞浆内细胞器较花刺参组略有减少。说明复方花刺参粘多糖和辛伐他汀均有较好的抑制家兔髂动脉血管成形术后病变血管 SMC 的过度增殖,减轻新生内膜增生和管腔狭窄的作用。

从实验结果来看,辛伐他汀较复方花刺参粘多糖作用稍明显,但复方花刺参粘多糖系纯天然中药制剂,长期服用无毒副作用。因此,复方花刺参粘多糖做为天然中药用于防治 PTCA 后内皮素与 NO 失衡,保护和恢复血管内皮功能,改善血管重构,防止或降低再狭窄,可能具有潜在的临床应用前景。

[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 (2): 145-146
- [2] 姚成芳, 蔡生业, 王丽. 复方花刺参制剂抗凝血机制的实验研究. 中国海洋药物, 2000, 19 (1): 33-35
- [3] 童传凤, 王瑞英, 任江华. 血管紧张素 II 受体阻滞剂对动脉粥样硬化后内膜增生的影响. 临床心血管病杂志, 1999, 15 (3): 126-127
- [4] Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. JACC, 1992, 18 (2): 418-432
- [5] Yan Z, Hansson GK. Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. Circ Res, 1998, 82 (1): 21-29
- [6] Chen L, Daum G, Forough R, et al. Overexpression of human endothelial nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells and in balloon-injured carotid artery. Circ Res, 1998, 82 (8): 862-870
- [7] Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (4): 1 137
- [8] Forrester J, Fishbein M, Helfant R, et al. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. J Am Coll Cardiol, 1991, 17: 756-769

(此文编辑 胡必利)