

[文章编号] 1007-3949(2005)13-01-0037-03

• 实验研究 •

麝香保心丸对家兔血管球囊损伤后胶原增生的影响

谢春毅, 崔 嫵, 张家美, 劳晓翔
(上海市中西医结合医院心内科, 上海市 200082)

[关键词] 中药学; 麝香保心丸对胶原增生的影响; 球囊损伤; 分子杂交技术; 放射免疫法; 胶原; 麝香保心丸/药理作用

[摘要] **目的** 探讨血管球囊损伤后血清 I 型前胶原羧基端肽浓度和 iv 型胶原基因表达的变化及麝香保心丸对其影响。**方法** 将 45 只实验兔随机分为 3 组, 每组 15 只: 血管成形术组、血管成形术+ 麝香保心丸组及对照组。应用球囊拉伤动脉内膜加高脂饲养的方法建立兔髂动脉硬化模型并行球囊扩张血管成形术, 采用放射免疫法和核酸分子杂交技术对血清 I 型前胶原羧基端肽和髂动脉壁平滑肌细胞的 iv 型胶原基因的表达情况进行观察。**结果** 术后 1 周时血管成形术组血清 I 型前胶原羧基端肽较对照组水平增加(I 型前胶原羧基端肽为 9.54 ± 1.49 , $P < 0.05$), iv 型胶原基因表达增加, 经计算机图像辉度扫描定量分析结果为 (160 ± 12 , $P < 0.05$), 2、4 周时显著增加 ($P < 0.01$), (血清 I 型前胶原羧基端肽为 14.21 ± 2.67 和 15.63 ± 6.87 , iv 型胶原基因表达为 416 ± 16 和 438 ± 17), 血管成形术+ 麝香保心丸组血清 I 型前胶原羧基端肽无显著增加、iv 型胶原基因未表达。**结论** 血管内皮损伤可致 iv 型胶原合成增加, 麝香保心丸对其有抑制作用。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Effect of Musk Pill on Collagen Proliferation of Artery after Balloon Injury

XIE Chun-Yi, CUI Yan, ZHANG Jia-Mei, and LAO Xiao-Xiang

(Department of Cardiology, Shanghai Traditional and Chinese Medicine Integrated Hospital, Shanghai 200082, China)

[KEY WORDS] Balloon Injury; Musk Pill; Collagen

[ABSTRACT] **Aim** To study the changes of serum type I procollagen carboxyl terminal peptide (PIP) and the expression of type I collagen after balloon injury in rabbit and the effects of musk pill (MP) on it. **Methods** 45 rabbits were divided randomly into three groups: group of angioplasty (AP), group of AP plus musk pill (AP+ MP) and group of control. A reproducible rabbit model of atherosclerosis was established with cholesterol feeding after iliac artery injury induced by an inflated balloon and balloon angioplasty was carried out. The expression of type I collagen gene in the smooth cells (SMC) of the iliac artery and serum PIP was respectively observed by molecular hybridization and radioimmunoassay. **Results** The level of serum PIP increased (9.54 ± 1.49 , $P < 0.05$) in AP group compared with in control group. The expression of type I collagen (160 ± 12 , $P < 0.05$) in AP group increased compared with in control group one week after the operation, and markedly increased at 2 and 4 weeks after the operation ($P < 0.01$) (serum PIP: 14.21 ± 2.67 and 15.63 ± 6.87 , the expression of type I collagen: 416 ± 16 and 438 ± 17), while no expression of type I collagen in AP+ MP group. **Conclusion** These results suggest that iliac artery balloon injury may induce increase of type I collagen synthesis, which can be inhibited by MP.

经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)已成为冠心病心肌血管再通的重要手段,但术后头 6 个月再狭窄的发生率高达 30%~40%^[1],近年来,冠状动脉内支架的应用使再狭窄发生率有所下降,但仍超过 20%,这已成为影响其疗效的主要因素。PTCA 后再狭窄血管组织中胶原增生是引起病变的主要因素,其参与了再狭窄的形成过程^[2]。本实验观察兔

髂动脉血管成形术后动脉壁血管平滑肌(SMC)的 iv 型胶原基因表达及麝香保心丸(简称保心丸)对其影响。

1 材料与方法

1.1 家兔模型的建立

健康纯种新西兰大白兔 45 只,雌雄兼用,体重 2.0~2.5 kg,随机分为血管成形术(AP)组、血管成形术+ 麝香保心丸(简称保心丸)组及对照组,每组 15 只。对照组除不作手术处理及药物干预外,其余同另外两组。保心丸组于术前 3 d 至术后 4 周每天 6 粒麝香保心丸(上海中药一厂)加生理盐水口服。每只动物均高脂饲养(胆固醇 1 g/d,猪油 10 g/d),

[收稿日期] 2004-03-16

[修回日期] 2004-11-18

[作者简介] 谢春毅,医学博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,大内科主任,主要从事冠心病研究及其介入诊断、治疗和心脏起搏工作。崔嫵,主治医师,主要从事冠心病研究和介入工作。张家美,硕士研究生,主治医师,主要从事冠心病研究和介入工作。

饲养一周后行髂动脉内膜剥脱术。3%戊巴比妥钠静脉麻醉,沿股动脉走向作一纵切口,钝性分离股动脉,结扎远端,近端线拉阻断血流。在两线间剪一小切口,逆行插入PTCA球囊导管(Cordis公司产品),插入深度10~15 cm。向球囊内注入肝素生理盐水使其膨胀,并维持压力在4~6个大气压。缓慢回拉导管至切口处,回抽球囊内液体,使压力降为零。再将导管送入,重复上述过程三次。

1.2 球囊血管成形术

髂动脉内膜剥脱术后5~7周进行髂动脉造影。3%戊巴比妥钠静脉麻醉,颈正中切开,分离右颈总动脉,逆行插入5F造影导管,在X线透视下将造影导管送入腹主动脉中段,连接高压注射装置,用60%复方泛影葡胺行髂动脉造影;对局限性或弥漫性狭窄>50%的血管行球囊扩张术。在X线透视下将导引钢丝(直径0.36 mm)沿造影导管插入,使其通过狭窄部后撤出造影导管。沿导引钢丝插入PTCA球囊导管(球囊直径2.5 mm,长20 mm)至狭窄部,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压力升至4~6个大气压,持续1 min,抽出肝素生理盐水使压力降为零。重复上述过程三次,撤出球囊导管,再插入造影导管至腹主动脉中段,以相同条件重复髂动脉造影。

1.3 病理形态学检查

血管成形术后第1、2和第4周分别处死各组实验兔,剪开皮肤,分离血管,剪下髂股动脉,置于10%中性福尔马林中固定24 h,常规石蜡包埋,制成6 μm厚连续切片,分别以胶原纤维和弹力纤维染色后镜检查。

1.4 血清iv型前胶原羧基端肽的测定

通过放射免疫分析法测定血清iv型前胶原羧基端肽(PIP),药盒为美国INCSTAR公司生产。测定方法严格按照操作手册要求进行。

1.5 动脉壁总RNA的提取及杂交^[3]

处死各组实验兔,取出髂动脉,液氮研碎,每50~100 mg组织加入1 mL Trizol(美国生命技术公司的RNA抽提试剂)制成匀浆,15~30℃孵育5 min,加入氯仿(0.2 L/L Trizol)孵育2~3 min,3.2 kr/min 4℃离心15 min,取上清加入异丙醇(0.5 L/L Trizol)孵育10 min,3.2 kr/min 4℃离心10 min沉淀RNA,然后弃去异丙醇。用75%乙醇洗涤RNA沉淀,弃乙醇,真空干燥RNA,最后用无RNase的去离子水重新溶解RNA。

在AP组、保心丸组和对照组的实验兔中,分别

取一只兔的RNA编为一组,作甲醛变性电泳,Northern转膜,最后80℃烘烤固定,共制成5张膜。iv型胶原探针为cDNA片段,长为670 bp(由上海市消化所提供),探针采用随机引物地高辛标记法标记(德国宝灵曼公司的地高辛标记试剂盒),按试剂盒要求进行预杂交、杂交和显色。

1.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本的均数比较采用方差分析,多个样本均数间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 病理形态学结果

病理切片发现AP组管腔变窄,管壁增厚,内皮下组织增多,增厚,保心丸组管腔狭窄程度较AP组轻($P < 0.01$)。将病理切片进行计算机图象分析的结果见表1(Table 1)。

表1. 血管成形术后不同时间各组管腔面积大小的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2$)

Table 1. Comparison of the luminal area of artery in different time between every group

分 组	第1周末	第2周末	第4周末
对照组	30.5 ± 6.8	31.8 ± 7.1	31.1 ± 7.1
AP组	27.8 ± 9.9 ^a	19.8 ± 5.2 ^{ac}	17.4 ± 4.3 ^{ac}
保心丸组	28.8 ± 7.9 ^a	26.8 ± 7.0 ^{ab}	27.5 ± 7.4 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与AP组比较; c: $P < 0.01$, 与一周时比较。

2.2 血中I型前胶原羧基端肽检测结果

I型前胶原羧基端肽(PIP)在血管成形术后1周略有少量增加,术后第2和4周显著增加,而保心丸组PIP的增加被抑制,对照组中PIP未增加(表2, Table 2)。

表2. 血管成形术后不同时间各组血清PIP水平的比较($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$)

Table 2. Comparison of the level of serum PIP in different time between every group

分 组	第1周末	第2周末	第4周末
对照组	5.15 ± 0.64	7.48 ± 0.45	7.95 ± 1.78
AP组	9.54 ± 1.49 ^a	14.21 ± 2.67 ^{bc}	15.63 ± 6.87 ^{bc}
保心丸组	8.23 ± 1.81	9.01 ± 2.11	8.43 ± 2.76

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.01$, 与第1周末比较。

2.3 分子杂交结果

iv型胶原在血管成形术后 1 周略有少量表达, 术后 2、4 周表达显著增加, 而保心丸组 iv型胶原的表达被抑制, 在对照组中 iv型胶原未表达, 经计算机图像辉度扫描定量分析结果见表 3(Table 3)。

表 3. 血管成形术后不同时间各组 iv型胶原表达的比较($\bar{x} \pm s$, 辉度)

Table 3. Comparison of the level of expression of type I collagen in different time between every group

分 组	第 1 周末	第 2 周末	第 4 周末
对照组	109 $\pm$ 11	115 $\pm$ 16	105 $\pm$ 13
AP 组	160 $\pm$ 12 ^a	416 $\pm$ 16 ^{bc}	438 $\pm$ 17 ^{bc}
保心丸组	110 $\pm$ 13	120 $\pm$ 17	107 $\pm$ 18

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.01$, 与第 1 周末比较。

3 讨论

血管内皮剥脱模型被广泛用于研究再狭窄的发生机制。研究表明^[4]经高脂饲养的兔子, 动脉血管损伤后极易形成动脉粥样硬化, 主要是由血管平滑肌细胞迁移增生及血栓形成等因素造成。我们通过球囊拉伤血管内膜加高脂饲养的方法建立兔髂动脉粥样硬化模型及在此模型基础上建立血管成形术后的再狭窄模型, 经造影和病理形态学检查证实模型兔的成功。多年来, 对球囊血管损伤后血管壁的重构机制仍未完全了解, 尤其是对细胞外基质的作用知之甚少, 直到最近才有一些研究报道了细胞外基质在 PTCA 后再狭窄形成中所起的作用, 但多局限在病理形态学方面的研究。Coats 等^[5]发现在人冠状动脉再狭窄的病变中细胞成份仅占 11%, 而胶原成分约占 89%。其中 iv型胶原又是主要的亚型, 其占病变处胶原成分的 85% ~ 90%。在粥样硬化兔模型中血管成形术后 30 天时其血管蛋白成分中有 50% 以上是胶原。Strauss 等^[6]观察发现血管损伤后第 1、2 和第 4 周时胶原、弹力蛋白和糖蛋白的合成增加 4~ 10 倍, 伴随着合成的加快, 血管壁中胶原累积量也增加, 并与血管横截面积的增加相一致。有人认为血管成形术后胶原纤维的迅速沉积是再狭窄发生的关键因素。本实验结果提示在血管成形术后 1 周 iv型胶原即开始有少量表达, 至第 2 和第 4

周时表达显著增加, 且与病理结果相一致, 说明血管成形术后稍后阶段胶原的增加与再狭窄密切相关。该结果进一步支持了上述观点。本研究结果发现与 AP 组比较保心丸组管腔狭窄轻、PIP 水平较低、iv型胶原的表达被抑制, 提示麝香保心丸可抑制血管内皮损伤后 iv型胶原增生。麝香保心丸对血管壁的保护机理可能与其组分有关。它主要由麝香、人参、苏合香、蟾酥等中药组成, 麝香可作用于 β_1 受体, 人参可降血脂、减少氧自由基、抑制平滑肌细胞增生、其有效成分可拮抗血栓烷素 A₂、促进前列环素 I₂ 的形成、抑制血小板的聚集, 蟾酥有抗炎功能^[7]。但该药在抑制胶原增生方面的整体作用究竟是通过何种途径显效, 尚不明了。可能是通过降低血管紧张素 (Ang) 的水平, 研究已证实^[8-10]肾素—血管紧张素—醛固酮系统(RAS) 涉及胶原的增生。因此保心丸与肾素—血管紧张素—醛固酮系统的关系有待进一步研究。该药无明显毒副作用, 价格便宜, 本研究初步结果发现, 保心丸能抑制血管壁胶原增生, 对防治再狭窄有一定的研究价值。

[参考文献]

[1] Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *J Am Cardiol*, 2004, **44** (7): 1 373-385 Review

[2] Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburn MJ, Montiel C, et al. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1999, **17** (1): 107-114

[3] 李伊雄. 核酸的分离与纯化. 见: 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993; 206-218

[4] 刘立英, 文继舫, 涂江华, 钟志莲, 吴晋湘. Cariporide 对高脂饮食所致兔动脉粥样硬化的保护作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 1-5

[5] Coats, Jr. WD, Cheung DT, Han B, Rekhter MD. Balloon angioplasty significantly increases collagen content but does not alter collagen subtype I/III ratios in the atherosclerotic rabbit iliac model. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28** (2): 441-446

[6] Strauss BH, Chisholm RT, Kelley FW, Diez J. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res*, 1994, **75** (4): 650-658

[7] 史载祥, 陈可冀. 第二届中西医结合抗动脉硬化、血栓症及一级预防国际会议述要. *中国中西医结合杂志*, 1995, **15** (1): 62-63

[8] 申景平, 李瑞峰, 雷立权, 高广道. 心肌梗死大鼠心肌成纤维细胞对血管紧张素 II 的反应. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 115-117

[9] 曹政, 王家宁, 杨桂元, 李建军. 醛固酮促进血管紧张素 II 诱导大鼠心脏成纤维细胞合成胶原. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 135-138

[10] Goldstein S, Ali AS, Sabbah H. Ventricular remodeling. Mechanism and prevention. *Cardiol Clin*, 1998, **16** (4): 623-632

(此文编辑 胡必利)