

## 局部应用没食子儿茶素-3-没食子酸抑制移植静脉内膜增生

姜春力, 谷天祥

(中国医科大学附属第一医院心脏外科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 药理学; 茶多酚抑制移植静脉平滑肌细胞增殖; 异硫氰酸荧光素荧光标记; 内膜增生; 茶多酚; 移植静脉; 兔

[摘要] 目的 探讨局部应用没食子儿茶素-3-没食子酸对移植静脉内膜增生的抑制作用及其发生机制。方法 应用异硫氰酸荧光素荧光标记技术和高效液相色谱法体外定性和定量测定血管对没食子儿茶素-3-没食子酸的吸收情况。日本大耳白兔 20 只, 随机分为没食子儿茶素-3-没食子酸处理组和对照组 ( $n=10$ )。建立兔颈外静脉与颈内动脉间置移植模型, 移植前没食子儿茶素-3-没食子酸处理组血管在 0.1 g/L 没食子儿茶素-3-没食子酸中常温保存 1 h, 而对照组血管保存在生理盐水中。组织学方法测定移植三周后移植静脉血管新生内膜厚度、内膜中膜厚度比, 原位 DNA 断裂位点的 3'-羟基末端标记、Ki67 免疫组织化学染色测定新生内膜阳性细胞百分比。结果 0.1 g/L 没食子儿茶素-3-没食子酸中保存 1 h、2 h、4 h, 静脉血管的吸收量分别为  $2.9 \pm 0.9$  mg/g、 $5.8 \pm 2.1$  mg/g 和  $8.0 \pm 2.3$  mg/g, 分布在血管壁全层。两组移植血管术后 3 周的通畅率均为 90% (9/10)。移植术后 3 周没食子儿茶素-3-没食子酸处理组较对照组内膜厚度 ( $41.1 \pm 13.6$   $\mu$ m 比  $89.9 \pm 48.3$   $\mu$ m,  $P < 0.01$ ) 及内膜/中膜厚度比 ( $0.40 \pm 0.18$  比  $0.77 \pm 0.31$ ,  $P < 0.05$ ) 均显著降低, 新生内膜 Ki67 阳性染色平滑肌细胞百分比也显著下降 ( $22.4\% \pm 8.6\%$  比  $8.8\% \pm 2.4\%$ ,  $P < 0.05$ )。而凋亡细胞百分比 ( $0.40\% \pm 0.55\%$  比  $0.60\% \pm 0.89\%$ ,  $P > 0.05$ ) 无明显变化。结论 局部应用没食子儿茶素-3-没食子酸能够抑制移植静脉内膜增生, 可能与其抑制内膜平滑肌细胞增殖有关。

[中图分类号] R817

[文献标识码] A

## Locally Delivered Epigallocatechin-3-Gallate Inhibiting Intimal Hyperplasia in a Model of Vein Bypass Grafting

JIANG Chun-Li, and GU Tian Xiang

(Department of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Intimal Hyperplasia; Catechin; Vein Graft; Rabbits; Smooth Muscle Cells; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] Aim To examine the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on intimal hyperplasia in a vein graft model by local delivery. Methods Rabbit jugular vein segments were incubated in saline containing EGCG 0.1 g/L.

HPLC and FITC-labelled EGCG were used to assess the absorption characteristics of EGCG in vitro. Autogenous vein graft model was established in 20 rabbits which were randomly divided into two groups: EGCG group and control group. Vein grafts were incubated with EGCG or saline before arterial interposition grafting ( $n=10$ ). Animals were sacrificed 21 days later and intimal thickening (intimal thickness and intimal to medial ratio, I and I/M) was assessed by computerized digital morphometry. The proliferation and apoptosis of neointimal cells were determined by Ki67 staining and terminal deoxynucleotidyl transferase biotin nick end-labeling (TUNEL) method, respectively. Results At dose of 0.1 mg/L, the vein segments showed evidence of EGCG localization, EGCG was absorbed at levels of  $2.9 \pm 0.9$  mg/g,  $5.8 \pm 2.1$  mg/g and  $8.0 \pm 2.3$  mg/g after incubation for 1 h, 2 h and 4 h, respectively. All animals survived until the time of harvest, and there was 1 closed case respectively in two study groups. The EGCG group showed a significant reduction in neointimal formation at 21 days compared with the control condition ( $41.1 \pm 13.6$   $\mu$ m vs  $89.9 \pm 48.3$   $\mu$ m,  $P < 0.01$  and  $0.40 \pm 0.18$  vs  $0.77 \pm 0.31$ ,  $P < 0.05$ ). Immunohistochemical analysis of Ki67 also indicated decreased rate of positive smooth muscle cells in the EGCG group ( $22.4\% \pm 8.6\%$  vs  $8.8\% \pm 2.4\%$ ,  $P < 0.05$ ). Cell apoptosis was not different in two groups ( $0.40\% \pm 0.55\%$  vs  $0.60\% \pm 0.89\%$ ,  $P > 0.05$ ).

Conclusions These results indicate that the local delivery of EGCG prevent intimal hyperplasia in a rabbit vein bypass grafting model through inhibition of neointimal smooth muscle cells proliferation.

虽然冠状动脉旁路手术(CABG)中应用动脉桥

的比例在逐渐上升, 但大隐静脉桥仍然是目前应用最多的血管桥。静脉桥术后易发生以血管平滑肌细胞增殖及间质沉积为特征的内膜增生, 进而发生再狭窄或闭塞, 严重的限制了其应用。多年来, 人们为解决这一难题, 进行了许多尝试, 但目前仍然没有好

[收稿日期] 2005-02-26

[修回日期] 2005-11-20

[作者简介] 姜春力, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为冠状动脉外科的基础与临床, E-mail 为 jiangchunli@hotmail.com。谷天祥, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为房颤、冠状动脉外科的基础与临床。

的解决办法<sup>[1]</sup>。作为绿茶提取物中主要成分的没食子儿茶素-3-没食子酸 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG), 体外研究证实其低浓度可抑制血管平滑肌细胞增殖, 高浓度引起细胞凋亡<sup>[2]</sup>。在大鼠的动脉成形术模型中, 局部或全身应用 EGCG, 均收到了抑制动脉内膜增生的效果<sup>[3,4]</sup>。本文拟探讨局部应用 EGCG 对移植静脉内膜增生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 没食子儿茶素-3-没食子酸体外吸附定性实验

日本大耳白兔 3 只, 无菌条件下游离右侧颈外静脉内侧支, 长约 2.5 cm, 血管取出后放入 1:1 浓度的异硫氰酸荧光素标记 EGCG (0.1 g/L, PFI 公司, 日本) 中, 常温保存 1 h, 生理盐水漂洗 3 次后, OCT 包埋, 干冰冷冻固定。制成 5  $\mu$ m 冰冻切片, NIKON ECLIPSS E600 (NIKON 株式会社, 日本) 显微镜下观察绿色荧光的分布情况。

### 1.2 没食子儿茶素-3-没食子酸体外吸附定量实验

血管取材同上, 室温条件下将血管放入 2 mL EGCG 0.1 g/L 生理盐水溶液中保存 4 h。采用高效液相色谱法测定保存液中 EGCG 浓度的变化。以下述公式计算保存 1 h、2 h、4 h 静脉段吸收的 EGCG 量。EGCG 吸附量 =  $2 \times (100 - \text{各时间点溶液中 EGCG 浓度}) / \text{血管质量}$ 。

### 1.3 动物模型的建立

雄性日本大耳白兔 20 只, 2.5~3.5 kg, 购自中国医科大学动物部, 苯巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉注射, 氯胺酮 70 mg/kg 肌注麻醉, 手术期间, 间断给予苯巴比妥钠维持。无菌条件下, 取颈部正中切口, 游离截取右侧颈外静脉约 2.5 cm。将实验兔随机分为两组 ( $n=10$ ), 实验组血管放入 0.1 g/L EGCG 生理盐水溶液中室温保存 1 h; 对照组静脉则置于生理盐水中保存。游离同侧颈总动脉, 将保存后的颈外静脉两端倒置, 在 OME-KA-1 (OLYMPUS, 日本) 手术显微镜下与颈总动脉行端端吻合, 9-0 尼龙线连续缝合<sup>[5]</sup>。检查无出血后, 局部生理盐水冲洗, 缝合切口。正常饮食喂养。

### 1.4 指标观测

1.4.1 静脉桥标本的取材 全身肝素化后, 胸部正中切口, 16F 套管针升主动脉插管, 过量苯巴比妥钠处死动物, 阻断降主动脉, 然后经此套管灌注肝素生理盐水溶液 (100 mmHg) 300~500 mL 后, 再灌注 10% 中性福尔马林约 300 mL。最后将移植静脉剪下置于 10% 中性福尔马林中固定 24 h, 常规脱水、石

蜡包埋、切片。

1.4.2 内膜增生程度的测定 静脉桥中段连续 5  $\mu$ m 切片 4 张, 间距 0.5 mm, 弹性纤维 (VG) 染色, 显微镜下 ( $\times 20$ ) 观察拍照, NIKON ECLIPSS E600 显微镜下采集图像应用八点定位法, Scion Image4.02 软件分析, 计算内膜和中膜厚度及内膜中膜厚度比。取平均值作为该血管标本的标准数值。

1.4.3 新生内膜细胞增殖和凋亡的免疫组织化学染色 各组随机取 5 根静脉血管, 中段石蜡包埋标本, 5  $\mu$ m 切片, 脱蜡至水, 参照试剂盒说明, 采用生物素标记、TAB 显色 TUNEL 标记法 (凋亡检测试剂盒, Dako) 检测新生内膜凋亡细胞数量, Ki67 (Dako, 鼠抗, SP 法) 免疫组织化学染色测定细胞增殖情况, 高倍镜 (400 倍, 0.221 mm<sup>2</sup>/每视野) 下计数内膜细胞中阳性染色细胞百分比, 每张切片取 5 个视野, 每一标本取 3 张切片, 计数平均值。 $\alpha$ -actin (sc7210, Santa Cruz 公司) 抗体染色识别血管平滑肌细胞。

### 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$ , 组间比较采用  $t$  检验, 百分数的比较采用  $\chi^2$  一致性检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 静脉血管壁没食子儿茶素-3-没食子酸的分布

保存后 1 h、2 h、4 h 静脉血管的 EGCG 吸收量分别为  $2.9 \pm 0.9$  mg/g、 $5.8 \pm 2.1$  mg/g 和  $8.0 \pm 2.3$  mg/g。吸收量随保存时间延长逐渐增加。EGCG 荧光标记检测发现, 生理盐水保存 1 h 血管中膜弹性纤维背景弱荧光, 而 EGCG 0.1 g/L 保存 1 h 血管全层可见强绿色荧光, 以内皮细胞、外膜为显著 (图 1, Figure 1)。

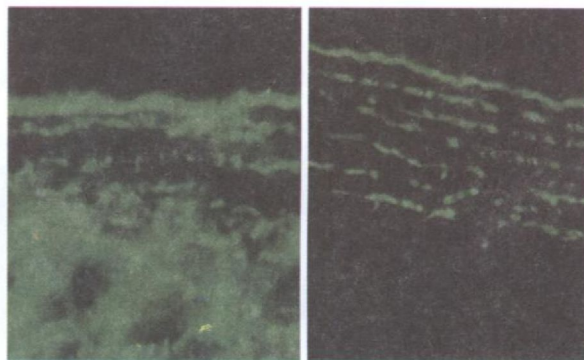


图 1. 应用异硫氰酸荧光素标记没食子儿茶素-3-没食子酸在静脉血管壁的分布情况 ( $\times 400$ , 内膜面朝上) 左为没食子儿茶素-3-没食子酸处理组, 右为对照组。

Figure 1. The distribution of FITC-labelled EGCG in vein graft



## 2.2 移植静脉的内膜增生

移植血管 3 周后, 两组各有一只血管闭塞, 通畅率为 90%, 两组比较无显著性差异。术后 4 周 EGCG 处理组内膜厚度为  $41.4 \pm 13.6 \mu\text{m}$ , 对照组为  $89.9 \pm 48.3 \mu\text{m}$ , 约降低 54% ( $P < 0.01$ ); EGCG 处理组内膜中膜厚度比为  $0.40 \pm 0.18$ , 显著低于对照组的  $0.77 \pm 0.31$  ( $P < 0.05$ )。图 2 (Figure 2)。

## 2.3 新生内膜细胞增殖和凋亡

EGCG 处理组和对照组血管新生内膜中可见细胞核 Ki67 染色阳性细胞, 细胞核呈棕黄色、褐色, 阳性细胞百分比分别为  $22.4\% \pm 8.6\%$  和  $8.8\% \pm 2.4\%$ , 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 见图 3 (Figure 3)。这些增殖的细胞  $\alpha$ -actin 染色阳性, 证实为血管平滑肌细胞。两组血管内膜凋亡细胞百分比分别为  $0.40\% \pm 0.55\%$  和  $0.60\% \pm 0.89\%$ , 无显著性差异。

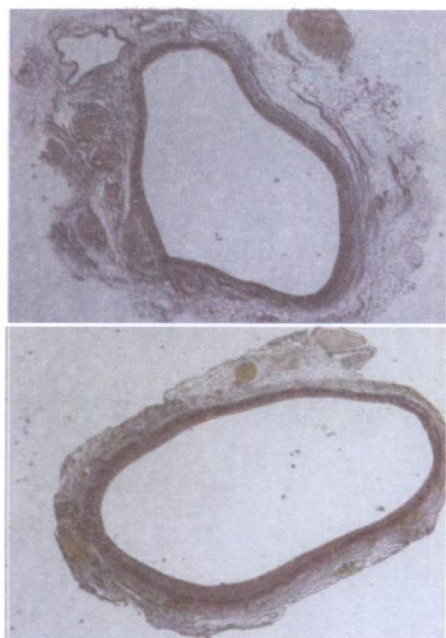


图 2. 术后 3 周移植静脉石蜡切片弹力纤维染色 ( $\times 50$ )

上为没食子儿茶素-3-没食子酸处理组, 下为对照组。

Figure 2. Paraffin section of vein grafts stained by Van Gieson 3 weeks after surgery

## 3 讨论

本研究表明, 体外局部短时间应用 EGCG, 能够抑制移植静脉血管平滑肌细胞增殖, 明显降低术后 3 周血管内膜增生程度, 使得内膜厚度以及内膜和中膜厚度的比值均显著下降, 抑制内膜厚度增生达 54%。这一结果与应用 EGCG 防治动脉成形术后再狭窄的实验结果类似<sup>[3,4]</sup>。它提示, 在血管保存期

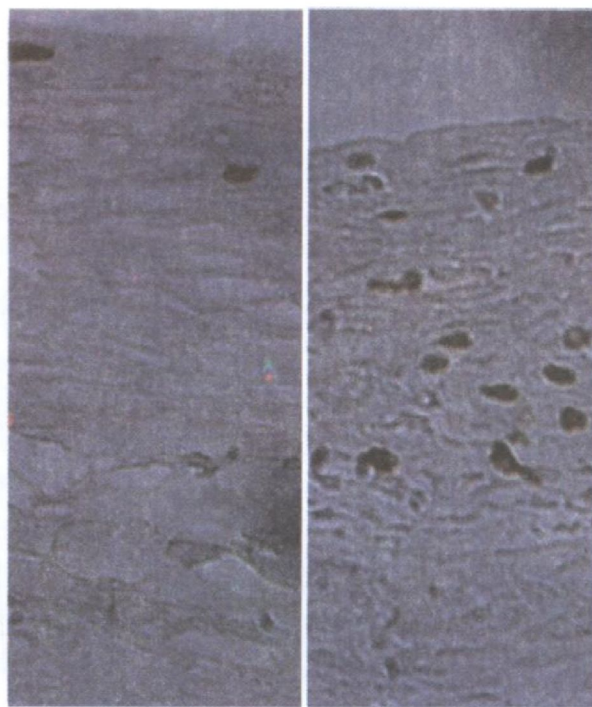


图 3. 移植静脉内膜细胞 Ki67 免疫组织化学染色 ( $\times 400$ , 内膜面朝上) 左为没食子儿茶素-3-没食子酸处理组, 右为对照组。

Figure 3. The results of Ki67 immunohistologic staining in neointima of vein grafts

间, 给予特定的预处理, 足以防治术后远期内膜增生、再狭窄。这段时间, 可能成为有效干预血管病理重构的重要阶段。

静脉血管移植后, 一系列分子和细胞事件的结果, 就是先出现血管内皮细胞、平滑肌细胞的坏死、凋亡, 然后形成以血管平滑肌细胞过度增殖、细胞外基质沉积为特征的内膜增生, 其确切发生机制不清, 因而目前尚缺乏有效的治疗, 成为制约静脉血管桥应用的关键因素<sup>[1]</sup>。EGCG 是绿茶中的主要成分, 研究表明其具有抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等多种作用<sup>[2]</sup>。离体研究证明, 培养液中加入 EGCG, 能够明显抑制血小板生长因子、低密度脂蛋白等诱导的血管平滑肌细胞增殖<sup>[2,6]</sup>, 80 mg/L EGCG 还能够引起增殖的血管平滑肌细胞凋亡<sup>[2]</sup>。Ki67 蛋白是细胞增殖的标志, 且较增殖细胞核抗原更为特异<sup>[7]</sup>, 本研究选用 Ki67 阳性细胞百分数作为衡量细胞增殖的指标。研究发现, 短时间应用 100 mg/L 处理血管, 就能够抑制术后 3 周的血管平滑肌细胞增殖, 提示 EGCG 可能作用于平滑肌细胞增殖的始动环节, 抑制了随后由于血流动力学、体液因素和缺血再灌注损伤等因素引起的平滑肌细胞增殖。而这一

始动环节,可能开始于静脉血管未移植之前,即在血管的游离过程和/或保存过程中。有研究证实体外保存1 h的犬大隐静脉有丝分裂原激活蛋白激酶的活性明显增加,这些酶的激活与移植后血管平滑肌细胞的增殖、凋亡、重构等相关,参与内膜增生的病理生理过程,可能是始动环节中的关键因素<sup>[8]</sup>。本研究局部应用EGCG处理血管是否可通过干预有丝分裂原激活蛋白激酶的激活而发挥抑制血管平滑肌细胞增殖的作用,则尚需进一步研究。体外应用较高浓度的EGCG处理对细胞凋亡没有影响,这一结果可能与单一时点观察、体内体外实验不同等因素有关。

没食子儿茶素-3-没食子酸(EGCG)为双歧性物质,容易为血管组织摄取,离体荧光标记试验结果证实了这一点。体外长期保存人大隐静脉的研究结果表明EGCG还具有吸收迅速而解离缓慢的特性,它可结合到血管间质的胶原蛋白上,产生类似缓释的效果而发挥较长期的作用<sup>[9]</sup>。这一特性有利于其应用于临床,因为临床上,静脉血管移植前保存的时间平均较短,在1 h左右<sup>[8]</sup>。本研究结果发现,0.1 g/L EGCG处理1 h,血管摄取量在2.9 mg/g左右,这个量可以抑制内膜增生,表明局部给予EGCG的方案

是可行的,既可避免全身应用的副反应,又可降低治疗成本,有潜在的临床应用价值。

#### [参考文献]

- [1] Kent KC, Liu B. Intimal hyperplasia still here after all these years. *Ann Vasc Surg*, 2004, **18** (2): 135-137
- [2] Hofmann CS, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of proliferating vascular smooth muscle cells via activation of p53. *FASEB*, 2003, **17** (6): 702-704
- [3] Kim DW, Park YS, Kim YG, Piao H, Kwon JS, Hwang KK, et al. Local delivery of green tea catechins inhibits neointimal formation in the rat carotid artery injury model. *Heart Vessels*, 2004, **19** (5): 242-247
- [4] 欧阳平, 彭文烈, 谢晋国, 屠燕, 刘伊丽, 徐安龙. 绿茶多酚对大鼠颈动脉损伤后血管新生内膜增殖的影响. *中药材*, 2005, **28** (7): 589-590
- [5] 黄东, 梁春, 罗育坤, 张红旗, 贾剑国, 王克强, 等. 兔自体静脉移植粥样硬化模型的建立. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (1): 96-99
- [6] Locher R, Emmanuele L, Suter PM, Vetter W, Barton M. Green tea polyphenols inhibit human vascular smooth muscle cell proliferation stimulated by native low-density lipoprotein. *Eur J Pharmacol*, 2002, **434** (1-2): 1-7
- [7] Kibbe MR, Tzeng E, Gleixner SL, Watkins SC, Kovacs I, Lizonova A, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human inducible nitric oxide synthase in porcine vein grafts inhibits intimal hyperplasia. *J Vasc Surg*, 2001, **34** (1): 156-165
- [8] Bizelik C, Pintucci G, Derivaux CC, Saponara F, Kim JH, Hyman KM, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases during preparation of vein grafts and modulation by a synthetic inhibitor. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **126** (3): 659-665
- [9] Han DW, Park YH, Kim JK. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. *J Biotechnol*, 2004, **110** (2): 109-117

(此文编辑 文玉珊)