

白藜芦醇对损伤动脉再内皮化和内膜增生的影响

顾俊¹, 王长谦², 张大东¹, 范华骅³, 何奔⁴, 王彬尧⁴, 黄定九⁴

(1. 上海瑞金医院集团闵行医院, 上海市 201100; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市 200092;

3. 上海市血液中心血液工程研究室, 上海市 200051; 4. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市 200001)

[关键词] 病理学和病理生理学; 白藜芦醇调节内皮祖细胞动员; 免疫组织化学法; 白藜芦醇; 内皮剥脱; 内皮祖细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨白藜芦醇对大鼠主动脉内膜剥脱后内皮修复、内膜增生的影响及其潜在机制。方法 54 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组($n=9$)、对照组($n=15$)、小剂量[$10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]白藜芦醇组($n=15$)和大剂量[$50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]白藜芦醇组($n=15$)。术前 2 周至动物处死期间经灌胃器给药; 术后 1 周、2 周分别应用 (1)因子检测和伊文思蓝染色评价各组损伤血管内皮修复情况; 术后 2 周、4 周采用 HE 染色观察内膜增生情况; 采用逆转录聚合酶链反应及免疫组织化学法评价术后 1 周、4 周损伤血管的内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白水平的表达; 体外分离、培养大鼠外周血内皮祖细胞, 并采用免疫组织化学法进行鉴定; 通过倒置荧光显微镜计数双阳性细胞以评价各组术后 1 周的外周循环内皮祖细胞数量。结果 $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 白藜芦醇明显促进术后 1 周及 2 周的内皮修复, 而 $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 不能; $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 白藜芦醇显著抑制术后 2 周、4 周的内膜增生, 而 $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 只能抑制术后 4 周的内膜增生, 且效果不如前者; $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 白藜芦醇明显促进损伤血管的内皮型一氧化氮合酶 mRNA 水平和蛋白水平的表达, 而 $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 组与对照组无明显差异; 与对照组相比, $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 白藜芦醇显著升高术后 1 周的外周血内皮祖细胞数量 (32.46 ± 6.52 比 21.58 ± 3.69 , $P<0.05$), 而 $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 白藜芦醇无明显差异 (22.48 ± 6.89 比 21.58 ± 3.69 , $P>0.05$)。结论 小剂量白藜芦醇可上调损伤血管内膜的内皮型一氧化氮合酶表达、促进内皮祖细胞动员、加快内皮修复及抑制内膜增生; 而大剂量白藜芦醇只能抑制术后 4 周的内膜增生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Resveratrol on Reendothelialization and Neointimal Formation in Intimal Injury Model

GU Jun, WANG Chang-Qian, ZHANG Da-Dong, FAN Hua-Hua, HE Ben, WANG Bing-Yao, and HUANG Ding-Jiu

(Department of Cardiology, Minhang Hospital, Shanghai Ruijin Hospital Group, Shanghai 201100, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; Endothelium Denudation; Endothelial Progenitor Cell; Atherosclerosis; Reendothelialization; Mobilization

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of resveratrol on reendothelialization and intimal hyperplasia in balloon injured aorta of rat and its potential mechanism. **Methods** 54 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group ($n=9$), placebo-treated group ($n=15$), small dose resveratrol [$10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] group ($n=15$) and large dose resveratrol [$50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] group ($n=15$). Rats were gavaged with resveratrol or placebo 2 weeks before balloon injury until sacrificed. At 1 and 2 weeks after endothelium denudation, (1)factor immunohistochemical staining and Evans blue staining were used to measure the reendothelialized area. Neointimal formation was determined by HE staining at 2 and 4 weeks after operation. At 1 and 4 weeks after artery injury, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein expression were assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. Endothelial progenitor cells (EPC) were isolated and cultured from rat peripheral blood, which were identified by immunohistochemistry, then the amount of EPC at 1 week after balloon injury were measured by counting DiI-acLDL/FITC-UEA-1 double positive cells in inverted fluorescence microscope. **Results** $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ resveratrol significantly accelerated reendothelialization at 1 and 2 weeks after balloon injury, $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ could not. $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ resveratrol markedly inhibited neointimal formation at 2 and 4 weeks after operation, however, $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ only reduced neointimal formation at 4 weeks after operation, which was not as effective as previous one. The expressions of eNOS mRNA and protein were potently enhanced in $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ resveratrol group, but not in $50\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ group. $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ resveratrol also significantly increased the amount of EPC in rat peripheral blood at 1 week after operation compared with placebo-treated group (32.46 ± 6.52 vs 21.58 ± 3.69 , $P<0.05$), while

[收稿日期] 2006-04-24

[修回日期] 2006-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金(30170365)项目

[作者简介] 顾俊, 硕士, 医师, 研究方向为内皮祖细胞在冠心病中的应用, E-mail 为 forrestgu@126.com。通讯作者王长谦, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 weqian@hotmail.com。张大东, 主任医师, 教授, 研究方向为冠心病的介入治疗。

the results of 50 mg/kg group did not reach statistical difference (22.48 ± 6.89 vs 21.58 ± 3.69 , $P > 0.05$). **Conclusions**

Small dose resveratrol could markedly increase the expression of eNOS, enhance the mobilization of EPC as well as accelerate reendothelialization and reduce neointimal formation compared with placebo-treated group. However, large dose resveratrol only attenuated the intimal hyperplasia at 4 weeks after operation.

高脂饮食的法国人群保持较低冠心病发病率(法兰西奇迹)归因于其饮用适量的红葡萄酒,而白藜芦醇是红葡萄酒中起心血管保护作用的主要成分,研究发现其具有包括抗氧化、抗炎症、抗血小板聚集、抗增殖以及降脂在内的多种生物活性。近年来其在心血管疾病中所具有的保护作用日益受到重视,特别是在心脏缺血再灌注损伤过程中的保护作用,其机制与促进内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)表达有关^[1]。有文献报道白藜芦醇能抑制血管损伤后新生内膜的形成^[2],但有关其对内皮损伤后再内皮化的影响及其可能机制国内外尚未见报道,本研究拟对此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

54只SD雄性大鼠(250~350g)购自中科院上海实验动物中心;白藜芦醇(纯度99.34%)购自上海纳贝生物公司;伊文思蓝(沃凯)购自国药集团上海试剂公司;人纤维连接蛋白购自美国Chemicon公司;重组人血管内皮生长因子165(VEGF165)以及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自以色列Cytolab公司;M199购自美国Gibco公司;胎牛血清购自北京鼎国生物公司;牛脑提取物、Histopaque 10831淋巴细胞分离液、FITC标记荆豆凝集素iv(FITC-UEA-iv)均购自美国Sigma公司;DiI荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购自美国Molecular Probe公司;多克隆血管内皮生长因子受体2(VEGFR-2, Flk-1)和eNOS抗体购自美国Santa Cruz公司;多克隆(11)因子抗体购自美国Siget公司;HRP标记的山羊抗兔以及山羊抗小鼠二抗均购自美国GeneTech公司;逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)采用MJ Research PTC-200 PCR仪。

1.2 动物分组

实验共分4组:假手术组($n=9$)、对照组($n=15$)、10 mg/(kg·d)白藜芦醇组($n=15$)和50 mg/(kg·d)白藜芦醇组($n=15$),白藜芦醇溶于10%乙醇中,假手术组和对照组给予10%乙醇;于术前2周开始经灌胃器灌药,至动物处死为止。

1.3 大鼠主动脉内皮剥脱模型制作

以40 mg/kg戊巴比妥腹腔麻醉大鼠,常规消毒、

铺巾,剪开颈部皮肤2~3 cm,依次分离皮下组织、肌肉,并暴露气管,在气管左侧游离左颈总动脉1~1.5 cm,远端结扎,近端用动脉钳夹闭后,于颈动脉远端做一切口,将2F导管(美国Edward公司)插入约10 cm至腹主动脉,注入生理盐水0.1 mL使球囊扩张,然后回拉至左锁骨下动脉与胸主动脉交界处,抽尽生理盐水重新送入球囊,共重复3次,结扎左颈总动脉,缝合皮下组织和皮肤,术后大鼠自由进食、饮水;假手术组不插入球囊,其余操作相同。

1.4 伊文思蓝染色

参照文献[3],于术后2周大鼠经40 mg/kg戊巴比妥腹腔麻醉后,经股静脉注入2.5%伊文思蓝1.5 mL,30 min后处死,快速取出大鼠主动脉观察动脉修复情况,随后每个标本中取下两段1 cm长血管段作常规固定、包埋、切片、HE染色,观察损伤血管内膜增厚情况。

1.5 病理学检查

于术后1周和4周麻醉处死动物,快速取损伤胸主动脉中下段(分别取两段1 cm长血管段),常规固定、包埋、切片行病理学检查。术后4周进行HE染色观察血管内膜增生情况;免疫组织化学法检测损伤血管内膜在术后1周(11)因子的表达以及术后1周、4周eNOS的表达,步骤为切片脱腊至水,3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶10 min,抗原修复20 min,多克隆eNOS和(11)因子抗体分别以1:200和1:40稀释度参与反应,其余按免疫组织化学二步法操作。以上病理切片在Nikon ECLIPSE 80i显微镜下,经Nikon Digital camera DXM1200F数码相机及Nikon ACT-1软件拍照,用Image Pro 5.0软件(Media Cybernetics公司)计算HE染色的内膜/中膜面积比以及血管内膜的积分光密度值。

1.6 逆转录聚合酶链反应

按照Trizol RNA提取试剂盒(Invitrogen公司)说明书,分别提取术后1周和4周大鼠损伤血管组织总RNA,取0.5 μg总RNA行RT-PCR(Promega公司)检测eNOS的表达;引物源自文献[4]:eNOS(189 bp)正义为5'-TGC ACC CTT CCG GGG ATT CTG GCA-3',反义为5'-GGA TCC CTG GAA AAG GCG GTG AGG-3';β-actin(314 bp)正义为5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AA-3',反义为5'-AGC CAT GCC AAA TGT GTC AT-3'。eNOS的RT-PCR反应条件为45℃

逆转录 45 min, 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s → 65 °C 退火 45 s → 70 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 70 °C 延伸 10 min; β -actin 退火温度调整为 55 °C, 其余相同。各取 PCR 产物 4 μ L, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (95 V, 45 min), 电泳后在 Image Master VDS 凝胶成像系统 (Pharmacia Biotech) 扫描拍照, 以 Band Scan 5.0 (Glyko 公司) 软件计算 PCR 产物电泳灰度值, 并以 β -actin 的灰度值进行校正。

1.7 大鼠内皮祖细胞的分离和培养

大鼠以 40 mg/kg 戊巴比妥腹腔麻醉后开腹, 经下腔静脉取血 5~10 mL (肝素抗凝), 采用密度梯度离心法分离单个核细胞: 大鼠外周血经 PBS (Gibco, pH 7.2) 1:1 稀释充分混匀后, 沿管壁加在 Histopaque 10831 淋巴细胞分离液上, 2 000 r/min 离心 20 min, 将中间白色云雾层吸出, 再用 PBS 洗 2 遍, 细胞悬浮于培养基中并用台盼蓝计数。将分离的外周血单个核细胞置于 Fibronectin 铺板 (2 μ g/cm²) 的盖玻片上, 添加 10 μ g/L 血管内皮生长因子和 2 μ g/L bFGF 的 M199 培养基 (含 20% 胎牛血清、牛脑提取物 12 mg/L、青霉素 100 ku/L、链霉素 100 ku/L) 于 37 °C、5% CO₂ 环境下培养; 培养至第 4 天用 PBS 洗去未贴壁细胞、换液, 继续培养至第 7 天。

1.8 大鼠内皮祖细胞的鉴定和计数

采用免疫组织化学法进行内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 鉴定。将培养在盖玻片上的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 分别与 1:100 的 Flk-1、eNOS 抗体在 4 °C 孵育 24 h, PBS 清洗 3 遍, 然后与辣根过氧化物酶结合的二抗在室温条件下共同孵育 30 min, PBS 清洗 3 遍, 镜下控制 DAB 显色。细胞与 10 mg/L DiI-acLDL 37 °C 孵育 4 h, 然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 浸洗, 将 10 mg/L FITC-UEA-iv 加入上述标本于 37 °C 下孵育 1 h, 激光

共聚焦显微镜 (LSM510, Zeiss) 鉴定 UEA-iv 和 DiI-acLDL 双阳性细胞, 即为正在分化的 EPC^[5,6]。倒置荧光显微镜对 DiI-acLDL/FITC-UEA-iv 双荧光染色细胞进行计数。

1.9 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。采用 SPSS 11.5 统计软件。

2 结果

2.1 大鼠的基本情况

各组大鼠的体重及手术时间无明显差异。

2.2 白藜芦醇对损伤血管内皮修复的影响

术后 2 周, 10 mg/(kg·d) 白藜芦醇组与对照组相比内皮修复率明显提高, 而 50 mg/(kg·d) 白藜芦醇组与对照组相比无明显差异 (表 1 和图 1); 术后 1 周, 10 mg/(kg·d) 白藜芦醇组 α 1 因子的表达量明显高于对照组, 而 50 mg/(kg·d) 白藜芦醇组与对照组无明显差异 (表 2 和图 2)。

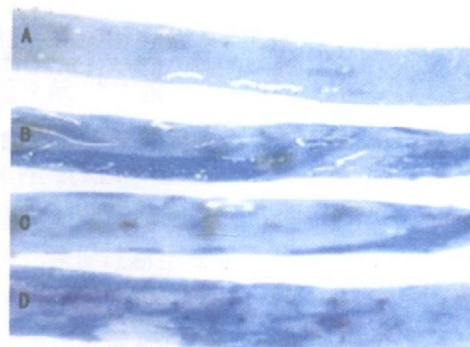


图 1. 伊文思蓝染色 A 为假手术组, B 为对照组, C 为小剂量白藜芦醇组, D 为大剂量白藜芦醇组。

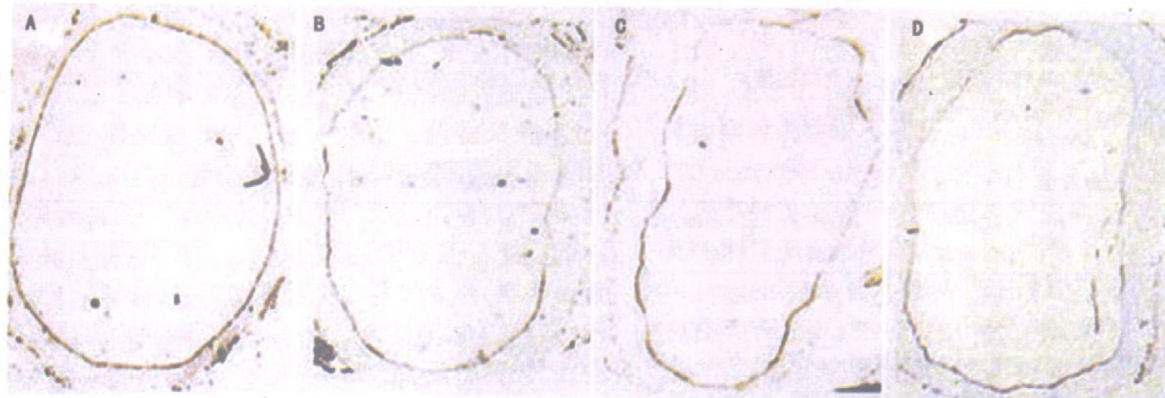


图 2. 术后 1 周大鼠主动脉内膜 α 1 因子染色 ($\times 40$) A 为假手术组, B 为对照组, C 为小剂量白藜芦醇组, D 为大剂量白藜芦醇组。

2.3 白藜芦醇对损伤血管内膜增生的影响

10 mg/(kg·d) 白藜芦醇明显抑制术后 2 周及 4 周的内膜增生, 而 50 mg/(kg·d) 组只能抑制术后 4 周的内膜增生, 且效果不及 10 mg/(kg·d) 白藜芦醇组(表 1 和图 3)。

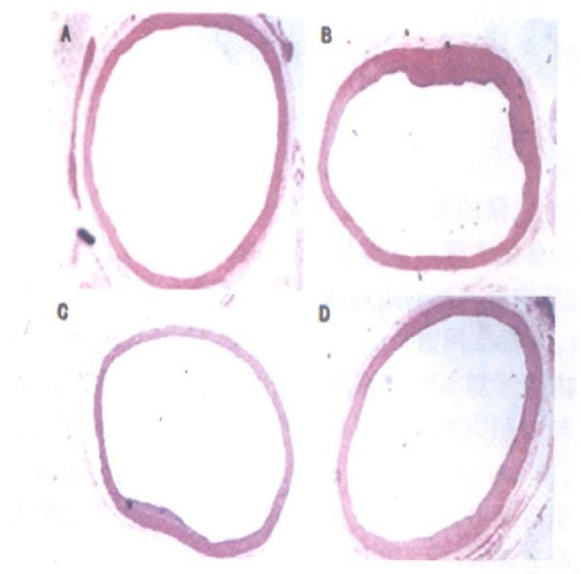


图 3. 术后 4 周大鼠主动脉 HE 染色 (×40) A 为假手术组, B 为对照组, C 为小剂量白藜芦醇组, D 为大剂量白藜芦醇组。

2.4 白藜芦醇对损伤血管内皮型一氧化氮合酶表达的影响

术后 1 周及 4 周, 10 mg/(kg·d) 白藜芦醇促进损

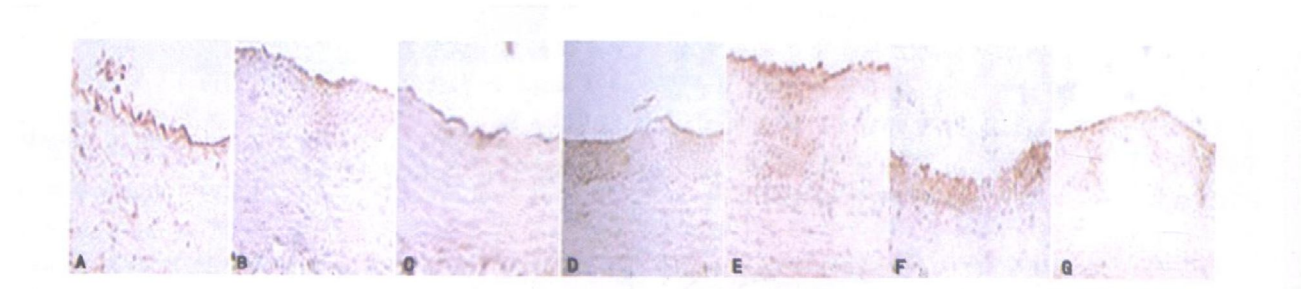


图 5. 大鼠主动脉内膜内皮型一氧化氮合酶的表达 上图为术后 1 周, 下图为术后 4 周; A 为假手术组, B 和 E 为对照组, C 和 F 小剂量白藜芦醇组, D 和 G 为大剂量白藜芦醇组。

表 2. 积分光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	VIII 因子 (术后 1 周)	eNOS (术后 1 周)	eNOS (术后 4 周)
假手术组	3	110737 ± 19573	116684 ± 18183	125678 ± 11928
对照组	5	44683 ± 11484	41899 ± 11438	113421 ± 16848
小剂量白藜芦醇组	5	65921 ± 11944 ^a	64432 ± 9146 ^a	158430 ± 19884 ^a
大剂量白藜芦醇组	5	37470 ± 9100	47987 ± 11562	117191 ± 10783

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

伤血管 eNOS 的表达, 而 50 mg/(kg·d) 白藜芦醇则不能(表 3 和图 4); 10 mg/(kg·d) 白藜芦醇促进损伤血管内膜 eNOS 蛋白水平的表达, 50 mg/(kg·d) 白藜芦醇无明显作用(表 2 和图 5)。

表 1. 术后内皮修复和内膜增生情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	内皮修复比 (术后 2 周)	内膜/中膜 (术后 2 周)	内膜/中膜 (术后 4 周)
对照组	0.5839 ± 0.0583	0.2332 ± 0.0553	0.3383 ± 0.0369
小剂量白藜芦醇组	0.8083 ± 0.0765 ^b	0.0888 ± 0.0389 ^a	0.1532 ± 0.0694 ^b
大剂量白藜芦醇组	0.6376 ± 0.1025	0.1939 ± 0.1269	0.2429 ± 0.0491 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

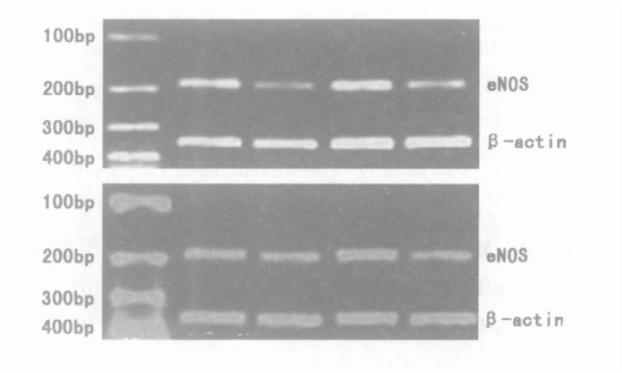


图 4. 逆转录聚合酶链反应 上图为术后 1 周, 下图为术后 4 周; M 为 DNA marker, 1 为假手术组, 2 为对照组, 3 为小剂量白藜芦醇组, 4 为大剂量白藜芦醇组。

表 3. 术后内皮型一氧化氮合酶的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	术后 1 周	术后 4 周
假手术组	0.7086 ± 0.1419	0.5812 ± 0.1502
对照组	0.3084 ± 0.1104	0.5376 ± 0.1077
小剂量白藜芦醇组	0.6594 ± 0.0874 ^b	0.8041 ± 0.1960 ^a
大剂量白藜芦醇组	0.3783 ± 0.0243	0.4877 ± 0.0725

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.5 大鼠内皮祖细胞的鉴定

大鼠外周血单个核细胞培养至第 7 天时呈梭形内皮样细胞, 大部分细胞呈阳性(图 6)。

2.6 大鼠内皮祖细胞计数

术后 1 周, 10 mg/(kg·d) 白藜芦醇组外周血 EPC 数量明显高于对照组, 50 mg/(kg·d) 白藜芦醇组与对照组无明显差异, 对照组与假手术组相比 EPC 数量有明显上升(表 4 和图 7)。

表 4. 术后 1 周内皮祖细胞数量 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	EPC 数量
假手术组	3	14.6 ± 2.1
对照组	4	21.6 ± 3.7 ^a
小剂量白藜芦醇组	4	32.5 ± 6.5 ^b
大剂量白藜芦醇组	4	22.5 ± 6.9

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

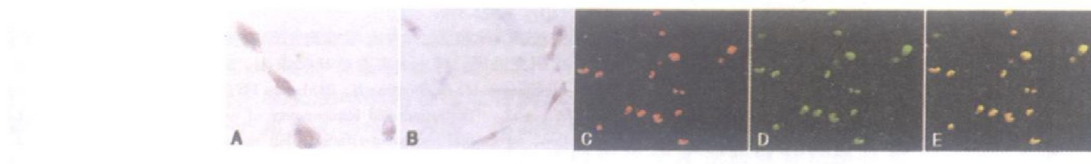


图 6. 大鼠内皮祖细胞鉴定 A 为 Flk-1 免疫组织化学结果 (×400); B 为内皮型一氧化氮合酶免疫组织化学结果 (×400), C 为 DiI-acLDL 染色 (×200), D 为 FITC-UEA-iv 染色 (×200), E 为 DiI-acLDL/FITC-UEA-iv 双荧光染色 (×200)。

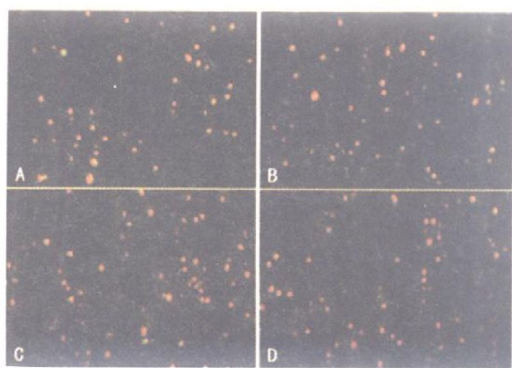


图 7. 大鼠外周血内皮祖细胞计数 (×100) A 为假手术组, B 为对照组, C 为小剂量白藜芦醇组, D 为大剂量白藜芦醇组。

3 讨论

自从 1997 年^[7]首次成功从外周血液中分离出 EPC 以来, 大量研究表明其具有向内皮细胞分化、促进新生血管生成、改善缺血肢体血供、促进心肌梗死后侧枝循环的形成及加快血管损伤后的内皮修复等作用; 近期报道使用 EPC 移植^[8]、药物骨髓动员 EPC^[9]或 EPC 捕获支架^[10]等方法都可促进损伤血管内皮修复及抑制新生内膜生成^[11]。本研究中, 我们成功分离培养了大鼠外周血 EPC, 并且发现对照组大鼠外周血 EPC 数量明显高于假手术组, 推测血管内皮损伤后机体可能存在自身动员 EPC 的反应; 但由于自身动员后外周循环中 EPC 含量仍甚少, 因此如何通过其它方法更有效地刺激 EPC 动员是急需解决的问题之一。

研究表明不少药物能够体内动员或体外扩增 EPC, 如他汀类^[12]、PPAR γ 受体激动剂^[13]、雌激素^[9]、葛根素等; 而其中多数药物动员 EPC 的机制涉及 eNOS 表达上调^[9, 12, 13]。研究指出 eNOS 是 EPC 从骨髓动员至外周血过程中不可或缺的^[14]。目前已有许多文献^[1, 15-18]报道了白藜芦醇能在体外及体内促进 eNOS 的表达, 特别是其能依次促进 iNOS-VEGF-VEGFR 2(KDR)-eNOS 的表达而抑制心脏缺血再灌注损伤^[1]以及上调 VEGF、Flk-1、eNOS、iNOS 等基因的表达来促进新生血管生成、改善心肌梗死后心功能的恢复^[18, 19]; 本实验的目的是观察白藜芦醇能否上调损伤血管 eNOS 的表达以及促进术后 EPC 的动员。

目前影响 eNOS 表达的白藜芦醇剂量范围较大, 研究指出体外小剂量(10~ 100 nmol/L)^[16]和大剂量(10~ 100 μ mol/L)^[15]白藜芦醇均促进 eNOS 的表达, 体内研究主要使用较小剂量(1~ 10 mg/kg)^[1, 17-19]上调 eNOS 的表达, 而大剂量白藜芦醇在体内能否上调 eNOS 的表达鲜有报道。因此, 本研究尝试在体内同时观察较小剂量[10 mg/(kg·d)]和较大剂量[50 mg/(kg·d)]对损伤血管 eNOS 表达的影响; 结果发现小剂量能够促进损伤血管内膜 eNOS 的表达, 而大剂量无明显作用。

此外, 我们进一步分析了各组动物的外周循环 EPC 水平以及术后损伤血管的内皮修复及内膜增生情况, 结果发现小剂量白藜芦醇能明显促进外周循环 EPC 数量的上升, 加快损伤血管内皮的修复以及抑制内膜的增生, 结合 eNOS 的检测结果我们提出

两种假设: 小剂量白藜芦醇和他汀类等药物一样, 可以通过上调 eNOS 的表达而促进 EPC 骨髓动员, 两者协同修复损伤血管; ④小剂量白藜芦醇分别通过上调 eNOS 的表达以及动员 EPC 从而促进内皮修复和抑制内膜增生, 其促进 EPC 动员是非 eNOS 介导的, 其确切机制有待深入研究。而大剂量未能增加外周循环 EPC 数量及促进损伤血管内皮修复, 只能抑制术后 4 周内膜增生, 且效果不如小剂量, 推测这可能与未能上调损伤血管 eNOS 的表达有关, 关于其不依赖 eNOS 抑制内膜增生机制, 可能与白藜芦醇下调内皮素 1 表达、抑制胞外信号调控激酶活化^[20] 以及上调肿瘤抑制基因 P53 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 P21 的表达^[21], 从而抑制细胞增殖的机制有关。上述结果表明体内对于心血管系统起保护作用的可能是低剂量的白藜芦醇, 这与动物心肌梗死模型中起保护作用的剂量相似^[18, 19]。

综上所述, 小剂量白藜芦醇可上调 eNOS 表达、促进 EPC 动员, 加快内皮修复及抑制内膜增生; 而大剂量白藜芦醇只能抑制术后 4 周的内膜增生。上述结论可能是白藜芦醇具有心血管系统保护作用的机制之一, 值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart[J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, **42** (5-6): 281-289
- [2] Zou JG, Huang YZ, Cao KJ, Yang GP, Yin H, Len J, et al. Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model[J]. *Life Sciences*, 2000, **68**: 153-163
- [3] Yoshida T, Kiuchi K, Nejima J, Kudo M, Asano G, Takano T. Expression of endothelin-1 after endothelial denudation of thoracic aortas in experimental hypercholesterolemic rats[J]. *J Nippon Med Sch*, 2000, **67** (5): 342-351
- [4] Cheng X, Cheng XS, Kuo KH, Pang CC. Inhibition of iNOS augments cardiovascular action of noradrenaline in streptozotocin induced diabetes[J]. *Cardio-vasc Res*, 2004, **64** (2): 298-307
- [5] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (7): 3 422-427
- [6] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2001, **89** (1): E1-7
- [7] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, **275** (5302): 964-967
- [8] Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy[J]. *Circulation*, 2003, **108** (21): 2 710
- [9] Iwakura A, Luedemann C, Shastri S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury[J]. *Circulation*, 2003, **108** (25): 3 115-121
- [10] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **45** (10): 1 574-579
- [11] 宋筱筱, 傅国胜. 内皮祖细胞与经皮冠状动脉介入术后再内皮化治疗研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 175-178
- [12] Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2004, **110** (14): 1 933-939
- [13] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, Smitko PE, Weisel RD, Fedak PW, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: A new paradigm in glitazone pleiotropy[J]. *Circulation*, 2004, **109** (11): 1 392-400
- [14] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rühm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthases for mobilization of stem and progenitor cells[J]. *Nat Med*, 2003, **9** (11): 1 370-376
- [15] Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2002, **106** (13): 1 652-658
- [16] Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, Sumarasekera WK, et al. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (9): 7 460-468
- [17] Miatello R, Vazquez M, Renna N, Cruzado M, Zumino AP, Risler N. Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats[J]. *Am J Hypertens*, 2005, **18** (6): 864-870
- [18] Fukuda S, Kaga S, Zhan L, Bagchi D, Das DK, Bertelli A, et al. Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2006, **44** (1): 43-49
- [19] Kaga S, Zhan L, Matsumoto M, Maulik N. Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor[J]. *J Moll Cell Cardiol*, 2005, **39** (5): 813-822
- [20] Chao HH, Juan SH, Liu JC, Yang HY, Yang E, Cheng TH, et al. Resveratrol inhibits angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, **515** (1-3): 1-9
- [21] Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2[J]. *Cancer Res*, 1999, **59** (11): 2 596-601

(此文编辑 文玉珊)