

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0816-03

益气活血中药对糖尿病动脉粥样硬化家兔血管平滑肌细胞凋亡及 Bcl-2 表达的影响

刘春梅¹, 周涛¹, 张大伟¹, 徐娜娜²

(1. 山东中医药大学附属医院周围血管病科, 山东省济南市 250011;

2. 济南市第五人民医院普外科, 山东省济南市 250022)

[关键词] 内科学; 益气活血中药; 糖尿病动脉粥样硬化; 平滑肌细胞; 细胞凋亡; Bcl-2

[摘要] 目的 探讨益气活血中药对糖尿病动脉粥样硬化家兔血管平滑肌细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2 表达的影响。方法 选用新西兰家兔, 利用静脉注射胰岛 β 细胞毒剂四氧嘧啶, 继以高糖高脂饲料复制家兔糖尿病动脉粥样硬化模型, 随机分为模型组、小剂量中药治疗组、大剂量中药治疗组和正常对照组, 实验 12 周后, 处死家兔, 观察主动脉内膜的病理形态学改变, 采用流式细胞术检测凋亡率以及凋亡相关基因 Bcl-2 表达。结果 模型组与正常对照组比较, 动脉内膜出现典型的斑块, 动脉管腔极度狭窄, 平滑肌细胞凋亡率明显增高 ($13.89\% \pm 1.53\%$ 比 $2.36\% \pm 0.76\%$, $P < 0.01$), Bcl-2 表达降低 (22.04 ± 1.38 比 30.48 ± 0.68 , $P < 0.01$)。中药治疗组与模型组比较, 主动脉斑块缩小, 动脉管腔狭窄减轻, 平滑肌细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达上调 ($P < 0.05$), 且大剂量中药治疗组优于小剂量中药治疗组。结论 益气活血中药拮抗糖尿病动脉粥样硬化形成的机制可能与上调 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制血管平滑肌细胞凋亡有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Nourishing Qi and Promoting Blood Herbs on the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell and Expression of Bcl-2 in Rabbit Model with Atherosclerosis and Diabetes

LIU Chur-Mei¹, ZHOU Tao¹, ZHANG Da-Wei¹, and XU Na-Na²

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011; 2. The General Surgery of People's NO. 5 Hospital, Jinan 250022, China)

[KEY WORDS] Nourishing Qi and Promoting Blood Herbs; Atherosclerosis; Diabetes; Smooth Muscle Cell; Apoptosis; Bcl-2

[ABSTRACT] **Aim** To approach the effect of nourishing qi and promoting blood herbs on the apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) and expression of Bcl-2 in rabbit model with arteriosclerosis and diabetes. **Methods** By injecting teroxyprymidine intravenous and breeding high glucose and grease animal feeds, the rabbit animal with arteriosclerosis and diabetes can be obtained. The models were divided into three groups randomly: model group, large dose and low dose treatment group, controlled with the normal group. After 12 weeks, all the animals were killed. The pathomorphology of intima of aorta were observed, and the apoptotic rate and expression of Bcl-2 were detected by flow cytometry. **Results** In the model group the apoptotic rate of smooth muscle cell was higher than that in the normal group ($P < 0.01$), but the expression of Bcl-2 was lower ($P < 0.01$). The visible atheromatous plaque which caused the serious stenosis were observed in model group. In the treatment group the apoptotic rate of smooth muscle cell was lower than that in the model group ($P < 0.01$), but the expression of Bcl-2 was higher ($P < 0.01$), the atheromatous plaque were decreased, and the stenosis were reduced, which were more obvious in the large dose treatment group than in the low dose treatment group. **Conclusion** The nourishing qi and promoting blood herbs can influence the apoptosis of VSMC and expression of Bcl-2 in rabbit model with arteriosclerosis and diabetes. The herbs have the better treatment on the diabetic arteriosclerosis obliterans.

糖尿病血管病变是糖尿病常见的并发症之一,

据统计其中大血管疾病发生率为 33.5%, 其主要病理变化是在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)基础上并发血栓形成^[1]。本研究通过建立糖尿病动脉粥样硬化家兔模型, 探讨血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的凋亡在糖尿病血管病变中的作用以及益气活血中药的干预影响。

[收稿日期] 2007-02-01 [修回日期] 2007-10-20

[基金项目] 山东省中医药科技计划项目(2005-175)

[作者简介] 刘春梅, 博士, 主治医师, 从事中西医结合周围血管病学的研究, E-mail 为 lcmzyw@163.com。周涛, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中西医结合周围血管病学的研究。张大伟, 博士研究生, 主治医师, 从事中西医结合周围血管病学的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新西兰家兔 48 只, 雄性, 体重 1.5~2.0 kg, 由山东省农学科学院实验动物中心提供。动物合格证号为 20040013。

1.2 中药制备

按照益气活血法则, 选择代表性药物黄芪、当归、地龙和水蛭(制), 按 3:2:1:1 比例配制, 黄芪和当归水提, 地龙和水蛭超微粉碎至破细胞壁水平, 然后加入到水提液中, 浓缩成 800 g/L 溶液。

1.3 模型制备

参照有关造模方法, 先以胰岛 β 细胞毒剂四氧嘧啶静脉注射 (100 mg/kg), 造成轻度胰岛损伤, 继以喂食高糖高脂饲料 (30% 蔗糖、15% 蛋黄粉、5% 猪油、0.5% 胆固醇及基础饲料) 的方法建立糖尿病动脉粥样硬化动物模型。以模型家兔连续 2 次空腹血糖大于 6.7 mmol/L, 胆固醇及甘油三酯水平显著升高, 动脉内膜粥样斑块突起, 中膜明显钙化, 为模型制备成功^[2]。

1.4 动物分组

将实验家兔在实验环境下给予基础饲料常规饲养 1 周。随机分为 4 组, 各组均为 10 只, 各组均加 20% 脱落率, 共 48 只。正常对照组 (基础饲料 + 5 mL/kg 蒸馏水灌胃), 不行胰岛 β 细胞损伤, 其余家兔形成四氧嘧啶糖尿病模型后随机分为 3 组, 模型组 (高糖高脂饲料 + 5 mL/kg 蒸馏水灌胃), 大剂量中药组 (高糖高脂饲料 + 实验药物 10 mL/kg 灌胃)、小剂量中药组 (高糖高脂饲料 + 实验药物 3 mL/kg 灌胃), 6 周后确认模型成功后, 继续观察给药 6 周, 然后取各组实验动物的主动脉血管组织进行检测。

1.5 主动脉病理形态学观察

取家兔胸主动脉至腹主动脉全长, 沿腹侧剖开, 剪去外膜附着组织, 内膜面向上, 平铺固定于滤纸, 10% 福尔马林固定后置苏丹染液中浸泡 30 min, 观察主动脉形态变化; 取一部分继用 10% 福尔马林固定, 石蜡切片, HE 染色, 观察主动脉病理变化。

1.6 流式检测样品的制备及检测方法

取胸主动脉 1 cm, 70% 乙醇固定, 剥取中膜, 剪碎, 用胰酶消化法收集平滑肌细胞悬液。(1) 取 1×10^9 个/L 或单分散细胞悬液各 1.0 mL, 分别加入 1:100 稀释的 Bcl-2 单克隆抗体各 0.1 mL, 混匀后放入 37°C 水浴 30 min。(2) 分别加入 PBS 缓冲液 5 mL 混匀, 离心 (1 000 r/min) 洗涤 2 次, 弃上清液。(3) 分别加入 1:50 的羊抗鼠 FITC-IgG 0.1 mL 进行荧光染

色, 37°C 水浴温育 30 min, 重复步骤 (2) 二次。(4) 分别加入 1 mL PBS 混匀, 经 400 目铜网过滤后上机检测。采用美国 BD 公司生产的 FACSCalibur 流式细胞仪, 光源为 2 W 氩离子激光器, 工作功率 300 mW, 激发波长 488 nm, 对平滑肌细胞凋亡以及凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白表达进行检测, 数据采集为对数方式, 测量的数据输入 HP300. Consort30 计算机, 应用相应的软件进行资料处理。

1.7 统计学处理

检验及分析过程在 SAS 8.1 标准统计软件包上进行。全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析进行数据处理。

2 结果

2.1 大体标本观察

模型组家兔动脉内膜表面可见较厚的脂斑形成, 呈弥漫性隆起, 凹凸不平, 动脉管腔明显狭窄; 中药治疗组家兔动脉内膜表面仅见局限性的脂斑形成, 不平滑, 管腔轻度狭窄, 且大剂量中药组优于小剂量中药组。

2.2 主动脉病理检查

模型组家兔主动脉内膜明显增厚隆起, 多处被破坏, 不完整, 平滑肌细胞核固缩明显, 弹力纤维排列紊乱, 断裂, 可见成堆的泡沫细胞; 小剂量中药组家兔主动脉内膜局部轻度增厚, 破坏较轻, 尚连续, 平滑肌细胞核固缩, 弹力纤维排列紊乱, 但无明显断裂, 可见少量的泡沫细胞; 大剂量中药组家兔主动脉内膜较完整, 平滑肌细胞核固缩, 弹力纤维排列较整齐, 可见有少量的泡沫细胞 (图 1)。

2.3 血管平滑肌细胞凋亡率和 Bcl-2 的表达

模型组家兔 VSMC 凋亡率显著增高, Bcl-2 基因蛋白表达降低, 与正常对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。中药治疗组与模型组比较, VSMC 凋亡率下降, Bcl-2 基因蛋白表达增加 ($P < 0.05$ 或 0.01 , 表 1)。

表 1. 各组血管平滑肌细胞凋亡率和 Bcl-2 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率	Bcl-2(荧光道数)
正常对照组	10	2.36% \pm 0.76%	30.48 \pm 0.68
模型组	10	13.89% \pm 1.53% ^a	22.04 \pm 1.38 ^a
小剂量中药组	10	11.56% \pm 0.53% ^b	27.93 \pm 3.18 ^b
大剂量中药组	10	10.38% \pm 0.83% ^c	29.11 \pm 0.66 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

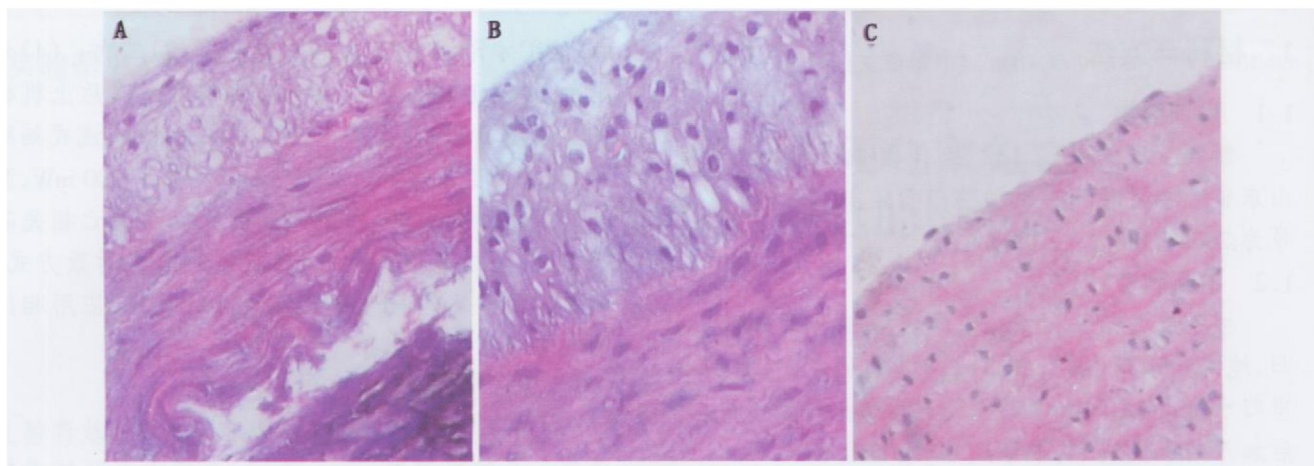


图 1. 实验兔主动脉病理切片图(×400) A 为模型组, B 为小剂量中药组, C 为大剂量中药组。

3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMC)的过度增殖与过度凋亡是构成As斑块的主要病理基础。近年研究认为,细胞凋亡可能是As病变中细胞死亡的主要方式,VSMC凋亡失调和凋亡小体清除不足可能是加剧As发展的重要因素。Han等^[3]认为细胞凋亡在As过程中始终存在,凋亡细胞主要来源于巨噬细胞和平滑肌细胞,大量平滑肌细胞凋亡后,凋亡的细胞不能及时清除,发生继发性坏死,细胞内的脂质释放并堆积形成脂质池。Hegyí等^[4]发现原发性As病变中细胞数量较少而凋亡小体较多,提示脂质核心的形成可能是细胞凋亡活性大于增殖活性的结果。Bcl-2基因蛋白与细胞凋亡关系最密切,Bcl-2通过和结合体ApoB-1作用抑制细胞凋亡,延长细胞寿命,使细胞数目增加,上调Bcl-2基因表达,引起细胞增殖,下调其表达,促进细胞凋亡^[5,6]。Saxena等^[7]研究表明,在严重的As斑块中,以VSMC为主的Bcl-2和Bcl-x1等基因表达量极少或缺如。本实验结果发现,糖尿病动脉粥样硬化模型组与正常对照组比较,动脉管腔明显狭窄,脂斑形成广泛,动脉内膜增厚,平滑肌细胞核固缩,可见成堆的泡沫细胞;VSMC凋亡率显著增高,抗凋亡基因蛋白Bcl-2表达显著下降。由此表明糖尿病动脉粥样硬化VSMC凋亡的发生率较正常者明显增高。

糖尿病血管病变主要由糖尿病(消渴)久治不愈、正气不足、气阴两虚和脉络瘀阻所致,属于中医“脱疽”等范畴。本实验通过糖尿病动脉粥样硬化家

兔模型的复制,针对其气虚血瘀、本虚标实的特点,选用益气活血中药黄芪、当归、水蛭和地龙进行整体治疗,从根本上改善其阴阳气血不足、经络阻塞和血行不畅等病理变化,探讨益气活血中药对VSMC凋亡及凋亡相关基因蛋白Bcl-2表达的影响。研究结果发现,中药治疗组与模型组比较,动脉管腔狭窄减轻,脂斑局限,动脉内膜及中膜破坏较轻,只有少量的泡沫细胞;VSMC凋亡率明显下降,抗凋亡基因蛋白Bcl-2表达增加,且大剂量组优于小剂量组。由此说明益气活血中药拮抗糖尿病动脉粥样硬化形成的机制可能与上调Bcl-2基因蛋白的表达,抑制VSMC凋亡有关。

[参考文献]

- [1] 郁正亚. 糖尿病合并下肢血管病变和缺血性糖尿病足的血管重建[J]. 国外医学·外科学分册, 2003, 30(2): 107-109.
- [2] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003;
- [3] Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147: 267-277.
- [4] Hegyí L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(4): 423-429.
- [5] 邹飞雁, 杨和平, 涂玉林, 杨永宗. 动脉粥样硬化与平滑肌细胞凋亡的研究进展[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 1997, 5(1): 75-78.
- [6] 司艳红, 王家富. 动脉粥样硬化与平滑肌细胞凋亡的调控[J]. 中国临床康复, 2005, 47(9): 118-120.
- [7] Saxena A, McMeekin JD, Thomson DJ. Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens [J]. *J Pathol*, 2002, 196(3): 335-342.

(此文编辑 许雪梅)