

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0775-03

· 抗氧化专栏 ·

## 普罗布考对兔颈动脉血管成形术后血管内膜生长因子的影响及其对再狭窄的干预作用

梅斌, 章军建, 刘煜敏

(武汉大学中南医院神经科, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 药理学; 血管成形术; 普罗布考; 胰岛素样生长因子 1受体; 血管内皮生长因子

[摘要] 目的 研究普罗布考对兔颈动脉血管成形术后血管内膜生长因子表达的影响及其对再狭窄的干预作用。方法 将 32只普通级大耳白兔随机分为高胆固醇组 and 普罗布考组。喂养 1周后以球囊损伤颈总动脉, 分别用高胆固醇食物及普罗布考粉剂饲养 8周后处死, 切取颈总动脉, HE染色观察血管管腔面积和内膜面积的变化, 用免疫组织化学法检测胰岛素样生长因子 1受体和血管内皮生长因子的表达。结果 与高胆固醇组相比, 普罗布考组管腔面积明显扩大 ( $P < 0.01$ ), 内膜面积明显减少 ( $P < 0.05$ ), 胰岛素样生长因子 1受体和血管内皮生长因子表达明显减少 ( $P < 0.01$ )。结论 普罗布考显著减轻兔颈动脉血管成形术后再狭窄的形成, 抑制胰岛素样生长因子 1受体和血管内皮生长因子的表达。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effect of Probucol on Restenosis and Growth Factors After Balloon Angioplasty in Rabbits Carotid Artery

MEI Bin, ZHANG Jun-Jian and LIU Yu-Min

(Department of Neurology, the Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

[KEY WORDS] Balloon Angioplasty; Probucol; Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of probucol on the prevention of restenosis after balloon angioplasty in hypercholesterolaemic rabbits and to examine the expression of growth factor. **Methods** 32 white rabbits were randomly divided into high cholesterol diet group ( $n = 16$ ) and probucol group ( $n = 16$ ), after one week of diet all rabbits were injured on carotid artery by balloon angioplasty. Carotid artery tissues were harvested at 8 weeks after injury by balloon. During 8 weeks the rabbits were fed with hypercholesterolaemic diet and probucol. The areas of lumen of blood vessel, intima and elastic fibers dying were observed by HE staining and the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were examined by immunohistochemical method. **Results** Compared with the high cholesterol diet group, the lumen areas of the probucol group were larger ( $P < 0.01$ ), the intimal areas were smaller ( $P < 0.05$ ), and the expression of IGF-1R and VEGF significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions**

Probucol can prevent the restenosis of rabbits' carotid artery from balloon angioplasty injury, and inhibit the expression of IGF-1R and VEGF.

研究发现, 不同生长因子间可以相互作用影响彼此的表达, 形成一个复杂的网络, 而胰岛素样生长因子 1受体 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在其中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。普罗布考原是具有调血脂能力的抗氧化剂, 但是近年来的研究显示普罗布考具有抑制血管平滑肌细胞增殖

的作用。本研究旨在通过动物实验评价普罗布考对血管成形术后再狭窄的干预作用及其对生长因子的影响, 从而为防治再狭窄提供实验基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

普通级大耳白兔, 雌雄各半, 体重  $2.5 \pm 0.5$  kg 由武汉大学医学部实验动物中心供给。家兔饲养和实验均在普通级动物实验室内进行。普罗布考粉剂由齐鲁制药有限公司提供。

#### 1.2 分组

将家兔随机分为高脂饮食组、高脂饮食 + 普罗

[收稿日期] 2008-08-02 [修回日期] 2008-09-20

[作者简介] 梅斌, 主治医师, 博士研究生, 研究方向脑血管病及介入治疗。Email为 meibin@163.com。章军建, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管病及神经心理学。刘煜敏, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病及介入治疗。

布考组, 每组 16 只。

### 1.3 模型的建立

分别将两组家兔普通饲料适应性喂养 1 周, 再用高脂饲料 (2% 胆固醇、6% 花生油和 92% 普通颗粒饲料) 喂养 1 周, 肌肉注射速眠新 ① 全身麻醉, 麻醉效果不满意时, 局部注射 1% 利多卡因。常规暴露并游离颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉, 丝线结扎颈外动脉远端, 由颈外动脉向颈内动脉插入 2F 球囊导管, 使球囊置于颈总动脉的起始部, 加压, 压力 2 Pa (压力器为 ENCORE), 然后将球囊缓慢拉出, 重复操作 3 次后将气囊取出, 结扎颈外动脉, 放开颈总动脉夹, 切口撒入庆大霉素预防感染, 逐层缝合创口, 并于大腿股四头肌注射青霉素, 连续 3 天。术后两组分别高脂饲料喂养、高脂饲料 + 普罗布考喂养。由于普罗布考为脂溶性, 不溶于水, 须与脂类食物调和在起使动物一同食入才能保证有效药量的摄入。本研究先用 10 g 猪油拌在兔食表面, 然后将普罗布考撒在普罗布考组兔食中拌匀, 剂量 200 mg / (kg · d)。为保持两组间脂类摄入量相同, 每组兔食中拌入等量猪油, 所有动物高脂饮食饲养时间为 8 周。

### 1.4 标本的留取

8 周后用气栓法处死动物, 以适当压力灌注肝素生理盐水, 颈内动脉远端插管引流冲洗管内血液, 再用 10% 甲醛溶液按同样方法灌注 30 min, 原位固定血管, 确保拉伤血管保持原有在体时的形态, 防止取材和病理标本制作造成血管变形, 便于进行血管形态学分析。原位固定后, 按插管深度分别取颈总动脉血管 2 cm 及相邻的正常血管 1 cm 置于 10% 甲醛溶液中进一步固定, 每支血管平均分成 3 段, 常规石蜡包埋。

### 1.5 HE 染色及图像分析

石蜡切片常规处理后, 进行 HE 染色, 在 40 倍、100 倍光镜下进行拍照。用计算机辅助组织形态测量仪测量新生内膜面积、最大内膜厚度和血管腔面积, 每个标本测 3 个血管环, 取平均值。

### 1.6 免疫组织化学检测

石蜡切片 3 张, 切片厚度 4 μm, 用 SP 法分别进行 IGF-1R (NeoMarkers 公司) 和 VEGF (福州迈新公司) 免疫组织化学检测。每张切片在 LEICA 全自动图像分析系统上随机计算 10 个 40 倍物镜视野中阳性细胞数和细胞总数, 计算阳性细胞百分率。

### 1.7 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 形态学改变

普罗布考组颈总动脉新生内膜面积、最大内膜厚度明显低于高脂饮食组, 颈总动脉管腔面积明显高于高脂饮食组 ( $P < 0.05$  表 1 和图 1)。

### 2.2 阳性细胞百分率比较

两组 IGF-1R 和 VEGF 阳性颗粒表达主要集中在内膜, 中膜和外膜逐渐减少。与高脂饮食组比较, 普罗布考组 IGF-1R 和 VEGF 阳性细胞百分率显著减少 ( $P < 0.01$ ; 表 2 和图 2)。

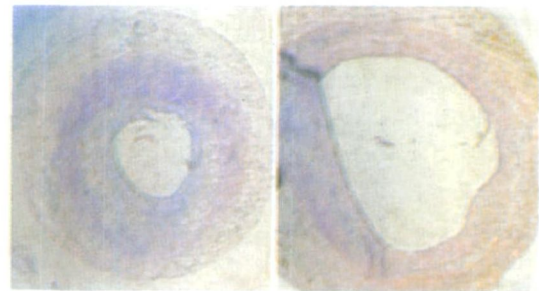


图 1 颈动脉 HE 染色 ( $\times 50$ ) 左为高脂饮食组, 右为普罗布考组。

表 1 颈总动脉管腔横截面组织形态学比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

分 组	n	新生内膜面积	最大内膜厚度	血管腔面积
高脂饮食组	15	3.11 ± 0.14	0.36 ± 0.04	0.44 ± 0.16
普罗布考组	15	1.91 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.13 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$  与高脂饮食组比较。

表 2 阳性细胞百分率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	IGF-1R 阳性细胞百分率	VEGF 阳性细胞百分率
高脂饮食组	15	40.18% ± 7.80%	54.29% ± 8.52%
普罗布考组	15	21.88% ± 7.76% <sup>a</sup>	24.42% ± 7.19% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$  与高脂饮食组比较。



图 2 免疫组织化学染色 ( $\times 200$ ) 上为高脂饮食组, 下为普罗布考组。

### 3 讨论

颈动脉狭窄是引起缺血性脑卒中的主要原因,一方面颈动脉狭窄可使大脑血流减少,另一方面狭窄部位可产生大量栓子,栓子脱落可造成脑梗死。为了解除颈动脉狭窄,目前主要采取两种治疗方法,一种是颈动脉内膜切除术,另一种是经皮腔内血管成形术及支架植入术。但是由于经皮腔内血管成形术和支架植入术或颈动脉内膜切除术治疗颈动脉狭窄都是一种创伤性治疗,因此,在狭窄解除后所面临的最大的问题就是预防血管再狭窄,再狭窄形成机制主要包括平滑肌细胞增殖、内膜增生以及血管损伤和内膜增生的再塑形过程。内膜增生在其中起着关键作用。内膜增生过程主要包括血管平滑肌细胞的迁移、增殖、表型转变和细胞外基质的合成及分泌等过程。最近的研究显示,IGF-1系统在其中起重要作用,IGF-1系统包括IGF、IGF-1R和多种结合蛋白。IGF-1可以促进血管平滑肌细胞和内皮细胞的迁移和转化,其作用主要是通过IGF-1R实现的,并受到多种结合蛋白的调控<sup>[2]</sup>。研究显示,与正常动脉相比,再狭窄动脉斑块血管平滑肌细胞中IGF-1R mRNA的表达增加<sup>[4]</sup>。用特异性抗体选择性阻滞IGF-1R可以抑制平滑肌细胞增殖和迁移,而用反义DNA技术减少IGF-1R数目可以抑制血管平滑肌细胞对IGF-1的增生反应。以上研究提示IGF-1R参与了血管再狭窄的过程。VEGF在内膜增殖中的作用尚未完全明确,有研究认为VEGF可以促进内膜增生,导致再狭窄和动脉粥样硬化的发生<sup>[5,6]</sup>。VEGF可通过影响IGFBP-3、4及5表达间接调控IGF-1R的作用<sup>[7]</sup>。而IGF-1R可以通过影响IGF-1的作用介导细胞表达VEGF mRNA<sup>[8]</sup>。普罗布考最初作为降脂药应用于临床,具有降低血清胆固醇的作用。近年来研究发现,当血管受到损伤后,普罗布考具有强大的抗再狭窄作用<sup>[9,10]</sup>。普罗布考能抑制血管成形术后内膜增生和血管平滑肌细胞增殖。本研究中,普罗布考组颈总动脉新生内膜面积、最大内膜厚度明显低于对照组,而普罗布考组颈总动脉管腔面积明显高于对照组。说明普罗布考有减轻球囊损伤后血管狭窄形成的作用。而与高胆固醇组相比,普罗布考组管腔面积明显扩大,内膜面积明显

减少,IGF-1R和VEGF表达均明显减少,表明普罗布考可能通过抑制IGF-1R和VEGF表达来减轻内膜增生,扩大管腔,从而减少血管再狭窄的发生<sup>[11]</sup>。国内亦有研究表明,普罗布考可保护内皮细胞合成与释放内皮源性舒张因子,降低血管对内源性收缩物质的收缩反应性,从而说明普罗布考可通过提高扩张性血管重塑,抑制收缩性血管重塑,从而防止动脉成形术及支架成形术后再狭窄的发生<sup>[12]</sup>。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Miele C, Rochford JJ, Filippa N, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways [ J ]. *J Biol Chem*, 2000 **275** ( 28 ): 21 695-702
- [ 2 ] Delafontaine P, Song YH, Li Y, et al. Expression, regulation and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 **24** ( 3 ): 435-444
- [ 3 ] Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, et al. Lack of  $\alpha$ 2-antiplasmin in promotes re-endothelialization via over-release of VEGF after vascular injury in mice [ J ]. *Blood*, 2003 **102** ( 10 ): 3 621-628
- [ 4 ] Grant MR, Wangovich TJ, Ellis EA, et al. Expression of IGF-1, IGF-1 receptor and IGF binding proteins-1, -2, -3, -4 and -5 in human atherosclerotic specimens [ J ]. *Regul Pept* 1996 **67** ( 3 ): 137-144
- [ 5 ] Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, et al. The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation [ J ]. *Histochem Cell Biol* 2001 **116** ( 6 ): 471-481
- [ 6 ] Bhandari S, Roy H, Heekeren T, et al. VEGF-A, VEGF-D and VEGF-D (Delta N Delta C) induced intimal hyperplasia in carotid arteries [ J ]. *Eur J Clin Invest* 2005 **35** ( 11 ): 669-676
- [ 7 ] Dahlbom G, Amqvist HJ. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-1 regulate the expression of insulin-like growth factor binding protein-3, -4 and -5 in large vessel endothelial cells [ J ]. *Endocrinology*, 2000 **141** ( 6 ): 2 062-067
- [ 8 ] Miele C, Rochford JJ, Filippa N, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways [ J ]. *J Biol Chem*, 2000 **275** ( 28 ): 21 695-702
- [ 9 ] Witting PK, Wu BJ, Raftery M, et al. Probucol protects against hypochlorite-induced endothelial dysfunction: identification of a novel pathway of probucol oxidation to a biologically active intermediate [ J ]. *J Biol Chem*, 2005 **280** ( 16 ): 612
- [ 10 ] Tagawa T, Urae Y, Kinura Y, et al. Long term treatment with probucol improves endothelial function in patients with coronary artery disease [ J ]. *Hypertens Res* 2004 **27**: 311
- [ 11 ] Miyauchi K, Akawa M, Tani T, et al. Effect of probucol on smooth muscle cell proliferation and differentiation after vascular injury in rabbits: possible role of PDGF [ J ]. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998 **12** ( 3 ): 251
- [ 12 ] 杨云波, 廖端芳, 谢志忠. 普罗布考抑制再狭窄与其调节功能性血管重构的关系 [ J ]. *中国药理学通报*, 2003 **19** ( 4 ): 388

(此文编辑 文玉珊)