

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-04-0304-05

粉防己碱对内膜损伤后血管平滑肌细胞表型转化和 p38 表达的影响

张新平¹, 庞月华², 冯义伯¹, 崔华中³, 付作林¹, 史春志¹, 谷翔¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科, 湖北省武汉市 430022; 2. 新疆乌鲁木齐市友谊医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830049; 3. 汕头大学医学院附属第二医院急诊科, 广东省汕头市 510041)

[关键词] 病理学; 粉防己碱抑制血管平滑肌细胞增殖; 免疫组织化学染色; 粉防己碱; 增殖细胞核抗原; 表型转化; p38

[摘要] **目的** 研究粉防己碱防治血管内膜损伤后再狭窄与血管平滑肌细胞表型转化及其信号转导途径之间的关系。**方法** 采用 HE 染色检测假损伤组、损伤组和粉防己碱组损伤后 28 天的血管形态学改变; 分别使用免疫组织化学和免疫印迹技术检测损伤组和粉防己碱组损伤后 7、14 和 28 天增殖细胞核抗原、平滑肌 α 肌动蛋白和 p38 表达的变化。**结果** 假损伤组血管壁各层结构完整; 损伤组新生内膜面积显著增加, 管腔面积显著缩小; 粉防己碱组内膜增殖较损伤组明显减轻, 管腔面积增加。损伤后 7 天, 粉防己碱组与损伤组之间血管壁平滑肌 α 肌动蛋白、增殖细胞核抗原和 p38 表达变化无显著性差异, 新生内膜增殖程度亦基本相同。粉防己碱治疗 14 和 28 天, 血管壁增殖细胞核抗原和 p38 表达均低于损伤组; 而损伤后 14 天平滑肌 α 肌动蛋白表达略高于损伤组, 损伤后 28 天两组间无显著性差异。**结论** 粉防己碱可不同程度地拮抗内膜损伤后血管平滑肌细胞表型转化及 p38 信号转导, 继而减缓新生内膜增殖。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effects of Tetrandrine on Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells and Expression of p38 after Intimal Injury

ZHANG Xin-Ping¹, PANG Yue-Hua², FENG Yi-Bai¹, CUI Hua-Zhong³, FU Zuo-Lin¹, SHI Chun-Zhi¹, and GU Xiang¹

(1. Department of Cardiology, the Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. the Friendship Hospital, Urumchi City, Urumchi, 830049, China; 3. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 510041, China)

[KEY WORDS] Tetrandrine; Proliferation Cell Nuclear Antigen; Phenotypic Modulation; p38; Smooth Muscle α actin; Neointimal Hyperplasia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between tetrandrine (Tet) on prevention and treatment of restenosis and phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells (VSMC) as well as its signal transduction pathway after vascular intimal injury. **Methods** HE staining was used to analyse vascular morphology change at sham injured, injured and Tet-treated group 28 days. Immunohistochemistry and Western blot were respectively used to detect the expression change of smooth muscle α actin (SM α actin) and proliferation cell nuclear antigen (PCNA), p38 in injured group and Tet group at 7, 14 and 28 days after balloon injury. **Results** The every layer structure in vascular wall of sham injured artery was intact. Neointimal area was obviously increased and lumen area was notably decreased in injured group. In the Tet group the intimal proliferation was showed but notably weaker than that of the injured group and lumen area notably increased. Compared with the injured group, the expression of SM α actin, PCNA and p38 in vascular wall of the Tet group was not significantly different and neointimal proliferation degree was also basically the same at 7 days after injury. The expression of PCNA and p38 in Tet group was all significantly lower than that in injured group in vascular wall at 14 and 28 days after injury. However, expression of SM α actin in Tet group was slightly higher than that in injured group at 14 days, and not significantly different between the two groups at 28 days. **Conclusion** Tet could reduce neointimal hyperplasia by inhibiting VSMC phenotypic modulation and its signal transduction.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells,

VSMC) 异常增殖、迁移及大量合成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是导致再狭窄 (restenosis, RS) 的主要原因^[1]。VSMC 只有从分化状态转变为去分化状态即表型转化, 才能获得增殖和合成能力^[2]。而丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是细胞内多种促细胞增殖信息传递的

[收稿日期] 2005-06-09 [修回日期] 2006-03-21

[作者简介] 张新平, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病介入诊治, E-mail 为 zhangxinping117202@sina.com。庞月华, 主治医师, 研究方向为老年心血管病学。冯义伯, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入诊治。

交会点和共同通路,是细胞表型转化和增殖的关键酶^[3]。p38 是 MAPK 超家族的新成员,在细胞分化中起着至关重要的作用^[4]。由于再狭窄发生机制的复杂性,迄今尚未找到理想的防治药物或方法。近年来,应用中药防治血管再狭窄逐渐受到重视。熊一力等^[5]认为粉防己碱(tetrandrine, Tet)具有抑制内膜素诱导的 VSMC cDNA 合成作用。李佃贵等^[6]研究认为 Tet 可增加血管内膜损伤后 VSMC 的凋亡,抑制血管内膜增殖。本研究以平滑肌 α -肌动蛋白(smooth muscle α -actin, SM α -actin)和增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)作为分化型与去分化型 VSMC 的分子标志,使用中药 Tet 进行干预治疗,旨在研究 Tet 对内膜损伤后 VSMC 增殖的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

PTCA 球囊导管(2.5 mm × 13 mm)为德国贝朗公司产品;高清晰度彩色医学图文分析系统(HMIAS-2000)为日本 Olympus 公司产品;凝胶图像分析仪(Gel doc 2000)为美国 Bio-Rad 公司产品;鼠抗 PCNA、SM α -actin 单克隆抗体、兔抗 p38 多克隆抗体、SABC 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;Tet 为江西彭泽制药厂产品;家兔购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.2 实验动物及分组

体重 2.3 ~ 2.8 kg 的家兔,雌雄不拘,清洁级,随机分为假损伤组($n=6$)、损伤组和 Tet 组,其中损伤组和 Tet 组又分为损伤后 7、14 和 28 天三个亚组,每组 6 只。损伤组于损伤前 3 天用生理盐水 2 mL 腹腔注射;Tet 组于损伤前 3 天用 Tet 10 mg/(kg·d)(生理盐水稀释成 2 mL)腹腔注射,每日一次,直到不同时间点动物被处死。

1.3 内膜损伤模型制备

按文献[7, 8]方法改进。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉家兔后,沿颈前正中中线剪开皮肤 4~5 cm,游离左颈外动脉 0.5 cm 和左颈总动脉 3~4 cm,将颈外动脉远心端结扎,颈总动脉近心端用动脉夹临时夹闭后,在颈外动脉结扎处近心端做“V”型切口,插入球囊导管至颈总动脉,经压力泵向球囊内注入肝素生理盐水使其充分膨胀,慢速回拉球囊至颈内外动脉分叉处。回抽生理盐水后重新送回导管,反复 3 次,结扎颈外动脉近心端,松开动脉夹,恢复血流,逐层缝合切口。术前静脉注射肝素 0.1

u/kg 抗凝。术后肌注青霉素预防感染,连续 3 天。以结扎左颈外动脉的家兔作为假损伤组。

1.4 标本制备

假损伤组于 28 天处死,损伤组和 Tet 组分别于损伤后 7、14 和 28 天处死,剪取靶血管段 3 cm,置冰 PBS 液中,洗净残血并去除血管周围过多的脂肪及结缔组织。将其远端 1 cm 血管段置于 4% 甲醛溶液固定,2 段血管同块石蜡包埋,间断均匀切片(4 μ m),行 HE 和免疫组织化学染色。余标本迅速置 -70℃ 冰箱保存,用于 Western blot 检测。

1.5 形态学观察

取 28 天假损伤组、损伤组和 Tet 组动脉 HE 染色切片,置于显微镜下放大 40 倍,使包括完整动脉环的图像摄入医学图文分析系统,分别测量内膜面积(intima area, IA)、中膜面积(media area, MA)、外弹力膜面积(external elastic lamina area, EELA)和腔面积(lumen area, LA),再经换算得出实际值。每只动物随机选取 3 张切面进行图像分析,取平均值。

1.6 免疫组织化学染色

采用 SABC 法,严格按照试剂盒说明进行 PCNA、SM α -actin 和 p38 免疫组织化学染色。三种蛋白阳性表达均为棕黄色或棕褐色,PCNA 主要定位于细胞核;SM α -actin 定位于胞质;p38 定位于胞质和部分细胞核。每张切片取 3 个视野,分别计算阳性细胞百分率和阳性细胞面积,取其均值。

1.7 Western blot 检测 p38 蛋白

分别取各组血管标本 100 mg 剪碎,加入裂解液,碾磨成乳糜状,离心后收集上清液,考马斯亮兰法测定蛋白含量。各取 50 μ g 蛋白,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,硝酸纤维素膜转膜,5% 脱脂奶粉室温下封闭,分别用 p38 抗体(26 kDa, 1:100 稀释)和 GAPDH(144 kDa, 1:200 稀释)处理 12 h,冲洗后加生物素标记的二抗(羊抗兔 IgG)。用化学荧光剂压片显影。凝胶图像处理系统扫描显影密度。p38 蛋白相对量 = p38 条带灰度/GAPDH 条带灰度。实验重复三次。

1.8 统计学处理

所有测定指标均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。使用 SPSS 12.0 统计软件。

2 结果

2.1 粉防己碱对损伤后血管结构的影响

假损伤组血管内皮细胞紧贴血管内弹力膜,动

脉壁各层结构完整, 内膜光滑, 中膜 VSMC 呈梭型, 排列整齐, 分布均匀。与假损伤组比较, 损伤组新生内膜(niointimal, NI) 面积显著增加($P < 0.01$), LA 显著缩小($P < 0.01$), MA 和 EELA 稍增加。增厚的 NI 以 VSMC 为主, 排列紊乱, 同时伴有大量 ECM 生成。

与损伤组比较, Tet 组 NI 增殖程度明显减轻($P < 0.05$), LA 增加($P < 0.05$), MA 降低, EELA 增加, 但无显著性差异。Tet 组与损伤组 IA 变化值和 LA 变化值有明显差异(图 1 和表 1)。

表 1. 粉防己碱对损伤后 28 天血管面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, mm^2)

分 组	LA	LA 变化值	IA	IA 变化值	MA	EELA
假损伤组	0.338 \pm 0.023		0.012 \pm 0.004		0.350 \pm 0.028	0.700 \pm 0.035
损伤组	0.215 \pm 0.039 ^b	- 0.123 \pm 0.015	0.147 \pm 0.021 ^b	0.135 \pm 0.014	0.371 \pm 0.032	0.733 \pm 0.044
粉防己碱组	0.281 \pm 0.034 ^a	- 0.057 \pm 0.011	0.106 \pm 0.015 ^a	0.094 \pm 0.009	0.353 \pm 0.029	0.740 \pm 0.052

a 为 $P < 0.05$, 与损伤组比较; b 为 $P < 0.01$, 与假损伤组比较。

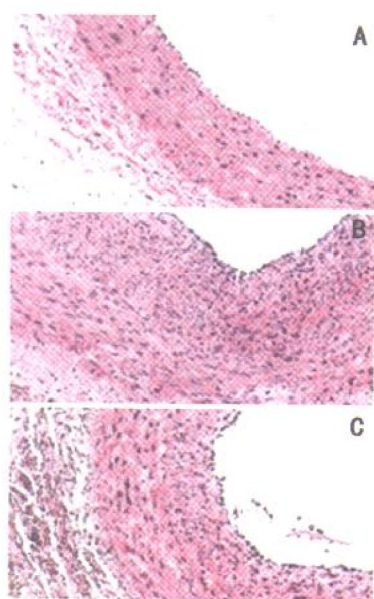


图 1. 损伤后 28 天 HE 染色 ($\times 100$) A 为假损伤组, B 为损伤组, C 为粉防己碱组。

2.2 粉防己碱对增殖细胞核抗原表达的影响

损伤组损伤后 7 天和 14 天 NI 及中膜 PCNA 呈高表达, 以 14 天最高, 至 28 天显著降低($P < 0.01$)。损伤后 7 天 Tet 组 NI 和中膜 PCNA 阳性细胞百分率与损伤组比较无显著性差异, 而损伤后 14 天和 28 天 NI 和中膜 PCNA 阳性细胞百分率明显低于损伤组, 以 14 天最为明显(图 2 和表 2)。

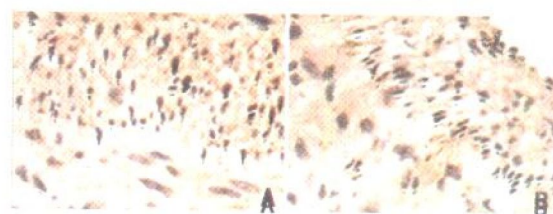


图 2. 损伤后 28 天新生内膜和中膜增殖细胞核抗原免疫组化染色 ($\times 400$) A 为损伤组, B 为粉防己碱组。

表 2. 粉防己碱对损伤后血管中膜和新生内膜增殖细胞核抗原阳性细胞百分率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

时间	中膜		新生内膜	
	损伤组	粉防己碱组	损伤组	粉防己碱组
7 天	46.53% \pm 5.67%	41.92% \pm 4.82%	48.69% \pm 5.35%	45.28% \pm 5.12%
14 天	58.21% \pm 6.13% ^b	40.31% \pm 5.25% ^a	63.93% \pm 6.84% ^b	44.35% \pm 5.59% ^a
28 天	43.76% \pm 3.81% ^c	34.65% \pm 3.98% ^a	49.28% \pm 5.46% ^c	38.56% \pm 3.58% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与损伤组同一时间段比较; b 为 $P < 0.01$, 与 7 天时比较; c 为 $P < 0.01$, 与 14 天时比较。

2.3 粉防己碱对平滑肌 α -肌动蛋白表达的影响

损伤后 7、14 和 28 天损伤组中膜及 NI 中 SM α -actin 表达均较高, 且随着时间推移略微增加。各时间点 Tet 组中膜及 NI 中 SM α -actin 表达较同期损伤组有所增加, 但均无显著性差异(图 3)。

2.4 粉防己碱对血管壁 p38 表达的影响

损伤后 7 天和 14 天损伤组中膜及 NI 中 p38 呈持续性高表达, 以 14 天最为明显, 28 天开始减少。与损伤组比较, 损伤后 7 天 Tet 组中膜及 NI 中 p38 表达无显著变化, 而 14 天和 28 天均明显减少(表 3)

和图 4)。损伤后 7、14 和 28 天损伤组和 Tet 组血管壁 p38 表达较假损伤组显著增加。Tet 组与损伤组

比较损伤 7 天时血管壁 p38 阳性表达无显著性差异, 而损伤后 14 天和 28 天显著减少(表 4 和图 5)。

表 3. 粉防己碱对损伤后血管中膜和新生内膜 p38 阳性细胞面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间	中膜		新生内膜	
	损伤组	粉防己碱组	损伤组	粉防己碱组
7 天	55.98% \pm 5.53%	53.38% \pm 5.12%	58.57% \pm 5.42%	54.34% \pm 5.23%
14 天	58.87% \pm 5.27%	46.87% \pm 4.56% ^a	61.35% \pm 6.14%	48.98% \pm 4.61% ^a
28 天	43.73% \pm 4.62% ^b	30.25% \pm 3.76% ^{ab}	56.82% \pm 5.61%	44.92% \pm 4.57% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与损伤组同一时间段比较; b 为 $P < 0.01$, 与 14 天时比较。

表 4. 不同时间点各组 p38 与 GAPDH 蛋白表达的灰度比

时 间	灰度比
7 天 假损伤组	0.853 \pm 0.033
损伤组	1.536 \pm 0.057
粉防己碱组	1.524 \pm 0.052
14 天 损伤组	1.687 \pm 0.062
粉防己碱组	1.521 \pm 0.048 ^a
28 天 损伤组	1.518 \pm 0.053
粉防己碱组	1.346 \pm 0.039 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与损伤组同一时间段比较; b 为 $P < 0.01$, 与假损伤组比较。

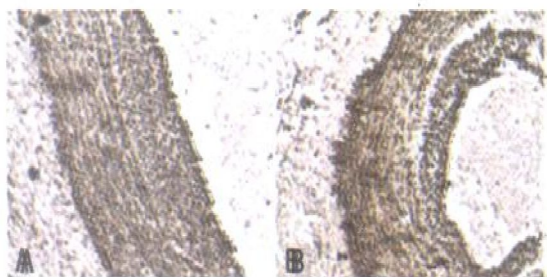


图 3. 损伤后 28 天新生内膜和中膜平滑肌 α 肌动蛋白免疫组织化学染色 ($\times 100$) A 为损伤组, B 为粉防己碱组。

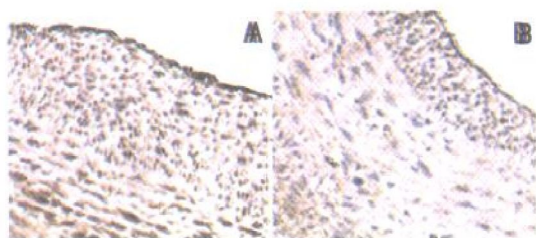


图 4. 损伤后 28 天新生内膜和中膜 p38 免疫组织化学染色 ($\times 200$) A 为损伤组, B 为粉防己碱组。

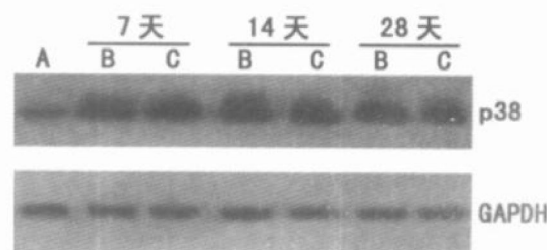


图 5. 免疫印迹产物电泳图 A 为假损伤组, B 为损伤组, C 为粉防己碱组。

3 讨论

粉防己碱(Tet)是从防己科植物粉防己的干燥块根中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱,具有对 L 型和 T 型钙通道阻滞作用^[9]。Tet 制成注射剂可快速产生药理作用,但必须注意其安全性。对家兔降压的有效剂量约为 10 mg/kg,中毒剂量为 15 mg/kg,有效剂量约为中毒剂量的 66%^[10]。本实验中 1 只家兔在静脉注射稀释 5 倍的 Tet (10 mg/kg) 后,即刻出现四肢抽搐,呼吸心跳停止死亡。提示静脉注射给药,应注意控制其剂量范围;家兔对 Tet 的耐受性可能较低,静脉给药的安全性值得再评价。故建议家兔动物实验最好采用口服、肌注或腹腔给药的方法。

用中药注射液进行细胞水平的研究,无需对药物进行预处理,其含有的有效成分可直接作用于细胞,因此能够较客观地反映药物的药理作用。本研究 HE 染色结果发现,损伤组 NI 面积显著增加,LA 显著缩小,MA 增加。Tet 组 NI 虽有增殖但程度较损伤组明显减轻,LA 明显增加,MA 降低,而 EELA 增加。Tet 组与损伤组比较 LA 增加大于 IA 减小。两组间 IA 变化值和 LA 变化值有明显差异。说明 Tet 能抑制 NI 增殖,同时还具有一定程度地改善血管重塑作用。

本研究结果还发现, Tet 组与损伤组比较损伤后 7 天 NI 增殖程度并无区别, 血管壁 SM α -actin、PCNA 和 p38 表达亦基本相同。与损伤组相比, Tet 治疗 14 天 NI 增殖程度有所减轻, SM α -actin 阳性表达略升高, 而 PCNA 阳性率和 p38 阳性面积明显降低。说明此时 Tet 组已显示出对 VSMC 去分化及其信号转导的抑制效应。损伤后 28 天, Tet 组 NI 增殖程度明显低于损伤组, PCNA 和 p38 阳性表达亦明显低于损伤组。Western blot 结果显示, 损伤后 7 天和 14 天血管壁中 p38 表达显著增加, 28 天开始减少, 但仍明显高于假损伤组, 说明 p38 MAPK 参与了损伤后 VSMC 表型转化的信号转导。不同时间点 Tet 组与损伤组血管壁中 p38 表达基本同免疫组织化学结果。提示 Tet 可不同程度抑制内膜增殖, 其机制可能与 Tet 抑制 VSMC 表型转化及 p38 MAPK 信号转导途径, 减少去分化 VSMC 比例, 进而抑制 VSMC 增殖、迁移和 ECM 合成密切相关。

Ca^{2+} 信号传导异常, 细胞质 Ca^{2+} 浓度升高是许多疾病的病理生理基础, 而几乎所有的丝裂原刺激均以细胞内 Ca^{2+} 增高作为共同信号通路^[11]。MAPK 活性受上游信号分子蛋白激酶 C 的调节, 它是一种 Ca^{2+} 激活、磷脂依赖性蛋白激酶, 在细胞信号转导、细胞增殖中起关键性作用^[12]。所以推测 Tet 抑制 NI 增殖的具体机制可能与 Ca^{2+} 阻滞有关。

总之, Tet 虽是单味中药, 不仅能影响损伤后 VSMC 表型转化, 而且还可抑制 p38 蛋白表达, 提示 Tet 可从多途径上拮抗损伤后 VSMC 增殖效应, 体现出了中药多途径、多位点及整体调节的优势。从而

可认为 Tet 对血管损伤后再狭窄的形成具有防治作用, 有望成为预防再狭窄的一种有效药物。

[参考文献]

- [1] Schoenhagen P, Vince DG, Ziada KM, Kapadia SR, Lauer MA, Crowe TD, et al. Relation of matrix-metalloproteinase 3 found in coronary lesion samples retrieved by directional coronary atherectomy to intravascular ultrasound observations on coronary remodeling[J]. *Am J Cardiol*, 2002, **89** (12): 1354-359
- [2] Jimenez M, Daret D, Choussat A, Bonnet J. Immunohistological and ultrastructural analysis of the intimal thickening in coarctation of human aorta[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (3): 737-745
- [3] Bernhard M, Chaohong L, Yanhua H, Gertraud S, Nassim GTI, Qingbo X. LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 1862-871
- [4] Zetser A, Gredinger E, Bengali E. P38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation[J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (8): 5193-200
- [5] 熊一力, 张露, 姚伟星. Tet 抑制血管平滑肌细胞增殖及对 HSP70 和 p53 表达的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 1998, **14** (2): 109-113
- [6] 李佃贵, 李俊峡, 李振彬, 扈国杰, 蔡春江. Tet 对血管内膜剥脱后再狭窄的预防作用及其分子机制研究[J]. *河北医科大学学报*, 2002, **23** (2): 68-70
- [7] 胡信群, 沈向前, 周胜华, 祁述善, 方臻飞, 刘启明. 环氧合酶 2 在高脂饮食兔颈总动脉球囊损伤后的动态变化及其与内膜增生的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 443-446
- [8] 苏海霞, 盛净. 大鼠和兔颈动脉再狭窄模型比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 332-334
- [9] Liu QY, Karpinski E, Pang PK. Tetrandrine inhibits both T and L calcium channel currents in ventricular cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, **20** (4): 513-519
- [10] 李风前, 陆彬. Tet 制剂研究进展[J]. *中草药*, 1999, **6** (30): 475-477
- [11] Yusufi ANK, Jingfei C, Thompson MA, Burnett JC, Grande JP. Differential mechanisms of Ca^{2+} release from vascular smooth muscle cell microsomes[J]. *Exp Biol Med*, 2002, **227** (1): 36-44
- [12] Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, et al. Increased protein kinase C activity and expression of Ca^{2+} -sensitive isoforms in the failing human heart[J]. *Circulation*, 1999, **99** (3): 384-391

(此文编辑 文玉珊)