

[文章编号] 1007-3949(2011)19-02-0095-05

• 实验研究 •

加味补阳还五汤对兔髂动脉球囊损伤后血管狭窄的影响及机制

周彬¹, 刘勇¹, 王敏¹, 吴琳¹, 廖火成¹, 刘定辉¹, 吴伟康², 钱孝贤^{1,2}

(中山大学附属第三医院 1. 心血管内科, 2. 中西医结合研究所, 广东省广州市 510630)

[关键词] 加味补阳还五汤; 再狭窄; 一氧化氮

[摘要] **目的** 观察加味补阳还五汤对兔髂动脉球囊损伤后血管狭窄以及一氧化氮系统的影响。**方法** 24 只 4 个月龄雄性新西兰兔随机分为假手术组、模型组和药物组, 每组 8 只。假手术组给予普通饲料, 模型组和药物组给予高脂饮食。饲养 2 周后模型组和药物组兔行髂动脉内膜剥脱术, 假手术组兔行假手术。药物组添加加味补阳还五汤药颗粒剂 2 mL/(kg·d), 假手术组及模型组喂食同前。观察 4 周后处死动物, 通过普通光镜观察髂动脉内膜的损伤情况, 并检测血清一氧化氮及一氧化氮合酶的水平; 免疫组织化学法和逆转录聚合酶链反应法分别检测内皮型一氧化氮合酶蛋白和 mRNA 在血管的表达。**结果** 病理观察可见假手术组兔髂动脉管壁光滑, 管腔和管壁厚度正常; 模型组管壁和内膜明显增厚、管腔明显狭窄, 可见巨大动脉硬化斑块; 而药物组管壁及内膜增厚较轻, 管腔狭窄较轻。药物组兔血清一氧化氮水平和总一氧化氮合酶活性均明显高于模型组; 免疫组织化学发现药物组内皮型一氧化氮合酶的蛋白和 mRNA 表达较模型组均明显增强。**结论** 加味补阳还五汤具有防止家兔球囊扩张损伤髂动脉所致的管腔狭窄及抗实验性动脉粥样硬化作用, 其机制可能与激活一氧化氮系统有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Jiawei Buyang Huanwu Decoction on Vascular Stenosis After Balloon Injury of Rabbit Iliac Artery

ZHOU Bin¹, LIU Yong¹, WANG Min¹, WU Lin¹, LIAO Huo-Cheng¹, LIU Ding-Hui, WU Wei-Kang², and QIAN Xiao-Xian^{1,2}

(1. Department of Cardiology, 2. Institute for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sun University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

[KEY WORDS] Jiawei Buyang Huanwu Decoction; Restenosis; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of Jiawei Buyang Huanwu decoction on vascular stenosis and on the nitric oxide (NO) system after iliac artery were injured by balloon in diet-induced atherosclerotic rabbits.

Methods 24 male New Zealand albino rabbits were equally randomized into control group, model group and drug group.

The iliac arteries of the rabbits in the latter two groups were subjected to balloon injury. Four weeks later, serum NO synthases (NOS) activity and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) level was assayed, endothelial hyperplasia, eNOS protein and mRNA expression were observed in injured iliac artery.

Results Optical microscope revealed narrowed vascular lumen, thicken intima and numerous arteriosclerotic plaques in the model group compared with the control group, whereas the vascular lumen and intima thickness remained basically normal in drug group. The serum NO level and total NOS activity were higher in drug group than that of model group. Immunohistochemistry and RT-PCR results showed that eNOS protein and mRNA expression was stronger in rabbit iliac artery of drug group than that in model group.

Conclusion Jiawei Buyang Huanwu decoction can lessen intimal hyperplasia and vascular stenosis in iliac artery injury rabbits, and this effect is possibly related with that Jiawei Buyang Huanwu decoction activated the NO system.

自 1977 年 Gruentzig 开展第 1 例经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary an-

gioplasty, PTCA) 以来, PTCA 已作为有效治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的一种方法广泛应用于临床,

[收稿日期] 2009-10-27

[基金项目] 广州市科技计划项目 (2001-J-019-01)

[作者简介] 周彬, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 zb4280@136.com。刘勇, 硕士, 研究方向为中西医结合防治心肌缺血。通讯作者钱孝贤, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心肌缺血的发病机制及其防治, E-mail 为 xiaoxianq@tom.com。

但成形术后冠状动脉再狭窄的发生率达 30% ~ 50%, 成为影响其进一步发展的障碍。目前认为再狭窄的发生主要为内膜增生、血管重塑和弹性回缩, 另外, 局部的炎症、免疫反应、感染和血管外膜纤维化等因素也起着重要作用^[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为血管生理的重要内源性调节因子, 具有阻止血管负性重塑、抑制内膜增生及加速再内皮化以及保护和修复内皮细胞等多重功效, 其抑制再狭窄的作用已得到公认^[2]。本实验拟通过球囊损伤兔髂动脉模型, 观察加味补阳还五汤对损伤后动脉内膜的保护和修复作用以及对一氧化氮系统的影响, 探讨其对兔髂动脉球囊损伤后狭窄的防治作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

一氧化氮(NO)试剂盒及一氧化氮合酶(nitric oxide synthases, NOS)诊断试剂盒(南京建成公司); PCR 引物(上海生工公司合成); GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas); DNA Marker (Takara); 药物均购自广东佛山制药厂, 加味补阳还五汤由黄芪 60 g、当归尾 6 g、赤芍 4.5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g、生山楂 3 g、三七 3 g 组成(合并煎煮液后浓缩含生药浓度相当于 5000 g/L 备用)。德国 KONTRON IBAS 2.0 及 2.5 全自动图像分析系统; 日本 JVC ky-F30B 3-CCD 彩色图像摄录分析仪; JVC tk-S310 图像摄录输入仪; 2.5 mm × 2.0 mm 球囊导管、BMW 导丝及压力泵(Guidant)。

1.2 动物分组及模型的建立

纯种雄性新西兰兔 24 只, 兔龄 4 个月, 体重 2.0 ~ 2.5 kg, 由中山大学动物实验中心提供(合格证号 0013318)。动物在适应性喂养 3 天后, 随机分为假手术组、模型组和药物组, 每组各 8 只。模型的建立参考文献[3]方法, 假手术组兔予普通饲料, 模型组和药物组兔予以高脂饮食(胆固醇 1.0%, 猪油 10%, 余为普通饲料)。2 周后, 肌肉注射速眠新 1 mL/kg 待完全麻醉后从其右股动脉逆行缓慢插入球囊导管至距离皮肤切口 15 cm 的深度(达腹主动脉处), 然后由导管尾端注入无菌生理盐水(注推压力为 2.5 kg)以扩张及拉动共 3 次。术前注入 300 u/kg 肝素, 为排除干扰因素, 假手术组行假手术(仅分离和结扎髂动脉), 术后 3 天各组兔肌注青霉素 10⁵ u/kg, 模型组、药物组兔皮下注射肝素 100 u/kg, 并继续高脂喂养, 药物组同时喂饲加味补阳还五

汤 2 mL/(kg · d)。

1.3 取材方法

观察 4 周结束实验, 快速放血处死动物, 取全血 10 mL, 4℃ 3000 r/min 离心 10 min 分离血清, 分装置 -70℃ 冰箱保存备检测。取球囊损伤侧髂动脉, 置预冷 PBS 洗去血液, 送普通光镜检, 部分髂动脉置液氮转 -70℃ 冰箱保存, 备检测 mRNA。

1.4 病理组织学检查

取手术侧髂动脉约 0.5 cm, 10% 中性甲醛固定 12 h 后包埋腊块, 切片行 HE 染色。采用德国 KONTRON IBAS 2.0 全自动图像分析系统, 测定管腔面积(lumina area, LA), 以内弹力板围绕面积减去管腔面积为内膜面积(intima area, IA), 以外弹力板围绕面积减去内弹力板围绕面积为中膜面积(media area, MA), 计算内膜中膜厚度(IMT)及内膜/中膜比值(I/M)。

1.5 血清一氧化氮和一氧化氮合酶的检测

血清 NO 测定采用硝酸还原酶法, 血清总一氧化氮合酶(tNOS)的测定采用比色法。具体操作步骤参考说明书进行。

1.6 免疫组织化学法检测内皮型一氧化氮合酶表达

用 ABC 法进行免疫组织化学染色。切片脱蜡至水, 1% H₂O₂ 封闭抗原。加入抗内皮型一氧化氮合酶(eNOS) IgG (1:50); 4℃ 过夜, PBS 冲洗后加入二抗, 37℃、20 min; PBS 冲洗 3 次, 加入三抗, 并行染色, 再用苏木素衬染。封片, 镜检。将免疫组织化学阳性结果采用德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统进行图像分析, 分别测量阳性面积比(阳性反应面积/测量窗面积)。

1.7 RT-PCR 检测内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达

eNOS 引物序列根据 Genebank AY179960, β -actin 引物序列根据 Geneban AF 309819, 采用 primer5.0 软件设计, 由上海生工公司合成。eNOS 上游为 5'-GTGTTTGGCTGCGTCCTC-3', 下游为 5'-TGTC-CTCGTGCTAGCGTTG-3'; β -actin 上游为 5'-CCCATCTACGAGGGCTACGC-3', 下游为 5'-AG-GAAGGAGGGCTGGAACA-3'。按异硫氰酸胍一步法抽提血管壁组织总 RNA。取适量 RNA 溶液经 1% 琼脂糖凝胶电泳和用紫外分光光度计定性和定量。体外逆转录后, 在 PCR 仪上进行以下循环: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环, 72℃ 再延伸 7 min 终止反应。取 10 μ L PCR 产物与阳性对照和阴性对照在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 经溴化乙锭(EB)染色后在紫外分析仪下根据相对分子质量的大小进行结果判断,

以 Lab-work 图像分析系统分析条带灰度, 计算 eNOS 与 β -actin 扩增产物的比值表示 eNOS mRNA 的表达水平。

1.8 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计分析软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 再行组间 Student-Newman-Keuls 检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 加味补阳还五汤对兔髂动脉病理形态学的影响

光镜下见假手术组内膜薄且结构完整, 无动脉硬化斑块; 模型组内膜增厚, 可见脂质斑块弥漫或散在, 内皮有时不完整, 泡沫细胞大量积聚, 少数胞外

有胆固醇结晶和无定形坏死细胞碎片, 管腔明显狭窄; 药物组则斑块厚度减小, 泡沫细胞数目减少, 胞内脂肪空泡明显减少, 管腔狭窄程度较轻 (图 1, Figure 1)。

经图像分析系统处理发现, 模型组 LA 较假手术组明显减少 ($P < 0.05$), 而药物组 LA 较模型组显著增加 ($P < 0.05$), 但仍少于假手术组 ($P < 0.05$)。模型组 IA 较假手术组明显增加 ($P < 0.05$), 而药物组 IA 较模型组明显减少 ($P < 0.05$), 但仍比假手术组增加 ($P < 0.05$)。各组 MA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组 I/M 较假手术组明显增大 ($P < 0.05$), 而药物组 I/M 较模型组明显减少 ($P < 0.05$), 但仍比假手术组增大 ($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

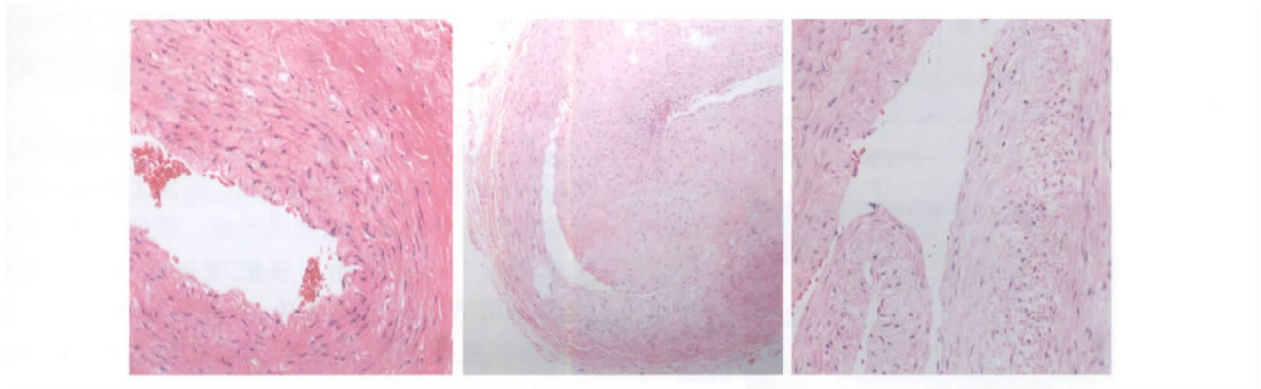


图 1. 各组兔髂动脉 HE 染色 ($\times 400$) 从左到右依次为假手术组、模型组和药物组。

Figure 1. HE staining of rabbit iliac artery in different group

表 1. 各组兔髂动脉管腔、内膜、中膜面积及内膜/中膜比较
Table 1. LA, IA, MA and I/M of rabbit iliac artery in different group

参 数	假手术组	模型组	药物组
LA (mm^2)	0.44 ± 0.09	0.09 ± 0.03^a	0.26 ± 0.07^{ab}
IA (mm^2)	0	1.82 ± 0.42^a	0.78 ± 0.44^{ab}
MA (mm^2)	0.48 ± 0.28	0.75 ± 0.53	0.62 ± 0.43
I/M	0	4.68 ± 3.16^a	1.66 ± 1.29^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

2.2 加味补阳还五汤对血清一氧化氮水平和总一氧化氮合酶活性的影响

模型组兔血清 NO 水平和 tNOS 活性均明显低于假手术组 ($P < 0.05$), 而药物组血清 NO 水平和 tNOS 活性则显著高于模型组 ($P < 0.05$), 且与假手术组比差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 2, Table 2)。

表 2. 血清一氧化氮水平及总一氧化氮合酶活性
Table 2. The serum nitric oxide level and total nitric oxide synthases activity

分 组	n	NO ($\mu\text{mol/L}$)	tNOS 活性 (kU/L)
假手术组	7	52.49 ± 8.22	136.41 ± 16.82
模型组	7	18.18 ± 5.21^a	34.65 ± 9.71^a
药物组	7	48.65 ± 13.90^b	105.14 ± 45.26^b

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

2.3 加味补阳还五汤对内皮型一氧化氮合酶蛋白和 mRNA 表达的影响

免疫组织化学染色表明各组动物内膜均有 eNOS 蛋白表达, 模型组 eNOS 染色阳性面积明显小于假手术组 ($P < 0.05$), 而药物组 eNOS 染色阳性面积则比模型组显著增加 ($P < 0.05$), 但仍比假手术组显著减小 ($P < 0.05$; 图 2 和表 3, Figure 2 and Table 3)。



图2. 免疫组织化学法检测兔髂动脉内皮型一氧化氮合酶表达($\times 200$) 从左到右依次为假手术组、模型组和药物组。

Figure 2. eNOS protein expression was measured in rabbit iliac artery by immunohistochemistry

RT-PCR 结果表明模型组 eNOS mRNA 表达明显低于假手术组 ($P < 0.05$), 而药物组 eNOS mRNA 表达则比模型组显著增加 ($P < 0.05$), 但仍低于假手术组 eNOS mRNA 表达 ($P < 0.05$; 图 3 和表 3, Figure 3 and Table 3)。

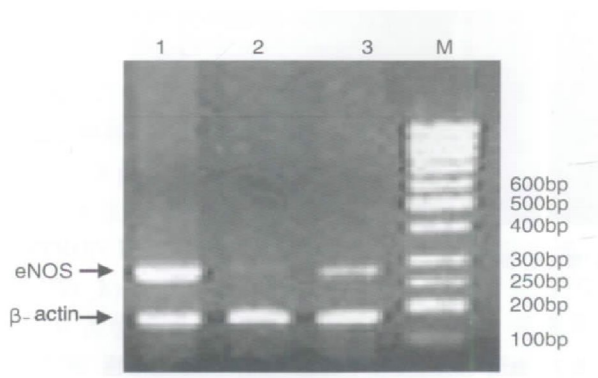


图3. RT-PCR 检测兔髂动脉内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达 M 为 Marker, 1 为假手术组, 2 为模型组, 3 为药物组。

Figure 3. eNOS mRNA expression was measured in rabbit iliac artery by RT-PCR

表3. 兔髂动脉内皮型一氧化氮合酶的蛋白和 mRNA 表达

Table 3. Protein and mRNA expression of eNOS in rabbit iliac artery

分 组	n	eNOS 蛋白	eNOS mRNA
假手术组	7	0.030 ± 0.020	0.350 ± 0.072
模型组	7	0.005 ± 0.003 ^a	0.150 ± 0.058 ^a
药物组	7	0.017 ± 0.007 ^{ab}	0.270 ± 0.050 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨 论

本实验发现模型组兔髂动脉内膜明显增厚, 巨

大动脉硬化斑块形成, 并可见大量泡沫细胞, 管腔明显狭窄, 而药物组受累的血管病变程度明显减轻, 斑块明显缩小, 管腔狭窄程度较轻, 表明加味补阳还五汤可显著防止家兔球囊扩张损伤髂动脉所致的管腔狭窄及抗实验性动脉粥样硬化的作用。

补阳还五汤是收载于《医林改错》中的经典方剂, 具有益气、活血、通络之功效, 临床上常用于防治心脑血管意外及其后遗症的治疗。现代动物及药理实验证明^[4,5], 补阳还五汤能增加血管内皮细胞 eNOS mRNA 和蛋白的表达, 升高血清 NO 水平, 从而发挥抗氧化应激、抗血栓、保护血管内皮功能等作用, 进而防治再狭窄的发生。

近年来, 随着 PTCA 后再狭窄病理生理机制的逐渐阐明, NO 作为一种具有多种确定的生物学作用的活性分子, 它除了可以调节血管张力外, 在预防 PTCA 后再狭窄中的作用正日益受到重视。Gomma 等^[6]调查 226 例经过支架置入患者, 6 个月后再次冠状动脉造影发现再狭窄发生率 29.3%, 同时发现 eNOS-786C 等位携带较 786T > C 再狭窄发生率高 ($P = 0.028$), 提示 NO 系统对再狭窄的重要性。国内有学者将 eNOS 基因转染至球囊损伤后的大鼠颈总动脉中, 结果发现 eNOS 基因体内转染可以在血管平滑肌细胞中成功表达, 且可以明显改善球囊损伤后颈总动脉狭窄的程度^[7]。大量研究表明, NO 系统可以在多个环节上抑制再狭窄的形成^[1,2,8-10]: ①阻止血管负性重塑; ②抑制血管平滑肌细胞增殖并诱导其凋亡; ③抑制血小板活化和血栓形成; ④抑制中性粒细胞及单核细胞的黏附和趋化; ⑤拮抗内皮素等血管收缩因子; ⑥直接消除超氧阴离子; ⑦促进内皮祖细胞归巢、增殖和分化, 修复内皮细胞等。

本研究结果观察到, 模型组兔血清 NO 含量和

tNOS 活性明显低于药物组和假手术组,而后两者之间差异无统计学意义,且模型组 eNOS 蛋白表达和 eNOS mRNA 表达明显低于药物组。说明加味补阳还五汤不仅可以改善和恢复兔受损内皮细胞的功能,还可促进其它正常部位血管内皮代偿性表达 eNOS,以维持血清 NO 含量和 tNOS 活性总体平衡,进而抑制再狭窄的发生。

综上所述,加味补阳还五汤可防治球囊损伤内膜后血管的狭窄,其机制可能与激活 NO 系统表达通路有关。

[参考文献]

- [1] Bhoday J, de Silva S, Xu Q. The molecular mechanisms of vascular restenosis: Which genes are crucial [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, 4 (3): 269-275.
- [2] Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al. Nitric oxide and cardiac function [J]. *Life Sci*, 2007, 81 (10): 779-793.
- [3] 冯 斌, 杨庭树, 张华巍. 高脂饲料喂养与动脉内膜球囊损伤结合建立兔腹主动脉粥样硬化模型 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13 (15): 2 911-914.
- [4] 孙学刚, 张丽华, 蔡红兵. 补阳还五汤对内皮型 eNOS 启动子活性的影响 [J]. *山东中医杂志*, 2005, 24 (3): 162-165.
- [5] 翟丽莉, 吕建华. 补阳还五汤的药理研究与临床新用 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2009, 7 (2): 9-10.
- [6] Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, et al. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and-786T > C) gene polymorphisms are associated with coronary instant restenosis [J]. *Eur Heart J*, 2002, 23 (24): 1 955-962.
- [7] 盛 净, 蔡文玮, 王士强. 内皮型一氧化氮合酶基因体内转染对大鼠颈总动脉损伤后血管狭窄程度的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (4): 439-442.
- [8] Sarkar K, Sharma SK, Sachdeva R, et al. Coronary artery restenosis: vascular biology and emerging therapeutic strategies [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2006, 4 (4): 543-556.
- [9] Carrier E, Brochu I, de Brum-Fernandes AJ, et al. The inducible nitric-oxide synthase modulates endothelin-1-dependent release of prostacyclin and inhibition of platelet aggregation ex vivo in the mouse [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323 (3): 972-978.
- [10] Loomans CJ, Wan H, de Crom R, et al. Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial NO synthase expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (8): 1760-767.

(此文编辑 许雪梅)