

益肾通脉汤对兔动脉粥样硬化形成过程中平滑肌细胞增殖和凋亡的影响

★ 程红 罗陆一 (广州中医药大学附属深圳市中医院心内科 深圳 318033)

摘要:目的:探讨益肾通脉汤对兔动脉粥样硬化(AS)形成过程中血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和凋亡的影响。方法:40只健康新西兰雄性大耳白兔,随机分成4组,即模型组(MG),益肾通脉汤组(YSG),阿托伐他汀组(ACG);通过兔耳缘静脉注射牛血清白蛋白及高脂饲料喂养,复制兔动脉粥样硬化模型,免疫组化法检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达,缺口末端标记法(TUNEL)检测VSMC凋亡情况。结果:与CG组比较, MG组、YSG组、ACG组PCNA和VSMC凋亡均有显著升高($P=0.000$);与MG组比较, YSG组、ACG组PCNA和VSMC凋亡表达的阳性细胞率均有显著降低($P=0.000$); YSG组和ACG组相比PCNA和VSMC凋亡表达无明显区别($P=0.255, P=0.276$)。结论:对AS形成过程中VSMC增殖和凋亡进行合理调节可能是益肾通脉汤延缓动脉粥样硬化发生发展的有效途径。

关键词:动脉粥样硬化;血管平滑肌细胞;增殖;凋亡

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

4 讨论

中药活性成分的药代动力学研究在阐述中药的药效物质基础及作用机制发挥着重要的作用。但是中药成分复杂,进入体内的活性成分含量低,常规的色谱方法不易检测。质谱检测以高灵敏性和高准确性无疑是中药体内药物分析的发展趋势。本文通过液质联用技术,定量检测了金银花粗提物灌胃给药的SD大鼠体内绿原酸的含量,区分了绿原酸代谢物对其含量的影响。

从LC-MS法及微生物效应法所得数据可以明显看出两者之间有密切关系。从侧面论证了绿原酸是金银花中主要的抗菌成分。因此,可以初步认为体内绿原酸浓度的变化一定程度反映了抗菌成分的变化,绿原酸及转化成分还是金银花在体内的主要活性成分。

本文建立一种快速、灵敏的体内绿原酸的检测方法,并应用于口服金银花粗提物的药代动力学研究,并且辅助以抗菌活性成分的微生物效应法,建立时间、浓度、抗菌效应三者同步的PK-PD模型,为解

释金银花的抗菌活性成分在体内的药效物质基础提供一种新的方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005. 152.
- [2] 孙延波,冯延民. 金银花对口腔病原性微生物体外抑菌试验的研究[J]. 中国中药杂志,1996,21(4):242.
- [3] Xin-Pu Li, Jie Yu, Jin-Yin Luo, et al. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, Ferulic Acid, Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde in Chinese Herbal Preparation by RP-HPLC[J]. Chem. Pharm. Bull., 2004, 52(10):1251.
- [4] Hongjuan Yang, Bo Yuan, Lei Li, et al. HPLC Determination and Pharmacokinetics of Chlorogenic Acid in Rabbit Plasma after an Oral Dose of Flos Lonicerae Extract [J]. Journal of Chromatographic Science, 2004, 42(4):173.
- [5] Marie-Paule Gonthier, Marie-Anne Verny, Catherine Besson, et al. Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats[J]. Nutr., 2003, 133(6):1853.
- [6] John V. Bennett, Jean L. Brodie, et al. Simplified, Accurate Method for Antibiotic Assay of Clinical Specimens [J]. Appl Microbiol. 1966, 14(2):170.

(收稿日期:2009-03-25)

Effects of Yishentongmai Decoction on the Smooth Muscle cell proliferation and Apoptosis in course of Atherosclerosis Model forming of the Rabbits

CHENG Hong, LUO Lu-yi

Shenzhen Hospital of TCM Affiliated Guangzhou University of TCM, Shenzhen 518033

Abstract: Objective: To investigate the effects of Yishentongmai decoction on the VSMC (smooth muscle cell, SMC) apoptosis in course of Atherosclerosis Model forming of the Rabbits. Methods: 40 New Zealand male rabbits divided into 4 groups, each group have 10 rabbits. To make atherosclerosis model with BSA (bull serum albumin, BSA) injection through the marginal vein of the ear and feed them high lipid diet. Detect the expression of PCNA (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) by Immunohistochemical techniques and the apoptosis of VSMC by TUNEL. Results: The expression of PCNA and the apoptosis of VSMC increased in MG, YSG and ACG compared with CG ($P=0.000$). The expression of PCNA and the apoptosis of VSMC decreased in YSG and ACG compared with MG ($P=0.000$). There is no difference between the YSG and ACG ($P=0.255, P=0.276$). Conclusion: It is possible that the Yishentongmai decoction to alleviate and retard the development of the atherosclerosis plaque by regulate the proliferation and apoptosis of VSMC.

Key words: Yishentongmai decoction, atherosclerosis, smooth muscle cell, apoptosis, proliferation

血管平滑肌细胞(VSMC)异常增殖被认为是动脉粥样硬化(AS)等疾病发生、发展的病理基础, VSMC 凋亡作为其增殖的平衡力量,可减少斑块局部细胞堆积,延缓斑块形成,抑制血栓形成及血管重构等的发生。因此对 VSMC 增殖及凋亡进行研究有助于揭示粥样硬化和动脉管腔再狭窄的病因,为 AS 的防治寻求有效的方法。

1 材料与方法

1.1 动物 健康新西兰雄性大耳白兔 40 只,体重约 1.7~2.3 kg,3~4 月龄,安徽医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(皖)2005-001。

1.2 药物与试剂 益肾通脉汤:广州中医药大学罗陆一教授提供处方,安徽中医学院制剂室提供制剂;牛血清白蛋白、增殖细胞抗原(PCNA)试剂盒、TUNEL 凋亡试剂盒:北京中杉金桥生物技术有限公司;胆固醇、猪胆盐:郑州利伟生物实业有限公司。

1.3 高脂饲料配方 胆固醇 1%、猪胆盐 0.1% (郑州利伟生物试剂有限公司)、猪油 5% (双汇食品有限公司)、基础饲料 93.9% (由安徽医科大学实验动物中心配制:玉米面 15%,豆粉 12%,麸皮 28%,骨粉 2%,鱼粉 2%,草粉 40%,食盐 0.5%,多维 0.05%,矿物质 0.1%,鱼肝油 0.35%)。

1.4 分组与造模方法 40 只兔子适应性饲养 2 周,然后随机分成 4 组,CG 组、MG 组、YSG 组、ACG 组,每组 10 只,后面 3 组为造模组。实验开始时,使用牛血清白蛋白经为各造模组兔耳缘静脉注射,每周一次,连续 3 周,造成内源性的内皮损伤,给药量为 250 mg/kg;CG 组给以普通饲料喂养,3 组给以高脂饲料喂养,至 MG 动脉粥样硬化形成,约 12 周后

取材。

1.5 给药方法 MG 组只造模不给药,YSG 组和 ACG 组从开始造模时分别给以益肾通脉汤和阿托伐他汀每天一次灌胃至 MG 组模型成功,约 12 周。用药剂量阿托伐他汀 1.25 mg/(kg·d),益肾通脉汤相当于生药 5.83 g/kg。

1.6 取材方法 3% 戊巴比妥钠 1 ml/kg 麻醉,麻醉成功后将兔固定于手术台上,剪开胸部及腹部,从主动脉根部切取整条主动脉,小心去除血管外的脂肪组织,1010 万像素数码相机拍照留存,然后将动脉置于 4% 多聚甲醛中固定,制备成约 4~5 mm 的组织块,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片备用。

1.7 指标检测方法 SP 法免疫组化检测 PCNA, TUNEL 检测 VSMC 凋亡,具体操作方法按照试剂盒。

1.8 统计方法 通过图像分析系统对进行分析,每组随机选取 5 张切片,每张切片随机挑选 5 个高倍镜($\times 400$)视野,计算 PCNA、VSMC 凋亡表达的阳性细胞率;实验结果数值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较单因素方差分析。

2 结果

见表 1。

表 1 4 组动物 PCNA 和 VSMC 凋亡表达的阳性细胞率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n(只)	PCNA(%)	VSMC 凋亡(%)
CG	8	4.21 $\pm$ 1.52	2.82 $\pm$ 1.01
MG	7	28.11 $\pm$ 4.25 $\blacklozenge$	27.72 $\pm$ 3.64 $\blacklozenge$
YSG	6	15.83 $\pm$ 4.12 $\blacklozenge\triangle$	16.58 $\pm$ 2.58 $\blacklozenge\triangle$
ACG	7	18.18 $\pm$ 2.73 $\blacklozenge\triangle$	18.09 $\pm$ 2.50 $\blacklozenge\triangle$

VS CG $\blacklozenge P=0.000$; VS MG $\triangle P=0.000$ 。

2.1 斑块内 PCNA 染色及表达结果 正常动脉内膜下几乎无 PCNA 阳性染色。PCNA 阳性细胞为细胞核呈棕黄色染色,阳性细胞多集中在 AS 斑块的纤维帽及靠近肩部,斑块的基地部位也较多表达,脂质核心内偶尔有极少阳性细胞染色,少量的阳性细胞融合成片。

与 CG 组比较, MG 组、YSG 组、ACG 组 PCNA 均有显著升高, $P = 0.000$; 与 MG 组比较, YSG 组、ACG 组 PCNA 表达的阳性细胞率均有显著降低, $P = 0.000$; YSG 组和 ACG 组相比 PCNA 表达无明显区别 $P = 0.255$ 。

2.2 斑块内 VSMC 凋亡染色及表达结果 正常动脉内膜下几乎无 VSMC 凋亡阳性染色。造模组,免疫组织化学显示 VSMC 凋亡阳性的 VSMC 多集中在脂质核周围靠近内膜或者中膜区域,多为圆形、椭圆形或梭形的细胞核染色,均匀棕黄染色,凋亡细胞体积缩小,可以看到部分细胞致密的染色质边集,有的断裂成核碎片,可能是形成了膜包裹性的凋亡小体。

与 CG 组比较, MG 组、YSG 组、ACG 组 VSMC 凋亡均有显著升高, $P = 0.000$; 与 MG 组比较, YSG 组、ACG 组 VSMC 凋亡均有显著降低, $P = 0.000$; YSG 组和 ACG 组相比, VSMC 凋亡无明显区别, $P = 0.276$ 。

3 讨论

AS 形成过程中, VSMC 大量增殖,增殖的 VSMC 内部结构发生变化,其表型也发生改变,由收缩型向合成型转变,肌丝成分减少,粗面内质网和高尔基体等蛋白质合成器很发达,其功能与结构改变相适应,以收缩为主变为以增殖为主;合成型 VSMC 在各种因子的作用下大量的增殖,并活跃地合成胶原纤维、弹力纤维、蛋白多糖等 ECM 成分,摄取脂质转变为泡沫细胞,部分保持增殖活性,并由中膜向内膜迁移,结果最初血管壁表现为增厚,随着泡沫细胞增多,血管壁上的增厚演变成脂质斑块^[1],随后间质成分日渐增多成为斑块的主要成分在外周包绕,病灶处的 VSMC 和由其分泌胶原纤维、ECM 形成纤维帽,覆盖于深部大量脂质之上^[2],至此 AS 斑块形成。

VSMC 的增殖状态可以通过对 PCNA 的测定来监测, PCNA 是 PCNA 基因表达的核内蛋白,是 DNA 多聚酶 δ 的一个辅助亚单位,其含量在细胞周期中的变化与 DNA 的合成一致^[3],与 DNA 多聚酶协同作用,影响 DNA 链的复制,使细胞进入并通过 S 期,

在细胞增殖中起关键性作用。细胞在静息期中 PCNA 含量很低,但在周期 S 期中, PCNA 则大量表达,因此 PCNA 指数与细胞的增殖状态显著相关,可以作为细胞周期中 S 期细胞数量的特异性标志^[3,4],因此对 PCNA 蛋白表达进行检测可以得知 VSMC 的增殖情况。

与 VSMC 增殖一样, VSMC 的凋亡是调节内膜厚度演变的重要机制之一,细胞凋亡发生率和细胞增殖率成正比以保持细胞总数不变。AS 病变中,可能这种平衡破坏,细胞凋亡受抑,增殖活跃,导致 AS 后的官腔狭窄,而凋亡过度,致使 VSMC 数量减少,分泌的 ECM 成分减少,并且在 AS 形成过程中 VSMC 分泌 MMPs 增加,进一步对 ECM 降解,导致纤维帽变薄, AS 斑块易损性增加,斑块容易破裂。

从中医的角度分析认为:肾阳促进温煦、运动、兴奋和化气的功能,这些功能使血液在脉管内正常的运行,肾阳虚,则全身的津液和血液运行的速度减慢,津液不得输布、聚液成痰,血液不得运行、留而成瘀,类似于动脉内血液的正常轴流失常,导致炎性细胞浸润、内皮损伤、脂质沉积,最后形成 AS;肾阴的主要生理作用是促进机体的滋润、宁静、成形和制约阳热等功能。肾阴通过三焦到达全身,促进津液的分泌和血液的生成,津液与血液有滋润和濡养的作用,当肾阴亏虚,则津枯血少,化痰成瘀,滋润和濡养的作用失常,类似于血管内皮损伤后,血流异常,炎性细胞浸润、脂质沉积等,最后导致 AS。因此,肾之阴阳亏虚,痰瘀互结是 AS 发生发展的重要病机之一,因此,本实验使用具有补肾活血化痰作用的益肾通脉汤取得了显著的疗效。

参考文献

- [1] Hanke H, Lenz C, Finking G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis - a review [J]. Acta Chir Belg, 2001, 101(4): 162 - 169.
- [2] Rivard A, Andrés V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases [J]. Histol Histopathol, 2000, 15(2): 557 - 571.
- [3] Miniati DN, Hoyt EG, Feeley BT, et al. Ex vivo antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Cdc2 kinase inhibit graft coronary artery disease. Circulation, 2000, 102(19 Suppl 3): III 237 - 242.
- [4] Van Dierendonck J H, Wijnman J H, Keijzer R, et al. Cell cycle related staining patterns of anti - proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki267 staining [J]. Am J Pathol, 1991, 138(5): 1 165 - 1 172.

(收稿日期: 2009-02-10)