

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 23-0021-05

蛇床子素对大鼠颈动脉内膜增生的影响

张宇, 孙淑娴, 马威, 李昌义, 王斌, 王兆祥, 亢小丽, 纪征

(河北省唐山工人医院 心内一科, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 研究蛇床子素对球囊损伤后大鼠颈动脉内膜增生的影响。**方法** SD 雄性大鼠 30 只, 随机分为假手术组、模型组、低剂量蛇床子素组 [10 mg/(kg·d)] 和高剂量蛇床子素组 [30 mg/(kg·d)]。复制大鼠颈动脉球囊损伤模型, 蛇床子素组大鼠术前 2 d 开始给药, 假手术组、模型组同时给予 0.9% NaCl, 共给药 16 d。术后第 13 天行苏木精-伊红染色法染色, 观察血管内膜的形态学变化; 采用免疫荧光法检测新生内膜增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达, ELISA 检测大鼠受损血管中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平, Western blot 检测核转录因子 κ B (NF- κ B) 和 Toll 样受体 (TLR4) 蛋白的表达。**结果** 与模型组相比, 高、低剂量蛇床子素组均能减少球囊损伤后新生内膜面积、内膜/中膜比 ($P < 0.05$), 并使 PCNA 阳性指数降低 ($P < 0.05$), 降低球囊损伤血管组织 TLR4 和 NF- κ B 的过表达和炎症介质 TNF- α 和 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$)。**结论** 蛇床子素能够抑制大鼠颈动脉球囊损伤后的内膜增生, 主要通过影响 TLR4/NF- κ B 通路, 减轻炎症反应, 抑制血管平滑肌细胞的增殖而发挥作用。

关键词: 蛇床子素; 球囊损伤; 血管平滑肌; 内膜增生

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Effect of Osthole on carotid intimal hyperplasia in rats

Yu Zhang, Shu-xian Sun, Wei Ma, Chang-yi Li, Bin Wang, Zhao-xiang Wang, Xiao-li Kang, Zheng Ji
(Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Osthole on carotid intimal hyperplasia in rats after balloon injury. **Methods** Male SD rats were randomly assigned to a sham group, a model group, a low-dose group and a high-dose group. The rats of the model group were injured by balloon catheter. The rats in the low-dose group and the high-dose group were given 10 mg/(kg·d) and 30 mg/(kg·d) respectively for 16 days while those in the sham group and model group were given normal saline. On the 13th day after balloon injury, HE staining was applied for observation of the morphological changes of carotid intima, immunohistochemical staining was used to detect the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neointima, ELISA was employed to determine the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-1 β , and Western blot was performed to test the expressions of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and Toll-like receptor (TLR4) proteins. **Results** Compared with the model group, Osthole significantly decreased the neointima area and the intimal/media ratio, markedly reduced positive index of PCNA expression. Furthermore, Osthole significantly inhibited NF- κ B and TLR4 over-expressions induced by balloon injury and reduced the levels of TNF- α and IL-1 β . **Conclusions** These findings suggest that Osthole is involved in the control of neointimal formation via inhibiting TLR4 and NF- κ B activation, decreasing inflammatory reaction and inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells.

Keywords: Osthole; balloon injury; vascular smooth muscle; intima hyperplasia

冠状动脉疾病通过经皮冠状动脉介入治疗, 虽然可以改善患者的心肌血流灌注, 但是术后再狭窄成为

主要临床问题。由于术后受损血管的自我修复, 导致炎症的发生、血管平滑肌细胞增殖并向内膜迁移, 从

收稿日期: 2018-02-17

[通信作者] 纪征, E-mail: zizeng2017@126.com; Tel: 18332906566

而使血管内膜增厚及再狭窄发生^[1]。有研究表明, Toll 样受体 TLR4 (toll-like receptor, TLR4) 与核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B) 信号通路参与受损血管内膜增生^[2-4]。因此阻断 TLR4/NF- κ B 表达, 可有效抑制炎症反应、减轻细胞增殖、防止术后再狭窄。蛇床子素为香豆素化合物, 常见于蛇床、当归等伞形科中药材, 具有抗炎、抗氧化、调节血脂、改善记忆等药理作用^[5-6]。本研究采用大鼠颈动脉内皮损伤的模型, 予以蛇床子素后, 观察其对血管内膜和平滑肌细胞增殖的影响, 并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

蛇床子素 (中国药品检验所, 纯度 >98%), 小鼠增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体、DyLight 594 红色荧光二抗购自美国 Santa Cruz 公司, BSA 封闭液、DAB 显色试剂盒、TBST 缓冲液、枸橼酸盐缓冲液购自北京索莱宝生物技术有限公司, TNF- α 、IL-1 β 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自大连凡邦生物科技有限公司, 切片机 (德国 Leica 公司 CM1900), 自动染色机 (德国 Leica 公司 AUTOSTAINERXL), 自动封片机 (德国 Leica 公司 CV5030), 光学显微镜 (日本 Olympus 公司 BX51), 病理图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 (美国 Media Cybernetics 公司)。

1.2 动物模型的复制与分组

1.2.1 大鼠颈动脉球囊损伤模型的复制 SD 大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉, 颈正中中线切口, 通过颈外静脉注射肝素钠 (100 u/kg), 夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉远心端, 进而阻断血流。于颈外动脉远心端处, 剪出斜形切口, 在颈外动脉切口处将导引钢丝和 PTCA 球囊导管 (1.5 mm \times 20.0 mm) 逆行插入颈总动脉, 距颈外动脉分叉处 2.5 cm, 向球囊内注入生理盐水直至球囊充盈, 抽动并旋转球囊, 从而剥脱内膜。假手术组不插入球囊导管, 其余各组平行操作。给药干预 16 d 后处死所有动物, 分离左颈总动脉进行实验^[7]。

1.2.2 实验动物分组 健康雄性 SD 大鼠, 体重 250 ~ 300 g, 由北京大学实验动物学部提供。实验动物随机分为 4 组: ①假手术组; ②模型组: 颈动脉球囊损伤组 +0.9% NaCl; ③低剂量蛇床子素组: 颈动脉

球囊损伤 +10 mg/(kg \cdot d) 蛇床子素, 1 次/d; ④高剂量蛇床子素组: 颈动脉球囊损伤 +30 mg/(kg \cdot d) 蛇床子素, 1 次/d。

1.3 苏木精-伊红染色法

采用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 显微镜下观察血管内膜的病理变化, 通过 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件, 测量各组血管内膜和中膜面积比 (intima/media, I/M)^[8]。

1.4 免疫组织化学法荧光染色

采用免疫组织化学法检测斑块内 PCNA^[9-10], 组织切片脱蜡后, 抗原修复 15 min, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 荧光二抗 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min, PBS 漂洗, 中性树脂封片。每张切片随机观察 3 个不同视野, 计算 PCNA 阳性表达指数, PCNA 阳性表达指数 = PCNA 阳性细胞数 / 细胞总数 \times 100%。

1.5 ELISA

采用 ELISA 检测损伤血管 TNF- α 和 IL-1 β 水平。受损血管预冷 PBS 洗涤, 滤纸吸干水分, 加入 RIPA 裂解液后, 在冰水中充分研磨 5 min, 低温高速离心机 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照试剂盒说明书检测 TNF- α 和 IL-1 β 水平。

1.6 Western blot 检测

收集各组血管, PBS 洗 2 次, 用蛋白裂解液在冰上研磨血管 3 min, 提取蛋白, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定蛋白浓度, 配平各组蛋白浓度, 蛋白变性, SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, NF- κ B p65 (1 : 500) 或 TLR4 (1 : 200) 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 弃一抗, TBST 洗膜 3 次, 5 min/次; 将膜转入杂交袋, 室温孵育二抗 (1 : 5 000) 2 h, 弃二抗, TBST 洗膜 3 次, 5 min/次; ECL 系统显影, 采用 β -actin 作为内参, 计算相对灰度值, 实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

数据处理采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血管结构的改变

大鼠球囊损伤后可见动脉内皮剥脱, 部分内弹力板由正常的波浪状变平坦, 失去弹性; 并且新生内膜形成并增厚, 新生内膜中可见大量血管平滑肌细胞,

纤维成分增多, 管腔呈向心或偏心性狭窄, 中膜可见血管平滑肌细胞排列紊乱。假手术组、模型组和高、低剂量蛇床子素组的 I/M 比值分别为 (0.14 ± 0.03) 、 (0.87 ± 0.13) 、 (0.45 ± 0.14) 和 (0.56 ± 0.16) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=25.768, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 与假手术组比较, 模型组 I/M 比值升高 ($t=5.864, P=0.000$); 低剂量和高剂量蛇床子素组的 I/M 比值与模型组比较, 差异有统计学意义 ($t=3.004$ 和 $3.281, P=0.032$ 和 0.027), 低剂量和高剂量蛇床子素组血管壁厚度减小, 抑制了新生内膜的形成。见图 1。

2.2 新生血管内膜中 PCNA 的表达

PCNA 染色阳性细胞呈红色荧光。假手术组、模型组和高、低剂量蛇床子素组的 PCNA 表达指数分别为 $(20.1 \pm 1.2)\%$ 、 $(54.8 \pm 4.9)\%$ 、 $(28.3 \pm 3.9)\%$ 和 $(41.2 \pm 4.1)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=17.476, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 模型组与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($t=7.104, P=0.000$), 模型组新生平滑基层可见大量的阳性表达细胞; 低剂量和高剂量蛇床子素组与模型组比较, 差异有统计学意义 ($t=2.564$ 和 $4.132, P=0.034$ 和 0.028), 低剂量和高剂量蛇床子素组的新生平滑基层 PCNA 阳性细胞数较少。见图 2。

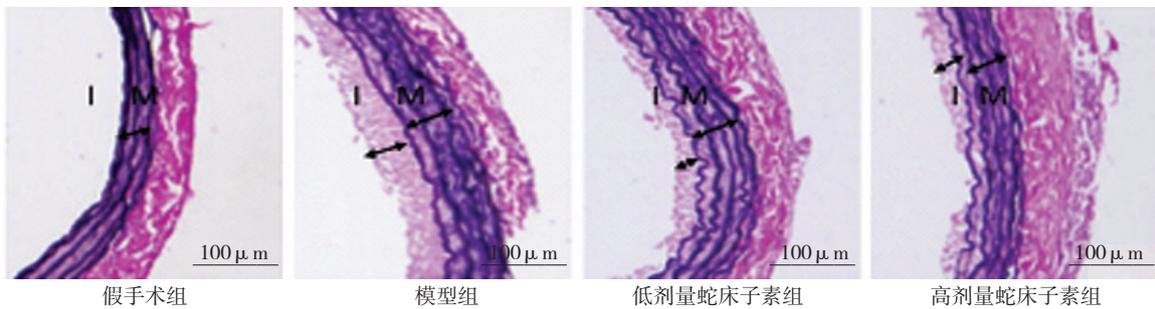


图 1 各组大鼠颈动脉 (HE)

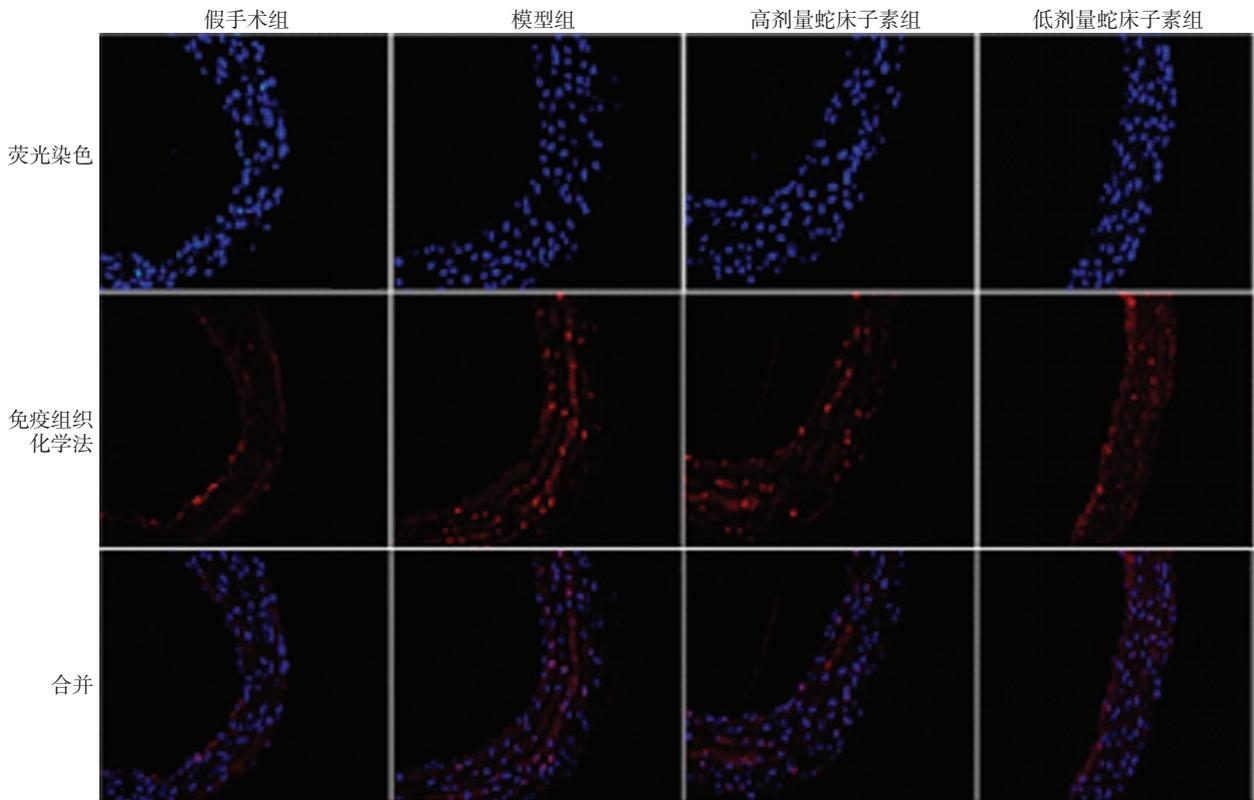


图 2 各组新生血管内膜中 PCNA 的表达 ($\times 400$)

2.3 受损血管 TNF- α 和 IL-1 β 水平

各组 TNF- α 和 IL-1 β 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型成立。模型组较假手术组大鼠血管 TNF- α 和 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 低剂量蛇床子素组 TNF- α 和 IL-1 β 水平低于模型组 ($P < 0.05$); 高剂量蛇床子素组 TNF- α 和 IL-1 β 水平低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组受损血管 TNF- α 和 IL-1 β 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β
假手术组 ($n=8$)	38.7 \pm 4.2	22.5 \pm 2.5
模型组 ($n=7$)	103.8 \pm 5.2 ¹⁾	59.1 \pm 4.3 ¹⁾
低剂量蛇床子素组 ($n=7$)	83.5 \pm 8.1 ²⁾	41.9 \pm 5.2 ²⁾
高剂量蛇床子素组 ($n=8$)	56.2 \pm 5.3 ²⁾	34.3 \pm 5.5 ²⁾
F 值	74.080	34.424
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

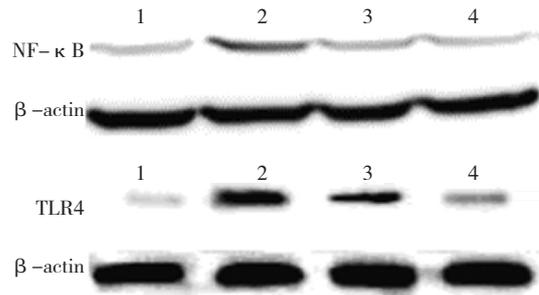
2.4 各组血管 NF- κ B 和 TLR4 蛋白表达的变化

各组 NF- κ B 和 TLR4 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 模型组 NF- κ B 蛋白表达水平较假手术组升高 ($P < 0.05$); 不同剂量蛇床子素给药干预后, 较模型组 NF- κ B 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。模型组 TLR4 蛋白表达水平较假手术组升高 ($P < 0.05$); 而给予高、低剂量蛇床子素后, 可抑制 TLR4 蛋白过表达 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 3。

表 2 各组血管 NF- κ B 和 TLR4 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF- κ B	TLR4
假手术组 ($n=8$)	0.156 \pm 0.017	0.214 \pm 0.065
模型组 ($n=7$)	0.643 \pm 0.018 ¹⁾	0.582 \pm 0.060 ¹⁾
低剂量蛇床子素组 ($n=7$)	0.359 \pm 0.020 ²⁾	0.317 \pm 0.041 ²⁾
高剂量蛇床子素组 ($n=8$)	0.282 \pm 0.042 ²⁾	0.257 \pm 0.043 ²⁾
F 值	184.069	28.827
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$



1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 高剂量蛇床子素组; 4: 低剂量蛇床子素组

图 3 各组血管 NF- κ B 和 TLR4 蛋白的表达

3 讨论

预防术后再狭窄是当前心血管病学研究领域所面临的重要课题之一。研究表明, 球囊扩张对血管壁的直接损伤导致多种炎症应答、细胞生长因子的释放和血管平滑肌细胞的增殖、迁移、表型改变, 以及血管内膜增生, 共同造成术后再狭窄的发生^[11-12]。本实验采用不同剂量蛇床子素治疗颈动脉球囊损伤大鼠。HE 染色结果表明, 模型组 I/M 比值高于假手术组, 蛇床子素给药干预后, 与模型组比较 I/M 比值降低, 表明蛇床子素具有抑制内膜增生的作用。

PCNA 只存在于正常增殖细胞和肿瘤细胞, 参与细胞 DNA 的合成, 反映细胞增殖状态。因此, 通过其表达的高低可以间接反映血管平滑肌细胞的增殖情况。实验结果显示, 模型组大鼠新生内膜中 PCNA 阳性表达指数最高, 在蛇床子素组, 新生内膜中 PCNA 阳性表达指数较模型组降低, 说明蛇床子素通过抑制血管平滑肌细胞的增殖, 从而降低新生内膜的增生。

TLR 可以调控获得性免疫应答类, TLR4 介导的炎症细胞发挥重要作用, 其与增殖的血管平滑肌细胞参与动脉粥样硬化形成和再狭窄^[13]。激活状态的 TLR4 可活化 NF- κ B, 产生趋化因子和细胞因子, 如 IL-1 β 、TNF α ^[14-15]。NF- κ B 激活介导炎症级联反应, 血栓形成, 刺激炎症基因持续表达, 促进 TNF- α 、IL-1 β 的分泌, 导致新生内膜形成, 促使其增殖、迁移, 最终导致血管壁发生病理改变。因此, 有效控制炎症反应是控制术后再狭窄发生、发展的有效途径之一^[16]。抑制 TLR4/NF- κ B 激活便可有效阻止其介导的下游炎症反应, 阻断其调节血管平滑肌细胞增殖。本研究结果发现, 蛇床子素可以降低球囊损伤大鼠动脉血管 TLR4/NF- κ B 的表达和炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 水

平, 进而延缓或减轻移植静脉再狭窄的病变程度。

总之, 蛇床子素通过抑制 TLR4/NF- κ B 的表达, 减少炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的生成, 抑制大鼠颈动脉球囊损伤后诱导的内膜增生、血管平滑肌细胞增殖。本研究为临床应用蛇床子素, 预防术后再狭窄的发生提供了实验依据。

参 考 文 献:

- [1] TANG Y L, JIANG J H, WANG S, et al. TLR4/NF- κ B signaling contributes to chronic unpredictable mild stress-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. PLoS One, 2015, 10(4): DOI: 10.1371/journal.pone.0123685.
- [2] 吴亚希, 杨丽霞. Toll 样受体 4 与心血管疾病的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2016, 37(1): 58-61.
- [3] ZHANG X, WANG Y, HU W, et al. Interleukin-1/toll-like receptor-induced nuclear factor kappa B signaling participates in intima hyperplasia after carotid artery balloon injury in goto-kakizaki rats: a potential target therapy pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(8): DOI: 10.1371/journal.pone.0103794.
- [4] YDE P, MENGEL B, JENSEN M H, et al. Modeling the NF- κ B mediated inflammatory response predicts cytokine waves in tissue[J]. BMC Syst Biol, 2011, 19(5): 115.
- [5] 梅艳飞, 张力. 蛇床子素药代动力学及神经系统药理作用的研究进展 [J]. 神经药理学报, 2014, 4(3): 57-64.
- [6] CHEN T, LIU W, CHAO X, et al. Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Neuroscience, 2011, 2(183): 203-211.
- [7] 钟一鸣, 钟华平, 廖伟, 等. 大鼠颈总动脉球囊损伤模型建立及其动态病理学和 P27 的变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(13): 13-17.
- [8] 熊国祚, 彭鹏, 蒋杰, 等. 二苯乙炔苷对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生的作用 [J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(1): 25-30.
- [9] 赵京山, 方明星, 郭浅好, 等. 羟基红花黄色素 A 通过影响 PCNA 表达和 MEK-ERK1/2 信号通路抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(7): 984-988.
- [10] 陈静, 周燕, 夏鹏程, 等. α -SMA 和 PCNA 在 OSAS 继发高血压模型大鼠血管中的表达 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5): 708-711.
- [11] SPARGIAS K, GYÖNGYÖSI M, HEMETSBERGER R, et al. Valvuloplasty with a paclitaxel-eluting balloon prevents restenosis in an experimental animal model of aortic stenosis[J]. J Heart Valve Dis, 2014, 23(4): 484-491.
- [12] WU X, LIU W, JIANG H, et al. Kindlin-2 siRNA inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, migration and intimal hyperplasia via Wnt signaling[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2): 436-444.
- [13] LIN F Y, CHEN Y H, TASI J S, et al. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(12): 2630-2637.
- [14] ROY A, SRIVASTAVA M, SAQIB U, et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4) -mediated signaling pathways[J]. 2016, 40, (11): 79-89.
- [15] TANG Y L, JIANG J H, WANG S, et al. TLR4/NF- κ B signaling contributes to chronic unpredictable mild stress-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. PLoS One, 2015, 10(4): DOI: org/10.1371/journal.pone.0123685.
- [16] DEMASI M, LAURINDO F R. Physiological and pathological role of the ubiquitin proteasome system in the vascular smooth muscle cell[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(2): 183-193.

(童颖丹 编辑)