

旋覆花提取物抑制血管内皮剥脱后内膜增生的实验研究

狄柯坪, 韩梅*, 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所 省部共建教育部重点实验室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 观察旋覆花提取物 (*Inula britannica* extract, IBE) 对内皮剥脱诱导的新生内膜形成的影响, 并初步探讨其机制。方法 采用主动脉球囊损伤后血管再狭窄动物模型, 以免疫组化和 Western blotting 方法分别检测血管内膜增生情况、内膜与中膜比值 (I/M)、核转录因子 κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)、激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 的表达变化及 IBE 对它们的影响。结果 在实验结束时, 模型组损伤处血管壁血管平滑肌细胞 (VSMC) 大量增生、新生内膜呈弥漫性增厚、I/M 值增加, NF- κ B p65、AP-1 的表达均比对照组明显升高 ($P < 0.05$)。IBE 给药组内膜增生程度显著减轻、I/M 值减少 ($P < 0.05$), NF- κ B p65、AP-1 的表达均比模型组明显降低 ($P < 0.05$), 细胞核 NF- κ B 减少。结论 IBE 可能是通过抑制 NF- κ B p65 和 AP-1 的表达而发挥抗血管炎症反应和抑制内膜增生的作用。

关键词: 旋覆花提取物 (IBE); 血管内皮剥脱; 内膜增生; 核转录因子 κ B (NF- κ B); 激活蛋白-1 (AP-1)

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)01-0085-04

Inhibition of *Inula britannica* extract on neointima formation after endangium scrape

DI Ke-ping, HAN Mei, WEN Jin-kun

(Key Laboratory Established by Province and Education Ministry, Institute of Basic Medicine,

Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Key words: *Inula britannica* extract (IBE); endangium scrape; neointima formation; nuclear factor- κ B (NF- κ B); activator protein-1 (AP-1)

高血压、动脉粥样硬化、经皮腔内冠状动脉成形术 (PTCA) 及支架植入后血管再狭窄等心血管疾病是由多种因素对血管内皮刺激所触发的慢性炎症反应, 血管平滑肌细胞的异常增殖是其发生的病理基础。核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 作为一种多向性转录因子, 其结合序列存在于多种促炎和促增殖基因的启动子和增强子中, 通过激活靶基因表达而参与机体的免疫炎症反应及细胞增殖分化与凋亡。因此, 如何调控血管细胞的 NF- κ B 活性以阻断炎症应答信号通路, 减少血管损伤部位炎症介质的释放, 已成为目前抗心血管疾病药物研究的重要策略之一。

欧亚旋覆花 *Inula britannica* L. 是一种用于治疗偏头痛的传统中药, 具有活血化瘀、抗炎镇痛之功效, 本课题组曾经用有机溶剂萃取法从该植物中分离得到一种具有抗炎镇痛作用的有效部位——旋覆花提取物 (*Inula britannica* extract, IBE), 其中的有效单体主要是旋覆花内酯 (acetylbrannilactone, ABL) 及其 3 种同系物。已经证实 ABL 通

过抑制 RAW 264.7 细胞中 NF- κ B 的激活而抑制炎症相关基因 iNOS、COX2 等的表达而发挥抗炎作用^[1]。但对于 RAW 264.7 细胞中 IBE 的抗炎作用机制尚不明确。本研究基于内皮剥脱所引起的慢性血管炎症是导致内膜增生的主要因素, 采用免疫组织化学及 Western blotting 方法, 探讨 IBE 对球囊损伤主动脉炎症进展的抑制作用及其分子机制, 为研发新型抗血管再狭窄药物奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料: IBE (含 ABL 2.66 mg/mL), 由河北医科大学药学院从欧亚旋覆花的氯仿提取物中分离制备 (已获专利授权); 免疫组化染色即用型 SP 系列试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; 兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体、兔抗鼠 AP-1 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗及发光试剂均购自美国 Santa Cruz 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。成年雄性 SD 大鼠由河北省医学动物中心提供, 体重 300~350 g。

1.2 大鼠主动脉内膜损伤模型的复制与分组: 按照

收稿日期: 2006-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472167); 河北省自然科学基金资助项目 (C2005000722)

作者简介: 狄柯坪 (1970—), 男, 辽宁沈阳人, 现为河北医科大学在读博士, 主要从事中草药活血化瘀作用的分子机制研究。

Tel: (0311) 86876173

* 通讯作者 韩梅 Tel: (0311) 86265563 E-mail: hanmei@hebm.u.edu.cn

文献方法^[2]进行模型复制。用 25% 乌拉坦 3 mL/kg ip 麻醉大鼠,分离左颈总动脉,于左颈总动脉远心端结扎,近心端夹闭。自左颈总动脉远心端剪一楔形切口,将自制的球囊导管向近心端插入至腹主动脉远端,注入 0.9% 氯化钠溶液 0.1~0.15 mL,使球囊充分膨胀,然后回拉至胸主动脉起始部。期间以导丝为轴旋转球囊,反复 3 次,退出导管,结扎颈总动脉,松开动脉夹恢复血流,缝合切口。术后大鼠随机分为模型组及给药组 ($n=5$)。给药组于术前 3 d 及术后每天 ig IBE 26 mg/kg,共给药 14 d;模型组用聚山梨酯 80-水溶液 ig 给药;以假手术大鼠为对照组。

1.3 标本制备及形态学观察:模型组及给药组大鼠于术后 21 d 采取股动脉放血法处死。于胸腹主动脉非连续切取 2 段各约 0.5 cm 长的血管,置于 4% 多聚甲醛液中固定,石蜡包埋,间断均匀切片,切片厚约 5 μ m,常规 HE 染色,光镜下观察内膜增生情况并测量内膜与中膜比值 (I/M)。

1.4 免疫组织化学染色:按照试剂盒说明操作。血管组织贴片、干燥后常规脱蜡、脱水,经正常山羊血清封闭后,分别加入抗 p65 (1:80)、抗 AP-1 (1:80) 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加生物素-辣根过氧化物酶标记的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗 3 次。DAB 显色后于镜下观察。阴性对照用 PBS 替代一抗。在显微镜下随机选取 5 个视野,计数 p65、AP-1 阳性染色细胞数,以细胞核中出现棕褐色浓染颗粒作为判定阳性细胞的标准。

1.5 Western blotting 分析:按照文献的方法^[3,4]分别提取血管细胞胞浆蛋白、核蛋白和总蛋白,用 Lowry 法测定蛋白浓度。各组取等量蛋白提取液经 8% SDS-PAGE 电泳分离后,电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭,依次与兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体 (1:400) 或 AP-1 多克隆抗体 (1:400) 及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:10 000) 室温反应 2 h,经 TTBS、TBS 充分洗涤,采用化学发光法显影。用美国 Kodak 公司 ID 数码成像分析系统分析结果。

1.6 统计学处理:实验数据经 SPSS10.0 统计软件包处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数采用单因素方差分析 (One Way ANOVA),组间均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 血管形态学改变:光镜下对照组大鼠主动脉壁各层结构完整,内膜表面光滑仅见单层内皮细胞,中

膜血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 排列整齐呈梭形。球囊损伤 21 d 后,血管内膜可见 VSMC 大量增殖且排列紊乱,内膜呈弥散性增厚;中膜 VSMC 排列紊乱;管腔缩小。给药组的血管内膜增生明显减轻,内膜增厚程度比模型组显著减轻,管腔内径虽明显扩大,但仍旧没有恢复到正常水平 (图 1)。

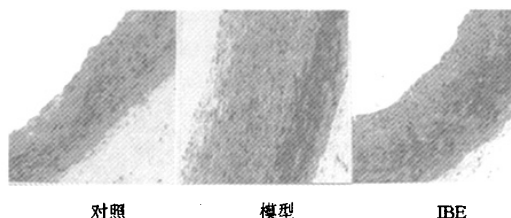
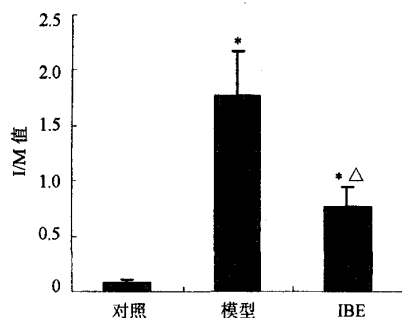


图 1 大鼠主动脉组织形态学改变

Fig. 1 Histomorphological changes of rat aorta

对照组 I/M 值很小,约 0.04 ± 0.01 ,模型组 I/M 值明显增加,达 1.76 ± 0.11 ,与对照组相比增加具有显著差异 ($P < 0.05$)。给药组 I/M 值为 0.76 ± 0.16 ,虽比模型组减少,但仍比正常组高 ($P < 0.05$),见图 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

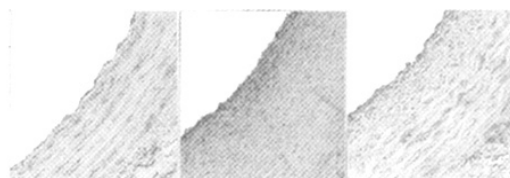
* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

图 2 大鼠主动脉 I/M 值 ($n=5$)

Fig. 2 I/M Values of rat aorta ($n=5$)

2.2 球囊损伤后血管壁 NF- κ B p65 的变化:结果发现,对照组主动脉未见 p65 阳性染色细胞;模型组新生内膜处可见大量 p65 阳性细胞;给药组,新生内膜处仅可见少量 p65 阳性细胞。p65 阳性细胞数及着色强度与内膜增厚有正相关关系 (图 3)。

为了进一步观察 p65 在细胞中的分布变化,将分布提取的细胞不同区域的蛋白进行 Western blotting 分析。结果显示,在正常血管细胞中 p65 主要分布于胞浆中,胞核中仅有少量 p65 存在;内皮剥脱诱发的新生内膜中 p65 在胞核中的聚集明显增多;而给药组血管细胞核中 p65 虽减少但尚未恢



对照 模型 IBE

图 3 大鼠主动脉血管壁 NF-κB p65 阳性表达

Fig. 3 Positive expression of NF-κB p65 on vessel wall of rat aorta

复至正常水平。p65 在 3 组血管细胞浆中的量无明显差异。结果表明,IBE 具有抑制血管细胞 p65 表达与核转位的效应(见图 4 和 5)。

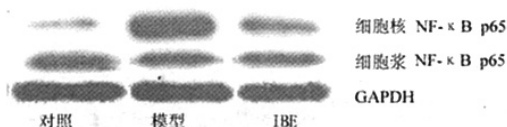


图 4 NF-κB p65 Western blotting 分析结果

Fig. 4 Analysis of NF-κB p65 by Western blotting

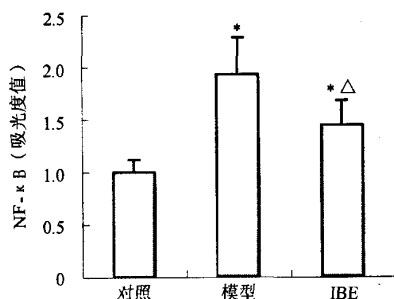


图 5 IBE 对新生血管内膜 NF-κB p65 表达的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Inhibition of IBE on NF-κB p65 expression of neoendangium ($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.3 球囊损伤后血管壁 AP-1 的表达变化:免疫组化及 Western blotting 分析结果显示,模型组血管的新生内膜中可见大量 AP-1 阳性染色的平滑肌细胞(图 6),而且细胞中的 AP-1 水平比正常血管组织明显升高($P<0.05$)(图 7 和 8),说明这些细胞具有较强的增殖活性。给予 IBE 的大鼠血管在内皮剥脱后内膜增生受抑制的同时,AP-1 阳性染色的细胞数及单个细胞的染色强度均较模型组降低,组织蛋白提取液中的 AP-1 浓度也减少(图 7 和 8)。结果提示,IBE 通过抑制 AP-1 表达而减缓内膜增生。

3 讨论

PTCA 作为治疗冠状动脉硬化性心脏病的有



对照 模型 IBE

图 6 大鼠主动脉新生血管内膜 AP-1 表达

Fig. 6 Expression of AP-1 in neoendangium of rat aorta

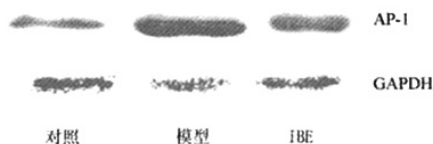
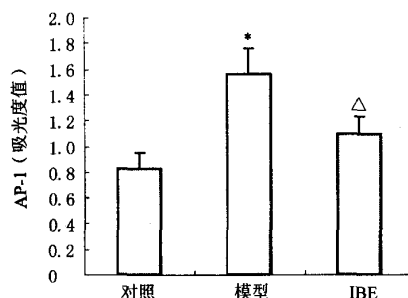


图 7 AP-1 Western blotting 分析结果

Fig. 7 Analysis of AP-1 by Western blotting



与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: Δ $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; Δ $P<0.05$ vs model group

图 8 IBE 对新生血管内膜 AP-1 表达的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 8 Inhibition of IBE on AP-1 expression of neoendangium ($\bar{x} \pm s, n=5$)

效手段现已得到广泛的应用,但介入性治疗后 3~6 个月约 35%~50% 的患者出现血管再狭窄,严重限制了 PTCA 的远期疗效。目前认为造成 PTCA 术后再狭窄的主要病理基础是,血管内膜受到刺激后导致 VSMC 表型改变,从血管中膜迁移至内膜并进一步分裂增殖,从而形成新生内膜^[5]。因此如何抑制 VSMC 的异常增殖,防止再狭窄的发生,就成为心血管疾病研究的一个热点。

NF-κB 作为一种多向性转录因子其结合序列存在于多种促炎和促增殖基因的启动子和增强子中,通过激活靶基因表达,广泛参与机体的免疫炎症反应、细胞周期调控、细胞增殖分化与凋亡。本研究表明血管内皮损伤可诱导血管细胞(包括单核/巨噬细胞,平滑肌细胞等)高表达 NF-κB,并且后者在细胞核的聚集增多。有体外实验表明,用碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)刺激大鼠胸主动脉可以导

致 VSMC 增殖,并认为 VSMC 增殖的主要原因是 NF- κ B 转录活性增高及与 DNA 结合能力增强^[6]。如果转染 NF- κ B 顺式元件诱骗双链寡核苷酸 (decoy ODNs) 到猪冠状动脉球囊损伤处,就可明显抑制血管成型术后 VSMC 的增殖^[7]。可见 NF- κ B 对平滑肌细胞的异常增殖起着关键性作用。

AP-1 是一类能与许多基因上的 AP-1 位点 [佛波酯应答元件 (TRE)] 结合的反式作用因子,它参与调控与增殖相关靶基因的转录活性。NF- κ B 可以调节 AP-1 的表达,当 NF- κ B 活性受抑制后使 c-fos 基因的表达及 AP-1 活性均受到明显抑制,导致 AP-1 依赖的血管内皮生长因子 (VEGF) 表达下调,细胞增殖受限^[8]。可见,NF- κ B 与 AP-1 在增殖性疾病中具有共活化特性,两者在转录调控中可能存在“交谈”。

欧亚旋覆花为菊科旋覆花属植物,其性味咸、温,具有活血化痰、抗炎止痛之功效,是一种传统的中草药。欧亚旋覆花的化学成分有 40 多种,目前认为有药理活性的成分多为倍半萜内酯类化合物。本研究小组利用已经申请专利的技术从欧亚旋覆花的氯仿提取物中分离出有效单体成分——旋覆花内酯,一种结构上属于苯并呋喃酮衍生物的物质。本研究小组曾在体外细胞培养实验中发现,ABL 通过抑制 RAW 264.7 巨噬细胞合成炎症介质 NO、前列腺素 I₂(PGI₂) 而发挥抗炎作用,并证明其分子机制为 ABL 抑制 NF- κ B 的活化和两种与炎症密切相关的酶,即诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧化酶 (COX-2) 的表达。本研究在整体水平上进一步观察旋覆花单体有效成分的特定组合——IBE 是否具有通过抑制 NF- κ B 的表达而发挥抗炎、抗增殖的作用。结果发现,球囊损伤 21 d 后大鼠主动脉处内膜增生明显,而应用 IBE 后可明显减轻损伤处内膜增生程度,可见在本实验条件下 IBE 发挥了抑制内膜增生的作用。进一步的免疫组织化学染色发现,IBE 处理组的内膜增生程度显著减轻,NF- κ B p65、AP-1 阳性细胞数明显减少,提示内膜增厚主要是由 VSMC 增殖导致的,并且 VSMC 的增生程度可能与 NF- κ B p65 及 AP-1 的表达量有关。从 Western blotting 结果可以看出 IBE 组核蛋白 NF- κ B p65

表达量比模型组明显减轻,而胞浆蛋白 NF- κ B p65 表达量与模型组基本相同,从而在蛋白水平上证实,IBE 抑制内膜增生作用的主要原因是抑制了 NF- κ B p65 的激活与核转位。Western blotting 还发现,模型组 AP-1 表达明显增多,给药组 AP-1 表达下降,这提示内膜增生的程度与 AP-1 的表达量之间可能也存在一定的关系。

本实验观察到球囊损伤后大鼠颈动脉内膜 VSMC 大量增生,NF- κ B、AP-1 表达增强,而 IBE 能明显抑制损伤处 VSMC 的增殖、使 I/M 值减少,显著降低 NF- κ B 及 AP-1 表达。提示 IBE 可能是通过抑制 NF- κ B、AP-1 的表达阻止 VSMC 的增殖。但对于 IBE 抑制 VSMC 异常增殖的信号传导途径如何、IBE 是否也影响 VSMC 的迁移以及 IBE 对细胞外基质代谢有何影响等诸多方面的问题还有待做进一步的探讨,以深入阐明 IBE 发挥药效的分子机制。

References:

- [1] Han M, Wen J K, Zheng B, *et al.* Acetylbrannilactone suppresses NO and PGE₂ synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression [J]. *Life Sci*, 2004, 75: 675-684.
- [2] Zhou X X, Wen J K, Han M. The Change of MMP-2 gene expression and collagen turnover during vascular restenosis development [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 1999, 15: 997-1001.
- [3] Han M, Wen J K, Zheng B, *et al.* Redifferentiation of cultured human vascular smooth muscle cells after serum deprivation [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2003, 19: 250-255.
- [4] Han M, Wen J K. Effect of E2F and CArG decoy oligodeoxynucleotides on expression of phenotype associated genes of vascular smooth muscle cells [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2001, 17: 622-630.
- [5] Faries P L, Rohan D I, Wyers M C, *et al.* Vascular smooth muscle cells derived from atherosclerotic human arteries exhibit greater adhesion, migration and proliferation than venous cells [J]. *J Surg Res*, 2002, 104: 22-28.
- [6] Hoshi S, Goto M, Koyama N, *et al.* Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear factor- κ B and its inhibitor I- κ B [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 883-889.
- [7] Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, *et al.* Inhibition of NF- κ B activation using cis-element “decoy” of NF- κ B binding site reduces neointimal formation in porcine balloon injured coronary artery model [J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 356-364.
- [8] Shuichi F, Jiang G N, Christian S, *et al.* NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 7806-7819.

八 荣 八 耻

树立社会主义荣辱观,坚持以热爱祖国为荣、以危害祖国为耻,以服务人民为荣、以背离人民为耻,以崇尚科学为荣、以愚昧无知为耻,以辛勤劳动为荣、以好逸恶劳为耻,以团结互助为荣、以损人利己为耻,以诚实守信为荣、以见利忘义为耻,以遵纪守法为荣、以违法乱纪为耻,以艰苦奋斗为荣、以骄奢淫逸为耻。