

川芎嗪对血管平滑肌细胞增殖抑制作用的探讨

冯津萍¹, 卢奕², 陈星¹, 陈敏荔¹, 郭玉军¹, 梁爽霖¹
(1. 天津市胸科医院, 天津 300051; 2. 天津医科大学, 天津 300203)

摘要:目的 观察川芎嗪(TMP)对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的抑制作用,并探讨其作用机制。方法 利用大鼠颈动脉血管内膜损伤可引起VSMC增殖、血管增厚的实验模型。行增殖细胞核抗原(PCNA)、I型胶原、IV型胶原组织化学检测,纤维母细胞生长因子(FGF)、血小板源生长因子(PDGF)、Bcl-2、Bax、c-myc原位杂交检测及TUNEL染色。结果 内皮损伤后VSMC增殖,血管管腔面积减少;低剂量TMP治疗组有轻度抑制VSMC增殖的作用,使管腔面积有所增加;TMP高剂量抑制作用明显增强。高剂量TMP组和假手术组PCNA、I型胶原、PDGF的表达低于模型组;TMP低剂量组与模型组相比无显著差异。高、低剂量TMP组和假手术组的I型胶原、FGF、Bcl-2、c-myc和TUNEL的表达低于模型组。高、低剂量TMP组和假手术组的Bax表达高于模型组。结论 TMP能抑制平滑肌细胞I型胶原、IV型胶原、FGF、PDGF表达;影响Bcl-2、c-myc、Bax基因表达,促进血管平滑肌细胞凋亡;达到抑制平滑肌细胞增殖的作用。

关键词:血管平滑肌细胞(VSMC);增殖;川芎嗪

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)01-0092-04

Exploration for inhibitory mechanism of tetramethylpyrazine on vascular smooth muscle cell proliferation

FENG Jin-ping¹, LU Yi², CHEN Xing¹, CHEN Min-li¹, GUO Yu-jun¹, LIANG Shuang-lin¹

Key words: vascular smooth muscle cell (VSMC); proliferation; tetramethylpyrazine (TMP)

冠状动脉介入治疗存在的主要问题仍是再狭窄,近年来研究认为,再狭窄是血管损伤的一种修复反应,是平滑肌细胞增殖的结果。与血管平滑肌细胞(VSMC)有关的生长因子主要为血小板源生长因子(PDGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)等。增殖细胞核抗原(PCNA)是反映细胞增殖程度的指标。I型和IV型胶原在再狭窄中作用机制报道甚少。川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是一种新型钙离子拮抗剂,有研究^[1]发现川芎嗪对原代培养的VSMC具有明显的抑制作用,其机制尚不清楚。本研究通过建立大鼠颈动脉内皮损伤模型,观察了血管内皮损伤后平滑肌细胞增殖及相关因子的调节情况、细胞凋亡及相关基因(Bcl-2、Bax、c-myc)的调节情况,应用TMP进行干预,探讨TMP抑制血管成形术后再狭窄的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:PCNA、I型胶原和IV型胶原免疫组化试剂盒和Bax、c-myc、FGF和PDGF原位杂交试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。bcl-2原位杂交试剂盒购自天津津脉生物有限公司。TUNEL试剂盒购自美国罗氏诊断公司。

1.2 动物模型的建立及实验分组:6~8周龄Wistar大鼠,体重250~350g,购自军事医学科学院实验动物中心。大鼠麻醉后,钝性分离出大鼠颈外动脉,将Fogarty导管(2F)沿颈外动脉到颈总动脉伸至主动脉弓,稍回撤,充盈气囊回拉Fogarty导管剥脱颈总动脉血管内膜,撤出导管,结扎该侧颈外动脉^[2]。受试药物:盐酸川芎嗪注射液(北京第四制药厂生产,批号021027)。随机分组:假手术组,9只,仅暴露左侧颈总动脉后缝合局部伤口;模型组,10只,行左侧颈总动脉内膜剥脱术;TMP低剂量药物组,10只,术前3d ip给予盐酸川芎嗪50mg/(kg·d),行左侧颈总动脉内膜剥脱术,术后继续给药2周;TMP高剂量药物组,11只,术前3d ip给予盐酸川芎嗪120mg/(kg·d),行左侧颈总动脉内膜剥脱术,术后继续给药2周。标本制备:术后2周处死大鼠,以5%多聚甲醛和3%戊二醛配制的灌注液进行血管的固定。取材左侧颈总动脉,送电镜,并进行蜡块包埋,制备石蜡切片。

1.3 方法:HE染色光镜观察血管管腔面积。电镜观察。免疫组织化学检测:包括胶原I、胶原IV、PCNA等。原位杂交检测,包括:FGF、PDGF、Bcl-2、

收稿日期:2006-05-09

基金项目:天津市科技发展计划项目(973113310)

作者简介:冯津萍(1967—),女,副主任医师,硕士学位,天津医科大学和南开大学硕士生导师,从事心血管内科临床和科研工作,发表论

文10余篇,曾主持多项课题研究,曾获天津市科技进步三等奖。

Bax、c-myc 等。TUNEL 检测。各项检测结果应用 MIAS2000 图像分析系统进行分析。每张切片随机选取 5 个不同视野进行扫描分析,测定平均吸光度。显色越深平均吸光度值越低,显色越浅平均吸光度值越高,故平均吸光度值与表达量成反比。本实验各项指标的染色结果用平均吸光度值表示。

1.4 统计学分析:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检测采用单因素方差分析和 Dunnett-*t* 检验。

2 结果

2.1 HE 染色结果:见图 1。在内皮损伤后,血管内膜增厚,平滑肌细胞增殖、排列紊乱,内弹力层迂曲明显,细胞外基质增加。TMP 低剂量对上述改变有抑制作用,使内皮损伤后血管管径增加,TMP 高剂量的该抑制作用更加明显。

2.2 各组血管截面积和 TUNEL 染色结果:见表 1。

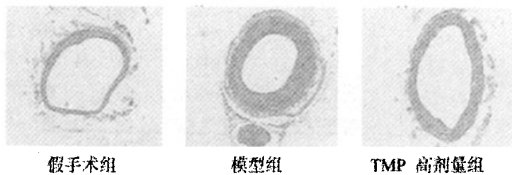


图 1 光镜结果

Fig. 1 Results of light-microscope

表 1 各组血管管腔面积和 TUNEL 染色的比较

Table 1 Comparison between vascular capacity area and TUNEL among groups

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	血管管腔面积/ mm ²	TUNEL 染色 (平均吸光度)
模型	—	10	0.23 ± 0.05	240.28 ± 2.33
TMP	120	11	0.38 ± 0.03**	203.33 ± 1.21**
	60	10	0.32 ± 0.04*	230.99 ± 2.73*
假手术	—	9	0.42 ± 0.04**	226.23 ± 1.81*

与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs model group

2.3 电镜结果:见图 2。假手术组平滑肌细胞超微结构形态特点:核不规则,异染色质沿核膜下分布,核两极端可见线粒体和聚核糖体;胞膜外可见胶原纤维和弹性纤维;细胞突起有微纤维包绕,偶见粗面内质网;细胞间胶原纤维排列较为规整。模型组:平

滑肌细胞形态呈激活状态,细胞突起明显增多,核不规则,异染色质沿核膜下分布;胞浆内微纤维减少,粗面内质网和线粒体以及游离聚核糖体增多;细胞外有基底膜物质,弹性纤维包围线粒体和突起。TMP 低剂量组:平滑肌细胞较活跃,胞核皱褶多;微纤维少,粗面内质网和线粒体较多;聚核糖体多;细胞周围的微纤维物质较少。TMP 高剂量组:平滑肌细胞核较规则,细胞突起明显减少,细胞间距较窄,胞浆内粗面内质网和线粒体数量减少;微纤维较多;细胞外微纤维和弹性纤维减少;无定型物质增多。

2.4 免疫组织化学结果:见表 2。

2.5 原位杂交结果:见表 3。

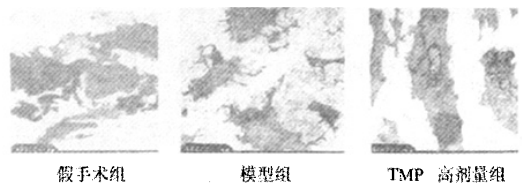


图 2 电镜结果

Fig. 2 Results of electro-microscope

表 2 各组 I 型胶原、IV 胶原、PCNA 免疫组织化学结果 (平均吸光度)

Table 2 Results of immune histochemistry of collagen I, collagen IV, and PCNA among groups (average absorbance)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	动物/只	I 型胶原	IV 型胶原	PCNA
TMP	120	11	180.32 ± 5.46**	204.62 ± 11.52*	148.96 ± 1.45*
	60	10	152.27 ± 8.83**	160.00 ± 16.68	124.90 ± 4.74
假手术	—	9	189.42 ± 6.81**	230.24 ± 17.35*	220.90 ± 6.85*
模型	—	10	129.57 ± 15.69	156.29 ± 11.51	129.21 ± 14.99

与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs model group

3 讨论

冠心病是一种危害人类健康的常见病,随着冠心病介入治疗领域的飞速发展,经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 已经成为冠心病的有效治疗手段之一,但是 PCI 后困扰着临床医生的重要问题是 PCI 术后再狭窄,再狭窄的发生机制及防治亦成为当今心血管疾病领域研究的热点之一。

表 3 各组 FGF、PDGF、c-myc、bcl-2、Bax 原位杂交的结果 (平均吸光度)

Table 3 Results of *in situ* hybridization of FGF, PDGF, c-myc, bcl-2, and Bax among groups (average absorbance)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	动物/只	FGF	PDGF	c-myc	bcl-2	Bax
TMP	120	11	222.22 ± 6.19**	146.78 ± 9.72*	191.17 ± 2.09**	242.37 ± 2.09**	148.28 ± 6.98**
	60	10	191.61 ± 8.99*	139.72 ± 11.04	181.91 ± 5.49**	236.29 ± 2.05*	151.91 ± 9.34**
假手术	—	9	177.82 ± 3.79*	144.52 ± 5.92*	181.96 ± 0.51**	234.95 ± 2.31*	123.34 ± 1.34**
模型	—	10	148.23 ± 2.11	113.96 ± 5.45	153.48 ± 4.69	231.34 ± 3.60	189.03 ± 0.34**

与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs model group

TMP 是一种新型钙离子拮抗剂,是从川芎的根茎中提取分离的生物碱单体,是川芎的主要有效成分。现已证实其具有抗凝血活性^[3]。有研究发现^[2] TMP 对原代培养的 VSMC 具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性,TMP 能明显缩小 VSMC 的细胞面积、核面积和核周长,能明显抑制 VSMC 数目的增长,从形态学角度证实其有效抑制 VSMC 增殖的作用。本研究电镜结果提示模型组 VSMC 明显增殖,为合成表型。TMP 对细胞的形态和分泌功能有一定的影响,表现在平滑肌细胞较静止、突起减少、细胞膜较平滑、细胞外基质减少及胞浆内粗面内质网、线粒体和游离聚核体减少。HE 染色结果提示内皮损伤后 VSMC 增殖,血管管腔面积减少;低剂量 TMP 有轻度抑制 VSMC 增殖的作用,使管腔面积有所增加;TMP 高剂量的该抑制作用明显增强。内皮损伤后平滑肌细胞明显增殖、血管管腔面积减少,TMP 对该平滑肌细胞增殖有一定的抑制作用,从而使血管管腔面积增加,为 TMP 治疗经皮冠状动脉腔内成形术 (PTCA) 术后再狭窄提供理论依据。

本研究结果提示随着平滑肌细胞的增殖,PCNA 表达亦增多,TMP 对其有一定的抑制作用,进一步支持 TMP 抑制 VSMC 增殖的理论。本研究在体实验显示内皮损伤后胶原 I 和胶原 IV 表达均增加,TMP 干预后表达降低,接近正常。TMP 对胶原 I 和胶原 IV 合成的抑制作用是其干预内皮损伤后再狭窄的可能机制之一。TMP 抑制平滑肌细胞的增殖,同时也抑制了胶原的合成,使血管管腔面积增加,干预了血管成型术后再狭窄。

血管成形术导致血管的非血栓性表面破裂后,胶原纤维暴露导致血小板黏附、聚集以及生长因子的释放。损伤内皮分泌许多促平滑肌迁移增殖生长因子如 PDGF、FGF 等。有研究表明^[4]血管成形术后的修复过程,发现在血管成形术后人冠状动脉部位有 PDGF-B^[5]表达。本研究结果显示内皮损伤后 PDGF 表达明显增加,低剂量 TMP 可抑制其表达,TMP 高剂量进一步抑制其表达,提示 TMP 对平滑肌细胞的抑制作用可能是通过抑制 PDGF 的表达从而抑制了 SMC 由中膜迁移至内膜而起的作用。FGF 出现在动脉损伤早期受损细胞所释放的生长因子中,对 SMC 的增殖有促进作用。本研究显示内皮损伤后 FGF 表达增多,TMP 随剂量增加对 FGF 表达的抑制作用亦增强,TMP 对 SMC 的抑制作用亦可能与其对 FGF 分泌的抑制有关,从而抑制了 FGF 对 SMC 增殖的促进作用。

细胞外生长因子与细胞表面受体结合可激活,最终导致细胞分裂信号传导所需的级联反应。c-myc 的激活被认为是血管平滑肌细胞增殖的始动因素之一。本研究提示在内皮损伤后出现 c-myc 表达增多,TMP 对其有明显的抑制作用,从而抑制了平滑肌细胞增殖的始动环节,抑制平滑肌细胞的增殖。

细胞凋亡是一个主动的、可控的、正常的生命现象,受一系列基因调控。再狭窄病灶中的细胞增生比原发性动脉粥样硬化病灶中的更活跃,而且细胞凋亡发生率亦更高,许多动物实验结果支持了这一结论。bcl-2 基因是一种原癌基因,又称之为凋亡相关基因。Bax 基因在核苷酸序列上与 bcl-2 有一定同源性,但作用迥异^[6]。本研究显示球囊损伤后凋亡现象减少,TMP 促进细胞凋亡。Bcl-2 在球囊损伤后表达减少,TMP 抑制其表达,相反,Bax 在球囊损伤后表达增加,TMP 促进其表达。该研究提示球囊损伤后血管平滑肌细胞增殖,平滑肌细胞凋亡减少,TMP 可促进平滑肌细胞凋亡,bcl-2 抑制细胞凋亡,Bax 促进细胞凋亡,TMP 正是抑制 bcl-2 的表达,促进 Bax 的表达,从而促进平滑肌细胞的凋亡,抑制平滑肌细胞的增殖。

内皮损伤后血管平滑肌细胞增殖,胶原合成增加,平滑肌细胞凋亡减少,细胞外生长因子与细胞表面受体结合可激活,最终导致细胞分裂信号传导所需的级联反应。平滑肌细胞的凋亡和增殖对再狭窄的发生、发展和形成起重要作用,其中 PDGF 和 FGF 起介导作用,从而定量调控细胞增殖诱导内膜增厚。PDGF 与 FGF 等生长因子与平滑肌细胞凋亡有密切关系,有防止凋亡形成的作用。PDGF 可促进平滑肌细胞产生胶原,此与 PDGF 和 FGF 对平滑肌细胞增殖的诱导而产生胶原密切相关。TMP 抑制了 PDGF 和 FGF 的表达,从而抑制平滑肌细胞的增殖和胶原的合成;TMP 抑制 bcl-2 的表达,促进 Bax 的表达,促进平滑肌细胞的凋亡,从而抑制了内皮损伤后的再狭窄。

总之,大鼠颈动脉血管内膜损伤可引起 VSMC 增殖,血管增厚,管径缩小。PCNA、I 型胶原、IV 型胶原、PDGF、FGF、bcl-2、c-myc 和 TUNEL 均高表达,Bax 呈低表达。血管内皮损伤,是多种细胞因子和生长因子介导的局部血管重建和再塑,是血管平滑肌细胞迁移、增殖、凋亡及细胞的基质分泌和堆积的结果,是一系列基因异常表达所引起的血管功能与结构的改变,此为 PCI 术后再狭窄的部分机制。

不同浓度的 TMP 对上述异常表达有一定抑制作用, TMP 抑制细胞因子和生长因子介导的局部血管重建和再塑, 抑制 VSMC 的增殖, 使管壁变薄, 管径增大, 为 TMP 用于治疗 PCI 术后再狭窄提供部分理论依据。

References:

- [1] Tang L L, Wang L H, Zhang J H, *et al.* Effect of Tetramethylpyrazine on express of collagen genes in primary cultured smooth muscle cells in rats [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1995, 15: 666-668.
- [2] Hen S T, Li H, Durand J, *et al.* Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery [J]. *Circulation*, 1996, 93: 577-584.
- [3] Xia C J, Wang S, Zhu H S. The study of effect of Tetramethylpyrazine and its derivants on anticoagulability [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35: 911-913.
- [4] Linder V. Role of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor (B-chain) in neointima formation after arterial injury [J]. *Z Kardiol*, 1995, 84 (Supple 4): 137-144.
- [5] Suzuki A, Mizuno K, Ino Y, *et al.* Effects of 17 β -estradiol and progesterone on growth factor induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells *in vitro* [J]. *Cardiovasc Res*, 1996, 32: 516-523.
- [6] Cheng E H, Kirsch D G, Clem R J, *et al.* Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases [J]. *Science*, 1997, 278: 1966-1968.

十五味沉香散等 5 种藏药抗慢性缺氧的实验研究

新国恩¹, 张伟¹, 杨应忠¹, 杨全余², 周晓梅², 多杰², 格日力^{1*}

(1. 青海大学医学院 高原医学研究中心, 青海 西宁 810001; 2. 青海省藏医药研究所, 青海 西宁 810007)

长期慢性缺氧往往使机体处于一种严重的代谢与机能障碍, 从而影响正常的生理和代谢活动, 如不及时给予处理, 就会导致慢性高原病的发生。慢性高原病是青藏高原特有的常见病, 其病理生理特征为严重的低氧血症、红细胞过度增殖和持续性肺动脉高压。据流行病学调查, 海拔 3 500 m 以上地区, 慢性高原病的患病率是 10.1%, 并随海拔高度的上升而增加, 而且移居者明显高于世居者^[1], 严重影响着青藏高原人民的身心健康。藏药是我国尚待开发的民族药物, 在我国传统医药中占有重要地位。发掘、整理、研究藏药对进一步开发利用藏药具有深远意义。本研究在以往藏药抗急性缺氧研究基础上^[2], 对十五味沉香散等 5 种有一定抗急性缺氧效果的藏药进行抗慢性低氧的研究。

1 材料与方法

1.1 药物: 本研究小组在对抗急性缺氧药物筛选实验中有一定抗缺氧作用的八味沉香散、十五味沉香散、愈心冲剂、七十味珍珠丸、如意珍宝丸等 5 种藏药制成混悬液以备用^[3,4]。具体如下: 十五味沉香散(藏名: 阿嘎交阿, 由沉香、肉豆蔻、诃子、藏木香等 15 味藏药组成), 临床常用于益气行滞, 通络止痛, 特别用于冠心病、心绞痛、脑梗死等气滞血瘀症。剂

量: 每次 1 g, 1 日 2~3 次。制法: 15 味药粉碎成细粉, 过筛, 混匀即得。愈心冲剂(由檀香、肉豆蔻、广枣 3 味组成), 临床用于清心热。剂量: 每次 1 g, 1 日 3 次。制法: 将 3 味药材粉碎成粗粉, 加水浸泡, 先提取挥发油, 另器收集, 药渣加水煎煮 3 次, 合并煎液, 滤过, 浓缩为浸膏, 加乙醇静置, 滤过, 回收乙醇, 浓缩为稠膏, 加入蔗糖, 制成小颗粒, 干燥, 喷入挥发油, 混匀即得。七十味珍珠丸(由珍珠、玛瑙、珊瑚等 70 味藏药精炼制成), 用于各种中毒症、“白脉”病、中风等心脑血管及神经性障碍疾病。剂量: 每 3~7 天 1 丸, 每丸 1 g。制法: 除藏红花、牛黄、麝香另研细粉外, 其余动、植物类药共研细粉, 矿物类药按其炮制粉碎后, 与动、植物类药细粉配研, 过筛, 再加入藏红花、牛黄、麝香细粉, 混匀, 用麝香细粉加适量水泛丸, 阴干即得, 八味沉香散制法同十五味沉香散, 如意珍宝丸制法同七十味珍珠丸。以上藏药均由青海省金河藏药厂提供。

1.2 动物: Wistar 大鼠, 160~200 g, 雌雄各半, 由兰州医学院动物所提供。

1.3 方法: 将 90 只 Wistar 大鼠随机分成 6 组, 每组 15 只, 雌雄分开并运至玛多县(海拔 4 300 m)饲养, 其中 5 个药物组作为实验组用 5 种藏药混悬

收稿日期: 2006-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30260034)

作者简介: 新国恩(1967—), 男, 藏族, 青海籍, 硕士研究生, 副教授, 研究方向为中藏药开发和研究。

Tel: (0971) 6108394 E-mail: jmcy2005_teacher@yahoo.com.cn; jmcy2005_student@sina.com

* 通讯作者 格日力 Tel: (0971) 6142063 E-mail: gerili@Public.xn.qh.cn