

等^[1],而如何缓解这些临床症状,对患者术后的康复很重要。

本研究统计学显示麻仁软胶囊对比液体石蜡在排便疼痛、排便时间、排便费力、排便不尽感均有显著性差异,而在胃肠道反应上无差异,从总体上讲麻仁软胶囊明显优于液体石蜡。肛门手术后病人往往发生肛门周围局部炎症,造成肛门疼痛,使病人畏惧排便,这也使大便干结,不易排出,而改善大便性状,润肠通便的麻仁软胶囊在临床应用中发挥了很好的作用。其可以细化大便,缩短排便时间,减少排便疼痛,这样可避免硬质粗粪引起肛门灼热、出血、剧痛,也可避免水样稀便嵌入创面诱发感染,避免了使用通便药的弊端。

中医理论一般认为,肛门病术后治疗应以润肠、清热为主要原则^[2]。麻仁软胶囊是这方面的代表方剂,具有润肠通便的功效^[3~5],其药物组成为火麻仁、大黄、枳实、厚朴、苦杏仁、白芍。具有润肠通便,通而不泻,润而不燥等特点,可以有效地缓解术后大

便困难^[6]。液体石蜡是一种透明的矿物油,服用后能润滑肠壁,但长期服用液体石蜡可妨碍脂溶性维生素A、D、K及钙、磷等的吸收,引起脂溶性维生素类缺乏症。

总之,麻仁软胶囊在肛门手术后应用效果良好,既减少病人术后并发症的发生,也避免了口服液体石蜡引起的不良反应。

参考文献:

- [1] 陈伟,闫杰,黄杰平. 直肠肛门手术后常见并发症的预防与治疗[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2001(7): 5.
- [2] 陈菊. 中药治疗肛门直肠疾病手术后并发症 120 例[J]. 辽宁中医学院学报, 2003(5): 1.
- [3] 陈梅莉,占蔚,马友正. 麻仁软胶囊与便塞停片治疗习惯性便秘疗效比较[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(7): 902.
- [4] 张伟,支江波,吴瑕,等. 麻仁软胶囊治疗便秘 105 例疗效观察[J]. 河南医药信息, 2002, 10(15): 78.
- [5] 杨巍,郑德,陆宏. 混合痔切除术后服用麻仁软胶囊的临床观察[J]. 中草药, 2009, 40(5): 781-782.
- [6] 郑有章. 西沙必利联合麻仁软胶囊治疗老年慢性便秘疗效观察[J]. 中华现代内科学杂志, 2004, 2(1): 168.

鹿蹄草总黄酮抑制动脉内膜增生的研究

刘书勤,李增利,臧伟进,袁秉祥

(西安交通大学医学院 药理学系,陕西 西安 710061)

摘要:目的 观察鹿蹄草总黄酮(total flavones of *Herba Pyrdae*, TFHP)抑制病理性动脉内膜增生,并初步探讨其作用机制。方法 采用小鼠颈总动脉结扎所致内膜增生和管腔狭窄模型和血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖试验(MTT法)。结果 ICR小鼠颈总动脉结扎28d成功复制出内膜增生和管腔狭窄,TFHP具抑制作用。HE染色切片图像分析显示,TFHP 50 mg/kg组颈总动脉管腔面积、内膜面积、中膜面积、相对管腔面积与模型组比较均无差异($P>0.05$),但内膜/中膜面积比值明显减小($P<0.01$);TFHP 100、200 mg/kg组内膜面积、内膜/中膜面积比值均较模型组减小($P<0.05, 0.01$),管腔面积、相对管腔面积均较模型组增大($P<0.01$)。免疫组化染色显示,与模型组相比,TFHP各组血管壁增殖细胞核抗原阳性细胞指数均减少($P<0.01$)。MTT法研究表明,小鼠颈总动脉平滑肌细胞培养48h后,TFHP各组细胞增殖活性随TFHP浓度增加而减小,与对照组比较,均有显著差异($P<0.05, 0.01$)。结论 TEHP能抑制病理性动脉内膜增生和管腔狭窄,可能与抑制VSMCs增殖有关。

关键词:鹿蹄草总黄酮;内膜增生;动脉;平滑肌细胞增殖

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)11-1792-04

经皮冠状动脉腔内成形术后30%~45%病人在3~6个月内会发生管腔再狭窄^[1],直接影响远期治疗效果。因此,寻找包括中草药成分在内的抗血管再狭窄物质具有重要意义。有报道^[2]指出,槲皮素能抑制兔球囊血管成形术后再狭窄及培养的动脉平滑肌细胞(VSMCs)增殖。鹿蹄草 *Pyrola calliantha*

H. Andres为常用中药,秦巴山区该药材资源极为丰富。鹿蹄草中化学成分以黄酮类为主(质量分数为5.23%),且结构相似,多为黄酮醇,主要有槲皮素类、山柰酚类和鼠李素类化合物^[3]。因此,推测鹿蹄草中黄酮类化合物有抑制血管再狭窄作用,可作为有效部位被整体开发利用。本研究观察鹿蹄草总

收稿日期:2008-12-06

作者简介:刘书勤(1968—),男,陕西凤翔人,讲师,博士,现主要从事血管壁结构重构及其治疗措施。

Tel: 15202960481 E-mail: lsq@mail.xjtu.edu.cn

黄酮 (total flavones of *Herba Pyrolae*, TFHP) 对小鼠颈动脉结扎损伤后血管壁结构重塑和细胞增殖状况的影响。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂: TFHP 系用大孔吸附树脂法从鹿蹄草提取分离 (棕黄色粉末, 质量分数 65.22%)。体内给药前用 10% 淀粉配成 0.5%、1% 和 2% 悬液; 体外实验先配成 30% 甲醇溶液, 再用 PBS 液稀释 100 倍, 临用前取稀释后的溶液 0.1 mL 加 DMEM (含 FBS) 至 10 mL, 则 TFHP 最大终浓度为 30 mg/L, 甲醇 (溶媒) 最大终浓度为 0.1 mL/L。小鼠增殖细胞核抗原 (PCNA) 单克隆抗体及 PCNA 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德公司), DMEM 细胞培养液 (Sigma), 胎牛血清 (FBS, 武汉三利公司), 胰蛋白酶 (Amresco), MTT (Sigma)。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 对小鼠颈动脉结扎损伤后血管壁结构重塑的影响

1.2.1 动物模型建立、分组与给药: 32 只雄性 ICR 小鼠 (体质量 20~23 g, 本校实验动物中心提供) 随机分为 4 组: 模型组, TFHP 大、中、小剂量 (200, 100, 50 mg/kg) 组。动物麻醉 (戊巴比妥钠 40 mg/kg, ip) 后按文献报道方法^[4]找到左颈总动脉, 在靠近颈内、颈外动脉分叉处分离并用丝线完全结扎。模型组动物同时分离右颈总动脉但不结扎, 作为对照。伤口涂撒少许磺胺粉后缝合皮肤。待术后 0.5~1 h 动物全部苏醒, 将动物移至饲养室常规饲养 [自由饮食, 室温度 (20±2) °C、相对湿度 60%~70%]。术后第 2 天开始给药: 模型组小鼠每天 ig 10% 淀粉 10 mL/kg, TFHP 大、中、小剂量组分别 ig TFHP 200、100、50 mg/kg。每日 1 次, 连续给药 25 d。

1.2.2 血管壁及管腔面积测定: 术后第 28 天, 小鼠于麻醉状态下心脏内注射 0.1 mL 0.3% 肝素生理盐水 5 min 后处死并找出左颈总动脉 (模型组同时找出右颈总动脉), 自结扎处向近心端方向取约 3 mm 长, 在 PBS 中冲洗后入 4% 甲醛溶液内固定 48 h (其间于解剖镜下剥除血管外膜脂肪和部分结缔组织)。蒸馏水冲洗后剪除结扎处及近心端多余部分, 使标本长约 2 mm, 用 OCT 包埋剂包埋 (结扎端均向外) 做冰冻切片 (厚 5 μm)。每个标本于 5 个不同切面 (间隔 70~100 μm) 分别取切片 (载玻片经多聚赖氨酸预处理)。HE 染色后, 光镜下观察血管壁结构, 数码相机拍照, 照片用会达图像分析系统测定管腔周长、内弹力膜周长及外弹力膜周长。

假定血管为圆筒形, 则可计算出管腔面积、内膜面积、中膜面积、相对管腔面积 [管腔面积/(管腔面积+内膜面积+中膜面积)×100] 及内膜/中膜面积比值。同一血管取 5 个不同切面平均值。

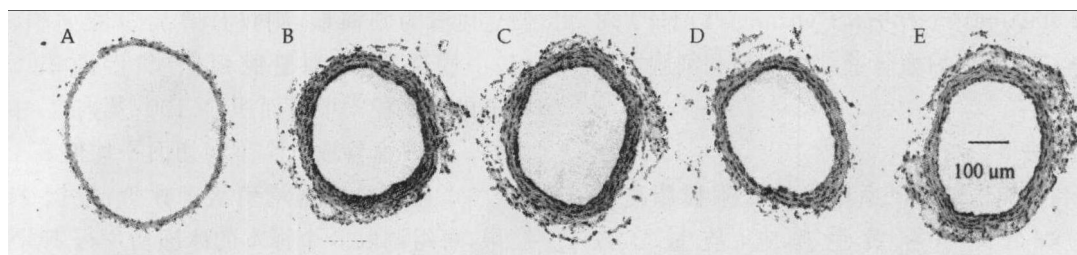
1.2.3 血管壁细胞增殖状态评价: 根据 HE 染色结果, 每组调取 3 个标本的冰冻切片行 PCNA 免疫组化染色 (按试剂盒说明书操作), 苏木素复染, 常规脱水, 中性树胶封片。光镜下随机取 3 个视野, 进行细胞总数和 PCNA 阳性细胞 (细胞核呈棕黄色或棕褐色) 计数, 算出 PCNA 阳性细胞指数 (PCNA 阳性细胞/细胞总数×100%)。

1.3 对 VSMCs 细胞增殖的影响: 取 6 只 ICR 小鼠 (28~30 g) 左、右颈总动脉, 常规贴块法培养血管平滑肌细胞 (VSMCs) 并传代, 3~5 代用于实验。将 VSMCs 按 5×10^3 /孔接种于 96 孔培养板。设空白对照, 溶媒对照 (甲醇 0.1 mL/L), TFHP 3.8、7.5、15 和 30 mg/L 共 6 组, 每组 12 孔, 即各组同一小鼠 2 孔, 取其平均值, 因此每组统计例数实为 6 例。各孔细胞先在含 10% FBS 的 DMEM 中培养 24 h, 继而在不含 FBS 的 DMEM 中培养 12 h (使 VSMCs 静止于同一状态), 然后加入含 10% FBS DMEM 培养 48 h, 溶媒对照组和 TFHP 各浓度组培养液中事先分别加入甲醇或 TFHP。PBS 冲洗后加入含 MTT (0.5 g/L) 的 PBS 200 μL, 于 37 °C 孵育 4 h。吸除各孔的液体, 加入 200 μL DMSO, 振荡 10 min。在酶标仪上测定各孔吸光度值 (测定波长为 490 nm)。

1.4 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用组间 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 血管壁及管腔变化: 从图 1 和表 1 可见, 对照组血管管壁薄而且均匀, 内皮细胞紧贴内弹力膜。模型组血管管壁增厚且 HE 染色偏蓝, 其中内膜增厚最明显, 内皮细胞与内弹力膜之间有数层排列密集细胞, 且各处厚度不均匀, 内膜面积、内膜/中膜面积比值与对照组相比均显著增大 ($P < 0.01$); 管腔面积、相对管腔面积与对照组相比均显著减小 ($P < 0.01$); 中膜面积与对照组无差异 ($P > 0.05$)。TFHP 小剂量组管腔面积、内膜面积、中膜面积、相对管腔面积与模型组比较均无差异 ($P > 0.05$), 但内膜/中膜面积比值明显减小 ($P < 0.01$)。TFHP 中、大剂量组内膜面积、内膜/中膜面积比值均较模型组减小 ($P < 0.05, 0.01$), 管腔面积、相对管腔面积均较模型组增大 ($P < 0.01$)。



A-对照 B-模型 C~E-TFHP 50、100、200 mg/kg
A-control B-model C-E-TFHP 50, 100, 200 mg/kg

图 1 小鼠颈总动脉结扎后鹿蹄草总黄酮对血管病理形态的影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effect of TFHP on artery pathomorphological of mouse common carotid arteries after ligation (HE staining)

表 1 小鼠颈总动脉结扎后鹿蹄草总黄酮对内膜、中膜和管腔面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

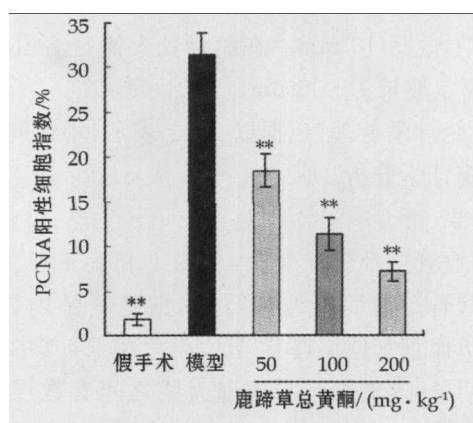
Table 1 Effect of TFHP on intimal-, medial- and lumen area of mouse common carotid arteries after ligation ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	剂量/(mg · kg ⁻¹)	管腔面积/μm ²	内膜面积/μm ²	中膜面积/μm ²	相对管腔面积/%	(内膜/中膜面积)/%
对照	—	57 629 ± 7 942 **	2 579 ± 189 **	16 369 ± 2 025	75.1 ± 2.9 **	14.2 ± 5.5 **
模型	—	24 099 ± 7 540	18 976 ± 4 495	17 382 ± 4 185	39.7 ± 9.4	113.5 ± 5.7
TFHP	50	26 445 ± 3 790	16 628 ± 1 578	17 924 ± 1 389	43.2 ± 3.3	93.5 ± 7.5 **
	100	37 392 ± 5 551 **	12 828 ± 3 851 *	18 613 ± 2 911	52.6 ± 8.0 **	76.7 ± 9.0 **
	200	41 809 ± 8 363 **	11 934 ± 2 499 **	18 110 ± 2 125	57.8 ± 6.9 **	66.1 ± 10.4 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

2.2 血管壁 PCNA 阳性细胞指数: 对照组血管 PCNA 阳性细胞极少, 模型组血管 PCNA 阳性细胞较对照组明显增多 ($P < 0.01$), 内膜、中膜均有分布, 以内膜居多。与模型组相比, 给药各组血管壁 PCNA 阳性细胞指数均减少 ($P < 0.01$) (图 2)。



与模型组比较: ** $P < 0.01$

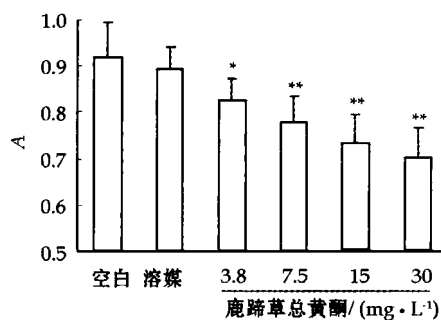
** $P < 0.01$ vs model group

图 2 小鼠颈总动脉结扎后鹿蹄草总黄酮对管壁 PCNA 阳性细胞指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of TFHP on PCNA-positive cells in wall of mouse common carotid arteries after ligation ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 对 VSMCs 增殖的影响: 相同数量 VSMCs 培养 48 h 后, MTT 法测得的吸光度 (A), 溶媒对照组与空白对照组相比无差异 ($P > 0.05$), 而 TFHP

各剂量组 A 随 TFHP 浓度增加而减小, 与空白对照组比较, 均有统计学意义 ($P < 0.05$, 0.01) (图 3), 间接反映 TFHP 体外可抑制 VSMCs 细胞的增殖。



与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank control group

图 3 鹿蹄草总黄酮对小鼠颈总动脉平滑肌细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effect of TFHP on proliferating viabilities of cultured smooth muscle cells from mouse common carotid arteries ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

血管再狭窄是血管内皮受损后, 新内膜形成和血管结构重塑的结果。其中 VSMCs 转型、迁移、增殖是必然和主要过程^[5,6], 而炎症反应和多种细胞因子、生长因子参与了该过程^[7]。在模拟经皮冠状动脉腔内成形术 (PTCA) 后血管再狭窄小鼠动物

模型中,颈动脉金属丝损伤^[8]、股动脉塑料微导管损伤^[9]及股动脉金属直弹簧丝损伤^[10]3种模型最接近PTCA造成损害,但技术操作难度偏大。颈动脉结扎法引起的动脉血狭窄,与PTCA手术后产生血管再狭窄的病理机制虽不完全一致,但确能引起以内膜增生为主要特征的血管壁结构重塑和管腔狭窄,而且由于操作简单,可作为一种动物模型用于血管再狭窄和血管壁结构重塑相关研究。多数学者认为结扎造成血流受阻,在较高的动脉压反复作用下,动脉壁张力持续增加和血管剪切力异常,引起血管内皮受损或直接刺激VSMCs转型、迁移、增殖是基本机制。

有研究提示,不同品系小鼠颈动脉结扎后引起管壁结构重塑的时间点和管腔狭窄程度不同^[11,12]。用ICR品系小鼠造模迄今未有报道。本实验结扎ICR雄性小鼠颈动脉28d观察到了内膜增生和管壁结构重塑,其内膜面积约增加了635.8%,管腔面积减少了约58.2%(以对侧颈动脉为对照)。

黄酮类化合物广泛存在于植物中,大部分成苷,小部分以游离形式存在,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和防治心血管疾病等多种作用。TFHP含槲皮素类、山柰酚类和鼠李素类等结构相似的黄酮醇化合物。

本研究表明,TFHP在达到一定剂量时可抑制动脉结扎引起的结扎点之外动脉内膜增生和管腔狭窄;结扎引起的动脉壁结构重塑特别是内膜增生与血管壁细胞增殖有关,TFHP可遏制血管壁细胞增殖;在体外可抑制VSMCs增殖。

需要指出,TFHP小剂量(50 mg/kg)虽未使内膜面积减小和管腔面积增大,但使内膜/中膜面积比值减小了,说明在中膜面积基本未变的情况下,内膜面积实际有轻度减小。

综上所述,TFHP能抑制动脉病理性内膜增生

和管腔狭窄,这一作用可能与抑制VSMCs增殖有关。在PTCA后,应用TFHP可能有助于预防血管再狭窄。

致谢:TFHP由原本系研究生成亮(现在首都医科大学任教)在药理学系王军宪教授指导下提取分离。

参考文献:

- [1] Lafont A, Guzman L A, Whitlow P L, et al. Restenosis after experimental angioplasty: Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling [J]. *Circ Res*, 1995, 76: 996-1002.
- [2] 黄慧,王昌明,阳耀忠,等. 槲皮素对兔球囊血管成形术后管壁增生及培养的动脉平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国循环杂志, 1997, 12: 53-55.
- [3] 李星海,王军宪,唐有明. 鹿蹄草中金丝桃苷及总黄酮的含量测定[J]. 中药材, 1994, 17: 36-37.
- [4] Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow [J]. *Arterioscler Thromb*, 1997, 17: 2238-2244.
- [5] Schwartz S M, Majesky M W, Murry C E. The intima: development and monoclonal responses to injury [J]. *Atherosclerosis*, 1995, 118: S125-S140.
- [6] Nunes G L, Sgoutas D S, Redden R A, et al. Combination of vitamins C and E alters the response to coronary balloon injury in the pig [J]. *Arterioscler Thromb*, 1995, 15: 156-165.
- [7] Cassells W, Engler D, Willerson J, et al. Mechanism of restenosis [J]. *Tex Heart Inst J*, 1994, 21: 68-77.
- [8] Lindner V, Fingerle J, Reidy M A. Mouse model of arterial injury [J]. *Circ Res*, 1993, 73: 792-796.
- [9] Moroi M, Zhang L, Yasuda T, et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1225-1232.
- [10] Sata M, Maejima Y, Adachi F, et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 2097-2104.
- [11] 穆军升,朱洪生,郑家豪,等. 小鼠颈动脉狭窄模型与T细胞免疫缺陷的初步研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12: 5-7.
- [12] 穆军升,朱洪生. 两种品系小鼠左颈总动脉结扎建立血管再狭窄模型实验研究[J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(1): 26-28.

《中草药》杂志售过刊信息

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1988-1993年(80元/年)、1996年、1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)、2005年(260元/年)、2006年(280元/年)、2007年(280元/年)、2008年(280元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)、2006年增刊(65元)、2007年增刊(65元)、2008年增刊(55元)。欢迎订购。订阅者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzjb@sina.com