

黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生、平滑肌细胞表型转化和增殖的影响

李霞¹, 曹旺¹, 刘彩霞², 邓常清^{1,2*}

1. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410028

2. 湖南中医药大学 血管生物学实验室, 湖南 长沙 410028

摘要: 目的 探讨黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生、平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 表型转化和增殖的影响及作用机制。方法 新西兰兔随机分为对照组、模型组、黄芪 (1 g/kg) 组、当归 (1 g/kg) 组、黄芪-当归 (1:1) 组、黄芪-当归 (1:5) 组、黄芪-当归 (5:1) 组和阿托伐他汀 (5 mg/kg) 组。除对照组外, 其余各组按颈总动脉套管法改良制备颈总动脉血管内膜增生模型, 自术后第 1 天起给予 2% 高胆固醇饲料。各给药组于术后第 1 天起 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 28 d。采用 ELISA 法检测各组家兔血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平; 采用 Masson 染色法观察各组家兔颈动脉病理变化及血管内膜增生程度; 采用免疫组化法检测各组家兔颈动脉 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达情况; 采用 Western blotting 法检测各组家兔颈动脉磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路相关蛋白表达情况。结果 与对照组比较, 模型组家兔血清中 TC、TG、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 颈动脉内膜增生明显, 血管内膜面积 (intimal area, IA)、内膜厚度 (intimal thickness, IT)、内膜面积增生率 (hyperplasia ratio of intimal area, HRIA) 和内膜厚度增生率 (hyperplasia ratio of intimal thickness, HRIT) 均显著增加 ($P < 0.01$); 颈动脉 VSMC 收缩表型 α -SMA 表达显著降低 ($P < 0.05$), 合成表型 OPN 和细胞增殖标志物 PCNA 表达增加 ($P < 0.01$); 颈总动脉 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪-当归 (1:1、5:1) 组家兔血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$); 当归组血清中 TG 和 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 黄芪-当归 (1:1、5:1) 组家兔颈动脉 IA、IT、HRIA、HRIT 均显著降低 ($P < 0.01$), 颈总动脉 α -SMA 表达显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), OPN 和 PCNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 黄芪-当归 (1:5) 组颈总动脉 PCNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 黄芪-当归 (1:1、1:5、5:1) 组颈总动脉 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 黄芪-当归 (1:1、5:1) 能够有效改善家兔血管内膜增生、调节血脂、调控 VSMC 表型转化和增殖, 其作用机制与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 黄芪; 当归; 血管内膜增生; 平滑肌细胞表型; 细胞增殖; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4598-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.018

Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on intimal hyperplasia, phenotypic transformation and proliferation of vascular smooth muscle cells in rabbits

LI Xia¹, CAO Wang¹, LIU Cai-xia², DENG Chang-qing^{1,2}

1. Hunan Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardiocerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410028, China

2. Laboratory of Vascular Biology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410028, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of Huangqi (*Astragali Radix*)-Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*) on intimal hyperplasia, phenotypic transformation and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) in rabbits. **Methods**

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874406); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2019CX01); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金资助项目 (2019ZXYJH10)

作者简介: 李霞, 博士, 初级医师, 从事中西医结合心脑血管疾病的研究。Tel: 18570379265 E-mail: 469980486@qq.com

*通信作者: 邓常清, 博士生导师, 教授, 从事中西医结合心脑血管疾病的研究。Tel: (0731)88458258 E-mail: dchangq@sohu.com

New Zealand rabbits were randomly divided into control group, model group, *Astragali Radix* (1 g/kg) group, *Angelicae Sinensis Radix* (1 g/kg) group, *Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix* (1:1, 1:5, 5:1) groups and atorvastatin (5 mg/kg) group. Except for control group, the other groups were modified to prepare the intimal hyperplasia model of common carotid artery according to common carotid artery cannula method, and given 2% high-cholesterol diet from the first day after operation. Rabbits in each administration group were given corresponding drugs on the first day after surgery, once a day for 28 d. ELISA was used to detect levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum of rabbits in each group; Masson staining method was used to observe the pathological changes of carotid artery and degree of vascular intimal hyperplasia in rabbits of each group; Immunohistochemical method was used to detect the expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), osteopontin (OPN) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in carotid artery of rabbits in each group; Western blotting was used to detect the expressions of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway related proteins in carotid arteries of rabbits in each group. **Results** Compared with control group, the levels of TC, TG and LDL-C in serum of rabbits in model group were significantly increased ($P < 0.01$), and HDL-C level was significantly decreased ($P < 0.01$); Carotid artery intimal hyperplasia was obvious, intimal area (IA), intimal thickness (IT), hyperplasia ratio of intimal area (HRIA) and hyperplasia ratio of intimal thickness (HRIT) in endovascular were significantly increased ($P < 0.01$); Expression of VSMC contraction phenotype α -SMA was significantly reduced ($P < 0.05$), expressions of synthetic phenotype OPN and cell proliferation marker PCNA in carotid artery were increased ($P < 0.01$); Expressions of p-PI3K and p-Akt in common carotid artery were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the levels of TC, TG and LDL-C in serum of rabbits in *Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix* (1:1, 5:1) groups were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), and HDL-C level was significantly increased ($P < 0.01$); Levels of TG and LDL-C in serum of rabbits in *Angelicae Sinensis Radix* group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); IA, IT, HRIA and HRIT in carotid of rabbits in *Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix* (1:1, 5:1) groups were significantly reduced ($P < 0.01$), α -SMA expression in carotid artery of rabbits were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), OPN and PCNA expressions were significantly decreased ($P < 0.01$); PCNA expression in carotid artery of rabbits in *Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix* (1:5) was significantly reduced ($P < 0.01$); Expressions of p-PI3K and p-Akt in common carotid artery of rabbits in *Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix* (1:1, 1:5, 5:1) groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix* (1:1, 5:1) can effectively improve intimal hyperplasia of vascular in rabbits, regulate blood lipids, regulate VSMC phenotypic transformation and proliferation, and its mechanism is related to the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: *Astragali Radix*; *Angelicae Sinensis Radix*; intimal hyperplasia; vascular smooth muscle cells phenotypic; cell proliferation; PI3K/Akt signaling pathway

血管内膜增生 (intimal hyperplasia, IH) 是多种心血管疾病的基本病理机制^[1-2]。IH 是一种独特的血管重塑状态, 涉及内皮细胞损伤、成纤维细胞激活、细胞外基质重建以及血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 迁移、增殖和分化等血管的所有组成部分。VSMC 迁移至血管内膜并不断增殖, 血管管腔逐渐缩小, 为造成动脉粥样硬化、冠状动脉搭桥术、冠状动脉支架置入术等血管狭窄的主要原因^[3]。

黄芪和当归药对为临床常用的气血双补药对, 也是常用的益气活血药对。黄芪味甘而薄, 具补气之功; 当归味甘而重, 故专能补血, 其气轻而辛, 故又能行血。黄芪-当归配伍具有保护心血管^[4]、抗动脉粥样硬化、抗脑缺血、抗脏器纤维化等作用, 可以干预血管内膜增生多个相关的病理机制^[5-7]。本课题组前期研究表明, 黄芪-当归配伍能够抑制大鼠

血管内皮损伤诱导的血管内膜增生, 其作用机制与抑制 VSMC 增殖、炎症反应和细胞外基质沉积等有关^[8]。目前对于黄芪-当归配伍抗血管内膜增生的配伍形式、药效物质基础和作用机制尚不明确。由于中药治疗疾病具有多成分、多靶点、多通路的作用特点, 本课题组前期采用网络药理学方法, 探讨了黄芪-当归配伍改善血管内膜增生的药效物质基础和可能的作用靶点, 发现黄芪-当归配伍可能通过 20 个活性成分, 作用于 193 个潜在靶点, 调控磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitrogen-activated protein kinase, MAPK)、Ras 等信号通路, 从而发挥抗血管内膜增生的作用^[9]。本研究以黄芪和当归配伍益气活血功效为基础, 以 VSMC 功能为切入点, 探讨黄芪-当归配伍抗血管内膜增生的作用, 并从 VSMC 表型转化和增殖研究其

作用机制,旨在揭示其抗血管内膜增生的有效配伍,为临床合理应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级新西兰兔,雌雄各半,3~4月龄,体质量2.0~2.5 kg,购自湖南中医药大学实验动物中心,动物许可证号SCXX(湘)2020-0005。动物于清洁级动物实验室适应性饲养1周,温度25℃、湿度45%~65%,自由进食饮水。动物实验经湖南中医药大学医学动物实验伦理委员会批准(批准号LL219102002)。

1.2 药材

黄芪、当归由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,经湖南中医药大学第一附属医院药剂科左亚杰教授鉴定分别为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,符合《中国药典》2020年版规定。

1.3 药品与试剂

阿托伐他汀钙片(批号20190411B,10 mg/片)购自浙江乐普药业有限公司;Masson改良三色染色试剂盒(批号20190613)购自北京索莱宝科技有限公司;二步法免疫组化法试剂盒(批号2015G0115)、DAB显色试剂盒(批号K196721D)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PI3K抗体(批号LS-C312573)购自美国LSBio公司;Akt抗体(批号bs69512)、磷酸化PI3K(p-PI3K)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号GR3257713-3)、p-Akt抗体购自英国Abcam公司;增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(批号10003678)、 β -actin抗体、HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG抗体购自美国Proteintech公司;骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体(批号NB110-89062)购自美国Novus公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(批号20201028)、三酰甘油(triglycerides, TG)检测试剂盒(批号20101034)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)检测试剂盒(批号20200820)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)检测试剂盒(批号20201024)购自南京建成生物科技有限公司;BCA蛋白定量试

剂盒(批号PQ0012)购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜(批号IPV00010)、ECL化学发光试剂盒(批号WBKLS0100)购自美国Millipore公司。

1.4 仪器

石蜡切片机(英国Shado公司);光学显微镜(日本Olympus公司);水平电泳仪、凝胶成像分析系统、蛋白电泳及转膜设备(美国Bio-Rad公司);高速离心机(美国Beckman公司);低温台式高速离心机(赫西仪器装备有限公司);台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);脱色摇床(上海新波公司);超纯水仪(美国Millipore公司)。

2 方法

2.1 黄芪-当归配伍和制备

本课题组前期研究表明,黄芪-当归(1:1)配伍时具有较好的抗血管内膜增生的作用^[8],而传统的黄芪-当归配伍(当归补血汤)多为5:1配伍,因此本研究设置黄芪-当归(1:1)、黄芪-当归(1:5)、黄芪-当归(5:1)3个比例的配伍。按以上比例分别取药材,加入8倍量水,回流提取1 h,滤过;再加入6倍量水,回流提取1 h,滤过;再加入6倍量水,回流提取1 h,滤过;合并3次滤液,真空减压浓缩至1 g/mL(以生药量计)。

2.2 造模、分组与给药

新西兰兔随机分为对照组、模型组、黄芪(1 g/kg)组、当归(1 g/kg)组、黄芪-当归(1:1, 2 g/kg)组、黄芪-当归(1:5, 6 g/kg)组、黄芪-当归(5:1, 6 g/kg)组和阿托伐他汀(5 mg/kg)组,每组10只。按颈总动脉套管法改良制备颈总动脉血管内膜增生模型^[10],新西兰兔术前12 h禁食不禁水,耳缘iv 2.5%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉,仰卧固定,颈部正中切口,分离两侧颈总动脉;将1个无活性的柔软的硅橡胶管(长20 mm、内径1.0 mm)沿长轴剪开后,套在分离的两侧颈总动脉外面,用丝线结扎固定;术后im青霉素,1次/d,连续7 d。对照组只分离颈总动脉,不进行血管套管。自术后第1天起喂养高脂饲料(2%胆固醇+3%橄榄油+95%普通饲料),对照组喂养普通饲料。自术后第1天起,各给药组ig相应药物,对照组和模型组ig等体积蒸馏水(15 mL/kg),1次/d,连续28 d。

2.3 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型血清中TC、TG、LDL-C和HDL-C水平的影响

给药结束后,新西兰兔腹主动脉采血,3000 r/min离心15 min,取上层血清,按试剂盒说明书测

定血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平。

2.4 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉病理变化的影响

新西兰兔腹主动脉采血后,取损伤段颈总动脉,在 PBS 中将血管剥离干净,于 4%多聚甲醛中固定 7 d,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,每段血管间断均匀切取 8 片(厚 4~6 μm);按试剂盒说明书进行 Masson 染色,于显微镜下观察并拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定中膜面积(media area, MA)、内膜面积(intimal area, IA)、内膜中线周长、中膜中线周长,计算中膜厚度(media thickness, MT)、内膜厚度(intimal thickness, IT)、内膜面积增生率(hyperplasia ratio of intimal area, HRIA)、内膜厚度增生率(hyperplasia ratio of intimal thickness, HRIT),评价血管内膜增生程度。

MA=外弹力膜内面积-内弹力膜内面积

IA=内弹力膜内面积-管腔面积

MT=(外弹力膜内面积/π)^{1/2}-(内弹力膜内面积/π)^{1/2}

IT=(外弹力膜内面积/π)^{1/2}-(管腔面积/π)^{1/2}

HRIA=内膜面积/(内膜面积+中膜面积)

HRIT=内膜厚度/(内膜厚度+中膜厚度)

2.5 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 α-SMA、OPN 和 PCNA 表达的影响

免疫组化法测定损伤段颈总动脉增生内膜中 VSMC 收缩表型标志物 α-SMA、合成表型标志物 OPN 和增殖标志物 PCNA 表达。取各组损伤段颈总动脉,于 4%多聚甲醛中固定 7 d,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片(厚 4 μm);60 °C 烤片过夜,脱蜡水化,微波抗原修复,冷却至室温,分别滴加 50 μL α-SMA 抗体(1:2000)、PCNA 抗体(1:300)、OPN 抗体(1:300),4 °C 孵育过夜;滴加 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体,37 °C 孵育 30 min;

DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明后封片,于显微镜下观察并拍照,阳性表达呈棕黄色点状或纤维状染色,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定吸光度(A)值并计算阳性染色面积。

2.6 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

取各组损伤段颈总动脉,加入 RIPA 裂解液,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,100 °C 加热变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶,室温封闭 90 min;分别加入 PI3K 抗体(1:1000)、p-PI3K 抗体(1:500)、Akt 抗体(1:1000)、p-Akt 抗体(1:1000)和 β-actin 抗体(1:5000),4 °C 孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体(1:1000),室温孵育 90 min;加入 ECL 化学发光液显影,采用 Image J 软件分析条带。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。先将各组数据进行正态性、方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者用 LSD 检验;方差不齐者用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组家兔血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平显著升高($P < 0.01$),HDL-C 水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪-当归(1:1、5:1)组及阿托伐他汀组血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低($P < 0.05$ 、0.01),HDL-C 水平显著升高($P < 0.01$);当归组血清中 TG 和 LDL-C 水平显著降低($P < 0.05$ 、0.01)。

表 1 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C in serum of vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	2.95±0.41	0.64±0.05	4.49±0.13	0.52±0.18
模型	—	64.24±13.12**	6.39±1.55**	0.87±0.05**	15.83±3.34**
黄芪	1	53.56±11.60	5.13±1.37	0.64±0.26	18.57±3.94
当归	1	50.31±8.88	3.98±0.91 ^{△△}	0.54±0.31	11.94±2.62 [△]
黄芪-当归(1:1)	2	25.92±10.02 [△]	2.91±0.98 ^{△△}	4.30±1.83 ^{△△}	6.11±1.97 ^{△△}
黄芪-当归(1:5)	6	54.90±10.02	6.22±1.32	1.27±0.60	15.12±2.25
黄芪-当归(5:1)	6	29.15±2.85 [△]	2.38±0.73 ^{△△}	6.16±3.44 ^{△△}	6.53±1.65 [△]
阿托伐他汀	0.005	9.04±2.44 ^{△△}	2.11±0.62 ^{△△}	5.95±1.31 ^{△△}	2.87±1.83 ^{△△}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

3.2 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组家兔血管内弹力膜完整, 呈单层, 未见明显增生; 模型组血管内膜呈均一或不均一增厚, 并有大量增生的 VSMC 存在, 排列紊乱, 内膜增生明显; 各给药组血管内膜呈增生性改

变, 但增生程度较模型组减轻。

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组 IA、IT、HRIA、HRIT 均显著升高 ($P<0.01$), 表明兔颈总动脉不完全性狭窄后出现明显的内膜增生; 与模型组比较, 黄芪-当归 (1:1、5:1) 组及阿托伐他汀组 IA、IT、HRIA、HRIT 均显著降低 ($P<0.01$)。

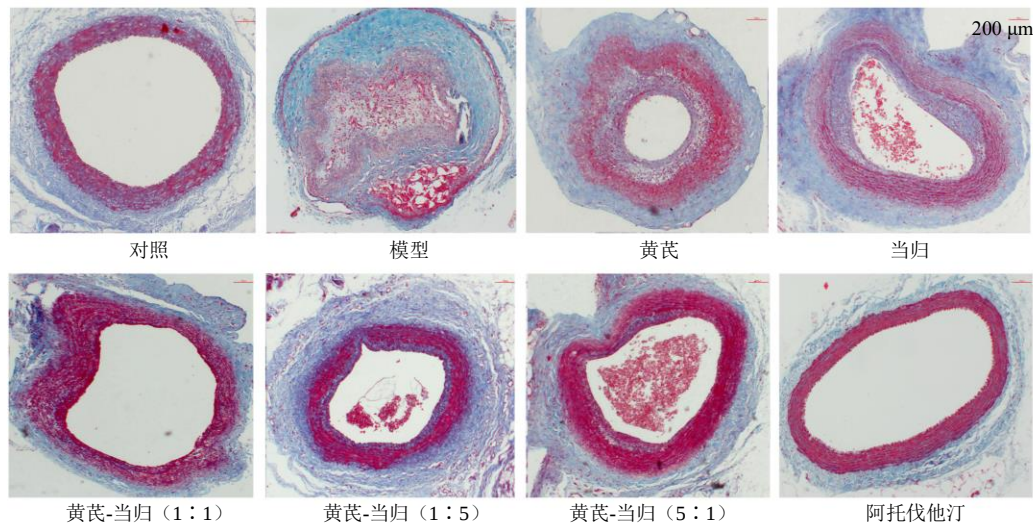


图 1 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉病理变化的影响 (Masson, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of *Astragali Radix*-*Angelicae Sinensis Radix* on pathological changes of common carotid artery in vascular intimal hyperplasia rabbit model (Masson, $\times 100$)

表 2 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 IA、IT、HRIA 和 HRIT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of *Astragali Radix*-*Angelicae Sinensis Radix* on IA, IT, HRIA and HRIT of common carotid artery in vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IA/ μm^2	IT/ μm	HRIA/%	HRIT/%
对照	—	6 711.80 $\pm$ 1 583.54	2.92 $\pm$ 0.58	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
模型	—	43 150.40 $\pm$ 10 544.20**	25.69 $\pm$ 9.09**	0.35 $\pm$ 0.03**	0.37 $\pm$ 0.02**
黄芪	1	37 335.00 $\pm$ 7 316.51	19.53 $\pm$ 3.57	0.32 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.05
当归	1	44 011.00 $\pm$ 9 800.04	19.33 $\pm$ 0.72	0.29 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.05
黄芪-当归 (1:1)	2	15 493.00 $\pm$ 5 119.52 $\Delta\Delta$	4.43 $\pm$ 0.98 $\Delta\Delta$	0.18 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	0.18 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
黄芪-当归 (1:5)	6	45 310.20 $\pm$ 16 247.25	22.29 $\pm$ 12.54	0.33 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.11
黄芪-当归 (5:1)	6	11 904.60 $\pm$ 9 971.65 $\Delta\Delta$	5.00 $\pm$ 1.98 $\Delta\Delta$	0.23 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$	0.22 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$
阿托伐他汀	0.005	22 196.00 $\pm$ 10 451.97 $\Delta\Delta$	7.12 $\pm$ 3.19 $\Delta\Delta$	0.23 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$	0.20 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$

3.3 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 α -SMA、OPN 和 PCNA 表达的影响

α -SMA 是 VSMC 的收缩表型标志物, 能够反映 VSMC 的收缩状态; OPN 是 VSMC 合成表型标志物, 能够反映 VSMC 的合成和分泌状态; PCNA 能够反映 VSMC 的增殖活性。如图 2~4 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组颈总动脉 α -SMA 表达显著降低 ($P<0.05$), OPN 和 PCNA 表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪-当归 (1:1、5:1) 组及阿托伐他汀组颈总动脉 α -SMA 表达显著升高

($P<0.05$ 、0.01), OPN 和 PCNA 表达显著降低 ($P<0.01$); 黄芪-当归 (1:5) 组颈总动脉 PCNA 表达显著降低 ($P<0.01$)。

3.4 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组颈总动脉 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪-当归 (1:1、1:5、5:1) 组及阿托伐他汀组颈总动脉 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。

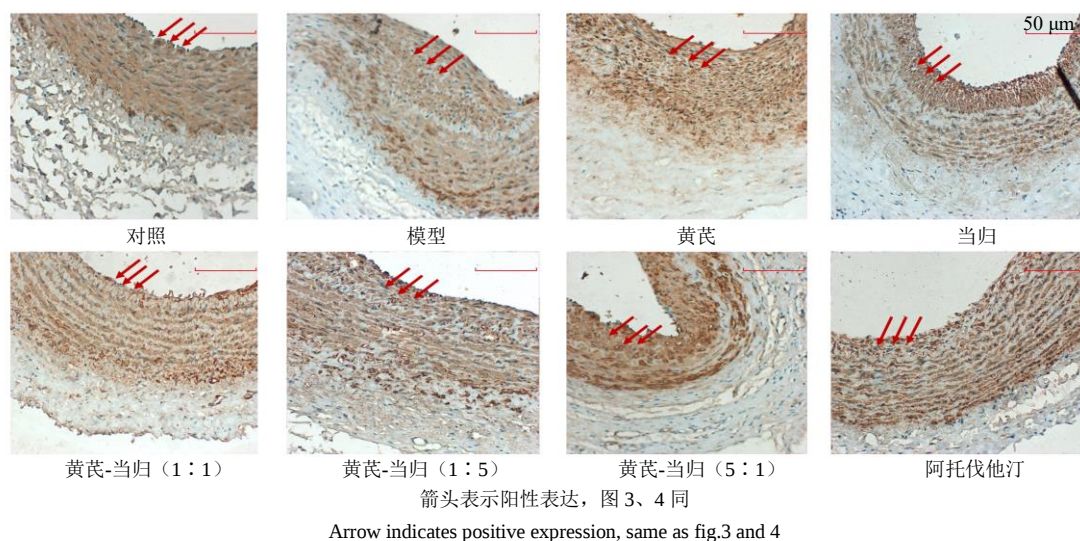


图 2 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 α -SMA 表达的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on α -SMA expression in common carotid artery of vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\times 200$)

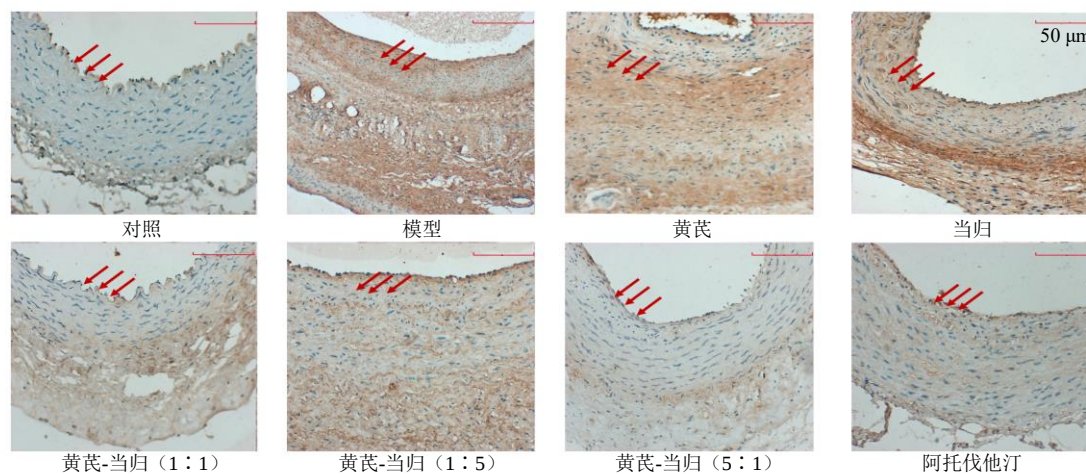


图 3 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 OPN 表达的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on OPN expression in common carotid artery of vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\times 200$)

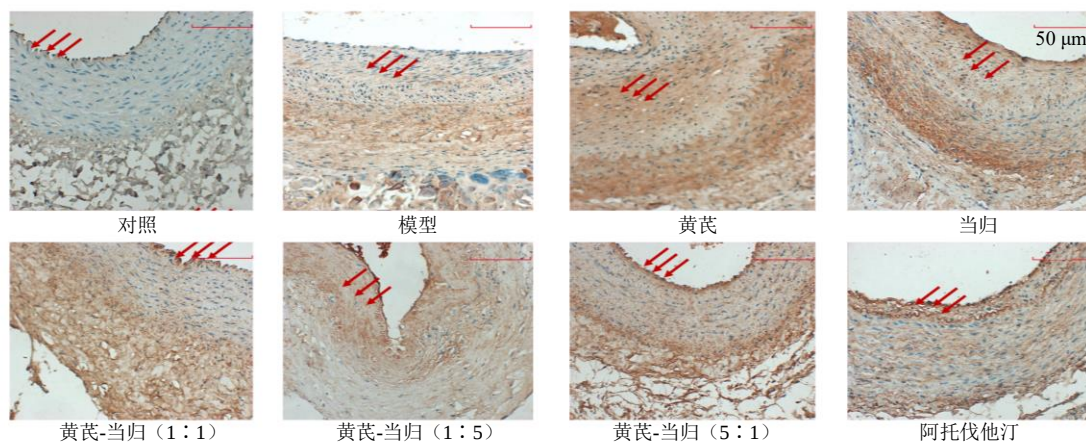
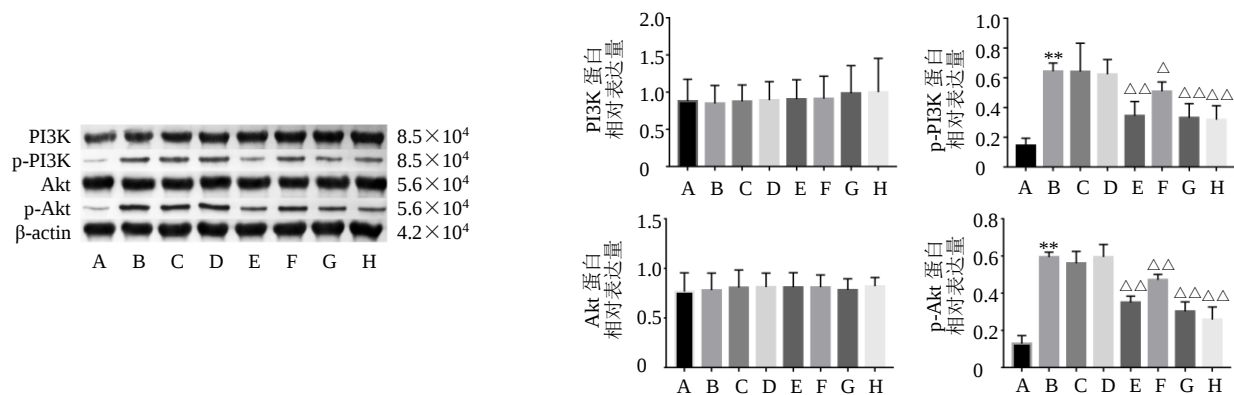


图 4 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 PCNA 表达的影响 ($\times 200$)

Fig. 4 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on PCNA expression in common carotid artery of vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\times 200$)

表 3 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 α -SMA、OPN 和 PCNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 3 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on expression of α -SMA, OPN and PCNA in common carotid artery of vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	α -SMA/ μm^2	OPN/ μm^2	PCNA/ μm^2
对照	—	0.40±0.05	0.22±0.02	0.24±0.03
模型	—	0.23±0.01*	0.33±0.02**	0.33±0.03**
黄芪	1	0.26±0.02	0.32±0.06	0.31±0.02
当归	1	0.26±0.03	0.29±0	0.31±0.02
黄芪-当归(1:1)	2	0.39±0.03 $\Delta\Delta$	0.24±0.02 $\Delta\Delta$	0.23±0.01 $\Delta\Delta$
黄芪-当归(1:5)	6	0.25±0.03	0.30±0.03	0.29±0.03 $\Delta\Delta$
黄芪-当归(5:1)	6	0.38±0.05 Δ	0.21±0.01 $\Delta\Delta$	0.23±0.01 $\Delta\Delta$
阿托伐他汀	0.005	0.34±0.02 Δ	0.22±0.01 $\Delta\Delta$	0.24±0.03 $\Delta\Delta$



A-对照组 B-模型组 C-黄芪组 D-当归组 E-黄芪-当归(1:1)组 F-黄芪-当归(1:5)组 G-黄芪-当归(5:1)组 H-阿托伐他汀组 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

A-control group B-model group C-Astragali Radix group D-Angelicae Sinensis Radix group E-Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix (1:1) group F-Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix (1:5) group G-Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix (5:1) group H-atorvastatin group ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

图 5 黄芪-当归配伍对家兔血管内膜增生模型颈总动脉 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 5 Effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on PI3K/Akt pathway related protein expressions in common carotid artery of vascular intimal hyperplasia rabbit model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

血管成形术后的 6 个月内, 55% 患者会发生血管再狭窄^[11]。血管成形术和支架植入后再狭窄主要由 IH 引起, VSMC 活化在 IH 的发生发展中具有重要的作用。当血管成形术和支架植入后, 血管内皮受损, 导致 VSMC 由收缩表型向合成表型转化, 具有增殖、分化和合成的能力; VSMCs 由血管中膜向内膜迁移并增殖, 并合成大量细胞外基质, 导致血管内膜增生, 管腔逐渐缩小^[12-13]。中药具有多环节、多靶点的调控作用, 可以通过多成分调节血管内膜增生的病理机制, 从而抑制或延缓血管内膜增生的发生发展。由于 VSMC 迁移和增殖是血管内膜增生的主要病理机制, 因此基于 VSMC 功能来研究中药防治血管内膜增生具有重要的意义。

本研究通过建立家兔颈总动脉血管内膜增生模型, 考察黄芪和当归不同比例配伍对血管内膜增生

的作用, 结果显示, 单用黄芪或当归对血管内膜增生无显著抑制作用, 黄芪-当归配伍能够抑制兔血管内膜增生, 黄芪和当归不同配伍显著降低 IA、IT、HRIA、HRIT, 其中黄芪-当归(1:1、5:1)配伍的疗效最佳, 提示黄芪-当归配伍具有抑制血管内膜增生的作用, 以黄芪-当归(1:1、5:1)配伍为宜。

血脂是诱发血管内膜增生的重要因素, 高脂水平易引起机体代谢与功能紊乱, 导致血管内皮受损、发生炎症反应及氧化损伤, 从而直接或间接参与 IH 的病理过程^[14]。血清炎症因子水平与血脂水平密切相关, 调节血脂有助于改变机体的炎症反应^[15]。研究表明, 黄芪当归合剂具有调脂作用, 疗效与他汀类药物相似且更持久^[16]。本研究结果显示, 单用黄芪对血脂水平无显著影响, 单用当归仅降低 TG 水平, 黄芪-当归(1:1、5:1)配伍能够降低血清中 TC、TG、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平, 表明黄

芪-当归配伍可能通过调节血脂水平,抑制脂质向血管壁沉积,从而抑制血管内膜增生。

VSMC向血管内膜迁移和增殖在血管增生性疾病的发生发展中具有重要作用^[17]。VSMC是一种高度分化的细胞,可以形成血管壁的中层,通过收缩和舒张血管从而控制血压。与其他终末分化的肌细胞不同,VSMC保留了分化(或收缩)和去分化(或合成)表型之间相互转换的独特能力,能够响应血管损伤、机械拉伸或生长因子刺激等生理和病理信号^[18-20]。收缩型VSMC呈细长的纺锤形形态,表现为极低的增殖活性,表达 α -SMA、平滑肌22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α)等VSMC特异性收缩基因。合成型VSMC形态与成纤维细胞类似,体积较收缩型VSMC大,其迁移、增殖活性增加,合成胶原、基质金属蛋白酶等细胞外基质蛋白的能力增强,收缩基因的表达减少^[19],表达OPN、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等合成型标志物^[21]。PCNA是一种核蛋白,参与细胞增殖相关的DNA合成,只在增殖细胞中合成和表达^[22]。本研究结果显示,模型组颈总动脉中VSMC收缩表型的标志物 α -SMA表达降低,合成表型标志物OPN和细胞增殖标志物PCNA表达升高,表明在血管狭窄模型中,VSMC活化,由收缩表型向合成表型转化增多,细胞向内膜迁移并增殖,促进新生内膜的形成;与模型组比较,单用黄芪或当归对 α -SMA、OPN和PCNA表达无明显作用,黄芪-当归(1:1、5:1)配伍能够上调 α -SMA表达水平,下调OPN和PCNA表达水平,提示黄芪-当归配伍可以抑制VSMC活化,抑制VSMC由收缩型向合成型转换和细胞增殖。

PI3K-Akt信号通路是EGFR下游信号通路的重要组成部分,在调节细胞周期、细胞生长、增殖和凋亡中发挥关键作用。PI3K/Akt磷酸化激活是刺激VSMC增殖和迁移的主要信号通路^[23-25]。在血管内膜增生性疾病中,PI3K/Akt被激活,从而抑制VSMC收缩表型标记基因的表达^[26-28]。本研究结果显示,模型组颈总动脉中p-PI3K和p-Akt蛋白表达水平显著升高,表明PI3K/Akt信号被激活;与模型组比较,黄芪-当归(1:1、5:1)组p-PI3K和p-Akt蛋白表达水平显著降低,表明黄芪-当归(1:1、5:1)配伍能够抑制PI3K/Akt信号通路,从而抑制VSMC增殖及表型转化,发挥抗血管内膜增生的作用。

综上所述,血管成形术后再狭窄的发生涉及血

管重构、血管内膜增生、炎症反应、氧化应激、血管平滑肌细胞迁移和过度增殖等病理过程。黄芪-当归配伍能够调节血脂、抑制血管内膜增生、缓解管腔狭窄,其机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路、抑制VSMC表型转化和增殖有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Subbotin V M. Excessive intimal hyperplasia in human coronary arteries before intimal lipid depositions is the initiation of coronary atherosclerosis and constitutes a therapeutic target [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(10): 1578-1595.
- [2] Braga S F, Neves J R, Ferreira J, et al. Neointimal hyperplasia [J]. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc*, 2019, 26(3): 213-217.
- [3] Mills B, Robb T, Larson D F. Intimal hyperplasia: Slow but deadly [J]. *Perfusion*, 2012, 27(6): 520-528.
- [4] Li Y D, Ma Y H, Zhao J X, et al. Protection of ultra-filtration extract from Danggui Buxue Decoction on oxidative damage in cardiomyocytes of neonatal rats and its mechanism [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(11): 854-859.
- [5] 彭熙炜, 阎卉芳, 黄娟, 等. 黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型炎症反应的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(2): 580-584.
- [6] 阎卉芳, 徐昊, 彭熙炜, 等. 黄芪和当归配伍对大鼠血管内膜增生血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(4): 361-369.
- [7] 彭熙炜, 阎卉芳, 黄娟, 等. 黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型细胞外基质的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(6): 629-634.
- [8] Yan H F, Peng X W, Xu H, et al. Inhibition of aortic intimal hyperplasia and vascular smooth muscle proliferation and extracellular matrix protein expressions by *Astragalus-Angelica* combination [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2018, 2018: 1508637.
- [9] 李霞, 曹旺, 唐标, 等. 基于网络药理学探讨黄芪-当归配伍活性成分改善血管内膜增生的作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(15): 3987-3995.
- [10] Chan E C, Datla S R, Dilley R, et al. Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin *in vivo* reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 710-718.
- [11] Kruger D. Neo-intimal hyperplasia, diabetes and endovascular injury [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2012, 23(9): 507-511.
- [12] Lee S W, Park S W, Kim Y H, et al. A randomized,

- double-blind, multicenter comparison study of triple antiplatelet therapy with dual antiplatelet therapy to reduce restenosis after drug-eluting stent implantation in long coronary lesions: Results from the DECLARE-LONG II (Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with long coronary lesions) trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(11): 1264-1270.
- [13] Siablis D, Karnabatidis D, Katsanos K, et al. Intrapopliteal application of paclitaxel-eluting stents for critical limb ischemia: Midterm angiographic and clinical results [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2007, 18(11): 1351-1361.
- [14] Miyazaki T, Shimada K, Miyauchi K, et al. Effects of fenofibrate on lipid profiles, cholesterol ester transfer activity, and in-stent intimal hyperplasia in patients after elective coronary stenting [J]. *Lipids Health Dis*, 2010, 9: 122.
- [15] 赵若池, 陈晓敏, 王双双. 不同降脂方案对兔血脂及颈动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. 现代实用医学, 2019, 31(9): 1148-1151.
- [16] 黄水清, 徐志伟. 黄芪当归合剂黄芪当归调节血脂作用的研究进展 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(11): 2020-2030.
- [17] Albinsson S, Sessa W C. Can microRNAs control vascular smooth muscle phenotypic modulation and the response to injury? [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(10): 529-533.
- [18] Owens G K, Kumar M S, Wamhoff B R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [19] Kang H, Hata A. MicroRNA regulation of smooth muscle gene expression and phenotype [J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19(3): 224-231.
- [20] Yang F, Chen Q S, He S P, et al. miR-22 is a novel mediator of vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and neointima formation [J]. *Circulation*, 2018, 137(17): 1824-1841.
- [21] Lin H, Ni T, Zhang J, et al. Knockdown of Herp alleviates hyperhomocysteinemia mediated atherosclerosis through the inhibition of vascular smooth muscle cell phenotype switching [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 269: 242-249.
- [22] Miniati D N, Hoyt E G, Feeley B T, et al. Ex vivo antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Cdc2 kinase inhibit graft coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2000, 102(19 Suppl 3): 237-242.
- [23] Zhu S B, Zhu J, Zhou Z Z, et al. TGF- β 1 induces human aortic vascular smooth muscle cell phenotype switch through PI3K/AKT/ID2 signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12): 2764-2774.
- [24] Wang S, Cheng Z Y, Chen X J. Promotion of PTEN on apoptosis through PI3K/Akt signal in vascular smooth muscle cells of mice model of coronary heart disease [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14636-14644.
- [25] Fang H H, Yang S L, Luo Y Y, et al. Notoginsenoside R₁ inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal hyperplasia through PI3K/Akt signaling [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7595.
- [26] Dong X Z, Hu H J, Fang Z D, et al. CTRP6 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 844-850.
- [27] Wang C, Wen J Y, Zhou Y, et al. Apelin induces vascular smooth muscle cells migration via a PI3K/Akt/FoxO3a/MMP-2 pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 69: 173-182.
- [28] Tang F, Liu M J, Zeng O, et al. Gefitinib-coated balloon inhibits the excessive hyperplasia of intima after vascular injuries through PI3K/AKT pathway [J]. *Technol Health Care*, 2019, 27(S1): 331-343.

[责任编辑 李亚楠]