

文章编号:1005-6947(2007)12-1155-04

· 基础研究 ·

经外膜缓释雷公藤内酯醇抑制自体移植静脉内膜增生

武国, 时德

(重庆医科大学附属第一医院 血管外科, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨经外膜缓释雷公藤内酯醇(triptolide)对自体移植静脉内膜增生的抑制作用。方法 健康雄性新西兰大白兔24只,建立颈外静脉-颈总动脉移植模型。随机将动物等分为3组。空白组移植血管不给任何处理,F-127多聚凝胶对照组在移植血管外膜喷洒20%F-127多聚凝胶0.5mL,实验组在移植血管外膜喷洒携带雷公藤内酯醇300 μ g的F-127多聚凝胶0.5mL。术后2周取标本。用组织形态学方法检测血管内膜增生程度,免疫组化检测标本中bcl-2和Fas的表达,TUNEL法检测标本中血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡的水平。结果 静脉移植2周后,与空白组和F-127对照组比较,实验组血管内膜增生明显受抑制($P < 0.05$),bcl-2的表达[(18.2 \pm 8.4)%]显著减少,而Fas的表达[(21.4 \pm 8.9)%]显著增加,凋亡细胞[(28.4 \pm 7.6)%]也显著增加($P < 0.05$)。结论 经外膜缓释雷公藤内酯醇可有效抑制移植静脉内膜增生,这一作用可能系通过促进VSMC凋亡而实现的。 [中国普通外科杂志,2007,16(12):1155-1158]

关键词: 静脉; 移植; 内膜增生; 雷公藤内酯醇

中图分类号: R 654; R 337.1

文献标识码: A

Adventitia applied slow-releasing triptolide inhibits intima hyperplasia in vein graft

WU Guo, SHI De

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of applying slow-releasing triptolide on adventitia on the intima hyperplasia of autologous vein graft. **Methods** In 24 male New Zealand rabbits, external jugular vein to common carotid artery models were established, and then were divided into 3 equal groups at random: blank-control group, receiving no management on adventitia of the vein graft; F-127 control group, receiving local application of 0.5 mL of 20% F-127 on adventitia of the vein graft; experiment group, receiving local application of 0.5 mL of 20% F-127 containing triptolide 300 μ g. Vein graft specimens were harvested at 2 weeks after the operation. Histomorphologic methods were used to detect the degree of intima hyperplasia of the specimens. The expression of bcl-2 and Fas of the specimens was detected by immunohistochemistry. The apoptosis vascular smooth muscle cells (VSMC) were detected by TUNEL. **Results** Two weeks after vein grafting, compared to blank-control group and F-127 control group, intima hyperplasia of experiment group [intima thickness (29.9 \pm 7.6) μ m, I/M 0.56 \pm 0.08] was markedly inhibited ($P < 0.05$). Expression of bcl-2 [(18.2 \pm 8.4)%] was reduced significantly, however, expression of Fas (21.4 \pm 8.9)% increased markedly, and the apoptotic cells [(28.4 \pm 7.6)%] also increased markedly ($P < 0.05$). **Conclusions** Applied slow-releasing triptolide by F-127 pluronic on the vein graft adventitia can effectively inhibit intima hyperplasia of vein graft by a mechanism of enhancement of VSMC apoptosis. [Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(12):1155-1158]

Key words: Vein; Graft; Intima Hyperplasia; Triptolide

CLC number: R 654; R 337.1

Document code: A

收稿日期:2007-05-08; 修订日期:2007-11-28。

作者简介:武国,男,四川南充人,重庆医科大学附属第一医院硕士研究生,主要从事血管外科疾病的基础与临床方面的研究。

通讯作者:时德 E-mail:SDPWQLSL@126.com

雷公藤内酯醇 (triptolide, TL) 是从卫矛科植物雷公藤中提取的主要活性成分, 具有抑制体外培养的 VSMC 增殖^[1] 和诱导 VSMC 凋亡^[2] 的作用。本实验建立兔颈外静脉-颈总动脉移植模型, 在移植静脉外膜喷洒携带 TL 的缓释载体 F-127 多聚凝胶, 观察 TL 对血管内膜增生的影响, 探讨其作用机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性新西兰大白兔 18 只, 体重 2.0 ~ 3.0 kg, 购自重庆医科大学实验动物中心; TL 购自复旦大学附属中山医院药学研究室; F-127 多聚凝胶购自美国 Sigma 公司; 抗 bcl-2 和 Fas 多克隆抗体 (兔 IgG 多抗, 工作浓度 1:100) 及 SP 试剂盒、DAB 显色剂购自武汉博士德公司; TUNEL 检测试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立和标本收集 动物用 2.5% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 静脉麻醉, 消毒后取颈部正中切口, 游离右侧颈外静脉和颈总动脉; 肝素 1 mg/kg 行全身肝素化, 切取静脉长约 2 cm, 修剪外膜后倒向与颈总动脉用 9-0 无损伤缝线行间置式端-端吻合, 每个吻合口缝 10 ~ 12 针。动物随机分为 3 组, 每组 8 只。(1) 空白组: 行静脉移植, 不施以任何干预措施。(2) F-127 对照组: 移植静脉外膜喷洒 F-127 多聚凝胶 0.5 mL。(3) 实验组: 移植静脉外膜喷洒含 TL 300 μg 的 F-127 多聚凝胶 0.5 mL。将 10 mg TL 溶于 3.33 mL 二甲亚砜 (DMSO) 中, 配成 3 mg/mL 浓度。术毕注射青霉素 80 万 U。术后 2 周麻醉状态下经原切口行移植静脉原位灌注固定后, 切取移植静脉桥。

1.2.2 组织形态学染色 标本置 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 垂直于血管长轴切成 4 μm 厚切片, HE 和弹力纤维 VVG (Verhoff-van Gieson) 染色。应用计算机图像分析系统采集图像, 每张切片血管横切面每 60° 测量一次内膜厚度 (I) 及中膜厚度 (M), 共 6 处, 取平均值。计算内膜增生程度 = I/M。

1.2.3 免疫组化染色 常规 SP 法染色, DAB 显色。正常静脉作自身对照, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照。光镜观察: 二者均为细胞浆着色, 有棕黄色颗粒为阳性。随机取 6 个部位, 计算每个高倍视野下阳性细胞数占细胞总数的百分比, 取平均值。

1.2.4 凋亡细胞检测 采用 DNA 末端转移酶介

导的缺口末端标记法 (TUNEL) 检测标本中凋亡细胞水平。检测方法严格按试剂盒说明进行, DAB 显色。随机选取 6 个部位, 计算每个高倍视野下凋亡细胞数及细胞总数, 取平均数计算细胞凋亡指数。细胞凋亡指数 = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件处理数据。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异显著性采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 两两比较采用配对 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学变化

肉眼观 3 组静脉桥均通畅, 管壁均有不同程度增厚, 为静脉血管动脉化后表现。显微镜下观察, 正常静脉内膜为单层内皮细胞, 中层仅有 2 ~ 3 层平滑肌细胞。HE 染色和弹力纤维 VVG 染色可见 3 组移植于动脉环境下的静脉桥血管内膜及中膜不同程度增厚; 内膜增厚不均匀, 为大量排列不规则的平滑肌细胞, 内皮细胞部分脱落、坏死; 中膜增厚, 厚度均匀, 细胞成分为增生的平滑肌细胞, 排列不规则, 弹力纤维增多增粗, 排列紊乱; 中膜与外膜界限不清晰。空白组与 F-127 对照组内膜增生明显, 内膜厚度不均匀; 而实验组内膜增生明显受抑制 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 移植静脉内膜、中膜厚度及内膜增生程度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	内膜厚度(I)(μm)	中膜厚度(M)(μm)	内膜/中膜(I/M)
空白对照组	6	92.0 ± 9.4 [†]	56.2 ± 8.1	1.65 ± 0.15 [†]
F-127 对照组	6	87.5 ± 10.4 [†]	56.6 ± 6.5	1.55 ± 0.09 [†]
实验组	6	29.9 ± 7.6	52.7 ± 7.0	0.56 ± 0.08

注: [†] 与实验组比较, $P < 0.05$

2.2 免疫组化及凋亡检测结果

移植后 2 周, 实验组 bcl-2 的表达较空白组和 F-127 对照组明显减低, 而 Fas 的表达明显增高 ($P < 0.05$) (图 1-4); 实验组凋亡细胞数亦显著增多 ($P < 0.05$) (图 5-6) (表 2)。

表 2 移植静脉 bcl-2 和 Fas 免疫组化及 TUNEL 染色结果 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	bcl-2	Fas	凋亡细胞
空白对照组	6	33.7 ± 11.2 [†]	10.5 ± 5.3 [†]	13.6 ± 5.1 [†]
F-127 对照组	6	30.8 ± 9.5 [†]	12.1 ± 5.9 [†]	12.2 ± 6.1 [†]
实验组	6	18.2 ± 8.4	21.4 ± 8.9	28.4 ± 7.6

注: [†] 与实验组比较, $P < 0.05$

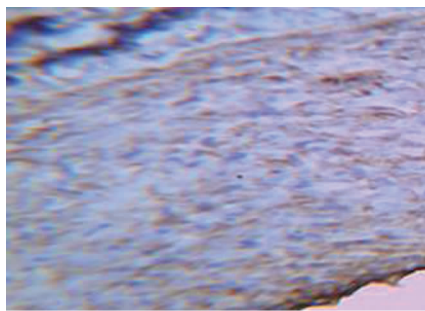


图1 移植2周,空白组内膜 bcl-2 蛋白表达增高(S-P × 400)

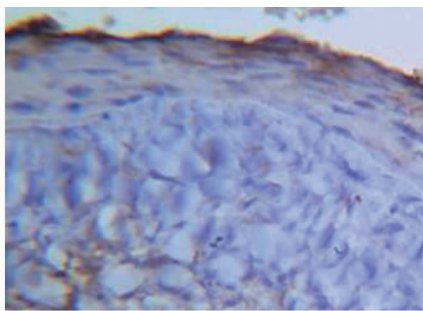


图2 移植2周,实验组内膜 bcl-2 蛋白表达降低(S-P × 400)

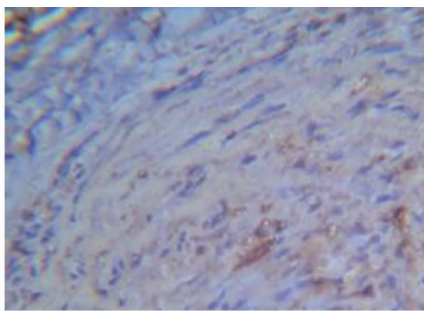


图3 移植2周,空白组内膜 Fas 蛋白表达低(S-P × 400)

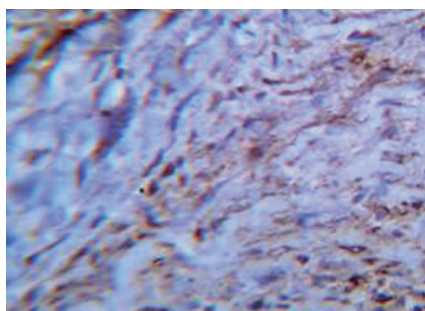


图4 移植2周,实验组内膜 Fas 蛋白表达增高(S-P × 400)

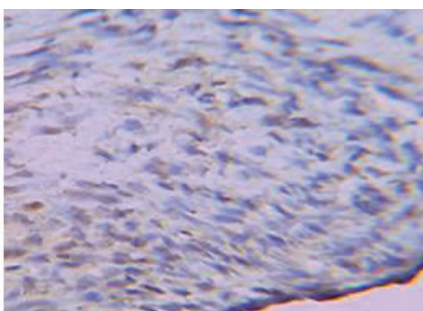


图5 移植2周,空白组凋亡细胞数少(TUNEL × 400)

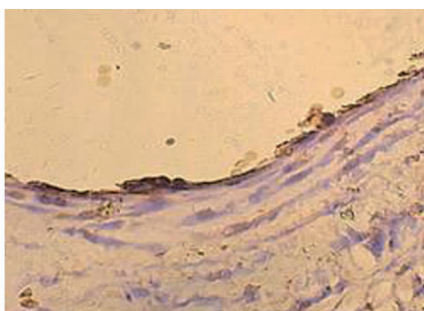


图6 移植2周,实验组凋亡细胞数增多(TUNEL × 400)

3 讨论

血管移植后狭窄闭塞是一个多因素、多阶段、多基因参与的复杂病理过程,其发生的确切机制目前仍不甚明了。据报道自体静脉移植术后1~2年就有20%~40%的患者出现移植血管再狭窄,其主要原因是VSMC迁移增殖所致的内膜增生。研究^[3]表明,血管移植1~2周是VSMC增殖的高峰,而VSMC的凋亡不足,增殖和凋亡失衡可能是内膜增生的一个重要机制。

TL是从雷公藤中分离纯化的三氧二萜内酯化合物单体,是雷公藤的主要活性成分,具有显著的抗炎、免疫抑制和抗肿瘤作用。它可降低凋亡基因 bcl-2 的表达,增加促凋亡基因 bax 的表达,使 bax/bcl-2 值提高,从而诱导细胞凋亡。Choi 等^[4]发现 TL 通过激活 caspase-3 和下调 XIAP 的表达而诱导 U937 人幼单核细胞凋亡。Hachida 等^[5]发现 TL 通过降低 PDGF-A 的表达而抑制接受异体心脏移植小鼠血管桥的新生内膜形成,从而明显降低血管桥的粥样硬化。TL 能阻断体外培养的 VSMC 从 G₀/G₁ 期细胞向 S 期转化,药物浓度越高,S 期细胞含量越少,从而抑制其增殖^[1,6]。李玫等^[7]发现,TL 通过促进体外培养的

VSMC 从 G₁ 期细胞过多地进入并阻滞于 S 期,使 S 期峰值增高,细胞凋亡率随之升高。结论的不一致可能与不同实验所采用的浓度不一有关。TL 诱导 VSMC 凋亡还与促凋亡基因 Fas 的表达明显增高有关^[2]。

TL 通过系统给药,毒副作用较大而使其临床应用受限;另一方面,血管再狭窄是一个缓慢的过程,系统给药不能在移植血管局部长时间保持有效浓度。血管腔内药物涂层支架通过局部缓释给药,克服了上述缺点。将 TL 涂层支架置入幼猪的冠状动脉,能明显抑制新生内膜的形成^[8]。研究^[9-10]发现用 F-127 多聚凝胶包裹反义寡核苷酸涂抹于移植静脉外膜,可明显减轻其内膜增生,且该作用可持续2周,证实了经外膜途径干预的可行性和 F-127 多聚凝胶可作为药物缓释载体。F-127 多聚凝胶的微观形态为密布小孔的网状结构,生物学性质稳定,组织相容性好,0~4℃下呈液态,可以分散携带药物;37℃时与组织接触后立即变成固态胶体,所携带的药物80%在5d内缓慢释放,而其本身并不影响血管内膜增生^[11]。

本研究将 TL 分散融入液态 F-127 多聚凝胶中,涂抹于移植血管外膜,使药物缓释发挥作用。结果发现:血管移植后2周,空白组及 F-127 对

照组的抑凋亡基因 bcl-2 表达增强,促凋亡基因 Fas 表达减弱,细胞凋亡不足,内膜增生明显;而实验组经外膜应用 TL 后,bcl-2 表达明显减弱,Fas 表达增强,细胞凋亡也增强,内膜增生受到显著抑制。此结果初步证实,经血管外膜局部应用 TL 后,可通过促进 VSMC 凋亡而防止移植血管再狭窄。本研究为血管重建术后再狭窄的防治提供了新的实验依据。

参考文献:

- [1] 陶蓉, 陆林, 沈卫峰, 等. 雷公藤内酯醇对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(8): 780-783.
- [2] 李玫, 吴宗贵, 陈金明, 等. 雷公藤甲素诱导大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 49-51.
- [3] Wang YL, Liu Y, Sun W, *et al.* Apoptosis and proliferation in smooth muscle cell of autogenous vein graft in rat experimental model[J]. *Chn J Mod Med*, 2005, 15(8): 822-824.
- [4] Choi YJ, Kim TG, Kim YH, *et al.* Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase-3 and down-regulation of XIAP in U937 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(2): 273-280.
- [5] Hachida M, Lu H, Zhang X, *et al.* Inhibitory effect of triptolide on platelet derived growth factor-A and coronary arteriosclerosis after heart transplantation [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(7): 2719-2723.
- [6] 陆东风, 刘威, 李昭骥. 雷公藤内酯醇对大鼠血管平滑肌细胞的增殖及 DNA 合成的影响[J]. 岭南心血管病杂志, 2002, 8(6): 418-420.
- [7] 李玫, 吴宗贵, 潘晓明, 等. 雷公藤甲素抑制大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的作用及机制[J]. 中华国际医学杂志, 2001, 1(4): 297-300.
- [8] 黄璟, 陆东风, 吴昊, 等. 雷公藤内酯醇洗脱支架对冠状动脉支架内再狭窄的影响[J]. 岭南心血管病杂志, 2006, 12(4): 298-300.
- [9] Neschis DG, Sattord SD, Hanna AK, *et al.* Antisense fibroblast growth factor gene transfer reduces early intimal thickening in a rabbit femoral artery balloon injury model [J]. *J Vasc Surg*, 1998, 27(1): 126-134.
- [10] 杨军, 胡新华, 刘程伟, 等. 转染反义 survivin 寡脱氧核苷酸对移植血管内膜增生的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(1): 32-36.
- [11] Hu Y, Zou Y, Dietrich H, *et al.* Inhibition of neointima hyperplasia of a mouse vein graft by locally applied suramin [J]. *Circulation*, 1999, 100(8): 861-868.

欢迎订阅 2008 年《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005-6947/CN43-1213R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新知识、新技术、临床研究及实用性临床经验。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

《中国普通外科杂志》由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、郑树森、夏家辉、黄志强、裘法祖、黎介寿等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。出版周期短, 时效性强。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态、病案报告。《中国普通外科杂志》已进入多个国内外重要检索系统和大型数据库, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据-数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

2008 年《中国普通外科杂志》由每期 80 页增至 96 页, 届时中国普通外科杂志编辑部办公将全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期和时效性将进一步提高。欢迎订阅, 欢迎赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 96 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 12.0 元/册, 全年 144 元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731-4327400 网址: <http://www.zpwz.net> E-mail: pw4327400@126.com; jcgssych@126.com; zpwzcn@gmail.com