论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1504-03

吲哚-3-甲醇对大鼠动脉损伤后内膜增殖的影响

江永红,黄 晶,邓昌明,刘地川 (重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

提 要:目的 观察吲哚-3-甲醇对大鼠损伤动脉内膜增生的影响并探讨可能机制。**方法** 采用球囊扩张方法,建立大鼠颈总动脉损伤模型。20只Sprague-Dawley大鼠,随机分为单纯球囊扩张组(对照组)和球囊扩张+吲哚-3-甲醇治疗组(治疗组),其中治疗组又分为3个亚组,在球囊扩张术后灌胃给予吲哚-3-甲醇7 d,剂量分别为12.5、25、50 mg/d,2周后取损伤段血管用于病理组织学检查和免疫组化染色检查。**结果** ①治疗组内膜厚度、内膜面积均显著小于对照组($P<0.05$);管腔狭窄程度较对照组分别降低25.2%、29.9%、48.5%。②PCNA阳性细胞表达在治疗组明显低于对照组。③各治疗组细胞凋亡率与对照组比较均明显增高($P<0.01$)。**结论** 口服适宜剂量吲哚-3-甲醇可抑制血管内膜增生及血管再狭窄,并可能与其抑制平滑肌细胞增殖并诱导其凋亡有关。

关键词:吲哚-3-甲醇;细胞,平滑肌;增殖;凋亡

中图法分类号:R364.33;R654.3;R979.1 **文献标识码**:A

Effects of indole-3-carbinol on neointimal hyperplasia of rat artery after balloon injury

JIANG Yong-hong, HUANG Jing, DENG Chang-ming, LIU Di-chuan (Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the effects of indole-3-carbinol on neointimal hyperplasia and restenosis of rat artery after balloon injury and the possible mechanisms. **Methods** Balloon dilation was used to establish the neointimal injury model of left carotid artery in rats. Twenty Sprague-Dawley rats were randomly divided into single balloon dilation group (control group) and balloon dilation followed by indole-3-carbinol therapy group (therapeutic group). After balloon dilation, indole-3-carbinol (12.5, 25, 50 mg/d) was applied to the rats for 7 days respectively. The rats were killed two weeks after balloon dilation and the injured vascular specimens were harvested for pathologic examination and immunohistochemical staining. **Results** ①The neointimal thickness, neointimal area in the therapeutic groups were significantly less than that of the control group ($P<0.05$). The stenosis ratio of vessels in the therapeutic groups decreased by 25.2%, 29.9% and 48.5% respectively, as compared with the control group. ②The percentages of PCNA positive cells were obviously decreased in the therapeutic groups as compared with the control group. ③The apoptosis of vascular smooth muscle cells was significantly higher in the therapeutic groups than the control group ($P<0.01$). **Conclusion** Taking indole-3-carbinol orally can inhibit neointimal hyperplasia *in vivo*, which mechanism may be related to inhibiting the proliferation and promoting the apoptosis of vascular smooth muscle cells.

Key words: indole-3-carbinol; cells, smooth muscle; proliferation; apoptosis

经皮冠状动脉腔内成形术是治疗冠心病安全、有效的方法,但术后3~6个月再狭窄发生率达30%~50%[1],严重影响其远期疗效。再狭窄的发生机制至今尚未完全阐明。目前,大多数学者认为血管平滑肌细胞向内膜下迁移并过度增殖是其关键环节之一[2],因此血管平滑肌细胞增殖的调节成为研究的焦点。

本实验选用具有细胞周期调节作用的自然抗肿瘤药物吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol,I3C)作用于大鼠,探讨I3C对大鼠颈总动脉球囊扩张术后血管内膜增生是否有抑制作用及其可能的作用机制,为临床防治再

作者简介:江永红(1978-),女,重庆市人,硕士,医师,主要从事介入心脏病学方面的研究,电话:13060206601,E-mail:jiangyoho686@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-08-31;修回日期:2006-09-10

狭窄提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及器材

吲哚-3-甲醇购自 Sigma 公司；PCNA 试剂盒购自武汉博士德公司；Tunnel 原位细胞凋亡试剂盒购自美国 Roche 公司；球囊导管购自美国 Edwards Lifesciences 公司。

1.2　动物模型制备及药物干预

20 只清洁级健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠（购自第三军医大学大坪医院实验动物中心），体质量（300 ± 50）g，分为对照组与治疗组（对照组 $n = 5$ 和治疗组 $n = 15$），建立颈总动脉球囊损伤模型[3]，方法如下：动物麻醉后在无菌条件下，做颈部正中切口，分离左侧颈外和颈总动脉，从颈外动脉插入 2F 球囊导管至胸主动脉上端，球囊充水 0.10 ~ 0.15 ml，然后自远心端慢速回拉至颈内、外动脉分叉处，重复 3 次，退出导管，结扎颈外动脉，作为对照组；治疗组在球囊扩张术后灌胃给予 I3C 7 d，剂量分别 12.5、25、50 mg/d（3 亚组，$n = 5$），术后 2 周处死动物，从颈内、外动脉分叉处起向近心端取 1 cm 颈总动脉，同时取各组大鼠右侧未手术颈总动脉作为非手术对照组。

1.3　血管形态学定量分析

石蜡切片经弹力纤维染色后，用 CM-2000 计算机图像分析系统分别测定血管内膜厚度（neointimal thickness，NT）、内膜面积（neointimal area，NIA）、中膜面积（media area，MA）、内弹力板围绕面积（internal elastic membrane，IEM）、外弹力板围绕面积（external elastic membrane，EEM）并计算内膜面积/中膜面积（NIA/MA）及管腔狭窄指数（stenosis index，SI）。其中，内膜面积 = 内弹力板围绕面积 − 腔内面积，中膜面积 = 外弹力板围绕面积 − 内弹力板围绕面积，管腔狭窄指数 = 内膜面积/内弹力板围绕面积（SI = NIA/IEM）。

1.4　PCNA 免疫组织化学法测定细胞增殖率

石蜡组织切片经脱蜡、脱水后，按实验说明书步骤进行操作，封片后每张切片取 5 个视野（400 ×），计数 PCNA 阳性和非阳性细胞，计算阳性细胞百分比。

1.5　细胞凋亡检测

实验步骤按 TUNNEL 试剂盒说明书进行。封片后，每张切片于 400 倍光镜下，选择 5 个无重复的亮视野，计数细胞核呈棕黄色的 Tunnel 阳性细胞核及所有细胞核数。计算细胞凋亡率 = 平均阳性染色细胞核数/所有细胞核数 × 100%。

1.6　统计学分析

资料用 $x \pm s$ 表示，采用 SAS 8.0 软件进行 t 检验。

2　结果

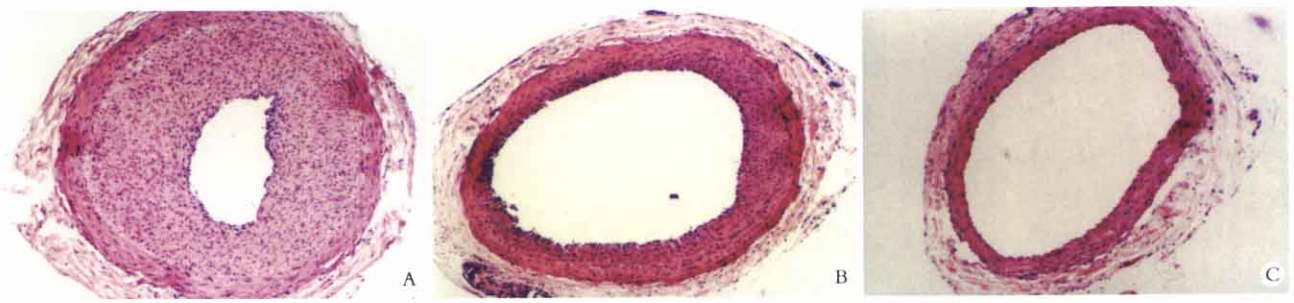
2.1　动脉狭窄程度观察

实验结果显示球囊损伤术后 2 周，HE 染色各组标本均见不同程度的内膜增厚，血管腔面凹凸不平，以对照组最为严重，治疗组与对照组比较，内膜厚度、内膜面积、内膜面积/中膜面积均有不同程度减少，以 50 mg 治疗组最为明显，治疗组管腔狭窄指数较对照组分别降低 25.2%、29.9%、48.5%；非手术对照组未见内膜增生。各组血管中膜面积差异不明显（$P > 0.05$）。见表 1、图 1。

表 1　血管病理形态学定量分析（$n = 5$，$x \pm s$）

组别	内膜厚度（μm）	内膜面积（mm^2）	中膜面积（mm^2）	内膜/中膜面积比	狭窄指数
对照组	92.46 ± 39.09	0.10 ± 0.03	0.06 ± 0.01	1.82 ± 0.50	0.60 ± 0.19
治疗组					
12.5 mg	44.09 ± 6.21[a]	0.06 ± 0.01[a]	0.05 ± 0.01	1.18 ± 0.26[a]	0.35 ± 0.07[a]
25 mg	31.09 ± 10.64[b]	0.04 ± 0.02[b]	0.06 ± 0.01	0.68 ± 0.19[b]	0.31 ± 0.12[b]
50 mg	12.45 ± 4.59[b]	0.02 ± 0.01[b]	0.06 ± 0.003	0.27 ± 0.07[b]	0.12 ± 0.03[b]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较



A：对照组内膜明显增厚；B：I3C 25 mg 作用 7 d 组内膜见少量增厚；C：正常非手术对照组内膜未见增厚

图 1　术后两周大鼠颈总动脉内膜增殖情况　（HE × 200）

2.2　I3C 对血管平滑肌细胞增殖的影响

光镜观察 PCNA 染色切片，发现 PCNA 阳性细胞在对照组血管壁大量表达，且主要分布在新生内膜中，I3C 治疗后 PCNA 阳性率明显下降，在各治疗组分别为（37.9 ± 3.9）%、（34.0 ± 1.9）%、（21.5 ± 1.8）%；在剂量为 12.5 ~ 50.0 mg，I3C 呈剂量依赖地抑制血管平滑肌细胞增殖，与对照组（55.6 ± 1.9）% 相比差异显著（$P < 0.01$）。

2.3　I3C 对血管平滑肌细胞凋亡的影响

TUNEL 法测得的细胞凋亡率随着药物剂量的增加而增加，TUNEL 阳性细胞率在对照组为（23.4 ± 1.6）%，治疗组为（28.8 ± 0.6）%、（30.2 ± 0.4）%、（37.2 ± 0.9）%，各治疗组与对照组比较均有显著差异（$P < 0.01$）。

3 讨论

术后再狭窄是经皮腔内冠状动脉成形术及血管支架植入后主要的远期不良反应,再狭窄的机制较复杂,但血管壁增生性重塑是主要机制之一,在血管壁增生性重塑过程中,血管平滑肌细胞大量增生,同时出现细胞凋亡,当细胞增生过度,凋亡不足时,血管壁细胞总量及其合成的细胞外基质构成肥厚的血管壁[4]。近期人们发现细胞周期调节药物防治再狭窄具有较大优势,雷帕霉素包被支架的应用结果令人鼓舞[5,6],但是,随着研究的深入,人们开始发现这些强力的细胞抑制药物可能对局部血管壁有不利影响,延迟局部血管损伤的愈合。为了取得对血管平滑肌细胞增殖更好的抑制作用,同时最大限度地减少药物对血管局部可能发生的不良作用 ,有必要筛选安全性更高的药物或寻求新的给药途径。此外,目前国产的药物支架所用药物与国际产品相同或相近,存在知识产权争议,因此急需开发具有自主知识产权的抗再狭窄药物。吲哚-3-甲醇(I3C)是广泛存在于十字花科蔬菜中的天然活性成分,由芸苔葡糖硫甙水解产生,常用于抑制乳腺、子宫、消化道、肝脏及前列腺等处肿瘤的研究,其机制可能与调节细胞周期、抗激素样活性、调节体内酶等作用有关。故本实验通过 I3C 干预实验性大鼠颈总动脉损伤模型,观察 I3C 对血管损伤后内膜增生及 VSMCs 增殖、凋亡的影响,探讨 I3C 防治 PCI 术后再狭窄的可能性。实验显示 I3C 可抑制动脉损伤后内膜增生,使血管腔的面积增大,管腔狭窄程度降低,给予小剂量 I3C (12.5 mg/d)7 d 后,对血管损伤后内膜增生即可产生明显的抑制效应,且 I3C 对新生内膜的抑制作用呈明显的剂量依赖关系。PCNA 是细胞核中 DNA 聚合酶的附属蛋白,其主要生物学作用是促进细胞核中 DNA 链的合成与延伸,促进细胞的生长与增殖。本研究表明大鼠在灌胃给予 I3C 后,其损伤动脉内膜及中膜的 PCNA 阳性表达率均较对照组有所减少,可见 I3C 能降低损伤血管壁中 PCNA 蛋白质表达。细胞凋亡是调节内皮损伤所致内膜增生演变的一个重要机制,细胞增殖活性越高则伴随凋亡活性越高,球囊血管损伤术后,由于细胞增殖程度大于凋亡程度,从而导致再狭窄的发生[7]。本研究表明 I3C 对细胞的增殖抑制和凋亡诱导效应都在同一剂量水平(12.5 mg/d)开始表现出显著性差异,而且随着药物剂量的增减,两者的变化趋势相似,表明 I3C 对损伤血管壁细胞凋亡诱导效应也是该细胞增殖受抑制的机制之一,国外有研究表明 I3C 通过抑制 AKt 和 NF-kB 活性抑制前列腺癌细胞[8,9]增殖并促进其凋亡;但 I3C 对损伤血管内膜的作用是否也是通过抑制类似的信号途径抑制细胞增殖并诱导其凋亡的还有待实验的证实。

大量研究表明 I3C 对多种肿瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用,但其对血管平滑肌细胞的作用尚少见报道。本实验证明口服适宜剂量的 I3C 在活体血管损伤模型中可抑制内膜增生及血管平滑肌细胞增殖,提示口服 I3C 可能成为一种潜在的防治 PCI 术后再狭窄的有效手段。目前,I3C 主要用于抗肿瘤方面,虽然 I3C 用于心血管疾病防治的研究才刚刚起步,许多问题尚未解决,但由于 I3C 广泛存在于多种十字花科蔬菜中,作为自然来源药物具有众多的优势:①自然来源,毒副作用小;②细胞周期调节剂,其作用环节与雷帕霉素相似;③可制成多种剂型,使用方便;④可通过口服给药达到抗再狭窄效果;⑤价格低廉。因此,I3C 在心血管病领域具有潜在的但十分广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Williams D O, Holubkov R, Yeh W, *et al*. Percutaneous coronary intervention in the current era compared with 1985 - 1986: The National Heart, Lung, and Blood Institute Registries[J]. Circulation, 2000, 102(24): 2945 - 2951.

[2] 覃跃龙,舒茂琴,江明宏. ORC1 基因 RNA 干扰对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1161 - 1163.

[3] 韩雅玲,王效增,康 建,等. 血管球囊损伤后内膜增生及血管重塑对再狭窄的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(9): 788 - 790.

[4] Freeman E J. The Ang II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase D-mediated signaling mechanism[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 374(2): 363 - 370.

[5] Colombo A, Orlic D, Stankovic G, *et al*. Preliminary observations regarding angiographic pattern of restenosis after rapamycin-eluting stent implantation[J]. Circulation, 2003, 107(17): 2178 - 2180.

[6] Sousa J E, Costa M A, Abizaid A C, *et al*. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow up[J]. Circulation, 2001, 104(17): 2007 - 2011.

[7] 李东宝, 沈潞华, 谢苗荣. 动脉粥样硬化和再狭窄中平滑肌细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志,2000, 8(3): 276 - 278.

[8] Chinni S R , Sarkar F H. Akt inactivation is a key event in indole-3-carbinol-induced apoptosis in PC-3 cells[J]. Clin Cancer Res,2002,8(4): 1228 - 1236.

[9] Chinni S R, Li Y, Upadhyay S, *et al*. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells[J]. Oncogene, 2001, 20(23): 2927 - 2936.

(编辑 栗 嘉)