维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0683-03

局部缓释雷公藤内酯醇对移植静脉平滑肌细胞增殖和凋亡的影响

武 国,时 德

(重庆医科大学附属第一医院血管外科 重庆市普外科学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究经外膜缓释雷公藤内酯醇(Triptolide,TL)对自体移植静脉血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells,VSMC)增殖和凋亡的影响。方法:健康家兔 24 只,建立颈外静脉 - 颈总动脉移植模型,随机分为 3 组,空白对照组: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含二甲亚砜(DMSO)0.1ml 的 20%F-127 多聚凝胶 0.5ml;实验组:在移植血管外膜喷洒携带 TL300μg 的 F-127 多聚凝胶 0.5ml。术后 2 周取标本,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增殖细胞核抗原(PCNA)和 bcl-2 的表达情况,TUNEL 法检测标本中 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,局部应用 TL300μg 明显抑制血管内膜增生($P<0.05$),PCNA、bcl-2 的表达均显著减少($P<0.05$),TUNEL 阳性细胞显著增加($P<0.05$)。结论:经外膜缓释 TL 可以抑制移植静脉 VSMC 增殖和促进 VSMC 凋亡,从而抑制血管内膜增生。

【关键词】静脉;移植;内膜增生;雷公藤内酯醇

【中国图书分类法分类号】R654.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-25

Effects of local applied slow-releasing triptolide on proliferation and apoptosis of VSMCs of the vein graft

WU Guo, et al

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

【Abstract】*Objectives*: To investigate the effect and mechanism of adventitia applied slow-releasing triptolide on proliferation and apoptosis of VSMCs of the autologous vein graft. *Methods*: Twenty-four healthy rabbits were made external jugular vein to common carotid artery models and then were divided into 3 equal groups at random: Blank-control group received no management on adventitia of the vein graft; F-127 pluronic gel control group received local application of 0.5 ml 20% F-127 pluronic gel containing 0.1ml DMSO on adventitia; and experimental group received local application of 0.5 ml F-127 pluronic gel containing triptolide 300μg on adventitia. Vein graft samples were harvested at 2 weeks after the operation. Histomorphologic methods were used to detect the degree of intima hyperplasia of the samples. The expressions of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and bcl-2 of the samples were detected by immunohistochemistry. The apoptosis of vascular smooth muscle cells(VSMC) was detected by TUNEL. *Results*: Two weeks after vein grafting, compared with blank-control group and F-127 control group, intima hyperplasia was markedly inhibited by applying triptolide 300μg on adventitia ($P<0.05$), expressions of both PCNA and bcl-2 reduced significantly($P<0.05$), and the positive cells of TUNEL increased markedly($P<0.05$). *Conclusion*: Applying slow-releasing triptolide on adventitia by F-127 pluronic gel can effectively reduce VSMC proliferation and induce VSMC apoptosis, to inhibit intima hyperplasia of the vein grafts.

【Key words】 Vein; Graft; Intima hyperplasia; Triptolide

利用自体静脉行冠状动脉搭桥或肢体动脉旁路转流手术,目前仍然是挽救患者生命和肢体功能的重要手段。但是,由于损伤性炎症反应和血流动力学的改变,局部产生大量生长因子和血管活性物质,刺激 VSMC 向内膜下迁移并大量增殖,移植静脉内膜增生,从而导致移植血管狭窄甚至闭塞,致手术远期失败率高达 50%左右。TL 是从卫矛科植

作者介绍:武 国(1977-),男,主治医师,硕士,研究方向:血管外科疾病的诊治。

通讯作者:时 德,男,教授,E-mail:SDPWQLSL@126.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

物雷公藤中提取的主要活性成分，研究表明它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 动物模型的建立和标本收集

健康雄性家兔 24 只，体重(2.5 ± 0.5)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；将 10mgTL 溶于 3.33ml 二甲亚砜(DMSO)，配成 3mg/ml。动物称重后用 2.5% 戊巴比妥钠 1ml/kg 经耳缘静脉注射麻醉，仰卧位固定于手术台，备皮，消毒铺巾，取颈部正中切口，游离右侧颈外静脉和颈总动脉，肝素 1mg/kg 行全身肝素化，切取静脉约 2cm 长，修剪外膜后倒向与颈总动脉用"8-0"无损伤缝线行端—端吻合，每个吻合口 10～12 针。动物随机分为 3 组，每组 8 只，空白对照组：行静脉移植，不施予任何干预措施；F-127 多聚凝胶对照组：移植静脉外膜喷洒含 DMSO 0.1ml 的 F-127 多聚凝胶 0.5ml；实验组：移植静脉外膜喷洒含 TL300μg 的 F-127 多聚凝胶 0.5ml。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获取移植静脉桥。

1.2 组织形态学染色

标本于 4%多聚甲醛中固定，石蜡包埋，垂直于血管长轴切成 4μm 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。

1.3 免疫组织化学染色

抗 PCNA 单克隆抗体、bcl-2 多克隆抗体购自武汉博士德公司(工作浓度 1∶100)。常规 SP 法染色，DAB 显色，苏木精复染。正常静脉作为自身对照，PBS 代替一抗作阴性对照。光镜观察：PCNA 为细胞核着色，bcl-2 为细胞浆着色，有棕黄色颗粒为阳性。随机取 5 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。

1.4 凋亡细胞检测

采用 TUNEL 法检测标本中凋亡细胞水平，TUNEL 检测试剂盒购自 Roche 公司。检测方法严格按照试剂盒说明进行，DAB 显色。随机选取 6 个部位，计数每个高倍视野下凋亡细胞数及细胞总数，计算细胞凋亡指数，细胞凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 × 100%，取平均值。

1.5 统计学分析

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 组织形态学染色结果

空白组和实验组术后各死亡 1 只，空白组和 F-127 组各有 1 只静脉桥血栓形成，管腔闭塞。其余每只静脉桥均通畅，管壁不同程度增厚，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 染色可见移植于动脉环境下的静脉内膜不均匀增厚，为大量排列不规则的平滑肌细胞及细胞外基质，内皮不完整，有大小不等附壁血栓。中膜平滑肌细胞增生，弹力纤维增多增粗。空白对照组与 F-127 对照组内膜

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(μm)	中膜厚度(μm)	内膜 / 中膜(I/M)
空白对照	6	72.0 ± 9.4	42.1 ± 7.4	1.73 ± 0.16
F-127 对照	7	67.1 ± 7.7	39.9 ± 4.2	1.68 ± 0.11
实验组	7	21.4 ± 6.4*	37.8 ± 3.2	0.56 ± 0.13*

注：与空白对照和 F-127 对照组比较，*$P<0.05$

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

组别	动物数	PCNA	bcl-2	TUNEL(凋亡指数)
空白对照	6	35.2 ± 9.6	33.7 ± 11.2	13.6 ± 5.1
F-127 对照	7	37.8 ± 10.3	30.8 ± 9.5	12.2 ± 6.1
实验组	7	20.4 ± 6.2*	18.2 ± 8.4*	28.4 ± 7.6*

注：与空白对照和 F-127 对照组比较，*$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

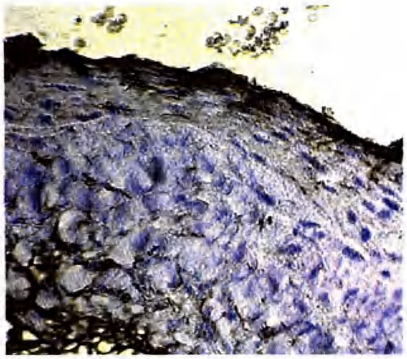


图 1 移植 2 周,实验组 PCNA 蛋白表达减少(SP×400)

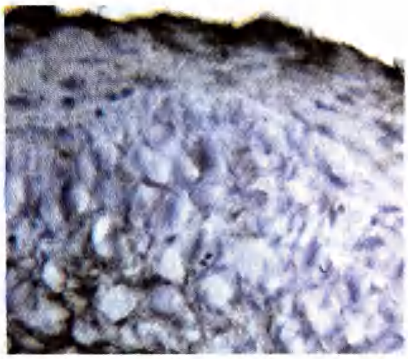


图 2 移植 2 周,实验组 bcl-2 蛋白表达减少(SP×400)

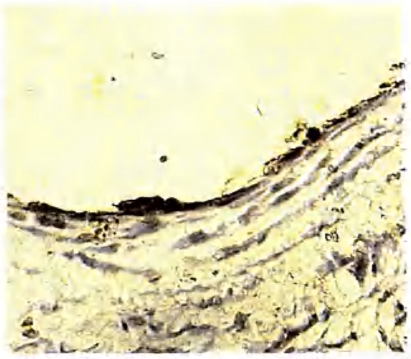


图 3 移植 2 周,实验组凋亡细胞数增多(TUNEL×400)

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)。

2.2 免疫组化及凋亡检测结果

移植后 2 周,实验组 PCNA 和 bcl-2 的表达均较空白组和 F-127 对照组明显减低($P<0.05$)(图 1、2)。TUNEL 阳性细胞数在实验组显著增多($P<0.05$)(图 3、表 2)。

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,确切发生机制目前仍不完全清楚。研究表明,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[3]。

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[4]。它可降低抑凋亡基因 bcl-2 的表达,增加促凋亡基因 bax 的表达,bax/bcl-2 比值提高,从而诱导细胞凋亡。1999 年 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。陶蓉[1]和陆东风[6]都报道了 TL 能阻断体外培养的 VSMC 从 G_0/G_1 期细胞向 S 期转化,药物浓度越高,S 期细胞含量越低,从而抑制其增殖;而李玫等[7]发现 TL 通过促进体外培养的 VSMC 从 G_1 期细胞过多的进入并阻滞于 S 期,使 S 期峰值增高,细胞凋亡率也随之升高。结论的不一致可能与不同实验所采用的浓度不一样有关。TL 诱导 VSMC 凋亡还与促凋亡基因 Fas 的表达明显增高有关[2]。最近有人制成 TL 洗脱支架置入幼猪的冠状动脉,能明显抑制新生内膜的形成[8]。

关于给药途径,人们发现预防用药防治血管再狭窄效果不佳的原因可能是动物实验中口服药物剂量过大,超过临床安全用药上限而受到限制;另一方面,移植血管狭窄是一个缓慢的过程,常用给药方式不能在移植血管局部保持长时间的治疗浓度。药物洗脱支架通过局部给药,克服了上述缺点。有人[9,10]用 F-127 多聚凝胶包裹反义寡核苷酸涂抹于移植静脉外膜,发现内膜增生明显减轻,并且这一作用可持续至术后 2 周。这些研究证实了经外膜途径干预的可行性和 F-127 多聚凝胶作为药物缓释载体的作用。F-127 多聚凝胶的微观结构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,其携带的药物可以在 5d 内缓慢释放出 80%,且 F-127 本身并不影响血管内膜增生[11]。本实验受此启发,将 TL 分散融入液态 F-127 多聚凝胶,喷洒于移植血管的外膜,药物缓释发挥作用。

本研究发现:血管移植后 2 周,PCNA 和抑凋亡基因 bcl-2 表达均增强,细胞增殖过度而凋亡不足,内膜增生明显,而经外膜应用 TL 后,PCNA、bcl-2 的表达均明显减弱,TUNEL 显示凋亡细胞增多,细胞增殖受抑而凋亡增强,内膜增生受到显著抑制。此结果初步证实了经血管外膜局部应用 TL 可通过抑制 VSMC 增殖和促进 VSMC 凋亡而防止内膜过度增生,为减轻血管移植术后再狭窄提供了新的方法。但本实验观察期限仅 2 周,其远期效应有待进一步的实验研究。

参 考 文 献

(下转第 690 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

ADM 48h 后，瘤细胞表达 P-gp、MRP 较转染前明显减弱，偶见部分细胞呈阴性表达。FCM 检测结果显示 SGC7901/ADM 细胞在 ASODN 转染前对 Rhodamine123 具有很强的泵出功能，细胞内潴留量很少；但 ASODN 转染后 48h 瘤细胞内 Rhodamine123 潴留量明显增多，间接反映了瘤细胞对药物的泵出能力下降。

在 MDR1 和 MRP 2 种 ASODN 分别转染 SGC 7901/ADM 细胞 48h 后，阿霉素对瘤细胞的抑制作用明显增强，且 SGC7901/ADM 细胞对卡铂、紫杉醇、5-Fu 等化疗药物的敏感性也有所提高；2 种 ASODN 联合转染后，SGC7901/ADM 细胞对卡铂、紫杉醇等化疗药物的敏感性显著提高；提示联合转染两种 ASODN 后 SGC7901/ADM 细胞内药物的蓄积明显增加，从而发挥更强的细胞毒作用。罗华友等的实验结果也证实联合抑制 MDR1 和 MRP 基因能更有效地逆转肝癌耐药细胞的耐药表型，癌细胞对阿霉素和柔红霉素的敏感性提高了 47.8 和 21.6 倍[12]。

本实验结果证实 MDR1 和 MRPASODN 可抑制其基因的表达，从而降低 P-gp 和 MRP1 蛋白水平，有效逆转了 SGC7901/ADM 细胞的耐药表型，联合转染 2 种 ASODN 较单纯转染明显提高了瘤细胞的耐药逆转效率。肿瘤的耐药与多个耐药基因高表达有关，因此同时抑制多个基因能发挥更大的耐药逆转作用，本实验的结果也充分证实了基因联合治疗的有效性。

参 考 文 献

[1] Chen CJ,Clark D,Ueda K,et al. Genomic organization of the human multidrug resistance (mdr1)gene and origin of P-glycoprotein [J]. J Biol Chem,1990;265(1):506-514.

[2] 张 威,邹寿椿,赵大健,等.多药耐药相关基因在胃癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志,2002;8(2):76-78.

[3] 王延明,王爱民,王文杰,等.胃癌组织中多药耐药相关蛋白基因表达的临床意义[J]. 临床军医杂志,2002;30(4):1-3.

[4] Ramesh S,Shanthi P,Krishnan KB,et al. Multidrug resistance 1 gene expression in Indian patients with gastric carcinoma[J]. Indian J Gastroenterol,2003;22(1):19-21.

[5] 张 燕,金先庆,赵珍珍,等. 5 种耐药基因在成人常见恶性肿瘤中的表达特点[J]. 重庆医科大学学报,2007;32(10):1023-1026.

[6] Alahari SK,Dean HM,Fisher MH,et al. Inhibition of expression of the multidrug resistance associated P-glycoprotein of by phosphorothioate and 5'cholesterol-conjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides[J]. Mol Pharmacol,1996;50(4):808-819.

[7] Stewart AJ,Canitrot Y,Banacchini E,et al. Reduction of expression of the multidrug resistance protein(MRP) in human tumor cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides[J]. Biochem Pharm,1996,51(4):461-469.

[8] 徐志渊,李德锐.肿瘤化疗多药耐药研究新进展[J]. 中国肿瘤,2006;15(6):382-385.

[9] 马 华,梅 峰,马千里,等.RegⅣ在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报,2006;28(5):441-443.

[10] O'Connor R. The pharmacology of cancer resistance[J]. Anticancer Res,2007;27(3A):1267-1272.

[11] Dexter DW,Reddy RK,Geles KG,et al. Quantitative reverse transcript-.tasepolymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma[J]. Clin Cancer Res,1998;4(6):1533-1542.

[12] 罗华友,扬家印,刘自明,等. 多药耐药基因反义寡核苷酸逆转肝癌细胞耐药的研究[J]. 中华肝脏病杂志,2004;12(2):85-87.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 685 页)

[1] 陶 蓉,陆 林,沈卫峰,等. TL 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] 王宇令,刘 源,孙 威,等.自体静脉移植术后血管平滑肌细胞凋亡与增殖的研究[J]. 中国现代医学杂志,2005;15(6):822-824.

[4] 岗艳云,张正行.雷公藤及其单体的药理作用研究进展[J]. 中国药科大学学报,1995;26(4):252-256.

[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.TL 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. TL 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 basic 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 Z,ZouY,Dietrieh H,et al. Inhibition of neointimal hyperplasia of a mouse vein graft by locally applied suramin[J]. Circulation,1999;100(8):861-868.

(责任编辑:冉明会)