基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000844

小白菊内酯对球囊损伤后内膜增殖的影响及其机制

毛　霞，高丽华，邓昌明
（重庆医科大学附属第二医院心血管内科，重庆　400010）

【摘　要】**目的**：探讨小白菊内酯（parthenolide，PN）对球囊损伤后内膜增殖的影响及其可能机制。**方法**：通过球囊损伤联合高脂喂养建立兔髂血管炎症反应及内膜增殖模型，将 30 只兔高脂适应性喂养 1 周后随机分为 6 组：对照组：假手术+0.9%生理盐水（normal saline，NS）（n=5）；假手术+4%二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）（n=5）；模型组：球囊损伤+0.9%NS（n=5）；球囊损伤+ 4%DMSO（n=5）；治疗组（PN 溶解于 4%DMSO）：低剂量：球囊损伤+ PN 1 mg/（kg·d）（n=5）；高剂量：球囊损伤+PN 2 mg/（kg·d）（n=5），假手术组分离结扎股动脉不行球囊损伤，术后立即按分组给药。4 周后检测比较各组血管内膜增殖、核转录因子-κB（nuclear transcription factor-κB，NF-κB）、白介素（interleukin，IL）-6 和肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 的表达。**结果**：模型组与对照组比较，内膜厚度、NF-κB、IL-6 和 TNF-α 明显增加（P<0.05）；治疗组与模型组比较，上述指标在高剂量组显著降低（P<0.05）。**结论**：PN 通过抑制 NF-κB 及其下游炎症因子 IL-6 和 TNF-α 表达来抑制炎症反应，从而抑制内膜增殖。

【关键词】小白菊内酯；球囊损伤；内膜增殖；核转录因子-κB
【中图分类号】R541.4　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-05-12

Effect of parthenolide on intimal hyperplasia after balloon injury and the underlying mechanism

Mao Xia, Gao Lihua, Deng Changming
(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To detect the effect of parthenolide (PN) on intimal hyperplasia and the underlying mechanism. ***Methods***: The inflammatory model of intimal hyperplasia was established by a combination of balloon injury and high-fat diet. After one week of high-fat feeding, 30 rabbits were randomly divided into 6 groups. Control groups: rabbits got 0.9% normal saline (NS, n=5) or 4% DMSO (n=5) after sham operation. Model groups: rabbits got equal volume of 0.9% NS (n=5) or 4% DMSO (n=5) after balloon injury. PN groups (PN dissolved in 4% DMSO): rabbits immediately injected with PN (dissolved in 4%DMSO) at 1 mg/(kg·d) (low) or 2 mg/(kg·d) (high) after balloon injury. Four weeks later, the thicknesses of intima, the expression of nuclear transcription factor-κB (NF-κB), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis

作者介绍：毛　霞，Email：maoxia2013@sina.cn，
研究方向：冠心病诊断与治疗。
通信作者：邓昌明，Email：dy070308@126.com。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2115.032.html（2016-01-09）

modulates human metapneumovirus-induced pulmonary disease in an acute mouse model of infection[J].PLoS One,2012,7(5):e37173.

[12] 李　瑞，周立新.肺泡表面活性物质蛋白 D 与急性肺损伤关系的研究进展[J].医学综述，2012，18(24)：4141-4144.

[13] Mahajan L, Gautam P, Dodagatta-Marri E, et al.Surfactant protein SP-D modulates activity of immune cells: proteomic profiling of its interaction with eosinophilic cells[J].Expert Rev Proteomics,2014,11(3):355-369.

[14] Moran AP, Khamri W, Walker MM, et al.Role of surfactant protein D(SP-D) in innate immunity in the gastric mucosa: evidence of interaction with Helicobacter pylori lipopolysaccharide[J].J Endotoxin Res,2005,11(6):357-362.

[15] Hu F, Liang W, Ren Z, et al.Surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human renal tubular epithelial cells: implication for tubulointerstitial fibrosis[J].Clin Exp Immunol,2012,167(3):514-522.

[16] Yamazoe M, Nishitani C, Takahashi M, et al.Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors[J].J Biol Chem,2008,283(51):35878-35888.

[17] Zhou Y, Wang H, Xing J, et al.Expression levels of surfactant-associated proteins and inflammation cytokines in serum and bronchoalveolar lavage fluid among coal miners: a case-control study[J].J Occup Environ Med,2014,56(5):484-488.

[18] 舒林华，魏克伦，尚云晓，等.肺表面活性蛋白 A，D 在内毒素急性肺损伤时变化的研究[J].中国医科大学学报，2008，37(2)：217-220.

[19] Kati C, Alacam H, Duran L, et al.The effectiveness of the serum surfactant protein D(Sp-D) level to indicate lung injury in pulmonary embolism[J].Clin Lab,2014,60(9):1457-1464.

（责任编辑：冉明会）

factor-α(TNF-α) were detected. ***Results***: Compared with those of control groups, the thickness of intima, the amount of NF-κB, IL-6 and TNF-α in model groups were significantly increased($P<0.05$); compared with those of high dose group, the thickness of intima, the amount of NF-κB, IL-6 and TNF-α in model groups were significantly decreased($P<0.05$). ***Conclusion***: PN suppresses intimal hyperplasia by inhibiting the expressions of NF-κB, IL-6 and TNF-α.

【Key words】parthenolide; balloon injury; intimal hyperplasia; nuclear factor-κB

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病(coronary heart disease, CHD)最重要的病理基础，它是一种慢性炎性反应疾病，是内皮损伤后血管内膜增殖性反应的结果，以血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型改变、迁移以及过度增殖为特征，同时伴有多种炎症细胞浸润和炎症因子的表达[1]。研究表明抑制炎症可达到抑制内膜增殖[2]，从而起到抗 AS 的作用。

小白菊内酯(parthenolide, PN)具有促凋亡、激活氨基末端激酶(jun amino-terminal kinase, JNK)、减少有丝分裂原激酶蛋白(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等作用，因而广泛用于抗肿瘤研究[3-4]。近年来，PN 因其抗炎作用而被用于发热、关节炎、子宫内膜异位的治疗[5-6]。国内外关于 PN 对动脉内膜增殖影响的研究甚少，本实验通过观察 PN 对球囊损伤后内膜增殖的影响，并研究其可能存在的机制，为临床防治 AS 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

PN(纯度 98%，天津士兰科技有限公司)，胆固醇(北京鼎国昌盛科技有限公司)，二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma 公司，美国)，免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司)，核转录因子-κB(nuclear transcription factor, NF-κB)p65 抗体(北京博奥森生物科技有限公司)，白介素(interleukin, IL)-6 抗体(武汉三鹰生物科技有限公司)，肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。3.0 Fogarty 球囊导管及压力泵(美国 Edwards Life science 公司)。

1.2 分组和处理

30 只雄性新西兰大白兔(2.0~2.3 kg)由重庆医科大学实验动物中心提供，实验符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。采用 3.0F 球囊损伤联合高脂饮食(1% 胆固醇，6%猪油，93% 普通饲料)在既往建模基础上进行改良建立兔髂血管炎症反应及内膜增殖模型[7-8]。高脂适应性喂养 1 周后将兔子随机分为 6 组：对照组：假手术+0.9%生理盐水(normal saline, NS)($n=5$)；假手术+4%DMSO($n=5$)；模型组：球囊损伤+0.9%NS($n=5$)；球囊损伤+ 4%DMSO($n=5$)；治疗组(PN 溶解于 4% DMSO 中，腹腔注射)：低剂量：球囊损伤+PN 1 mg/(kg·d)($n=5$)；高剂量：球囊损伤+PN 2 mg/(kg·d)($n=5$)。兔子麻醉后仰卧固定，右侧腹股沟区备皮消毒，钝性分离血管鞘，暴露股动脉，送入球囊导管至髂总动脉，用压力泵注入肝素生理盐水充盈球囊(球囊内压力约0.69 ATM)并回拉导管损伤血管内膜，重复 3 次，每次约 20 s，间歇约 1 min。抽空球囊后退出血管，结扎股动脉，逐层缝合皮肤。假手术只分离并结扎股动脉不行球囊损伤。术后给予兔子普通肝素 100 U/kg 耳缘静脉注射抗凝；青霉素 800 000 U/d，连续 3 d 肌肉注射预防感染，术后立即按分组给予治疗。继续高脂喂养 4 周后，处死兔子并取出建模后的髂血管(一段 4%多聚甲醛固定，一段-80 ℃冰箱储存)与血清(股静脉采血，3 000 r/min 离心 15 min，取上清液)。

1.3 形态学观察

髂血管行石蜡包埋后切片(4 μm)，经 HE 染色后用Olympus 显微镜采图观察(400×)。

1.4 免疫组织化学(IHC)检测

采用 IHC 法检测血管局部 NF-κB 和 IL-6 的表达。4 μm 厚的切片经过脱蜡、水化、抗原修复、目的抗体 4 ℃孵育过夜、DAB 显色、苏木素染核、盐酸酒精分化、碳酸锂复染、脱水、透明、封片处理制成。目的抗体浓度：NF-κB 抗体(1:100)，IL-6 抗体(1:100)。显微镜下采图，每张切片采 5 个视野，用 Image Pro Plus 6.0 软件测量阳性细胞的数量作为上述指标的相对表达量。

1.5 ELISA 检测

按试剂盒说明书操作，ELISA 法检测各组血清中 TNF-α 含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。数据表达为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)，两样本均数比较采用成组 t 检验，多组之间的比较采用单因素方差分析，SNK 检验(方差齐性)和 Kruskal-Wallis 秩和检验(方差不齐性)用于两组之间比较。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 DMSO 对血管内膜增殖影响

为了排除溶剂 DMSO 的影响，首先在对照组和模型组中比较了 DMSO 对内-中膜厚度的作用。结果显示：不管是在对照组还是模型组中，DMSO 对内-中膜厚度都没有影响($P>0.05$)，见表 1。对照组(假手术+4%DMSO，$n=5$)与模型组(球囊损伤+4%DMSO，$n=5$)将用于后续实验比较。

表 1 DMSO 对血管内－中膜的作用（$\bar{x} \pm s$）

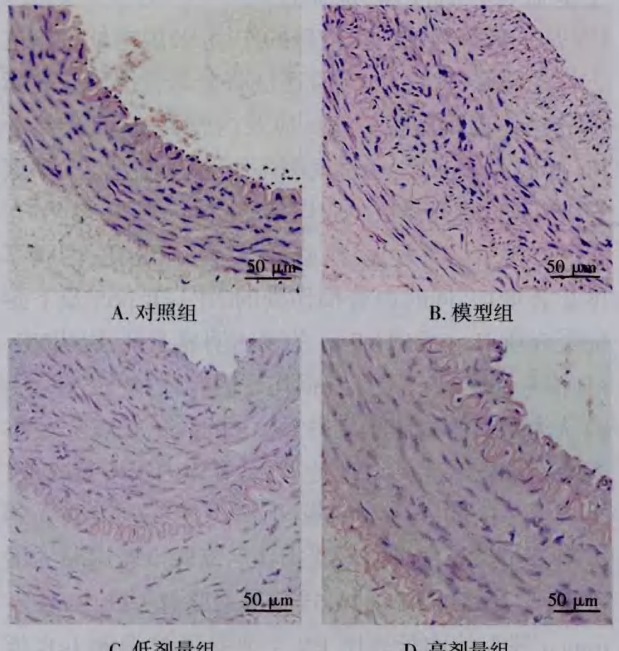
Tab.1 Effect of DMSO on intima-media thickness（$\bar{x} \pm s$）

	组别	n	IT(μm)	MT(μm)	I/M
对照组	假手术 +0.9%NS	5	-	106.13 ± 6.55	-
	假手术 +4%DMSO	5	-	98.13 ± 4.63	-
模型组	球囊损伤 +0.9%NS	5	148.94 ± 15.47	107.98 ± 5.89	1.40 ± 0.17
	球囊损伤 +4%DMSO	5	144.02 ± 10.34	111.57 ± 10.37	1.30 ± 0.14
F 值			1.095	2.231	0.861
P 值			0.571	0.520	0.335

注：IT：内膜厚度；MT：中膜厚度；I/M：内膜中膜厚度比值

2.2 PN 抑制新生内膜增殖

通过测量髂血管内-中膜厚度评估 PN 对建模后新生内膜的作用。HE 染色后观察：对照组中，内弹力膜完整光滑，无内膜增殖，中膜平滑肌排列整齐；模型组内弹性膜断裂，内膜增殖明显（P=0.000），中膜平滑肌层排列紊乱；治疗组内膜增殖程度较模型组有所改善，仅在高剂量组中差异具有统计学意义（P=0.000）。此外，PN 在抑制内膜增殖同时，对血管中膜并无影响（低、高剂量组与模型组比较，P=0.636、0.246）。见图 1 和表 2。



A. 对照组　B. 模型组

C. 低剂量组　D. 高剂量组

图 1 各组兔髂血管组织形态学变化（HE 染色，400×）

Fig.1 Pathological changes in rabbits of each group（HE staining，400×）

2.3 PN 抑制局部 NF-κB 和 IL-6 的表达

为了探索 PN 抑制新生内膜增殖的机制，采用 IHC 染色检测血管局部 NF-κB 和 IL-6 的表达。结果显示：对照组中膜内仅有少量阳性细胞（NF-κB：细胞核中出现棕黄色颗粒；IL-6：胞浆中出现棕黄色颗粒）表达；模型组中，阳性细胞数量主要在增殖的内膜和受损的中膜中表达，且表达量明显较对照组增加（NF=κB、IL-6 的 P 值均<0.05）；治疗组阳性细胞数较模型组有不同程度减少：NF-κB 在低剂量组和高剂量组中显著减少（P 值均<0.05）；IL-6 仅在高剂量组中的减少具有统计学意义（P<0.05）。见图 2 和表 3。

表 2 PN 对内膜增殖的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Effect of PN on intimal hyperplasia（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IT(μm)	MT(μm)	I/M
对照组	5	-	98.13 ± 4.63	-
模型组	5	144.02 ± 10.34	111.57 ± 10.37	1.30 ± 0.14
低剂量组	5	139.89 ± 10.83	109.64 ± 4.75	1.27 ± 0.10
高剂量组	5	48.39 ± 16.67[a]	107.27 ± 7.42	0.44 ± 0.13[a]
F 值		199.746	2.843	174.210
P 值		0.000	0.071	0.001

注：IT：内膜厚度；MT：中膜厚度；I/M：内膜中膜厚度比值；a，与模型组比较，P<0.05

表 3 PN 对各组 NF-κB 和 IL-6 表达的影响（$\bar{x} \pm s$）

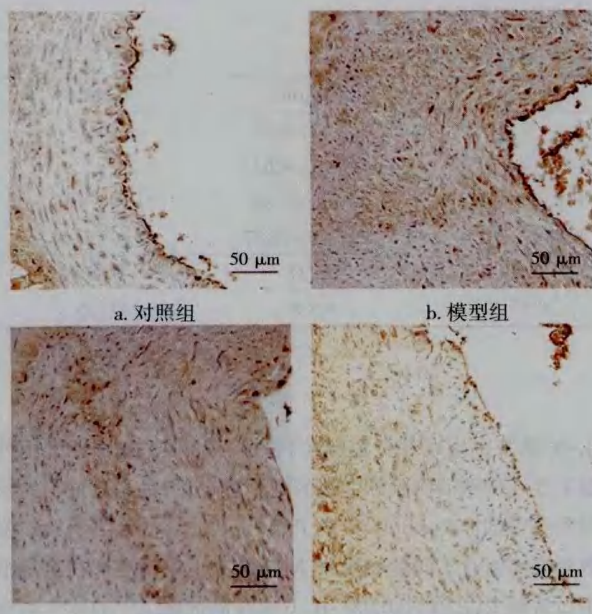
Tab.3 Effect of PN on the expression of NF-κB and IL-6（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	NF-κB	IL-6
对照组	5	16.00 ± 4.12	10.20 ± 3.03
模型组	5	71.20 ± 10.18[a]	41.20 ± 9.91[a]
低剂量组	5	26.00 ± 5.15[b]	35.40 ± 5.94
高剂量组	5	27.60 ± 3.78[b]	20.20 ± 3.03[b]
F 值		74.594	26.352
P 值		0.000	0.000

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与模型组比较，P<0.05

2.4 PN 抑制血清中 TNF-α 的表达

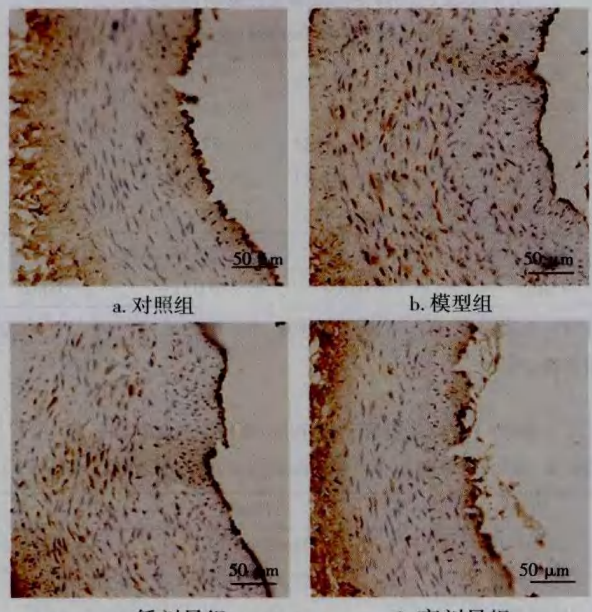
为了探讨 PN 对炎症反应的影响，还检测了血清中TNF-α 的含量。与对照组[(88.40 ± 4.06) pg/ml 相比，模型组[(185.67 ± 16.21) pg/ml]血清 TNF-α 含量明显增加（P<0.05）。治疗组与模型组相比，仅高剂量组[118.09 ± 13.64) pg/ml]明显降低（P<0.05）；低剂量组 TNF-α 的表达量[(186.82 ± 48.10) pg/ml]差异没有统计学意义（P>0.05）。



a. 对照组　　b. 模型组

c. 低剂量组　　d. 高剂量组

A. NF-κB 的表达



a. 对照组　　b. 模型组

c. 低剂量组　　d. 高剂量组

B. IL-6 的表达

图 2　各组血管组织 NF-κB 和 IL-6 表达（IHC 染色，400×）

Fig.2　Expression of NF-κB and IL-6 in different groups (IHC staining, 400×)

3　讨　论

AS的病理过程与血管壁炎性增殖反应密切相关，炎症贯穿于 AS 发生发展的整个过程[9]。内膜损伤是 AS 的始动环节，多种因素作用下可致内膜损伤，随后多种炎症细胞浸润并分泌大量促炎因子，导致 VSMC 增殖并向内膜迁移，血管内膜增厚，管腔狭窄。研究表明抑制炎症可起到改善内膜增殖的作用[7]。

NF-κB 是由 p50、p52、p65、c-Rel 和 RelB 亚单位组成的分子家族。它作为重要的核转录因子，在炎症反应中占据重要地位：可通过抑制凋亡和延长炎症细胞寿命来促进炎症发展[10]；调控促炎因子的表达；NF-κB 还可以被多种促炎因子所激活，进一步扩大炎症反应级连。正常情况下，NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 结合以未激活形式存在于胞浆中，当受到刺激（如内膜受损）后，IκB 发生磷酸化降解，NF-κB 以游离态进入细胞核与 DNA 结合，激活基因的转录和表达。研究显示，NF-κB p65 参与了血管增殖性疾病的发生和发展[11]，抑制其激活能有效抑制损伤后的新生内膜增殖[2]，可达到治疗 AS 的目的。

PN 属于艾叶菊属的提取物，具有抗肿瘤、抗血小板聚集等特性。近年来，PN 因其抗炎作用而被用于缺血性心肌损伤、缺血性脑卒中[12]等实验研究。PN 是否具有抑制内膜增殖的作用呢？国内外关于这方面的研究甚少。本实验通过联合球囊损伤和高脂喂养构建兔髂血管炎症反应及内膜增殖模型，给予 PN 腹腔注射治疗，通过观测各组内膜增殖情况来探讨 PN 对球囊损伤后内膜增殖的影响，并研究其潜在机制。实验结果发现，模型组与对照组相比，内膜厚度显著增加，同时血管损伤处的 NF-κB p65 及下游促炎介质 IL-6 和 TNF-α 的表达明显上升，说明NF-κB 信号通路参与了球囊损伤后内膜增殖[13]。NF-κB 被认为是血管内膜增殖导致 AS 的防治靶点[14-15]，本实验结果显示，给予 PN 处理后，血管内膜增殖改善，NF-κB p65 的表达量下降，下游炎症反应级联受到抑制，表明 PN 能抑制球囊损伤后动脉血管内膜的增殖，且与其抑制 NF-κB p65 信号通路有关[16]。Lopez-franco 等人的实验表明 PN 主要是通过抑制 IκB 蛋白磷酸化降解来抑制 NF-κB 的激活[12]，从而发挥抗炎作用。此外翁少翔等研究结果显示 PN 还可以通过上调细胞周期相关蛋白 p21 和 p27 来抑制 VSMC 的增殖[17]。

本实验结果还显示，PN 对内膜增殖的抑制作用呈现剂量依赖性。与模型组相比，仅在高剂量组（2 mg/kg）中 PN 对内膜增殖的抑制作用具有统计学

差异，NF-κB、IL-6 和 TNF-α 的表达量明显减少，在低剂量组（1 mg/kg）中并未发现相似结果，这与朱晓芳等研究结果一致[18]。

综上所述，PN 抑制球囊损伤后动脉血管的新生内膜增殖，且抑制程度呈剂量依赖性，其与抑制 NF-κB 炎症信号通路的激活、下调促炎症因子的表达有关。AS 发生发展中的内膜增殖是复杂的炎症反应过程，抑制内膜增殖的机理也往往是多环节多靶点的，因此，关于 PN 抑制内膜增殖机制的研究仍需进一步深入。

参 考 文 献

[1] 赵然尊，龙先萍，刘志江，等.降钙素基因相关肽抑制动脉损伤后 NF-κB 表达及其对新生内膜增殖的作用[J].第三军医大学学报，2014，36(14)：1472-1476.

[2] Li YJ，Chen Y，You Y，et al.Effects of shenlian extracts on atherosclerosis by inhibition of the inflammatory response[J].J Tradit Chin Med，2011，31(4)：344-348.

[3] Parada-Turska J，Paduch R，Majdan M，et al.Antiproliferative activity of parthenolide against three human Cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells[J].Pharmacol Rep，2007，59(2)：233-237.

[4] 王秀英，冷水龙.小白菊内酯增强肝癌 HepG2 细胞对顺铂敏感性的实验研究[J].实用医学杂志，2011，27(2)：177-180.

[5] Li X，Su J，Cui X，et al.Can we predict the effects of NF-kappaB inhibition in sepsis? Studies with parthenolide and ethyl pyruvate[J].Expert Opin Investig Drugs，2009，18(8)：1047-1060.

[6] Takai E，Taniguchi F，Nakamura K，et al.Parthenolide reduces cell proliferation and prostaglandin E2 [corrected] in human endometriotic stromal cells and inhibits development of endometriosis in the murine model[J].Fertil Steril，2013，100(4)：1170-1178.

[7] 郭蓓蓓，黄 晶，朱 蕊，等.探讨白介素 18 结合蛋白对球囊损伤后内膜增殖的影响及其机制[J].重庆医科大学学报，2011，36(12)：1427-1431.

[8] 熊龙根，黎德恩，董 颀.环孢菌素 A 对大鼠腹主动脉球囊损伤后内膜增生的抑制作用[J].中国病理生理杂志，2011，27(9)：1687-1691.

[9] Libby P，Ridker PM，Hansson GK.Inflammation in atherosclerosis：from pathophysiology to practice[J].J Am Coll Cardiol，2009，54(23)：2129-2138.

[10] Hayden MS，West AP，Ghosh S.NF-kappaB and the immune response[J].Oncogene，2006，25(51)：6758-6780.

[11] Davies PF，Civelek M，Fang Y，et al.The atherosusceptible endothelium：endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo[J].Cardiovasc Res，2013，99(2)：315-327.

[12] Lopez-franco O，Suzuki Y，Sanjuan G，et al.Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis[J].Am J Pathol，2002，161(4)：1497-1505.

[13] Dong L，Qiao H，Zhang X，et al.Parthenolide is neuroprotective in rat experimental stroke model：downregulating NF-κB，phospho-p38 MAPK，and caspase-1 and ameliorating BBB permeability[J].Mediators Inflamm，2013，2013:370804.doi.10.1155/2013/370804.Epub 2013 July 11.

[14] Grassia G，Maddaluno M，Musilli C，et al.The I {kappa}B kinase inhibitor nuclear factor-{kappa}B essential modulator-binding domain peptide for inhibition of injury-induced neointimal formation[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol，2010，30(12)：2458-2466.

[15] Ohtani K，Egashira K，Nakano K，et al.Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits[J].Circulation，2006，114(25)：2773-2779.

[16] Lopez-Franco O，Hernandez-Vargas P，Ortiz-Munoz G，et al.Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol，2006，26(8)：1864-1870.

[17] 翁少翔，单 江，徐 耕，等.小白菊内酯抑制胎牛血清诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及信号转导机理[J].中国药理学与毒理学杂志，2002，16(5)：331-335.

[18] 朱晓芳，周润华，石宇红，等.小白菊内酯对兔膝关节炎血清 IL-1β 及 TNF-α 影响[J].中国中西医结合杂志，2013，33(10)：1382-1384.

（责任编辑：冉明会）