

论著·实验研究

心脑血管宁减少家兔易损斑块模型 斑块内血肿、稳定斑块的研究*

姜希娟, 马东明, 卢斌, 杨琳, 宋石林, 范英昌

摘要 [目的] 探讨心脑血管宁对家兔动脉粥样硬化易损斑块模型斑块内血肿、斑块内新生血管成熟的影响。[方法] 通过喂养高脂饲料和主动脉球囊内皮拉伤术复制动脉粥样硬化易损斑块模型, 实验分为模型组、假手术组、心脑血管宁组, 历时15周。处死后, 取腹主动脉行苏木精—伊红(HE)染色, 观察新生血管结构, 计数斑块出血数, 免疫组化方法检测血小板源性生长因子受体的表达。[结果] 1) HE观察: 模型组有6只家兔的12斑块发生血肿, 而心脑血管宁组有3只家兔的3斑块发生血肿。模型组新生血管周围缺乏周细胞包裹, 而心脑血管宁干预后, 新生血管周围的周细胞明显增多。2) 免疫组化结果: 心脑血管宁可上调血小板源性生长因子受体(PDGFR)蛋白增加, 与模型组相比差异有显著性 $P < 0.01$ 。[结论] 心脑血管宁干预家兔动脉粥样硬化易损斑块模型, 能减少斑块内血肿, 促斑块内新生血管成熟, 其机制可能与上调PDGFR的表达, 募集周细胞有关。

关键词 心脑血管宁; 易损斑块; 新生血管; 血小板源性生长因子受体; 周细胞

中图分类号: R563.8 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2011)01-0027-03

斑块内血管新生是粥样斑块进程中的重要伴随现象, 斑块不稳定与斑块内新生血管数量增加有关, 研究显示抑制斑块内血管新生可以稳定斑块^[1]。2007年Dunmore BJ等^[2]将不同类型斑块对比分析后发现, 斑块不稳定与斑块内新生血管结构不成熟同样密切相关。促进斑块内新生血管成熟, 降低其通透性和脆性为稳定斑块提供了一个新视角。

天津市中医药研究院附属医院制剂心脑血管宁[批准文号: 津药制字(2001)Z第0346号]为益气活血方药, 临床应用防治动脉粥样硬化导致的缺血性疾病, 近年来取得效果良好^[3]。笔者前期研究表明心脑血管宁具有稳定斑块的作用, 然而, 其作用机制与减少斑块内血肿, 改善血管结构是否相关尚不得知。因此, 本研究将从诱导斑块内新生血管成熟, 改善新生血管结构入手, 阐明心脑血管宁稳定斑块的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物及饲料

日本纯系大耳白家兔40只, *

基金项目: 天津市卫生局中西医结合专项基金资助项目

(023611611)。

作者单位: 300193 天津中医药大学
作者简介: 姜希娟(1972-), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病。

通讯作者: 范英昌。

雄性, 体质量(1.7~2.0 kg), 北京科宇动物养殖中心提供。单笼饲养, 自由饮水。

高脂饲料组成: 胆固醇2%(天津市英博生化试剂有限公司批号: 060619, 含量>98%)、新远牌大豆色拉油10%(秦皇岛金海食品有限公司), 普通饲料88%(天津市武清区科达养殖中心提供)。

1.2 药物 心脑血管宁由天津市中医药研究院附属医院提供[批准文号: 津药制字(2001)Z第0346号], 组成: 黄芪、当归、川芎、赤芍等。蝮蛇毒(广州蛇毒研究所), 组胺(Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs)。

1.3 实验动物分组及造模 40只家兔适应性饲养1周, 测定血脂和体质量, 依据血脂和体质量分为假手术组10只, 模型组15只, 心脑血管宁组15只。假手术组饲以普通饲料, 其余两组每天每只给予含1g胆固醇的高脂饲料, 剩余普通饲料补足。2周后, 行主动脉球囊内皮拉伤术: 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉注射麻醉, 在无菌条件下, 于兔股动脉搏动最明显处皮肤消毒, 铺无菌洞巾, 切开皮肤, 分离组织, 暴露股动脉, 结扎远心端, 近心端备用, 动脉夹夹住近心端股动脉, 靠近远心端结扎处作一动脉切口并导入4F无菌球囊导管, 放开动脉夹并收紧下方细线, 局部压迫止血, 将球囊导管插入15 cm左右, 球囊用注射器推注10~15 mL空气, 往返回拉球

囊3次损伤血管内皮,撤出导管和导丝,结扎股动脉并缝合伤口,术后10万U/kg青霉素肌注预防感染,连续7d。术后继续饲以高脂饲料,普通饲料补足。假手术组仅分离组织,暴露股动脉,不作动脉切口,直接缝合皮肤。药物触发,于处死动物前24h和48h给予两次药物触发,药物触发的方法:以蝮蛇毒0.15mg/kg腹膜下注射,30min后耳缘静脉注射组胺0.02mg/kg。指标检测时,每组选取动物样本数为8只。

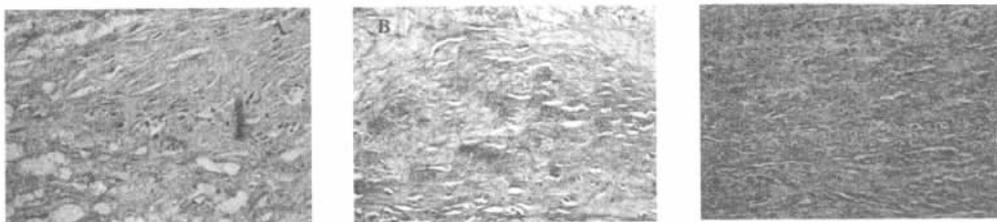
1.4 指标检测

1.4.1 形态学观察斑块内血肿发生情况和新生血管结构变化 每只动物主动脉选取4个斑块,福尔马林固定后,连续切片,行常规苏木精—伊红(HE)染色,观察斑块内出血情况,进而观察斑块内新生血管的结构,是否有周细胞或平滑肌细胞包被。

1.4.2 免疫组化染色斑块内血管周围血小板源性生长因子受体(PDGFR)的表达 切片贴附于经3-氨丙基-3-乙氧基甲硅烷(APES)处理的载波片上,应用免疫组织化学方法,染色,一抗为大鼠来源的抗-PDGFR抗体,二氨基联苯氨(DAB)显色,每张切片于×400倍光镜下随机选取5个互不重叠视野,应用Image-Pro Plus 6.0专业图像分析系统进行图像分析,测定每个视野的积分光密度值,取其平均值作为每张切片的结果。积分光密度数值大小反映了应用免疫组化方法所检测的蛋白表达量的多少。

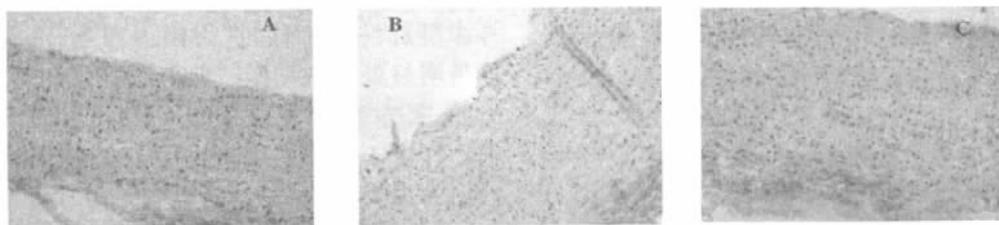
2 结果

2.1 斑块内血肿发生情况和斑块内新生血管的形



A,假手术组;B,模型组;C,心脑血管宁组

图1 HE染色显示斑块内血管形态(400×)



A,假手术组;B,模型组;C,心脑血管宁组

图2 免疫组化法观察各组PDGFR的表达

态学观察 模型组有6只家兔的12斑块发生血肿,而心脑血管宁组有3只家兔的3斑块发生血肿,提示心脑血管宁有增加易损斑块稳定性的作用。通过对斑块内新生血管的结构观察发现:模型组新生血管内皮细胞周围缺乏壁细胞包绕,而心脑血管宁干预后,新生血管周围的壁细胞明显增多,提示心脑血管宁有改善新生血管结构,促新生血管成熟的作用(见图1)。

2.2 免疫组化法观察 PDGFR 是募集周细胞,稳定成熟血管的关键受体。 研究结果显示,模型组斑块内PDGFR表达低于假手术组,心脑血管宁干预后可以上调PDGFR蛋白增加,与模型组相比差异有显著性, $P < 0.01$ (见图2表1)。

表1 心脑血管宁对易损斑块模型家兔主动脉PDGFR表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PDGFR 光密度值(IOD)
假手术组	8	7 484.13±1 115.37*
模型组	8	3 864.56± 821.14
心脑血管宁组	8	10 395.76±2 003.92*

注:模型组与假手术组比较,心脑血管宁组与模型组比较 * $P < 0.01$ 。

3 讨论

2003年R Cao等^[4]试图利用不同因子单一或者组合应用,显示碱性成纤维生长因子(bFGF/FGF-2)和血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)具有良好的协同作用,可以有效募集周细胞,促使稳定新生血管,新生血管210d仍然健在,其稳定血管的效果优

于单纯血小板源生长因子(PDGF)的应用。2007年 Lars Johan Nissen 等^[5]解释了两者的协同作用的机制:缺乏 bFGF 时,内皮细胞对 PDGF-BB 无反应性;只有被 bFGF 激活后,内皮细胞才会表达 PDGF 受体,PDGF-BB 通过与其内皮细胞的 PDGF 受体结合后最终实现募集周细胞、稳定血管的作用。因此,上调 PDGF 受体的表达可以促进周细胞的表达。

中医学认为气虚、血瘀是导致动脉粥样硬化(AS)形成斑块内病理性新生血管的主要病机,正气内虚,气行不畅,而气为血帅,气行则血行,气虚则血瘀。故在以补气为根本法则的基础上,兼用活血方药可以有效阻断AS的病机演变。针对该病气虚血瘀的基本病机,根据多年临床实践和结合现代研究进展,天津市中医药研究院附属医院研制出具有益气活血功效的中药复方心脑血管宁,由黄芪、当归、川芎和赤芍组成。该方用于防治AS所致的缺血性疾病,近年临床实践取得良好疗效^[6]。方中重用黄芪,黄芪乃补气之圣药,气壮则血畅行。

本研究显示该方药可以有效减少斑块内血肿的发病率,完善新生血管结构,其作用与促进PDGF受体表达有关,提示心脑血管宁稳定新生血管的作

用与募集周细胞有关,然而其深入机制尚待进一步阐明。

参考文献:

- [1] 袁卓,张军平.血管新生与冠状动脉粥样硬化性疾病[J].辽宁中医杂志,2009,36(10):1679-1681.
- [2] BJ Dunmore, MJ McCarthy, AR Naylor, et al. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques[J]. J Vasc Surg, 2007, 45(1): 155-159.
- [3] 段宝贵,张曾馨.心脑血管宁治疗脑梗塞40例[J].陕西中医,2010,31(3):326-326.
- [4] R Cao, E Brakenhielm, R Pawliuk, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2 [J]. Nature Medicine, 2003, 9 (5):604-613.
- [5] LJ Nissen, R Cao, EM Hedlund, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis[J]. J Clin Invest, 2007, 117 (10): 2766-2777.
- [6] 郭茂娟,马东明,卢斌,等.心脑血管宁对家兔动脉粥样硬化易损斑块模型 MMP-2, TIMP-2 表达的影响[J].天津中医药,2010,27(2):150-153.

(收稿日期 2011-01-11)

Effect of Xinnao Xuemaining on reducing plaque hematoma and stable plaques of vulnerable plaque in rabbits with atherosclerosis

JIANG Xi-juan, MA Dong-ming, LU Bin, et al

(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: **[Objective]** To observe the effects of Xinnao Xuemaining on reducing plaque hematoma and the expression of PDGFR of vulnerable plaque in rabbits with atherosclerosis. **[Methods]** The vulnerable atherosclerotic plaque model was reproduced by operation on abdominal aorta endothelium for inducing sacculus pull injury with the foraging with high cholesterol lipid feeding. Rabbits were divided into three groups: model group, sham operation group and Xinnao Xuemaining group. The experiment lasted for 15 weeks. After killing at the end of experiment, the sample of abdominal aorta was collected for HE staining and microscopic lesion examination, counting of the number of plaque hematoma and detecting the protein content of PDGFR by immunohistochemistry. **[Results]** HE observation was found 6 rabbits of the 12 plaque hematoma in model group, and three rabbits, three plaque hematoma in Xinnao Xuemaining group. The new blood vessels lacked pericytes surrounded, and after the intervention of Xinnao Xuemaining, pericytes surrounded the new blood vessels increased. The results of immunohistochemical staining showed that the expression of platelet derived growth factor receptor in Xinnao Xuemaining group enhanced significantly compared with model group ($P < 0.01$). **[Conclusion]** Xinnao Xuemaining can reduce plaque hematoma of vulnerable plaque in rabbits with atherosclerosis and promote plaque neovascularization mature, whose mechanism may be related to increased expression of PDGFR and raised on pericytes.

Key words: Xinnao Xuemaining; vulnerable plaque; neovascularization; platelet derived growth factor receptor; pericytes