

西洛他唑对大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生及氧化应激的影响

苏华科¹ 宋耀明^{2△} 郭文昀² 李文军¹ 刘启亮²

(1 解放军第 253 医院心内科 内蒙古 呼和浩特 010051 2 第三军医大学新桥医院 全军心血管病研究所 重庆 400037)

摘要 目的 探讨西洛他唑对大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生的抑制作用和血管壁氧化应激的影响。方法 SD 大鼠 24 只 随机分组 假手术组、损伤组及西洛他唑治疗组。采用球囊损伤大鼠左侧颈总动脉,于术后 2 周处死大鼠 取损伤血管标本 进行 HE 染色、免疫组化染色及原位 DHE 染色 检测内膜增生、平滑肌细胞增殖及血管壁局部 ROS 水平。结果 球囊损伤 2 周后 血管壁内膜显著增生 西洛他唑治疗后内膜增生显著抑制 两组相比 $P<0.05$ 。PCNA 免疫组化染色 假手术组未见 PCNA 阳性细胞 损伤组 PCNA 阳性细胞面积百分比明显高于西洛他唑组 主要分布于新生内膜和内弹力膜区域($P<0.05$)。原位 DHE 染色 球囊损伤后局部 ROS 水平显著升高 较假手术组差异显著 $P<0.05$ 西洛他唑干预后局部 ROS 水平显著降低($P<0.05$)。结论 新型抗血小板制剂西洛他唑可显著抑制大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生及局部氧化应激 抑制局部氧化应激可能是西洛他唑抑制内膜增生的机制之一。

关键词 氧化应激 西洛他唑 球囊损伤 再狭窄

中图分类号: Q95-3 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)02-247-03

Effects of Cilostazol on Oxidative Stress and Neointimal Hyperplasia after Balloon Injury in Rat Model

SU Hua-ke¹, SONG Yao-ming^{2△}, GUO Wen-yun², LI Wen-jun¹, LIU Qi-liang²

(1 The 253 Hospital of PLA, Hohhot, 010051, China; 2 Institute of Cardiovascular Disease of People's Liberation Army, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of cilostazol on oxidative stress and neointimal hyperplasia after balloon injury in rat model. **Methods:** Twenty-four male SPF SD rats were randomly divided into three groups: sham-operation group, injury group and cilostazol group($n=8$). Except sham-operation group, all Left common carotid artery of rats were injured by a balloon catheter. 14days later, the injured carotids were sliced, HE and immunohistochemistry stained. The level of reactive oxygen species (ROS) was examined by Dihydroethidium (DHE). Ratios of intima/media area, PCNA positive indexes and the level of ROS were compared. **Results:** The ratios of intima/media area, PCNA positive indexes and the level of ROS in injury group were significantly higher than that in sham-operation group ($P<0.05$). Cilostazol can significantly decrease the ratios of intima/media area, PCNA positive indexes and the level of ROS($P<0.05$). **Conclusion:** Cilostazol reduces neointimal hyperplasia by inhibition superoxide production after balloon common arterial injury in a rat model.

Key words: Oxidative stress; Cilostazol; Balloon injury; Restenosis

Chinese Library Classification: Q95-3, R322.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-247-03

前言

西洛他唑是一种新型血小板抑制剂,临床试验证实西洛他唑在防治经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后再狭窄(restenosis, RS)方面疗效显著^[1],但具体机制目前尚未完全明确。研究表明球囊损伤后局部氧化应激增加是促进 PCI 术后的重要因素之一^[2,3]。本实验通过建立大鼠颈总动脉球囊损伤动物模型,观察西洛他唑对球囊损伤后内膜增生及局部活性氧族(reactive oxygen species, ROS)水平的影响,探讨西洛他唑防治再狭窄的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及器材 西洛他唑片(商品名赛活灵 重庆华森制药有限公司 批号 061201090) Dihydroethidium (DHE 超氧化物阴离子荧光探针)(s0063 碧云天生物技术研究所) 免疫组化 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、兔抗山羊二抗(武汉博士德公司) PCNA 抗体(美国 Santa) Fogarty 球囊导管(直径 0.66mm(2F) 美国 Baxter 公司)。

1.1.2 动物及分组 清洁级雄性 SD 大鼠 24 只,体重在 300g~350g 之间,由第三军医大学实验动物中心提供。动物生产许可证号 SCXK (J)2002-007; 动物使用许可证号 SYXK (J) 2002-029。24 只大鼠随机分成三组:假手术组(A 组 $n=8$)、损伤组(B 组 $n=8$)、西洛他唑组(C 组 $n=8$)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠颈总动脉球囊损伤模型建立 损伤组及西洛他唑组

作者简介 苏华科(1977-)男,医学硕士,主治医师,主要从事冠心病基础与临床方面研究, Email:shkyisheng@163.com

△通讯作者:宋耀明, E-mail sym553142002@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-05-22 接受日期 2011-06-18)

大鼠照参考文献建立球囊损伤模型^[4]。主要步骤简述如下：2%戊巴比妥腹腔麻醉，将大鼠固定、消毒。切开皮肤暴露并钝性分离颈总动脉、颈内外动脉。结扎颈外动脉远心端，动脉夹阻断颈总动脉远心端及颈内动脉血流。颈外动脉结扎处近心端做一横切口，将2.0F球囊导管插入颈总动脉，扩张球囊，来回抽送3次，使球囊恢复原状后撤出导管。结扎动脉切口近心端，恢复左侧颈总动脉血流，逐层缝合。术后腹腔注射庆大霉素4万单位。假手术组不做左侧颈总动脉球囊损伤，其他同球囊损伤组。

1.2.2 给药方法及标本采集 西洛他唑组于术前1周开始给予20mg/(d.kg)西洛他唑灌胃至术后两周。假手术组及损伤组给予药物溶剂做对照灌胃。各组大鼠于术后2周麻醉，取左侧颈总动脉，做冰冻切片，切片于-70℃冰箱保存备用。

1.2.3 血管壁组织形态学观察 每个标本随机取3张切片行HE染色，光学显微镜下观察内膜增生情况，用计算机图像分析系统检测内膜面积、中膜面积并计算其比值(IA/MA)。

1.2.4 PCNA免疫组化染色观察及计算PCNA阳性细胞指数 PCNA免疫组化方法，严格按试剂盒说明书进行。染色后细胞核呈现棕褐色或深黄色为PCNA阳性细胞。PCNA阳性细胞指数：每个标本取5个不同的视野计算内膜和中膜PCNA阳性细胞数与总细胞数比值的平均数，结果以%表示。

1.2.5 DHE检测血管壁局部ROS生成 DHE是一种最常用的超氧化物阴离子荧光检测探针，DHE被细胞摄取后，可在细胞

内的超氧化物阴离子的作用下脱氢，产生 ethidium，ethidium(例如溴化乙锭)可以和RNA或DNA结合产生红色荧光。局部ROS水平越高，产生 ethidium 就越多，红色荧光就越强，反之则越弱。检测方法：新鲜未固定标本做冰冻切片，切片厚6μm。PBS清洗2次后滴加10μM DHE，于暗箱内室温孵育40分钟后取出，于荧光显微镜下，535nm作为激发波长摄像。红色荧光强弱反应血管壁局部ROS水平高低。

1.3 统计学分析

统计学分析采用SPSS13.0统计软件进行。计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组间比较用t检验；多组间进行单因素方差分析，组间比较用Turkey's，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组颈动脉光镜检查结果

假手术组大鼠颈总动脉内膜可见单层内皮细胞，动脉弹力层结构清楚(图1A)。模型组及西洛他唑组，损伤的动脉内膜呈均一或不均一增厚，管腔呈向心性或偏心性狭窄，内膜平滑肌细胞增生，细胞间质大量堆积，内弹力板不同程度破坏、断裂，中膜与内膜增生的SMC在断裂处链接，中膜可见损伤、可有增厚(图1B、C)。

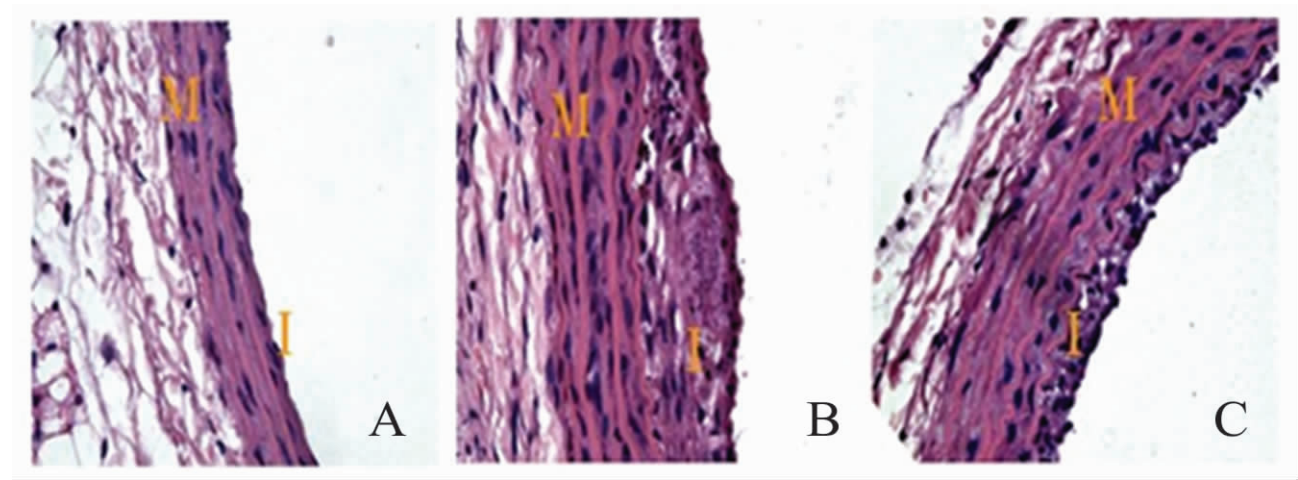


图1 各组颈总动脉血管壁内膜增生 HE 染色 × 400 A. 假手术组 B. 损伤组 C. 西洛他唑组 M. 中膜 I. 内膜
Fig.1 Neointima hyperplasia of carotid artery in differet groups(HE staining, × 400) A. sham-operation group;B. injury group;C. cilostazol group;M. medial,I.inimal

2.2 各组颈动脉内膜和中膜的面积比(IA/MA)和PCNA阳性细胞数

从表1看，IA/MA三组观察结果不同，损伤组与假手术组

比较差异显著(P<0.05)，西洛他唑组与损伤素比较亦存在显著差异(P<0.05)。PCNA阳性细胞指数与I/M有相似的结果，损伤组与假手术组、西洛他唑组之间差异显著(P<0.05)。

表1 各组术后14天颈动脉IA/MA比和PCNA阳性细胞指数($\bar{x} \pm s$)
Table 1 IA/AM、PCNA index in different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	IA/MA	PCNA index(%)
Sham-operation group	0.110± 0.012	0± 0
Injury group	1.120± 0.219*	8.01± 1.90*
Cilostazol group	0.580± 0.146**	4.08± 1.06**

Note: *P<0.05, compared with sham-operation group; ** P<0.05 , compared with injury group

2.3 各组血管壁局部 ROS 水平

如图 2 所示, DHE 荧光染色显示, 红色荧光强弱反应局部 ROS 水平。假手术组仅见微弱的红色荧光, 而球囊损伤组红色

荧光显著增强, 主要集中在新生内膜区; 西洛他唑组新生内膜区红色荧光较损伤组显著减弱。

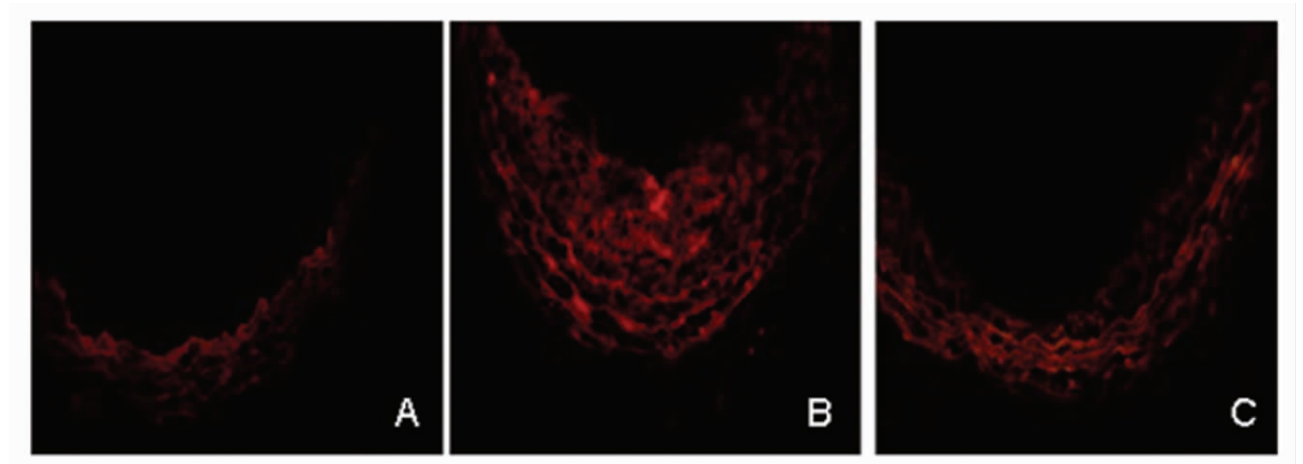


图 2 各组颈总动脉血管壁局部 ROS 水平内层增生 DHE 荧光 X400 :A. 假手术组 B. 损伤组 C. 西洛他唑组

Fig.2 The level of ROS in neointima hyperplasia of carotid artery in differet groups s(DHE staining, $\times 400$) A. sham-operation group; B. injury group; C. cilostazol group

3 讨论

PCI 术后再狭窄形成过程是一个复杂的病理生理过程, 涉及众多的因素, 其中局部 ROS 生成增加是重要因素。平滑肌细胞的增殖及细胞外基质沉积是再狭窄形成的病理基础, 而 ROS 是促及平滑肌细胞增殖、迁移及细胞外基质沉积的重要因素。血管球囊损伤后, 损伤局部 ROS 生成增加, 如超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、氧化氢根(OH)等, ROS 可使氧敏感信号通道(redox-sensitive signaling pathways)激活, 产生一系列反应, 从而激活细胞内某些蛋白和酶, 如内皮生长因子受体、c-Src、P38MAPK(丝裂原激活蛋白酶)、Ras 及 Akt/蛋白激酶 B 等, 进而促进平滑肌细胞的增殖、炎症基因的表达加重局部炎症反应、细胞外基质的修饰及沉积等^[5,6]。ROS 是调节血管平滑肌细胞的增殖迁移、内皮细胞功能、炎症因子的表达及细胞外基质沉积等重要因素, 是促进再狭窄形成的重要因素。本研究发现, 球囊损伤 2 周后, 新生内膜区 ROS 水平显著增加, 进一步证实 ROS 参与了内膜增生过程。实验表明, 抗氧化剂如普罗布考、维生素 E 可显著抑制内膜增生及促及血管重构^[7,8]。

西洛他唑是一种新型抗血小板制剂, 早期主要用于治疗间歇性跛行。研究表明西洛他唑不仅具有抗血小板、抗血栓形成作用, 同时还具有抑制平滑肌细胞增殖、抗氧化等功效, 在防治 PCI 术后再狭窄方面疗效显著^[1]。本研究发现, 大鼠颈总动脉球囊损伤后 2 周平滑肌细胞大量增殖并迁移, 新生内膜形成, 西洛他唑可显著抑制平滑肌细胞的增殖及新生内膜的形成, 证实了西洛他唑防治再狭窄的作用。西洛他唑是一种 III 型磷酸二酯酶抑制剂, 可选择性抑制磷酸二酯酶活性, 使细胞内环腺苷酸(cAMP)浓度增加, 启动一系列反应的发生, 包括调节肿瘤抑制基因 p53/p21 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 的表达。P53 蛋白抑制作用的增加将导致平滑肌细胞的

凋亡, 起到抗细胞增殖作用。HGF 可刺激内皮细胞快速再生, 加速内皮细胞的修复从而抑制内膜增生。此外 cAMP 是重要的炎症反应和免疫反应的调节因子, 西洛他唑可通过增加细胞内 cAMP 来调节炎症及免疫反应。上述可能是西洛他唑抑制内膜增生、防治 PCI 术后再狭窄的机制之一。

同时本研究还发现, 球囊损伤后新生内膜区 ROS 水平显著升高, 而西洛他唑可显著降低新生内膜区 ROS 水平。由此可见抑制局部 ROS 生成, 从而抑制有 ROS 诱导的平滑肌细胞增殖及细胞外基质沉积亦可能是西洛他唑防治再狭窄的机制。球囊损伤后局部血小板集聚并释放炎症因子是促进局部 ROS 生成的因素之一, 抑制血小板集聚可能是西洛他唑抑制 ROS 生成的途径之一。Souza HP 等研究表明, 球囊损伤后早期血管氧化应激与 DAD(P)H 氧化酶活性增加相关^[9]。Szocs P 等研究发现, 球囊损伤后血管壁 DAD(P)H 氧化酶的 nox1 和 nox4 含量显著增加^[10]。而 Shin HK 等研究发现, 西洛他唑可显著抑制 RLP 诱导的 NADPH 氧化酶活性, 抑制超氧阴离子的形成^[11]。由此可以推测, 西洛他唑可能通过抑制 DAD(P)H 氧化酶活性, 减少球囊损伤后 ROS 生成。

西洛他唑是三型磷酸二酯酶抑制剂, 可增加细胞内 cAMP 浓度。西洛他唑对 DAD(P)H 氧化酶活性影响是同增加细胞内 cAMP 浓度相关, 还是另有途径, 目前尚不清楚?但可以明确的是西洛他唑可抑制局部 ROS 生成, 从而抑制球囊损伤后新生内膜的形成、防治 PCI 术后再狭窄, 抑制 ROS 生成是西洛他唑抑制新生内膜形成的机制之一。西洛他唑可能为 PCI 术后再狭窄的防治带来新的希望。

参考文献(References)

- [1] Min PK, Jung JH, Ko YG, et al. Effect of cilostazol on in-stent neointimal hyperplasia after coronary artery stenting: a quantitative coronary angiography and volumetric intravascular ultrasound study[J]. Circ J, 2007, 71(11): 1685-1690 (下转第 225 页)

了可以高效感染造血细胞的重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 经鉴定在 HEK293 细胞能够高水平表达所携带的外源基因。最后, 重组腺病毒载体 Ad5fl1p-Spred2 在 K562 细胞能够得到高表达, 且其 ERK 活性水平被强烈抑制, 与在其它细胞中的研究报道一致^[1,4,7]。ERK 信号通路在细胞增殖、分化与凋亡的调控中发挥重要作用, Spred2 是否能够通过负调控 ERK 信号通路, 影响造血细胞的增殖、分化与凋亡, 是下一步的研究重点。

总之, 本研究成功构建制备了重组腺病毒载体 Ad5fl1p-Spred2 和质粒载体 pCDNA3.0-Spred2, 为研究 Spred2 过表达对 CML 细胞的生物学特性影响提供了有效的工具, 同时还发现 Spred2 能够强烈抑制 K562 细胞 ERK 活性水平, 为 Spred2 在造血细胞中的作用研究奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Wakioka T, Sasaki A, Kato R, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling[J]. 2001, Nature, 412 :647-651
- [2] Bundschu K, Walter U, Schuh K. Getting a first clue about SPRED functions[J]. BioEssays, 2007, 29:897-907
- [3] Nonami A, Kato R, Taniguchi K, et al. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/Mitogen- activated Protein (MAP) Kinase activation in hematopoietic cells [J]. J. Biol. Chem, 2004, 279: 52543-52551
- [4] Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, et al. Spred-2 suppresses Aorta-Gonad-Mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP Kinase activation [J]. J. Exp. Med, 2004,199:737-742
- [5] Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, et al. Are Essential for Embryonic

Lymphangiogenesis by Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Signaling[J]. Mol. Cell. Bio, 2007,27:4541-4550

- [6] Wang SS, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific MicroRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev. Cell, 2008,15:261-271
- [7] Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, et al. Spreds, inhibitors of the Ras-ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors[J]. Oncogene, 2006, 25: 6056-6066
- [8] Momeny M, Mohammad RK, Ghaffari SH, et al. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase[J]. Eur. J. Pharmacol, 2008,591:13-20
- [9] Pasmant E, Sabbagh A, Hanna N, et al. SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype [J]. J Med Genet, 2009, 46:425-430
- [10] Brems H, Chmara M, Sahbatou M, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype[J]. Nat Genet, 2007,39:1120-1126
- [11] Lu ZZ, Ni F, Hu ZB, et al. Efficient gene transfer into hematopoietic cells by a retargeting adenoviral vector system with a chimeric fiber of adenovirus serotype 5 and 11p, Exp [J]. Hematol,2006,34 : 1170-1181
- [12] Li QF, Huang WR, Duan HF, et al. Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells[J]. Oncogene, 2007, 26:7904-7908

(上接第 249 页)

- [2] Luciano CP, Marcelo AP, Liliete C, et al. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury The redox hypothesis of restenosis[J]. Cardiovascular Research, 2000,47(3):436-445
- [3] Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity[J]. Free Radic Biol Med, 2000,28:1232-1242
- [4] Tulis DA. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model[J].Methods Mol Med, 2007,139:31-66
- [5] Azevedo LC, Pedro MA. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis[J]. Cardiovasc Res, 2002, 47(3): 436-445
- [6] McCully KS. Homocysteine, vitamins, and prevention of vascular disease[J]. Mil Med,2004,169(4): 325-329
- [7] Muscoli CI. The protective effect of superoxide dismutase mimetic M40401 on balloon injury-related neointima formation: role of the

lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1[J]. J Pharmacol Exp Ther 2004,311(1): 44-50

- [8] Nunes GL, Abizaid AC. Role of probucol in inhibiting intimal hyperplasia after coronary stent implantation: a randomized study [J]. Am Heart J, 2006,152(5): 914 e1-7
- [9] Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity[J]. Free Radic Biol Med,2000, 28:1232-1242
- [10] Szöcs K, Lassegue B, Sorescu D, et al. Upregulation of Nox-based NAD (P)H oxidases in restenosis after carotid injury [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002,22:21-27
- [11] Shin HK, Kim YK, Lee JH, et al. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD (P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol [J]. Circulation, 2004,109(8): 1022-1028