

颅内消瘀汤对大鼠颈动脉球囊损伤后血管内皮 AMPK/eNOS 信号的影响

肖颖^{1a}, 陈实^{1b*}, 余文珍², 刘盛泽^{1b}, 张永亮^{1b} (1.厦门大学附属福州第二医院, a.病理科; b.神经外科, 福州 350007; 2.福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350122)

摘要: 目的 观察颅内消瘀汤对大鼠颈动脉球囊损伤后血管内皮及 AMPK、eNOS 表达的影响, 探讨其可能的作用机制。方法 32 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、颅内消瘀汤低剂量(临床等效量)组和颅内消瘀汤高剂量(临床 2 倍量)组, 除假手术组大鼠仅切开皮肤, 其余大鼠均行颈总动脉球囊损伤术以成模。成模第 4 天灌胃给药, 模型组及假手术组给予等体积生理盐水, 连续给药 14 d 后取损伤侧颈总动脉, 行 HE 染色观测血管内皮损伤及内膜增生情况, 用免疫组化染色检测 eNOS 表达水平, 并用 Western blot 检测总 AMPK、eNOS 蛋白水平。结果 颈总动脉球囊损伤模型组大鼠血管内膜增生明显、管壁变厚, 颅内消瘀汤低、高剂量组大鼠经治疗后损伤血管增生较模型组轻、管壁较薄; eNOS 免疫组化染色: 模型组阳性细胞较少, 经颅内消瘀汤干预后, 低、高剂量 2 组均有不同程度的表达, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); Western blot 检测结果显示模型组总 AMPK、eNOS 蛋白表达下降, 经颅内消瘀汤干预后, 均有不同程度增加, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 颅内消瘀汤可通过上调 AMPK/eNOS 信号表达, 保护大鼠颈动脉球囊损伤血管内皮的作用。

关键词: 颅内消瘀汤; 血管内皮; 球囊损伤; AMPK; eNOS

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)02-0166-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.008

Effect of Lunei Xiaoyu Decoction on Vascular Endothelial AMPK/eNOS Signal in Balloon Injury Model of Common Carotid Artery in Rats

XIAO Ying^{1a}, CHEN Shi^{1b*}, YU Wenzhen², LIU Shengze^{1b}, ZHANG Yongliang^{1b} (1. Second Hospital Affiliated to Xiamen University, a. Department of Pathology; b. Department of Neurosurgery, Fuzhou 350007, China; 2. College of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of Lunei Xiaoyu Decoction on vascular endothelial AMPK, eNOS expression in balloon injury model of common carotid artery in rats, and to explore its possible mechanism. **METHODS** Thirty two SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, low dose of Lunei Xiaoyu Decoction(dose in clinical equivalent) group and high dose of Lunei Xiaoyu Decoction(2 times the amount of clinical) group, except the sham operation group rats only skin incision, the other rats underwent carotid artery balloon injury surgery. On the 4th day after modeling, the rats were administrated orally for 14 d, model group and sham operation group were given equal volume of physiological saline. Then all the rats were killed, HE staining observation of vascular endothelial injury and intimal hyperplasia, immunohistochemistry staining was used to detect the expression level of eNOS, and Western-blot was used to detect the expression level of AMPK and eNOS. **RESULTS** The endometrial hyperplasia and thickness were obvious after carotid artery balloon injury in rats; and after Lunei Xiaoyu Decoction treatment, the rats' endometrial hyperplasia and thickness were improved. The expression of AMPK and eNOS was significantly higher in Lunei Xiaoyu Decoction groups compared with the model group($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSION** Lunei Xiaoyu Decoction can upregulate the expression of AMPK/eNOS signal, in order to protecting vascular endothelial after balloon injured carotid artery in rats.

KEY WORDS: Lunei Xiaoyu Decoction; vascular endothelial; balloon injury; AMPK; eNOS

高血压、冠心病和动脉粥样硬化等心血管疾病是当今危害人类健康的第一杀手, 内皮舒张功能障碍与这些心血管疾病关系十分紧密^[1], 逆转内皮功能障碍是维持心血管健康的必要手段。AMPK 是细胞的能量变化感受器, AMPK/eNOS 信号途径可以调节血管内皮的增生。NO 是一种最重要的内

皮源性血管舒张因子, 近年来诸多研究表明 NO 尤其是内皮型 NO 作为血管内皮的保护因子, 在血管性疾病的防治中起了重要作用^[2-3], 本课题组在临床研究发现, 采用活血化瘀法(方药为颅内消瘀汤)可有效降低患者血黏度, 抑制血小板活化、聚集, 起到改善脑部供血、供氧等作用^[4]。其作用原

基金项目: 福州市科技计划项目(2012-S-155-1)

作者简介: 肖颖, 男, 副主任医师 Tel: (0591)88039152 E-mail: 740106978@qq.com *通信作者: 陈实, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: (0591)88039277 E-mail: CS007528@163.com

理可能与 AMPK/eNOS 相关。本实验以高脂饲料喂养加颈动脉球囊损伤大鼠为模型, 观察活血化瘀中药方对损伤血管内皮及 AMPK、eNOS 蛋白的表达, 以探讨其保护血管内皮的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 32 只, ♂, 体质量(200±20)g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 生产许可证: SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物与试剂、仪器

颅内消瘀汤组成: 桃仁 12 g、红花 9 g、当归 9 g、生地黄 9 g、牛膝 9 g、川芎 6 g 等, 购自福建中医药大学国医堂医院中药房。药物浸泡 30 min, 水煎 3 次, 每次 30 min, 合并 3 次煎液, 4 层纱布过滤, 水浴浓缩成含生药量 2 g·mL⁻¹, 分装冻存备用。胆固醇(上海惠兴生化试剂有限公司产品, 批号: 20111108); 胆酸钠(北京奥博星生物技术有限责任公司, 批号: 20110508)。一抗 NOS3(C-20) ZS-6540 兔抗(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: G1312)。总 AMPK 抗体(CST); BCA 蛋白试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, 批号: P0012A)。手术显微镜(美国 World Precision Instruments)。

1.3 大鼠颈动脉球囊损伤模型制备(参照 David Tulis 等^[5]方法进行改良)

大鼠予以高脂饲料(自制, 配方如下: 25%猪油、2%胆固醇、0.1%胆酸钠、72.9%基础饲料)喂养 1 个月后, 禁食 12 h, 用戊巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ (配成 2%溶液)腹腔注射麻醉, 后固定于蛙板上, 剪毛, 碘伏消毒颈部皮肤, 取左斜切位, 即从下颌角到胸骨上窝(中点)切开皮肤, 逐层分离皮下组织, 找到胸锁乳突肌, 从其前缘用玻璃分针钝性分开其与颈前肌群之间的间隙(头稍往右偏), 必要时可剪断部分肌束, 移到手术显微镜下操作, 用玻璃分针分离血管直至颈总动脉分叉, 在颈外动脉(其靠近气管侧)远心端下留线结扎, 颈总动脉近心端及颈内动脉用动脉夹夹住, 将球囊导管从颈外动脉近心端插入至颈总动脉起始部。注入约 0.1 mL 生理盐水使球囊充盈, 缓慢来回推拉球囊导管 3 次以剥脱颈动脉内皮, 然后退出导管, 结扎左颈外动脉, 缝合切口。术后在水瓶中加入苜蓿青霉素以通过饮水预防感染, 并单笼喂养。

1.4 分组及治疗

将大鼠随机分为假手术组(颈部皮肤切开但不

插球囊导管)、模型组、颅内消瘀汤低剂量组[临床等效量, 2 g·(100 g)⁻¹·d⁻¹]和高剂量组(临床 2 倍量), 每组 8 只。术后第 4 天开始灌胃给药, 模型组与假手术组给予等体积生理盐水。连续给药 14 d 后再次麻醉大鼠, 取术侧颈总动脉段, 生理盐水洗净, 取术侧颈总动脉段(每组各取 3 只)放入 10% 中性甲醛中固定, 余下颈动脉段取出后迅速置于液氮中再转存-70 °C 备用。

1.5 血管内膜病理形态学观察

常规石蜡包埋切片后, 行苏木精-伊红(HE)染色, 在光学显微镜下观察血管内皮损伤程度、管壁厚度、内膜增生等情况。

1.6 免疫组织化学法

采用过氧化物酶标记的链酶卵白素(SP)法, 并严格按照 SP 染色试剂盒的操作步骤进行 NOS3(即 eNOS)免疫组化染色。eNOS 一抗稀释比例 1:100, 内皮组织染成棕黄色为阳性, 定位于胞浆, 采用 Imagepro-plus 分析系统, 在高倍光镜下每张切片随机采取 5 个不重叠视野, 测定颈动脉 eNOS 免疫反应阳性产物平均光密度值。

1.7 Western blot 法检测组织总 AMPK、eNOS 蛋白表达

将组织加入蛋白裂解液冰浴条件下匀浆, 并按 BCA 法进行蛋白定量。配 SDS-PAGE 胶, 后将蛋白样品用此凝胶电泳进行分离, 再转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉封闭液室温轻摇漂洗 PVDF 膜 1 h, 将膜放入大小适宜的自封袋中, 分别加入 1:(500~1 000)稀释一抗 37 °C 1 h, 取出 PVDF 膜, 用 T-TBS 液洗 3 次, 每次 10 min, 后加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗。室温 2 h, 取出 PVDF 膜, 用 T-TBS 液洗 3 次, 每次 10 min, 用 ECL 化学发光显色, 曝光显影。以 β -actin 蛋白为内参照, 计算各组总 AMPK、eNOS 的相对表达量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件处理, 各项指标均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察

假手术组大鼠未见明显异常改变。模型组大鼠术后前 3 d 大鼠精神较差, 后稍有好转, 但毛发欠光泽, 体质量增长缓慢, 未见感染死亡现象。

颅内消痰汤组大鼠较模型组大鼠毛色光泽, 活动度较好。

2.2 各组大鼠损伤侧颈动脉的病理形态学观察

光镜下可见, 假手术组大鼠血管壁完整, 内、外弹力板完整连续, 内膜光滑, 中膜未见增厚;

模型组大鼠颈动脉内皮细胞脱落, 内膜明显不规则增生, 增生的细胞胞核大、胞浆丰富, 类似平滑肌细胞, 中膜增厚较明显; 颅内消痰汤治疗组(尤其是低剂量组)较模型组管壁明显变薄、管腔面积增大。结果见图 1。

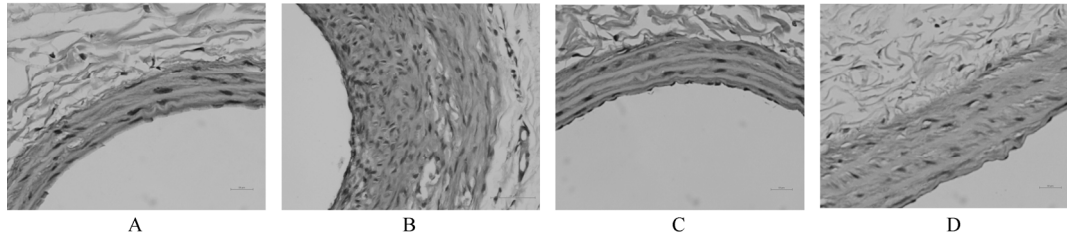


图 1 各组大鼠颈动脉病理变化(HE, 400×)
A-假手术组; B-模型组; C-颅内消痰汤低剂量组; D-颅内消痰汤高剂量组。

Fig. 1 Pathological changes of rat carotid in each group(HE, 400×)

A-sham operation group; B-model group; C-low dose of Lunei Xiaoyu Decoction group; D-high dose of Lunei Xiaoyu Decoction group.

2.3 各组大鼠损伤侧颈动脉 eNOS 表达的比较

免疫组织化学染色结果显示, 假手术组 eNOS 阳性细胞主要集中在血管内皮, 其细胞胞膜呈棕褐色(蛋白表达量 0.212 ± 0.014)。模型组阳性细胞

较少(0.003 ± 0.001), 经颅内消痰汤干预后, 低、高剂量 2 组均有不同程度的表达(分别为 0.173 ± 0.011 , 0.057 ± 0.018), 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 2。

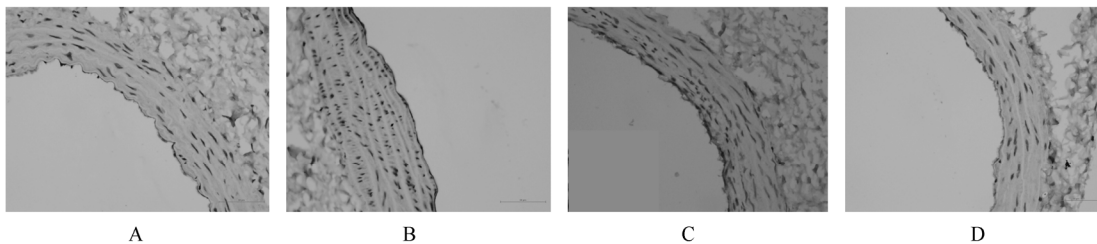


图 2 各组大鼠颈动脉 eNOS 蛋白表达变化(SP, 400×)
A-假手术组; B-模型组; C-颅内消痰汤低剂量组; D-颅内消痰汤高剂量组。

Fig. 2 Expression of eNOS protein of rat carotid in each group (SP, 400×)

A-sham operation group; B-model group; C-low dose of Lunei Xiaoyu Decoction group; D-high dose of Lunei Xiaoyu Decoction group.

2.4 Western blot 结果

图像分析结果显示模型组颈动脉球囊损伤术后总 AMPK、eNOS 的蛋白表达下降, 经颅内消痰汤干预治疗后, 各组大鼠 AMPK、eNOS 蛋白表达较模型组明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 1 及图 3。

表 1 各组大鼠总 AMPK、eNOS 与 β -catenin 总灰度比值 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 1 The ratio of total grey value of AMPK、eNOS vs β -catenin of each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	AMPK	eNOS
假手术组	0.94 ± 0.03	0.45 ± 0.05
模型组	0.63 ± 0.02	0.17 ± 0.04
颅内消痰汤低剂量组	$0.74 \pm 0.05^{1)}$	$1.26 \pm 0.08^{2)}$
颅内消痰汤高剂量组	$1.22 \pm 0.07^{2)}$	$1.41 \pm 0.09^{2)}$

注: 与模型组比较, $^{1)}P < 0.05$, $^{2)}P < 0.01$ 。
Note: Compared with model group, $^{1)}P < 0.05$, $^{2)}P < 0.01$.

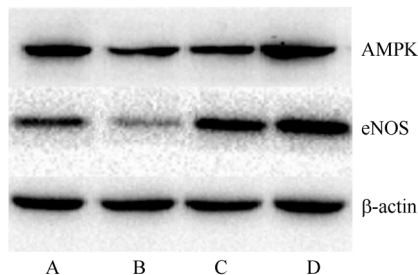


图 3 各组大鼠总 AMPK、eNOS 蛋白的变化
Fig. 3 The changes of AMPK、eNOS in each group

3 讨论

血管内皮损伤是血管疾病中最常见的原因, 尤其与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。本实验中采用高脂饲料喂养的大鼠, 行颈动脉球囊损

伤术以期造成血管内皮功能受损,病理切片结果显示模型组大鼠颈动脉血管内皮细胞脱落,内膜明显不规则增生,管壁增厚明显,这证实该模型可模拟临床上常见的血管性疾病如动脉粥样硬化的发生^[6-7]。本实验同时通过对 AMPK/eNOS 信号途径分析,认为其参与了该病理生理过程。而活血化瘀药可以调节该信号途径,减轻血管内皮的损伤。

AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)是进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,由 $\alpha\beta\gamma$ 三亚基组成。AMPK 可通过不同的方式和途径影响糖原、脂肪酸及蛋白质代谢,并对心血管系统功能起重要调节作用^[8]。在缺血、缺氧等因素的影响下,导致 AMP/ATP 比值显著增高,AMPK 系统激活,启动其下游各种靶蛋白从而发挥其生物学效应。通过 AMPK-eNOS-NO 途径影响血管的生成。AMPK 缺失会增强氧化损伤,降低 eNOS 磷酸化和 NO 合成^[9]。NO 有许多生物学功能,调节内皮细胞的生长、凋亡以及迁移,也是血管生成必需的调节因子。NO 尤其是内皮源性 NO 是血管生物学的一个关键分子,可促进血管内皮细胞增殖、降低血管张力和内皮细胞黏附^[10]。在生理条件下,NO 主要由内皮型一氧化氮合酶(eNOS)生成,其活化主要与细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高,eNOS 酶的翻译后修饰(如磷酸化、乙酰化)和蛋白质-蛋白质相互作用等机制有关^[11];若 eNOS 活性降低,将引起血管内皮功能障碍及持续血管痉挛。本实验结果显示模型组大鼠损伤颈动脉血管 AMPK、eNOS 蛋白表达下调,提示该模型大鼠血管内皮功能受损。

中医认为“血瘀”是导致心血管疾病的重要原因,认为离经之血停留在体内未能及时排出或消散,壅遏经脉,瘀积于脏腑组织器官造成瘀血症。而活血化瘀法适用于一切瘀血阻滞之证。本实验所采用的颅内消瘀汤主要以活血化瘀药为主,含桃仁、红花、莪术、血竭等活血化瘀药,结合地龙干清热通络,川芎活血行气,祛风止痛,

再佐以生地黄滋阴养血,当归补血活血,黄芪补气利水。诸药合用,能使瘀血去,气血和。本实验结果发现,经治疗后,颅内消瘀汤低剂量组改善明显,损伤血管较模型组管壁明显变薄、管腔面积增大;血管 AMPK、eNOS 蛋白表达也增强;提示该方可通过上调 AMPK/eNOS 途径信号表达,改善球囊损伤大鼠血管内皮功能。

REFERENCES

- [1] LI P W, FU X, FU Z X. Effect of endothelin receptors, endothelin receptor antagonist on cardiovascular disease [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(3): 376-380.
- [2] QIAN J, FULTON D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium [J]. *Front Physiol*, 2013, 4(4): 347. Doi: 10.3389/fphys.2013.00347.
- [3] XIA N, FÖRSTERMANN U, LI H. Resveratrol and endothelial nitric oxide [J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 16102-16121.
- [4] LIU S Z, CHEN S, HE D X, et al. Removing blood stasis decoction in treating 148 cases of subdural hematoma [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*(福建中医药), 2007, 38(1): 8-9.
- [5] TULIS D A. Histological and morphometric analyses for rat carotid artery balloon injury studies [J]. *Methods Mol Med*, 2007(139): 31-66.
- [6] LUO Y Y, CHEN L Y, GONG Q, et al. Effect of Guanxin Danshen tablet on neointimal hyperplasia after balloon catheter injury to the common carotid artery of rat with hyperlipidemia of Guanxin Danshen pellet [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(23): 203-206.
- [7] CHEN Y L. Blockade of oxidative stress and Ras-MEK1/2-ERK1/2 pathway is involved in fasudil attenuating balloon injury-induced neointima hyperplasia [J]. *Chin J Geriatrics*(中华老年医学杂志), 2012, 31(9): 814-818.
- [8] ALMABROUK T A, EWART M A, SALT I P, et al. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(3): 595-617.
- [9] SU K H, YU Y B, HOU H H, et al. AMP-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced activation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(8): 3053-3062.
- [10] ZHAO Y, VANHOUTTE P M, LEUNG S W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS [J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 129(2): 83-94.
- [11] FLEMING I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS [J]. *Pflugers Arch*, 2010, 459(6): 793-806.

收稿日期: 2015-07-21