

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.06.016

# 舒脉胶囊对介入术后下肢动脉再狭窄模型大鼠 下肢动脉内膜增生的影响

谢书睿<sup>1</sup>, 朱迎君<sup>2</sup>, 孙旭<sup>1</sup>, 徐旭英<sup>✉</sup>

(1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010; 2. 首都医科大学中医药学院)

**摘要** 目的 观察舒脉胶囊对介入术后下肢动脉再狭窄模型大鼠下肢动脉内膜增生的抑制作用。方法 32 只 SD 大鼠随机分为模型组和假手术组各 7 只, 舒脉低、中、高剂量组各 6 只。除假手术组外, 其余各组大鼠利用经皮冠状动脉腔内血管成形术 (PTCA) 扩张导管经左股动脉损伤左髂总动脉法建立下肢动脉再狭窄模型, 假手术组不进行球囊损伤。术后第 2 天舒脉低、中、高剂量组分别给予 0.0324、0.0648、0.1296 g/ml 舒脉胶囊悬浊液灌胃, 模型组和假手术组给予生理盐水灌胃, 每 300 g 大鼠体重给予 1 ml 药液, 给药 8 周。术后第 4 周以彩色多普勒超声检测各组大鼠左髂动脉中内膜厚度、管腔直径; 于术后第 8 周 HE 及弹力纤维染色法观察血管组织形态学, 测量内膜最大厚度、内膜面积和计算内膜中膜面积比。结果 术后第 4 周时模型组及舒脉低、中、高剂量组大鼠左髂动脉内膜增厚、毛糙, 模型组及舒脉低、中、高剂量组髂动脉内膜厚度及管腔直径均大于假手术组 ( $P < 0.05$ ); 第 8 周髂动脉横断面切片的 HE 染色及弹力纤维染色显示除假手术组外其余各组内膜明显增厚, 新生内膜存在大量平滑肌细胞, 新生内膜面积模型组 > 舒脉低剂量组 > 舒脉中剂量组 > 舒脉高剂量组, 四组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且与假手术组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论 舒脉胶囊可抑制下肢动脉再狭窄模型大鼠下肢动脉内膜增生, 改善循环, 缓解动脉狭窄。

**关键词** 外周动脉病; 介入术后再狭窄; 舒脉胶囊; 动脉内膜; 血管平滑肌细胞

血管介入治疗是外周动脉病 (peripheral arterial disease, PAD) 首选外科治疗手段, 介入术后再狭窄 (postoperative restenosis, PRS) 是下肢动脉介入术后最常见的并发症, 可见管腔再次狭窄或闭塞, 以弹性回缩、新生内膜增生及负性血管重构为主要发生机制<sup>[1-4]</sup>。舒脉胶囊为首都医科大学附属北京中医医院院内制剂, 广泛用于 PAD 及 PRS 的临床治疗。本实验构建下肢动脉介入后再狭窄模型, 探究舒脉胶囊对球囊损伤后下肢动脉内膜增生及动脉狭窄的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只, 250 ~ 300 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许

可证号: SCXK (京) 2012-0001, 饲养于首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所实验动物中心。

### 1.2 实验药物

舒脉胶囊 (首都医科大学附属北京中医医院院内制剂, 批准文号: 京药制字 Z20053323; 批号: 1602032), 主要成分: 鸡血藤 30 g, 丹参 30 g, 黄芪 30 g, 当归 10 g, 淫羊藿 10 g, 菟丝子 10 g 等, 每粒胶囊含原药材 0.4 g。

### 1.3 主要试剂及仪器

肝素钠 (法国 Sanofi 公司, 批号: H20120601); 伊文思蓝 (中国医药公司, 批号: 871225); 庆大霉素注射液 (山西芮城科龙有限公司, 批号: 20170202); 青霉素注射剂 (河北华北制药有限公司, 批号: 161202); 戊巴比妥钠 (美国 Sigma 公司, 批号: 626Y7618); 弹力纤维染色液 (北京中杉金桥公司, 货号: BSBA-4083A)。经皮冠状动脉腔内血管成形术 (PTCA) 扩张导管 (美国 Boston

基金项目: 国家自然科学基金 (81673975); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划 (2013-3-080); 北京市科技计划 (Z161100000516149)

\* 通讯作者: xxying7341@126.com

Science 公司, 批号: 16802484, 1.5 mm × 15 mm); 指引导丝 (美国 Boston Science 公司); 8-0 不可吸收性缝合线 (宁波医用缝针公司, 批号: 170103); 5-0 可吸收缝合线 (上海金环公司, 批号: 66s0408B); Vevo2100 超高分辨率小动物彩色多普勒超声系统 (加拿大 VisualSonics 公司, 探头: MS-550D, 频率: 40 MHz); Autostainer XL/ST 5010 全自动 HE 染色机 (德国 Leica 公司)。

#### 1.4 动物分组、造模及给药方法

适应性喂养 1 周, 32 只大鼠用随机数字表法分为模型组和假手术组各 7 只, 舒脉低、中、高剂量组各 6 只。除假手术组外, 其余各组大鼠用球囊损伤大鼠髂动脉内膜建立下肢动脉再狭窄模型<sup>[4]</sup>。大鼠以戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg 麻醉后, 尾静脉注射肝素钠溶液 100 U/100 g 以抗凝。沿大鼠左股动脉走行打开皮肤, 分离筋膜和肌层, 分离并暴露股动脉。使用眼科剪于股动脉做 V 字形切口, 将 PTCA 球囊以导丝引导穿入股动脉, 上行 5 cm 至腹主动脉中, 以肝素钠生理盐水为扩张介质, 以 2 bar 压力扩张球囊并顺血行方向牵拉球囊至切口处, 重复 3 次以造成髂动脉内膜机械损伤。撤出球囊导丝后分别使用不可吸收缝合线对股动脉切口进行三点式缝合、可吸收缝合线逐层缝合肌层筋膜皮肤, 并以庆大霉素溶液冲洗手术区域, 腹腔给药青霉素 4 万 U。假手术组不进行球囊扩张牵拉。术后用随机数字表法从模型组及假手术组中各选取 1 只大鼠, 经尾静脉注射 0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液 2 ml/kg, 1 h 后处死大鼠, 打开腹腔并暴露髂总动脉, 以生理盐水冲洗血管腔内的血液, 观察动脉内壁蓝染情况。正常血管为腔面不染色, 内皮损伤后的血管腔面染成蓝色<sup>[4]</sup>。

以体重 70 kg 人的每日舒脉胶囊服用剂量与大鼠等效剂量换算法<sup>[5]</sup>则换算为大鼠的中等服用剂量, 分别以其 1/2 和 2 倍为低剂量和高剂量。使用生理盐水将舒脉胶囊药粉分别配制成低剂量 0.0324 g/ml、中剂量 0.0648 g/ml 和高剂量 0.1296 g/ml 的悬浊液。从术后第 2 天起每日对大鼠灌胃给药 300 g/ml, 模型组和假手术组给予等体积生理盐水, 共给药 8 周。

#### 1.5 观察指标及方法

1.5.1 生存状况及行为学观察 实验期间观察各组大鼠的麻醉苏醒、生存状况; 手术伤口愈合及感染情况; 日常体征及活动情况。

1.5.2 影像学观察 术后第 4 周使用彩色多普勒

超声观察各组大鼠左髂动脉内膜光滑程度、中内膜厚度、管腔直径及管腔狭窄情况。

1.5.3 血管组织形态学观察 术后第 8 周处死各组大鼠, 对其左髂动脉进行取材、固定、脱水、包埋, 制成血管横断面石蜡切片, 行 HE 染色和弹力纤维染色, 以观察血管组织形态学, 确定血管内外弹力板位置, 标识内中膜范围, 以 Imaging-Pro Plus 6.0 图像处理软件测量切片的内膜最大厚度、内膜面积、中膜面积, 并计算内膜中膜面积比。

#### 1.6 统计学方法

应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐者采用 Games-Howell 法。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠生存状况及行为学观察结果

手术过程中无大鼠死亡, 手术成功且缝合后未见异常, 无出血。各组大鼠术后 1~3 天的饮食量、活动量有不同程度的减少, 伤口在 3~5 天愈合, 未见感染活动及饮食状态恢复至术前水平。第 5 周开始, 球囊损伤各组大鼠陆续出现步态失调, 术侧下肢不能对抗较大阻力的现象, 且对比健侧下肢皮温较低, 部分大鼠饮食饮水减少, 活动减少, 体重下降, 粪便较干燥; 舒脉胶囊各剂量组大鼠步态失调不明显, 状态体征普遍优于模型组, 差于假手术组。各组均未发现肌肉萎缩、间歇性跛行、肢体干瘪发黑乃至坏疽等严重缺血症状。

### 2.2 各组大鼠血管影像学结果比较

术后第 4 周模型组及舒脉低、中、高剂量组大鼠左髂动脉中内膜增厚, 内壁粗糙; 假手术组未见明显增厚。模型组及舒脉低、中、高剂量组的管腔增大为球囊扩张引起。表 1 示, 模型组及舒脉低、中、高剂量组髂动脉内膜厚度及管腔直径均大于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 而模型组及舒脉低、中、高

表 1 各组大鼠术后第 4 周左髂动脉中内膜厚度及管腔直径比较 (mm,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 内膜厚度           | 管腔直径           |
|--------|----|----------------|----------------|
| 假手术组   | 6  | 0.029 ± 0.016  | 0.808 ± 0.121  |
| 模型组    | 6  | 0.144 ± 0.032* | 1.203 ± 0.079* |
| 舒脉低剂量组 | 6  | 0.121 ± 0.009* | 1.265 ± 0.087* |
| 舒脉中剂量组 | 6  | 0.124 ± 0.023* | 1.240 ± 0.174* |
| 舒脉高剂量组 | 6  | 0.140 ± 0.029* | 1.214 ± 0.110* |

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$

剂量之间内膜厚度、管腔直径差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

2.3 各组大鼠血管组织形态学结果比较

图 1 示, 除假手术组外, 其余各组大鼠左髂动脉内膜均有明显的新生内膜增厚和管腔狭窄发生, 模型组及舒脉低、中、高剂量组新生内膜面积依次降低, 模型组最厚, 舒脉高剂量组最薄, 增厚的新生内膜中存在大量的血管平滑肌细胞, 且数量依次降低。图 2、图 3 示, 四组管腔均较假手术组小,

管腔内壁多层环形排列的波浪形弹力纤维膜 (弹力板) 较为明显; 假手术组大鼠动脉壁各层结构紧密完整, 内膜光滑, 仅为扁平的单层内皮细胞, 弹力纤维和排列整齐有序的血管平滑肌细胞组成血管中膜。表 2 示, 与假手术组比较, 模型组和舒脉低、中、高剂量组大鼠的最大内膜厚度、内膜面积及内膜中膜面积比均增大 ( $P<0.05$ ), 中膜面积差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与模型组比较, 舒脉低、中、高剂量组大鼠的内膜面积及内膜中膜

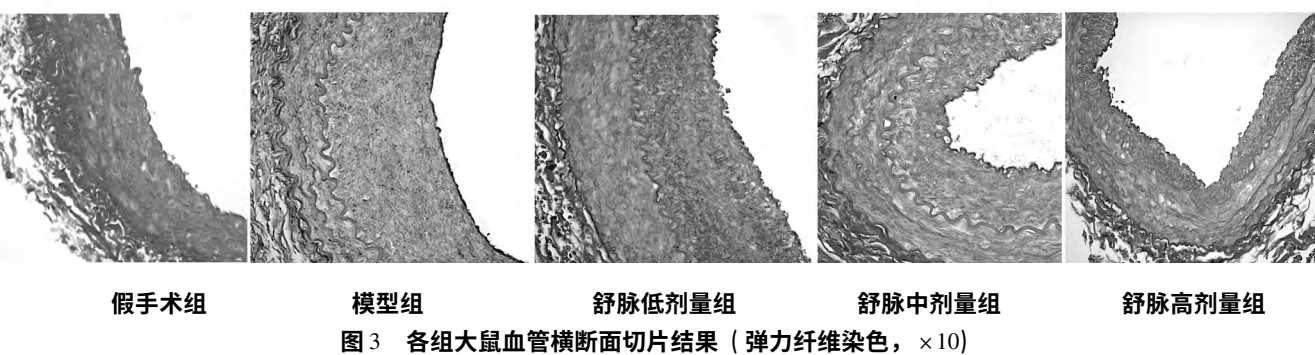
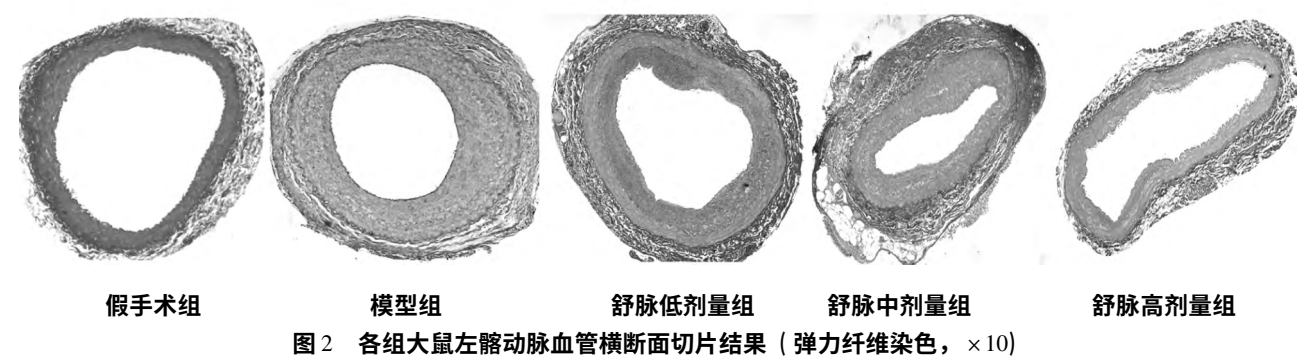
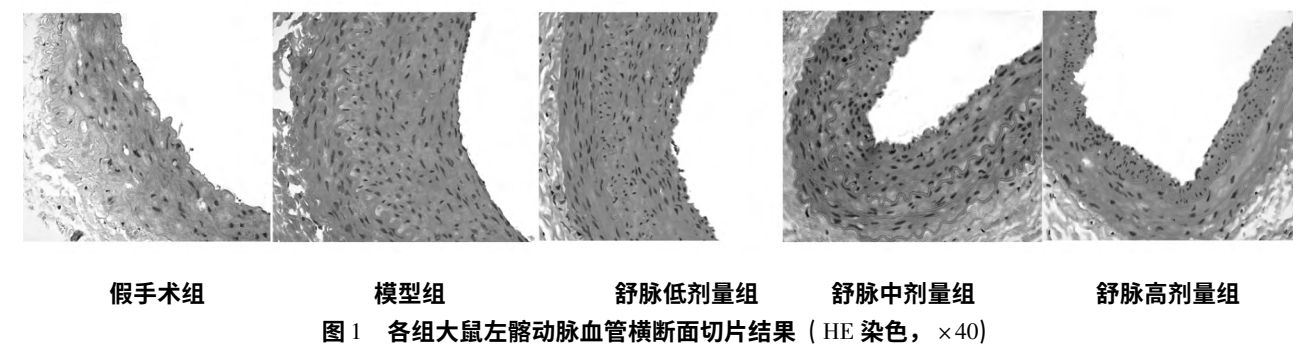


表 2 各组大鼠左髂动脉血管形态学指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 最大内膜厚度 (mm)          | 内膜面积 (mm <sup>2</sup> )                             | 中膜面积 (mm <sup>2</sup> )                            | 内膜中膜面积比                                             |
|--------|----------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 假手术组   | 0.0020 $\pm$ 0.0001  | 0.0112 $\pm$ 0.0029                                 | 0.1235 $\pm$ 0.0227                                | 0.0950 $\pm$ 0.0339                                 |
| 模型组    | 0.1007 $\pm$ 0.0287* | 0.1576 $\pm$ 0.0154*                                | 0.1008 $\pm$ 0.0924                                | 1.5739 $\pm$ 0.2017*                                |
| 舒脉低剂量组 | 0.0968 $\pm$ 0.0363* | 0.1268 $\pm$ 0.0153* $\Delta$                       | 0.1147 $\pm$ 0.0130                                | 1.1083 $\pm$ 0.1050* $\Delta$                       |
| 舒脉中剂量组 | 0.0833 $\pm$ 0.0212* | 0.1052 $\pm$ 0.0109* $\Delta$ $\blacktriangle$      | 0.1256 $\pm$ 0.0159 $\Delta$                       | 0.8458 $\pm$ 0.1173* $\Delta$ $\blacktriangle$      |
| 舒脉高剂量组 | 0.0730 $\pm$ 0.0393* | 0.0827 $\pm$ 0.0132* $\Delta$ $\blacktriangle$ $\#$ | 0.1573 $\pm$ 0.0315 $\Delta$ $\blacktriangle$ $\#$ | 0.5362 $\pm$ 0.1001* $\Delta$ $\blacktriangle$ $\#$ |

注: 与假手术组比较, \*  $P<0.05$ ; 与模型组比较,  $\Delta P<0.05$ ; 与舒脉低剂量组比较,  $\blacktriangle P<0.05$ ; 与舒脉中剂量组比较,  $\#P<0.05$

面积比均减小 ( $P < 0.05$ ), 而舒脉中、高剂量组大鼠中膜面积减小 ( $P < 0.05$ ); 与舒脉低剂量组比较, 舒脉中、高剂量组大鼠内膜面积及内膜中膜面积比均减小 ( $P < 0.05$ ), 舒脉高剂量组大鼠中膜面积增大 ( $P < 0.05$ ); 与舒脉中剂量组比较, 舒脉高剂量组内膜面积、内膜中膜面积比均减小, 中膜面积增大 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

现代医学认为, PRS 是一种动脉血管对机械性损伤的慢性愈合反应<sup>[8]</sup>, PTCA 扩张球囊可机械损伤下肢动脉, 致其发生内皮受损及修复、弹性回缩、内膜增生、血管重构及炎症反应等病理改变, 其中以新生内膜增生为主要表现<sup>[10-11]</sup>。本实验采用一步法构建再狭窄动物模型以侧重研究 PRS 发生中具有代表性的内膜增生阶段, 可控性强, 操作相对简单, 模型成功率高, 能较直观地观察研究下肢 PRS 中的内膜增生的发生过程, 侧重说明单个病理改变在 PRS 中发挥的作用<sup>[12-13]</sup>。

舒脉胶囊是在首都医科大学附属北京中医医院已故房芝萱教授、王玉章教授治疗下肢动脉硬化闭塞症的经验基础上研制而成, 方中黄芪、当归、淫羊藿、鸡血藤等, 立法重视气血, 以活血化瘀与补脾益肾同用, 主治脾肾不足所致下肢供血不足之肢体畏寒、酸胀麻木、肢软乏力、脉道闭塞等病症, 目前多用于 PAD 及 PRS 的治疗, 有较好的临床疗效<sup>[14]</sup>。我们认为, PRS 是在原有气虚血瘀基础上, 局部受到损伤, 加之先前虚瘀痰诸证未祛, 多种因素引发痰毒互结而发, 病位在脉道, 以气虚血瘀为主要病机, 病性属本虚标实。

既往研究表明, 舒脉胶囊有增加血管流量, 扩张血管, 促进侧支循环建立, 调控脂代谢等功效<sup>[14-15]</sup>, 并且可抑制细胞周期良性转化和调控基质金属蛋白酶的表达, 从而抑制血管紧张素 II 诱导的兔 VSMC 增殖和迁移<sup>[16-17]</sup>。

本研究结果显示, 球囊损伤后动脉的中内膜在第 4 周发生了增厚及粗糙的改变; 第 8 周时 HE 染色及弹力纤维染色结果证实了球囊损伤可致动脉内膜增生, 成功构建下肢动脉再狭窄模型。球囊损伤后的大鼠在服用不同剂量舒脉胶囊后, 步态失调、下肢对抗阻力等情况普遍轻于模型组。病理结果表明, 舒脉胶囊可抑制动脉内膜增生, 维持动脉的血管结构, 从而改善动脉再狭窄引起的下肢缺血症状, 具体作用机制有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] KRISHNA SM, MOXON JV, GOLLEDGE J. A review of the pathophysiology and potential biomarkers for peripheral artery disease [J]. Int J mol Sci, 2015, 16(5): 11294-11322.
- [2] JAFF MR, WHITE CJ, HIATT WR, et al. An update on methods for revascularization and expansion of the TASC lesion classification to include below-the-knee arteries: a supplement to the inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II): The TASC Steering Committee (.) [J]. Ann Vasc Dis, 2015, 8(4): 343-357.
- [3] JONES DW, SCHANZER A, ZHAO Y, et al. Growing impact of restenosis on the surgical treatment of peripheral arterial disease [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(6): e000345. doi: 10.1161/JAHA.113.000345.
- [4] DENES L, ENTZ L, JANCSIK V. Restenosis and therapy [J]. Int Journal Vasc Med, 2012; 406236. doi: 10.1155/2012/406236.
- [5] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 下肢动脉硬化闭塞症诊治指南 [J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2016; 1-48.
- [6] 卢富娥. 下肢动脉硬化闭塞症支架术后再狭窄中西医研究进展 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2015: 6-9.
- [7] GABELER EE, VAN HILLEGERSBERG R, STATIUS VAN EPS RG, et al. A comparison of balloon injury models of endovascular lesions in rat arteries [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2002, 2: 16.
- [8] LI X, CHEN C, WEI L, et al. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function [J]. Cytotherapy, 2016, 18(2): 253-262.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 202.
- [10] 袁向珍, 王艳芳, 曹中朝, 等. 球囊损伤术建立血管再狭窄鼠模型 [J]. 内蒙古医学杂志, 2014, 46(10): 1159-1162.
- [11] 孙续鹏, 高爱社, 朱艳琴. 中药抑制再狭窄中血管平滑肌细胞增殖和迁移的研究进展 [J]. 中医研究, 2016, 29(6): 76-78.
- [12] 尉希清, 刘帅, 牛珩, 等. 黄芪甲苷对大鼠平滑肌细胞及颈动脉内膜增生的影响及机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3432-3440.
- [13] 高杨, 杨洁, 安勇刚, 等. 人参皂苷 Re 对球囊损伤所致大鼠颈动脉新生内膜增生及 ERK 通路的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(18): 1589-1593.
- [14] 吕培文, 张金茹. 舒脉胶囊对早期动脉硬化性闭塞病的临床研究 [J]. 北京中医药, 2001, 19(6): 19-20.

- [[5] 董建勋,郝钰,孙丹,等. 舒脉胶囊对实验性家兔肢体动脉硬化防治作用及其机制的研究 [J]. 北京中医药大学学报,2007,30(11):744-747.
- [[6] 余胜. 舒脉胶囊拮抗 Ang II 诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移的机制探讨 [D]. 北京:北京中医药大学,2009:30-68.

- [[7] 余胜,董建勋,郝钰,等. 舒脉胶囊对 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 北京中医药大学学报,2009,32(3):178-181.
- [[8] 余胜,董建勋,黄敏. 舒脉胶囊对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞迁移的影响 [J]. 安徽中医学院学报,2012,31(4):69-72.

# Impact of *Shumai Jiaonang* (舒脉胶囊) on Lower Extremity Artery Intimal Hyperplasia in Lower Extremity Artery Postoperative Restenosis Model Rats

XIE Shurui<sup>1</sup>, ZHU Yingjun<sup>2</sup>, SUN Xu<sup>1</sup>, XU Xuying<sup>1</sup>

(1. Beijing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100010; 2. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine)

**ABSTRACT Objective** To examine the inhibitory effect of *Shumai Jiaonang* on lower extremity artery intimal hyperplasia in model rats with lower extremity artery postoperative restenosis (PRS). **Methods** Thirty-two Sprague Dawley (SD) rats were randomized into a model group, a sham operation group (n=7 in each group), the *Shumai* low, medium and high dose groups (n=6 in each group). Lower extremity artery restenosis models were made by dilated catheter with percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) through left femoral artery to make left common iliac artery injury in rats in each group, except those in the sham operation group. No balloon injury was made in sham operation group. From the 2nd day of operation, the *Shumai* low, medium and high dose groups were given 0.0324, 0.0648 and 0.1296 g/ml of *Shumai Jiaonang* turbid liquid by gavage, respectively. The model group and the sham operation group were given normal saline by gavage. The dose was 1 ml of solution per 300 g body weight, and the treatment lasted for 8 weeks. At the 4th week after operation, the intimal thickness and lumen diameter of left iliac artery of rats in each group were measured by color doppler ultrasound. At the 8th week after operation, vascular histomorphology was examined by hematoxylin and eosin (HE) stain and elastic fiber staining. The maximum intimal thickness and intimal area were measured. The area ratio of tunica intima and tunica media was calculated. **Results** At the 4th week after operation, rats' left iliac artery thickened and roughened in the model group, as well as the *Shumai* low, medium and high dose groups. Intimal thickness and lumen diameter of iliac artery in the model group, and the *Shumai* low, medium and high dose groups were higher than those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). At the 8th week, cross section of iliac artery HE stain and elastic fiber staining showed that rats' intima was obviously thickened; there were large number of smooth muscle cells in neointima in all the groups except the sham operation group. The neointima area of the rats in the model group was the biggest, followed those in the *Shumai* low dose group, the *Shumai* medium dose group, and the *Shumai* high dose group. There were significant differences in neointima area among the 4 groups ( $P < 0.05$ ), as well as between the sham operation group and each of other groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Shumai Jiaonang* might inhibit the lower extremity artery intimal hyperplasia in lower extremity artery PRS model rats, improve the circulation and relieve arterial stenosis.

**Keywords** peripheral arterial disease; postoperative restenosis; *Shumai Jiaonang*; endarterium; vascular smooth muscle cell

(收稿日期: 2017-08-23; 修回日期: 2018-01-03)

编辑: 王利芬