

硫化氢抑制大鼠颈总动脉球囊损伤后 血管内膜增生的研究

姜宝平 夏 勇

摘 要 **目的** 探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)供体对球囊损伤大鼠颈总动脉后血管新生内膜面积(neointimal area, NA)、血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和内膜B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达的影响。**方法** 假手术组作为正常参照,用球囊损伤对照组、 H_2S 组和PPG组大鼠的颈总动脉,各组12只,每组再平均分为14天和28天两个亚组。建模后,假手术组和对照组每天用生理盐水腹腔注射, H_2S 组每天用硫化氢钠(sodium hydrogen sulfide, NaHS)溶液(2.8mg/kg)经腹腔注射给药,PPG组每天用炔丙基甘氨酸(propargylglycine, PPG-内源性 H_2S 生成抑制剂)药物(37.5mg/kg)经腹腔注射给药。预定时间点,观察管腔病理改变、ELISA检测IL-6的含量和免疫组化法测Bcl-2与Bax蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,相同亚组的 H_2S 组NA及内膜中膜比(neointimal area/medial area, NA/MA)均明显减小($P < 0.05$),Bcl-2表达减弱,Bax表达增强($P < 0.05$),14天亚组IL-6含量减低($P < 0.05$),28天亚组IL-6含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组相比,相同亚组的PPG组NA及NA/MA显著增加($P < 0.05$),Bcl-2表达增强,Bax表达减弱($P < 0.05$),14天亚组IL-6含量增加($P < 0.05$),28天亚组IL-6含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** H_2S 可以减轻损伤后血管的狭窄,其作用机制可能包括通过影响Bcl-2蛋白和Bax蛋白表达,从而使血管损伤后增殖和迁移至内膜的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)凋亡大于增殖和通过减少早期IL-6的分泌来影响IL-6通过JAK/STAT通路诱导的VSMC的增殖。

关键词 硫化氢 PPG 球囊损伤 血管平滑肌细胞

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.023

Study of Inhibiting Effect of Hydrogen Sulfide on Vascular Intimal Hyperplasia after Balloon Injury in Rat Carotid Artery. Jiang Baoping, Xia Yong. Institute of Cardiovascular Diseases, Xuzhou Medical College, Jiangsu 221066, China

Abstract **Objective** Discuss influence of hydrogen sulfide (H_2S) donor on rats with balloon injury in carotid artery in terms of neointimal area (NA), serum Interleukin-6 (IL-6). B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) expression. **Methods** Sham-operation group was taken as the normal reference. Control group, H_2S group and PPG group were treated with balloon injury in carotid artery. There are 12 rats in each group and each group was divided into 14d and 28d sub-groups again. After modeling, the sham-operation group and control group were treated with intraperitoneal injection of normal saline every day. H_2S group were treated with intraperitoneal injection of Sodium hydrogen sulfide (NaHS) solution (2.8mg/kg) every day. PPG group were treated with intraperitoneal injection of Propargylglycine (PPG-endogenous H_2S -generated inhibitor) (37.5mg/kg). At the scheduled time, the luminal pathologic change was observed, content of IL-6 were determined by ELISA, and Bcl-2 and Bax protein expression were measured with immunohistochemical method. **Results** Compared to the control group, NA and neointimal area/medial area (NA/MA) of H_2S group in the same sub-groups decreased significantly ($P < 0.05$). Bcl-2 expression decreased and Bax expression increased ($P < 0.05$). Content of IL-6 in 14 d sub-group decreased ($P < 0.05$). There is no significant difference in content of IL-6 in 28 d sub-group ($P > 0.05$). Compared to the control group, NA and NA/MA of PPG group in the same sub-group increased significantly ($P < 0.05$). Bcl-2 expression increased and Bax expression decreased ($P < 0.05$). Content of IL-6 in 14 d sub-group increased ($P < 0.05$). Content of IL-6 in 28 d sub-group did not have significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** H_2S can alleviate the vascular stenosis after balloon injury. The mechanism of action is possibly that apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) of the proliferated and migrated vessels after damaged through influencing Bcl-2 protein and Bax protein expression is greater than proliferation and the proliferation of VSMC induced through JAK/STAT pathway influenced by reducing the secretion of early IL-6.

Key words H_2S ; PPG; Balloon injury; Vascular smooth muscle cells

经皮冠脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后再狭窄是困扰介入医师和冠心病患者的一个世界性难题,单纯球囊扩张术后的再狭窄率高达30%~50%,即使置入支架,术后仍有17%~32%再狭窄率,严重影响了其疗效^[1]。而最近进入临床的药物涂层支架(drug eluting stent, DES)和生物可降解支架虽可以使简单病变的再狭窄率降至0~10%,但其对复杂病变的疗效还有待观察^[2]。以往研究已经表明,在血管损伤后,一些细胞因子和介质可促使VSMC发生表型转化,从收缩型转为合成型,并增殖和从中膜迁移到内膜,这构成了一个动脉内膜增生发展为斑块的重要过程,是血管再狭窄发生的主要病理机制^[3-5]。因此,若能有效阻止VSMC的增殖和迁移,则可以预防血管损伤后再狭窄的发生率。 H_2S 是20世纪末人们发现的可以由哺乳动物体内产生与CO和NO有相似生理特性的一种小型、水溶性、自由渗透内源性气体信号分子,参与了体内多个生理系统的功能调节^[6]。多项研究表明, H_2S 具有抗凝、调脂、抗炎、扩血管,调节心肌收缩力和保护心肌细胞等多种生理作用,与许多心血管疾病的发生、发展紧密相关^[7]。本实验通过研究 H_2S 对血管内皮损伤后内膜增生的影响,为临床防治血管再狭窄提供新的依据。

材料与方法

1. 实验材料: NaHS、PPG 购自上海阿拉丁生化科技有限公司, 1.5mm × 15mm 球囊购自美国Medtronic公司, IL-6 ELISA试剂盒购自北京诚林生物科技有限公司, Bcl-2、Bax 蛋白免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. 实验方法: (1) 实验动物级分组: 由徐州医学院动物实验中心提供48只清洁级雄性SD大鼠(体重约300g), 分成假手术组、球囊损伤组(对照组)、球囊损伤+硫化氢组(H_2S 组)、球囊损伤+PPG组(PPG组), 每组12只, 各组再分为14天、18天两个亚组(每个亚组6只)。(2) 建立模型及药物干预: 用10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉大鼠, 假手术组只

分离颈总动脉不行球囊损伤。其余3组分离出颈外动脉后, 用小血管钳挑起颈外动脉, 使其与颈总动脉平直, 于颈外动脉远端切一小口, 沿切口将球囊送至颈总动脉内约3cm, 压力泵给予3个大气压, 反复抽送球囊3次。术毕结扎颈外动脉, 缝合消毒切口, 常规饲养。术后, 假手术组与对照组每天给予1ml生理盐水腹腔注射, H_2S 组每天腹腔注射1ml的NaHS溶剂(2.8mg/kg)和PPG组每天腹腔注射1ml的PPG溶剂(37.5mg/kg)。(3) 获取标本: 所有大鼠根据亚组分类, 分别于14天和28天抽血后处死, 剪取损伤段血管, 常规漂洗、脱水、固定和包埋。血液室温下静置10min后离心取上清备用。(4) 酶联免疫分析法(ELISA)法检测IL-6的浓度: 按照ELISA试剂盒的操作步骤, 用全波长酶标仪测得标准品和所有样本吸光度(A值), 根据标准品浓度A值绘制的标准曲线, 算出样本浓度。(5) 管腔病理观察: 血管切片HE染色后, 通过图像分析软件, 以内弹力膜和外弹力膜为界, 测量损伤后血管NA和MA, 并算出NA/MA值。(6) 免疫组化染色(SP法)观察VSMC的Bcl-2、Bax蛋白的表达: 取得切片后实验遵照试剂盒操作说明进行, 在高倍镜下测算随机4个视野的血管内膜相关蛋白阳性细胞表达率, 取均值。

3. 统计学方法: 所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用GraphPad Prism 5.0软件处理, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

术后14天和28天, 与对照组相比, 对应时间点 H_2S 组NA与NA/MA均明显减小($P < 0.05$); Bcl-2表达减弱, Bax表达增强($P < 0.05$); 14天亚组IL-6含量减低($P < 0.05$), 28天亚组IL-6含量无明显差异($P > 0.05$)。对应时间点PPG组与对照组相比, NA与NA/MA增加($P < 0.05$); Bcl-2表达增强, Bax表达减弱($P < 0.05$); 14天亚组IL-6含量增加($P < 0.05$), 28天亚组IL-6含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1、表2和图1~图3。

表1 术后14、28天各组NA、NA/MA、Bcl-2、Bax细胞阳性率的比较($\bar{x} \pm s$)

分组 (n=6)	NA(mm ²)		NA/MA(%)		Bcl-2(%)		Bax(%)	
	14天	28天	14天	28天	14天	28天	14天	28天
假手术组	-	-	-	-	-	-	-	-
对照组	0.133 ± 0.006	0.178 ± 0.004	1.308 ± 0.092	1.860 ± 0.086	27.48 ± 3.78	38.52 ± 2.89	19.42 ± 1.38	29.75 ± 2.13
H_2S 组	0.060 ± 0.008*	0.093 ± 0.005*	0.808 ± 0.087*	1.068 ± 0.080*	15.44 ± 2.20*	28.76 ± 3.08*	29.98 ± 2.24*	42.68 ± 1.86*
PPG组	0.157 ± 0.006*	0.206 ± 0.006*	1.514 ± 0.104*	2.106 ± 0.092*	31.62 ± 2.57*	43.86 ± 2.66*	14.62 ± 1.96*	24.59 ± 2.02*

与对照组相比, * $P < 0.05$

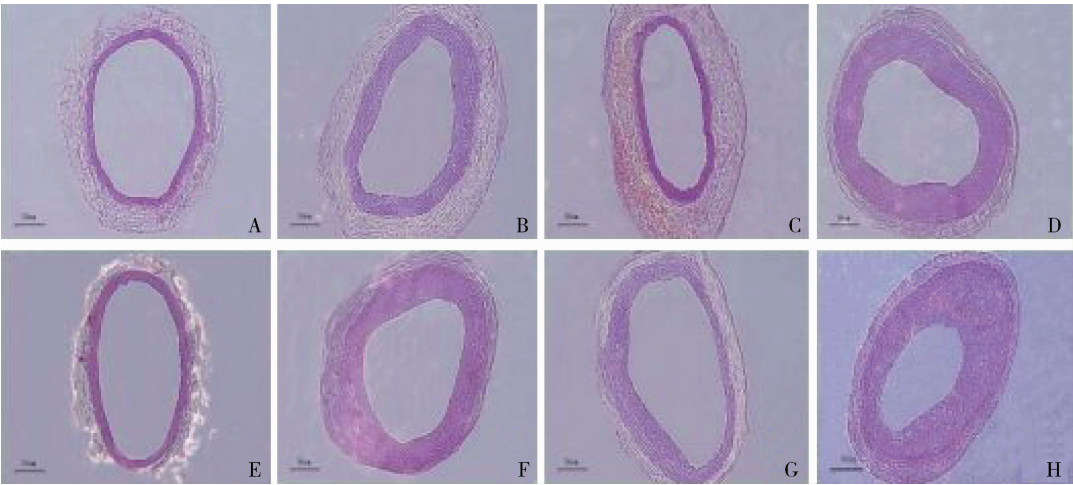


图1 术后14、28天各组颈总动脉新生内膜增生情况(HE, ×100)
A. 假手术组14天;B. 对照组14天;C. 硫化氢组14天;D. PPG组14天;
E. 假手术组28天;F. 对照组28天;G. 硫化氢组28天;H. PPG组28天

表2 术后14天和28天血清IL-6的含量

组别(n=6)	IL-6含量(ng/L)	
	14天	28天
假手术组	130.17±9.06	123.11±8.67
对照组	171.30±5.76 [▲]	128.07±11.53
H ₂ S组	159.32±3.24 ^{▲*}	123.76±14.86
PPG组	189.48±11.70 ^{▲**}	138.45±11.65

与假手术组相比, [▲]*P* < 0.05; 与对照组相比, ^{*}*P* < 0.05; 与 H₂S 组相比, [#]*P* < 0.05

讨 论

在人体内几乎所有组织中都能产生 H₂S,生成部位最高的主要分布在中枢神经系统、心血管系统和肝、肾等组织。在心血管系统中,H₂S 的产生途径主要是以细胞质内的 L-半胱氨酸为底物,通过胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)途径产生的^[8]。而 PPG 是 CSE 的特异性抑制剂,可以特异性的抑制循环系统中内源性 H₂S 的生成^[9]。目前

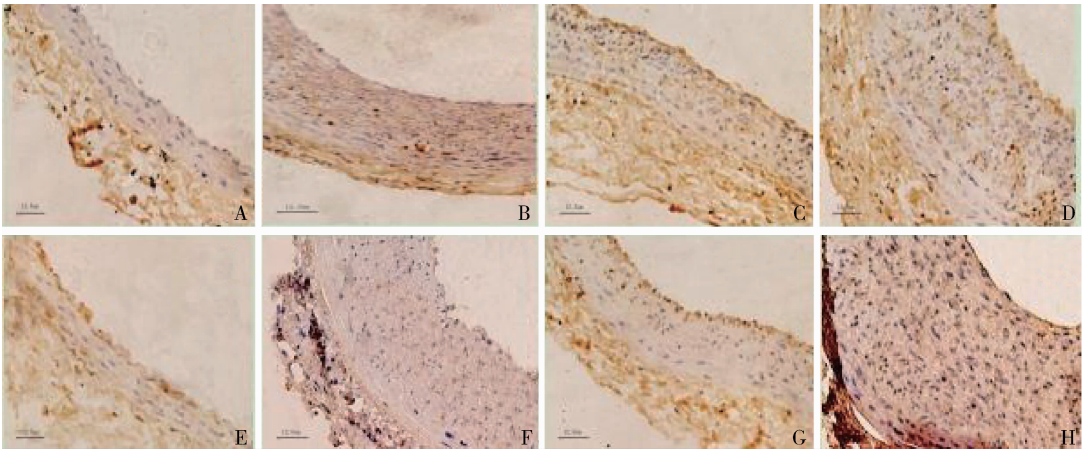


图2 术后14、28天各组颈总动脉内膜 Bcl-2 的表达情况(免疫组化, ×400)
A. 假手术组14天;B. 对照组14天;C. 硫化氢组14天;D. PPG组14天;
E. 假手术组28天;F. 对照组28天;G. 硫化氢组28天;H. PPG组28天

常用的 H₂S 供体试剂主要有 H₂S 气体、H₂S 饱和水溶液、NaHS 和 Na₂S/Hcl 溶液等多种类型。但气体和水溶液有可控性及精确性差、易挥发、给药不便利和容易污染实验环境等缺点,所以不适合作为本实验的

H₂S 供体。因为体内的 H₂S 有气态和 NaHS 两种形式存在,而 NaHS 和 H₂S 在体内可以解离成离子状态,并相互转化,保持动态平衡,且不改变 pH 值水平,所以硫化钠溶液更接近 H₂S 在水溶液中的生

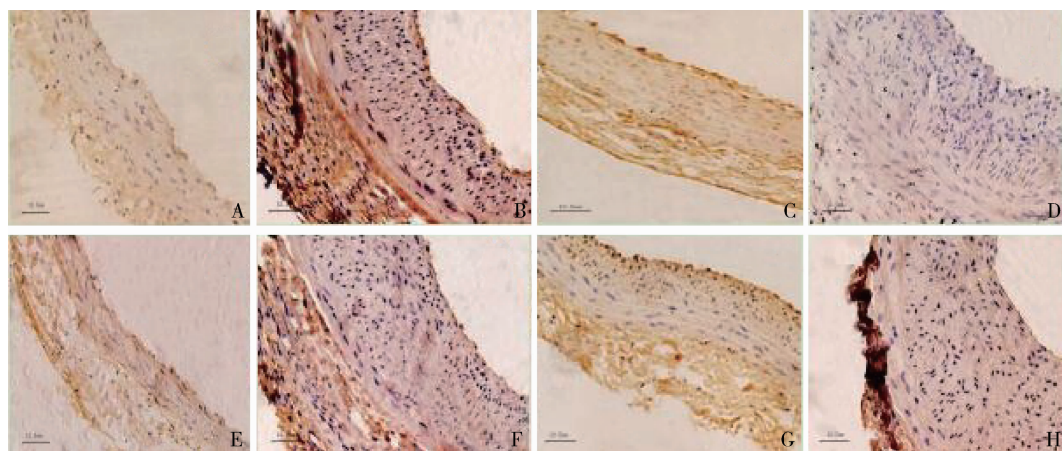


图3 术后14、28天各组颈总动脉内膜Bax的表达情况(免疫组化, ×400)

A. 假手术组14天; B. 对照组14天; C. 硫化氢组14天; D. PPG组14天;
E. 假手术组28天; F. 对照组28天; G. 硫化氢组28天; H. PPG组28天

理状态,因此本试验选择硫化氢钠作为 H_2S 的试剂的供体^[10]。

IL-6 是一种多功能的细胞因子,可由机体内包括血管平滑肌细胞、成纤维细胞在内的多种细胞,在不同的刺激条件下反射性的表达,在急性炎症反应、免疫应答、细胞的增殖与分化、损伤,甚至某些肿瘤的生长方面有着重要意义^[11]。最近还有一些研究表明,IL-6 在心血管疾病的病理生理中扮演了重要的角色,其中就包括参与血管平滑肌细胞的增殖与凋亡^[12]。在以往报道中,JAK/STAT 信号转导通路在细胞的增殖、分化、应激、凋亡、炎症反应和免疫调节等过程中发挥了重要作用,而与 VSMC 的分化、增殖、凋亡和炎症反应密切相关的主要是 JAK/STAT 信号转导通路中的 STAT1 和 STAT3^[13,14]。Watanabe 等^[15]发现,JAK/STAT 信号通路可以部分介导 IL-6 诱导的大鼠血管平滑肌细胞 DNA 合成,促进其分化增殖。由此可见,若能有效调节 IL-6 的表达水平,就可能抑制 VSMC 通过 JAK/STAT 通路诱导的增殖。

有实验表明,在血管内膜损伤后早期,血清中 IL-6 的含量明显升高,于第14天达到峰值后下降,在第28天时降低至正常水平。在损伤后14~28天,血清中 IL-6 含量进行性减低,而管腔狭窄仍继续进展,可能是内膜增生由于惯性效应持续发展,在28天后则表现为下降的趋势^[16]。也有可能是血管平滑肌细胞的分化增殖是多途径、多通道的,单纯通过调节 IL-6 表达水平来抑制诱导的 VSMC 通过 JAK/STAT 通路诱导的增殖,并不能完全阻止内膜的增生,必然还有其他调节方式,如 Bcl-2 和 Bax 蛋白,两者均

为 Bcl-2 家族成员,二者的氨基酸序列有21%的同源性,它们分别是由两个重要的凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 基因所表达,前者表达的 Bcl-2 蛋白表示抑制细胞凋亡,而后者表达的 Bax 蛋白则是促进细胞凋亡^[17]。细胞的最终命运就取决于细胞内 Bcl-2 和 Bax 两种调控蛋白的平衡结果^[18]。而近年来研究表明,Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白可能是通过线粒体途径参与了血管平滑肌的调控,并认为 Bcl-2/Bax 比率是调节细胞凋亡的可变电阻,当比率增加时是促进 VSMC 增殖,而减低是促进 VSMC 凋亡。

本实验发现,球囊损伤大鼠经总动脉后,PPG 组和对照组的相同亚组相比,血管管腔狭窄明显加重,说明 PPG 抑制内源性 H_2S 的生成有加重损伤后血管内膜增生的效果;而 H_2S 组与对照组的相同亚组相比,血管腔狭窄明显减轻,说明在血管内膜损伤后给予适量外源性的 H_2S 可以有效的减轻内膜增生和管腔再狭窄的程度,根据本实验所检测的相关指标来看,其作用机制可能是多途径、多通道的:①通过影响 VSMC 内 Bcl-2 和 Bax 基因的表达,使其表达的蛋白倾向于凋亡大于增殖,从而减少 VSMC 增殖,减轻损伤后血管增生的内膜面积和管腔狭窄程度;②通过抑制血管内膜损伤后早期 IL-6 的分泌,影响 IL-6 经 JAK/STAT 通路诱导的 VSMC 的增殖,降低球囊损伤后血管再狭窄发生率。但 H_2S 究竟通过何种途径来影响 IL-6、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达,尚需开展进一步的研究证实。

参考文献

- 1 Eyeuboglu M. In stent restenosis after percutaneous coronary interven-

- tion[J]. *Anatolian J Cardiol*, 2016, 16(1): 68-77
- 2 杨娜, 赵学忠, 王全伟, 等. 冠状动脉支架内再狭窄的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 6: 1731-1733
- 3 Cao C, Ji X, Luo X, *et al*. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* promote the transformation and proliferation of vascular smooth muscle cell phenotypes[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18327-18334
- 4 鲍慧慧, 李菊香, 俞建华, 等. 球囊损伤后血管内皮平滑肌细胞肿瘤抑制因子的表达及意义[J]. *山东医药*, 2013, 18: 31-34
- 5 Arun K, Subrata K, Fay WP. Thrombosis, physical activity and acute coronary syndromes[J]. *J Appl Physiol*, 2011, 111(2): 599-605
- 6 Mayumi K, Ryo F, Bateman RM, *et al*. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(2): 449-472
- 7 Liu YH, Lu M, Hu LF, *et al*. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(1): 141-185
- 8 Erzsébet Z, Viktória J, Anupam A, *et al*. Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(7): 731-739
- 9 Kunihiro S, Gabor O, Katalin M, *et al*. Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13829-13834
- 10 Fu Z, Liu X, Geng B, *et al*. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2008, 82(23-24): 1196-1202
- 11 宋斌斌, 高美华. 白细胞介素-6 与心血管疾病的相关性研究[J]. *药物与人*, 2014;7: 255-255
- 12 Balakrishnan A, Satyamoorthy K, Joshi M B. Role of IL-6/JAK/STAT pathway in inducing vascular insulin resistance[J]. *Mol Cytogenet*, 2014, 7(Suppl 1): 1-1
- 13 Si Y, Bao H, Liu H, *et al*. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation[J]. *J Translat Med*, 2013, 11(1): 1-12
- 14 Nagadhara D, Zhimin L, Chunmei W, *et al*. STAT-3-dependent cytosolic phospholipase A2 expression is required for thrombin-induced vascular smooth muscle cell motility[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(4): 3112-3120
- 15 Watanabe S, Mu W, Kahn A, *et al*. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Nephrol*, 2004, 24(4): 387-392
- 16 张春炳, 朱健, 张秋玉, 等. Cyr61、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 与颈动脉损伤后再狭窄的关系[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2008, 28(11): 1410-1415
- 17 Burguillos MA, Hajji N, Englund E, *et al*. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: evidence in Parkinson's disease patients[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 41(1): 177-188
- 18 Bleicken S, García-Sáez AJ. New biophysical methods to study the membrane activity of bcl-2 proteins[J]. *Method Mol Biol*, 2014, 1176(1176): 191-207

(收稿日期: 2016-04-09)

(修回日期: 2016-04-18)

PSA 相关指标在前列腺重复穿刺活检中的诊断价值

陈 磊 王 韧 白文坤 胡 兵 周永昌 张心如 冯 超

摘 要 **目的** 探讨分析 PSA 相关指标在前列腺重复穿刺活检中的诊断价值。**方法** 自 2008 年 1 月 1 日~2015 年 4 月 1 日,在笔者医院超声医学科进行超声引导下前列腺穿刺 4315 例患者中,筛选出 145 例进行了重复穿刺的患者进行分析,按第 2 次穿刺结果将患者分为肿瘤组以及非肿瘤组。分析指标包括患者年龄、两次穿刺间隔时间、穿刺针数、前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)、前列腺特异抗原速率(prostate specific antigen rate, PSAV)、血清游离前列腺特异性抗原与总前列腺特异性抗原比值(freeprostate specific antigen/total prostate specific antigen, f/tPSA)、前列腺特异性抗原密度(prostate specific antigen density, PSAD)、前列腺特异性抗原移行带密度(prostate specific antigen density transitional zone, PSATZ)。对所有入选患者中 63 例初次穿刺 PSA 位于灰区且穿刺间隔超过 1 年的患者进行进一步分层研究,分为灰区肿瘤组和非肿瘤组。**结果** 第 2 次穿刺针证实为前列腺癌的共有 42 例,阳性率 28.97% (42/145)。按第 2 次穿刺结果将病患分为肿瘤组以及非肿瘤组进行比较,两组患者穿刺间隔时间和穿刺针数相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组患者年龄相比较,肿瘤组大于非肿瘤组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组患者 PSATZ 相比较,肿瘤组明显大于非肿瘤组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组患者两次穿刺间 PSA

基金项目:上海交通大学医工交叉项目(YG2014MS17)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科(陈磊、王韧、白文坤、胡兵、周永昌),泌尿外科(张心如、冯超)

通讯作者:陈磊,电子信箱:doctorchenlei@163.com