

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.010.html>

硫辛酸胺对损伤血管内膜增生的影响及机制

汪 洋 鲍得俊 程传东 董永飞 魏祥品 牛朝诗 傅先明 汪业汉

摘要 目的 研究硫辛酸胺(LAP)对大鼠颈总动脉球囊压迫损伤后内膜增生(IH)的影响及机制。方法 48只健康成年雄性SD大鼠随机分为4组(每组12只):假手术组、血管损伤组、LAP低剂量组(100 mg/kg)、LAP高剂量组(150 mg/kg)。颈总动脉球囊压迫法构建活体大鼠颈动脉损伤模型,血管损伤后6 h鼻饲LAP,连续3 d,每天给药一次。测定损伤血管的氧化应激水平;Western blot、免疫荧光评估CathepsinB/D、Caspase-3的蛋白水平;TUNEL染色测定血管损伤区域内皮细胞(ECs)凋亡率;HE染色评估3周后血管IH及管腔狭窄程度情况。结果 血管内膜损伤72 h后,与假手术组比较,损伤血管的氧化应激水平,CathepsinB/D、Caspase-3的蛋白水平,ECs凋亡率明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),LAP能显著抑制氧化应激水平、ECs凋亡率及上述蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$);当血管内膜损伤3周后,HE染色结果显示损伤节段血管可见明显的IH,血管腔狭窄($P < 0.01$),LAP可显著抑制IH,减轻血管腔的狭窄($P < 0.05$)。高、低剂量LAP抑制血管IH的能力无明显差异。结论 LAP抑制大鼠颈动脉球囊损伤后IH,其可能机制为LAP特异性抑制溶酶体内Cathepsins介导的凋亡通路,减少ECs的凋亡率,加速损伤区域内皮修复,从而抑制IH。

关键词 内膜损伤; 硫辛酸胺; 凋亡; 组织蛋白酶

中图分类号 R 743

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1532-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.010

介入手术是治疗心脑血管疾病重要手段,但术后引起的血管内膜损伤后再狭窄是困扰介入治疗的难题^[1],而内膜增生(intimal hyperplasia,IH)是血管介入术后再狭窄的病理基础^[2]。研究^[3]显示血管内皮细胞(endothelial cells,ECs)凋亡减弱了血管内皮层的屏障作用,加速斑块的形成。ECs凋亡后,又可以启动凝血机制在病变局部形成血栓,加重血管腔狭窄^[4]。目前,一些相应的抑制ECs凋亡的药物被应用到临床。硫辛酸胺(α -lipoic acid-plus,

LAP)是硫辛酸(α -lipoic acid,LA)的衍生物,可抑制蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)引起的氧化应激,进而抑制神经细胞的凋亡,与最常见的抗氧化剂LA相比,LAP的抗凋亡作用更强^[5]。该研究拟通过球囊压迫法建立颈动脉内膜损伤动物模型,再予以LAP干预,探讨LAP对IH的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 活性氧(reactive oxygen species,ROS)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TUNEL试剂盒购自美国Sigma公司;LAP由大连美仑生物科技有限公司合成,纯度100%。Western blot和免疫荧光一抗:Cathepsin B/D、Caspase-3购自英国Abcam公司;Western blot二抗:HRP标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗购自美国Santa Cruz公司;免疫荧光二抗:Alexa Fluor-488 donkey anti-rabbit IgG抗体、Alexa Fluor-488 donkey anti-goat IgG抗体购自美国Invitrogen公司。

1.2 实验动物 成年健康雄性SD大鼠由上海实验动物研究中心提供,雄性,300~350 g。所有动物实验遵照国家实验动物饲养和使用指南,术前单笼饲养,保持室温18~22℃,自由饮飮水,安静、避光环境中饲养。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立 10%水合氯醛(药物剂量:4 ml/kg)对SD大鼠进行腹腔注射麻醉。麻醉成功后,将大鼠仰卧于操作台上,颈部去毛备皮,安尔碘常规消毒。正中偏右0.5 cm切开皮肤,切开颈前肌,牵开胸锁乳突肌,找到颈动脉分叉处,游离颈内、颈外、颈总动脉。显微镜下血管夹夹住颈总动脉,在颈外动脉上剪开一个缺口,球囊装置塞入缺口,沿着管腔一直到达颈总,松开血管夹,球囊装置继续向前,大约离分叉处2 cm左右,注射器注水使球囊充盈,关闭阀门,然后沿着管腔来回滑动3次,造成颈动脉内膜损伤。抽出球囊中的水,退出导管,显微镜

2018-06-15 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号:1708085QH174)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院神经外科,合肥 230001

作者简介: 汪 洋,男,住院医师,硕士研究生;

魏祥品,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: ahweixiangpin@126.com

下缝合颈外动脉上的缺口^[6]。

1.3.2 实验分组和处理 SD 大鼠 48 只, 随机分为 4 组, 假手术组: 12 只, 只分离颈动脉; 血管损伤组: 12 只, 显微镜下利用球囊压迫法建立大鼠颈动脉损伤模型; LAP 低剂量组: 12 只, 模型建立后 6 h, 将 LAP(100 mg/kg) 与 2 ml 的甲基纤维素(浓度为 0.5%) 混合, 通过胃管给药, 连续 3 d, 每天给药一次; LAP 高剂量组: 12 只, 模型建立后 6 h, 将 LAP(150 mg/kg) 与 2 ml 的甲基纤维素(浓度为 0.5%) 混合, 通过胃管给药, 连续 3 d, 每天给药一次。

1.3.3 氧化应激水平的测定 用 ROS、MDA、SOD、GSH-Px 试剂盒来进行氧化应激水平的测定。显微镜下剥除损伤区域血管内皮层, 加入适量生理盐水研磨成匀浆, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液分装, 分别用作 ROS、MDA、SOD、GSH-Px 的分析, 匀浆中的蛋白浓度由考马斯亮蓝法试剂盒测定。ROS 含量的测定选用 ROS 检测探针 DCF-DA, 混合液的荧光强度由荧光酶标仪(FilterMax F5, Molecular Devices) 来测定, 最佳激发波长为 485 nm, 最终的 ROS 的测定结果以荧光强度/mg 蛋白表示, 根据试剂盒中提供的步骤, 类似地测定 MDA 含量、SOD、GSH-Px 的活性。

1.3.4 Western blot 法 显微镜下取适当长度的颈动脉内皮研磨, 加入裂解液, 离心 4 °C 过夜; Bradford 比色法测定总蛋白浓度; 制胶, 15% 分离胶, 5% 浓缩胶; 蛋白样品 100 °C 变性 5 min, 上样 30 μg; 恒压 60 V 进胶, 当溴酚蓝前沿刚进入分离胶后, 恒压 100 V 跑胶; 用转移槽恒流转膜 2 h; 用丽春红染液将 PVDF 膜染色, 据目标蛋白分子量将膜进行适当剪切; 用 PBS 浸泡使膜上的丽春红颜色褪去; 用含 5% BSA 的 PBST 溶液在室温下封闭 1 h; 用含 3% BSA 的 PBST 溶液稀释一抗(1:1 000), 与含目标蛋白的 PVDF 膜在 4 °C 孵育过夜; 用 PBST 浸泡膜 1 次, 10 min; 用 PBS 浸泡膜 2 次, 每次 10 min; 用 PBS 稀释二抗(1:5 000), 室温孵育 1 h; 用 PBS 浸泡膜 3 次, 每次 10 min; ECL 化学发光底物法暗室中显色; 扫描保存实验结果, 用 QUANTITY ONE (v4.6.2) 凝胶电泳图象分析软件, 分析结果。

1.3.5 免疫荧光共染 取 4 μm 的血管石蜡切片, 70 °C 烘片 2 h, 经二甲苯、乙醇脱蜡水化; 切片置于 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0) 中行抗原修复, 微波炉加热(95 °C), 30 min, 自然冷却至室温; PBS 浸泡 3 次, 每次 5 min; 0.2% Triton X-100 透化 2 min; PBS 浸泡 3 次, 每次 5 min; 0.5% 天空蓝浸

泡 10 min; PBS 浸泡 3 次, 每次 5 min; 10% 血清封闭液封闭 20~30 min; 加一抗(1:100) 4 °C 过夜; 恢复室温, PBST 浸泡 3 次, 每次 5 min; 加相应二抗(1:200) 37 °C 孵育 30 min~1 h(避光), 恢复室温, PBST 浸泡 3 次, 每次 5 min; 防淬灭封片剂封片; 共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3.6 HE 染色 取 4 μm 的血管石蜡切片, 70 °C 烘片 2 h, 经二甲苯、乙醇脱蜡水化; 梯度酒精脱脂。将切片依次放入 100%、95%、80% 乙醇中各 3 min, 最后放入自来水中 2 min; 苏木精染色 30 s; 蒸馏水洗片 2 min; 0.5% 盐酸酒精分化 3 s; 自来水洗片 2 min; 80% 乙醇中 15 s; 伊红染色 1 min(不可超时); 蒸馏水速洗; 脱水, 将切片依次放入 80%、95%、100% 乙醇中各 15 s, 最后放入二甲苯中 10 min; 将切片放置通风橱中干燥, 滴加中性树脂封片; 显微镜下观察并拍照。

1.3.7 TUNEL 染色 根据 TUNEL 试剂盒实验步骤进行染色: ① 取 4~6 μm 的石蜡切片, 预热 70 °C 烤片 2 h, 在二甲苯及梯度酒精(100%、95%、90%、80%、70%) 溶液中脱蜡; ② 预处理: 在 37 °C 避光保温箱中, 切片浸没孵育在蛋白酶 K 溶液(10~20 μg/ml in 10 mol/L TRIs/HCl, pH 7.4~8) 浸泡 30 min; ③ PBS 溶液冲洗 3 次, 每次 5 min; ④ 在 37 °C 的避光保温箱中, 滴加 TUNEL 工作溶液, 孵育 60 min; ⑤ PBS 溶液冲洗 3 次, 每次 5 min; ⑥ 暗室中常温风干, 滴加抗淬灭荧光封片剂, 加盖玻片封存。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异行单因素方差分析, 两组间的数据采用 SNK-q 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 损伤血管氧化应激水平测定 假手术组中 ROS、MDA 水平很低, 而损伤组 ROS、MDA 水平显著上升, 为对照组的(1.370 ± 0.101)、(1.432 ± 0.089) 倍($F = 12.32, 10.14, P < 0.05$); 干预组中, LAP 能显著抑制 ROS、MDA 的上调, 为损伤组的(0.784 ± 0.081)、(0.681 ± 0.078) 倍($F = 7.75, P < 0.05, F = 14.67, P < 0.01$); 同时 SOD、GSH-Px 在损伤后活性显著下降, 为对照组的(0.509 ± 0.213)、(0.588 ± 0.093) 倍($F = 22.69, P < 0.01, F = 24.35, P < 0.01$), 但 LAP 能显著抑制 SOD、GSH-Px 的下调, 为损伤组的(1.364 ± 0.112)、(1.417 ± 0.056) 倍($F = 7.45, P < 0.05, F = 16.78, P < 0.01$), 其变

化趋势与 ROS、MDA 含量的变化趋势相反。不同剂量的 LAP 抗氧化应激的能力无明显差异,见图 1。

2.2 血管内皮组织中的 CathepsinB/D、Caspase-3 的表达 Western blot 结果显示,与假手术组比较,损伤组内皮组织中 CathepsinB/D、Caspase-3 的蛋白水平明显上升($F = 19.35, P < 0.01$, $F = 23.65, P < 0.01$, $F = 7.86, P < 0.05$),LAP 能够显著抑制 CathepsinB/D、Caspase-3 的水平($F = 21.73, P < 0.01$, $F = 11.54, P < 0.05$, $F = 8.95, P < 0.05$);高剂量的 LAP 较低剂量 LAP 能发挥更强的效应($F = 9.39, P < 0.05$, $F = 17.15, P < 0.01$),见图 2。利用免疫荧光方法检测了血管内皮层中 CathepsinB/D 表达,损伤组中内皮组织中 CathepsinB/D 的表达较假手术组轻度增多,但应用 LAP 干预后,内皮组织中的 CathepsinB/D 显著下调,见图 3、4。

2.3 TUNEL 染色结果 与假手术组比较,损伤组内皮层中的 ECs 凋亡率显著升高($F = 14.35, P < 0.01$),LAP 处理显著地降低了 ECs 的凋亡率($F = 7.76, P < 0.05$, $F = 25.63, P < 0.01$)。验证了 LAP

通过抑制凋亡,保护 ECs 的作用,见图 5。

2.4 HE 染色结果 血管损伤后 3 周,损伤节段血管内可见明显的内膜增厚,有效管腔面积低于假手术组,为假手术组的(0.764 ± 0.201)倍($F = 17.84, P < 0.01$),LAP 可显著被抑制 IH,有效抑制管腔狭窄,为损伤组的(1.231 ± 0.359)倍($F = 7.26, P < 0.05$)。结果表明 LAP 能够抑制损伤血管 IH 及管腔狭窄,见图 6。

3 讨论

内皮损伤是介入治疗的特异性损伤,也是一种严重的并发症,内皮损伤与血管内血栓和再狭窄形成密切相关,而促进血管内皮再生,短时间内恢复内皮完整性有助于预防血管再狭窄。当血管内皮损伤后,延迟性再内皮化和 IH 将会变得不可避免,同时对血管的再狭窄率和血栓的形成发挥很大的作用。目前文献^[7]报道已经有很多有效的干预措施及药物来预防血管损伤后的 IH。例如,血管周围应用雷帕霉素可对血管 IH 呈现持续的抑制作用。在损伤

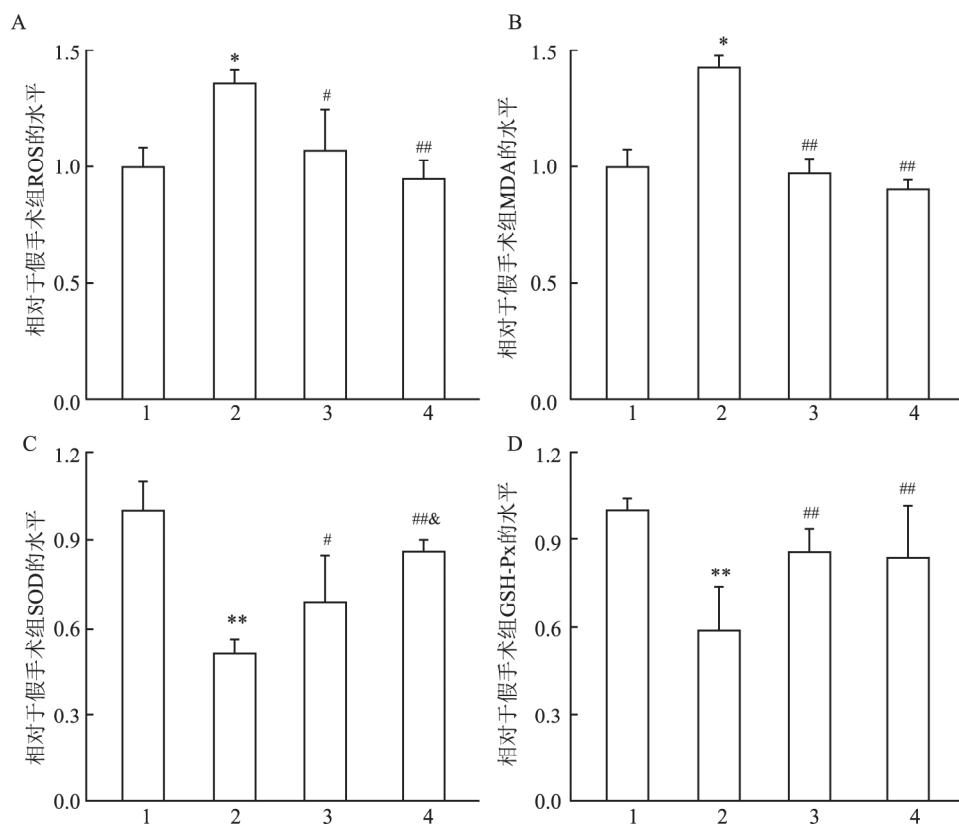


图 1 损伤血管的氧化应激水平

A: ROS; B: MDA; C: SOD; D: GSH-Px; 1: 假手术组; 2: 血管损伤组; 3: LAP 低剂量组; 4: LAP 高剂量组; 与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与血管损伤组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与低剂量组比较: & $P < 0.05$

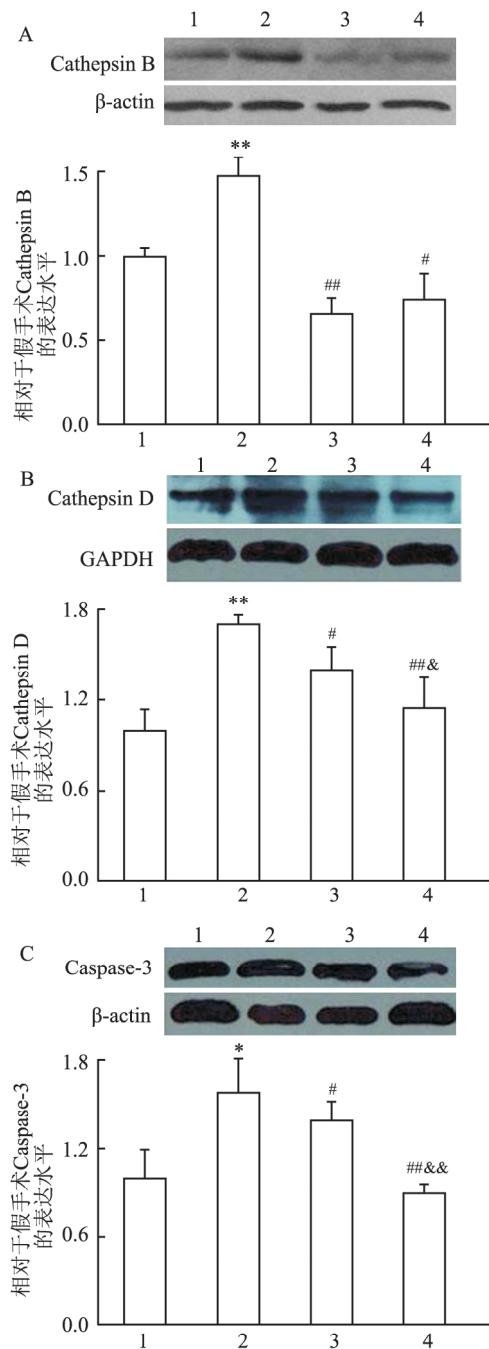


图2 Western blot 检测 Cathepsin B/D 和 Caspase-3 的表达水平

A: Cathepsin B; B: Cathepsin D; C: Caspase-3; 1: 假手术组; 2: 血管损伤组; 3: LAP 低剂量组; 4: LAP 高剂量组; 与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与血管损伤组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与低剂量组比较: & $P < 0.05$

血管局部使用胰岛素可显著减少增生内膜的厚度,增加管腔面积而不影响全身的血糖水平,同时平滑肌细胞的增殖和迁移受到了抑制,因此,胰岛素涂支架对血管内手术后的再狭窄提供了保护效应^[8]。近年来,ECs 凋亡引起延迟再内皮化引起了重视,有多种信号通路参与 ECs 凋亡,如 Ox-LDL 可通过

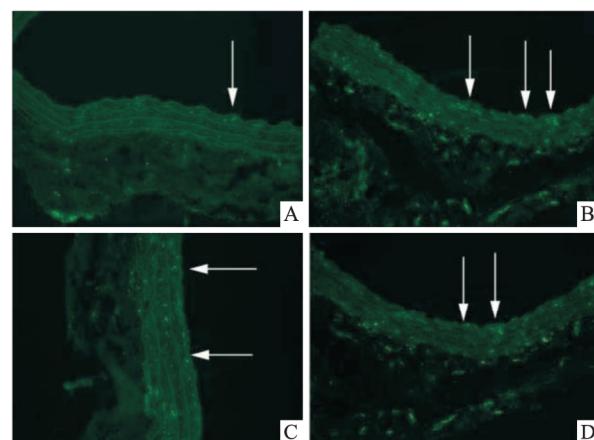


图3 免疫荧光法检测 Cathepsin B 的表达水平 $\times 400$
A: 假手术组; B: 血管损伤组; C: LAP 低剂量组; D: LAP 高剂量组

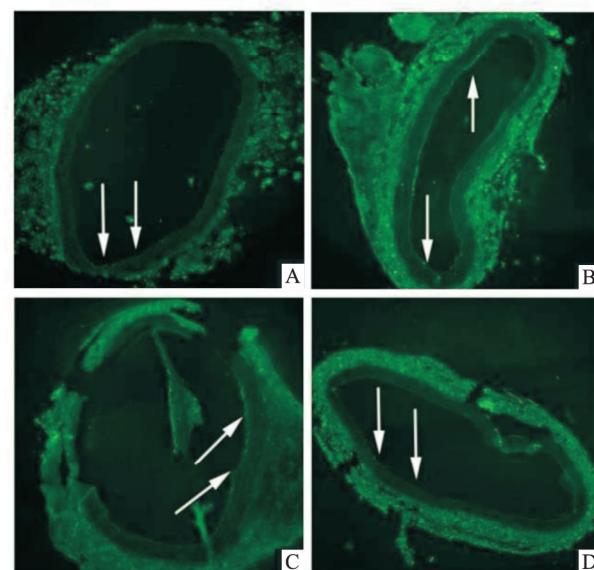
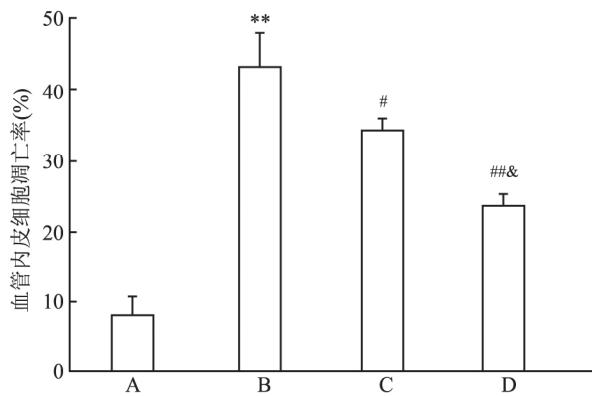
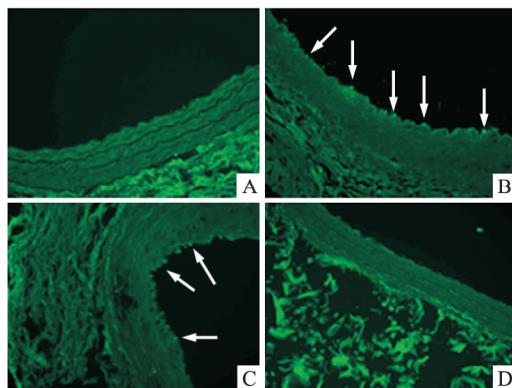


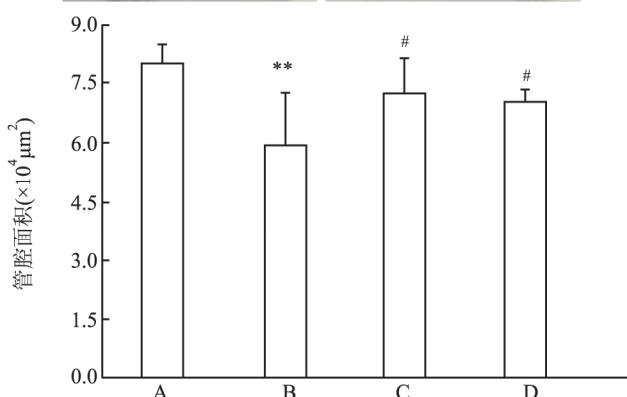
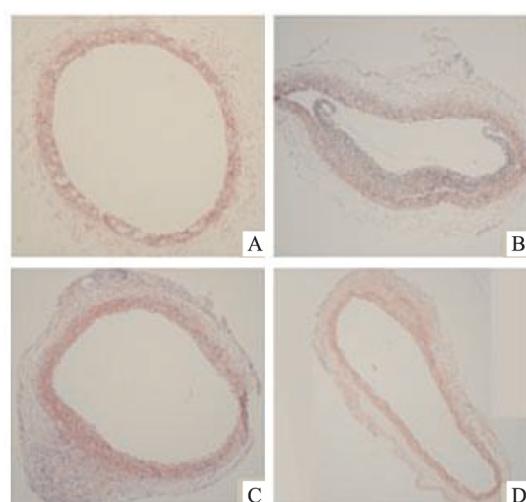
图4 免疫荧光法检测 Cathepsin D 的表达水平 $\times 100$
A: 假手术组; B: 血管损伤组; C: LAP 低剂量组; D: LAP 高剂量组

PERK/eIF2 α /CHOP ER-stress 信号通路诱导 ECs 凋亡^[9]。有文献^[10]证实内皮抑素特异性抑制 ECs 生长、迁移,诱导 ECs 凋亡,抑制损伤血管的再内皮化,参与了再狭窄形成。另外,有文献^[11]证实姜黄素可抑制 ECs 的凋亡来促进血管损伤区域再内皮化,继而抑制血管 IH。在前期研究中,Svensson et al^[12]已经在实验中论证了 miR-425a 在 ECs 中过表达可抑制 ECs 的增殖和分化,同时下调 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白水平,激活内部凋亡通路,加速 ECs 的凋亡,因此,应用 miR-425a 抑制剂可能是增加 ECs 增殖及分化,促进血管损伤后再内皮化的一种重要方法。当血管内皮损伤后,部分红细胞粘滞在受损的内皮层,继而发生分解产生血红蛋白,血红蛋白

图 5 TUNEL 染色标记凋亡的内皮细胞 $\times 400$

A: 假手术组; B: 血管损伤组; C: LAP 低剂量组; D: LAP 高剂量组; 与假手术组比较: $** P < 0.01$; 与血管损伤组比较: $\# P < 0.01$, $\# P < 0.05$; 与 LAP 低剂量组比较: $\& P < 0.05$

白的分解产物亚铁血红素在血红素加氧酶的作用下生成二氧化碳和胆绿素, 随之生成具有催化作用的活性铁, 此反应中通过 Fenton 反应也有大量的 ROS 的产生^[13]。Yu et al^[14] 前期试验已经证实细胞的溶酶体内存在一个不稳定、氧化活性铁池, 如果细胞遭受到外界氧化应激损伤时, 溶酶体内铁将会增加细胞损伤的危险。同时, 笔者在之前的试验中证实了 SAH 后早期脑损伤与神经元与小胶质细胞的凋亡密切相关, 其具体表现为 SAH 后神经细胞内溶酶体膜的通透性增加, 破裂的溶酶体数目增多, 释放的 Cathepsins 将进一步级联放大溶酶体外的凋亡信号。但这一过程可能有自由铁的参与, 溶酶体酸性环境和高水平的自由铁促进了 Fenton 反应, 产生了氧化能力更强的羟自由基, 损伤并破坏溶酶体膜。而一种亲溶酶体内铁的螯合剂 LAP, 作为 LA 的衍生物, 结构中含有巯基, 可靶向与溶酶体内铁反应, 稳定溶酶体膜, 抑制 Cathepsins 介导的凋亡通路, 减轻神经细胞的凋亡, 起到脑保护的作用^[5]。众所周知, 溶酶体和 Cathepsins 能级联放大溶酶体外的凋亡信号在多种疾病中已经被证实^[15]。

图 6 HE 染色评估内膜增生及管腔狭窄情况 HE $\times 100$

A: 假手术组; B: 血管损伤组; C: LAP 低剂量组; D: LAP 高剂量组; 与假手术组比较: $** P < 0.01$; 与血管损伤组比较: $\# P < 0.05$

综上所述, ECs 凋亡在血管内膜损伤后再内皮化及 IH 过程中受到广泛重视, 一些相应抑制 ECs 凋亡的药物被应用到临床。但在血管内膜损伤中, Cathepsins 介导的 ECs 凋亡通路却很少被探讨, 本次实验结果提示当血管内膜损伤 72 h 后, 损伤血管内皮层的氧化应激水平、CathepsinB/D、Caspase-3 的表达水平及 ECs 凋亡率明显上调, 但 LAP 能显著抑制氧化应激水平、ECs 凋亡率及上述蛋白的表达; 当血管内膜损伤 3 周后, HE 染色结果显示损伤节段血管可见明显的内膜增厚, 导致管腔狭窄。而 LAP 可显著抑制 IH, 减轻血管腔的狭窄。因此, LAP 抑制大鼠颈动脉球囊损伤后 IH, 其可能机制为 LAP 不仅因为其抗氧化的特性, 还特异性抑制溶酶体内 Cathepsins 介导的凋亡通路, 减少 ECs 的凋亡, 加速损伤区域内皮修复, 从而抑制 IH。因此, 像此类能抑制溶酶体内 Cathepsins 的药物, 将会成为治疗血管内膜损伤中延迟再内皮化及内膜过度增生的一种新的策略。

参考文献

- [1] Ding H ,Zhang T ,Du Y ,et al. HUCMNCs protect vascular endothelium and prevent ISR after endovascular interventional therapy for vascular diseases in T2DM rabbits [J]. *Mol Cell Biochem* , 2017 ,433(1-2) : 161 - 7.
- [2] Grote K ,Sonnenschein K ,Kopopara P R ,et al. Toll-like receptor 2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 promotes reendothelialization and inhibits neointima formation after vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2013 ,33(9) : 2097 - 104.
- [3] Quillard T ,Franck G ,Mawson T ,et al. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques [J]. *Curr Opin Lipidol* , 2017 ,28 (5) : 434 - 41.
- [4] Schiro A ,Wilkinson F L ,Weston R ,et al. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease [J]. *Atherosclerosis* , 2014 ,234(2) : 295 - 302.
- [5] Wang Y ,Gao A ,Xu X ,et al. The neuroprotection of lysosomotropic agents in experimental subarachnoid hemorrhage probably involving the apoptosis pathway triggering by cathepsins *via* chelating intralysosomal iron [J]. *Mol Neurobiol* , 2015 ,52(1) : 64 - 77.
- [6] Madigan M ,Entabi F ,Zuckerbraun B ,et al. Delayed inhaled carbon monoxide mediates the regression of established neointimal lesions [J]. *J Vasc Surg* , 2015 ,61(4) : 1026 - 33.
- [7] Shi X ,Chen G ,Guo L W ,et al. Periadventitial application of rapamycin-loaded nanoparticles produces sustained inhibition of vascular restenosis [J]. *PLoS One* , 2014 ,9(2) : e89227.
- [8] Chiang S ,Breen D M ,Guo J ,et al. Local insulin application on the carotid artery inhibits neointima formation [J]. *Can J Physiol Pharmacol* , 2013 ,91(12) : 1086 - 94.
- [9] Tao Y K ,Yu P L ,Bai Y P ,et al. Role of PERK/eIF2 α /CHOP endoplasmic reticulum stress pathway in oxidized low-density lipoprotein mediated induction of endothelial apoptosis [J]. *Biomed Environ Sci* , 2016 ,29(12) : 868 - 76.
- [10] 马颖,何援利. VEGF 对内皮抑素诱导的血管内皮细胞凋亡的抑制作用 [J]. 重庆医学 ,2011 ,40(2) : 133 - 4.
- [11] Guo N ,Chen F ,Zhou J ,et al. Curcumin attenuates rapamycin-induced cell injury of vascular endothelial cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* , 2015 ,66(4) : 338 - 46.
- [12] Svensson D ,Gidlöf O ,Turczyńska K M ,et al. Inhibition of microRNA-425a promotes human endothelial cell proliferation and viability through an antiapoptotic mechanism [J]. *J Vasc Res* , 2014 ,51(3) : 239 - 45.
- [13] Garton T ,Keep R F ,Hua Y ,et al. Brain iron overload following intracranial haemorrhage [J]. *Stroke Vasc Neurol* , 2016 ,1(4) : 172 - 84.
- [14] Yu Z ,Persson H L ,Eaton J W ,et al. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death [J]. *Free Radic Biol Med* , 2003 ,34(10) : 1243 - 52.
- [15] Appelqvist H ,Wäster P ,Kägedal K ,et al. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target [J]. *J Mol Cell Biol* , 2013 ,5(4) : 214 - 26.

Effect of lipoic acid amine on intimal hyperplasia of injured vessels and its mechanism

Wang Yang ,Bao Dejun ,Cheng Chuandong ,et al

(Dept of Neurosurgery ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001)

Abstract **Objective** To study the effect of α -lipoic acid-plus (LAP) on intimal hyperplasia (IH) after rat carotid artery injury and the relevant mechanism. **Methods** 48 healthy adult male SD rats were randomly divided into 4 groups (12 in each group) : sham group ,injured + vehicle group ,injured + low-dosage LAP (100 mg/kg) group ,and injured + high-dosage LAP (150 mg/kg) group. Rat carotid artery endarterium injury model was created by balloon compression. LAP or an equal volume of vehicle was orally administered at 6 h after injury and then once daily for the next 2 days. The level of oxidative stress of damaged blood vessels was determined by chemical fluorescence method. Western blot and immunofluorescence were applied to evaluate Cathepsin B/D and Caspase-3 protein levels. Endothelial cells (ECs) apoptosis was assessed by TUNEL staining. HE staining was to observe IH and the degree of vascular stenosis induced in 3 weeks. **Results** The results showed that the levels of oxidative stress ,Cathepsin B/D ,Caspase-3 and the rate of ECs apoptosis increased markedly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,which were further confirmed by double immunofluorescence staining and reversed by LAP treatments induced by 72 hours ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . In addition ,The results of HE staining showed that the IH was visible in the injured segmental vessels ,and the vessel lumen was narrowed ($P < 0.01$) ,and LAP treatment markedly suppressed IH and alleviated vascular stenosis ($P < 0.05$) . It was noteworthy that the findings of the present study suggested that high-dose LAP intervention might have not exerted more significant effects than low-dose LAP. **Conclusion** LAP can impart a protective effect on ameliorating IH ,and is mediated by its anti-apoptosis effect which suppresses the apoptosis pathway triggering by intralysosomal cathepsins.

Key words endarterium injury; α -lipoic acid-plus; apoptosis; cathepsins