

垂体腺苷酸环化酶激活肽对家兔实验性 动脉粥样硬化血管重塑的影响

任彩霞¹, 常青¹, 李自成², 李建芝¹, 唐海兰¹, 黄华梅¹, 关洁宾³

(暨南大学医学院 1. 组织学与胚胎学教研室, 广州 510632; 2. 附属第一医院心内科, 广州 510630; 3. 动物所, 广州 510632)

[主题词] 垂体腺苷酸环化酶激活肽; 动脉粥样硬化; 血管重塑

[摘要] 为探讨垂体腺苷酸环化酶激活肽对家兔动脉粥样硬化血管重塑的影响, 将 60 只新西兰雄性家兔随机等分为正常对照组、动脉粥样硬化组和垂体腺苷酸环化酶激活肽组, 分别于实验的第 4、8 和第 12 周末随机处死每组家兔各 5~8 只并取胸主动脉。在上述动脉条的头、中、尾部各截取约 0.5 cm 长的组织作石蜡切片, 苏木素—伊红染色, 光镜下观察并用图像分析系统测量相关形态学参数。余下的动脉条用苏丹 Ⅲ染色, 作大体形态观察。结果发现, 随时间延长, 动脉粥样硬化组斑块面积逐渐增大, 斑块检出率逐渐增加 ($P < 0.05$), 且斑块多分布于头段, 而中段、尾段依次减少。管腔面积在早期斑块形成时并无改变, 晚期则明显缩小 ($P < 0.05$)。垂体腺苷酸环化酶激活肽组斑块面积、斑块最大厚度均小于同期动脉粥样硬化组, 而管腔面积则大于动脉粥样硬化组 ($P < 0.05$)。提示垂体腺苷酸环化酶激活肽可通过抑制负性血管重塑及促进正性血管重塑的作用而延缓动脉粥样硬化病变的进展。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide on Vascular Remodeling in Experimental Atherosclerotic Rabbits

REN Cai-Xia¹, CHANG Qing¹, LI Zi-Cheng², LI Jian-Zhi¹, TANG Hai-Lan¹, HUANG Hua-Mei¹, and GUAN Jie-Bin³

(1. Department of Histology & Embryology, 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, 3. The Animal Institute, Medical College of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

[MeSH] Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide; Atherosclerosis; Vascular Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on vascular remodeling in atherosclerotic rabbits. **Methods** 60 male New Zealand rabbits were divided randomly and equally into three groups: control group, atherosclerosis (As) group and PACAP group. 5~8 rabbits of each group were sacrificed at the end of the fourth, eighth and twelfth week and the thoracaortae were collected. The segments about 0.5 cm long from the beginning, middle and end part of the above aortae were obtained to be made into paraffin sections and stained with hematoxylin-eosin (HE), then the sections were observed by light microscope and the related parameters were measured by image analysis system. The rest part of the aortae were stained with Sudan Ⅲ and surveyed by naked eyes. **Results** Plaque area and percentage of plaque formation increased gradually with the proceeding of experiment in As group ($P < 0.05$), and plaque mostly located in the beginning segment, decreased in the middle and end segments in turn. Lumen area varied rarely in early plaque formation, while decreased significantly at the advanced stages ($P < 0.05$). Plaque area and maximal plaque thickness in PACAP group were smaller than those in As group, but lumen area was larger than that in As group ($P < 0.05$). **Conclusion** PACAP can retard the progression of As by inhibiting negative remodeling and promoting positive remodeling.

近年来血管重塑 (vascular remodeling, VR) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 血管腔狭窄中的作用越来越受到人们的重视。而对 VR 加以干预, 防止其向不利的方向发展, 可能成为防治管腔狭窄的一条新的途径。大量研究表明, 垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) 与心血管系统有着密切的联系^[1-3], 但其对

VR 有无干预作用尚未见报道。本研究通过复制家兔实验性 As 模型, 对兔胸主动脉进行定性观察和定量分析, 以证明 PACAP 是否对 VR 具有干预作用, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及标本采集

雄性新西兰家兔 60 只 (购自第一军医大学实验动物所), 体重 1.5~2.5 kg, 随机等分为 3 组: 对照组: 喂饲普通颗粒兔饲料; ④As 组: 喂饲含胆固醇颗粒兔饲料, 每兔每日进食胆固醇 1.5 g; ④PACAP

[收稿日期] 2002-06-26 [修回日期] 2002-11-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (39800068) 资助。

[作者简介] 任彩霞, 女, 1974 年出生, 组胚学硕士生, E-mail: dxrener@sina.com。常青, 女, 1963 年出生, 副教授, 硕士生导师。李自成, 男, 1962 年出生, 副教授, 硕士生导师。

组:除喂饲含胆固醇饲料外,从耳缘静脉注射 PACAP(日本 Kimura 博士惠赠),使兔血浆终浓度约为 10^{-8} mol/L,每周 3 次。分别于实验第 4、8 和第 12 周末随机处死每组家兔各 5~8 只,迅即取出胸主动脉,置中性福尔马林缓冲溶液中固定,在头、中、尾部各截取约 0.5 cm 长的组织制作常规石蜡切片,HE 染色,光镜下作定性观察及定量分析。余下的动脉条沿正中中线剪开,苏丹Ⅲ染色,进行大体观察。

1.2 测量参数

用 Tiger 2000 型图像分析系统(泰格尔图形图像工程技术研究室)进行测量。测量参数包括:内弹性膜周长、外弹性膜周长、斑块面积(plaque area, PA)、斑块最大厚度(maximal plaque thickness, MPT)。并计算内弹性膜包围面积(internal elastic laminal area, IELA)、外弹性膜包围面积(external elastic laminal area, EELA)、中膜面积(medial area, MA)和管腔面积(lumen area, LA)。公式如下:IELA=内弹性膜周长²/4 π , EELA=外弹性膜周长²/4 π , MA= EELA- IELA, LA= IELA- PA。头中尾段血管各取 3 张切片(间隔 30 μ m)进行测量,以其平均值作为该段测量值。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用 t 检验,多组比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

对照组血管内膜光滑、平坦,无斑块形成。As 组及 PACAP 组管壁粗糙,可见不同程度灰黄色斑块(苏丹Ⅲ染色后斑块呈鲜红色)隆起于内膜表面,且多分布于头段,中段和尾段依次减少。两组血管的斑块均随时间延长而逐渐呈弥漫性分布,在 12 周末时 As 组绝大部分血管的斑块互相融合,几乎布满整条血管的内膜面,而 PACAP 组斑块比同期 As 组的分布局限。

2.2 显微观察

对照组切片上未见斑块。As 组和 PACAP 组切片中可见内含泡沫细胞的斑块,且 PACAP 组大部分斑块较同期同部位 As 组的明显为小。随时间延长,各部分的斑块均呈进行性加重趋势。As 组 4 周末时头段多为散在的小斑块,而中段、尾段较少形成斑块;8 周末时头段多为大斑块弥漫性分布于管腔一侧,中段则可见多个中小斑块,而尾段斑块少于中段斑块;12 周末时斑块明显增大,且头段大多为同心性斑块覆盖于整个管腔表面,中段多为弥漫性分布的大斑块,尾段则可见多个中小斑块。PACAP 组 4 周末、12 周末的斑块均比 As 组小,且 12 周末时头段多为弥漫性分布的大中斑块,而很少见到同心性斑块(图 1, Figure 1)。

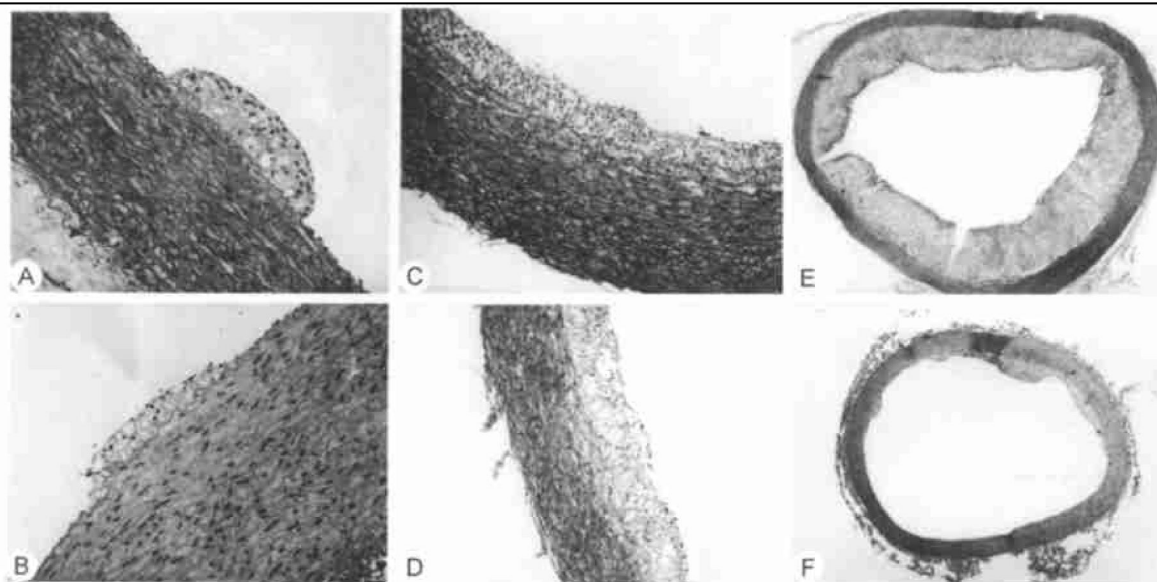


图 1. 光镜下动脉粥样硬化组与垂体腺苷酸环化酶激活肽组各时间点的胸主动脉头段横截面(HE 染色)。

Figure 1. Cross section of beginning segments of thoracaortae at different times in As group and PACAP group viewed after stained with HE under light microscopy. A: Section at 4th weekend in As group ($\times 100$), small plaque located dispersively at one side of the lumen; B: Section at 4th weekend in PACAP group ($\times 100$), plaque was smaller than that in As group; C: Section at 8th weekend in As group ($\times 50$), plaque became larger and located diffusely at one side of the lumen; D: Section at 8th weekend in PACAP group ($\times 50$), plaque was slightly larger than that in As group; E: Section at 12th weekend in As group ($\times 20$), plaque size increased significantly and concentric plaque covered totally the lumen surface; F: Section at 12th weekend in PACAP group ($\times 20$), plaque was smaller than that in As group and mainly was eccentric plaque.

2.3 形态测量结果

2.3.1 垂体腺苷酸环化酶激活肽组与动脉粥样硬化组斑块面积及斑块最大厚度比较 4 周末和 12 周末时 PACAP 组斑块面积及斑块最大厚度均小于 As 组。As 组 12 周末斑块面积大于 4 周末与 8 周末面积(表 1 和表 2, Table 1 and Table 2)。

表 1. 垂体腺苷酸环化酶激活肽组与动脉粥样硬化组斑块面积比较。

Table 1. Comparison of plaque area between PACAP group and As group (mm^2).

Time	As group(<i>n</i>)	PACAP group(<i>n</i>)
4th weekend	0.23 \pm 0.17(8)	0.03 \pm 0.03 ^a (6)
8th weekend	0.32 \pm 0.25(11)	0.35 \pm 0.38(8)
12th weekend	2.32 \pm 2.88 ^b (11)	0.13 \pm 0.13 ^a (5)

a: $P < 0.05$, compared with As group; b: $P < 0.05$, compared with 4th and 8th weekend. Numbers in the brackets show sample numbers.

表 2. 垂体腺苷酸环化酶激活肽组与动脉粥样硬化组斑块最大厚度比较。

Table 2. Comparison of maximal plaque thickness between PACAP group and As group(mm).

Time	As group(<i>n</i>)	PACAP group(<i>n</i>)
4th weekend	0.26 \pm 0.24(8)	0.07 \pm 0.01 ^a (6)
8th weekend	0.23 \pm 0.15(12)	0.16 \pm 0.09(8)
12th weekend	0.28 \pm 0.18(11)	0.06 \pm 0.03 ^a (6)

a: $P < 0.01$, compared with As group.

2.3.2 头段、中段、尾段斑块检出率比较 动脉粥样硬化组与 PACAP 组的斑块检出率均呈头段>中段>尾段的规律。PACAP 组斑块检出率从数值上看均小于同部位 As 组,但无统计学差异(表 3, Table 3)。

表 3. 垂体腺苷酸环化酶激活肽组与动脉粥样硬化组头段、中段、尾段斑块检出率比较。

Table 3. Comparison of the percentage of plaque formation in different segments between PACAP group and As group(%).

Site	As group	PACAP group
Beginning	88.89 ^a (16/18)	83.33 ^a (10/12)
Middle	61.11 ^b (11/18)	50.00 ^b (6/12)
End	50.00 ^{ab} (9/18)	33.33 ^{ab} (4/12)

a: $P < 0.01$, compared with middle segment; b: $P < 0.01$, compared with beginning segment.

2.3.3 动脉粥样硬化组、垂体腺苷酸环化酶激活肽组和正常对照组管腔面积比较 4 周末 PACAP 组管腔面积比 As 组及正常对照组的大,而 As 组与正常对照组间无差别。12 周末时 PACAP 组管腔面积仍比 As 组的大,而与正常对照组间无差别。As 组 12 周时的管腔面积与 4 周末、8 周末相比,出现了明显的狭窄(表 4, Table 4)。

表 4. 动脉粥样硬化组、垂体腺苷酸环化酶激活肽组和正常对照组管腔面积比较。

Table 4. Comparison of lumen area among As group, PACAP group and control group(mm^2).

Time	As group(<i>n</i>)	PACAP group(<i>n</i>)	Control group(<i>n</i>)
4th weekend	5.8 \pm 1.3(10)	8.8 \pm 3.5 ^{ab} (10)	5.3 \pm 1.4(12)
8th weekend	5.9 \pm 1.4(10)	4.3 \pm 1.3 ^a (10)	5.3 \pm 1.1(12)
12th weekend	4.2 \pm 2.1 ^c (13)	6.4 \pm 2.3 ^a (9)	5.4 \pm 1.1(15)

a: $P < 0.05$, compared with As group; b: $P < 0.05$, compared with control group; c: $P < 0.05$, compared with 4th and 8th weekend.

2.3.4 垂体腺苷酸环化酶激活肽组与动脉粥样硬化组中膜面积比较 4 周末、8 周末 3 组间中膜面积无差别,12 周末时 As 组中膜面积小于同期正常对照组的面积,同时也小于同组 4 周末的面积(表 5, Table 5)。

表 5. 动脉粥样硬化组、垂体腺苷酸环化酶激活肽组和正常对照组中膜面积比较。

Table 5. Comparison of media area among As group, PACAP group and control group(mm^2).

Time	As group(<i>n</i>)	PACAP group(<i>n</i>)	Control group(<i>n</i>)
4th weekend	2.26 \pm 0.67(10)	2.34 \pm 0.62(10)	2.50 \pm 0.59(12)
8th weekend	2.16 \pm 0.43(11)	2.07 \pm 0.27(12)	2.57 \pm 0.56(12)
12th weekend	1.70 \pm 0.46 ^{ab} (12)	2.28 \pm 0.86(10)	2.60 \pm 0.58(12)

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with 4th weekend.

3 讨论

血管重塑是在血流动力学及体液刺激作用下血管的动态构型变化过程,与很多因素有关,这些因素包括血流动力学刺激,氧化应激,细胞迁移、增殖、凋亡,细胞外基质的合成与降解,外膜的改变等。血管重塑可分为血管的正性重塑(或称为扩张性重塑、向外重塑、代偿性重塑)和负性重塑(或称为收缩性重塑、向内重塑、失代偿性重塑^[4,5])两种类型。正性重塑通过血管代偿性扩张来防止血管腔的狭窄,而负性重塑则由于斑块形成而代偿不足或血管收缩而导致血管腔的狭窄。目前对内膜增生(斑块形成)和

VR 的关系存在不同看法, 有人认为内膜增生和 VR 是两个独立的概念, 而另一些人则认为内膜增生是一种有害的 VR。Gibbons 等^[6]认为, VR 是细胞增殖、坏死、迁移以及细胞外基质合成、降解所致的动态性血管构型变化过程。我们认为内膜增生属于 VR, 而且是一种负性 VR。如果能对 VR 加以干预, 通过抑制斑块的形成(内膜增生)或促使血管代偿性向外扩张来抑制负性 VR 而促进正性 VR, 有可能达到防止管腔狭窄以及延缓 As 病变进展的目的。

垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAD)是由日本学者 Miyata 等^[7] 1989 年在羊下丘脑中发现的由 38 个氨基酸组成的神经肽, 因其氨基端的 28 个氨基酸残基中有 68% 与血管活性肠肽同源, 故被认为是促胰液素/胰高血糖素/血管活性肠肽家族中的新成员。研究表明, PACAP 与心血管系统有着密切的联系, 它不仅能扩张血管、降低血压、增加局部血流量等, 离体及在体研究还表明 PACAP 具有一定的抗 As 效应^[2,8], 如可对抗高脂因素对血管内皮细胞、血管平滑肌细胞造成的形态和功能的损伤, 增加内皮细胞抗 As 物质的产生, 明显抑制血管平滑肌细胞的增殖和极强的抗脂质过氧化作用等。但 PACAP 能否干预 As 的 VR, 尚未见报道。

本文发现, 随时间延长, As 组管壁斑块面积逐渐增大, 中膜面积呈下降趋势, 说明 As 病变随时间延长逐渐加重。4 周末和 12 周末时, PACAP 组斑块面积、斑块最大厚度均小于同期 As 组, PACAP 组中膜面积在 12 周末时大于 As 组。提示在 PACAP 干预作用下 As 病变有所减轻, PACAP 可能通过保护内皮细胞免受损伤, 抑制中膜平滑肌细胞增殖、迁移等作用, 减少斑块的形成(内膜增生), 从而起到抑制负性 VR 的作用。As 组管腔面积早期无改变, 晚期则明显缩小。PACAP 组管腔面积在 4 周末、12 周末时均大于 As 组, 与正常对照组相比, PACAP 组管腔面积在 4 周末时显著扩大, 12 周末时两者间无差别。表明在病变初期, As 组和 PACAP 组并不因斑块形成而发生管腔的狭窄, 而是存在血管壁的向外扩张, 以代偿斑块形成可能导致的管腔阻塞。PACAP 组的代偿作用显著强于 As 组, 且持续时间也比 As 组长。这说明血管在斑块形成早期具有代偿性扩张的能力, 而且 PACAP 可以促进血管的这种代偿性向外扩张, 即 PACAP 具有促进正性血管重塑的作用。有研究报道血管的这种代偿作用是内皮依赖性的, 内皮源性血管扩张剂一氧化氮(nitric oxide, NO)在其中起着非常重要的作用。当血管内斑块增加时

局部剪切力增加, 后者刺激内皮细胞在内皮型一氧化氮合酶的作用下合成 NO, NO 主要通过激活平滑肌细胞内鸟苷酸环化酶而使平滑肌松弛, 从而促使动脉扩张^[9]。本课题组研究发现, PACAP 确可促进 NO 的产生, 而且 PACAP 还可以促使内皮细胞分泌扩血管物质前列环素^[2]。可能在大量 NO 和前列环素的作用下, PACAP 组血管代偿作用增强, 从而促使管腔明显扩大; 但这种代偿作用并不是无限制的。研究发现随病变进展, As 组及 PACAP 组的代偿作用都有所下降, 这也证明了 Glagov 等^[10]的研究结果, 即病变早期血管具有代偿作用, 管腔不会发生狭窄, 而在病变晚期血管代偿作用减弱, 血管壁不再向外扩张而使管腔变窄。PACAP 组的管腔面积在病变晚期虽没有出现狭窄, 但其代偿作用也随病变的进展而有所下降, 可能和 NO 的氧化失活及剪切力水平 $> 380 \text{ dynes/cm}^2$ 时导致细胞死亡及内皮剥脱有关^[11]。

本实验中 PACAP 组 8 周末组织学观测的个别指标(如管腔面积)与整体结果不符, 考虑可能由个体差异、切片抽样误差及管腔变形等因素造成。但从大体形态观察来看, 各组病变仍表现出明显的规律, 即 As 组病变随时间延长逐渐加重, PACAP 组病变比同期同部位 As 组的有所减轻。

[参考文献]

- [1] Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, et al. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological Reviews*, 2000, **52** (2): 269-324
- [2] 常青. 垂体腺苷酸环化酶激活肽对血管壁细胞成分的作用及其机制的实验研究. *生理科学进展*, 1997, **28** (2): 132-135
- [3] 常青. 垂体腺苷酸环化酶激活肽及其生物学效应. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (1): 79-82
- [4] Pasterkamp G, de Kleijn DPV, Borst C. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Res*, 2000, **45** (4): 843-852
- [5] Herity NA, Ward MR, Lo S, et al. Review: Clinical aspects of vascular remodeling. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999, **10** (7): 1 016-024
- [6] Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *Mechanisms of Disease*, 1994, **330** (20): 1 431-438
- [7] Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al. Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulate adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **164** (1): 567-574
- [8] 李建芝, 常青, 黄华梅, 等. 垂体腺苷酸环化酶激活肽对动脉粥样硬化形成过程中脂质过氧化的影响. *解剖学研究*, 2002, **24** (1): 28-29
- [9] Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*, 2000, **47** (3): 426-435
- [10] Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 1987, **316** (22): 1 371-375
- [11] Lutgens E, de Muinck ED, Heeneman S, et al. Compensatory enlargement and stenosis develop in *Angiotensin II* and *Angiotensin II* 3-Leiden transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (8): 1 359-365

(此文编辑 曾学清)