

内皮细胞功能的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系

李大勇¹, 马贤德², 陈文娜², 李鑫¹, 李世征¹, 侯俊杰¹, 李雪晶¹

(1. 辽宁中医药大学附属医院血管外科, 2. 辽宁中医药大学教学实验中心, 辽宁省沈阳市 110032)

[关键词] 循环内皮细胞; 动脉硬化闭塞症; 血流灌注; 白细胞介素 1; 肿瘤坏死因子 α

[摘要] **目的** 探讨内皮细胞功能的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系。**方法** 采用高脂饮食喂养及动脉内膜损伤的方法制作大鼠动脉硬化闭塞症模型, 分别于造模后 4、8、12 周用激光多普勒血流仪观测肢体血流灌注, 光镜、透射电镜观察动脉大体形态, Percoll 密度梯度离心法测定循环内皮细胞数量, 酶联免疫吸附双抗体夹心法检测血清中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1、内皮素 1 和一氧化氮水平。**结果** 成功建立了大鼠动脉硬化闭塞症模型, 造模后各组大鼠左后肢血流灌注量明显下降, 外周血中循环内皮细胞数量明显增多, 血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1、内皮素 1 水平均较正常对照组明显升高, 一氧化氮水平较正常对照组明显降低 ($P < 0.01$)。**结论** 内皮细胞的损伤及分泌功能的异常是动脉硬化闭塞症发生的重要病理过程, 保护血管内皮细胞, 改善血管内皮细胞的分泌功能, 应是动脉硬化闭塞症早期重要的治疗原则。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Relationship Between the Changes of Endothelial Cell Function and Pathogenesis of Arteriosclerosis Obliterans

LI Da-Yong¹, MA Xian-De², CHEN Wen-Na², LI Xin¹, LI Shi-Zheng¹, HOU Jun-Jie¹, and LI Xue-Jing¹

(1. Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang, Liaoning 110032, China; 2. Teaching Experimental Center, Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang, Liaoning 110032, China)

[KEY WORDS] Circulating Endothelial Cell; Arteriosclerosis Obliterans; Blood Perfusion; Interleukin-1; Tumor Necrosis Factor- α

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the relationship between the changes of endothelial cell function and pathogenesis of arteriosclerosis obliterans (ASO). **Methods** ASO models were constructed with the method of high-fat diet plus intimal injury, at 4, 8 and 12 weeks after operation, the limb blood perfusion was observed using laser doppler flowmetre, the arterial morphology was observed using light microscopy and transmission electron microscopy, using percoll density gradient centrifugation method to determine the number of circulating endothelial cells (CECs), serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) levels were detected using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) double antibody sandwich assay. **Results** Rat models of ASO were established successfully, the left limb blood perfusion was significantly decreased after operation, the serum TNF- α , IL-1, ET-1 levels were significantly higher, and the level of NO was significantly less than normal control after operation, and there was significant difference ($P < 0.01$). **Conclusions** The injury of endothelial cells and its secretory function is the important pathological process of ASO, and protecting vascular endothelial cells, improving endothelial cell secretion function, should be important therapeutic principles in early ASO.

动脉硬化闭塞症 (arteriosclerosis obliterans, ASO) 是动脉粥样硬化所致的慢性动脉闭塞性疾病,

亦是周围动脉疾病的重要组成部分^[1,2]。血管内皮细胞是人体最大的内分泌器官, 其分泌功能的异常

[收稿日期] 2013-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金 (81173273); 辽宁省自然科学基金 (201202154); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划 (LJQ2012083); 沈阳市科学技术项目 (F12-277-1-73)

[作者简介] 李大勇, 博士, 教授, 研究方向为肢体缺血性疾病的发病机制及其中西结合治疗, E-mail 为 sylidy@yahoo.com.cn。马贤德, 硕士, 讲师, 研究方向为细胞生物学。陈文娜, 硕士, 副教授, 研究方向为生物技术与中医药临床。

可导致血液成分和状态的异常改变,不仅促进了动脉粥样硬化的进程,同样决定了ASO的发展、预后和转归。本研究拟通过大鼠ASO模型探讨动脉内皮细胞功能的变化与ASO发病的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

酶联免疫吸附双抗体夹心法检测试剂盒购自上海越研生物技术有限公司,白细胞介素1(interleukin-1, IL-1;批号 AE98022Ra),肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α ;批号 AE90133Ra),内皮素1(endothelin-1, ET-1;批号 AE90650Ra),一氧化氮(nitric oxide, NO;批号 201209)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗鼠CD31、抗VIII因子-FITC多克隆抗体购自武汉博士德生物公司。

1.2 主要设备

电热恒温培养箱(HH·B11·500,上海),微量移液器(Thermo,美国),酶标仪(Anthos2010,奥地利),多通道激光多普勒血流检测仪(Moor VMS,英国),透射电镜(JEM-1200EX,日本)。

1.3 实验动物模型的制备及分组

6个月龄清洁级Wistar大鼠40只,体质量 250 ± 20 g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供。高脂饲料组成:62.8%基础饲料+20%猪油+150 g/L胆固醇+20 g/L胆酸钠+2 g/L丙基硫氧嘧啶。联合采用高脂饮食喂养及隐动脉内膜损伤的方法制作大鼠ASO模型。实验前适应性喂养1周,排除饮食异常大鼠,高脂饮食喂养1周后于清洁动物实验室内用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,每只大鼠均取左后肢消毒。从腹股沟中点向后肢内侧纵行切开皮肤,分离并暴露隐动脉,动脉夹阻断隐动脉远、近端共1.5~2.0 cm,取胰岛素注射器1支,沿隐动脉血管长轴从远端向近端刺入血管腔,将0.2~0.3 mL注射用无菌蒸馏水缓慢注入阻断部位血管,至血管充盈为止。5 min后取下针头和动脉夹,压迫止血,缝合切口。内膜损伤模型完成后仍继续每日饲喂高脂饮食,并应用维生素D3(300 ku/kg),右后肢肌肉注射,每4周进行1次。共制作大鼠ASO模型30只,按随机数字表分为4周组、8周组、12周组,每组10只。另取10只清洁级Wistar大鼠作为正常对照组。

1.4 肢体血流灌注测定

在每组大鼠的实验终点,用激光多普勒流仪记录每只大鼠左后肢的血流灌注量、血细胞浓度、

血流速度和皮肤温度。

1.5 标本收集

肢体血流灌注检测完成后,麻醉大鼠方法同前,腹部消毒,剪开皮肤,由腹主动脉采血4~5 mL,分为两份,1份于肝素钠抗凝管中待测循环内皮细胞(circulating endothelial cell, CEC)数;余1份2500 r/min离心5 min后,分离血清, -80℃保存,用于血脂及免疫学检测。游离出左隐动脉上段,剪下约1 cm,分成两部分,分别于4%多聚甲醛溶液和2.5%戊二醛溶液中固定保存。快速切取左后肢内收肌群,用4%多聚甲醛溶液固定。

1.6 新生毛细血管密度检测

组织标本制成4 μ m厚石蜡切片,行CD31免疫组织化学染色,显微镜下每张切片随机取5个高倍视野(200 \times),计数成簇的CD31阳性细胞的平均值,用于反映新生的毛细血管密度。

1.7 透射电镜检测血管壁超微结构

2.5%戊二醛固定的血管以PBS漂洗,1%锇酸再固定,PBS漂洗,梯度酒精(30%~100%)、100%丙酮脱水,Epon 812浸透、包埋、聚合,半薄切片定位血管,超薄切片70 nm,醋酸铀、柠檬酸铅染色,镜下观察、摄片。

1.8 CEC检测

取1.5 mL淋巴细胞分离液于离心管中,将1 mL肝素钠抗凝管中外周血用玻璃吸管缓慢加入淋巴细胞分离液面上部,1800 r/min离心15 min,弃去上层血浆层,尽量取出全部第2层环状乳白色淋巴细胞层,加PBS液混匀,1300 r/min离心5 min,弃上清液,取下层细胞悬液,滴于血细胞计数池中,光镜下计数9个大方格的CEC数,同一标本计数4次,取平均值(单位为cells/0.9 μ L)。另取下层细胞悬液100 μ L,加入500 μ L多聚甲醛4℃固定10 min,取50 μ L各测细胞悬液于专用EP管中,加入2 μ L抗VIII因子-FITC抗体,振荡混匀,室温避光孵育30 min,加入PBS液混匀,1300 r/min离心5 min,弃上清液,加入50 μ L PBS液重悬细胞,于荧光显微镜下观察阳性细胞(表达绿色荧光)。

1.9 血脂及内皮细胞功能指标检测

应用全自动生化分析仪进行血脂测定。采用酶联免疫吸附双抗体夹心法检测血清中IL-1、TNF- α 、ET-1含量,具体检测过程严格按照试剂盒说明书步骤进行操作,于450 nm处检测各孔吸光度(OD)值,根据标准品浓度及相应OD值拟合标准曲线及方程,计算各检测孔中待测因子的浓度。采用化学法对各组大鼠血清中NO含量进行检测,具体检测

过程严格按照试剂盒说明书步骤进行操作,于 540 nm 比色,根据公式计算各待测样本中 NO 含量。

1.10 统计学方法

用 SPSS 11.0 进行统计描述和分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异性比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

各组大鼠均成活至标本采集,造模后恢复较好,切口愈合良好。造模后 1 周以内,部分大鼠患侧肢体呈拖拉步态,但 1 周后均逐渐恢复正常。

2.2 肢体血流灌注

与正常对照组相比,造模后各组大鼠左后肢的血流灌注量、血细胞浓度、血流速度及皮肤温度均明显下降 ($P < 0.01$)。其中以 4 周组数值最低,至 8

周和 12 周时均有所改善(表 1)。

表 1. 各组大鼠肢体血流灌注情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1. The limb blood perfusion of rats in each group

分 组	血流灌注量 (PU)	血细胞浓度 (CU)	血流速度 (mm/s)	皮肤温度 (°C)
正常对照组	107.9 ± 9.2	267 ± 23.5	19.9 ± 2.1	29.4 ± 0.5
4 周组	23.1 ± 2.8 ^a	163 ± 13.6 ^a	7.4 ± 0.8 ^a	28.1 ± 0.3 ^a
8 周组	65.7 ± 5.4 ^a	187 ± 16.7 ^a	18.5 ± 1.5	28.3 ± 0.3 ^a
12 周组	83.4 ± 7.9	222 ± 20.1	20.6 ± 2.8	28.6 ± 0.6

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比。

2.3 隐动脉病理学变化

正常对照组大鼠隐动脉内皮细胞、内弹力板及平滑肌细胞均排列规整,血管腔未见狭窄。造模后 4 周时大鼠隐动脉管腔不规则狭窄,动脉壁内皮细胞、内弹力板及平滑肌细胞均排列紊乱;8 周时大鼠隐动脉管腔进一步狭窄,动脉壁结构紊乱;12 周时大鼠隐动脉内膜增厚,管腔部分闭塞(图 1)。

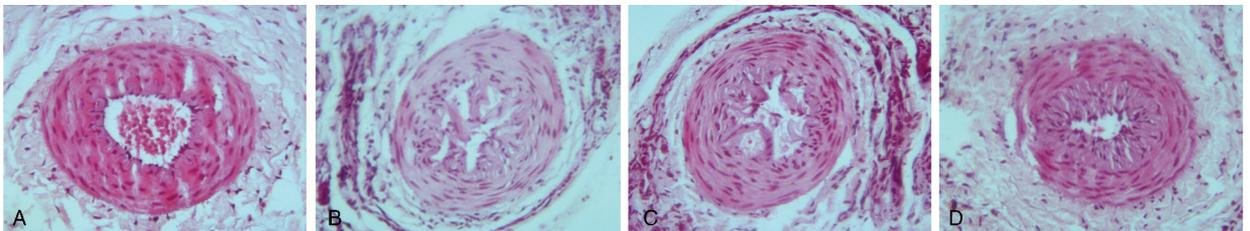


图 1. 隐动脉 HE 染色 ($\times 50$) A 为正常对照组, B 为 4 周组, C 为 8 周组, D 为 12 周组。

Figure 1. HE staining of saphenous artery

2.4 新生毛细血管密度变化

正常对照组大鼠肌肉中有少量 CD31 阳性表达 (1.2 ± 0.2 /高倍视野),造模后各组大鼠左后肢肌肉中 CD31 表达逐渐增多,其中 8 周组表达最多 (4.8 ± 0.5 /高倍视野)。

2.5 隐动脉血管壁超微结构的变化

正常对照组大鼠内皮细胞形态完整,覆于血管腔面,内弹力板清晰,无破坏。造模后各组内皮细胞不连贯,内膜不完整,内皮下层暴露于血管腔面,内弹力板部分破坏,平滑肌细胞变形,核浓聚,并向内膜迁移,造模后 8 周组的变化更为明显(图 2)。

2.6 血脂水平改变

与正常对照组相比,造模后各组大鼠的血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 水平明显升高,高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平明显降低 ($P < 0.01$; 表 2)。

2.7 CEC 数量

正常对照组外周血中 CEC 数量极少,造模后各

组大鼠外周血中 CEC 数量明显增多 ($P < 0.01$)。造模后各组间大鼠外周血中 CEC 数量比较差异无显著意义 ($P > 0.05$; 表 3)。VIII 因子相关抗原免疫荧光染色发现阳性细胞超过 95%。

2.8 免疫学指标变化

造模后各组大鼠的血清 TNF- α 、IL-1、ET-1 水平均较正常对照组明显升高,血清 NO 水平较正常对照组明显降低 ($P < 0.01$; 表 3)。

表 2. 各组大鼠血脂水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2. Blood lipid levels of rats in each group

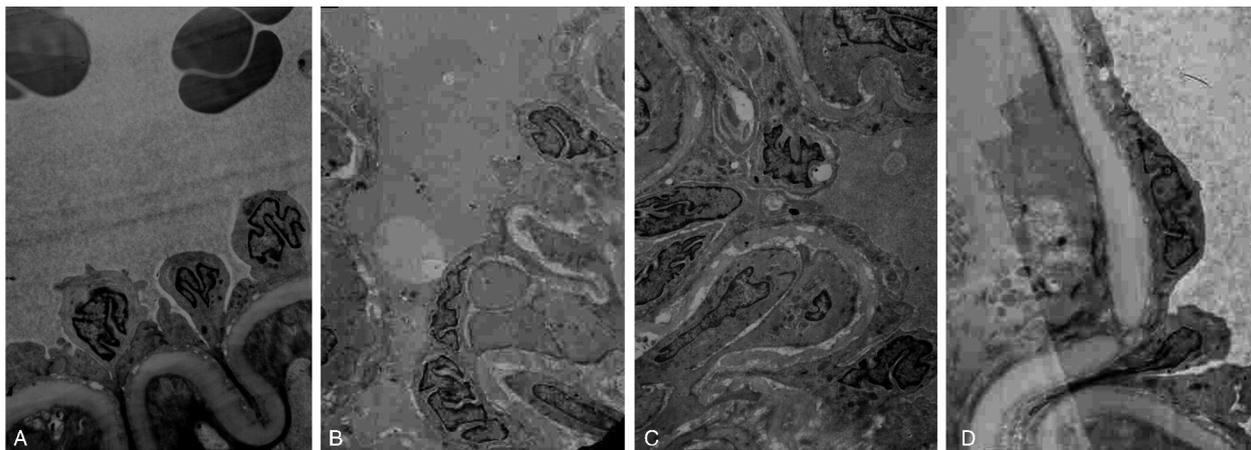
分 组	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)
正常对照组	0.55 ± 0.07	2.71 ± 0.24	1.21 ± 0.17	1.81 ± 0.19
4 周组	1.80 ± 0.15 ^a	8.20 ± 0.76 ^a	6.62 ± 0.74 ^a	0.81 ± 0.07 ^a
8 周组	1.88 ± 0.21 ^a	9.01 ± 0.93 ^a	7.54 ± 0.69 ^a	1.03 ± 0.11 ^a
12 周组	1.76 ± 0.18 ^a	7.72 ± 0.79 ^a	5.92 ± 0.61 ^a	0.67 ± 0.07 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比。

表 3. 各组大鼠 TNF- α 、IL-1、ET-1、NO 水平及 CEC 数量的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3. Levels of serum TNF- α , IL-1, ET-1, NO and CEC numbers of rats in each group

分 组	TNF- α (ng/L)	IL-1 (ng/L)	ET-1 (ng/L)	NO(μ mol/L)	CEC(cells/0.9 μ L)
正常对照组	13.11 \pm 1.23	73.94 \pm 6.25	35.24 \pm 2.98	19.39 \pm 1.51	0.9 \pm 0.2
4 周组	29.39 \pm 2.51 ^a	117.22 \pm 10.65 ^a	81.47 \pm 7.65 ^a	11.91 \pm 0.97 ^a	4.5 \pm 1.1 ^a
8 周组	31.29 \pm 2.68 ^a	119.24 \pm 11.25 ^a	90.98 \pm 8.73 ^a	12.72 \pm 1.04 ^a	5.1 \pm 1.6 ^a
12 周组	26.45 \pm 2.23 ^a	112.87 \pm 9.84 ^a	97.05 \pm 9.21 ^a	12.32 \pm 1.15 ^a	4.8 \pm 1.2 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比。

图 2. 透射电镜观察隐动脉血管壁超微结构的变化($\times 3000$)

A 为正常对照组, B 为 4 周组, C 为 8 周组, D 为 12 周组。

Figure 2. Ultrastructure of the saphenous artery wall by transmission electron microscope

3 讨论

目前尚缺乏经典的 ASO 动物模型, 但脂质代谢紊乱结合免疫损伤的方法值得重点关注。大鼠具有饲养方便、抵抗力强, 食性与人相近的特点, 能够用于动脉粥样硬化的研究。本研究中给大鼠饲喂高脂饮食, 其中胆盐能明显增加大鼠对胆固醇的吸收, 丙基硫氧嘧啶能减少胆固醇的代谢, 血中总胆固醇、甘油三酯、LDL 的含量明显升高。予维生素 D3 注射后, 血钙浓度迅速升高, 加速了动脉粥样硬化的进程, 再结合蒸馏水损伤动脉内膜, 能在短时间内制成 ASO 模型, 该模型能较好地模拟人 ASO 的病理变化^[3]。

本研究中病理学检测发现, 造模后的 8~12 周, 内皮细胞脱落、平滑肌细胞向内膜迁移、增殖, 病变的动脉出现了明显的狭窄及闭塞改变, 是由于蒸馏水的低渗作用, 致内皮细胞最初发生空泡变性、坏死, 随着血流的再通而脱落, 破坏内膜的平滑性和完整性, 出现通透性和分泌功能障碍, 促进血液中的脂质进入动脉壁, 最终导致了 ASO 的局部病理变化。笔者研究发现, 行裸鼠股动脉单纯结扎即出现

了明显的后肢缺血坏疽^[4], 本模型针对大鼠的隐动脉进行造模, 虽然发现在隐动脉的病理改变上与人 ASO 极为相似, 但大鼠并未出现明显的后肢跛行或坏疽。从大鼠局部解剖分析^[5], 髂外血管、股血管自近而远分支有旋股内侧和外侧血管、旋髂深和旋髂浅血管、腹壁浅血管、股血管肌支、隐血管、膝最上血管, 各血管间存在丰富的血管网状交通, 故处理单支血管并未出现明显的缺血体征。从左后肢血流灌注和肌肉中新生毛细血管密度的检测发现, 造模后随着时间的延长, 左后肢内收肌群中存在明显的血管新生, 既往的研究表明, 这应是肢体缺血后炎性及血管新生相关因子引发的代偿性病理过程^[6]。

CEC 是指能够在外周血中测得的血管内皮细胞。正常人体内 CEC 数量非常少, 然而在内皮受损的病理状态下, CEC 会发生数量的变化, CEC 是目前在活体内唯一可以直接反映血管内皮损伤的标志物^[7,8]。血管内皮的损伤, 可启动一系列反应来诱导动脉粥样硬化的发生, 也是 ASO 的早期病理过程之一。本研究采用密度梯度离心法检测发现, 造模后大鼠外周血中 CEC 数量明显增多, 表明内皮细

胞的损伤与 ASO 的发病存在密切关系,由于内皮细胞层的破坏,诱发了血中脂质沉积、平滑肌细胞迁移、斑块形成等继发病理过程,最终导致动脉腔的狭窄甚至闭塞。

ET-1 是由血管内皮细胞分泌的一种强有力的收缩肽,具有强烈的缩血管和促细胞增殖作用^[9],是目前所知作用最强和作用时间最持久的缩血管物质。血管内皮损伤时,ET-1 合成和释放增加,参与了动脉粥样硬化的过程。NO 亦由血管内皮细胞分泌,在生理浓度下能舒张血管,抑制血小板的聚集和黏附,抑制平滑肌细胞增殖,是能阻止动脉粥样硬化病程发展的内皮保护因子^[10]。造模后的免疫学检测发现,大鼠血清中 ET-1 的水平显著升高,NO 的水平明显下降,进一步证实了内皮细胞功能受损是 ASO 早期的重要病理过程。

动脉粥样硬化是一种与炎症反应密切相关的疾病,促炎因子 TNF- α 被认为是炎症反应中最重要的启动因子,它可以促进中性粒细胞聚集,活化凝血因子,进而诱发动脉粥样硬化^[11]。IL-1 可刺激内皮细胞产生反应性氧分子,使血管通透性增加以及产生有细胞毒性的脂质过氧化物,提高凝血酶原活性,促进中性粒细胞对血管壁的黏附及平滑肌细胞增殖,导致血管壁损伤、增厚、血栓形成。本研究发现,正常对照组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 表达水平相对较低,造模后二者的表达水平明显升高,且持续很长时间,提示了与动脉粥样硬化的发病类似,在 ASO 发病过程中,血液中的单核-巨噬细胞系统、血管内皮细胞和平滑肌细胞的分泌功能均处于相对旺盛的状态,诸多炎症因子引发的炎症反应在 ASO 的发病中亦具有重要作用。因此,调节内皮细胞的功能,抑制促炎细胞因子的分泌,能够从始动环节干预 ASO 的级联反应。

总之,内皮细胞的损伤及分泌功能的异常是 ASO 发生的重要病理过程,保护血管内皮细胞并改善血管内皮细胞的分泌功能,应是 ASO 早期重要的治疗原则。

[参考文献]

- [1] Moriya J, Minamino T, Tateno K, et al. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2009, 2 (3): 245-254.
- [2] Aronow WS. Office management of peripheral arterial disease[J]. *Am J Med*, 2010, 123 (9): 790-792.
- [3] 车兆义, 宋清斌, 张继文, 等. 大鼠动脉硬化闭塞模型两种构建方法的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12 (50): 9 841-844.
- [4] 李大勇, 郑巧楠, 袁明殿, 等. 裸鼠肢体缺血后炎症细胞浸润及相关因子表达的动态变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14 (41): 7 665-670.
- [5] 林海涛, 陈振光, 郑晓晖, 等. 大鼠股部血管解剖及其在骨组织工程血管化模型中的应用[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2008, 29 (3): 338-341.
- [6] 李大勇, 谷峰, 陈文娜, 等. 肢体缺血后代偿性血管新生及相关基因表达的动态变化和意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (12): 961-965.
- [7] Eleftheriou D, Ganesan V, Hong Y, et al. Endothelial injury in childhood stroke with cerebral arteriopathy: A cross-sectional study [J]. *Neurology*, 2012, 79 (21): 2 089-096.
- [8] 董红梅, 黄岚, 宋耀明, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆氧化型低密度脂蛋白、高敏 C 反应蛋白与血管内皮损伤的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (3): 227-229.
- [9] Raina A, Horn ET, Benza RL. The pathophysiology of endothelin in complications after solid organ transplantation: a potential novel therapeutic role for endothelin receptor antagonists [J]. *Transplantation*, 2012, 94 (9): 885-893.
- [10] Madden JA. Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke[J]. *Neurology*, 2012, 79 (13 Suppl 1): S 58-62.
- [11] Jeong YJ, Cho HJ, Whang K, et al. Melittin has an inhibitory effect on TNF- α -induced migration of human aortic smooth muscle cells by blocking the MMP-9 expression [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50 (11): 3 996-4 002.

(此文编辑 文玉珊)