

兔动脉粥样硬化过程中主动脉内膜水含量变化的研究

曹建成, 刘伏元, 沈启明, 严激

(安徽医科大学附属省立医院心内科, 安徽省合肥市 230001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 主动脉; 血管内膜; 兔; 水含量

[摘要] **目的** 研究高脂饮食复制兔动脉粥样硬化过程中主动脉内膜水含量的变化。**方法** 将 45 只新西兰大白兔随机分为普通饲料组(对照组)、高脂饲料组(高脂组)和高脂饲料加辛伐他汀组(辛伐他汀组), 每组 15 只。在饲养的第 8、16、24 周末分别检测对照组、高脂组和辛伐他汀组血清中总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇的浓度, HE 染色观察主动脉的病理形态学变化并测量内膜厚度变化; 将高脂组和辛伐他汀组主动脉弓内膜剥离, 用真空冷冻干燥方法检测粥样硬化斑块内膜中水含量的变化。**结果** ①高脂组血清中总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇浓度均高于对照组和辛伐他汀组($P < 0.05$)。②对照组主动脉内膜薄而光滑; 高脂组动脉内膜明显增厚, 光镜下可见大量泡沫细胞和脂质斑块; 辛伐他汀组内膜局限性增厚, 斑块局限, 泡沫细胞数目减少、体积变小。③高脂饮食诱导兔形成动脉粥样硬化过程中, 高脂组 16 周、24 周与 8 周相比粥样硬化斑块内膜中水含量明显减少, 24 周与 16 周相比也明显减少($P < 0.05$); 辛伐他汀组 16 周、24 周斑块内膜中水含量较高脂组相同时间点增多($P < 0.05$)。**结论** 兔动脉粥样硬化形成过程中, 随时间延长粥样硬化斑块内膜中水含量减少。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

The Change of Water Content in Aortic Intima of Rabbit During Atherosclerosis

CAO Jian-Cheng, LIU Fu-Yuan, SHEN Qi-Ming, and YAN Ji

(Department of Cardiology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Aorta; Tunica Intima; Rabbits; Water Content

[ABSTRACT] **Aim** To research the change of water content in the atherosclerotic rabbits' aortic intima during atherosclerosis at 8th, 16th, 24th week after high-cholesterol diet. **Methods** 45 New Zealand rabbits were divided into common control group, high-cholesterol diet group and simvastatin group randomly and equally. At the end of 8th, 16th and 24th week, we detected the serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) respectively. Aorta were stained with hematoxylin-eosin and were studied with optical microscope. The changes of thickness of aortic intimal were measured and aortic intima of aortic arch were stripped. The water content of atherosclerotic plaques was detected with the vacuum freeze drying. **Results** ①The serum levels of total cholesterol, triglyceride and low density lipoprotein cholesterol concentrations were higher in high-cholesterol diet group ($P < 0.05$). ②Common control group: the intima was smooth and glossy; High-cholesterol diet group: the intima was thicker and a lot of foam cells and fatty streak plaques in the intima; Simvastatin group: thinner of intima and fewer foams cells and fatty steak plaques than high-cholesterol group. ③In the high-cholesterol diet group, the atherosclerosis was formed and the water content in 16th and 24th week group was lower than 8th week group ($P < 0.05$). Compared with that of 16th week, the water content was reduced at the end of 24th week ($P < 0.05$). In the simvastatin group, the water content was much more than the high-cholesterol diet group at the end of 16th and 24th week ($P < 0.05$). **Conclusion** During atherosclerosis of rabbit, the water content was reduced in atherosclerotic plaques.

动脉粥样硬化是心脑血管疾病常见的病理机制, 由多种因素参与形成^[1]。其中高血脂是一个重

要的危險因素, 血浆中脂质水平的升高促使大量脂质特别是低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprot-

[收稿日期] 2013-08-07

[作者简介] 曹建成, 硕士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 cjcjn@126.com。通讯作者刘伏元, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及高血压病的预防和治疗, E-mail 为 liufuyuan@med-mail.com.cn。沈启明, 硕士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

ein cholesterol, LDLC) 进入动脉血管壁内膜, 发生氧化反应。由于局部黏附分子的存在, 巨噬细胞迁移进入内皮下并吞噬已氧化的低密度脂蛋白后形成泡沫细胞; 同时, 平滑肌细胞的增殖迁移和细胞间质的合成增多等使血管内膜增厚, 促使动脉粥样硬化病变发生^[2]。临床治疗动脉粥样硬化时, 最担忧的是粥样硬化斑块破裂导致严重心血管事件发生, 这与不同病变程度的粥样硬化斑块中脂质核心的大小、炎症细胞和纤维结缔组织的数量、钙化的程度等相关^[3]。目前国内外对于粥样斑块稳定性的研究多侧重于脂质核心的大小、斑块内炎症细胞和结缔组织的数量等方面。是否存在其他原因影响斑块的稳定性? 粥样斑块的稳定性是否和斑块局部的水含量相关? 这些都是亟待探讨的问题。家兔因对高脂饲料的敏感性高, 容易发生高脂血症及动脉粥样硬化而成为建立高脂血症和动脉粥样硬化模型应用最广泛的动物^[4]。本文通过高脂饮食建立兔动脉粥样硬化模型, 观察第 8、16、24 周时主动脉内膜水含量的变化。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

雄性新西兰大白兔 45 只(购自安徽医科大学实验动物中心), 经检测大白兔血脂水平在正常范围, 体重 1.92 ± 0.26 kg。随机分为 3 组: 对照组(15 只): 每日普通饲料喂养; 高脂组(15 只): 每日高脂饲料喂养(每单位重量普通饲料里含 5% 猪油、5% 植物油、15% 鸡蛋黄和 0.5% 胆固醇); 辛伐他汀组(15 只): 饲料同高脂组, 并于喂养第 8 周后给予辛伐他汀 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 喂服。喂养后第 8、16、24 周设为时间点, 每次处死 5 只, 用于下游指标检测。

1.2 主要试剂和设备

血脂测定试剂盒(Hitachi, 日本), 全自动生物化学分析仪(Olympus AU5400, 日本), 台式高速离心机(Beckman, 美国), 病理切片机(Leica, 德国), Jeda 801D 形态学图像分析系统, YB-FD-1 台式冷冻干燥机(上海亿倍公司)。

1.3 外周血血脂检测

对照组、高脂组和辛伐他汀组每只大白兔分别第 8、16、24 周末清晨空腹状态下从兔耳缘静脉抽血 5 mL, 离心后检测血清血脂水平, 包括: 总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、LDLC。

1.4 升主动脉病理形态学检测

分别于第 8、16、24 周末从对照组、高脂组和辛

伐他汀组各随机挑选 5 只大白兔, 称重麻醉后, 快速完整取出全段主动脉, 取主动脉弓备用; 余下部分放入冰浴 PBS 液中去除血液, 剥去血管外膜的纤维脂肪层。取兔升主动脉长度 $1.0 \sim 1.5 \text{ cm}$ (近主动脉弓), 4% 多聚甲醛溶液固定血管标本后常规石蜡包埋, 于与升主动脉长轴垂直的横截面连续切片, 片厚 $4 \mu\text{m}$, 行 HE 染色。切片常规脱蜡, 苏木精染液染色 5 min 染细胞核; 流水稍洗去苏木精液 1~3 s 后放入 1% 盐酸乙醇 1~3 s, 脱去胞质着色, 稍水洗 10~30 s, 蒸馏水过洗 1~2 s 后 0.5% 伊红液染色 1~3 min, 蒸馏水稍洗 1~2 s 后二甲苯透明、中性树胶封片后观察。

1.5 主动脉内膜厚度的测定

采用 Jeda 801D 形态学图像分析系统测量各组升主动脉平均内膜厚度(intima thickness, IT)。光镜 200 倍下测量 HE 切片内膜最厚处、中间 2 点和最薄处 4 组数值, 取均值作为该张切片平均内膜厚度。

1.6 主动脉弓内膜水含量测定

取高脂组和辛伐他汀组兔主动脉弓, 用滤纸充分吸干血管内膜表面可能存在的少许水分后, 使用眼科手术器械及刀片剥离血管内膜, 放入已称重的 EP 管后称重, 即可得出剥离下的血管内膜的重量。将血管内膜置于真空冷冻干燥箱中, 使用真空冷冻干燥法, 使血管内膜脱水至恒定重量, 表明脱水完全。将完全脱水后的血管内膜再次放入已称重的 EP 管进行称重, 即可得出脱水后内膜的重量。脱水前内膜的重量减去脱水后内膜的重量即为血管内膜中水的含量, 而水含量除以脱水前血管内膜的重量即为剥离下的内膜中水含量的百分比。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件包, 正态性分布资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血血脂浓度的变化

对照组血清中的 TC、TG、LDLC 浓度在各时间点均无明显变化($P > 0.05$); 高脂组血清中的 TC、TG、LDLC 浓度第 16 周和第 24 周均较第 8 周明显升高, 第 24 周较第 16 周亦明显升高, 且高脂组中第 8、16、24 周的血清 TC、TG、LDLC 浓度均较对照组相同时间点升高($P < 0.05$); 辛伐他汀组中第 8、16、24 周的血清 TC、TG、LDLC 浓度均较对照组相同时间点升高, 但 16 周、24 周较高脂组相同时间点降低(P

<0.05)(表1)。

表 1. 实验兔外周血脂浓度的变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1. Changes of serum lipid concentrations in peripheral blood of rabbits ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	时 间	TC	TG	LDLC
对照组	第 8 周	1.46 ± 0.12	1.21 ± 0.02	0.82 ± 0.03
	第 16 周	1.54 ± 0.07	1.22 ± 0.02	0.83 ± 0.07
	第 24 周	1.54 ± 0.04	1.23 ± 0.02	0.86 ± 0.04
高脂组	第 8 周	16.72 ± 0.45 ^a	1.74 ± 0.03 ^a	8.80 ± 0.16 ^a
	第 16 周	22.72 ± 0.94 ^{ab}	3.56 ± 0.05 ^{ab}	11.76 ± 0.23 ^{ab}
	第 24 周	28.52 ± 1.09 ^{abc}	5.25 ± 0.04 ^{abc}	17.92 ± 0.28 ^{abc}
辛伐他汀组	第 8 周	16.82 ± 0.37 ^a	1.72 ± 0.03 ^a	8.71 ± 0.12 ^a
	第 16 周	13.24 ± 0.23 ^{ad}	1.63 ± 0.05 ^{ad}	8.16 ± 0.04 ^{ad}
	第 24 周	12.32 ± 0.21 ^{ad}	1.60 ± 0.03 ^{ad}	8.32 ± 0.13 ^{ad}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相同时间点比较; b 为 $P < 0.05$, 与本组第 8 周比较; c 为 $P < 0.05$, 与本组第 16 周比较; d 为 $P < 0.05$, 与高脂组相同时间点比较。

2.2 动脉血管壁病理形态学观察

肉眼观察: 对照组升主动脉柔软且富有弹性, 颜色粉红均匀, 管腔内膜光滑鲜亮; 高脂组血管壁明显增粗、变硬(8 周), 血管内膜出现黄白色脂纹(16 周)和隆起的大小不等的蜡滴样斑块, 呈散在或

融合成片状(24 周)(图 1); 辛伐他汀组主动脉管壁脂纹程度轻, 斑块范围小。

光镜下见: 对照组升主动脉内膜薄且光滑, 单层内皮细胞紧贴内弹力板, 中层平滑肌细胞排列整齐, 外膜为疏松结缔组织, 无明显脂质沉积; 高脂组升主动脉内膜明显增厚, 可见大量泡沫细胞和脂质斑块, 平滑肌增生明显, 细胞排列紊乱, 纤维组织增生; 辛伐他汀组内膜局限性增厚, 斑块局限, 泡沫细胞数目减少、体积变小, 腔内空泡明显减少(图 2)。



图 1. 高脂组动脉粥样硬化肉眼观察

Figure 1. Atherosclerotic plaques in high-cholesterol diet group

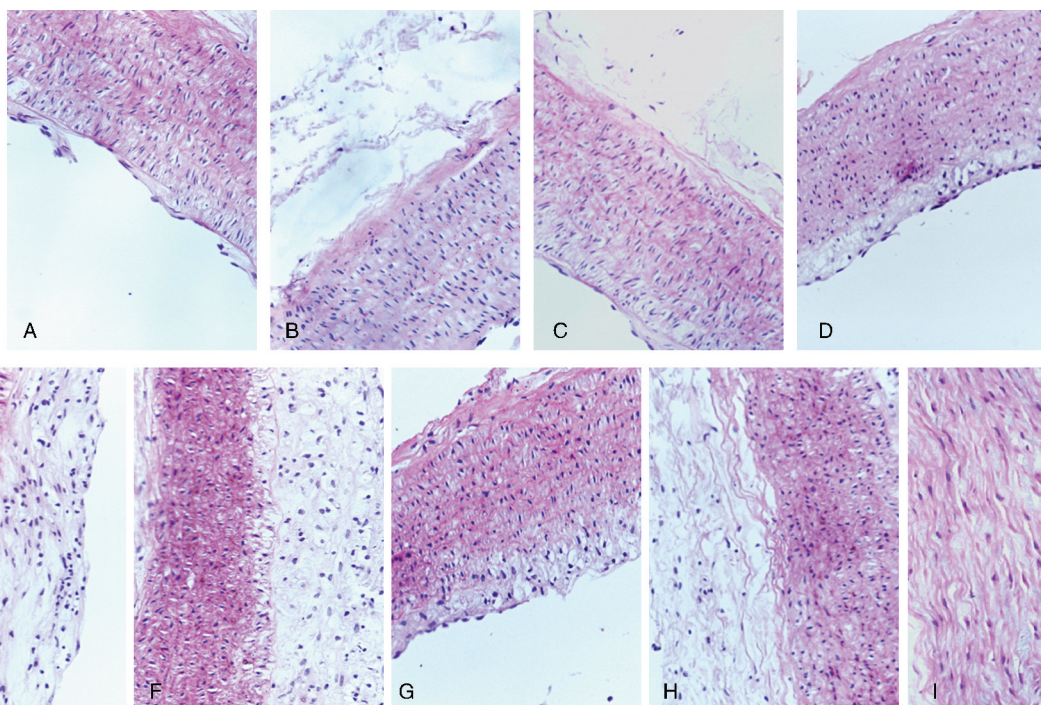


图 2. 对照组、高脂组、辛伐他汀组兔动脉血管 HE 染色 (SP × 200) A 为对照组 8 周, B 为对照组 16 周, C 为对照组 24 周, D 为高脂组 8 周, E 为高脂组 16 周, F 为高脂组 24 周, G 为辛伐他汀组 8 周, H 为辛伐他汀组 16 周, I 为辛伐他汀组 24 周。

Figure 2. HE staining pathological picture in the control group, high-cholesterol diet group, and simvastatin group (SP × 200)

病理形态学定量分析:对照组动脉内膜厚度随喂养时间延长无明显变化($P > 0.05$);高脂组动脉内膜厚度第16周和第24周均较第8周明显升高,第24周较第16周亦明显升高,且高脂组中第8、16、24周的动脉内膜厚度均较对照组相同时间点升高($P < 0.05$);辛伐他汀组第8、16、24周的动脉内膜厚度均较对照组相同时间点升高,但16周和24周的动脉内膜厚度较高脂组相同时间点降低($P < 0.05$)(表2)。

2.3 主动脉弓内膜水含量的变化

高脂组动脉内膜中水含量的百分比第16周和第24周均较第8周减少,第24周较第16周减少(P

< 0.05);辛伐他汀组动脉内膜中水含量的百分比第16周和第24周较高脂组相同时间点增多($P < 0.05$)(表3)。

表2. 实验兔升主动脉内膜厚度比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

Table 2. Comparison of aortic intimal thickness ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

分 组	第8周	第16周	第24周
对照组	5.04 ± 0.98	5.70 ± 0.32	5.88 ± 0.29
高脂组	72.40 ± 1.82 ^a	130.80 ± 7.85 ^{ab}	181.40 ± 6.23 ^{abc}
辛伐他汀组	71.82 ± 1.63 ^a	111.20 ± 1.64 ^{ad}	132.40 ± 2.07 ^{ad}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相同时间点比较; b 为 $P < 0.05$, 与本组第8周比较; c 为 $P < 0.05$, 与本组第16周比较; d 为 $P < 0.05$, 与高脂组相同时间点比较。

表3. 高脂组和辛伐他汀组兔主动脉弓内膜水含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of water content of aortic arch intimal between the high-cholesterol diet group and simvastatin group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	第8周	第16周	第24周
高脂组	62.31% ± 1.21%	55.73% ± 1.93% ^a	47.30% ± 4.98% ^{ab}
辛伐他汀组	62.38% ± 1.79%	59.08% ± 1.36% ^c	54.92% ± 0.80% ^c

a 为 $P < 0.05$, 与本组第8周比较; b 为 $P < 0.05$, 与本组第16周比较; c 为 $P < 0.05$, 与高脂组相同时间点比较。

3 讨 论

脂质沉积于动脉内膜下是动脉粥样硬化形成过程中的一种病理现象。本研究应用高脂饮食方法建立兔动脉粥样硬化模型^[5]。高脂组第8、16、24周检测血脂浓度明显高于相同时间点的对照组($P < 0.05$),且高脂组血脂浓度第16周和第24周均较第8周明显升高,第24周较第16周亦明显升高($P < 0.05$)。肉眼观察及光镜下均可见动脉血管壁有明显的粥样斑块,提示模型建立成功。本实验对高脂组及辛伐他汀组内膜进行剥离并检测内膜水含量的变化。

酸性粘多糖为结缔组织中的一类大分子物质,是由氨基糖和糖醛酸为基础的双糖单位重复连接所形成的长链化合物,具有结合水的特性。正常人体动脉血管壁酸性粘多糖的含量与年龄相关,不同年龄段具有不同的含量,正常动脉血管壁的水含量与酸性粘多糖的含量始终呈正相关^[6]。Murata等^[7]对外死亡的人体尸体进行解剖获取冠状动脉后测定血管壁中水的含量,结果发现,动脉血管壁粥样硬化程度越严重,血管壁的水含量越少,内膜斑块越趋向于破裂;同时还发现,血管壁水含量的变化与其中酸性粘多糖含量的变化相关,水含量

减少的同时酸性粘多糖的含量也显著减少。本实验同样发现,在兔动脉粥样硬化形成过程中,随时间延长动脉血管壁粥样硬化程度越严重,粥样斑块中水含量越少。因此,动脉粥样硬化斑块的稳定性与斑块的水含量密切相关,粥样斑块越趋向于不稳定状态,其中水含量越少。

辛伐他汀具有降脂、改善血管内皮功能、抗炎、改善斑块内成分结构等方面的作用,能够稳定斑块^[8]。本实验中辛伐他汀组较高脂组主动脉管壁脂纹程度轻、斑块范围局限、泡沫细胞数目减少、体积变小,斑块更趋于稳定状态,对斑块中的水含量进行检测发现辛伐他汀组中水含量较高脂组明显增多,间接说明了斑块的稳定性与其中的水含量密切相关。

早期鉴别和预测动脉粥样硬化不稳定斑块有助于尽早采取措施稳定斑块从而减少心脑血管事件的发生^[9]。血管造影仅能显示血管腔二维轮廓,判断管腔的狭窄程度,但无法检测斑块的特征及组成成分,因此难以对斑块的稳定性作出评价。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)对化学成分敏感,综合多种序列图像分析常可达到对斑块内各组成成分的有效识别,从而有效判断斑块的稳定性。对粥样硬化的动脉血管行核磁共振扫描发现,

粥样硬化斑块脂质核心部分在 T2 信号上呈低信号,表明水含量减少^[10]。因此,粥样硬化斑块中水的含量越少,斑块在 T2 信号上的信号强度越低,斑块脆性越大越趋向于不稳定状态。临床上可根据此特性,对粥样硬化斑块的稳定性特别是临界病变的冠状动脉粥样硬化斑块是否需行介入治疗及颈动脉粥样硬化斑块导致颈动脉狭窄的治疗方案提供参考;也可根据此特性对存在颈动脉和主动脉粥样硬化但无症状的未经治疗的高胆固醇血症患者用他汀类药物降脂治疗效果的评价提供有价值的参考,从而有助于指导临床治疗。

有研究发现:在动脉粥样硬化早期阶段即动脉血管壁内膜开始出现炎症反应和脂质沉积时,血管壁内膜因炎症反应时内皮细胞水肿等使血管壁内膜水含量增加^[11]。因此,对于动脉粥样硬化尚未形成的早期阶段的水含量的变化是本实验下一步的研究方向。动脉粥样硬化斑块内膜中水含量的减少除与酸性粘多糖的减少及内膜钙化等因素相关外,是否还存在其他因素导致水含量的减少?对冠心病粥样斑块表面温度进行检测发现,粥样硬化斑块表面温度与正常血管壁相比具有明显差异,并且有从稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛到急性心肌梗死逐渐升高的趋势,而在正常对照组之间则没有差别^[12],这与本实验及其他研究发现的随着动脉粥样硬化的逐渐进展,粥样硬化内膜中水含量的逐渐减少似乎存在着关联性;动脉粥样硬化内膜随着病变的逐渐加重,斑块表面的温度逐渐升高,而逐渐升高的温度是否使斑块的水含量逐渐减少?有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵琦,朴海南,李婉秋. 干细胞与动脉粥样硬化[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(6): 580-581.
- [2] Mughal MM, Khan MK, DeMarco JK, et al. Symptomatic and asymptomatic carotid artery plaque [J]. Expert Rev

Cardiovasc Ther, 2011, 9(10): 1 315-330.

- [3] Finn AV, Nakano M, Narula J, et al. Concept of vulnerable unstable plaque [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(7): 1 282-292.
- [4] Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, et al. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis [J]. J Lipid Res, 2009, 50(1): 787-797.
- [5] 田永波,王东琦,雷新军,等. 脑心通对兔动脉粥样斑块形成及高敏 C 反应蛋白的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(8): 660-664.
- [6] Murata K. Distribution of acidic glycosaminoglycans, lipids and water in normal human cerebral arteries at various ages [J]. Stroke, 1985, 16(4): 687-694.
- [7] Murata K, Yokoyama Y. Acidic glycosaminoglycan, lipid and water contents in human coronary arterial branches [J]. Atherosclerosis, 1982, 45(1): 53-65.
- [8] 徐卫刚,张戟,彭文辉,等. 不同剂量辛伐他汀对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者 PCI 术后左心功能及短期预后的影响[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(1): 35-37.
- [9] Degnan AJ, Gallagher G, Teng Z, et al. MR angiography and imaging for the evaluation of middle cerebral artery atherosclerotic disease [J]. Am J Neuroradiol, 2012, 33(8): 1 427-435.
- [10] Toussaint JF, Southern JF, Fuster V, et al. Water diffusion properties of human atherosclerosis and thrombosis measured by pulse field gradient nuclear magnetic resonance [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(3): 542-546.
- [11] 俞哲锋,张敏鸣. USPIO 增强 MRI 在体无创性评价他汀对血管损伤炎症及动脉硬化作用的实验研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2012; 23-33.
- [12] Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, et al. Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo: a new method of detection by application of a special thermography catheter [J]. Circulation, 1999, 99(5): 1 965-971.

(此文编辑 曾学清)