

月见草油脂肪酸钠盐影响家兔实验性 动脉粥样硬化的病理形态学观察

孙 抒 金在洙 曹东铤 金昌范 尹正日^① 金青松^① 金英锦^①
(延边医学院病理学教研室, ①电镜室, 吉林省延吉市 133000)

Pathomorphological Observation of Effects of Fatty Acid Sodium of Evening Primrose Oil on Experimental Atherosclerosis in Rabbits

SUN Shu, JIN Zai-Zhu, CAO Dong-Xun, JIN Chang-Fan, YIN Zheng-Ri, JIN Qing-Song and JIN Ying-Jin
(Department of Pathology, Yanbian Medical College, Yanji 133000, Jilin, China)

To look for the effective method of prevention and treatment for the atherosclerosis (As), we made this experiment with fatty acid sodium of evening primrose oil for observing the effect of the drug to As in morphology.

Methods Sixteen rabbits were divided into one experimental and two control group. In the experimental group, 4.1 g/kg fatty acid sodium of evening primrose oil was given to each rabbit daily for 150 days. Each rabbit of the experimental and the first control group was fed with 0.5 g cholesterol per day. After 150 days of feeding, all the rabbits were killed by air embolism. Aorta was investigated by optics and electron microscopy.

Results The result indicates that As lesions were significantly improved in experimental group than in control one.

Conclusion Our study indicates that fatty acid sodium of evening primrose oil shows remarkable preventive effects on experimental As in rabbits.

KEY WORDS Evening primrose oil; Atherosclerosis; Pathomorphology

摘要 为进一步探讨月见草油脂肪酸钠盐对家兔实验性动脉粥样硬化的影响,我们将16只家兔分3组:实验对照组、预防服药组和空白对照组。前二组动物均饲胆固醇,预防服药组同时加饲月见草油脂肪酸钠盐,所有动物均饲等量基本饲料。150天后处死动物,在光学显微镜和电子显微镜下观察主动脉壁形态,并测算内膜动脉粥样硬化斑块面积等。结果发现,预防服药组动物主动脉粥样硬化病变程度明显较实验对照组轻,斑块面积减小;两组的斑块面积与总面积的百分比和斑块厚度差异有极显著性意义($P < 0.001$)。实验结果说明,服用月见草油脂肪酸钠盐有延缓高脂饮食所致的动脉粥样硬化发生的作用。

关键词 月见草油; 动脉粥样硬化; 病理形态学

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),是目前危害人类健康最严重的疾病之一。目前前列环素(prostacyclin, PGI_2)与As的关系很受重视。研究结果表明,与 PGI_2 有类似作用的 PGE_1 具有抗As作用^[1]。月见草(*Oenothera Biennis* L)又称夜来香(Evening Primrose),是我国东北地区盛产的野生植物。研究证明,月见草籽富含必需脂肪酸—油酸、亚油酸和 γ -亚麻酸,而且是唯一富含 γ -亚麻酸的植物种籽。 γ -亚麻酸在体内经过延长碳链,衍生成二高- γ -亚麻酸(8,11,14-廿碳三烯酸)而形成I类前列腺素的前体,对As、冠心病、血栓形成等疾病具有治疗作用^[2]。本实验观察了月见草油脂肪酸钠盐对家兔实验性动脉粥样硬化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型复制及给药

健康性日本大耳白兔16只,体重2.4~3.5 kg,年龄5~6个月,喂饲基础饲料。随机分3组:胆固醇对照

组(下简称对照组)6只;预防组6只;空白对照组(下简称为空白组)4只。预防组和对照组喂养胆固醇,每只每日0.5g,共150天,预防组加喂月见草油脂酸钠盐(汪清制药厂提供原油,本校植化教研室制作)。每日二次拌入饲料中,每日 $4.1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。持续喂150天。

1.2 动脉粥样硬化病变面积和厚度测量方法

动物解剖后,即取主动脉,纵行剪开,平铺在滤纸上,中性富尔马林固定,油红O染色后,肉眼观察动脉粥样硬化病变。用透明方格纸($1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$)法测量每条主动脉总面积和粥样硬化斑块面积。计算病变面积占总面积的百分比。

自主动脉弓部取材,做石蜡切片及冰冻切片,进行HE、Weigert-VG、Pollak、AB-PAS、Von-Kossa及油红O染色,在光学显微镜下观察主动脉壁形态,并用测微尺测量斑块厚度及主动脉弓部厚度。

1.3 主动脉壁超微结构观察方法

动物处死后,立即在主动脉弓部同一部位取材,按下列步骤处理:在4℃戊二醛液(用 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液配制,浓度 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.2)固定2h后取出,经磷酸缓冲液冲洗3次,用1%锇酸液(用同样磷酸缓冲液配制)固定2h,再用缓冲液冲洗3次,梯度酒精和丙酮脱水,Epooor 812、815包埋,分别在45℃和60℃聚合24h,在LBK-Ⅴ型切片机上用玻璃刀切成厚约 50 nm 的超薄片,经醋酸铀和枸橼酸铅染色后,在JEM-1200EX型透射电镜下观察。

1.4 统计方法

主动脉病变面积百分比,斑块厚度及主动脉弓部厚度均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用校正t检验。

2 结果

2.1 主动脉粥样硬化斑块面积及厚度

肉眼观察,空白组动物主动脉未发现粥样硬化病变。对照组及预防组动物均在主动脉弓部见到动脉粥样硬化斑块,但病变程度不同。对照组动物的斑块较弥漫、较厚、面积大;预防组有2只动物几乎没有病变,另4只动物的斑块较局限,较薄、面积小。两组动物主动脉粥样硬化斑块面积占总面积的百分比及斑块厚度见Table,经检验,差异有极显著性意义($P < 0.001$)。

由于主动脉弓部发生粥样硬化斑块,使动脉壁的厚度增加,两组动物比较,主动脉弓部管壁厚度的差异亦有非常显著性意义(Table P

< 0.01)。

Table. The atherosclerotic lesions of aortic arch in rabbits ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	percentage in area	plaques thickness (μm)	wall thickness (μm)
control	6	34.9 ± 19.6	37.2 ± 9.3	62.5 ± 15.4
prevent	6	$8.1 \pm 7.0^{***}$	$9.4 \pm 8.8^{***}$	$25.0 \pm 17.5^{**}$

** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ compared with control group.

2.2 光学显微镜观察结果

空白组动物主动脉内膜形态正常。对照组动物主动脉壁均见到脂质浸润,有的达中膜的2/3。病变弥漫,多数斑块较厚,泡沫细胞可达5~6层、部分斑块中可见平滑肌细胞增殖明显和大量弹力纤维形成;多数内弹力板分离、断裂、甚至消失,斑块内有较多的酸性粘多糖基质。外膜基本正常。

预防组仅在4只动物的主动脉壁上见到脂质浸润,且较局限、较薄,由1~2层泡沫细胞组成。有的仅见内皮下疏松及少量细胞外脂质沉积,多数动脉壁基本正常,未见胆固醇结晶及钙盐沉着。Pollak和Weigert-VG染色未见明显的平滑肌细胞增殖及弹力纤维形成,内弹力板基本正常。AB-PAS染色内膜及中膜基质含量不多。

以上观察结果说明,动物服用月见草油脂酸钠盐,能使高胆固醇所致的动脉粥样硬化斑块形成减缓、斑块内平滑肌细胞增殖减轻,泡沫细胞减少。

2.3 电子显微镜观察结果

对照组平滑肌细胞内质网增多、扩张,线粒体增生、肿胀、嵴减少或消失,甚至透亮而空泡化。平滑肌细胞内出现数量和大小不等的脂滴,部分脂滴的外层有高电子密度物质围绕,胞质内因充满脂滴而使胞核移位和变形,而被挤向细胞的边缘部。病变内可见到由平滑肌细胞逐渐向泡沫细胞演变的过渡型细胞,其胞质内脂滴含量不等。平滑肌细胞周边部可清楚地见到特有的肌丝、密体和密斑(Figure 1)。部分平滑肌细胞胞质发生变性、局部胞质密度降低或浓缩,肌丝和密体模糊不清,甚至消失。在平

滑肌细胞普遍可见大量胶原纤维,弹力纤维并见弹力板密集(Figure 2),间质疏松,在病灶内还可见大量无定型坏死物质(Figure 3),预防组平滑肌细胞内超微结构改变明显较对照组轻,部分平滑肌细胞基本正常(Figure 4)。

结果说明,月见草油脂酸钠盐可保护血管壁平滑肌细胞免受高脂损害。

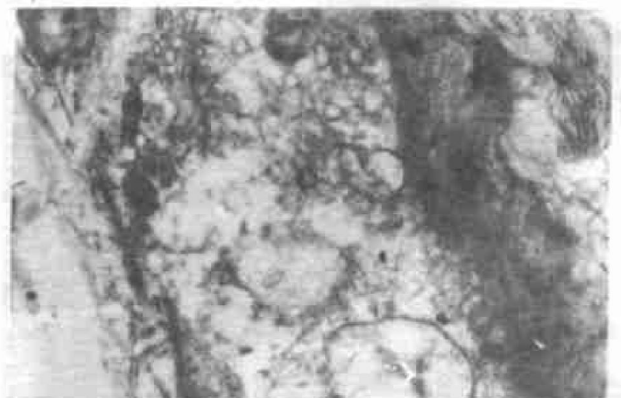


Figure 1. Smooth muscle cell had been transformed into foam cell. TEM, $\times 12\,000$.



Figure 2. Smooth muscle cell produce collagen fiber, elastic fiber and stroma. TEM, $\times 7\,500$.

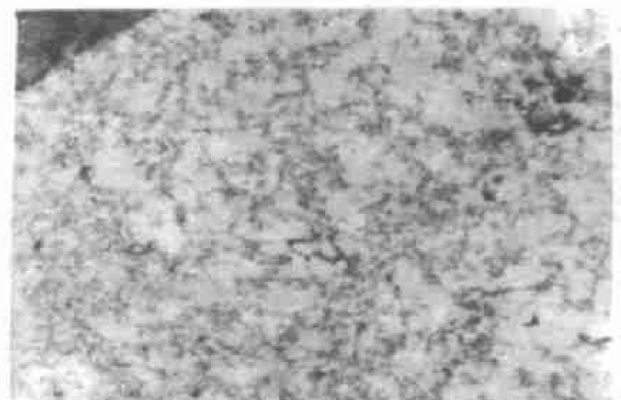


Figure 3. Necrotic matters are seen in ather osclerotic plaques. TEM, $\times 7\,500$.



Figure 4. Smooth muscle cells in rabbit aorta of preventing group almost are normal. TEM, $\times 6\,000$.

3 讨论

本实验结果表明,预防组与对照组比较,在斑块的性质、脂质浸润崩解程度、平滑肌细胞增殖程度及内膜中基质、弹力纤维等结缔组织成分显著少于对照组。预防As作用的机理为能明显降低血脂,从而减少低密度脂蛋白在动脉内膜的沉积,继而减轻平滑肌细胞的增殖,在高血脂脂质过氧化物生成过多情况下,脂质过氧化物分解成丙二醛可以改变低密度脂蛋白的性质,这种LDL可以经“清道夫”受体途径进入单核细胞和平滑肌细胞并使之转变为泡沫细胞。而一旦斑块内泡沫细胞崩解,局部组织内脂质进一步分解,便对平滑肌细胞的增殖有明显刺激作用。由于该药能明显地降低血清脂质过氧化物^[1],减少脂质经清道夫受体途径进入细胞,从而减少泡沫细胞的生成。故能明显地抑制As斑块的形成。

本实验对照组平滑肌细胞内质网、线粒体等细胞器明显增多,说明细胞代谢活动增高,但多数内质网明显扩张、线粒体肿胀、嵴变短、甚至消失,提示这些细胞内代谢发生障碍。由于能量不足、血管壁合成磷脂和脂蛋白降低,使血管壁对胆固醇清除率降低,引起胆固醇等类脂质在动脉壁内堆积。而预防组细胞器基本正常,说明该药能维护细胞内能量正常代谢,确保动脉壁内脂质代谢处于动态平衡,从而防止脂质在动脉壁内堆积。

本实验对照组平滑肌细胞周围胶原纤维

明显增多并可见大量弹力纤维和基质。这进一步证实了胶原、弹力蛋白及氨基葡聚糖等物质是由平滑肌细胞合成分泌的。它们是 As 病变中主要的基质。氨基葡聚糖可通过分子筛、空间排斥、离子结合等理化作用,将进入动脉壁的脂蛋白阻留于内膜中,加重病变的发展。胶原与弹性蛋白亦有与脂质蛋白结合的能力,可同样起到阻留脂蛋白的作用。此外,细胞间质增多,还可引起内膜增厚,影响氧的扩散,不利于动脉壁的代谢,妨碍脂质消除,使病变加重。而预防组由于抑制了平滑肌细胞的增殖,从而减少和抑制了平滑肌细胞的合成和分泌功能,即抑制或减轻了 As 的病变。

关于泡沫细胞的来源,本实验结果支持主要来源于平滑肌细胞^[4]。依据为:从平滑肌细胞到典型的泡沫细胞之间存在着明显的过渡类型细胞,平滑肌细胞的显著特征是具有肌丝、密体和密斑。我们从电镜观察发现,斑块内有些细胞即具有肌丝、密体等平滑肌细胞的形

态特点,细胞胞质内又含数量不等的脂滴,由少到多,最后充满于平滑肌细胞的整个胞质而演变为泡沫细胞。

通过本实验证实了月见草油脂酸钠盐能明显抑制平滑肌细胞增殖和减少泡沫细胞形成,所以能抑制或减轻动脉粥样硬化病变的发生、发展。

参考文献

- 1 王泰玲,姚大林,尹鸿珍, et al. 前列腺素 E₁ 对实验性动脉粥样硬化治疗作用的初步观察. 中华医学杂志, 1985, 65 (1): 13~16.
- 2 高雅琴,李霞冰,胡连生, et al. 月见草有效成分的研究. I. γ -亚麻酸的分离与鉴定. 中草药, 1982, 13 (9): 385.
- 3 于庆海,郭月英,邹莉波, et al. 复方月见草油乳剂抗脂质过氧化作用. 沈阳药学院学报, 1986, 3 (3): 178.
- 4 Wissler RW, Vesselinouifch D, Getz GS. Abnormalities of the arterial wall and its metabolism in atherogenesis. *Prog Cardiovasc Dis*, 1975, 18: 341.