



颈动脉球囊损伤对高同型半胱氨酸诱导兔动脉粥样硬化病变的形成无明显影响

陆红玲¹, 汤 阳², 黄 跃³, 钱民章¹, 冯赞杰¹

(1. 遵义医学院生物化学教研室; 2. 遵义医学院附属医院心胸外科;
3. 遵义医学院形态学实验室, 遵义 563099)

【摘要】 目的 观察颈动脉球囊损伤对高同型半胱氨酸诱导的家兔动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变形成的影响。**方法** 新西兰家兔 20 只, 随机分成对照组($n=10$), As 模型组($n=10$)。两组均行颈动脉球囊拉伤术, 术后 As 模型组每日经皮下注射甲硫氨酸 80 mg/(kg·d) 以诱导家兔形成动脉粥样硬化病变; 对照组每日经皮下注射生理盐水。24 周后处死动物, 采用酶联免疫吸附法(ELISA) 检测两组家兔实验前后血清同型半胱氨酸(Hcy) 水平, 运用光学显微镜检测 24 周后 HE 染色的动脉壁横切面病理改变, 通过图像分析软件测量血管壁厚度变化, 并与对照组进行比较。**结果** 24 周后, As 模型组家兔血清同型半胱氨酸含量较对照组明显升高($P<0.05$); 同时主动脉壁出现不同程度地病理改变。但球囊损伤后的颈动脉壁厚度与对照组相比无统计学差异。**结论** 球囊拉伤颈动脉对高同型半胱氨酸诱导的家兔动脉粥样硬化病变形成无显著影响。

【关键词】 同型半胱氨酸; 动脉粥样硬化; 病变; 球囊扩张; 颈动脉

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 04-0043-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 004. 010

Balloon injury does not significantly influence on the formation of atherosclerotic lesions induced by hyperhomocysteinemia in rabbits

LU Hong-ling¹, TANG Yang², HUANG Yue³, QIAN Ming-zhang¹, FENG Zan-jie¹

(1. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College;
2. Department of Thoracic and Cardiac Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College;
3. Laboratory of Morphology, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563099, China)

【Abstract】 Objective To explore the influence of carotid artery balloon injury on the formation of atherosclerotic lesions induced by hyperhomocysteinemia in rabbits. **Methods** Twenty New Zealand rabbits were divided into control group and model group ($n=10$) randomly. The left carotid arteries were injured by balloon catheterization in all rabbits. After operation, the model group was given methionine 80 mg/kg per day by subcutaneous injection for 24 weeks to induce atherosclerotic lesions, and the control group was given the same amount of normal saline. All rabbits were killed at the 24th week. ELISA was used to detect the content of homocysteine and HE staining was used to observe the pathological changes in the arterial wall. The arterial wall thickness was measured using an image analysis software. **Results** After 24

[基金项目] 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字 LKZ[2010]28]。

[通讯作者] 陆红玲, 副教授, 硕士。研究方向: 心血管疾病分子生物学。电话: 0852-8609445。E-mail: l_hongling2@163.com。

weeks, the level of serum homocysteine of the model group was significantly increased and pathological changes of aortic wall were observed in different degrees compared with that of the control group ($P < 0.05$). But the carotid artery wall thickness of model group after balloon injury had no visible changes compared with that of the control group. **Conclusion** Balloon injury of carotid artery has no significant effect on the formation of atherosclerotic lesions induced by hyperhomocysteinemia.

【Key words】 Homocysteine; Atherosclerosis; Pathology; Balloon injury; Carotid artery; Aorta; Rabbit

高同型半胱氨酸血症能明显增加心血管动脉硬化病变和其他疾病的发生^[1],严重威胁人们生命健康安全。要了解其导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病原因和机制,需要建成或复制 As 动物模型。很多文献报道复制高脂血症诱导的 As 动物模型常采用动脉球囊损伤术,以促进 As 病变的形成。本实验也试图在颈动脉球囊拉伤基础上加以皮下注射甲硫氨酸,以建立高同型半胱氨酸动脉粥样硬化模型。

1 材料和方法

1.1 实验试剂及器材

L-甲硫氨酸(北京索莱宝有限公司)、同型半胱氨酸试剂盒(美国 Sigma 公司)、冠状动脉扩张球囊(美国强生公司 CARDIC 系列)、显微镜及照相系统(日本奥林巴斯 CX41、德国徕卡公司)、酶标仪(澳大利亚 Tecan, Safire)、切片机(德国徕卡公司)。

1.2 实验动物及分组

新西兰兔 20 只(重庆市中药研究院动物所,生产许可证 SCXK(渝)2007-0006, SYXK(黔)2011-003),雌雄不限,体重(2.0~2.5)kg。随机分为对照组、As 模型组,每组 10 只。所有动物均单笼饲养,饮水不限,自由摄食,每日每只予 150 g 普通饲料,喂养 24 周。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法:家兔予普通饲料适应性喂养 1 周后,于第 2 周行颈动脉球囊拉伤术,术前 12 h 禁食不禁水。用 3% 戊巴比妥溶液(1 mL/kg)腹腔麻醉动物后仰面固定于手术台,充分暴露颈部,扣及甲状软骨及气管软骨环,于周边区域剪毛常规皮肤消毒,颈部正中切口,长度约 3 cm,选取左侧颈动脉为手术损伤侧。血管钳分离气管前筋膜及颈前肌群,暴露血管,充分游离左颈总动脉、颈内及颈外动脉,暂时阻断左颈总动脉近心及远心端血流。三股 7 号丝线穿过颈外动脉血管,远心端结扎,近心端先予动脉夹闭,在两端之间的动脉壁上约呈 45 度剪开一“v”形小口,向近心端置入 2.5 mm × 20 mm 直径

球囊导管,开放动脉夹,使球囊进入近心端动脉,并向颈总动脉起始部推送,推送长度约 3~4 cm,连接手推式压力泵,注入肝素生理盐水,然后将气囊充气,压力为 6 个大气压,来回移动球囊(以回拉时有明显阻力感,又可以拉动球囊为宜),使之与动脉内膜摩擦,造成内膜机械损伤。来回摩擦 3~5 次后,释放球囊气体,退出导管,在穿刺点近心端用 7 号丝线双重结扎颈外动脉,恢复血流,逐层缝合颈前肌群、气管前筋膜及皮肤,酒精消毒皮肤。术后连续 3 d 每日肌注青霉素 80 万单位预防感染。术后对照组每日皮下注射生理盐水,模型组每日皮下注射甲硫氨酸 80 mg/(kg·d)。

1.3.2 标本的采集与处理:

1.3.2.1 兔血清同型半胱氨酸含量检测:于颈动脉球囊拉伤术前及第 24 周实验结束时,各采集家兔耳缘静脉血 8 mL,静置 30 min 后,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集血清置 -80℃ 保存,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测同型半胱氨酸含量。

1.3.2.2 动脉病理标本的采集及观察:第 24 周取材,用 3% 戊巴比妥溶液(1 mL/kg)腹腔麻醉动物后仰卧固定于手术台,麻醉生效后空气栓塞法处死动物,自颈部正中切开,切口约 10 cm,打开胸腔,暴露血管并充分游离,取出双侧颈总动脉、胸主动脉及腹主动脉。用眼科剪沿纵轴剪开血管,用生理盐水轻轻冲洗以去除血污及血凝块,以肉眼大体观察动脉内壁情况后,将标本置于 4% 甲醛溶液固定 12 h,石蜡包埋切片,每个标本切 3 张切片行 HE 染色。于光镜下观察各部位动脉病变,拍照图像输入 MiE 显微图像处理软件,并测量血管壁厚度。

1.3.3 同型半胱氨酸诱导的家兔动脉粥样硬化病变模型复制成功判断:光镜下见血管壁弥漫性隆起,突向管腔面,内膜增厚,平滑肌细胞增生,胶原纤维和弹性纤维增多,中层结构紊乱等即可确认。

1.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。各组资料先进行方差齐性检验,方差齐,两组比较采用成组设计的 t 检验;方差不齐采用

t' 检验或秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 血清同型半胱氨酸含量检测

造模 24 周后,与对照组相比,As 模型组家兔血清同型半胱氨酸含量明显升高 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 家兔血清同型半胱氨酸水平 ($n = 10$)
Tab.1 Levels of serum hyperhomocysteinemia in the rabbits ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

组别 Groups	0 周 Week 0	24 周 Week 24
对照组 Control	7.29 $\pm$ 2.55	6.42 $\pm$ 2.20
模型组 Model	8.53 $\pm$ 2.08	26.35 $\pm$ 2.34 *

* : compare with control, $P < 0.05$;

2.2 动脉病理学变化

2.2.1 动脉粥样硬化病变的观察:肉眼观:对照组右侧颈动脉及胸、腹主动脉管壁光滑有弹性,颜色均匀;左侧损伤颈动脉除结扎部位血管变细、颜色变白并有部分血栓形成外,未见明显斑块形成。As 模型组双侧颈动脉及胸、腹主动脉壁触之弹性减弱,局部有管壁变硬缩窄,似有增生;损伤侧颈动脉还可见血管局部片状颜色较深的损伤区域,有血栓形成。镜下观:正常对照组未损伤侧颈动脉及胸、腹主动脉血管壁三层结构清晰,内膜光滑完整,平滑肌细胞排列整齐,内皮细胞结构连续完整,内皮下未见脂质及炎性细胞浸润,中层及外膜结构清楚,未见明显病理改变(图 1A)。损伤侧颈动脉结扎部位形成血栓,可见大量炎性细胞浸润,并有新生小血管生成(图 1B)。As 模型组:双侧颈动脉及胸、腹主动脉三层结构界限模糊,可见血管壁向管腔隆起(图 1C);中层结构紊乱,平滑肌细胞增生,胶原纤维和弹性纤维增多,内膜增生,有大量巨噬细胞浸润(见图 1D),血管壁出现不同程度地增厚;损伤侧动脉结扎部位除上述病理改变外,也可见血栓形成伴新生小血管生成(见图 1E),图 1 见彩插 3)。

2.2.2 动脉血管壁厚度检测:各组检测了家兔颈动脉损伤侧及未损伤侧血管壁厚度,平均厚度如表 2 所示。各组损伤侧颈动脉血管壁厚度与未损伤侧比较均差异显著 ($P < 0.05$),但两组损伤侧管壁厚度比较无差异。同时检测了对照组与模型组损伤侧颈动脉厚度增加比值([损伤侧动脉厚度 - 未损

伤侧动脉厚度]/未损伤侧动脉厚度),两组比值无统计学差异。

表 2 各组家兔颈动脉壁厚度 ($n = 10$)
Tab.2 The arterial wall thickness of the thoracic aorta in various groups ($n = 10$)

组别 Groups	颈动脉壁厚度 (μm) Arterial wall thickness	颈动脉壁厚度增加比值 Arterial wall thickness increase ratio
对照组颈动脉未损伤侧 Control group, non-injured side	39.36 $\pm$ 9.04	
对照组颈动脉损伤侧 Control group, injured side	131.07 $\pm$ 40.57 *	4.046 $\pm$ 2.205
模型组颈动脉未损伤侧 Model group, non-injured side	37.34 $\pm$ 4.49	
模型组颈动脉损伤侧 Model group, injured side	137.03 $\pm$ 36.23 *	5.645 $\pm$ 3.398

* : 各组颈动脉与本组未损伤侧比较, $P < 0.05$;

Note: Compared with the control group, non-injured side, * $P < 0.05$;

此外还检测了各组家兔颈总动脉及胸、腹主动脉血管壁厚度(表 3),与对照组相应部位比较,模型组上述部位动脉管壁均出现不同程度地增厚 ($P < 0.05$),以胸主动脉最明显。而球囊损伤侧颈动脉壁厚度与颈总动脉及腹主动脉无差异。

表 3 各组家兔动脉壁厚度 ($n = 10$)
Tab.3 The arterial wall thickness in the rabbits of various groups ($n = 10$)

组别 Groups	动脉壁厚度 (μm) Arterial wall thickness
对照组颈总动脉 Control group, common carotid artery	109.1 $\pm$ 16.49
模型组颈总动脉 Model group, common carotid artery	151.89 $\pm$ 22.13 #
对照组腹主动脉 Control group, abdominal aorta	54.27 $\pm$ 4.78
模型组腹主动脉 Model group, abdominal aorta	165.63 $\pm$ 28.56 #
对照组胸主动脉 Control group, thoracic aorta	71.82 $\pm$ 17.53
模型组胸主动脉 Model group, thoracic aorta	255.00 $\pm$ 11.33 #

: 模型组各部位与对照组相应部位比较, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, # $P < 0.05$.

3 讨论

动脉粥样硬化所引起的疾病发病率及死亡率日益增高,在我国亦呈快速增长趋势。其病因及发病机制复杂,其中高同型半胱氨酸血症作为诱导动脉粥样硬化形成的独立危险因子已越来越受到重视^[3]。本研究参照文献[2]采用皮下注射甲硫氨酸

制作高同型半胱氨酸血症模型,结果显示,实验组家兔的胸、腹主动脉及颈总动脉等部位均出现了不同程度地 As 病理改变。肉眼观察,可见动脉管壁颜色不均匀,触之弹性减弱,局部有管壁变硬缩窄。镜下见血管壁弥漫性增厚,局部隆起突向管腔面,中层结构紊乱,内膜下有不规则平滑肌细胞增生,胶原纤维和弹性纤维增多,见巨噬细胞浸润。建立 As 模型的方法有很多,球囊损伤胸/腹/股动脉加高脂饲料建立 As 模型^[4-6],或球囊损伤建立颈总动脉狭窄的模型^[7]常被广泛应用。为此我们在建立模型过程中也使用了球囊拉伤颈动脉内膜的方法,想有助于快速诱导动脉粥样硬化模型形成,但实验中发现,行动脉内膜球囊损伤需对实验家兔进行血管切开,操作完成后还需结扎损伤的血管,对动物损伤较大,且具有一定的死亡率。而实验结束时经对损伤部位血管观察,可见内膜损伤、断裂、增生,炎性物质附着,平滑肌纤维增生,管腔堵塞及小血管再生等病变,因此无法证实损伤侧血管的继发改变是球囊牵拉损伤内膜所致,还是高同型半胱氨酸血症诱导所致。与未损伤且出现了 As 病理改变的其他部位动脉比较,球囊损伤侧颈动脉壁厚度与颈总动脉及腹主动脉无差异;已形成高同型半胱氨酸血症的模型组颈动脉壁厚度增加比值与对照组比较也无差异。因此我们认为球囊损伤对高同型半胱氨酸血症诱导的动脉粥样硬化模型形成无明显作用,且牵拉导致的动脉内膜损伤会影响实验结果观测(如图 B 与图 E 镜下病理改变无明显差异)。与高脂血症诱导的动脉粥样硬化病变相比,高同型半胱氨酸血症导致的动脉病理改变没有明显的泡沫细胞形成,也没有典型的粥样斑块产生,而是以动脉炎症反应、内膜及平滑肌增生、动脉内壁结构紊乱等为更主要的可见的病理特征。推测同型半胱氨酸刺激平滑肌细胞增殖效应可能是通过核内癌

基因、细胞周期调控蛋白及 PKC/MAPK 信号传导等途径实现的^[8-10],具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang W, Sun K, Chen J, et al. High plasma homocysteine levels contribute to the risk of stroke recurrence and all-cause mortality in a large prospective stroke-population [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 118:187-194.
- [2] 姜亚秋, 郭晓林, 谭岩. 高同型半胱氨酸致动脉粥样硬化模型炎症介质的变化及意义 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2008, 34(2):230-234.
- [3] McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation [J]. Ann Clin Lab Sci, 2009, 39(3):219-232.
- [4] 张军平, 许颖智, 李良军, 等. 实验性动脉粥样硬化模型复合建模的方法及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(1):41-45.
- [5] 黄成磊, 李天奇, 乔伟伟, 等. 兔股动脉粥样硬化症改良模型的建立及其评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(1):6-10.
- [6] 卢静, 廖祁伟, 尹淇, 等. 两种动脉粥样硬化兔模型制作方法的比较 [J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(8):96-99.
- [7] 李秋梅, 王硕仁, 赵明镜, 等. 家兔实验性血管成形术后再狭窄模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(4):203-209.
- [8] Sun Y, Chien KL, Hsu HC, et al. Use of serum homocysteine to predict stroke, coronary heart disease and death in ethnic Chinese. 12-year prospective cohort study [J]. Circ J, 2009, 73(8):1423-3140.
- [9] Papatheodorou L, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. Antioxid Redox Signal. 2007, 9(11):1941-1958.
- [10] Clarke MC, Littlewood TD, Figg N, et al. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration [J]. Circ Res, 2008, 102(12):1529-1538.

[修回日期]2014-02-17