

L-精氨酸抗家兔动脉粥样硬化内皮损伤*

杨和平 杨爱莲^① 王小平^① 陈颜芳^②

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

Influence of L-Arginine on the Endothelium Lesion in Atherosclerotic Plaques in Rabbits.

YANG He-Ping, YANG Ai-Lian, WANG Xiao-Ping and CHEN Yan-Fang.

(Molecular Biology Center, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT New Zealand white rabbits were divided at random into three groups which were, fed a normal chow (Control) and a high-cholesterol diet (HCD), a high cholesterol diet supplemented with L-arginine (HCD-Arg) for 4 or 8 weeks respectively. In the high-cholesterol diet group (vs HCD-Arg group), scanning electron micrographs of rabbit aortic arteries stained with silver nitrate showed that endothelium cells had irregular sizes and lacked the typical alignment in the direction of blood flow. Permeability of endothelium cells of atherosclerotic plaques was increased in HCD group (vs HCD-Arg group). Meanwhile, L-arginine could partly inhibit the development of atherosclerotic plaques. These data suggest that hypercholesterolemia enhances the endothelium lesion; this effect is attenuated by dietary L-arginine.

KEY WORDS L-arginine; Nitric oxide; Endothelium; Atherosclerosis

摘要 将新西兰兔分成三组: 正常组、高胆固醇组、高胆固醇加 L-精氨酸组。分别饲养 4 周和 8 周。扫描电镜下观察到: 高胆固醇组与高胆固醇加 L-精氨酸组

相比, 内皮细胞排列不规则, 细胞间隙银染较粗, 内膜损伤和增生明显。说明补充 L-精氨酸可减轻内膜损伤。

关键词 L-精氨酸; 一氧化氮; 内皮细胞; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块能否消退, 关系到动脉硬化性疾病的防治。我们曾在低脂喂养家兔的动脉模型上观察到 As 斑块能部分消退^[1,2]; 在高胆固醇血症的动物模型中, 补充一氧化氮 (nitric oxide, NO) 前体即 L-精氨酸, 可逆转这种损伤, 并可延缓和防止动脉粥样硬化的发生。我们在复制家兔动脉粥样硬化模型的基础上, 探讨了 L-精氨酸对内皮损伤的保护作用。

1、材料和方法

1.1 动物模型

新西兰雄性白兔 36 只, 体重 2.0~2.4 kg。实验分组: ① 正常组 (标准饲料喂养); ② 高胆固醇组 (标准饲料内含 2% 胆固醇); ③ 高胆固醇 + L-精氨酸组 (标准饲料内含 2% 胆固醇和 2% L-精氨酸)。动物进食 100 g/天。于 4 周和 8 周时, 每组处死 6 只动物, 每组 1 只动物作银染, 其余作光镜和扫描电镜观察。

1.2 精氨酸水平测定

在实验前和动物处死时各收集一次耳静脉血液, 分离血浆并贮存在 -20℃, 参照文献 [3] 经反相高效液相色谱测定精氨酸水平。

1.3 血清胆固醇测定

实验前 1 周, 实验后第 1、2、4、6 和 8 周时分别测血浆总胆固醇。

1.4 主动脉内膜银染

用 3% 戊巴比妥钠过量麻醉处死动物后, 打开胸腔, 经左室向主动脉弓部插入导管 A, 另从髂总动脉分支处向腹主动脉插入导管 B, 使灌注液从 A 导管输入, 经 B 导管流出, 然后输注 5% 葡萄糖-Krebs-Ringer-碳

* 湖南省卫生厅重大攻关项目资助。

① 现在广东省韶关市人民医院。

② 北京医科大学第三医院。

酸氢盐缓冲液,洗净主动脉腔内的残血;结扎两导管之间的所有主动脉分支。用0.25%硝酸银生理常压灌注1分钟后,输入上述缓冲液,冲洗剩余的银溶液,以80~100 mmHg的压力向主动脉内输入4%甲醛磷酸缓冲液。小心取出主动脉,纵向剪开,蒸馏水洗涤2~3次,磁力搅拌2小时,系列酒精脱水,浸入丙酮20分钟,临界点干燥,余下按常规扫描电镜操作。

1.5 常规扫描电镜观察

动物注入过量戊巴比妥钠麻醉,迅速取出髂动脉,KH液冲洗,2%戊二醛固定,锇酸后固定,临界点干燥,镀膜,电镜观察。

1.6 资料分析

所有资料以平均数±标准误表示,统计分析用ANOVA方法。

2 结果

2.1 血浆精氨酸水平

实验前1周血浆各组精氨酸水平没有明显差别($P>0.05$)。实验后第4周和第8周,喂养L-精氨酸组的血浆精氨酸明显高于未用精氨酸组($P<0.01$, Figure 1)。

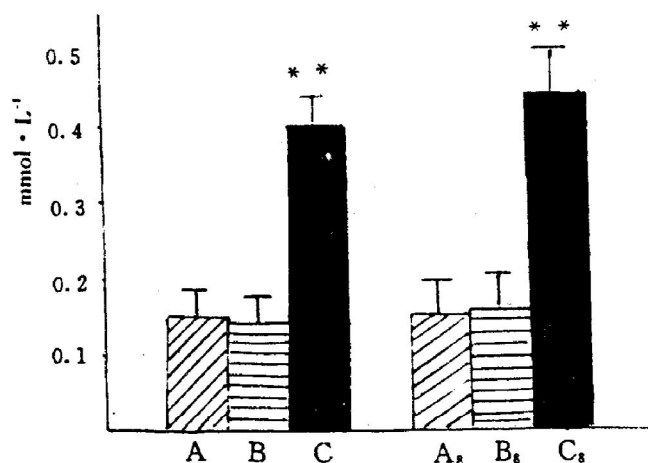


Figure 1. Plasma arginine level was elevated in L-arginine-supplemented animals compared with controls ($P<0.01$). A=no cholesterol-feeding (4 week after experiment); B=2% cholesterol (4 weeks after experiment); C=2% cholesterol + 2% L-arginine (4 weeks after experiment); A₈=no cholesterol-feeding (8 weeks after experiment); B₈=2% cholesterol (8 weeks after experiment); C₈=2% cholesterol + 2% L-arginine (8 weeks after experiment).

2.2 血清胆固醇

喂养胆固醇后第1、2、4、6和8周与未喂养

胆固醇的动物血清胆固醇明显增高($P<0.01$, Figure 2)。

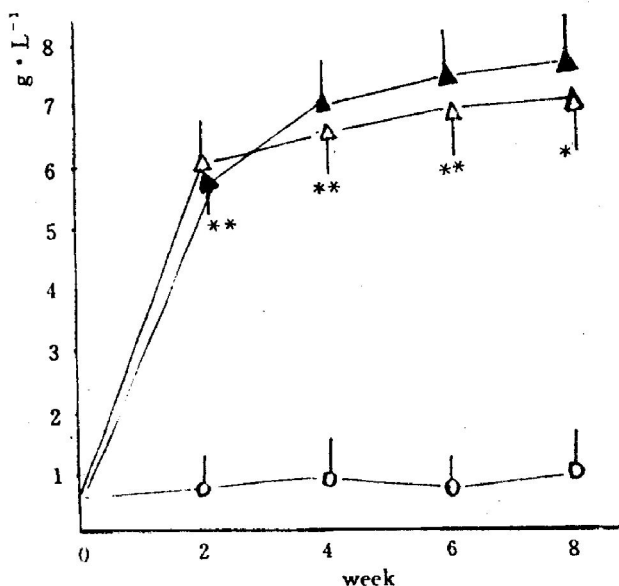


Figure 2. Plasma cholesterol levels of rabbit. Plasma cholesterol level of rabbits after 2% cholesterol-feeding was significantly higher than that of rabbits after normal diet-feeding.

2.3 银染样品的观察

正常家兔主动脉内皮表面光滑、银染线描出内皮细胞的轮廓,银线细小、均匀且连续,有些微状弯曲。内皮细胞呈长梭形或椭圆形,相连接着沿血流方向排列。喂养胆固醇4周时,可见银染线增宽,呈双银染线现象(Figure 3A)。8周时除4周的改变外,还出现银染线不连续,细胞交接部位孔洞增大(Figure 3B)。喂养胆固醇和L-精氨酸,内皮银染相连接着沿血流方向排列,银线较细小(Figure 3C)。

2.4 扫描电镜定性观察

镜下可见对照组整个内膜基本平整(Figure 4A),细胞形态结构正常。高胆固醇喂养4周时(Figure 4B),内膜出现脂肪条纹,单核细胞附着于内皮细胞,或伸出足通过内皮细胞的间隙游入游出,也可见内膜的泡沫细胞通过间隙向血管腔内移动;并可见内皮细胞肿胀融合,火山口样凹陷,泡沫隆起和“虫蛀状”结构;8周时出现明显的斑块,大量泡沫细胞穿越内皮(Figure 4C)。高胆固醇加L-精氨酸喂养4周时,内膜面基本平整,内皮细胞损伤较轻,偶见

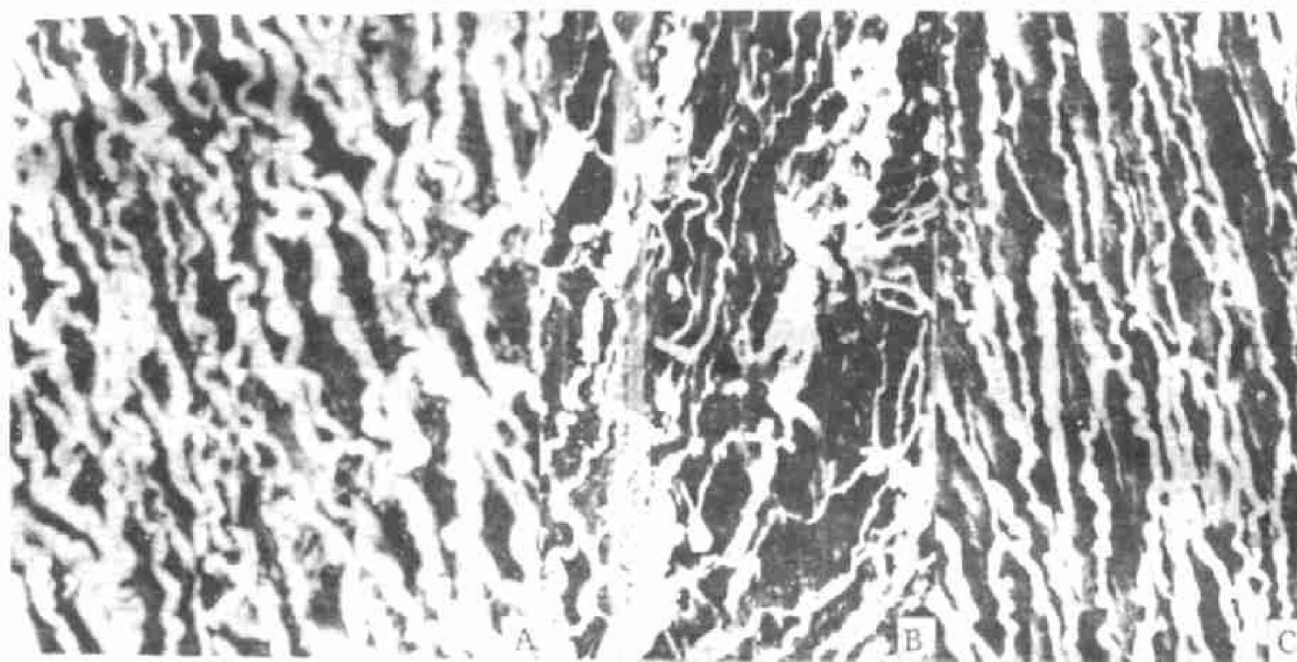


Figure 3. Scanning electron micrographs of rabbit aortic arteries, stained surface of endothellum with silver nitrate, showing endothelial morphological features. A. 2% cholesterol-feeding rabbits (4 weeks) showed that endothelial cells were often irregular in size, polygonal in shape, and lacked the normal longitudinal orientation with blood flow, $\times 100$. B. in comparison to the vessels of 2% cholesterol-feeding rabbit, injury of endothelial cells was more severe in 8 weeks, $\times 100$. C. vessel of 2% cholesterol and 2% L-arginine, endothelial cells were aligned in the direction of blood flow, $\times 100$.

内皮细胞凹陷(Figure 4D);8周时,虽然有脂肪条纹的出现,但较同期高胆固醇组的损伤轻,未见明显的斑块。

2.5 脂纹或脂斑面积

在扫描电镜下观察主动脉弓,低倍镜下($\times 100$)连续照片,经洗相进一步放大,若落在脂纹上有 P_i 测试点,则脂斑面积近似为 $A_i = aP_i$,其中 a 代表一个小方格面积,为测试格常数。若落在整个内膜面有 P_c 个测试点,则整个内膜所取的面积为 $A_c = aP_c$ 。主动脉整个内膜面所取的面积与脂斑面积之比等于其中测试点之比: $A_i/A_c = P_i/P_c$ 。经测定4周和8周高胆固醇组的脂纹分别约占整个内膜面的 $1/6$ 和 $1/5$,4周和8周的高脂胆固醇+L-精氨酸组分别约占整个内膜面积的 $1/15$ 和 $1/11$ 。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块中的泡沫细胞有平滑肌源性和单核细胞源性两种。在As的发生过程中,单核细胞首先粘附在受损的内皮上并向内

皮下迁移。As的危险因子如吸烟、高低密度脂蛋白血症可以降低内皮前列环素(prostacyclin, PGI_2)的产生。内环境稳定机制受损可以导致单核-内皮之间作用失平衡从而有助于单核细胞的粘附和向内皮下迁移。Bath等^[4]证明NO在 $>10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时可以抑制单核细胞的自发性粘附,但不能抑制FMLP(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)引起的单核细胞粘附。其机制是认为趋化的单核细胞产生超氧阴离子增多可以灭活NO。 PGI_2 不能抑制单核细胞的粘附,但在 $NO > 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $PGI_2 > 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别可以抑制对单核细胞的趋化作用。Rubes等证实,NO合成的特异性抑制剂如L-MNNA和L-NAME通过 CD_{11}/CD_{18} 依赖机制引发中性粒细胞在小静脉的粘附。在某些病理生理状态下如心肌缺血再灌注,粘附的中性粒细胞激活后可以引发内皮功能失调。通过释放氧自由基,特别是超氧阴离子,可以灭活NO。在As血管,内皮NO释放的

降低可能引起血管收缩,有助于血小板聚集和血小板激活物如血栓素 A_2 、ADP、5-羟色胺的释放,从而加重病变进展。中性粒细胞可影响血小板、血管壁之间的作用和血栓形成。激活的中性粒细胞可以释放花生四烯酸代谢产物(白三

烯 A_2 、 B_2)和蛋白水解酶(弹性蛋白酶、胶原酶)增加对血管壁的损伤。Provost^[1]用 L-精氨酸预处理完整的猪主动脉内皮,发现被标记的中性粒细胞粘附降低了 32%,用 L-NAME 可以拮抗这种作用。这表明在动脉流体情况下,NO 可

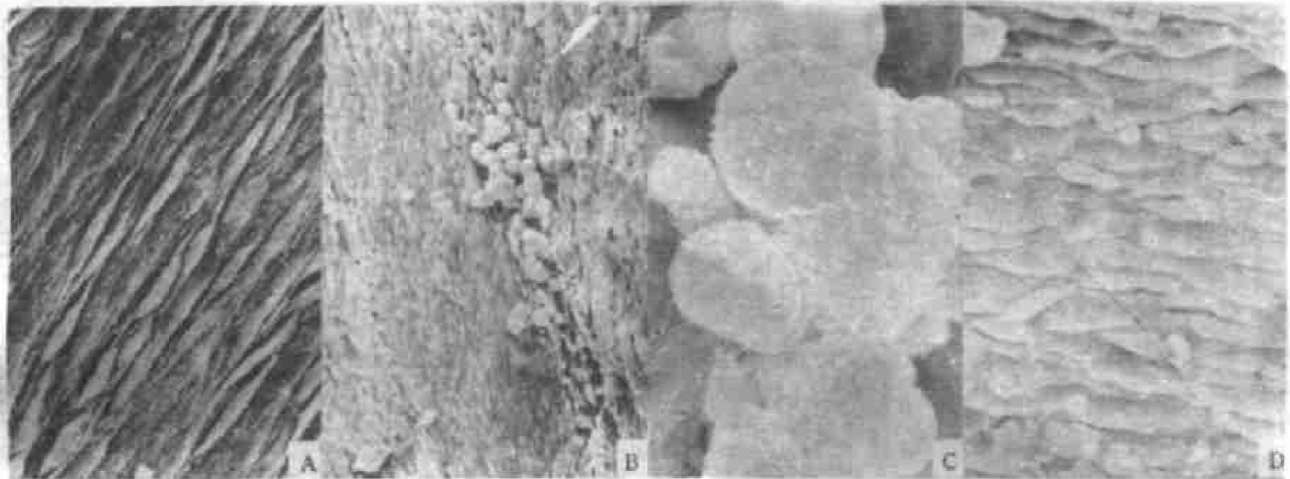


Figure 4. Scanning electron micrographs of rabbit aortic arteries, showing intima feature. A, normal endothelial cells that line the luminal surface of a control vessel. B, monocytes that line the luminal surface of vessel (2% cholesterol-feeding, 4 weeks). C, monocytes that adhere to intima (2% cholesterol-feeding, 4 weeks). D, endothelial cells are aligned in the direction of blood flow (2% cholesterol-feeding + 2% L-arginine, 4 weeks).

以减弱中性粒细胞和内皮的相互作用,提示增加 NO 的产生可以调节内皮的功能。McCall 等的研究也表明 NO 可以抑制 fMLP 引起的中性粒细胞的聚集。提示 NO 是中性粒细胞与内皮细胞作用的重要调节剂。Tarry 等^[4]在家兔单侧髂动脉球囊血管成形术后,在饮食中补充 L-精氨酸,四周后发现 L-精氨酸组内皮依赖性松弛并伴有内膜增生的显著减轻,这些效应都在没有明显的血流动力学和内皮非依赖性松弛作用发生改变时观察得到。电镜观察到完全剥去内皮,会丧失内皮依赖性血管松弛,血管易发生痉挛和血栓形成。内皮再生一般发生在术后 2~3 周,但其形态和功能都不同于正常的内皮细胞,形态表现为大小不一、呈多角形,不沿血流方向排列,功能上表现内皮依赖性松弛作用降低。内皮细胞可以产生生长因子和肝素样化合物,有可能对周围细胞有重要影响和维持正常血管壁内环境的稳定。内膜增生是血小板、白细胞、平滑肌细胞复杂作用的结果,可受到 NO 的影响。损伤处 NO 的产生降低,因而增加了血

小板、白细胞的粘附,它们又可刺激 SMC 的增殖。补充 L-精氨酸抑制内膜的增殖作用,部分是因为邻近完整的内皮细胞、血小板、白细胞和/或平滑肌细胞生成 NO 增加,但也不能排除其他细胞成分或血流动力学的作用。L-精氨酸通过 NO 的产生可影响单核细胞的粘附、浸润、血小板活性或 As 的其他过程。

Cooke^[7]对新西兰兔喂养正常饲料、1%胆固醇、1%胆固醇和 2.25% L-精氨酸膳食造成兔的高胆固醇血症,10 周后发现胆固醇组兔胸主动脉内皮的依赖性松弛作用显著受损,而 L-精氨酸组内皮依赖性松弛作用明显改善并伴有动脉粥样硬化病变面积减小和内膜增生的减轻,不伴有血浆胆固醇水平的改变。本实验深入比较研究了 L-精氨酸抗家兔内皮细胞损伤的作用。实验中注意到高胆固醇的内皮通透性增加,内皮细胞损伤严重,单核/巨噬细胞粘附内皮,脂斑面积大。而在喂养高胆固醇的同时,加 2% L-精氨酸可明显抑制上述病理改变。说明 L-精氨酸具有明显的抗内皮损伤的作用,这为

动脉粥样硬化的防治带来了新的启示。

参考文献

- 1 杨和平, 胡恒山, 杨永宗, et al. 内皮细胞、单核细胞与动脉粥样硬化消退. 心肺血管学报, 1990, 9: 36~38.
- 2 杨和平, 杨永宗. 动脉粥样硬化形成和消退中平滑肌细胞定量研究. 心肺血管学报, 1990, 9: 166~168.
- 3 Hogan DL, Kraemer KL, Isenberg JL. The use of high-performance liquid chromatography for quantitation of plasma amino acids in man. *Anal Biochem*, 1982, 127: 17~24.
- 4 Bath PMW, Hassall DG, Gladwin AW, et al. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on

monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11: 254~260.

- 5 Provost P, Lam JYT, Lacoste L, et al. Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 331~335.
- 6 Tarry WC, Makhoul RG. L-arginine improves endothelium dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 938~943.
- 7 Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*, 1992; 90: 1 168~72.

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅱ)

生长调节蛋白	growth-regulate protein, GRP
巨噬细胞炎性蛋白	macrophage inflammatory protein, MIP
巨噬细胞集落刺激因子	macrophage colony-stimulating factor, MCSF
血管新生	angiogenesis, Ag
血管内皮生长因子	vascularendothelium growth factor, VEGF
血管紧张素	angiotensin, At
血管紧张素转换酶	angiotensin converting enzyme, ACE
血管紧张素转换酶抑制剂	angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI
内皮依赖性舒张	endothelium-dependent relaxation, EDR
活化蛋白 C	activated protein C, APC
低密度脂蛋白受体	lowdensity lipoprotein receptor, LDLR
冠心病	coronary heart disease, CHD
冠状动脉粥样硬化	coronary atherosclerosis, CAs
经皮冠状动脉腔内成形术	percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA
组织型纤溶酶原激活物	tissue type plasminogen activator, t-PA
高峰充盈率	peak full rate, PFR
偏心指数	eccentric index, EI
多不饱和脂肪酸	polyunsaturated fatty acid, PUFA
溶血卵磷脂	lysolecithin, LL
粒细胞趋化蛋白	granulo chemotactic protein, GCP
细胞化学发光	cellular chemiluminescence, CCL
细胞外基质	extracellular matrix, ECM
单克隆抗体	monoclonal antibody, McAb
前列腺素	prostaglandin, PG
前列腺素 D ₂	prostaglandine D ₂ , PGD ₂
前列环素	prostacyclin, PGI ₂ , PC

(胡必利编写)