

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-06-0476-03

血管内皮生长因子与家兔动脉粥样硬化病变进展的关系

李建芝¹, 常青¹, 唐海兰¹, 黄华梅¹, 关洁宾², 李自成³

(暨南大学医学院 1. 组织学与胚胎学教研室, 2. 实验动物所, 广州, 510632. 3. 附属第一医院心内科, 广东省广州市, 510630)

[主题词] 血管内皮生长因子; 动脉粥样硬化; 心血管疾病模型/家兔

[摘要] 为探讨血管内皮生长因子与动脉粥样硬化病变进展的关系。将 50 只雄性新西兰家兔随机分为二组: 对照组动物喂饲普通颗粒兔饲料; 动脉粥样硬化模型组动物喂饲含胆固醇(每只 1.5 g/d)颗粒兔饲料。分别于实验的第 0、4、8、12 周末每组处死兔各 5~8 只, 取主动脉, 采用宏观和微观相结合的方法, 定性及定量观察病变进展情况。同时用免疫组织化学 SP 法观察血管内皮生长因子的表达。大体标本及显微标本定性观察均发现, 随时间延长, 动脉粥样硬化组兔主动脉的斑块面积逐渐增大, 斑块厚度增加。显微图象定量测量的结果与定性观察结果一致, 12 周末时, 斑块平均厚度为 $5.78 \pm 3.75 \mu\text{m}$, 明显大于 4 周末的 $1.28 \pm 0.86 \mu\text{m}$, 两者相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 斑块最大厚度可达 $26.16 \mu\text{m}$ 。残存管腔面积呈现逐渐狭窄的趋势。免疫组织化学染色发现, 正常兔主动脉组织中无血管内皮生长因子表达, 而动脉粥样硬化斑块区内血管内皮生长因子表达呈阳性, 且随动脉粥样硬化病变进展, 血管内皮生长因子表达逐渐增强, 阳性区域的面积也逐渐增大。此结果提示, 血管内皮生长因子在动脉粥样硬化的发生发展中可能发挥着重要的促进作用。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

Relationship between Vascular Endothelial Growth Factor and the Pathogenesis of the Experimental Atherosclerosis of Rabbits

LI Jian-Zhi¹, CHANG Qing¹, TANG Hai-Lan¹, HUANG Hua-Mei¹, GUAN Jie-Bin², and LI Zi-Cheng³

(1. Department of Histology & Embryology; 2. Institute of Laboratory Animal; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[MeSH] Vascular Endothelial Growth Factor; Atherosclerosis; Cardiovascular Disease Model rabbit

[ABSTRACT] Aim To investigate the relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) and the development of atherosclerosis (As). Methods 50 male rabbits were divided into two groups: the rabbits in control group received normal feed, each rabbit in As group received the feed with 1.5 g cholesterol every day. The aortas of rabbits were harvested and observed the pathological changes at the end of week 0, week 4, week 8, and week 12. VEGF expression was studied with immunohistochemical techniques in these samples. Results The results of qualitative observation and quantitative measure are coincident. The average plaque thickness, maximal plaque thickness of aortae in As group gradually increased. The percentage of residual luminal area in As group appears the trend of narrowing gradually. At 12th weekend, the average plaque thickness ($5.78 \pm 3.75 \mu\text{m}$) is significantly larger than that at 4th weekend ($1.28 \pm 0.86 \mu\text{m}$) ($P < 0.05$), the maximal plaque thickness reach $26.16 \mu\text{m}$. Normal arterial segments showed no VEGF expression, while atheromatous lesions showed distinct VEGF expression. Furthermore, VEGF positivity was intensified gradually as the pathology developed. Conclusion VEGF may have some role in the progression of atherosclerosis.

近年来,在对动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病机制的研究中,生长因子和细胞因子的作用日益受到重视。既往研究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的作用主要集中于外源性 VEGF 对缺血组织侧枝循环的影响,而有关 VEGF 与 As 的关系报道少见。本研究通过复制家

兔 As 模型,运用免疫组织化学技术及图象分析技术,探讨 VEGF 与 As 发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

新西兰雄性家兔 50 只,体重 1.5~2.5 kg,随机分为二组:对照组 25 只,喂饲普通颗粒兔饲料;As 模型组 25 只,喂饲含胆固醇(荷兰进口分装,批号 000805)颗粒兔饲料,每只兔每日进食胆固醇 1.5 g。动物单笼饲养,自由饮水。

1.2 标本采集

分别于实验的第 0、4、8 和第 12 周末用气体栓

[收稿日期] 2002-01-30 [修回日期] 2002-11-25

[基金项目] 国家自然科学基金(39800068)资助。

[作者简介] 李建芝,女,1973 年出生,内蒙古自治区人,组织学与胚胎学硕士,现为北京师范大学附属中学教师。常青,女,1963 年出生,湖北省武汉市人,博士,副教授,硕士研究生导师,本文通讯作者,研究方向为心血管系统的细胞保护。李自成,男,1962 年出生,湖北省鄂州市人,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病的防治与介入诊疗。

塞法随机处死每组家兔 5~8 只, 迅速取出主动脉, 生理盐水冲洗后, 中性缓冲福尔马林溶液固定。

1.3 病理学检查及免疫组织化学染色

取主动脉中段(约 0.5 cm) 进行石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度为 0.5 μm 。做常规 HE 染色及 VEGF 免疫组织化学染色。

血管内皮生长因子(VEGF) 免疫组织化学染色采用 SP 法(SP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司)。抗 VEGF 单克隆抗体购自福建迈新生物技术有限公司, 工作浓度为 1:50, 一抗孵育时间为室温下 20 min(切片不经过微波抗原修复)。阴性对照片以 PBS 替代 VEGF 单克隆抗体。实验以 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminoazobenzidine, DAB) 显色, 显微镜下控制显色程度, 自来水冲洗终止反应。常规脱水、透明、中性树脂封片。

其余的动脉条沿正中线剪开, 苏丹 III 染色液(70% 乙醇 50 mL, 丙酮 50 mL, 苏丹 III 1 g) 染色 4 h, 70% 乙醇分化, 直至无斑块区基本呈灰白色止。

1.4 图像分析

用 TIGER 图象分析仪定量测量 HE 染色的石蜡切片上 As 斑块的平均厚度、最大厚度, 以及残存管腔面积占总管腔面积的百分比。

1.5 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。SPSS 8.0 软件对各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 病理学检查

2.1.1 大体标本观察 As 组兔主动脉内膜斑块部分呈现鲜红色, 其它不含脂质的部分及对照组表现为灰白色。随时间延长, As 组兔主动脉斑块面积明显增大, 至第 12 周末, 部分兔主动脉内膜几乎完全被融合的斑块覆盖。斑块的形成与分布表现出一定的规律性。主动脉弓段斑块出现较早, 斑块面积也较大。然后, 斑块逐渐向胸主动脉发展, 呈弥漫性分布。

2.1.2 显微标本观察 对照组兔主动脉内膜平滑、完整, 中膜平滑肌排列规整。As 组兔主动脉内膜局部或全部增厚, 斑块为偏心性或同心性。内皮下间隙增宽, 泡沫细胞堆积。中膜平滑肌排列紊乱。

2.2 图像分析测量结果

用 TIGER 图象分析仪对斑块的测量结果见表 1 (Table 1)。可见, 随实验进展, 斑块有逐渐增厚、管腔呈逐渐狭窄的趋势。

表 1. 不同时间点动脉粥样硬化组斑块平均厚度、最大厚度及残存正常管腔面积占总管腔面积百分比的比较。

Table 1. The comparison of the average plaque thickness, maximal plaque thickness and the percentage of residual luminal area in As group ($\bar{x} \pm s$).

Time	n	Plaque thickness (μm)	Maximal plaque thickness (μm)	Residual luminal area (%)
4th weekend	4	1.3 \pm 0.9	3.9 \pm 1.4 (5.3)	97.9 \pm 2.8
8th weekend	6	3.8 \pm 2.7	6.7 \pm 4.6 (16.1)	93.7 \pm 12.2
12th weekend	6	5.8 \pm 3.7 ^a	10.8 \pm 7.7 (26.2)	89.4 \pm 11.9

a: $P < 0.05$, compared with the 4th week; 括号内数字为该组内实测最大值。

2.3 血管内皮生长因子免疫组织化学染色结果

实验动物标本的免疫组织化学染色结果见图 1 (Figure 1)。对照组兔主动脉各层均未见 VEGF 表达 (图 1A, Figure 1A)。As 组兔(图 1B 为 4 周末, 图 1c 为 8 周末, 图 1d 为 12 周末。Figure 1b is the 4th weekend and Figure 1c is the 8th weekend and Figure 1d is the 12th weekend) 血管中膜基本无着色, 斑块区可见棕黄色阳性颗粒, 位于细胞质、细胞表面和间质。随实验进展, 斑块区着色逐渐增强, 至 12 周末时, As 组所有标本的斑块区均可见强阳性表达, 且 VEGF 阳性区域占据斑块面积的绝大部分。

3 讨论

本文发现, 正常兔血管壁无 VEGF 表达, As 组斑块区内则有明确的 VEGF 表达, 与文献^[1,2]报道一致。但在 As 病变过程中 VEGF 的表达是否发生改变, 尚未见文献报道。本文结果发现, 随实验进展, As 病变逐渐加重, 表现为斑块有逐渐增厚、管腔有逐渐狭窄的趋势。相应地 VEGF 在斑块内的表达有逐渐增强的趋势, 12 周末时, As 组所有标本的斑块区均可见强阳性表达, 且 VEGF 阳性区域占据斑块面积的绝大部分。VEGF 选择性的在斑块区表达, 且随 As 病变进展表达逐渐增强, 提示 VEGF 可能与 As 的发生、发展有关。

内皮细胞、平滑肌细胞、单核-巨噬细胞是 As 病变中的主要细胞类型。VEGF 与三者均有密切关系。正常内皮细胞在维持血管壁的稳定方面发挥着重要作用, 内皮细胞功能紊乱被认为是 As 发生发展的重要始动原因^[3]。内皮细胞不仅是 VEGF 作用的主要靶细胞, 在某些情况下内皮还可合成 VEGF。

血管内皮生长因子(VEGF) 的两种特异性受体 flt-1、KDR/flk-1 主要分布于血管内皮, 通过与其受体结合可引起内皮细胞发生多种变化^[4,6]。VEGF 可

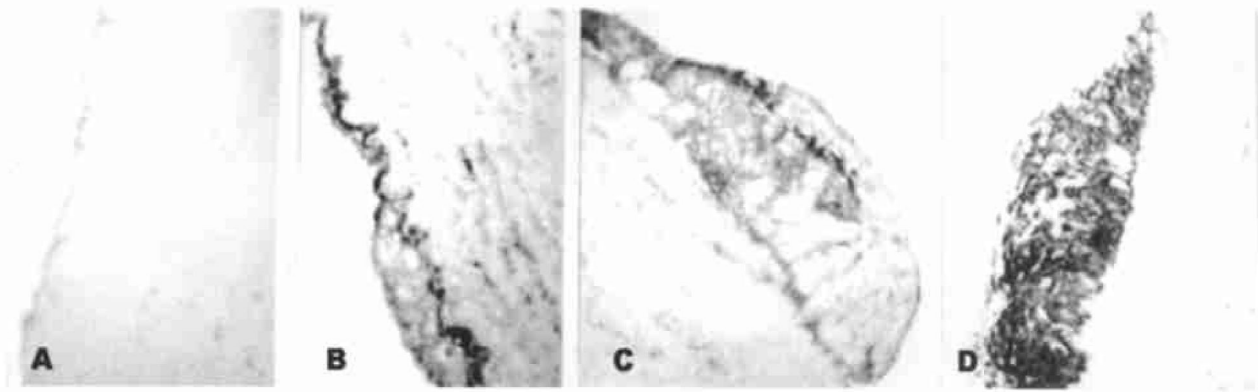


图 1. 对照组及不同时间点动脉粥样硬化组兔主动脉血管内皮生长因子免疫组织化学染色结果。

Figure 1. VEGF immunohistochemical staining of the rabbits aortae in control group and As group at different time. A is control group ($\times 200$); B: As group at 4th weekend ($\times 200$); C: As group at 8th weekend ($\times 200$); D: As group at 12th weekend ($\times 100$).

诱导内皮胞浆钙离子、三磷酸肌醇的积聚;内皮细胞形状改变;内皮通透性增加;诱导内皮细胞迁移、增殖;改变内皮表面抗凝—促凝的平衡;VEGF 还可特异性增加内皮素转化酶 mRNA 及蛋白水平。因此 VEGF 表达失调可能影响内皮功能。另外,免疫组织化学研究发现^[2],正常冠状动脉内皮细胞无 VEGF 表达,而 As 损伤处的内皮细胞呈激活状态(HLA-DR⁺),VEGF 呈阳性表达,且 VEGF 阳性内皮细胞在斑块区内的面积明显高于其在弥漫性内膜增厚的冠状动脉中的面积。作者认为,内皮细胞表达 VEGF 的这种差异,可能是多种有害因素作用下内皮功能紊乱的一个表现。

血管中膜的平滑肌迁入内膜,在内皮下增殖并发生表型转换是 As 进展的重要原因。Inoue 等^[2]报道平滑肌表型不同与合成 VEGF 有关。血管壁中膜的平滑肌呈完全分化状态,其 VEGF 免疫组织化学反应呈阴性;相反,As 斑块处的平滑肌细胞呈 VEGF 阳性表达。本研究发现,除斑块内有明确的 VEGF 表达外,As 组血管中膜及正常兔中膜平滑肌基本无 VEGF 表达。综合以上实验结果,提示平滑肌分泌 VEGF 反映了其未完全分化状态。

血液中的单核细胞进入内膜、激活分化为巨噬细胞,可产生多种生物活性物质,在 As 发生发展中起着关键性的作用。聚集在 As 斑块处的巨噬细胞不仅可合成 VEGF,而且还可表达 VEGF 受体^[2]。Ramos 等认为 VEGF 可以旁分泌或自分泌的方式作为单核细胞的趋化因子,进一步引起单核细胞在斑

块内的聚集,形成恶性循环^[7]。

综合以上分析结果,提示 VEGF 可能参与了 As 的发生发展。但 VEGF 还具有某些对心血管系统有益的功能^[9],因此应结合病变进展、病理类型等综合评价其与 As 的关系。

[参考文献]

- [1] 赵仙先,朱家麟,张宝仁,等. 血管内皮生长因子在动脉粥样硬化斑块中的表达. 第二军医大学学报, 1999, **20** (9): 669-671
- [2] Inoue M, Itoh H, Ueda M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerosis lesions possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*, 1998, **98** (20): 2 108-116
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801
- [4] Pepper MS, Ferrara N, Orci L, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **181**: 902-906
- [5] Senger DR, Connolly DT, Van De Water L, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, 1990, **50**: 1 774-778
- [6] Matsuura A, Kawashima S, Yamochi W, et al. Vascular endothelial growth factor increases endothelin-converting enzyme expression on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **235**: 713-716
- [7] Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, et al. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1 188-196
- [8] Zachary I, Matheu A, Martin J, et al. Vascular protection A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (6): 1 512-520

(此文编辑 胡必利)