

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2002)10-06-0502-03

吉非罗齐对高脂血症鼠一氧化氮活性及血管内皮粘附的影响

吴峻, 孙明, 周宏研

(中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[主题词] 高脂血症; 一氧化氮; 血管细胞粘附分子1; 吉非罗齐

[摘要] 探讨高脂血症在动脉硬化早期对内皮功能的损伤机制。实验分为对照组、高脂血症组和吉非罗齐治疗组, 对照组只喂基础饲料, 另两组通过4周建立高脂血症模型, 此后继续高脂喂养, 其中吉非罗齐治疗组在高脂喂养同时喂服吉非罗齐 60 mg/(kg·d), 16周后检测三组的总胆固醇、甘油三酯、一氧化氮浓度以及观察血管内皮血管细胞粘附分子1的表达水平和细胞粘附密度。结果发现, 与对照组比较, 高脂血症组一氧化氮水平降低, 血管细胞粘附分子1表达强度增强及范围较广, 且白细胞粘附数明显增多。与高脂血症组比较, 吉非罗齐治疗组血清一氧化氮水平增高、血管细胞粘附分子1表达水平降低和白细胞粘附数减少。结果提示, 高脂血症抑制机体一氧化氮活性, 并促进血管细胞粘附分子1对血管内皮的损害, 而吉非罗齐可通过改善内皮功能阻止动脉硬化的发生。

[中图分类号] R543.502

[文献标识码] A

Impact of Gemfibrozil on Nitric Oxide Activity and Cell Adherence of Hyperlipidemic Rats

WU Jun, SUN Ming, and ZHOU Hong-Yan

(Department of Cardiology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[MeSH] Hyperlipidemia; Nitric Oxide; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Gemfibrozil

[ABSTRACT] **Aim** To study the impact of hyperlipidemia on endothelial lesion during the early stage of atherosclerosis.

Methods The investigation included control, hyperlipidemic and gemfibrozil treated groups. Hyperlipidemic model was set up on the 4 week atherogenic diet, followed by a 16 week treatment in the treated group [gemfibrozil 60 mg/(kg·d)]. Serum TC, TG, NO level were measured. Expressions of VCAM-1 and cell adhesiveness on aortic endothelium were observed and analyzed by computer aided system.

Results Compared with the control group, hyperlipidemic rats showed lower level of NO, stronger and more expansive endothelial expression of VCAM-1. Moreover there was an increase in leukocyte accumulation on the endothelial surface. In contrast, in treated group, expression of VCAM-1 as well as leukocyte adhesion were significantly decreased which associated with improvement of endothelial dysfunction.

Conclusions NO activity would be inhibited by hyperlipidemia which facilitated the endothelial impairment of VCAM-1. Gemfibrozil could prevent atherogenesis by restoring endothelial function.

动脉粥样硬化早期不一定有典型的粥样斑块, 血管造影时也无狭窄或阻塞迹象, 但患者仍可出现临床症状, 因为该阶段已有内皮功能障碍及血管痉挛的改变^[1]。本实验通过观察高脂血症时血管活性物质一氧化氮、血管细胞粘附分子1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)以及细胞对血管壁粘附性的变化, 探讨动脉粥样硬化早期血脂对内皮功能的损害机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制及分组

饲料中含2%胆固醇、0.3%去氧胆酸钠、7.5%

猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%蛋黄粉、85%基础饲料, 每天进食量控制在15 g/100 g体重, 分早、中、晚三餐定时定量分别给予^[2], 持续4周, 第4周末从尾部抽血化验以确定模型是否复制成功。

SD大鼠30只, 雄性, 体重200~250 g, 由中南大学实验动物学部提供及饲养(室温20℃~25℃、分笼、定时定量喂食、专人负责, 无厌食及死亡)。随机分为三组: ①对照组10只, 基础饲料喂养20周; ②高脂血症组10只, 按高脂血症动物模型方法进食高脂饲料, 持续20周; ③吉非罗齐治疗组10只, 造模方法同高脂血症组。于第5周起按60 mg/(kg·d)喂服吉非罗齐(湖南株洲湘江药业股份有限公司, 批号010312), 治疗16周。

1.2 生物化学指标检测

于第4周末用4%戊巴比妥钠按40 mg/kg腹腔注射麻醉, 从鼠尾静脉采血1.5 mL, 离心提取血清,

[收稿日期] 2002-06-12 [修回日期] 2002-11-12

[作者简介] 吴峻, 男, 医学博士, 主治医师, 主要从事高血压病、冠心病研究。孙明, 男, 教授, 博士研究生导师。周宏研, 女, 教授, 硕士研究生导师。

以酶比色法(北京中生生物工程高技术公司)经自动生化分析仪(HITACHI 7170A)检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平。20 周末麻醉后从心脏采血,提取血清测量 TC、TG、LDLC 及 HDLC 水平,并以酶比色法(北京晶美生物工程有限公司)测 NO₂⁻/NO₃⁻ 浓度(DU640 分光光度仪 BECKMAN USA),以此代表一氧化氮(nitric oxide, NO)水平。

1.3 免疫组织化学检测

在主动脉以 100 cmH₂O 压力的生理盐水冲洗干净后,去除外膜脂肪组织,取根部 5 mm 置 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,经脱蜡、脱水、封闭内源性过氧化物酶、微波修复抗原、10% 正常山羊血清封闭后,分别加入 VCAM-1 兔抗多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)的工作液(浓度为 20 mg/L)、

生物素标记的羊抗兔二抗工作液、过氧化物酶标记的链酶亲和素复合物三抗工作液。DAB 显色,苏木素复染,1% 盐酸酒精分色,碳酸锂反蓝,脱水,封片。通过病理图文分析系统(HPIAS-1000)定量分析 VCAM-1 表达的强度^[3]、表达的范围,并计算粘附在内膜上白细胞面数密度 N_A^[4],每只鼠血管取 4 张切片的均值。

1.4 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,前后比较采用配对 *t* 检验,取双侧;相关统计采用直线相关回归分析。

2 结果

2.1 各组血生物化学指标的比较

4 周末,高脂血症组 TC 和 TG 均比对照组升高,而 NO 水平下降;20 周末,吉非罗齐治疗组 TG 比治疗前显著下降,而 NO 水平显著增高(表 1, Table 1)。

表 1. 各组不同阶段血脂水平及一氧化氮活性比较。

Table 1. Comparison of serum lipid level and NO activity between groups in different stages ($\bar{x} \pm s$, $n=10$).

Index	4 th week			20 th week		
	Control	Hyperlipidemic	Gemfibrozil	Control	Hyperlipidemic	Gemfibrozil
TC (mmol/L)	1.75 ± 0.21	3.80 ± 0.26 ^a	3.82 ± 0.41 ^a	1.78 ± 0.21	3.97 ± 0.27 ^a	3.32 ± 0.36
TG (mmol/L)	0.38 ± 0.11	0.79 ± 0.07 ^a	0.80 ± 0.14 ^a	0.40 ± 0.12	0.83 ± 0.08 ^{ab}	0.45 ± 0.08 ^d
NO (μmol/L)	38.1 ± 8.7	30.4 ± 7.9	31.1 ± 9.2	38.0 ± 9.9	29.6 ± 7.2	37.9 ± 9.6 ^c

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with gemfibrozil group after treatment; c: $P < 0.05$; d: $P < 0.01$, compared with the same group before treatment.

2.2 各组血管内皮的病理改变

高脂血症组 VCAM-1 表达强度、范围和白细胞粘附密度均高于对照组,吉非罗齐治疗组 VCAM-1

表达强度、范围和白细胞粘附密度则显著低于高脂血症组(表 2, Table 2)。

表 2. 第 20 周末各组间内皮粘附分子表达水平及白细胞粘附密度的比较。

Table 2. Comparison of VCAM-1 expression and leukocyte adherence between groups in 20 weeks ($\bar{x} \pm s$, $n=10$).

Index	Control	Hyperlipidemic	Gemfibrozil
VCAM-1 positive relative intensity	37.9 ± 7.2	53.1 ± 7.5 ^a	44.6 ± 6.4 ^b
VCAM-1 positive rate (%)	6.1 ± 1.4	20.0 ± 7.9 ^a	10.1 ± 2.9 ^c
Leukocyte N _A (10 ⁵ /μm ²)	0.9 ± 0.1	5.6 ± 1.1 ^a	2.0 ± 0.6 ^c

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.01$, compared with hyperlipidemia group.

光镜下,高脂血症组主动脉内皮表面粗糙、局部内皮细胞脱落,平滑肌层排列紊乱,内皮表面可见 VCAM-1 特异性浓染,损害较重者平滑肌层也有局部深染,并有单个核细胞嵌入;吉非罗齐治疗组内皮 VCAM-1 特异性染色显著减弱、表面较光滑,平滑肌层排列较整齐(图 1, Figure 1)。

2.3 直线相关回归分析

血清 NO 浓度与 TC 和 TG 水平呈显著性负相关($r = -0.670$ 和 $r = -0.637$, P 均 < 0.05),与 VCAM-1 表达强度及范围也呈显著性负相关($r = -0.676$ 和 $r = -0.684$, P 均 < 0.05)。

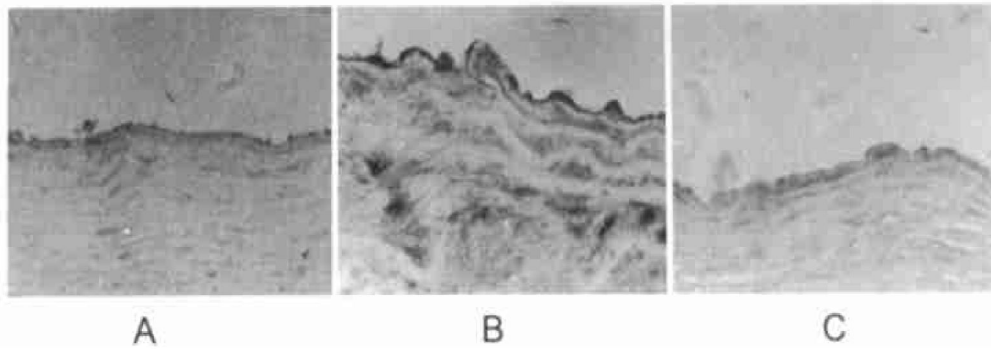


图 1. 各组血管内皮.

Figure 1. Vascular endothelium of the three groups. A: Control; B: Hyperlipidemic; C: Gemfibrozil.

3 讨论

高脂血症患者往往存在内皮功能障碍, 关键原因是内源性一氧化氮不足, 表现为血管无法充分舒张以及受刺激时易收缩。血管痉挛多数只在受刺激时(精神紧张或运动)才发生, 但这种间断发作会发展为持续性病变, 因为内皮功能障碍时血管壁易致炎症细胞粘附并释放炎症因子, 甚至激活凝血机制形成血栓。有研究发现, 及时补充足量的一氧化氮则能改善血管内皮功能, 阻止以上系列改变^[5]。

实验结果显示, 高脂喂养后的大鼠不但 NO 活性下降, 而且炎症因子 VCAM-1 表达增高。高脂血症对血管内皮的损伤机制相当复杂, 目前尚未完全明了。已知血脂成分本身(尤其是氧化型低密度脂蛋白)能抑制内皮 NO 的生成和释放, 并进一步诱导细胞粘附分子的表达^[6]; 其次, 非氧化型 LDL 也可通过诱发内皮细胞胞浆内钙浓度、AP-1 依赖的基因转录水平以及 VCAM-1 表达水平的升高^[7]来影响血管功能。VCAM-1 的高表达不但提示了内皮有损害, 而且能体现内皮功能受损的程度(两者呈负相关)。VCAM-1 表达最显著的部位不是在内皮细胞的胞浆, 而是在胞膜边缘并向外周蔓延。正常情况下, 动脉内皮会有少量的 VCAM-1 表达, 高脂血症则使其表达水平显著提高。VCAM-1 的表达不是均匀分布的, 主要集中在受损位置, 表达强度与损害程度呈正相关, 如在损伤严重、泡沫细胞较多的部位, 许多深层细胞、甚至在血管中层平滑肌也有 VCAM-1 的表达, 提示这些受脂质刺激的细胞可能发生了表型的转变, 有向内皮转化并向内皮层迁移的趋势, 与缺陷性的血管内皮形成有关。

吉非罗齐能显著降低 TG 水平, 虽然改变 TC 水平并不显著, 但仍能明显地抑制 VCAM-1 的表达及

细胞粘附, 提示降低 TG 水平和提高 NO 活性有利于阻止炎症因子对内皮的损伤及动脉硬化的进程。另外, Gerhard 等使用抗炎药在不影响血脂的前提下, 通过抑制内皮 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达不但能抑制单个核细胞的粘附, 还抑制了它的趋化和吞噬作用, 最终有效地阻止高脂饮食诱导的斑块形成, 这种非降脂途径的血管保护作用说明炎症因子对血管的损伤具有独立的机制^[8]。所以在调脂的同时抑制炎症因子的表达有其现实的意义。

总之, 在动脉硬化形成之前, 内皮功能下降及炎症因素的介入已较早地参与了血管损害机制, 降脂治疗(吉非罗齐治疗)能有效地阻止动脉硬化的进展, 这种作用与内源性一氧化氮水平的提高、内皮功能的改善有关。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] 蔡波, 郑惠珍. 高脂饮食对大鼠动脉血管张力的影响. *广东医学院学报*, 2000, **18** (3): 239-240
- [3] 张新超, 徐成斌, 王申五. 普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉粥样硬化形成及主动脉壁血管细胞粘附分子 1 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 34-37
- [4] 郑富盛. 细胞形态立体计量学. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1990: 85-86
- [5] Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE, et al. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor following acute myocardial ischemia and perfusion in dogs. *Circulation*, 1993, **88** (5): 2 337-350
- [6] Scalia R, Murohara T, Campbell B, et al. Lysophosphatidylcholine stimulates leukocyte rolling and adherence in rat mesenteric microvasculature. *Am J Physiol*, 1997, **272** (6): H2 584-590
- [7] Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, et al. Native low density expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 1998, **101** (5): 1 064-075
- [8] Walker G, Langheinrich AC, Dennhauser E, et al. 3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (11): 2 673-679

(此文编辑 文玉珊)