

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0415-04

•实验研究•

外膜炎症诱发载脂蛋白 E 基因敲除鼠冠状动脉粥样硬化病灶

高琳琳¹, 翟同钧², 陈融³, 王建丽³, 李莉³, 胡维诚³, P. D. Polinsky⁴

(1. 泰山医学院生理学教研室, 山东省泰安市 271000; 2. 临沂医学专科学校病理学教研室,

山东省临沂市 276002; 3. 山东大学医学院病理生理学教研室, 山东省济南市 250012;

4. Dept. of Pathophysiology, University of Washington, Seattle, WA, 98195 USA)

[关键词] 病理学; 动脉粥样硬化; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 冠状动脉; 外膜炎症; 细胞间粘附分子 1; 血管细胞粘附分子 1

[摘要] 研究载脂蛋白 E 基因敲除(载脂蛋白 E⁰)小鼠冠状动脉内粥样硬化病灶的分布、组成与动脉外膜炎症的关系。取载脂蛋白 E⁰小鼠心脏作连续切片, Movat 法染色, 追踪冠状动脉主干及其心肌内的小分支; 寻找病灶, 观察病灶内组成, 分析其分布规律。复制小鼠股动脉外膜无菌性炎症模型, 用免疫组织化学方法检查内膜粘附分子的表达。结果发现, 冠状动脉主干内有延伸病灶, 在主干以下分支(包括心肌内小分支)内有在原位生成的病灶, 在两类病灶相邻的外膜有炎性细胞浸润, 外膜炎症面积大于动脉粥样硬化病灶累及的内膜面积, 亦发现一些部位血管外有炎性细胞浸润, 而尚无病灶形成。原位病灶均发生于心室壁, 大的原位病灶多发生在左室壁心肌内、血管分支处和乳头肌附近的冠状动脉分支内。股动脉外膜炎症可诱发内膜表达细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1, 同时伴白细胞的附壁。以上提示: 血管外膜炎症是小鼠冠状动脉内病灶的一个始动环节。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Adventitial Inflammation Induces the Formation and Progress of the Atherosclerotic Lesions within Coronary Artery of ApoE Knockout Mice

GAO Lin-Lin¹, ZHAI Tong-Jun², CHENG Rong³, WANG Jian-Li³, LI Li³, HU Wei-Cheng³, and P. D. Polinsky⁴

(1. Department of Physiology, Taishan Medical School, Taian, Shandong 271000; 2. Department of Pathology, Linyi Medical School, Linyi, Shandong 276002; 3. Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 4. Department of Pathophysiology, University of Washington, Seattle, WA, 98195 USA)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; ApoE Gene Knockout Mice; Coronary Artery; Adventitial Inflammation; Intima; ICAM-1; VCAM-1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the occurrence and the morphological manifestation of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}) mice. Explore the relationship between lesion formation and adventitial inflammation.

Methods The successive sections of the hearts of 60 and 112 weeks old ApoE^{-/-} mice were made, then stained by Movat method.

Trailed all the trunks and intramyocardial small branches of coronary arteries for finding the lesions, and analyzed the relationship between lesion distribution and adventitial inflammation. The aseptic adventitial inflammation of the femoral artery in C57BL/6 mice were duplicated, detected the expression of adhesive molecules. **Results** There were extending lesions in the trunks of coronary artery, which extended directly from the aorta. There were in situ lesions in the branches of the trunks (including intramyocardial small branches). There were inflammatory cells aggregation at the adventitia with the lesions at the corresponding intima. The infiltrating area of inflammatory cells was much larger than the area of lesion at intima. Some positions with inflammatory infiltration in adventitia could be seen without lesion at corresponding intima. All the in situ lesions were arised within ventricular muscle, most of the large in situ lesions appeared in the left ventricular wall. ICAM-1, VCAM-1 and adhesion of white blood cells could be seen at the intima of femoral artery in the mice with experimental aseptic adventitial inflammation.

Conclusions The adventitial inflammation is one of the predisposing factors for the formation of lesions within the coronary artery.

目前载脂蛋白 E 基因敲除(载脂蛋白 E⁰)小鼠已成为研究动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病

机制的最重要的动物模型^[1]。非高脂喂养的载脂蛋白 E⁰小鼠在 20 周时整个主动脉树就已存在严重 As 病灶, 而且这些病灶与人的 As 病灶极为相似^[2]。迄今为止, 已有对载脂蛋白 E⁰小鼠主动脉和冠状动脉根部 As 病灶病变的多篇研究报告^[1-3]。本研究追踪观察了载脂蛋白 E⁰小鼠冠状动脉主干和心肌内所有小分支 As 病灶情况, 并研究其 As 病灶和动脉外膜炎症的关系, 现将研究结果报告如下。

[收稿日期] 2003-02-19 [修回日期] 2003-07-30

[作者简介] 高琳琳, 女, 1966 年出生, 山东省泰安市人, 硕士, 讲师, 主要从事动脉粥样硬化发病机理研究, 联系电话: 0538-6238860, E-mail: gao_linlin@sina.com。翟同钧, 男, 1960 年出生, 山东省青岛市人, 硕士, 副教授, 主要从事动脉粥样硬化发病机理研究, 联系电话: 0539-8213807, E-mail: zjt0402@sina.com。陈融, 女, 1963 年出生, 福建省福州市人, 本科, 实验师。

1 材料和方法

1.1 材料

取 11 只 60 周龄和 10 只 112 周龄雄性载脂蛋白 E⁰ 小鼠(均购自美国 Jackson Labs), 喂以市售普通饲料。腹腔注射氯胺酮(85.7 μg/g 体重)和甲苯噻嗪(7.7 μg/g 体重)麻醉, 剪开胸腔暴露心脏, 左心室插管(24 g-3/4" B-D Angiocath I. V.)。以 100 mm Hg 压力灌注生理盐水 20 s, 继续灌注 10% 福尔马林 4 min, 在解剖显微镜下剥离心脏, 并从左右心耳下缘 1~2 mm 水平分为心底和心尖两部分, 石蜡包埋。

1.2 切片及染色方法

应用 LEICA3027 切片机制备小鼠心脏连续切片, 于冠状动脉主动脉开口处连续切至心尖, 每个心脏大约可获得 1 700 个厚 5 μm 切片。用改良的 Movat 5 色套染法染色^[4], 细胞核及弹力纤维为黑色、基质和粘蛋白为蓝色、纤维蛋白为深红色、胶原和网状纤维为黄色、肌细胞为红色。

1.3 观察切片方法

连续观察每个心脏切片, 辨认各条冠状动脉主干走向和逐级分支情况, 并绘制全部血管走行图, 标出所发现的病灶在血管树的位置。根据含有病灶的切片数计算病灶大小。根据 Movat 染色估算相应组织成分含量。用 TD2000 病理和细胞图像分析系统(北京天地高科技技术开发公司)测量血管内径。

1.4 复制小鼠动脉外膜无菌性炎症模型

取与载脂蛋白 E⁰ 小鼠有相同遗传背景的健康雄性近交系 C57BL/6 小鼠(由山东大学医学院实验动物中心提供) 30 只, 给予市售普通饲料。常规皮肤消毒, 沿腹股沟中点纵行切开皮肤, 暴露股动脉鞘, 将消毒过的长 2 mm 的塑料管套于小鼠的左侧股动脉鞘外, 右侧股动脉为对照, 复制模型的过程即完成。术后给予乙酰螺旋霉素水溶液服用 3 天抗感染, 于术后的 7、15 和 30 天处死小鼠, 取两侧股动脉分别行 HE 染色和 Movat 染色, 用免疫组织化学染色观察血管外膜及内膜的细胞间粘附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)及血管细胞粘附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的表达。两试剂盒均购自武汉博士德公司, 实验操作严格按照说明书进行。

2 结果

2.1 小鼠冠状动脉树结构

小鼠的冠状动脉树结构与人冠状动脉结构不

同, 除左、右冠状动脉主干之外, 大都有一条走行在室间隔肌肉内的较粗而且少有分支的动脉血管, 从其供血范围看类似人的冠状动脉左前降支, 在本文称为“室间隔动脉”, 这一发现与 Doevendans 等^[5] 报告相同。因为这一条血管多直接起源于主动脉, 为叙述方便, 在本文中左冠状动脉、右冠状动脉和室间隔动脉统称为冠状动脉的 3 条主干血管。

2.2 冠状动脉主干血管内的延伸病灶

60 周龄和 112 周龄载脂蛋白 E⁰ 小鼠的主动脉腔面满布 As 斑块。在 11 只 60 周龄小鼠 33 支主干血管中有 19 条主干血管内有直接从主动脉病灶延伸进来的 As 病灶(57%), 本文将此称为“延伸病灶”。延伸病灶从冠状动脉于主动脉开口处向冠状动脉延伸的长度为 20~420 μm(平均 90 μm)。在 10 只 112 周龄小鼠 30 条主干血管中有 24 条存在延伸病灶(80%), 长度为 80~720 μm(平均 150 μm)。

延伸病灶的形态学表现与主动脉内病灶完全相同, 在较薄的纤维帽下有大量的胆固醇结晶。在有延伸病灶的 43 条冠状动脉主干血管外膜均有大量的炎性细胞浸润, 而无外膜炎性细胞浸润的冠状动脉主干内均无延伸病灶(图 1, Figure 1)。同时发现外膜炎性细胞浸润面积大于延伸病灶所覆盖的内膜面积, 观察病灶连续切片时发现当延伸病灶消失时, 对应的外膜部位仍然有炎性细胞聚集。

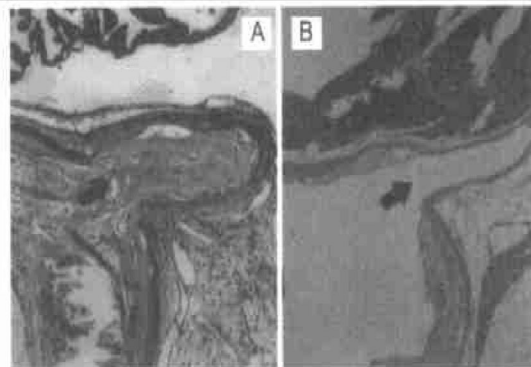


图 1. 小鼠主动脉向冠状动脉开口处(×100) A: As 病灶向冠状动脉主干内延伸, 外膜部位有大量炎性细胞浸润; B: 冠状动脉主干内无延伸病灶, 外膜无炎性细胞浸润。

Figure 1. The open of aorta from coronary (×100)

2.3 冠状动脉小分支内的原位病灶

在 3 条冠状动脉主干的分支(包括心肌内小分支)发现有在局部生成的小 As 病灶, 与延伸病灶不相连, 本文称之为“原位病灶”。原位病灶不发生在冠状动脉主干, 发生原位病灶的血管直径均在 30~130 μm 之间。经 Movat 染色显示, 小的原位病灶常

常只由几个富含蛋白聚糖的细胞组成,随着病灶体积的增大,病灶内蛋白聚糖含量逐渐减少,细胞内外脂质成分逐渐增多。在许多原位病灶所在血管的外膜部位常常可发现有炎性细胞浸润,而且有炎细胞浸润的范围大于原位病灶覆盖内膜的面积。还有许多部位的血管外膜有局灶性的细胞浸润,但尚无内膜病灶形成(图 2, Figure 2)。

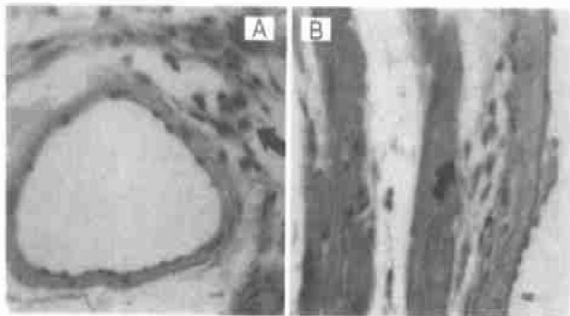


图 2. 载脂蛋白 E⁰ 小鼠冠状动脉小分支原位病灶 (×400)

A: 新生原位病灶, 外膜有炎性细胞聚集; B: 动脉外膜有炎性细胞浸润, 但内膜尚未发现病灶。

Figure 2. Small in situ lesion in tiny branches of coronary (×400)

每只载脂蛋白 E⁰ 小鼠心脏有 2~10 个原位病灶。在 21 只载脂蛋白 E⁰ 小鼠心脏共发现有 141 个原位病灶, 所有的原位病灶均发生在心室壁内的冠状动脉分支。本文将长度在 20~40 μm 原位病灶称为小病灶, 60~200 μm 为中病灶, 220~400 μm 为大病灶, 有 82% (116/141) 的原位病灶和 85% (35/41) 的大原位病灶位于左心室壁。在所有的 141 个原位病灶中, 32 个位于小血管分支处, 22 个位于心室乳头肌附近的心肌内。

2.4 实验性股动脉外膜无菌性炎症观察结果

在小鼠股动脉周围埋入塑料管 7 天后, 在血管外膜有炎性细胞聚集, 并表达 ICAM-1 和 VCAM-1 增强, 但在血管内膜只表达 ICAM-1。15 天后, 可看到在动脉外膜炎细胞大量聚集, 动脉内膜表面有白细胞附着, 同时发现血管内膜 ICAM-1 和 VCAM-1 均表达增强(图 3, Figure 3)。

3 讨论

一般认为动脉粥样硬化病灶发生在大、中动脉, 有关的临床和实验研究多集中于主动脉及其较大的分支(如颈总动脉和肾动脉等), 很少对脏器实质内的细小动脉分支进行详细的观察。本课题组首次采

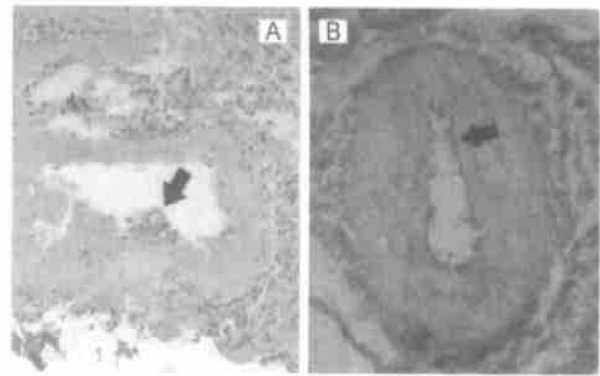


图 3. C57BL/6 小鼠股动脉壁改变 (×200) A: 股动脉周围有大量炎性细胞聚集, 内膜有白细胞附壁; B: 股动脉内膜表达 VCAM-1 增强。

Figure 3. The changes in the wall of femoral artery (×200)

用连续切片方法, 从每个载脂蛋白 E⁰ 小鼠心脏获得了 1700 张组织切片, 通过连续观察每张切片, 追踪观察了每一条冠状动脉从开口处直到心尖的所有分支(包括心肌内细小分支), 由此获得了 60 周龄和 112 周龄载脂蛋白 E⁰ 小鼠心脏冠状动脉及其全部分支的系统观察结果, 发现在小鼠冠状动脉主干的 As 病灶是直接从主动脉病灶延伸而来的; 在冠状动脉主干以下的分支血管(包括心肌内小分支)确有在原位生成的 As 病灶。

另一个发现是, 载脂蛋白 E⁰ 小鼠冠状动脉内 As 病灶的发生和发展与外膜炎密切相关。没有外膜炎的冠状动脉主干血管内没有延伸病灶, 在有外膜炎的冠状动脉主干血管内才有延伸病灶, 而且所有的延伸病灶累及的范围均小于炎性细胞浸润的范围, 提示动脉外膜炎性细胞(据形态学判断, 现认为以淋巴细胞为主, 亦可能有部分巨噬细胞^[6])的浸润可能引起内膜延伸病灶的发生。在追踪观察冠状动脉小分支血管走向时, 经常发现局灶性的血管外膜炎, 有些伴有血管内病灶, 有些尚未出现病灶。外膜炎性细胞浸润的面积总是大于内膜 As 病灶累及的面积。由此强烈提示外膜炎是促使内膜 As 病灶形成和发展的一个始动因素。

目前在 As 发病机制研究中占主导地位的是“损伤—反应假说”^[7], 该假说未提及外膜与 As 病灶形成的关系, 国内外涉及动脉外膜炎与 As 发病关系的研究论文也比较少。有关文章的基本观点是外膜炎性细胞浸润和动脉中膜萎缩一样, 是继发于晚期 As 病灶的病理改变, 而外膜炎又常见于动脉瘤的动脉周围^[8-11]。

有一些研究报告提出动脉外膜病变可以引起中膜和内膜的改变: Okamoto 等^[12]报告猪冠状动脉血管成形术后, 血管周围有嗜中性粒细胞和巨噬细胞聚集, 并释放血管活性物质和细胞因子, 与血管成形术后血管重塑有关。Gutierrez 等^[13]通过对急性心肌梗死病人尸检认为外膜炎症与 As 斑块的不稳定性有关。Neschis 等^[14]在兔髂动脉球囊扩张段的动脉外膜涂布生物凝胶包裹的反义 bFGF 基因, 经外膜进行基因转染, 不仅成功地将外源基因转至血管壁, 而且有效地抑制了内皮损伤后新生内膜的增生。杜军保等^[15]发现血管外膜源性一氧化氮可抑制内皮素 1 刺激的血管平滑肌细胞增殖。

Rayner 等^[16]用原位杂交方法连续观察了 0~ 12 周载脂蛋白 E⁰ 小鼠的主动脉切片, 发现在 As 病灶形成过程中, 小鼠 JE/MCP-1 及其受体(CCR-2) 的 mRNA 表达最早见于外膜的间质细胞, 从而提示外膜炎症可能是主动脉 As 病灶形成过程中的一个早期事件, 与本文持相同的观点。对实验性股动脉周围无菌性炎症小鼠研究发现, 随着股动脉周围的炎性细胞数目增多, 内膜有白细胞附壁和 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达, 说明外膜炎症确实可能造成动脉内皮细胞的功能障碍, 而这一功能障碍正是作为 As 病灶形成始动环节的内皮细胞损伤的最早表现。

值得注意的是所有原位病灶均发生于心肌内的冠状动脉分支, 有 82% (116/141) 的原位病灶和 85% (35/41) 的大原位病灶位于左心室壁; 而在 60 周龄载脂蛋白 E⁰ 小鼠的右冠状动脉分支未见到一个体积较大的原位病灶; 又因为发生在心肌内小分支的原位病灶多发生在血管分支处和乳头肌附近部位, 这些部位的血管在心肌收缩时承受更强的挤压力, 所以强烈提示心肌收缩舒张的机械挤压牵拉作用是冠状动脉外膜炎性细胞浸润的主要原因。机械因素和化学信号一样, 可以作用于血管周围间质细胞, 激活 G 蛋白和小 G 蛋白, 以 Ca²⁺、IP₃、DAG 和 cAMP 等作为第二信使, 通过蛋白质磷酸化的级联反应导致信号的转导, 最终作用于转录因子(如 NF- κ B), 引起局部炎症反应^[17]。

研究动脉外膜炎症在 As 病灶形成过程中的作用是在 As 发病机制中的一个研究领域, 今后需要通过测定在外膜炎症与内膜病灶形成关系的不同阶段, 各种促炎因子和有关信号转导分子的表达水平的动态变化, 从而研究外膜炎症发生及外膜炎症诱导内膜病灶形成的机理。

[参考文献]

- [1] Plump AS, Smith JD, Havek T. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992, **71**: 343-353
- [2] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking Apolipoprotein E. *Science*, 1992, **258**: 468-472
- [3] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 133-136
- [4] 李莉, 翟同钧, 陈融. Movat 五色套染法的改进及应用. *临床与实验病理学杂志*, 2002, **18** (6): 660-662
- [5] Doevendans PA, Daemen MJ, Muinck ED. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular Research*, 1998, **39**: 34-39
- [6] 陈培利, 冯友梅, 从容. 极低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 92-98
- [7] Ross R. Atherosclerosis-An inflammation disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-123
- [8] Parums DV, Dixon AK, Mitchinson MJ. Characterization of inflammatory cells in a patient with chronic periaortitis. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1990, **3** (2): 121-129
- [9] Freestone T, Turner RJ, Hignam DJ. Influence of Hypercholesterolemia in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (1): 10-17
- [10] Houtkamp MA, De Boer OJ, van der Loos CM. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. *J Pathol*, 2001, **193** (2): 263-269
- [11] Stratford N, Britten K, Gallagher P. Inflammatory infiltrates in human coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1986, **59** (3): 271-276
- [12] Okamoto E, Couse T, Leon HD. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation*, 2001, **104** (18): 2228-2235
- [13] Gutierrez PS, Bezerra HG, Palomino SA. Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured and nonruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Arq Bras Cardiol*, 2002, **79** (1): 20-24
- [14] Neschis DG, Sattton SD, Hanna AK. Antisense basic fibroblast growth factor gene transfer reduces early intimal thickening in a rabbit femoral artery balloon injury model. *J Vasc Surg*, 1998, **27**: 126-134
- [15] 杜军保, 唐朝枢, 李夏. 血管外膜源性一氧化氮对内皮素-1 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响. *高血压杂志*, 2002, **10** (2): 139-142
- [16] Rayner K, Van Eersel S, Groot PH. Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the apoE knockout mouse. *J Vasc Res*, 2000, **37** (2): 93-102
- [17] 刘明耀, 潘真. 细胞对机械信号的感受及传导. 见: 卢建主编. 受体信号转导系统与疾病. 济南: 山东科学技术出版社, 1999; 329-341

(此文编辑 朱雯霞)