

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0151-04

•实验研究•

球囊拉伤致家兔动脉粥样硬化斑块破裂及血栓形成

陈文强, 张运, 季晓平, 张梅, 朱永锋, 殷乐, 姚桂华

(山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 内科学; 药物触发斑块破裂及血栓形成; 斑块破裂及血栓形成的兔模型; 动脉粥样硬化; 血栓形成; 球囊; 组胺

[摘要] 为建立动脉粥样硬化的兔模型并用药物触发造成斑块破裂及血栓形成, 将 60 只雄性纯种新西兰兔随机平均分成三组: 球囊损伤+高脂(1%胆固醇)组、高脂喂养组及普通饲料喂养组, 喂养 3 个月后分别给予鲁塞尔蝰蛇毒和组胺药物触发以造成斑块破裂及血栓形成。结果发现, 球囊损伤+高脂组与高脂喂养组均形成动脉粥样硬化斑块, 其中球囊损伤+高脂组所形成的粥样斑块为具有较大脂质核的软斑块; 药物触发后球囊损伤+高脂组存活的 18 只中有 11 只共 15 处发生斑块破裂及血栓形成; 高脂喂养组中的 19 只经药物触发后仅 5 只共 7 处发生斑块破裂及血栓形成; 普通饲料喂养组中未见斑块破裂及血栓形成。结果提示, 在构建的动脉粥样硬化斑块的动物模型基础上, 应用药物触发后能够造成斑块破裂及血栓形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Research on Triggering Plaque Disruption and Arterial Thrombosis in Vivo

CHEN Wen-Qiang, ZHANG Yun, JI Xiao-Ping, ZHANG Mei, ZHU Yong-Feng, YIN Yue, and YAO Gui-Hua

(Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Thrombosis; Balloon; Histamine; Pharmacological Triggering; Disruption

[ABSTRACT] **Aim** To build an animal model of plaque disruption and arterial thrombosis by pharmacological triggering atherosclerotic rabbits. **Methods** Sixty New Zealand White rabbits were equally divided into 3 groups at random: balloon injury + high lipid diet group, high lipid diet group and regular diet group. Rabbits in balloon injury + high lipid diet group underwent balloon induced arterial wall injury and then were fed on a diet of 1% cholesterol; rabbits in high lipid diet group were only given 1% cholesterol; rabbits in regular diet group were fed on a regular diet. They were all fed for 3 months. Then the three groups underwent pharmacological triggering with Russell's viper venom (RVV) and histamine. **Results** Atherosclerotic plaques were found in balloon injury + high lipid diet group and high lipid diet group; the lipid cores in the first group were larger than those in the second group. In balloon injury + high lipid diet group, it was found that plaques disruption and thrombosis occurred in 11 out of the 18 rabbits and in total 15 lesions occurred plaque disruption and thrombi after triggering. In high lipid diet group, only 5 rabbits demonstrated plaques disruption and thrombosis and there were in all 7 thrombi. However, rabbits in the regular diet group did not have plaques disruption and thrombosis. **Conclusions** With atherosclerotic plaque animal models, we could pharmacologically trigger plaque disruption and arterial thrombosis.

近年来研究发现急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 主要是由于动脉粥样硬化斑块破裂、血栓形成造成冠状动脉急性闭塞所致^[1,2], 从而认为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一个稳定期和不稳定期交替的非线性过程, 这一过程取决于斑块的稳定性。因此, 对不稳定性斑块的准确识别及预防性干预促使斑块由不稳定向稳定方向转化对于预防急性心脑血管事件的发生具有十分重要的意义。然而, 由于缺乏研究不稳定斑块及其破裂

的理想动物模型, 对研究动脉粥样硬化斑块破裂、血栓形成的分子生物学机制较为困难。本研究主要是建立 As 斑块的动物模型并在此基础上应用药物触发造成斑块破裂及血栓形成, 为 As 的基础和临床研究提供最适宜的研究对象。

1 材料与方法

1.1 试剂、药品与仪器

鲁塞尔蝰蛇毒 (Russell's viper venom, RVV) 购自 Sigma 化学试剂公司, 组胺购自上海东风生物技术有限公司, CD68 单抗购自北京中山试剂公司, 抗 α -actin 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。日本 JEM-1200 透射电子显微镜, 日本产 JSM T-300 扫描电镜, 美国产 Beckman CX-7 全自动生化分析仪。

[收稿日期] 2003-05-30 [修回日期] 2003-12-22

[基金项目] 卫生部临床学科重点项目基金(20012943)资助

[作者简介] 陈文强, 心内科博士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病方面的研究工作。张运, 中国工程院院士, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化及血流动力学方面的研究。季晓平, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病心肌梗死方面的研究。

1.2 动物与分组

雄性纯种新西兰大白兔 60 只, 体重 1.5~ 2.5 kg, 由山东省农业科学院提供。随机平均分成三组: 球囊损伤+ 高脂(1%胆固醇)组、高脂喂养组和普通饲料喂养组, 共喂养 3 月, 每只 120~ 140 g/d。

1.3 腹主动脉球囊拉伤术

戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉麻醉动物, 穿刺针从右侧股动脉穿刺成功后, 沿 0.014 导丝把内径为 3.5 mm、长为 15 mm 的球囊导管送入腹主动脉约 20 cm, 8 个大气压充盈球囊回拉至髂动脉, 反复回拉损伤内膜 3 次。

1.4 药物触发

三组实验兔参照 Constantinides 和 Chakravarti^[3]提供的方法: RVV 0.15 mg/kg 腹膜下注射, 30 min 后, 经耳缘静脉注射组胺 0.02 mg/kg, 于处死动物前 24 h 和 48 h 给予两次药物触发。

1.5 血液生物化学检测

分别于实验开始及 3 月末处死动物前作血液生物化学检测。禁食 12 h 以上, 测定体重后, 经耳缘静脉抽取空腹血, 一部分自凝血检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL), 应用公式 $LDL = TC - HDL - TG \div 2.2$ 计算低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。

1.6 病理学检查

1.6.1 标本大体形态观察 耳缘静脉注射过量的 3% 戊巴比妥钠处死实验兔, 处死前静脉推注肝素 10 u/kg 以抗凝。开腹取出腹主动脉全长, 纵行切开, 生理盐水冲洗干净后, 观察斑块破裂和血栓形成情况, 应用游标卡尺测量血栓的长度和面积。斑块破裂是以局部有血栓形成为依据的, 未见血栓形成不诊断为斑块破裂^[4]。

1.6.2 组织病理学检查 截取腹主动脉血栓形成段及对照组腹主动脉下段 1 cm, 立即放入 10% 福尔马林内浸泡固定。24 h 后经组织制片, 给予苏木素-伊红(HE)染色及 Masson's 三色染色。利用 HE 染色的切片, 在 ≤ 40 倍光镜下, 内膜层以有局部脂质沉积为脂质斑块的诊断标准^[5], 利用微机图像处理测量系统对切片进行图像摄取和转换, 测量斑块直径。

1.6.3 免疫组织化学染色 应用 CD68 及 α -actin 抗体分别测定斑块破裂与未破裂部位的巨噬细胞及 α -平滑肌肌动蛋白的局部表达。

1.6.4 电镜观察 分别应用扫描电镜及透射电镜观察斑块及血栓形成情况。标本以戊二醛和锇酸双重固定, 脱水、置换、干燥、粘托、喷金后, 扫描电镜观察斑块破裂、血栓形成情况。通过环氧树脂包埋及硬化剂、加速剂、增塑剂的调配, 超薄切片机切成 70 nm 的薄片, 重金属染色, 透射电镜观察血管的斑块部位和正常部位的超微结构。

1.7 统计学分析

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 计数资料应用 Fisher 精确检验, $P < 0.05$ 具有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

球囊损伤+ 高脂组因麻醉意外死亡 2 只, 高脂喂养组因腹泻死亡 1 只, 普通饲料喂养组全部存活。

2.2 血脂水平

高脂喂养 3 个月后, 球囊损伤+ 高脂组和高脂喂养组 TC、TG 及 LDL 显著升高, 与高脂喂养前比较差异有显著性, 但两组间无统计学差异。普通饲料喂养组血脂水平变化无显著性差异(表 1, Table 1)。

表 1. 三组血脂水平

Table 1. Lipid levels of three groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	实验前			实验 3 月后		
	总胆固醇	甘油三酯	低密度脂蛋白	总胆固醇	甘油三酯	低密度脂蛋白
球囊损伤+ 高脂组	2.01 ± 0.59	1.10 ± 0.33	0.72 ± 0.36	31.04 ± 10.73 ^b	2.06 ± 2.14 ^a	26.84 ± 10.43 ^b
高脂喂养组	2.00 ± 0.51	1.13 ± 0.41	0.69 ± 0.29	30.29 ± 7.65 ^b	2.07 ± 2.01 ^a	27.31 ± 10.10 ^b
普通饲料喂养组	2.03 ± 0.61	1.11 ± 0.48	0.71 ± 0.32	2.00 ± 0.44	1.09 ± 0.30	0.68 ± 0.28

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与实验前比较。

2.3 斑块大小与斑块破裂及血栓形成情况

球囊损伤+ 高脂组及高脂喂养组均形成动脉粥样硬化斑块, 其中球囊损伤+ 高脂组所形成的粥样

斑块为具有较大脂质核的软斑块; 药物触发后球囊损伤+ 高脂组存活的 18 只中有 11 只共 15 处发生斑块破裂及血栓形成; 高脂喂养组中的 19 只经药物

触发后仅 5 只共 7 处发生斑块破裂及血栓形成,与球囊损伤+ 高脂组相比较具有显著性差异($P < 0.05$); 高脂喂养组血栓长度、血栓横截面积与球囊损伤+ 高脂组相比较均无统计学意义($P > 0.05$; 表 2, Table 2)。普通饲料喂养组中未见斑块破裂及血栓形成。

表 2. 球囊损伤+ 高脂组及高脂喂养组斑块大小及血栓形成情况比较

指 标	球囊损伤+ 高脂组 ($n=18$)	高脂喂养组 ($n=19$)
斑块直径 (μm)	997 \pm 339	598 \pm 359 ^a
斑块破裂及血栓 (处)	15/18	7/19 ^a
血栓长度 (mm)	6.0 \pm 2.4	5.6 \pm 2.2
血栓横截面积 (mm^2)	15 \pm 6	14 \pm 6

a: $P < 0.05$, 与球囊损伤+ 高脂组比较。

2.4 大体形态观察

斑块破裂处所有的血栓均为白色血栓,紧紧地贴在动脉血管壁上,这些血栓为圆柱体,具有圆形的边缘,两端带有一段红色血凝块,分析为死后所致且与血管附着不紧。

2.5 组织病理学检查

光学显微镜观察发现,血栓与血管壁紧密结合,血栓形成处斑块纤维帽明显变薄且连续性中断,血栓富含血小板、纤维蛋白原及红细胞,血栓部位浸润大量的炎性细胞如巨噬细胞、淋巴细胞等。血栓邻近部位的斑块中可见大量的泡沫细胞,球囊损伤+ 高脂组可见 4 处斑块内出血。Masson's 染色发现血栓由红细胞、白细胞、血小板和纤维蛋白原组成,破裂部位血管平滑肌细胞明显减少(图 1, Figure 1)。

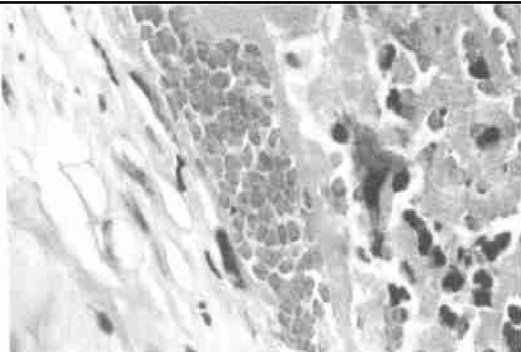


图 1. 球囊损伤+ 高脂喂养组药物触发后可见斑块破裂、出血及血栓形成 ($\times 40$)

Figure 1. In balloon injury + high lipid diet group, plaque rupture, intraplaque haemorrhage and thrombosis are found in the plaque location after pharmacological triggering

2.6 免疫组织化学染色

巨噬细胞 CD68 染色阳性信号为细胞膜上的棕黄色颗粒,平滑肌肌动蛋白 α -actin 染色阳性信号为细胞浆内的棕黄色颗粒。破裂部位的阳性巨噬细胞数较未破裂处增多,血栓部位聚集有较多的阳性细胞。 α -平滑肌肌动蛋白阳性细胞主要集中于中膜及纤维帽处,斑块破裂处的阳性细胞数少于斑块未破裂部位(图 2, Figure 2)。

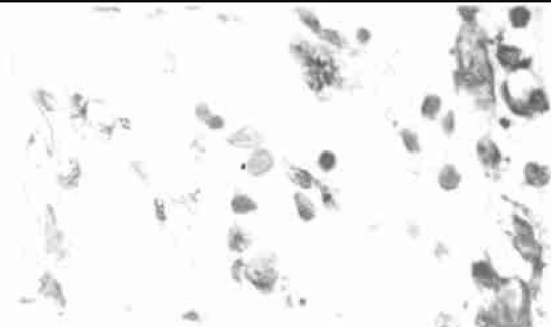


图 2. 球囊损伤+ 高脂喂养组斑块破裂处 α -平滑肌肌动蛋白阳性细胞显著减少 ($\times 400$)

Figure 2. In balloon injury + high lipid diet group, the positive cells of α -actin in the ruptured position decrease significantly

2.7 电镜观察结果

扫描电镜可见斑块破裂及血栓形成,血栓主要是由纤维蛋白原、血小板及血细胞构成,肌纤维排列紊乱,破裂部位纤维稀少,可见大量的巨噬细胞聚集。透射电镜可见巨噬细胞为分泌型,平滑肌细胞排列紊乱,胞体缩小,胞浆中可见脂滴、溶酶体、糖原和较多圆形的凋亡小体,而线粒体及内质网减少,胞核中可见异染色体边聚(图 3, Figure 3)。

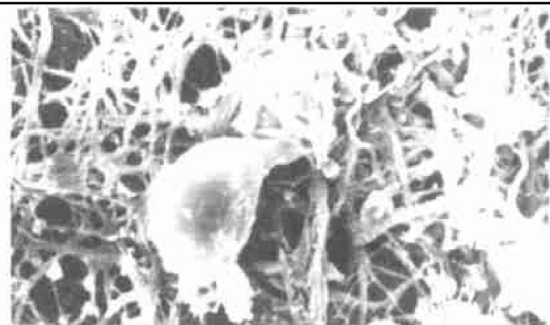


图 3. 球囊损伤+ 高脂喂养组斑块破裂部位肌纤维排列紊乱
Figure 3. In balloon injury + high lipid diet group, scanning electron microscopy shows myofibrils are disorder in the rupture location ($\times 3500$)

3 讨论

冠心病和脑卒中是严重危害人类健康的常见病和多发病,其病理基础是 As。传统认为 As 是一个进行性的发展过程,由于脂质沉积于动脉内膜的斑

块逐渐增大,突入管腔,造成管腔狭窄和组织缺血,最终导致急性心脑血管事件。然而现已证实 ACS 主要是因不稳定性斑块破裂、血栓形成所致,所以不稳定性斑块的破裂是 ACS 的最根本的始动因素,稳定性斑块比消退斑块更为重要。因此研究 As 斑块的稳定性问题,已成为目前国内外研究的热点。成功建立 As 斑块破裂的动物模型可以为更好地探索不稳定性斑块破裂的分子生物学机制提供适宜的研究对象,具有十分重要的意义。

家兔是复制 As 模型较为常见的动物^[6],在斑块破裂、血栓形成动物模型的研究方面,国外已着手这方面的研究,但国内较少。1961 年 Constantinides 和 Chakravarti^[3]通过鲁塞尔蝥蛇毒和组胺触发粥样硬化斑块,成功建立了药物诱发斑块破裂的动物模型,但斑块破裂的发生率较低。1998 年 Rekhter 等^[7]在兔 As 斑块中埋置压力可控性球囊,以充盈球囊的压力代表诱发斑块破裂的机械牵张力,成功建立了压力诱发斑块破裂的动物模型。2000 年 Johnson 等^[8]在载脂蛋白 E 基因缺陷(Apo E^{-/-})小鼠中通过长期高脂喂养建立了 As 斑块慢性破裂的动物模型。这些模型的成功建立为研究 ACS 的发生机制及药物干预打下了坚实的研究基础。

本研究发现,通过球囊损伤后高脂喂养可以成功建立 As 的动物模型并用药物触发造成斑块破裂及血栓形成,这与人类的急性心脑血管事件在应激情况下的发生发展过程极为相似^[9]。高脂喂养的两组斑块破裂率差异较大,提示斑块破裂的发生率与所形成的斑块的大小尤其是脂质核的大小密切相关,同时发现破裂斑块处的巨噬细胞数明显增多而平滑肌细胞减少,充分说明斑块破裂与炎症反应密切相关。较薄的纤维帽是斑块不稳定的十分重要的因素之一。本研究中发现斑块破裂发生率为 61%,与国外的研究结果较为相似^[10]。

本研究发现所形成的血栓均为白色血栓,病理检查显示斑块内富含纤维蛋白原和炎性细胞,与促凝剂及血管暂时痉挛产生的红色血栓明显不同。同时发现斑块破裂、血栓形成好发于腹主动脉,分析原因:腹主动脉处血流剪切力和环管周应力明显高

于胸主动脉。④在髂总动脉以上的腹主动脉最细,在同一球囊扩张下,损伤最重,所形成的斑块最大,也最不稳定。

蝥蛇毒是一种内源性促凝剂,可以激活凝血因子 V 和 X,同时对内皮细胞具有毒性作用,能够促进血栓形成,从而对斑块破裂具有很好的观察作用^[11]。蝥蛇毒对正常血管或轻度病变的血管不起作用,本研究对照组未发现斑块破裂及血栓形成。组胺在体内转变为去甲肾上腺素,具有收缩血管的作用,通过对斑块局部挤压造成斑块破裂^[12]。

在已建立的 As 斑块的兔模型基础上,应用药物触发后能够促使斑块破裂及血栓形成。此模型的建立为 As 的研究提供适宜的研究对象。

[参考文献]

- [1] Falk E. Why do plaques rupture? *Circulation*, 1992, **86** (6 Suppl): III30-42
- [2] Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Vimani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*, 1997, **336** (18): 1 276-282
- [3] Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Arch Pathol*, 1961, **72** (8): 197-208
- [4] Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, Stewart R, Quist WC, Hamilton JA, et al. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (9): 1 556-560
- [5] 严苏,王声愿,蒋文平,刘强,邓海珍.依那普利、硝苯吡啶和洛伐他汀对家兔实验性动脉粥样硬化的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 44-47
- [6] 刘恩歧,范江霖.转基因兔在动脉粥样硬化研究中的应用与进展. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 371-375
- [7] Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, et al. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Cir Res*, 1998, **83** (7): 705-713
- [8] Johnson JL, Jackson CL. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis*, 2000, **154** (2): 399-406
- [9] Mittleman MA, Maclure M, Toffler GH, Sherwood JR, Goldberg RJ, Muller JE. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J med*, 1993, **329** (23): 1 677-683
- [10] Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M, et al. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation*, 1995, **91** (3): 776-784
- [11] Warr-Cramer BJ, Rapaport SI. Studies of factors Xa/phospholipid-induced intravascular coagulation in rabbits: effects of immunodepletion of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13** (11): 1 551-557
- [12] Constantinides P, Robinson M. Ultrastructural injury of arterial endothelium. *Arch Pathol*, 1969, **88** (2): 99-117

(此文编辑 文玉珊)