

脂多糖诱导的血管外膜炎症对兔股动脉 内膜增生的影响及机制

胡 鹏, 李建军, 陈 莉, 王 晶

(武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内科学; 外膜炎症对内膜增生的影响; 免疫组织化学法; 股动脉; 核因子 κ B; 兔

[摘要] 通过用脂多糖诱导兔股动脉外膜炎症, 来观察其对内膜增生的影响, 并用免疫组织化学方法观察股动脉壁核因子 κ B p65 的表达情况, 从而探讨外膜炎症对内膜增生影响的分子机制。高脂饮食饲养新西兰大耳白兔 24 只, 两侧股动脉按实验要求分为脂多糖组($n=24$)和对照组($n=24$)。制备用脂多糖诱导的外膜炎症模型, 于术后 0 天($n=8$)、3 天($n=8$)和 2 周($n=8$)处死动物取得股动脉标本, HE 染色观察形态学变化和内膜增生情况, 同时用免疫组织化学方法镜下观察核因子 κ B p65 在动脉壁的表达。结果发现 3 天和 2 周时, 脂多糖组血管外膜和内膜面炎症细胞明显增多。在 3 天时, 脂多糖组血管内皮细胞和外膜细胞在胞浆中出现核因子 κ B p65 阳性表达。计算机图象分析发现, 2 周时脂多糖组内膜面积($0.93 \pm 0.14 \text{ mm}^2$)和对照组($0.75 \pm 0.15 \text{ mm}^2$)相比有明显差异($P < 0.05$)。结果提示脂多糖诱导的血管外膜炎症可导致兔股动脉内膜增生, 而在内膜增生之前伴随着血管内皮细胞和外膜细胞核因子 κ B p65 的阳性表达, 外膜炎症可能是通过激活上述细胞中的核因子 κ B 从而启动炎性细胞因子的转录导致内膜增生。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Influence of Lipopolysaccharide-induced Adventitial Inflammation on Intimal Proliferation of Rabbit Iliac Artery and Its Mechanism

HU Peng, LI Jian-Jun, CHEN Li, and WANG Jing

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Adventitia; Inflammation; Intimal Proliferation; Immunohistochemistry; Iliac Artery; Nuclear Factor κ B; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of lipopolysaccharide (LPS)-induced adventitial inflammation on artery intimal proliferation and its mechanism. **Methods** 24 New Zealand rabbits were fed with high cholesterol diet for 2 weeks, two sides of iliac artery were randomly divided into two groups: LPS group ($n=24$) and control group ($n=24$). A nonconstrictive polyethylene cuff was placed loosely around the iliac artery of New Zealand rabbits, between the artery and the cuff, and a sterilized cotton thread was placed, which was previously soaked overnight in 6 mg/L LPS in saline. Animals were killed at intervals of 0 day ($n=8$), 3 days ($n=8$), 2 weeks ($n=8$) after surgery. The morphology of the artery and the immunohistochemistry expression of nuclear factor (NF) κ B p65 in the artery was investigated. **Results** In LPS group, 3 days after surgery, inflammation cells migrated into artery from both the luminal and adventitial side, and 2 weeks after surgery, inflammation cells could only be seen in adventitia; NF κ B p65 was expressed in endothelium and adventitial cell in LPS group 3 days after surgery; 2 weeks after surgery, LPS group have increased intimal area ($0.93 \pm 0.14 \text{ mm}^2$), compared with control group ($0.75 \pm 0.15 \text{ mm}^2$) ($P < 0.05$). **Conclusions** LPS-induced adventitial inflammation contributes to intimal proliferation, and the activation of NF κ B in endothelium and adventitial cells may be the mechanism of it.

动脉粥样硬化被视为一种炎症性疾病^[1,2], 且在动脉粥样斑块内发现单核巨噬细胞和淋巴细胞为佐证。晚近研究提示动脉粥样硬化的炎症反应不仅仅出现在内膜, 在其病变的早期, 血管外膜面也可出现炎性细胞, 而且外膜炎症和内膜增生^[3]以及急性冠状动脉综合征^[4]的发生有关。然而有关血管外膜

炎症对内膜增生影响的机制的研究尚不多见。本研究通过用细菌内毒素主要成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导产生血管外膜炎症, 来观察其对内膜增生的影响, 并以核因子 κ B 为促炎症标志物来探讨外膜炎症对内膜增生影响的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

新西兰大耳白兔 24 只, 雌雄不拘, 由武汉大学

[收稿日期] 2003-11-17

[修回日期] 2004-02-09

[作者简介] 胡鹏, 硕士, 研究方向为冠心病的基础与临床, 联系电话为 027-88315024。李建军, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。

人民医院实验动物中心提供,体重 1.5~2.0 kg,术前喂以高脂饮食(普通基础饲料+7%花生油+1.5%胆固醇)两周。随机分为脂多糖组($n=24$)和对照组($n=24$)。

1.2 血管外膜炎模型的建立

动物经 30 mg/kg 氯胺酮+5 mg/kg 麻醉后,常规消毒,切开腹股沟处皮肤,暴露股动脉,将一聚乙烯袖套(长 1.5 cm,内径 1.5 mm²,外径 2.0 mm²)套于股动脉上,袖套与动脉之间放置一用 6 mg/L 脂多糖生理盐水浸泡过夜的医用棉线(长 1.5 cm),使棉线和动脉外膜充分接触,对侧用生理盐水代替 6 mg/L 脂多糖生理盐水进行处理,术后所有动物仍喂以高脂饮食。

1.3 形态学观察

分别于术后 0 天、3 天和 2 周各处死动物 8 只,获得股动脉标本,10% 甲醛固定,石蜡包埋,作 4 μ m 厚连续切片,HE 染色,光镜下观察形态学变化。OLYMPUS 显微镜采集图象,采用同济千屏影象公司 HPIAS2000 型图象分析软件计算血管内膜面积。以内弹力板下面积减去管腔面积为内膜面积。

1.4 免疫组织化学检查

术后 0 天和 3 天获得的股动脉标本切片进行核因子 κ B p65 免疫组织化学染色,采用 SP 法,核因子 κ B p65 一抗购自美国 Santa Cruz 公司,SP 试剂盒及 DAB 显色液购自北京中山生物公司。染色步骤按试剂说明书进行,用 PBS 代替一抗作空白对照,以细胞染色为棕黄色为阳性细胞。染色后光镜下观察核因子 κ B p65 在动脉壁的表达。

1.5 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 核因子 κ B p65 在动脉壁的表达

术后 0 天,核因子 κ B p65 在两组的动脉壁均无表达。术后 3 天,核因子 κ B p65 在脂多糖组的血管内皮细胞和血管外膜细胞中出现阳性表达,其表达部位位于细胞浆;而在对照组术后 3 天无阳性表达(图 1, Figure 1)。

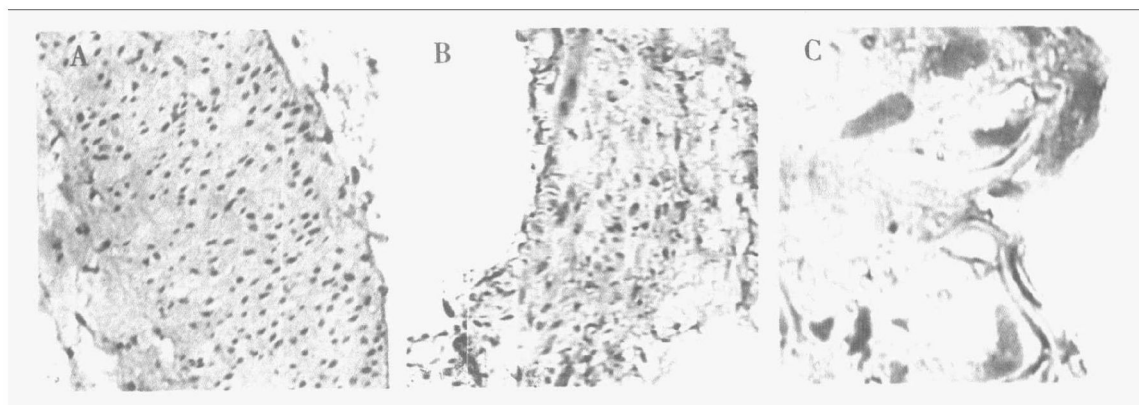


图 1. 术后 3 天核因子 κ B p65 在血管壁的表达的免疫组织化学染色 A 为对照组($\times 100$), B 为脂多糖组($\times 100$), C 为脂多糖组($\times 400$)。

Figure 1. Immunohistochemistry assay of NF κ B p65 expression at 3 day in iliac artery

2.2 形态学观察

脂多糖组术后 0 天血管壁未见炎性细胞浸润;术后 3 天可见在外膜面有明显炎性细胞浸润,血管内皮也有炎性细胞粘附(图 2A, Figure 2A);术后 2 周仍可见外膜炎细胞浸润,多为单核巨噬细胞,并有少量异物巨噬细胞,且可见血管中膜平滑肌细胞出现泡沫化,并可见血管内膜增生(图 2B, Figure 2B),有时内膜面可出现斑块并向管腔突出(图 2C, Figure 2C),而对照组均无上述变化(图 2D, Figure 2D)。

2.3 外膜炎对内膜增生的影响

术后 0 周和两周时,两组内膜面积见表 1(Table 1)。可见术前两组内膜面积无显著性差异,术后 2 周时,脂多糖组内膜面积高于对照组($P < 0.05$)。

表 1. 脂多糖组和对照组血管内膜面积比较(mm², $\bar{x} \pm s$)
Table 1. Comparison of intima area between LPS group and control group

分 组	<i>n</i>	0 周	2 周
对照组	8	0.71 \pm 0.05	0.75 \pm 0.15
脂多糖组	8	0.70 \pm 0.04	0.93 \pm 0.25*

a: $P < 0.05$, *与对照组相比较。

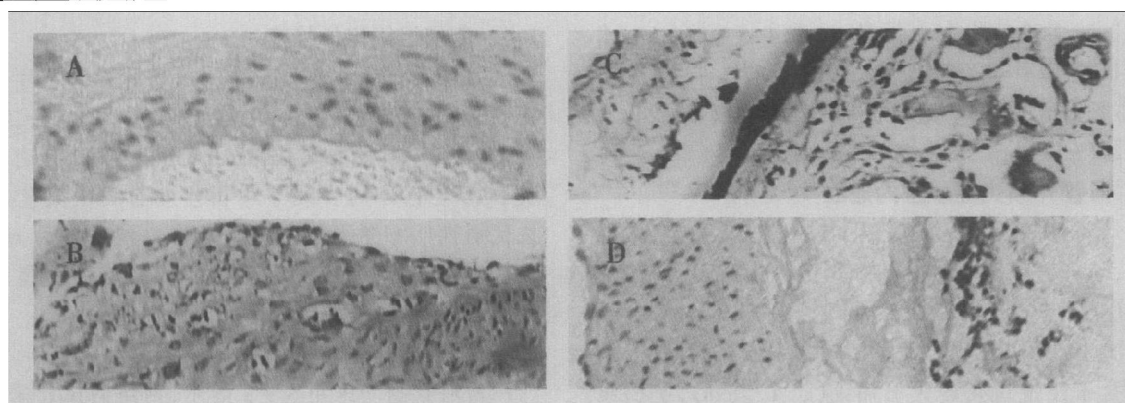


图2. 光镜下不同时间点脂多糖组和对照组股动脉 HE 染色 A 为脂多糖组术后 3 天($\times 100$), B 和 C 为脂多糖组术后 2 周($\times 200$), D 为对照组术后 2 周($\times 100$)。

Figure 2. Iliac artery at different times in LPS group and control group viewed after stained with HE under light microscopy

3 讨论

炎症在动脉粥样硬化的发生发展过程中可能起着重要作用。粥样硬化的动脉壁的炎症反应可以不仅仅出现在血管管腔面。Rayner 等^[5]对载脂蛋白 E 基因敲除鼠的观察发现,在动脉粥样硬化病变的早期,血管外膜面即可出现炎症细胞。临床上观察到在心肌梗死相关冠状动脉的外膜面可出现炎症细胞,如肥大细胞^[4],提示血管外膜炎症和急性冠状动脉综合征的发生有关。还有一些研究发现动脉外膜炎症可导致内膜增生^[3,6,7],其机制可能是通过促进外周炎性细胞向血管壁和外膜面的粘附和促使中膜层的平滑肌细胞向内膜面迁移有关。然而,有关外膜炎症对内膜增生影响的分子机制报道较少。

在炎症细胞向血管壁粘附和平滑肌细胞的迁移过程中,有众多的炎症细胞因子发挥作用,其中包括 MCP-1、ICAM、P 选择素和 IL-1 等,而核因子 κ B 是这众多的炎症细胞因子的核转录因子。核因子 κ B 是由多肽链 p65 和 p50 蛋白亚基构成的二聚体。细胞处于静息状态下时核因子 κ B 通常与 I κ B 形成复合物存在于胞浆,当受到外界因素如细胞因子,细菌脂多糖,病毒,氧自由基刺激时, I κ B 发生磷酸化,并从核因子 κ B 二聚体上解离,核因子 κ B 得以激活,并移位进入细胞核,与 DNA 链上特异部位结合,启动基因转录^[7]。

血管中膜平滑肌的增殖和向内膜的迁移被认为是动脉粥样硬化内膜增生的主要原因,众多炎症细胞因子可促进平滑肌细胞的增殖和迁移。在本文中所用到的外膜袖套模型本身几乎不产生内膜增生^[5],然而在同时伴随有外膜炎症存在时,我们观察到可产生明显的内膜增生。

本实验通过脂多糖刺激血管外膜,发现在血管

外膜受到刺激后 3 天血管外膜和管腔面就有炎症细胞浸润,并持续至两周后,和 Prescott 等^[2]的研究结果类似。血管外膜主要细胞成分为成纤维细胞。最近研究表明成纤维细胞可作为免疫调节细胞合成细胞因子启动炎症反应^[8]。Vink 等^[5]的观察发现,用脂多糖刺激的体外培养的人血管外膜成纤维细胞可合成 MCP-1、IL-1 α 和 IL-6 等炎症细胞因子。而本文第一次用免疫组织化学的方法观察到外膜炎症第 3 天时血管内皮细胞和外膜细胞胞浆出现核因子 κ B p65 的阳性表达,表明细胞内核因子 κ B 激活,使这些细胞中一些炎症细胞因子的转录被启动。而这些炎症细胞因子又可能通过促使中膜平滑肌细胞增殖和向内膜迁移导致内膜增生的发生。

【参考文献】

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 93-95
- [3] Prescott MF, McBride CK, Court M. Development of intimal lesions after leukocyte migration into the vascular wall. *Am J Pathol*, 1989, **135** (5): 835-846
- [4] Laine P, Kaartinen M, Penttilä A, Parula P, Paavonen T, Kovanen PT. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation*, 1999, **99** (3): 361-369
- [5] Rayner K, van Eersel S, Groot PH, Reape NJ. 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
- [6] Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaa BJ, Sluiter JP, Smeets MB, et al. In vivo evidence for a role of Toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation*, 2002, **106** (15): 1985-990
- [7] 高琳琳, 翟同均, 陈融, 王建丽, 李莉, 胡维诚, 等. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 415-418
- [8] Lincher V, Collins T. Expression of NF κ B and I κ B- α by aortic endothelium in an arterial injury model. *Am J Pathol*, 1996, **148** (2): 427-438
- [9] Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol*, 1997, **151** (2): 317-322

(此文编辑 胡必利)