

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0143-03

•实验研究•

## 血小板活化因子受体拮抗剂 WEB2086 抑制载脂蛋白 E 基因敲除鼠主动脉粥样硬化斑块内血管新生

王 双<sup>1,2</sup>, 杨永宗<sup>2</sup>, 唐雅玲<sup>2</sup>, 易光辉<sup>2</sup>, 唐朝克<sup>2</sup>, 孙玉惠<sup>2</sup>, 叶旭<sup>2</sup>, 万载阳<sup>2</sup>, 任重<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅医学院病理生理学系, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血小板活化因子受体拮抗剂; WEB2086; 血管新生; 动脉粥样硬化斑块

[摘要] 目的 观察血小板活化因子受体拮抗剂 WEB2086 对载脂蛋白 E 基因敲除鼠斑块内血管新生和斑块面积的影响。方法 8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除鼠普通饲料喂养 24 周, 然后随机分为对照组和 WEB2086 组 2 组, 每组 18 只。两组均普通饲料, 对照组普通饮水, WEB2086 组则在普通饮水中加入血小板活化因子受体拮抗剂 WEB2086(43 mg/L)。继续喂养 8 周后, 空腹 18 h 采血, 安乐死, 取材。全自动生物化学分析仪检测血清脂质含量, CD31 全层铺片检测斑块内毛细血管密度, 含斑块的主动脉环置于 matrigel 中培养检测斑块新生毛细血管的能力, 苏丹 Ⅲ染色检测斑块面积。结果 WEB2086 对血清脂质无明显影响。WEB2086 明显抑制粥样斑块内毛细血管平均密度(34.6% ± 10.2% 比 16.1% ± 6.7%,  $P < 0.01$ )、明显抑制含斑块的主动脉环在 matrigel 中新生毛细血管(172.3 ± 40.6 比 73.1 ± 24.9,  $P < 0.05$ )、显著减小主动脉斑块面积(31.4% ± 9.7% 比 17.5% ± 6.3%,  $P < 0.01$ )。结论 WEB2086 对血脂无明显影响, 但可抑制斑块内血管新生和减小斑块面积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Platelet Activating Factor Receptor Antagonists WEB2086 Inhibits Angiogenesis in Atherosclerotic Plaque of Apolipoprotein E Gene Deficient Mice

WANG Shuang, YANG Yong-Zong, TANG Ya-Ling, YI Guang-Hui, TANG Chao-Ke, SUN Yu-Hui, YE Xu, WAN Zai-Yang, and REN Zhong

(1. Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha, 410078; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Platelet Activating Factor Receptor Antagonist; Angiogenesis; Atherosclerotic Plaque

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of platelet activating factor receptor (PAFR) antagonist on angiogenesis in plaque and lesion area of apolipoprotein E-deficient mice (apo E<sup>-/-</sup>). **Methods** 8-week-old male apo E<sup>-/-</sup> mice were fed a standard chow diet for 24 weeks to develop advanced lesions. Mice were then separated into the following two groups ( $n = 18$ ) and treated for 8 weeks: (1) chow diet with regular water, (2) chow diet with WEB2086 in the water (4.3 mg in 100 mL). Whole-mount CD31 Stain and Plaque-Associated Sprouting have been used to estimate angiogenesis in plaque of aorta, Sudan Ⅲ staining to measure lesion area. **Results** Administration of WEB 2086 did not affect the lipid composition of mouse serum. However, lesion area was significantly reduced (31.4% ± 9.7% vs 17.5% ± 6.3%,  $P < 0.01$ ). The mean density of intimal capillaries of atherosclerotic plaque (34.6% ± 10.2% vs 16.1% ± 6.7%,  $P < 0.01$ ) and the mean number of sprouts per ring were significantly reduced in the WEB2086 group (172.3 ± 40.6 vs 73.1 ± 24.9,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** These studies provide evidence that WEB2086 can inhibit angiogenesis in atherosclerotic plaque and reduce lesion area of apolipoprotein E-deficient mice.

血管新生是近年来动脉粥样硬化研究领域出现的新命题。系列研究表明, 血管新生在动脉粥样硬化斑块的发展过程中起重要作用, 并可促进斑块内出血和斑块破裂<sup>[1]</sup>。文献[2]报道, 动脉粥样硬化的患者颈总动脉斑块内, 血小板活化因子(platelet acti-

vating factor, PAF) 的含量高于正常动脉组织的 60 倍以上, 且 PAF 含量与斑块单核细胞浸润及血管新生显著正相关。但 PAF 受体拮抗剂是否能抑制斑块内血管新生尚无实验依据, 本对此进行探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

血小板活化因子(PAF)受体拮抗剂 WEB2086 由 Boehringer Ingelheim 馈赠, CD31 单克隆抗体(大鼠抗小鼠)、生物素标记的山羊抗大鼠 IgG 二抗、matrigel

[收稿日期] 2005-03-25 [修回日期] 2005-03-29

[基金项目] 国家 973 项目(G2000056905)资助

[作者简介] 王双, 博士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化, 联系电话为 0734-8281277, E-mail 为 swansino@163.com。通讯作者杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化。唐雅玲, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化。

购自 Becton Dickinson 公司, ABC 试剂盒购自 Vector 公司。

## 1.2 实验动物及分组

8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除鼠购自北京维通利达科技有限公司, 普通饲料喂养 24 周。32 周龄时, 随机分为对照组和 WEB2086 组(每组 18 只): 两组均普通饲料, 对照组普通饮水, WEB2086 组则在普通饮水中加入 WEB2086(43 mg/L)。继续喂养 8 周后, 禁食 18 h, 眼眶采血后行安乐死, 根据实验需要取材。

## 1.3 血脂检测

血液凝固后离心 10 min (3 kr/min), Hitachi 717 (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany) 全自动生物化学分析仪检测血清 TC、LDL-C、HDL-C 和 TG。

## 1.4 主动脉斑块内毛细血管密度检测<sup>[4]</sup>

2% 多聚甲醛原位灌注, 取主动脉(注意勿损伤血管壁外膜), 置于含 1% 牛血清白蛋白和 0.1% Triton X 100 的 0.1 mol/L PBS 过夜, 新配制的 0.01% 过氧化氢 1 h 封闭过氧化氢酶活性。0.5 mg/L 抗 CD31 单抗(大鼠抗小鼠)、1:500 生物素标记的山羊抗大鼠二抗、ABC 试剂盒, 以上三种抗体均需过夜, 浸入含 0.05% DAB 的 50 mmol/L Tris(pH 7.4), 5 min 后加入过氧化氢(终浓度为 0.01%), 于避光处启动呈色反应, 5 min 后用流水冲洗, 去除外周脂肪组织, 纵向剪开主动脉, 体视显微镜拍照。HMIAS2000 软件分析斑块内毛细血管面积与斑块面积之比。

## 1.5 斑块内新生毛细血管数目检测<sup>[5]</sup>

将 100  $\mu$ L Matrigel 加入 48 孔组织培养板, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 45 min 成胶。无菌环境下取主动脉弓, 置于无血清培养基中漂洗, 去除外周脂肪组织。将主动脉弓剪成 0.8 mm 长的血管环, 置于 Matrigel 覆盖的培养孔中, 再用 200  $\mu$ L Matrigel 覆盖血管环, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 45 min 成胶, 加 200  $\mu$ L 无血清培养基, 第 5 天用相差显微镜拍照, 计数血管环周围的毛细血管。

## 1.6 主动脉斑块面积检测

CD31 全层铺片拍照后的血管条, 行苏丹 Ⅲ 染色。程序如下: 70% 酒精 2 min, 苏丹 Ⅲ 40 min, 80% 酒精 20 min, 流水冲洗 1 h。体视显微镜拍照, HMIAS2000 软件分析斑块面积与主动脉面积之比。

## 1.7 统计学分析

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS10.0 软件进行数据分析, 组间差异比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 WEB2086 对血清脂质含量无明显影响

脂质分析发现, WEB2086 对血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 均无明显影响( $P > 0.05$ , 表 1, Table 1)。

表 1. 对照组与 WEB2086 组的血清脂质含量

Table 1. lipid composition of mouse serum.

分 组	TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	4.58 $\pm$ 1.21	0.32 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.14	3.93 $\pm$ 1.26
WEB2086 组	5.97 $\pm$ 1.74	0.41 $\pm$ 0.09	0.61 $\pm$ 0.17	4.99 $\pm$ 1.35

### 2.2 WEB2086 能降低主动脉斑块内毛细血管密度

血管新生仅在粥样硬化斑块中出现。比较 CD31 染色的毛细血管(图 1, Figure 1; 深棕色, 箭头所示)面积占斑块面积的百分比, 结果发现 WEB2086 组粥样斑块内毛细血管平均密度明显低于对照组(34.6%  $\pm$  10.2% 比 16.1%  $\pm$  6.7%,  $P < 0.01$ )。

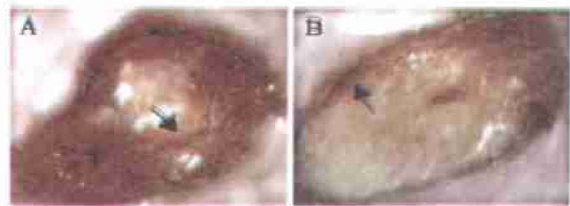


图 1. WEB2086 降低主动脉斑块内毛细血管密度 A 为对照组, B 为 WEB2086 组

Figure 1. WEB2086 reduce the mean density of intimal capillaries of atherosclerotic plaque

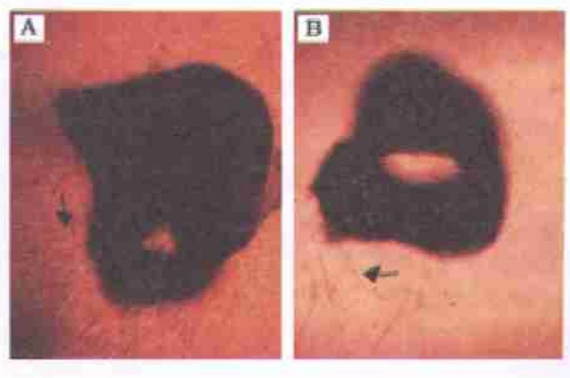


图 2. WEB2086 抑制含斑块的主动脉环在 matrigel 中新生长毛细血管 A 为对照组, B 为 WEB2086 组

Figure 1. WEB2086 reduce the mean number of sprouts per ring



### 2.3 WEB2086 能抑制含斑块的主动脉环在 matrigel 中新生毛细血管

仅含粥样斑块的血管环可在 matrigel 中新生毛细血管。比较血管环周围的毛细血管(图 2, Figure 2; 箭头所示)数目, 结果发现 WEB2086 组在 matrigel 中新生毛细血管数明显低于对照组( $172.3 \pm 40.6$  比  $73.1 \pm 24.9$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.4 苏丹Ⅲ染色发现 WEB2086 能减小主动脉粥样硬化斑块面积

苏丹Ⅲ将斑块染成红色。斑块最集中的区域是主动脉弓, 与对照组相比, WEB2086 主要是减小了腹主动脉斑块面积(图 3, Figure 3)。比较两组斑块面积与主动脉血管面积的比例, 结果表明, WEB2086 可显著减小主动脉斑块面积( $31.4\% \pm 9.7\%$  比  $17.5\% \pm 6.3\%$ ,  $P < 0.01$ )。

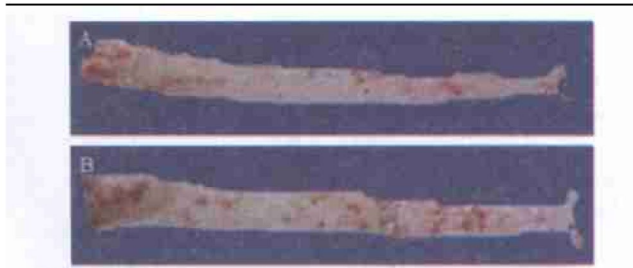


图 3. WEB2086 减小主动脉斑块面积 A 为对照组, B 为 WEB2086 组

Figure 3. WEB2086 reduce the mean lesion area of aorta

## 3 讨论

近年的研究发现, 动脉粥样硬化斑块内常出现病理性血管新生, 后者可促进粥样病变的发展, 甚至诱发斑块内出血和斑块破裂。2001 年 Celletti 等<sup>[6]</sup>在胆固醇喂养的家兔模型上表明 VEGF165 增加动脉斑块面积和病变程度, 进一步证实了血管新生在动脉粥样斑块发生和发展中的作用。

血小板活化因子(PAF)是一种具有广泛生物活性的炎症介质, 其化学性质为磷脂, 可由多种细胞和组织产生, 尤其是炎性细胞, 如单核/巨噬细胞, 多形核中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血小板。另外, 内皮细胞和心肌细胞在炎症介质等适当的刺激下也产生 PAF。

血小板活化因子是一个不恰当的命名, 它只反

应了该介质对血小板的活化作用。体外实验证明, PAF 促进白细胞的趋化、聚集、脱颗粒和生成活性氧, 促进白细胞黏附于内皮。PAF 提高单层内皮细胞的通透性, 刺激平滑肌收缩, 使心肌收缩力减弱并导致心律失常。它参与了多种生理和病理过程。PAF 通过其受体起作用, PAF 受体属于 G 蛋白偶联受体超家族。能产生 PAF 的细胞多具有 PAF 受体<sup>[7]</sup>。

系列文献表明, PAF 是参与血管新生的可能介质之一。PAF 可诱导多种血管生长因子的表达, 如嗜酸性或嗜碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子及其受体 Flk-1、肝细胞生长因子和巨噬细胞炎症蛋白 2 等。在体和离体实验还表明, PAF 受体拮抗剂可阻断多种多肽促进内皮细胞迁移的作用, 如肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 肝细胞生长因子、血管内皮生长因子, 白细胞介素 3, 提示这些多肽诱导血管新生的过程中需要 PAF 的合成<sup>[8]</sup>。

本研究应用 PAF 受体拮抗剂证实, PAF 在动脉粥样硬化斑块的发生发展中起重要作用, 其机制至少部分归结于其对血管新生的促进作用, 应用 PAF 受体拮抗剂有望成为新的动脉粥样硬化治疗手段。

### [参考文献]

- [1] 姜志胜, 唐朝枢. 血管新生及其意义. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (2): 178-181
- [2] Lupia E, Pucci A, Peasso P, Merlo M, Baron P, Zanini C, et al. Intraplaque production of platelet activating factor correlates with neovascularization in human carotid atherosclerotic lesions. *Int J Mol Med*, 2003, 12 (3): 327-334
- [3] Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faul KF, Berliner JA. Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis. in vitro and in vivo inhibition by WEB2086. *Circ Res*, 1999, 85 (4): 311-318
- [4] Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvan E, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100 (8): 4736-741
- [5] Malinda KM, Nomizu M, Chung M, Delgado M, Kuratomi Y, Yamada Y, et al. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J*, 1999, 13 (1): 53-62
- [6] Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37 (8): 2126-130
- [7] Montrucchio G, Alloati G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*, 2000, 80 (4): 1669-699
- [8] Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (9): 2915-921

(此文编辑 胡必利)