

## 血管内皮生长因子 165 对实验性兔动脉粥样硬化斑块形成的影响

肖敏<sup>1</sup>, 王玮<sup>1</sup>, 党书毅<sup>1</sup>, 朱艳霞<sup>1</sup>, 张群林<sup>1</sup>, 黄从新<sup>2</sup>

(1. 郧阳医学院附属太和医院急诊科, 湖北省十堰市 442000; 2. 武汉大学附属人民医院, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管生成与动脉粥样硬化; 动脉粥样硬化兔模型; 血管内皮生长因子 165; 斑块面积; 斑块最大厚度; CD34 阳性面积

[摘要] 目的 观察血管内皮生长因子 165 对动脉粥样硬化斑块形成与发展的影响。方法 利用高胆固醇饲料复制动脉粥样硬化兔模型。15 只兔随机分为正常对照组、高胆固醇组和血管内皮生长因子组。42 天时处死动物, 截取胸主动脉进行计量组织学及免疫组织化学分析。结果 正常对照组、高胆固醇组和血管内皮生长因子组的斑块面积(0% 比 1.81%  $\pm$  0.61% 比 24.12%  $\pm$  3.58%)、斑块周径(0 比 6.05%  $\pm$  1.62% 比 25.71%  $\pm$  1.97%) 以及斑块最大厚度(0 比 0.06 mm  $\pm$  0.002 mm 比 0.16 mm  $\pm$  0.007 mm) 均存在显著差异( $P < 0.05$ )。3 组 CD34 阳性细胞数(cells/mm<sup>2</sup>) 分别为 0、12.35  $\pm$  2.02 和 61.15  $\pm$  7.55( $P < 0.05$ )。电镜显示新生血管与动脉粥样硬化斑块相邻, 新生血管腔内可见淋巴细胞。血管内皮生长因子组 CD34 阳性细胞数与斑块面积之间呈正相关( $r = 0.989$ ,  $P < 0.001$ )。结论 血管内皮生长因子 165 能促进兔动脉粥样硬化斑块的形成与发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Vascular Endothelial Growth Factor 165 on Progression of Atherosclerotic Plaque in Rabbits

XIAO Min, WANG Wei, DANG Shu-Yi, ZHU Yan-Xia, ZHANG Qun-Lin, and HUANG Cong-Xin

(Emergency Department, the Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Growth Factor 165; Exogenous Atherosclerotic Plaque; Plaque Area; Maximal Plaque Thickness; CD34 Positive Area; Angiogenesis; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of recombinant human vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) on progression of atherosclerotic plaque in rabbits. **Methods** Fifteen rabbits were randomly fed with normal diet or high cholesterol diet. Albumin or VEGF165 was administered by a single intramuscular injection (2  $\mu$ g/kg) to rabbits fed with cholesterol diet beginning three weeks before therapy. Subsets of rabbits from control group, high cholesterol group and VEGF group underwent perfusion fixation and harvesting of the thoracic aorta for morphometric and immunohistochemical analysis at 42 days. **Results** In control group, high cholesterol group and VEGF group, significant difference was shown in comparing mean plaque area (0% vs. 1.81%  $\pm$  0.61% vs. 24.12%  $\pm$  3.58%), plaque circumference (0% vs. 6.05%  $\pm$  1.62% vs. 25.71%  $\pm$  1.97%) and maximal plaque thickness (0 vs. 0.06 mm  $\pm$  0.002 mm vs. 0.16 mm  $\pm$  0.007 mm) respectively. There were significant differences ( $P < 0.05$ ) in neovascularization density (number of CD34+ positive cell, 0 vs. 12.35  $\pm$  2.02 vs. 61.15  $\pm$  7.55 cells/mm<sup>2</sup>) in control group, high cholesterol group and VEGF group at 42 days. Transmission electron microscopy showed intimal vessels were associated with lesion and the capillary lumen contain lymphocytes. There was positive correlation between CD34 positive area and plaque area ( $r = 0.989$ ,  $P < 0.001$ ) in VEGF group. **Conclusions** Vascular endothelial growth factor 165 increased the rate and degree of atherosclerotic plaque formation in the thoracic aorta in a cholesterol-fed rabbit model.

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor 165, VEGF165)不仅能诱导血管新生<sup>[1]</sup>,而且能够增加血管通透性,因而可以促进巨噬细胞和单核细胞向动脉粥样硬化斑块内迁移并分泌细胞因子如 VEGF 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF-

$\alpha$ )等<sup>[3]</sup>,细胞因子反过来又可促进斑块内血管的生成,这些新生血管可能在动脉粥样硬化的发生发展中起关键作用<sup>[4]</sup>。因此,我们观察了 VEGF165 对兔动脉粥样硬化斑块的影响及其可能的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 兔动脉粥样硬化模型的复制

日本大耳白兔 15 只(湖北省中科院实验动物中心提供),雄性,2~4 个月龄,体重 2.0~2.5 kg,随机

[收稿日期] 2004-07-05 [修回日期] 2005-04-20

[基金项目] 湖北省教育厅科研基金资助项目(2002A3008)

[作者简介] 肖敏,硕士,副教授,研究方向为动脉粥样硬化的病因及发生机制,联系电话为 0719-8801347, E-mail 为 xm@yymc.edu.cn。王玮,教授,硕士研究生导师。党书毅,医学硕士,副教授,联系电话为 0719-8801430。

分为3组,每组5只。正常对照组仅给普通饲料喂养。高胆固醇组给普通饲料+10%鸡蛋黄粉+1%胆固醇+5%猪油喂养。VEGF组饲养方式同高胆固醇组。专人喂养21天,给正常对照组和高胆固醇组肌注白蛋白(2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), VEGF组肌注 VEGF165 (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 各一次(由晶美公司提供),继续喂养21天后处死动物。分别在实验开始时(0天)、VEGF干预时(21天)及处死时(42天),禁食、水12 h后清晨从耳中央动脉抽血6 mL,分离血清, -70  $^{\circ}\text{C}$  保存,同批酶法检测血清胆固醇水平。

### 1.2 取材与病理切片

42天时将动物深麻醉后固定,打开腹腔分离腹主动脉,逆行插入导管(直径约0.5 cm),丝线固定。打开胸腔剪开心包,用12号穿刺针刺入左心室,先用生理盐水从左心室灌注,待静脉端导管流出液变清亮时,换多聚甲醛-PBS生理压原位固定(100 mm Hg),灌注瓶液面高于心脏140~150 cm,流速2.0~2.5 mL/min,持续0.5 h以上。最后截取胸主动脉(从主动脉根部至膈上,约10 cm长)体外固定。

### 1.3 斑块形态学测量<sup>[5]</sup>

所截取胸主动脉被均分为4段,将组织脱水,石蜡包埋,在每一段的近端连续切片,每段标本切片8~10张,片厚5  $\mu\text{m}$ 。行常规HE染色,采用Leica-Q500 IW图像分析系统进行图像分析,测量斑块面积(plaque area, PA)、斑块周径(plaque circumference, PC)及斑块最大厚度(maximal plaque thickness, MPT)。PA为内弹力膜所包围的面积与管腔面积之差,除以血管的横截面积,以百分数表示。避免了由于血管大小引起的误差。PC为斑块的周径与管腔的周径之比,以百分数表示。MPT选斑块最厚处测厚度,以mm表示。

### 1.4 免疫组织化学检测

免疫组织化学采用SP法,按照试剂盒要求操作。切片经脱水后PBS漂洗10 min,依次以氧化酶阻断剂和非免疫血清室温孵育10 min, PBS漂洗15 min,滴CD34 McAb,室温孵育60 min,同样以PBS漂洗,再依次滴加生物素标记的二抗和链霉素抗生物素蛋白,各室温孵育10 min,其间均以PBS漂洗10~15 min,最后以DBA反应5~10 min,自来水终止反应,以苏木素复染后,经乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片,光镜下观察。

动脉粥样硬化斑块上凡有CD34阳性染色(呈棕红色),即证明有内皮细胞形成,作为新生血管密度的指标,用计算机图像分析系统(Leica-Q500IW)进行主动脉新生血管密度的半定量分析,将阳性染

色点数量除以斑块面积,即为标准化CD34的阳性面积,以cells/ $\text{mm}^2$ 表示。

### 1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行方差分析及相关分析,用SPSS10.0软件系统完成,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 42天时各组形态学观察的比较

42天时对照组胸主动脉层次清晰,内膜薄,中层平滑肌均匀,厚度正常,无动脉粥样硬化斑块。高胆固醇组胸主动脉层次不清,内膜厚,厚薄不均,可见脂质斑块但无明显管腔狭窄。VEGF组胸主动脉层次不清,内膜增厚,厚薄不均,可见纤维斑块突入管腔引起管壁狭窄,斑块呈偏心性(图1, Figure 1)。



图1. 42天时各组兔胸主动脉光镜形态学观察(HE染色 $\times 16$ ) A为正常对照组, B为高胆固醇组, C为VEGF组。

Figure 1. Representative photomicrographs at 42 days, low-magnification photographs of thoracic aortic cross section stain with HE from each group

### 2.2 42天时血管内皮生长因子组动脉粥样斑块处新生血管的电镜观察

42天时可见近动脉粥样斑块处有一新生血管,管腔内一淋巴细胞与新生血管的内皮细胞紧密相邻



(图 2, Figure 2)。



图 2. 血管内皮生长因子组兔胸主动脉新生血管与动脉粥样硬化斑块(50×1 000)

Figure 2. Transmission electron microscopy: images of intimal and neovascularization associated with lesion

### 2.3 兔胸主动脉 CD34 免疫组织化学显色

普通显微镜下可见 VEGF 组靠近内膜处可见多处 CD34 阳性显色(棕红色),其间可见散在类毛细血管结构。正常对照组内膜处未见 CD34 阳性显色(图 3, Figure 3)。

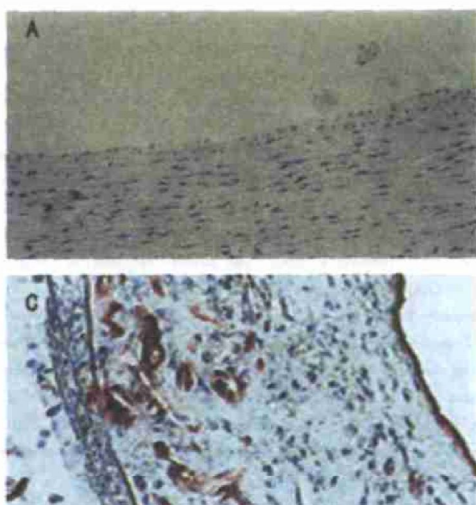


图 3. 兔胸主动脉 CD34 免疫组织化学阳性显色(×200)

A 为正常对照组, C 为 VEGF 组。

Figure 3. Intimal neovascularization in advanced lesion was identified by antibodies against CD34 (×200)

### 2.4 计算机图像分析

正常对照组未见动脉粥样斑块形成,内膜下未见新生血管。斑块面积、斑块周径、斑块最大厚度及 CD34 阳性细胞数三组之间比较,差异均有显著性( $P < 0.05$ ), VEGF 组明显高于其他两组。正常对照组肌注了与高胆固醇组同等剂量的白蛋白,未见

动脉粥样斑块形成,证明白蛋白无促进动脉粥样斑块形成的作用(表 1, Table 1)。

表 1. 42 天时各组形态学及新生血管密度的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Analysis of morphometry and CD34 positive area in the thoracic aorta at 42 days

指 标	正常对照组	高胆固醇组	VEGF 组
PA(%)	0	1.81±0.61 <sup>a</sup>	24.12±3.58 <sup>ab</sup>
PC(%)	0	6.05±1.62 <sup>a</sup>	25.71±2.97 <sup>ab</sup>
MPT(mm)	0	0.06±0.002 <sup>a</sup>	0.16±0.007 <sup>ab</sup>
CD34 (cells/mm <sup>2</sup> )	0	12.35±2.02 <sup>a</sup>	61.15±7.55 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较, b:  $P < 0.05$ , 与高胆固醇组比较。

### 2.5 血管内皮生长因子组 CD34 细胞数与斑块面积的相关性

相关分析发现 CD34 阳性细胞数与斑块面积之间呈正相关( $r = 0.989$ ,  $P < 0.001$ )。表明 VEGF 组新生血管的密度与斑块面积相关性良好。

### 2.6 各时间点各组血清胆固醇浓度的比较

0 天时血清胆固醇浓度各组间比较无差异。21 天时与正常对照组比较其他两组均有差异,但高胆固醇组与 VEGF 组比较无差异。42 天时与正常对照组比较其他两组均有差异,但高胆固醇组与 VEGF 组比较无差异(表 2, Table 2)。

表 2. 各时间点各组血清胆固醇浓度的变化( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

Table 2. The changes of serum level of cholesterol in different time point and groups

分 组	0 天	21 天	42 天
正常对照组	1.54±0.13	1.58±0.13	1.49±0.07
高胆固醇组	1.45±0.11	13.36±4.69 <sup>a</sup>	14.35±3.93 <sup>a</sup>
VEGF 组	1.53±0.15	14.95±4.59 <sup>a</sup>	15.72±4.13 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与同期正常对照组比较。

## 3 讨 论

### 3.1 血管生成与动脉粥样硬化斑块形成与发展的关系

Chen 等<sup>[6]</sup>证明,随着动脉粥样硬化从 iv~v 的病理分型,病变内膜新生血管的发生率也从 31% 发展到 100%。本研究结果发现,正常对照组无动脉粥样硬化斑块形成的内膜处无新生血管生成。高胆固醇组及 VEGF 组之间不仅斑块面积、斑块周径及斑块最大厚度差异有显著性,而且血管壁上 CD34 阳性细胞数差异同样也有显著性。但血清胆固醇浓

度比较差异无显著性。尤其应该注意的是, VEGF 组 CD34 阳性显色与斑块面积之间有良好的相关性 ( $r = 0.989$ ), 证明斑块面积、斑块周径及斑块最大厚度之间的差异与血清胆固醇浓度无关, 与斑块内血管生成相关。

### 3.2 外源性血管内皮生长因子 165 与斑块内血管生成及动脉粥样硬化斑块之间的相互关系

血管内皮生长因子 165 是迄今发现的具有特异性促进血管内皮细胞有丝分裂的生长因子, 已证明其在动脉粥样硬化斑块中的表达明显增加, 并可能促进斑块的发生与发展<sup>[3]</sup>, 其可能的机制是增加斑块毛细血管密度并促进新生血管向内膜延伸<sup>[7]</sup>。而毛细血管增加可促进巨噬细胞和 T 淋巴细胞等向斑块内迁移, 这些组织细胞又分泌白细胞介素 8 和 VEGF 等细胞因子<sup>[8]</sup>, 反过来再促进血管新生, 进而促进动脉粥样硬化斑块的形成与发展。最近有学者证明, 斑块内血管生成主要与斑块内炎性细胞聚积程度有关, 而不是与斑块的厚度相关, 以上均证明血管生成与炎性反应有关<sup>[9, 10]</sup>。Yonemitsy 等<sup>[11]</sup>证明把外源性 VEGF165 注入兔的颈动脉壁内可诱导其内皮细胞显著增生及内膜增厚。Lee 等<sup>[12]</sup>也在他们的实验中得出了类似的结论。本研究证实了外源性 VEGF165 有促进动脉粥样硬化斑块形成与发展的作用, 这个作用可能是通过促进斑块内血管生成而达到的。本研究发现在 VEGF165 干预后 21 天, VEGF 组斑块内新生血管明显增加。同时斑块面积、周径和厚度均较对照组明显增加, 而且 VEGF 组 CD34 阳性细胞数与斑块面积相关性良好, 证明 VEGF165 是通过促进斑块内血管新生从而达到促进动脉粥样硬化斑块发生与发展的目的。电镜观察不仅发现新生血管与斑块的关系, 也在新生的血管中发现了淋巴细胞, 这些均提示 VEGF165 在动脉粥样硬化斑块形成与发展的过程中新生血管可能是一个关键环节。

Moulton 等<sup>[4]</sup>证实血管生成抑制剂可以抑制动脉粥样硬化斑块内新生血管的形成, 减缓斑块的发展。Wilson 等<sup>[13]</sup>在猪动脉粥样硬化模型上证实, 他

汀类药物 (simvastatin) 可减少实验性高脂血症动脉滋养血管的新生, 并可减少 VEGF 表达, 减少基质金属蛋白酶 2 及基质金属蛋白酶 9 的分泌, 使斑块更趋于稳定, 并且这些作用都是与其降脂作用无关的。这些均从治疗的角度证实了斑块内血管生成在动脉粥样硬化形成与发展中的作用。因此, 深入研究斑块内血管生成在动脉粥样硬化发生发展中的作用及其机制可能有广阔的临床应用前景。

### [参考文献]

- [1] 蔡晓敏, 江时森. 血管新生和动脉粥样硬化. 中国微循环, 2001, 5 (2): 91-93
- [2] Celletti FL, Hicfiker PR, Ghatouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque. JACC, 2001, 37: 2 126-130
- [3] Inoue, Itoh, Veda. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions. Circulation, 1998, 98: 2 108-116
- [4] Moulton KS, Heller E, Konerling MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, 1999, 99: 1 726-752
- [5] 郝群, 李太金, 朱影, 袁敏敏, 王明雁, 孟毅. 补肾宁心方对去势高脂血症家兔主动脉血管细胞粘附分子 1 表达的调节. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (3): 301-304
- [6] Chen, Nakashima, Tanaka. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor vascular permeability factor in atherosclerotic intimals of human coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 131-139
- [7] Tenaglia, Peters, Sketch. Neovascularization in atherectomy specimens in patients with unstable angina. Am Heart, 1998, 135: 10-14
- [8] Leek, Hunt, Landers. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGF-R expression in breast cancer. J Pathol, 2000, 190: 430-436
- [9] Moulton K, Vakili K, Zurakowski D. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (8): 4 736-741
- [10] Hayden MR, Tyagi SC. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: a malignant transformation. Cardiovasc Diabetol, 2004, 3 (1): 1
- [11] Yonemitsy Y, Kaneda Y, Morishita R, Nakagawa K, Nakashima Y, Sueshi K. Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai virus (hemagglutinin virus of Japan) liposomes: an effective tool for the in vivo study of arterial disease. Lab Invest, 1996, 75: 313-323
- [12] Lee RJ, Spinger ML, Blumberg WE, Shaw R, Ursell P, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effect of unregulated expression. Circulation, 2000, 102: 898-901
- [13] Wilson SH, Hermann J, Lerman LO. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. Circulation, 2002, 105: 415-421

(此文编辑 朱雯霞)