

Compound 48/80 对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 颈总动脉套环诱导斑块的影响

唐雅玲, 王 双, 杨永宗, 许增祥, 叶 旭, 孙玉慧, 彭 茜, 彭 旷

(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; Compound 48/80 对斑块的影响; 甲苯胺蓝染色法; 肥大细胞; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 颈总动脉套环术; 类胰蛋白酶

[摘要] 目的 采用肥大细胞脱颗粒剂——Compound 48/80 作用于颈总动脉套环的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠, 以探讨肥大细胞脱颗粒对动脉粥样硬化斑块的影响及其可能作用机制。方法 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠高脂高胆固醇饲料喂养, 行右颈总动脉套环术后分为实验组 and 对照组, 分别腹腔注射 Compound 48/80 或 D-Hank's。第 4 次注射后 30 min, 安乐死, 取材。全自动生物化学分析仪测定血清中脂质含量, 比色法测定血清中类胰蛋白酶活性, 苏木素—伊红染色观察颈总动脉病理改变, 甲苯胺蓝肥大细胞染色, 免疫组织化学检测平滑肌肌动蛋白和巨噬细胞特异性抗原在斑块内的表达。结果 Compound 48/80 对血清脂质水平无明显影响。Compound 48/80 明显刺激肥大细胞脱颗粒 ($80.6\% \pm 17.8\%$ 比 $13.5\% \pm 4.1\%$, $P < 0.01$), 升高血清中类胰蛋白酶活性 (0.57 ± 0.13 u/L 比 0.36 ± 0.10 u/L, $P < 0.05$)。套环能加速颈总动脉斑块形成(未套环侧颈总动脉斑块面积均为 0, 套环侧颈总动脉均有斑块形成), Compound 48/80 增大套环侧颈总动脉斑块最大横截面积 ($58\,500 \pm 7\,500 \mu\text{m}^2$ 比 $8\,600 \pm 2\,800 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$), 并使管腔最大狭窄程度加重 ($81\% \pm 15\%$ 比 $41\% \pm 12\%$, $P < 0.05$)。Compound 48/80 使颈总动脉斑块内 α 平滑肌肌动蛋白表达量增加 ($1\,219 \pm 364$ iu 比 522 ± 137 iu, $P < 0.05$) 和巨噬细胞特异性抗原表达量增加 (426 ± 133 iu 比 169 ± 38 iu, $P < 0.05$)。结论 套环能加速载脂蛋白 E 基因敲除小鼠颈总动脉斑块形成。Compound 48/80 使套环侧颈总动脉斑块最大横截面积和颈总动脉最大狭窄程度增加, 其机制可能与其刺激肥大细胞脱颗粒促使平滑肌细胞增殖和巨噬细胞聚集有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Compound 48/80 on Plaque Induced by Perivascular Common Carotid Collar Placement in Apolipoprotein E Gene-Knock Out Mice

TANG Ya-Ling, WANG Shuang, YANG Yong-Zong, XU Zeng-Xiang, YE Xu, SUN Yu-Hui, PENG Qian, and PENG Kuang
(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Compound 48/80; Plaque; Mast Cells; Apolipoprotein E-Knock Out Mice; Perivascular Common Carotid Collar Placement; Tryptase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of mast cells degranulation on plaque development and their possible mechanisms in animal experiments by dealing apolipoprotein E gene-knock out ($\text{apoE}^{-/-}$) mice which had been placed perivascular common carotid collars with mast cells degranulator Compound 48/80. **Methods** 12-week-old male $\text{apoE}^{-/-}$ mice were fed a western-type diet and operated with perivascular right common carotid collar placement. 4 weeks after surgery, mice were divided into 2 groups with 20 mice each. The experimental mice were intraperitoneally injected with Compound 48/80, 0.5 $\mu\text{g/g}$, every other day; the control mice received the same injection of an equal volume of D-Hank's. Thirty minutes after 4th injection, animals were sacrificed to obtain carotid sections. Sections were routinely stained with hematoxylin and eosin. Corresponding sections on separate slides were stained with toluidine blue and immunohistochemically with antibodies against a macrophage-specific antigen or α smooth muscle actin. **Results** Administration of Compound 48/80 did not affect the lipid contents of mice serum. However, the percentage of degranulated mast cells ($80.6\% \pm 17.8\%$ vs $13.5\% \pm 4.1\%$, $P < 0.01$) and the activity of tryptase in serum (0.57 ± 0.13 u/L vs 0.36 ± 0.10 u/L, $P < 0.05$) were significantly increased. There were no pathological changes in common carotids nor collar placement but atheromatous plaques occurred in common carotids collar placement of both groups. Significant increase in plaque area of maximum cross section ($58\,500 \pm 7\,500 \mu\text{m}^2$ vs $8\,600 \pm 2\,800 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$), the degree of lumen stenosis ($81\% \pm 15\%$ vs $41\% \pm 12\%$, $P < 0.05$) and the expressions of α smooth muscle actin ($1\,219 \pm 364$ iu vs 522 ± 137 iu, $P < 0.05$) and macrophage-specific antigen (426 ± 133 iu vs 169 ± 38 iu, $P < 0.05$) were

[收稿日期] 2005-10-13 [修回日期] 2006-02-02

[基金项目] 国家 973 项目 (G2000056905) 资助

[作者简介] 唐雅玲, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化防治, 联系电话为 0734-8281277, E-mail 为 tangyaling7508@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防治, 联系电话为 0734-8281288, E-mail 为 yzyanghy@163.com。王双, 博士研究生, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化防治, 联系电话为 0734-8281277, E-mail 为 swansino@hotmail.com。

detected in plaque of common carotids collar placement in the experimental group. **Conclusions** Perivascular common carotid collar placement can accelerate atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knock out mice. Compound 48/80 increases plaque area of maximum cross section and the degree of lumen stenosis by promoting proliferation of smooth muscle cells and accumulation of macrophages.

肥大细胞来源于骨髓多能干细胞, 主要位于结缔组织内, 其主要特征为胞浆内含有大量异染性颗粒, 颗粒中含有多种生物活性成分^[1]。近年对动脉粥样硬化切除标本及尸检标本的研究表明, 肥大细胞在动脉粥样硬化斑块的发生发展中起着重要作用^[2,3]。本实验室在细胞学水平多方面探讨了肥大细胞促进动脉粥样硬化发生发展的机制, 主要结论有: ①肥大细胞促进氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞泡沫化^[4]; ②肥大细胞抑制巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出。到目前为止, 肥大细胞与动脉粥样硬化的关系研究主要是细胞学实验, 而从整体水平上研究两者关系的报道甚少, 本课题拟采用动物模型对此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

Compound 48/80 和甲苯胺蓝均购自 Sigma 公司, 大鼠抗小鼠巨噬细胞特异性抗原 (macrophage specific antigen, Mac3) 一抗购自 Santa Cruz 公司, 生物素标记羊抗大鼠二抗购自 BD 公司, 小鼠抗小鼠 α 平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle actin, SMA) 一抗和小鼠 IgG 即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.2 动物模型制备及分组

12 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠购自北京大学医学部实验动物中心, 高脂高胆固醇饲料喂养直至实验结束。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 μ g/g) 麻醉后, 行右颈总动脉套环术^[5]。术后 4 周, 随机分为实验组和对照组, 每组 20 只, 实验组小鼠腹腔注射 Compound 48/80 (0.5 μ g/g), 对照组小鼠腹腔注射相同体积的 D-hank's。隔日 1 次, 共 4 次。第 4 次注射后 30 min, 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 (3 000 r/min), Hitachi717 (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany) 全自动生物化学分析仪检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平。

1.4 类胰蛋白酶活性的测定

取实验组、对照组各 20 只小鼠血清, 参照文献 [6] 方法测定血清中类胰蛋白酶活性。将 40 μ L 待测样本加入到 1.5 mL Tris-HCl 缓冲液中, 震荡混匀后, 加入 40 μ L Na-苯甲酰-DL-精氨酸-p 硝酰基苯胺二甲基亚砷溶液, 3 $^{\circ}$ C 水浴并计时, 20 min 后 30% 乙酸终止反应, 立即用紫外分光光度计取 410 nm 波长测定吸光值; 利用公式计算类胰蛋白酶活性: 胰蛋白酶活性 (u/L) = $\Delta A \times 10^6 \times V / (\Delta t \times v \times \epsilon \times L)$, 其中 ΔA 为吸光值的差值, V 为反应总体积, v 为待测样本体积, ϵ 为摩尔吸光系数, L 为光程。

1.5 颈总动脉一般形态学检查

颈总动脉石蜡连续切片, 经苏木素-伊红染色后, 在光学显微镜下观察, 采用 HMIAS2 000 高清晰度彩色医学图文分析系统分析颈总动脉斑块最大横截面积和管腔最大狭窄程度。

1.6 肥大细胞检测

颈总动脉石蜡连续切片, 0.5% 甲苯胺蓝酒精溶液染色, 通过观察肥大细胞胞浆脱颗粒, 计算脱颗粒的肥大细胞数与肥大细胞总数的比值即脱颗粒的肥大细胞百分率。

1.7 免疫组织化学检测

套环侧颈总动脉斑块石蜡连续切片, 进行免疫组织化学染色。采用小鼠抗小鼠 α 平滑肌肌动蛋白单克隆抗体标记平滑肌细胞, 大鼠抗小鼠 Mac3 单克隆抗体标记巨噬细胞。每只小鼠随机选取 2 张免疫组织化学染色切片, 参照文献 [7] 方法, 在 40 倍物镜下测定目标积分光密度, 即斑块内 SMA 和 Mac3 的表达量。

1.8 统计学分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS11.0 进行统计处理, 采用 *t* 检验或 Fisher 精确概率检验法检验, 以 $P < 0.05$ 判定差异的显著性。

2 结果

2.1 Compound 48/80 对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂含量的影响

脂质分析发现, Compound 48/80 对血清总胆固醇、LDLC、HDLC 和甘油三酯均无明显影响 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1. 各组血清脂质含量的比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n=20$)

分 组	TG	TC	HDLc	LDLC
对照组	1.30 \pm 0.37	12.74 \pm 0.93	0.46 \pm 0.12	12.02 \pm 0.91
实验组	0.94 \pm 0.22	11.74 \pm 3.56	0.53 \pm 0.06	11.01 \pm 4.13

2.2 Compound 48/80 对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血清类胰蛋白酶活性的影响

对照组和实验组血清类胰蛋白酶活性分别为 0.36 ± 0.10 u/L 和 0.57 ± 0.13 u/L, 两者存在明显

差异($P < 0.05$), Compound 48/80 增加载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血清类胰蛋白酶活性。

2.3 颈总动脉一般形态学检查结果

对照组、实验组未套环侧颈总动脉内膜下均无明显病理改变(斑块面积均为 0), 而两组套环侧颈总动脉内膜下均有斑块形成。对照组和实验组斑块最大横截面积分别为 $8\,600 \pm 2\,800 \mu\text{m}^2$ 和 $58\,500 \pm 7\,500 \mu\text{m}^2$, 颈总动脉最大狭窄程度分别为 $41\% \pm 12\%$ 和 $81\% \pm 15\%$ ($P < 0.05$, 图 1), Compound 48/80 增大斑块面积, 并使管腔狭窄程度加重。



图 1. 套环及 Compound 48/80 对颈总动脉斑块面积及狭窄程度的影响($\times 20$) A 和 B 为对照组和实验组未套环侧颈总动脉, C 和 D 为对照组和实验组套环侧颈总动脉。

2.4 Compound 48/80 对颈总动脉外膜肥大细胞脱颗粒的影响

对照组和实验组套环侧颈总动脉外膜脱颗粒的肥大细胞百分率分别为 $13.5\% \pm 4.1\%$ 和 $80.6\% \pm 17.8\%$ ($P < 0.01$, 图 2)。

2.5 Compound 48/80 对颈总动脉斑块内平滑肌细胞和巨噬细胞数量的影响

对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 SMA 积分光密度分别为 522 ± 137 iu 和 1219 ± 364 iu, Mac3 积分光密度分别为 169 ± 38 iu 和 426 ± 133 iu ($P < 0.05$, 图 3)。

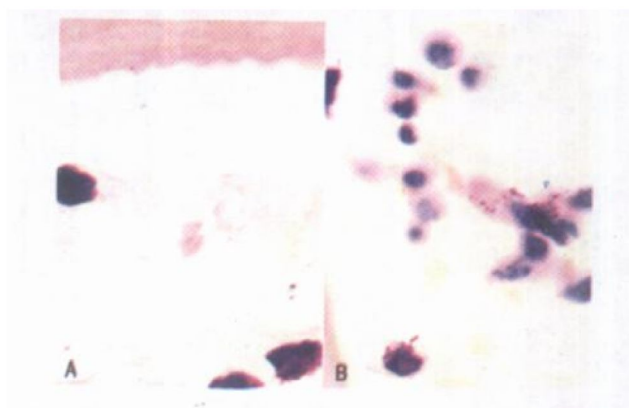


图 2. Compound 48/80 对套环侧颈总动脉外膜肥大细胞脱颗粒的影响($\times 100$) A 为对照组, 未见肥大细胞脱落的颗粒; B 为实验组, 可见肥大细胞脱落的颗粒。

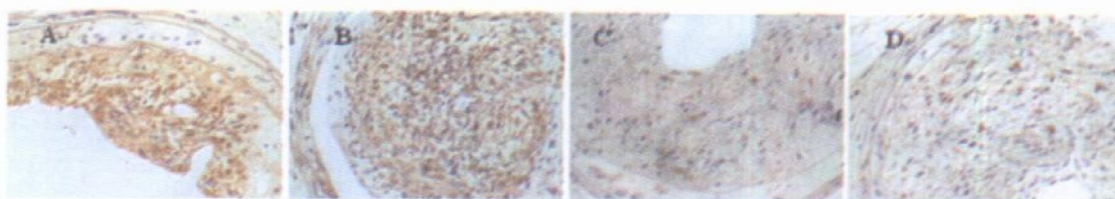


图 3. Compound 48/80 对套环侧颈总动脉斑块内平滑肌细胞和巨噬细胞的影响($\times 20$) A 和 B 为对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 SMA 免疫组织化学染色, 可见胞浆内含有棕黄色颗粒的平滑肌细胞。C 和 D 为对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 Mac3 免疫组织化学染色, 可见胞浆内含有棕黄色颗粒的巨噬细胞。

3 讨论

肥大细胞是一种参与炎症免疫应答反应的炎症细胞,近年研究发现,动脉粥样硬化斑块病灶的外膜和内膜肥大细胞数量增多,在主动脉背侧(易形成动脉粥样硬化病变)的肥大细胞数量显著高于腹侧部分(不易形成动脉粥样硬化病变),提示肥大细胞与动脉粥样硬化的早期形成密切相关,他们认为肥大细胞释放的介质可能参与动脉粥样硬化形成过程。

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠是动脉粥样硬化易感动物,在高脂高胆固醇饲料喂养下出现了高脂高胆固醇血症,同时通过颈总动脉套上 0.3 mm 内径的硅胶管,造成管腔狭窄,导致血流动力学改变,从而促进套环侧颈总动脉斑块快速形成。

Compound 48/80 是肥大细胞脱颗粒剂,它能刺激肥大细胞产生胞吐作用,释放多种活性介质如组胺、类胰蛋白酶、胃促胰酶、硫酸软骨素蛋白多糖和少量肝素蛋白多糖等物质,作用于上述动物模型,从而使套环侧颈总动脉斑块最大横截面积、颈总动脉最大狭窄程度增加,其机制主要归结于斑块内平滑肌细胞和巨噬细胞数量明显增加。有资料表明,肥大细胞脱颗粒释放的胃促胰酶可促进血管紧张素 iv 转化为血管紧张素 E_2 而血管紧张素 E_2 对平滑肌细胞增殖有显著的促进作用;而且,在心血管疾病中,血管紧张素 E_2 生成主要来源于胃促胰酶转化途径,而不是血管紧张素转换酶的转化途径^[8]。因此,应当用胃促胰酶抑制剂(而不是血管紧张素转换酶抑制剂)以及血管紧张素 E_2 受体拮抗剂抑制平滑肌细胞增殖以减小斑块面积。肥大细胞脱颗粒释放多种趋化因子,如巨噬细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 1 α 和巨噬细胞炎性蛋白 1 β 等。在趋化因子家族中,巨噬细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 1 α 和巨噬细胞炎性蛋白 1 β 都属于 CC 型趋化因子,主要用于单核细胞,使外周血单核细胞迁入血管内膜,转

化为巨噬细胞,构成动脉粥样硬化早期的重要事件^[9]。巨噬细胞在斑块内聚集,除了直接增大斑块面积外,其作为斑块内最主要的炎性细胞(占斑块内炎性细胞的 80% 左右),分泌的多种炎性介质对动脉粥样硬化的发生和发展起着更重要的作用。由此可见,肥大细胞诱导巨噬细胞在斑块内聚集,可通过炎症瀑布效应促进斑块的发展。

本研究应用肥大细胞脱颗粒剂——Compound 48/80 证实,肥大细胞可促进斑块内平滑肌细胞增殖、巨噬细胞聚集,增大斑块面积,加重管腔狭窄程度,从而使动脉粥样硬化性病变不断发展。因此,应用肥大细胞膜稳定剂将为动脉粥样硬化防治提供一个新思路。

[参考文献]

- [1] Kovanen PT. Role of mast cell in atherosclerosis[J]. *Chem Immunol*, 1995, 62: 132-170
- [2] Lehtonen-Sneds EM, Mayranpaa M, Lindsberg PJ, Soinne L, Saimanen E, Jarvinen AA, et al. Carotid plaque mast cells associate with atherogenic serum lipids, high grade carotid stenosis and symptomatic carotid artery disease[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2005, 19: 291-301
- [3] Kelley JL, Chi DS, Abou Auda W, Smith JK, Krishnaswamy G. The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease[J]. *Mol Med Today*, 2000, 6 (8): 304-308
- [4] 甘露,刘录山,万载阳,万腊香,杨永宗. 肥大细胞对平滑肌源性泡沫细胞 iv 型胶原和 α_2 型胶原表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (5): 541-544
- [5] Von der Thüsen Jan H, Van Berkel Theo JC, Biessen Erik AL. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2001, 103 (8): 1164-170
- [6] Lavens SE, Proud D, Warner JA. A sensitive colorimetric assay for the release of tryptase from human lung mast cells in vitro[J]. *J Immunol Methods*, 1993, 166 (1): 93-102
- [7] 郑智勇,吴文钰. 图像分析仪与定量诊断病理学[J]. *诊断病理学杂志*, 1996, 4 (3): 246-247
- [8] Akasu M, Urata H, Kinoshita A, Sasaguri M, Ideishi M, Arakawa K. Differences in tissue angiotensin E_2 forming pathways by species and organs in vitro[J]. *Hypertension*, 1998, 32: 514-520
- [9] 杨永宗,阮长耿,唐朝枢,范乐明,陈纪言. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004; 609-617

(此文编辑 朱雯霞)