

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-05-0374-03

易卒中型肾血管性高血压大鼠脑大动脉重塑类型

崔春梅¹, 武庆庆², 温红梅³, 林健雯¹, 王立志¹, 曾进胜¹

(中山大学附属第一医院 1. 神经科脑血管专科, 2. 肾脏内科, 3. 附属第三医院康复科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 神经病学; 肾血管性高血压, 易卒中型; 血管重塑; 纤维连接素; 血管平滑肌细胞; 动物模型, 大鼠; 大脑中动脉; 基底动脉; 颈总动脉

[摘要] 目的 观察易卒中型肾血管性高血压大鼠脑动脉的结构变化。方法 将易卒中型肾血管性高血压大鼠第4周和8周时处死, 脑大动脉切片用HE染色后, 测量这些大动脉重塑参数, 对免疫组织化学对纤维连接素蛋白表达进行图象分析。结果 易卒中型肾血管性高血压大鼠组血压高于对照组。易卒中型肾血管性高血压大鼠第4周时颈总动脉平滑肌细胞总数(282.5 ± 59.6 个)和纤维连接素蛋白表达量(184.3 ± 2.4)较对照组(344.7 ± 50.9 个和 181.4 ± 3.2)减少, 单个细胞面积增加; 第8周时, 管壁厚度($74.8 \pm 12.3 \mu\text{m}$)、横截面积($233.428.3 \pm 76.487.9 \mu\text{m}^2$)、壁腔比(0.086 ± 0.007)、壁面积比(0.00030 ± 0.00011)、单个细胞面积($547.9 \pm 111.8 \mu\text{m}^2$)和纤维连接素蛋白表达量(180.8 ± 2.3)均增加, 单位面积细胞数(282.5 ± 59.6 个)减少。易卒中型肾血管性高血压大鼠基底动脉横截面积第4周和第8周时($15867.4 \pm 1316.9 \mu\text{m}^2$ 和 $22556.5 \pm 6485.6 \mu\text{m}^2$)均高于对照组($13598.9 \pm 1090.8 \mu\text{m}^2$), 纤维连接素蛋白表达量第8周时(166.2 ± 5.1)增加。第4周时易卒中型肾血管性高血压大鼠大脑中动脉管腔内直径($208.6 \pm 59.6 \mu\text{m}$)增加, 壁腔比(0.094 ± 0.048)和壁面积比(0.00150 ± 0.00040)减少; 第8周时管壁厚度($23.3 \pm 7.2 \mu\text{m}^2$)、横截面积($16236.2 \pm 6538.4 \mu\text{m}^2$)和平滑肌细胞总数(52.2 ± 16.1 个)增加, 管腔内直径和壁面积比与对照组的差异仍有统计学意义。结论 易卒中型肾血管性高血压大鼠不同脑动脉在高血压不同时期的重塑类型和机制存在明显差异, 可能是各动脉脑卒中不同的病理基础。

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

The Types and the Mechanisms of Cerebrovascular Remodeling in Stroke-prone Renalvascular Hypertensive Rats

CUI Chun-Mei¹, ZENG Jin-Sheng¹, WU Qing-Qing², WEN Hong-Mei³, LIN Jian-Wen¹, and WANG Li-Zhi¹

(1. Department of Neurology, 2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510080, China)

[KEY WORDS] Renalvascular Hypertension, Stroke-prone; Vascular Remodeling; Vascular Smooth Muscle Cells; Fibronectin; Carotid Artery; Middle Cerebral Arteries

[ABSTRACT] Aim To investigate the difference in the types and mechanisms of vascular remodeling among the different brain arteries. Methods The parameters of vascular remodeling and the smooth muscle cells (SMC) were measured through the HE staining photos of the arteries. Protein expression of fibronectin (FN) was determined by immunohistochemistry.

Results The amount of SMC and FN expression level in carotid arteries decreased significantly while the SMC average area increased compared with SD at 4 weeks post-operation. At the end of eighth week, there was a significant increase in wall thickness, wall area, wall-to-lumen diameter ratio, wall-to-area ratio, SMC average area and FN expression level and a decrease in SMC amount of specific area of RHRSP carotid arteries. Wall area in RHRSP basal arteries had been increased since the fourth week post-operation and FN expression increased at the eighth week. There was a significant difference in lumen diameter, wall-to-lumen diameter ratio and wall-to-area ratio between the middle cerebral arteries of SD and RHRSP (4 or 8 weeks post-operation). The wall thickness, wall area and the SMC amount of RHR middle cerebral arteries were significantly higher than SD at 8 weeks post-operation. Conclusions The difference in the types and mechanisms of vascular remodeling in RHRSP brain arteries may be connected with different stroke behavior among them.

[收稿日期] 2005-07-11 [修回日期] 2006-05-20

[基金项目] 国家自然科学基金(39940012, 30271485); 美国 CMB 基金(00-730); 卫生部临床学科重点项目(2004); 广东省自然科学基金(990065, 21906); 广东省医药卫生科研基金(B1999035); 广东省博士基金(984225); 广东省自然科学基金团队项目(2000年); 广东省自然科学基金攻关项目(B30303, 2003D30301)

[作者简介] 崔春梅, 博士研究生, 从事脑血管病的临床防治研究。曾进胜, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事脑血管病预防、治疗和康复的临床和基础研究。

临床上, 不同脑动脉卒中的发生率、类型、发展和预后均有差异, 然而产生这一现象的原因仍不明确。血管结构是血管功能的基础, 早期血管重塑概念的提出, 旨在区分由排列异常和由过度生长引起的结构改变^[1]。近年来倾向于把任何血管结构的改变均称为血管重塑^[2]。因此本研究采用易卒中型肾血管性高血压大鼠(stroke-prone renalvascular hypertensive rats, RHRSP)这一特殊的动物模型, 观察高血

压发生时颈总动脉、基底动脉和大脑中动脉结构重塑的异同,以为更有效地防治脑卒中提供依据。

1 材料与方法

1.1 高血压大鼠模型的建立和取材

选取 17 只体重为 80~120 g 的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,随机分为 2 组:其中 12 只按双肾双夹法复制 RHRSP 模型^[1],为 RHRSP 组,另外 5 只做为假手术对照组。术后每周经鼠尾动脉用 SBP-1 型大鼠心率血压仪测量收缩压一次(购自中日友好医院,北京)。RHRSP 组于术后第 4 周和第 8 周各处死 5 只,经心脏 4% 多聚甲醛灌注后取双侧颈总动脉分叉前 3 mm,4% 多聚甲醛后固定 5~6 h,显微镜下取大脑中动脉起始和基底动脉末端 3 mm,梯度酒精脱水,石蜡包埋行 HE 染色和免疫组织化学。

1.2 血管重塑参数的测量

颈总动脉、基底动脉和大脑中动脉进行石蜡包埋时,动脉纵轴与模具的刀面保持垂直,以使动脉的横切面处于标准位,石蜡切片 4 μm 厚行 HE 染色,用 OLYMPUS BX51 系统显微镜摄取血管图片,同时拍摄相同放大倍数的已知特定距离的脑组织 HE 染色切片,作为图象分析的标尺。ImageJ 1.29X 测取血管图片的内外管腔面积和周长。使用 Excel 计算管腔内直径(内腔周长/3.14)、管壁厚度[(外腔周长-内腔周长)/6.28]、横截面积(外腔面积-内腔面积)、壁腔比(管壁厚度:管腔内直径)和壁面积比(管壁厚度:内腔面积)。

1.3 血管平滑肌细胞参数

镜下计数大脑中动脉和基底动脉 HE 染色中的平滑肌细胞核总数。用 ImageJ 1.29X 将颈总动脉 HE 染色 RGB 图象转换为 8bit 图,根据每张图片的染色情况设定灰度域值,以获得最好的信噪比。同时设定细胞核大小为 5~150 像素,以排除内皮细胞和背景信号干扰,保证所计数的核多为平滑肌细胞核。用 Excel 计算单个平滑肌细胞平均面积(管壁横截面积/细胞数)和单位面积细胞数(细胞数/管壁横截面积)。

1.4 免疫组织化学染色和定量分析

颈总动脉、大脑中动脉和基底动脉 4 μm 厚石蜡切片贴于多聚赖氨酸处理后的玻片,用 ABC 法 (LSAB+ 试剂盒, Dako 公司),采用 1:200 小鼠抗大鼠纤维连接素 (fibronectin, FN) 单克隆抗体 (New Markers 公司) 行免疫组织化学染色, DAB 显色。脱水、透明后,封片,光镜观察。删去一抗作为阴性对

照。所得图片用 ImageJ 1.29X 测量管壁平均阳性灰度。管壁 FN 的表达量与阳性灰度成反比。

2 结果

2.1 血压观测结果

对照组、RHRSP 第 4 周时和第 8 周时的血压分别为 123 ± 14 mmHg、 153 ± 21 mmHg 和 208 ± 29 mmHg, RHRSP 组第 4 周和第 8 周时的血压与对照组相比,差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示高血压模型复制成功。

2.2 血管重塑参数变化

2.2.1 颈总动脉 第 4 周时, RHRSP 组结构参数无明显变化;第 8 周时, RHRSP 组管壁厚度、横截面积和壁腔比分别为 74.8 ± 12.3 μm 、 233.428 ± 76.488 μm^2 和 0.086 ± 0.007 , 与对照组 (P 值均 < 0.001) 和第 4 周相比,差异均有显著性意义 (P 均 < 0.01 或 0.001),壁面积比 (0.00030 ± 0.00011) 与对照组相比,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2.2 大脑中动脉 第 4 周时, RHRSP 组大脑中动脉管壁内直径、壁腔比和壁面积比分别为 209 ± 60 μm 、 0.09 ± 0.05 和 0.0015 ± 0.0004 , 与对照组 (152 ± 30 μm 、 0.14 ± 0.05 和 0.00192 ± 0.00028) 相比差异有统计学意义 (P 均 < 0.05 或 0.01);第 8 周时, RHRSP 组管腔内直径和壁面积比与对照组的差异仍有统计学意义 (P 均 < 0.01),管壁厚度 (23 ± 7) 与第 4 周时 (17 ± 4) 的差异有显著性 ($P < 0.05$),横截面积 (16236 ± 6538) 与对照组 (10542 ± 1215) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2.3 基底动脉 第 4 周和第 8 周, RHRSP 组横截面积分别为 15867.4 ± 1316.9 μm^2 和 22556 ± 486 μm^2 与对照组 (13598.9 ± 1090.8) 相比,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.3 血管平滑肌细胞参数变化

2.3.1 颈总动脉 第 4 周时, RHRSP 组平滑肌细胞总数 (283 ± 59 个) 和单个平滑肌细胞面积 (548 ± 111 μm^2) 与对照组 (345 ± 51 个和 456 ± 55 μm^2) 相比,差异有显著性 (P 均 < 0.05)。第 8 周时单个平滑肌细胞面积和单位面积细胞数均与对照组和第 4 周时相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.3.2 大脑中动脉 第 8 周时 RHRSP 组的平滑肌细胞总数为 52.16 ± 16.07 个,与对照组 (40.3 ± 10.6 个) 和第 4 周 (41.4 ± 8.5 个) 的差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.3.3 基底动脉 平滑肌细胞总数、单个平滑肌细胞面积和单位面积细胞数均无显著改变。

2.4 纤维连接素蛋白在各级脑血管表达量的变化

第4周时 RHRSP 组的颈总动脉的 FN 表达量 (184.3 ± 2.4) 与对照组 (181 ± 3) 和第8周 (181 ± 2) 相比, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。第8周时 RHRSP 组的基底动脉 FN 平均阳性灰度为 (166 ± 5), 与对照组 (172 ± 4) 和第4周时 (171 ± 3) 相比, 差异有显著性 (P 均 < 0.05) 大脑中动脉 FN 的表达量无显著性变化。

3 讨论

动脉血管重塑时若横截面积不变称为正常重塑, 成分增加称肥厚性重塑, 成分减少称不良性重塑。依据管腔直径变小、变大或不变称之为向心性重塑、外向性重塑或代偿性重塑^[2]。本研究发现 RHRSP 第4周时, 基底动脉横截面积增加已有统计学意义, 即发生肥厚性重塑。第8周时, 随着血压升高, 颈总动脉、大脑中动脉和基底动脉均发生肥厚性重塑。RHRSP 第4周和第8周时只有大脑中动脉的管腔内直径高于对照组, 即从第4周起 RHRSP 的大脑中动脉开始进行外向性重塑。

以往研究发现, 自发性高血压大鼠^[3]、双肾一夹 Goldblatt 大鼠^[4] 和原发性高血压患者^[5] 的血管主要发生向心性正常重塑。而 DOCA 盐大鼠^[6]、一肾一夹 Goldblatt 大鼠^[7]、Dahl 盐敏感大鼠^[8] 和继发性高血压患者^[9] 多发生肥厚性重塑, 此类模型以严重高血压为特点。虽然 RHRSP 脑大动脉重塑类型多样, 但以肥厚性重塑为主, 具有严重高血压的脑动脉病理改变特点, 是 RHRSP 发生脑卒中的病理基础。

第8周时 RHRSP 三支动脉横截面积或管壁厚度均增加, 说明此时三支血管成分均增加。但本研究发现, 三者增加的成分是不同的。颈总动脉平滑肌细胞平均面积从第4周起即开始增加, 而此时细胞总数减少; 第8周时单位面积细胞数仍减少, 提示颈总动脉平滑肌细胞早期即明显肥大, 而增殖作用并不显著。RHRSP 大脑中动脉第8周时平滑肌细胞总数增多, 说明增生是大脑中动脉肥厚的机制。基底动脉平滑肌细胞参数均无明显变化, 但 FN 的表达量第8周时增加明显, 所以间质纤维化是基底动脉管壁内容物增加的主要成分, 但在颈总动脉和大脑中动脉的肥厚过程中并不起最主要作用。

高血压患者早期即有动脉结构改变, 并影响血流速度、血管僵硬度和顺应性等功能^[12]。根据泊肃叶公式, 血流量与管壁压力和半径正相关。血流速度与血流量成正比, 与管腔直径成反比。假设单位

平滑肌面积产生的收缩力一定时, 管壁厚度和管腔直径之比与血管收缩产生的压力成正比^[10]。本研究中发现 RHRSP 第8周时颈总动脉壁腔比和壁面积比均明显增加, 提示此时颈总动脉管腔内压力增加, 而管腔内直径不变, 所以血流量和血流速度应增加, 易发生湍流。大脑中动脉从第4周起壁腔比和壁面积比均小于对照组, 第8周时壁面积比仍低于对照组。管腔内压力减少而管腔内直径增加, 推测血流量应大致保持恒定, 但血流速度变慢, 上述变化均为血小板等粘附成分的沉积创造了有利条件。基底动脉是唯一血流动力学相关的指标保持稳定的血管。临床上亦可以观察到, 颈总动脉和大脑中动脉比基底动脉更易于发生脑卒中, 但以上是否为产生这一现象的直接原因仍需进一步研究。

本研究发现 RHRSP 颈总动脉、基底动脉和大脑中动脉在高血压不同时期的重塑类型和机制不同。RHRSP 脑血管以肥厚性重塑为主。平滑肌细胞肥大主要参与了颈总动脉的结构重塑, 大脑中动脉则通过平滑肌细胞增生发生结构重塑, 间质纤维化作用是基底动脉重塑的主要机制。结构重塑的差异可能产生不同的血流变学结果, 从而影响不同血管脑卒中的发生和发展。深入研究以逆转这些结构改变将为更有效防治脑卒中提供依据。

[参考文献]

- [1] Baumbach G, Heistad D. Adaptive changes in cerebral blood vessels during chronic hypertension [J]. *J Hypertens*, 1991, **9** (6): 987-991
- [2] Mulvany M. Small artery remodeling in hypertension [J]. *Curr Hypert Rep*, 2002, **4** (1): 19-55
- [3] Deng LY, Schiffrin E. Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Hypertens*, 1992, **5** (11): 817-822
- [4] Knafo L, Turgeon A, Garcia R, et al. Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats [J]. *Am J Physiol*, 1996, **40**: H88-93
- [5] Aalkjer C, Heagerty A. Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension [J]. *Hypertension*, 1993, **22** (4): 523-526
- [6] Deng L, Schiffrin E. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats [J]. *Am J Physiol*, 1992, **262** (6): H1782-787
- [7] Korsgard N, Mulvany M. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1998, **12** (2): 162-167
- [8] d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P, Luscher TF. Structure and function of small resistance arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin receptor blockade [J]. *Hypertension*, 1997, **30** (4): 905-911
- [9] Schiffrin E, Deng L, Larochelle P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients [J]. *Clin Invest Med*, 1993, **16** (3): 177-186
- [10] Zeng J, Zhang Y, Mo J, Su Z, Huang R. Two-kidney, two-clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke-prone rats [J]. *Stroke*, 1998, **29** (8): 1708-714
- [11] 郑杨, 迟宝荣, 佟倩. 高血压病患者动脉结构和功能的变化 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2005, **31** (2): 299-302

(此文编辑 胡必利)