

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-12-1020-05

动脉粥样硬化发生中高脂血症与动脉狭窄的作用比较

金海燕, 冬毕华, 彭旷, 孙慧, 叶旭, 杨永宗

(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; 动脉粥样硬化; 实验动物, 家兔; 套环, 硅胶; 动脉狭窄模型; 高脂血症模型; 血脂测定

[摘要] 目的 分析比较高脂血症和动脉狭窄在动脉粥样硬化形成中的作用, 并探讨其可能的作用机制。方法 采用颈总动脉套环术加高脂高胆固醇饲料喂养新西兰白兔, 建立兔颈总动脉粥样硬化模型。血浆总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇的浓度均用酶法测定。用数字剪影动脉造影技术来检测手术效果和动脉狭窄程度。通过病理技术观察血管壁组织形态并进行图象分析。结果 喂养9周后, 无论是对照组还是高脂组, 套环的颈总动脉均发现了大量的泡沫细胞, 尤以高脂组更为显著。此时, 高脂组兔的主动脉弓部可见脂质条纹, 病变面积占主动脉面积的 $30.8\% \pm 6.3\%$ 。而对照组兔未见动脉粥样硬化病变。结论 结果提示采用颈总动脉套环术, 可以使兔颈总动脉在较短时间内在明确预定的部位形成动脉粥样硬化病变。动脉粥样硬化病变的形成与高脂血症和血流动力学的变化密切相关。动脉狭窄可通过血流动力学作用引发粥样硬化病变, 该作用可不依赖于高脂血症的存在。动脉狭窄引发的病变在狭窄远心端较近心端严重。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Comparing the Effects of Hyperlipidemia and Arterial Stenosis on Atherosclerosis

JIN Hai-Yan, DONG Bi-Hua, PENG Kuang, SUN Hui, YE Xu, and YANG Yong-Zong

(The Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Animal Model; Collar; Artery Stenosis; Hyperlipidemia

[ABSTRACT] **Aim** To compare the roles of hyperlipidemia and arterial stenosis on atherosclerosis, and explore the potential mechanisms. **Methods** Established atherosclerosis model of rabbit carotid arteries by putting silastic collars around the carotid arteries and raising New Zealand rabbits with a high fat and high cholesterol diet. The total cholesterol, triglyceride and high density lipoprotein cholesterol in plasma were measured with kits. The extents of artery stenosis were controlled by digital arteriography. The character of artery morphology was observed with pathology methods. **Results** After nine weeks, a lot of foam cells were found in the carotid arteries with the collar, whether in the chow diet or high fat and high cholesterol diet group, especially in the latter. The rabbit aortic arches of the high fat and high cholesterol diet group showed a little fatty streak, but no changes in the chow diet group. **Conclusion** The results suggested that collars around carotid arteries can induce atherosclerotic lesions in a relatively shorter time and specific area of arteries. The formation of atherosclerotic lesions are closely related with hemodynamic changes and hyperlipidemia. Atherosclerotic lesions can be caused by hemodynamic changes with artery stenosis. Lesions of the area distal to the collar, induced by artery stenosis, were more serious than the area proximal.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是许多心、脑血管疾病共同的病理生理学基础^[1], As的发生与多种因素密切相关^[2,3]。其中以高脂血症和血流动力学变化两个因素的作用最著,在As形成过程中都起重要作用。但在动脉粥样硬化发生过程中高脂血症和血流动力学变化两者之间的关系尚不明确^[4,5]。本实验通过高脂高胆固醇饲料饲养新西兰白兔诱发高脂血症,采用颈总动脉套环术造成动脉狭窄,观察

动脉粥样硬化病变差异以分析比较动脉粥样硬化病变动脉粥样硬化病变高脂血症和动脉狭窄两个因素在动脉粥样硬化病变形成的作用,探寻两者的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

硅胶套环(内径1.2 mm和1.5 mm)购于深圳骏鼎达科技有限公司。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)酶法测定试剂盒均购于上海荣盛生物技术有限公司。数码成像系统(GT-800, Seiko Epson公司), Olympus BX51型光学显微镜(日本奥林巴斯有限公司), Polaroid数码相机(Polaroid公司), PIPS-2020超清晰度病理图文分析

[收稿日期] 2006-11-11 [修回日期] 2006-12-08

[基金项目] 湖南省重点科技项目(01SSY1003)

[作者简介] 金海燕, 硕士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化防治, 联系电话为0734-8281586。冬毕华, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病理学。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。

系统(重庆天海医疗设备有限公司)。

1.2 动物分组和颈总动脉处理

6 周龄新西兰白兔 20 只, 雄性, 体重 1.8 ± 0.3 kg。随机分成对照组 ($n=10$) 和高脂组 ($n=10$), 前者普通饲料喂养, 后者高脂饲料喂养(普通饲料 94%, 胆固醇 1%, 猪油 5%)。实验开始时, 两组动物均行左颈总动脉套环术: 常规备皮, 麻醉, 消毒后行颈部正中切口, 钝性分离两侧颈总动脉, 于甲状软骨水平下 1 cm 处, 将内径 1.2 mm, 长 5 mm 的薄壁套环套于左侧颈总动脉上^[6,7](图 1), 以造成左颈总动脉狭窄。右侧颈总动脉套上不造成狭窄的内径为 1.5 mm 的大环作为对照, 结扎固定。用庆大霉素浸润切口处暴露组织后, 缝合各层组织及皮肤。所有操作过程均在无菌条件下进行。手术完毕后再用庆大霉素浸润缝合部位, 以防切口感染。套环术后, 通过数字剪影血管造影(digital subtraction angiography, DSA) 技术(图 2) 对两侧颈总动脉进行造影观察, 以确保左侧颈总动脉小套环处狭窄, 但仍有血流通过, 不造成血管闭合; 而右侧颈总动脉大套环处没有狭窄, 血流通畅。按照对两侧颈总动脉的不同处理, 实验再分成大环对照组、小环对照组、大环高脂组和小环高脂组四组, 每组 10 支颈总动脉。每 3 周称体重一次, 并经耳缘静脉取血检测血脂指标。实验时间为 9 周。

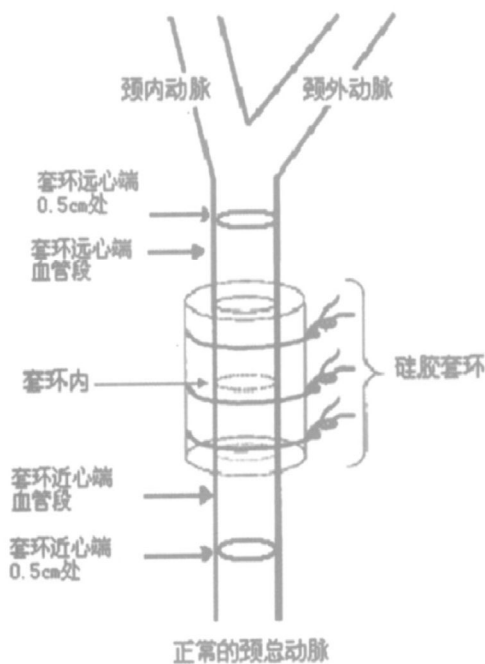


图 1. 颈总动脉套环术示意图

1.3 血脂测定

采血前禁食 12 h, 常规备皮。从兔耳缘静脉采

血后, 于 1 kr/min 离心 5 min, 小心收集析出的血浆备用。血浆总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)、和甘油三酯(TG)均按照检测试剂盒说明书操作酶法测定。低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)采用 Friedwald 经验公式计算: $\text{LDLC}(\text{mmol/L}) = \text{TC} - (\text{HDLC} + 0.457\text{TG})$; 或 $\text{LDLC}(\text{mg/dL}) = \text{TC} - (\text{HDLC} + 0.2\text{TG})$ 。

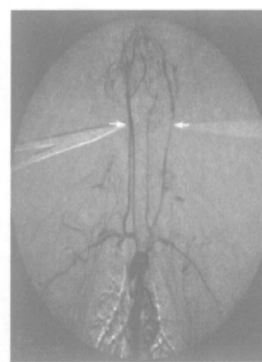


图 2. 套小环术后的兔颈总动脉 数字剪影血管造影显示左侧套小环处的颈总动脉明显狭窄, 但仍保持一定血流。

1.4 主动脉苏丹Ⅲ染色及分析

全部实验动物于第 9 周麻醉状态下经股动脉插管放血处死。取出整条主动脉(从主动脉起始处至髂动脉分枝下 1 cm), 清除其外部的脂肪和结缔组织后, 用生理盐水冲洗干净, 福尔马林液固定后, 沿动脉纵向剪开, 在 70% 的乙醇中短暂漂洗, 然后在室温下于 Herxheimers 液[苏丹(g): 70% 乙醇(mL): 丙酮(mL) = 1: 100: 100] 中浸泡 20 min, 用 80% 乙醇分色 20 min, 最后流水冲洗 1 h。染色后, 血管标本脂纹病变区呈深红色。把动脉平铺于平板上并摄像, 用图象分析软件测定和分析脂纹与动脉总面积, 计算脂纹占动脉总面积的百分比。

1.5 血管壁组织形态学观察及图象分析

在各组动物两侧颈总动脉套环处及套环近心端、远心端分别取颈总动脉 0.5 cm 各一段, 用常规方法脱水, 石蜡包埋后进行连续切片, 行 HE 染色。用 Olympus BX 51 显微镜观察动脉壁的病变情况, 数码相机摄影, 超清晰度病理图文分析系统进行图象分析。

1.6 统计学分析

实验所得数据用 SPSS13.0 统计软件建立数据库, 进行统计学计算, 同一组实验前后的血脂水平比较采用配对 t 检验, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 判定差异显著性。

2 结果

2.1 动物基本情况

实验期间高脂组动物的体重由 1.72 ± 0.32 kg 增加到 2.78 ± 0.27 kg, 对照组动物体重由 1.89 ± 0.30 kg 增长到 2.86 ± 0.28 kg。两组动物开始的体重及实验期间的体重增加值无显著差异。

2.2 血脂水平

至实验第9周末, 对照组在实验前后血脂各项指标均无明显变化, 高脂组动物血浆 TC、TG、LDLC 水平比对照组显著增高, 而 HDLC 与对照组无显著差异(表 1)。

表 1. 对照组和高脂组实验前后血脂水平比较(mg/dl)

指标	对照组		高脂组	
	实验前	第9周末	实验前	第9周末
TC	69.3 ± 17.8	74.1 ± 4.0^a	84.3 ± 22.4	611.8 ± 37.1^{bd}
HDLC	32.8 ± 2.6	31.4 ± 5.2^a	38.1 ± 4.1	30.8 ± 5.2^{ac}
TG	86.6 ± 10.6	87.0 ± 7.2^a	107.8 ± 20.7	355.3 ± 58.6^{bd}
LDLC	19.6 ± 4.5	24.5 ± 4.7^a	9.0 ± 5.3	511.1 ± 62.7^{bd}

a 为 $P > 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与实验前相比; c 为 $P > 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.3 主动脉脂质条纹

高脂组兔的主动脉都出现脂质条纹, 病变面积占整个主动脉的 $30.8\% \pm 6.3\%$ 。主动脉管壁粗糙, 可见不同程度灰黄色斑块(苏丹Ⅲ染色后斑块呈鲜红色)隆起于内膜表面, 病变分布依升主动脉、主动脉弓、胸主动脉和腹主动脉逐次减少。对照组兔的主动脉内膜平坦光滑, 没有发现动脉粥样斑块和脂质条纹病变。

2.4 颈总动脉病理形态学观察

2.4.1 大环对照组 颈总动脉无狭窄, 腔径较大, 管腔内膜光滑, 较薄, 正常血管侧动脉内、中、外膜三层结构清晰, 内皮细胞形态完整, 单层有序排列, 紧贴于内弹力板。位于中层的平滑肌细胞呈梭形或椭圆形, 分层有序排列, 无增生。弹力纤维完整, 排列有序, 无损伤, 无断裂, 亦无溶解现象, 血管外膜无炎症表现(图 3A、B 和 C)。

2.4.2 小环对照组 套环近心端颈总动脉腔径未见明显变小, 但管腔内膜比较粗糙, 不光滑, 可见内膜明显增厚呈乳头状向管腔突起, 出现黏液水肿, 内皮脱落, 内膜不完整, 但内弹力板比较完整。内膜中有少许平滑肌细胞杂乱排列其中, 并有少量胶原及弹力纤维增生, 细胞成分增多, 多为平滑肌细胞、单核巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞(图 3D 和

E), 并可见泡沫细胞。中膜受压变薄, 平滑肌萎缩消失, 弹力纤维融合, 纤维组织增生。外膜无明显改变(图 3F)。

套环远心端靠近套环处的颈总动脉腔径极度狭窄, 管腔内膜粗糙, 内膜明显增厚, 内皮细胞脱落, 内膜中出现很多杂乱排列的平滑肌细胞, 并有胶原及弹力纤维增生和细胞成分增多, 并可见泡沫细胞(图 3G 和 H)。出现坏死组织, 有炎症细胞浸润, 以淋巴细胞和中性粒细胞为主。中膜受压变薄, 平滑肌萎缩消失, 弹力纤维融合, 纤维组织增生, 弹力纤维之间有泡沫细胞浸润, 外膜大量炎症细胞浸润(图 3I)。

2.4.3 大环高脂组 套环处颈总动脉血管壁基本正常, 但可见内膜增厚, 出现较多平滑肌细胞和少量炎症细胞, 并可见泡沫细胞和脂质积聚, 少量胶原和少量片状弹力纤维增生。中膜弹力纤维之间也有泡沫细胞浸润, 外膜有炎症细胞浸润, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主(图 4A、B 和 C)。

2.4.4 小环高脂组 套环近心端管腔被病灶完全堵塞, 颈总动脉腔壁明显增厚, 可见粥样斑块, 病变内大量堆积泡沫细胞、胆固醇结晶以及肉芽组织, 并有大量炎症细胞浸润, 表面还可见纤维组织覆盖粥样斑块的纤维帽。中膜变薄, 弹力纤维之间夹杂着泡沫细胞, 还可见钙化灶。外膜出现大量炎症细胞, 也见有泡沫细胞(图 4D、E 和 F)。

套环远心端几乎完全闭塞, 血管腔几乎被 As 斑块完全堵塞, As 斑块有大量的胆固醇结晶及大量脂质, 斑块内可见到较大的脂质性粥样坏死核, 坏死核边缘部可见较多的泡沫细胞和炎症细胞, 并可见含铁血黄素, 管腔极度狭窄, 病灶呈层状排列, 陈旧病灶纤维帽表面也可见泡沫细胞堆积(图 4G、H 和 I)。

3 讨论

新西兰白兔是动脉粥样硬化的易感动物, 高脂高胆固醇饲料喂养容易形成类似人动脉粥样硬化的病变^[5,8,9]。但单纯高脂血症诱发动脉粥样硬化病变, 不仅实验周期长, 而且出现病变的部位难以预控^[10,11]。本实验在高胆固醇饲料喂养的同时加用硅胶套环对新西兰白兔颈总动脉实施套环术, 不仅可明显缩短动物模型建立时间, 还可通过套环位置以设计动脉狭窄诱发粥样硬化病变出现部位, 以便为特定实验目的提供动物模型。在本实验条件下颈总动脉套环术对血管的作用有三: (1) 血管套环使颈总动脉狭窄, 造成局部血流动力学变化以“锚定”动脉粥样硬化病变形成部位; (2) 套环近心端和远心端所

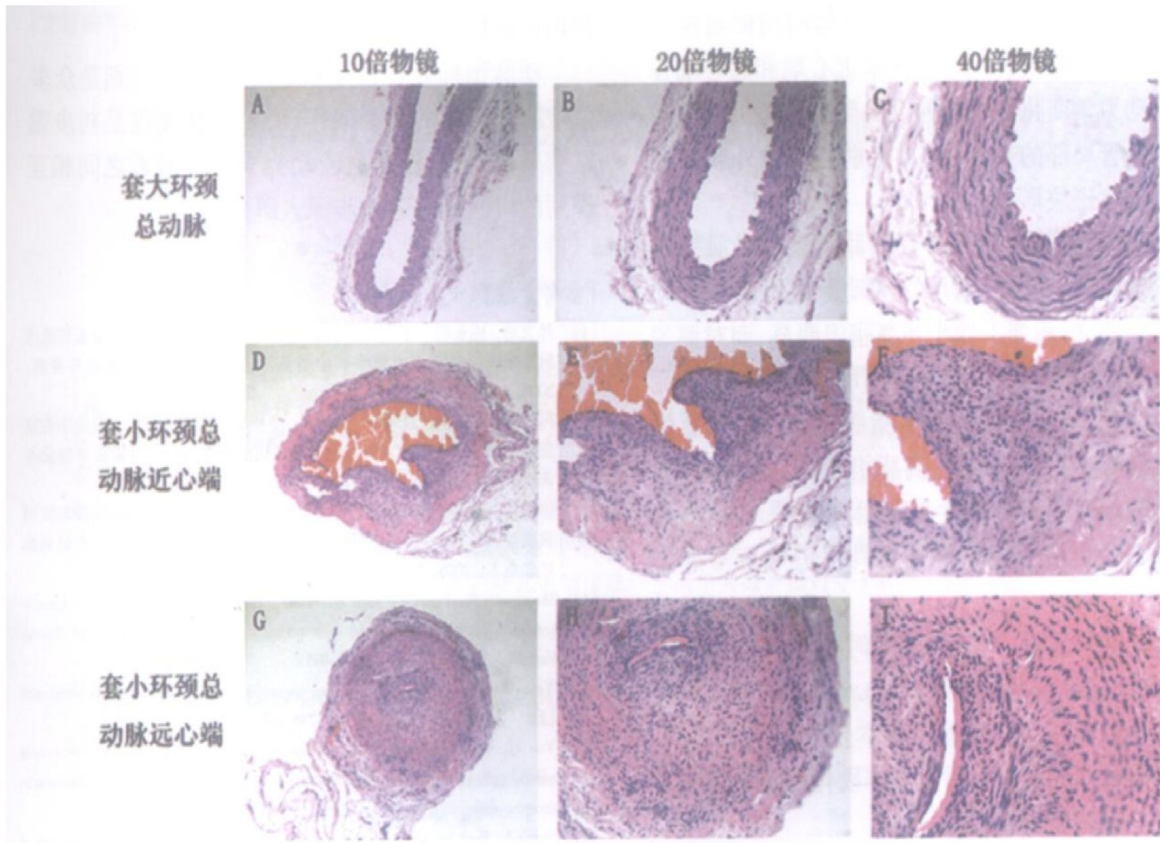


图 3. 对照组两侧颈总动脉 HE 染色 在大环对照组颈总动脉未发现明显病灶, 而小环对照组颈总动脉套环近、远心端血管壁中出现了大量的泡沫细胞等粥样病变。

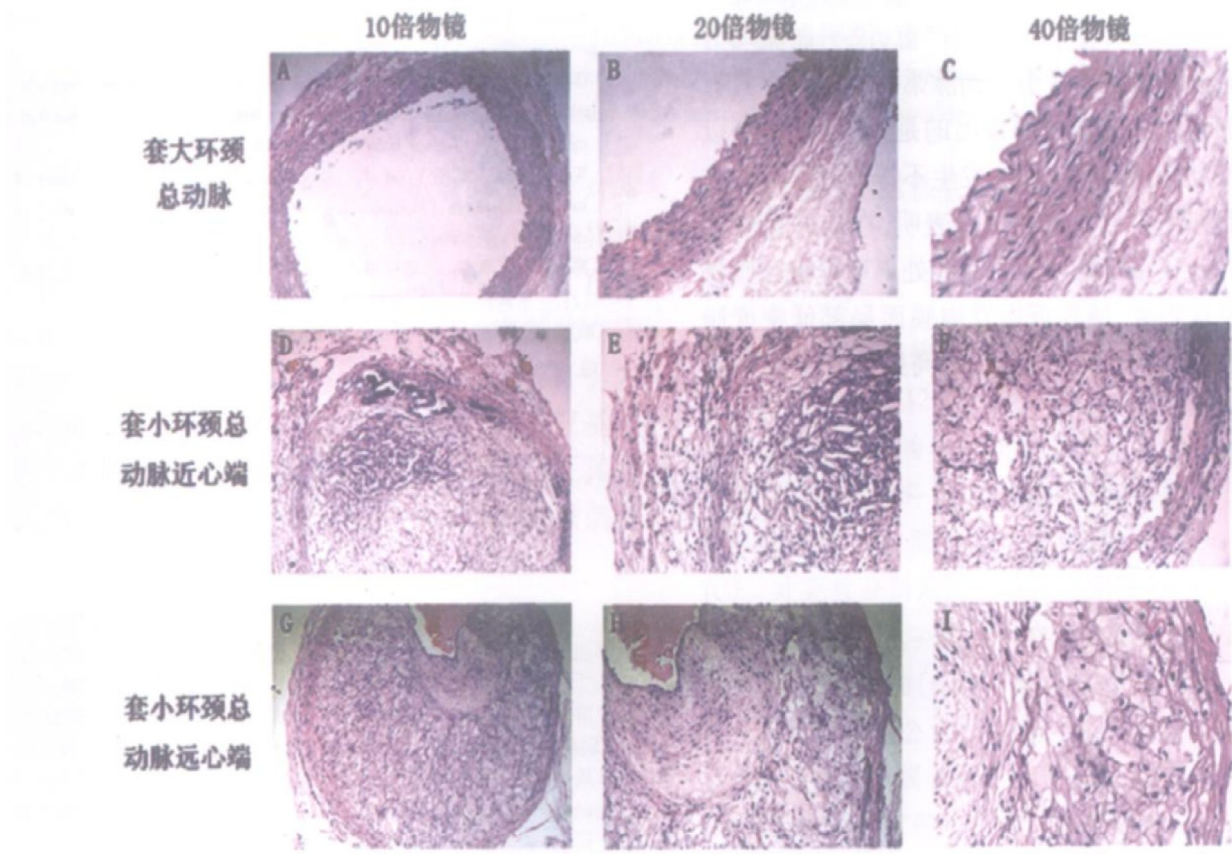


图 4. 高脂组两侧颈总动脉 HE 染色 在大环高脂组, 套环处颈总动脉壁中发现了少量脂纹期动脉粥样病变, 而在小环高脂组, 套环近心端和远心端颈总动脉壁出现了发展迅速并比较成熟的动脉粥样硬化斑块。

形成的病变有别,提示血管狭窄引起的局部血流动力学变化十分复杂,狭窄处、狭窄近心端和远心端各处血流动力学变化各不相同;(3)动脉套环机械刺激可引发血管局部的炎症反应,特别是动脉外膜炎症可促进动脉斑块形成。

本实验观察到,不仅小环高脂组狭窄动脉侧出现动脉粥样病变,小环对照组的动脉也可观察到动脉粥样病变,但病变不如小环高脂组明显,而对侧颈总动脉未见粥样病变。结果说明动脉狭窄时的血流动力学变化,可以不依赖于高脂血症而诱发动脉粥样硬化病变。另外,不管是高脂组还是对照组动物,狭窄血管远心端病变较近心端相对严重,提示狭窄血管远心处血流动力学变化更具促进病变形成作用。

实验结果显示,高脂组9周时主动脉出现脂质条纹,病变面积可占主动脉的 $30.8\% \pm 6.3\%$,但此时套大环的颈总动脉血管壁基本正常。结果提示,对于高脂高胆固醇血症引发粥样硬化病变而言主动脉较颈总动脉更为敏感。

从本实验比较研究高脂血症与动脉狭窄在动脉粥样硬化发生中的作用可以得出:高脂组主动脉出现明显病变,小环对照组套小环的颈总动脉血管壁也出现明显病变,说明高脂血症和动脉狭窄都可独立引发动脉粥样硬化病变发生;而小环高脂组套小环的颈总动脉血管壁病变最为严重,说明血流动力学因素和高脂血症两者引发动脉粥样硬化发生具有协同叠加作用。应当强调指出的是,动脉狭窄可以独立引发动脉粥样硬化病变发生不等于脂质浓度在其中不起作用。已有研究资料表明,在动脉血管的分支、弯曲、狭窄等低剪切力紊流处出现低密度脂蛋白浓度极化现象,使靠近血管内膜面局部低密度脂蛋白浓度增高,所以即使不存在高脂血症情况下内

膜仍可能接触较高浓度的低密度脂蛋白^[12]。

动脉粥样硬化发生机制非常复杂,特别是众多危险因素之间的关系尚不清楚,本研究仅是初步观察结果,高脂血症与血流动力学因素两者之间相互作用的机制尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 孙文清, 杨永宗, 叶旭, 彭旷, 孙慧, 姜至胜. 兔颈总动脉套环致动脉狭窄在粥样硬化血管重构中的作用[J]. 中国医学理论与实践, 2006, 16 (6): 688-690.
- [2] 冯大明, 孙文清, 刘录山, 唐朝克, 冬毕华, 易光辉, 等. 贵州小香猪颈总动脉内膜球囊损伤致动脉粥样硬化的研究[J]. 中国医学理论与实践, 2004, 14 (8): 1116-1118.
- [3] 唐雅铃, 王双, 杨永宗, 许增祥, 叶旭, 孙玉慧等. Compound48/80对载脂蛋白E基因敲除鼠颈总动脉套环诱导斑块的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (2): 103-106.
- [4] Mavromatis K, Fukai T, Tate M, et al. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (8): 1 889-895.
- [5] Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research [J]. *Lab Anim*, 2004, 38 (3): 246-256.
- [6] Von TJ, Van BF, Biessen EA. 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): 1 164-170.
- [7] Strom A, Fredrikson GN, Schiopu A, et al. Inhibition of injury-induced arterial remodeling and carotid atherosclerosis by recombinant human antibodies against aldehyde-modified apoB-100 [J]. *Atherosclerosis*, 2006: 1-8.
- [8] Madhumathi BG, Venkataranganna MV, Gopumadhavan S, et al. Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand white rabbits [J]. *Ind J Exp Biol*, 2006, 44 (3): 203-208.
- [9] Yang PY, Almofti MR, Lu L, et al. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in foam cells by a water-soluble fraction of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99 (3): 294-300.
- [10] Cimini M, Boughner DR, Ronald JA, et al. Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study [J]. *J Heart Valve Dis*, 2005, 14 (3): 365-375.
- [11] Wei W, Li C, Wang Y, et al. Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term Cholestin (Monascus purpureus-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits [J]. *J Nutr Biochem*, 2003, 14 (6): 314-318.
- [12] 邓小燕, 王贵学. 动脉系统中致动脉粥样硬化脂质的浓度极化现象 [J]. 中国科学 C 辑, 2002, 32 (6): 559-567.

(此文编辑 胡必利)