

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-12-1028-04

## 低剪切应力促进基质细胞衍生因子 1 在 动脉粥样硬化斑块中表达

吴孟津<sup>1</sup>, 危当恒<sup>1,2</sup>, 王贵学<sup>2</sup>, 刘录山<sup>1</sup>, 唐朝君<sup>2</sup>, 王佐<sup>1</sup>, 唐朝克<sup>1</sup>

(1. 南华大学医学院, 湖南省衡阳市 421001; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆市 400044)

[关键词] 病理学与病理生理学; 基质细胞衍生因子 1; 动脉粥样硬化斑块; 剪切应力; 基因表达

[摘要] 目的 探讨基质细胞衍生因子 1 在局部狭窄远心端低切应力诱导的动脉粥样硬化斑块中的表达, 从而探讨基质细胞衍生因子 1 在动脉粥样硬化病变中的作用。方法 建立颈总动脉局部狭窄动物模型, 数值模拟局部狭窄远心端流场以及剪切应力分布, HE 染色观察局部狭窄远心端病理学改变, 免疫组织化学法观察基质细胞衍生因子 1 在病变处的表达。结果 在局部狭窄远心端形成低剪切应力区域(0~0.3 Pa), 并有明显的动脉粥样硬化病变, 有明显的内膜增生形成(对照组为  $8 \pm 3 \mu\text{m}$ , 处理组 4 周为  $38.5 \pm 12.7 \mu\text{m}$ , 8 周为  $95.3 \pm 19.6 \mu\text{m}$ )。免疫组织化学检测发现病变中有大量的基质细胞衍生因子 1 表达, 对照侧血管无基质细胞衍生因子 1 表达, 并且随着病变程度的增加, 基质细胞衍生因子 1 表达量明显增加。结论 基质细胞衍生因子 1 可能在低剪切应力诱导的动脉粥样硬化斑块的发生发展中起着重要的调节作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Stromal Cell-Derived Factor-1 Expression in Atherosclerotic Lesions Induced by Low Shear Stress

WU Meng-Jin<sup>1</sup>, WEI Dang-Heng<sup>1,2</sup>, WANG Gu-Xue<sup>1</sup>, LIU Lu-Shang<sup>1,2</sup>, TANG Chao-Jun, WANG Zuo<sup>1,2</sup>, TANG Chao-Ke<sup>1</sup>

(1. The Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Heng Yang 421001; 2. Bioengineering College of Chongqing University and Key Lab for Biomechanics • Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell derived Factor-1; Atherosclerotic Plaque; Low Shear Stress

[ABSTRACT] **Aim** Detected the expression of stromal cell-derived factor-1(SDF-1) in atherosclerotic lesions induced by low shear stress to research the roles of SDF-1 in atherosclerosis formation and development. **Methods** We set up a local stenosis in left carotid artery, then stimulated the local hemodynamics at the downstream of stenosis with numerical simulation; HE staining was taken to identify the pathology of common carotid artery; Immunohistochemistry staining was used to detect the expression in atherosclerotic lesions. **Results** There was a low shear stress region (0~0.3 Pa) at distal of ring where there was obvious atherosclerosis lesions formed. The intimal of control group ( $8 \pm 3 \mu\text{m}$ ) is obviously lower than the treated group (4 weeks  $38.5 \pm 12.7 \mu\text{m}$ , 8 weeks  $95.3 \pm 19.6 \mu\text{m}$ ). Immunohistochemistry showed that SDF-1 highly expressed in atherosclerotic plaque without expression in control. **Conclusion** SDF-1 may play important roles in atherosclerosis formation and development induced by low shear stress.

血液与动脉壁细胞之间的相互调控在动脉粥样硬化的发生、发展中起着极为重要的作用, 而且这种调控是通过这些细胞分泌趋化因子、生长因子以及其它细胞因子而实现, 其中趋化因子起着主导作用。斑块形成过程中白细胞的捕获、血管生成、平滑肌细胞的迁移和增殖等均与趋化因子的作用密切相关。基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1,

SDF-1) 是新近发现的趋化因子, 对血液干(祖)细胞的归巢具有强烈的趋化能力, 并能介导巨核细胞跨内皮迁移, 并且在与动脉粥样硬化发生、发展密切相关的单核细胞、受损后的内皮细胞以及活化的血小板中均有表达, 提示 SDF-1 可能在动脉粥样硬化发生发展过程中起着重要调节作用。本文通过建立颈总动脉局部狭窄远心端低切应力诱导动脉粥样硬化的动物模型, 探讨 SDF-1 在动脉粥样硬化斑块中的表达变化。

[收稿日期] 2006-11-07 [修回日期] 2006-12-01

[基金项目] 湖南省自然科学基金(06JJ50051, 06JJ30016); 湖南省教育厅科学研究项目(06C693)

[作者简介] 吴孟津, 讲师, 主要从事分子生物学研究。通讯作者危当恒, 博士, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治, E-mail 为 weizhonghua99@126.com。王贵学, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉硬化的发病机制以及生物力学与生物材料学的研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

雄性新西兰大白兔 16 只, 体重 1.4~1.6 kg(湖

南省衡阳市南岳制药厂),分笼普通饮食饲养。

## 1.2 颈总动脉局部狭窄动物模型的建立

参考 Cheng 等<sup>[1]</sup>方法,简述如下:腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,仰卧位,颈部除毛,络合碘消毒,铺设无菌巾;颈部正中剪开皮肤,分离肌群,暴露颈动脉鞘,分离出左、右颈总动脉;将预先剪开的硅胶管套于左侧颈总动脉平直段(圆筒形硅胶管长度为 8 mm,内径为 0.5 mm),手术线固定套环。分别喂养 4 周和 8 周。

## 1.3 局部狭窄血管流场的数值模拟

按照上述硅胶套管与左颈总动脉的位置关系,建立颈总动脉局部狭窄的几何模型,采用 FLUENT 软件模拟血管内壁表面流场及剪切应力分布。

## 1.4 颈总动脉病理学观察

将 10% 中性福尔马林固定的颈总动脉经蒸馏水冲洗 0.5~1 h, 70% 酒精浸泡 24 h, 80% 酒精浸泡 24 h, 95% 酒精 iv 浸泡 30 min, 95% 酒精 ⊕ 30 min, 100% 酒精 iv 浸泡 30 min, 100% 酒精 ⊕ 浸泡 30 min, 100% 酒精与二甲苯混合液(1:1)浸泡 20 min, 二甲苯 iv 浸泡 20 min, 二甲苯 ⊕ 浸泡 20 min, 软蜡浸泡 10 min, 硬蜡浸泡 10 min 包埋,连续切片(厚度为 5 μm),摊片,60℃烤片 1 h,常规脱蜡入水,HE 染色,光学显微镜下观察动脉粥样硬化斑块病变情况。NIH-image 图像分析系统测定动脉内膜厚度。

## 1.5 免疫组织化学检测基质细胞衍生因子 1 表达

参照文献[2],切片常规脱蜡、入水,3% 过氧化氢-甲醇封闭内源性过氧化酶,磷酸盐缓冲液洗涤后加入 SDF-1 一抗(鼠抗兔 IgG 按 1:100 稀释),后面的步骤按链酶亲和素-生物素-过氧化酶染色试剂盒操作说明进行操作,AEC 显色,苏木素复染,甘油封片。结果判定,红色部分为阳性。

## 1.6 统计学处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析,两两均数间的多重比较,采用 Student *t* 检验, $P < 0.05$  为差异达到显著水平。

# 2 结果

## 2.1 局部狭窄血管的流场分布

由数值模拟的结果可知,当血流流速不太大时,狭窄下游存在强度很小的涡流。上游无狭窄段流场基本保持不变,直到狭窄入口处流场迅速改变,在狭窄后段的流场明显发生改变,流场变得紊乱,有涡流形成。随着流速的增大,狭窄下游的涡流强度也随之增大,并且流场也变得更为复杂。

## 2.2 局部狭窄血管的剪切应力分布

数值模拟的结果表明,壁面剪切应力在狭窄处的近前部稍微降低,然后突然升高达到峰值,随后急剧下降,但在狭窄段仍然维持较高的剪切应力值。在狭窄的远心端壁面剪切应力迅速下降,直到接近于零,尔后又回升,逐步回复到无扰动层流值。

## 2.3 低剪切应力对颈总动脉病理形态的影响

HE 染色可见,左颈动脉套环 4 周后狭窄血管远心端即低剪切应力区域有明显的内膜增生和动脉粥样硬化斑块形成,斑块内含有大量炎性细胞和泡沫细胞,第 8 周时,病变明显比 4 周时严重,而对照侧颈总动脉内皮完整、光滑,未见内膜增生和动脉粥样硬化斑块。

表 1. 局部狭窄后血管内膜厚度(μm)

部位	0 周	4 周	8 周
对侧颈总动脉	8 ± 3	10 ± 5	15 ± 5
套环远心端	8 ± 4	38.5 ± 12.7 <sup>ac</sup>	95.3 ± 19.6 <sup>bd</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 0 周比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ . 与对侧比较。

## 2.4 基质细胞衍生因子 1 在低剪切应力诱导的斑块中的表达

免疫组织化学检测结果表明,正常血管组织无 SDF-1 的表达,但在动脉粥样硬化斑块中有大量的 SDF-1 的表达,主要表达于增生的内膜,中膜和外膜几乎无表达,并且随着病变程度的增加,增生内膜中的 SDF-1 表达量明显增加。

# 3 讨论

Caro 等在尸检中发现动脉粥样硬化好发于人体动脉系统血管的分叉处、弯曲处、血管狭窄处这样一些血管几何形状发生急剧变化的部位,特别是动脉分支的外壁(而不是分叉点)、弯曲内壁(例如主动脉弓)、颈动脉窦(颈动脉突出部,与瓣膜无关)、及腹主动脉,而不是升主动脉,这些部位都存在一个低剪切应力区域,这些区域血管性疾病更容易形成。狭窄血管的远心端的壁面剪切应力数值模拟的结果表明,在狭窄血管的远心端形成一剪切应力剧烈改变的区域,在紧靠狭窄的出口处,壁面剪切应力迅速降低,直至降低到零值,然后又缓慢上升达到接近无扰动条件下的剪切应力值。

研究表明,细胞因子、生长因子以及趋化因子在介导壁面剪切应力、流动分离、二次流等对血管内皮细胞损伤、动脉内膜增生以及对单核细胞、血小板和

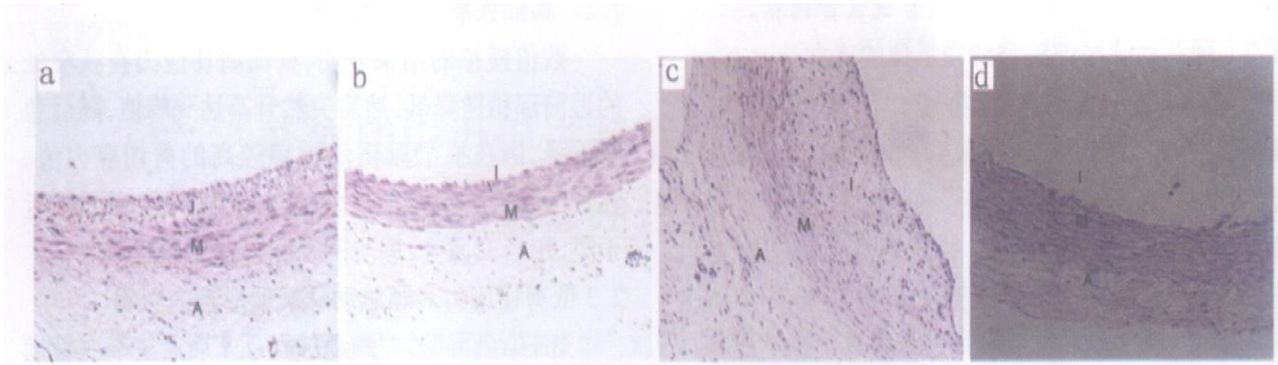


图1. 低剪切应力对颈总动脉病理形态的影响 ( $\times 200$ ) a 为4周狭窄远心端, b 为4周对侧颈总动脉, c 为8周狭窄远心端, d 为8周对侧颈总动脉。各图中I为内膜, M为中膜, A为外膜。

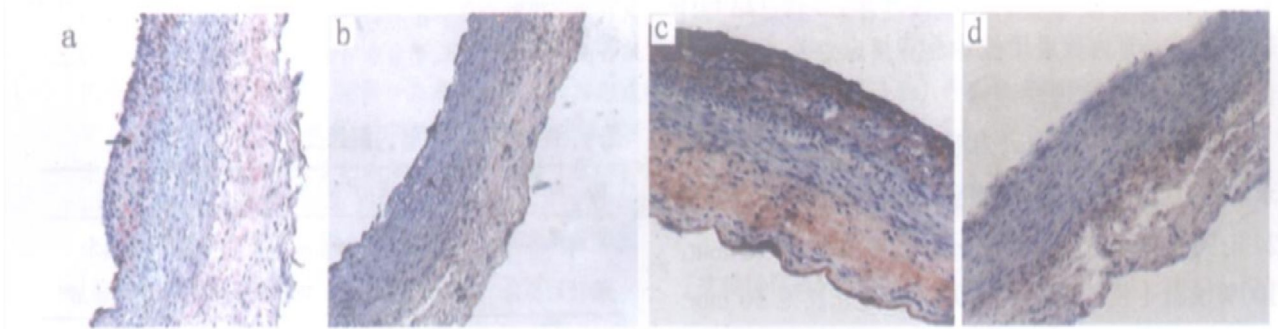


图2. 免疫组织化学染色检测基质细胞衍生因子1在兔颈总动脉的表达 ( $\times 200$ ) a 为4周狭窄远心端, b 为4周对侧颈总动脉, c 为8周狭窄远心端, d 为8周对侧颈总动脉。

巨噬细胞的聚集都有着重要作用<sup>[3-8]</sup>, 为外界刺激与动脉粥样硬化发生发展之间的桥梁。Conklin 比较了低切应力和生理情况下切应力对紧密连接蛋白 (occludin) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响。结果发现, 低切应力通过降低 occludin 表达, 增加 VEGF 表达参与调节血管壁的通透性。大量研究表明低切应力诱导内皮细胞粘附分子和趋化因子的表达增加, 介导捕获血液中单核细胞以及单核细胞跨内皮迁移<sup>[9-12]</sup>。

基质细胞衍生因子1 (SDF-1) 属于 CXC 超家族成员, 最初认为系 B 淋巴细胞生长因子, 以及 T 淋巴细胞和单核细胞的趋化因子。随着研究的不断深入, 发现 SDF-1 及其受体 CXCR4 在造血干细胞归巢骨髓的过程以及动脉粥样硬化病变的过程中发挥重要作用<sup>[13, 14]</sup>。Abi Younes 等<sup>[15]</sup> 研究发现, 冠状动脉粥样斑块内的平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞中趋化因子 SDF-1 水平明显升高, 而高表达的 SDF-1 可通过其受体 CXCR4 来诱导血小板聚集和活化。Schober 等<sup>[16]</sup> 发现在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 大鼠颈动脉导线损伤后新生内膜形成过程中 SDF-1 着色主要局限在平滑肌细胞, 并且用 SDF-1 单克隆抗体治疗颈总动脉损伤后的载脂蛋白 E 大鼠 3 周可使新生内膜减少

44%, 表现为新生内膜中的平滑肌细胞成分减少, 认为 SDF-1 通过调节新生内膜的平滑肌成分在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 大鼠损伤颈动脉后新生内膜形成方面发挥着重要作用。我们的实验发现在狭窄远心端低切应力诱导的动脉粥样斑块中有大量的 SDF-1 表达, 免疫组织化学染色显示在正常对照侧的血管中无 SDF-1 的表达, 而斑块中 SDF-1 主要表达于增生的内膜, 并且越靠近管腔 SDF-1 的表达量越多; 我们推测低剪切应力诱导高表达的 SDF-1 可以趋化、捕获血液中的单核细胞、血小板、淋巴细胞, 参与动脉粥样硬化的发生发展。

#### [参考文献]

- [1] Cheng C, van Haperen R, de Waard M, van Damme LC, Tempel D, Hanemaaijer L, et al. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique [J]. *Blood*, 2005, **106** (12): 3691-698.
- [2] 甘露, 刘录山, 万载阳, 万腊香, 杨永宗. 肥大细胞对平滑肌细胞源性泡沫细胞 iv 型胶原和  $\alpha$  型胶原表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 541-544.
- [3] Kwak BR, Silacci P, Stergiopoulos, Hayoz D, Meda P. Shear stress and cyclic circumferential stretch, but not pressure, alter connexin43 expression in endothelial cells [J]. *Cell Commun Adhes*, 2005, **12** (5-6): 261-270.
- [4] Dardil A, Yamashita A, Aziz F, Asada H, Sumpio BE. Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin 1 alpha [J]. *J Vasc Surg*, 2005, **41** (2): 321-331.

(下转第 1048 页)

(上接第 1030 页)

- [5] 李黔宁, 应大君, 戴光明, 郑健. 切应力对内皮细胞组织因子表达上调的影响及其作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (1): 1-4.
- [6] Dardik A, Chen L, Frattini J, Asada H, Aziz F, Kudo FA, et al. Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells [J]. *J Vasc Surg*, 2005, **41** (5): 869-880.
- [7] Chen XL, Grey JY, Thomas S, Qiu FH, Medford RM, Wasseman MA, et al. Sphingosine kinase 1 mediates TNF- $\alpha$  induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: upregulation by oscillatory flow [J]. *Am J Physiol*, 2004, **287** (4): H1452-458.
- [8] Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces [J]. *J Intern Med*. 2006, **259** (4): 381-392.
- [9] Yang QW, Mou L, Lv FL, Wang JZ, Wang L, Zhou HJ, et al. Role of Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B pathway in monocyte endothelial adhesion induced by low shear stress and ox-LDL [J]. *Biochemistry*, 2005, **42** (3): 225-236.
- [10] 邢海燕, 李宏妹, 马丽, 朱文云, 金永娟. 流体切应力下血管内皮单核细胞趋化蛋白 1 的表达[J]. 中华病理学杂志, 2001, **30** (5): 361-364.
- [11] Yu H, Zeng Y, Hu J, Li C. Fluid shear stress induces the secretion of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2002, **26** (3): 199-207.
- [12] 钱冠清, 刘会齐, 刘晓辉. 流体的不同流动方式对血管内皮细胞血管细胞粘附分子 1、核因子  $\kappa$ B 表达影响[J]. 中国病理生理杂志, 2002, **18** (7): 753-756.
- [13] Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and FTAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development [J]. *J Exp Med*, 2006, **203** (9): 2201-213.
- [14] Wang Y, Haider HKh, Ahmad N, Zhang D, Ashraf M. Evidence for ischemia induced host-derived bone marrow cell mobilization into cardiac allografts [J]. *J Mol Cell Cardiol*. 2006, **41** (3): 478-487.
- [15] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 1999, **86** (2): 131-138.
- [16] Andreas Schober, Sandra Knarren, Micheal Lietz, Lin EA, Weber C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, **108** (20): 2491-497.

(此文编辑 胡必利)