

白细胞介素 1β 介导小型猪冠状动脉粥样硬化病变与药物诱发冠状动脉痉挛模型的研究

关启刚¹, 程颖¹, 曾定尹¹, 孙喜琢², 何学志², 韩凤桐², 周旭晨¹, 苗志林¹, 张利²

(1. 中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 大连市中心医院心内科, 辽宁省大连市 116033)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 冠状血管痉挛; 白细胞介素 1; 5 羟色胺; 组胺

[摘要] 目的 探讨白细胞介素 1β 介导的小型猪冠状动脉粥样硬化病变与药物诱发冠状动脉痉挛模型的构建方法。方法 小型雄性家猪随机分为 3 组, 每组 8 头, 开胸手术分离冠状动脉左前降支和回旋支近端, 对照组血管外膜包裹吸附含生理盐水琼脂糖微粒悬液的纸巾; 模型 1 组和模型 2 组分别包裹吸附含白细胞介素 1β 2.5 μg 和 6.0 μg 琼脂糖微粒悬液的纸巾。2 周后冠状动脉造影观察管腔狭窄程度及分别往冠状动脉内注 5 羟色胺 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 和组胺 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 诱发冠状动脉痉挛情况。光镜观察管腔病理学改变。结果 冠状动脉外膜包裹白细胞介素 1β 血管段发生不同程度的管腔狭窄, 5 羟色胺和组胺均可诱发模型 1 组 (冠状动脉狭窄 20% ~ 30%) 病变血管段痉挛, 阳性率为 82%, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。而模型 2 组 (冠状动脉狭窄 50% ~ 70%) 均未诱发出痉挛。两组光镜均可见病变血管段内膜增殖和炎症细胞聚集现象。结论 白细胞介素 1β 包裹冠状动脉外膜可引起动脉粥样硬化病变, 5 羟色胺和组胺可诱发轻度狭窄的冠状动脉发生痉挛。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Development of Coronary Artery Atherosclerosis and Coronary Artery Spasm Model in Chinese Mini-swine Mediated by Interleukin- 1β

GUAN Qi-Gang¹, CHENG Ying¹, ZENG Ding-Yin¹, SUN Xi-Zhuo², HE Xue-Zhi², HAN Feng-Tong², ZHOU Xu-Chen¹, MIAO Zhi-Lin¹, and ZHANG Li²

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Cardiology, Dalian Central Hospital, Dalian 116033, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Coronary Vasospasm; Interleukin 1; Serotonin; Histamine

[ABSTRACT] Aim To study development coronary artery Atherosclerosis and coronary artery spasm model in Chinese mini-swine mediated by inflammatory factor. Methods Chinese mini-swine were randomly divided into three groups. For establishing coronary artery atherosclerosis and coronary artery spasm model, chest operation was done by isolation of left-anterior descending branch and circumflex branch proximate. Coronary artery membranna externa in swine was packed by paper towel absorbing saline agarose particle suspension in control group. Coronary artery membranna externa in swine was packed by paper towel absorbing IL- 1β (2.5 μg) agarose particle suspension in model 1 group. Coronary artery membranna externa was packed by paper towel absorbing IL- 1β (6.0 μg) agarose particle suspension in model 2 group. After 2 weeks the state of coronary artery spasm was induced by injecting 5-serotonin (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and histamine (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) into coronary artery via conduct. Lumens narrow was observed by coronary arteriography. Results Lumens narrow and CAS in model 1 group were observed. Positive rate of coronary artery lumens narrow was 20~30%, positive rate of CAS was 82%. CAS in model 2 group was not observed. The pathological examination showed that the macrophage accumulation could be found at different degrees in both groups. Conclusions 5-Hydroxytryptamine and histamine can induce CAS, Atherosclerosis and lumens narrow produce in coronary artery membranna externa packed by IL- 1β .

冠心病主要病理基础是冠状动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 和冠状动脉痉挛 (coronary artery

spasm, CAS)。CAS 是急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 的基本病因。构建理想的动物模型对于探讨 CAS 的发病机理及开发新的防治方法具有十分重要的意义。本研究采用炎症因子 IL- 1β 包裹冠状动脉外膜介导小型猪发生冠状动脉发生粥样硬化病变, 并以 5 羟色胺和组胺诱发冠状动脉痉挛, 旨在诱导构建一种病理机制与人类 CAS 发病过程类似, 能直接在体观察 CAS 的动物模型。

[收稿日期] 2006-12-14 [修回日期] 2007-03-30

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2005CB523310)

[作者简介] 关启刚, 博士, 讲师, 研究方向为冠心病防治与介入治疗研究, 联系电话为 024-81225021, E-mail 为 gg74725@sina.com。程颖, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病防治研究, 联系电话为 024-83282691, E-mail 为 chengying0511@sina.com。通讯作者曾定尹, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病与动脉粥样硬化防治研究, 联系电话为 024-83282602, E-mail 为 zenghetao@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物

小型家猪, 雄性, 体重 20~30 kg, 月龄 2~3 个月, 共 24 头, 由中国医科大学实验动物部提供, 单圈饲养。

1.2 白细胞介素 1β 悬液的制备

200 mg 琼脂糖微粒(真径为 45~165 μm 晶美生物公司)加入 10 mL(浓度为 1 mol/L) 盐酸溶液中, 1 200 r/min, 5 min, 离心 4 次。琼脂糖微粒重悬于生理盐水溶液中, 加入细胞因子 IL- 1β 200 μg , 悬液置于室温 1 h, 4℃过夜。再次离心, 1 200 r/min, 5 min, 弃上清, 微粒重悬于 Tris/HCL 缓冲液 1 h, 然后用生理盐水洗脱。最后微粒重悬于生理盐水溶液中, 浓度为 50 mg/L。

1.3 动物模型制作及分组

将小型家猪分圈饲养一周后, 随机分成 3 组, 对照组、模型 1 组和模型 2 组, 每组 8 头。肌注安定(1.0 mg/kg)和盐酸氯氨酮(1.5 mg/kg), 然后耳缘静脉注射苯巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉。气管插管, 呼吸机辅助呼吸。在无菌条件下, 进行左侧开胸手术。开胸器撑开肋骨, 剪开心包, 选择左前降支及回旋支近端管腔外径近似的两处血管节段(长度为 1.0~1.5 cm)进行仔细分离。模型 1 组, 在血管外膜包裹吸附含 IL- 1β 2.5 μg (0.05 mL) 琼脂糖微粒悬液的纸巾; 模型 2 组, 血管外膜包裹吸附含 IL- 1β 6.0 μg (0.12 mL) 琼脂糖微粒悬液的纸巾; 对照组, 只在血管外膜单纯包裹吸附含生理盐水琼脂糖微粒的纸巾(0.05 mL, 无 IL- 1β)。然后缝合关胸, 待动物恢复自主呼吸后, 拔掉气管插管。术后给予青霉素肌注, 单圈饲养。

1.4 冠状动脉造影及诱发冠状动脉痉挛实验

手术后 2 周用上述同样方法麻醉动物, 选择左颈动脉, 在肝素化(10 ku/头)后, 经颈动脉插入 6 F 鞘管, 然后在 X 光下插入 6 F Judkin's 导管至冠状动脉开口处, 经导管冠状动脉内给予硝酸甘油(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 取左前斜位(左前斜 30°+ 头位 20°), 注入造影剂进行冠状动脉造影, 观察局部冠状动脉粥样硬化及狭窄情况, 然后经造影导管注入 5 羟色胺(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 诱发冠状动脉痉挛, 2 min 后用电影血管造影系统连续观察记录造影图像, 采集图像结束后经导管冠状动脉内给与硝酸甘油(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 观察冠状动脉痉挛缓解。5 min 后冠状动脉内再次给予 5 羟色胺(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)诱发痉挛, 以同样方法记录图像及缓解冠状动脉痉挛。10 min 后用组胺再次进行诱发冠状

动脉痉挛实验。冠状动脉内分别给予组胺(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)诱发冠状动脉痉挛并记录造影结果。全部冠状动脉造影资料采用 CRS-PC 系统, 按照标准方法学定量分析病变长度, 管腔狭窄百分比及管腔狭窄面积。

1.5 标本采集与病理检查

造影结束后用致死剂量苯巴比妥(1.5~2.0 g)处死动物, 放血摘除心脏。截取包裹纸巾的冠状动脉节段, 置于 4% 多聚甲醛中固定(用于光镜检测)。依常规方法制作病理标本, 并进行 HE 染色, 观察血管形态学变化, 并采用计算机图像分析系统分别测出管腔面积(CA)、内弹力板包绕面积(IEL)、外弹力板包绕面积(EEL); 再计算出新生内膜面积(NIA) = IEL - CA。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 11.5 软件进行分析处理, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较计数资料采用 t 检验, 多组资料比较计量资料采用单因素方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠状动脉造影诱发痉挛情况

开胸手术后 2 周, 冠状动脉造影结果显示模型 1 组, 6 头小型家猪前降支及回旋支包裹 IL- 1β 的血管段 20%~30% 狭窄, 5 羟色胺和组胺(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)诱发冠状动脉痉挛阳性; 1 头前降支和回旋支狭窄 80%~90%, 未能诱发出痉挛; 1 头前降支狭窄 20%~30%, 回旋支无狭窄, 诱发前降支痉挛阳性, 回旋支痉挛阴性; 模型 2 组, 前降支和回旋支 50%~70% 狭窄, 5 羟色胺和组胺(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)未能诱发出痉挛; 对照组, 7 头前降支和回旋支包裹生理盐水的血管段均未见狭窄, 5 羟色胺和组胺诱发痉挛阴性; 1 头前降支狭窄 10%~20%, 回旋支无狭窄, 5 羟色胺和组胺(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)诱发痉挛均阳性。模型 1 组, 13(82%) 包裹 IL- 1β 的血管段 20%~30% 狭窄, 5 羟色胺和组胺诱发冠状动脉痉挛阳性; 3(18%) 血管段诱发痉挛阴性。对照组, 2(12.5%) 血管段诱发痉挛阳性, 14(87.5%) 血管段诱发痉挛阴性。模型 1 组诱发痉挛阳性率与对照组比较差异具有显著性($P < 0.05$)。模型 2 组, 包裹 IL- 1β 的血管段 50%~70% 狭窄, 5 羟色胺和组胺均未能诱发出痉挛(表 1、2 和图 1)。

表 1. 各组冠状动脉痉挛情况

组 别	血管段	阳性	阴性
模型 1 组	16	13(82%) ^a	3(18%)
模型 2 组	16	0(0%) ^a	16(100%)
对照组	16	2(12.5%) ^a	14(87.5%)

^a 为 $P < 0.05$, 与模型 1 组比较。

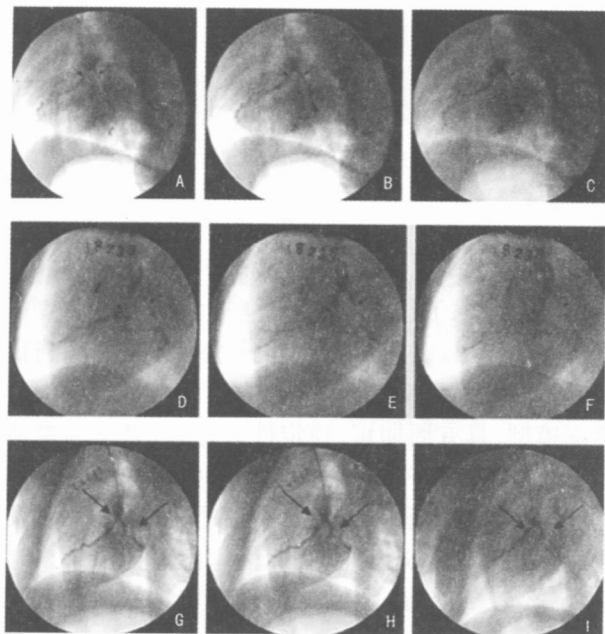


图 1. 对照组与模型 1、2 组诱发冠状动脉痉挛前后造影结果

A 为对照组诱发痉挛前造影, 前降支和回旋支均无狭窄; B、C 为对照组诱发冠状动脉痉挛后造影, 5 羟色胺、组胺诱发冠状动脉痉挛均为阴性; D 为模型 1 组诱发冠状动脉痉挛前造影, 前降支 20% 狭窄, 回旋支 30% 狭窄; E、F 为模型 1 组诱发痉挛后造影, 5 羟色胺、组胺诱发痉挛均为阳性; G 为模型 2 组诱发痉挛前造影, 前降支、回旋支 80% 狭窄; H、I 为模型 2 组诱发冠状动脉痉挛后造影, 5 羟色胺、组胺诱发痉挛均为阴性(箭头指示为包裹纸中血管段)。

表 2. 药物诱发痉挛前、后冠状动脉造影测量结果比较

药物	浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	管腔狭窄程度	
		模型 1 组($n=13$)	模型 2 组($n=16$)
硝酸甘油 (诱发痉挛前)	10	20.12% \pm 7.34%	65.21% \pm 12.08%
5 羟色胺	3	60.23% \pm 8.76% ^a	67.43% \pm 8.24%
	10	66.87% \pm 4.94% ^a	68.36% \pm 5.92%
组胺	3	50.34% \pm 6.38% ^a	66.47% \pm 6.76%
	10	52.54% \pm 4.78% ^a	67.12% \pm 3.37%

^a 为 $P < 0.05$, 与冠状动脉内给予硝酸甘油相比, n 为血管段, 模型 1 组 3 个血管段因诱发痉挛阴性未列入统计内。

2.2 病理学结果

模型 1 组冠状动脉内膜轻度增殖, 管腔 20% ~ 30% 狭窄, 炎性细胞聚集和平滑肌细胞内膜下迁移;

模型 2 组可见内膜显著增殖, 管腔 50% ~ 70% 狭窄, 较多炎性细胞浸润和平滑肌细胞内膜下迁移; 对照组内膜无增殖, 管腔无狭窄。血管形态学测量结果, 3 组经方差分析, 差异有显著性, 再经两两比较的 t 检验, 模型 1 组、2 组的 CA、NIA 与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$; 表 3 和图 2)。

表 3. 血管形态学测量结果比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, mm^2)

组 别	CA	IEL	EEL	NIA
模型 1 组	1.65 \pm 0.40 ^a	2.38 \pm 0.68	3.46 \pm 0.52	0.73 \pm 0.15 ^a
模型 2 组	0.81 \pm 0.16 ^a	2.65 \pm 0.81	3.67 \pm 0.72	1.82 \pm 0.37 ^a
对照组	2.24 \pm 0.58	2.44 \pm 0.56	3.58 \pm 0.62	0

^a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

3.1 炎症因子与冠状动脉粥样硬化病变和冠状动脉痉挛

动脉粥样硬化是一种炎症性疾病, 是内皮细胞损伤炎症反应的结果^[1]。早期研究发现, 外膜包裹性损伤参与冠状动脉痉挛的发病, 不稳定型心绞痛病人可见冠状动脉外膜炎性细胞浸润, 变异型心绞痛病人痉挛血管段炎症细胞浸润^[2]。长期吸毒人群尸检发现, 外膜炎性细胞聚集促进了动脉粥样硬化性改变及增强血管痉挛反应性^[3]。细胞因子介导的炎症反应之间的不平衡所激发的内源性的抗炎或促炎反应是急性冠状动脉综合征结局的主要决定因素。 $\text{IL-1}\beta$ 是动脉粥样斑块中重要的炎症因子, 可损伤内皮功能, 削弱内皮对舒血管物质的反应^[4], 直接抑制内皮细胞释放舒血管物质, 是介导机体外非特异性炎症反应和血管痉挛的关键细胞因子^[5]。本实验采用的 $\text{IL-1}\beta$ 对小型猪心血管系统具有广泛的生物学效应。

白细胞介素 1β ($\text{IL-1}\beta$) 构建冠状动脉粥样硬化病变模型也有采用经导管在冠状动脉内膜转染 $\text{IL-1}\beta$ 基因^[6], 或应用 osmotic 泵冠状动脉内注入 $\text{IL-1}\beta$ 等方法^[7]。本实验采用冠状动脉外膜包裹 $\text{IL-1}\beta$, 结果可见 $\text{IL-1}\beta$ 包裹的血管外膜可引起不同程度的冠状动脉粥样硬化病变, 5 羟色胺和组胺均可诱发 CAS, 推测其机制可能是 $\text{IL-1}\beta$ 增强了局部冠状动脉炎症, 提高了冠状动脉痉挛的反应性, 并增加了 Rho 激酶的表达及提高了肌球蛋白轻链激酶的肌球蛋白结合亚基磷酸化水平而发生的^[8]。

3.2 药物种类、剂量与冠状动脉粥样硬化病变和冠状动脉痉挛的关系

本实验采用白介素 1β 包裹血管外膜, 6.0 μg 比



图 2. 各组手术处理血管段病理学改变 (HE × 4) A 为对照组, B 为模型组, C 为模型 2 组。

2.5 μg 包裹的血管段狭窄程度较重, 可见管腔狭窄程度与 $\text{IL-1}\beta$ 用量具有明显的量效关系。诱发 CAS 常用的药物有 5 羟色胺、组胺、乙酰胆碱、内皮素、垂体后叶素和前列腺素 2α 等药物。5 羟色胺和组胺可与血管内皮相应的受体结合, 从而介导动脉收缩。本实验结果显示, 不同浓度的 5 羟色胺和组胺均可诱发轻度狭窄 (20% ~ 30%) 的血管段发生 CAS, 而 5 羟色胺诱发冠状动脉痉挛程度略强于组胺。冠状动脉内给予 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 5 羟色胺和组胺诱发痉挛程度大于 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但两组剂量间诱发痉挛的程度无统计学差异, 与报道相一致^[3]。研究发现, CAS 易发生于有粥样硬化的冠状动脉, 偶发生于正常的冠状动脉, 它的任何一个分支或多个分支均可能发生痉挛^[9]。本研究还发现, 冠状动脉痉挛的发生与冠状动脉狭窄程度密切相关。轻度的冠状动脉狭窄易发生痉挛, 而中重度的狭窄不易发生痉挛, 推测可能是因为轻度狭窄时冠状动脉多呈半月型或偏心性病变, 其对侧管壁尚具有收缩能力, 而严重的粥样硬化性狭窄病变多为同心圆病灶, 管壁平滑肌均萎缩, 斑块僵硬为不可逆性, 故不易发生痉挛。

3.3 白细胞介素 1β 介导冠状动脉粥样硬化病变与药物诱发冠状动脉痉挛模型评价

研究报道: 冠状动脉粥样硬化病变与药物诱发冠状动脉痉挛模型采用气囊拉伤血管内膜然后给予高脂饮食喂养方法, 使冠状动脉内膜发生粥样硬化性改变, 并以 5 羟色胺诱发痉挛^[10]。此方法周期长, 同时损伤了冠状动脉内膜, 使冠状动脉内皮舒张功能失调, 而且不能体现出炎症因素参与冠状动脉痉挛发生中的作用。也有采用经导管在冠状动脉内膜转染 $\text{IL-1}\beta$ 基因, 或应用 osmotic 泵, 长期冠状动脉内注入 $\text{IL-1}\beta$ 的方法。前者会导致明显的内膜和中

膜平滑肌的破坏, 而后者则需要注入大量的 $\text{IL-1}\beta$, 结果使之损伤了心肌及引起全身的生物学效应^[67]。本实验采用 $\text{IL-1}\beta$ 包裹冠状动脉外膜然后应用药物诱发冠状动脉痉挛的方法, 所构建成功的冠状动脉痉挛模型, 具有周期短、稳定性较好、成功率较高的特点, 是一种较好可行的冠状动脉痉挛模型的构建方法。特别对于研究炎症因子在冠状动脉痉挛的发生机制有重要意义。同时小型猪病理生理特点和冠状动脉解剖结构接近人类, 诱发冠状动脉痉挛情况比较符合临床冠状动脉痉挛的特点。其实验结果具有重要的理论及实践意义。

[参考文献]

- [1] Reiss AB, Glass AD. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects [J]. *J Invest med*, 2006, **54** (3): 123-131.
- [2] Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami K, Nakaike R, Sakata M, et al. Chronic treatment with interleukin 1β induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97** (3): 769-776.
- [3] Kolodgie FD, Virmani R, Cornhill JF, Herderick EE, Smialek J. Increase in atherosclerosis and adventitial mast cells in cocaine abusers: an alternative mechanism of cocaine-associated coronary vasospasm and thrombosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1991, **17** (7): 1553-560.
- [4] Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium dependent dilatation in human Veins in vivo [J]. *Circulation*, 1997, **96** (9): 3042-047.
- [5] Robinson LJ, Busconi L, Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Biol chem*, 1995, **270** (3): 995-998.
- [6] Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall [J]. *Science*, 1990, **249** (4974): 1285-288.
- [7] Nimmo WS, Todd JG. Fentanyl by constant rate iv infusion for postoperative analgesia [J]. *Br J Anaesth*, 1985, **57** (3): 250-254.
- [8] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-Kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, **25** (9): 1767-775.
- [9] Kawano H, Ogawa H. Endothelial function and coronary spastic angina [J]. *Intern Med*, 2005, **44** (2): 91-99.
- [10] Shimokawa H, Tomoike H, Nabeyama S. Coronary artery spasm induced in atherosclerotic miniature swine [J]. *Science*, 1983, **221** (4610): 560-562.

(此文编辑 李玲玲)