

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0294-03

超生理剂量维生素 D3致小鼠动脉硬化及机制

康海仙, 吴铁, 崔燎

(广东医学院药理教研室, 广东省湛江市 524023)

[关键词] 维生素 D3 动脉硬化; 血管平滑肌细胞; 软骨细胞; 超生理剂量

[摘要] 目的 探讨超生理剂量维生素 D3致小鼠动脉硬化及其机制。方法 SPF级 KM 小鼠 40只, 随机分为对照组、超生理剂量维生素 D3组和常量维生素 D3组。超生理剂量维生素 D3组给予小鼠 40万 u/(kg·d)维生素 D3灌胃诱导小鼠动脉硬化, 连续给药 3次, 观察 42 d 取血管标本制作主动脉病理切片, Von kossa染色计算钙化面积百分比, 离子型发射光谱仪检测血管钙、磷含量。结果 超生理剂量维生素 D3组小鼠主动脉中膜严重钙化, 动脉中膜平滑肌细胞表型改变为类软骨细胞, 血管钙化面积百分比显著高于对照组 ($P < 0.01$), 血管钙、磷含量较对照组均升高 ($P < 0.05$)。结论 超生理剂量维生素 D3可致小鼠动脉硬化, 机制与其诱导血管平滑肌细胞发生类软骨样细胞改变, 同时导致大量钙、磷在血管内沉积有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Large Dose of Vitamin D3 Inducing Arteriosclerosis in Mouse

KANG Haixian, WU Tie, and CUI Liao

(Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

[KEY WORDS] Vitamin D3, Mouse, Arteriosclerosis, Vascular Smooth Muscle Cell, Chondrocyte, Large Dose

[ABSTRACT] **Aim** To study arteriosclerosis induced by large dose of vitamin D3 (V_iD₃) and its mechanism in mouse. **Methods** Forty Kunming mouse were randomly divided into three groups including control group, model group and normal V_iD₃ group with sixteen in the former two groups in which male and female were eight equally and eight in the last group. Then mouse in model group were given forty units of V_iD₃ for three days and observed for forty-two days. Sections were made for aortic arch and stained by hematoxylin and eosin, thoracic aorta were stained by Von kossa and the percentage of calcificational areas was counted, the content of Ca and P was measured by ICP. **Results** The media of aorta was seriously calcified in V_iD₃ model group compared with control group, phenotype of smooth muscle cell in media of aorta have changed to another phenotype which was suspected for chondrocyte, percentage of calcificational areas in model group was remarkably higher than in control group ($P < 0.01$). The content of Ca and P for abdominal aorta was higher in model group than in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Large dose of V_iD₃ could lead to the serious calcification located in media of aorta in mouse, and the vascular smooth muscle cell converted to analogical chondrocyte. The mechanism was connected to that large dose of V_iD₃ which induces the conversion of vascular smooth muscle cell to analogical chondrocyte and simultaneously leads to the massive deposition of Ca and P in blood vessel.

血管钙化一直被认为是与年老和动脉粥样硬化有关的被动过程, 未被重视^[1]。近年研究表明它是一种主动可调的过程并可引起严重的临床后果, 可极大地增加心血管病的病死率, 是很多疾病的病理生理基础^[2], 但确切机制仍不清楚。研究发现超生理剂量维生素 D3能诱导大鼠血管钙化^[3], 但能否用维生素 D3诱导小鼠动脉硬化还未报道, 本实验给予小鼠超生理剂量的维生素 D3诱导钙化, 试图建立小鼠动脉硬化模型, 为阐明超生理剂量维生素

D3致动脉硬化机制和临床防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及给药

SPF级 KM 小鼠 40只 (来自广东医学院实验动物中心), 适应性饲养 1周后随机分为对照组、超生理剂量维生素 D3组 (每组 16只, 雌雄各 8只) 和常量维生素 D3组 ($n=8$)。分组后超生理剂量维生素 D3组第 1、2、3天给予小鼠维生素 D3 (江苏吴中实业股份有限公司苏州第六制药厂, 批号: 070601) 40万 U/(kg·d) 灌胃给药, 同时对照组给予等量蒸馏水灌胃, 常量维生素 D3实验第 1天给予 7.68万 U (按成人最大正常治疗量换算) 维生素 D3 灌胃, 第

[收稿日期] 2009-01-04 [修回日期] 2009-03-12

[作者简介] 康海仙, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 kang_haixian@163.com。通讯作者吴铁, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为皮肤药理和骨质疏松药理, E-mail 为 WUTie2@163.com。

2.3 天给予等量蒸馏水灌胃, 2 周 (14 天) 后即第 15 天再次给予常量维生素 D 37.68 万 U 维生素 D3 灌胃, 每 3 天称一次体重。实验共 6 周, 到期后处死小鼠, 取主动脉弓、胸主动脉、腹主动脉分别作病理切片及钙化面积百分比和血管钙、磷含量检测等。

1.2 取材及指标检测

6 周后, 眼球取血处死小鼠, 剪开胸腔将心脏和血管 (从主动脉弓到肾髂总动脉) 一并取出, 以腹主动脉左肾分支处为标志沿主动脉弓方向剪 1 cm 血管, 剥离干净后称湿重, 烘干后称干重, 浓盐酸消化后用 ICP 离子性发射光谱仪 (IRIS/AP 型, 美国 JJA 公司产品) 检测血管钙含量。依次向主动脉弓方向再剪 1 cm 长血管, 沿纵轴剪开后行 Von kossa 染色, 4 倍镜下拍片, 每个标本选择 3 个视野, Image-ProPlus 6.0 病理图像分析软件计算各组小鼠钙化斑面积百分比。剩余血管同心脏一起投入 10% 中性甲醛固定, 将主动脉弓和降主动脉分别经固定、包埋、切片后, 行 HE 染色在光镜下观察病理改变。

1.3 统计学处理

采用 Excel 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析处理数据。

2 结果

2.1 主动脉弓肉眼观察和血管切片 HE 染色镜下观察

对照组小鼠主动脉弓肉眼观察见血管外壁光滑, 呈淡粉色半透明状, 柔软而富有弹性, 触之无沙粒感, 管壁厚度均匀。HE 切片高倍镜下观察内皮细胞完整、突向管腔排布, 平滑肌细胞呈梭形, 管壁无钙质沉积, 各层膜结构紧密完整 (图 1A)。常量维生素 D3 组小鼠主动脉弓肉眼观和高倍镜下所见同对照组 (图 1B)。超生理剂量维生素 D3 组小鼠主动脉弓肉眼观察见主动脉整体增粗, 管腔增大, 血管外壁有颗粒或团块状灰白色突起呈弥漫性分布, 整个主动脉呈白色不透明状, 管壁僵硬拉之易断, 触之有沙粒感, 主动脉管壁厚薄不均, 有时可观察到内膜上有突起凸向管腔。高倍镜下内皮细胞仍然完整、凸向管腔, 但细胞核增大、深染, 有时在管腔可见脱落的内皮细胞; 弹性纤维数量减少, 变平变直, 其间原有的梭形平滑肌细胞转化为圆形, 核大深染变圆, 占整个细胞大小的一半以上; 细胞质 (也可能是细胞外基质) 在 HE 染色时不易着色而显白色, 有时转化后的细胞间相互融合, 细胞核融合成长椭圆形, 被融合的白色细胞质所包围 (图 1C); 病变进一步发展

可见大量钙质沉积于中膜弹性纤维, 平滑肌细胞消失而弹性纤维间距扩大 (图 1D)。

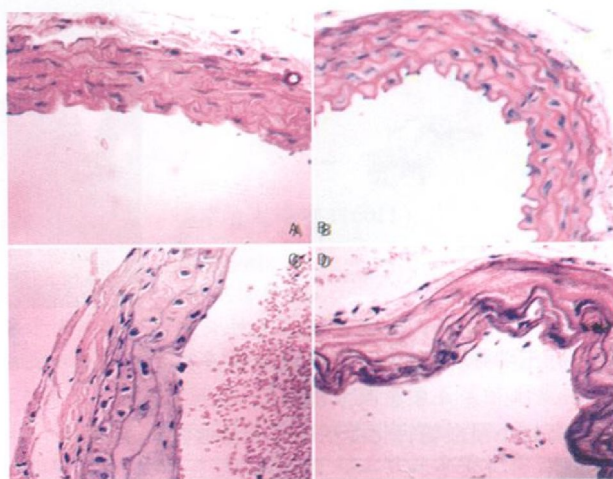


图 1 血管切片 HE 染色镜下观察 (40×)

2.2 胸主动脉大体 Von kossa 染色观察

肉眼可观察到对照组小鼠胸主动脉内壁光滑平坦、富有弹性; 常量维生素 D3 组小鼠胸主动脉肉眼观同对照组; 而超生理剂量维生素 D3 组小鼠内壁有弥漫性散在的颗粒状和团块状灰白色突起, 触之有沙粒感。将各组小鼠胸主动脉大体标本投入 5% 的 $AgNO_3$ 溶液, 5 min 后取出, 可观察到对照组小鼠胸主动脉颜色无变化, 常量维生素 D3 组小鼠胸主动脉有少量针状黄色斑点, 而超生理剂量维生素 D3 组小鼠胸主动脉内壁整体呈黄色; 将各组标本暴露在强日光下 5 min, 可见对照组小鼠胸主动脉整个过程无颜色变化, 常量维生素 D3 组小鼠胸主动脉的少量针状黄色斑点转变为黑色针状, 而超生理剂量维生素 D3 组小鼠胸主动脉整体从黄色迅速转变成深黑色, 管壁变硬。在 4 倍镜下拍片后观察, 对照组小鼠胸主动脉经 Von kossa 染色显示整体为灰白色, 偶有褐色散布, 常量维生素 D3 组小鼠胸主动脉整体颜色较对照组稍深显示为浅褐色, 超生理剂量维生素 D3 组小鼠胸主动脉经 Von kossa 染色后整体变黑, 偶有灰白色散布 (图 2)。

2.3 血管钙化面积百分比及血管钙、磷含量

4 倍镜下拍片后用 Image-ProPlus 6.0 病理图像分析软件计算各组小鼠胸主动脉钙化面积, 超生理剂量维生素 D3 组小鼠胸主动脉钙化严重, 其钙化面积有的可达 80% 左右, 与对照组小鼠比较其钙化面积百分比明显升高 ($P < 0.01$); 腹主动脉血管钙、磷含量均显著升高 ($P < 0.05$)。常量维生素 D3 组与对照组小鼠相比, 胸主动脉钙化面积百分比和腹

主动脉钙含量差异均无显著性, 但血管磷含量降低 ($P < 0.05$, 表 1)。



图 2 胸主动脉 Von kossa 染色镜下观 (4×) 左为对照组, 中为超生理剂量维生素 D3 组, 右为常量维生素 D3 组。

表 1 各组小鼠血管钙化面积百分比及血管钙、磷含量

组别	钙化面积	血管钙含量 (mg/g)	血管磷含量 (μg/g)
对照组	1.81% ± 0.58%	10.4 ± 5.1	26.3 ± 13.4
常量维生素 D3 组	1.74% ± 0.35%	10.9 ± 4.7	16.4 ± 9.9 ^a
超生理剂量维生素 D3 组	60.2% ± 16.2% ^b	28.4 ± 21.0 ^a	84.6 ± 62.1 ^a

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

本研究结果表明, 超生理剂量维生素 D3 可致小鼠动脉出现弥漫性的中膜钙化, 弹性纤维断裂, 动脉僵硬失去弹性, 说明超生理剂量的维生素 D3 可致小鼠主动脉出现严重钙化, 这种钙化具有下述特征: (1) 弥漫性, 整条主动脉血管壁均出现钙化, 但钙化程度和形式有所不同; (2) 钙化的部位为动脉中膜, 很少累及内外膜; (3) 钙化的早期看到中膜平滑肌细胞表型改变, 并形成类软骨细胞, 钙化的动脉其钙、磷含量均升高, 钙化可能以羟磷灰石结晶的形式存在; (4) 内膜无脂质沉积、钙化等预示动脉粥样硬化病变存在。因此推测其钙化的病变发展过程可能是先诱导血管平滑肌细胞转化为软骨细胞, 接着转化的成骨样细胞分泌细胞外基质刺激羟磷灰石结晶的形成, 最后导致整个动脉中膜钙质的大量沉积, 致密结构被破坏, 使动脉失去弹性而导致动脉硬化。

本研究观察到超生理剂量维生素 D3 组小鼠动脉硬化同临床上慢性肾功能衰竭患者、糖尿病患者出现的血管钙化类型相似, 都为大量的钙质沉积于血管中膜, 内外膜无明显病变, 与有无动脉粥样硬化无关。但在这些患者中, 出现血管中膜钙化的同时往往伴随着左心室心肌肥厚、收缩期高血压等表现, 因而心血管病的患病率和死亡率较一般人群大幅升高^[4-5]。本实验观察到单纯使用超生理剂量维生素 D3 可诱导小鼠出现动脉钙化, 由于慢性肾功能衰竭

患者常患有尿毒症、钙磷代谢失衡、甲状旁腺功能亢进等, 临床经常使用维生素 D 类似物治疗肾性骨营养不良症, 是否会加重临床血管钙化的发展进程, 值得进一步探讨。

4 小结

正常治疗剂量维生素 D3 不会造成小鼠动脉钙化, 临床只要不滥用便可避免其毒副作用。超过正常剂量 5 倍的维生素 D3 能诱导小鼠主动脉中膜出现弥漫性钙化, 血管钙含量明显升高, 平滑肌细胞呈软骨样改变, 弹性纤维因有大量钙质沉积而断裂, 动脉僵硬、顺应性降低等典型的动脉硬化病理学改变。这种钙化的病变发展过程可能是先诱导血管平滑肌细胞转化为软骨细胞, 接着转化的成骨样细胞分泌细胞外基质刺激羟磷灰石结晶的形成, 最后导致整个动脉中膜钙质的大量沉积, 致密结构被破坏, 使动脉失去弹性而引发动脉硬化。

【参考文献】

- [1] Davies MR, Huska KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease [J]. *Kidney Int* 2001; **60** (2): 472-479
- [2] Raffi Merjanian, Matthew Bufoff, Sharon Adler et al. Coronary artery, aortic wall and valvular calcification in nondialyzed individuals with type 2 diabetes and renal disease [J]. *Kidney Int* 2003; **64**: 263-271
- [3] Grases F, Sanchez P, Perello J et al. Effect of crystallization inhibitors on vascular calcification induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats [J]. *Circ J* 2007; **71** (7): 1152-1156
- [4] Rodriguez Garcia M, Gomez Alonso C, Naves Diaz M, et al. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24** (1): 239-246
- [5] Block GA, Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management [J]. *Am J Kidney Dis* 2000; **35** (6): 1226-237

(此文编辑 许雪梅)