

[文章编号] 1007-3949(2009)17-07-0515-04

• 实验研究 •

沙利度胺抑制异常剪切应力诱导的动脉粥样硬化形成

符晖¹, 杨琼², 阳辉¹, 汤石林¹, 刘录山²

(南华大学 1 附属第一医院重症医学科, 2 心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 剪切应力; 动脉粥样硬化; 新西兰兔; 颈总动脉; 沙利度胺

[摘要] 目的 研究沙利度胺对异常剪切应力诱导的兔颈总动脉粥样硬化病变形成的作用。方法 新西兰兔分为 3 组, 每组 13 只: 正常饮食组、高脂组 (给予 2% 高胆固醇饮食) 和高脂加药组 (2% 高胆固醇饮食 + 20 mg/kg 沙利度胺)。39 只新西兰兔均予以右颈总动脉硅胶管套环, 套环长度为 8 mm, 内径为 1.4 mm。9 周后处死动物, 0 周和第 9 周收集血清测量总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白及甘油三酯等血脂指标水平。2 个月后宰杀动物, 取整条颈总动脉行苏丹Ⅲ染色检测病变面积, HE 染色检测病变的病变程度。结果 0 周和 9 周时三组动物体重差异没有显著性, 一般体征无明显变化, 表明动物对沙利度胺有很好耐受性。高脂组和高脂加药组总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白及甘油三酯血清水平较对照组明显升高, 高脂组和高脂加药组血脂指标间差异无显著性。颈总动脉苏丹Ⅲ染色结果发现, 高脂组远心段和近心段有明显的红染区域示动脉粥样硬化病变形成, 且近心段动脉粥样硬化病变更加明显, 狭窄段基本上没有动脉粥样硬化病变形成; 高脂加药组主要在近心段有少量动脉粥样硬化病变存在; 正常饮食组整条颈总动脉都无可见动脉粥样硬化病变。HE 染色发现, 高脂组近心段有明显的动脉粥样硬化病变存在, 管腔明显狭窄, 动脉粥样硬化病变中有大量的脂质蓄积和细胞浸润; 高脂组套环段管壁明显变薄, 无明显动脉粥样硬化病变存在; 高脂组远心段动脉粥样硬化病变程度较近心段轻。高脂加药组仅在近心段有内膜增生病变存在。正常饮食组内膜无明显改变。结论 剪切应力改变可以导致不同程度动脉粥样硬化病变的形成; 沙利度胺对异常剪切应力诱导的兔颈总动脉粥样硬化病变的形成有抑制作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Thalidomide Inhibits the Atherosclerotic Lesions Induced by Abnormal Shear Stress

FU Hu¹, YANG Qiong², YANG Hu¹, TANG ShiLin¹, and LIU Lu-Shan²

(1. the First Hospital Affiliated to University of South China; Institute of Cardiovascular Disease Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Shear Stress; Atherosclerosis; New Zealand Rabbits; Carotid Artery; Thalidomide

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of thalidomide on the atherosclerotic lesions induced by abnormal shear stress in the carotid arteries of New Zealand Rabbits. **Methods** After assembled silastic collars (length 8 mm, inner diameter 1.4 mm) around the right carotid arteries of all the New Zealand White rabbits, they were randomly divided into three groups: control group (chow diet, $n=13$), high-fat group (with 2% cholesterol, $n=13$) and high-fat added with thalidomide (20 mg/kg) group. The rabbits were fed for 9 weeks. Serum was collected at the first week and the end week. Plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), and low density lipoprotein (LDL) were determined by commercially enzymatic methods. The atherosclerotic lesions in carotid arteries were determined by using SudanⅢ staining and HE staining. **Results** There was no obvious difference in body weight between three groups before and after experiment. Plasma TG, TC, LDL and HDL concentrations were markedly increased in high-fat group and high-fat added with thalidomide group compared with Control ($P<0.05$). Compared with high-fat group, the content of TC, LDL, HDL and TG in high-fat added with thalidomide group had not statistical difference. Plaques were identified to exist in the upstream from the cast obviously more than downstream from the cast in sizes in high-fat group with SudanⅢ staining. The atherosclerotic lesions in high-fat added with thalidomide group existed in the upstream mainly, and the sizes were less than that in high-fat group. Compared with no atherosclerotic lesion in the cast, there were lipid accumulation and cells infiltration in atherosclerotic lesions in high-fat group with HE staining, which extended to the lumen. The atherosclerotic lesions in the downstream existed with neointima formation. The main lesion in high-fat added with thalidomide group was neointima formation in the upstream, and no obvious lesion in downstream and the cast. There were no lesions the carotid arteries in the control group. **Conclusion** Abnormal shear stress may induce the atherosclerotic lesion formation in the carotid arteries in New Zealand Rabbits, and which could be inhibited by thalidomide.

[收稿日期] 2009-02-12

[修回日期] 2009-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (30700325) 和动脉硬化化学湖南省高校科技创新团队经费资助

[作者简介] 符晖, 主治医师, 研究方向为心血管危急重症的临床防治与基础研究, E-mail 为 feifufeifei@sina.com.cn. 杨琼, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治。通讯作者刘录山, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治, E-mail 为 liuls2000@163.com.

动脉粥样硬化性疾病发病机制复杂且严重危害人类健康。单纯的脂质浸润学说、损伤反应学说、免疫炎症学说^[1]等都不能解释一个现象:动脉粥样硬化(As)病变的局部好发性。但一个共同的事实是As病变好发的局部都存在血流动力学的异常。血流剪切应力异常是促进As病变形成的重要原因。但局部血流动力学变化是如何影响血管壁功能的确切机制尚未阐明,也就是说剪切应力变化与As局部好发性的关系并未完全阐明。本研究拟通过建立颈总动脉套环的狭窄模型,研究血流动力学参数改变对As病变形成的影响。已有研究表明,沙利度胺对高脂饮食诱导的主动脉As病变的形成有明显的抑制作用,其机制可能是通过抑制炎症反应而发挥作用^[2-3]。异常剪切应力可导致血管壁炎症反应的发生,本研究初步探讨沙利度胺是否对异常剪切应力诱导的As病变形成有抑制作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

购自南华大学动物部的39只新西兰兔,月龄3~4月,雌雄相当,分为3组,每组13只:正常饮食组(喂饲普通饲料)、高脂组(在普通饲料基础上加喂2%胆固醇)和高脂加药组[2%高胆固醇饮食+20 mg/(kg·d)沙利度胺(按人与动物体表面积给药剂量换算)]。高脂加药组饲料分周做好,动物分栏喂养9周,每日投食两次,日粮为体重的1.5%。39只新西兰兔于右颈总动脉中段给予纵轴剪开的硅胶管套环(圆筒形硅胶管长度为8 mm,内径为1.4 mm),手术线固定套环。

1.2 血脂分析

0周和第9周时,分别抽取兔耳缘外静脉血,静置4~5 h,高速离心机800 g离心10 min,取上层血清送至本院检验科检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)水平。

1.3 苏丹Ⅲ染色

每组三只动物,分离左右两条颈总动脉,且将其近心段和远心段做好标记,放入配好的1×PBS缓冲液中。剥离血管外肌肉和筋膜组织,将血管剪开,放入70%酒精中浸泡2 min,再入苏丹Ⅲ40 min,80%酒精20 min,自来水冲洗1 h,数码拍照。

1.4 制作石蜡切片

每组三只动物,取右颈总动脉将其分为三段:套环段、远心段和近心段,远心段和近心段距离套环部

位约0.5 cm,取左颈总动脉相应长度的对应部位作为对照,1×PBS缓冲液漂洗3次,用10%中性福尔马林固定24 h以上,流水冲洗过夜,梯度酒精脱水,透明,石蜡包埋。

1.5 HE染色

石蜡连续切片(5 μm),切片60℃烘干15 min,二甲苯iv 5 min,二甲苯⊖ 5 min,95%酒精5 min,85%酒精5 min,水洗数秒,苏木素6 min,自来水冲洗6 min,1%盐酸酒精分化溶液分化3 s,流水冲洗蓝化20 min,伊红染色2 min,85%酒精5 s,95%酒精5 s,无水酒精iv 2 min,无水酒精⊖ 2 min,二甲苯透明iv 2 min,二甲苯透明⊖ 2 min,树胶封片。

1.6 统计学方法

Pixera Camera图像分析系统采集图像;数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS11.0统计软件进行统计学处理,两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般体征变化

实验开始时各组动物体重差异无显著性,到第9周实验结束时,对照组体重较高脂组和高脂加药组略有增加(图1),但差异无显著性,其原因在于高脂饲料对新西兰兔的适口性不如普通饮食。高脂加药组与高脂组比较体重差异无显著性。各组动物一般体征如毛发的光洁度、活动状况都没有明显差异。

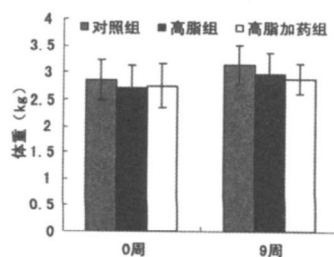


图1 实验前后各组体重比较($n = 13$ kg)

2.2 血脂水平变化

三组动物实验前TC、LDL、HDL和TG等血脂指标之间比较差异无显著性($P > 0.05$,图2)。实验结束时,高脂组和高脂加药组TC、LDL、HDL和TG血清水平较对照组明显升高($P < 0.05$),但高脂组和高脂加药组之间各项血脂指标差异无显著性($P > 0.05$,图3)。

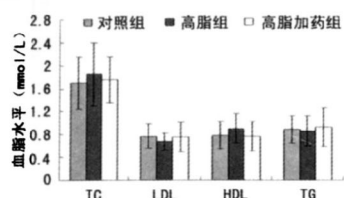
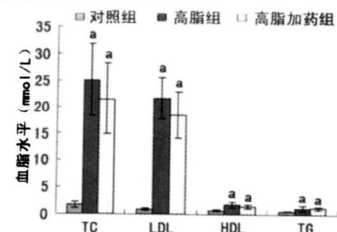


图2. 实验前血脂水平比较

图3. 实验9周血脂水平比较 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 颈总动脉粥样硬化病变比较

苏丹Ⅲ染色发现, 对照组套环处动脉狭窄, 近心段、远心段、套环段、未套环段都未见明显病变。高脂组套环处动脉狭窄, 近心段和远心段均有明显的As病变形成, 而且近心段相对于远心段的病变严重, 套环段未见明显As病变。高脂加药组各节段病变均较高脂组轻, 在近心段可见病变, 而在远心段和套环段基本上无可见As病变(图4)。

HE染色发现, 对照组各节段血管壁结构完整, 血管壁内膜保持完整, 无粥样病变形成, 右侧近心段有轻度内膜增生。高脂组远心段和近心段内膜明显增生, 内皮结构不完整, As病变中可见大量泡沫细胞, 内中膜界限不清楚, 且远心段和近心段有不同程度病变, 其中以近心段病变更明显, 病变突起于血管腔, 且几乎堵塞整个管腔。高脂加药组各节段病变均较高脂组轻, 主要是在近心段血管内膜可见增生, 脂质沉积不明显, 其它节段无明显改变(图5-7)。

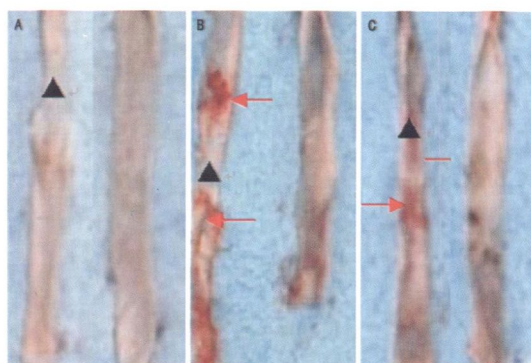


图4 苏丹Ⅲ染色 ▲所指为右颈总动脉套环狭窄段, 红色箭头所指为As病变, 未有▲指示血管为左颈动脉。A为正常饮食组, B为高脂组, C为高脂加药组。

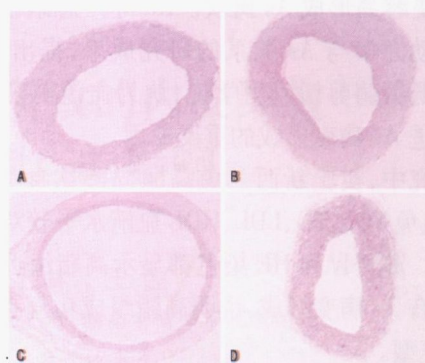


图5. 正常饮食组颈动脉 HE 染色 ($\times 10$) A 为左侧未套环段, B 为右侧近心段, C 为右侧套环段, D 为右侧远心段。

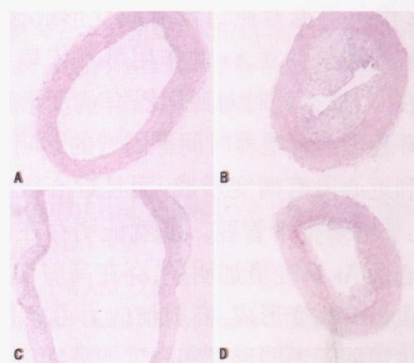


图6. 高脂组颈动脉 HE 染色 ($\times 10$) A 为左侧未套环段, B 为右侧近心段, C 为右侧套环段, D 为右侧远心段。

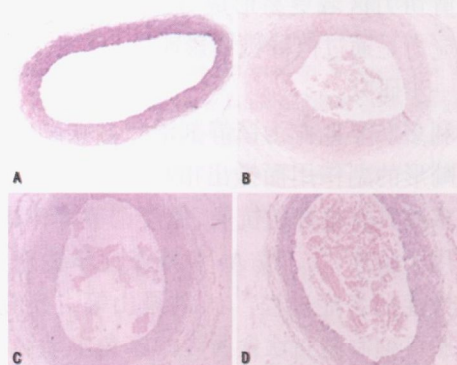


图7. 高脂加药组颈动脉 HE 染色 ($\times 10$) A 为左侧未套环段, B 为右侧近心段, C 为右侧套环段, D 为右侧远心段。

3 讨论

As是一多因素参与、多基因异常调控的长期的综合性病理过程, 临床及人体尸检研究表明, As好发于人体动脉系统的某些局部部位, 如腹主动脉、颈动脉、冠状动脉和外周动脉, 也即动脉血管的分叉处、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^[4]。与血管几何形状改变相一致的是这些部位血流动力学也发生了明显改变。传统学说并不能完全解释为何血流动力学发生较大改变

的血管壁更容易形成As斑块。Ku等^[5]总结了大量有关血流动力学与As关系的研究成果,提出了As发病学的低振荡剪切应力学说,认为血流剪切应力异常是促进As病变形成的主要原因。

本研究中,实验新西兰兔高胆固醇饮食喂养9周,高脂组兔TC、TG、LDL、HDL血清水平较对照组明显升高。苏丹Ⅲ和HE染色都显示高脂组远心段和近心段有As病变形形成,说明高脂组成功复制了颈动脉As模型。

研究报道,相对于同组未套环段来说,套环段为高剪切应力区,近心段为相对低剪切应力区域,远心段有紊乱或震荡剪切应力的产生^[6-8]。本研究中,苏丹Ⅲ和HE染色可见对照组没有病变形形成,但有研究报道血流动力学引发As的作用可不依赖于高脂血症的存在^[9],那么此时对照组没有病变形形成可能是由于套环程度或者喂养时间等因素的影响。高脂组远心段和近心段有病变形形成,而且近心段病变更明显,几乎堵塞整个管腔。那就证明存在低剪切应力的近心段As病变更明显,存在高剪切应力区域的套环段没有病变形形成,高剪切应力可能是抗As的因素。也说明了不同形式和程度的剪切应力的改变对病变有不同程度的影响。学术界虽然存在着低剪切应力学说和高剪切应力学说,目前大多数学者认为低剪切力区域更易形成As病变^[6-10-11]。那么低剪切应力是通过何种机制影响As的发生发展还有待进一步研究。

沙利多胺早期作为镇静剂治疗妊娠晨吐,由于致胎儿畸形的副作用而撤出市场^[12]。但是近来发现沙利多胺具有很好的抗炎、免疫调节等作用而重新被应用于临床^[13]。按As免疫炎症学说观点,As是一个慢性的炎症过程^[14]。刘录山等^[2]研究发现沙利多胺可抑制高脂饮食诱导的家兔主动脉As发生,其机制可能就是通过抑制TNF- α 等炎症因子的表达。本研究首先通过兔右颈总动脉套环方法建立了异常剪切应力模型,然后在高脂饮食条件下给予沙利多胺进行预防性治疗。研究结果表明沙利多胺能明显抑制异常剪切应力诱导的As病变的形成。通过血脂指标检测表明,沙利多胺对血脂并没有明显影响,因此排除了沙利多胺通过降脂影响As病变形成的机制。考虑到套环对血管壁的损伤有可能导

致炎症反应的发生,因此在本研究中沙利多胺抑制异常剪切应力诱导的As病变形形成有可能是通过其抗炎作用。此外有报道^[15],沙利多胺对血管内皮生长因子下调Caveolin-1的表达有阻断作用,即沙利多胺有可能上调Caveolin-1表达,而Caveolin-1作为细胞膜上与细胞内外脂质转运和信号转导密切相关的重要分子,可能在介导沙利多胺抑制异常剪切应力诱导的颈总动脉As病变形形成中起重要作用。

[参考文献]

- [1] 杨永宗(主编). 动脉粥样硬化性心血管病的基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004 48-61.
- [2] 刘录山, 潘利红, 杨琼, 等. 沙利度胺对高脂饮食兔动脉粥样硬化病变形成的抑制作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009 17(1): 4-8.
- [3] Chew M, Zhou J, Daugherty A, et al. Thalidomide inhibits early atherogenesis in apoE-deficient mice [J]. *APMIS Suppl* 2003 (109): 113-116.
- [4] Millan DE. Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques [J]. *Stroke* 1985 16(4): 582-587.
- [5] Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, et al. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress [J]. *Arteriosclerosis* 1985 5(3): 293-302.
- [6] Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress [J]. *Circulation* 2006 113(23): 2744-2753.
- [7] Cheng C, van Haperen R, deWaal M, 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.
- [8] Cheng C, de Crom R, van Haperen R, et al. The role of shear stress in atherosclerosis: action through gene expression and inflammation [J]. *Cell Biochem Biophys* 2004 41(2): 279-294.
- [9] 金海燕, 冬华, 彭旷, 等. 动脉粥样硬化发生中高脂血症与动脉狭窄的作用比较 [J]. *Chin J Arterioscler* 2006 14(12): 1020-024.
- [10] Caro CG. Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 29(2): 158-161.
- [11] Ridger V, Krams R, Campi A, et al. Hemodynamic parameters regulating vascular inflammation and atherosclerosis: a brief update [J]. *Biomol Pharmacol* 2008 62(8): 536-540.
- [12] Jokit J, Vaananen I. Thalidomide and embryopathies: Report of 2 cases [J]. *Duodecim*, 1962 78: 822-827.
- [13] Ye Q, Chen B, Tong Z, et al. Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF- α release from alveolar macrophages in interstitial lung disease [J]. *Eur Respir J* 2006 28(4): 824-831.
- [14] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005 13(3): 249-253.
- [15] Liu J, Razani B, Tang S, et al. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells: Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1 [J]. *J Biol Chem* 1999 274(22): 15781-785.

(此文编辑 文玉珊)