

肥大细胞脱颗粒对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块稳定性的影响

唐雅玲¹, 黄 韬², 王 双³, 许增祥¹, 叶 旭¹, 孙玉慧¹, 杨永宗¹

(南华大学 1. 心血管病研究所, 3 病理生理学教研室 动脉硬化湖南省重点实验室;

2 中国人民解放军 95871 部队, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 肥大细胞; 斑块稳定性; 血管新生; 斑块内出血; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] 目的 探讨肥大细胞脱颗粒对颈总动脉套环的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块稳定性的影响。方法 40 只雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠予以高脂高胆固醇饲料喂养, 行右颈总动脉套环术, 术后 4 周, 随机分为实验组和对照组, 实验组小鼠腹腔注射肥大细胞脱颗粒剂——化合物 48/80 (0.5 mg/kg), 对照组小鼠腹腔注射相同体积的溶媒 D-Hank's 隔日一次, 共 4 次。第 4 次注射后 30 min 安乐死, 取材。比色法测定血清类胰蛋白酶活性; 甲苯胺蓝染色检测肥大细胞脱颗粒; 苏木素-伊红染色观察颈总动脉病理改变及斑块内出血; (II) 因子相关抗原免疫组织化学染色检测斑块内新生血管密度; 血管内皮钙粘蛋白、白细胞介素 1 β 免疫组织化学染色检测其在斑块内的表达量。结果 实验组套环侧颈总动脉内膜下斑块内泡沫细胞、细胞外脂质及炎性细胞较对照组明显增多; 实验组肥大细胞脱颗粒、血清类胰蛋白酶活性、斑块内新生血管密度、斑块内出血、斑块内白细胞介素 1 β 及血管内皮钙粘蛋白的表达量比对照组显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 肥大细胞脱颗粒增加斑块内泡沫细胞、细胞外脂质及炎性细胞, 并促进斑块内血管新生、斑块内出血及白细胞介素 1 β 和血管内皮钙粘蛋白的表达, 从而使斑块稳定性削弱。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Mast Cell Degranulation on Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-Knock Out Mice

TANG Ya-Ling¹, HUANG Tao², WANG Shuang³, XU Zeng-Xiang¹, YE Xu¹, SUN Yu-Hui¹, and YANG Yong-Zong¹
(1. Institute of Cardiovascular Disease, 3 Department of Pathophysiology, University of South China & Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China. 2 Chinese People's Liberation Army No. 95871, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Mast Cells; Plaque Stabilization; Angiogenesis; Intraplaque Hemorrhage; Apolipoprotein E-Knock Out Mice

[ABSTRACT] **Aim** To approach the effects of mast cell degranulation on plaque stabilization in apolipoprotein E-knock out (ApoE^{-/-}) mice with perivascular common carotid collar placement. **Methods** 40 male ApoE^{-/-} mice were fed a western-type diet and operated with perivascular right common carotid collar placement. 4 weeks after surgery, mice were divided into 2 groups and treated for 7 days as follows ($n = 20$): experimental mice were intraperitoneally injected with mast cell degranulator Compound 48/80 (0.5 mg/kg); control mice were intraperitoneally injected with an equal volume of dissolvent (D-Hank's). Thirty minutes after the 4th injection, animals were sacrificed to obtain blood and carotid. Serum was collected to quantify the activity of tryptase by colorimetric assay. Sections were routinely stained with hematoxylin and eosin. Corresponding sections on separate slides were stained with toluidine blue to detect mast cell degranulation and immunohistochemically with antibodies against a von Willebrand factor (vWF), interleukin-1 β (IL-1 β) and VE-cadherin. **Results** There were more foam cells, pericellular lipids and inflammatory cells in plaque in com-

[收稿日期] 2010-04-21

[基金项目] 湖南省教育厅项目资助 (10C1132)

[作者简介] 唐雅玲, 硕士, 实验师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治。黄韬, 硕士, 医师, 研究方向为心血管疾病诊断。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发病机制及其防治, Email 为 yzyanghy@163.com。

mon carotids with collar placement of experimental group. The percentage of degranulated mast cells ($P < 0.01$), the activity of tryptase in serum ($P < 0.05$), the density of neovessel in plaque ($P < 0.05$), intraplaque hemorrhage ($P < 0.05$), the expressions of IL-1 β ($P < 0.05$) and VE-cadherin ($P < 0.05$) in plaque were significantly increased in experimental group than in control group. **Conclusions** Mast cell degranulation increases foam cells, pericellular lipids and inflammatory cells in plaque and promotes angiogenesis in plaque, intraplaque hemorrhage, the expressions of IL-1 β and VE-cadherin in plaque, accordingly weakens plaque stabilization.

肥大细胞具有广泛的生物学功能, 主要特征为胞浆内含有大量异染性颗粒, 并且在受到刺激时脱颗粒, 释放一系列可溶性介质到细胞外, 从而发挥其生物学作用。已有研究表明肥大细胞与动脉粥样硬化斑块的发生发展密切相关^[1,2]。动脉粥样硬化斑块的生物学特性是决定其稳定性的主要因素。斑块脂核体积增大、炎细胞浸润、斑块内血管新生及斑块内出血均能削弱其稳定性。Lappalainen等^[3]报道人冠状动脉粥样硬化斑块内血管新生与肥大细胞密切相关。本课题组通过细胞实验多方面探讨了肥大细胞促进动脉粥样硬化发生发展的机制, 本研究采用肥大细胞脱颗粒剂——化合物 48/80 作用于颈总动脉套环的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠, 以在动物实验水平探讨肥大细胞脱颗粒对斑块稳定性的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠由北京大学医学部实验动物中心提供; 化合物 48/80、甲苯胺蓝和苏木素-伊红为 Sigma 公司产品; 兔抗小鼠 CD 因子相关抗原 (vWF) 一抗和生物素标记山羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司; 兔抗小鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β) 一抗、兔抗小鼠血管内皮钙粘蛋白 (VE-cadherin) 一抗、兔 IgG 即用型 SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 动物模型及实验分组

40 只 10 周龄雄性载脂蛋白基因敲除 (apoE^{-/-}) 小鼠予以高脂高胆固醇饲料喂养直至实验结束, 12 周龄时行右颈总动脉套环术。apoE^{-/-} 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg), 待小鼠麻醉后, 固定, 75% 酒精棉球消毒颈部皮肤, 除毛, 用手术剪沿颈部正中从甲状软骨与胸骨之间剪开皮肤, 纵向钝性分离颈部肌群, 暴露气管, 找到气管两侧的颈总动脉鞘, 用玻璃分针细心剥离鞘膜, 分离左、右颈总动脉, 分离长度约 2 cm, 在右颈总动脉下穿三根浸润生理盐水的 0 号线备用, 将已准备好的硅胶管套在右颈总动脉上, 并用三根备用的 0 号线

结扎硅胶管的上、中、下端, 导致管腔狭窄, 术毕, 缝合颈部皮肤, 放置鼠笼中^[4]。术后 4 周, 随机分为实验组和对照组, 每组 20 只, 实验组小鼠腹腔注射化合物 48/80 (0.5 mg/kg), 对照组小鼠腹腔注射相同体积的溶媒 (D-Hank's)。隔日一次, 共 4 次。第 4 次注射后 30 min 采血, 安乐死处死小鼠, 收集血管标本。

1.3 类胰蛋白酶活性检测

比色法检测血清中类胰蛋白酶活性。将 40 μ L 待测样本加入到 1.5 mL Tris-HCl 缓冲液中, 震荡混匀后, 加入 40 μ L BAPNA 二甲基亚砷溶液, 3 $^{\circ}$ C 水浴, 20 min 后, 30% 乙酸终止反应, 立即用紫外分光光度计取 410 nm 波长测定吸光值, 利用公式 [酶活性 (u/L) = $\Delta A \times 10^6 \times V / (\Delta t \times v \times \epsilon \times L)$], ΔA 为吸光值的差值, V 为反应总体积, v 为待测样本体积, ϵ 为摩尔吸光系数, L 为光程] 计算类胰蛋白酶活性。

1.4 肥大细胞脱颗粒检测

颈总动脉石蜡连续切片, 0.5% 甲苯胺蓝酒精溶液染色 1~2 min, 蒸馏水速洗, 0.01% 伊红水溶液染色 30 s~1 min, 95% 酒精分色 1~2 min, 100% 酒精脱水 3 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片。通过观察肥大细胞胞浆脱颗粒, 脱颗粒的肥大细胞数与肥大细胞总数的比值为脱颗粒的肥大细胞百分率。

1.5 颈总动脉形态学观察

颈总动脉石蜡连续切片, 苏木素-伊红染色, 光学显微镜下观察其病理改变, 图像分析系统收集图像并在显微镜下拍照。

1.6 免疫组织化学检测

套环侧颈总动脉斑块石蜡切片常规脱蜡至水, 经过灭活内源性过氧化物酶、热修复抗原、BSA 封闭后, 滴加 1:50 稀释的兔抗小鼠 vWF、IL-1 β 和 VE-cadherin, 37 $^{\circ}$ C 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}$ C 20 min, 滴加 SABC, 37 $^{\circ}$ C 20 min, DAB 显色; 苏木素复染 5 min, 1% 盐酸水溶液分化数秒钟; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜观察。每只小鼠随机选取 2 张 vWF 免疫组织化学染色切片, 40 倍物镜下计算斑块内新生血管数, 该数值与其斑块面积的比值为斑块内新生血管

密度;每只小鼠随机选取 2 张 IL-1 β 和 VE-cadherin 免疫组织化学染色切片,在 40 倍物镜下测定目标积分光密度。

1.7 斑块内出血检测

套环侧颈总动脉石蜡连续切片,苏木素-伊红染色,光学显微镜下观察斑块内出血情况。凡斑块内出现红细胞,而该红细胞又不在血管腔内判断为斑块内出血。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验或 Fisher 精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 类胰蛋白酶活性分析

对照组小鼠血清类胰蛋白酶活性为 0.36 ± 0.10 u/L,实验组小鼠血清类胰蛋白酶活性为 0.57 ± 0.13 u/L,两者差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 颈总动脉外膜肥大细胞脱颗粒情况

对照组和实验组套环侧颈总动脉外膜脱颗粒的肥大细胞百分率分别为 $13.5\% \pm 4.1\%$ 和 $80.6\% \pm 17.8\%$,两者差异具有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 颈总动脉形态学改变

光镜下,实验组套环侧颈总动脉整个内膜增厚,管腔变小,斑块内泡沫细胞、细胞外脂质及淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞等炎性细胞明显增多(图 1)。

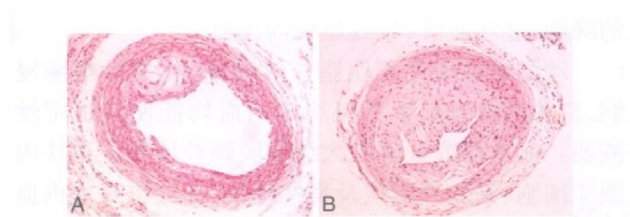


图 1 颈总动脉形态学改变 ($\times 5$) A 为对照组, B 为实验组。

Figure 1. Morphological changes in carotid artery

2.4 免疫组织化学检测情况

对照组套环侧颈总动脉斑块内新生血管密度为 366 ± 97 个/ mm^2 ,实验组套环侧颈总动脉斑块内新生血管密度为 859 ± 278 个/ mm^2 ,两者差异具有显著性 ($P < 0.05$, 图 2)。对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 IL-1 β 、VE-cadherin 积分光密度分别为 189 ± 57 和 834 ± 213 , 96 ± 29 和 327 ± 98 ,

两者差异具有显著性 ($P < 0.05$, 图 2)。

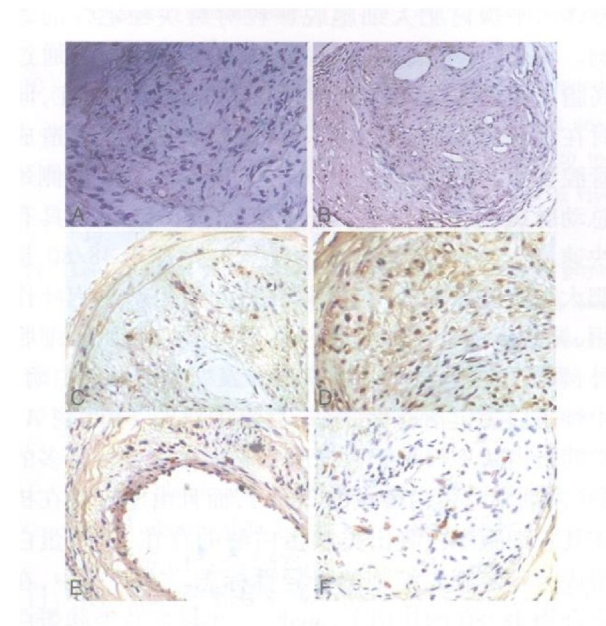


图 2 免疫组织化学检测 ($\times 10$) A 和 B 分别为对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 WFA 免疫组织化学染色, C 和 D 分别为对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 IL-1 β 免疫组织化学染色, E 和 F 分别为对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内 VE-cadherin 免疫组织化学染色。

Figure 2. Immunohistochemistry Detection

2.5 斑块内出血情况

光镜下,对照组和实验组套环侧颈总动脉斑块内出血例数分别为 2 例和 8 例,经 Fisher 精确概率检验法检验,两组差异具有显著性 ($P < 0.05$, 图 3)。

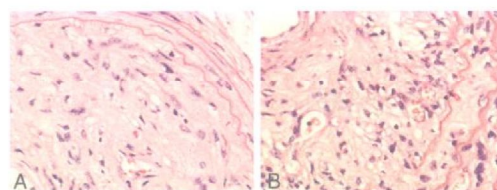


图 3 斑块内出血检测 ($\times 20$) A 为对照组, B 为实验组。

Figure 3. Detection of intraplaque hemorrhage

3 讨论

肥大细胞通过其分泌的细胞因子级联反应介入机体的多种生理、病理和免疫反应^[5]。近年来的研究表明肥大细胞脱颗粒释放的多种介质促进了动脉粥样硬化斑块的发展^[6]。本课题组通过细胞学实验探讨肥大细胞参与动脉粥样硬化形成的部分机

制^[7],本研究采用 apoE^{-/-}小鼠作为动物模型,以在整体水平探讨肥大细胞脱颗粒对斑块稳定性的影响。apoE^{-/-}小鼠是动脉粥样硬化易感动物,通过高脂高胆固醇饲料喂养出现高脂高胆固醇血症,同时在其颈总动脉套上 0.3 mm 内径的硅胶管,造成管腔狭窄,导致血流动力学改变,从而促进套环侧颈总动脉斑块快速形成^[8]。该模型被一致认为具有快速、定点诱导斑块形成的优点。化合物 48/80 是肥大细胞脱颗粒剂,它能刺激肥大细胞产生胞吐作用,释放胞浆分泌颗粒及一系列可溶性介质到细胞外,颗粒的主要成分是肝素蛋白聚糖和中性蛋白酶。中性蛋白酶包括胃促胰酶、类胰蛋白酶、羧肽酶 A。类胰蛋白酶不仅是肥大细胞分泌颗粒中含量最多的酶(占细胞总蛋白含量的 20%),而且由于未能在机体其它细胞中检测出类胰蛋白酶的存在,类胰蛋白酶成为鉴定肥大细胞的特异性标志。本研究中,在化合物 48/80 的作用下,apoE^{-/-}小鼠血清类胰蛋白酶活性升高,表明用腹腔注射化合物 48/80 促进肥大细胞脱颗粒的方法是可行的。

本研究发现,肥大细胞脱颗粒使斑块内泡沫细胞、细胞外脂质明显增多,其机制主要是肥大细胞激活后释放的颗粒能部分水解载脂蛋白 A_{IV}、载脂蛋白 A_{II}和载脂蛋白 E 等,这些与高密度脂蛋白相关的载脂蛋白能够诱导胆固醇流出,因此,细胞外肥大细胞依赖式的蛋白水解作用能产生功能失调的高密度脂蛋白,从而在体内胆固醇逆转运起始发挥抑制作用^[9-11]。肥大细胞颗粒残余物也能结合低密度脂蛋白,通过清道夫受体介导的吞噬作用进入平滑肌细胞内,导致平滑肌细胞源性泡沫细胞形成。

本研究中,肥大细胞脱颗粒使套环侧颈总动脉斑块内 VE-cadherin 和 IL-1 β 的表达量明显增加。VE-cadherin 是血管内皮细胞特异表达的钙离子依赖性黏附分子,介导内皮细胞之间的连接。选用 VE-cadherin 作为检测指标之一是源于它在血管形成中发挥着重要的作用:在体内,来源于 VE-cadherin^{-/-}的胚胎干细胞的内皮细胞不能形成血管样结构;同样,在体内注入阻断 VE-cadherin 的单克隆抗体能限制内皮细胞形成试管样结构。本研究发现,实验组斑块内 VE-cadherin 的表达量高于对照组,与斑块内新生血管密度增加的结果相一致,也与 Sigala 等^[12]观察到的人冠状动脉斑块内 VE-cadherin 表达增加相一致。IL-1 β 具有多种重要的生物学效应,可激活单核/巨噬细胞、淋巴细胞,使其产生多种细胞因子和生长因子如血小板源性生长因子,从而促进血管平滑肌细胞和血管内皮细胞增殖。由此可

见,肥大细胞脱颗粒增加斑块内 IL-1 β 的分泌,并通过其产生的级联反应,促进斑块内血管新生。

肥大细胞本身也能分泌多种细胞因子和生长因子促进斑块内血管新生^[13]。如 Lappalainen 等发现,人冠状动脉粥样硬化性斑块处,血管内膜和外膜的肥大细胞胞浆颗粒有碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达。bFGF 对内皮细胞有趋化性,直接刺激内皮细胞释放基底膜降解酶,并刺激内皮细胞的迁移和增殖,形成新血管。肥大细胞脱颗粒释放的类胰蛋白酶,也能切断纤维蛋白原,激活胶原酶和基质金属蛋白酶前体,达到降解组织基质的目的^[14],从而为血管新生提供空间,诱导内皮细胞形成管腔样结构。

斑块内新生血管为炎性细胞进入斑块提供了通道,而斑块内炎性细胞分泌的多种细胞因子和生长因子又可促进血管新生,二者形成恶性循环,促使动脉粥样硬化性病变逐渐加重。斑块内新生血管还有一个重要后果就是导致斑块内出血。斑块内新生血管是仅由简单的内皮细胞围成的管道,周围没有支撑的结缔组织,没有基底膜,由于管壁发育不完善,这些血管脆性大,在局部众多因子的作用下容易破裂出血。斑块内出血使斑块体积迅速增加,而且作为血管生成刺激物使滋养血管继续延伸扩大,形成又一个恶性循环。实验组斑块内出血的例数明显高于对照组,除实验组新生血管密度较高之外,还与肥大细胞脱颗粒分泌的胃促胰酶和类胰蛋白酶直接相关,两者分别通过活化基质金属蛋白酶(MMP)的酶原形式 pro-MMP-3 和 pro-MMP-1 来触发细胞外基质的降解,破坏血管,导致斑块内出血。

动脉粥样硬化斑块脂核体积增大、炎性细胞浸润、斑块内血管新生及斑块内出血均能使其稳定性减弱。而本研究证实肥大细胞脱颗粒增加了斑块内泡沫细胞、细胞外脂质及炎性细胞,并促进斑块内血管新生、斑块内出血,从而使斑块稳定性削弱,导致一系列临床事件的发生。因此,应用肥大细胞稳定剂将为临床预防与治疗动脉粥样硬化提供新的手段。

[参考文献]

- [1] Emo MP, Lehtonen-Smeds M, Mäkelä M, Ayrampaa J, et al. Carotid plaque mast cells associate with atherogenic serum lipids: high grade carotid stenosis and symptomatic carotid artery disease [J]. Cerebrovasc Dis. 2005; 19(5): 291-301.
- [2] Zhdanov VS, Drobkova IP, Chumachenko PV. Inflammato-

- ry cell reaction and mast cells in aortic intima and pulmonary artery of humans at early stages of atherosclerosis [J]. *Arch Pathol* 2006; 68(2): 19-23
- [3] Lappalainen H, Laine P, Pentikainen MO, et al. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor: a potent angiogenic mediator [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(10): 1880-885
- [4] Von der Thüsen Jan H, Van Berkel Theo JC, Biessen Erik AL. 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): 1164-170
- [5] Peter Libby, Guo-Ping Shi. Mast cells as mediators and modulators of atherogenesis [J]. *Circulation* 2007; 115(19): 2471-473
- [6] Kovanen PT. Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis [J]. *Immunol Rev* 2007; 217: 105-122
- [7] 甘露, 刘录山, 万载阳, 等. 肥大细胞对平滑肌源性泡沫细胞 iv 型胶原和 α 型胶原表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; 12(5): 541-544
- [8] 唐雅玲, 王双, 杨永宗, 等. Compound 48/80 对载脂蛋白 E 基因敲除小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
- [9] Heikkilä HM, Trosien J, Mäntö J, et al. Mast cells promote atherosclerosis by inducing both an atherogenic lipid profile and vascular inflammation [J]. *J Cell Biochem* 2010; 109(3): 615-623
- [10] Judström I, Jukkola H, Mäntö J, et al. Mast cell-dependent proteolytic modification of HDL particles during anaphylactic shock in the mouse reduces their ability to induce cholesterol efflux from macrophage foam cells ex vivo [J]. *Atherosclerosis* 2010; 208(1): 148-154
- [11] Lee-Rueckert M, Kovanen PT. Mast cell proteases: physiological tools to study functional significance of high density lipoproteins in the initiation of reverse cholesterol transport [J]. *Atherosclerosis* 2006; 189(1): 8-18
- [12] Sigala F, Vourliotakis G, Georgopoulos S, et al. Vascular endothelial cadherin expression in human carotid atherosclerotic plaque and its relationship with plaque morphology and clinical data [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 26(5): 523-528
- [13] Hirumatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis [J]. *Microsc Res Tech* 2003; 60(1): 64-69
- [14] Kovanen PT. Mast cells and degradation of pericellular and extracellular matrices: potential contributions to erosion, rupture and intraplaque haemorrhage of atherosclerotic plaques [J]. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(5): 857-861

(此文编辑 文玉珊)

• 读者 • 作者 • 编者 •

作者声明

《中国动脉硬化杂志》2011年第 19卷第 4期所发表的《不稳定型心绞痛患者 CD4⁺ T 淋巴细胞 mRNA 的差异表达》一文中李浪教授为通讯作者,特此声明。

中国动脉硬化杂志编辑部