

达肝素对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 肾动脉粥样硬化病变的影响

苏琳¹, 康丽萍¹, 宝辉¹, 李卫¹, 闫征², 陈定宝³, 王颖³, 李荣³, 苗懿德¹

(北京大学人民医院 1. 老年科, 2. 中心实验室, 3. 病理科, 北京市 100044)

[关键词] 动脉粥样硬化; 肾动脉; 达肝素; 植物血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 血管内皮生长因子

[摘要] 目的 在动脉粥样硬化模型鼠中, 观察达肝素对肾动脉粥样硬化病变进展及对植物血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达影响, 探讨达肝素可能的抗动脉粥样硬化机制。方法 以 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只为对照, 随机分为普通饲料组及高脂饲料组。雄性 6 周龄载脂蛋白 E 基因缺陷 (Apo E^{-/-}) 小鼠 36 只, 均予高脂饲料喂养至 12 周龄, 随机分为模型组、低剂量肝素组 [达肝素钠 100 IU/(kg·d)]、高剂量肝素组 [达肝素钠 200 IU/(kg·d)], 皮下注射连续 4 周 (16 周龄) 后各组随机取 6 只处死。分离肾动脉, 制成石蜡切片行 HE 及免疫组织化学染色, 观察斑块情况及 LOX-1 蛋白的表达。用 RT-PCR 方法, 检测肾动脉 LOX-1 mRNA 及 VEGF mRNA 的表达。用 Western Blot 分析法, 检测肾动脉中 LOX-1 蛋白的表达。剩余小鼠继续原方案喂养 4 周 (20 周龄) 后处死, 肾动脉石蜡切片行 HE 染色, 观察斑块情况。结果 Apo E^{-/-} 模型组在 16 周龄时出现轻度肾动脉粥样硬化。低剂量及高剂量达肝素均抑制肾动脉粥样硬化的形成 ($P < 0.05$)。Apo E^{-/-} 模型组 LOX-1 mRNA、VEGF mRNA 及 LOX-1 蛋白的表达水平较 C57BL/6J 普通饲料组的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。低剂量及高剂量达肝素治疗后, LOX-1 mRNA、VEGF mRNA 及 LOX-1 蛋白的表达水平表达较模型组明显下降 ($P < 0.05$)。结论 达肝素钠可能通过抑制 LOX-1 蛋白及 VEGF 表达的途径, 抑制肾动脉粥样硬化的进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Dalteparin on Renal Artery Atherosclerotic Lesion Formation in ApoE-Deficient Mice

SU Lin¹, KANG Li-Ping¹, BAO Hui¹, LI Wei¹, YAN Zheng², CHEN Ding-Bao³, WANG Ying³, LI Rong³, and MIAO Yi-De¹

(1. Department of Geriatrics; 2. Central Laboratory; 3. The Pathology Department, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Renal Artery; Dalteparin; Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of dalteparin on the renal artery atherosclerotic lesion formation in the apolipoprotein E knockout (Apo E^{-/-}) mice. **Methods** 36 male Apo E^{-/-} mice, 6 weeks, fed with high-fat diet, were randomized into three groups: control group, dalteparin low dose group [100 IU/(kg·d)], dalteparin high dose group [200 IU/(kg·d)]. 24 male C57BL/6J mice, 6 weeks, were randomized into two control groups: normal diet group and high-fat diet group. At 12 weeks Apo E^{-/-} mice were received dalteparin treatment for 4 weeks, then six mice of each group were killed. Light microscopy was adopted to assess the degree of the atherosclerotic plaque of renal artery wall and image analysis was performed with computer. The expressions of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) in aortic wall were studied by immunohistochemistry and Western Blot. The expressions of LOX-1 mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA were studied by RT-PCR. The rest mice were fed with the same diet as before for another 4 weeks, then were killed. Light microscopy was adopted to assess the degree of atherosclerotic plaque of renal artery. **Results**

[收稿日期] 2011-05-06

[基金项目] 北京大学人民医院研究与发展基金资助 ((RDB2007-19))

[作者简介] 苏琳, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的机制, E-mail 为 sussanlin2003@yahoo.com.cn, 联系电话为 010-88326755。康丽萍, 博士, 副主任医师, 研究方向为老年高脂血症。宝辉, 博士, 主治医师, 研究方向为老年高血压。

As compared with the control groups, the extents of atherosclerotic plaque of renal artery were significantly reduced ($P < 0.05$). And the effect were lasted for 4 weeks after the treatment was stopped. Dalteparin reduced the expressions of LOX-1 and VEGF in Apo E^{-/-} mice. **Conclusions** Our results show that dalteparin could inhibit the development of atherosclerotic lesions by decreasing the expressions of LOX-1 and VEGF in renal artery in Apo E^{-/-} mice.

动脉粥样硬化(As)是全身性疾病,肾动脉粥样硬化进展方面的研究较少。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)升高是As的独立危险因素。植物血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)是内皮细胞摄取 ox-LDL 的主要受体,在As的发生发展中起重要作用。低分子肝素有明显的抗凝血因子Xa及抗凝血酶活性,广泛应用于急性冠状动脉综合症的抗凝治疗及介入治疗中,并可显著抑制肾小球基底膜增厚及系膜增生,并明显降低尿蛋白排泄率,但其作用机制目前尚不清楚。本研究在高脂饲养的载脂蛋白E基因缺陷小鼠(apolipoprotein E deficient mice, Apo E^{-/-}小鼠)中,动态观察低分子肝素对肾动脉斑块形成、血管壁LOX-1及VEGF表达的影响,探讨低分子肝素抗凝外可能的抗As作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

C57BL/6J近交系小鼠24只及C57BL/6J品系的Apo E^{-/-}小鼠36只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,均为雄性、6周龄、SPF级(许可证:SYXK(京)2006-0009)。Apo E^{-/-}小鼠体重 18 ± 1 g, C57BL/6J小鼠体重 16 ± 2 g。实验用小鼠饲养环境:SPF级,室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~70%,每日光照12 h,每笼4~5只,自由摄食、饮水。

PCR引物由赛百盛公司提供。TritonX购自鼎国生物技术公司。Trizol试剂盒购自Gibco/BRL公司,Lowry蛋白试剂测定购自BioRad公司,逆转录试剂盒购自Pmmega公司,硝化纤维素膜购自PRO-TRAN, Schleicher和Schuell。ECL Western免疫印迹探测显影试剂购自Amersham。马抗鼠IgG购自Amersham。兔抗LOX-1多克隆抗体IgG购自英国abcam公司(货号:ab31238)。小鼠血压测定采用ALC-NIBP无创血压测量分析系统,仪器由上海奥尔科特生物科技有限公司提供。

1.2 动物分组及实验方法

Apo E^{-/-}小鼠随机分为3组:模型组、低剂量肝

素组、高剂量肝素组,均予高脂饲料喂养。C57BL/6J小鼠随机分为两组:标准饲料组和高脂饲料组。所有动物引进后适应1周开始实验。Apo E^{-/-}小鼠及C57BL/6J小鼠高脂组自7周龄后给予高脂饲料喂养。高脂饲料,即普通标准小鼠饲料+21%脂肪(猪油)+0.15%胆固醇。小鼠饲料均为SPF级,由北京科澳协力饲料有限公司生产(许可证号:SCXK(京)2009-0012)。

喂养至12周龄后给药。法安明(达肝素钠,5000 IU/0.2 mL,抗-Xa),由辉瑞制药有限公司惠赠。达肝素钠原液用生理盐水稀释,每日更换, 4°C 保存。低剂量组予达肝素钠 $100 \text{ IU}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,高剂量组予达肝素钠 $200 \text{ IU}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射(此剂量为临床的常规用量),每日注射,连续4周(16周龄)后各组随机取6只处死。剩余小鼠继续原方案喂养4周(20周龄)后处死。

小鼠用1%戊巴比妥麻醉后剖开胸腔,从左心室用生理盐水逆行灌注主动脉后,剥离肾动脉,去除外膜脂肪组织。一侧肾动脉用10%福尔马林液固定24 h后,乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋切片,行HE染色及免疫组织化学检测。另一侧肾动脉置于液氮中保存,行RT-PCR及Western Blot检测。

1.3 病理形态学观察肾动脉病变

取一侧肾动脉常规固定,石蜡包埋,切片厚度为 $5 \mu\text{m}$ 。每组连续横切20张,制备石蜡切片。每间隔5张取1张行HE染色,其余行免疫组织化学检测。普通光镜观察肾动脉内动脉粥样硬化病变情况。Image J(日本NIH公司产品)图像分析软件进行图像分析处理。

1.4 免疫组织化学检测

石蜡切片常规脱蜡、脱水,于0.3% H_2O_2 的甲醇中孵育15 min,灭活内源性过氧化物酶活性。高压修复抗原,PBS清洗。在含1.5%封闭血清的PBS中孵育1 h,消除非特异性染色。加入兔抗LOX-1多克隆抗体IgG,浓度为1:100, 4°C 过夜。PBS冲洗后,加入1:1稀释的生物素化兔抗羊IgG, 37°C 孵育20 min,滴加1:1稀释的辣根酶标记的III抗工作液, 37°C 孵育20 min,DAB显色。苏木素复染,盐酸分色,脱水,封片。镜下观察,拍照。实验中各组免疫组织化学染色在同一时间进行,阴性对照以PBS替

代 LOX-1 多克隆抗体。棕黄色颗粒为阳性染色。采用图像分析系统测量切片上阳性染色信号的平均光密度值。

1.5 RT-PCR 检测小鼠肾动脉 LOX-1 和 VEGF mRNA 的表达

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 260/280 nm 处吸光值, 在 1.8~2.0 之间, 进行定量分析。用逆转录试剂盒合成 cDNA, cDNA 样本于 94℃ 温育 5 min 灭活逆转录酶, 然后以 PCR 反应放大。PCR 反应用 25 μL 的反应体系。以 GAPDH 作为内参照。LOX-1 上游引物: 5'-TGTCCA-CAAGACTGGCTCTG-3', 下游引物: 5'-TGCACAGTT-GCCTGATGAAT-3'。PCR 产物为 300 bp。LOX-1 的 PCR 条件: 94℃ 预变性 3 min, 随后 35 个循环反应 (每个循环包括 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s), 后 72℃ 延伸 7 min。GAPDH 上游引物: 5'-ACGCATTT-GGTCGTATTGGG-3', 下游引物: 5'-TGATTTTG-GAGGGATCTCGC-3'。PCR 产物为 231 bp。GAPDH 的 PCR 条件: 首先 94℃ 预变性 3 min, 随后 35 个循环反应 (每个循环包括 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s), 随后 72℃ 延伸 7 min。VEGF 上游引物: 5'-CTT-GCTGCTGTACCTCCACCAT-3', 下游引物: 5'-TGTT-GTGCTGTAGGAAGCTCATCT-3'。PCR 产物为 341 bp。VEGF 的 PCR 条件: 首先 94℃ 预变性 3 min, 随后 35 个循环反应 (每个循环包括 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 40 s), 随后 72℃ 延伸 7 min。

扩增循环结束后, PCR 产物经琼脂糖电泳后, 在紫外灯下拍照, 用凝胶分析系统对凝胶电泳条带的表达强度进行分析。计算 LOX-1 与 GAPDH 条带吸光度比值作为其表达强度。

1.6 Western Blot

取小鼠肾动脉, 在冰上剪碎, PBS 液漂洗 2 次, 弃去洗液。以 1:4 比例加入蛋白抽提液, 冰浴反应 30 min。4℃ 8 kr/min 离心 30 min, 收集上清, 即蛋白提取液。蛋白提取液被超声刺激后在 95℃ 加热 5 min。蛋白浓度用 Lowry 蛋白试剂测定。相同蛋白浓度的细胞裂解液 12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行垂直电泳, 随后转移到硝化纤维素膜。室温下, 硝化纤维素膜在阻断缓冲剂 (含 0.1% Tween 20 和 5% 脱脂干奶粉的 PBS) 中阻断 1 h。丽春红染色显出条带后蒸馏水清洗, 将膜放入密封袋中与兔抗 LOX-1 多克隆抗体 IgG (浓度 1:200) 4℃ 过夜孵育。随后硝化纤维素膜用阻断缓冲剂清洗 2 次后, 与马抗鼠 IgG (浓度 1:3000) 室温下孵育 1 h。在含 0.04%

Tween 20 的 PBS 中清洗 3 次后, 用 ECL Western 免疫印迹探测试剂显影。检测的 LOX-1 蛋白条带约 36 kDa。用凝胶图像分析系统对条带密度进行扫描。本步骤重复 3 次。

1.7 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 主要实验数据来源于 3 个重复实验的均数。统计方法采用单因素方差分析, 所用统计工具为 SPSS 11.0 统计软件。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中小鼠均存活。两组 C57BL/6J 小鼠一般情况良好, 无掉毛及咬伤现象。Apo E^{-/-} 小鼠模型组毛发不顺, 不活泼。Apo E^{-/-} 小鼠各组均有掉毛及咬伤现象。高剂量达肝素组掉毛及咬伤现象较模型组轻。整个低分子肝素注射过程中, 均未见皮下出血, 或其他部位的出血。

各组小鼠体重变化经 F 检验, 方差整齐。16 周时 C57BL/6J 普通饲料组体重 27 ± 2 g。C57BL/6J 高脂组小鼠体重 28 ± 3 g, Apo E^{-/-} 小鼠模型组体重 31 ± 2 g, 低剂量肝素组体重 32 ± 3 g。高剂量肝素组体重 32 ± 2 g。Apo E^{-/-} 小鼠体重高于 C57BL/6J 普通饲料组 (P < 0.05)。Apo E^{-/-} 小鼠各组间体重差异无显著性。

16 周时 C57BL/6J 小鼠血压为 115/81 ± 5/3 mmHg。Apo E^{-/-} 小鼠模型组血压为 115/86 ± 2/4 mmHg, 低剂量肝素组血压为 115/84 ± 5/2 mmHg, 高剂量肝素组血压为 115/80 ± 1/4 mmHg。各组血压差异无显著性 (每组取 3 只)。

2.2 达肝素对小鼠肾动脉粥样硬化病变的影响

HE 染色显示普通饲料喂养的 C57BL/6J 小鼠, 血管内膜光滑, 内皮完整, 未见动脉粥样硬化斑块形成。高脂饲料喂养的 C57BL/6J 小鼠, 血管内膜中膜稍增厚, 未见动脉粥样硬化斑块形成。Apo E^{-/-} 小鼠模型组可见轻度动脉粥样硬化斑块, Apo E^{-/-} 小鼠模型组 16 周龄肾动脉内膜增厚、脂质沉积, 纤维斑块形成, 基底膜破坏, 未导致管腔狭窄。低剂量和高剂量达肝素治疗后未见肾动脉粥样斑块 (图 1)。停止肝素治疗 4 周后上述差异仍存在 (图 2)。说明达肝素能抑制肾动脉粥样硬化的形成。

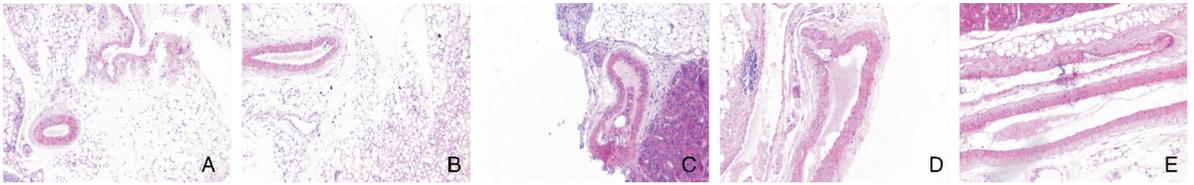


图 1. 16 周小鼠肾动脉粥样硬化病变情况 (HE × 100) A 为 C57BL/6J 小鼠普通饲料组, B 为 C57BL/6J 小鼠高脂饲料组, C 为 Apo E^{-/-} 小鼠模型组, D 为 Apo E^{-/-} 小鼠低剂量肝素组, E 为 Apo E^{-/-} 小鼠高剂量肝素组。

Figure 1. 16 weeks-old mice, renal artery atherosclerotic lesions (HE × 100)

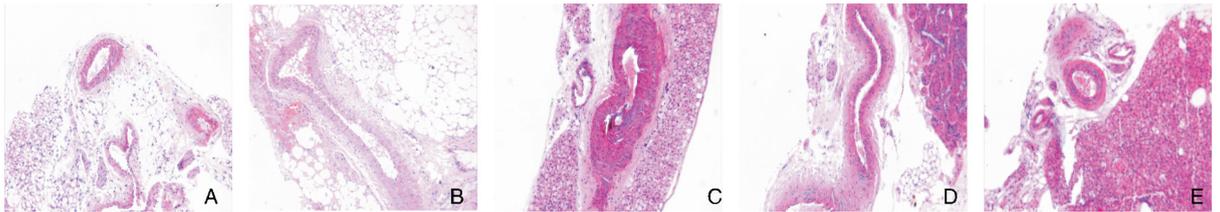


图 2. 20 周 (停止肝素治疗 4 周后) 小鼠肾动脉粥样硬化病变情况 (HE × 100) A 为 C57BL/6J 小鼠普通饲料组, 无动脉硬化; B 为 C57BL/6J 小鼠高脂饲料组, 无动脉硬化; C 为 Apo E^{-/-} 小鼠模型组, 可见动脉粥样硬化斑, 血管内膜中膜增厚; D 为 Apo E^{-/-} 小鼠低剂量肝素组, 停止肝素治疗 4 w 后未见动脉粥样硬化斑, 血管内膜中膜增厚; E 为 Apo E^{-/-} 小鼠高剂量肝素组, 未见动脉粥样硬化斑, 血管内膜中膜增厚。

Figure 2. 20 w (4 weeks' cessation of heparin injection) renal artery atherosclerotic lesions in mice (HE × 100)

2.3 免疫组织化学法检测达肝素对小鼠肾动脉 LOX-1 表达的影响

棕黄色阳性颗粒主要表达在肾动脉内膜的内皮细胞上, 两组 C57BL/6J 小鼠均未见明显的 LOX-1 抗原表达。Apo E^{-/-} 模型组 LOX-1 抗原表达较两组 C57BL/6J 的抗原表达均明显增强 ($P < 0.05$), 棕

黄色颗粒粗大密集。高剂量肝素组及低剂量肝素组 LOX-1 抗原表达较 Apo E^{-/-} 模型组明显减弱, 棕黄色颗粒细小稀疏 ($P < 0.05$)。但是不同剂量肝素组间差异无统计学意义。说明 100 IU/(kg · d) 达肝素可抑制肾动脉内 LOX-1 的表达 (图 3)。

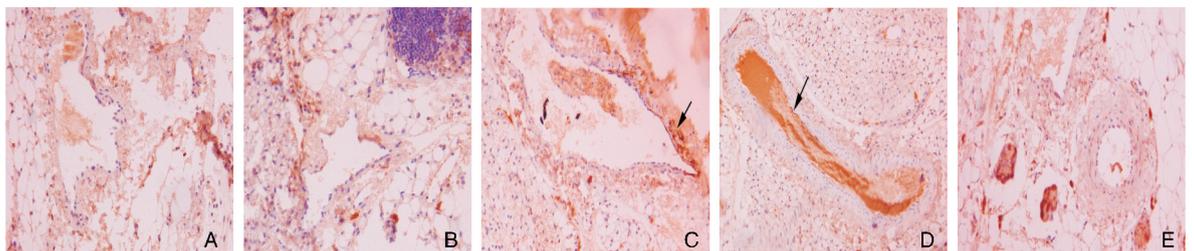


图 3. 16 周小鼠肾动脉 LOX-1 表达的情况 (× 100) A 为 C57BL/6J 小鼠普通饲料组, LOX-1 无明显表达; B 为 C57BL/6J 小鼠高脂饲料组, LOX-1 无明显表达; C 为 Apo E^{-/-} 小鼠模型组, LOX-1 阳性表达; D 为 Apo E^{-/-} 小鼠低剂量肝素组, LOX-1 弱阳性表达; E 为 Apo E^{-/-} 小鼠高剂量肝素组, LOX-1 极弱阳性表达。

Figure 3. 16 weeks-old mice, renal artery LOX-1 expression (× 100)

2.4 达肝素对小鼠肾动脉 LOX-1 及 VEGF mRNA 表达的影响

Apo E^{-/-} 模型组 LOX-1 mRNA 的表达水平较 C57BL/6J 普通饲料组明显升高 ($P < 0.05$)。与 Apo E^{-/-} 模型组相比, 200 IU/(kg · d) 达肝素可抑制 LOX-1 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 100 IU/(kg · d) 达肝素未达到统计学意义 (图 4)。Apo E^{-/-} 模型组 VEGF

mRNA 的表达水平较 C57BL/6J 普通饲料组明显升高 ($P < 0.05$)。与 Apo E^{-/-} 模型组相比, 100 IU/(kg · d) 和 200 IU/(kg · d) 达肝素可抑制 VEGF mRNA 表达 ($P < 0.05$), 100 IU/(kg · d) 和 200 IU/(kg · d) 达肝素组间差异未达到统计学意义 (图 5)。

2.5 达肝素对小鼠肾动脉 LOX-1 蛋白表达的影响

Apo E^{-/-} 小鼠模型组 LOX-1 蛋白的表达水平

较普通饲料喂养 C57BL/6J 小鼠的 LOX-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与 Apo E^{-/-} 小鼠模型组 LOX-1 蛋白表达水平相比,200 IU/(kg·d) 达肝素可使 LOX-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。100 IU/(kg·d) 达肝素治疗 LOX-1 蛋白表达水平差异未达到统计学意义 ($P > 0.05$; 图 6)。

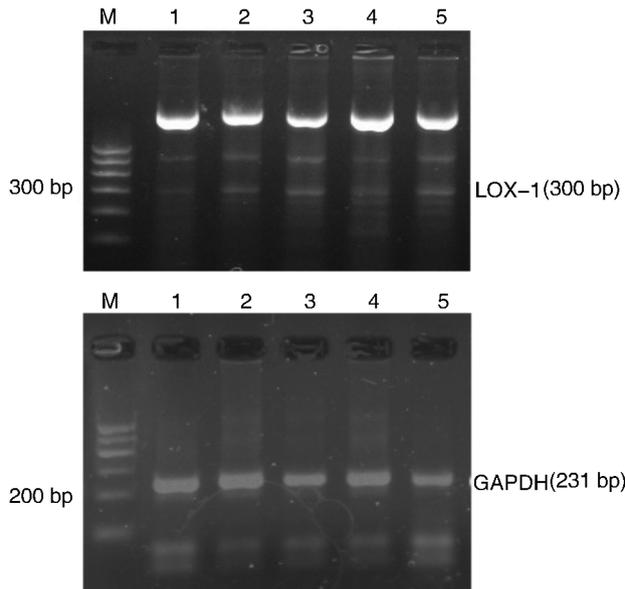


图 4. 小鼠肾动脉 LOX-1 mRNA 的表达 1 为 C57BL/6J 小鼠普通饲料组,2 为 C57BL/6J 小鼠高脂饲料组,3 为 ApoE^{-/-} 小鼠模型组,4 为 Apo E^{-/-} 小鼠低剂量肝素组,5 为 Apo E^{-/-} 小鼠高剂量肝素组。

Figure 4. LOX-1 mRNA expression of mice renal artery

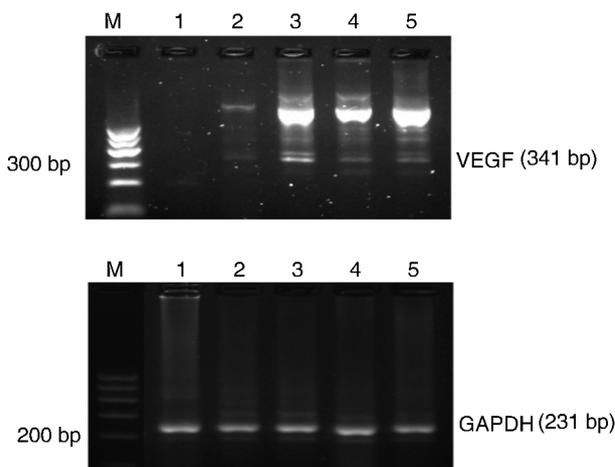


图 5. 小鼠肾动脉 VEGF mRNA 的表达 1 为 C57BL/6J 小鼠普通饲料组,2 为 C57BL/6J 小鼠高脂饲料组,3 为 Apo E^{-/-} 小鼠模型组,4 为 Apo E^{-/-} 小鼠低剂量肝素组,5 为 Apo E^{-/-} 小鼠高剂量肝素组。

Figure 5. VEGF mRNA expression of mice renal artery

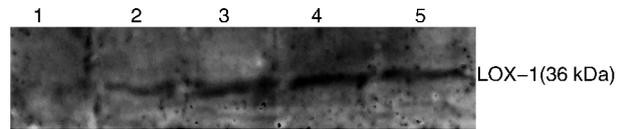


图 6. 小鼠肾动脉内 LOX-1 蛋白的表达 1 为 C57BL/6J 小鼠普通饲料组,2 为 C57BL/6J 小鼠高脂饲料组,3 为 Apo E^{-/-} 小鼠模型组,4 为 Apo E^{-/-} 小鼠低剂量肝素组,5 为 Apo E^{-/-} 小鼠高剂量肝素组。

Figure 6. LOX-1 protein expression of mice renal artery

3 讨论

低分子肝素有明显的抗凝血因子 Xa 及抗凝血酶活性,应用于急性冠状动脉综合症的抗凝治疗及介入治疗中。临床研究 FRISCII 表明:予达肝素钠(低分子肝素)持续注射 1 个月后,不稳定性冠状动脉疾病患者的心肌梗死率及血管重建术率降低^[1]。但是低分子肝素是否可抑制动脉硬化的进程尚不清楚。

平滑肌细胞和巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后转化为富含脂质的泡沫细胞,这一过程是动脉硬化斑块形成的关键环节^[2]。LOX-1 是 ox-LDL 的特异性受体,是一种单链跨膜蛋白,在巨噬细胞和内皮细胞及平滑肌细胞中表达。ox-LDL 通过上调 LOX-1 受体的表达,诱导了内皮功能的紊乱,内皮细胞和血管平滑肌细胞的凋亡、坏死崩解,导致粥样斑块的形成^[3]。LOX-1 可能是一系列分子级联瀑布反应的关键环节,也是脂质代谢紊乱与动脉粥样硬化病变程度间重要的关联环节^[4-6]。

下调 LOX-1 的表达,可部分阻断这种连锁反应,减少斑块内胆固醇浓度,增加斑块稳定性,可能是逆转粥样硬化病变的一种有效途径。作者在血管平滑肌细胞中的前期研究表明:凝血因子 Xa 和凝血酶可诱导 LOX-1 表达增加^[7]。Bea 等^[8]研究发现,对老年 Apo E^{-/-} 小鼠,凝血酶抑制剂美拉加群,不但可以促进斑块稳定,还可以减轻成熟斑块的大小,这是他汀类药物所不能达到的。

本研究结果表明动脉粥样硬化鼠模型中,达肝素可抑制肾动脉粥样硬化的进展,疗效持续至停止肝素治疗后 4 周。可能的机制是抑制肾动脉血管内皮细胞的 LOX-1 蛋白表达。达肝素通过抑制凝血因子 Xa 和凝血酶的表达,可能下调凝血酶及凝血因子 Xa 诱导的 LOX-1 的表达,使斑块内 ox-LDL 水平下降,减少斑块内脂质沉积,抑制粥样斑块的形成。抑制 LOX-1 蛋白的表达可能是低分子肝素独

立于抗凝作用以外的抗动脉粥样硬化的作用靶点。但是由于肾动脉粥样硬化程度较轻,肾动脉血管内膜 LOX-1 表达量不大,免疫组织化学的检测结果未达到统计学意义。尚需在晚期较重的肾动脉粥样硬化模型中进一步研究。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所发现的唯一特异性促进血管内皮细胞有丝分裂的生长因子。正常状态下,它们呈低表达或不表达。在缺氧状态下 VEGF 产生增加。ox-LDL 和炎症因子等动脉粥样硬化的危险因子可使 VEGF 产生增加。VEGF 可以促进动脉粥样硬化斑块的形成,并造成斑块稳定性下降,导致斑块破裂、出血及血栓形成。人冠状动脉粥样斑块标本中 VEGF 的高度表达,在急性冠脉综合症患者血清中 VEGF 水平显著升高^[9]。本研究发现达肝素治疗后 VEGF mRNA 表达下降。达肝素可能通过抑制 LOX-1 蛋白的表达,减少斑块内 ox-LDL 浓度,下调由 ox-LDL 诱导的 VEGF 表达,进一步稳定斑块,抑制动脉粥样硬化的发生。但是具体的机制及传导通路尚不清楚,需进一步研究。

Apo E^{-/-}小鼠由美国 Jackson 实验室应用基因敲除技术于 1992 年培育成功,以 C57BL/6J 品系的小鼠动脉粥样硬化损害最严重。雌性小鼠动脉粥样硬化程度低于雄性。故本研究采用雄性小鼠作为肾动脉粥样硬化模型。该小鼠在普通饮食饲喂下自发形成高胆固醇血症和动脉粥样硬化,As 形成呈慢性、进展性、广泛性,是研究 As 较好的动物模型^[10]。病变部位以主动脉根部最明显,其次为冠状动脉、双肾动脉,与人类全身 As 好发处相近,其肾动脉病理改变与人类动脉粥样硬化性病变是相似的^[11]。高胆固醇饮食会加速小鼠 As 形成的进程。高脂饮食组载脂蛋白 E 基因敲除小鼠大约 15 周龄即开始形成纤维斑块。一般动物的耐受性比人大,单位体重的用药量比人要高。本研究采用的达肝素剂量为人体的常规用量,但已经得出阳性结果。

本研究为低分子肝素的作用机制提供可能的新理论依据。为动脉粥样硬化的发生机理及防治措施提供新的角度和治疗靶点。但是因为动物本身特性,使其不能很准确的反映或代表复杂的人类粥样斑块,相似性存在争议,尚需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Lagerqvist B, Husted S, Kontny F, et al. Fast Revascularisation during InStability in Coronary artery disease (FRISC-II) Investigators. 5-year outcomes in the FRISC-II randomised trial of an invasive versus a non-invasive strategy in non-ST-elevation acute coronary syndrome: a follow-up study[J]. *Lancet*, 2006, 368(9 540): 998-1 004.
- [2] Marwali MR, Hu CP, Mohandas B, et al. Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322(3): 1 324-332.
- [3] Westerwell PE, Verhaar MC. LOX-1: luring ox-LDL into the arterial wall[J]. *J Hypertens*, 2010, 28(6): 1 127-128.
- [4] Chen XP, Du GH. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance[J]. *Chin Med J*, 2007, 120(5): 421-426.
- [5] Wang X, Hu DY, Yang SW, et al. Associations between the plasma inflammatory markers and plaque morphologies of coronary artery lesions[J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2008, 47(1): 27-30.
- [6] Xiangbin X, Xue G, Barry JP, et al. Anti-LOX-1 rescues endothelia function in coronary arterioles in atherosclerotic ApoE knockout mice[J]. *Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 871-877.
- [7] 苏琳, 苗懿德, 孙立新, 等. 凝血酶及凝血因子 Xa 诱导血管平滑肌细胞中植物血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1 表达的实验研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(3): 262-265.
- [8] Bea F, Kreuzer J, Preusch M, et al. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(12): 2 787-792.
- [9] 王春彬, 高大中. 高脂血症兔主动脉 NF-KB、VCAM-1 和 VEGF 的表达及氟伐他汀的影响[J]. *中国心血管病研究*, 2008, 6(5): 379-382.
- [10] Falk E, Schwartz SM, Galis ZS, et al. Putative murine models of plaque rupture[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 969-972.
- [11] 翟永志, 晏沐阳. 老龄 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的病理观察[J]. *心血管康复医学杂志*, 2008, (1): 5-8.

(此文编辑 李小玲)