

# 全反式维甲酸对兔颈动脉内膜损伤和炎症反应的影响

阚冰冰<sup>1</sup>, 董果雄<sup>1</sup>, 张社华<sup>2</sup>, 姚如永<sup>3</sup>

(1. 青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003; 2. 青岛大学医学院实验中心, 山东省青岛市 266021;

3. 青岛大学医学院附属医院中心实验室, 山东省青岛市 266003)

[关键词] 全反式维甲酸; 炎症反应; 动脉硬化; 血小板活化因子; 白三烯 B4

[摘要] **目的** 通过建立兔颈动脉内膜损伤模型, 观察损伤病灶内血管内膜增生状态, 检测炎症相关因子即血小板活化因子(PAF)与白三烯 B4(LTB4)的表达水平, 探讨全反式维甲酸(ATRA)是否具有通过抗炎而稳定斑块的作用及其机制。**方法** 选取 36 只新西兰雄性健康兔, 随机分为对照组、高脂组、治疗组, 每组 12 只。每组再分为 A、B、C 3 个亚组, 每个亚组 4 只。对照组给予基础饲料, 高脂组与治疗组给予高脂饲料, 两周后行动脉内膜空气干燥术。对照组仅暴露颈动脉但不损伤内膜(即假手术); 其余两组进行空气干燥术损伤动脉内膜; 治疗组于术前 3 天开始给予 ATRA 灌胃。分别于术后 1、2、4 周处死 A、B、C 3 个亚组动物, 取病变血管进行形态学观察, 测量所取血管横截面的内膜面积, 采用酶联免疫吸附法检测兔血清 PAF 与 LT B4 的表达水平。**结果** 对照组未见内膜增生, PAF 及 LT B4 有正常少量表达; 高脂组内膜增生明显, 管腔狭窄甚至变形, 管壁不规则脂质斑点形成, PAF (281.3 ± 14.6 ng/L) 及 LT B4 (42.79 ± 0.18 ng/L) 表达显著增多(均  $P < 0.05$ ); 治疗组内膜增生程度介于对照组与高脂组之间( $P < 0.05$ ), PAF 及 LT B4 的表达水平亦介于对照组与高脂组之间( $P < 0.05$ )。**结论** ATRA 可以显著抑制动脉内膜损伤病灶内膜增生, 其机制可能与 ATRA 抑制 PAF 的激活和表达, 减少炎症趋化因子 LT B4 的释放, 从而抑制炎症反应有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effect of All-trans Retinoic Acid on the Endometrial Injuring and Inflammatory Response in Carotid Artery of Rabbits

KAN Bing-Bing<sup>1</sup>, DONG Guo-Xiong<sup>1</sup>, ZHANG She-Hua<sup>2</sup>, and YAO Ru-Yong<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China; 2. Central Laboratory, Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China; 3. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China)

[KEY WORDS] All-trans Retinoic Acid; Inflammatory Reaction; Atherosclerosis; Platelet-activating Factor; Leukotriene B4

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the all-trans retinoic acid (ATRA) will perform anti-inflammatory role and therefore to inquire into its possible mechanism of stabilizing plaques, by establishing the animal models of carotid artery endometrial injuring in rabbits and observing the expression level of platelet-activating factor (PAF) and leukotriene B4 (LTB4). **Methods** 36 New Zealand male healthy rabbits were randomly divided into three groups; contrast group ( $n = 12$ ), high-fat group ( $n = 12$ ) and treatment group ( $n = 12$ ), each group then were divided into three subgroups (A, B, C). Contrast group were provided basic feed while the other two groups were given fatty feed. All groups have to be suffered from artery intima air-drying technique after two weeks. Contrast group only had exposure of carotid artery but no damage to the intima; others should have injury to artery intima; the treatment group were administered ATRA lavage daily from 3 days before the surgery. On the 7d, 14d and 28d, the target vessels were taken out for morphological observation and measuring of intima thickening. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the expression level of PAF and LT B4 in rabbit serum. **Results** Contrast group did not see endometrial hyperplasia, PAF and

[收稿日期] 2013-04-15

[作者简介] 阚冰冰, 硕士研究生, 研究方向为冠心病、高血压、心力衰竭, E-mail 为 1083685061@qq.com。通讯作者董果雄, 硕士, 主任医师, 教授, 研究方向为冠心病、高血压、心力衰竭, E-mail 为 qydgx@public.qd.sd.cn。张社华, 副教授, 研究方向为分析化学。

LTB4 had normal small expression. High-fat group were of endometrial hyperplasia obviously, target vessels were stenosis even deformation, PAF and LTB4 had quantity expression. The intima hyperplasia in treatment group was lower than high-fat group ( $P < 0.05$ ) as the same as the expression level of PAF and LTB4. **Conclusion** ATRA can significantly alleviate injury area endometrial proliferation, the mechanism may be related to its inhibition of PAF activation and expression, then reduce the release of inflammatory chemokines LTB4 in order to restrain the inflammatory response ultimately.

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)与动脉粥样硬化斑块破裂、血栓形成有关。研究发现,动脉粥样硬化是血管内皮损伤导致的以脂质沉积和慢性炎症反应为特点的血管壁病变<sup>[1]</sup>。在粥样硬化斑块形成的各个阶段,大量的炎症因子参与其中,对其形成和发展发挥了至关重要的作用。炎症因子通过趋化炎症细胞向血管损伤部位浸润,促进血管平滑肌细胞凋亡及降解,细胞外基质造成了动脉粥样斑块的不稳定<sup>[2]</sup>。前期研究证明,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)可以通过抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的转化、迁移,调节细胞内信号传导途径从而抑制 VSMC 增生<sup>[3-5]</sup>。本文旨在通过建立兔颈动脉损伤与修复模型,观察 ATRA 对损伤与修复病灶中内膜增生的影响,探讨全反式维甲酸是否具有通过抑制炎症相关因子血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)与白三烯 B4(leukotriene B4, LTB4)的表达而减轻 VSMC 增殖,进而达到稳定动脉粥样硬化斑块、预防急性冠状动脉综合征等急性心血管事件的作用,为指导临床用药提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

健康新西兰雄性白兔 36 只(山东省农业科学院畜牧兽医研究所),许可证号 SCXK(鲁)20080002,90 天龄,体重  $2.50 \pm 0.20$  kg,单笼饲养。基础饲料(青岛市药品检验所),胆固醇(上海如吉生物科技发展有限公司),兔 PAF 与 LTB4 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(青岛沃尔森生物技术有限公司),ATRA(重庆华邦制药有限公司,批号 2012014)。Olympus CellSens Dimension 免疫荧光显微镜,Image-Pro Plus 图像分析系统。

### 1.2 动物模型制备

36 只兔随机分为对照组、高脂组、治疗组,每组 12 只。每组再分为 A、B、C 3 个亚组,每个亚组 4 只。对照组每只每日给予基础饲料 150 g,高脂组和治疗组每日每只给予 150 g 高脂饲料(6% 猪油、1.5% 胆固醇、92.5% 基础饲料),3 组均自由饮水。

两周后按 Fischman 等<sup>[6]</sup>的方法行动脉内膜空气干燥术。对照组施行假手术,即仅暴露一侧颈动脉但不损伤其内膜;其余两组暴露一侧颈动脉并穿刺行空气干燥以损伤内膜。治疗组术前 3 天开始给予 ATRA  $6 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  溶于植物油灌胃至处死动物,对照组、高脂组分别给予等量植物油灌胃亦至处死动物。分别于术后 1、2、4 周处死 A、B、C 3 个亚组动物,取约 1.0 cm 的病变血管等距离切为 3~4 段,10% 甲醛缓冲溶液固定,石蜡包埋。

### 1.3 血管内膜形态学观察及测量

将病变血管横切面(约  $3 \sim 4 \mu\text{m}$ )行 HE 染色,光学显微镜下观察管壁结构,Image-Pro Plus 系统进行图像分析,测量所取病变血管横截面的内膜面积(intimal area, IA)、中膜面积(medial area, MA)、内膜/中膜面积比(I/M),结果取平均值。

### 1.4 ELISA 法检测血清 PAF 与 LTB4 的表达水平

术后 1、2、4 周取病变血管前经兔颈静脉采血约 3 mL,不抗凝,全血标本于室温下静置半小时以上,3 000 r/min 21℃ 离心 10 min,将血清和血细胞小心分离,留取上清液置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。样品收集结束后使用兔 ELISA 试剂盒检测血清中 PAF 与 LTB4 的表达水平。PAF 拟合曲线公式:  $Y = 0.0002X + 0.0531$ , LTB4 拟合曲线公式:  $Y = 0.0065934X + 0.061982$ ,相关系数  $r = 0.98797$ 。

### 1.5 统计学处理

使用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,行  $t$  检验,计数资料用等级 H 检验,  $P < 0.05$  为差别有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动物情况及血管形态学观察

实验初期,对照组病兔 1 只,其余各组动物健康。动脉内膜空气干燥术后,3 组动物均未出现伤口感染或其他全身患病情况,切口愈合良好。对照组 A、B、C 3 个亚组动脉内膜光滑,管壁平整,单层内皮细胞排列整齐,染色均匀,与内弹力板紧贴,内弹力板结构完整, VSMC 排列规则,方向一致。高脂组 A 亚组内膜粗糙,可见小脂质点,脂质细纹,内皮

细胞增生,内弹力板部分断裂,VSMC 排列紊乱,迁入内膜基层,细胞外基质增多;高脂组 B 亚组脂质团聚,局部形成皂斑,动脉内膜增生,管壁厚薄不均,VSMC 积聚于复层内皮下,其中浸润单核细胞、巨噬细胞等炎症细胞,内弹力板断裂严重;高脂组 C 亚组

片状脂质斑形成,隆起突入管腔内,引起管腔狭窄甚至堵塞,管腔变形,内膜增生显著,内皮细胞大量增生并有多量炎性细胞浸润,胞内出现脂质空泡,VSMC 增生明显并移行内皮层中。治疗组与高脂组病理变化类似但相应程度均较轻(图 1)。

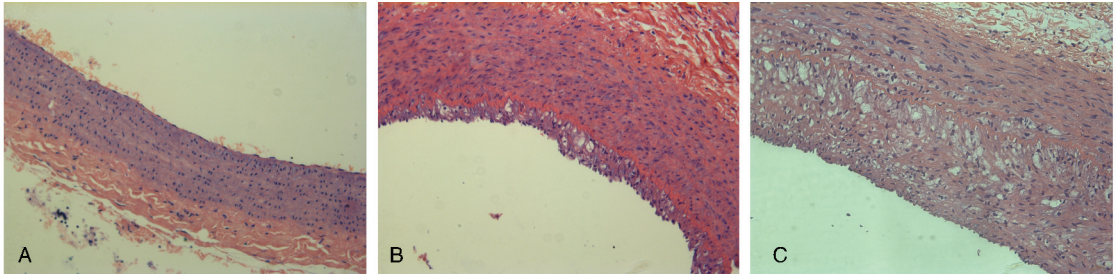


图 1. 术后 4 周 3 组动物颈动脉 HE 染色 ( $\times 200$ ) A 为对照组 C 亚组, B 为治疗组 C 亚组, C 为高脂组 C 亚组。

Figure 1. HE staining of rabbits' carotid artery in the 4th week after operation ( $\times 200$ )

## 2.2 内膜面积、中膜面积、内膜/中膜面积比

术后 14、28 天,治疗组各亚组 IA、I/M 值低于相应高脂组各亚组,差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。术后 7、14、28 天,各组中膜面积差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 表 1)。

表 1. ATRA 对各亚组动物颈动脉内膜增殖的影响及内膜/中膜面积比

Table 1. The comparison of IA and MA in three groups

分 组	n	IA ( $\text{mm}^2$ )	MA ( $\text{mm}^2$ )	IA/MA
对照组 A 亚组	3	-	0.61 $\pm$ 0.03	-
对照组 B 亚组	4	-	0.62 $\pm$ 0.02	-
对照组 C 亚组	4	-	0.61 $\pm$ 0.04	-
治疗组 A 亚组	4	0.05 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.02
治疗组 B 亚组	4	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.65 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
治疗组 C 亚组	4	0.24 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
高脂组 A 亚组	4	0.07 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.03
高脂组 B 亚组	4	0.21 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.05
高脂组 C 亚组	4	0.34 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.04

a 为  $P < 0.05$ ,与高脂组 B 亚组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与高脂组 C 亚组比较。

## 2.3 ELISA 检测兔血清 PAF 与 LTB4 结果

对照组血清中可见 PAF、LTB4 有少量正常表达;高脂组术后 7 天可见 PAF、LTB4 表达增多,术后 14、28 天表达量显著增多 ( $P < 0.05$ ; 表 2);治疗组各亚组 PAF、LTB4 表达规律与高脂组类似,但表达量显著低于高脂组,差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 2)。

## 2.4 PAF 与 LTB4 的相关性分析

根据数据结果,将两变量置于直角坐标轴上,把其中一变量取作 X,另一个取作 Y,绘制散点图,用计算机软件求得样本相关系数  $r = 0.955$ ,进行 Pearson 积距相关系数的假设检验 ( $t = 8.52$ ),结果显示两变量间线性相关有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

说明当 PAF 的激活和表达受到抑制时,炎症趋化因子 LTB4 的释放也相应减少,从而减轻炎症反应。

表 2. 术后 7、14、28 天各亚组血清 PAF、LTB4 的表达水平 (ng/L)

Table 2. The expression level of PAF and LTB4 in rabbit serum after operation (ng/L)

分 组	n	PAF	LTB4
对照组 A 亚组	3	149.5 $\pm$ 12.6	35.73 $\pm$ 0.23
对照组 B 亚组	4	161.3 $\pm$ 13.1	36.88 $\pm$ 0.32
对照组 C 亚组	4	167.4 $\pm$ 12.8	36.42 $\pm$ 0.21
治疗组 A 亚组	4	216.7 $\pm$ 13.6	38.83 $\pm$ 0.14
治疗组 B 亚组	4	221.2 $\pm$ 14.6 <sup>a</sup>	38.30 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
治疗组 C 亚组	4	226.7 $\pm$ 15.1 <sup>b</sup>	37.89 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
高脂组 A 亚组	4	258.8 $\pm$ 13.2	40.46 $\pm$ 0.28
高脂组 B 亚组	4	266.3 $\pm$ 14.3	41.58 $\pm$ 0.27
高脂组 C 亚组	4	281.3 $\pm$ 14.6	42.79 $\pm$ 0.18

a 为  $P < 0.05$ ,与高脂组 B 亚组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与高脂组 C 亚组比较。

## 3 讨 论

长期临床实践发现,虽然 ACS 患者的临床表现迥异,但其冠状动脉病理生理变化却有着高度相似性,即粥样硬化病灶中的斑块由稳定变为不稳定至破裂,继而血小板激活导致血栓形成。血栓形成是其主要病理环节,而血小板的活化和血管内皮的损伤是血栓形成的重要原因<sup>[7]</sup>。血小板既参与动脉粥样硬化炎症反应,又参与粥样斑块破裂血栓形成,在动脉粥样硬化的发生和发展中发挥了重要作用。血小板只有激活才能引起黏附、聚集、趋化、释放等一系列生物学效应。除此之外,单核巨噬细胞在血小板激活后,诱导产生多种炎症因子以及金属

蛋白酶系列,进一步促进和加重炎症反应,加速动脉粥样硬化的进展和斑块的不稳定<sup>[8]</sup>。

全反式维甲酸衍生于维生素 A 族,它可抑制细胞增生并诱导正常分化,广泛应用于早幼粒细胞白血病、银屑病等的治疗。先前研究证实 ATRA 可抑制 VSMC 的活化、迁移、增殖<sup>[3-5]</sup>。本实验采用高脂饮食、空气干燥术损伤动脉内膜,从而建立动物动脉内膜损伤模型的方法,通过检测炎症因子的表达量,观察内膜损伤病灶中 VSMC 的增生情况,探讨 ATRA 可能通过减少炎症因子的表达,减轻炎症反应而抑制内膜增生的机制。血小板活化因子是一类磷脂介质,具有广泛生物学活性,它是目前已知的最强的血小板激活剂。有研究发现,PAF 在 Mantagel 鼠模型体内可直接刺激内皮细胞的迁移,增加血管通透性,这种生物学活性类似于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>[9]</sup>,这对粥样硬化病灶中 VSMC 的迁移增殖途径可能具有协同作用。此外,中性粒细胞在 PAF 的趋化作用下,不断向内皮损伤区域黏附、聚集,在积聚部位释放大量的自由基、溶酶体酶及白三烯类物质。目前认为,炎症参与了不稳定斑块的形成和破裂,是 ACS 发病的主要机制。白三烯 B4 是 5 脂氧化酶促炎途径的重要产物之一,参与冠心病炎症发病机制,与动脉粥样斑块不稳定、斑块破裂有关<sup>[10]</sup>。Bek 等<sup>[11]</sup>对人冠状动脉平滑肌细胞进行体外培养,发现加入白三烯 B4 后能够促进人冠状动脉平滑肌细胞的迁移和增殖,提示白三烯 B4 在血管内膜增生过程中的作用,及其在动脉粥样硬化发生发展中重要炎症介质的身份。在本实验中发现,PAF 与 LTB4 在对照组有少量正常表达,在高脂组表达明显增多,管壁增厚并有粥样斑块形成,管腔狭窄变形。使用 ATRA 治疗后 PAF 与 LTB4 表达水平、内膜增殖程度均明显降低。治疗组与高脂组表达水平数据比较结果证明 ATRA 能够下调 PAF、LTB4 的表达水平。实验数据显示当 PAF 受到抑制的同时 LTB4 的表达亦降低。直线相关分析结果表明两者具有相关性,即 PAF 与 LTB4 的表达呈正相关,说明 ATRA 对白三烯 B4 的抑制作用可能是通过下调血小板活化因子的表达实现的。ATRA 抑制动脉内膜损伤与修复病灶内膜增生的作用机制之一,可能是通过抑制 PAF 的激活和表达从而下调炎症趋化因子 LTB4 的表达而抑制炎症过程。

动脉粥样硬化是一种全身性病变,可同时累及冠状动脉、颈动脉及下肢动脉等,因颈动脉解剖位

置表浅、相对固定、易于寻找,成为常用的实验途径<sup>[12]</sup>。该实验结果显示,ATRA 可抑制与动脉粥样硬化相关的炎症因子诸如 PAF、LTB4 的表达,减轻炎症反应及内膜增殖,稳定粥样斑块继而预防 ACS。由于关于 ATRA 对动脉粥样硬化病灶中的炎症反应抑制作用资料尚少,炎症因子众多,炎症反应复杂,能否利用 ATRA 的抗炎作用作为治疗动脉粥样硬化疾病的新策略还有待进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] 李晶, 裴毅刚, 张蓉, 等. 炎症因子在人动脉粥样硬化组织的表达分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 215-217.
- [2] Zakyntinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease[J]. J Cardiol, 2009, 53(3): 317-333.
- [3] 胡真真, 董果雄, 张社华, 等. ARTA 对兔颈动脉内膜损伤病灶 Cyclin D3 及 LP-PLA2 的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2012, 12(5): 280-283.
- [4] 张青青, 董果雄, 张社华. 全反式维甲酸对兔颈动脉粥样硬化病灶 VSMC 增殖及 AKT1 表达影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(2): 135-139.
- [5] Ren N, Dong GX, Zhang SH, et al. The effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the expression of MCP-1 and TLR-4 in atherosclerotic lesions of rabbits[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(5): 823-827.
- [6] Fischman DL, Leon MB. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary disease[J]. N Engl J Med, 1994, 331(8): 496-501.
- [7] 陈章强, 洪浪, 王洪, 等. 急性冠状动脉综合征患者介入术后血小板活化及血管内皮功能的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(5): 381-384.
- [8] 何钊, 杨永宗. 血小板活化在动脉粥样硬化中的致炎作用[J]. 中国心血管病研究, 2007, 5(11): 858-860.
- [9] Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, et al. A mutation in plasma platelet-activating factor acetyl hydrolase (Val279-Phe) is a genetic risk factor for cerebral hemorrhage but not for hypertension[J]. Thromb Haemost, 1998, 80(3): 372-375.
- [10] 王琳, 江建军, 许莎莎, 等. 白三烯 B4 对巨噬细胞小凹蛋白 1 表达的影响及其与冠状动脉斑块不稳定的关系[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2010, 18(4): 213-218.
- [11] Bek M, Bu DX, Brnstrm R, et al. Leukotriene B4 signaling through NF-kappa B-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(48): 17 501-506.
- [12] 李文, 张鸿举, 丁少娟, 等. 颈动脉粥样斑块与冠状动脉病变的相关性研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2011, 3(4): 278-280.

(此文编辑 曾学清)