

## 慢性应激对大鼠冠状动脉粥样硬化病变及相关因素的影响

李娜, 赵兴蓉, 龚雪梅, 陈美玲, 乐发国, 许秀峰

(昆明医学院附属第一医院精神科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 内科学; 应激; 动脉粥样硬化; 细胞因子; 血栓素; 大鼠模型

[摘要] 目的 探讨慢性应激对冠状动脉粥样硬化病变及相关因素的影响。方法 36 只 Wistar 雄性大鼠随机分为 3 组, 均饲养 6 周, 正常对照组喂食普通饲料; 高脂组喂食高脂混合饲料; 高脂加应激组除喂食高脂混合饲料外, 同时给予限制应激、旋转应激、拥挤应激。高脂组和高脂加应激组在应激开始时一次性腹腔注射维生素 D (600, 000 IU/kg), 对照组注射同等剂量生理盐水。在研究 6 周末测定总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白水平, 采用放射免疫测定方法测定血栓素 B<sub>2</sub>、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子水平, 并用 HE 染色法及油红 O 染色观察冠状动脉病理变化。结果 (1) 高脂加应激组的总胆固醇、低密度脂蛋白浓度明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 高脂组的总胆固醇、低密度脂蛋白浓度显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。 (2) 高脂加应激组的血栓素 B<sub>2</sub>、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子浓度明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ) 及高脂组 ( $P < 0.05$ )。 (3) 慢性应激与血栓素 B<sub>2</sub>、肿瘤坏死因子、总胆固醇呈正相关 ( $r$  为 0.543、0.354、0.392,  $P$  均  $< 0.05$ )。 (4) 高脂加应激组和高脂组均形成冠状动脉粥样硬化早期病变, 但高脂加应激组病变较高脂组加重。结论 慢性应激可促进冠状动脉粥样硬化的发展, 并可能通过扰乱脂质代谢、增强细胞因子介导的炎症反应、活化血小板等方面影响冠状动脉粥样硬化的发生和发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### A Study on the Impact of Chronic Stress on the Coronary Atherosclerosis and Related Factors in Rats

LI Na, ZHAO Xing-Rong, GONG Xue-Mei, CHEN Mei-Ling, YUE Fa-Guo, and XU Xiu-Feng

(The First Affiliated Hospital Of Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

[KEY WORDS] Stress; Atherosclerosis; Cytokines; Thromboxane; Rat Model

[ABSTRACT] **Aim** To study the impact of chronic stress on the coronary atherosclerosis and related factors. **Method**

Totally 36 male Wistar rats were randomly and averagely divided into three groups, and all groups were fed for 6 weeks: control group were fed with basic food; the rats in hyperlipidemia group were fed with hyperlipidemia diet; the rats in hyperlipidemia stress group were given hyperlipidemia diet, and were exposed under the different stressors at the same times, including limit, circumsolve and huddle. The rats in hyperlipidemia group and hyperlipidemia stress group were injected with a single dose of vitamin D (600,000 IU/kg) at the beginning of the test, and the control group were injected saline with the equal capacity. The serum level of TC, TG, HDL and LDL were determined after 6 weeks, the serum level of TXB<sub>2</sub>, IL-6, and TNF- $\alpha$  were tested synchronously with radioimmunoassay, and the change of pathology of the coronary artery were observed with HE dyeing method. **Results**

(1) Level of TC, LDL in hyperlipidemia stress group were obviously higher than those in control group ( $P < 0.01$ ); Compared with control group, level of TC, LDL in hyperlipidemia group were higher ( $P < 0.01$ ). (2) Level of TXB<sub>2</sub>, IL-6 and TNF- $\alpha$  in hyperlipidemia stress group were remarkably higher than those in control group ( $P < 0.01$ ) and those in hyperlipidemia group ( $P < 0.05$ ). (3) TXB<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  and TC were significantly correlated with chronic mental stress ( $r$  were 0.543, 0.354 and 0.392,  $P < 0.05$ ). (4) Forepart pathological changes of coronary atherosclerosis were formed in both hyperlipidemia stress group and hyperlipidemia group, but hyperlipidemia stress group were more obvious. **Conclusion** Chronic mental stress could promote the development of coronary atherosclerosis, which was involved in the formation and development of coronary atherosclerosis by disturbing lipid metabolism, increasing inflammatory reaction guided by cytokines and elevating platelet activation.

[收稿日期] 2007-11-12 [修回日期] 2008-05-20

[基金项目] 云南省教育厅青年教师科研基金(5Y0415C); 昆明医学院附属第一医院院内基金(2006YN01)

[作者简介] 李娜, 硕士, 主治医师, 主要从事心身医学方向, 联系电话为 0871-2965062, E-mail 为 phoebe11@sina.com。赵兴蓉, 硕士, 医师, 主要从事精神疾病康复治疗, E-mail 为 zhaoxingrongwawa@126.com。通讯作者许秀峰, 硕士, 主任医师, E-mail 为 xfxu2004@sina.com。

冠心病(coronary heart disease, CHD)是严重威胁人们生命安全和影响生活质量的心身疾病, 其发病率及死亡率都逐年上升。除了传统的生物学危险因素, 许多研究证明, 由于现代社会生活节奏的不断加快, 一些精神应激, 也逐渐成为冠心病另一个不可忽略的重要危险因素。应激是如何影响冠心病病程

的? 这一直是众多研究者致力研究的课题。本研究拟通过观察大鼠在冠状动脉粥样硬化形成过程中, 慢性应激作用下冠状动脉血管壁的形态学改变以及外周血血栓素 B2(thromboxane B2, TXB2)、白细胞介素 6(leukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和血脂的变化, 了解慢性应激对大鼠冠状动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的作用, 并从血小板活化、炎症反应的角度, 探讨慢性应激与 As 之间的关系及可能的病理机制。旨在为冠心病的预防、治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

由云南生物制药厂动物实验中心提供的健康成年雄性 Wister 大鼠 36 只, 体重 200~250 g。使用标准大鼠笼饲养, 除高脂加应激组外, 均 4 只/笼, 饲养环境为自然光照, 温度为  $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 通风良好, 大鼠自由进食饲料和水。适应性饲养 1 周后随机分为 3 组, 每组 12 只, 均饲养 6 周: 对照组喂食普通大鼠饲料; 高脂组喂食高脂混合饲料; 高脂加应激组除喂食高脂混合饲料外, 同时给予精神应激。

### 1.2 喂养方法

对照组给予基础饲料(20 g/d); 高脂组和高脂加应激组给予高脂混合饲料(20 g/d), 配料为 3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油、81.3% 基础饲料。同时高脂组和高脂加应激组在喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D 60 万 IU/kg, 对照组腹腔注射同等体积的生理盐水。

### 1.3 慢性应激方法

将大鼠放入自制的  $5\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 20\text{ cm}$  铁质圆柱形小舱内, 可依照动物的大小对该装置长度予以适当调节, 大鼠在其内不可扭头、转身, 每周随机进行 3 次, 每次 30 min。自制旋转器, 转速为 33 r/min, 每天 8:00~18:00 内, 于每 45~150 min 内进行 1 次, 每次 15 min。按 10 只/笼喂养。

### 1.4 血栓素 B2、细胞因子和血脂

自大鼠颈总动脉活体取血 5 mL, TXB2、IL-6、TNF- $\alpha$  的测定采用放射免疫方法, 试剂盒均由北京科美东雅生物科技技术有限公司提供, 测定方法按说明书进行; 血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的测定使用 AU 5400 奥林巴斯全自动生物化学分析仪。

## 1.5 病理学检验

在升主动脉起始处、距心尖 0.5 cm 处将心脏横断成 3 段, 取其间组织块, 石蜡包埋, 连续切片, 作 HE 染色及油红 O 染色, 每段切片不少于 6 片, 光学显微镜观察。

## 1.6 统计分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 13.0 软件包进行分析。三组间均数比较使用单因素方差分析, 三组间均数两两比较使用  $q$  检验, 应激与血脂及 TNF、IL-6、TXB2 相关分析使用偏相关分析, 冠状动脉粥样硬化相关因素分析采用等级回归分析等统计学方法。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

36 只大鼠中, 高脂加应激组因饮食不佳死亡 3 只, 高脂组因腹泻死亡 1 只, 对照组无死亡。

### 2.2 各组血脂水平比较

3 组 HDL 浓度比较, 差异均无显著性。高脂加应激组的 TC、LDL 浓度明显高于对照组( $P < 0.01$ )。高脂组的 TC、LDL 浓度显著高于对照组( $P < 0.01$ ), TG 浓度高于对照组( $P < 0.05$ )。高脂加应激组的 TC、TG、LDL 浓度与高脂组差异无显著性( $P > 0.05$ , 表 1)。

表 1. 各组血脂水平比较 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	TC	TG	HDL	LDL
对照组	12	$1.38 \pm 0.20$	$0.50 \pm 0.24$	$0.69 \pm 0.14$	$0.43 \pm 0.13$
高脂加应激组	9	$2.33 \pm 1.02^a$	$0.59 \pm 0.15$	$0.73 \pm 0.16$	$0.87 \pm 0.50^a$
高脂组	11	$2.14 \pm 0.50^a$	$0.74 \pm 0.26^b$	$0.77 \pm 0.17$	$0.80 \pm 0.24^a$

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

### 2.3 各组血栓素 B2 和细胞因子比较

高脂加应激组的 TXB2、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度明显高于对照组( $P < 0.01$ )。而高脂加应激组与高脂组比较, 高脂加应激组 TXB2、IL-6 和 TNF- $\alpha$  浓度高于高脂组( $P < 0.05$ )。高脂组与对照组比较, 差异均无显著性( $P > 0.05$ , 表 2)。

表 2. 各组血栓素 B2 和细胞因子比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	TXB2 (g/L)	IL-6 (g/L)	TNF- $\alpha$ (g/L)
对照组	$64.25 \pm 35.06$	$130.18 \pm 44.00$	$1.09 \pm 0.47$
高脂加应激组	$158.93 \pm 78.51^{ab}$	$193.94 \pm 36.74^{ab}$	$2.33 \pm 1.07^{ab}$
高脂组	$67.99 \pm 45.18$	$145.35 \pm 51.43$	$1.47 \pm 0.69$

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

## 2.4 慢性应激与血脂、血栓素 B2 和细胞因子的相关分析

以 TC 为控制变量, 显示慢性应激与 TXB2 呈正相关( $r = 0.543$ ,  $P$  为 0.001), 与  $\text{TNF-}\alpha$  呈正相关( $r = 0.354$ ,  $P$  为 0.025)。以  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、TXB2 为控制变量, 慢性应激与 TC 呈正相关( $r = 0.392$ ,  $P < 0.05$ )。另外, TC 与 LDL 呈正相关( $r = 0.947$ ,  $P < 0.01$ )。TNF- $\alpha$  与 TXB2 正相关( $r = 0.540$ ,  $P < 0.01$ )。

## 2.5 冠状动脉病理学改变

正常对照组无明显病变(图 1A)。高脂组病变的血管主要分布于冠状动脉中、小分支。冠状动脉壁增厚, 管腔轻度狭窄, 内有脂质沉积, 可见胞浆中有大量脂质空泡, 有少量的纤维组织增生和炎细胞浸润(图 1B、C)。高脂加应激组病变的血管主要分布于冠状动脉中、小分支。冠状动脉壁呈不规则增厚, 内有脂质沉积, 有平滑肌增生, 伴有纤维组织增生和炎细胞浸润, 病变区血管壁油红 O 染色阳性。部分心肌坏死, 心肌间质有大量炎细胞浸润, 主要为淋巴细胞(图 1D~F)。病变心肌组织油红 O 染色呈阳性。

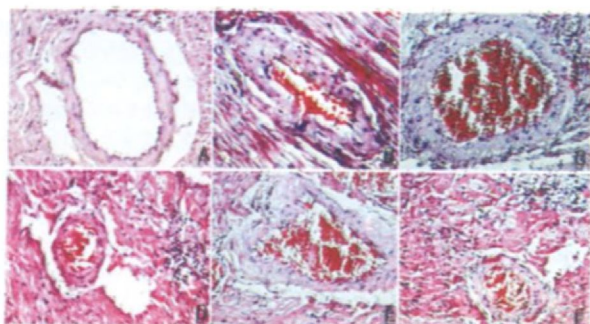


图 1. 各组冠状动脉的病理变化(HE  $\times 200$ ) A 为对照组; B 和 C 为高脂组; D、E 和 F 为高脂加应激组。

## 2.6 冠状动脉粥样硬化危险因素分析

根据 3 组的比较结果, 将存在显著差异的 TC、TG、LDL、TNF- $\alpha$ 、TXB2、IL-6 以及慢性应激进行等级回归分析, 以冠状 As 病变为因变量 TC、TG、LDL、TNF- $\alpha$ 、TXB2、IL-6 以及慢性应激(1 为应激; 2 为无应激)为自变量, 按  $\alpha = 0.05$  检验标准, TC、慢性应激进入方程。等级回归显示上述变量存在时可增加冠状 As 病变风险(见表 3)。

## 3 讨论

与冠心病密切相关的精神因素主要是慢性应

表 3. 冠状动脉粥样硬化危险因素分析

自变量	参数估计值 (Estimate)	参数估计值 标准误(Std. Error)	WALD (WALD 统计量)	P 值
TC	32.58	16.37	4.94	< 0.05
慢性应激	20.62	9.92	4.32	< 0.05

激, 本研究参照 Carter 等<sup>[1]</sup>的慢性多相应激法并加以改良, 采用随机的限制、旋转、拥挤三种方法造成长期、温和且不可预测的应激环境, 一方面减少了因应激方法本身直接导致的血管损伤可能, 另一方面则模拟了类似人类所面临的慢性应激, 如职业应激、长期的婚姻冲突<sup>[2]</sup>等。结果显示这种应激模式具有可行性, 大鼠对此模式无法适应, 结合高脂饮食及腹腔维生素 D 注射, 既而产生致病效应。

大鼠是较为理想的动脉粥样硬化动物模型。本研究采用杨鹏远等<sup>[3]</sup>的动脉粥样硬化大鼠模型建模方法, 以其成功建立动脉粥样硬化模型的 6 周时间, 将注射维生素 D 和高脂饲料诱导相结合, 通过钙超负荷的方法, 使动脉发生钙化, 进一步促进动脉粥样硬化的形成, 避免了单纯高脂饲料很难诱导大鼠动脉粥样硬化形成的问题。

本研究显示, 高脂加应激组与高脂组均形成冠状动脉粥样硬化早期病变。但高脂加应激组除冠状动脉壁呈不规则增厚, 内有脂质沉积外, 还伴有纤维组织增生和炎细胞浸润, 部分心肌坏死, 心肌间质有大量炎细胞浸润。该组病变较高脂组加重, 提示慢性应激可促进冠状动脉粥样硬化的发展, 与相关文献报道一致<sup>[4,5]</sup>。其心肌坏死并非管壁狭窄堵塞所致, 考虑可能与慢性应激环境下, 儿茶酚胺释放增加, 促使交感张力亢进, 心率变异性降低, 促发冠状动脉痉挛、诱发心肌缺血有关<sup>[6]</sup>。而本研究发现病变的血管主要分布于冠状动脉中、小分支, 可能与大鼠的抗动脉粥样硬化特性有关<sup>[7]</sup>。

本研究显示, 高脂加应激组 TXB2、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度均高于高脂组和对照组, 而对照组与高脂组间差异无显著性。慢性应激与 TXB2、TNF- $\alpha$  呈正相关。提示慢性应激可能通过增强细胞因子介导的炎症反应、活化血小板、损害内皮细胞功能等微观效应促进冠状动脉粥样硬化的发展<sup>[8,9]</sup>。白细胞介素 6、TNF- $\alpha$  作为介导机体炎症反应的关键细胞因子, 在应激等诱导因素作用下, 促进单核细胞向内膜下迁移, 促使内皮细胞表达多种黏附分子和趋化因子, 增加炎症细胞、血小板的黏附, 刺激机体表达纤溶酶原激活抑制物, 提高机体的高凝状态, 促进动脉粥样硬



化的发展<sup>[10,11]</sup>。而由血小板合成并释放的TXA<sub>2</sub>及其代谢物TXB<sub>2</sub>,作为血小板活化的一个标志物,具有强烈的促血小板聚集和缩血管作用,TXB<sub>2</sub>释放增多,可引起血管痉挛,血小板聚集和TXB<sub>2</sub>释放则是诱发血栓、导致和加重冠状动脉粥样硬化的另一重要原因<sup>[12,13]</sup>。国内有文献显示精神应激能显著提高CD41和CD62P的阳性率而活化血小板,进而促进冠状动脉粥样硬化的形成<sup>[9]</sup>。此外,本研究发现TNF- $\alpha$ 与TXB<sub>2</sub>正相关,说明细胞因子与血管活性物质之间关系密切,而慢性应激参与的非单一途径,可能是上述机制的交互作用所致。

本研究显示,高脂加应激组的TC和LDL浓度明显高于对照组,高脂组的TC、LDL和TG浓度高于对照组,而高脂加应激组与高脂组比较则差异无显著性。此外,慢性应激与TC呈正相关。提示脂质代谢紊乱尤其是TC增高仍是动脉粥样硬化发生的主要因素。在长期喂食高脂饲料的基础上,脂肪的生成显著增加,是动脉粥样硬化形成的基本条件。而慢性应激在动脉粥样硬化形成中可能也参与了扰乱脂质代谢的过程:一方面应激状态下,TXB<sub>2</sub>、白细胞介素6、TNF- $\alpha$ 等浓度增高,刺激脂肪水解,游离脂肪酸增多,提高了血脂浓度;另一方面,糖皮质激素、儿茶酚胺等主要应激激素以及胰高血糖素、生长激素的释放使肝细胞中LDL的结合、降解减少<sup>[8,13]</sup>。

综上所述,慢性应激可促进冠状动脉粥样硬化的发展,并可能通过扰乱脂质代谢、增强细胞因子介导的炎症反应、活化血小板等方面影响冠状动脉粥样硬化的发生和发展。本研究通过等级回归,显示除TC外,慢性应激可增加冠状动脉粥样硬化病变风险。此结论与国内外报道一致<sup>[2,14]</sup>。

诚然,本研究尚不尽完善,如将丙基硫氧嘧啶加

入高脂饲料中,导致饲料味道苦涩,影响大鼠食欲,使所测TG水平较低,未形成典型的动脉粥样硬化斑块。还有本研究样本量较小,研究时间较短。今后应扩大样本,延长研究时间,调整饲料的喂食方法,则研究更加完善。

#### [参考文献]

- [1] Carder WR, Herman J, Stokes K. Promotion of diabetes onset by stress in SD rat [J]. *Diabetologia*, 1987, **30** (9): 674-677.
- [2] Matthews KA, Gump BB. Chronic work stress and marital dissolution increase risk of posttrial mortality in men from the Multiple Risk Factor Intervention Trial [J]. *Arch Intern Med*, 2002, **162** (3): 309-315.
- [3] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, **24** (7): 802-804.
- [4] Bacon SL, Sherwood A, Hinderliter AL, et al. Change in plasma volume associated with mental stress ischemia in patients with coronary artery disease [J]. *Int J Psychophysiol*, 2006, **61** (2): 143-145.
- [5] Akinboboye O, Krantz DS, Kop WJ, et al. Comparison of mental stress-induced myocardial ischemia in coronary artery disease patients with versus without left ventricular dysfunction [J]. *Am J Cardiol*, 2005, **95** (3): 322-324.
- [6] 杨菊贤, 卓杨. 心理行为应激诱发的心源性猝死[J]. 国际心血管病杂志, 2006, **33** (4): 217-219.
- [7] 刘磊, 焦向英, 张炜芳, 等. 高脂饲料及维生素D<sub>3</sub>联合应用建立大鼠动脉粥样硬化模型[J]. 山西医科大学学报, 2005, **36** (6): 681-683.
- [8] 李卫晖, 李凌江. 精神应激与冠心病的发病机制[J]. 中国心理卫生杂志, 2004, **18** (2): 135-137.
- [9] 樊民, 黄佐, 任雨笙, 等. 冠心病患者血小板功能在精神应激后的变化[J]. 心脏杂志, 2006, **18** (1): 76-78.
- [10] 王易, 杨跃进. 细胞因子在冠心病中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 2003, **31** (12): 950-952.
- [11] 云伟, 于艳秋, 卢晓梅, 等. 小鼠心肌梗死后肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素6和白细胞介素10表达变化及心肌病理变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **15** (4): 245-247.
- [12] 范甲卯, 张健, 谢权. 冠心病、急性心肌梗死患者血浆中血栓素、前列腺素的水平及临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, **5** (5): 539-541.
- [13] 马承恩, 王可富, 徐冬玲, 等. 急性冠状动脉综合征患者血液凝固性加强[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **14** (5): 438-440.
- [14] Blumenthal JA, Sherwood AB, Babyak MA, et al. Effects of exercise and stress management training on markers of cardiovascular risk in patients with ischemic heart disease: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2002, **293** (13): 1626-629.

(此文编辑 李小玲)