

高脂血症对移植前静脉内皮功能和组织形态的影响

褚红军¹, 于伟勇^{1*}, 纪广玉¹, 邹良建¹, 徐志云¹, 滕忠照²

(1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433; 2. 西班牙萨拉哥萨大学机械工程系, 西班牙 萨拉哥萨 50018)

[摘要] **目的:** 研究静脉移植前高脂血症对静脉内皮功能和组织形态的影响。**方法:** 成年雄性健康家兔 50 只, 随机分为对照组(普通饮食)和实验组(高脂饮食), 每组 25 只; 分别在实验前和喂养 2 周、4 周、8 周、12 周末, 采集血样本和获取颈内静脉标本, 酶标法检测血脂水平。获取静脉标本前行超声多普勒检查观察其管壁厚度、管腔内径变化以及有无脂质或粥样硬化斑块等。免疫组化法检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达, 硝酸还原酶法检测一氧化氮(NO)生成量, 同时进行病理组织学检查。**结果:** (1) 高脂喂养 8 周血脂升高异常显著($P < 0.01$), 并稳定于此较高水平, 同时出现颈动脉脂质斑块。(2) 高脂血症兔颈内静脉 eNOS 蛋白表达、NO 生成量显著降低($P < 0.05$), 可见内皮剥脱、弹力纤维明显减少甚至消失, 未见泡沫细胞和粥样斑块。**结论:** 高脂血症可导致静脉内皮功能不全和组织形态学异常。

[关键词] 高脂血症; 静脉; 内皮型一氧化氮合酶; 一氧化氮

[中图分类号] R 589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0068-03

Effect of hyperlipemia on endothelial function and histomorphology of venous conduit in rabbits before grafting

CHU Hong-jun¹, YU Wei-yong^{1*}, JI Guang-yu¹, ZOU Liang-jian¹, XU Zhi-yun¹, TENG Zhong-zhao² (1. Department of Cardiovascular Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Mechanical Engineering, Zaragoza University, Spain Zaragoza 50018)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of hyperlipemia on endothelial function and histomorphology of venous conduit in rabbits before grafting. **Methods:** Fifty adult male rabbits were randomly divided into 2 groups; one group was fed with normal diet (control group, $n=25$) and the other with high-cholesterol diet (hyperlipemia group, $n=25$). The blood samples and cervical vein specimens were harvested before and 2, 4, 8 and 12 weeks after feeding. The serum levels of total cholesterol (TC), low-density lipoproteins (LDL), triglycerides (TG), and high-density lipoproteins (HDL) were determined. The expression of endothelial NO synthase (eNOS) protein, the production of NO, and the histopathological changes (including the thickness of intima and media, the diameters of the veins, and the presence of lipid or plaque) in the vein specimens were examined. **Results:** Eight weeks after feeding, the serum levels of TC, LDL, TG, and HDL in hyperlipemia group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). Obvious lipid plaques were formed in the carotid artery of rabbits in hyperlipemia group. The jugular veins of hyperlipemia rabbits had significantly lower eNOS expression and NO production ($P < 0.05$). Endothelial denudation was noticed and the elastic fibers almost disappeared in hyperlipemia group; there were no foam cells and lipid plaques. **Conclusion:** Hyperlipemia may result in endothelium dysfunction and histomorphological change of venous conduit.

[KEY WORDS] hyperlipidemia; veins; endothelial nitric oxide synthase; nitric oxide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 68-70]

目前, 自体静脉仍然是冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)最常用的桥血管材料, 高脂血症与冠心病(coronary heart disease, CHD)密切相关, CHD 患者多伴有高脂血症^[1]。本研究通过建立兔高脂血症模型, 观察高脂血症时自体静脉内皮功能和组织形态的变化, 以明确自体静脉在其移植前是否存在基础病变。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作及实验分组 成年雄性健康家兔 50 只, 体质量(2.25 ± 0.25) kg (第二军医大学实验动物中心), 随机分为对照组和高脂血症组, 每组

25 只; 对照组予以普通饮食, 每只每日喂饲基础饲料 100~120 g (兔基础饲料%: 小麦粉 39.2、大米 10.5、玉米粉 30.2、鱼粉 15.1、酵母粉 3.8、鱼肝油 0.7、精盐 0.5), 适当喂饲青草, 饮水不限。高脂血症组予以高脂饮食即除普通饮食外, 每只每日加喂胆固醇 1 g。分别在实验前和喂养 2、4、8、12 周末, 采集血样本和获取颈内静脉标本, 酶标法检测血脂水平。

1.2 超声多普勒检查 获取静脉标本前行超声多普勒检查观察其管壁厚度、管腔内径变化以及有无

[作者简介] 褚红军, 硕士。E-mail: drhjchu35@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: drwyyu@yahoo.com.cn

脂质或粥样硬化斑块。

1.3 内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达检测

应用兔 eNOS 多克隆特异性抗体(LAB VISION 公司),采用免疫组化染色法检测 eNOS 蛋白表达。结果判断:细胞核或胞质呈棕黄色颗粒的内皮细胞为阳性细胞,Leica 计算机图像分析仪检测其灰度值作为 eNOS 蛋白表达值。

1.4 一氧化氮(NO)生成量检测 将冻存的血管标本复温,切成若干小块并称量;将标本置于 96 孔板的各个孔中,加入等量含 5%FBS 的 DMEM 培养基,在 37℃、95%O₂/5%CO₂条件下振荡孵育 6 h。取离心后的孵育液应用硝酸还原酶法测定标本中 NO²⁻含量以代表 NO 生成量,NO 检测试剂盒由碧云天公司提供。

1.5 病理组织学检查 采用油红“O”染色观察组织中脂质沉积情况,H-E 染色观察组织细胞变化,使用 Leica 图像分析系统测量内、中膜厚度,VB 染色观察弹力和胶原纤维分布。应用兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(DAKO 公司)检测内皮细胞完整性。

1.6 统计学处理 实验数据除标本的内、中膜厚度用 $\bar{x} \pm s_x$ 表示外,其余数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Student's *t* 检验、方差分析(ANOVA)和 SNK-*q* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 高脂血症兔的血脂变化 总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)在进入实验前两组间无显著差异。对照组血脂水平稳定,各时间点之间无显著差异。高脂血症组 TC 在 2 周时与实验前和对照组无显著差异,4 周时显著升高($P < 0.05$),约为高脂喂养前的 1.44 倍,而 8 周时约为高脂喂养前的 10.31 倍,与实验前和对照组比较差异非常显著($P < 0.01$),但与 12 周无显著差异。TG、HDL 和 LDL 的变化趋势与 TC 相似,8 周时达到相对高峰分别为高脂喂养前的 3.51、3.85 和 15.61 倍,与 12 周亦无显著差异。见图 1。

2.2 超声多普勒检查 两组颈内静脉均未见管壁明显增厚、管腔狭窄和脂质斑块。而颈动脉在高脂喂养 8 周时出现脂质斑块,高脂喂养 12 周脂质斑块更为明显。

2.3 eNOS 蛋白表达的变化 eNOS 在两组颈内静脉内膜均有明显表达。对照组 eNOS 稳定在基础表达量,各时间点之间无显著差异。高脂血症组 2 周时显著高于基础表达量,差异非常显著($P < 0.01$),4 周仍明显高于基础表达量($P < 0.05$),4 周后逐渐下降,到 8 周、12 周时已较基础表达量明显降低

($P < 0.05$)。详见图 2。

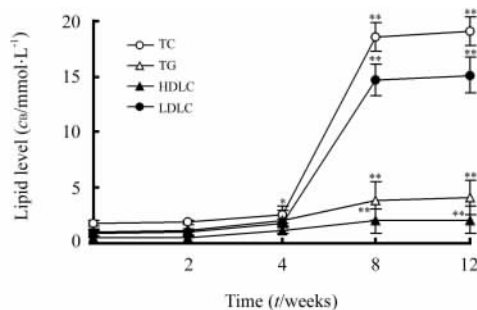


图 1 高脂血症组血脂变化

Fig 1 Changes of lipid profile in hyperlipemia group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 week

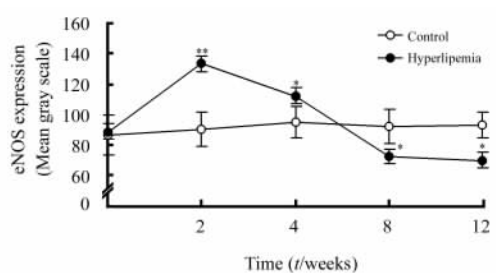


图 2 高脂血症对兔颈内静脉 eNOS 蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of hyperlipemia on eNOS expression of jugular vein in rabbits

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 NO 生成量的变化 实验前两组间无显著差异。对照组各时间点之间无显著差异。高脂血症组 2 周时显著增加($P < 0.01$),4 周仍较实验前和对照组显著增加($P < 0.05$),4 周后逐渐减少,至 8 周、12 周时已较实验前和对照组显著减少($P < 0.05$)。详见图 3。

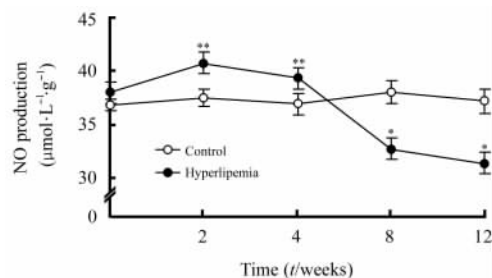


图 3 高脂血症对兔颈内静脉 NO 生成量的影响

Fig 3 Effect of hyperlipemia on NO production in jugular veins in rabbits

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.5 病理组织学变化 对照组未见异常改变,高脂血症组在整个实验过程中内、中膜未见明显增厚,高

脂喂养8周、12周偶见内皮剥脱,有少量脂质沉积在内、中膜,未见泡沫细胞,未见脂质和(或)粥样硬化斑块,中膜弹力纤维明显减少甚至消失。见图4、图5。

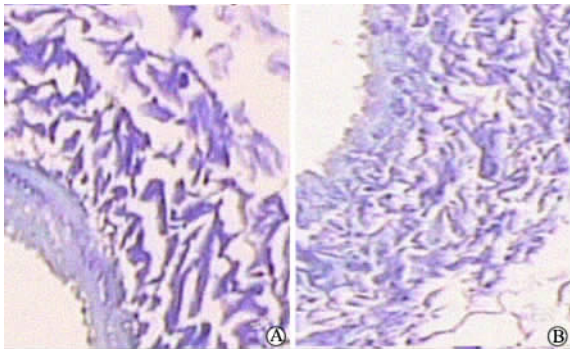


图4 颈内静脉胶原、弹力纤维改变
Fig 4 Collagen fibers and elastic fibers in jugular veins in rabbits(VB, ×200)

A: Control group, elastic fiber was found; B: Hyperlipemia group, no elastic fiber or hyperplasia of collagen fiber was found 12 weeks after high-cholesterol diet

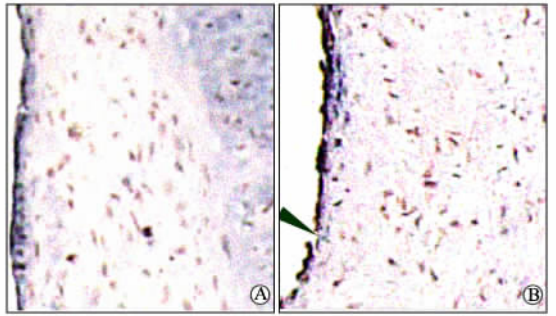


图5 颈内静脉内皮细胞改变
Fig 5 Changes of endothelium cells (Ⅷ factor, ×200)

A: Control group, no endothelium denudation; B: Hyperlipemia group, endothelium denudation was found

3 讨论

高脂血症造成动脉内皮功能受损的原因是内皮细胞 NO 代谢异常,主要表现为内皮依赖性舒张功能的调节受损。而静脉因其本身的结构和功能特性和所处的力学环境与动脉有所不同,高脂血症时其内皮功能变化可能与动脉有所不同。本研究发现颈内静脉 eNOS 蛋白表达、NO 生成量在高脂喂养初期(高脂喂养2周)显著升高,高脂喂养4周有下降趋势但仍高于正常,但至高脂喂养8周、12周时则明显下降且低于正常。说明在形成稳定高血脂之前机体处于代偿状态,通过增加颈内静脉 eNOS 蛋白表达,使 NO 生成量增加,以维持正常的血管舒缩功能;形成稳定高血脂后机体已处于失代偿阶段,颈内静脉 eNOS 蛋白表达和 NO 生成量均下降,表明形

成稳定高血脂后静脉存在与 NO 代谢异常密切相关的内皮功能障碍。高脂血症时 NO 生成量减少的可能原因有:(1)低密度脂蛋白胆固醇和氧化型低密度脂蛋白胆固醇通过减少左旋精氨酸的吸收,使 eNOS 的作用底物减少,从而抑制 NO 的生成^[2];(2)高脂血症时高脂内环境下存在 eNOS 蛋白表达降低和(或)eNOS 活性降低^[3],导致 NO 生成量降低;(3)血管内皮细胞在高脂血症时释放 NO 的储备能力下降^[4];(4)随着血脂的升高,血管内皮及其周围的巨噬细胞和/或其他炎性细胞增多,这些细胞释放的超氧阴离子对 NO 的降解作用增强。

Vanhoutte^[5]研究显示高脂血症对血管内皮的损害在早期主要是内皮功能异常而解剖学无明显变化,而侯旭敏等^[6]的研究显示高脂血症可明显损伤动脉内皮细胞,造成内皮脱落、超微结构损害,刺激内膜增生。本研究发现高脂血症可使静脉内、中膜少量脂质沉积,弹力纤维明显减少甚至消失,偶见内皮剥脱,未见泡沫细胞;表明高脂血症时静脉不仅内皮功能受损,而且出现组织形态异常,但其改变程度较动脉轻得多(高脂血症时动脉内膜增生,可见内皮细胞脱落、大量泡沫细胞聚集、脂质斑块沉积、液化坏死灶和钙化等^[6-7])。静脉的内皮功能受损以及弹力纤维的减少甚至消失将影响其力学性质,力学性质的改变在原有的静脉环境下可能无明显功能影响,但若将其作为桥血管材料移植到动脉系统,将会严重影响移植静脉的重塑,甚至可能易导致移植静脉再狭窄。因此,对于存在基础病变的移植静脉应采取有效的保护措施,以提高其近、远期通畅率。

[参考文献]

- [1] 屈建锋,刘小冬,刘芬儒,等. 超声评价高脂血症患者肱动脉内皮功能[J]. 中国超声诊断杂志, 2005, 6: 177-179.
- [2] 陈凯,张雁芳,王倩,等. 高胆固醇饲养兔胸主动脉和大鼠诱发高血脂和动脉粥样硬化的特征[J]. 解放军药理学学报, 2001, 17: 117-120, 124.
- [3] Aliev G, Smith MA, Turmaine M, et al. Atherosclerotic lesions are associated with increased immunoreactivity for inducible nitric oxide synthase and endothelin-1 in thoracic aortic intimal cells of hyperlipidemic watanabe rabbits[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 71: 40-54.
- [4] 刘群峰,马虹,周少春,等. 高脂饮食兔血管内皮功能障碍的早期变化[J]. 心脏杂志, 2001, 13: 352-353, 356.
- [5] Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. Eur Heart J, 1997, 18(Suppl E): E19-E29.
- [6] 侯旭敏,倪唤春,罗心平,等. 珍菊降压片对高脂血症兔内皮功能的改善作用[J]. 中西医结合学报, 2004, 2: 111-114.
- [7] 戴顺龄,段金虹,陆媛,等. 新的植物雌激素α玉米赤霉醇明显抑制实验性动脉粥样硬化发病进程[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11: 385-390.

[收稿日期] 2006-10-28

[修回日期] 2006-12-18

[本文编辑] 孙岩