

·基础研究·

慢性增强型体外反搏对高胆固醇血症猪血管 内皮细胞凋亡的影响

熊 艳¹, 何小洪¹, 罗景云¹, 马 虹¹, 谢 强², 方典秋², 刘东红³, 王奎健⁴, 伍贵富¹, 陈国伟¹, 郑振声²
(中山大学 1. 附属第一医院心血管医学部心内科, 2. 卫生部辅助循环重点实验室, 3. 附属第一医院超声科,
4. 生物医学工程教研室, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】探讨慢性增强型体外反搏对高胆固醇血症猪主动脉血管内皮细胞凋亡的影响。【方法】18 头雄性乳猪随机分为正常饲养组(n=6), 高脂饲养组(n=6) 及高脂饲养+反搏组(n=6)。后 2 组复制高胆固醇血症猪模型并对高脂饲养+反搏组进行为时 36 h 的慢性增强型体外反搏, 收集 3 组动物主动脉血管内皮细胞, TUNEL 法测定其主动脉血管内皮细胞的凋亡指数。【结果】与正常饲养组相比, 高脂饲养组和高脂饲养+反搏组血清总胆固醇和低密度脂蛋白明显升高。主动脉血管内皮细胞凋亡指数在正常饲养组为(127±36)%, 在高脂饲养组为(237±23)%, 在高脂饲养+反搏组为(177±12)%, 高脂饲养组和高脂饲养+反搏组较正常饲养组明显升高(P<0.05), 高脂饲养+反搏组较高脂饲养组明显降低(P<0.05)。【结论】高胆固醇血症刺激血管内皮细胞凋亡, 慢性增强型体外反搏通过减轻血管内皮细胞凋亡拮抗高胆固醇血症对血管内皮的损伤作用。

关键词: 增强型体外反搏; 高胆固醇血症; 内皮细胞; 凋亡

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0610-04

Effect of Long-term EECP on Apoptosis of Vascular Endothelial Cells in Porcine Aorta with Hypercholesterolemia

XIONG Yan¹, HE Xiao-hong¹, LUO Jing-yun¹, MA Hong¹, XIE Qiang², FANG Dian-qiu²,
LIU Dong-hong³, WANG Kui-jian⁴, WU Gui-fu¹, CHEN Guo-wei¹, ZHENG Zhen-sheng²

(1.Department of Cardiology, 2.The Key Laboratory on Assisted Circulation of Health Ministry, 3.Department of Ultrasonic Medicine, The First Affiliated Hospital, 4.Department of Biomedical Engineering, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To explore the effect of long-term enhanced external counterpulsation (EECP) on apoptosis of vascular endothelial cells in the aorta of hypercholesterolemic pigs. 【Methods】Eighteen male infant pigs were randomly divided into 3 groups according to their chow diet: the normal control group (n=6), the hypercholesterolemic control group (n=6) and the hypercholesterolemic + EECP group(n=6). After having performed EECP for 36 hours on the hypercholesterolemic + EECP group(n=6), we harvested the vascular endothelial cells from the aorta of three groups of pigs and detected their apoptosis indexes by TUNEL. 【Results】The apoptosis indexes in vascular endothelial cells of both the hypercholesterolemic control group and the hypercholesterolemic + EECP group were significantly higher than that of the normal control group [(237±23)%, (177±12)% vs. (127±36)%, respectively, P<0.05]. The apoptosis index of the hypercholesterolemic +EECP group was obviously lower compared with that of the hypercholesterolemic control group (P<0.05). 【Conclusion】Long-term EECP may protect vascular endothelial cells from the damage resulting from hypercholesterolemia by reducing the apoptosis of vascular endothelial cells.

Key words: enhanced external counterpulsation; hypercholesterolemia; endothelial cell; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):610-613]

收稿日期: 2006-05-22

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划基金资助项目(2001BA706B07); 国家自然科学基金重点项目仪器专项基金资助(30127001)

作者简介: 熊 艳(1972-), 女, 湖南宁乡人, 博士生, 主治医师; 陈国伟, 教授, 导师; 伍贵富, 副教授, 通讯作者.E-mail: eecpchina@yahoo.com.cn

脂质代谢异常是动脉粥样硬化最重要的危险因素之一。脂蛋白胆固醇从不同途径损害血管内皮细胞的结构与功能,导致内皮剥脱及损伤部位低密度脂蛋白胆固醇沉积,白细胞、血小板和巨噬细胞被征募,被征募的巨噬细胞捕捉沉积的低密度脂蛋白胆固醇形成泡沫细胞,这是早期动脉粥样硬化病变的一个标志。在此过程中,内皮细胞凋亡增加可能是血脂紊乱导致动脉粥样硬化发生的最早步骤,也是形成易损粥样斑块的重要环节^[1]。体外细胞培养发现,提高血流切应力能够减少内皮细胞的凋亡^[2],但尚无在体的实验研究证实这种作用。体外反搏能明显提高动脉血管的血流切应力,并影响部分内皮相关因子的表达,因而推测体外反搏疗法可能是保护血管内皮功能的方法之一,但具体的机制尚待明瞭。本研究复制猪高胆固醇血症模型,探讨体外反搏对高胆固醇血症猪内皮细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 高胆固醇血症猪模型的建立

猪龄 20 d 雄性乳猪共 18 头,随机分为正常饲养、高脂饲养和高脂饲养+体外反搏 3 组。正常饲养的基础饲料主要成分为:玉米、大豆粉、鱼粉,按 50 g/(kg·d) 给予。高脂饲养的饲料除含以上成分外按以下顺序添加胆固醇、猪油、蛋黄粉和食盐。初始:基础饲料加 2%胆固醇、4%猪油、6%蛋黄粉、1%食盐;半月后:基础饲料加 3%胆固醇、6%猪油、8%蛋黄粉、1.2%食盐;再半月后:基础饲料加 4%胆固醇、8%猪油、10%蛋黄粉、1.5%食盐直至实验结束。

饲养过程中监测体质量并于高脂饲养前、反搏前、反搏结束从猪肘静脉抽血检测血脂水平。

1.2 体外反搏方案

从 3 月龄开始,对“高脂饲养+体外反搏组”进行体外反搏。速眠新(2.0~3.0 mL,肌肉注射)和戊巴比妥钠(30 mg/kg,分次静脉注射)麻醉后,动物取右侧卧位,以 0.04 MPa/cm² 压力反搏,每次 2 h,隔日 1 次,共计 36 h。

1.3 动脉血管内皮细胞的收集

完成 36 h 反搏,抽取外周静脉血后,立即用 100 mL/L 氯化钾心腔内注射处死动物。迅速取出主动脉,磷酸盐缓冲溶液(PBS)缓冲液冲洗,用胶原酶(购自 Sigma 公司)37 消化 15 min 后,收

集消化液,4 离心,取沉淀的内皮细胞,40 g/L 多聚甲醛固定 24 h,用移液枪吸取固定后的内皮细胞并转移到 30 g/L 半凝固状态琼脂糖中包裹,凝固完全后立即送中山大学病理实验室进行脱水、石蜡包埋和连续切片,片厚 4 μm。

1.4 内皮细胞凋亡的检测

在每个标本连续切片中随机抽取 1 张切片,进行凋亡的原位末端标记法(TUNEL 法)检测凋亡的内皮细胞,TUNEL 试剂盒购自德国 ROCHE 公司,按照试剂盒说明的实验步骤进行。染色后置玻片于光学显微镜高倍视野下观察,计算 100 个内皮细胞中染色阳性的细胞个数,随机选择 10 个高倍视野记数并取其总数值即为凋亡指数。

1.5 统计学分析

用 SPSS13.0 软件分析数据,全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用单因素方差分析(ONEWAY ANOVA),有统计学意义后进行 post-hoc 分析作组间比较。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 动物体质量变化

分组饲养前、反搏前和反搏结束时各组动物的体质量如表 1 所示,各时间点 3 组之间体质量差异无统计学意义(P > 0.05)。

表 1 3 组动物实验过程中体质量的变化

Table 1 Body mass during the process of the experiment among the three groups ($\bar{X} \pm s$, m/kg)

Group	Baseline	Pre-EECP	Post-EECP
Normal control	8.2 ± 1.2	32.7 ± 1.9	65.6 ± 2.7
Hypercholesterolemic control	8.0 ± 1.3	34.8 ± 2.4	67.5 ± 3.4
Hypercholesterolemic +EECP	8.3 ± 1.1	33.0 ± 1.8	66.8 ± 3.7

EECP: enhanced external counterpulsation

2.2 动物血脂变化

血清总胆固醇(cholesterone,Chol)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)水平在分组饲养前 3 组无显著性差异,反搏前期,反搏中期和反搏结束时,高脂饲养组与高脂饲养+反搏组血清总胆固醇和低密度脂蛋白较正常饲养组同时期均有显著性增高,表明通过高脂饲养成功建立猪高胆固醇血症疾病模型,如表 2 所示。

2.3 内皮细胞凋亡指数的变化

正常饲养组内皮细胞凋亡指数为 (127 ±

表 2 各组血清胆固醇和低密度脂蛋白水平的变化

Table 2 Changes of serum cholesterol and low density lipoprotein

 $(\bar{x} \pm s, c_b / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$

Group		Normal control	Hypercholesterolemic control	Hypercholesterolemic+EECP	F	P
Pre-EECP	Chol	2.03 ± 0.32	5.18 ± 0.34 ¹⁾	4.87 ± 0.49 ¹⁾	117.309	0.000
	LDL	1.11 ± 0.15	1.71 ± 0.35 ¹⁾	1.74 ± 0.32 ¹⁾	9.261	0.002
During EECP	Chol	2.05 ± 0.28	6.86 ± 0.75 ¹⁾	6.96 ± 0.70 ¹⁾	124.363	0.000
	LDL	1.17 ± 0.14	3.05 ± 0.65 ¹⁾	3.58 ± 0.60 ¹⁾	35.589	0.000
Post-EECP	Chol	2.02 ± 0.21	9.71 ± 0.73 ¹⁾	9.24 ± 0.88 ¹⁾	247.760	0.000
	LDL	1.10 ± 0.17	4.93 ± 0.62 ¹⁾	4.38 ± 0.66 ¹⁾	91.194	0.000

Chol: cholesterol; LDL: low density lipoprotein; EECP: enhanced external counterpulsation.

1) compared with normal control group, $P < 0.05$

36)%, 高脂饲养组为 (237 ± 23)%, 高脂饲养+反搏组为 (177 ± 12)%, 高脂饲养组和高脂饲养+反搏组内皮细胞凋亡指数显著高于正常饲养组, 经 36 h

体外反搏后, 高脂饲养+反搏组内皮细胞凋亡指数较高脂饲养组有显著降低 ($F=28.438, P < 0.05$), 如图 1 所示。

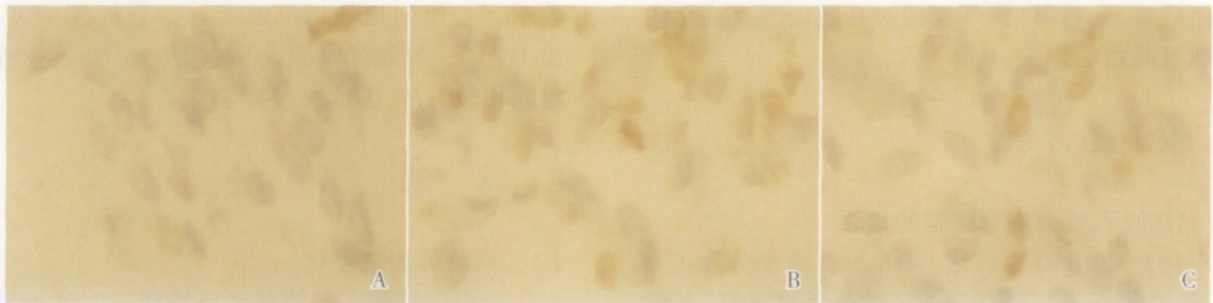


图 1 正常饲养组, 高脂饲养组和高脂饲养+反搏组内皮细胞凋亡

Fig.1 Apoptosis of vascular endothelial cells

Cells stained brown are apoptotic endothelial cells (TUNEL, $\times 400$)

A: normal control group; B: hypercholesterolemic control group; C: hypercholesterolemic + EECP group

3 讨论

慢性心脑血管病是当前威胁人类健康与寿命的主要疾病之一, 其主要的发病机理和病理基础是动脉粥样硬化形成。血脂紊乱尤其是低密度脂蛋白胆固醇升高与动脉粥样硬化发生明显相关。根据“损伤反应”假说, 在动脉粥样硬化发生机制的诸多环节中, 血管内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化形成和导致易损斑块的关键所在, 在动脉粥样硬化发生发展过程中起着扳机作用。内皮细胞损伤后, 白细胞、血小板和巨噬细胞被征募, 被征募的巨噬细胞捕捉沉积的低密度脂蛋白胆固醇形成泡沫细胞。血管内皮细胞凋亡已成为研究动脉粥样硬化发病与治疗的重要靶点之一^[1]。本研究通过复制高胆固醇血症猪模型, 用 TUNEL 法检测并证实了高胆固醇血症可刺激内皮细胞凋亡, 从而损

伤内皮结构与功能。

体外反搏技术通过在心脏舒张期序贯加压于躯体下肢与臀部, 提高心脏舒张期回心血流量, 增加冠状动脉血流灌注量, 同时在心脏舒张期明显地提高动脉血管的血流切应力, 促进损伤内皮细胞修复, 改善血管内皮细胞功能。近年来国内外临床观察结果提示, 体外反搏是目前有效治疗动脉粥样硬化性疾病尤其是冠状动脉粥样硬化性心脏病的无创疗法之一^[3-5]。然而体外反搏对血管内皮细胞作用的细胞分子机制和信号转导途径尚有待进一步阐明^[6,7]。离体实验表明, 提高血流切应力可以促进血管内皮细胞沿血流方向的梭形排列, 抗击血流冲击损伤, 促进血管内皮的自我修复能力, 抑制内皮细胞凋亡^[2]。国内王聪霞等^[8]报告通过检测体外反搏前后循环内皮细胞记数的改变, 推测体外反搏可能通过影响内皮细胞的凋亡逆转内皮细胞的功能障碍和损伤, 从而拮抗动脉粥样硬化

的发生和发展。卫生部辅助循环重点实验室何小洪、陈小林等^[9,10]分别利用基因芯片和蛋白质芯片技术,发现慢性体外反搏能够在转录和翻译水平上影响高胆固醇血症猪血管内皮细胞某些调控凋亡相关基因的表达,从而进一步推测慢性体外反搏可能从减轻血管内皮细胞凋亡的角度影响动脉粥样硬化病变的形成和发展。本研究通过对高胆固醇血症猪进行36h的体外反搏,用TUNEL法定量地测定主动脉血管内皮细胞的凋亡指数,从而首次从整体动物实验的水平证实了体外反搏通过减轻血管内皮细胞凋亡修复高胆固醇血症对内皮的损伤。这可能是长期体外反搏抗动脉粥样硬化的作用机制之一,但究竟哪些因子参与了抗凋亡的过程?其确切的分子机制和信号转导途径如何?还需要进一步研究。

(感谢辅助循环实验室钱月桃老师、凌桂芳护士长、戴刚技师、梁陆光技师、冯铭哲技师对本实验的大力支持与协助)

参考文献:

- [1] DIMMELER S, HERMANN C, ZEIHNER A M, et al. Apoptosis of endothelial cells :contribution to the pathophysiology of atherosclerosis [J]. Eur Cytokine Netw, 1998, 9(4):697- 698.
- [2] LI Y S, HAGA J H, CHIEN S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells[J]. J Biomech, 2005, 38(10) :1949- 1971.
- [3] ZHENG Z S. The past present and future of external counterpulsation [A]. ABSTRACTS: 2006 International External Counterpulsation Symposium [M]. Guangzhou: IECS, 2006: 1- 3.
- [4] THADANI U. Selection of optimal therapy for chronic stable angina [J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2006, 8(1):23- 35.
- [5] LAWSON W E, HUI J C, KENNARD E D, et al. Two-year outcomes in patients with mild refractory angina treated with enhanced external counterpulsation [J]. Clin Cardiol, 2006, 29(2):69- 73.
- [6] FELDMAN A M. Enhanced external counterpulsation: mechanism of action [J]. Clin Cardiol, 2002, 25(12): 1111- 15.
- [7] 伍贵富,杜志民,方典秋,等.体外反搏的生物力学效应与血管内皮功能[J].中山大学学报:医学科学版, 2005, 26(2) : 121- 124.
- [8] 王聪霞,孙济川,田清海,等.体外反搏对冠心病患者血清内皮素和循环内皮细胞的影响[J].临床心血管病杂志, 1996, 12(5): 322- 323.
- [9] 何小洪,张 焰,陈小林,等.长期体外反搏对高胆固醇血症猪血管内皮细胞的保护作用及机制[J].中国康复医学杂志, 2005, 20(10): 730- 733.
- [10] 陈小林,何小洪,张 焰,等.慢性体外反搏对高胆固醇血症猪动脉内皮细胞的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(12) : 1491- 1493.

(编辑 黄小延)

· 简 讯 ·

中山大学许庚教授赴德国进行手术教学

带领 32 名外国医生进行手术训练,是我国耳鼻喉科专家首次到发达国家进行手术教学

今年 9 月 8- 13 日,应德国马堡大学邀请,中山大学耳鼻喉科医院院长、全国鼻科学组组长许庚教授赴德国担任第七期国际鼻内镜微创手术培训班讲学主讲人,并带领来自欧洲、非洲的 32 名医生进行尸体手术训练,同时作了 5 例慢性鼻窦炎、鼻息肉病人的现场手术示范。这是我国耳鼻喉科专家首次被发达国家邀请进行临床手术教学和培训,标志着我国鼻内镜外科的理论研究与临床技术已经走到国际前沿。许庚教授是我国鼻内镜微创外科学创始人和奠基人,早在 1990 年,他把这项先进技术带回国内,使慢性鼻窦炎、鼻息肉的手术治愈率从传统手术的不足 30%提升到 90%左右,成为我院耳鼻喉科专业的支柱技术。15 年来,该院举办了 36 期技术培训班,为国内、港澳台与东南亚培训专业技术人员超过 5 000 人次。近年来他们与国外著名院校和专家建立了紧密的联系和合作,使国际学术界对我国这项技术的发展更加了解。

(医 讯)