

· 论 著 ·

全反式维 A 酸对兔动脉粥样硬化病灶中 NF- κ B 和 P-选择素表达的影响

张玉保¹,董果雄^{1△},郭琳琳²,张社华³,姚如永⁴,冯培青¹

(青岛大学医学院:1. 附属医院心内科,山东青岛 266003;2. 附属心血管病医院,山东青岛 266071;3. 实验中心,山东青岛 266071;4. 附属医院中心实验室,山东青岛 266003)

摘要:目的 通过观察全反式维 A 酸(ATRA)对兔颈动脉粥样硬化病灶中内膜增生、核因子 κ B(NF- κ B)及 P-选择素表达的影响,探讨其可能的抗炎机制。**方法** 选择新西兰雄性大白兔 54 只,随机分为 3 组,每组 18 只,假手术组(A、B、C 组, $n=6$)、对照组(A、B、C 组, $n=6$)、治疗组(A、B、C 组, $n=6$)。假手术组给予普通饮食并分离暴露颈动脉但不损伤内膜;对照组给予高脂饮食,行动脉内膜空气干燥术损伤颈动脉内膜;治疗组给予 ATRA 灌胃,其余操作同对照组。分别于术后 7、14、28 d 处死 A、B、C 组动物,取病变血管进行形态学观察及测定,采用免疫组化法检测 NF- κ B 及 P-选择素表达水平。**结果** (1)假手术组未见内膜增生,NF- κ B 及 P-选择素仅有微量表达;(2)对照组术后 7 d 内膜开始增生,14、28 d 时内膜增生明显,管腔狭窄,管壁有粥样斑块形成,NF- κ B 及 P-选择素有大量表达;(3)治疗组内膜增生较轻,14、28 d 时内膜面积及斑块厚度显著低于对照组($P<0.05$),NF- κ B 及 P-选择素阳性表达指数也显著低于对照组($P<0.05$)。**结论** ATRA 能明显减轻动脉内膜损伤后病灶区域内膜增生,其机制可能是通过抑制 NF- κ B 的激活和表达,下调 NF- κ B 的靶基因 P-选择素的表达从而抑制炎症过程。

关键词: 维 A 酸;炎症;再狭窄;核因子 κ B;P-选择素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.25.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)25-2503-03

Effects of all-trans retinoic acid on the expressions of NF- κ B and P-selectin in atherosclerotic plaques in rabbits

Zhang Yubao¹, Dong Guoxiong^{1△}, Guo Linlin², Zhang Shehua³, Yao Ruyong⁴, Feng Peiqing¹

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital, Qingdao, Shandong 266003, China;

2. the Affiliated Cardiovascular Hospital, Qingdao, Shandong 266003, China;

3. Central Laboratory, Qingdao, Shandong 266003, China; 4. Department of Central

Laboratory, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: **Objective** By observing the influence of all-trans retinoic acid(ATRA) on intimal proliferation and the expression of NF- κ B and P-selectin in atherosclerotic plaques in rabbits to probe into the possible anti-inflammatory mechanism. **Methods** 54 New Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups: sham-operation groups(A, B, C), contrast groups(A, B, C), treatment groups(A, B, C). There were 6 rabbits in each group. The sham-operation groups were fed with conventional chow, and underwent surgery without endothelium injury; The contrast groups were fed with high cholesterol chow and subjected to carotid endothelial injury by air desiccation after 2 weeks; The treatment groups were administered ATRA daily by gavage, and other measures were the same as the contrast groups. The rabbits in groups A, B and C were killed respectively after 7, 14 and 28 days since the surgery. The carotid artery segments were harvested for histomorphometry observation and determination, and immunohistochemistry was used to detect the expressions of NF- κ B and P-selectin. **Results** (1)The thickening of intima was not found in the sham-operation groups and the expressions of NF- κ B and P-selectin was micro-scale. (2)In the contrast groups, the thickening of intima was found in carotid artery after 7 days since surgery, and severe thickening of intima and atherosclerotic plaques were found after 14, 28 days. The expressions of NF- κ B and P-selectin of contrast groups were significantly detected. (3)In the treatment groups, the intimal area, intimal/medial area ratio and maximum plaque thickness of the artery after 14, 28 days since the surgery were lower than the contrast groups($P<0.05$), and the expressions of NF- κ B and P-selectin were lower, too($P<0.05$). **Conclusion** The results show that ATRA can inhibit neointimal formation after carotid endothelial injury in rabbits, and the possible mechanism is that ATRA inhibits the activation and expression of NF- κ B and then decreases the expression of P-selectin which is regulated by NF- κ B and ultimately inhibits the inflammation.

Key words: retinoic acid; inflammation; restenosis; NF- κ B; P-selectin

再狭窄(restenosis, RS)是影响经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)及支架置入术后远期疗效的主要限制因素^[1]。炎症反应在再狭窄尤其是支架置入术后再狭窄的发生、发展过程中起着重要作用^[2]。随着对再狭窄分子机制研究的深入,人们发现参与再狭窄过程中的许多炎症因子都受到核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的调控,特别是多种黏附分子如 P-选择素、E-选择素、VCAM-1、ICAM-1 等。有研究发现,全反式维 A 酸(all-trans retinoic acid, ATRA)能通过抑制血管平滑肌细胞增殖信号传导途径而抑制平滑肌细胞增生^[3-5],但对其在动脉粥样硬化斑块形成过程中炎症反应的抑制作用却报道较少。

本研究通过建立兔颈动脉内膜损伤模型,观察 ATRA 对内膜损伤后粥样硬化病灶中内膜增生的抑制作用,探讨其可能的抗炎机制,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性新西兰大白兔 54 只(山东省农业科学院畜牧兽医研究所),许可证号:SCXK(鲁)20040013,体质量(2.2±0.12)kg。ATRA(山东良福制药有限公司)、胆固醇(上海如吉生物科技发展有限公司)、NF- κ B p65、P-选择素多克隆抗体浓缩型(武汉博士德公司)、PV-6001 二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥)、奥林巴斯 BX50 显微镜、Image-Pro Plus 图

△ 通讯作者, Tel:15066216969; E-mail: qydgx@public.qd.sd.cn.

像分析系统等。

1.2 动物分组及模型制作 将 54 只新西兰大白兔随机分为 3 组, 每组 18 只。假手术组(A、B、C 组, $n=6$)和对照组(A、B、C 组, $n=6$)和治疗组(A、B、C 组, $n=6$)。假手术组每日每只喂 150 g 基础饲料, 对照组和治疗组每日进食 150 g 高脂饲料(6%猪油、1.5%胆固醇、92.5%基础饲料), 均自由饮水。喂 2 周后假手术组分离暴露血管但不损伤内膜, 治疗组和对照组行颈动脉内膜空气干燥术^[6-7]。治疗组术前 3 d 开始给予 ATRA 6 mg/(kg·d), 溶于 1 mL 植物油中灌胃至处死, 对照组、假手术组给予等量植物油灌胃。

颈动脉内膜空气干燥术手术过程无菌操作。以 25%乌拉坦(1 g/kg)经耳缘静脉麻醉家兔后, 沿颈前正中中线剪开皮肤, 游离右颈总动脉 3~4 cm, 近心端和远心端用动脉夹临时夹闭, 以 4.5 号头皮针穿刺阻断血管的两端, 用生理盐水冲洗后向夹闭血管腔内注射空气, 持续时间 10 min。然后松开动脉夹压迫止血, 血流通畅后逐层缝合。术后每只大白兔每天肌内注射青霉素 40 万 U, 连续 3 d。于术后第 7、14、28 天分别处死 A、B、C 组动物, 取病变部位血管等距切分 4~5 段, 用 10%中性缓冲甲醛溶液固定, 石蜡包埋。血管标本横截面切片(4 μm)。

1.3 血管形态学测定 切片行 HE 染色, 显微镜下观察血管结构, 用 Image-Pro Plus 图像分析系统(IPP)进行图像分析, 测定各个血管截面的内膜面积(IA)、中膜面积(MA)、内/中膜面积比率(I/M), 取平均值。测量术后 14、28 d 处死兔颈动脉粥样硬化病变最厚处内弹力板至腔面垂直距离, 作为该例动物的最大斑块厚度。

1.4 免疫组化 用 SP 二步法进行 NF- κB p65、P-选择素免疫组化染色, 一抗稀释度均为 1:150, DAB 显色, 苏木素复染, NF- κB p65 胞核及胞质棕黄、棕褐色为阳性, P-选择素胞膜棕黄、棕褐色为阳性。PBS 代替一抗作阴性对照。用 IPP 进行图像分析, 随机测量每张切片 6 个高倍视野中阳性面积百分比及阳性染色的平均吸光度, 各取平均值, 用二者乘积再乘以 100 作为阳性表达指数。

1.5 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间用 t 检验及方差分析, 组间比较用 Student-Newman-Keuls 法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光学显微镜观察 (1)假手术组各组内膜结构完整连续, 紧贴于内弹力板; 内弹力板结构完整, 中膜层厚度均匀, 平滑肌细胞呈环形排列, 可见梭形胞核, 排列方向一致。(2)对照组 A 组内膜可见增生, 为单层至数层细胞; 内弹力板多处断裂, 可见平滑肌细胞穿过内弹力板, 中膜层近内弹力板处细胞外基质增多, 细胞排列紊乱。对照组 B 组内膜增生较 A 组明显加重, 粥样斑块形成, 平滑肌细胞聚积于内皮下, 尚可见炎症细胞浸润, 以内膜层为主; 内弹力板破坏更为严重, 中膜细胞排列更加紊乱。对照组 C 组粥样斑块向管腔隆起, 环形均匀性增厚和典型粥样硬化偏心性狭窄均可见, 内膜层可见大量泡沫细胞并有脂质池、脂质核心形成, 炎症细胞浸润更加严重; 中膜亦有平滑肌细胞向泡沫细胞转变。(3)治疗组各组与对照组相比, 其内膜增厚程度、平滑肌细胞增生移行程度、内弹力板破坏程度、炎症细胞浸润程度及细胞泡沫化程度均较轻。各组 IA、MA、I/M 见表 1。

2.2 粥样斑块厚度测定 治疗组 B 组最大斑块厚度为(0.08 \pm 0.02)mm, 小于对照组 B 组的(0.13 \pm 0.03)mm($t=3.397$, $P<0.05$)。对照组 C 组[(0.21 \pm 0.05)mm]与治疗组 C 组[(0.15 \pm 0.03)mm]最大斑块厚度比较差异有统计学意义($t=2.521$, $P<0.05$)。

2.3 免疫组化结果

2.3.1 NF- κB p65 的表达 假手术组各组内皮层及中膜细胞胞质内可见微量 NF- κB p65 表达。对照组 A 组中膜及内膜层细胞胞质和胞核内可见 NF- κB p65 多量表达, 以新生内膜为主。对照组 B、C 组 NF- κB p65 表达量增加, 泡沫细胞亦有表达。治疗组 NF- κB p65 表达规律与对照组相同, 但阳性表达指数低于对照组(表 2、插图 I 图 1)。

表 1 各组 IA、MA 及 I/M 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IA(mm ²)	MA(mm ²)	I/M
假手术组				
A 组	6	—	0.33 \pm 0.03	—
B 组	5	—	0.33 \pm 0.03	—
C 组	6	—	0.33 \pm 0.05	—
对照组				
A 组	6	0.07 \pm 0.01	0.36 \pm 0.05	0.21 \pm 0.05
B 组	6	0.22 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04	0.64 \pm 0.15
C 组	6	0.33 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04	0.97 \pm 0.08
治疗组				
A 组	6	0.06 \pm 0.01*	0.33 \pm 0.04*	0.19 \pm 0.04*
B 组	6	0.13 \pm 0.02 Δ	0.33 \pm 0.04	0.39 \pm 0.09 Δ
C 组	6	0.19 \pm 0.02 Δ	0.34 \pm 0.03	0.58 \pm 0.13 Δ

*: $P<0.05$, 与对照组 A 组比较; Δ : $P<0.05$, 与对照组比较; —: 表示无此项。

2.3.2 P-选择素的表达 假手术组各组内皮层可见微量 P-选择素表达。对照组 A 组内膜层及中膜层细胞膜可见 P-选择素大量表达, 内皮表面和移行的平滑肌细胞及浸润的炎症细胞膜表达更加明显。对照组 B、C 组 P-选择素持续高表达, 中膜平滑肌细胞、移行平滑肌细胞、内皮细胞、泡沫细胞均可见其表达。治疗组 P-选择素表达规律与对照组相同, 但阳性表达指数低于对照组(表 2、插图 I 图 2)。

表 2 ATRA 对兔颈动脉 NF- κB 、P-选择素表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NF- κB p65	P-选择素
对照组			
A 组	6	2.20 \pm 0.82	2.21 \pm 0.73
B 组	6	4.52 \pm 1.11	4.24 \pm 0.70
C 组	6	3.82 \pm 0.71	3.28 \pm 0.43
治疗组			
A 组	6	0.92 \pm 0.59 \blacklozenge	1.13 \pm 0.40 \blacklozenge
B 组	6	2.39 \pm 0.45 \blacktriangle	2.18 \pm 0.68 \blacktriangle
C 组	6	2.23 \pm 0.45 \blacksquare	2.14 \pm 0.46 \blacksquare

\blacklozenge : $P<0.05$, 与对照组 A 组比较; \blacktriangle : $P<0.05$ 与对照组 B 组比较; \blacksquare : $P<0.05$, 与对照组 C 组比较。

2.3.3 相关性分析 P-选择素表达水平与 NF- κB p65 表达水平呈显著正相关($r=0.832$, $P<0.05$)。

3 讨论

本研究应用高脂饮食联合内膜损伤法制作兔颈动脉粥样硬化狭窄模型, 模拟兔颈动脉粥样硬化形成的损伤和脂肪浸润学说, 以及 PTCA 术后再狭窄形成损伤学说, 结果显示, 对照组与治疗组显微镜下可见大量炎症细胞浸润, 提示粥样斑块形成过程中炎症可能起着重要作用, ATRA 能够减轻内膜增厚程度、平滑肌细胞增生移行程度、内弹力板破坏程度和炎症细胞浸润程度。ATRA 能明显抑制内膜增厚。本研究结果还表明内膜损伤后粥样硬化性狭窄的形成主要归因于内膜的增厚, 而血管中膜增厚并不明显。

有研究表明, 炎症反应在再狭窄的整个过程中起着重要作用^[2]。球囊损伤和支架置入引起的内膜增生在病理生理机制上有所不同, 支架置入术后炎症反应起着更为重要的作用^[8]。NF- κB 信号通路与动脉粥样硬化及再狭窄的关系越来越受到

关注^[9]。有研究证明,多种药物是通过抑制 NF- κ B 通路,影响炎症因子的表达发挥其抗粥样硬化及再狭窄的作用^[10-12]。P-选择素是一种重要的黏附分子,它的表达受 NF- κ B 的调控。P-选择素在血小板、内皮细胞、血管损伤后的平滑肌细胞、巨噬细胞、再生内皮细胞表面均有表达^[13]。有研究表明,P-选择素缺失小鼠血管损伤后新生内膜增生明显减少,证明 P-选择素在血管损伤反应中起重要作用^[14]。

本研究结果显示,NF- κ B 在正常血管即有少量表达,但主要集中在胞质。而对照组可见 NF- κ B 多量表达,平滑肌细胞、单核细胞和内皮细胞中均可以检测到 NF- κ B,而且胞质、胞核均有表达,胞核检测到 NF- κ B 提示 NF- κ B 处于激活状态。P-选择素在多种细胞胞膜上广泛表达。但是本研究中 P-选择素在粥样斑块形成过程中持续表达,与黏附分子主要参与动脉粥样硬化及再狭窄的早期过程的观点并不相符,提示 P-选择素在兔颈动脉粥样硬化及再狭窄的进展期同样发挥着重要作用。治疗组与对照组阳性表达指数比较结果表明 ATRA 能够下调 NF- κ B 和 P-选择素的表达。直线相关分析结果表明,NF- κ B 与 P-选择素的表达呈正相关,说明 ATRA 对 P-选择素的抑制作用可能是通过下调 NF- κ B 的表达实现的。金红芳等^[15]研究发现,ATRA 能够抑制 NF- κ B 的激活和表达,下调 NF- κ B 的靶基因的表达,从而有效抑制炎症。本研究结果与之相符。

综上所述,ATRA 通过抑制 NF- κ B 的激活和表达,下调 NF- κ B 的靶基因 P-选择素的表达,进而抑制病灶中的炎症过程,可能是抑制内皮损伤后内膜增生的机制之一。鉴于再狭窄过程炎症机制涉及多种信号通路及促炎性细胞因子,故对于 ATRA 抑制炎症反应的机制还需要进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 王国栋,褚现明,郭英华,等. ATRA 对兔颈动脉粥样硬化性狭窄中平滑肌细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志,2005,5(1):418-420.
- [2] Costa MA, Simon DI. Molecular Basis of Restenosis and Drug-Eluting Stents[J]. *Circulation*, 2005, 11(17):2257-2273.
- [3] 张社华,王旖旎,郭琳琳,等. ATRA 对兔颈动脉粥样硬化病灶 VSMC 增殖信号传导途径的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志,2007,7(1):30-33.
- [4] 郭琳琳,董果雄,张社华,等. ATRA 对兔颈动脉粥样硬化病变中 C-myc 表达及血管平滑肌细胞增生的影响[J]. 复旦学报:医学版,2006,33(4):526-529.
- [5] 张青青,董果雄,张社华,等. ATRA 对兔颈动脉粥样硬化

病灶 VSMC 增殖及 E2F1 表达的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志,2009,9(5):282-286.

- [6] 徐永革,周定标,郑集义,等. 颈动脉粥样硬化性狭窄动物模型的建立[J]. 中华神经外科杂志,2003,19(4):255-258.
- [7] 王凯,王涛,张占普,等. 颈动脉狭窄动物模型的构建及核因子- κ B 和胰岛素样生长因子-1 的表达[J]. 中华神经科杂志,2009,42(12):813-818.
- [8] Toutouzas K, Colombo A, Stefanadis C. Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions[J]. *Eur Heart J*, 2004, 25(19):1679-1687.
- [9] Ohtani K, Egashira K, Nakano K, et al. Stent-Based Local Delivery of Nuclear Factor- κ B Decoy Attenuates In-Stent Restenosis in Hypercholesterolemic Rabbits[J]. *Circulation*, 2006, 114(25):2773-2779.
- [10] 马志强,成蓓,曾永利,等. 缬沙坦对动脉粥样硬化兔核因子- κ B 和单核细胞趋化因子-1 的影响[J]. 微循环学杂志,2008,18(3):28-31.
- [11] Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Mahidhara RS, et al. Overexpression of mutated IkappaB alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation[J]. *J Vasc Surg*, 2003, 38(4):812-819.
- [12] Cui R, Tieu B, Recinos A, et al. RhoA Mediates Angiotensin II-Induced Phospho-Ser536 Nuclear Factor κ B/RelA Subunit Exchange on the Interleukin-6 Promoter in VSMCs [J]. *Circ Res*, 2006, 99(7):723-730.
- [13] Li GH, Sanders JM, Phan ET, et al. Arterial Macrophages and Regenerating Endothelial Cells Express P-Selectin in Atherosclerosis-Prone Apolipoprotein E-Deficient Mice [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(6):1511-1518.
- [14] Smyth SS, Reis ED, Zhang W, et al. Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury[J]. *Circulation*, 2001, 103(20):2501-2507.
- [15] 金红芳,方红,王宏伟. ATRA 抗支气管哮喘大鼠气道炎症的作用及机制[J]. 中华结核和呼吸杂志,2004,27(4):280-281.

(收稿日期:2011-04-20 修回日期:2011-05-21)

(上接第 2502 页)

- [6] Mayer TG, Vanharanta H, Gatchel RJ, et al. Comparison of CT scan muscle measurements and isokinetic trunk strength in postoperative patients[J]. *Spine*, 1989, 14(1):33-36.
- [7] Fujita T, Kanbara M. RIR and electromyographic assessment of paravertebral muscle damage in posterior lumbar surgery[J]. *Cen Jpn J Orthp Surg*, 1996, 39(1):319.
- [8] Boelderl A, Daniaux H, Kathrein A, et al. Danger of damaging the medial branches of the posterior rami of spinal nerves during a dorsomedian approach to the spine[J]. *Clin Anat*, 2002, 15(2):77-81.
- [9] Suwa H, Hanakita J, Ohshita N, et al. Postoperative changes in paraspinal muscle thickness after various lumbar back surgery procedures[J]. *Neurol Med Chir(Tokyo)*, 2000, 40(3):151-155.

- [10] Kuriyama N, Ito H. Electromyographic functional analysis of the lumbar spinal muscles with low back pain[J]. *J Nippon Med Sch*, 2005, 72(3):165-173.
- [11] Datta G, Gnanalingham KK, Peterson D. Back pain and disability after lumbar laminectomy: is there a relationship to muscle retraction? [J]. *Neurosurgery*, 2004, 54(6):1413-1420.
- [12] Kim DY, Lee SH, Chung SK, et al. Comparison of multifidus muscle atrophy and trunk extension muscle strength: percutaneous versus open pedicle screw fixation [J]. *Spine*, 2005, 30(1):123-129.
- [13] 杨维权,刘大雄,郑和平,等. 腰椎间盘突出症后路微创手术的应用解剖学研究[J]. 骨与关节损伤杂志,2004,19(9):588-589.

(收稿日期:2011-01-09 修回日期:2011-03-22)