

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00912

## 血管外膜损伤后血管组织氧化应激与内膜病变

汤月霞<sup>1</sup>, 梁春<sup>2</sup>, 刘永<sup>2</sup>, 吴宗贵<sup>2\*</sup>

1. 济南军区青岛第一疗养院, 青岛 266071

2. 第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003

**[摘要]** 目的:探讨 NADPH 氧化酶相关的氧化应激在外膜损伤致内膜病变中的作用。方法:选用纯种新西兰大白兔,采用胶原酶消化+钝性机械分离的方法建立血管外膜损伤动物模型,采用 H-E 染色观察外膜损伤血管的形态变化,实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RQ-PCR)技术检测外膜损伤后血管组织 NADPH 氧化酶亚单位 p22phox、抗氧化酶 HO-1 的 mRNA 表达,荧光探针检测外膜损伤后血管组织活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成。结果:外膜损伤可致内膜增生性病变;外膜损伤导致 p22phox/HO-1 mRNA 表达明显升高,血管组织 ROS 产量增加。结论:血管外膜参与了内膜病变形成的病理过程;NADPH 氧化酶活性升高导致的氧化应激可能是外膜损伤致内膜病变的机制之一。

**[关键词]** 血管外膜损伤;氧化应激;NADPH 氧化酶;活性氧;动脉粥样硬化

**[中图分类号]** R 543.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0912-05

### Oxidative stress and intimal hyperplasia lesion in vascular tissues after vascular adventitial injury

TANG Yue-xia<sup>1</sup>, LIANG Chun<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>2</sup>, WU Zong-gui<sup>2\*</sup>

1. The First Sanatorium of Qingdao, PLA Jinan Military Area Command, Qingdao 266071, China

2. Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

**[ABSTRACT]** **Objective:** To assess the role of NADPH oxidase-related oxidative stress in the intimal hyperplasia induced by adventitial injury. **Methods:** Animal model of vascular adventitial injury was established by combining collagenase digestion and mechanical dissection. HE staining was used to observe the morphological changes of the vessels after adventitial injury; RT-PCR was used to examine the mRNA expression of NADPH oxidase subunit p22phox and antioxidant heme oxygenase-1; and fluorescence probe was employed to detect the ROS production in the vessels. **Results:** Adventitial injuries could induce intimal hyperplasia lesions in the vessels; they also led to the elevated expression of p22phox/HO-1 mRNA and increased production of ROS. **Conclusion:** The vascular adventitia is involved in the pathological process of intimal hyperplasia, and oxidative stress caused by increased NADPH oxidase activity may be one of the mechanisms.

**[KEY WORDS]** adventitia; oxidative stress; NADPH oxidase; reactive oxygen species; atherosclerosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8):912-916]

血管内皮损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发病的始动因素,外膜一直被认为没有参与这一病理过程。1994年 Barker 等<sup>[1]</sup>采用外科手术的方法剥离兔颈动脉外膜,发现可导致内膜病变形成,引起了研究者对外膜在动脉粥样硬化发生中作用的关注,并相继有报道发现血管外膜炎<sup>[2]</sup>、外膜成纤维细胞<sup>[3]</sup>、外膜脂肪组织<sup>[4]</sup>等均可能与内膜病变的发生相关。但这些研究仅仅提示外膜在致 AS 危险因素的作用下可被激活,并参与病变的形成,但

没有阐明外膜本身独立的作用。基于此,我们在牟华明等<sup>[5]</sup>的研究基础上,改进了动脉外膜损伤的动物模型,以了解血管外膜作为血管组织的一部分,在 AS 发生中可能发挥的作用。

已知氧化应激是 AS 发生的主要机制之一。NADPH 氧化酶是血管组织活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源,其跨膜亚单位 p22phox 是 NADPH 氧化酶必需的活性成分<sup>[6-7]</sup>。已有研究

**[收稿日期]** 2008-01-11 **[接受日期]** 2008-07-02

**[基金项目]** 国家重点基础研究规划(“973”计划)(2005CB523309), Supported by National Basic Research Program of China(“973” Program)(2005CB523309)。

**[作者简介]** 汤月霞, 博士, 主治医师, E-mail: penglaitang@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73201, E-mail: zgwu@medmail.com.cn

发现,血管组织 NADPH 氧化酶来源的过氧化物如  $H_2O_2$  可通过激活一些信号通路介导外膜成纤维细胞、平滑肌细胞的转分化、增殖和迁移,从而参与 AS 的发生发展<sup>[8-10]</sup>。在血管外膜套管致内膜病变、球囊损伤后再狭窄以及移植静脉病变等动物模型中,血管 NADPH 氧化酶的激活参与了病变的发生发展<sup>[11-13]</sup>,血管外膜损伤是否导致了血管组织 NADPH 氧化酶激活,进而导致血管病变的形成,目前尚无相关报道。

基于以上研究基础,本实验在成功建立颈动脉外膜损伤兔模型的基础上,对 NADPH 氧化酶在血管外膜损伤后内膜病变形成中的作用进行了探讨。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 雄性纯种新西兰大白兔 6 只,体质量( $2.5 \pm 0.5$ ) kg,单笼饲养,自由饮水,活动不受限制,外膜损伤术后普食饲养 2 周,观察外膜损伤后内膜的变化。另外 33 只普食饲养的动物,分别在外膜损伤术后即刻,3、5、7、15 d 取双侧颈动脉标本,H-E 染色观察血管内皮形态变化,RQ-PCR 检测 NADPH 氧化酶 p22phox 亚单位/抗氧化酶 HO-1 的 mRNA 表达,探针法检测活性氧的生成。

1.2 外膜损伤方法 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)耳缘静脉静推麻醉动物。暴露并仔细游离双侧颈动脉长约 3 cm,用 2 mg/ml 的 I 型胶原酶浸湿的棉纱外敷一侧颈动脉 30 min,生理盐水中止消化,用眼科镊钝性分离外膜白色疏松组织,至白色组织消失。每只动物的对侧颈动脉不予处理,作为对照。术后逐层缝合,皮下注射青霉素 40 万 U/d $\times$ 3 d。

1.3 H-E 染色 取双侧颈动脉标本,盐水冲洗后 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu$ m 切片,行 H-E 染色。

1.4 原位杂交 采用地高辛标记的寡核苷酸探针,对 p22phox 亚单位和 HO-1 的 mRNA 表达进行定位检测。探针序列分别为:p22phox 5'-CCG CTC AGC AGG AAC TACT-3',HO-1 5'-AGG AGG AGA TTG AGC ACA AC-3'。

1.5 RQ-PCR 在外膜损伤术后不同时间取双侧颈动脉标本,抽提 RNA,采用试剂盒逆转录为 cDNA,采用 SYBR Green I 的方法定量检测 p22phox、HO-1 的 mRNA 表达。引物序列分别为:p22phox 5'-CCG CTC AGC AGG AAC TACT-3',5'-CAG CCA GCA GGT AGA TGA TG-3';HO-1

5'-AGG AGG AGA TTG AGC ACA AC-3',5'-CGT ACC AGA AGG CCA TGTC-3'。内参基因 GAPDH 5'-AAG GTC ATC CAC GAC CAC TT-3',5'-AGG CCA TGC CAG TGA GTT-3'。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 1 min 后,进入循环:95 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ x $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 45 s,循环 40~45 次。基因表达的相对定量根据 Ct 值计算,然后通过  $2^{-\Delta Ct}$  法比较不同样本中基因表达差异。

1.6 血管组织 ROS 检测 外膜损伤术后不同时间取双侧颈动脉,即刻行 8  $\mu$ m 厚的冰冻切片,滴加 DCFH-DA 探针,置于湿盒,37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 60 min,1 $\times$ PBS 冲洗,倒置荧光显微镜观察荧光定位并拍照。用 BioSens Digital Imaging System 病理图像分析系统进行血管组织 ROS 相对定量分析。

1.7 统计学方法 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析或 t 检验。

## 2 结果

2.1 动脉外膜损伤效果 H-E 染色可见血管外膜结缔组织基本不存在,平滑肌层暴露于最外层,内皮完整(图 1)。提示胶原酶消化+钝性机械分离可有效破坏血管外膜结构的完整性。

图 1 外膜损伤术后即刻血管组织 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of blood vessel right after adventitial injury  
Original magnification:  $\times 200$

2.2 血管外膜损伤与内膜病变 H-E 染色显示(图 2),普食饲养条件下,损伤侧血管内膜在外膜损伤术后即刻、3 d 及 5 d 时正常,术后 7 d 开始出现轻微的增生性病变,2 周时形成了明显的增生性内膜病变,而对侧血管完全正常,提示外膜损伤与内膜病变的形成相关。

2.3 血管外膜损伤致血管组织氧化应激 原位杂交定位检测 NADPH 氧化酶亚单位 p22phox 和抗氧化酶 HO-1 的 mRNA 表达可见 p22phox 在对照

血管内皮及外膜均有少量表达,外膜损伤术后 5 d 时中膜平滑肌细胞中的表达明显增加,15 d 时变化不明显(图 3)。HO-1 的表达在对照血管、术后 5 d 及 2 周时无明显差异(图 4)。

图 2 外膜损伤术后血管 H-E 染色

Fig 2 H-E staining of blood vessels 2 weeks after adventitial injury

A: Control group; B-F: Vessels immediately, 3 d, 5 d, 7 d, and 15 d after adventitial injury. Original magnification:  $\times 200$

图 3 p22phox mRNA 表达原位杂交

Fig 3 *In situ* hybridization of p22phox mRNA

A: Control group; B: 5 d after adventitial injury; C: 15 d after adventitial injury. Original magnification:  $\times 200$

图 4 HO-1 mRNA 表达原位杂交

Fig 4 *In situ* hybridization of HO-1 mRNA

A: Control group; B: 5 d after adventitial injury; C: 15 d after adventitial injury. Original magnification:  $\times 200$

采用 SYBR Green I 方法分别于外膜损伤术后即刻,3、5、7、15 d 检测血管组织 p22phox 和 HO-1 mRNA 的表达,最终结果用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示,即外膜损伤术后不同时间血管组织目的基因 mRNA 相对于对照血管含量的百分率( $A_x/A_0 \times 100\%$ )。结果显示:外膜损伤术后对照侧血管各目的基因的表达无明显变化( $P > 0.05$ ),而外膜损伤血管各目的基因表达水平发生了显著变化(图 5)。在外膜损伤血管, NADPH 氧化酶的 p22phox 亚单位 mRNA 表达于术后 3 d 开始升高,术后 5 d 达到高峰,为对照侧的  $(9.86 \pm 1.20)\%$ ,15 d 时为对照侧的  $(7.01 \pm 0.73)\%$ ;而抗氧化酶 HO-1 mRNA 表达在术后也有上调,但幅度明显低于 p22phox,术后 3 d 时表达水平最高,为对照的  $(2.18 \pm 0.36)\%$ 。p22phox/HO-1 比值在术后即刻为 1.03,术后 3 d 开始升高至 1.87,并持续至术后 15 d  $(5.12)$ ,5 d 时最高为 6.90。表明血管外膜损伤导致了血管组织的氧化/抗氧化失衡,即氧化应激。

2.4 外膜损伤后血管组织 ROS 的生成 可见正常血管环全层均有较弱的绿色荧光,提示正常情况下血管组织存在低水平的 ROS,外膜损伤后血管环绿色荧光分布与正常血管相同,强度逐渐增强,提示 ROS 水平逐渐升高(图 6A ~ F)。采用 BioSens Digital Imaging System 病理图像分析系统对外膜损伤后不同时间点血管组织荧光强度进行定量分析,结果发现,与对照血管比较,术后即刻 ROS 生成量无显著变化,术后 3 d 至 15 d 均有显著升高( $P < 0.05$ ,图 7)。

图 5 外膜损伤术后血管组织 p22phox 和 HO-1 mRNA 表达的相对定量

Fig 5 Relative expression of p22phox and HO-1 mRNA in blood vessels after adventitial injury

\*  $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs control group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

图6 血管外膜损伤术后  
不同时间血管组织 ROS 的生成

Fig 6 ROS production in blood vessels at  
different time points after adventitial injury

A: Control group; B-F: Vessels immediately, 3 d, 5 d, 7 d, and 15 d after adventitial injury. Original magnification:  $\times 40$

图7 血管外膜损伤术后  
不同时间血管组织 ROS 的生成

Fig 7 Relative quantitation of ROS production  
in vessels after adventitial injury

\*  $P < 0.05$  vs control group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

随着对 AS 发生机制研究的深入, 血管外膜的作用日益受到重视。外膜在 AS 发生过程中究竟发挥了什么作用? 回答这一问题的关键是建立一种稳定、可重复的外膜损伤动物模型。以往有研究者采用胶原酶消化剥离离体动脉外膜的方法, 对血管外膜剥离后血管舒缩功能的变化进行了研究<sup>[14]</sup>, 但是在体研究很少。我们采用类似的方法, 采用胶原酶消化+钝性机械分离的方法有效损伤血管外膜, 发现在普食饲养条件下, 损伤血管形成了明显的增生性内膜病变, 而对照血管完全正常, 证明血管外膜损

伤与内膜病变的发生相关。

氧化应激是 AS 重要的发病机制之一。研究已证实, NADPH 氧化酶是血管组织主要的氧化酶, 与 AS 的发生发展密切相关<sup>[15-19]</sup>。各种致 AS 的危险因素均可上调 NADPH 氧化酶活性, 其活性产物 ROS 一方面通过直接损伤血管内皮细胞、灭活 NO 致内皮功能障碍发挥致 AS 作用<sup>[15]</sup>, 另一方面通过介导黏附分子、趋化蛋白表达, 脂质氧化及摄取, 以及血管平滑肌细胞增殖、迁移<sup>[20-21]</sup>, 参与 AS 的发生发展。Warnholtz 等<sup>[22]</sup>发现高胆固醇血症兔的血管 NADPH 氧化酶活性升高, 并导致内皮功能障碍, 对糖尿病大鼠的研究同样证实 NADPH 氧化酶活性升高是导致血管内皮功能障碍的原因<sup>[23]</sup>。临床研究方面也证实高胆固醇血症患者及 CABG 患者的内皮依赖性舒张功能障碍也与血管 NADPH 氧化酶依赖的过氧化氢生成增加有关<sup>[15, 24]</sup>。近期有研究发现, 不存在 AS 危险因素的情况下, 血管 NADPH 氧化酶相关的氧化应激与外膜套管诱导的内膜病变、球囊损伤后再狭窄的发生以及移植静脉病变的形成相关, 那么在外膜损伤后形成内膜增生性病变的过程中, NADPH 氧化酶是否发挥作用了呢? 本研究对外膜损伤后不同时间血管组织 NADPH 氧化酶亚单位 p22phox mRNA 表达进行了检测, 发现外膜损伤后 3 d 开始明显升高, 并持续至术后 15 d。而具有抑制 NADPH 氧化酶作用的抗氧化酶 HO-1<sup>[25]</sup>的表达虽然也有一定程度的增加, 但幅度明显低于同期 p22phox 的表达。P22phox/HO-1 的不对称变化, 主要是 NADPH 氧化酶活性的升高, 可能导致了血管组织氧化应激的发生。对血管组织 ROS 生成的检测发现, ROS 在外膜损伤术后的变化趋势基本同 p22phox/HO-1 一致, 证实外膜损伤导致了血管组织 NADPH 氧化酶相关的氧化应激, 并可能通过导致内皮功能障碍、介导炎症介质分泌、调节血管平滑肌细胞增殖、迁移等进一步导致了内膜病变的形成。

由此我们推测, 结构和功能正常的血管外膜可维持血管组织的氧化平衡, 血管外膜损伤后可能通过上调 NADPH 氧化酶的表达导致这一平衡的破坏, 进而导致内膜病变成形。

### [参考文献]

- [1] Barker S G, Tilling L C, Miller G C, Beesley J E, Fleetwood G, Stavri G T, et al. The adventitia and atherogenesis: removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of al neoadventitia' [J]. *Atherosclerosis*, 1994, 105: 131-144.
- [2] Higuchi M L, Gutierrez P S, Bezerra H G, Palomino S A, Aiello

- V D, Silvestre J M, et al. Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured and nonruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2002, 79:20-24.
- [3] Siow R C, Mallawaarachchi C M, Weissberg P L. Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from *in vivo* gene transfer to rat carotid arteries [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59:212-221.
- [4] Henrichot E, Juge-Aubry C E, Pernin A, Pache J C, Velebit V, Dayer J M, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis [J]? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25:2594-2599.
- [5] 牟华明, 祝之明, 王海燕, 王利娟. 兔血管外膜对血管重构及收缩功能影响的初步观察 [J]. *生理学报*, 2003, 55:290-295.
- [6] Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, et al. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:22152-22158.
- [7] Ushio-Fukai M, Zafari A M, Fukui T, Ishizaka N, Griendling K K. P22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:23317-23321.
- [8] Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan P J, Ariyan S, Dikalov S, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts [J]. *Circ Res*, 2005, 97:900-907.
- [9] Dourron H M, Jacobson G M, Park J L, Liu J, Reddy D J, Scheel M L, et al. Perivascular gene transfer of NADPH oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced neointimal proliferation of rat carotid artery [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288:H946-H953.
- [10] Weaver M, Liu J, Pimentel D, Reddy D J, Harding P, Peterson E L, et al. Adventitial delivery of dominant-negative p67phox attenuates neointimal hyperplasia of the rat carotid artery [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290:H1933-H1941.
- [11] Paravicini T M, Gulluyan L M, Dusting G J, Drummond G R. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits [J]. *Circ Res*, 2002, 91:54-61.
- [12] Szöcs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski L L, Valppu L, Couse T L, et al. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22:21-27.
- [13] West N, Guzik T, Black E, Channon K. Enhanced superoxide production in experimental venous bypass graft intimal hyperplasia: role of NAD(P)H oxidase [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21:189-194.
- [14] González M C, Arribas S M, Molero F, Fernández-Alfonso M S. Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280:H2876-H2881.
- [15] Guzik T J, West N E, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors [J]. *Circ Res*, 2000, 86:E85-E90.
- [16] Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries [J]. *Circulation*, 1999, 100:1494-1498.
- [17] Zalba G, Fortuño A, Orbe J, San José G, Moreno M U, Belzunce M, et al. Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:587-593.
- [18] Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus R E, Szöcs K, Sorescu G P, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105:1429-1435.
- [19] Vendrov A E, Hakim Z S, Madamanchi N R, Rojas M, Madamanchi C, Runge M S. Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:2714-2721.
- [20] Jeong H Y, Jeong H Y, Kim C D. P22phox-derived superoxide mediates enhanced proliferative capacity of diabetic vascular smooth muscle cells [J]. *Res Clin Pract*, 2004, 64:1-10.
- [21] Jeong H Y, Son S M, Kim Y K, Yun M R, Lee S M, Kim C D. Tyrosine kinase-mediated activation of NADPH oxidase enhances proliferative capacity of diabetic vascular smooth muscle cells [J]. *Life Sci*, 2005, 76:1747-1757.
- [22] Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen J H, Skatchkov M, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system [J]. *Circulation*, 1999, 99:2027-2033.
- [23] Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Circ Res*, 2001, 88:E14-E22.
- [24] Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski H R, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of HMG-coenzyme A reductase inhibitor therapy [J]. *Circulation*, 2001, 104:1767-1772.
- [25] Kim H J, So H S, Lee J H, Lee J H, Park C, Park S Y, et al. Heme oxygenase-1 attenuates the cisplatin-induced apoptosis of auditory cells *via* down-regulation of reactive oxygen species generation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40:1810-1819.