

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00585

## 血管外膜损伤致动脉粥样硬化斑块形成对兔局部交感神经功能的影响

陈 玮, 梁 春, 刘 星, 王 华, 周卫健, 吴宗贵\*

第二军医大学长征医院心内科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨兔颈动脉外膜损伤后血管粥样硬化(AS)程度与动脉内去甲肾上腺素含量及交感神经密度的关系, 并分析通心络对 AS 的作用效果及可能机制。 **方法** 采用 I 型胶原酶局部损伤兔颈动脉外膜结合高脂喂养的方法, 制备颈动脉外膜损伤致动脉粥样硬化模型, 将模型动物随机分为 2 组: 外膜损伤组、通心络治疗组; 组内对左侧颈动脉行外膜损伤, 右侧作为自身对照。分别于术后 1、3、7 d、2、4、8 周取血及双侧颈动脉, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测兔血清及动脉壁中去甲肾上腺素含量, 免疫组化法检测血管外膜交感神经密度。 **结果** 外膜损伤组左侧颈动脉内膜增生面积明显大于右侧, 内膜增生面积与神经染色强度及局部动脉壁去甲肾上腺素含量呈正相关( $r=0.94, P<0.05; r=0.90, P<0.05$ ); 与外膜损伤组相比, 通心络能够明显减轻外膜损伤后血管内粥样斑块面积[IMR( $48\pm 2$ )% vs ( $70\pm 3$ )%,  $P<0.01$ ], 降低动脉壁组织中去甲肾上腺素含量[( $83.76\pm 3.3$ ) ng/g vs ( $74.25\pm 2.1$ ) ng/g,  $P<0.05$ ]及血管的交感神经密度( $P<0.05$ )。 **结论** 外膜损伤可加重高脂饮食诱导的 AS 病变程度, 部分可能与其促进局部交感神经功能失调有关, 通心络能够拮抗外膜损伤诱导的 AS 病变。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; 交感神经系统; 去甲肾上腺素; 颈动脉; 外膜损伤; 通心络

**[中图分类号]** R 541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0585-05

### Influence of adventitia injury-induced atherosclerosis on sympathetic nerve function in rabbits

CHEN Wei, LIANG Chun, LIU Xing, WANG Hua, ZHOU Wei-jian, WU Zong-gui\*

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

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of adventitia injury on atherosclerosis(AS)development, norepinephrine content, and sympathetic nerve density in the carotid artery of rabbits, so as to analyze the effect of *Tongxinluo* (TXL) on AS and the possible mechanism. **Methods** Totally 96 male rabbits with left carotid adventitia removed were fed with high cholesterol diet and were divided into two groups randomly; one group was lavaged with TXL (TXL group) and the other with water (adventitia injury group). In each group the adventitia of left cervical artery was injured and the right one served as control. The bilateral carotid artery specimens and blood samples were collected 1 d, 3 d, 7 d, 2 w, 4 w, and 8 w after the operation. The norepinephrine contents in serum and carotid artery were determined by ELISA and the density of the sympathetic nerve was analyzed by immunohistochemical method. **Results** In the adventitia injury group adventitia injury aggravated AS in the left carotid artery compared with that in the right carotid artery; the area of atherosclerotic plaque was positively correlated with the nerve density( $r=0.94, P<0.05$ ) and local norepinephrine content in the artery ( $r=0.90, P<0.05$ ). TXL significantly decreased the area of atherosclerotic plaque compared to the adventitia injury group (IMR [ $48\pm 2$ ] % vs [ $70\pm 3$ ] %,  $P<0.01$ ); besides, it also decreased the level of norepinephrine in the artery [( $83.76\pm 3.3$ ) ng/g vs ( $74.25\pm 2.1$ ) ng/g,  $P<0.05$ ] and the density of the sympathetic nerve ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Adventitia injury can promote the development of AS in high-cholesterol fed animals, partially through promoting the disorder of local sympathetic function, and TXL can inhibit the adventitia injury-induced AS.

**[Key words]** atherosclerosis; sympathetic nervous system; norepinephrine; carotid artery; adventitia injuries; *Tongxinluo*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6): 585-589]

慢性应激状态、交感神经的激活与冠心病及动脉粥样硬化(AS)的发生和进展密切相关<sup>[1-4]</sup>。解剖学研究发现好发动脉粥样硬化的大中动脉血管周围

神经支配明显多于静脉、小动脉及毛细血管, 且主要以去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)能神经为主, 提示血管周围神经可能与外膜共同参与 AS 病变的

**[收稿日期]** 2009-12-16 **[接受日期]** 2010-04-10

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2005CB523309)。Supported by Major National Basic Research Development Program of the People's Republic of China (“973” Program, 2005CB523309)。

**[作者简介]** 陈 玮, 博士。E-mail: cecila0505@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81886999, E-mail: zgwu@medmail.com.cn

发生和发展<sup>[5]</sup>,但具体机制仍不清楚。因此,本研究尝试观察血管外膜损伤致AS过程中神经重构的可能作用,并探讨中药制剂通心络(TXL)对此过程的影响,为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 通心络超微粉由石家庄以岭药业股份有限公司提供;酪氨酸羟化酶(TH)单抗购自美国R&D公司;I型胶原酶购自美国Sigma公司。

1.2 实验动物及分组 健康雄性新西兰兔96只,体

质量2.0~3.0 kg,购自上海市松江区车墩实验动物良种场,随机均分为2组,外膜损伤组:高脂饲养(2%胆固醇、4%炼猪油、6%蛋黄粉、88%普通饲料)加左侧颈动脉外膜损伤;通心络(TXL)治疗组:高脂饲养+左侧颈动脉外膜损伤+通心络超微粉,通心络超微粉于术后每天上午定时给药( $0.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃),继续高脂喂养,组内分别与各自假手术右侧颈动脉进行自身对照。动物分笼喂养,自由饮水,连续给药。各指标观察时间点分别为术前,术后1 d、3 d、7 d、2周、4周、8周。具体实验流程见图1。

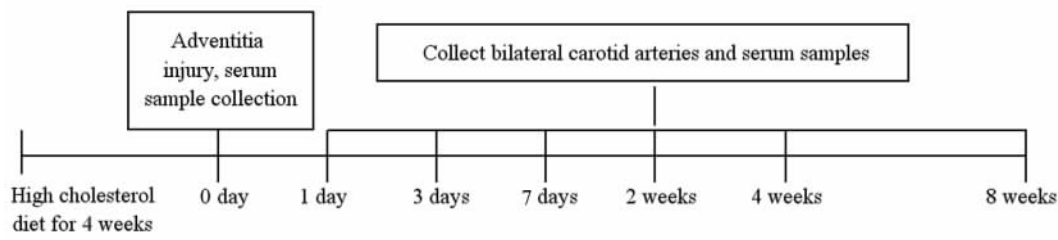


图1 动物实验标本采集流程

Fig 1 Animal experiment procedure

1.3 颈动脉外膜损伤模型的制备 室温下3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)耳缘静脉静推麻醉动物。动物仰卧,头部及四肢固定于手术台上,颈前脱毛后常规碘酒、乙醇消毒铺巾。纵形切开颈前皮肤,逐层钝性分离颈部筋膜及肌肉,暴露双侧颈动脉鞘,仔细游离出双侧颈动脉,长约3 cm,用消化液(I型胶原酶2 g/L)浸湿的棉纱外敷左侧颈动脉30 min,生理盐水冲洗、中止消化,用眼科镊钝性分离外膜白色疏松组织,直至完全剥离。右侧不予处理,作为阴性对照。术后逐层缝合,皮下注射青霉素40万U/d共3 d。

1.4 颈动脉标本的获取及H-E染色观察 建模前及术后4周、8周均经兔耳中心动脉采血5 ml,采用全自动生化分析仪测定血胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。术后1 d、3 d、7 d、2周、4周、8周在麻醉下活体状态取双侧颈总动脉,部分做组织匀浆;部分置于4%多聚甲醛溶液固定24 h,常规石蜡包埋,4~6 μm厚连续切片。常规烤片、脱蜡、水化后行苏木精-伊红(H-E)染色,光学显微镜下观察血管壁形态学变化,以内膜增生面积比值(内膜面积/中膜面积×100%,IMR)代表斑块面积。

1.5 免疫组化染色检测颈动脉组织交感神经纤维酪氨酸羟化酶(TH)表达 石蜡切片经干燥箱烤片2 h后,常规脱蜡至水,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶20 min,0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液热抗原修复,0.01 mmol/L PBS洗涤,滴加正常山羊血清封闭20 min。

滴加一抗TH抗体4℃过夜,0.01 mol/L PBS洗涤后滴加生物素化偶联的二抗,37℃孵育20 min,PBS洗涤3 min×3次后滴加辣根过氧化物酶偶联的链霉卵白素,37℃孵育20 min,PBS洗涤5 min×4次后滴加DAB室温显色。显微镜下控制显色5~8 min,采用蒸馏水洗涤,苏木精轻度复染,脱水,封片。以PBS液替代一抗为阴性对照。确定免疫阳性染色的阈值,固定不变,检测TH阳性染色的平均光密度(integrated optical density,IOD),以各组与对照组比值代表TH表达的相对含量。

1.6 颈动脉组织及血清中NE水平的检测 血清及组织匀浆标本保存于-80℃,检测前取出,在常温下复温,采用ELISA法,对照标准曲线获得血清及组织NE浓度值,组织匀浆再按照蛋白定量换算出质量浓度。

1.7 统计学处理 所有图片采用Image-Pro Plus 6.0分析软件;采用SPSS 10.0统计软件,数据资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用t检验,检验水平(α)为0.05。

## 2 结果

2.1 各组动物血脂水平的变化 结果(表1)表明:实验前所有动物TC、TG、LDL-C差异均无统计学意义;给予高脂饮食4周后,各组动物血脂(TC、TG、LDL-C)水平均显著升高( $P<0.05$ )。术后8周,通心络治疗组动物的TC、TG、LDL-C均显著低于外膜损伤组( $P<0.05$ )。

表 1 各组动物血脂水平的变化

Tab 1 Blood lipid levels in different groups 4 weeks after high-fat feeding

[ $n=8, \bar{x} \pm s; c_B / (mmol \cdot L^{-1})$ ]

Group	Time point	TC	TG	LDL-C
TXL+adventitia injury	0 d	1.10±0.03	1.02±0.05	0.31±0.03
	4 weeks	20.2 ±2.00*	2.06±0.08*	7.65±0.85*
	8 weeks	17.8 ±1.54*△	2.10±0.10*△	8.10±0.45*△
Adventitia injury	0 d	1.15±0.06	0.98±0.04	0.40±0.03
	4 weeks	21.4 ±1.50*	2.12±0.85*	7.35±0.66*
	8 weeks	45.4 ±1.55*	2.45±0.38*	18.88±0.91*

\*  $P < 0.05$  vs 0 d in the same group; △  $P < 0.05$  vs adventitia injury group at the same time point. TXL: Tongxinluo

2.2 各组动物颈动脉 H-E 染色结果 结果(图 2、图 3A)表明:术后 8 周,外膜损伤组左颈动脉内膜明显增厚,内膜下可见明显脂质浸润,部分可见粥样斑块形成;右颈动脉内膜增厚较左侧有所减轻[IMR(25±1)% vs (70±3)%,  $P < 0.01$ ],但仍可见明显内膜增

生。TXL 治疗组左颈动脉斑块减小,脂质浸润减轻,增生内膜面积小于外膜损伤组[IMR(48±2)% vs (70±3)%,  $P < 0.01$ ],但与右侧(0.130±0.004)相比增生明显, TXL 治疗组右颈动脉内膜增生明显轻于其他组( $P < 0.01$ ),部分病变甚至消失。

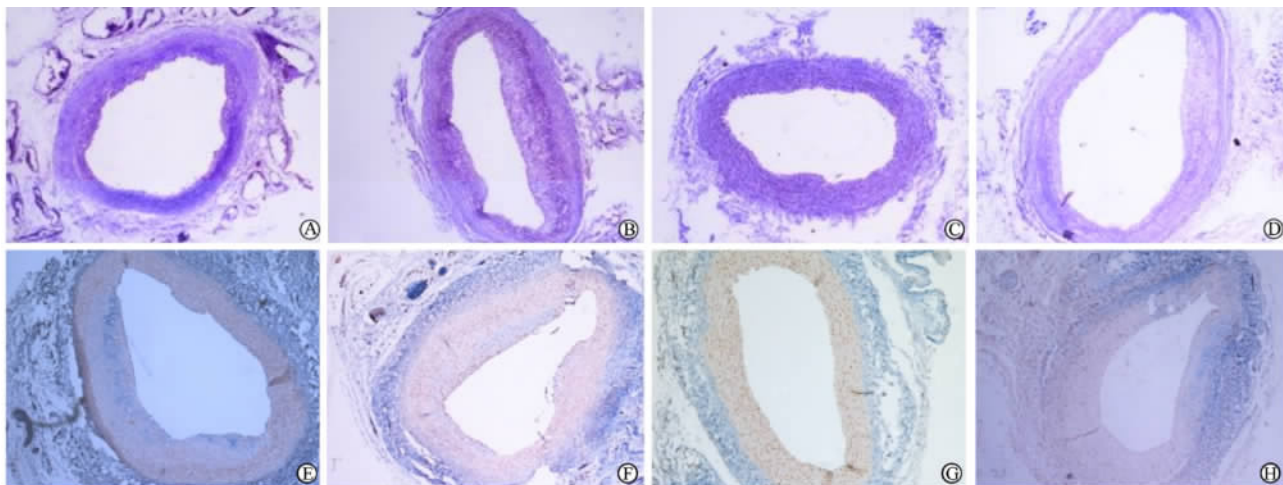


图 2 外膜损伤术后 2 个月各组动物动脉粥样斑块增生情况(H-E 染色, A~D)及血管酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化染色(E~H)

Fig 2 H-E staining(A-D) for atheromatous plaque and immunohistochemical staining

for tyrosine hydroxylase (TH, E-H) in different groups two months after adventitia injury

A, E: Adventitia injury group right artery; B, F: Adventitia injury group left artery; C, G: TXL+adventitia injury group right artery; D, H: TXL+adventitia injury group left artery. Original magnification: ×10

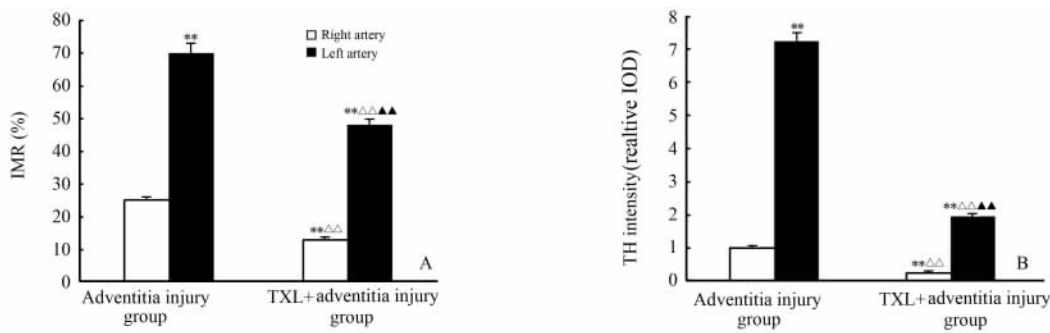


图 3 外膜损伤术后 2 个月各组动脉粥样斑块面积(A)及交感神经酪氨酸羟化酶(TH)染色强度(B)比较

Fig 3 Comparison of atheromatous plaque area(A) and TH expression(B) in different groups two months after adventitia injury

\*\*  $P < 0.01$  vs adventitia injury group right artery; △△  $P < 0.01$  vs adventitia injury group left artery; ▲▲  $P < 0.01$  vs TXL+adventitia injury group right artery.  $n=8, \bar{x} \pm s$

2.3 各组动物颈动脉 TH 免疫组化染色结果 结果(图 2、图 3B)表明:术后 8 周时,外膜损伤组左侧外膜有明显交感神经增生,神经节染色明显,右侧外膜也存在阳性染色,但程度较左侧有所减轻( $IOD\ 26\ 373\pm\ 1\ 024\ vs\ 3\ 654.049\ 1\pm\ 98, P<0.05$ )。TXL 治疗组左侧颈总动脉 TH 染色明显弱于同侧外膜损伤组( $IOD\ 7\ 078\pm\ 188\ vs\ 26\ 373\pm\ 1\ 024, P<0.05$ ),TXL 治疗组右侧外膜( $IOD\ 898\pm\ 54$ )少见阳性着色。

2.4 去甲肾上腺素(NE)含量的测定结果

2.4.1 局部血管壁组织 结果(图 4)表明:外膜损伤组术后 7 d 时左侧血管组织 NE 含量与基础水平相比明显上升( $P<0.01$ ),达到峰值( $83.76\pm\ 3.3$ ) ng/g,此后逐渐回落稳定,TXL 治疗组左侧血管组织 NE 含量同样在 7 d 到达峰值( $74.25\pm\ 2.1$ ) ng/g,二者差异无统计学意义。外膜损伤组、TXL 治疗组右侧 NE 含量无明显变化。

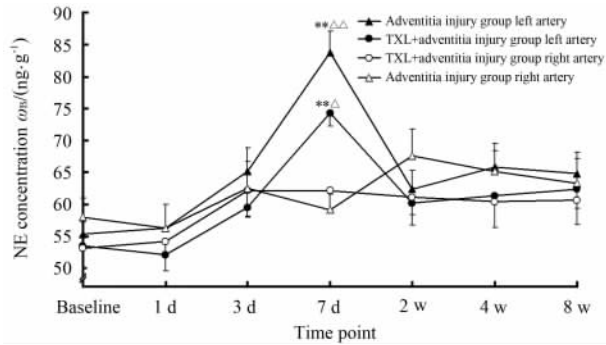


图 4 术后不同时间点颈动脉壁去甲肾上腺素含量变化  
Fig 4 Norepinephrine content in carotid artery at different time points after surgery

\*\*  $P<0.01$  vs the baseline level;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs other groups at the same time point.  $n=4, \bar{x}\pm s$

2.4.2 血清水平 结果(图 5)表明:外膜损伤组和 TXL 治疗组在手术即刻 NE 血清含量都明显升高并达到峰值,分别为( $3.85\pm\ 0.12$ )、( $3.98\pm\ 0.08$ )  $\mu\text{g/g}$ ,此后含量逐步下降并达到稳定。TXL 治疗组术后各个时间点 NE 含量都低于外膜损伤组,仅在术后 8 周时差异才具有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.5 相关性分析结果 颈动脉内粥样斑块面积与神经染色密度的关系:随着动脉内膜增生面积的增大,交感神经染色强度也逐渐增大,二者存在明显的正相关关系( $r=0.98, P<0.05$ ,图 6A)。动脉壁中去甲肾上腺素含量与粥样斑块面积及神经密度的关系:术后 2 个月时局部动脉壁中 NE 含量随着神经染色强度的增加而升高,二者正相关( $r=0.94, P<0.05$ ),且 NE 含量与粥样斑块面积也存在明显正相关( $r=0.90, P<0.05$ ,图 6B)。

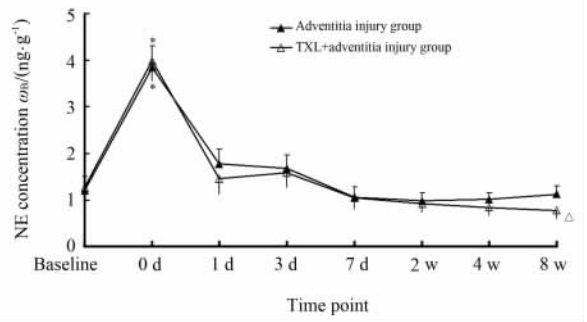


图 5 术后不同时间点血清去甲肾上腺素含量变化  
Fig 5 Serum norepinephrine content at different time points after surgery

\*  $P<0.05$  vs the baseline level;  $\Delta P<0.05$  vs adventitia injury group.  $n=6, \bar{x}\pm s$

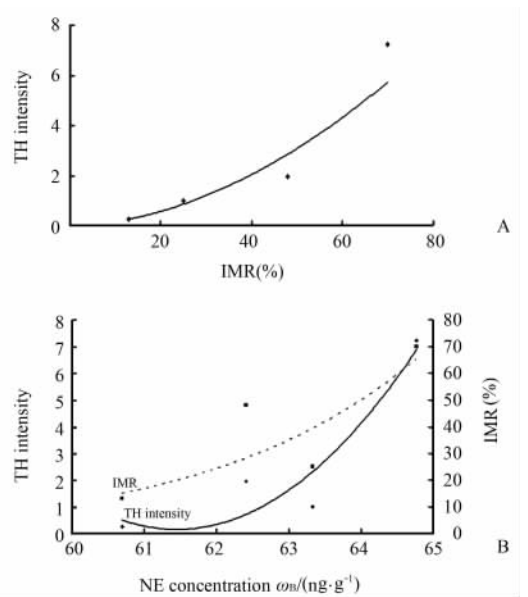


图 6 相关性分析结果

Fig 6 Correlationship analysis results

A: Correlation analysis between IMR and TH intensity ( $r=0.98, P<0.05$ ); B: Correlation analysis of norepinephrine concentration in the carotid artery with TH intensity ( $r=0.94, P<0.05$ ) and IMR ( $r=0.90, P<0.05$ )

3 讨论

本研究结果再次证实外膜损伤能够诱导内膜增生,而中药制剂通心络能够减少斑块的面积,减轻动脉粥样硬化的程度<sup>[6]</sup>。研究结果还发现,外膜损伤 2 个月后血管周围 TH 染色强度增加,提示交感神经密度升高,同时局部 NE 含量在术后 7 d 也出现反射性升高,而通心络可以抑制上述两种上升趋势。实验还发现粥样斑块的面积和血管外膜 TH 染色强度存在明显正相关,术后 2 个月的 TH 染色强度与局部 NE 含量也存在明显正相关,提示交感神经系

统功能的改变与粥样斑块的发生紧密相关。

外膜损伤诱导内膜增生的具体机制目前尚不清楚,可能与损伤诱导的炎症相关<sup>[7-8]</sup>,也可能与外膜微血管损伤有关<sup>[9]</sup>。Dashwood等<sup>[5]</sup>发现在冠状动脉旁路移植术后所用的静脉桥血管隐静脉周围出现了明显的小神经束,神经增生与移植静脉内膜增生密切相关,提示神经重构在外膜致内膜增生过程中发挥了重要作用。然而,De Meyer等<sup>[10]</sup>在对套管诱导外膜损伤从而促进内膜增生的机制进行探讨时发现,滋养血管、神经重构及血流动力学的影响都不是促使内膜病变的主要原因。本研究发现在外膜损伤后存在交感神经纤维反应性增生现象,进一步对动脉壁中神经递质去甲肾上腺素的动态检测发现,在外膜损伤后7 d局部NE含量反弹性上升,且与AS斑块面积正相关。结果提示交感神经系统功能亢进参与了粥样硬化的发生,而交感神经系统功能亢进可能是外膜损伤造成的后果之一。交感神经纤维是动脉周围分布的主要神经纤维<sup>[5]</sup>,因此在外膜损伤的同时对神经纤维也造成了损伤,加之术后局部炎症、水肿及其他部位神经纤维代偿等因素,使得其在术后7 d才出现神经递质破坏性释放的高峰。同时由于外膜损伤造成的慢性炎症,可诱导神经纤维创伤后反应性增生,加重了AS斑块的进展,与其他研究结果<sup>[11-14]</sup>类似。本研究发现NE在外膜损伤后期的波动变化并不十分明显,可能与机体的自我调节及副交感神经递质的释放受损更严重有关,这有待于进一步的研究。

前期研究发现通心络能够明显抑制外膜损伤所诱导的内膜增生,其机制可能与通心络减少粥样斑块中CD40的表达有关<sup>[15]</sup>。因此,本研究还进一步观察了中药复方制剂通心络对外膜损伤所致的AS斑块及交感神经功能的影响,结果发现通心络能减少损伤血管交感神经的增生及神经递质NE的上升,从另一角度证实通心络的抗AS作用,具体机制仍有待进一步研究。

(志谢 本研究得到第二军医大学基础部人体解剖学教研室、训练部动物实验中心、长海医院病理科、长征医院实验诊断科、中心实验室多位老师的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

## [参考文献]

[1] Kubzansky L D, Koenen K C, Spiro A 3rd, Vokonas P S, Sparrow D. Prospective study of posttraumatic stress disorder symptoms and coronary heart disease in the Normative Aging Study[J]. Arch Gen Psychiatry, 2007, 64: 109-116.

- [2] Carney R M, Freedland K E. Depression and heart rate variability in patients with coronary heart disease[J]. Cleve Clin J Med, 2009, 76(Suppl 2): S13-S17.
- [3] Chaldakov G N, Stankulov I S, Fiore M, Ghenev P I, Aloe L. Nerve growth factor levels and mast cell distribution in human coronary atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2001, 159: 57-66.
- [4] Freccero C, Svensson H, Bornmyr S, Wollmer P, Sundkvist G. Sympathetic and parasympathetic neuropathy are frequent in both type 1 and type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Care, 2004, 27: 2936-2941.
- [5] Dashwood M R, Angelini G D, Wan S, Yim A, Mehta D, Izzat M B, et al. Does external stenting reduce porcine vein-graft occlusion *via* an action on vascular nerves[J]? J Card Surg, 2002, 17: 556-560.
- [6] 汤月霞, 梁 春, 刘 永, 吴宗贵. 血管外膜损伤后血管组织氧化应激与内膜病变[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 912-916. Tang Y X, Liang C, Liu Y, Wu Z G. Oxidative stress and intimal hyperplasia lesion in vascular tissues after vascular adventitial injury[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 912-916.
- [7] Gotoh R, Suzuki J, Kosuge H, Kakuta T, Sakamoto S, Yoshida M, et al. E-selectin blockade decreases adventitial inflammation and attenuates intimal hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24: 2063-2068.
- [8] Isoda K, Shiigai M, Ishigami N, Matsuki T, Horai R, Nishikawa K, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury[J]. Circulation, 2003, 108: 516-518.
- [9] Pels K, Labinaz M, Hoffert C, O'Brien E R. Adventitial angiogenesis early after coronary angioplasty: correlation with arterial remodeling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 229-238.
- [10] De Meyer G R, Van Put D J, Kockx M M, Van Schil P, Bosmans R, Bult H, et al. Possible mechanisms of collar-induced intimal thickening[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17: 1924-1930.
- [11] Laine P, Naukkarinen A, Heikkilä L, Penttilä A, Kovanen P T. Adventitial mast cells connect with sensory nerve fibers in atherosclerotic coronary arteries[J]. Circulation, 2000, 101: 1665-1669.
- [12] Zhang H, Facemire C S, Banas A J, Faber J E. Different alpha-adrenoceptors mediate migration of vascular smooth muscle cells and adventitial fibroblasts *in vitro*[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282: H2364-H2370.
- [13] Faber J E, Yang N, Xin X. Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 298: 441-452.
- [14] Faber J E, Yang N. Balloon injury alters alpha-adrenoceptor expression across rat carotid artery wall[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33: 204-210.
- [15] 刘 永, 汤月霞, 梁 春, 吴宗贵. 通心络抑制兔血管外膜损伤致内膜动脉粥样硬化斑块及CD40表达[J]. 上海医学, 2007, 30: 734-736.