

大鼠动脉粥样硬化不同阶段的血管紧张素 II 变化

郭延松, 吴宗贵*, 杨军柯, 黄高忠 (第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003)

[摘要] 目的:探讨组织和血浆血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的关系。方法:40只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为4组(每组10只):正常对照组、高脂组、维生素D负荷组、内皮损伤组,分别以普通饲料、高脂饲料、高脂饲料+维生素D负荷、高脂饲料+维生素D负荷+内膜球囊损伤术处理,复制大鼠AS形成3个阶段(高脂血症、纤维增生性动脉硬化、较成熟AS病变斑块形成)模型。利用计算机图像分析系统测定大鼠胸主动脉内(中)膜厚度,采用放射免疫分析法测定各组大鼠胸主动脉组织和血浆 Ang II 水平。结果:与正常对照组相比,维生素D负荷组及内皮损伤组大鼠胸主动脉内膜厚度均显著增加($P < 0.01$),中膜厚度减少($P < 0.05, P < 0.01$);3组模型动物胸主动脉组织 Ang II 水平均显著高于(以内膜损伤组最高)对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且组织 Ang II 水平与内膜厚度呈显著正相关($r = 0.934, P < 0.01$);而血浆 Ang II 水平在各组间无统计学差异。结论:AS的病变程度与大鼠胸主动脉 Ang II 水平密切相关,而与血浆 Ang II 水平无关。提示 Ang II 水平增高是AS的致病因素之一。

[关键词] 动脉粥样硬化;高脂;维生素D;内皮损伤;血管紧张素 II

[中图分类号] R 541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)06-0629-04

Changes of angiotensin II at different stages of atherosclerosis in rats

GUO Yan-Song, WU Zong-Gui*, YANG Jun-Ke, HUANG Gao-Zhong (Department of Cardiovasology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the relation between the angiotensin II (Ang II) levels in thoracic aorta and plasma and atherosclerosis (AS). **Methods:** Totally 40 healthy male Wistar rats were randomly divided into 4 groups ($n = 10$). Four different feeding methods, including normal diet, high lipid, high lipid + vitamin D overload, and high lipid + vitamin D overload + endothelium injury, were used for inducing AS in rats. The thickness of intima was taken as the index of AS severity, radio-immunity analysis was used to assay Ang II in each group in thoracic aorta and plasma. **Results:** Only rats in high lipid diet group did not develop AS plaque; high lipid + vitamin D only resulted in AS fibrous plaque with VSMC proliferation; high lipid + vitamin D + endothelium injury formed ripe AS plaque. The thickness of intima and Ang II of thoracic aorta increased gradually compared with control group ($P < 0.01$). The Ang II of plasma was not different among all the groups. Ang II in thoracic aorta had positive relation with the thickness of intima ($r = 0.934, P < 0.01$). **Conclusion:** The Ang II level in thoracic aorta, but not in plasma, has close relation with AS severity, which indicates that Ang II is one of etiological factors of AS.

[KEY WORDS] atherosclerosis; high lipid; vitamin D; endothelium injury; angiotensin II

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(6): 629-632]

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成是一个长期缓慢的过程,是多因素共同作用的结果。大量研究表明肾素-血管紧张素-醛固酮系统参与了AS的病理过程^[1,2],特别是血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)起重要作用。本实验通过高脂饮食、维生素D负荷结合主动脉内球囊损伤法^[3]建立大鼠AS形成不同阶段的动物模型,测定AS各阶段组织和血浆 Ang II 水平,探讨 Ang II 与 AS 的关系,以利于进一步研究 AS 的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 200只健康雄性 Wistar 大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),体质量 200~300 g。球囊导

管(1.5 F, Cordis 公司),胆固醇及胆酸钠(上海蓝季科技发展有限公司),维生素 D₃ 粉剂及针剂(上海第九制药厂),丙基硫氧嘧啶(上海复星朝晖制药有限公司),Ang II 放射免疫分析测定盒(北京北方生物技术研究所)。

1.2 实验分组 40只大鼠随机分为4组(每组10只):(1)正常对照组,以大鼠基础饲料饲养90 d,开始实验后7 d行假球囊损伤手术;(2)高脂组,以高

[基金项目] 国家重点基础研究规划("973"计划)(G2000056900)。

[作者简介] 郭延松(1971-),男(汉族),博士,主治医师。现在福建省立医院心血管内科,福州 350001。
E-mail: ysguo1234@sina.com

*Corresponding author. E-mail: zgwu@medmail.com.cn

脂饲料(2%胆固醇、3%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、0.5%胆酸钠、94.3%的基础饲料)饲养90 d,余处理同对照组;(3)维生素D负荷组,以动脉粥样硬化饲料(高脂饲料基础上加入维生素D₃ 1.25×10⁶ U/kg)饲养90 d,同时予每只大鼠右下肢肌内注射3×10⁵ U/kg 维生素D₃,每隔30 d注射1次,共3次,余处理同对照组;(4)内皮损伤组,动物处理同第3组,不同的是开始实验后7 d行球囊损伤手术,具体方法见文献[4]。

1.3 标本采集 模型制备完成后,采集血液和动脉标本。(1)暴露大鼠腹主动脉,采集动脉血,迅速注入冰浴冷却的含酶抑制剂抗凝管中摇匀,即刻放回冰浴中冷却,待离心时取出。4℃下1 000 r/min离心5 min,分离出血浆,-80℃保存备用。(2)剪取大鼠胸主动脉,取其下段约1 cm,立即以10%中性甲醛固定,用于后续检查。(3)提取胸主动脉管壁蛋白:用手术刀迅速将50 mg胸主动脉分离成适宜的小块,迅速加入冰浴冷却的酶抑制剂,再加入1 ml预冷的PBS(0.01 mol/L,pH=7.4),以匀浆器在冰浴中匀浆,4℃下5 000 r/min离心10 min,收集上清,于-80℃冰箱中保存备用。

1.4 病理形态学观察 主动脉标本连续切片,H-E染色,利用计算机图像分析系统检测动脉内膜、中膜厚度。

1.5 血浆及血管组织 Ang II 的测定 采用放射免疫分析测定法,按 Ang II 放射免疫分析测定盒(北京北方生物技术研究所)说明书进行。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行方差分析,各组间两两比较用 SNK 法。血管组织 Ang II 水平与相应的内膜厚度行相关分析。

2 结果

2.1 各组大鼠胸主动脉病理改变 H-E 染色显示,正常对照组大鼠主动脉内膜、中膜和外膜分界清楚;光镜下见内皮细胞完整,内膜光滑;中膜主要由呈同心排列的弹性纤维膜组成,基质内可见有环形的平滑肌细胞;外膜较薄,为疏松结缔组织,内含少量平滑肌细胞。高脂组大鼠主动脉壁层次尚清晰;内膜内皮细胞仍存;中膜平滑肌层无明显萎缩、增厚;外膜为疏松结缔组织,内含少量平滑肌细胞。维生素D负荷组大鼠主动脉壁内膜增厚,平滑肌细胞增生明显,细胞排列紊乱,弹性纤维层结构不清,纤维组织增生伴片状、点状钙化;中膜萎缩,局部管壁向管腔内突出,形成纤维增生性动脉硬化斑块。内皮损伤组大鼠主动脉壁内皮细胞脱落,内膜明显增厚,斑块

表面纤维帽很薄,其下有大量脂质沉积,平滑肌细胞减少,见钙化灶,深部为坏死物质;中膜明显受压萎缩,呈较典型的成熟 AS 斑块。

2.2 各组大鼠胸主动脉内膜、中层厚度 高脂组与正常对照组相比,内膜、中膜厚度均无统计学差异;维生素D负荷组与正常对照组相比,内膜厚度显著增加($P < 0.01$),中膜厚度减少($P < 0.05$);内皮损伤组与正常对照组相比,内膜厚度明显增加($P < 0.01$),中膜厚度明显变薄($P < 0.01$)。见表1。

表1 胸主动脉内膜及中层厚度

Tab 1 Thickness of intima and media in thoracic aorta ($n=6, \bar{x} \pm s, l/\mu m$)

Group	Intima	Media
Control	8.3 ± 1.4	100.7 ± 9.7
HC	8.6 ± 1.3	102.7 ± 10.1
HC+D ₃	37.8 ± 8.9**	80.2 ± 9.1*
HC+D ₃ +BI	105.7 ± 24.6**	42.6 ± 6.1**

HC: High lipid; HC+D₃: High lipid + vitamin D₃ overload; HC+D₃+BI: High lipid + vitamin D₃ overload + endothelium injury; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 各实验组大鼠血浆及胸主动脉组织 Ang II 水平 血浆 Ang II 水平在4组间无统计学差异;而胸主动脉组织中 Ang II 水平,各实验组均较对照组显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以内膜损伤组最高(表2)。

表2 各组大鼠血浆及胸主动脉组织的 Ang II 水平

Tab 2 Ang II levels in thoracic aorta and plasma in different groups

($n=4, \bar{x} \pm s$)

Group	Plasma ($\rho_B/pg \cdot ml^{-1}$)	Thoracic aorta ($\rho_B/pg \cdot mg^{-1}$)
Control	147.4 ± 27.3	454.3 ± 41.1
HC	152.7 ± 23.1	577.8 ± 60.5*
HC+D ₃	140.5 ± 24.8	720.3 ± 35.3**
HC+D ₃ +BI	138.0 ± 19.5	937.8 ± 101.6**

HC: High lipid; HC+D₃: High lipid + vitamin D₃ overload; HC+D₃+BI: High lipid + vitamin D₃ overload + endothelium injury; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 血管组织 Ang II 水平与相应的内膜厚度相关分析 直线相关分析结果表明,大鼠主动脉粥样硬化病变中 Ang II 水平与相应的内膜厚度密切相关($r=0.934, P < 0.01$)。

3 讨论

AS 动物模型是研究其发病机制及探讨治疗措

施的重要条件。AS的形成是多因素引起,相应地曾提出不少学说,如脂质浸润学说、钙超载学说、内皮损伤学说、血栓形成学说、免疫反应学说、氧化修饰脂蛋白学说等。前期我们根据AS的前3种发病机制学说,以3种不同方法建立大鼠AS斑块形成模型并进行了比较^[3],发现不同方法在较短时间(3个月)内建立的大鼠AS模型各不相同,其中高脂饲料不易形成AS病变;高脂饲料+维生素D负荷仅仅导致以血管平滑肌细胞增生为主的纤维增生性动脉硬化;高脂饲料+维生素D负荷+内膜球囊损伤术可形成较成熟的AS病变斑块。虽然高脂饲料+维生素D负荷+内膜球囊损伤术在短期内能形成较成熟的AS病变斑块,但要按时间划分病变的各阶段有一定困难。故本研究实验利用已建立的动物模型,模拟AS形成的3个阶段:高脂阶段、纤维增生性动脉硬化阶段、较成熟AS病变斑块阶段,以放射免疫分析法测定了各组动物血浆和胸主动脉AngⅡ水平,并以胸主动脉内膜(中膜)厚度值作为反映AS严重程度的指标,比较分析了内膜厚度与AngⅡ水平的相关性。结果发现,血浆AngⅡ水平在对照组及3个模型组间均无统计学差异;而胸主动脉组织AngⅡ水平在各组中逐渐升高,在较成熟AS病变斑块形成时达最高,且胸主动脉AngⅡ水平与内膜(中膜)厚度呈显著正相关($r=0.934, P<0.01$)。Diet等^[5]研究也证实,AS斑块中血管紧张素转换酶及AngⅡ水平均升高。提示AS病变形成与动脉组织AngⅡ水平密切相关,而与血浆AngⅡ水平无关。

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)最早发现于血液中。近来研究证实,RAAS广泛存在于局部组织(血管内皮及平滑肌、心肌、肺、脑和性腺等),以自分泌或旁分泌形式发挥作用,并通过血液循环作用于其他器官,同时发现血循环与组织中RAAS的含量有明显差别^[1,2]。大量研究表明RAAS参与了AS的病理过程^[6~8],有关其参与AS的发病机制,现大多数研究倾向于认为^[9,10]:(1)AngⅡ引起血管收缩,导致高血压,继发性引起AS;(2)AngⅡ促进VSMC增殖及血管重构;(3)RAAS的抗纤溶功能;(4)AngⅡ引起内皮细胞依赖性舒血管功能减弱;(5)AngⅡ引起多种炎症因子(黏附分子、IL-6、单核细胞趋化因子)的产生。

现认为各种致AS因素作用,使血管局部各主要炎性细胞中RAAS活性增加,如氧化低密度脂蛋白-胆固醇可攻击ACE基因,在局部血管壁内产生

AngⅡ^[5],AngⅡ能刺激心肌成纤维细胞增生,诱导其I、Ⅲ型胶原mRNA表达及蛋白分泌增多^[11];AngⅡ能促进心肌细胞凋亡、内皮细胞凋亡,刺激血管平滑肌细胞增生,并分泌多种细胞因子(血小板衍生生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子 β 和内皮素),并使VSMC膜上这些细胞生长因子受体表达增加,进而加速AS的形成^[12]。

另外,本研究发现胸主动脉组织AngⅡ水平在各组中逐渐升高,而血浆AngⅡ水平在各组间均无统计学差异,这可能与RAAS以自分泌或旁分泌形式发挥作用,并通过血液循环作用于其他器官的特点有关,导致血循环与组织中RAAS的含量有明显差别。Campbell等^[13]应用ACEI对高血压大鼠进行降压作用时,发现循环中的AngⅡ水平治疗前后无变化,而ACEI的降压作用仍能发挥作用,进一步研究发现高血压大鼠的心脏、肾脏等组织中的AngⅡ水平明显下降,也从侧面证明了RAAS可以自分泌或旁分泌形式在局部组织中起作用。

[参考文献]

- [1] Zhuo JL, Froomes P, Casley D, et al. Perindopril chronically inhibits angiotensin converting enzyme in both the endothelium and adventitial of the internal mammary artery in patients with ischemic heart disease[J]. *Circulation*, 1997, 96(2):174-182.
- [2] Re RN. Tissue renin angiotensin systems[J]. *Med Clin North Am*, 2004, 88(1):19-38.
- [3] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(5):465-469. Guo YS, Wu ZG, Yang JK, et al. Comparison on the three duplication methods of atherosclerosis model in rats[J]. *Zhongguo Dongmaiyinghua Zazhi (Chin J Arterioscler)*, 2003, 11(5):465-469.
- [4] Fonseca FA, Paiva TB, Silva EG, et al. Dietary magnesium improves endothelial dependent relaxation of balloon injured arteries in rats[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 139(2):237-242.
- [5] Diet F, Pratt R, Berry GJ, et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease[J]. *Circulation*, 1996, 94(11):2756-2767.
- [6] Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states[J]. *Am J Med Sci*, 2003, 326(1):15-24.
- [7] Zennaro MC, Farman N, Bonbalet JP, et al. Tissue specific expression of and messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(5):1345-1352.
- [8] Miyazaki M, Sakonjo H, Takai S. Anti-atherosclerotic effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and an an-

giotensin II antagonist in cynomolgus monkeys fed a high cholesterol diet[J]. *Br J Pharmacol*,1999,128(3):523-529.

[9] Grafe M, Angsch-Schwelk W, Zakrzewicz A, et al. Angiotensin II induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin[J]. *Circ Res*,1997,81(5):804-881.

[10] Ishida M, Ishida T, Nakashima H, et al. Mnk1 is required for angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*,2003,93(12):1218-1224.

[11] Brilla CG, Zhou G, Rupp H, et al. Role of angiotensin II and

prostaglandin E₂ in regulating cardiac fibroblast collagen turnover[J]. *Am J Cardiol*,1995,76(13):8D-13D.

[12] Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Hypertension*,1996,28(4):635-640.

[13] Campbell DJ, Dumcan AM, Kladis A, et al. Converting enzyme inhibition and its withdrawal in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Cardiol Pharmacol*,1995,26(3):426-436.

[收稿日期] 2003-10-09 [修回日期] 2004-04-06

[本文编辑] 邓晓群

• 个案报告 •

肾移植术后超声随访检查尿路肿瘤二例报告

Ultrasound examinations of urinary tract tumors in patients after renal transplantation: a report of 2 cases

张 玲^{1,2}, 章建全¹

(1. 第二军医大学长征医院超声科, 上海 200003; 2. 宜昌市第一人民医院超声科, 宜昌 443000)

[关键词] 肾移植; 尿道肿瘤; 超声检查

[中图分类号] R 737.15 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)06-0632-01

1 临床资料 例1, 女, 66岁, 因尿毒症接受同种异体肾移植, 术后4个月出现间歇性、无痛性肉眼血尿, 超声检查发现膀胱内占位性病变, MRI检查见膀胱内多个散在分布的菜花状赘生物, 以右侧壁较多(图1A), 镜下活检提示为“膀胱移行细胞癌”, 予经尿道膀胱肿瘤电切术。1年后患者再发血尿, 超声检查发现左侧原肾肾盂及左输尿管上段实性占位性病变(图1B), 手术切除左肾及左输尿管后病理诊断为“左肾

盂、左输尿管移行细胞癌”。术后半年余患者再次因无痛性肉眼血尿门诊行超声检查, 发现右侧原肾83 mm×42 mm×45 mm大小, 实质萎缩, 肾盂内有一约42 mm×25 mm的实性低回声团块, 形态不规则, 充填整个肾盂并侵及肾实质(图1C)。移植肾声像图未见明确异常。超声诊断“右侧原肾肾盂内实性占位, 移行细胞癌可能”。右侧原肾全切除术后如图1D所见。病理诊断: 右原肾移行细胞癌(Ⅱ~Ⅲ级)侵犯肾髓质。



图1 病例1的影像学资料

A: 膀胱内多发菜花状赘生物; B: 左侧原肾肾盂及左输尿管上段实性占位;
C: 右侧原肾肾盂内实性占位并侵犯实质; D: 右侧原肾切除术后标本; 箭头所指为肿瘤

例2, 女, 54岁, 因尿毒症接受同种异体肾移植, 术后16个月因无痛性血尿就诊, 超声检查发现左侧输尿管开口附近处、膀胱右后壁及顶部均可见多个实性强回声, 较大者约20 mm×15 mm, 位于右后壁(图2A), 超声诊断为“膀胱内多发实性占位, 移行细胞癌可能”。予经尿道膀胱肿瘤电切术, 病理诊断与超声诊断相符。1个月后患者再次出现肉眼血尿, 超声检查发现左侧输尿管下段管壁不规则增厚, 长约45 mm, 厚约10 mm, 管腔狭窄, 输尿管上中段及左肾盂轻度积水(图2B)。超声诊断为“左侧输尿管实性占位, 移行细胞癌可能”。



图2 病例2的超声影像学资料

A: 左侧输尿管开口处实性强回声;
B: 左侧输尿管下段实性占位并中上段梗阻; 箭头所指为肿瘤
(下转第637页)

2 讨论 随着肾移植技术的日臻完善, 移植肾患者存活时间的延长及免疫抑制剂的长期使用, 这类人群恶性肿瘤的