文章编号:0253-3626(2003)01-0025-04

高胆固醇高脂喂养兔血管内皮功能的超声检测

秦 俭[1],陈运贞[1],黄晓玲[2],周岐新[3],陈受田[2]

(1.重庆医科大学临床学院心血管内科;2.重庆医科大学临床学院 B 超室;
3.重庆医科大学基础医学院药理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:以外周动脉超声法,研究喂养高胆固醇高脂不同时间兔的血管内皮功能。方法:12 只雌雄各半的日本大耳白兔,随机分为对照组(NC 组)和高胆固醇高脂饮食组(HC 组),分别于喂养 0、1、2、4、6、8、10、12 和 14 周,以外周髂外动脉超声法,测定血管内皮依赖性舒张功能(EDD)和内皮非依赖性舒张功能(NEDD)。结果:高胆固醇高脂喂养兔 1 周后,EDD 即已发生损害,随着喂养的继续,EDD 进一步损害,喂养 8 周后,NEDD 才发生障碍。结论:高胆固醇高脂喂养兔的血管内皮功能明显障碍,EDD 障碍发生的时间明显早于 NEDD。

【关键词】高胆固醇高脂血症;血管功能;内皮功能;血管超声
【中国图书分类法分类号】R589.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-05-09

Vascular endothelial function measured with high-resolution ultrasound in atherogenic diet feeding rabbits

QIN Jian, et al

(*Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the vascular endothelial function in atherogenic diet fed rabbits during a variety of feeding time. *Methods*: 12 Japanese big-eared rabbits were fed either a normal control diet or an atherogenic diet (containing 1% cholesterol, 5% lard and 2% yolk) for 14 weeks. At different feeding times (week 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14), vascular endothelial functions, including endothelial dependant dilation (EDD) and non-endothelial dependant dilation (NEDD) were measured with high-resolution ultrasound. *Results*: EDD dysfunction occurred after 1 week of atherogenic diet feeding. With continued feedings, EDD dysfunction was progressively worse. NEDD dysfunction occurred at week 8, much later than EDD dysfunction. *Conclusion*: Vascular endothelial functions including EDD and NEDD in atherogenic diet fed rabbits were seriously damaged. EDD dysfunction occurred much earlier than NEDD dysfunction.

【Key words】 Hypercholesterolemia; Vascular function; Endothelial function; High-resolution ultrasound

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

胆固醇(进口,广州分装);熟猪油、鸡蛋黄(自备);硝酸甘油(西安康复药厂);新福林(上海禾丰制药);氯化乙酰胆碱(上海化学试剂总厂所属上海试剂三厂);硝普钠(中国医药(集团)上海化学试剂公司);含 95% O_2、5% CO_2 的混合气;恒温水浴锅;通气沟;张力换能器(航天医学工程研究所);LMS—2B 型二导生理记录仪(成都仪器厂);彩色血管多普勒检测仪(HP8500GP);日立 7170A 全自动生化分析仪(日本)。

1.2 动物及模型制备

2.0~2.25kg 雌雄各半的日本大耳白兔 12 只,随机分为对照组(NC 组)和高胆固醇高脂组(HC 组)。动物先适应性喂养 1 周,然后对照组给予普通全价兔颗粒饲料,高胆固醇高脂组给予下列配方的饲料:1% 胆固醇、5% 熟猪油、2% 鸡蛋黄和 92% 普通全价兔颗粒饲料。动物由专人室内单笼饲养,饮水不限,自由摄食,每日摄入饲料 150g。喂养 14 周。

1.3 血脂测定

分别于入选时、喂养 8 周和 14 周时,经耳缘静脉取血 2ml,用全自动生化分析仪测定血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL)。

1.4 外周髂外动脉血管超声检测

1.4.1 静息时髂外动脉的内径 探头频率为 7.5KHz,于兔腹股沟靠腹侧获取该动脉满意的二维图象后,同步记录心电图,于 T 波末测定其内径,取 3 次测定的平均值。

1.4.2 血管内皮依赖性舒张功能 EDD(Endothelium Depen-

作者介绍:秦 俭(1966-),女,副主任医师,博士,
主要研究方向:高血压、冠心病的防治。

dent Dilation)　将血压计压脉带绑于兔右大腿，充气到280mmHg，维持 5min 后迅速放气，测定 0.5～1min 内髂外动脉内径的变化，计算出该内径的最大扩张率即为 EDD。

1.4.3　血管内皮非依赖性舒张功能 NEDD(Non－Endothelium Dependent Dilation)　动物休息 15min 后，舌下含化硝酸甘油 0.25mg，3～5min 内测定髂外动脉内径的变化，计算出该内径的最大扩张率即为 NEDD。

1.5　离体髂外动脉条舒张功能

于喂养 14 周时，经耳缘静脉空气栓塞处死动物，取出髂外动脉，按离体实验方法进行其舒张功能的测定。

1.5.1　血管条片对乙酰胆碱(Ach)的舒张反应　血管条片以 10^{-5}mol/L 的新福林(PE)预收缩后，依次向浴槽加入浓度递增的 Ach(终浓度为 10^{-8}～10^{-5}mol/L)，并同步记录血管张力的变化，以血管条片对累积浓度 Ach 舒张反应的幅度占血管条片对 PE 引起的收缩幅度之比表示血管对 Ach 的舒张反应。

1.5.2　血管条片对硝普钠(SNP)的舒张反应　用同(1.5.1)的方法，研究血管对 SNP 的舒张反应，并计算 IC_{50}(引起最大舒张效应一半的药物浓度)。所不同的是 SNP 所用浓度为：10^{-8}～10^{-4}mol/L。

1.6　髂外动脉 AS 病变病理程度积分

于喂养 14 周时处死动物，取出髂外动脉，做常规石蜡切片。根据下列标准进行评分：

0—血管内皮完整光滑，未见明确泡沫细胞积聚及脂斑形成；

1—血管内皮完整，内皮下见灶性泡沫细胞积聚，泡沫细胞不超过 5 层；

2—血管内膜下见弥漫的泡沫细胞，脂斑厚度不超过血管壁厚度的 1/2；

3—弥漫的脂斑＞血管壁厚度 1/2。

1.7　数据统计

结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，以 SAS 软件统计包进行重复设计的方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有显著性，以 $P<0.01$ 为差异非常显著。

2　结　果

2.1　血脂

对照组在喂养的不同时间血脂稳定，差异无显著性；而高脂组 TC 和 LDL 较正常组明显增高，随着喂养时间的延长，TC 和 LDL 并不继续升高，HDL 也增高，但其幅度更小，TG 无明显增高。结果见表 1。

表 1　两组兔不同时期血脂测值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TC		TG		HDL		LDL	
	8 周	14 周	8 周	14 周	8 周	14 周	4 周	12 周
对照组	1.18±0.35	1.27±0.31	1.10±0.46	0.83±0.43	0.64±0.21	0.71±0.30	0.33±0.13	0.37±0.22
高脂组	35.74±8.27*	38.23±3.53*	1.59±0.77	1.35±0.98	2.22±0.20*	3.30±1.60*	12.41±4.48*	11.23±3.84*

*：与对照组比较，差异非常显著，$P<0.01$。实验前血脂水平与对照组类同，故略。

2.2　髂外动脉 EDD

于喂养不同时间，对照组 EDD 无显著性变化，$P>0.05$；高脂组于进食高脂后第 1 周，EDD 明显减退，与 0 周时比较有显著性差异，以后随着喂养的继续，EDD 进一步减退。结果见表 2。

2.3　髂外动脉 NEDD

结果表明，高脂组自第 6 周起 NEDD 才开始减退，以后随着喂养的继续，NEDD 进一步减退。结果见表 3。

2.4　离体髂外动脉条舒张功能

2.4.1　血管条对 Ach 的舒张反应　结果表明，高脂组髂外动脉条对 Ach 的舒张反应完全丧失，与 NC 组比较，差异非常显著。结果见图 1。

表 2　不同喂养时间髂外动脉 EDD(%)($\bar{x} \pm s$)

组别	0 周	1 周	2 周	4 周	6 周	8 周	10 周	14 周
对照组	11.15±1.79	11.02±2.30	10.67±3.84	11.25±2.37	8.86±2.04	10.35±3.90	10.47±2.17	10.82±1.64
高脂组	12.65±2.00	8.66±3.36	8.43±2.90	6.44*±3.46	4.99≠±1.56	2.92*±1.81	1.09*±1.50	0.88*±0.99

≠：与对照组比较，$P<0.05$；　*：与对照组比较，$P<0.01$；* 与对照组比较，$P<0.0001$。

表 3　不同喂养时间髂外动脉 NEDD(%)($\bar{x} \pm s$)

组别	0 周	1 周	2 周	4 周	6 周	8 周	10 周	14 周
对照组	9.67 ± 2.03	11.04 ± 3.65	10.75 ± 3.62	10.69 ± 3.37	8.99 ± 1.58	9.35 ± 3.50	11.91 ± 2.52	10.69 ± 2.02
高脂组	9.68 ± 2.09	8.98 ± 3.36	8.83 ± 2.90	7.44 ± 3.46	4.79 ± 1.50	2.92* ± 1.81	1.09* ± 1.00	0.88* ± 0.40

*：与对照组比较，$P<0.01$。

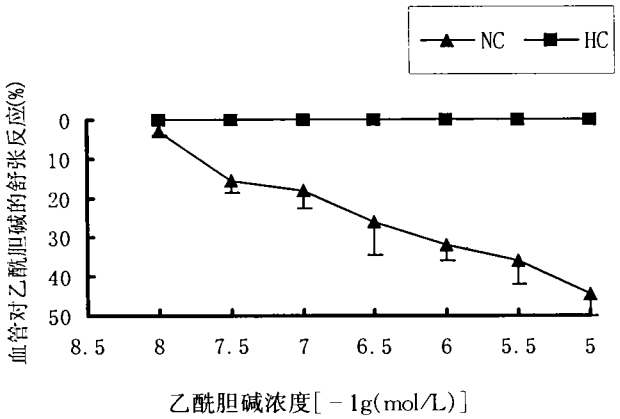


图 1　髂外动脉对乙酰胆碱的舒张反应

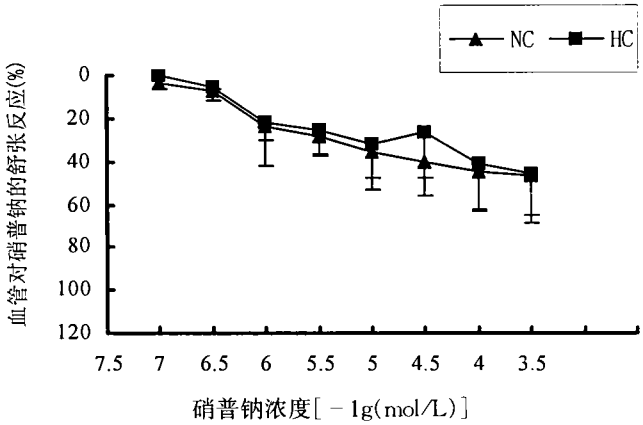


图 2　髂外动脉对硝普钠的舒张反应

*：与 NC 组比较，$P<0.01$。

2.4.2　血管条对 SNP 的舒张反应　结果显示，虽然高脂组髂外动脉血管条片对 SNP 的舒张反应与 NC 组比较无显著性差异（见图 2），但其 IC_{50} 为 (0.20±0.11)nmol/L，较 NC 组 IC_{50}(0.04±0.02) nmol/L 明显增大，两者差异非常显著。

2.5　髂外动脉粥样硬化斑块病理程度积分

结果表明，对照组无 1 例发生粥样硬化病变，而高脂组均可见程度不等的粥样硬化病变，积分见表 5。

表 5　髂外动脉粥样硬化斑块病理程度积分

组别	动物数	髂外动脉粥样硬化斑块病理程度				积分	平均积分
		0	1	2	3		
NC	6	6				0	0.00
HC	6		1	4	1	12	2.00*

*：与 NC 组比较，$P<0.01$。

3　讨　论

本研究结果显示，高胆固醇高脂饲料喂养兔后 8 周，血脂(TC 和 LDL 为主)显著增高，HDL 也有增高，但幅度不大。以后随着喂养时间的延长，到 14 周时血脂并不继续升高。

有关高脂饮食致家兔血管内皮功能障碍的报道较多。关于血管内皮功能，可以进行以下几方面的检测：内皮依赖性调节蛋白、内皮依赖性血管舒张功能（EDD）、和内皮非依赖性血管舒张功能（NEDD）[1]。早期曾采用定量血管造影、血管内超声等有创方法及离体实验测定 EDD，但前者价格昂贵，后者不能重复测定。现多采用 Celermajer 设计的无创性高分辨超声法[2]，以外周动脉反应性充血前后内径的变化来测定 EDD，以含化硝酸甘油前后动脉内径的变化来测定 NEDD。1995 年 Anderson 等[3]证实以外周肱动脉超声所得 EDD 结果与经冠脉内注入乙酰胆碱(Ach)所得结果具有高度相关性。因而以无创性外周动脉超声法评价血管内皮功能渐为人们所接受。

已有关于高脂饮食致家兔血管内皮功能障碍的报道。然而以外周动脉超声法，研究喂饲高胆固醇

高脂不同时间兔的血管内皮功能动态变化的报道很少。本实验结果表明,高胆固醇高脂喂养 1 周后,兔 EDD 即已发生障碍,以后随着喂养的继续,EDD 进一步加重,到 14 周时 EDD 几乎为 0。这较晏沐阳等[4]报道的兔进食高脂 2 周后 EDD 出现损害更早。而 NEDD 在高脂喂养后期才开始减退,到 8 周时与 NC 组比较有显著性差异。以上说明内皮功能失调在高脂血症早期表现为 EDD 的损害,到后期才合并 NEDD 的损害。结合髂外动脉离体实验结果、髂外动脉病理学切片动脉粥样硬化斑块积分结果,说明以在体髂外动脉血管超声评估高脂血症 AS 病变和血管功能包括 EDD 和 NEDD 是切实可靠的。

虽然该方法简便易行,但有一些方法学的问题尚急待解决,如一天中何时做更好,阻断血流的部位、压力及时间如何等。上述问题如得到了解决,该方法值得推广应用。

参 考 文 献

[1] 张湘瑜,赵水平.内皮功能失调与动脉粥样硬化[J].心血管病学进展,1999;2(4):241-244.

[2] Celermajer JS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non—invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis [J]. Lancet, 1992;340:1111-1115.

[3] Anderson TJ, Uehata A, Gerbard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations [J]. J Am Coll Cardiol, 1995;26:1235.

[4] 晏沐阳,段云友,曹铁生,等.高胆固醇血症兔髂外动脉内皮依赖性舒张功能的在体、离体研究[J].中国超声医学杂志,2000;16(9):648-651.

(上接第 16 页)能奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

[1] 刘北忠.K562 细胞增殖抑制与诱导分化的分子机制研究[D].重庆医科大学博士学位论文,2001.

[2] 张学敏,王宜强.靶向新基因的分子克隆策略——理论与方法[M].军事医学科学出版社,1999;7:237.

[3] Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells [J]. J Immunol, 1992;148(1):267-271.

[4] Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988;85(23):8998-9002.

[5] Maruyama IN, Rakow TL, Maruyama HI. cRACE: a simple method for identification of the 5′ end of mRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 1995;23(18):3796-3797.