DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000626

肾脏去神经对家兔动脉粥样硬化的影响及其机制研究

杨瀚晅[1],谭　震[1],卢嘉奕[1],梅　霞[2],殷跃辉[1]

（1. 重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆　400010;2. 重庆市中山医院心内科,重庆　400013）

【摘　要】**目的**:探讨肾脏去神经对家兔动脉粥样硬化影响及其机制。**方法**:28 只雄性新西兰白兔随机平均分为正常对照组(control)、肾脏去神经(renal denervation,RDN)+高脂组、假手术(sham)+高脂组、单纯高脂饮食(high-fat-diet,HFD)组。检测血脂、血浆去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)和氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)浓度,免疫组化检测血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)和血小板内皮细胞粘附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1,PECAM-1)的表达;Western blot 检测细胞间粘附分子-1(intercellular cell adhesion molecule,ICAM-1)和血管细胞间粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule,VCAM-1)的表达;RT-PCR 检测 MCP-1、PECAM-1、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 的表达。**结果**:术后 RDN 组 NE 水平低于 sham 组和 HFD 组($P<0.05$),其血浆甘油三酯(triglyceride,TG)浓度低于 HFD 组($P<0.05$);RDN 组血浆 ox-LDL 浓度、主动脉的 AngⅡ和粘附分子表达较 sham 组和 HFD 组明显降低($P<0.05$),RDN 组内膜/中膜比值较 HFD 组降低($P<0.05$)。**结论**:RDN 可降低 TG 浓度,同时可能通过降低交感神经活性,下调粘附分子的表达,延缓动脉粥样硬化形成。

【关键词】动脉粥样硬化;肾脏去神经;血管紧张素Ⅱ;粘附分子

【中图分类号】R543.5　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-03-01

Effects of renal denervation on atherosclerosis in rabbits and its mechanism

Yang Hanxuan[1], Tan Zhen[1], Lu Jiayi[1], Mei Xia[2], Yin Yuehui[1]

(1. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Cardiology, Chongqing Zhongshan Hospital)

【Abstract】***Objectives***:To evaluate the effects of the renal denervation on atherosclerosis in rabbits and its mechanism. ***Methods***:Twenty-eight male New Zealand White rabbits were randomly divided into control group, renal denervation(RDN)+high-fat-diet(HFD) group, Sham+HFD group and HFD group. Blood samples were collected to measure norepinephrine(NE), lipids and oxidized low density lipoprotein(ox-LDL) levels. Angiotensin Ⅱ(Ang Ⅱ), monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)and platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1) were detected by immunohistochemistry. Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) and vascular intercellular adhesion molecules-1(VCAM-1) were detected by Western bolt and the mRNA expressions of MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 and PECAM-1 were detected by RT-PCR. ***Results***:The NE level was lower in RDN group than in sham+HFD groups after RDN procedure. TG was lower in RDN group than in HFD group. Plasma ox-LDL was significantly decreased in RDN+HFD group compared with that in HFD group and Sham+HFD group($P<0.05$). Meanwhile, the expressions of AngⅡ, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 and PECAM-1 were significantly down-regulated in RDN+HFD group($P<0.05$). The ratio of intima-media thickness in aorta was significantly decreased in RDN group compared with those in HFD group($P<0.05$). ***Conclusion***:Renal denervation could decrease the level of TG and may down-regulate the expression of adhesion molecules by decreasing sympatholytic activity, so it may delay atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.

【Key words】atherosclerosis; renal denervation; angiotensinⅡ; adhesion molecules

作者介绍:杨瀚晅,Email:yhx046@sina.com,

研究方向:高血压、心律失常。

通信作者:殷跃辉,Email:yinyh63@163.com。

基金项目:重庆市渝中区科学技术委员会资助项目(编号:20110301)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150518.2337.001.html

(2015-05-18)

动脉粥样硬化是威胁人类健康的由多种因素参与的一种常见疾病。目前针对其发病机制产生了多种学说，但尚未完全清楚。炎症学说近来逐渐受到人们的重视[1]，其中粘附分子单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1）、血小板内皮细胞粘附分子-1（platelet endothelial cell adhesion molecule-1，PECAM-1）、细胞间粘附分子-1（intercellular cell adhesion molecule-1，ICAM-1）和血管细胞间粘附分子-1（vascular cell adhesion molecule，VCAM-1）与动脉粥样硬化密切相关，参与了动脉粥样硬化的发生、发展过程[2-3]。高血脂时，血浆中的氧化低密度脂蛋白（oxidized low density lipoprotein，ox-LDL）浓度增加，刺激血管内皮细胞表达多种粘附分子，使单核细胞，中性白细胞和淋巴细胞与内皮结合的数量增多，促进泡沫细胞形成及炎症反应，从而启动动脉粥样硬化形成。有研究发现，交感神经系统在调节肾素-血管紧张素-醛固酮系统（renin-angiotensin-aldosterone system，RAAS）方面发挥着重要的作用，交感神经过度激活，激活RAAS系统，使得肾素、血管紧张素Ⅱ（angiotensinⅡ，AngⅡ）大量生成。而AngⅡ在动脉粥样硬化的形成上扮演重要的角色[4-5]，AngⅡ可以促进低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）的氧化修饰和摄取[6]，生成的ox-LDL进一步刺激粘附分子的表达，参与血管的重塑与炎症，最终促进了动脉粥样硬化。目前肾脏去神经（renal denervation，RDN）在治疗顽固性高血压和改善心功能等方面取得了一些进展[7]，本实验首先观察RDN术后家兔动脉粥样硬化中血管壁粘附分子的表达情况，进一步探讨RDN对动脉粥样硬化的影响及机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

雄性新西兰白兔28只，体质量2.0~2.5 kg，普通级饲料与含2%胆固醇的高脂饲料，均由重庆医科大学实验动物中心提供。鼠抗单克隆VCAM-1、PECAM-1抗体（美国abcam公司），鼠抗多克隆AngⅡ、ICAM-1、MCP-1抗体（北京博奥森公司），鼠抗Tubulin单克隆抗体（武汉三鹰生物），兔ox-LDL Elisa试剂盒（上海沪尚生物科技有限公司），兔ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1、MCP-1引物（上海生工），苯酚（重庆东方化工厂）。

1.2 动脉粥样硬化家兔模型的建立和分组

根据随机数目表采用完全随机分组法将28只新西兰白兔分成4组，每组7只，分别为对照组（control）（普通饲料喂养8周）、肾脏去神经（renal denervation，RDN）+高脂组（肾脏去神经术后，高脂饲料喂养8周）、假手术（sham）+高脂组（假手术后高脂饲料喂养8周）和单纯高脂组（high-fat-diet，HFD）（高脂饲料喂养8周）。高脂饲料为含2%胆固醇+普通级饲料。所有家兔分笼喂养，自由饮水。本实验研究通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.3 RDN及假手术

3%戊巴比妥按照1 ml/kg耳缘静脉注射麻醉，取腹旁线切口，开腹后假手术组用生理盐水涂擦并包裹肾动脉，15 min后取出并逐层缝合关腹消毒。去神经组用10%苯酚乙醇溶液涂擦并包裹肾动脉，15 min后取出并逐层缝合关腹消毒。2组术后连续3 d肌肉注射80万单位青霉素预防感染，术前和术后8周抽取后肢静脉血5 ml，离心（3 000 r/min，15 min，4 ℃）后取血浆存放于-80 ℃冰箱。

1.4 标本的处理

空气栓塞处死家兔后，取主动脉开口处1 cm组织及肾动脉标本，以4%多聚甲醛固定，石蜡包埋、切片、HE染色，经OLYMPUS光学显微镜采图，在400倍镜下随机选取5个视野，测量内膜厚度、中膜厚度以及计算内膜/中膜厚度比。

1.5 血浆生化指标测定

全自动生化仪检测血浆总胆固醇（total cholesterol，TC），甘油三酯（triglyceride，TG），高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoprotein cholesterol，HDL-C），低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein-cholesterol，LDL-C）。Elisa试剂盒检测血浆去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）和ox-LDL的浓度。

1.6 免疫组织化学检测主动脉AngⅡ、MCP-1、PECAM-1的表达

按照免疫组化试剂盒说明书操作，石蜡切片脱蜡，洗涤，3% H_2O_2 室温孵育10 min，加入枸橼酸钠溶液后微波修复10 min，室温下血清孵育30 min，Ⅰ抗4 ℃孵育过夜，Ⅱ抗37 ℃孵育45 min，室温下亲和素-生物素复合物孵育60 min，DAB显色，苏木素复染，脱水，透明，封片，光镜下观察照相，Image pro-plus图像分析软件计算平均光密度值。

1.7 Western blot检测主动脉ICAM-1、VCAM-1的表达

取100 mg主动脉组织剪碎后放入研磨瓶内，加入1 ml组织裂解液，在冰上反复研磨，然后在4 ℃离心机里转速12 000 g离心10 min，小心吸出上清液，用BCA法进行蛋白质定量。加入1/4蛋白体积的5×SDS缓冲液，在100 ℃下水浴10 min使蛋白质变性，每泳道取60 μg蛋白，加入1×SDS缓冲液至等体积，60 V浓缩胶，100 V分离胶，电泳分离蛋白质，再用转膜仪250 mA转膜1 h，将蛋白质转移至二氟化树脂膜上，5%脱脂牛奶室温封闭1 h后，加入Ⅰ抗，4 ℃孵育过夜；PBST（phosphate buffered saline and tween 20）洗膜3次，每次持续10 min；用辣根过氧化物酶标记的Ⅱ抗37 ℃孵育1 h；然后PBST洗膜3次，每次10 min。最后用凝胶成像系统显像。

1.8 RT-PCR检测主动脉MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1 mRNA的表达

取100 mg主动脉组织使用TRIzol试剂盒提取总RNA

并测定其浓度。取 1 μg RNA 逆转录（总体系 20 μl，37 ℃，15 min；85 ℃，5 s；4 ℃，5 min）合成 cDNA，-20 ℃保存。用逆转录产物 PCR 合成目的基因，ICAM-1 引物的上游序列为 5'-TTGAACAGTGACAGCCCTTG-3'，下游序列为 5'-CTCCG-TGGGAATGAGACAC-3'；VCAM-1 引物的上游序列为 5'-GATGGTCCTGGTCTTTGGAGT-3'，下游序列为 5'-GGGCTG-TCTATCTGGGTTCTC-3'；MCP-1 引物的上游序列为 5'-TCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'，下游序列为 5'-GGACAC-TTGGTGCTGTTGATT-3'；PECAM-1 引物的上游序列为 5'-TCTGAACTCCAACAGCGAGA-3'，下游序列为 5'-CACCGA-GGACACTTCCACTT-3'；GADPH 引物的上游序列为 5'-A-GAGCACCAGAGGAGGACG-3'，下游序列 5'-TGGGATGG-AAACTGTGAAGAG-3'。反应条件为：95 ℃预变性 30 s 后进入 PCR 循环，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 30 s，共 40 个循环。PCR 结束后，采用 Bio-Rad CFX Manager 系统分析结果。

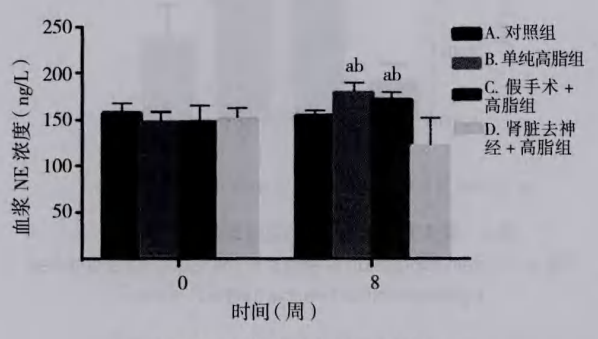
1.9 统计学分析

用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析处理。所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组间的比较采用独立样本 t 检验；多组间的比较，如果资料满足方差齐性要求采用单因素方差分析及 LSD-t 检验法两两比较；如果不满足方差齐性要求，则采用非参数检验 Dunnett's T3。均用双侧检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 RDN 的效果

2.1.1 各组家兔血浆 NE 浓度比较 处理前各组去甲肾上腺素浓度无统计学差异，8 周末 4 组家兔血浆 NE 浓度的差异具有统计学意义（F=17.185，P=0.000）。两两分析结果示：HFD 组血浆 NE 浓度为（180.15 ± 9.97）ng/L，假手术组为（171.81 ± 8.71）ng/L，均高于对照组的（154.83 ± 5.20）ng/L（P=0.001，P=0.007），并且高于 RDN 组的（123.13 ± 28.86）ng/L（P=0.007，P=0.018）（图 1）。



a、b：与对照组比较，P=0.001，P=0.007；
c、d：与 RDN 组比，P=0.007，P=0.018

图 1 血浆去甲肾上腺素浓度

Fig.1 Plasma levels of norepinephrine

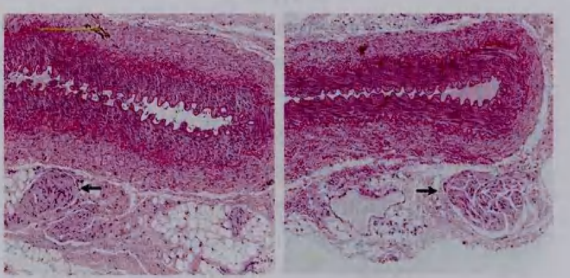
2.1.2 肾脏神经分布情况 显微镜下 HE 染色示：假手术组神经纤维分布在血管周围，髓鞘及施万细胞结构完整；去神经组神经纤维稀疏，排列紊乱，施万细胞胞核破裂、固缩，神经分布数量及面积明显减少，图中箭头所示肾动脉神经分布（表 1，图 2）。

表 1 肾脏神经数量和面积的比较（$\bar{x} \pm s$，n=7）

Tab.1 Comparison of the quantities and areas of renal nerves（$\bar{x} \pm s$，n=7）

分组	神经面积（mm²）	神经数量
假手术组	0.75 ± 0.29	7.86 ± 1.77
RDN组	0.47 ± 0.11[a]	5.71 ± 1.50[b]
t 值	2.391	2.444
P 值	0.034	0.031

注：a、b，与假手术组比较



A. 假手术 + 高脂组 B. 肾脏去神经 + 高脂组

图 2 2 组肾动脉 HE 染色显微照片（200×）

Fig.2 Photomicrographs of the renal artery detected by HE staining（200×）

2.2 RDN 对血脂和 ox-LDL 的影响

各组家兔入组时血脂无明显差异。喂养 8 周后：与对照组比较，RDN 组（P=0.008）、假手术组（P=0.007）和 HFD 组（P=0.002）的 HDL-C 水平升高；与对照组比较，RDN 组、假手术组和 HFD 组的 TC 和 LDL-C 水平增高（P=0.000）；与对照组比较，假手术组（P=0.015）、HFD 组（P=0.003）的 TG 水平增高，与 RDN 组比较，HFD 组的 TG 水平增高（P=0.021）；与对照组和 RDN 组比较，假手术组、HFD 组的 ox-LDL 浓度升高（P=0.000），RDN 组的 ox-LDL 浓度比对照组升高（P=0.000）（表 2）。

2.3 RDN 对主动脉内膜、中膜的影响

光镜下：对照组内皮完整，排列整齐，内弹力膜连续；RDN 组内皮排列较紊乱、稍增厚，中膜内弹力膜缺失断裂，中膜向内膜增殖迁移；假手术组内皮排列紊乱，厚度增加，可见泡沫细胞，内弹力膜不连续，中膜向内膜增殖迁移；HFD 组内皮排列紊乱，明显增厚，可见泡沫细胞，内弹力膜不连续，中膜增厚。内膜厚度：与对照组比较，RDN 组（P=0.017）、假手术组（P=0.000）、HFD 组（P=0.000）内膜厚度增加，而 RDN 组与假手术组、HFD 组比较内膜厚度无明显差异；内膜/中膜比值：与

表 2　各组血脂和 ox-LDL 的比较（$\bar{x}\pm s$，n=7）

Tab.2　Comparison of the lipids and ox-LDL levels in four groups（$\bar{x}\pm s$，n=7）

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	ox-LDL(ng/L)
对照组	0.99 ± 0.45	1.02 ± 0.29	0.39 ± 0.27	0.37 ± 0.12	6.51 ± 0.88
HFD组	20.15 ± 1.19[a]	2.75 ± 1.23[bd]	0.94 ± 0.35[e]	10.82 ± 1.17[h]	11.99 ± 0.88[jk]
假手术组	20.35 ± 1.32[a]	2.39 ± 1.37[c]	0.85 ± 0.29[f]	11.41 ± 1.72[h]	12.99 ± 0.92[jk]
手术组	21.75 ± 3.08[a]	1.46 ± 0.60	0.85 ± 0.28[g]	12.37 ± 1.90[h]	9.05 ± 1.38[j]

注：a，与对照组比较 P = 0.000；b、c：与对照组比较：P=0.003，P=0.015；d：与 RDN 组比较 P=0.021；e、f、g：与对照组比较：P=0.002，P=0.007，P=0.008；h：与对照组比较 P = 0.000；j：与对照组比较：P = 0.000；k：与 RDN 组比较 P = 0.000

对照组比较，RDN 组、假手术组、HFD 组内膜/中膜厚度比值增加（P=0.000），而 RDN 组与假手术组比较其比值无明显差异，与 HDF 比较比值降低（P=0.024）（表 3，图 3）。

表 3　各组主动脉内膜厚度、中膜厚度以及内膜 / 中膜厚度比（$\bar{x}\pm s$，n=7）

Tab.3　Comparison of the intimal thickness，medial thickness and the ratio of intima to media in four roups（$\bar{x}\pm s$，n=7）

分组	内膜(μm)	中膜(μm)	内膜/中膜
对照组	10.921 ± 2.353	356.153 ± 53.820	0.031 ± 0.007
HFD组	47.231 ± 7.172[a]	280.140 ± 29.311[c]	0.172 ± 0.031[de]
假手术组	46.744 ± 6.811[b]	309.398 ± 12.713	0.153 ± 0.021[d]
RDN组	43.519 ± 18.612[b]	311.794 ± 66.310	0.138 ± 0.036[d]
F 值	19.358	3.340	39.683
P 值	0.000	0.036	0.000

注：a、b，与对照组比较，P=0.017，P=0.000；c：与对照组比较，P=0.047；d：与对照组比较 P=0.000；e：与 RDN 组比较，P=0.024

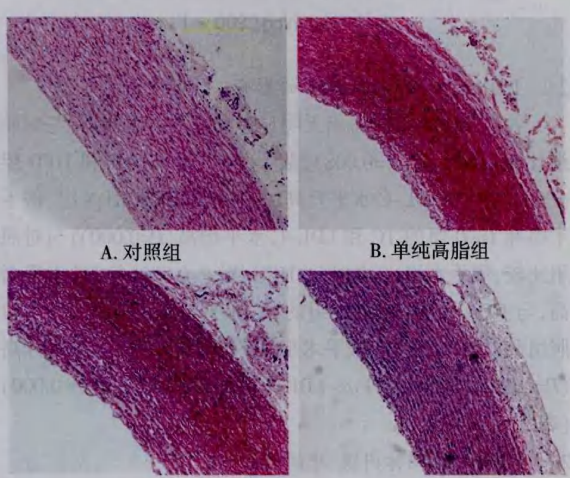
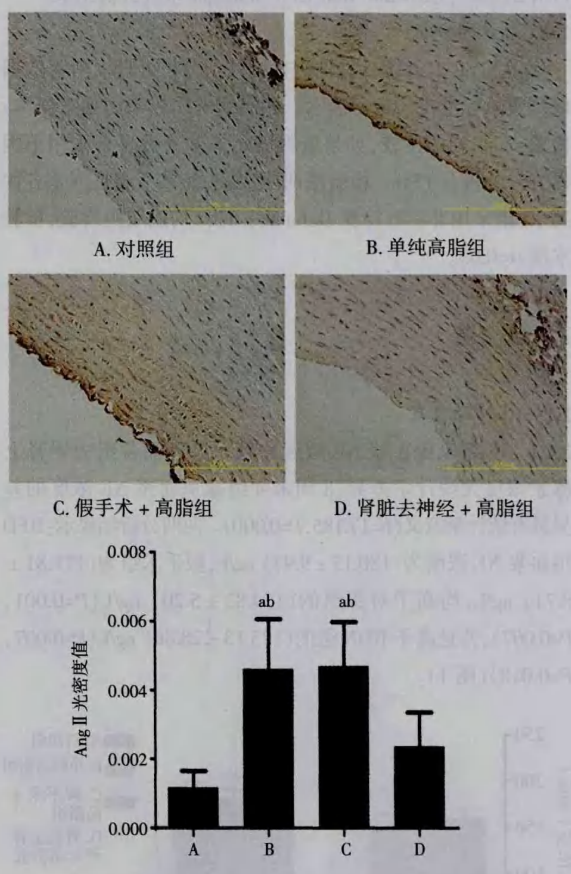


图 3　各组主动脉 HE 染色显微照片（200×）

Fig.3　Photomicrographs of the aorta detected by HE staining（200×）

2.4　RDN 对 AngⅡ的影响：各组家兔主动脉 AngⅡ免疫组化的表达

光镜下 AngⅡ免疫组化阳性主要表达在主动脉内膜及外膜，为复合型，胞浆和胞核均有。4 组家兔 AngⅡ蛋白表达的差异具有统计学意义（F=16.659，P=0.000）。两两比较结果示：与对照组比较，RDN 组 AngⅡ水平无显著差异；与对照组比较，假手术组、HFD 组 AngⅡ水平明显升高（P=0.000），与 RDN 组比较，假手术组、HFD 组 AngⅡ水平明显升高（P=0.001）（图 4）。



a：与对照组比较 P=0.000；b：与 RDN 组比较 P=0.000

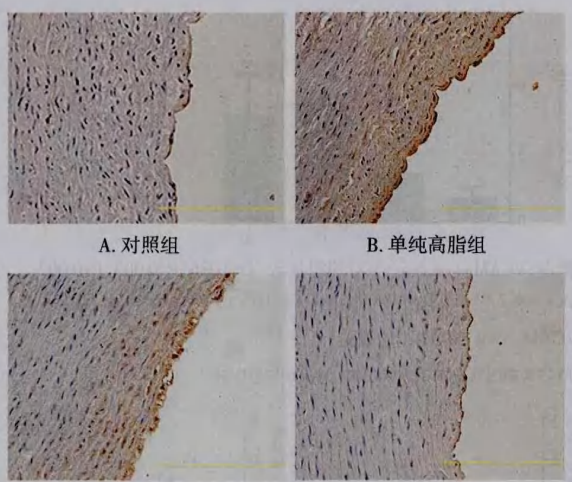
图 4　家兔主动脉 AngⅡ的免疫组化表达（400×）

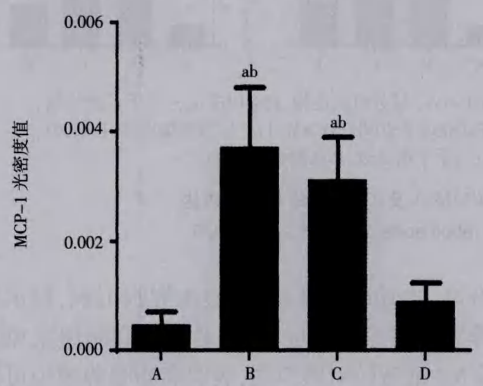
Fig.4　Protein expression of AngⅡ in the rabbit aorta detected by immunohistochemical method（400×）

2.5　RDN 对粘附因子的影响

2.5.1　各组家兔主动脉 MCP-1 免疫组化的表达　MCP-1 的免疫组化阳性主要表达在胞浆中，4 组家兔 MCP-1 蛋白表达的差异具有统计学意义（F=37.127，P=0.000）。两两比较结

果示：与对照组比较，RDN 组 MCP-1 水平无统计学差异；假手术组、HFD 组 MCP-1 水平较对照组和 RDN 组明显升高（P=0.001，P=0.002）（图 5）。





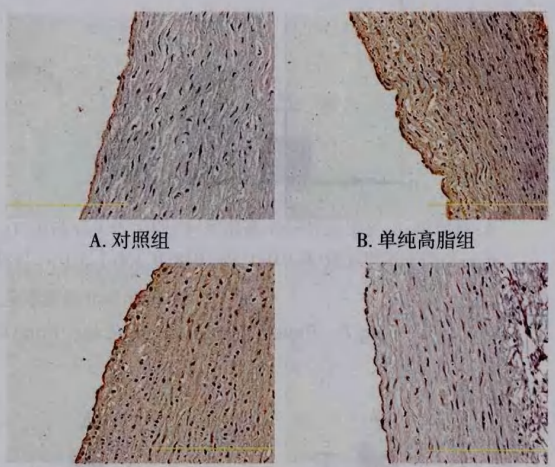
a：与对照组比较 P=0.001；b：与 RDN 组比较 P=0.002

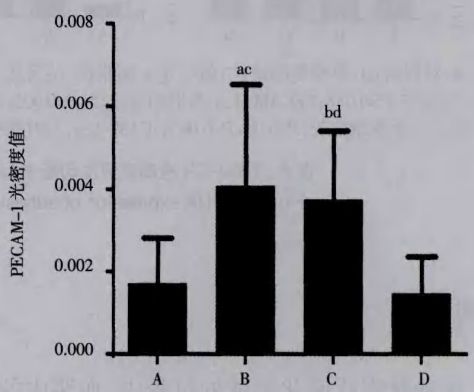
图 5 家兔主动脉 MCP-1 免疫组化表达（400×）

Fig.5 Protein expression of MCP-1 in the rabbit aorta detected by immunohistochemical method（400×）

2.5.2 各组家兔主动脉 PECAM-1 免疫组化的表达 PECAM-1 免疫组化阳性主要表达在胞浆中。4 组家兔 PECAM-1 蛋白表达的差异具有统计学意义（F=4.797，P=0.009）。两两比较结果示：与对照组比较，RDN 组 PECAM-1 水平无统计学差异；与对照组比较，HFD 组（P=0.029）、假手术组（P=0.012）的 PECAM-1 水平升高；与 RDN 组比较，HFD 组（P=0.015）、假手术组（P=0.006）的 PECAM-1 水平升高（图 6）。

2.5.3 各组家兔主动脉 ICAM-1、VCAM-1 的 Western blot 的表达 4 组家兔 ICAM-1 蛋白（F=21.355，P=0.000）和 VCAM-1 蛋白（F=19.043，P=0.000）表达的差异具有统计学意义。两两比较结果示：与对照组比较，RDN 组（P=0.02）、假手术组（P=0.000）和 HFD 组（P=0.007）的 ICAM-1 表达增加；与 RDN 组比较，假手术组（P=0.001）和 HFD 组（P=0.040）的 ICAM-1 表达增高。与对照组比较，RDN 组（P=0.036）、假手术组（P=0.003）和 HFD 组（P=0.002）的 VCAM-1 表达增加；与假手术组比较，RDN 组（P=0.031）和 HFD 组（P=0.038）的 VCAM-1 表达降低（图 7）。



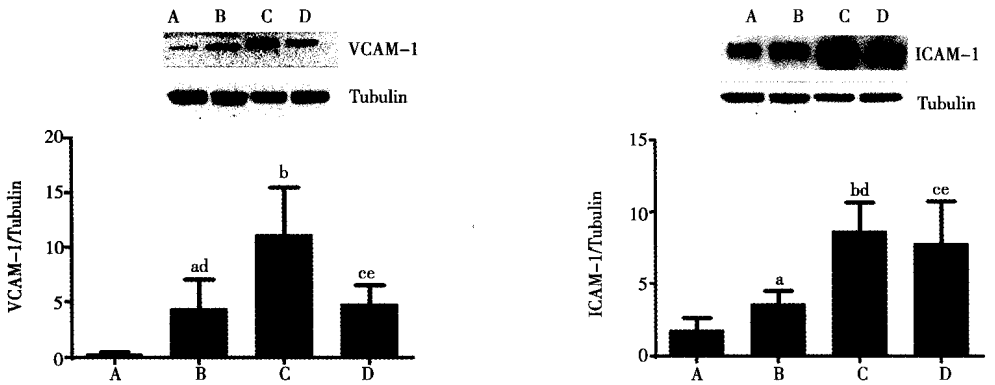


a、b：与对照组比较 P=0.029，P=0.012；
c、d：与 RDN 组比较 P=0.015，P=0.006

图 6 家兔主动脉 PECAM-1 免疫组化表达（400×）

Fig.6 Protein expression of PECAM-1in the rabbit aorta detected by immunohistochemical method（400×）

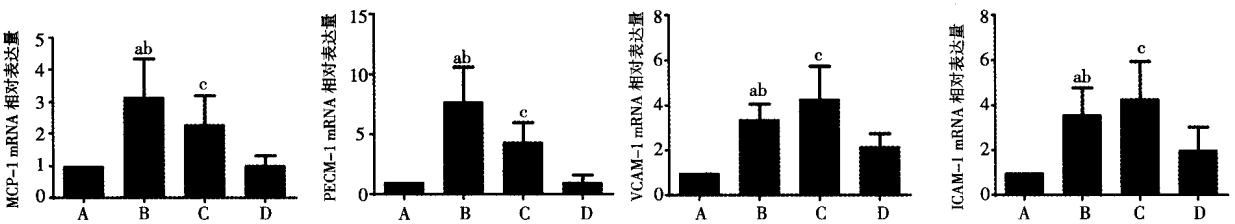
2.5.4 各组家兔主动脉 MCP-1、PECAM-1、VCAM-1、ICAM-1 的 RT-PCR 的表达 4 组家兔 MCP-1（F=12.917，P=0.000）、PECAM-1（F=24.675，P=0.000）、VCAM-1（F=19.046，P=0.000）及 ICAM-1（F=13.112，P=0.000）的 RT-PCR 结果的差异具有统计学意义。两两比较结果示：与对照组比较，HFD 组 MCP-1（P=0.016）、PECAM-1（P=0.005）、VCAM-1（P=0.001）及 ICAM-1（P=0.006）表达增高；与 RDN 组比较，HFD 组 MCP-1（P=0.015）、PECAM-1（P=0.004）、VCAM-1（P=0.03）及 ICAM-1（P=0.044）表达增高，假手术组 MCP-1（P=0.048）、PECAM-1（P=0.005）、VCAM-1（P=0.043）及 ICAM-1（P=0.041）表达增高（图 8）。



A：对照组；B：肾脏去神经 + 高脂组；C：假手术 + 高脂组；D：单纯高脂组；VCAM-1：a、b、c，与对照组比较，P=0.036，P=0.003，P=0.002；d、e：与假手术组比较，P=0.031，P=0.038；ICAM-1：a、b、c，与对照组比较 P=0.02，P=0.000，P=0.007；d、e：与 RDN 组比较 P=0.001，P=0.04

图 7 Western blot 检测家兔主动脉 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达

Fig.7 Protein expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the rabbit aorta detected by Western blot



A：对照组；B：单纯高脂组；C：假手术 + 高脂组；D：肾脏去神经 + 高脂组；MCP-1：a，与对照组比较，P=0.016；b、c：与手术组比较，P=0.015，P=0.048；PECAM-1：a，与对照组比较，P=0.005；b、c：与手术组比较，P=0.004，P=0.005；VCAM-1：a，与对照组比较，P=0.001；b、c：与手术组比较，P=0.03，P=0.043；ICAM-1：a，与对照组比较，P=0.006；b、c：与手术组比较，P=0.044，P=0.041

图 8 RT-PCR 检测家兔主动脉中 MCP-1、PECAM-1、VCAM-1 及 ICAM-1 的 mRNA 表达

Fig.8 mRNA expression of adhesion molecules in the rabbit aorta detected by RT-PCR

3 讨 论

在动脉粥样硬化形成的过程中，血浆中的 ox-LDL损伤血管内皮细胞[8]，刺激内皮细胞和单核/巨噬细胞分泌粘附分子（MCP-1、ICAM-1、VCAM-1和PECAM-1）、炎性因子等。AS 早期时，粘附分子介导单核细胞、中性白细胞及淋巴细胞等细胞的粘附及向内膜下移行，使其进入动脉壁分化为巨噬细胞，巨噬细胞摄取 ox-LDL 后形成泡沫细胞，促使脂纹的形成；在进展期，粘附分子增加单核细胞、中性白细胞等细胞间的相互作用，加速其进入粥样硬化斑块，促进斑块的发展并影响其稳定性。王国平等[9]的研究表明，ox-LDL 能促进单核巨噬细胞 MCP-1 的表达，提示其可能通过诱导单核巨噬细胞产生 MCP-1，并趋化其自身迁移至内皮下；Scalia 等[10]的研究表明在高脂喂养家兔的高脂血症早期，ICAM-1、VCAM-1 介导白细胞与内皮细胞的粘附，其在血管内皮中观察到粘附分子上调。

本实验中单纯高脂组家兔与对照组相比，血脂明显升高，主动脉壁增厚，有泡沫细胞沉积，提示高脂喂养家兔模型建立成功，同时单纯高脂组家兔在 8 周后 NE 浓度较对照组高，表明高脂喂养家兔可使全身交感活性增高。单纯高脂组与假手术组相比，血脂、血浆 NE 浓度及主动脉壁内中膜厚度等改变无明显统计学差异。Western blot 和 RT-PCR 结果一致提示 RDN 组 ICAM-1、VCAM-1 的表达较假手术组和单纯高脂组降低，而 MCP-1、PECAM-1 在免疫组化和 RT-PCR 中的表达亦有相同的结果，除 RDN 组 VCAM-1 的蛋白印迹表达较单纯高脂组仅有降低趋势无统计学差异外，其它结果均具有统计学差异。同时 RDN 组主动脉内膜/中膜比值较单纯高脂组降低，也具有统计学差异，说明 RDN 后，主动脉壁粘附分子生成减少，改善了内膜的病理改变。

有研究发现交感神经系统与 RAAS 系统密切相关，而 RAAS 系统中的 AngⅡ影响动脉粥样硬化的形成。喂养高脂饮食的家兔可使全身交感活性增高[11]，交感神经活性增高后可产生和分泌过多的去甲肾上腺素，使肾血管收缩、肾血流量减少，进而激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统，肾素分泌增加[12-13]，

使 AngⅡ的浓度升高。AngⅡ通过增加巨噬细胞表面 LDL 受体和促进巨噬细胞介导的 LDL 氧化修饰等途径使巨噬细胞摄取 LDL 以及 ox-LDL，血管壁细胞摄取 ox-LDL 后，粘附分子生成增多，促进了动脉粥样硬化形成。肾脏交感神经为全身交感神经系统的重要组成部分，本实验去除肾交感神经后，RDN 组血浆 NE 浓度明显低于假手术组和单纯高脂组组，间接反映了 RDN 可降低交感神经活性[14]。交感神经活性降低后交感递质被阻断，球旁细胞的 β 肾上腺素能受体不能被激活，肾素活性降低[15-16]，使 AngⅡ的浓度降低[17]。RDN 术后，AngⅡ表达降低，可能是本实验中促使主动脉壁 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 和 PECAM-1 表达降低的原因，因为 AngⅡ浓度的降低减少了 LDL 的氧化修饰和血管壁细胞对 ox-LDL 的摄取减少，从而降低了 ox-LDL 的浓度，使动脉壁的粘附分子生成减少。本实验中 RDN 组主动脉内膜/中膜比值较单纯高脂组降低，有统计学差异，考虑 ox-LDL 及粘附分子的减少进而延缓了动脉粥样硬化的发展，虽然 RDN 组主动脉内膜/中膜比值较假手术组有降低的趋势，但无统计学差异，考虑可能系样本量较小的原因。

同时，经 8 周高脂饮食喂养，RDN 组的血浆 TG 较单纯高脂组降低有统计学意义，较假手术组有降低趋势，但没有统计学意义，而 TC、LDL-C、HDL-C 没有统计学差异，说明肾脏去交感神经能降低高脂喂养家兔血浆 TG 水平。有研究表明[18]，AT1 受体阻断剂可以上调 PPAR-γ 的表达，进而 PPAR-γ 激活通过诱导脂解作用降低循环中的 TG 水平。本实验 AngⅡ浓度降低，减少与 AT1 受体的结合，可上调 PPAR-γ 表达，从而使 TG 浓度降低。单纯高脂组、假手术组和 RDN 组的血浆 HDL-C 较对照组明显增高，其机制可能与高脂喂养后机体内卵磷脂胆固醇酰基转移酶（lecithin-cholesterol acyltransferase，LCAT）和胆固醇酯转移蛋白（cholesterolestertransferprotein，CETP）的活性改变有关。有文献报道[19]，高脂喂养豚鼠血清中 HDL-C 浓度较正常组增高，机制为 LCAT 活性下降，催化胆固醇酯化的速率降低，使 HDL-C 成熟受阻，HDL-C 增高，同时 CETP 活性增高导致 HDL-C 增高。同时又有文献报道高脂喂养家兔血 HDL-C 浓度增高，但未研究其增高的机制。目前此实验中血浆 TC、LDL-C 浓度无明显差异的具体机制还不清楚。

总之，RDN 降低血浆 TG 浓度，同时可能降低交感神经活性后从而下调高脂喂养家兔主动脉中粘附分子的表达，从而延缓动脉粥样硬化的发生发展。

参 考 文 献

[1] 李俊涛，王高频. 对动脉粥样硬化炎症机制认识的新进展[J]. 新医学，2009，40(11)：762-764.

[2] 何玉辉，刘惠亮. 粘附分子与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 疑难病杂志，2006，5(2)：155-157.

[3] 李焕铮，曹运长. 单核细胞趋化蛋白 1 与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 医学综述，2008，14(20)：3050-3052.

[4] Miyazaki M，Takai S. Involvement of angiotensin Ⅱ in development of atherosclerosis[J]. Nihon Rinsho，2002，60(10)：1904-1910.

[5] 于丽娜，徐延敏. 血管紧张素Ⅱ及其受体拮抗剂在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 实用心脑肺血管病杂志，2010，18(1)：88-91.

[6] 张 莹，周颖玲. 血管紧张素Ⅱ协同氧化低密度脂蛋白致动脉粥样硬化[J]. 岭南心血管病杂志，2005，11(3)：209-212.

[7] 张 眉，殷跃辉. 肾脏去交感神经术的研究新进展[J]. 保健医学研究与实践，2014，11(3)：86-89.

[8] 徐佳杨，蔡 辉. 氧化低密度脂蛋白与动脉粥样硬化的研究[J]. 安徽医药，2011，15(2)：228-230.

[9] 王国平，邓仲端，瞿智玲. 氧化修饰的低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白对单核细胞 MCP-1 表达的影响[J]. 中华病理学志，1996，25(4)：28-31.

[10] Scalia R，Appel JZ Rd，Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit：role of P-selectin，ICAM-1，and VCAM-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，1998，18(7)：1093-1100.

[11] Rüster C，Wolf G. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in obesity-related renal diseases[J]. Seminars in Nephrology，2013，33(1)：44-53.

[12] 陈 炜，唐晓鸿. 肾交感神经对肾素血管紧张素醛固酮系统的影响[J]. 中华高血压杂志，2013，21(2)：127-129.

[13] Michaels S，Eppel GA，Burke SL，et al. Altered responsiveness of the kidney to activation of the renal nerves in fat-fed rabbits[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol，2009，296(6)：1889-1896.

[14] 丁雪燕. 去肾交感神经对自发性高血压大鼠左心室肥厚的影响[D]. 上海：第二军医大学，2013.

[15] Lohmeier TE，Lliescu R，Liu B，et al. Systemic and renal-specific sympathoinhibition in obesity hypertension[J]. Hypertension，2012，59(2)：331-338.

[16] Evans RG，Burke SL，Lambert GW，et al. Renal responses to acute reflex activation of renal sympathetic nerve activity and renal denervation in secondary hypertension[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol，2007，293(3)：1247-1256.

[17] 卢成志，刘 佳，夏大胜，等. 经皮肾动脉射频消融术对犬高血压影响机制的探讨[J]. 中华心血管病杂志，2012，40(1)：14-17.

[18] 马志强，成 蓓，丁宇慧，等. 缬沙坦对兔动脉粥样硬化斑块中 ACAT-1 和 PPAR-γ 表达的影响[J]. 解放军医学杂志，2008，33(9)：1105-1108.

[19] 陈慧敏，高南南，杨润梅，等. 高脂饮食豚鼠高密度脂蛋白代谢的特点[J]. 中国实验动物学报，2010，18(3)：199-203.

（责任编辑：张辉洁）