DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.010

兔动脉粥样硬化进程中红细胞 Na^+-K^+-ATPase和全血粘弹性参数的变化及其可能的预示作用*

王红勇** 何作云*** 秋华*** 黄永萍*** (第三军医大学附属大坪医院心血管内科) 重庆, 630042

提 要 目的: 了解血脂、Na^+-K^+-ATPase及全血粘弹性参数(弹性模量及动粘度)在兔动脉粥样硬化进程中的预示作用。方法: 健康家兔 80只随机分为实验组(AG) 60只及对照组(CG) 20只,各组又分为 4个亚组,即 AG_1~AG_4和 CG_1~CG_4, AG给予胆固醇粉 1 g·d^{-1}·只$^{-1}$,在喂养的第 2、4、8和 12周分别观察 AG_1~CG_1、AG_2~CG_2、AG_3~CG_3、AG_4~CG_4主动脉粥样硬化(AS)病变和上述指标的变化。结果: 在兔 AS阶段性进程中,血脂(Tch、TG)在 AS早期明显增高,其后有所降低;红细胞膜 Na^+-K^+-ATPase活性自 AS早期起进行性降低,且在 AS早、晚期与 Tch有密切负相关关系(r = -0.67~-0.51, P < 0.01~0.05);全血粘弹性参数中,在早期仅当角频率(ω)为 0.190 Hz时弹性模量呈单一性升高,而中、晚期弹性模量及动粘度普遍升高,二者之间有正相关关系(r = 0.51~0.85, P < 0.05~0.001)。结论: 上述指标在 AS进程中有一定的阶段性预示作用。

关键词 动脉粥样硬化;血脂; Na^+-K^+-ATPase;全血粘弹性;兔
中图法分类号 R543.5

动脉粥样硬化(AS)的形成是一个复杂的病理生理过程,病因尚不完全清楚,但已知许多因素可以通过损伤血管内皮细胞而致 AS形成,其中以高脂血症、血流动力学应力以及化学因子的作用为重要[1,2]。我们分阶段考察了兔实验性 AS进程中血脂、红细胞 Na^+-K^+-ATPase活性和全血粘弹性的改变,并探讨其在 AS进程中的预示作用。

1 材料和方法

1.1 兔 AS模型的建立

健康家兔 80只,体重 2.0 kg~2.5 kg,雌雄不拘,随机分为实验组(AG) 60只,对照组(CG) 20只,各又均分为 4个亚组,即 AG_1~AG_4和 CG_1~CG_4。所有家兔均单笼饲养,饮水不限, CG喂饲普遍颗粒饲料, AG另添加胆固醇粉(广州化学试剂分公司进口分装) 1 g·d^{-1}·只$^{-1}$,在喂养的第 2、4、8、12周分别气栓处死 AG_1~CG_1、AG_2~CG_2、AG_3~CG_3和 AG_4~CG_4之家兔,心脏穿刺抽血并取主动脉标本。

1.2 血脂测定

胆固醇(Ch)采用乙醇抽提,高铁-硫酸显色法;甘油三酯(TG)采用乙酰丙酮法测定。

1.3 Na^+-K^+-ATPase活性测定

红细胞膜样制备按 Pearson的方法[3];膜蛋白含量测定采用 Lowry法;磷含量测定采用硫酸亚铁钼蓝比色法;钠泵活性以单位重量膜蛋白在单位时间里产生无机磷的量表示。

1.4 全血粘弹性参数测定

按 Kaiber等[4]规定的条件采集肝素抗凝血(20 U/ml)全血 2 ml,利用 Contraves公司生产的 Low Shear-30流变仪测全血粘弹性,角频率(ω)分别为 0.190、0.252、0.351、0.476、0.648、0.880、1.196、1.627和 2.210 Hz,得到各组在不同角频率下的粘弹性参数,即复粘度的动粘度(η')和弹性模量(G')。

1.5 病理学检查

1.5.1光镜检查 于主动脉弓顶部取 0.5 cm×0.5 cm大小的全层组织,置于 10%福尔马林固定液中,石蜡切片、HE染色、光镜观察。

1.5.2电镜观察 取材部位用光镜检查,按本校电镜室常规方法制作标本, H-300型电镜(TEM)和 JSM-T300型扫描电镜(SEM)(日本岛津公司)观察超微结构改变。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间配对 t检验,并进行相关分析。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 938800300
** 王红勇,男, 30岁,讲师,主治医师,硕士
*** 第三军医大学附属新桥医院 重庆, 630037

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 病理改变

AG_1大体未见改变,但光、电镜下可见有微小病灶:内皮细胞增生,结构模糊,胞浆吞噬少量脂质,内弹力膜有破坏,此为AS前期(微小病灶期);AG_2出现脂点、脂纹,内膜及肌细胞显著增生,泡沫细胞堆积,此为AS早期(脂纹期);AG_3、AG_4可见大片AS斑块,并有大量纤维细胞,在AG_4尚可见粥样区,此为AS中晚期(纤维脂质斑块期和纤维粥样斑块期)。

CG无上述变化。

2.2 血脂、酶活性改变及其幅度见表1

表1 血脂、$Na^+-K^+-ATPase$活性改变($\bar{x}\pm s$)及各指标相对于对照组的增(减)幅(%)

Tab 1 Changes in blood lipid concentration and $Na^+-K^+-ATPase$ activity ($\bar{x}\pm s$) and their increased levels compared with control(%)

	CG($n=20$)	AG_1($n=15$)	AG_2($n=15$)	AG_3($n=15$)	AG_4($n=15$)
Tch(C_B/mmol·L^{-1})	3.47±1.92	3.46±1.55	16.9±12.16**	9.41±3.33**△△	19.22±8.30**□□
			(387.32%)	(171.18%)	(453.89%)
TG(C_B/mmol·L^{-1})	1.63±0.65	1.3±0.39	2.23±0.84*	1.48±0.70△△	1.60±0.90
			(36.85%)		
$Na^+-K^+-ATPase$ (C_B/μmol·$mg^{-1}\cdot h^{-1}$)	0.68±0.10	0.6±0.11	0.54±0.12**	0.35±0.14**△△	0.23±0.11**□□
			(-20.59%)	(-48.53%)	(-66.18%)

:$P<0.01$,*:$P<0.001$ *vs* CG;△△:$P<0.01$ *vs* AG_2;□□:$P<0.01$ *vs* AG_3

各对照亚组诸指标无变化($P>0.05$),因此将它们归为CG。AS前期各指标稳定,此后随喂养时间的延长Tch呈明显升高趋势($P<0.0$或0.001),但AS中期有回落,而TG仅在早期增高($P<0.01$);$Na^+-K^+-ATPase$活性进行性降低($P<0.0$或0.001)。

2.3 全血粘弹性的改变及其幅度见表2 3

表2 全血动粘度(η/mPa·s^{-1})的改变($\bar{x}\pm s$)及相对于对照组的增幅(%)

Tab 2 changes in whole blood dynamic viscosity (η/mPa·s^{-1}) ($\bar{x}\pm s$) and its increased levels compared with control(%)

ω(Hz)	CG($n=20$)	AG_1($n=15$)	AG_2($n=15$)	AG_3($n=15$)	AG_4($n=15$)
0.190	6.35±1.33	6.41±1.21	7.20±2.02	9.01±1.12*	11.12±3.71**△△
				(41.89%)	(75.12%)
0.252	5.47±1.29	5.49±0.97	6.23±2.28	9.89±5.26**	10.09±6.20**
				(80.8%)	(84.46%)
0.351	5.10±1.21	5.07±0.38	5.26±1.39	8.01±3.45**	9.99±1.34**△△
				(57.06%)	(95.88%)
0.476	4.03±1.27	4.00±1.01	4.39±1.03	6.82±2.80**	8.89±2.01**△△
				(69.23%)	(120.6%)
0.648	3.45±0.92	3.45±0.75	3.63±0.82	5.49±2.24*	8.15±3.72**△△
				(59.13%)	(136.23%)
0.880	2.34±0.73	2.33±0.33	2.56±0.71	3.26±1.05	4.01±1.01*△
					(71.37%)
1.196	1.2±0.15	1.23±0.37	1.4±0.43	2.04±0.38**	3.90±0.80**△△
				(68.6%)	(222.31%)
1.627	1.13±0.41	1.14±0.41	1.30±0.30	1.62±0.46**	2.01±0.40**△△
				(43.36%)	(77.88%)
2.210	1.01±0.10	1.09±0.35	1.18±0.28	1.82±0.80**	2.75±0.89**△△
				(80.2%)	(172.28%)

*:$P<0.05$,**:$P<0.01$ *vs* CG;△:$P<0.05$,△△:$P<0.01$ *vs* AG_3

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果显示各对照亚组 η′和 G′保持相对恒定($P>0.05$).AS前期无变化,早期仅 ω= 0.190 Hz时 G′明显增高($P<0.001$),中晚期 η′和 G′普遍增高($P<0.05$或 0.01, 0.001)。

表 3　全血弹性模量(E. mPa)的改变 ($\bar{x}\pm s$)及相对于对照组的增幅 (%)

Tab 3　Changes in whole blood dynamic medulus (E. mPa) ($\bar{x}\pm s$) and its increased levels compared with control (%)

ω(Hz)	CG($n=20$)	AG_1($n=15$)	AG_2($n=15$)	AG_3($n=15$)	AG_4($n=15$)
0.190	0.55± 0.37	0.58± 0.12	0.69± 0.22**	1.68± 1.42***	1.91± 0.39***△△
			(25.45%)	(205.45%)	(247.27%)
0.252	0.90± 0.33	0.89± 0.19	0.98± 0.39	1.98± 1.47**	2.14± 0.90*
				(120%)	(167.78%)
0.351	1.22± 0.71	1.27± 0.61	1.34± 0.55	2.54± 1.85**	3.11± 1.21**△△
				(108.2%)	(154.92%)
0.476	1.62± 0.32	1.71± 0.17	1.91± 0.73	3.14± 2.03**	3.29± 1.00**
				(93.83%)	(103.09%)
0.648	2.39± 0.63	2.40± 0.71	2.69± 1.00	4.16± 2.38*	4.72± 1.03*△
				(74.06%)	(97.49%%)
0.880	3.30± 0.71	3.50± 0.65	3.56± 0.99	5.46± 2.71**	6.60± 2.01**△△
				(65.45%)	(100%)
1.196	4.50± 1.01	4.51± 1.03	4.81± 1.18	6.71± 3.06**	8.12± 2.02**△△
				(49.11%)	(80.44%)
1.627	5.27± 1.37	5.31± 1.31	5.46± 1.38	7.51± 3.05*	8.94± 3.02*△△
				(42.5%)	(69.64%)
2.210	5.39± 1.21	5.40± 0.91	5.71± 1.49	7.35± 2.75*	9.46± 1.35**△△
				(36.36%)	(78.11%)

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,***: $P<0.001$ *vs* CG;△: $P<0.05$,△△: $P<0.01$ *vs* AG_3

2.4　相关性分析

在 AS早、晚期 Tch浓度与 $Na^+-K^+-ATPase$活性呈负相关(早期: $r=-0.67$, $P<0.01$;晚期: $r=-0.51$, $P<0.05$);G′与 η′普遍显示正相关关系($r=0.51\sim0.85$, $P<0.05\sim0.001$,但在 AS早期需除外 ω= 0.648 Hz时)。

3　讨论

服高胆固醇饲料的家兔其 Tch、TG、$Na^+-K^+-ATPase$活性及全血粘弹性参数发生了有序变化,我们拟借此探讨其在兔 AS形成的阶段性进程中的预示价值。

3.1　血脂与 AS

结果表明 AS前期血脂水平无变化,此后 Tch在全程呈现明显增高趋势,尽管在中期回落,但仍明显高于 CG,而 TG仅在早期显示增高。在早期出现了微小病灶而血脂却不高,可能是由于血脂增高过程和内皮损害、血脂沉着在同时进行,而中晚期血脂的回落恐也与脂质的大量沉积有关。由上可知血脂的不同组份的变化可以对 AS进程起到预示作用: Tch增高预示着 AS已形成,其明显增高期示 AS早期(增幅为 387.32%),而转低时可能意味着已转入 AS中晚期,这与我们既往发现在冠心病稳定期血脂无显著升高是一致的[5]。而若 Tch又突然升高(增幅为 453.89%),可能提示 AS又恶化。TG增高表明为 AS早期(增幅为 36.85%)。AS尚处于可逆阶段,应及时行降脂治疗,防治 AS进展。

3.2　$Na^+-K^+-ATPase$与 AS

结果表明除 AS前期外,其后 $Na^+-K^+-ATPase$活性进行性降低(AS早期降低 20.59%,中晚期各降低 48.53%和 66.18%),且在早、晚期与 Tch负相关,提示 Tch是 $Na^+-K^+-ATPase$活性降低的重要原因[6,7]。根据上述活性的梯级式变化,可以大致推测其 AS时期。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.3 全血粘弹性与 AS

G'及 η'在 AS前期无变化,而在早期仅 $\omega = 0.190$ Hz时 G'呈单一性升高(增幅为25.45%而 η'不升高),提示在低剪切率下红细胞变形性首先显示低下,对AS早期有独特的预示作用。其后 AS中晚期 G'及 η'呈全面上升态势(二者间有密切正相关关系),表明 G'及 η'的明显升高预示着 AS中晚期形成。全血粘弹性的增高与高脂血症有关[1,8],一般认为它比其它血流变参数与血液各组份的物理化学性质关系更密切[9],因此其预示作用较其它血流变指标更具特异性。

以上的研究是初步的,更长时间的变化及预示作用有待进一步探索。

参考文献

1 He Z Y, Yin C E, Li X K. Preliminary study of relationship between apparent viscosity, viscoelastic properties of whole blood and cardiac function in patients with acute myocardial infarction. Chin Pathophysiol, 1991; 7(5): 503

2 Spagnoli L G, Orlandi A, Mauriello A *et al*. Aging and atherosclerosis in rabbits, Ⅰ. distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. Atherosclerosis, 1991; 89(1): 11

3 Pearson T W, Na^+ -K^+ -ATPase of duchenne muscular dystrophy erythrocyte ghosts. Life Sciences, 1978; 22: 127

4 Kaber V *et al*. Reference ranges of viscoelastcity of human blood. Biorheology, 1988; 25(5): 727

5 何作云,丁秋华.老年前期和老年期冠心病血脂特性分析,重庆医药, 1992; 21(1): 13

6 Capon L I Shafer M Z H, Velizhamina L A *et al*. Effects of natriuretic hormone and changes in the lipid spectrum of transmembrane ion transport in patients with essential hypertension. Ter Arkh, 1990; 62(2): 40

7 Yeagle P L. cholesterol modulation of Na^+ -K^+ -ATPase A T P hydrolyzing activity in the human erythrocyte Biochemica Biophys Acta, 1983; 727(1): 39

8 Perri T D The hyperviscosity syndromes. Chin Hemorheol, 1990; 10(6): 581

9 吴西,陈 浩,蔡绍皙.肺癌病人血液粘弹性实验研究 中国血液流变学杂志, 1995; 5(4): 19

(收稿: 1996-12-30;修回: 1997-04-11)

(编辑 仇玉福)

Changes of erythrocyte Na^+ -K^+ -ATPase and whole blood viscoelastic parameters in the course of experimental atherosclerosis in rabbits and their possible predicting role*

Wang Hongyong (Department of Cardiovascular Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

He Zuoyun, Li Xikai, Ding Qiuhua, Huang Yongping (Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract Objective: The role of blood lipids, Na^+ -K^+ -ATPase activity, whole blood dynamic viscosity (η') and dynamic modulas (G') in predicting different stages of experimental atherosclerosis (AS) were studied. Methods: 80 rabbits were randomly divided into experimental group ($n = 60$) and control group ($n = 20$). Each of the two groups was also equally divided into for subgroups: four experimental subgroups and four control ones. Each rabbit of the experimental group was fed with cholesterol powder (1g/d). At the 2nd, 4th, 8th and 12th week, blood lipid concentration, erythrocyte Na^+ -K^+ -ATPase activity and whole blood viscoelasticity were tested and the pathologic alteration of AS in the aorta were also observed. Results: Serum triglyceride (TG) was increased only in the early stage of AS and serum total cholesterol (Tch) was significantly higher in the early, middle and late stage of AS than in controle. Erythrocyte Na^+ -K^+ -ATPase activity was progressively decreased and negatively correlated with Tch in the early and late stage of AS ($r = -0.67 \sim -0.51$, $P < 0.01, 0.05$) G' was significantly increased only when shear rate was 0.190 Hz in early AS, but G' and η' were progressively elevated in the middle and late stage of AS. Conclusion: It is possible that blood lipids, Na^+ -K^+ -ATPase activity and whole blood viscoelasticity can predict the various stages of experimental atherosclerosis in rabbits.

Key words atherosclerosis; blood lipid; Na^+ -K^+ -ATPase; viscoelasticity; rabbit

* This project was supported by National Natural Foundation of China, No. 938800300

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net