

• 论著-临床基础研究 •

全氟化碳乳剂对动脉粥样硬化大鼠 血管舒缩因子的调控作用

李其昌¹ 姜靖² 庞继恩²

【摘要】 目的:使用高剪切乳化机制备全氟化碳乳剂(PFCE),通过静脉注射 PFCE 对动脉粥样硬化(AS)模型大鼠进行干预,观察其内皮功能指标的变化,初步探讨 PFCE 对 AS 大鼠血管舒缩活性因子的调控作用及对内皮的可能保护作用。**方法:**将 50 只 Wistar 雄鼠随机分为 5 组:空白对照组,模型组,PFCE 低、中、高剂量组,每组 10 只。除空白对照组用普通维持饲料外,其余均以维生素 D3 加高脂饲料喂养诱导实验性大鼠 AS 模型,PFCE 低、中、高剂量组在造模同时给予不同剂量药物干预。12 周后,测定各组大鼠血清 NO、ET-1、TXA₂、6-K-PG 的含量,苏木精-伊红染色法观察各组大鼠主动脉病理变化。**结果:**模型组 NO、TXA₂ 含量显著降低,ET-1、6-K-PG 含量显著升高,与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且 NO/ET-1 比值、TXA₂/6-K-PG 比值平衡失调;PFCE 高、中剂量组较模型组血清 NO、TXA₂ 含量显著升高,ET-1、6-K-PG 含量显著降低($P<0.05$),并改善 NO/ET-1 及 TXA₂/6-K-PG 的比值($P<0.05$);PFCE 低剂量组与模型组相比血清中各指标差异无统计学意义($P>0.05$);PFCE 高剂量组与 PFCE 低剂量组相比血清 NO、TXA₂ 含量显著升高,ET-1、6-K-PG 含量显著降低($P<0.05$),与中等剂量组差异不显著($P>0.05$);PFCE 高、中剂量组较 PFCE 低剂量组减轻 AS 大鼠主动脉组织形态学变化更明显。**结论:**中等剂量以上 PFCE 可能通过调控 AS 大鼠血管舒缩活性因子,起到保护血管内皮的功能,发挥阻止 AS 进一步发生和发展的作用。

【关键词】 动脉粥样硬化;全氟化碳;血管舒缩因子

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.11.017

【中图分类号】 R543.5 **【文献标志码】** A

Antagonistic effect of perfluorocarbon emulsion on vasomotor activity factor of atherosclerosis rats

LI Qichang¹ JIANG Jing² PANG Jien²

(¹Department of Cardiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266071, China; ²Department of Cardiology, The Chinese People's Liberation Army 401 Hospital)
Corresponding author: PANG Jien, E-mail: pangjien@sina.com

Abstract Objective: The perfluorocarbon emulsion was prepared by using a high shear emulsifier. The rats in the atherosclerotic model were treated by intravenous injection of PFCE to observe the changes of endothelial function. **Method:** Fifty Wistar males were randomly divided into 5 groups: blank control group, model group, PFCE low, medium and high dose group, with 10 rats in each group. In the control group, the experimental rats were

¹ 青岛大学医学院心内科(山东青岛,266071)

² 中国人民解放军 401 医院心内科

通信作者:庞继恩, E-mail: pangjien@sina.com

得较好的临床疗效,是良好的手术策略。但为了进一步明确,则需要多中心、大样本随机对照研究证实。

参考文献

- [1] SIEGAL E M. Acute aortic dissection[J]. J Hosp Med, 2006, 1:94-105.
- [2] NAKAJIMA T, KAWAZOE K, IZUMOTO H, et al. Risk factors for hypoxemia after surgery for acute type A aortic dissection[J]. Surg Today, 2006, 36: 680-685.
- [3] WANG Y, XUE S, ZHU H. Risk factors for postoperative hypoxemia in patients undergoing Stanford A aortic dissection surgery[J]. J Cardiothorac Surg, 2013, 8:118-124.

- [4] JONDEAU G, DETAINT D, TUBACH F, et al. Aortic event rate in the Marfan population: a cohort study[J]. Circulation, 2012, 125: 226-232.
- [5] WEN D, WU H Y, JIANG X J, et al. Role of plasma C-reactive protein and white blood cell count in predicting in-hospital clinical events of acute type A aortic dissection[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124: 2678-2682.
- [6] AIKAWA N, ISHIZAKA A, HIRASAWA H, et al. Reevaluation of the efficacy and safety of the neutrophil elastase inhibitor, Sivelestat, for the treatment of acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome; a phase IV study[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24:549-554.

(收稿日期:2017-08-10)

induced by vitamin D3 plus high fat diet, and the treatment group was treated with different doses of drugs at the same time. After 12 weeks, the levels of serum NO, ET-1, TXA2 and 6-K-PG in each group were measured and the pathological changes of the aorta were observed by HE staining. **Result:** The content of NO and TXA2 in model group was significantly decreased ($P < 0.05$), the content of ET-1, 6-K-PG was significantly increased, and the ratio of NO / ET-1 and TXA2 / 6-K-PG were significantly different from the control group ($P < 0.05$). The levels of NO and TXA2 in the high and middle dose groups of PFCE were significantly higher than those in the model group, and the content of ET-1, 6-K-PG was significantly decreased and the ratio of NO / ET-1 and TXA2 / 6-K-PG was improved ($P < 0.05$). There was no significant difference in the serum levels between the low dose group and the model group ($P > 0.05$). The levels of NO and TXA2 in the PFCE high dose group and the low dose group were significantly higher than those in the low dose group, and the content of ET-1, 6-K- And the difference was not significant in the middle dose group ($P < 0.05$). The PFCE high and middle dose group reduced the morphological changes of the aorta in the AS group compared with the PFCE low dose group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Medium dose above perfluorocarbon emulsion may be regulated through the vasculature AS rats vasomotor activity factor, protect endothelial function, and play a role in preventing the occurrence and development of AS further.

Key words atherosclerosis; perfluorocarbon; vasomotor factors

现代医学认为,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病的发病基础,严重威胁人类健康,是中老年死亡的首因^[1]。然而 AS 的发病机制复杂,目前尚不十分明确。近年来多项研究表明,血管内皮细胞功能失调是 AS 发病早期的关键性环节。一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)含量及其比值反映 AS 内皮功能的变化,血栓素 A2(TXA2)和前列腺素(PGI2)之间的平衡也是保护血管内皮细胞免受损伤的关键因素。前期研究已证实,全氟化碳(perfluorocarbon, PFC)作为唯一得到 FDA 许可应用于临床的化学类血氧载体,对缺血心肌及心肌缺血再灌注损伤有一定的保护作用^[2]。前期研究证实腹腔注射 PFC 一定程度上可改善大鼠血管内皮功能,起到血管内皮保护作用^[3]。本实验在此基础上,进一步探讨静脉注射全氟化碳乳剂(PFCE)对大鼠血管舒缩活性因子的调控作用及对血管内皮的保护作用,以便为 PFC 临床应用进一步提供科学依据及研究基础。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

雄性清洁级 Wistar 大鼠 50 只,体质量 230 ~ 300 g,由青岛市药物检验所提供。

1.1.1 试剂 大鼠一氧化氮(NO)、内皮素 1(ET-1)、血栓素 A2(TXA2)、6 酮前列腺素(6-K-PG) ELISA 试剂盒均购自美国 R&D System 公司。

1.1.2 仪器 仪器低温高速离心机(3-18k,美国 Sigma 公司)、超低温冰箱(美国 Forma 科学仪器公司);Bio-rad Model 550 型酶标仪(美国 Bio-rad 公司);GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),高剪切乳化机(弗鲁克公司)。

1.1.3 药物 PFCE 制备 PFC 原液(全氟辛酸 C8F18 型),由上海华捷视医疗设备有限公司提供,与山梨醇、卵黄磷脂、注射用水按比例配制成溶液,调节 pH 值至 7.4,经高剪切乳化机循环乳化 30

min,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,制得稳定的乳剂(PFC 含量 48.7%)。所得乳剂经电子辐照(青岛青迈高能电子辐照有限公司)消毒备用,经动物实验证实安全。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 动物适应性喂养 1 周后,将 50 只大鼠按随机数字表法随机分为 5 组(每组 10 只):空白对照组(A 组),模型组(B 组),PFCE 低剂量组(C 组),PFCE 中剂量组(D 组),PFCE 高剂量组(E 组)。A 组给予普通饲料喂养,其余 4 组每只每天喂养 AS 饲料(江苏美迪森生物医药有限公司提供,含 1.25%胆固醇、0.5%去氧胆酸钠)20 g,并予丙基硫氧嘧啶 40 mg/d 灌胃。按 70 万 IU/kg 的总剂量给予腹腔注射维生素 D3,分 3 d 给完。之后均自由摄食,饮水。连续喂养 12 周。

1.2.2 药物干预及标本处理 自实验第 2 周开始,C 组、D 组、E 组每 3 d 给予 PFCE 药物干预,C 组每次静脉注射 5 ml/kg, D 组每次静脉注射 10 ml/kg, E 组每次静脉注射 20 ml/kg; A 组、B 组每次静脉注射 0.9%氯化钠注射液 20 ml/kg,直至模型组形成 AS 模型,实验周期 12 周。末次给药后禁食 12 h,不禁水,20%乌拉坦腹腔注射麻醉(6 ml/kg),开胸,心室取血约 4 ml 放于普通试管中,静止 1 h 后,4℃、3000 r/min 的条件下离心 15 min,取上层清液置于 4℃冰箱中待检。分离并剪取主动脉弓至腹主动脉分叉处,冷盐水灌洗去除血管内血液,置于 10%中性福尔马林溶液。

1.2.3 观察指标及检测方法 ①采用 ELISA 法分别检测血清中的 NO、ET-1、TXA2、6-K-PG 的含量,计算 NO 与 ET-1 比值、TXA2、6-K-PG 比值,严格按 ELISA 试剂盒说明的操作;②苏木素-伊红染色法检测主动脉病理变化:组织固定 48 h 后,常规脱水、透明、石蜡包埋,制备横切面石蜡切片,4

μm 连续间断切片,行苏木精-伊红染色,对主动脉行组织学观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 NO、ET-1 及 NO/ET-1 比值比较

各组测量的血清 NO、ET-1 及 NO/ET-1 比值具体结果见表 1。表 1 可见,与其他各组比较,模型组小鼠 NO 显著降低,ET-1 显著升高,NO/ET-1 比值显著降低;C 组的 NO、ET-1 含量与 B 组差异

无统计学意义(P>0.05),而 D 组、E 组相比 B 组、C 组 NO 显著升高(P<0.05),而 ET-1 显著降低(P<0.05),说明中等剂量的 PFC 即可改善 AS。D 组与 E 组比较差异无统计学意义(P>0.05),D 组、E 组对 AS 影响差异不显著。

2.2 各组大鼠血清 TXA2、6-K-PG 及 TXA2/6-K-PG 比值的比较

各组大鼠血清 TXA2、6-K-PG 及 TXA2/6-K-PG 比值具体结果见表 2。B 组与 A 组相比, TXA2、TXA2/6-K-PG 显著升高,6-K-PG 显著降低;与 B 组比较 D 组、E 组可改善 AS,降低 TXA2、TXA2/6-K-PG 并升高 6-K-PG,而 C 组作用不明显(P>0.05)。

表 1 各组大鼠血清 NO、ET-1 的表达水平及 NO/ET-1 比值情况

Table 1 Levels of serum NO, ET-1 and the ratio of NO/ET-1 pg/ml, $\bar{x} \pm s$

组别	NO	ET-1	NO/ET-1
A 组	34.44±1.78	84.31±5.66	0.41±0.04
B 组	20.06±1.43 ¹⁾	158.06±7.62 ¹⁾	0.14±0.02 ¹⁾
C 组	21.61±3.31	152.10±13.60	0.15±0.03
D 组	27.01±1.42 ²⁾³⁾	114.65±3.40 ²⁾³⁾	0.23±0.06 ²⁾³⁾
E 组	26.41±5.09 ²⁾³⁾	112.97±7.78 ²⁾³⁾	0.22±0.05 ²⁾³⁾

与 A 组比较,¹⁾ P<0.05;与 B 组比较,²⁾ P<0.05;与 C 组比较,³⁾ P<0.05。

表 2 各组大鼠血清 TXA2、6-K-PG 的表达水平及 TXA2/6-K-PG 的比值情况

Table 2 Levels of serum TXA2, 6-K-PG and the ratio of TXA2/6-K-PG pg/ml, $\bar{x} \pm s$

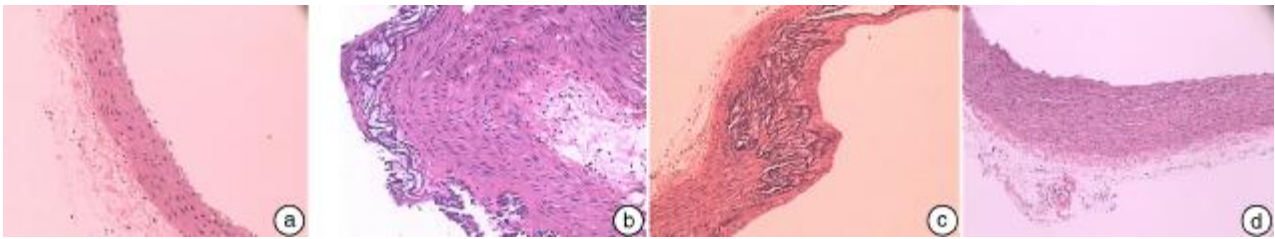
组别	TXA2	6-K-PG	TXA2/6-K-PG
A 组	121.24±12.39	87.69±10.10	1.37±0.24
B 组	231.84±16.60 ¹⁾	43.99±6.00 ¹⁾	5.87±1.26 ¹⁾
C 组	227.19±11.38	45.53±5.64	5.62±0.93
D 组	166.43±8.21 ²⁾³⁾	57.12±5.02 ²⁾³⁾	3.18±0.77 ²⁾³⁾
E 组	165.34±9.42 ²⁾³⁾	71.99±6.05 ²⁾³⁾	2.21±0.54 ²⁾³⁾

与 A 组比较,¹⁾ P<0.05;与 B 组比较,²⁾ P<0.05;与 C 组比较,³⁾ P<0.05。

2.3 各组大鼠主动脉形态学观察

经苏木精-伊红染色后,光镜下可见 A 组主动脉壁内膜连续完整,各层结构完整,无脂质沉积改变,弹力纤维分布均匀,未见异常改变(见图 1a);B 组可见血管壁内膜不连续脱落,内皮细胞肿胀,存在泡沫细胞,内膜及中膜有炎症细胞浸润,中膜变

厚,平滑肌紊乱,内膜下间隙增宽符合动脉硬化早期病变(见图 1b);C 组可见血管管壁增厚,内皮粗糙,中膜平滑肌纤维明显增生,病变范围及内膜增厚程度较 B 组略有减轻(见图 1c);D 组、E 组血管壁内膜光滑,中膜平滑肌纤维轻度增生,炎症细胞浸润明显减少较 B 组减轻(见图 1d)。



a: A 组;b: B 组;c: C 组;d: D 组、E 组。

图 1 各组主动脉壁的苏木精-伊红染色照片

Figure 1 HE stain

3 讨论

心血管疾病是全球死亡的主要原因,每年死亡人数达 1730 万人^[4]。美国心脏协会(AHA)认为,如果所有形式的心血管疾病被治愈,人类的预期寿命将提高近 7 年。AS 是最常见的心血管疾病,在我国 60 岁以上人群中发病率高达 79.9%。鉴于这种严重性,AS 应该引起我们足够的注意,并激发科研学者不断探索新的治疗方法或者干预措施。

改变饮食与生活方式变化是治疗 AS 的最佳方法,朱利月^[5]通过 6MWT、CPET、ABI 等评估方法,对老年下肢动脉硬化闭塞症行非介入治疗术患者进行有氧运动等治疗干预,观察其疗效,发现个体化运动处方指导下的有氧运动训练能有效改善老年下肢动脉硬化闭塞症非介入术患者症状和步行距离、提高运动耐力和 ABI 值。然而严重的病例需要辅助药物治疗,一些常规药物包括降胆固醇药物、降压药物、抗血栓形成药物。尽管药物作用显著,然而所有系统给药的药物都有潜在的不良反应。他汀类药物早已被广泛报道以诱导肝脏和肌肉的毒性,约有 1% 的患者转氨酶水平升高,还有可能导致肌肉疼痛或虚弱,横纹肌溶解,肌肉破裂和急性肾功能衰竭。

PFC 是碳氢化合物中的氢原子被氟原子全部取代后形成的一类环状或直链状有机化合物,由于碳原子与氟原子的强作用力,氟碳化合物具有非常好的稳定性。PFC 无毒、无色、无味,低极化,不溶于水,是最好的疏水物质,有很好的溶解非极性气体的功能,对氧气、二氧化碳的溶解及释放速度较快,并且过程完全可逆,可以作为氧气和二氧化碳的运载体。赵晓巍等^[6]探讨 PFC 雾化吸入对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)猪气体交换、呼吸力学和血流动力学的影响。发现 PFC 雾化吸入能明显改善 ARDS 家猪的氧合,提高损伤肺的顺应性,增加呼出潮气量。余革等^[7]探讨 PFC 汽化吸入预处理对油酸型兔急性肺损伤的干预作用及对 ALI 兔呼吸与氧合功能的影响。认为以 $2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 汽化吸入 PFC 预处理 60 min,可改善油酸型 ALI 实验兔早期呼吸功能及氧合状况。

由于 PFC 不溶于水,体内应用时应加以修饰。PFCE 是 PFC 经过乳化和加入稳定或平衡成份后得到的液体,其保留了 PFC 的高气体溶解性、低表面张力和低黏度等特性,提高了水溶性,使其能够溶解于水。樊毫军等^[8]对 Wistar 大鼠静脉注射 PFCE,证实 PFCE 能改善急性肺损伤。Koch 等^[9]推测可能的机制是嵌入的 PFC 改变了细胞的脂质

成分和蛋白的特性,从而干扰细胞表面受体功能或信号传导,如改变细胞膜的离子通透性或细胞骨架结构等。本研究发现 PFCE 高剂量组较模型组血清 NO、TXA2 含量显著升高,ET-1、6-K-PG 含量显著降低,提示 PFC 对微循环有明显改善。可能的原因是 PFC 促进单核细胞在 AS 部位上与活化的内皮细胞牢固黏附,并触发激活内皮细胞形态变化促进白细胞跨内皮迁移。同时降低了全血黏度,为缺血心肌输送氧气,并稀释缺血区域的代谢产物,减少自由基的生成,减轻心肌缺血时血液动力学异常改变,改善心功能。主动脉形态学观察也证实这一改变。

NO/ET-1 比值反映内皮功能障碍,A 组 NO/ET-1 比值为 0.41 ± 0.04 ,B 组下降至 0.14 ± 0.02 ,D 组、E 组有一定回升,也证实中等剂量的 PFC 改善了血管内皮功能。

参考文献

- [1] 张运. 动脉粥样硬化研究的当前问题[J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(9): 785—788.
- [2] 赵灿,庞继恩,姜靖. 全氟化碳对心肌缺血大鼠单核细胞趋化蛋白-1 水平的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(3): 212—215.
- [3] 张平,庞继恩,姜靖. 全氟化碳对动脉粥样硬化大鼠内皮功能的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(3): 291—294.
- [4] CHUNG E J, TIRRELL M. Recent advances in targeted, self-assembling nanoparticles to address vascular damage due to atherosclerosis[J]. Adv Healthc Mater, 2015, 4: 2408—2422.
- [5] 朱利月,刘新文,俞志红,等. 运动训练对老年下肢动脉硬化闭塞症非介入术患者的疗效观察[J]. 中华全科医学, 2016, 14(3): 482—484.
- [6] 赵晓巍,张健鹏,王晓光,等. 全氟化碳雾化吸入对急性呼吸窘迫综合征猪气体交换、呼吸力学和血流动力学的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 54(2): 104—108.
- [7] 余革,刘瑾,温晓晖,等. 全氟化碳汽化吸入预处理对急性肺损伤实验兔呼吸与氧合功能的影响[J]. 广东医学, 2011, 49(11): 1395—1398.
- [8] 樊毫军,刘书盈,张健鹏,等. 静脉注射全氟化碳乳剂对急性肺损伤大鼠肺的保护作用[J]. 中华内科杂志, 2007, 55(6): 491—492.
- [9] KOCH T, RAGALLER M, HAUFE D, et al. Perfluorohexane attenuates proinflammatory and procoagulatory response of activated monocytes and alveolar macrophages[J]. Anesthesiology, 2001, 94: 101—109.

(收稿日期:2017-07-15)