

慢性应激对大鼠主动脉超微结构和血管细胞 粘附分子-1 表达的影响

王旭梅, 李艳辉, 夏静, 韩继阳, 邵云, 宋飞
(中国医科大学附属第二医院心理科, 辽宁 沈阳 110004)

【摘要】 目的: 研究慢性应激对主动脉超微结构和主动脉血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1) 表达的影响。方法: 将健康的 24 只 Wistar 雄性大鼠随机分成实验组和对照组各 12 只。适应性饲养 1 周后, 实验组大鼠给予 3 周应激刺激制作慢性应激动物模型, 对照组不给予任何刺激正常饲养。两组大鼠同时处死, 用透射电镜观察主动脉组织的超微结构; 用免疫组化方法检测主动脉血管内皮细胞 VCAM-1 的表达情况。结果: 实验组大鼠主动脉的超微结构改变, 内皮细胞的线粒体明显肿胀, 空泡变。而对照组大鼠的主动脉内皮细胞超微结构无此改变; 实验组大鼠主动脉组织的 VCAM-1 表达增强(平均灰度值为 151.39 ± 1.17), 显著高于对照组(其平均灰度值为 159.48 ± 3.75 , $P < 0.05$)。结论: 慢性应激能造成大鼠主动脉超微结构的改变, 内皮细胞线粒体结构退化性变和内皮细胞的炎症性变; 慢性应激能导致大鼠主动脉血管内皮细胞 VCAM-1 的表达增强。

【关键词】 慢性应激; 大鼠; 主动脉; VCAM-1; 线粒体

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2006)03-0281-02

The Affect of Chronic Stress to Ultrastructure and Expression of Vascular Cell Adherence Molecules-1 in Thoracic Aorta in Rats

WANG Xu-mei, LI Yan-hui, XIA Jing, et al

Department of Psychiatry, 2nd Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China

【Abstract】 Objective: Studying the affect of chronic stress to ultrastructure and the expression of vascular cell adherence molecules-1 in thoracic aorta in rats. Methods: 24 male Wistar rats are divided into two groups randomly, including the test group and control group. The number of each group is 12. The test group are compelled to receive a series of stimulation after they are fed 1 week in quiet surrounding, but the control group are not. All of rats are executed at the same time. After have drawn the materials from the thoracic aorta, we observe the ultrastructure by electronic microscope and the expression of vascular cell adherence molecules-1 by the method immunohistochemistry in thoracic aorta. Results: The ultrastructures in test group are changed, but the control group are normal; the modification is concentrated on the obvious swelling, vacuolization transformation in mitochondria, but the control are not. The VCAM-1 is highly expressed in thoracic aorta of the test group, there is not in control group ($P < 0.05$). Conclusion: The chronic stress can exchange the ultrastructure in thoracic aorta in rats, the core of modification is that there occurrence the degenerative change in mitochondria of endothelial cell and inflammatory change in endothelial cell. The chronic stress can lead to the majority expression of VCAM-1 in the endothelial cell membrane.

【Key words】 Chronic Stress; Rat; Aorta; VCAM-1; Mitochondria

应激是机体对应激源的非特异性应答, 可引起一系列的全身反应。应激对人的工作、健康和生活质量的影响变得日益突出。适度的应激是维持人体正常心理功能和生理功能的必要条件; 如果紧张刺激超过了个人耐受能力就会破坏人的心身平衡, 损害人的健康, 造成或加重疾病^[1]。心理因素已经影响很多疾病的发生和发展。应激因素可能导致有机体组织超微结构发生改变, 也能影响有机体某些细胞因子的水平^[2], VCAM-1 属于免疫球蛋白超家族的黏附分子, 在炎症的发生和发展过程中起着很大的作用。本研究通过建立慢性应激动物模型, 观察应激对大鼠主动脉超微结构和 VCAM-1 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 24 只, 体重 $200\text{g} \pm 20\text{g}$, 购自中国医科大学实验动物中心。大鼠正常饮食, 在光暗周期为 12 小时, 温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 安静环境下饲养 7 天。随机分成实验组和对照组, 每组 12 只。

1.2 主要试剂和实验仪器

1.2.1 主要试剂 兔抗鼠 VCAM-1 多克隆抗体、生物素标记的山羊抗兔 IgG(即用型)、SABC(链霉素过氧化物复合物)免疫组化试剂盒, DAB 显色剂, 以上试剂均购自武汉 Boster 试剂公司。

1.2.2 主要仪器 计算机图像分析系统 (Meta

Morph/Cool Snapfx/Ax70)、LKBV 铝型超薄切片机、JEM1200EX 透射电镜。

1.3 实验方法

1.3.1 慢性应激大鼠模型的建立 按照 Benelli 等慢性应激的造模方法^[3]并加以改进。动物模型为慢性不可预见性应激加孤养模型。实验组大鼠进行单笼喂养,每天给予电击足底、冰水游泳、夹尾、热应激、禁食 48 小时、禁水 24 小时、摇晃等刺激,每天随机给予一种刺激,连续刺激 21 天后处死。对照组大鼠,不给予任何刺激,与实验组同日处死。

1.3.2 标本制备 各组动物均于实验的第 21 天后,腹腔注射戊巴比妥钠(50mg)/Kg,麻醉。电镜标本制备及观察:速取胸主动脉后用 4℃生理盐水冲洗,每只大鼠取胸主动脉组织取冠状面切位 5 块,厚 1mm,将组织块置于 3.1%戊二醛液中预固定,环境温度 4℃,48h-72h,1%锇酸后固定,4℃,2h,丙酮逐级脱水,Epon812 包埋,LKBV 铝型超薄切片机制片,5%的水性醋酸铀和枸橼酸铅双染,JEM1200EX 透射电镜观察。免疫组化标本制备及指标检测:将胸主动脉组织取冠状面切位 5 块,厚 5mm 左右,将组织浸放在 4%多聚甲醛溶液中进行外固定。常规石蜡脱水、包埋、制成石蜡切片,切片厚度 5μm。对 VCAM-1 检测,采用免疫组化 ABC 法,具体步骤参照文献的方法^[4]。图像分析:每只大鼠选取胸主动脉组织较完好的切片 1 张,随机选取 4 个视野,在计算机图像分析系统(Meta Morph/Cool Snapfx/Ax70)上测量主动脉的灰度值(grey density)。每张切片灰度值各取平均值来代表这张切片最终的灰度值。

2 结 果

2.1 电镜结果

实验组大鼠主动脉的超微结构发生改变,电镜下可见主动脉内皮细胞脱落,内皮下层增厚,结构不规则,平滑肌细胞尾足伸出;主动脉内皮细胞周围有淋巴细胞和单核细胞浸润,主动脉内皮间质弥漫水肿,内皮细胞肿胀,吞饮泡增多,胞质形成指状突起凸向管腔,小血管腔中见较多血小板聚集、附壁;主动脉内皮细胞的细胞器结构也发生了改变,表现在内皮细胞的线粒体明显肿胀,形状不规则空泡变,外膜模糊,内嵴不清,基底致密等退行性变。

2.2 免疫组化结果

实验组大鼠 VCAM-1 的表达主要表现在低倍光镜下可见胸主动脉内膜黄染,高倍镜下可见主动脉内皮细胞胞膜及胞浆呈棕黄色着色,而对照组的

着色却很淡或没有。实验组大鼠胸主动脉的 VCAM-1 表达情况(平均灰度值为 151.39 ± 1.17)和对照组 VCAM-1 的表达(平均灰度值为 159.48 ± 3.75)有差异,两者间比较差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨 论

应激能对机体的很多系统造成影响。本研究中,经过 21 天不可预见的应激刺激后实验组大鼠主动脉内皮细胞超微结构发生改变并伴有淋巴细胞和单核细胞浸润,小血管内皮细胞肿胀,吞饮泡增多,胞质形成指状突起凸向管腔,血管腔中见较多血小板聚集、附壁,这与国内外^[5,6]报道的结果相似。但这种超微结构的改变是一过性还是永久性,仍需我们进一步研究。应激造成血管内皮细胞结构的损伤可能和缺血造成的损伤有相同的机制^[7]。在缺血的情况下,可诱导 NF- κ B 激活,且 TNF 增加近 10 倍,促进炎症介质的释放,有利于炎症的发生而引起损伤^[8]。

随着分子生物学技术研究的逐步深入,一些与动脉粥样硬化相关的化学因子和细胞因子不断被检出,动脉粥样硬化是炎症的观点被重新提出^[9]。VCAM-1 属于免疫球蛋白超家族的黏附分子,在 1989 首次被鉴定^[10]。VCAM-1 的表达被认为与免疫和炎症反应有关。VCAM-1 在动脉粥样硬化慢性炎症过程发生发展的各个阶段起着不可忽视的作用,它的一些活性似都与其膜结合的形式表达有关,大部分研究认为 VCAM-1 参与白细胞的浸润过程^[11],目前描绘白细胞从循环血液中迁移入组织的过程可分为包含一系列粘附的三、四个连续步骤。用标准的免疫组化方法检测不到正常血管上 VCAM-1 的表达,当体内在炎症病理条件下,VCAM-1 才可表达在血管内皮细胞上^[12]。VCAM-1 除表达在内皮细胞上,也可在平滑肌细胞、淋巴组织和皮肤的树突状细胞、肝脏(枯否细胞)和脾脏的单核细胞衍生的细胞,以及脾脏的某些上皮细胞上表达。当在某些细胞因子如白细胞介素、肿瘤坏死因子等的诱导下,VCAM-1 的表达可以增加^[13]。在应激的环境下,机体的很多细胞因子水平发生改变,如白介素、肿瘤坏死因子等^[14,15]。本研究中实验组大鼠胸主动脉内皮细胞膜上 VCAM-1 的表达与对照组大鼠相比差异有显著性,说明应激能对机体 VCAM-1 的表达情况产生影响。应激对 VCAM-1 表达的影响,其机制可能不是单途径的,这种复杂的机制尚待进一步研究。在应激造成机体损伤的病理过程中,血管内皮细胞结构和功能的损伤为炎症反应的发生提供了可能。

(下转第 285 页)

也得到类似结果, 他们发现述情障碍高分组视觉 P300 的波幅较低分组视觉 P300 的波幅增高, 在 Pz 点尤为显著。

P300 的潜伏期代表了对刺激物评价所需要的时间, 它随任务难度的增加而增加^[10,14]。P300 的潜伏期主要认为与信息的加工速度有关^[10], 潜伏期的长短是反映认知功能的重要指标。在本研究中, 述情障碍高分组的平均潜伏期与低分组的平均潜伏期无统计学差异, 这说明述情障碍高分个体对简单信息加工处理的速度相对低分个体并没有显著降低, 这与 Franz 等^[11]的研究结果相同。

脑电地形图反映了认知加工过程中脑电的活动强度, 研究中发现, 高分组和低分组的脑电分布区域相类似, 但中央区、顶枕区等脑区高分组的脑电较低分组的脑电高, 提示述情障碍高分组的脑电活动较强, 说明述情障碍高分组投入的心理资源较述情障碍低分组投入的心理资源高。

参 考 文 献

- 1 PE S. The prevalence of "alexithymic" characteristics in psychosomatic patients. *Psychother Psychosom*, 1973, 22: 255- 262
- 2 Taylor G, B.a. RM, and P JDA. Disorder of affect regulation: Alexithymia in Medical and Psychiatric Illness. 1997
- 3 Bagby RM, JD Parker, and GJ Taylor. The twenty- item Toronto Alexithymia Scale- I. Item selection and cross- val-

idation of the factor structure. *J Psychosom Res*, 1994, 38(1): 23- 32

- 4 Taylor GJ. Recent developments in alexithymia theory and research. *Can J Psychiatry*, 2000, 45(2): 134- 142
- 5 Hoppe KD, JE Bogen. Alexithymia in twelve commissurotized patients. *Psychother Psychosom*, 1977, 28(1- 4): 148- 155
- 6 Zeitlin SB, et al. Interhemispheric transfer deficit and alexithymia. *Am J Psychiatry*, 1989, 146(11): 1434- 1439
- 7 Parker JD, et al. Interhemispheric transfer deficit in alexithymia: an experimental study. *Psychosom Med*, 1999, 61(4): 464- 468
- 8 蚁金瑶, 姚树桥, 朱熊兆. TAS- 20 中文版的信度、效度分析. *中国心理卫生杂志*, 2003, 17(11):
- 9 袁勇贵, 等. 多伦多述情障碍量表(TAS- 20) 的信度和效度研究. *四川精神卫生*, 2003, 16(1):
- 10 罗跃嘉, 魏景汉. 事件相关电位 P300 对老年人认知功能的评定作用. *中华老年医学杂志*, 1997, 16(6): 336- 338
- 11 Franz M, et al. Visual event- related potentials in subjects with alexithymia: modified processing of emotional aversive information? *Am J Psychiatry*, 2004, 161(4): 728- 735
- 12 刘哲宁, 龚耀先. 阴性、阳性精神分裂症患者听觉 P300 和抽象思维的比较研究. *中国临床心理学杂志*, 2000, 8(4): 199- 204
- 13 陈兴时. 事件相关电位及其亚成分. *现代电生理学杂志*, 2003, 10(3): 164- 170
- 14 魏景汉, 罗跃嘉. 认知事件相关脑电位教程. 2002. 32- 34

(收稿日期: 2006- 01- 09)

(上接第 282 页)

参 考 文 献

- 1 樊作树. 心理医生. 北京: 中国人口出版社, 2002. 61- 64
- 2 Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 966: 290- 303
- 3 Benelli A, Filafiero M, Bertolini A, et al. Influence of S-adenosyl- L- methionine on chronic mild stress- induced anhedonia in castrated rats. *Br J Pharmacol*, 1999, 127(3): 645- 654
- 4 张志, 孙静, Gavin P, 等. 精神分裂症患者海马区 氨基丁酸能中间神经元钙结合蛋白的免疫组化研究. *中华精神科杂志* 2002, 35(2): 77- 81
- 5 毕波, 王哲, 彭淼, 等. 慢性应激对大鼠海马 Bcl- x 表达的影响及应激后的变化. *中国临床心理学杂志*, 2005, 13(2): 144- 146
- 6 张政, 詹皓, 陆江阳, 等. 重复正加速度暴露对大鼠心血管内皮超微结构和 ICAM- 1 表达的影响. *中国应用生理学杂志*, 2002, 18(3): 245- 248
- 7 Mackenzie WF, Burton RR, Burcher WI, et al. Cardiac- pathology associated with high sustained +Gz II. Stress

cardiomyopathy. *Aviat Space Environ Med*, 1976, 47(7): 718- 725

- 8 Meldum DR, Shenker R, Sherided B, et al. Hemorrhage activates myocardial NF B and increases TNF α in the heart. *J mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 2849, 2854
- 9 Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115, 126
- 10 Osborn L, et al. *Cell*, 1989, 59: 1203.
- 11 Bevilacqua MP. Endothelial- leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 767- 804
- 12 Rothlein R, et al. *Immunol*, 1986, 137: 1270
- 13 Morisaki N, Kanzaki T, Tamura K et al. Specific inhibition of vascular cell adhesion molecule- 1 expression by type collagen in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214(3): 1163- 1167
- 14 Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, et al. Stress- induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(2): 309- 317
- 15 元晓丽, 姚树桥. 应激与海马可塑性及其机制的研究进展. *中国行为医学科学*, 2003, 12(3): 356- 359

(收稿日期: 2006- 02- 13)