

· 基础研究 ·

苯扎贝特对兔动脉粥样硬化单核细胞趋化因子的影响

李彦琦*, 董秋立, 刘海涛, 何敬堂, 郭水英

(华北石油总医院干部保健科, 任丘 062552)

【摘要】目的 探讨苯扎贝特对兔动脉粥样硬化(AS)时单核细胞趋化因子(MCP-1)的影响。方法 24只新西兰大白兔随机分为高脂组、苯扎贝特组和正常对照组, 每组8只。对照组饲以常规颗粒饲料, 高脂组饲以高胆固醇饲料(1%胆固醇+5%猪油的颗粒饲料), 苯扎贝特组饲以高胆固醇饲料加苯扎贝特[5 mg/(kg·d)], 共饲养4个月。HE染色检测兔胸主动脉AS程度, 并用免疫组化检测AS斑块的MCP-1蛋白及RT-PCR检测MCP-1 mRNA的转录水平, 同时检测血胆固醇和甘油三酯的浓度。结果 与高脂组比较, 苯扎贝特显著降低了甘油三酯的浓度[(0.71±0.11) vs (1.72±0.96) mmol/L, $P<0.05$]。在苯扎贝特组动脉粥样硬化的程度明显减轻, 动脉内膜面积减少[(2.92±0.54) vs (4.16±0.98) mm², $P<0.05$]。苯扎贝特治疗组斑块内的MCP-1蛋白表达减少[(19.8±2.2)% vs (26.2±3.1)%, $P<0.01$], RT-PCR结果显示, 苯扎贝特组MCP-1 mRNA的水平亦明显减少[(0.61±0.06) vs (1.06±0.06), $P<0.05$]。结论 使用苯扎贝特明显减轻了动脉粥样硬化程度, 其中MCP-1基因及蛋白表达的下降具有重要的作用。

【关键词】动脉粥样硬化; 趋化因子; 单核细胞; 苯扎贝特; 兔

【中图分类号】R541.4

【文献标识码】A

【文章编号】1671-5403(2011)03-0265-04

Effects of bezafibrate on MCP-1 level in rabbits with atherosclerosis

LI Yanqi*, DONG Qiuli, LIU Haitao, HE Jingtang, GUO Shuiying

(Department of Prevention and Health Care, Huabei Oil-field Hospital, Renqiu 062552, China)

【Abstract】Objective To observe the influence of bezafibrate on monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) level in rabbits with atherosclerosis(AS). Methods Twenty-four New Zealand white rabbits were randomly assigned into 3 groups: high-lipid group, bezafibrate group, and control group, with 8 in each group. The rats in high-lipid group were given high-lipid diet, in bezafibrate group were given high-lipid diet plus bezafibrate [5 mg/(kg·d)], and in control group were given routine diet. The animals were fed for 4 months. The ascending aorta were harvested, and the morphology was observed using HE staining. The MCP-1 protein and mRNA expression was analyzed by immunohistochemical staining and RT-PCR respectively. The concentrations of serum total cholesterol and triglyceride were also measured. Results The concentration of serum triglyceride was significantly lower in bezafibrate group than in high-lipid group[(0.71±0.11) vs (1.72±0.96) mmol/L, $P<0.05$]. Compared with high-lipid group, bezafibrate treatment significantly attenuated the atherosclerosis lesion[(2.92±0.54) vs (4.16±0.98) mm², $P<0.05$], and decreased the expression of MCP-1 protein and mRNA respectively [(19.8±2.2)% vs (26.2±3.1)%, $P<0.01$; (0.61±0.06) vs (1.06±0.06), $P<0.05$]. Conclusion Bezafibrate could attenuate AS in rabbits, in which the decrease of MCP-1 protein and gene expression may be involved.

【Key words】atherosclerosis; monocyte chemoattractant protein 1; bezafibrate; rabbits

急性心肌梗死等急性冠脉综合征是内科常见的急重症, 严重威胁着患者的生命, 其中, 斑块的破裂并继发血栓形成是引起急性冠脉综合征的病理基础。目前多数学者认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种炎症性疾病, 炎症在AS的发生、发展及并发症的产生中占有重要的地位^[1]。在不稳定斑块中含有大量巨噬细胞及其他炎症细胞, 其中巨噬细胞通过清道夫受体吞噬脂质、分泌大量的细

胞因子及多种蛋白水解酶而降解细胞外基质, 引起斑块的不稳定。单核细胞趋化因子(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)是一种重要的趋化因子, 在促进巨噬细胞进入内皮下层中占有重要地位, 从而促进斑块的不稳定及急性冠脉综合征的发生。文献报道AS病变中MCP-1蛋白表达明显升高^[2]。血脂代谢紊乱是冠心病的独立危险因素, 贝特类药物具有明确的降低甘油三酯并升高高密度脂蛋

白的作用,但有关贝特类对AS炎症研究较少,为此作者用苯扎贝特(商品名:阿贝它)对AS炎症的影响进行了研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 兔动脉粥样硬化模型的建立及分组

24 只新西兰大白兔(由山东省农科院畜牧兽医研究所提供)先按常规饲料喂养 1 周,然后随机分为 3 组:高脂组(8 只),苯扎贝特组(8 只),正常对照组(8 只)。对照组饲以常规颗粒饲料,高脂组饲以高胆固醇饲料(1%胆固醇+5%猪油的颗粒饲料),苯扎贝特组饲以高胆固醇饲料+苯扎贝特[5 mg/(kg·d)],共饲养 4 个月。

1.2 标本采集

用 3%戊巴比妥 1 ml/kg 麻醉,血由兔耳中动脉采取约 4 ml,留置于试管中,3000 r/min,15 min,取血清储存于-20℃冰箱中待用。采血后取兔胸主动脉上段放入液氮中等待进行 RT-PCR 实验,下段置于 4%多聚甲醛中固定 24 h 后,肉眼观察,常规石蜡包埋,切片。

1.3 血脂测定

采用酶学方法,单位以 mmol/L 表示。

1.4 病理组织学检查

1.4.1 血管切片的 HE 染色方法 石蜡切片经常规脱蜡和水化后,将切片置于苏木素液中 2~3 min,盐酸乙醇分化数秒,自来水反蓝 30 min,然后置于伊红乙醇液中 1~2 min,然后用 95%的乙醇脱水 10 min、无水乙醇脱水 10 min,二甲苯透明、中性树脂胶封片。

1.4.2 MCP-1 的免疫组化 兔主动脉石蜡切片常规脱蜡和水化后,用 1%的胰蛋白酶在 37℃下消化 20 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;然后用 3%的过氧化氢灭活内源性过氧化氢酶 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;血清封闭 20 min;加一抗,4℃过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min;加酶标二抗,37℃作用 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;加 DAB 显色 3~5 min,观察结果。然后用苏木素套染;常规脱水,甘油明胶封片。抗 MCP-1 抗体为羊抗人多克隆抗体,二抗为中山生物试剂公司产品。通过图像分析系统计算阳性面积所占的百分比。

1.5 RT-PCR 检测血管 MCP-1 mRNA 水平

采用异硫氰酸胍(GIT)-氯仿一步法提取主动脉组织内总 RNA。先逆转录反应合成 cDNA。MCP-1

上游引物序列为:5'-TGCTCATTCCATACAGCCTGTG-3',下游引物序列为:5'-CTTTTCATGCTTAGCGGCG-3',PCR 产物 330 bp; GAPDH 上游引物序列为:5'-GAGCTGAACGGGAAACTCAC-3',下游引物序列为:5'-GGTCTGGGATGGAAACTGTG-3',PCR 产物 476 bp。PCR 反应体系:反应体系中加入上游引物 1 μl、10×buffer 10 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 8 μl, 4×dNTP 1 μl, 超纯水 58 μl。快速离心混匀;95℃ 5 min,冰浴冷却,然后快速离心使蒸汽沉于管底;加 Taq DNA 聚合酶 2 μl (10⁶ IU/L),快速离心混匀,加入 60 μl 液体石蜡;预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 55℃ 45 s,延伸 72℃ 1 min,30 个循环,然后 72℃延伸 10 min,4℃终止。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫外光下拍照,用图像分析处理系统检测光密度值。

1.6 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS10.0 软件进行分析,多组间的均数比较用方差分析;两组间的均数比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 苯扎贝特对血总胆固醇及甘油三酯的影响

表 1 结果表明,苯扎贝特组与高脂组比较,甘油三酯有显著下降($P < 0.05$),而总胆固醇水平也有所下降,但差异没有统计学意义。

表 1 苯扎贝特对血总胆固醇及甘油三酯的影响
($n=8$, mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	总胆固醇	甘油三酯
对照组	0.75 ± 0.21	0.72 ± 0.18
高脂组	38.85 ± 8.15	1.72 ± 0.96
苯扎贝特组	30.19 ± 5.18*	0.71 ± 0.11*

注:与高脂组比较,* $P < 0.05$

2.2 高脂组及苯扎贝特组与对照组血管病理形态学的变化

高脂组的动脉内膜明显增厚、凹凸不平,光镜下观察可见到大量泡沫细胞,显示了典型动脉粥样硬化的病变。苯扎贝特组动脉内膜亦有不规则的增厚,但 AS 程度较高脂组减轻。苯扎贝特组动脉内膜面积与高脂组的动脉内膜面积相比,明显减少[(2.9 ± 0.5) vs (4.2 ± 1.0) mm², $P < 0.05$]。说明苯扎贝特有抗动脉粥样硬化作用。对对照常规组血管病理形态学显示内膜、中膜及外膜完整,内皮细胞完整(图 1)。

2.3 动脉粥样硬化血管 MCP-1 的免疫组织化学检测

免疫组织化学结果显示, MCP-1 蛋白主要表达

于内膜以及中膜的泡沫细胞,阳性蛋白表达为棕黄色颗粒物质,结果显示高脂组斑块内含有大量的 MCP-1 蛋白表达,呈团簇状分布;而苯扎贝特治疗

组斑块内的 MCP-1 蛋白表达较少,呈稀疏分布 [$(26.3 \pm 3.1) \%$ vs $(19.8 \pm 2.2) \%$, $P < 0.01$]。阴性对照无 MCP-1 蛋白的表达 (图 2)。

图 1 光镜下兔主动脉病理改变 (HE $\times 40$)
A: 对照组; B: 高脂组; C: 苯扎贝特组

图 2 光镜下兔主动脉 MCP-1 免疫组织化学染色 (DAB $\times 400$)
A: 对照组; B: 高脂组; C: 苯扎贝特组

2.4 主动脉 MCP-1 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,对照组主动脉无 MCP-1 mRNA 的转录,高脂组光密度比值(1.06 ± 0.06),而苯扎贝特组光密度比值(0.61 ± 0.06),较高脂组明显下降 ($P < 0.05$; 图 3)。

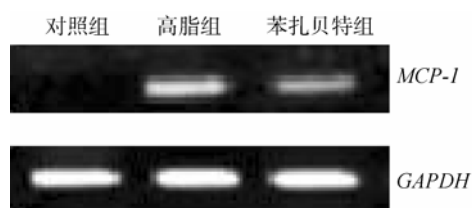


图3 主动脉MCP-1 mRNA水平

3 讨 论

AS 是心脑血管病的基础,目前的研究认为 AS 是一种慢性炎症性疾病^[1],斑块在出现裂缝、糜烂及破裂的基础上,形成血管内血栓导致管腔闭塞,是引起包括不稳定型心绞痛、急性心肌梗死和心脏性猝死在内的急性冠脉综合征的病理基础。不稳定斑块的特点是斑块内含有大量炎性细胞 (巨噬细胞、

泡沫细胞及 T 淋巴细胞和肥大细胞等)、脂质核大、胶原和平滑肌细胞少;而稳定斑块的特点是炎性细胞少、富含纤维组织、脂质核小或无。不稳定斑块内的大量炎性细胞可合成和分泌大量基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和细胞因子,使细胞外基质的合成降低和基质的降解增加,导致斑块的不稳定。因此,炎症因素在斑块的不稳定中起着重要作用,探讨抗动脉粥样硬化的炎症治疗具有重要意义。

大量文献报道,AS 病变中 MCP-1 蛋白表达明显升高^[2],MCP-1 在泡沫细胞的形成及动脉粥样硬化的发生、发展中起着关键作用。AS 斑块中的细胞,包括内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞均能产生 MCP-1。MCP-1 的过表达可以加速 AS 的进展和泡沫细胞的形成,而 MCP-1 的缺失可以减缓 AS 的进展^[3,4],使用抗 MCP-1 的中和抗体可以明显的减少动脉损伤后新生内膜的增生^[5]。有关 CCR2 (MCP-1 的受体) 的研究也得出了类似结论,在 apoE^{-/-}小鼠中进一步敲除 CCR2 基因后,主动脉根部的 AS 病变减小了 3 倍^[6]。另外, MCP-1 也可以诱导人的动脉平

滑肌细胞表达组织因子^[7], 从而参与斑块处凝血系统的激活。因此, MCP-1 在 AS 的发生、发展及并发症的形成中都起着重要的作用。

高脂血症是 AS 的重要危险因素之一, 积极降脂治疗可以使急性冠脉事件明显减少。冠心病患者中存在多种血脂代谢异常, 除高胆固醇血症外, 很多患者存在着其他的血脂异常: 即高甘油三酯、低高密度脂蛋白、小而密低密度脂蛋白增加, 这种脂质异常在代谢综合征的患者中最为常见。对于这类血脂异常, 我们常常应用贝特类药物来降低甘油三酯及升高高密度脂蛋白。

苯扎贝特是临床上广泛使用的贝特类药物, 主要是通过激活过氧化物酶体增生物活化受体- α 而起到改善脂质代谢, 增加胰岛素的敏感性的作用。苯扎贝特还通过干扰核因子- κ B 和活化蛋白-1 的信息转导途径, 抑制多种炎症因子的表达与产生。有研究发现, 贝特类药物可抑制人单核细胞及巨噬细胞表达和分泌炎症细胞因子, 如 hs-CRP 及肿瘤坏死因子- α 、白介素-6、白介素-2 及组织因子等。BECAIT 实验证实苯扎贝特不仅可以安全的用于降低甘油三酯并升高高密度脂蛋白, 而且经过血管造影证实, 还可以延缓心肌梗死后患者 AS 斑块的进展^[8]。另外一些临床研究表明, 苯扎贝特不仅对血脂有调节作用, 还可以改善胰岛素抵抗, 在空腹血糖受损的患者中应用苯扎贝特可以减少或者延缓 2 型糖尿病的发生^[9], 在代谢综合征患者中使用苯扎贝特可以降低致死性和非致死性心肌梗死的发生率^[10]。但苯扎贝特对 AS 炎症的影响, 尤其是对 MCP-1 的影响的相关研究仍然较少。

本研究首先建立动脉硬化兔模型, 然后用苯扎贝特干预, 结果发现苯扎贝特组 AS 程度减轻, 且明显减少了 MCP-1 蛋白及基因的表达, 提示苯扎贝特有明显的抗炎及抗动脉粥样硬化作用。这为临床上对患者, 尤其是合并有代谢综合征的患者使用苯扎贝特提供了更为有力的实验依据。

【参考文献】

[1] Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis[J]. Curr

Mol Med, 2006, 6(5): 489-499.

- [2] Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques[J]. J Clin Invest, 1991, 88(4): 1121-1127.
- [3] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(6): 1518-1525.
- [4] Gu L, Okada Y, Clinton SK, *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. Mol Cell, 1998, 2(2): 275-281.
- [5] Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries[J]. Circ Res, 1999, 84(3): 306-314.
- [6] Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, *et al.* Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 1999, 143(1): 205-211.
- [7] Schecter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, *et al.* Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells[J]. J Biol Chem, 1997, 272(45): 28568-28573.
- [8] Ericsson CG, Nilsson J, Grip L, *et al.* Effect of bezafibrate treatment over five years on coronary plaques causing 20% to 50% diameter narrowing(The Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial [BECAIT])[J]. Am J Cardiol, 1997, 80(9): 1125-1129.
- [9] Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor ligand bezafibrate for prevention of type 2 diabetes mellitus in patients with coronary artery disease[J]. Circulation, 2004, 109(18): 2197-2202.
- [10] Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ, *et al.* Bezafibrate for the secondary prevention of myocardial infarction in patients with metabolic syndrome[J]. Arch Intern Med, 2005, 165(10): 1154-1160.

(编辑: 周宇红)