

[文章编号] 1007-3949(2002)10-01-0053-03

•临床研究•

血脂康抑制高脂血症患者单核细胞粘附

黄颖, 陈运贞, 史若飞, 邓国兰

(重庆医科大学临床学院心内科, 重庆市 400016)

[关键词] 血脂康; 粘附, 单核细胞; 高脂血症; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨调脂药血脂康在治疗高脂血症的同时, 是否具有抑制粘附分子表达的作用。用血脂康治疗 15 例高脂血症, 治疗 4 周后用流式细胞仪双标法(CD11b/CD14)测定其外周血单核细胞和淋巴细胞粘附分子 CD11b 的表达, 以及单核细胞与内皮细胞的粘附率。结果发现, 治疗前后单核细胞表面 CD11b 的相对荧光强度和平均荧光强度均下降。淋巴细胞表面 CD11b 的相对荧光强度和平均荧光强度以及表达的百分率也降低。单核细胞与内皮细胞的粘附率从 $5.50\% \pm 2.30\%$ 降低到 $1.75\% \pm 0.85\%$ ($P < 0.05$)。CD11b 单克隆抗体封闭后可以抑制其粘附。此结果提示, 他汀类药物血脂康在临床治疗过程中可以抑制粘附分子表达, 发挥其降脂以外的作用。

[中图分类号] R589.2

[文献标识码] A

Inhibiting Effects of Xuezhikang on Monocytes adhesion in the Patients with Hypercholesterolemia

HUANG Ying, CHEN Yur-Zhen, SHI Ruo-Fei, and DENG Gu-Nan

(Cardiology Department, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

[MeSH] Xuezhikang; Adhesion, Monocytes; Hyperlipidemia; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To determine whether Xuezhikang, a HMG-CoA reductase inhibitor made in China, affects CD11b expression and adhesiveness of monocytes to endothelial cells in vitro after the treatment of patients with hypercholesterolemia.

Methods Fifteen patients with hypercholesterolemia were treated with Xuezhikang (1.2 g/d) for 4 weeks. Isolated human blood monocytes were subject to flow cytometric detection of CD11b and adhesion assays to live human endothelial cells were made before and after the treatments of Xuezhikang.

Results The average fluorescence intensity and the relative fluorescence intensity of CD11b expressed in monocytes and lymphocytes from the peripheral venous blood were lowered after the treatment of Xuezhikang. The expression rate of CD11b in lymphocytes was decreased from $27\% \pm 4\%$ to $13\% \pm 3\%$ ($P < 0.05$, $n = 15$).

The adhesion rate of monocytes to endothelial cells was reduced from $5.5\% \pm 2.3\%$ to $1.8\% \pm 0.8\%$ ($P < 0.05$, $n = 15$).

Pretreatment of CD11b mAb in vitro can inhibit the adhesion of monocytes to endothelial cells. **Conclusions** Xuezhikang, a kind of HMG-CoA reductase inhibitor, can inhibit the expression of CD11b in monocytes and the adhesion of monocytes to endothelial cells with the cholesterol-lowering effects. The nonlipid mechanisms may involve in it.

羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂即他汀类药物在改善心血管疾病终点事件以及冠状动脉狭窄方面所起的重要作用。然而该类药物所带来的益处不能完全由脂质基础水平或者治疗后的低密度脂蛋白水平来完全解释, 其中可能涉及“非降脂作用机制”。如改善内皮细胞、单核细胞 (monocyte, MC) 以及平滑肌细胞等的功能, 调节炎症反应, 维护斑块的稳定性等^[1]。本文就调脂药血脂康在治疗高脂血症, 发挥降脂作用的同时, 对外周血 MC、淋巴细

胞 (lymphocyte, LC) 粘附分子 CD11b 的表达, MC 与内皮细胞 (endothelial cell, EC) 的粘附的影响作一研究, 探讨该药的“非降脂作用”。

1 对象与方法

1.1 材料

血脂康 (北大维信生物科技有限公司); 藻红蛋白标记小鼠抗人 CD11b 单克隆抗体 (PE-CD11b McAb) 及 IgM 同型对照 (PE-IgM Isotype control, PE-IgMIC); 异硫氰酸酯荧光素标记小鼠抗人 CD14 单克隆抗体 (FITC-CD14 McAb) 及 IgM 同型对照 (FITC-IgM Isotype control, FITC-IgMIC)。以上均购自美国 Pharmingen 公司。LC 分离液 (Ficoll400, 上海试剂二厂)。M199 培养基 (美国 DIFCO 公司)。R1640 培养基 (美国 GIBCO 公司)。ECV-304 人脐静脉内皮细胞

[收稿日期] 2001-02-23 [修回日期] 2001-10-31

[作者简介] 黄颖, 男, 1973 年出生, 重庆市人, 重庆医科大学临床学院心内科医师, 博士, 主攻方向为冠心病和电生理研究。陈运贞, 女, 1934 年出生, 上海市人, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主研方向为冠心病和高血压。发表科研论文 50 余篇, 参编专著 5 部。获省市级和卫生部科技进步奖 4 项。史若飞, 男, 1955 年出生, 重庆市人, 博士, 副主任医师, 主攻方向为冠心病、高血压和心电生理研究。

株(上海细胞生物研究所)。FACS Calibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson)。

1.2 研究对象及服药方法

原发性高脂血症 15 例,经两周洗脱期后,血清总胆固醇(TC) ≥ 5.72 mmol/L、TG ≥ 1.7 mmol/L 者;年龄 55 ± 10 岁。无器质性心脏病,无糖尿病、肾病综合征、甲状腺和肝功能异常等继发血脂异常疾病。收缩压 145 ± 20 mm Hg;舒张压 90 ± 5 mm Hg。血脂康 600 mg,一天二次,4 周为一疗程。期间未服影响血脂代谢的药物。选择年龄、性别配对的正常对照 15 例,为血清 TC < 5.20 mmol/L 及 TG < 1.7 mmol/L 者。

1.3 血脂检测

分别于治疗前和 4 周后抽取空腹外周静脉血制备血清,TC 和 TG 分别用 CHOD-PAP 及 GPO-PAP 法检测,高密度脂蛋白胆固醇(HDL)用 PEG 沉淀法。LDL 按 Friedwald 公式计算。

1.4 外周血单个核细胞的分离

取空腹肝素抗凝静脉血 10 mL,LC 分离液行密度梯度离心($1\ 800\ g \times 30\ min$)后,吸取单个核细胞层(PBMC),PBS 洗涤两次,调节细胞浓度为 $5 \times 10^9/L$ 。取 0.1 mL 悬液加入 0.1 mL 0.1% 台盼兰,混匀后计数,存活率 $\geq 95\%$ 。取 1 mL 细胞悬液转移入培养瓶,加至含 10% 胎牛血清的 R1640 培养基中,CO₂ 孵育箱中孵育 2 h,洗涤未粘附的 LC,剩下为 MC,分离后分为两管,一管先用 CD11b 单克隆抗体(10 μ L)在 4 $^{\circ}$ C 条件下封闭 30 min,作 EC 粘附试验。

1.5 粘附试验

参照文献[2],将 ECV-304 EC 种植在六孔板中,使其铺满在载玻片上,将调好浓度($1 \times 10^8/L$)的 MC 加入到六孔板中。CO₂ 孵箱中孵育 1 h,倒置显微镜计数 20 个不同视野(400 \times)的 MC 均数后,用 PBS 洗涤两遍,取出载玻片,瑞氏染色,在光镜下计数 20 个不同视野(400 \times)与 EC 粘附的 MC 均数,计算粘附率:粘附率(%) = 洗涤后的 MC 均数 \div 洗涤前的 MC 均数 $\times 100\%$ 。

1.6 荧光抗体标记

取余下的 PBMC 细胞悬液,转移至 EP 管中,离心洗涤后分 2 管,每管 100 μ L。一管加入 PE-IgMIC 和 FITC-IgMIC 各 10 μ L,为对照管;另一管加入 PE-CD11b McAb 和 FITC-CD14 McAb 各 10 μ L,为测定管。将抗体与细胞悬液混匀,4 $^{\circ}$ C 放置 1 h。洗涤后立即行流式细胞仪检查或者用预冷的 2% 多聚甲醛固定后置于 4 $^{\circ}$ C 保存,2~3 天内送检。

1.7 流式细胞仪检测与分析

采用 468 nm 的激发波长,流式细胞仪收集标本

细胞。利用门技术分析软件,分析 MC (CD14⁺ 细胞)的平均荧光强度 (average fluorescence intensity, AFI) 及相对荧光强度 (relative fluorescence intensity, RFI) 来表示 MC 表面 CD11b 的相对表达量。以及 LC CD11b 表达百分率、AFI 及 RFI。RFI = 测定管 AFI \div 对照管 AFI。

1.8 统计学方法

所有计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行配对 *t* 检验及 *F* 检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 血脂康治疗前后的血脂变化

治疗 4 周后,15 例原发性高脂血症患者的血脂水平除 HDL 外都有不同程度的降低,与治疗前相比有显著差异 ($P < 0.05$)。正常对照组的血脂水平 4 周前后没有显著差异(表 1, Table 1)。

表 1. 两组对象血脂康治疗前后血脂的变化。

Table 1. Changes in blood lipid level before and after treatment in two groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L).

Index	Normal group		Patient group	
	Pretreat	Posttreat	Pretreat	Posttreat
TC	4.55 \pm 0.51	4.53 \pm 0.35	6.15 \pm 0.40	5.00 \pm 0.35 ^a
TG	1.30 \pm 0.32	1.32 \pm 0.33	1.95 \pm 0.92	1.68 \pm 0.75 ^a
LDL	2.53 \pm 0.35	2.55 \pm 0.31	4.68 \pm 1.0	2.90 \pm 0.71 ^a
HDL	1.12 \pm 0.32	1.15 \pm 0.29	1.08 \pm 0.60	1.00 \pm 0.42

a: $P < 0.05$, compared with pretreat of the same group.

表 2. 血脂康治疗前后 MC 与 EC 粘附率的比较

Table 2. The comparison of adhesion rate between monocytes and endothelial cells before and after the treatment of Xuezhikang (%)

Groups	Adhesion rate		Adhesion rate after CD11b mAb	
	Pretreat	Posttreat	Pretreat	Posttreat
Normal	0.50 \pm 0.20	0.43 \pm 0.21	0.23 \pm 0.13	0.30 \pm 0.18
Patient	5.50 \pm 2.30	1.75 \pm 0.85 ^a	5.50 \pm 1.60	0.85 \pm 0.20 ^a

a: $P < 0.05$, compared with pretreat of the same group.

2.2 血脂康治疗前后单核细胞与内皮细胞粘附率的改变

服用血脂康 4 周后,病例组外周血 MC 与内皮细胞的粘附率下降(表 2, Table 2)。

2.3 血脂康治疗前后淋巴细胞和单核细胞表面 CD11b 表达的变化

血脂康治疗后 CD11b 的表达降低(表 3 和表 4,

Table 3 and 4)。其中一例患者在治疗前 MC(CD14、CD11b 双阳性)的 AFI 为 1022, 计算 RFI 为 201。门技术分析 LC 的 AFI 为 35, 计算 RFI 为 17, 表达的百分率为 29.9%。血脂康治疗后 MC 的 AFI 为 564, 计算 RFI 为 114。LC 的 AFI 为 29, 计算 RFI 为 15, 表达的百分率为 19.9%。

表 3. 血脂康治疗前后 MCD11b 表达的变化。

Table 3. The changes of CD11b on monocytes before and after the treatment of Xuezhikang.

Groups	AFI		RFI	
	Pretreat	Posttreat	Pretreat	Posttreat
Normal	700 ± 210	650 ± 185	115 ± 30	100 ± 23
Patient	1100 ± 200	725 ± 230 ^a	177 ± 30	118 ± 25 ^a

a: $P < 0.05$, compared with pretreat of the same group.

表 4. 血脂康治疗前后 LCCD11b 表达的变化。

Table 4. The changes of CD11b on lymphocytes before and after the treatment of Xuezhikang

Index	Normal group		Patient group	
	Pretreat	Posttreat	Pretreat	Posttreat
AFI	18 ± 4	17 ± 3	35 ± 8	22 ± 5 ^a
RFI	13 ± 3	12 ± 2	18 ± 3	13 ± 2 ^a
Expression rate	12% ± 2%	10% ± 2%	27% ± 4%	13% ± 3% ^a

a: $P < 0.05$, compared with pretreat of the same group

2.4 相关性分析

血脂康治疗前后 MC 表面 CD11b 表达的变化与其与 EC 的粘附率的改变具有相关性。治疗 4 周后, CD11b 的 RFI 降低与 MC 和 EC 之间的粘附率减少的相关系数为 0.85 ($P < 0.05$)。本组病例 MCD11b 的 RFI 降低与血清 TC 的降低也具有相关性, 相关系数为 0.95 ($P < 0.05$)。

3 讨论

动脉粥样硬化(As)的炎性学说认为动脉 EC 受损可能是 As 发生的初始化步骤^[2]。而外周血管中 MC 和 EC 之间的粘附性改变又具有重要的病理意义。CD11 抗原属于超基因家系, 与 CD18 形成复合体。CD11b 表达于激活的 LC、MC、粒细胞与自然杀伤细胞(NK)亚类上。MC 表面的 CD11b/CD18 构成 MAC-1, 它可以与 ICAM-1、ICAM-2(CD54) 结合, 从而使 MC 与 EC 发生粘附。CD14 是脂多糖受体, 在 MC 和巨噬细胞上有表达, 是 MC 较为特异的标志。

血脂康是由中药红曲精炼而成的调脂药物, 主要成分为 HMG-CoA 还原酶抑制剂。高脂血症患者在服用血脂康 4 周后, 其血脂水平有不同程度的下降, 粘附分子 CD11b 的表达也降低。体外试验显示与 EC 的粘附率也下降。而加用 CD11b 单克隆抗体封闭后其粘附率下降, 说明 CD11b/CD18 复合体在 MC 与 EC 的粘附性增强反应中发挥作用。由于未服用其他药物, 证明上述作用为血脂康的药理作用所为。CD11b 在激活的 LC 及其亚型中也有表达, 而 LC 在 As 中也发挥作用。本文显示 LC 表面粘附分子的表达也受到血脂康的影响。临床病人的高脂血症通常是“多代谢紊乱综合症”中的一个表现, 如同时还存在肥胖、高血压、胰岛素抵抗等。他汀类药物的“非降脂机制”对于干预病人心血管事件的发生, 改善预后等可能具有潜在的益处。

HMG-CoA 还原酶抑制剂降脂的同时发挥着抑制炎症因子表达的作用^[1], 机理与抑制甲羟戊酸(Mevalonate)的生成有关^[3]。它还可能通过防止蛋白的异戊烯化(Prenylation)或者法尼基化(Farnesylation)来影响 GTP 结合蛋白与细胞膜之间的作用以及蛋白与蛋白之间的相互作用, 通过细胞信号传导调节, 影响许多代谢途径, 从而发挥其“非降脂作用”^[4,5]。该类药可以通过干扰细胞膜上 CD11b/CD18 的转运、二聚体的形成以及锚定作用从而抑制它在细胞膜上的表达量和活化。

体内外研究^[5]发现用甲羟戊酸可以逆转 HMG-CoA 还原酶抑制剂的作用, 且 HMG-CoA 还原酶抑制剂的体内外抑制炎症因子生成作用与脂质的降低无关, 认为这可能是 HMG-CoA 还原酶抑制剂的直接效果而不是继发于脂质的降低。本组病例在治疗 4 周后血清 TC、TG 水平都有不同程度的降低, 显示抑制粘附的作用与血脂降低之间具有相关性, 未能观察到这种现象。这种差异可能与病例数以及检测的时间有关, 有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc Res*, 2000, **47** (4): 648-657
- [2] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 93-95
- [3] Weber C, Erd W, Weber KSC, et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *JACC*, 1997, **30** (5): 1 212-217
- [4] Essig M, Nguyen G, Prie D, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. role of geranylgeranylation and rho proteins. *Circ Res*, 1998, **83** (7): 683-690
- [5] Laufs U, Fata VL, Plutzky J, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation*, 1998, **97**: 1 129-135

(此文编辑 胡必利)