

[文章编号] 1007-3949(2003)11-02-0099-04

• 实验研究 •

高血脂血瘀模型白细胞粘附活化和 白细胞介素 2、6 和 8 的变化

张红霞, 刘剑刚, 马鲁波, 史大卓

(中国中医研究院西苑医院心血管研究室, 北京市 100091)

[关键词] 医学实验动物学; 免疫损伤和炎症反应在动脉粥样硬化发病机理中的作用; 直接测定法; 白细胞粘附活化; 白细胞介素 2; 白细胞介素 6; 白细胞介素 8

[摘要] 建立高脂、免疫损伤、应激等综合因素所致高血脂血瘀动物模型, 探讨动脉粥样硬化相关免疫损伤和炎症反应机制。将 40 只 Wistar 大鼠随机分成高脂组、免疫损伤高脂组(异体血清蛋白和高脂)、免疫损伤应激高脂组(高脂、异体血清蛋白和肾上腺素)和应激组(单纯肾上腺素)。观察不同模型脂质代谢、白细胞粘附活化及白细胞介质的变化。结果发现, 和应激组比较, 高脂组、免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平明显升高, 免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组脂蛋白(a)水平明显升高, 尤其是免疫损伤应激高脂组甘油三酯水平升高更显著($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 高脂组、免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组白细胞介素 6 水平明显升高, 高脂组和免疫损伤高脂组白细胞介素 8 水平明显升高($P < 0.01$); 应激组白细胞粘附分子 CD11/CD18 表达率明显高于其他三组($P < 0.05$); 各组间白细胞介素 2 水平无显著差异。结果提示, 高脂、免疫损伤、应激等综合因素所致高血脂血瘀模型, 为中医药多环节干预动脉粥样硬化和血瘀证的作用研究提供了一个较为可靠的模型, 同时初步阐明了免疫损伤、炎症反应机制在动脉粥样硬化发病机理中的重要作用, 以及和高血脂协同致病的机理。

[中图分类号] R332

[文献标识码] A

Effect of Activation Leukocyte and Change of Leucocyte Medium on Hyperlipidemia and Blood Stasis Animal Model Induced by Immune Damaging and Stress

ZHANG Hong-Xia, LIU Jian-Gang, MA Lu-Bo, and SHI Da-Zhuo

(Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing 100091, China)

[KEY WORDS] Leukocyte Adhesiveness and Activation; Interleukin 2; Interleukin 6; Interleukin 8; Hyperlipidemia and Blood Stasis Animal Model; Immune Damage

[ABSTRACT] **Aim** To establish a new animal model which is more suitable for the study on atherosclerosis and to investigate its mechanisms and to study the immunological and inflammatory mechanisms in the pathogenesis of atherosclerosis.

Methods 40 Wistar rats were randomly divided into 4 groups. Rats of the first group ($n = 10$) were fed with high cholesterol diet (HCD). Rats of the second group ($n = 10$) were fed with high cholesterol diet and injected with xenoma serum protein (HCD-XSP). Rats of the third group ($n = 10$) were fed with high cholesterol diet and injected with xenoma serum protein and adrenaline (HCD-XSP-A), rats of the fourth group ($n = 10$) were fed with normal diet and just injected with adrenaline (ND-A).

The changes of platelet function, lipid metabolism, leucocyte activation and adhesiveness, mediators of inflammation and blood vessel endothelial function were observed in four groups.

Results In comparison with the ND-A group, TC and LDLC of the HCD-XSP-A group rised significantly ($P < 0.01$). As to the interleukins, the three groups fed with high cholesterol diet had high level of IL-6 and the HCD and HCD-XSP groups had high level of IL-8, compared with the ND-A group ($P < 0.01$). But in all of the four groups, IL-2 did not have marked difference. The ND-A group had the high leukocyte adhesion molecule express rate (CD11/CD18) than the other three groups ($P < 0.05$).

Conclusions The hyperlipidemia model induced by combined factors (HCD-XSP-A) is more suitable for the study on atherosclerosis and its mechanisms of traditional Chinese medicine treatment. And the immunological and inflammatory mechanisms play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis.

[收稿日期] 2002-07-02

[修回日期] 2002-12-16

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(G1999054405)资助

[作者简介] 张红霞,女,1971年9月出生,浙江省东阳市人,汉族,中国中医研究院中西医结合临床专业硕士研究生,研究方向为心血管临床与基础。E-mail: xiadawn@yahoo.com.cn。刘剑刚,男,1963年6月出生,助理研究员,从事生物流变学、心血管中药药理临床研究和科研工作。史大卓,男,1960年3月出生,研究员,从事中西医结合心血管临床与基础研究。

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病过程中, 高血脂症(hyperlipidemia)损伤内皮细胞, 影响内皮细胞的正常功能, 白细胞粘附于血管内皮细胞, 并迁入内皮摄取脂质转化为泡沫细胞, 粘附分子介导粘附过程^[1,2]。高血脂引起白细胞活化增加, 细胞表面粘附分子表达率及表达强度增加, 使白细胞与血

管内皮细胞粘附增加,粘附作用增强^[3]。另外,内源性或外源性诱导物可参与炎症反应或免疫过程,从而促进As的发展。本研究采用高脂血症结合免疫损伤、应激等诸多因素综合造成高脂血症动物模型^[4],观察其白细胞活化、粘附及炎症介质和脂质的变化,探讨As和血瘀证形成的复杂机理,以期为活血化瘀中药干预As作用的客观评价建立可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 药物制备与试剂

牛血清白蛋白(albumin bovine),批号:A-7030,美国Sigma公司生产;肾上腺素注射液(adrenaline hydrochloride),批号:20010103,北京永康制药厂生产;总胆固醇(total cholesterol, TC),批号:010116;甘油三酯(triglyceride, TG),批号:010126,由北京中生物工程高技术公司生产;高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC),批号:010212,低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC),批号:010215,由北京利德曼生化技术有限公司生产;脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]试剂盒,批号:0002601,上海明华体外诊断试剂有限公司生产;白细胞粘附CD11b-PE抗体(mouse rat),批号:MCA619PE,英国SEROTEC公司生产,由晶美生物工程有限公司提供。白细胞介素2、6、8(interleukin 2、6、8, IL-2, 6, 8)试剂由解放军总医院东亚放射免疫技术研究所提供。

1.2 动物和分组

Wistar大鼠40只,体重180~220 g,由中国科学院遗传研究所实验动物中心提供,合格号:(1999)036。动物饲养一周后随机分组,每组10只,分为高脂组:只喂高脂饲料(2%胆固醇、10%猪油、0.2%甲基硫氧嘧啶、0.5%胆盐、87.3%普通饲料);④免疫损伤高脂组:大鼠喂高脂饲料前一天,按每100 g体重从髂总静脉一次性注射牛血清白蛋白25 mg,然后高脂饲料喂养;④免疫损伤应激高脂组:大鼠喂高脂饲料前一天,按每100 g体重从髂总静脉一次性注射牛血清白蛋白25 mg,然后高脂饲料喂养,三周后,按每100 g体重注射肾上腺素注射液0.01 mg;应激组:普通饲料喂养,三周后按每100 g体重注射肾上腺素注射液0.01 mg。高脂饲料喂养和普通饲料喂养均为三周,末次喂食后,禁食不禁水12 h。四组动物腹腔麻醉(20%氨基甲酸乙酯,按每100 g体重0.7 mL),解剖暴露腹主动脉,一次性注射器抽取主

动脉血,一部份不加抗凝剂,离心(3000 r/min, 20 min)后取血清进行血脂及白细胞介素2、6和8测定。另一部份血用1% EDTA抗凝,全血检测白细胞粘附等指标。

1.3 实验方法

TC、TG、HDLC及LDLC采用直接测定法,脂蛋白(a)采用比浊法,以上血脂测定用全自动生化仪,型号:RX-2000,美国TECHNICON公司生产。白细胞粘附分子表达率(CD11/CD18)、活化荧光强度采用流式细胞仪,型号为ELITE型,美国COULTER公司生产。取2% EDTA抗凝全血各100 μ L,分别加入白细胞粘附CD11b-PE抗体(mouse antirat)及同型对照,避光孵育30 min,1%草酸铵溶解红细胞,20 min后PBS液洗涤一次,流式细胞仪检测,ELITE 4.5软件分析,读取细胞粘附表达阳性率和平均荧光强度。白细胞介素2、6和8采用放射免疫法,使用放射免疫计数器,型号为SN-682型,上海核福光仪器有限公司生产。

1.4 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 10.0软件处理,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 四种大鼠血瘀模型脂质代谢的变化

和应激组比较,其他三组大鼠的TC、LDLC水平明显升高,免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组脂蛋白(a)明显升高,尤其是免疫损伤应激高脂组TG升高更显著;高脂组TG、TC/HDLC无显著变化,而TC、LDLC显著升高,但浓度升高又不如免疫损伤高脂组;脂蛋白(a)作为独立的一类脂蛋白,在三个高脂模型组的浓度显著升高,和应激组比较差异显著(表1, Table 1)。

2.2 四种大鼠血瘀模型白细胞粘附与活化的变化

应激组白细胞粘附分子CD11/CD18表达率高于其他三组,和高脂组比较差异显著($P < 0.05$),而且应激组白细胞、淋巴细胞和中性粒细胞活化程度(平均荧光强度)均显著升高,和高脂组比较差异显著($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组白细胞、中性粒细胞活化程度也均显著升高,和高脂组比较差异显著($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);表2, Table 2)。

2.3 四种大鼠血瘀模型白细胞介素水平变化

和应激组比较,高脂组、免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组IL-6水平明显升高,高脂组和免疫损伤高脂组IL-8水平明显升高($P < 0.01$),四组间

IL-2 水平无显著差异(表 3, Table 3)。

表 1. 四组大鼠血瘀模型脂质代谢的变化

Table 1. Changes of lipids metabolism in the four groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	总胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	LDLc (mmol/L)	TC/HDLc	脂蛋白(a) (mg/L)
高脂组	2.03 ± 0.44 ^b	0.24 ± 0.05	1.66 ± 0.29	0.33 ± 0.19 ^a	1.22 ± 0.10	697.80 ± 243.19
HCD-XSP	2.36 ± 0.97 ^b	0.62 ± 0.31	1.76 ± 0.43 ^b	0.48 ± 0.62 ^b	1.31 ± 0.28	729.20 ± 337.56 ^a
HCD-XSP-A	2.50 ± 0.67 ^b	0.85 ± 0.53 ^a	1.91 ± 0.40 ^b	0.42 ± 0.47 ^b	1.31 ± 0.34	813.60 ± 302.18 ^a
应激组	1.70 ± 0.11	0.52 ± 0.30	1.44 ± 0.13	0.16 ± 0.12	1.19 ± 0.10	537.40 ± 83.96

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与应激组比较。 HDLc: 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol); LDLc: 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol); TC/HDLc: 总胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇比值 (the ratio of TC to HDLc); HCD-XSP: 免疫损伤高脂组 (the group of high cholesterol diet and injected with xenoma serum protein); HCD-XSP-A: 免疫损伤应激高脂组 (the group of high cholesterol diet and injected with xenoma serum protein and adreneine)。

表 2. 四组大鼠血瘀模型白细胞粘附与活化的变化

Table 2. Changes of leucocyte activation and adhesiveness in the four groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	白细胞		淋巴细胞		中性粒细胞	
	表达率	平均荧光强度	表达率	平均荧光强度	表达率	平均荧光强度
高脂组	39.50% ± 6.49%	14.20 ± 2.67	16.00% ± 3.84%	5.86 ± 0.55	83.52% ± 11.16%	20.98 ± 2.69
HCD-XSP	41.27% ± 6.92%	20.05 ± 3.06 ^a	17.64% ± 4.95%	6.89 ± 1.23	95.52% ± 5.72% ^a	39.22 ± 3.06 ^b
HCD-XSP-A	42.59% ± 6.46%	21.54 ± 4.04 ^a	16.17% ± 5.66%	6.00 ± 0.99	96.13% ± 3.15% ^a	38.37 ± 9.38 ^b
应激组	51.63% ± 10.67% ^a	25.10 ± 2.13 ^b	18.44% ± 2.13%	10.18 ± 2.44 ^b	97.44% ± 2.88% ^a	34.95 ± 4.40 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与高脂组比较。

表 3. 四组大鼠血瘀模型白细胞介素水平变化

Table 3. Changes of mediators of inflammation in the four groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	白细胞介素 2 (Pg/L)	白细胞介素 6 (ng/L)	白细胞介素 8 (Pg/L)
高脂组	2.09 ± 0.43	190.46 ± 61.55 ^a	0.43 ± 0.37 ^a
HCD-XSP	2.16 ± 0.41	203.38 ± 98.23 ^a	0.50 ± 0.37 ^a
HCD-XSP-A	2.18 ± 0.65	154.67 ± 60.25 ^a	0.21 ± 0.13
应激组	2.18 ± 0.46	127.86 ± 67.39	0.16 ± 0.08

a: $P < 0.01$, 与应激组比较。

3 讨论

高脂血症往往损伤内皮细胞结构和功能,而粥样斑块的形成是动脉对内膜损伤作出反应的结果。在这一过程中,内皮功能改变、白细胞粘附、血管活性物质和细胞因子改变等多因素参与其中。近年来,不少文献报道动脉硬化的发生与免疫有关^[5]。随着分子免疫学及分子生物学等相关基础学科快速发展,细胞活化和粘附机制在 As 发病中的作用日渐受到重视^[1]。

本研究单纯高脂模型动物血浆总胆固醇水平明显升高,甘油三酯水平升高与应激组比较并不明显,但造成免疫损伤的高脂模型组甘油三酯水平明显升高,且 LDLc 升高也显著。多数学者认为脂蛋白(a)是冠心病的一个独立危险因素。脂蛋白(a)可增加细胞间粘附分子的表达,而且发现脂蛋白(a)的主要成分一载脂蛋白(a)是诱导细胞间粘附分子表达的主要因素^[6]。本实验结果表明高脂血症模型大鼠的脂蛋白(a)含量显著升高,尤其是免疫损伤高脂模型大鼠的脂蛋白(a)含量升高更为显著,说明免疫损伤和脂质代谢异常有协同作用,机理如何,有待进一步研究。

白细胞中存在一自发活化的组分,活化的白细胞变形性降低,许多因素都可激活白细胞,使细胞表面分子的构象发生变化,暴露出粘附糖蛋白 CD11/CD18。高脂循环白细胞表面 CD11/CD18 表达率和强度升高,使白细胞与血管内皮细胞的粘附增加,作用增强。活化的白细胞(主要为中性粒白细胞、单核巨噬细胞)可渗入血管壁平滑肌层,释放 IL-2、TNF-a、PAF 和氧自由基等有害物质,导致或加重动脉粥样斑块形成^[7]。粘附分子,特别是整合素家族的

CD11b, 在白细胞粘附于血管内皮细胞中起突出作用^[8,9]。活化粒细胞和单核细胞的 CD11b 表达量显著增加。CD11b 在白细胞表面的表达已成为白细胞活化的标志。As 患者中这些粘附分子的可溶性成分血浆水平升高, 因此, 这些粘附分子被认为是提供临床前 As 的间接指标。本实验中免疫损伤高脂组和免疫损伤应激高脂组的白细胞、中性粒细胞活化程度也均显著升高, 亦说明白细胞活化和粘附在免疫损伤致 As 发生发展中的作用。

炎症反应参与了 As 的形成。As 患者和实验动物炎症标志物发生相应的变化, IL-6 和 IL-8 水平明显升高。IL-6 是一种多功能细胞因子, 是由多种淋巴细胞和非淋巴细胞自发地或在各种刺激下产生的因子, 与机体炎症、宿主抵抗、组织损伤的免疫作用有关。在动脉粥样斑块内有 IL-6 基因转录产物的表达^[10]。冠心病患者 IL-6 水平显著高于对照组, 而且不受其他传统危险因素影响^[11], IL-8 在炎症因子 IL-1、TNT 及脂多糖刺激下由多种细胞合成表达, 内皮细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等均可产生, 能诱导平滑肌细胞增殖、移行, 平滑肌细胞在 IL-1 引发下产生 IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白, IL-8 对平滑肌细胞具有致有丝分裂及趋化作用。As 的发生和发展伴随着一种非特异性慢性炎症过程。炎症学说的提出, 实质上是对 As 发病机理的一个新认识。本实验各高脂饲养组 IL-6 和 IL-8 水平皆有升高, 说明高脂血症和相关炎症介质有一定相关性。免疫细胞因子在 As 的发病机制中占重要地位, 但据报道在体外培养中具有炎症介导活性的细胞因子 IL-6 水平升高, 而有免疫调节活性的 IL-2、IL-4 并没有显著变化^[12]。本实验四组间 IL-2 水平没有显著差异, 与此报道相一致。另外, 在参与 As 形成的机制方面, 有报道 IL-6 促进了平滑肌细胞的增殖^[13], 以后的实验将作类似的进一步探讨。

本实验从动脉粥样硬化的机理入手, 运用现代生物技术, 采用高脂血症结合免疫损伤、应激方法造成高脂血症动物模型, 其脂质代谢、白细胞介素水

平、白细胞粘附与活化程度等方面, 皆较单因素如高脂饲料或肾上腺素注射所致模型更切合 As 复杂的病理改变, 既阐明了 As 的部分发病机理, 又为中医药多环节干预 As 和血瘀证的作用机理观察提供了一个可参考应用的实验模型。

(本院血液科许勇钢、杨晓红两位老师协助完成流式细胞测定工作, 谨致谢忱)。

[参考文献]

- [1] 张新超, 徐成斌. 细胞粘附分子在动脉粥样硬化发生发展中的作用. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (2): 179-184
- [2] Blann AD, Seigneur M, Steiner M. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral artery disease and hypercholesterolaemia relationship to the location of atherosclerotic disease, smoking, and in the prediction of adverse events. *Thromb Haemost*, 1998, 79 (6): 1 080-084
- [3] 金永娟, 朱文云, 邢海燕. 高脂血症循环白细胞自发活化作用的研究. 中国微循环, 1998, 1 (1): 29-32
- [4] 廖福龙, 李文, 温瑞兴. 人参再造丸对大鼠血液流变学指标及微循环的影响. 活血化瘀研究. 见: 中国中西医结合学会活血化瘀研究学会 (主编). 北京: 中国医药科技出版社, 第1版, 1995. 42
- [5] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115-126
- [6] Takami S, Yamashita S, Kihara S, Ishigami M, Takemura K, Kume N, et al. Lipoprotein(a) enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Circulation*, 1998, 97: 721-728
- [7] Wolfgang Volker, Dorszewski A, Unruh V, Robenek H, Breithardt G, Buddecke E. Copper-induced inflammatory of rat carotid arteries mimic restenosis arterosclerosis-like neointima formation. *Atherosclerosis*, 1997, 130: 29-36
- [8] Ognchi S, Dimayuga P, Zhu J. Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periaortic carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 1 729-736
- [9] Mehta JL, Li DY. Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc Res*, 1999, 43: 291-299
- [10] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene in human arteriol atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*, 1996, 127: 263-271
- [11] Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi N, Jouma N. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. *Clinical Chemistry*, 1999, 45: 1 967-973
- [12] Zoltan Szekancz, Shah MR, Pearce WH, Koch AE. Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: The possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. *Agents Actions*, 1994, 42: 159-162
- [13] 潘晓宏, 单江, 罗建红. 碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 促进大鼠血管平滑肌增殖的协同作用. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (3): 233-236

(此文编辑 文玉珊)