

## 普萘洛尔对高脂血症兔外周血白细胞 CD11a 表达及动脉粥样硬化病变形成的影响

杨维华, 周敬群

(三峡大学仁和医院心内科, 湖北省宜昌市 443001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 普萘洛尔对动脉粥样硬化形成的影响; 流式细胞术; 动脉粥样硬化; 高脂血症;  $\beta$ 受体阻滞剂; 粘附分子

[摘要] 目的 探讨普萘洛尔对高脂血症兔外周血白细胞 CD11a 的表达及动脉粥样硬化病变形成的影响。方法 选用 21 只健康雄性中国家兔随机分为正常组、高脂模型组和普萘洛尔组, 普萘洛尔组给予普萘洛尔(每天 5 mg/kg)灌胃。16 周后取外周血流式细胞术检测白细胞 CD11a 表达的阳性率。观察主动脉粥样斑块形成情况, 检测斑块面积与内膜面积百分比和动脉粥样硬化斑块巨噬细胞含量。结果 普萘洛尔组动脉粥样硬化斑块病变程度较模型组明显减轻, 正常组无动脉粥样硬化斑块形成。普萘洛尔组动脉粥样硬化斑块面积与内膜面积比为  $59.1\% \pm 11.3\%$ , 斑块内巨噬细胞含量为  $56.3\% \pm 4.9\%$ , 外周血 CD11a 阳性的白细胞比率为  $61.9\% \pm 4.2\%$ ; 模型组分别为  $78.3\% \pm 6.7\%$ 、 $70.6\% \pm 5.6\%$  和  $74.3\% \pm 3.6\%$ , 差异有显著性( $P < 0.05$ )。结论 普萘洛尔可通过减轻动脉粥样硬化斑块内炎症反应而延缓动脉粥样硬化斑块形成, 增加动脉粥样硬化斑块稳定性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Propranolol on Peripheral Blood Leucocyte CD11a Expression of Experimental Hyperlipemia Rabbits and the Formation of Atherosclerosis

YANG Wei-Hua, and ZHOU Jing-Qun

(Department of Cardiology, China Three Gorges University Renhe Hospital, Yichang 443001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Hyperlipemia; Adrenergic beta Antagonists; Adhesion molecule; Macrophage; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of propranolol on peripheral blood leucocyte CD11a expression of experimental hyperlipemia rabbits and the formation of atherosclerosis. **Methods** Twenty-one male rabbits were divided into three groups: normal group, model group and propranolol group [5 mg/(kg, d)]. Rabbits of last two groups were fed on 0.5% cholesterol and 5% lard diet for 16 weeks and were injected with 10% bovine serum albumin. Peripheral blood adhesion molecule CD11a were detected with flow cytometry. The aortas were harvested for histomorphometric observation and quantitative analysis. The ratio of atherosclerotic plaque area to intimal area and content of macrophage were detected. **Results** Compared with model group, propranolol group showed that the lesion degree of atherosclerotic plaque lessened significantly and normal group were not found the formation of atherosclerosis. In propranolol group, the ratio of atherosclerotic plaque area to intima area and content of macrophage and the positive percentage of peripheral blood leucocyte CD11a expression were  $59.1\% \pm 11.3\%$ ,  $56.3\% \pm 4.9\%$ ,  $61.9\% \pm 4.2\%$  respectively. In model group, they were  $78.3\% \pm 6.7\%$ ,  $70.6\% \pm 5.6\%$ ,  $74.3\% \pm 3.6\%$  respectively, propranolol group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Propranolol can postpone the formation of atherosclerosis through lessening the inflammation in the lesion of atherosclerosis of rabbits and increase the stability of atherosclerotic plaque.

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块可发现大量单核细胞和淋巴细胞等炎性细胞浸润, As 的形成和发展与单核细胞有密切关系<sup>[1,2]</sup>。 $\beta$ 受体阻滞剂可以阻滞循环系统  $\beta$ 受体, 减慢心率, 降低心肌收缩力, 降低心肌氧耗, 对冠心病二级预防有重要

作用。单核细胞和淋巴细胞表面也存在大量  $\beta$ 受体<sup>[3]</sup>,  $\beta$ 受体阻滞剂是否还可以通过影响 As 斑块炎症细胞活性来稳定 As 斑块, 从而防止心肌缺血的发生尚不明确。本研究就  $\beta$ 受体阻滞剂普萘洛尔对外周血粘附分子 CD11a 及 As 斑块形成的影响进行探讨。

[收稿日期] 2005-01-17 [修回日期] 2005-09-30

[作者简介] 杨维华, 硕士, 主治医师, 主要从事临床心血管免疫研究, 联系电话为 0717-8207375, E-mail 为 yangwh01@126.com。周敬群, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事临床心血管介入及免疫研究, E-mail 为 zhoujingqun1@medmail.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及模型建立

21 只成年健康雄性中国家兔, 体重  $2.4 \pm 0.2$  kg (购自三峡大学医学院实验动物中心), 适应性喂养 1 周后随机分为 3 组: 正常组 ( $n = 5$ ) 给予普通饲料, 模型组 ( $n = 8$ ) 和普萘洛尔组 ( $n = 8$ ) 给予高胆固醇饲料, 每日清晨每只给予含 1 g 胆固醇 (购于武汉亚法生物技术有限公司) 及 5 g 炼制猪油 (市售) 的颗粒饲料 100 g, 普萘洛尔组另给予普萘洛尔 (每天 5 mg/kg) 灌胃。2 周后按 250 mg/kg 予 10% 牛血清白蛋白 (购于武汉亚法生物技术有限公司) 静脉注射以造成免疫损伤。单笼喂养, 自由饮水, 饲养 16 周, 建立 As 模型。

## 1.2 血脂水平的测定

于第 16 周由兔耳缘静脉采血测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC), 采用酶法测定, 用日本东芝全自动生物化学分析仪检测。

## 1.3 外周血白细胞表达 CD11 阳性比率的检测

第 16 周末经兔耳缘静脉抽取外周静脉血各 1 mL, 肝素抗凝, 即时取 100  $\mu$ L, 加 20  $\mu$ L FITC 标记的 CD11a 单克隆抗体 (美国 BD 公司生产), 阴性对照管加入 20  $\mu$ L FITC 标记 IgG1- $\kappa$ , 震荡混匀, 避光反应 15 min 使抗体与抗原充分结合, 后加入红细胞裂解液, 作用 35 s, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 PBS 0.5 mL 重悬, 用流式细胞仪 (Coulter Epicsxl 型, 美国 Beckman 公司) 检测表达 CD11a 白细胞的阳性百分率。检测之前调整微球系数 (控制在 2% 以内)。

## 1.4 动脉粥样硬化斑块病理形态学观察

取外周血后, 空气栓塞法处死动物, 迅速取出主动脉根部至髂动脉分支处的主动脉组织, 放入冰盐水中洗去残血, 剥离血管外周结缔组织, 选取一段作大体形态观察, 行苏丹 III 染色 As 斑块, 观察比较 3 组有无 As 斑块形成及病变程度, 数码相机照相, Leica 自动病理图像分析系统分析比较 3 组 As 斑块面积与内膜面积比。剩余标本行 10% 甲醛固定 24 h, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 横断面连续切片, 厚约 5  $\mu$ m, 每个标本 5 张, 行 HE 染色, 光镜下随机选取 5 个视野, 根据巨噬细胞形态检测 As 斑块内巨噬细胞含量。

## 1.5 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用 SPSS10.0 统计学软件进行统计分析, 各组之间指标比较应用单因素方差分析或  $t$  检验进行统计分析, 当  $P < 0.05$  时, 表示差异有显著性; 当  $P < 0.01$  时, 表示差异有非

常显著性。

## 2 结果

### 2.1 各组血清脂质水平的比较

第 16 周时, 模型组、普萘洛尔组较正常组血清脂质水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 但模型组与普萘洛尔组无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (表 1, Table 1)。

表 1. 三组血清脂质水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

Table 1. Serum lipids level comparison in three groups

分 组	<i>n</i>	TC	TG	LDLC	HDLC
正常组	5	0.49 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.04
模型组	8	28.49 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	23.35 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	4.76 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
普萘洛尔组	8	32.29 $\pm$ 2.80 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	25.95 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>	5.87 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与正常组比较。

### 2.2 各组外周血白细胞 CD11a 表达阳性率的比较

正常组外周血 CD11a 阳性的白细胞比率为 58.7%  $\pm$  9.0%, 模型组为 74.3%  $\pm$  3.6%, 普萘洛尔组为 61.9%  $\pm$  4.2%, 普萘洛尔组外周血 CD11a 阳性的白细胞比率显著低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 但较正常组稍高 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 动脉粥样硬化斑块病理形态学观察

肉眼观: 模型组主动脉内膜病变广泛, 斑块和脂纹连成片状, 以主动脉弓为甚, 经苏丹 III 染色后呈红色, 从主动脉近端向远端逐渐减轻; 普萘洛尔组 As 斑块形成较模型组明显减轻, 斑块和脂纹较模型组减少; 正常组主动脉内膜光滑平整, 无 As 斑块形成 (图 1, Figure 1)。

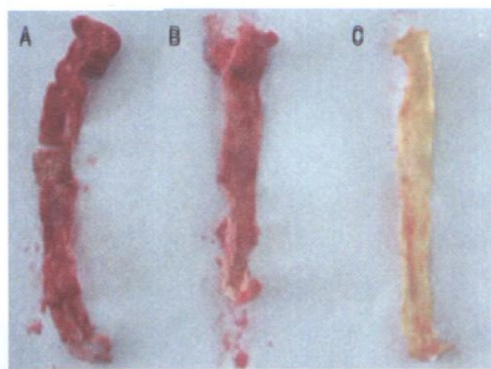


图 1. 3 组主动脉粥样硬化斑块大体照片 (苏丹 III 染色)

A 为模型组, B 为普萘洛尔组, C 为正常组。

Figure 1. Aorta atherosclerotic plaque photograph of three groups (Sudan III staining)

光镜下可见: 模型组的内膜显著增厚, 斑块隆起明显, 内含大量泡沫细胞; 普萘洛尔组的病变较模



型组明显减轻,其内膜厚度及泡沫细胞较模型组显著减少;正常组主动脉内膜光滑平整,无泡沫细胞及As斑块形成。普萘洛尔组As斑块面积与内膜面积比为 $59.1\% \pm 11.3\%$ 、斑块内巨噬细胞含量为 $56.3\% \pm 4.9\%$ ;

模型组As斑块面积与内膜面积比为 $78.3\% \pm 6.7\%$ 、斑块内巨噬细胞含量为 $70.6\% \pm 5.6\%$ ,分别减少 $19.2\%$ 和 $14.3\%$ ,差异有非常显著性( $P < 0.01$ ) (图2, Figure 2)。

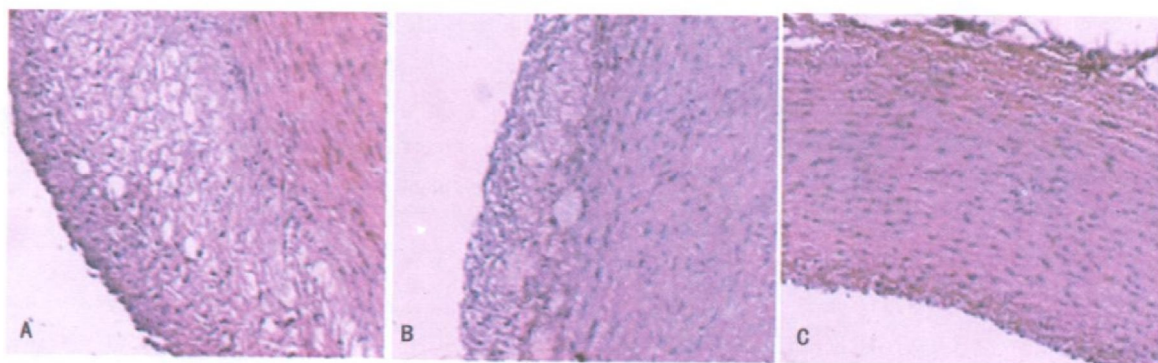


图2. 3组主动脉粥样硬化斑块光镜照片(10倍放大,HE染色) A为模型组, B为普萘洛尔组, C为正常组。

Figure 2. Aorta atherosclerotic plaque light microscope photograph of three groups (10 times enlargement, HE staining)

### 3 讨论

$\beta$ 受体阻滞剂对冠心病的二级预防有重要作用,但对其作用机制的认识仅限于降低交感神经活性,减慢心率,降低心肌收缩力,降低心肌氧耗等。由于在As斑块可发现大量单核细胞和淋巴细胞等炎性细胞浸润,而单核细胞和淋巴细胞表面均也存在大量 $\beta$ 受体, $\beta$ 受体阻滞剂是否还可通过神经—内分泌—免疫调节网络,影响As斑块的炎症细胞活性,稳定As斑块,从而防止心肌缺血发生尚不明确。

有研究表明,在As的形成过程中,单核细胞与内皮表面粘附分子结合,对As的形成有重要作用<sup>[4]</sup>。Mills等<sup>[5]</sup>发现普萘洛尔可以阻断由异丙肾上腺素诱导的 $CD8^+$   $CD62L^-$  T淋巴细胞和 $CD62L^+$ 及 $CD62L^-$  NK细胞的显著增加;阻断由异丙肾上腺素诱导的 $CD8^+$ 及 $CD4^+$  T细胞表面 $CD62L$ 密度的显著降低;以及阻断由异丙肾上腺素诱导的循环淋巴细胞表面淋巴细胞功能相关抗原1密度的升高,但不影响血浆可溶性 $CD62L$ 浓度。Rainer等<sup>[6]</sup>通过免疫荧光印迹术和流式细胞仪分析发现,肾上腺素可上调离体单核细胞L选择素表达,普萘洛尔能阻断由 $\beta$ 肾上腺素能受体部分介导的单核细胞表达L选择素百分数和L选择素平均荧光道数的显著升高,由于单核细胞L选择素可以促使炎症部位白细胞与内皮细胞的粘附,从而引起早期炎症反应,因此,上述研究表明 $\beta$ 受体阻滞剂可能对白细胞移动具有抑制作用。

本实验研究显示:模型组 $CD11a$ 较正常组升

高,与蒋红梅等<sup>[7]</sup>报道的冠心病患者 $CD11a$ 、 $CD11b$ 和 $CD18$ 升高及王雄等<sup>[8]</sup>报道冠心病患者 $CD11b/CD18$ 升高相吻合。普萘洛尔组 $CD11a$ 水平较模型组低,普萘洛尔可降低As斑块内巨噬细胞含量,减少As斑块面积。虽然普萘洛尔可使血脂轻度升高,但是普萘洛尔组与模型组血脂水平无显著性差异,所以普萘洛尔对血脂影响很小。

结果提示,普萘洛尔可能通过降低白细胞粘附分子 $CD11a$ 的表达,从而降低单核细胞、淋巴细胞与内皮细胞的粘附,减轻炎性细胞的浸润,减轻As斑块的炎症反应。这一发现将可能有助于加深对 $\beta$ 受体阻滞剂防治冠心病的进一步认识,为 $\beta$ 受体阻滞剂用于冠心病的二级预防提供新的理论依据。

### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115-126
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **105**: 1135-1143
- [3] Ilia J, Elenkov RL, Wilder GP. The sympathetic nerve, an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *J Pharmacol Exp Therap*, 2000, **52** (4): 595-638
- [4] Stefan B, Sandrine B, Laurence T. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2003, **170** (2): 191-203
- [5] Mills PJ, Goebel M, Rehman J. Leukocyte adhesion molecule expression and T cell naive/memory status following isoproterenol infusion. *J Neuroimmunol*, 2000, **102** (2): 137-144
- [6] Rainer TH, Lam N, Cocks RA. Adrenaline upregulates monocyte L-selectin in vitro. *Resuscitation*, 1999, **43** (1): 47-55
- [7] 蒋红梅, 刘若英. 动脉粥样硬化患者 $CD11a$ 、 $CD11b$ 和 $CD18$ 表达的初步研究. *临床内科杂志*, 2001, **18**: 107-109
- [8] 王雄, 刘胜辉, 贾永平. 冠心病患者白细胞膜粘附分子 $CD11b/CD18$ 表达的研究. *中国循环杂志*, 2005, **20** (3): 183-185

(此文编辑 朱雯霞)