

阿奇霉素对动脉粥样硬化家兔炎症反应的影响

张子新, 赵卫华, 宋丽新, 曾定尹

(中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 阿奇霉素; 动脉粥样硬化; 炎症; 高敏 C 反应蛋白; 肺炎衣原体; 血管细胞粘附分子 1

[摘要] 目的 观察动脉粥样硬化与炎症的关系及阿奇霉素对动脉粥样硬化的影响。方法 用高胆固醇喂养加血管内膜剥脱的方法复制家兔动脉粥样硬化模型, 并予阿奇霉素干预治疗 4 周。于实验 0、4、8、12 周检测血中炎症标志物高敏 C 反应蛋白、肺炎衣原体抗体的水平; 测定病变组织中血管细胞粘附分子 1 mRNA 水平; 观察病变组织动脉粥样硬化情况。结果 高脂组家兔动脉粥样硬化明显, 内膜增生幅度最大, 管腔面积最小。随着动脉粥样硬化的进展, 高脂组和阿奇霉素组血中高敏 C 反应蛋白、肺炎衣原体抗体的水平和组织中血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达均明显升高, 阿奇霉素组血中高敏 C 反应蛋白(123.9 ± 2.1 g/L)、肺炎衣原体抗体(1.40 ± 0.09 g/L)的水平与组织中血管细胞粘附分子 1 mRNA(0.978 ± 0.135)较高脂组血中高敏 C 反应蛋白(212.8 ± 5.3 g/L)、肺炎衣原体抗体(2.03 ± 0.08 g/L)的水平和组织中血管细胞粘附分子 1 mRNA(1.102 ± 0.108)明显降低($P < 0.05$)。两组之间血脂水平差异无显著性($P > 0.05$)。结论 动脉粥样硬化与炎症密切相关, 阿奇霉素有抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Azithromycin on Inflammation Reaction in Atherosclerosis Rabbits

ZHANG Zi Xin, ZHAO Wei Hua, SONG Li Xin, and ZENG Ding Yin

(Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Azithromycin; Atherosclerosis; Inflammation; High Sensitivity C-Reactive Protein; Chlamydia Pneumoniae Immunoglobulin G; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between atherosclerosis (As) and inflammation and the effect of azithromycin on As rabbits. **Methods** 45 rabbits were divided into control group, high lipid group and azithromycin group. The latter 2 groups were made as model by high lipid feeding [cholesterol 1.5 g/(kg·d)] and vascular intimal injury. Azithromycin group were given azithromycin 30 mg/(kg·d) 3 days 4 weeks. High sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), Chlamydia pneumoniae immunoglobulin G (CPIgG) were detected at 0, 4th, 8th, and 12th week. The damaged segments of abdominal artery were harvested for morphometry and reverse transcription polymerase chain reaction evaluated the mRNA expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). **Results** High-lipid As rabbit had higher level of hs-CRP (212.8 ± 5.3 g/L), CPIgG (2.03 ± 0.08 g/L) and mRNA expression of VCAM-1 (1.102 ± 0.108) than azithromycin group (hs-CRP: 123.9 ± 2.1 g/L, CPIgG: 1.40 ± 0.09 g/L, VCAM-1 mRNA: 0.978 ± 0.135). Azithromycin could reduce the levels of these inflammation indexes. **Conclusion** As had relationship with inflammation, azithromycin could inhibit inflammation and inhibit As.

研究证明动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一个炎症过程, 是血管内膜的慢性炎症反应^[1]。本实验观察了几种炎症标志物在 As 家兔血及粥样硬化组织局部的水平, 并使用阿奇霉素进行治疗, 旨在观察 As 与炎症的关系及抗炎治疗对 As 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

大耳白兔 45 只, 体重 2.5 ± 0.5 kg, 月龄 4~5 个

月, 由中国医科大学实验动物部提供。随机将动物分成对照组、高脂组和阿奇霉素组(治疗组), 每组 15 只。对照组喂食普通颗粒饲料 12 周, 高脂组喂普通饲料和胆固醇粉 [1.5 g/(kg·d)] 12 周, 阿奇霉素组喂普通饲料和胆固醇粉 12 周, 且从第 8 周起每周给予阿奇霉素 [30 mg/(kg·d)] 连续 3 天, 共 4 周。

1.2 动脉粥样硬化模型的复制

高脂组和阿奇霉素组家兔在高脂喂养 4 周后, 经一侧股动脉行腹主动脉内皮剥脱术, 采用直径 4.0~4.5 mm 的球囊, 压力 8~10 atm, 共拉伤 3 次, 每次 30 s, 间隔 1 min。然后再继续高脂喂养 8 周。阿奇霉素组于第 8 周开始加用阿奇霉素, 12 周时处死全部动物。

1.3 高敏 C 反应蛋白和肺炎衣原体抗体测定

各组动物于实验 0、4、8 和 12 周时分别从耳缘

[收稿日期] 2005-11-22 [修回日期] 2006-06-27

[作者简介] 张子新, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要研究方向为动脉粥样硬化及高血压, E-mail 为 catexin2000@yahoo.com.cn。赵卫华, 博士, 讲师, 主要研究方向为冠心病和心律失常的介入治疗, E-mail 为 zwh1963@sohu.com.cn。曾定尹, 教授, 博士研究生导师, 享受国务院特殊津贴, 主要研究方向为冠心病的基础与临床防治。

静脉采血 8 mL, 4℃ 3 000 r/min 离心 15 min, 留取上清-70℃保存备用, 用于甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高敏 C 反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、肺炎衣原体抗体(*Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin G, CPIgG)的测定。血脂测定使用日立 7060 型全自动生化分析仪, TG、TC 采用过氧化物酶抗过氧化物酶法, HDLC 采用选择性可溶化法, LDLC 采用化学修饰法。hs-CRP 的测定采用免疫比浊法, 使用 Beckman 公司试剂盒。CPIgG 的测定采用微量免疫荧光法, 使用丹麦 LabSystem 公司试剂盒。所有操作均由专业人员按照操作说明进行。

1.4 粥样硬化的观察

家兔处死后, 取腹主动脉损伤处血管组织, 多聚甲醛固定, 制成切片, HE 染色, 光镜下观察血管内膜的变化。

1.5 血管细胞粘附分子 1 mRNA 表达的测定

家兔处死后, 取靶病变血管组织, 采用异硫氰胍一步法提取组织中 RNA, 逆转录 cDNA 后采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)的方法测定组织中血管细胞粘附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) mRNA 表达, 以 GAPDH 为对照。VCAM-1 引物序列为 5'-GAACACTCTTACCTGTGCACAGC-3' 和 5'-GCCATCCTCATAGCAATTAAGGTGAG-3', 产物长度为 567 bp。GAPDH 引物序列为 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' 和 5'-GGTGAAGACGCCAGTGGACTC-3', 产物长度为 299 bp。反应条件为 94℃预变性 4 min 后, 94℃变性 40 s → 60℃复性 1 min → 72℃复性 1 min → 72℃延伸 1 min, 共 32 个循环。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外线条带放射显像仪显像, 图像自

动分析系统进行电泳条带强度测定, 计算 PCR 产物相对量。

1.6 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平的变化

家兔血中 TG、TC、HDLC、LDLC 水平随高脂喂养逐渐升高, 阿奇霉素组(治疗组)血脂水平与高脂组相比无明显变化(表 1)。

表 1. 各组血脂水平变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组		TG	TC	HDLC	LDLC
对照组	0 周	0.83 ± 0.29	1.48 ± 0.54	0.51 ± 0.13	0.63 ± 0.36
	4 周	0.98 ± 0.54	1.34 ± 0.68	0.40 ± 0.15	0.54 ± 0.39
	8 周	0.62 ± 0.13	1.21 ± 0.34	0.39 ± 0.13	0.29 ± 0.20
	12 周	0.50 ± 0.16	1.16 ± 0.29	0.40 ± 0.15	0.28 ± 0.10
高脂组	0 周	0.95 ± 0.25	1.61 ± 0.43	0.56 ± 0.11	0.74 ± 0.39
	4 周	1.28 ± 0.62	11.01 ± 5.68	1.00 ± 0.89	4.80 ± 1.87
	8 周	1.10 ± 1.21	11.77 ± 7.08	1.47 ± 0.42	6.60 ± 1.93
	12 周	1.72 ± 0.31	1.17 ± 0.57	1.41 ± 0.11	6.54 ± 2.47
治疗组	0 周	0.96 ± 0.70	1.31 ± 0.35	0.56 ± 0.15	0.45 ± 0.25
	4 周	0.96 ± 0.50	9.66 ± 7.81	1.04 ± 0.39	5.11 ± 1.71
	8 周	1.15 ± 0.43	14.63 ± 11.54	1.29 ± 0.74	6.49 ± 1.70
	12 周	1.70 ± 0.32	1.33 ± 0.57	1.50 ± 0.15	6.48 ± 2.33

2.2 高敏 C 反应蛋白和肺炎衣原体抗体水平

对照组 hs-CRP 和 CPIgG 无明显变化, 高脂组和阿奇霉素组 hs-CRP 和 CPIgG 水平从第 8 周起进行性升高, 阿奇霉素组治疗 4 周后 hs-CRP 和 CPIgG 水平明显低于高脂组($P < 0.05$, 表 2)。

表 2. 三组间高敏 C 反应蛋白和肺炎衣原体抗体滴度比较 ($\bar{x} \pm s$, g/L)

时间	对照组		高脂组		阿奇霉素组	
	hs-CRP	CPIgG	hs-CRP	CPIgG	hs-CRP	CPIgG
0 周	58.9 ± 2.1	1.42 ± 0.07	56.7 ± 1.3	1.39 ± 0.09	60.6 ± 1.6	1.41 ± 0.05
4 周	62.7 ± 2.3	1.55 ± 0.09	65.7 ± 1.5	1.48 ± 0.08	62.9 ± 4.7	1.47 ± 0.04
8 周	68.8 ± 2.1	1.67 ± 0.04	108.9 ± 3.7	1.85 ± 0.08 ^a	116.7 ± 4.4 ^a	1.83 ± 0.09 ^a
12 周	64.8 ± 1.2	1.63 ± 0.10	212.8 ± 5.3 ^a	2.03 ± 0.08 ^a	123.9 ± 2.1 ^{ab}	1.40 ± 0.09 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高脂组比较。

2.3 病理学 HE 染色结果

对照组未见有内膜增生, 内皮细胞完整; 高脂组

和阿奇霉素组均有明显的内膜增生, 内皮细胞破损, 增生的内膜处可见较多胆固醇结晶和泡沫细胞, 阿

奇霉素组内膜增生程度明显减轻, As 斑块体积小, 管腔面积大(图 1)。

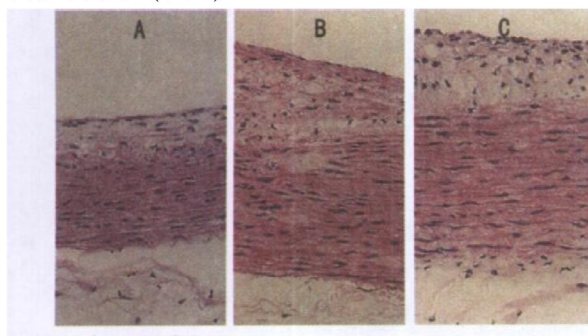


图 1. 血管内膜的病理改变(HE 染色, $\times 40$) A 为对照组, B 为高脂组, C 为阿奇霉素组。

2.4 组织血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

对照组仅有极少量 VCAM-1 mRNA 表达, 高脂组和阿奇霉素组 VCAM-1 mRNA 表达明显升高, 阿奇霉素组 VCAM-1 mRNA 水平较高脂组降低(0.978 ± 0.135 比 1.102 ± 0.108 , $P < 0.05$, 图 2)。

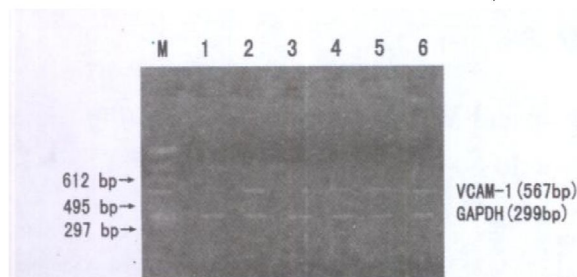


图 2. 逆转录聚合酶链反应产物琼脂糖凝胶电泳结果 M 为相对分子质量, 1 为对照组, 2 为高脂组, 3~6 为阿奇霉素组。

3 讨论

Ross^[1] 的炎症反应学说认为炎症反应介导 As 过程当中脂质沉积于动脉壁形成局部斑块的过程; 体液免疫和细胞免疫二者都能调控炎症反应和 As 的发生与发展; As 斑块破裂的过程有大量炎症细胞和炎症介质的参与。感染性病原体在 As 的发生中起始动作用, 其中肺炎衣原体感染与 As 的关系证据最多, 肺炎衣原体感染在 As 发生中起辅助因子的作用, 它能引起内皮细胞损伤, 从而促进高脂血症引起的 As 形成。单独肺炎衣原体感染不能引起 As 的形成, 但是肺炎衣原体感染可以加速高脂饮食引起的 As 形成^[24]。VCAM-1 和 hs-CRP 是公认的炎症标志物, 在炎症反应时升高, 而且与 As 和冠心病关系密切^[58]。冠心病病人血中 CRP 水平明显升高, 冠状动脉病变部位的炎症反应先于心血管事件, CRP 是

重要的预测因子, 尤其是急性冠状动脉综合征。CRP 可以诱导 VCAM-1 的表达, 局部 CRP 增高常常是循环中 CRP 增高的反应, 全面治疗以减少 CRP 的浓度与改善内皮功能是一致的。

我们的实验得出了与前人相似的结果^[9], 发现 As 家兔的炎症标志物水平明显升高, hs-CRP 升高与 CPIgG 的升高一致, 呈正相关趋势。给予大环内酯类抗生素阿奇霉素治疗后, 炎症反应减轻, 炎症标志物水平下降, 同时 As 的斑块也缩小, As 程度减轻, 这一结果进一步证明了 As 的确与炎症反应密切相关, 也为今后 As 的防治提供了新的治疗途径。但是许多针对炎症进行的防治 As 的临床研究得出了阴性结果, 由美国国立卫生研究院发起的阿奇霉素二级预防冠状动脉事件试验, 对 4 012 例冠心病患者给予阿奇霉素或安慰剂治疗, 平均随访 3.9 年, 结果报告两组发生的主要终点事件(冠心病死亡、非致死性心肌梗死、冠状动脉血运重建等)相似, 即使在 CRP 水平或肺炎衣原体滴度升高的患者也是如此^[10]。这种分歧一定程度上与炎症反应的复杂性和人体对炎症反应的多重性和非特异性有关。探索炎症与 As 的关系研究还有许多问题需深入进行。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Mehta JL, Romeo F. Inflammation, infection and atherosclerosis: do antibacterials have a role in the therapy of coronary artery disease [J]. *Drugs*, 2000, **59**: 159-170
- [3] 蒋文玲, 孙芸芸, 罗宪玲, 陈纪言. 冠心病患者肺炎衣原体感染的临床研究[J]. *心血管康复医学杂志*, 2003, **12** (2): 112-114
- [4] 刘漪伦. 肺炎衣原体感染致动脉粥样硬化的发病机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (1): 113-115
- [5] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, **420**: 868-874
- [6] Ridker PM, Rifai N, Rose MA, Buring JE, Cook NK. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2002, **347**: 1557-1565
- [7] Jabs WJ, Theissing E, Nitschke M, Bechtel JF, Duchraw M, Mohamed S, et al. Local generation of C-reactive protein in diseased coronary [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 1428-431
- [8] Ishikawa T, Imamura T, Kinta H, Haruhiko D, Toshiro N, Riichirou K, et al. Possible contribution of C-reactive protein within coronary plaque to increasing its own plasma levels across coronary circulation [J]. *Am J Cardiol*, 2004, **93** (5): 611-614
- [9] Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, et al. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model [J]. *Circulation*, 1998, **97**: 633-636
- [10] Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events [J]. *N Engl J Med*, 2005, **352** (16): 1637-645

(此文编辑 许雪梅)