

# CyPA 与 CD147 在兔动脉粥样硬化易损斑块中的表达

张雁斌<sup>1</sup>, 杜大勇<sup>2</sup>, 柳杨<sup>2</sup>, 李桂明<sup>2</sup>, 李沫言<sup>2</sup>, 王新亮<sup>2</sup>, 路怀志<sup>1</sup>, 杨升华<sup>1</sup>, 李运田<sup>1,2</sup>

(1. 南方医科大学第二临床医学院心内科, 广东省广州市 510515; 2. 解放军第 305 医院心脏中心, 北京市 100017)

[关键词] 易损斑块; 亲环素 A; CD147; C 反应蛋白

[摘要] **目的** 探讨亲环素 A (CyPA)/CD147 在兔动脉粥样硬化易损斑块中的表达。**方法** 新西兰雄性白兔 16 只, 3 月龄, 随机分为对照组和模型组, 每组 8 只。利用液氮损伤内膜 + 高脂饮食的方法建立易损斑块模型, 对照组正常饮食, 不做任何处理, 0 周和 13 周分别检测兔血清 C 反应蛋白 (CRP)、CyPA 和 CD147 表达水平。术后 13 周处死动物, 取血管行 HE 染色、Masson 染色, 观察血管形态, 并做巨噬细胞、CyPA、CD147 免疫组织化学染色。**结果** 对照组未见斑块形成, 模型组颈动脉形成典型的易损斑块, 斑块内 CyPA 和 CD147 表达丰富, 呈带状分布特征, 两者在同一斑块中具有共区域性; 13 周时模型组兔血 CRP、CyPA 和 CD147 水平较 0 周及同时期对照组均明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 易损斑块中 CyPA、CD147 表达丰富, CyPA 和 CD147 是易损斑块的危险因素, 其表达与易损斑块的存在呈正相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Expressions of CyPA and CD147 in Rabbit Atherosclerotic Vulnerable Plaques

ZHANG Yan-Bin<sup>1</sup>, DU Da-Yong<sup>2</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, LI Gui-Ming<sup>2</sup>, LI Mo-Yan<sup>2</sup>, WANG Xin-Liang<sup>2</sup>, LU Huai-Zhi<sup>1</sup>, YANG Sheng-Hua<sup>1</sup>, and LI Yun-Tian<sup>1,2</sup>

(1. Department of Cardiology, Second Clinical Medical College of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Heart Center, The 305th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100017, China)

[KEY WORDS] Vulnerable Plaque; Cyclophilin A; CD147; C-reactive Protein

[ABSTRACT] **Aim** To explore the expressions of cyclophilin A (CyPA)/CD147 in rabbit atherosclerotic vulnerable plaques. **Methods** 16 healthy male New Zealand rabbits (3 months) were randomly divided into control group and model group, 8 rabbits in each group. Rabbit model with typical atherosclerotic vulnerable plaque was developed by injuring carotid intima with liquid nitrogen combined with high-fat diet. Meanwhile, the control group was fed with standard diet, and without injury. Expressions of C-reactive protein (CRP), CyPA and CD147 in serum of rabbits were tested at the beginning and the 13th week. All rabbits were sacrificed after 13 weeks. Then paraffin-embedded sections were used for HE staining and Masson trichrome staining to analyze the changes of vascular morphology. Additionally, macrophagocyte, CyPA and CD147 monoclonal antibodies were applied for immunohistochemistry staining. **Results** Atherosclerotic vulnerable plaques were found in model group but not in control group. There were rich expressions of CyPA and CD147 with zonal distribution and co-location in the same atherosclerotic vulnerable plaques. The expressions of CyPA, CD147 and CRP in serum increased significantly in model group compared with those in control group at the 13th week ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** High expressions of CyPA and CD147 were found in atherosclerotic vulnerable plaques, and the expressions of CyPA and CD147 were the risk factors of the atherosclerotic vulnerable plaques, which have a positive correlation with the existence of atherosclerotic vulnerable plaques.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 作为冠状动脉粥样硬化性心脏病的基本病理生理基础, 是由多

种细胞 (单核巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等) 共同参与, 并以脂质代谢紊乱和粥样斑块局部突出

[收稿日期] 2014-09-09

[修回日期] 2014-12-08

[作者简介] 张雁斌, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 fjctzyb0734@163.com。杜大勇, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床。通讯作者李运田, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 lyt305@126.com。

管腔为特征的慢性进展性炎症疾病,炎症反应参与了 As 发生、发展的全过程<sup>[1-2]</sup>。在众多的内皮损伤及炎症诱导因子中,过度的氧化应激产物被认为是整个炎症瀑布效应中的上游因子之一。亲环素 A (cyclophilin A, CyPA) 作为氧化应激介导的主要产物,在 As 斑块单核/巨噬细胞的炎症激活中起着至关重要的作用。同时, CyPA 对单核细胞具有显著的趋化迁移作用,加速单核细胞向斑块的浸润并转化为巨噬细胞,参与 As 的炎性反应<sup>[3]</sup>。自 1994 年 Muller 提出易损斑块的概念以来,国内外大量对易损斑块的研究使我们对它的特性有了更多了解。易损斑块是指所有易于发生血栓,以及可能快速进展从而成为罪恶斑块的那些粥样病变。主要诊断标准包括急性炎症(单核/巨噬细胞或有 T 细胞浸润),纤维帽薄伴大的脂质核心,内皮剥脱伴表面血小板聚集,斑块裂口,狭窄 > 90%<sup>[4]</sup>。当前临床上急性冠状动脉综合征发生的病理基础就是易损斑块的形成。目前有证据显示, CyPA 通过其受体 CD147 分子作用于 As 发生、发展的全过程,两者的相互作用可导致斑块易损性增加,诱发血管内急性血栓形成,导致急性冠状动脉综合征的发生<sup>[5-6]</sup>。本研究拟通过动物模型来观察二者在斑块内及血清中的表达变化,为诊断和防治急性冠状动脉综合征提供新的方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

高脂饲料(1%胆固醇,8%猪油,10%蛋黄粉+兔基础饲料)购自北京华卓康生物科技股份有限公司;医用液氮(解放军 305 医院中心实验室);Masson 三色染色液(北京东方日创生物科技有限公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉生物技术开发有限公司);辣根过氧化物酶标记 GAPDH 抗体(美国 Sigma 公司);兔巨噬细胞 RAM11 单克隆抗体(丹麦 Dako 公司);兔 CyPA 抗体(英国 Biobyte 公司);兔 CD147 抗体(武汉博士德生物工程有限公司);兔 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP) ELISA 试剂盒、兔 CD147 ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);兔 CyPA ELISA 试剂盒(美国 Mybiosource 公司)。

### 1.2 实验动物及分组

健康纯种雄性新西兰白兔 16 只,按简单随机方法平均分为对照组和模型组。对照组以普通饲料喂养,不进行任何处理;模型组兔高脂喂养 7 天后,

液氮冻伤结合高脂饮食,建立兔 As 易损斑块模型<sup>[7]</sup>。

### 1.3 模型的建立

适应性喂养 1 周后,对照组不做任何处理,继续普通饮食。模型组实验动物禁食 12 h,自由饮水,耳缘静脉注射 0.3% 戊巴比妥钠 1 mL/kg,完全麻醉后,固定四肢于操作台上,常规去除颈部毛发,消毒,铺洞巾。逐步切开右侧颈部皮肤,分离肌肉组织,暴露右侧颈总动脉。血管夹先后阻断远、近心端血流,两夹间距约 4 cm。1 mL 注射器稍靠近心端 45°斜刺入管腔,抽除血液,生理盐水冲洗,留置针头于管腔,迅速用注射器抽取液氮,于针头处注入血管,反复 3 次,每次持续 10 s。直至血管被液氮充盈,血管膨胀,气体由穿刺点处溢出,肉眼可见选接管腔、管壁发白。并于术后第 12 周,再次重复上述步骤,行颈动脉液氮激发术,建立 As 易损斑块模型。

### 1.4 组织标本留取及处理

实验动物于术后 13 周处死,分别剥离留取右颈总动脉约 4 cm,每组取血管一部分常规石蜡包埋,分别作 HE 染色、Masson 染色,利用 CyPA、CD147、CAM11 单克隆抗体进行组织化学染色。光镜观察斑块的组织形态。

### 1.5 血清 CRP、CD147、CyPA 的检测

高脂饮食前及 13 周时分别在空腹 24 h 条件下经兔耳中动脉取血,离心分离血清,静置 20 min 后以 3000 r/min 离心 15 min,取上清液分装于 Eppendorf 管中,检测 CRP、CD147、CyPA 表达水平。

### 1.6 统计学分析

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本比较采用 *t* 检验,前后对比研究采用配对 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

兔总体生长良好,模型组 1 只兔因麻醉过量死亡,其余动物全部完成实验,所得 15 只动物实验数据参与分析。

### 2.2 斑块形态

对照组可见内皮细胞完整,排列整齐,内弹力膜清晰完好,中层平滑肌细胞排列整齐,形态规则,未见斑块形成,内膜未见巨噬细胞表达。模型组 HE 染色可见典型的不稳定性斑块,斑块表现为薄的纤维帽、脂质核心,内膜为巨噬细胞及各种来源的泡沫细胞浸润,局部存在黏液样变性。Masson 染

色可见纤维帽中平滑肌细胞明显减少,散在一些蓝染的胶原纤维;RAM11 标志的巨噬细胞免疫组织化学染色可见斑块内巨噬细胞丰富,部分存在片状的黏液聚集,弹力纤维与平滑肌细胞呈层状排列,部

分内弹力板破损,平滑肌细胞经破损弹力板迁移入内膜。部分血管中膜弹力纤维被牵拉变直,血管中膜变薄(图 1)。

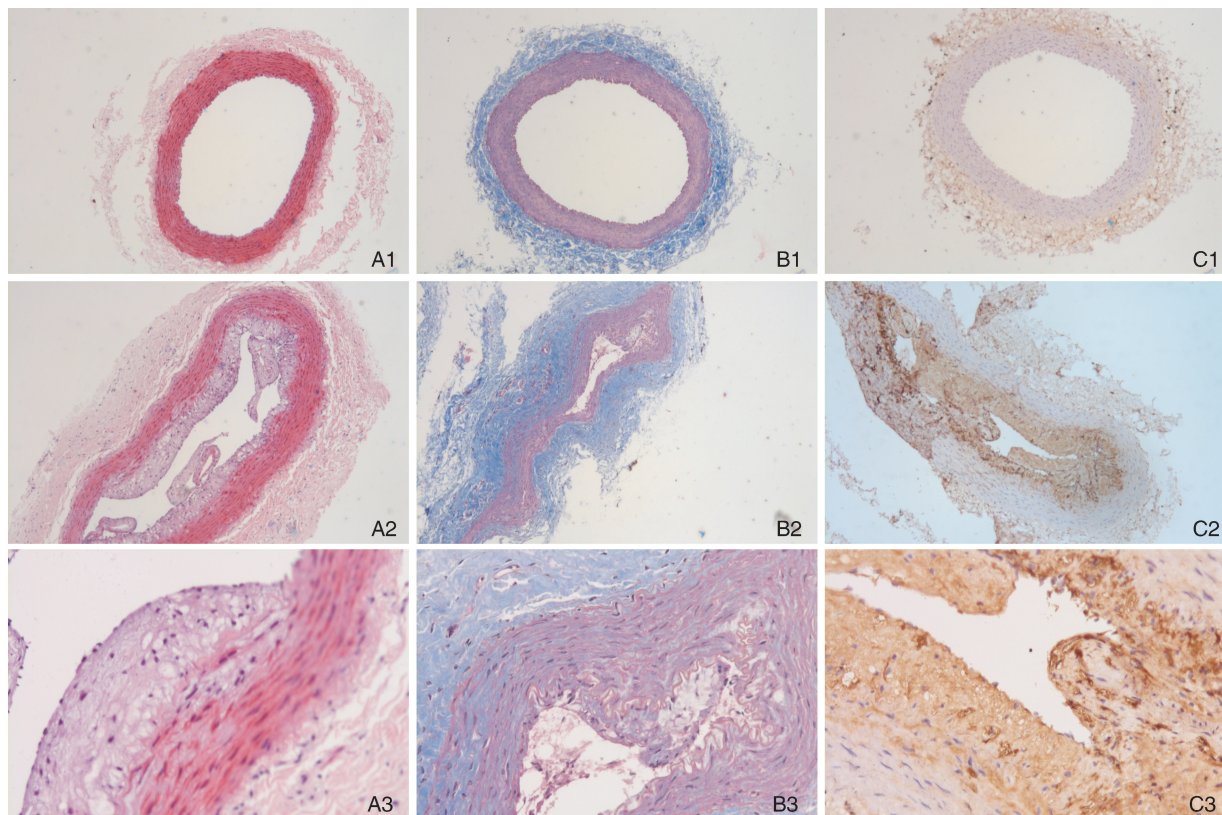


图 1. 斑块形态 A 为 HE 染色, B 为 Masson 染色, C 为 RAM11 抗体染色; 1 为对照组 ( $\times 40$ ), 2 为模型组 ( $\times 40$ ), 3 为模型组 ( $\times 200$ )。

Figure 1. Plaque morphology

### 2.3 斑块内 CyPA 和 CD147 的表达

对照组内膜部分散在巨噬细胞存在,有少量均匀分布的 CyPA、CD147 表达;中膜无巨噬细胞,可见散在少量 CyPA、CD147 表达。模型组斑块内富含巨噬细胞、泡沫细胞,CD147、CyPA 呈片状分布表达,且具有共区域性;与同一血管同一斑块的巨噬细胞标记染色对比,可见 CD147、CyPA 的表达多集中于巨噬细胞聚集部位(图 2)。

### 2.4 血清 CRP、CyPA 及 CD147 水平

实验前,两组兔血清 CyPA、CD147 及 CRP 水平皆无显著性差异( $P > 0.05$ )。第 13 周,对照组血清 CyPA、CD147 及 CRP 水平与实验前相比无显著性差异( $P > 0.05$ );模型组血清 CyPA、CD147 及 CRP 水平较实验前明显升高,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。对照组和模型组组间血清 CyPA、CD147 及 CRP 水平差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),表现为后者 CyPA、CD147 及 CRP 水平明显高于前者(表 1)。多因素 Logistic 回归分析 CyPA、CD147 及 CRP 对易

损斑块存在的预测价值,结果显示, CyPA、CD147 及 CRP 均为易损斑块的危险因素,表达与易损斑块的存在呈正相关( $OR = 1.10, P = 0.023$ ;  $OR = 1.15, P = 0.043$ ;  $OR = 1.05, P = 0.026$ )。

表 1. 血清 CD147、CyPA 及 CRP 水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Serum levels of CD147, CyPA and CRP( $\bar{x} \pm s$ )

项 目	对照组( $n=8$ )	模型组( $n=7$ )
0 周		
CD147( $\mu\text{g/L}$ )	62.15 $\pm$ 4.52	67.23 $\pm$ 5.32
CyPA( $\mu\text{g/L}$ )	0.99 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.07
CRP(mg/L)	0.33 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.07
13 周		
CD147( $\mu\text{g/L}$ )	61.50 $\pm$ 5.45	120.46 $\pm$ 6.99 <sup>ab</sup>
CyPA( $\mu\text{g/L}$ )	1.02 $\pm$ 0.07	2.03 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>
CRP(mg/L)	0.33 $\pm$ 0.07	0.83 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与同组 0 周比较。

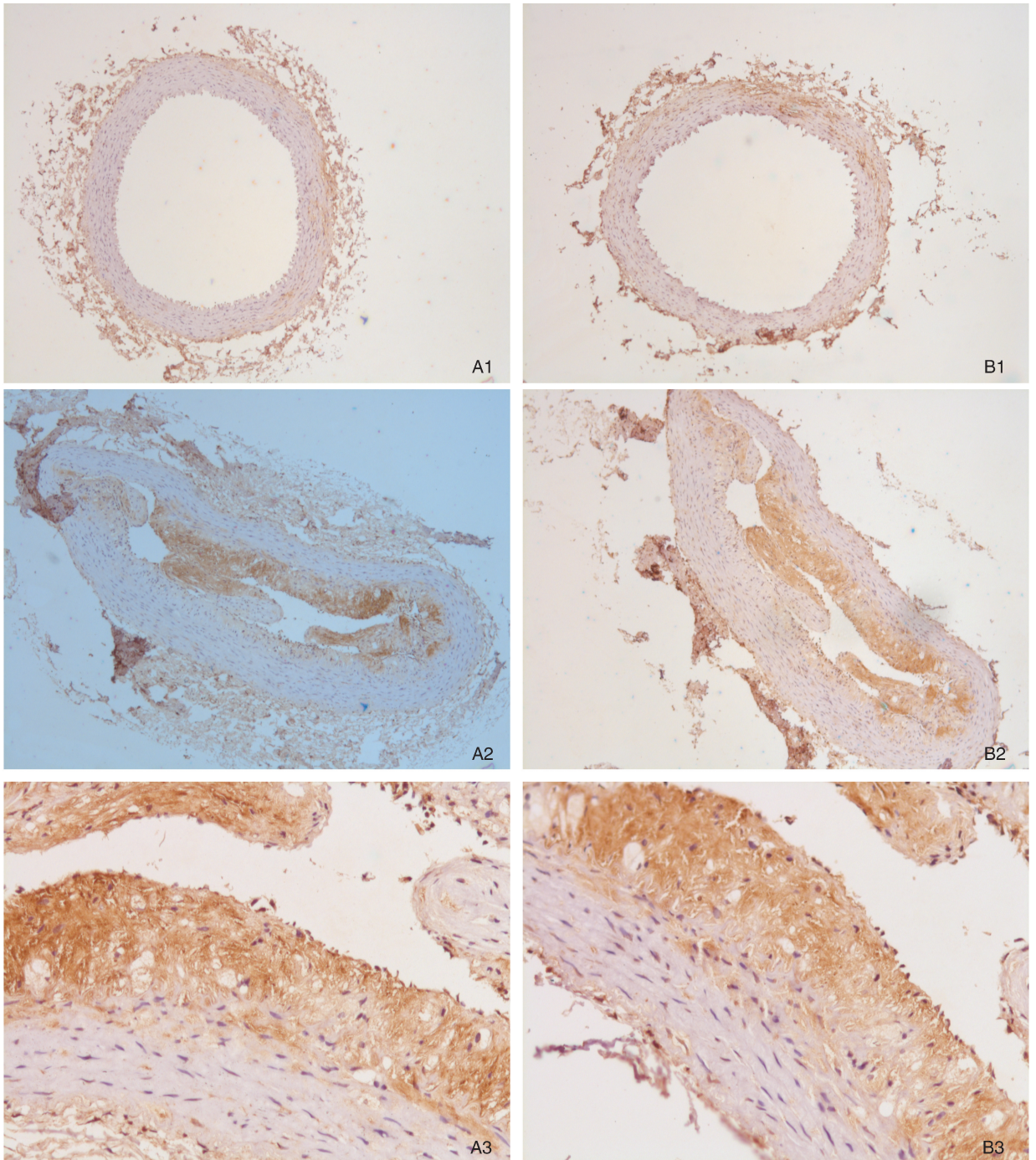


图 2. 斑块内 CyPA 和 CD147 的表达 A 为 CD147 抗体染色, B 为 CyPA 抗体染色; 1 为对照组 ( $\times 40$ ), 2 为模型组 ( $\times 40$ ), 3 为模型组 ( $\times 200$ )。

Figure 2. The expression of CyPA and CD147 in plaques

### 3 讨论

本研究成功创建了兔 As 易损斑块, 可见薄的纤维帽、大脂质核心, 内膜为巨噬细胞及泡沫细胞浸润, 部分内皮脱落、斑块出现裂隙, 局部小血栓形成, 与人类尸检研究相比, 属于典型易损斑块<sup>[8]</sup>, 对照组未见斑块形成。

在此基础上我们对 CD147、CyPA 表达进行了研究。结果显示, As 易损斑块中 CyPA、CD147 表达丰富, 呈带状分布特征, 两者具有共区域性, 同时发现同一血管的同一斑块中 RAM11 标记的巨噬细胞也表达在相近区域。在 As 发生发展过程中, CyPA 通过其受体 CD147 的协同作用可趋化单核细胞、中性粒细胞和 T 细胞等聚集至炎症反应部位<sup>[9-11]</sup>, 同时

CyPA-CD147 相互作用促进巨噬细胞等活化以产生 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等各种炎症因子,加重血管壁的炎症反应。炎症刺激及炎症因子的聚集又可诱导活化的巨噬细胞、平滑肌细胞分泌 CyPA 和 CD147,形成一个恶性循环。从某种程度上解释了斑块内 CyPA-CD147 表达具有共区域性,同时又与巨噬细胞表达范围相近。活化的巨噬细胞可在 CyPA-CD147 的作用下表达更多基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)<sup>[12]</sup>,特别是 MMP-9,通过降解细胞外基质,削弱 As 斑块纤维帽的厚度,此类斑块在血管切应力等因素下易出现斑块破裂,引发急性心肌缺血事件的发生。而在对照组,仅在内皮下可见散在 CyPA、CD147 表达。由上可知, CyPA-CD147 的相互作用促进了 As 斑块的发生发展,加重斑块的易损性。

血清学指标显示,模型组兔外周血 CyPA、CD147 及 CRP 水平与术前及对照组相比均明显升高,这与以往研究相同<sup>[13]</sup>。CRP 等的升高提示易损斑块模型兔体内炎症状态,结合斑块形态及回归分析,发现外周血 CyPA、CD147 与易损斑块的形成呈明显正相关。急性冠状动脉综合征患者斑块多为易损性,血清 CyPA 与 CD147 检测有望与 CRP 一样作为危险分层的指标,但需要临床进一步的大样本研究。

#### [参考文献]

- [1] Jain MK, Sangwung P, Hamik A. Regulation of an inflammatory disease: Kruppel-like factors and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34 (3): 499-508.
- [2] 阳巍, 廖端芳, 庾勤慧, 等. 姜黄素抗动脉粥样硬化研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32 (1): 55-58.
- [3] 袁伟, 严金川, 梁仪, 等. 亲环素 A 启动单核细胞炎症性募集的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (9): 791-796.

- [4] 吴平生, 张远慧, 许乙凯, 等. 易损斑块及易损患者的新定义及危险分层[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32 (3): 283-285.
- [5] Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, et al. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Exp Med*, 2011, 208 (1): 53-66.
- [6] Yuan W, Ge H, He B. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213 (2): 415-421.
- [7] Fang SM, Zhang QH, Jiang ZX. Developing a novel rabbit model of atherosclerotic plaque rupture and thrombosis by cold-induced endothelial injury[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 39.
- [8] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*, 2003, 108 (15): 1 772-778.
- [9] Huang J, Xie B, Li Q, et al. Infliximab reduces CD147, MMP-3, and MMP-9 expression in peripheral blood monocytes in patients with active rheumatoid arthritis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698 (1-3): 429-434.
- [10] Damsker JM, Bukrinsky MI, Constant SL. Preferential chemotaxis of activated human CD4 + T cells by extracellular cyclophilin A[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82 (3): 613-618.
- [11] 路怀志, 杜大勇, 李雪杰, 等. CD147 基因沉默对亲环素 A 趋化作用及 MMP-9 表达的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2014, 45 (1): 4-7.
- [12] Kim JY, Kim WJ, Kim H, et al. The stimulation of CD147 induces MMP-9 expression through ERK and NF-kappaB in macrophages: Implication for atherosclerosis [J]. *Immune Netw*, 2009, 9 (3): 90-97.
- [13] 臧璇, 严金川, 袁伟, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清亲环素 A 表达升高的临床意义[J]. *江苏医药*, 2013, 39 (12): 1 407-409.

(此文编辑 文玉珊)