论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0734-04

血清淀粉样P蛋白缺失对小鼠动脉粥样硬化斑块形成的影响

李小强,王尽淘,桂亚丽,唐富天,兰 天,温定文,吴 腾,王丽京 (510006 广州,广东药学院血管生物学研究所)

[摘要] **目的** 观察血清淀粉样P蛋白(serum amyloid P component, SAP)缺失对小鼠动脉粥样硬化形成的影响。**方法** 构建载脂蛋白E(Apolipoprotein E)和SAP双基因敲除小鼠($ApoE^{-/-}$;$SAP^{-/-}$)作为实验组,$ApoE^{-/-}$小鼠作为对照组。2组小鼠各12只,组内雄雌小鼠各半。在小鼠第8周龄时,体质量约20 g,此时开始同时给予2组小鼠高脂饮食,于第16周龄时获取小鼠全血分离得到血清进行血脂分析,处死小鼠后获取其心脏,胸腹主动脉进行油红O染色并进行病理统计。**结果** 双基因敲除小鼠组的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)明显高于对照小鼠($P<0.01$),低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的比值和动脉粥样硬化指数(AI)小于对照组小鼠且差异显著($P<0.01$),而总胆固醇(TC),甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)浓度无显著性差异($P>0.05$);主动脉根部切片和胸腹主动脉的油红O染色结果表明SAP缺失明显减轻了小鼠动脉粥样硬化斑块面积($P<0.01$)。**结论** AP缺失可能通过上调HDL从而抑制$ApoE^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化斑块形成。

[关键词] 血清淀粉样P蛋白;高密度脂蛋白;动脉粥样硬化

[中图法分类号] R331.1;R363.25;R543.502 [文献标志码] A

Effect of serum amyloid P component deficiency on formation of atherosclerosis plaques in mice

Li Xiaoqiang, Wang Jintao, Gui Yali, Tang Futian, Lan Tian, Wen Dingwen, Wu Teng, Wang Lijing (Institute of Vascular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of serum amyloid P component (SAP) deficiency on atherosclerosis(AS)in mice. **Methods** Apolipoprotein E (ApoE) and SAP knockout mice served as an experimental group ($n=12$) and ApoE knockout mice served as a control group ($n=12$). Their average body weight was about 20 g at the age of 8 weeks. The animals were then fed with high fat diet and killed at the age of 16 weeks. Blood, heart, and thoracico-abdominal aorta tissue samples were taken. Serum lipid was analyzed and the AS lesion Plaque area was measured after oil red O staining. **Results** The HDL-C level was significantly higher while the LDL-C/HDL-C value and atherogenic index(AI)were significantly lower in experimental group than in control group($P<0.01$). However, no significant difference was observed in TC, TG and LDL-C levels between the two groups($P>0.05$). Oil red O staining showed that SAP deficiency significantly reduced the area of atherosclerosis plaques in heart and thoracico-abdominal aorta tissue samples($P<0.01$). **Conclusion** SAP deficiency inhibits formation of atherosclerosis plaques in mice by up-regulating their HDL-C level.

[**Key words**] serum amyloid P component;high density lipoprotein;atherosclerosis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2010CB529702) and the National Natural Science Foundation of China(30900764).
Corresponding author: Wang Lijing, Tel: 86-20-39352126; E-mail: wanglijing62@163.com

血清淀粉样P蛋白(serum amyloid P component, SAP),顾名思义最初是作为一种淀粉样沉积蛋白为人们所认识,而因为它能以Ca^{2+}依赖性的方式广泛与多种生理配体结合而发挥其功能,近年来越来越多的人开始关注它对一些疾病的影响。已有研究人员发现SAP蛋白特异性沉积在动脉粥样硬化患者的斑块中且其含量随着病变的加重而不断增加[1],同时一些流行病统计学研究发现大量心血管疾病患者的血清中SAP的浓度明显增加[2-3],证明了SAP与心血管疾病之间存在着一定的联系。近年来有研究人员发现SAP能直接和血清中的高密度脂蛋白和极低密度脂蛋白结合[4],提示了SAP可能通过与这两种脂蛋白的结合来发挥其在心血管疾病中的作用。但是关于SAP在动脉粥样硬化中的作用目前仍无定论。

由于正常小鼠血浆内含有高浓度的高密度脂蛋

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2010CB529702);国家自然科学基金(30900764)

[通信作者] 王丽京,电话:(020)39352126,E-mail: wanglijing62@163.com

白[5],在正常饲料喂养情况下难以形成动脉粥样硬化斑块,即使采用高脂饲料促使其形成动脉粥样硬化病变也至少需要长达 8 个月的时间。而目前比较公认的研究小鼠动脉粥样硬化的模型是载脂蛋白 E 缺失小鼠(ApoE$^{-/-}$)和低密度脂蛋白受体缺失小鼠(LDLR$^{-/-}$)。本研究采用 SAP 基因敲除小鼠与自发动脉粥样硬化的载脂蛋白 E 缺失小鼠杂交获得双基因敲除小鼠(ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$),为了进一步缩短研究周期,我们同时用高脂饲料喂养加速其动脉粥样硬化病变的形成,探讨 SAP 缺失对小鼠动脉粥样硬化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

载脂蛋白 E 敲除小鼠(ApoE$^{-/-}$)购买于美国 Jackson 实验室,血清淀粉样 P 蛋白(SAP$^{-/-}$)缺失小鼠由本研究所与南京大学模式动物研究所参照文献[6]构建。在本研究所的动物平台上杂交两种小鼠,从 F2 代中获得双基因敲除小鼠作为实验组,同时筛选出的单基因 ApoE 缺失的小鼠作为对照组,2 种小鼠各 12 只,组内均雌雄各半,正常饲料喂养至第 8 周龄后换为高脂饲料,喂养 8 周至第 16 周龄,小鼠喂养符合《中华人民共和国卫生部实验动物标准》。普通饲料和高脂饲料(普通饲料 87.5%,胆固醇 2%,胆酸盐 0.5%,猪油 10%)均购买于广东省医学实验动物中心。

1.2 小鼠基因鉴定

取约 5 mm 长的小鼠尾部捣碎,然后加入 DNA 裂解液与蛋白酶 K,55 ℃过夜,离心,用三氯甲烷-异戊醇混合液(24∶1)纯化 DNA 2 次,最后用无水乙醇析出 DNA,加水溶解。获得的 DNA 经 PCR(美国应用生物系统公司 PCR 仪)扩增后,产物用于凝胶电泳并拍照(凝胶成像系统),ApoE 基因的引物序列为 5′-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3′, 5′-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3′, 5′-GCCGCCCCGACTGCATCT-3′;SAP 基因引物序列为 5′-CCTCCTCTGGCATTGTTGAATTTTGGGTC-3′, 5′-ATCGGCCATCTGATGTCCATGAGGTTTT-3′(Invitrogen 公司)。

1.3 血脂检测

检测 16 周小鼠血清中血脂,禁食 12 h 后,称量小鼠体质量后经眼眶静脉丛抽取空腹血,室温静置 2 h 后 3 000 r/min 离心,收集血清。采用相应试剂盒测量总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)浓度(中生北控生物科技股份有限公司),由公式 LDL-C = TC − HDL-C − TG/2.2 算得低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)浓度,致动脉粥样硬化指数(AI)=(TC − HDL-C)/HDL-C。

1.4 病理学检查

1.4.1 胸腹主动脉大体观察 乙醚麻醉处死小鼠后,用含 EDTA 的冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)灌注小鼠至其肝脏变白,获取小鼠心脏和胸腹主动脉,在活体显微镜下剥离主动脉外周的脂肪组织和其他组织,纵向单侧切开血管后平铺在滤纸上,4% 多聚甲醛固定 10 min 后进行油红 O 染色,用数码相机拍照其大体染色结果,最后利用 Image Pro Plus 软件统计动脉粥样硬化斑块面积占整个血管面积的比例[7]。

1.4.2 主动脉根部镜下观察 将小鼠的心脏包埋做冰冻切片,收集主动脉根部的连续切片,部分切片经 60% 的异丙醇漂洗 20 ~ 30 s 后进行油红 O 染色,避光染色 10 min 后用苏木精复染,漂洗并烘干,普通胶水封片后于 Olympus 光学显微镜下拍照,随后在 Image Pro Plus 软件中统计小鼠的粥样硬化斑块面积[7],剩余切片经丙酮固定后做苏木精-伊红染色(HE 染色)观察病变处巨噬细胞浸润情况。

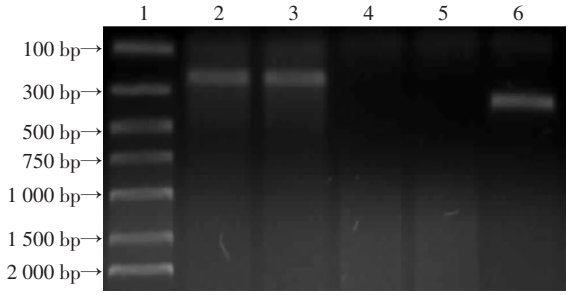
1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad prism 5 统计软件进行分析。组间比较采用非参数 t 检验。

2 结果

2.1 DNA 鉴定结果图

将 2 只小鼠的总 DNA 都分别用于 ApoE 基因(2、3 泳道)和 SAP 基因的扩增(4、5 泳道)。野生型小鼠纯合缺失 ApoE 基因以后,对该基因的扩增结果为 245 bp 的条带。同时野生型小鼠对 SAP 基因的鉴定结果为 356 bp 的条带(6 泳道),纯合缺失 SAP 基因以后,对该基因的鉴定结果是无条带出现。结果显示这 2 只小鼠为 ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 双敲除小鼠。见图 1。



1:DNA 标准;2、3:ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 小鼠 ApoE 基因;4、5:ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 小鼠 SAP 基因;6:野生型小鼠 SAP 基因

图 1 ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 小鼠的 ApoE 和 SAP 基因鉴定结果

2.2 血脂检测

在高脂喂养小鼠至第 16 周龄时,2 组小鼠体质量无明显差异。血脂分析的结果表明实验组 ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 小鼠的总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平及高密度脂蛋白/总胆固醇值均相比于对照组 ApoE$^{-/-}$ 小鼠无显著性差异;而高密度脂蛋白胆固醇水平(HDL-C)相比于对照组小鼠显著性上调($P < 0.01$),同时低密度脂蛋白胆固醇/高密度脂蛋白胆固醇和致动脉粥样硬化指数(AI)均显著性下降($P < 0.01$)。这表明 SAP 缺失可特异性上调 ApoE$^{-/-}$ 小鼠体内 HDL 水平。见表 1。

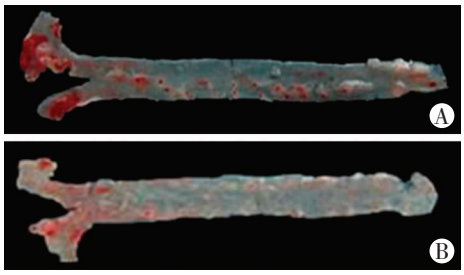
2.3 胸腹主动脉大体观察

肉眼观察可见对照组 ApoE$^{-/-}$ 小鼠(图 2A)主动脉弓部有明显的粥样斑块形成,呈片状分布,染色较深,且在胸主动脉和腹主动脉部分也存在颗粒状的粥样斑块,染色较浅。而实验组 ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 小鼠(图 2B)主动脉弓处粥样斑块明显减少,染色较浅,在胸主动脉和腹主动脉部分几乎无可见斑块。经 IPP 软件统计分析,ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$ 双基因敲除的斑块面积百分比(2.72 ± 0.74)% 显著低于对照组 ApoE$^{-/-}$ 小鼠的斑块面积百分比(4.22 ± 1.71)%($P < 0.01$)。

表1 2组小鼠血脂水平比较（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	LDL-C/ HDL-C	HDL-C / TC	AI
ApoE$^{-/-}$对照组	28.80±8.36	5.12±1.63	0.26±0.16	26.29±7.94	138.93±87.32	0.01±0.01	151.15±94.99
ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$实验组	26.25±8.17	5.67±1.55	0.48±0.18[a]	23.37±7.80	54.86±28.74[a]	0.02±0.03	60.63±31.56[a]

a：$P<0.01$，与ApoE$^{-/-}$对照组比较

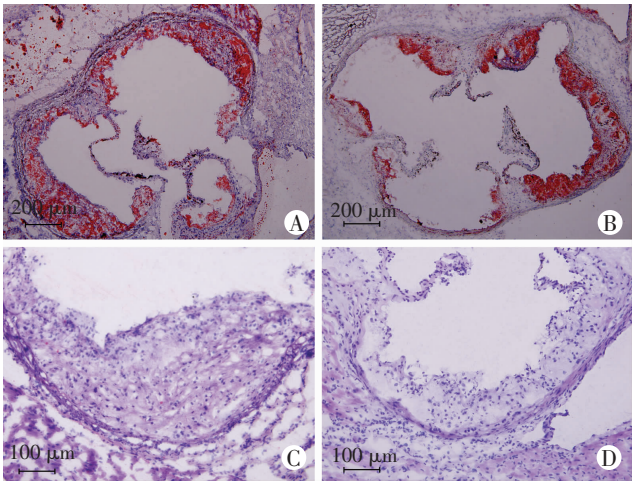


A：对照组ApoE$^{-/-}$小鼠；B：实验组ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$小鼠 红色区域示粥样斑块

图2 2组小鼠胸腹主动脉油红O染色后的大体观察

2.4 主动脉根部镜下观察

与ApoE$^{-/-}$对照组小鼠相比，实验组ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$小鼠的主动脉根部的斑块面积明显减少具有显著性差异[(2.42±0.57)*vs*(1.65±0.61)，$P<0.01$]。光镜下观察可见对照组ApoE$^{-/-}$小鼠的斑块中除了含有大量的单核巨噬细胞和纤维结构，也伴随着严重的巨噬细胞泡沫化；而实验组ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$小鼠动脉粥样斑块中浸润的炎性巨噬细胞和纤维成分均显著降低。见图3。



A、B：油红O染色；C、D：HE染色；A、C：对照组ApoE$^{-/-}$小鼠；B、D：实验组ApoE$^{-/-}$;SAP$^{-/-}$小鼠

图3 油红O染色与HE染色观察2组小鼠主动脉根部形态学变化

3 讨论

现代医学认为动脉粥样硬化是一种多因素参与的慢性疾病，针对其发病机制，目前广为接受的3种假说为脂质浸润、内皮损伤和炎症反应。但是已经比较明确的是脂代谢异常和炎症反应贯穿于AS的启动，形成和发展[8-9]。高密度脂蛋白作为一种“好胆固醇”能直接通过胆固醇逆转运途径将其他组织的胆固醇，包括将动脉粥样硬化斑块中的胆固醇转运到肝脏代谢，结合它的抗炎作用能显著抑制和逆转动脉粥样硬化的发展，因此如何有效提高血清中高密度脂蛋白的浓度已成为心血管疾病研究者共同关注的问题[10]。

血清淀粉样P蛋白(SAP)，与C反应蛋白(CRP)同属于血清正五聚体蛋白家族成员，因为它能以Ca^{2+}依赖性的方式与多种生理配体结合而广泛参与固有免疫反应，炎症和淀粉样病变等[11-12]，所以逐渐引起研究者们的关注。小鼠和人的SAP蛋白都主要由肝细胞表达，然后分泌到血浆中发挥其作用，然而不同的是小鼠SAP是一种急性反应期蛋白，在受到炎症刺激物的刺激时其浓度能得到显著性上调，随着刺激物的消失浓度恢复至正常水平(10～50 mg/L)[13]。人体的SAP却不会因为炎症刺激而上调，取而代之的是另外一种正五聚蛋白C反应蛋白(CRP)，原因尚不明确。有研究发现在人的粥样斑块中SAP蛋白特异性的结合ApoC-Ⅱ淀粉样纤维[14]，但是尽管AS斑块中广泛存在淀粉样纤维，关于它对动脉样硬化的作用现在仍不明确。而我们的研究结果表明SAP缺失的ApoE$^{-/-}$小鼠高密度脂蛋白水平显著上调，并明显抑制了动脉粥样硬化的形成。这种抑制作用与高密度脂蛋白上调有关。据报道高密度脂蛋白容易被吞噬细胞吞噬并在一些蛋白水解酶的作用下被水解[15-16]，而SAP能够作为调理素调节这些吞噬过程，而且能够以钙离子依耐性的方式结合高密度脂蛋白(HDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)，由此我们推测SAP的缺失可能使SAP失去对高密度脂蛋白的调节吞噬作用从而发挥抑制动脉粥样硬化的作用。其分子机制有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Song Z, Cai L, Guo L, *et al*. Accumulation and expression of serum amyloid P component in human atherosclerotic lesions[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(1): 90-95.

[2] Jenny N S, Arnold A M, Kuller L H, *et al*. Serum amyloid P and cardiovascular disease in older men and women: results from the Cardiovascular Health Study [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(2): 352-358.

[3] Koenig W. Serum amyloid P component and cardiovascular disease: is

there a sensible link ? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(4): 698 - 700.
[4] de-Haas C J, Poppelier M J, van-Kessel K P, *et al*. Serum amyloid P component prevents high-density lipoprotein-mediated neutralization of lipopolysaccharide [J]. Infect Immun, 2000, 68(9): 4954 - 4960.
[5] Elahi M M, Cagampang F R, Anthony F W, *et al*. Statin treatment in hypercholesterolemic pregnant mice reduces cardiovascular risk factors in their offspring[J]. Hypertension, 2008, 51(4): 939 - 944.
[6] Soma M, Tamaoki T, Kawano H, *et al*. Mice lacking serum amyloid P component do not necessarily develop severe autoimmune disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286 (1): 200 - 205.
[7] Rudolph T K, Rudolph V, Edreira M M, *et al*. Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30 (5): 938 - 945.
[8] Saely C H, Drexel H, Sourij H, *et al*. Key role of postchallenge hyperglycemia for the presence and extent of coronary atherosclerosis: an angiographic study [J]. Atherosclerosis, 2008, 199(2): 317 - 322.
[9] Devaraj S, Rogers J, Jialal I. Statins and biomarkers of inflammation [J]. Curr Atheroscler Rep, 2007, 9(1): 33 - 41.
[10] Meurs I, Van-Eck M, Van-Berkel T J. High-density lipoprotein: key molecule in cholesterol efflux and the prevention of atherosclerosis [J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(13): 1445 - 1467.
[11] Wang Y, Guo Y, Wang X, *et al*. Human serum amyloid P functions as a negative regulator of the innate and adaptive immune responses to DNA vaccines [J]. J Immunol, 2011, 186(5): 2860 - 2870.
[12] Bharadwaj D, Mold C, Markham E, *et al*. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis [J]. J Immunol, 2001, 166(11): 6735 - 6741.
[13] Tennent G A, Dziadzio M, Triantafillidou E, *et al*. Normal circulating serum amyloid P component concentration in systemic sclerosis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(6): 2013 - 2017.
[14] Stewart C R, Haw A 3rd, Lopez R, *et al*. Serum amyloid P colocalizes with apolipoproteins in human atheroma: functional implications [J]. J Lipid Res, 2007, 48(10): 2162 - 2171.
[15] Lee-Rueckert M, Kovanen P T. Mast cell proteases: physiological tools to study functional significance of high density lipoproteins in the initiation of reverse cholesterol transport [J]. Atherosclerosis, 2006, 189 (1): 8 - 18.
[16] Judstrom I, Jukkola H, Metso J, *et al*. Mast cell-dependent proteolytic modification of HDL particles during anaphylactic shock in the mouse reduces their ability to induce cholesterol efflux from macrophage foam cells *ex vivo* [J]. Atherosclerosis, 2010, 208(1): 148 - 154.

(**收稿**:2011-10-18;**修回**:2011-12-28)
(编辑 栾 嘉)

(上接 718 页)

2 讨论

本例肿瘤位于段支气管,向管腔内生长,未穿透管腔,其肿瘤大小为 1.5 cm,根据国际肺癌分期,T 分期为 T1a(Superficial spreading tumor of any size but confined to the wall of the trachea or mainstem bronchus is classified as T1)[1]。本例属少见的、特殊类型的 T1a 期肺癌,不同于既往的肺叶外周小结节。那么位于支气管腔内的肺癌,即使是包块(大于 3 cm),并且侵及支气管壁,仍然是 T1 期肿瘤(我们称之为 S 肿瘤)。而肺癌分期的意义在于指导临床手术的方式或者帮助临床医生判断患者的 5 年生存率[2],S 肿瘤适合行支气管袖式切除,而不同于常规意义上外周型肺癌的手术方式。但是 S 肿瘤与 T1 期外周型肺癌术后的 5 年生存率一致吗,它们之间有没有统计学的差异,值得我们去进一步研究证实。

支气管起源的肿瘤有良性肿瘤(如支气管乳头状瘤、炎性假瘤、支气管内血管瘤、平滑肌瘤等)和恶性肿瘤(如黏液表皮样癌、支气管腺样囊性癌、支气管癌等)。对于恶性支气管肿瘤不能手术患者的治疗方案,有经纤维支气管镜介入治疗气管腺样囊性癌[3],氩气刀联合二氧化碳冷冻治疗等,对改善患者呼吸窘迫、提高生存质量具有重要意义。对于能够明确的支气管恶性肿瘤,仍是以外科手术为主的综合治疗。我们常见的起源于支气管黏膜的肺癌,其病理特征为在肺内形成肿块(以肺门区多见)并合并不同程度的支气管堵塞,所以通过影像学检查,诊断并不困难。而即使是肿块尚较小的时候,中心型肺癌易阻塞管腔,临床以阻塞性肺炎为主要表现(是由于支气管或腔内肿瘤影响支气管引流引起的继发性感染,在相应的肺段或叶内表现为肺炎),依然能够通过 CT 影像学显示的支气管壁增厚、支气管狭窄与阻断等改变达到诊断的目的。本病例的肺癌位于尖后段支气管腔内,沿着管壁生长,管腔无阻塞,无阻塞性肺炎的表现,如斑片及条索状阴影,亦无肺门区的块影,所以胸部 CT 未发现肿瘤。但患者有不能解释的反复的咳嗽、咯血及痰中带血,进一步的纤支镜检查证实了肿瘤的存在。但是如果癌肿的位置位于段支气管以下的管腔更小的各级细支气管时,纤支镜由于管径及操作的限制,难以到达病变部位,诊断困难。

所以,对于难治性、经久不愈的呼吸道症状,我们应当引起重视。在常规的 X 线片、CT 及增强 CT 检查仍不能明确病变时,需行进一步的纤支镜检查(包括刷片、活检、细胞学等),甚至是薄层扫描。这就需要我们进一步提高临床能力,加强实验室诊断技术,甚至是通过细胞、蛋白、基因层面的研究,来提高肺癌的早期诊断率。

参考文献:

[1] Detterbeck F C, Boffa D J, Tanoue L T. The new lung cancer staging system[J]. Chest, 2009, 136(1): 260 - 271.
[2] Boffa D J. The revised stage classification system for primary lung cancer[J]. Clin Chest Med, 2011, 32(4): 741 - 748.
[3] 商艳, 李强, 白冲, 等. 纤维支气管镜介入技术在气管腺样囊性癌治疗中的应用[J]. 中国实用内科杂志,2006,26(1): 41 - 42.

(**收稿**:2011-12-26;**修回**:2012-03-06)
(编辑 栾 嘉)