doi:10.11659/jjssx.08E016067

普罗布考对动脉硬化闭塞症兔体内炎症反应的影响

高真生,刘国利,李 博,杨春宁,李 岩 (沈阳医学院附属第二医院血管外科,辽宁 沈阳 110023)

[摘 要] **目的** 探讨普罗布考对动脉硬化闭塞症兔体内炎症反应的影响。**方法** 采用右股动脉不全结扎在SPF级雄性健康新西兰白兔上建立动脉粥样硬化闭塞症动物模型。将模型兔分为实验组和对照组,其中实验组兔子采用普罗布考治疗。治疗4周后,采用HE染色评价各组兔股动脉血管的损伤程度;采用ELISA检测血浆中IL-1、IL-6、TNF-α及CRP水平;采用realtime PCR方法分析各组股动脉血管的IL-1、TNF-α的mRNA表达量;采用Western blot检测各组股动脉血管中NF-κB的核积累量及IκB磷酸化水平。**结果** 实验组兔股动脉血管的损伤程度相比于对照组得到显著改善;实验组兔血清中IL-1、IL-6、TNF-α及CRP水平显著低于对照组;实验组兔股动脉血管中IL-1、TNF-α的mRNA表达水平、NF-κB的核积累量及IκB磷酸化水平显著低于对照组。**结论** 普罗布考能够显著改善动脉硬化闭塞症兔体内的炎症反应。

[关键词] 普罗布考;动脉硬化闭塞症;动脉粥样硬化;炎症反应;周围血管疾病
[中图分类号] R34;R91;R363 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-08-22

Effect of probucol on inflammatory response in rabbits with arteriosclerosis obliterans

GAO Zhen-sheng, LIU Guo-li, LI Bo, YANG Chun-ning, LI Yan (Department of Vascular Surgery, Second Afflilated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang Liaoning 110023, China)

Abstract: Objective To explore the effect of probucol on the inflammatory response in rabbits with arteriosclerosis obliterans. **Methods** SPF male new zealand white rabbits were subjected to incomplete right femoral artery ligation model of arteriosclerosis obliterans. The model rabbits were divided into experimental group and control group. The rabbits in experimental group were treated by probucol. After treatment for 4 weeks, HE staining was used to evaluate the injury severity of right femoral artery in rabbits; ELISA was used to measure the levels of IL-1, IL-6, TNF-α and CRP; Realtime PCR was used to measure the expressions of IL-1, TNF-α in right femoral artery; Western blot was used to measured the nucleus accumulations of NF-κB, and the phosphorylation of IκB. **Results** Compared with control group, the degree of pathological injury of right femoral artery was significantly atteunated, the levels of IL-1、IL-6、TNF-α and CRP in plasma, the mRNA expressions of IL-1、TNF-α and the nucleus accumulations of NF-κB, and the phosphorylation of IκB in right femoral artery decreased significantly. **Conclusion** Probucol attenuates the inflammatory response in rabbits with arteriosclerosis obliterans significantly.

Keywords: probucol; arteriosclerosis obliterans; atherosclerosis; inflammatory response; peripheral vascular disease

动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)是一种由于动脉粥样硬化病变引起的周围血管疾病[1]。ASO始于动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),是一种比较难治的周围血管疾病。AS患者由于斑块的存在,导致血管血流变小,血小板发生堆积,进而引起动脉血管变窄、血管壁弹性降低,最终能够导致动脉血管发生闭塞,严重时甚至会出现继发性血栓及下肢坏疽等临床症状[2-3]。ASO作为一种常见的周围血管疾病,常发生于中老年人群,近些年发病率逐年增加,且因其复杂难治、治疗费用昂贵,严重影响患者的生活质量[4]。尽管ASO的具体发病机制尚未完全明确,但有研究认为慢性炎症是ASO发生的一个重要原因[5-6],当血管内皮细胞受到损伤时,单核细胞会大量聚集在损伤部位,激活一系列级联反应,最终导致动脉粥样硬化斑块的形成[7-9]。因此,对于ASO的治疗,抑制机体内的炎症反应十分重要。目前,ASO治疗主要是通过使用促进血液循环的药物以及手术治疗。普罗布考是一种常用药物,具有良好的抗动脉粥样硬化作用,其能抗氧化应激,降低OX-LDL水平,并可抑制多种炎性因子分泌,下调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)水平,抑制泡沫细胞形成,阻止斑块的破裂以及心脑血管事件发生。本研究采用手术建立ASO动物模型,探究普罗布考治疗对ASO动物体内炎症反应的影响,进而探讨其治疗ASO的机制,为普罗布考治疗ASO的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性清洁级健康新西兰白兔20只,体质量2.5~3.5 kg,置于长方形兔笼中,室温下(23~25 ℃)饲养,进食标准饲料。

1.2 模型制备及治疗

参照文献[10]中模型建立方法,采用3 mL/kg水合氯醛腹腔麻醉各组兔子,于右侧腹股沟下搏动处暴露股动脉,于无血管分支处,7号手术线绕动脉轻轻结扎(实验过程不拆线),注意不要完全结扎,缝合切口,禁食1 d,之后喂食高脂饲料,持续饲养结扎12周[10]。在第13周将结扎兔随机分成实验组和对照组,每组10只,2组兔均开始喂食普通饲料。实验组采用灌胃服用普罗布考,剂量200 mg/kg,每天1次,治疗2周。2周后麻醉处死兔子,分别采集兔血浆,离心取血清;剥离获取兔子右股动脉血管,部分置入4%多聚甲醛中固定,剩余置于液氮中冷藏保存。

1.3 血管HE染色

普罗布考治疗2周后,麻醉处死兔子,剥离获取右股动脉血管(共结扎14周),部分血管置入4%多聚甲醛中固定,然后脱水、石蜡包埋、切片、伊红美蓝染色,在光学显微镜下察血管病理损伤程度。

1.4 血清指标检测

采用酶联免疫分析法(ELISA)检测实验组和对照组血清中白细胞介素1β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、C反应蛋白(CRP)含量;兔IL-1、IL-6、TNF-α和CRP ELISA检测试剂盒购于R&D公司,实验操作均按购买试剂盒的说明书操作。

1.5 血管组织炎症因子表达水平

将冷冻兔股动脉血管组织研磨,采用Trizol法提取皮肤组织的总RNA,以总RNA为模板,Oligo(dT)18为引物反转录合成cDNA,选用在皮肤组织中稳定表达的β-actin作为内参,利用real-time PCR测定2组兔股动脉血管组织中IL-1β、TNF-α mRNA表达水平,IL-1β上游引物:5'-CCGCCAGATCGTCACCACG-3',下游引物:5'-TCTGAGCTACAGACCGAAG-3';TNF-α上游引物:5'-AAGTCCTTCCTACCCCTGCA-3',下游引物:5'-TACGGATCCTTAGGGCTGTA-3';β-actin上游引物:5'- ACATCTGCTGAAGGTGGAC-3',下游引物:5'-GGTACCACCATACCAGG-3'。将冷冻兔股动脉血管组织研磨,采用RIPA裂解液裂解细胞,采用细胞总蛋白提取试剂盒和细胞核蛋白提取试剂盒提取总蛋白和核蛋白,试剂盒均购于碧云天生物技术有限公司,采用Western blot检测兔股动脉血管组织中NF-κB的核积累量及IκB磷酸化水平。兔IκB和p-IκB抗体购于Cell Signaling Technology公司;兔NF-κB抗体、兔Lamin B抗体购于Affinity公司。

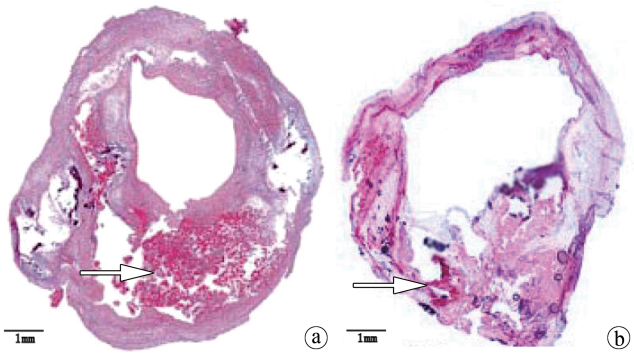
1.6 数据处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 普罗布考对股动脉血管病理损伤的影响

如图1所示,实验组兔子血管的闭塞程度相比于对照组得到显著改善(切片中央空白区即为血管空腔),且实验组血管壁炎性细胞浸润相比于对照组得到显著改善。

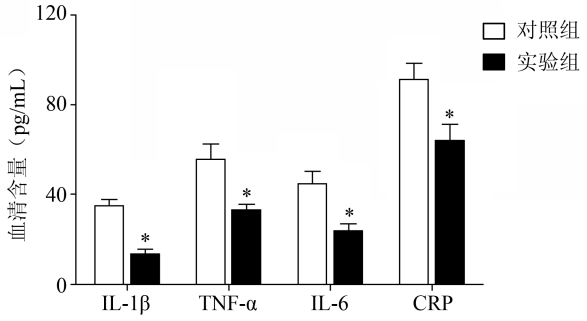


a:对照组;b:实验组 箭头(→):炎性侵润区域

图1 动脉血管HE染色切片

2.2 2组兔子血浆中IL-1β、IL-6、TNF-α及CRP水平

ELISA检测结果表明,与对照组比较,实验组兔子血浆中IL-1β、IL-6、TNF-α及CRP水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图2。



*:与对照组比较,$P<0.05$

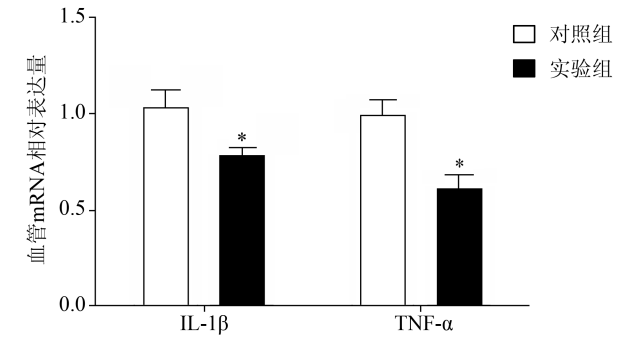
图2 2组血浆中IL-1β、IL-6、TNF-α及CRP水平比较

2.3 2组兔子血管中IL-1β、TNF-α mRNA表达水平的比较

Realtime PCR结果表明,与对照组比较,实验组股动脉血管中IL-1、TNF-α mRNA表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3。

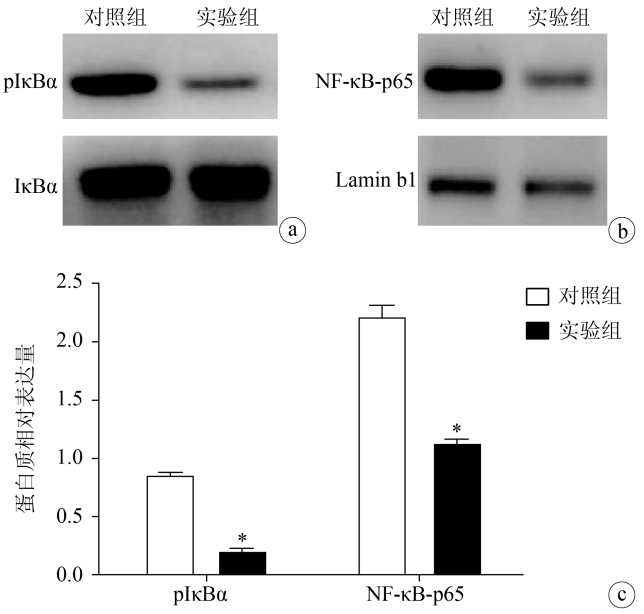
2.4 2组兔子血管中IκBα磷酸化水平及NF-κB的核积累量比较

Western blot结果显示,实验组IκBα磷酸化水平以及NF-κB-p65的核积累量相比于对照组显著减少($P<0.05$),见图4。



*:与对照组比较,$P<0.05$

图3 2组股动脉血管中 IL-1β、TNF-α mRNA 表达水平



a:IκBα 磷酸化水平;b:NF-κB 核积累量水平;c:pIκBα、NF-κB-p65 相对表达量比较 *:与对照组比较,$P<0.05$;

图4 2组股动脉血管中 IκBα 磷酸化水平及 NF-κB 的核积累量水平比较

3 讨论

ASO 是一种常见的慢性缺血性血管外科疾病,会严重影响患者的生活质量,探究新型有效的治疗 ASO 的新方法在临床上仍十分迫切。其中,采用手术结扎新西兰白兔的股动脉而建立 ASO 兔模型常被用来对 ASO 进行研究。该模型具有几个显著的特点:①具有较高的拟人性,研究表明该模型血管细胞增殖现象显著,内皮细胞脱落现象明显,弹力纤维破坏,平滑肌细胞和纤维细胞增殖活跃、泡沫细胞形成增多,中膜内层可见变形坏死灶[9],这些特征都与人类 ASO 发病过程高度相似;②具有较高的可重复性;③模型制备周期短;④血管直径适中,适宜后续研究;⑤简便经济,该方法取材便宜方便,手术简便[11-12]。基于手术建立 ASO 模型兔具有的这些特征,本研究选择手术方法建立 ASO 模型兔,并在该模型上探究普罗布考对 ASO 的治疗效果。

关于动脉硬化闭塞症发病机制有多个学说,包括脂质浸润学说、平滑肌细胞增殖和克隆学说、内皮损伤反应学说、血栓形成学说、炎症反应学说[13-14]。其中炎症反应学说近些年被广泛证实。炎症反应学说是由 Ross 提出的在内皮损伤学说的基础上发展而来,该学说指出动脉粥样硬化过程实际是一种慢性炎症的过程,在该过程中单核细胞、T 淋巴细胞等会浸入血管内膜,其中单核细胞在血管内膜中转化为巨噬细胞,巨噬细胞进一步变成泡沫细胞,最终逐渐发展成为动脉粥样硬化,在动脉粥样硬化的基础上进一步发展成为动脉硬化闭塞症[14-15]。

炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的复杂的防御反应,症状表现为局部的红肿热痛,病理检查可发现有大量炎性细胞如巨噬细胞、粒细胞的局部浸润和组织坏死,其中心环节是血管反应[16]。研究表明,动脉硬化闭塞症患者体内炎症水平显著升高[15]。其原因是机体受到异常刺激如血脂过高,能够导致血管内皮细胞受到损伤,损伤的内皮细胞释放大量的炎性因子,进一步激活血管中单核细胞及淋巴细胞,激活的淋巴细胞侵入血管内膜,启动炎症连锁级联反应,最终引发广泛的血管内炎症[17-18]。研究表明,机体内一些因子如细胞因子 IL-1、IL-6、TNF-α 和 CRP 水平能够反应机体内炎症水平[19]。NF-κB 是一种快反应转录因子,普遍存在于细胞浆中,与 NF-κB 的抑制性蛋白 IκB 结合而呈非活性状态[20-21]。研究显示,其受多种刺激物,如 TNF-α、IL-1、蛋白激酶 C 激活剂、有丝分裂原、氧化应激、细菌、病毒、免疫刺激剂等激活[22-23]。激活的 NF-κB 与 IκB 解离后入核与靶基因启动子/增强子上的 NF-κB 位点结合,从而调控许多靶基因的表达,因此被誉为控制早期基因表达的基因开关,虽然炎症反应包括众多分子参与,但是 NF-κB 在炎症反应中处在中心地位[24-25]。普罗布考是一种常见的治疗动脉硬化闭塞症的药物,研究发现联合应用普罗布考和阿托伐他汀组较单独服用阿托伐他汀组,急性脑梗死患者颈动脉内中膜厚度(IMT 值)及斑块面积均下降,斑块数量减少;此外,普罗布考和瑞舒伐他汀两种药物联合使用较单独使用瑞舒伐他汀能更有效地缩小高脂血症患者颈动脉斑块面积,降低炎性因子 IL-6、TNF-α 水平[26-27]。本研究结果证实,经过普罗布考治疗后模型兔的血管闭塞程度以及血管壁炎性细胞浸润程度得到了显著改善,兔血清中 IL-1、IL-6、TNF-α、CRP 水平著降低。此外,治疗组血管壁 IL-1、

TNF-α mRNA 表达水平以及 IκB 磷酸化水平、NF-κB 核积累量也较模型组显著降低。因此我们认为,普罗布考治疗能够显著改善动脉硬化闭塞症兔血管的闭塞程度,显著降低动脉硬化闭塞症图血管内的炎症水平,并且其可能与使 IκB 磷酸化水平降低,减少 NF-κB 的核积累量有关。

[参考文献]

[1] 邱大勇,杨小军. 前列地尔在下肢动脉硬化闭塞症治疗中的应用探讨[J]. 中国药物与临床,2014(12):1707 - 1708. doi:10.11655/zgywyle.2014.12.041.

[2] Aronow WS. Office management of peripheral arterial disease[J]. Am J Med,2010,123(9):790 - 792. doi:10.1016/j.amjmed.2010.03.017.

[3] 张金保,张艳军,崔广智,等. 动脉粥样硬化斑块内新生血管与斑块稳定性的研究进展[J]. 中国药理学通报,2011,27(7):901 - 903. doi:10.3969/j.issn.1001 - 1978.2011.07.004.

[4] 卫爱英. 活脉散治疗血瘀型动脉硬化闭塞症的临床研究[D]. 太原:山西中医学院, 2015.

[5] Ketha SS,Cooper LT. The role of autoimmunity in thromboangiitis obliterans(Buerger's disease)[J]. Ann N Y Acad Sci,2013,1285(1):15 - 25. doi:10.1285/anyas.2013.10.037.

[6] 曹 乾,任 丽,李晓东. 胰岛素抵抗下脂蛋白相关磷脂酶 A2 介导的炎症因子的表达与动脉硬化关系[J]. 山西医药杂志,2011,40(3):225 - 229. doi:10.3969/j.issn.0253 - 9926.2011.03.004.

[7] 马瑞爽,司 宇,吴晓明,等. 微粒在动脉粥样硬化形成及凝血异常中的作用[J]. 现代生物医学进展,2015,15(11):2198 - 2200. doi:10.3321/j.issn;2198 - 2200.2015.01.015.

[8] Paresh Dandona. 炎症、动脉粥样硬化与胰岛素[J]. 国际内分泌代谢杂志,2005,25(3):192 - 193.

[9] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis,and vascular biology,2012,32(9):2045 - 2051. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705.

[10] 陈凯伟,钱月慧,黄 鑫,等. 清脉饮及其拆方对动脉硬化闭塞症兔主动脉 IκB 及 NF-κB mRNA 表达的影响[J]. 宁夏医科大学学报,2014,36(7):720 - 724.

[11] 王春喜,蔡相军,梁发启,等. 髂股动脉粥样硬化闭塞症家兔模型的制作[J]. 中华实验外科杂志,2000,17(3):259 - 260. doi:10.3760/j.issn;1001 - 9030.2000.03.031.

[12] Murphy TP,Dorfman GS,Esparza AR,et al. Arteriosclerosis obliterans in a rabbit model[J]. Invest Radiol,1992,27(12):1059 - 1063.

[13] Li JJ,Fang CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases[J]. Medical hypotheses,2004,62(4):499 - 506. doi:10.1016/j.mehy.2003.12.014.

[14] 谭建峰. 动脉硬化闭塞症炎症细胞因子的变化规律与中医证型的相关性研究[D]. 济南:山东中医药大学,2009.

[15] Libby P,Okamoto Y,Rocha VZ,et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice[J]. Circ J,2010,74(2):213 - 220. doi:org/10.1253/circj.CJ - 09 - 0706.

[16] 吴 彧,孙 琳,黄彦生,等. 氧化应激与炎症在动脉粥样硬化发生发展中的作用及相关治疗药物研究[J]. 中国实用神经疾病杂志,2014(21):127 - 129. doi:10.3969/j.issn.1673 - 5110.2014.21.086.

[17] Xiao XG,Zu HG,Li QG,et al. Sivelestat sodium hydrate attenuates acute lung injury by decreasing systemic inflammation in a rat model of severe burns[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2016,20(3):528 - 536. doi:10.3109/00016357.2011.645067.

[18] Alexy T,Pais E,Wenby RB,et al. Abnormal blood rheology and chronic low grade inflammation:possible risk factors for accelerated atherosclerosis and coronary artery disease in Lewis negative subjects[J]. Atherosclerosis,2015,239(1):248 - 251. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.015.

[19] Cortez M,Carmo LS,Rogero MM,et al. A high-fat diet increases IL-1,IL-6,and TNF-α production by increasing NF-κB and attenuating PPAR-γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Inflammation,2013,36(2):379 - 386. doi:10.1007/s10753 - 012 - 9557 - z.

[20] 朱欣佚,奚肇庆,张文曦. 复方薤白胶囊抗内皮细胞凋亡与信号转导通路的研究[J]. 南京中医药大学学报,2010,26(5):359 - 361. doi:10.3969/j.issn.1000 - 5005.2010.05.014.

[21] 许 琰. 一种新型抗炎多肽的应用研究[D]. 上海:上海交通大学,2014.

[22] 胡映秋,史子敏,鲁雄兵. NF-κB 在泌尿系肿瘤中的研究进展[J]. 实用医学杂志,2011,27(22):4162 - 4163. doi:10.3969/j.issn.1006 - 5725.2011.22.074.

[23] 陈立敏,吕秋军,曹颖林. 基于报告基因和 NF-κB 信号通路的抗阿尔茨海默病药物细胞筛选模型的建立与应用[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(10):639 - 643. doi:10.3969/j.issn.1673 - 8683.2012.11.008.

[24] 汪秀华,杨雪莲,蒋绿芝. 短期胰岛素强化治疗对 2 型糖尿病患者血清 MCP-1 的影响[J]. 实用糖尿病杂志,2011,7(6):54 - 55. doi:10.3969/j.issn.1673 - 8225.2009.20.023.

[25] 薛建军,呼荟茹,齐兵献,等. 参附注射液对心肌缺血再灌注老年大鼠 NF-κB 及 IκB-α 表达的影响[J]. 西部中医药,2013,26(2):18 - 21. doi:10.3980/j.issn.1672 - 5123.2013.07.13.

[26] 李 鹏,梁丽贞. 普罗布考和阿托伐他汀联合治疗颈动脉粥样硬化斑块的临床观察[J]. 心脑血管病防治,2009,9(1):47 - 49. doi:10.3969/j.issn.1009 - 816X.2009.01.021.

[27] Wang T,Li C,Deng W,et al. Influence of Atorvastatin/Probucol combination on blood lipid and serum C-Reactive Protein levels in patients with cerebral infarction[J]. Tropic J Pharm Res,2015,14(12):2313 - 2317. doi:org/10.4314/tjpr.v14i12.23.

(编辑:刘 艺)