基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0227-04

茶多酚对兔动脉粥样斑块中免疫因素的影响

李鸿飞,张晓刚,任玉华
(重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过建立动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)兔模型探讨茶多酚(Tea polyphenols,TP)具有的免疫调节作用对动脉粥样斑块中 IgG、IgM 型免疫复合物(Immune complex,IC)、巨噬细胞(Microphage,Mφ)等免疫因素的影响。方法:将 40 只纯种新西兰大白兔随机分为正常对照组(NC)、动脉粥样硬化模型对照组(ASC)、低剂量 TP 组(LTP)、高剂量 TP 组(HTP)及辛伐他汀组(Sim),共喂养 12 周。苏木精伊红(HE)染色、免疫组化染色分析 AS 斑块病变程度、IgG 及 IgM 型 IC 的沉积、Mφ 的浸润,以及 TP 干预对此过程的影响。结果:模型在高脂饲料喂养 12 周后形成明显的 AS 斑块,IgG 型 IC 在斑块中大量沉积,主要沉积在斑块的脂质核心及斑块肩部,而 IgM 型 IC 在斑块中沉积不明显,Mφ 在斑块内亦大量浸润。IgG 及 Mφ 的表达在 ASC 组明显高于其他组($P<0.05$),高、低剂量 TP 能抑制 IgG 及 Mφ 在斑块内表达,高剂量 TP 较低剂量 TP 抑制程度更大($P<0.05$),与辛伐他汀的抑制程度相似。结论:AS 斑块内存在以 IgG 为主的 IC,它与 AS 的发生发展密切相关,茶多酚能通过其免疫调节作用抑制 IC 及 Mφ 在斑块内的表达,并具有一定的量效关系。

【关键词】动脉粥样硬化;免疫;茶多酚
【中国图书分类法分类号】R543.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-20

Effect of tea polyphenols on the immune factors in the atherosclerotic plaque lesion in rabbits

Li Hong-fei, et al
(*Department of Cardioloy, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstact】*Objective*: To evaluate the effect on immunomodulation of tea polyphenols(TP), and to study the influence of tea polyphenols on the immune factor in the atherosclerotic plaque lesion in rabbits. *Methods*: Forty male true-bred New Zealand rabbits were randomly divided into five groups: normal control group(NC), atherosclerosis model control group(ASC), low dose of TP group (LTP), high dose of TP group (HTP) and simvastatin group (Sim). The structural change of artery, the deposit of IgG and IgM and the infiltration of macrophage in plaque lesions of AS were analyzed by hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry. *Results*: Plaque lesions of AS were obvious after 12-week high-cholestrol feeding. The IC of IgG accumulated in plaque lesions, while the IC of IgM was not detected. The IC of IgG mainly localized in the core and the shoulder of mature plaque lesions and macrophage were greatly infiltrated in the plaque lesions. In comparison with other groups, the expression of IgG and macrophage in the plaque lesions were stronger in atherosclerosis model group($P<0.05$). High and low dose of TP could depress the expression of IgG and macrophage in the plaque lesions. The depressing amplitude in HTP group was more than that in LTP group($P<0.05$), but there was no difference between HTP group and Sim group. *Conclusion*: The IC of IgG and the macrophage exist in the plaque lesions of AS. The IC and the macrophage are closely related to the origin and progress of AS. The tea polyphenols can inhibit the formation of IC and depress the expression of macrophage in the plaque lesions through its effect on immunomodulation, and to some degree, the effect has dose-effect relationship.

【Key words】Atherosclerosis; Immune; Tea polyphenols

目前研究发现,动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)与免疫系统异常,尤其是自身免疫反应有密切联系[1]。茶多酚(Tea polyphenols,TP)是从茶叶中分离提取的多酚类化合物的复合体,很多研究已经证实 TP 可以通过抗氧化、调脂及抗炎等作用抗 AS[2]。新的研究发现,TP 还具有免疫调节的作用,其作用机制包括清除机体自由基、影响淋巴细胞的转化和增殖、影响细胞因子的分泌及抗体水平等[3]。本研究通过建立 AS 兔模型探讨 TP 具有的免疫调节作用对动脉粥样斑块中 IgG、IgM 型免疫复合物(Immune complex,IC)及巨噬细胞(Microphage,Mφ)等免疫因素的影响。

作者介绍:李鸿飞(1980-),男,硕士,
研究方向:动脉粥样硬化的防治。
通讯作者:张晓刚,男,教授,E-mail:zxg0233@sina.com。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

高脂饲料(胆固醇 1%、猪油 5%、普通饲料 84%混合配制,由重庆医科大学动物实验中心提供);茶多酚(TP)(纯度达 99.4%,由浙江大学茶学系提供);辛伐他汀片(即舒降之,由默沙东公司提供);山羊抗兔 IgG 抗体(武汉博士德公司);生物素化小鼠抗兔 IgM 抗体(北京 SINOPCR 公司);单克隆小鼠抗兔巨噬细胞抗体(美国 DAKO 公司);生物素标记山羊抗小鼠 IgG 抗体及 DAB 显色剂(北京中杉金桥生物公司);摄像系统(Olympus)。

1.2 模型制作及分组

纯种雄性新西兰大白兔 40 只,体重约(2.0 ± 0.2) kg,普通饲料适应性喂养 1 周后,随机分为 5 组:正常对照组(普通饲料)、AS 模型对照组(高脂饲料)、低剂量 TP 组(高脂饲料+低剂量 TP)、高剂量 TP 组(高脂饲料+高剂量 TP)、辛伐他汀组(高脂饲料+辛伐他汀),每组 8 只。所有动物均自由饮水,低剂量 TP 给药剂量为 0.2 g/(kg·d)[11],高剂量 TP 给药剂量为 0.8 g/(kg·d),辛伐他汀给药剂量为 2 mg/(kg·d)。单笼喂养,共喂养 12 周。

1.3 标本收集

于喂养第 12 周末,动物禁食 12 h,用速眠新 0.2 ml/kg 肌肉注射将兔麻醉,无菌操作剖开胸腹腔,并快速钝性剥离胸主动脉,切取降主动脉近主动脉弓部分,去除外膜脂质,常规石蜡包埋。

1.4 研究方法

1.4.1 苏木精 - 伊红(HE)染色 常规病理切片、染色。

1.4.2 免疫组化 采用 SABC 法测定斑块内 IgG 及 IgM 型 IC,采用 SP 法测定斑块内 Mφ,实验过程按试剂盒说明书进行。

1.5 结果处理

所有病理切片在显微镜下数码照相后保存,用 Image-Pro Plus 图像分析软件进行定量分析。HE 染色以内膜厚度、内膜/中膜厚度比来表示。免疫组化每个标本选取 3 张片子,每张片子有斑块视野随机选取 4 个视野,利用分析软件将图像以 20 × 物镜输入,终端显示器显示,设定窗口面积为 744 × 528(像素),以 BMP 格式输入,进行面密度及平均光密度分析。平均光密度越高说明免疫组化信号越强,面密度越大表明阳性目标面积越大,相应的阳性细胞数越多。

1.6 统计学分析

计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据统计采用 SPSS10.0 软件,组间比较采用 t 检验,两变量间用两变量的相关性分析,$P<0.05$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 血管的 HE 染色

NC 组血管壁层次清楚,内膜清晰。AS 模型组可见血管内膜侧有明显向管腔内突出的斑块组织,内含丰富的脂质空泡,聚集大量的炎性细胞。内膜肿胀增厚,与中膜平滑肌分界模糊,并有炎性细胞浸润,甚至平滑肌层出现瘤样斑块组织。高、低剂量 TP 组及 Sim 组斑块面积较 AS 模型组小,炎性细胞侵润轻。利用图像分析软件测量斑块内膜 / 中膜厚度比(I/M)示:AS 模型组血管内膜厚度较 NC 组明显增厚,I/M 亦显著高于其他各组,差异有统计学意义($P<0.05$);高、低剂量 TP 可减轻内膜厚度及 I/M,HTP 组较 LTP 组减轻幅度更大,差异有统计学意义($P<0.05$),但 HTP 组与 Sim 组比较无明显差异($P>0.05$)。

2.2 免疫组化染色

2.2.1 IgG 型 IC 免疫组化染色 NC 组血管内膜中膜未见 IgG 型 IC,AS 模型组斑块基底部、核心及肩部均可见明显的特异性染色,高、低剂量 TP 组及 Sim 组的免疫染色局限于斑块内,斑块肩部沉积不明显,外膜侧的染色改变不明显。免疫组化染色经半定量分析示:AS 模型组与其他各组相比,IgG 的表达水平明显增高(平均光密度值及面密度值明显升高,$P<0.05$);HTP 组面密度值及平均光密度值较 LTP 组明显减低($P<0.05$),而与 Sim 组相似(见表 1、图 1)。

2.2.2 IgM 型 IC 免疫组化染色 AS 模型组斑块内可见散在的着色,其余各组标本血管中内膜免疫组化染色均不明显。免疫组化染色经半定量分析后组间比较无显著性统计学意义($P>0.05$)(见表 1)。

2.2.3 AS 斑块内 Mφ 浸润 RAM11 是兔 Mφ 胞浆的特异性抗原。NC 组主动脉壁无 RAM11 染色阳性细胞浸润,AS 模型组在斑块内可见大量胞浆 RAM11 染色阳性细胞,并有大量向中膜浸润。低剂量 TP 组血管内膜含有较多 RAM11 染色阳性细胞,并有少量向中膜浸润。高剂量 TP 组及 Sim 组含有少

表 1 血管壁内 IC 及巨噬细胞免疫组化染色结果($\bar{x} \pm s$)

分组	IgG 型 IC		IgM 型 IC		巨噬细胞	
	面密度	平均光密度	面密度	平均光密度	面密度	平均光密度
NC	0	0.21 ± 0.02	0	0.19 ± 0.01	0	0.19 ± 0.01
AS	0.55 ± 0.10[b]	0.36 ± 0.02[b]	0.01 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.58 ± 0.09[b]	0.34 ± 0.02[b]
LTP	0.24 ± 0.06[a]	0.31 ± 0.02[a]	0	0.21 ± 0.01	0.30 ± 0.04[a]	0.29 ± 0.01[a]
HTP	0.13 ± 0.04[ac]	0.28 ± 0.02[ac]	0	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.03[ac]	0.27 ± 0.01[ac]
Sim	0.11 ± 0.03[ac]	0.27 ± 0.01[ac]	0	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.03[ac]	0.26 ± 0.01[ac]

注:a:与 AS 组比较,$P<0.05$;b:与 NC 组比较,$P<0.05$;c:与 LTP 组比较,$P<0.05$

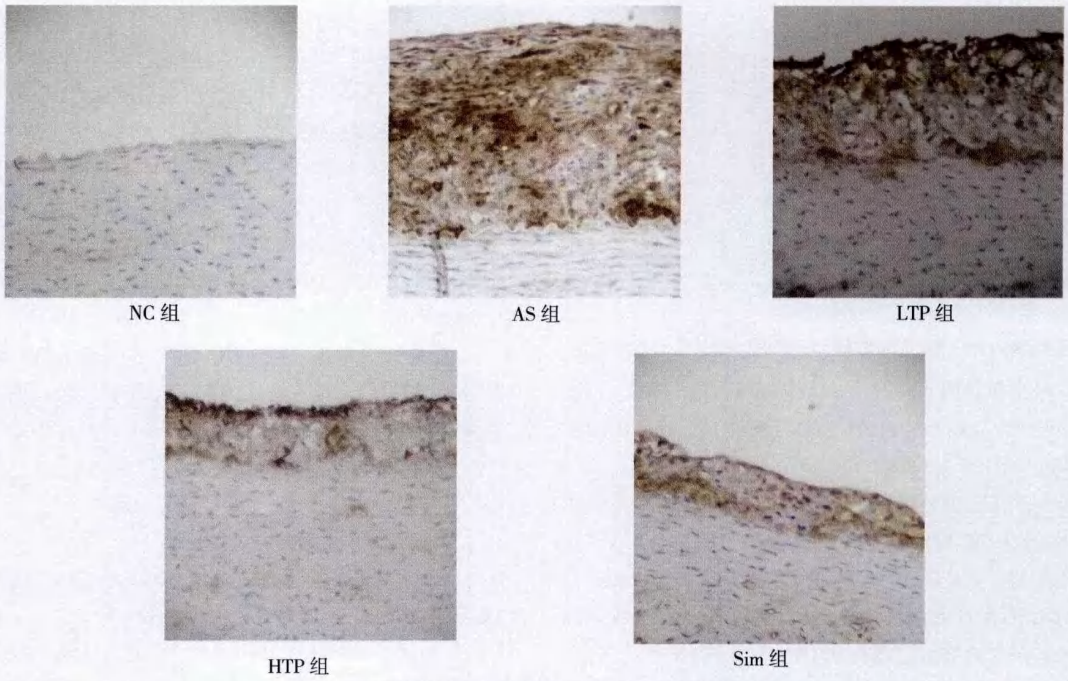


图 1 AS 斑块内 IgG 的表达（×200）免疫组化染色

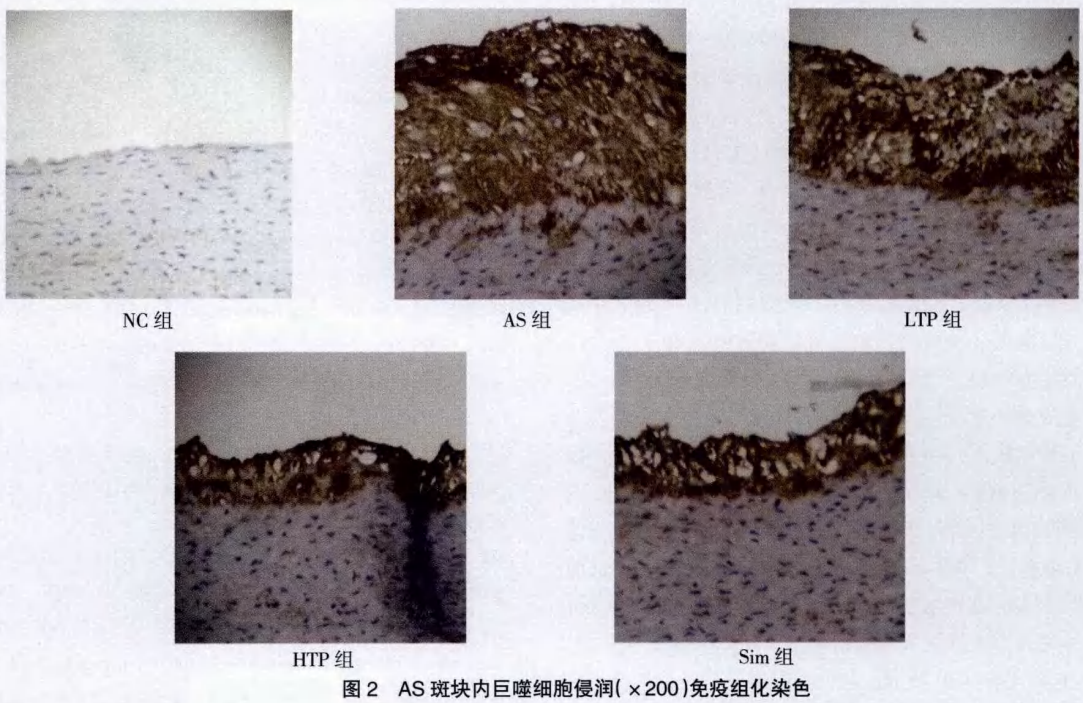


图 2 AS 斑块内巨噬细胞侵润（×200）免疫组化染色

量 RAM11 染色阳性细胞，未突破内弹力层向中膜浸润。免疫组化染色经半定量分析示：AS 模型组与其他各组相比，Mφ 的表达水平明显增高（平均光密度值及面密度值明显升高，$P<0.05$）；HTP 组面密度值及平均光密度值较 LTP 组明显减低（$P<0.05$），而与 Sim 组相似（见表 1、图 2）。

2.3 IgG 型 IC 与 Mφ 阳性表达率的相关性

将 IgG 型 IC 与 Mφ 的阳性表达率进行二者的相关性分析，$r=0.948$，差异有统计学意义（$P<0.05$）（见图 3）。

3 讨 论

有研究发现，多种自身抗体表达水平在 AS 患者及动物模型中显著升高，并且动脉粥样斑块内存在着抗体生成的细胞系统，即抗原呈递细胞（Mφ）及抗体生成细胞（B 淋巴细胞）。但自身免疫与 AS 究竟存在何种关系，目前研究结果并不一致，甚至相互矛盾。有人认为自身免疫反应可能参与了 AS 的全过程，甚至认为 AS 是一种自身免疫性疾病。部分研

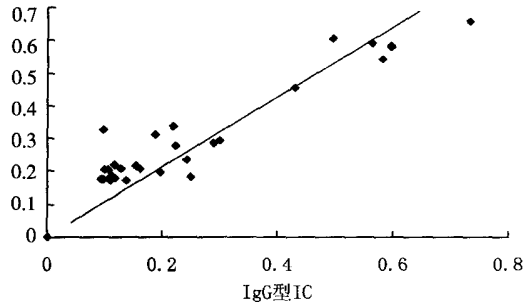


图 3 各组斑块内 IgG 型 IC 表达与 Mφ 表达的相关性分析散点图

究显示，自身抗体有利于 Mφ 对胆固醇的蓄积和 AS 的形成[4,5]。另有研究表明，自身抗体能够有效抑制泡沫细胞的形成，从而防止粥样斑块的发展[6]。

临床上一些自身免疫性疾病如 SLE、RA、APS 等常伴随 AS 的发生，这些患者体内抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗磷脂抗体等的滴度明显增高。这些自身抗体主要以 IgG 和 IgM 为主，它们本身有潜在的病理损伤作用，通过补体激活或是抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用介导内皮细胞的溶解[7]，秦俭等观察到兔在饲喂高脂饲料 1 周后即可见兔血管内皮依赖性舒张功能减退[8]。本实验观察了动脉粥样斑块中 IgG、IgM 型 IC 在斑块中的沉积，Mφ 在斑块中的浸润，以及 TP 干预对其的影响。结果表明，TP 能有效抑制斑块的进展，同时降低 IgG 型 IC 的沉积以及 Mφ 的浸润，并且存在一定的量效关系，一定剂量下能够达到与辛伐他汀相似的效果，但对 IgM 型 IC 影响不明显。我们分析其原因，可能包括：(1)免疫研究发现，IgM 型 IC 主要分布于外周，组织内分布较少，可能与其拥有的抗原结合片段(Fab)相对分子量及空间位阻效应较大而不利于其穿透组织有关。(2)研究表明，抗体进入粥样斑块部分可能是经动脉滋养血管由外膜途径进入的，而早期斑块内新生血管较少而影响大分子的 IgM 型抗体分布。(3)抗体的生成为一亚型转换过程，一般在抗原刺激后 1 周就开始产生 IgM 型抗体，3~4 周达峰值，而 IgG 型抗体在抗原刺激后 5~6 周才达峰值，此后再次免疫出现的抗体均以 IgG 为主，而早期沉积的 IgM 型 IC 则被 Mφ 清除。因本实验采集标本是在实验 12 周时，已过了 IgM 分泌的高峰期，因而此时不易检测出 IgM 在斑块中的表达。有研究表明，IgM 型抗体可能在外周血中发挥抗 AS 的作用[9]。

TP 能有效抑制 IC 及 Mφ 在斑块中的表达，其机制可能包括：(1)抑制抗原的产生：因各类脂蛋白经代谢、修饰后的产物是主要的自身抗原，其中以低密度脂蛋白 LDL 最为重要，脂蛋白本身具有的免疫原性很弱，但当其被氧化修饰后免疫原性明显增强，而且被 Mφ 吞噬的概率增加[10]。TP 已被证实有较强的抗氧化及调脂作用，它能够有效抑制血管内膜下过氧化物的生成来抑制 LDL 的氧化[11,12]，进而抑制斑块中氧化型低密度脂蛋白 oxLDL 自身抗原的生成。(2)抑制抗体的生成：TP 可通过减轻斑块内炎性反应，减少泡沫细胞生成过程中炎性因子的生成释放，抑制抗体生成所需各种炎性细胞在斑块内的聚集和相互作用，进而抑制抗体的生成。(3)本实验观察到，IgG 型 IC 与 Mφ 在斑块中的阳性表达率有较明显相关性。有研究显示，循环免疫复合物(CIC)由循环中弥散进入内膜，或由内膜局部形成的局部含 LDL 的 IC，可通过 Mφ 表面的 Fcr 受体和 LDL 受体以不受反馈调节的方式进入细胞内，使之转化为泡沫细胞，并激活多种功能。推测 TP 可能通过减少巨噬细胞在斑块内的侵润，可在某种程度上阻断抗原信息递呈及免疫细胞的激活，抑制抗体生成，从而抑制 IC 在斑块内的沉积。

TP 能通过其免疫调节作用在一定程度上抑制粥样斑块的发展，但自身免疫与 AS 究竟存在何种关系，目前研究结果并不一致，仍需要进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] Hansson G K. Immune mechanisms in atherosclerosis[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001,21(12):1876-1890.

[2] Chyu K Y,Babbidge S M, Zhao X N,et al. Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in aApolipoprotein E-null mice[J].Circulation,2004,109(20):2448-2453.

[3] 李 振,陈现伟.茶多酚的免疫调节作用及应用[J].中国兽药杂志,2004,38(4):33-35.

[4] Caligiuri G,Nicoletti A,Poirier B,et al. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholestemlemic mice[J]. J Clin Invest,2002,109(6):745-753.

[5] Wu R,Shoenfeld Y,Sherer Y,et al.Anti-idiotypes oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations:possible Immunomodulation of atherosclerosis[J].Autoimmunity,2003,36(2):91-97.

[6] Gabriel V,Maria F.Lipoprotein autoantibodies: measurement and significance[J]. Clinical and Diagnostic laboratory Immunology,2003,10(4):499-505.

[7] Yehuda S, Roberto G, Andrea D,et al.Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases[J].Circulation,2005,112(21):3337-3347.

[8] 秦 俭,陈运贞,周歧新,等.虎杖对高脂血症动脉粥样硬化兔NOS系统的在体干预[J].重庆医科大学学报,2005,30(4):501-504.

[9] Jarkko K,Markku P,Antero K Y,et al. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis[J].Circulation,2003,108(17):2107-2112.

[10] Yehuda S,Wu R H,Linda D. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective[J]?Circulation,2004,110(17):2552-2558.

[11] 张晓刚,陈运贞,雷 寒,等.茶多酚对实验性动脉粥样硬化兔脂蛋白脂酶、肝脂酶活性的影响及意义[J].中国病理生理杂志,2004,20(8):1476-1480.

[12] 赵秀兰,宫爱华,李建华,等.茶多酚抗动脉粥样硬化机制研究[J].中国公共卫生,2003,19(8):930-931.

（责任编辑：冉明会）