

CyPA 及 CD147 在动脉粥样硬化兔血管重构中的表达

张雁斌¹ 杜大勇² 李运田^{1,2} 柳 杨² 李桂明² 李沫言² 王新亮² 路怀志¹ 杨升华¹

摘要 目的 探讨亲环素 A (CyPA)/CD147 在动脉粥样硬化 (AS) 兔血管重构中的表达特点。方法 新西兰雄性白兔 32 只 (3 月龄) 随机分为对照组、模型组、液氮冻伤组、高脂饮食组 (每组 8 只)。0 周和 13 周分别检测兔血清 CD147 和 CyPA 表达水平。术后 13 周处死动物,取血管石蜡包埋切片,行 HE、弹力纤维染色,观察血管形态,并作巨噬细胞、CyPA、CD147 免疫组织化学染色。利用计算机图像分析系统观察动脉损伤后血管重构相关指标的变化。结果 13 周时模型组、液氮冻伤组、高脂饮食组血 CyPA 与 CD147 水平较同时期对照组均明显升高 ($P < 0.05$),尤以模型组为甚。除对照组,其余 3 组均可见内膜增生,模型组还可见典型 AS 斑块形成;斑块内及增生内膜均可见 CyPA 及 CD147 的表达。模型组、液氮冻伤组、高脂饮食组最小管腔直径及管腔面积较对照组均明显减小 ($P < 0.05$),内膜面积、中膜面积、最大内膜厚度、管腔狭窄度较对照组明显增大 ($P < 0.05$)。结论 CyPA 与 CD147 在 AS 兔血管重构中的表达明显升高。

关键词 动脉粥样硬化;亲环素 A;CD147;血管重构

中图分类号 R 543.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0770-05

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是由动脉血管内皮受损引发的功能障碍及炎症反应相互作用,持续的、动态的、进展的一个病理过程^[1-2]。而氧化应激产物被认为是整个炎症效应中的上游因子。亲环素 A (cyclophilin A, CyPA) 是氧化应激诱导的分泌因子,可以在活性氧的刺激诱导下分泌到细胞外,促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 从中膜向内膜转运,使血管内膜增厚,致血管重构^[3]。而血管重构有进一步促进 AS 引起冠状动脉介入术后血管再狭窄等心血管事件发生的风险。

该实验拟建立动物模型,观察 CyPA 及其受体 CD147 在 AS 血管重构中的表达,为避免上述不良心血管事件发生提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康纯种雄性新西兰白兔 32 只,月龄约 3 个月, (3.0 ± 0.5) kg,购自北京科宇动物养殖中心。分笼喂养,普通饲料适应性喂养 1 周,按简单随机方法分为对照组、液氮冻伤组、高脂饮食组、模型组,每组 8 只。对照组持续普通饮食,不做任何处理;模型组利用液氮冻伤血管内膜 + 高脂饮食的方法建立 AS 模型;液氮冻伤组液氮冻伤血管后持续普通饮食;高脂饮食组持续高脂饮食,血管不损伤处理。

1.2 主要试剂 高脂饲料 (1% 胆固醇、8% 猪油、10% 蛋黄粉 + 兔基础饲料) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司;医用液氮由解放军三〇五医院中心实验室提供;弹力纤维染色液购自北京东方日创生物科技有限公司;DAB 显色试剂盒、苏木精染色液购自北京中杉生物技术开发有限公司;辣根过氧化物酶标记 GAPDH 抗体购自美国 Sigma 公司;兔 CyPA 抗体购自英国 Biobyte 公司;兔 CD147 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;兔巨噬细胞 RAM11 单克隆抗体购自丹麦 Dako 公司;兔 CD147 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;兔 CyPA ELISA 试剂盒购自美国 Mybiosource 公司。

1.3 动物模型建立 适应性喂养 1 周后,对照组继续普通饮食,高脂组持续高脂饮食。模型组及液氮冻伤组实验动物 12 h 前禁食,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,两夹间距离约 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,历时 2 min,造成血管内皮损伤,建立 AS 模型^[4]。压

2015-03-02 接收

基金项目:全军“十一五”医药卫生科研基金资助项目 (编号:06G145)

作者单位:¹南方医科大学第二临床医学院,广州 510515

²解放军第 305 医院心脏中心,北京 100017

作者简介:张雁斌,男,硕士研究生;

李运田,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: lyt305@126.com

迫止血、缝合后,连续3 d肌注40万单位青霉素钠抗感染。造模后模型组继续高脂饮食喂养,液氮冻伤组术后持续普通饮食。

1.4 血清 CD147、CyPA 水平的检测 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,分离血清,静置20 min后3 000 r/min离心15 min,取上清液分装于Eppendorf管,ELISA法检测CD147、CyPA的表达水平。

1.5 组织标本留取及处理 4组实验动物于术后13周处死,分别剥离留取损伤部位动脉约4 cm,未损伤组取相对应同部位血管。每组取血管一部分常规石蜡包埋,分别作HE染色、弹力纤维染色;普通光镜观察组织病理学变化,并利用CyPA、CD147、VCAM11单克隆抗体进行免疫组织化学染色。

1.6 利用计算机病理图像分析系统(Image-pro-plus 6.0)分析 血管组织进行弹力纤维染色后,采用病理图像分析系统分析颈动脉外弹力层围绕面积(EELA)、内弹力层围绕面积(IELA)、管腔面积(LA)、最小管腔直径(MLD)、最大内膜厚度(MIT)、内膜面积(IA) = (IELA - LA)、中膜面积(MA) = (EELA - IELA)、管腔狭窄度(LS) = IA / IELA^[5]。

1.7 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;样本前后对比研究采用配对 t 检验,多组均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 新西兰白兔总体生长良好,模型组1只因麻醉过量死亡,液氮冻伤组1只死于术中大出血,其余30只全部完成实验,所得数据参与分析。

2.2 血管形态 对照组:可见内皮细胞完整,排列整齐,内弹力板清晰完好,无断裂及溶解现象。中层平滑肌细胞排列整齐,形态规则,未见斑块形成,无明显增殖及脂质沉积。内膜未见巨噬细胞表达。模型组:HE染色可见典型的AS斑块形成,斑块内可见纤维帽及大的脂质核心,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。弹力纤维染色可见部分内弹力板损害,内膜明显增厚,部分中膜平滑肌纤维崩解、断裂、溶解,可见胶原增生,弹力纤维稀疏。RAM11标志的巨噬细胞免疫组化可见斑块内及增生内膜巨噬细胞丰富,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,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。液氮冻伤组:主要表现为内膜的增厚,部分内弹力板损坏,内皮细胞下泡沫细胞浸润,散在少量脂质。RAM11标志可见增生内膜处散在巨噬细胞浸润。高脂饮食组:主要表现为内膜一定程度的增厚,部分内膜及中膜弹力纤维崩解、破坏。增生内膜可见泡沫细胞及巨噬细胞,有少量脂质浸润。同时内膜中亦可见少量胶原及部分弹力纤维增生。见图1。

2.3 血管内 CyPA、CD147 表达 对照组:内膜未见CyPA及CD147表达;中膜可见规整平滑肌细胞,散在少量CyPA、CD147表达。模型组:增生内膜及斑块内CD147与CyPA呈片状分布表达,且有共区域性。与巨噬细胞染色对比显示,CD147与CyPA表达多集中于巨噬细胞聚集部位。液氮冻伤组:内膜增生,中膜光滑规整,增生内膜可见CD147与CyPA散在表达;同时可见CD147与CyPA表达区域相同。高脂饮食组:CD147与CyPA在增生内膜中散在少量表达,内膜未增生区域与对照组相似,未见表达。见图2。

2.4 血清中 CyPA 及 CD147 表达水平 实验前4组兔血清中CD147和CyPA水平差异无统计学意义。第13周,对照组兔血清CD147、CyPA水平与0周相比,差异无统计学意义($t = -0.29, -1.75, P = 0.78, P = 0.12$);第13周,模型组CD147、CyPA与0周相比明显升高,差异有统计学意义($t = -50.95, -37.73, P < 0.05$);第13周,液氮冻伤组CD147、CyPA与0周相比明显升高,差异有统计学意义($t = 8.78, -21.25, P < 0.05$);第13周,高脂饮食组CD147、CyPA与0周相比明显升高,差异有统计学意义($t = -12.06, -19.97, P < 0.05$)。4组第13周CD147、CyPA相比,差异有统计学意义($F = 102.28, 163.31, P < 0.05$),结果表明模型组较液氮冻伤组、高脂饮食组、对照组,血清CD147及CyPA的表达均明显升高。见表1。

2.5 血管形态指标 模型组、液氮冻伤组、高脂饮食组较对照组内膜明显增厚,管腔明显缩小,MA明显增厚,管腔狭窄度明显增大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。4组IA相比差异有统计学意义($F = 22.54, P < 0.05$),模型组中IA较另外3组明显增厚;4组LA相比差异有统计学意义($F = 8.61, P < 0.05$)模型组中LA较另外3组明显缩小;4组MA相比,差异有统计学意义($F = 50.80, P < 0.05$)模型组中LA较单纯冻伤组及高脂饮食组明显缩小;

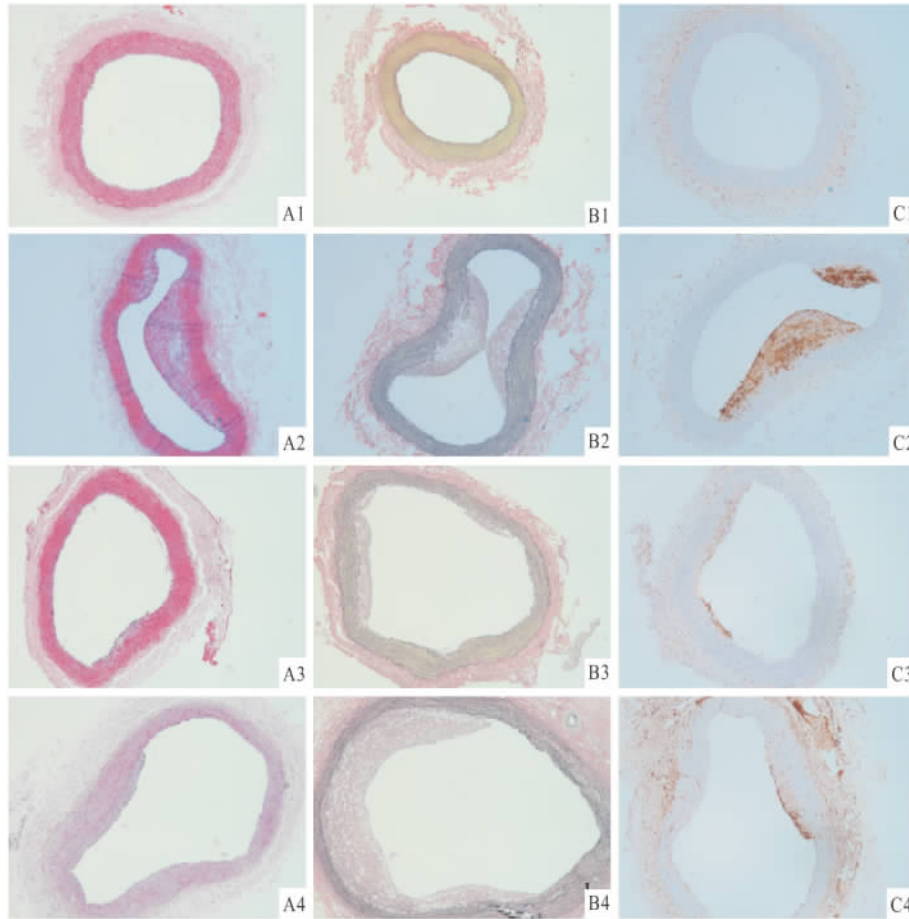


图1 4组不同染色下的血管形态 ×40

A: HE; B: 弹力纤维染色; C: RAM11 标记的巨噬细胞; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 液氮冻伤组; 4: 高脂饮食组

表1 血清 CD147 及 CyPA 在 0 周及 13 周的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=8)	模型组 (n=7)	液氮冻伤组 (n=7)	高脂饮食组 (n=8)
0 周				
CD147 (μg/L)	62.15 ± 4.52	67.23 ± 5.32	65.66 ± 7.49	60.96 ± 6.52
CyPA (μg/L)	0.99 ± 0.06	0.95 ± 0.07	1.01 ± 0.04	0.91 ± 0.12
13 周				
CD147 (μg/L)	61.50 ± 5.45	120.46 ± 6.99* #Δ▽	84.28 ± 6.02* ▽	90.94 ± 7.15* ▽
CyPA (μg/L)	1.02 ± 0.07	2.03 ± 0.11* #Δ▽	1.74 ± 0.12* ▽	1.86 ± 0.07* ▽

与对照组比较: * P < 0.05; 与液氮冻伤组比较: # P < 0.05; 与高脂饮食组比较: Δ P < 0.05; 与同组 0 周比较: ▽ P < 0.05

4 组 LS 相比, 差异有统计学意义 (F = 458.00, P < 0.05), 模型组中 LA 较单纯冻伤及高脂饮食明显缩小。结果表明, AS 斑块形成的模型组较液氮冻伤组及高脂饮食组, IA、LS 明显增大, LA、MA 明显减小。见表 2。

3 讨论

血管重构是在血流动力学及体液因子相互作用下引发的血管结构的慢性改变, 导致管腔狭窄。其有 2 种类型, 一种是早期的适应性重构, 又称为阳性

表2 血管重构相关指标分析 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=8)	模型组 (n=7)	液氮冻伤组 (n=7)	高脂饮食组 (n=8)
IA (mm ²)	0.00 ± 0.00	1.22 ± 0.59* #Δ	0.39 ± 0.08*	0.41 ± 0.08*
MIT (mm)	0.00 ± 0.00	0.72 ± 0.24* #Δ	0.31 ± 0.17*	0.40 ± 0.12*
LA (mm ²)	2.54 ± 0.32	0.76 ± 0.28* #Δ	2.02 ± 0.24*	1.96 ± 0.11*
MLD (mm)	1.49 ± 0.06	1.01 ± 0.31* #Δ	1.22 ± 0.18*	1.18 ± 0.09*
MA (mm ²)	0.84 ± 0.11	1.23 ± 0.17* #Δ	1.67 ± 0.15*	1.84 ± 0.20*
LS (%)	0.00 ± 0.00	61.61 ± 5.05* #Δ	16.18 ± 3.90*	17.23 ± 3.25*

与对照组比较: * P < 0.05; 与液氮冻伤组比较: # P < 0.05; 与高脂饮食组比较: Δ P < 0.05

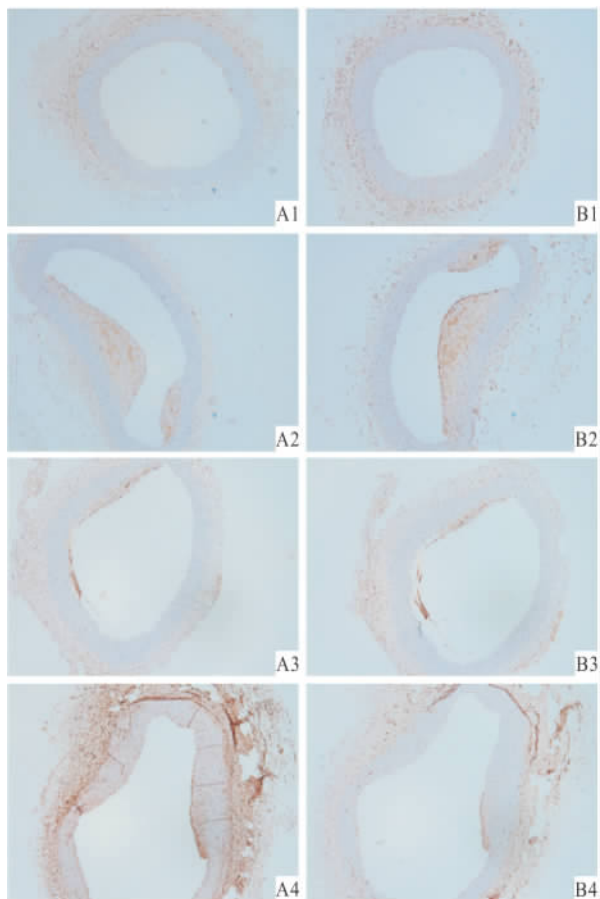


图2 免疫组织化学染色 ×40

A: CD147 抗体染色; B: CyPA 抗体染色; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 液氮冻伤组; 4: 高脂饮食组

重构或扩张性重构;另一种是后期的病理性重构,也称为负性重构或者收缩性重构。正性重构是内皮损伤及细胞增殖引起的血管代偿性反应,在 AS 早期阶段并未引起管腔缩小,但随着 AS 斑块的进一步发展,血管代偿功能失调,引起管腔狭窄,发展为负性重构。因此,管腔的大小,依赖于斑块的进展及正性重构的平衡^[6]。模型组、液氮冻伤组、高脂饮食组 LA 均明显缩小,发生了血管收缩性重构;说明单纯高脂饮食及单纯液氮冻伤都能发生血管重构,但 3 者发生血管重构的特点不同。液氮冻伤组及高脂饮食组导致的内膜增生占血管减少面积的比例大于模型组,而模型组 LA 减少明显大于其余 3 组。同时,模型组较液氮冻伤及高脂饮食组 LA 明显减小,面积狭窄率明显增大,内膜明显增厚,考虑 AS 血管发生血管重构程度更严重。血管重构既是 AS 过程的病理变化,又是 AS 得以持续及进展的结构基础;其主要病理变化既包括 VSMC 的增殖、迁移,也包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解与重

新分布。正常情况下 VSMC 位于血管中膜层,被基底膜所包绕,限制移动。当 AS 发生时,在炎症因子刺激下, VSMC 解除收缩状态,发生增殖、迁移。ECM 是血管壁的重要组成部分,主要由胶原纤维构成,处于不断合成与降解的动态平衡状态,现已证实基质金属蛋白酶能降解 ECM,使新的 ECM 不断合成,而旧的 ECM 不断降解,从而使胶原过多沉积,同时也能促进 VSMC 向内膜迁移,导致内膜增生,发生心血管重构^[7-8]。CD147 是 CyPA 受体,又是基质金属蛋白酶诱导剂, CyPA 与 CD147 形成的复合物在巨噬细胞及内皮细胞的作用下,通过 ERK1/2 和 I κ B /NF- κ B 的信号途径,促进基质金属蛋白酶释放^[9],降解细胞外基质,引起心血管的重构。模型组、液氮冻伤组及高脂饮食组 CD147 及 CyPA 在血清中及增生内膜中的表达较对照组明显升高,且血管发生 AS 的模型组较液氮冻伤及高脂饮食组的 CD147 及 CyPA 也明显升高。早期的研究^[10]显示, CyPA 的表达与内膜形成呈平行关系,早期球囊拉伤大鼠 CyPA 的表达主要在血管外膜,当内膜完全形成时, CyPA 的表达主要在血管内膜表达,呈现从外膜到内膜迁移的现象。近年来研究^[11]表明 CD147 及 CyPA 在风湿性关节炎、系统性红斑狼疮及肿瘤等疾病中明显表达,但研究其在 AS 性血管重构中如何表达的实验较少。本实验通过构建 AS 兔模型,结合血管重构参数分析,发现 CyPA 及其受体 CD147 在血管重构中的表达升高,尤其是在 AS 性血管重构中的表达明显上调,血管重构程度更重。这为研究抑制 AS 性血管重构提供了新的靶点,但本实验未对早期重构及晚期重构进行分别研究,未明确 CyPA 及 CD147 的表达于正性及负性血管重构是否不同,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-9.
- [2] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-26.
- [3] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Circulation, 2008, 117(24): 3088-98.
- [4] Fang S M, Zhang Q H, Jiang Z X. Developing a novel rabbit model of atherosclerotic plaque rupture and thrombosis by cold-induced endothelial injury[J]. J Biomed Sci, 2009, 16: 39.
- [5] Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl M N, et al. Effect of thymoqui-

- none and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus [J]. *Phytomedicine* 2007 ,14(9) :621 -7.
- [6] 徐凤芹,徐浩,刘剑刚等. 芎芩胶囊对兔实验性动脉粥样硬化血管重构的影响[J]. *中国中西医结合杂志* 2004(04) :331 -5.
- [7] Tummers A M ,Mountain D J ,Mix J W ,et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 as a marker of intimal hyperplasia [J]. *J Surg Res* 2010 ,160(1) :9 -13.
- [8] Karki R ,Kim S B ,Kim D W. Magnolol inhibits migration of vascular smooth muscle cells *via* cytoskeletal remodeling pathway to attenuate neointima formation [J]. *Exp Cell Res* ,2013 ,319 (20) : 3238 -50.
- [9] Kim J Y ,Kim W J ,Kim H ,et al. The stimulation of CD147 induces MMP-9 expression through ERK and NF- κ B in macrophages: implication for atherosclerosis [J]. *Immune Netw* 2009 ,9(3) : 90 -7.
- [10] Jin Z G ,Melaragno M G ,Liao D F ,et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress [J]. *Circ Res* 2000 , 87(9) :789 -96.
- [11] Yurchenko V ,Constant S ,Eisenmesser E ,et al. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics [J]. *Clin Exp Immunol* 2010 ,160(3) :305 -17.

Expressions of CyPA and CD147 in vascular remodeling of atherosclerosis rabbits

Zhang Yanbin¹ ,Du Dayong² ,Li Yuntian^{1,2} ,et al

(¹The Second Clinical Medical College of Southern Medical University ,Guangzhou 510515;

²The Heart Center of The 305 Hospital of People's Liberation Army ,Beijing 100017)

Abstract Objective To explore the expressions of Cyclophilin A (CyPA) /CD147 in vascular remodeling of atherosclerosis (AS) rabbits. **Methods** 32 healthy male New Zealand rabbits (3 months) were randomly divided into the control group ,model group ,cold-induced injury group , hyperlipid group (8 in each group). Expressions of CyPA and CD147 in serum of rabbits were tested at the beginning and the 13th week , respectively. All rabbits were sacrificed after 13 weeks. Then paraffin-embedded sections were used for HE staining and special staining for elastic fiber to analyze the changes of vascular morphology. Additionally , macrophagocyte /CyPA /CD147 monoclonal antibodies were applied to immunohistochemical staining and the changes of related vascular remodeling indexes after arterial injury were observed using computerized image analyzing system. **Results** The expressions of CyPA and CD147 in serum increased significantly in the model group , cold-induced injury group and hyperlipid group compared with those in control group at 13th week ($P < 0.05$) , respectively , especially the model group. Hyperplastic intima was found in the model group , cold-induced injury group and hyperlipid group , but not in the control group. Additionally , atherosclerotic plaque could be found in the model group. There were high expressions of CyPA and CD147 in atherosclerotic plaques and hyperplastic intima in the model group , also in the cold-induced injury group and hyperlipid group. The minimum lumen diameter and lumen area significantly decreased in these three group compared with the control group ($P < 0.05$). However , the intima area , media area , maximum intima thickness and lumen stenosis increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** High expressions of CyPA and CD147 are found in Remodeling Vascular of atherosclerosis rabbits.

Key words atherosclerosis ; cyclophilin A ; CD147 ; vascular remodeling