

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.01.002

瑞舒伐他汀对兔动脉粥样硬化模型中 IL-8 的干预研究

王 妍^{1,2} 王宏涛¹ 张 蕊¹ 辛 辉^{1△}

(¹ 青岛大学医学院, 山东 青岛 266003; ² 济宁医学院护理学院, 山东 济宁 272067)

摘 要 **目的** 观察瑞舒伐他汀对兔动脉粥样硬化模型中白细胞介素 8(IL-8) 水平及其表达的影响。**方法** 30 只新西兰大白兔随机分为对照组, 实验组, 治疗组, 每组 10 只。对照组以标准基础饲料喂养, 实验组和治疗组以高脂饲料喂养 4 周后, 行颈动脉内膜剥脱术, 分别继续予高脂饲料, 及高脂饲料加瑞舒伐他汀喂养 6 周。于 4 周末及 10 周末抽血测定血脂及 IL-8。于 10 周末将兔处死时, 取颈动脉标本行病理切片, 免疫组织化学方法检测 IL-8 的表达。**结果** 4 周末与对照组相比, 实验组及治疗组血脂及 IL-8 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。10 周末治疗组血脂及 IL-8 水平均明显低于实验组 ($P < 0.05$); 正常对照组颈动脉标本未见动脉硬化病变及 IL-8 表达; 治疗组中动脉内膜面积 (IA)、内膜/中膜面积比 (I/M)、管腔狭窄度 (LSD)、动脉粥样硬化斑块中 IL-8 的表达明显低于实验组 ($P < 0.05$)。**结论** 瑞舒伐他汀可降低血脂及 IL-8 的水平并减少其表达, 具有抗炎、抑制动脉粥样硬化进展的作用。

关键词 动脉粥样硬化; IL-8; 瑞舒伐他汀; 兔

中图分类号: R332 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)02-005-04

Effect of rosuvastatin on IL-8 expression of atherosclerotic rabbits

WANG Yan, WANG Hong-tao, ZHANG Rui, et al

(Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective To observe the influence of rosuvastatin on IL-8 and its expression in rabbit atherosclerosis model. **Methods** 30 New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: control group ($n=10$), experiment group ($n=10$) and treatment group ($n=10$). Animals in control group received normal diet, the other two groups received arterial intimal injury of carotid with balloon after four weeks experiment feeding, then treated with experiment, experiment and rosuvastatin for six weeks, respectively. 3 ml blood was drawn from the ear vein of all the rabbits after the carotid arterial intimal injury (at the end of the fourth week) and before sacrifice (at the end of the tenth week). Lipid and IL-8 levels were measured. At the end of the experiment, all rabbits were sacrificed, the carotid arteries were isolated and paraffin-embedded slices and immunohistochemical staining of IL-8 were performed. **Results** Compared with control group, Lipid and IL-8 levels in treatment group and experiment group were significantly increased at the end of 4 weeks ($P < 0.05$), and lipid and IL-8 levels in treatment group were significantly lower than experiment group at the end of 10 weeks ($P < 0.05$); There were no arteriosclerosis lesions and IL-8 expression in the carotid arteries of control group; compared with experiment group, intima area (IA), ratio of intima area to membrane area (I/M), luminal stenosis degrees (LSD) and the expression of IL-8 on atherosclerotic plaque were significantly decreased in treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosuvastatin can reduce IL-8 level and decrease expression of IL-8 in atherosclerosis plaques. It demonstrates that rosuvastatin may inhibit the progression of atherosclerosis by reducing the inflammatory action.

Key words: Atherosclerosis; IL-8; Rosuvastatin; Rabbit

动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病的共同病理基础, 深入探讨 AS 的发病机制、诊断方法和治疗措施, 已成为全球范围的重大课题。研究证实, 炎症在动脉粥样硬化的发生发展中起着非常重要

的作用。白细胞介素-8(IL-8)作为免疫炎症反应的重要介质, 参与机体炎症过程, 促进动脉粥样硬化斑块的形成和发展^[1], 在动脉粥样硬化病理的发生与发展过程中起重要作用。但关于 IL-8 与动脉粥样硬化关系研究甚少。他汀类药物是目前临

△[通信作者]辛辉, Email: xhqy2002@yahoo.com.cn

床上应用最为广泛的一类调血脂药物。除其调脂作用外,还可能有助于提高 AS 斑块的稳定性。本研究通过高脂喂养和球囊损伤建立动脉粥样硬化兔模型,并采用瑞舒伐他汀进行干预,观察瑞舒伐他汀对兔颈动脉内膜增殖及 IL-8 表达的影响,进而探讨瑞舒伐他汀对 AS 进展的防治作用及可能机制,为诊治 AS 提供一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制作

健康新西兰雄性大白兔 30 只(青岛市动物实验中心提供),4 月龄,体质量(2.35 ± 0.17)kg。随机分为治疗组、实验组、对照组,每组 10 只。治疗组:每日 150g 高脂饲料(1.5%胆固醇+6%猪油+92.5%基础饲料),自由饮水,喂养 4 周后,行颈动脉内膜球囊损伤术。术后予青霉素 80 万 U/d 肌注,连续 3 天,继续高脂饲料喂养,并加用瑞舒伐他汀 10mg/d,6 周后处死。实验组:除不予瑞舒伐他汀治疗外,余处理同治疗组。对照组:每日 150g 基础饲料,自由饮水。同期处死动物。

1.2 主要试剂与药品

瑞舒伐他汀由阿斯利康制药有限公司提供。双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒购自美国 R&D 公司。兔抗兔 IL-8 抗体、兔 SP Kit 一抗为兔来源的免疫组化试剂盒均购置北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 血脂和 IL-8 的测定

于 4 周末(术后)和 10 周末(处死前)经耳缘静脉抽血 3ml,3500r/min 离心取血清,采用全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)测定血脂,包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),ELISA 法测定血 IL-8 的水平。

1.4 标本制备

术后 6 周麻醉动物后,取颈内、外动脉分叉处下方病变明显的颈总动脉约 2.0cm,去除外膜疏松结缔组织,等距切分 4~5 段,10%的中性缓冲甲醛固定,石蜡包埋,血管标本横截面切片(4 μ m)。

1.5 血管组织形态学观察

切片行苏木素-伊红(HE)染色,每例动物 HE 染色 1 张。显微镜下观察血管结构并照相,用 Image-Pro Plus 软件进行图像分析,测定每张切片上各个血管截面的内膜面积(IA),中膜面积(MA),内膜/中膜面积比(I/M)及管腔狭窄度(LSD),(管腔狭窄度=内膜面积/内弹力板下的面积 $\times 100\%$)取平均值,反映血管狭窄程度。对比各组数值用以

评定瑞舒伐他汀对血管内膜增殖的影响。

1.6 血管壁免疫组织化学观察

采用 SABC 三步法进行血管组织切片的 IL-8 免疫组化染色,严格按照试剂盒要求染色,采用抗原微波修复,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片,PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.7 图像分析

采用 Image-Pro Plus 软件进行图像分析,随机测量每张切片中 6 个高倍视野(10 $\times$ 20)阳性部位的平均光密度和阳性面积百分比,取其平均值,二者乘积乘以 100 为阳性表达指数,用以分析 IL-8 的表达。

1.8 统计学分析

所有资料采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

所有实验动物无中途死亡或患病,术后恢复良好,无并发症出现。

2.2 各组动物血脂、IL-8 水平及血管狭窄程度比较

见表 1。

表 1 各组兔血脂、IL-8 水平比较($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

时间	组别	TC (c/mmol/L)	TG (c/mmol/L)	LDL-C (c/mmol/L)	IL-8 (pg/ml)
4 周末	对照组	2.07 $\pm$ 0.64	1.27 $\pm$ 1.31	0.84 $\pm$ 0.53	0.05 $\pm$ 0.01
	实验组	38.13 $\pm$ 0.36*	4.64 $\pm$ 0.73*	11.24 $\pm$ 4.62*	1.29 $\pm$ 0.12*
	治疗组	37.92 $\pm$ 0.18*▲	4.59 $\pm$ 2.04*▲	11.31 $\pm$ 5.32*▲	1.32 $\pm$ 0.11*▲
10 周末	对照组	2.11 $\pm$ 0.73	1.24 $\pm$ 0.96	0.89 $\pm$ 0.61	0.04 $\pm$ 0.03
	实验组	56.47 $\pm$ 0.29*#	7.24 $\pm$ 1.21*#	17.36 $\pm$ 3.55*#	1.82 $\pm$ 0.43*#
	治疗组	24.68 $\pm$ 0.33*△#	2.76 $\pm$ 1.64*△#	7.25 $\pm$ 2.67*△#	0.65 $\pm$ 0.17*△#

注: *4 周末及 10 周末,实验组、治疗组分别与对照组相比, $P < 0.05$; ▲4 周末,治疗组与实验组相比, $P > 0.05$; △10 周末,治疗组与实验组相比, $P < 0.05$; #10 周末治疗组、实验组分别与 4 周末治疗组、实验组相比, $P < 0.05$ 。

由表 1 可见,4 周末及 10 周末时实验组、治疗组 TC、TG、LDL-C 及 IL-8 水平与对照组相比,实验组(4 周末, $t=155.29$; 7.11; 7.07; 32.56, $P_{\text{组}} < 0.05$; 10 周末, $t=218.85$; 12.28; 14.46; 13.06, $P_{\text{组}} < 0.05$)及治疗组均明显升高(4 周末, $t=170.52$; 4.33; 6.19; 36.36, $P_{\text{组}} < 0.05$; 10 周末, $t=89.09$; 2.53; 7.34; 11.17, $P_{\text{组}} < 0.05$)。4 周末时,实验组 TC、TG、LDL-C 及 IL-8 水平与治疗组之间差异无显著性($t=1.65$; 0.073; 0.031; 0.58, $P_{\text{组}} > 0.05$)。但 10 周末治疗组与实验组相比,治疗组

TC、TG、LDL-C 及 IL-8 水平均明显降低($t=228.83; 6.95; 7.20; 8.00, P_{\text{均}} < 0.05$)。与 4 周末相比,10 周末实验组 TC、TG、LDL-C 及 IL-8 水平明显增高($t=125.46; 5.82; 3.32; 3.75, P_{\text{均}} < 0.05$);但治疗组血脂及 IL-8 水平明显降低($t=111.38; 2.21; 2.16; 10.46, P_{\text{均}} < 0.05$)。

对血管结构的图像分析结果发现,与实验组相比,治疗组 IA、I/M 及 LSD 均减低($P < 0.05$),各组间 MA 比较差异无显著性($P > 0.05$),见表 2。

表 2 各组 IA、MA、I/M 及 LSD 的结果比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

指标	对照组	实验组	治疗组	t	P
内膜面积(s/mm^2)	—	0.35 ± 0.09	0.18 ± 0.04	3.83	< 0.05
中膜面积(s/mm^2)	0.32 ± 0.11	0.37 ± 0.06	0.34 ± 0.18	0.35	
内膜/中膜面积比	—	0.94 ± 0.13	0.53 ± 0.11	5.37	< 0.05
管腔狭窄度(%)	—	45 ± 11	23 ± 7	3.76	< 0.05

2.3 HE 染色光镜分析

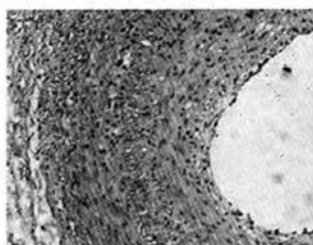
对照组:动脉内膜光滑完整,单层扁平内皮细胞紧贴内弹力板,内弹力板呈波纹状,内膜外膜分界清楚,中膜厚度均一,血管平滑肌细胞呈环形规则排列,见图 1a。

实验组:动脉管腔表面凹凸不平,内膜明显增厚,程度不等,致管腔不规则成偏心性狭窄,内膜层内有大量血管平滑肌细胞增生,形态不一,排列紊乱,泡沫细胞聚集,管腔内见到较大脂质核心,内弹力膜分离断裂,部分管腔可见到血栓形成,见图 1b。

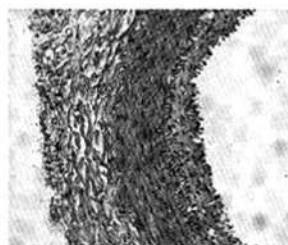
治疗组:内膜增厚明显轻于实验组,内膜层血管平滑肌细胞形态较实验组更接近正常细胞。泡沫细胞减少,脂质核心面积较实验组减小,内弹力膜连续,见图 1c。



a 对照组



b 实验组

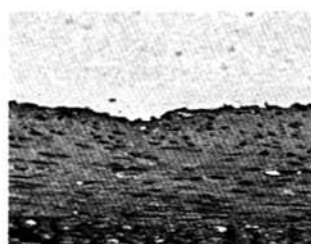


c 治疗组

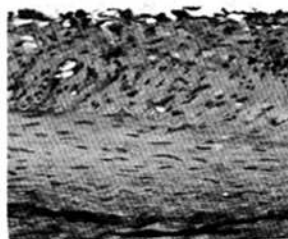
图 1 兔颈动脉壁切面光镜图(HE 染色 $\times 100$)

2.4 IL-8 在斑块中的阳性表达指数

对照组兔血管中未见动脉粥样硬化斑块,未见 IL-8 表达(见图 2a);实验组 IL-8 阳性细胞和染色强度明显增加,呈深棕色,主要位于斑块核心的周围,尤其是斑块的纤维帽中(见图 2b),其阳性表达指数为 9.3 ± 2.1 ;瑞舒伐他汀治疗组 IL-8 表达明显减少,为浅棕色(见图 2c),阳性表达指数为 6.2 ± 0.4 ,明显低于实验组($t=3.24, P < 0.05$)。



a 对照组



b 实验组



c 治疗组

图 2 兔颈动脉壁切面免疫组化染色光镜图($\times 100$)

3 讨论

本研究通过高脂饮食和球囊损伤成功建立动脉粥样硬化模型,并予以瑞舒伐他汀干预,结果显示:与实验组相比,治疗组血 TC、TG、LDL-C、IL-8 水平及动脉粥样硬化斑块中 IL-8 的表达均明显降低,内膜面积、内膜/中膜面积比及管腔狭窄度也减低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示瑞舒伐他汀可有效降低血 TC、TG、LDL-C,具有明显的调脂作用,此外,瑞舒伐他汀还可降低血 IL-8 水平,并减少 AS 斑块中 IL-8 的表达,减轻炎症反应、稳定斑块而发挥抑制 AS 进展的作用。

研究表明,炎症与动脉粥样硬化斑块的启动、发展、破裂及血管成形术后再狭窄等的一系列级联反应事件密切相关^[2],各种细胞因子包括致炎细胞因子等均参与炎症进程。IL-8 是免疫和炎症反应的重要调节因子,是由涉及动脉粥样硬化的多种类型细胞(包括内皮细胞、外周血单核细胞及血管平滑肌细胞)分泌的致炎细胞因子。Rus 等研究发现动脉粥样硬化管壁中 IL-6 和 IL-8 的蛋白和基因表达都比正常管壁中高。IL-8 能有效地促进单核细胞向内皮下间隙迁移,并趋化血管平滑肌细胞的增殖和聚集,是动脉粥样硬化早期的关键步骤。最近研究发现,IL-8 可促使滚动的单核细胞紧密黏附到内皮细胞并侵入血管壁,启动血管壁的炎症反应,而单核细胞和内皮细胞之间的黏附可以诱导二者的激活,使其在无需其他刺激的情况下就能产生 IL-8,加剧了局部的炎症病变^[3]。这些研究从不同的角度证实了 IL-8 在动脉粥样硬化的发生和发展中发挥着重要的作用,上调 IL-8 的表达将促进动脉粥样硬化的形成。IL-8 可加重动脉粥样硬化斑块的不稳定性^[4]。Romuk 等^[5]研究不稳定型心绞痛患者的血 IL-8 水平明显高于稳定型心绞痛患者和对照组。王育珊等研究显示急性心梗患者的血 IL-8 水平明显升高^[6]。本研究发现血浆 IL-8 水平及其在 AS 部位的表达在实验组升高,治疗组降低,提示瑞舒伐他汀具有抑制 AS 进展的作用。与最近他汀类药物可降低血 IL-8 水平及动脉粥样硬化部位 IL-8 的表达的研究一致^[7-10]。

综上,瑞舒伐他汀可降低血脂及 IL-8 的水平

并减少 IL-8 在 AS 处的表达,具有抗炎、抑制 AS 进展、稳定粥样斑块的作用。然而,机体炎症反应为一复杂的系统,其他信号转导分子可能也参与 IL-8 对血管重构及血管炎症反应的影响,尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Simonini A, Moscucci M, Muller DW, et al. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue [J]. *Circulation*, 2000, 101: 1519-1526.
- [2] Inoue T, Uchida T, Yaguchi I, et al. Stent-induced expression and activation of the leukocyte integrin Mac-1 is associated with neointimal thickening and restenosis [J]. *Circulation*, 2003, 107: 1757-1763.
- [3] Azghani AO, Baker JW, Shetty S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture [J]. *Inflamm Res*, 2002, 51: 506-510.
- [4] Ozeren A, Aydin M, et al. Levels of serum IL-1beta, IL-2, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha in patients with unstable angina pectoris [J]. *Mediators Inflamm*, 2003, 12: 361-365.
- [5] Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C, et al. Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32: 657-661.
- [6] 王育珊, 王奕骥, 王广, 等. 急性心肌梗死患者缺血-再灌注过程中血清白细胞介素-6、白细胞介素-8 的动态变化及意义 [J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32: 35.
- [7] Zhang B, Fan P, Shimoji E, et al. Modulating effects of cholesterol feeding and simvastatin treatment on platelet-activating factor acetylhydrolase activity and lysophosphatidylcholine concentration [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186: 291-301.
- [8] Qiao Z, Ren J, Chen H. Simvastatin reduces expression and activity of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in the aorta of hypercholesterolaemic atherosclerotic rabbits [J]. *J Int Med Res*, 2009, 37: 1029-1037.
- [9] Abdolreza Rezaie-Maca T, Robert A, et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemo-attractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 1194.
- [10] Wilson SH, Herrmann J, Lerman LO, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering [J]. *Circulation*, 2002, 105: 415-421.

(收稿日期 2011-01-05)