

· 临床研究 ·

## 鱼油对外周动脉疾病的治疗作用和机制研究

石 骏

(四川省南溪县人民医院 644100)

**摘要:**目的 检验外周动脉疾病(PAD)患者和健康受试者外周血中单核细胞 CD44 和 CD44v3 的表达,同时检测膳食补充鱼油对这些标志物的影响。方法 在基线水平和膳食补充鱼油 12 周后,分别测定 PAD 患者和健康对照组的 CD44 和 CD44v3 的表达情况。结果 在基线水平时,PAD 患者单核细胞的 CD44 表达较对照组高,中位荧光强度分别为(480±27.8)OD 和(336±25.1)OD,两组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。经膳食补充鱼油 12 周后,PAD 患者的单核细胞的 CD44 表达下降,中位荧光强度为(427±26.2)OD,和未补充鱼油的 PAD 患者比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而对照组在补充鱼油前、后无明显变化。CD44v3 在 PAD 患者来源的单核细胞的表达低于对照组来源的单核细胞中的表达,分别为(0.15±0.15)OD 和(0.22±0.14)OD,两组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );但经膳食补充鱼油后,CD44v3 在 PAD 患者来源的单核细胞中表达明显增加(0.27±0.23)OD,与未补充鱼油的 PAD 患者来源的单核细胞比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 CD44 和 CD44v3 在 PAD 患者中存在异常改变,经补充鱼油后有向正常水平回复的趋势。

关键词:鱼油;外周动脉疾病

中图分类号:R543.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)11-1387-02

### Therapeutical effect and mechanisms of fish oil in Peripheral arterial disease

SHI Jun

(Nanxi People's Hospital of Sichuan Province, Nanxi, Sichuan 644100, China)

**Abstract: Objective** To examine CD44 and CD44v3 expression on peripheral blood monocytes from patients with peripheral arterial disease (PAD) and healthy controls and to investigate the effect of fish oil supplementation on these markers. **Methods** CD44 and CD44v3 were assessed at baseline and following dietary supplementation with fish oil for 12 weeks in both PAD and control groups. **Results** Monocytes from PAD patients had higher CD44 expression than that from controls (median intensity fluorescence (MIF): 480±27.8 vs 336±25.1 OD;  $P<0.05$ ). After 12 weeks dietary supplementation with fish oil, CD44 expression was reduced in PAD patients (MIF: 427±26.2 vs 480±27.8 OD;  $P<0.05$ ) but not in controls (355±280 OD). Monocyte CD44v3 expression was lower in cultured monocytes from PAD patients compared to that from controls (0.15±0.15 vs 0.22±0.14 OD;  $P<0.05$ ). This was increased in the PAD group following fish oil supplementation (0.27±0.23 OD;  $P<0.05$ ). **Conclusion** Monocyte CD44 and CD44v3 expression is altered in arterial disease but is improved towards normal levels seen in control subjects by dietary fish oil supplementation.

Key words: fish oil; peripheral arterial disease

本研究证明 CD44 和 CD44v3 在炎症性疾病 PAD 患者外周血单核细胞上有较高的表达,并且该高表达可以被鱼油下调。

### 1 临床资料

**1.1 研究人群** 研究方案包括了 PAD 患者和健康受试者,该研究获得了伦理委员会的同意,并给每位受试者签署了知情同意书。纳入患有症状性 PAD(稳定的间歇性跛行)、踝臂压力指数小于 0.9 的男性患者和健康男性对照。排除了严重下肢缺血或在 3 个月前曾接受任何形式治疗的患者;排除患有任何部位动脉疾病或踝臂压力指数小于 0.9 的健康对照。健康对照均不能患有糖尿病、慢性炎症疾病,或正在接受免疫抑制治疗;被排除者还包括未受到良好控制的高血压患者(收缩压大于 160 mm Hg,舒张压大于 90 mm Hg),或在过去的 5 年内曾患有恶性疾病的患者,未服用鱼油胶囊或每周吃 1 条以上的鱼的患者。受试者在采血前 2 周内无感冒或轻度感染。

**1.2 实验设计** 试验开始时,所有患者和受试者在饥饿状态下采血以检测各项指标的基线水平,血样收集在 CPDA 或 EDTA 抗凝的样品管中,并让血样在室温下凝集 1 h。所有的受试者每天服用 6×1 g 的鱼油胶囊共 12 周,这样能够保证每

天摄入 1.02 g 二十五碳五烯酸和 0.69 g 的二十二碳六烯酸。12 周后第 2 次采集饥饿状态下的血样。

**1.2.1 血浆三酰甘油和胆固醇的测量** 采用标准色度法,检测血浆三酰甘油、总高密度脂蛋白胆固醇和总低密度脂蛋白胆固醇的浓度。

**1.2.2 血液单核细胞分离** 从 CPDA 保存的血样中分离单核细胞。采用 6% 的葡聚糖沉淀法除去红细胞,得到的富含白细胞的血浆在 Nycoprep1.068 上进行分层,并在室温下采用 650 r/min 离心 15 min,除去上层成分,含单核细胞的成分转入新鲜的试管,然后用含 0.3% 的小牛血清清蛋白的 PBS 的洗涤。在 6 mL 的 PBS-A 中重新悬浮细胞,300 r/min 离心 7 min 以除去血小板。

**1.2.3 流式细胞仪** 对 CPDA 保存的全血样进行流式细胞分析。采用 Serotec 公司生产的结合藻红蛋白(PE)的抗 CD14 抗体和结合异硫氰酸荧光素(FITC)的抗 CD54 或抗 CD44 抗体进行标记。采用抗鼠的 IgG1-FITC 抗体和抗鼠的 IgG2a-PE 抗体作为同种型的对照抗体以明确背景色情况。黑暗状态下在饱和浓度的抗体培养液内培养细胞 30 min,用 PBS-A 洗涤,

在 BD FACSCalibur 流式细胞仪上采用 Cellquest 软件进行分析。表达 CD14 的细胞被认为是单核细胞。采集单核细胞表面的 CD44 或 CD54 的中位荧光强度。

**1.2.4 CD44v3 测定** 在平底 96 孔组织培养皿上培养单核细胞,培养基包括:0.75 mmol/L 的 L-谷氨酸、0.1 mg/mL 的链霉素、0.1 mg/mL 的青霉素和 5% 的自体血清。每孔加入 100  $\mu$ L 的培养基和  $3 \times 10^4$  个细胞。部分培养的细胞接受 10 mg/mL 的细菌内毒素的刺激。20 h 后,采用 500 g(重力常数)的离心力对培养皿进行离心,并将培养基换成冰块冷却的 100  $\mu$ L 2% 甲醛,在 4  $^{\circ}$ C 下固定细胞 15 min。弃去甲醛,风干细胞,将培养皿用石蜡封口,-20  $^{\circ}$ C 储存备用。

解冻培养皿后,用含 0.15% 的 Tween20(Sigma 公司)的 PBS 液冲洗。1% 的清蛋白阻断非特异性结合后,培养孔用 PBS-Tween 液洗涤,再用 100  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL 的鼠抗人 CD44v3 克隆或对照抗体共同孵育。用 2% 山羊血清阻断非特异性结合,100  $\mu$ L 0.5  $\mu$ g/mL 的辣根过氧化物酶结合的羊抗鼠多克隆抗体 STAR77(Sigma 公司)共同孵育。再用 PBS-Tween 洗涤培养皿,邻苯二胺(Dako Cytomation)着色,100  $\mu$ L 1 mol/L 的硫酸阻断反应。将培养皿在 490 nm 下,用 Titretrek+MS2 平皿阅读器阅读。记录 2 次光密度值(OD)的平均值,以 CD44v3 孔减去两个对照孔的平均值作为最后结果。

**1.3 统计学方法** 以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示数据,采用 SPSS11.0 软件分析数据,Mann-Whitney U 检验对 PAD 和对照组进行比较,Wilcoxon 秩和检验比较鱼油的作用。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PAD 患者和健康受试者的一般情况比较** 48 例 PAD 患者(年龄 45~84 岁)和 54 例健康对照(年龄 46~84 岁)被纳入研究。两组受试者的一般情况比较见表 1。高密度脂蛋白胆固醇比率和血浆三酰甘油浓度这一指标两组之间差异无统计学意义,C 反应蛋白的浓度 PAD 组高于对照组。

表 1 PAD 患者和健康对照组的一般情况比较

项目	PAD 组(n=48)	对照组(n=54)
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )	23.5 $\pm$ 3.1	24.5 $\pm$ 3.0
腰臀比	1.1 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.05
收缩压(mm Hg)	153.3 $\pm$ 22.7*	136.6 $\pm$ 3.5
舒张压(mm Hg)	80.7 $\pm$ 9.6	83.5 $\pm$ 7.3
阿司匹林使用者人数(n)	35	5
药物控制血压者人数(n)	33	12
总胆固醇(mmol/L)	4.83 $\pm$ 0.88	5.68 $\pm$ 0.94
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.19 $\pm$ 0.27	1.27 $\pm$ 0.26
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.59 $\pm$ 0.76	3.74 $\pm$ 0.79
三酰甘油(mmol/L)	1.52 $\pm$ 0.81	1.48 $\pm$ 0.79
C 反应蛋白(mg/L)	4.57 $\pm$ 6.13*	2.31 $\pm$ 1.88
他汀类药物使用者人数(n)	35	3
饮酒质量(g/周)	11.00 $\pm$ 16.2	11.50 $\pm$ 10.6
吸烟(n)		
从未	8	89
曾经	47	8
正在	42	11

表 1(续) PAD 患者和健康对照组的一般情况比较

项目	PAD 组(n=48)	对照组(n=54)
左侧踝臂压力指数	0.70 $\pm$ 0.21*	1.15 $\pm$ 0.12
右侧踝臂压力指数	0.74 $\pm$ 0.23*	1.16 $\pm$ 0.13
较重腿的踝臂压力指数	0.6 $\pm$ 0.17	—
确诊冠心病者人数	17	0

**2.2 鱼油在调节 PAD 患者单核细胞 CD44 表达中的作用** 来源于 PAD 患者的单核细胞 CD44 的表达高于对照组,中位荧光强度分别为(480 $\pm$ 27.8)OD 和(336 $\pm$ 25.1)OD( $P < 0.05$ )。给予膳食补充鱼油 12 周后,PAD 患者血单核细胞 CD44 的表达有所下降,中位荧光强度给药前为(480 $\pm$ 27.8)OD,给药后为(427 $\pm$ 26.2)OD( $P < 0.05$ ),但对对照组患者的变化不明显,中位荧光强度给药前为(336 $\pm$ 25.1)OD,给药后为(355 $\pm$ 28.0)OD,图 1。

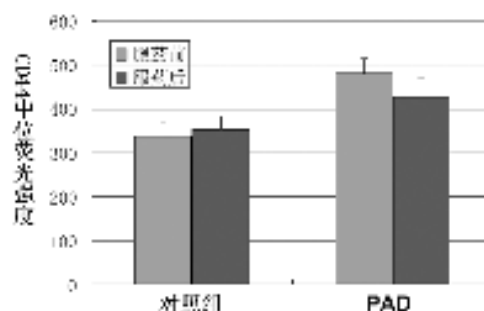


图 1 两组外周血单核细胞的 CD44 表达在服用鱼油前后的变化( $P < 0.05$ )

**2.3 培养单核细胞 CD44v3 的表达** PAD 患者来源的单核细胞 CD44v3 的表达低于健康对照者来源的单核细胞,PAD 患者(0.15 $\pm$ 0.15)OD,对照组(0.22 $\pm$ 0.14)OD, $P < 0.05$ 。补充鱼油能够增加 PAD 患者来源的单核细胞的 CD44v3 的表达,给药前(0.15 $\pm$ 0.15)OD,给药后(0.27 $\pm$ 0.23)OD, $P < 0.05$ 。但是不能增加对照组来源的单核细胞 CD44v3 的表达,给药前(0.22 $\pm$ 0.14)OD,给药后(0.17 $\pm$ 0.1)OD, $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

本研究显示,PAD 患者外周血单核细胞 CD44 表达量高于健康对照组。Krettek 等<sup>[1]</sup>的 Western blot 检验结果表明血管粥样斑块中 CD44 的含量高于对照组,与本研究结果相似。本研究发动脉粥样硬化患者外周血单核细胞 CD44 表达量较健康对照组高,且饮食中添加鱼油可降低动脉粥样硬化患者外周血单核细胞 CD44 的表达量,而对健康对照组无影响。

CD44 与 HA 的结合对 HA 的分解代谢起重要作用,而 HA 分解后产生的 20 kDa 亚单位可激活炎症细胞因子和基质金属蛋白酶,以及促进内皮细胞损伤<sup>[2]</sup>。鱼油饮食可降低某些炎症反应标志物的水平<sup>[3]</sup>。因此,鱼油饮食降低炎症反应的作用机制,很可能是降低外周血单核细胞 CD44 表达量,从而降低 HA 的分解代谢。

根据鱼油饮食可降低血管疾病患者外周血单核细胞 CD44 表达量的研究结果,作者提出假设——鱼油饮食通过降低外周血单核细胞 CD44 的表达量,从而降低 HA 的分解代谢,减少 HA 分解所产生的炎症诱发因子,最终减弱(下转第 1390 页)

分泌物阻塞,在中叶开口周围分布有三组淋巴结,当受到炎症刺激后,局部的淋巴结变得肿大,压迫支气管从而导致管腔狭窄<sup>[3]</sup>。但据本组病例中在纤维支气管镜下所见,在右中叶管口除了有炎症改变之外,大部分未见管口狭窄引流不畅改变,绝大多数管腔是完整的。因此我们认为,右中叶肺不张发生率相对较高,右中叶不张可能与肺泡表面活性物质相对减少有关<sup>[4]</sup>。

**3.3 纤维支气管镜检查及治疗 病因的检出率:**本组 76 例老年肺不张患者,病因经纤维支气管镜检出率达 92.1%。病因中肺癌占据首位,占总数的 64.5%,故应积极进行检查,以便及早进行相关治疗。

纤维支气管镜检查及治疗:通过纤维支气管镜可直接窥见患者肺不张支气管内的形态变化。从镜检与病理结果的对比中可以发现,癌症肺不张通常病变多表现为结节、菜花样及息肉样,向管壁阻塞、浸润,多见于未分化癌<sup>[5]</sup>;表面有坏死组织及水肿伪膜,活检质脆,容易出血者一般为鳞癌。支气管内膜结核表现为黏膜肥厚狭窄、糜烂溃疡、充血水肿、瘢痕狭窄,与邻近支气管黏膜无明显界限,有较广泛的浸润病变,有时呈多形性、多发性肉芽肿,肿块质软韧。炎症所致肺不张大部分为水肿、黏膜充血、脓性分泌物形成脓栓或堵塞。

通过纤维支气管镜可以对患者病变部位活检、刷检,可以明确病因。本组 76 例患者的诊断率为 92.1%。通过纤维支气管镜检查不但可以对恶性病变得出明确的诊断结果,进而指导以后的治疗,对于良性病变,更可以通过纤维支气管镜吸净血块、分泌物等异物,促进患者的肺部复张。对于吸引出的分

分泌物进行细菌学培养,使得结果更为可靠,从而可以指导对患者进行相关的抗感染药物治疗。纤维支气管镜检查操作方便,只要术中注意监护,操作熟练轻巧,很少出现严重的并发症,本组中无 1 例出现气胸、喉痉挛、心搏呼吸骤停等严重并发症。因此,老年人肺不张经纤维支气管镜检查是一项有效、安全、必不可少的诊断手段。

综上所述,运用纤维支气管镜检查老年肺不张,是明确病因的一种非常重要的方法。应及早进行,及早确诊,为患者的治疗掌握先机。

#### 参考文献:

- [1] 李一耕. 纤维支气管镜在肺科疾病中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(7): 389.
- [2] 刘淑华, 陈志雄. 肺不张的临床纤维支气管镜及病理检查特征分析[J]. 医师进修杂志, 2004, 27(11): 31.
- [3] 郑逸华, 毛娟华, 王伟华. 床边纤维支气管镜治疗肺不张 47 例分析[J]. 中国基层医药, 2004, 11(10): 1224.
- [4] 侯长毅, 赵淑娟, 赵秉坤. 67 例肺不张纤维支气管镜检查分析[J]. 中国基层医药, 2006, 13(10): 1728.
- [5] 段敏超, 李家萱. 纤维支气管镜检查肺不张 86 例临床分析[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(2): 297.
- [6] 刘健, 栾燕, 胡小平, 等. 纤维支气管镜检查 107 例肺不张病因分析[J]. 江西医药, 2006, 41(12): 1029.

(收稿日期: 2010-03-25)

(上接第 1388 页)

炎症反应。

PAD 患者外周血单核细胞 CD44v3 的表达量低于健康对照组,并且鱼油饮食可增加 CD44v3 的表达量。3 号外显子的保留可导致 CD44 分子在翻译后与肝素类硫酸根连结合,该过程使得与肝素结合的生长因子可以通过肝素/肝素类硫酸根和 CD44 结合<sup>[4]</sup>。鱼油可增加颈动脉斑块表面纤维帽的厚度,由于增加斑块表面纤维帽的厚度有助于阻止斑块破裂和凝固引起的动脉完全堵塞,所以目前认为鱼油通过增加纤维帽厚度降低心肌梗死的危险度<sup>[5]</sup>。本研究表明鱼油饮食可增加 CD44v3 的表达,从而促进纤维化的发生。这很可能是鱼油对心脏病患者起保护作用的机制。

总之,CD44 是一种多功能受体,可以通过裂解 HA 来上调炎症反应。本研究表明 PAD 患者外周血单核细胞 CD44 的表达出于上调状态(CD44 可上调炎症反应),而 CD44v3 的表达出于下调状态(CD44v3 可下调炎症反应)。本研究还表明鱼油饮食作用于 CD44,通过两条途径降低炎症反应。首先鱼油饮食可减少单核细胞膜表面 CD44 的表达,其次可促进 CD44v3 的表达。这一结果提供了一种用于降低动脉粥样硬化患者心血管死亡率的潜在方法。

#### 参考文献:

- [1] Krettek A, Sukhova GK, Schonbeck U, et al. Enhanced ex-

pression of CD44 variants in human atheroma and abdominal aortic aneurysm[J]. Am J Pathol, 2004, 165: 1571.

- [2] Motte CA, Hascall VC, Drazba J, et al. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid; polycytidylic acid; inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function[J]. Am J Pathol, 2003, 163: 121.
- [3] Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal e less active, but more versatile? [J]. Matrix Biol, 2001, 20: 509.
- [4] Rider CC. Heparin/heperan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34: 458.
- [5] Marchioli R, Barzi F, Bomba E, et al. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction; time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione[J]. Circulation, 2002, 105: 1897.

(收稿日期: 2010-02-27)