

动脉粥样硬化高低发区年轻人冠状动脉 硫酸软骨素蛋白聚糖的比较研究*

杨方 赵培真 张英珊 韩晓男 王爱忠 陈忠 赵斌 梁凤玲

(中国医学科学院心血管病研究所 阜外医院, 北京 100037)

Distribution and Comparison of Content of Chondroitin Sulfate Proteoglycan in Young Coronary Artery between Districts of High and low Prevalence of Atherosclerosis

YANG Fang, ZHAO Pei-Zhen, CHANG Ying-Shan, HAN Xiao-Nan, WANG Ai-Zong, CHEN Zhong, ZHAO Bin and LIANG Feng-Ling

(Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

ABSTRACT Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) was analyzed quantitatively on the basis of immunohistochemistry in 19 coronary arteries from district of high prevalence of atherosclerosis (Beijing) and 13 coronary arteries from district of low prevalence of atherosclerosis (Ningbo) with image analyzer, and the coronary arteries of one heart were chosen for immunoelectron microscopy. The results were as follows: ① The network-like CSPG positive substances were distributed diffusely in extracellular matrix (ECM); CSPG content was higher in intima than in media; ② The more colloidal gold particles were distributed in the loose region of ECM and the less on the surface of collagen; ③ CSPG content in coronary arteries was higher in Beijing than in Ningbo. Suggesting that difference of CSPG content in coronary artery is likely related to diversity of coronary morbidity between districts of atherosclerosis high and low prevalence.

KEY WORDS Chondroitin sulfate proteoglycan; Morphometry; Young coronary artery

摘要 选取动脉粥样硬化高发区(北京)19例、低发区(宁波)13例年轻人冠状动脉,行硫酸软骨素蛋白聚糖免疫组织化学染色,应用图象分析系统对切片中硫酸软骨素蛋白聚糖行定量分析及比较。1例心脏标本的冠状动脉行硫酸软骨素蛋白聚糖免疫电镜染色。观察分析结果为:①硫酸软骨素蛋白聚糖阳性物质呈丝网状分布于细胞外间质中,内膜中硫酸软骨素蛋白聚糖含量高于中膜;②胶体金颗粒多分布于细胞外间质的疏松区,少量贴附于胶原纤维上;③北京地区年轻人冠状动脉内硫酸软骨素蛋白聚糖含量高于宁波地区。提示硫酸软骨素蛋白聚糖在冠状动脉内含量差异可能与高、低发区冠状动脉粥样硬化发病率不同有关。

关键词 硫酸软骨素蛋白聚糖;形态定量;年轻人冠状动脉

蛋白聚糖(proteoglycan, PG)是动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)和内皮细胞(endothelial cell, EC)合成、分泌并构成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的重要组成部分,在维持血管壁的完整性、粘弹性和通透性等方面有重要作用^[1]。硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)为动脉壁中含量最多的一种PG,其变化对于动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成和发展有重要影响^[2]。有关CSPG在冠状动脉(冠脉)的分布及As高、低发区冠脉内CSPG含量的比较研究迄今未见报道。我们曾研究发现As高、低发区主动脉内PG(包括CSPG)含量的差异与两地区主动脉As发病率不同有关^[3],在此基础上我们采用免疫组织化学结合图像分析

* 国家“八、五”科技攻关课题(85-915-03-04)的部分内容。

及免疫电镜等方法定位定量分析研究了北京和宁波两地区年轻人冠脉内 CSPG 的分布特点及含量间的差异,以预测两地区年轻人冠脉 As 发生发展规律,并探讨 CSPG 与冠脉 As 病变形成的关系。

1 材料与方 法

北京 100 例和宁波地区 68 例意外死亡年轻人(15~39 岁)新鲜心脏标本,于左前降支近侧端取材,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片(4 μm),HE 染色用于光镜观察血管壁形态结构及病变类型后,选取北京地区 19 例、宁波地区 13 例(肉眼观无病变,镜下为正常血管或仅有少量泡沫细胞存在)行 CSPG 免疫组织化学染色。采用 LSAB (labelled streptavidin-biotin)法。CSPG(牛抗鼠单抗)由美国华盛顿大学病理室 TN Wight 教授提供。LSAB 试剂盒购自 DACO 公司。CSPG 抗体稀释为 1:100。染色时设立阴性对照。电镜标本取自一例心脏的左前降支近侧端,PG 固定液(含 0.014%戊二醛和 1%多聚甲醛的 0.1 mol·L⁻¹ PBS 液)固定,常规电镜制备超薄切片,包埋后胶体金法行 CSPG 免疫电镜染色,CSPG 稀释度为 1:50,羊抗鼠胶体金(直径 10 nm)标记 Ig G 为 1:10(军事医学科学院基础所制作)。并设立阴性对照。

免疫组织化学定量测定 用空军总医院生物医学工程研究所真彩色图象分析系统对 CSPG 染色的 32 张切片行定位测量。每张切片内膜、中膜均定点选取 4 个测试场测试 CSPG 阳性物质面密度(单位面积上阳性物质所占面积百分比)。将内膜、中膜测得的 4 个数值分别相加后求出均值,即内膜及中膜 CSPG 平均面密度,以代表血管横截面上内膜、中膜 CSPG 分布的相对含量。整个测试过程均在人机对话方式下完成。

数据处理用 SAS 软件在 IBM 486 微机上进行,采用方差分析及 t 检验。

2 结 果

2.1 冠脉硫酸软骨素蛋白聚糖的分布特点

冠脉内膜中 CSPG 阳性物质为散在丝网状、点片状均匀分布于细胞外间质中。部分泡沫细胞胞浆内可见 CSPG 阳性物质存在。在内弹力板两侧 CSPG 呈不连续线状分布。中膜内 CSPG 呈散在条束状分布于平滑肌纤维间(Figure 1)。北京地区年轻人冠脉内、中膜中 CSPG 分布范围较宁波地区广泛。

2.2 免疫电镜

标记 CSPG 的胶体金颗粒呈散在或小簇状遍布于内膜和中膜的细胞外基质中,以间质的疏松区较多(Figure 2)。胶体金颗粒多贴附于短细的丝状结构上,并在胶原纤维、弹力纤维周围有一定量的分布,胶原纤维表面有胶体金颗粒附着(Figure 3)。

免疫组织化学和电镜对照染色均为阴性。

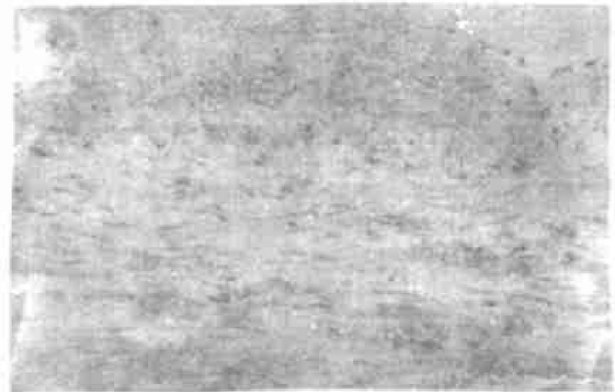


Figure 1. The distribution of CSPG in the intima and media of coronary artery (LSAB×200)

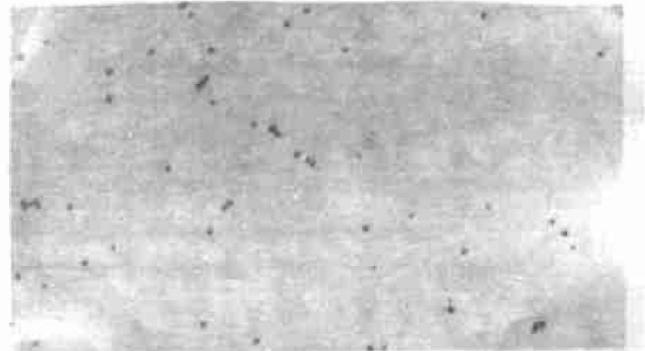


Figure 2. Scattered and clustered colloidal gold particles of CSPG in the loose region of the extracellular matrix (Postembedding colloidal gold method, ×20k).

2.3 两地区年轻人冠脉内硫酸软骨素蛋白聚糖定量分析

两地区年轻人冠脉内膜 CSPG 面密度明显大于中膜(P<0.01);北京年轻人冠脉内膜及中膜中 CSPG 面密度明显大于宁波(P<0.01, Table)。

3 讨 论

于石蜡切片上经免疫组织化学染色后,采用图象分析技术测量 CSPG 阳性物质在内膜、中膜中的面密度值来表示 CSPG 在冠脉横截面

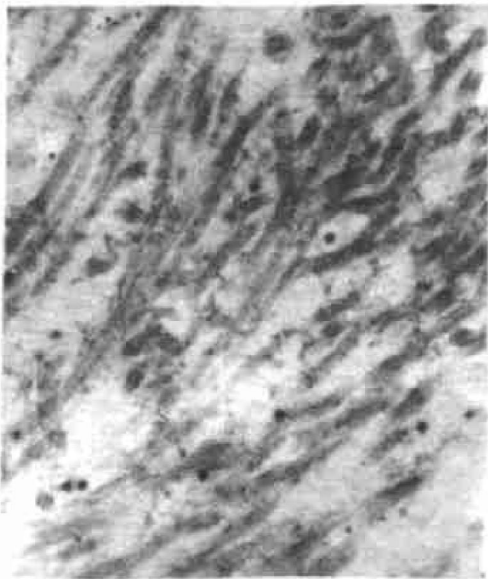


Figure 3. Some colloidal gold particles of CSPG in the surrounding and on the surface of collagen fibers (Postembedding colloidal gold method, $\times 25k$).

Table. Comparison of CSPG content in the coronary arteries between Beijing and Ningbo (area density $\%$, $x \pm s$)

area	n	intima	media
Beijing	19	34.1 \pm 6.9* #	17.8 \pm 5.6*
Ningbo	13	23.3 \pm 8.8 #	12.0 \pm 4.7

* $P < 0.01$, vs Ningbo; # $P < 0.01$, vs media

上分布的相对含量,是原位检测 CSPG 的好方法,能达到准确定位、定性和相对定量。

本研究观察到,人冠脉中 CSPG 弥漫分布于内膜、中膜的细胞外基质中,电镜见胶体金颗粒于疏松区分布多,在胶原纤维、弹力纤维周围及表面亦有少量分布,这与 Galis 等^[4]观察兔主动脉 CSPG 分布的特点相一致。但与 Lark 等^[5]所观察的结果不尽相同,他们发现在牛主动脉内 CSPG 仅分布于间质疏松区,而与胶原纤维、弹力纤维无明显定位关系,这可能与动物种属、动脉材料不同有关。人冠脉组织中 CSPG 的分布特点迄今未见报道。

张英珊等^[3]用生物化学方法分析了我国 As 高发区(北京)与低发区(广西)主动脉内各种 PG 含量及差异,发现高发区主动脉内 CSPG 含量有高于低发区的趋势,而 CSPG 在

PG 总量中所占的比例明显高于低发区。我们在冠脉内所检测的结果与张英珊等在主动脉内所得的结果相似。

体外实验证实 CSPG 与低密度脂蛋白有较强的结合力,并可形成复合物,CSPG 有捕获脂质的能力^[6,7]。在体内我们发现 β -脂蛋白与 CSPG 在人冠脉病变区的细胞内外有相近的分布方式^[4]。Galis 等^[4]也曾发现 CSPG 与脂蛋白 B 在牛主动脉内膜中有相同的定位,表明 CSPG 有促进脂质沉积及泡沫细胞形成的作用,对 As 形成和发展有重要影响^[8]。我们的结果显示,冠脉内膜中有较多 CSPG 存在,为脂质的沉积创造了条件,而北京地区年轻人冠脉中 CSPG 含量明显高于宁波,提示 CSPG 在冠脉内含量的差异可能是高低发区冠脉 As 发病率不同的物质基础之一。

致谢 空军总医院生物医学工程研究所全体同志在形态测量时给予支持和帮助。

参考文献

- Volker W, Schmidt A, Oortmann W, et al. Mapping of proteoglycans in atherosclerotic lesions. *Eur Heart J*, 1990, 11 (Suppl E): 29.
- Berenson GS, Radhakrishnamurthy B, Srinivasan SR, et al. Arterial wall injury and proteoglycan changes in atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med*, 1988, 112: 1002.
- Chang Y-S, Zhang C-L, Zhao P-Z, et al. Human aortic proteoglycans of subjects from districts of high and low prevalence of atherosclerosis in China. *Atherosclerosis*, 1991, 86: 9.
- Galis ZS, Alavi MZ, Moore S. Co-localization of aortic apolipoprotein B and chondroitin sulfate in an injury model of atherosclerosis. *Am J Pathol*, 1993, 142: 1432.
- Lark MW, Yeo TN, Mar H, et al. Arterial chondroitin sulfate proteoglycan localization with a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem*, 1988, 36: 1211.
- Radhakrishnamurthy BR, Jeankonne N, Tracy RE, et al. A monoclonal antibody that recognizes hyaluronic acid binding region of aorta proteoglycans. *Atherosclerosis*, 1993, 98: 179.
- Camejo G, Lopez A, Lopez F, et al. Interaction of low density lipoprotein with arterial proteoglycans. *Atherosclerosis*, 1985, 55: 93.

8 杨方, 赵培真, 张英珊, et al. 硫酸软骨素蛋白聚糖与年轻人冠状动脉粥样硬化的关系. 中华病理学杂志,

1995, 24 (2): 97.

(上接 28 页)

($r=0.99$, $P=0.0005$), 表明冠脉狭窄主要为斑块病变所引起。因此, 预防由斑块所致的冠脉狭窄应由 25 岁以前着手。

由于我们样本较小, 难以推论同龄人群 As 发生情况, 亦不宜与以前资料^[3]做直接比较, 但北京地区年青人 CAs 检出率及冠脉狭窄检出率较高的现象应予重视。

参考文献

- 1 Joseph A, Ackerman FD, Talley JD, et al. Manifestations of coronary atherosclerosis in young trauma victims—An autopsy study. *Atherosclerosis*, 1993, 22: 459.
- 2 Kagan AR, Sternby NH, Uemura K, et al. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries in five towns. *Bulletin of WHO*, 1976, 53: 485.
- 3 动脉粥样硬化病理普查协作组. 7159 例冠状动脉和 2044 例主动脉粥样硬化病理普查总结. 中华病理学杂志, 1983, 12: 81.
- 4 Dollar AL, Kragel AH, Fernicola DJ, et al. Composition of atherosclerotic plaques in coronary arteries in women < 40 years of age with fatal coronary artery disease and implications for plaque reversibility. *Am J Cardiol*, 1991, 67: 1 223.

- 5 Armstrong ML, Megan MB. Lipid depletion in atherosclerotic coronary arteries in rhesus monkeys after regression diets. *Circ Res*, 1972, 30: 675.
- 6 Armstrong ML, Megan MB. Arterial fibrous proteins in cynomolgus monkeys after atherogenic and regression diets. *Circ Res*, 1975, 36: 256.
- 7 A Coordination Group in China. A pathological survey of atherosclerotic lesions of coronary artery and aorta in China. *Path Res Pract*, 1985, 180: 457.
- 8 宋正行, 范乐明. 动脉粥样硬化与力学关系. 见: 蔡海江等 (编著). 动脉粥样硬化与冠心病. 人民卫生出版社. 1982, 86~103.
- 9 Zhao Hong, Yang Fang, Yang Rui-Biao, et al. Relationship between intimal thickness of coronary artery and atherosclerosis in youth. Thesis collection of the Second international Symposium of Coronary Artery Disease and Hypertensio, Beijing, 1993; 150.
- 10 杨方, 赵培真, 张英珊. 冠状动脉内膜增厚与冠状动脉粥样硬化. 中国循环杂志, 1995, 10: 309.
- 11 Pesonen E, Norio R, Hirvonen J, et al. Intimal thickening in the coronary arteries of infants and children as an indicator of risk factors for coronary heart disease. *Eur Heart J*, 1990, 11 (Suppl E): 53.
- 12 Velican C, Velican D. Study of coronary intimal thickening. *Atherosclerosis*, 1985, 56: 331.

(本文 1995-01-28 收到, 1995-02-28 修回)