

## 人白细胞 DR 抗原在冠状动脉粥样硬化早期病变中的表达及与 CS-PG 的关系\*

韩晓男 赵培真 杨方 杨瑞彪<sup>①</sup> 陈忠<sup>②</sup> 梁凤玲

(中国医学科学院阜外心血管病医院病理科, 北京 100037)

### Human Leukocyte Antigen-DR Expression and Relationship with Chondroitin Sulfate Proteoglycan in the Earlier Lesion of Coronary Atherosclerosis

HAN Xiao-Nan, ZHAO Pei-Zhen, YANG Fang, YANG Rui-Biao, CHEN Zhong and LIANG Feng-Ling  
(Department of Pathology, Cardiovascular Institute and阜外 Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

**ABSTRACT** In order to study expression of human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) and chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG) in human coronary artery, 13 coronary arteries including normal group ( $n=6$ ) and lesion group ( $n=7$ ), which were fixed with formalin, embedded in paraffin and slided successively ( $4\mu\text{m}$ ), were stained with HLA-DR and CS-PG microwave immunohistochemistry. Then the slides were quantitated with image analyzer. Results indicated that the numerical density of HLA-DR positive cells and the area density of CS-PG in the intima of lesion group were evidently higher than that of normal group, and were significantly correlative with that of normal group. One of lesion group was stained with proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and CD68. Similar localization of CD68 and HLA-DR was found in intima. Menatime, positive cells of HLA-DR mostly were positive ones of PCNA. These results indicated that expression HLA-DR in earlier As lesion was closely related with formation of foam cells, proliferation of SMC and increase of

CS-PG.

**KEY WORDS** Earlier atherosclerotic lesion; Human leukocyte antigen; Proliferative cell nuclear antigen; Microwave immunohistochemistry; Chondroitin sulfate proteoglycan

**摘要** 为研究人白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)和硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CS-PG)在人冠状动脉中的表达,将 13 例年轻人(15 岁~39 岁)的冠状动脉(左旋支或左前降支)用福尔马林固定后,进行石蜡包埋,其中 6 例为对照组(正常组),7 例为病变组(脂纹组)。连续切片后,应用微波炉对两组各例进行 HLA-DR 和 CS-PG 免疫组织化学染色。切片经图象分析仪定量后,所得结果显示,病变组内膜 HLA-DR 阳性细胞数密度和 CS-PG 阳性细胞面密度都分别明显高于对照组( $P<0.01$ ),并且对照组和病变组内膜 HLA-DR 数密度和 CS-PG 面密度都显著正相关( $P<0.01$ )。从脂纹组中任取一例进行 CD68、增殖细胞核抗原的免疫组织化学染色,经镜下观察发现,CD68 阳性细胞同时也是 HLA-DR 阳性;HLA-DR 阳性细胞大部分是增殖细胞核抗原阳性。提示冠状动脉粥样硬化早期病变中 HLA-DR 表达与泡沫细胞的形成、平滑肌细胞的增殖、CS-PG 增多有密切关系。

**关键词** 动脉粥样硬化早期病变; 人白细胞抗原; 增殖细胞核抗原; 微波免疫组织化学染色; 硫酸软骨素蛋白聚糖

DR 抗原是人主要组织相容性抗原复合体的 D 区座位基因所编码的抗原,正常出现于 B 细胞、巨噬细胞和其他抗原递呈细胞<sup>[1]</sup>。近年来国内外研究人员用免疫组织化学的方法发现动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变中增殖的平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)除了表

\* 本文为国家八·五攻关课题(85-915-03-04)资助项目

①军事医学科学院,北京

②广西医科大学病理学教研室,南宁

型转化外,细胞膜上还出现了HLA-DR的异常表达。但未见人冠脉HLA-DR表达的文献报道,本实验首次运用微波免疫组织化学技术在石蜡切片上对年轻人冠状动脉内膜DR抗原进行检测,并配合图象分析,目的在于观察人冠状As早期病变中DR抗原的异常表达,同时通过研究其与CS-PG(它可以在As病变内膜中大量聚集从而引起脂质沉积,并促进脂纹、脂湖、脂质核心的形成)<sup>[2]</sup>的关系,讨论其在冠状As早期病变发病学中的地位和作用。

## 1 材料和方法

选取福尔马林固定,石蜡包埋冠状动脉13例,其中正常组血管6例,病变组7例。连续切片厚4 $\mu$ m,分别作HLA-DR及CS-PG抗原的微波免疫组织化学染色<sup>[3]</sup>,并从病变组中任选一例作CD68(一种白细胞相关抗原,一般表达在巨噬细胞、单核细胞和淋巴细胞)和增殖细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA)的微波免疫组织化学染色。

实验所用抗体均为单克隆抗体,除CS-PG(MAB938)为美国华盛顿大学医学院病理室赠送外,HLA-DR(M775)、PCNA(C-56)、小噬细胞、CD68以及鼠抗LSAB试剂盒均购于DAKO公司。微波炉型号为Sharp R-5G14(W)。

免疫组织化学定量测定采用英国剑桥公司生产的全自动Quantiment 970图象分析仪(军事医学科学院),选用40倍物镜,对每组每切片选择管周内膜对应的4点,分别测量各点测试场中CS-PG阳性物质单位面积含量(面密度)或HLA-DR阳性单位面积数目(数密度),将4点内膜的数值分别相加,求出平均值分别代表内膜的CS-PG平均面密度和HLA-DR平均数密度。病变组测试可分为内膜病变区和非病变区的测量,若病变区小于血管周径的1/4,在其中任取一点测量CS-PG面密度和HLA-DR数密度,而非病变区取三点测量后,各取平均值。若病变区接近血管周径的2/4时,病变区、非病变区分别取两点测量。若病变区接近血管周径的3/4时,病变区取三点非病变区取一点测量。

统计方法 图象分析所得各组数据,运用SPSS/PC统计软件包进行方差分析、组间t检验和相关分析。

## 2 结果

### 2.1 各种抗原的免疫组织化学染色

#### 2.1.1 HLA-DR的免疫组织化学 无论对

照组还是病变组HLA-DR阳性细胞均分布于血管壁内膜和外膜。其中对照组内膜中,HLA-DR阳性细胞稀少并且多为紧贴血管腔面的内皮细胞(endothelial cell, EC);个别为内膜浅层的巨噬细胞和淋巴细胞。未复染时,后者镜下呈环形或圆球形。而病变组内膜中,阳性细胞多为内膜浅层的泡沫细胞(foam cell, FC),镜下呈环形或球形(Figure 1)。少数为内膜深层的FC,呈长梭形(Figure 2),还有少数为病灶边缘的淋巴细胞以及表层的EC。

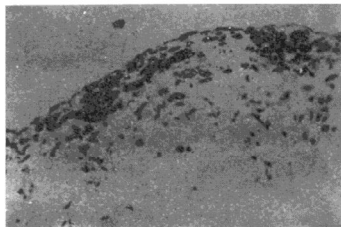


Figure 1. The distribution of HLA-DR cells in the fatty streak of the arterial intima (LSAB $\times$ 200).

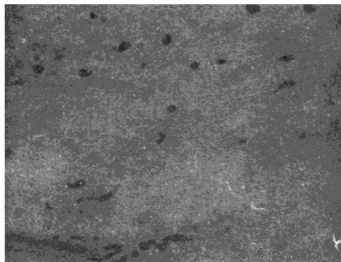
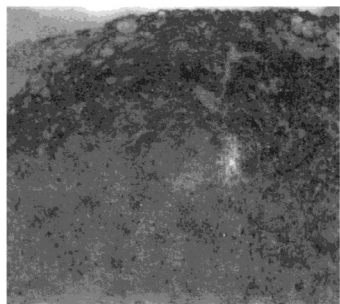


Figure 2. The foam cells with HLA-DR in the depth of fatty streak of the arterial intima (LSAB $\times$ 400).

2.1.2 CS-PG的免疫组织化学 对照组内膜中,CS-PG阳性物质呈散在丝网状分布于内皮细胞周围,内膜浅层有时呈波浪状与腔面平行,脂纹病变组,内膜脂纹区CS-PG阳性物质多为致密、凝集状的无定形物质分布于FC周围。部分FC胞浆内有均匀凝集状阳性物质并

围绕于细胞核周围(Figure 3)。

Figure 3. The distribution of CS-PG in the fatty streak of the arterial intima (LSAB $\times$ 200).

2.1.3 CD68 的免疫组织化学 CD68 阳性细胞位于病变血管壁内膜和外膜中,内膜阳性细胞多为聚集于脂纹病灶中央的巨噬细胞源性 FC,镜下呈环形或球形,少数为分布于病灶边缘和内膜浅层的淋巴细胞。

2.1.4 PCNA 的免疫组织化学 PCNA 阳性物质位于病变血管壁内膜细胞核中,阳性细胞多为病灶区和内膜浅层的 FC,少数为分布于内膜深层弹力板附近的 FC,呈长梭形。

经过以上的镜下形态观察,可以发现脂纹组内膜 HLA-DR、CD68、PCNA 阳性细胞分布类似,并发现 CD68 阳性细胞绝大多数为 HLA-DR 阳性,HLA-DR 阳性细胞大部分是 PCNA 阳性。

## 2.2 图象测量和统计分析

2.2.1 脂纹组内膜 HLA-DR 阳性细胞数密度明显大于对照组(Table 1,  $P<0.01$ )。脂纹组内膜病变区 HLA-DR 阳性细胞数密度明显大于对应非病变区(Table 2,  $P<0.01$ )。

2.2.2 脂纹组内膜 CS-PG 面密度明显大于对照组,脂纹组内膜病变区 CS-PG 面密度明显大于对应非病变区(Table 3,  $P<0.01$ )。

2.2.3 对照组内膜 HLA-DR 阳性细胞数密度与 CS-PG 面密度呈显著正相关,脂纹组内膜

HLA-DR 阳性细胞数密度与 CS-PG 面密度呈显著正相关(Table 4,  $P<0.01$ )。

Table 1. The mean number density\* comparison of cells expressing HLA-DR in the coronary intima between the fatty streak and normal group ( $\bar{x} \pm s, 1 \times 10^3 \cdot \text{mm}^{-2}$ ).

Groups	n	number density
normal	6	$0.87 \pm 0.70$
fatty streak	7	$2.60 \pm 0.54^{**}$

\*  $P<0.01$  compared with normal group

Table 2. The mean number density\* comparison of cell expressing HLA-DR in the coronary intima between lesion and non-lesion area ( $\bar{x} \pm s, 1 \times 10^3 \cdot \text{mm}^{-2}$ ).

Type	n	number density
non-lesion	7	$1.29 \pm 0.60$
lesion	7	$4.02 \pm 0.76^{**}$

\*  $P<0.01$  compared with non-lesion area

Table 3. The comparison of CS-PG content in the coronary intima between fatty streak and normal group ( $\bar{x} \pm s$ , area density).

Group	n	lesion	non-lesion
normal	6		$22.45 \pm 15.0$
fatty streak	7	$62.3 \pm 12.9^{**}$	$33.5 \pm 10.0$

\*  $P<0.01$  vs non-lesion of area normal group, \*\*  $P<0.01$  vs lesion area

Table 4. The correlation analysis of HLA-DR and CS-PG area density in the coronary intima between fatty streak and normal group.

Group	n	r	P
normal	6	0.9877	$<0.001$
fatty streak	7	0.9333	$<0.01$

## 3 讨论

### 3.1 人白细胞 DR 抗原在冠状动脉粥样硬化早期病变中的异常表达

人白细胞 DR 抗原一般只表达于免疫活性细胞,参与免疫应答和免疫调节<sup>[1-4]</sup>。本文组织化学实验显示,脂纹组 HLA-DR 阳性细胞含量

明显高于对照组,提示 HLA-DR 异常表达可能与 As 早期病变的发生发展有关。

动脉粥样硬化早期病变是由于 EC 受损后,血液中单核细胞粘附于其上,并迁入内皮下。这时巨噬细胞在外源性抗原刺激下,表达 DR 抗原,活化为抗原递呈细胞。被辅助性 T 细胞识别,吞噬脂质,成为 FC。同时,辅助性 T 细胞也被活化,释放多种活性因子,进一步刺激辅助性 T 细胞的自身增殖和活化,形成杀伤性 T 细胞<sup>[5,6]</sup>。本文免疫组织化学显示,早期病变绝大多数 FC 为 HLA-DR、CD68、PCNA 阳性细胞,并聚集于脂纹病灶中央,提示 As 早期病变 FC 大多数为巨噬细胞源性,并处于增殖状态。平滑肌细胞(SMC)增殖是 As 形成和发展的关键性因素之一,正常不表达 DR,而当血管 EC 受损,血液中单核细胞浸入,或血小板粘附于 EC 脱落处时,由于受损的 EC、巨噬细胞、血小板源性生长因子等,即可使中膜 SMC 发生表型转化,迁入内膜,吞噬脂质,变为免疫活性细胞,同时表达 DR 抗原<sup>[7,8]</sup>。DR、PCNA 免疫组织化学显示,增殖的 SMC 以及肌源性 FC 一般位于脂纹病灶周缘或内膜深层,提示 SMC 增殖和迁入可能继发于单核细胞侵入内膜之后。

此外,在病灶中心和边缘交界处的淋巴细胞也表达 DR 抗原,这些淋巴细胞可以释放活性很强的淋巴因子,这些因子除了活化巨噬细胞、激活杀伤性 T 细胞、使辅助性 T 细胞增殖外,淋巴因子中  $\gamma$  干扰素还可使 SMC 的 DR 基因异常表达<sup>[8]</sup>。

另外,还发现对照组以及病变组 EC 也表达 DR 抗原,这可能是由于淋巴细胞释放的淋巴因子诱导 EC 表达 DR 抗原<sup>[9]</sup>。

### 3.2 人白细胞 DR 抗原异常表达与早期病变中内膜硫酸软骨素蛋白聚糖增多的关系

细胞外基质增多是 As 病变的又一关键因素,而 CS-PG 是细胞外基质中的重要一种。本文结果显示,As 早期病变内膜 CS-PG 明显高于对照组,同时 HLA-DR 高表达,而且 HLA-DR 表达与 CS-PG 呈明显正相关。这就提示 DR 高表达可能与 CS-PG 增多有关。

硫酸软骨素蛋白聚糖主要由内皮细胞以及 SMC 分泌,可与低密度脂蛋白结合为复合物,使脂质“滞留”在动脉壁,促使 As 的发生。CS-PG 增多可能由于活化的巨噬细胞分泌生长因子,刺激 SMC 增殖并迁移至内膜,活化并吞噬脂质,同时大量分泌 CS-PG,使内膜 CS-PG 含量增多,从而加速了 As 病变的进程<sup>[2,10]</sup>。

综上所述,As 早期病变中,各种细胞异常表达 DR 抗原,从而促进 SMC 的增殖和迁移以及 CS-PG 增多,提示 DR 抗原异常表达是 As 进程中的一个重要环节。

### 参考文献

- 1 Palacios R, Shevach E, Stingl G, et al. Mechanism of cell activation role and functional relationship of HLA-DR Ag and interleukins. *Immunol Rev*, 1983, **63**: 73~110
- 2 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, **2**: 97.
- 3 韩晓男,赵培真,陈忠, et al. 微波免疫组织化学对冠状动脉粥样硬化早期病变细胞内抗原的检测. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2**(4): 183~184.
- 4 Nadler LM, Schlossman SF, Trivedi SS, et al. Monoclonal Abs defining serologically distinct HLA-DR related La-like Ag in man. *Human Immunol*, 1990, **1**: 77~90.
- 5 Hansson GK, Jonasson J, Lojsthe B, et al. Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 1988, **72**: 135~141.
- 6 Aquel NM, Ball RY, Waldmann H, et al. Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*, 1984, **53**: 265~271.
- 7 Jonasson L, Holm J, Skall O, et al. Expression of class II transplantation antigen on vascular SMC in human atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1985, **76**: 125~131.
- 8 Hansson JK, Jonasson L, Holm J, et al. Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque and SMC express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant chain. *Clin Exp Immunol*, 1986, **64**: 261~281.
- 9 汪建,卢咏才. IL-2 诱导的内皮细胞 HLA-DR 抗原表达. *中国免疫学杂志*, 1988, **4**: 331~327.
- 10 Weight TH. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**: 1~10.

(本文 1995-01-28 收到, 1995-08-30 修回)