

## 细胞因子对冠心病患者单核细胞粘附 相关蛋白表达的调节

安 靓                  李 进

(中国人民解放军第一军医大学组织学和胚胎学教研室, 广州 510515)

### Regulation of Cytokines to the Expression of Adhesive Related Proteins in Mononuclear cells in the Patients with Coronary Heart Disease

AN Jing and LI Jin

(Department of Histology and Embryology, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To observe the regulatory effect of cytokines on the expression of CD44, CD11b and Vn as well as the regulation change of cytokines to above antigen during coronary heart disease (CHD).

**Methods** The distribution of CD44, CD11b and Vn on the mononuclear cells was displayed by means of immunohistochemistry, and followed by quantitative process with Quantimet 520+ image analysis system. Finally, the data were Processed by factorial analysis of statistics.

**Results** The positive area of CD44, CD11b and Vn shows pink or dark pink color, and display a ring, semilunar, cap, spot-flat or granular shape. The distribution of the three antigens the mononuclear cell surfaces is different. Quantitative analysis indicates that the Sum value increased obviously as a result from the effect of cytokines ( $P < 0.001$ ) Which showed more significant in patients with coronary heart disease than in control ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion** Interleukin-1, tumor necrosis factor and interleukin-6 may up-regulate the expression of the adhesive related proteins (ARPs) and the effect of interferon-alpha is less intensive in CHD. Which indicate that the sensitivity of CHD patient's ARPs expres-

sion to regulatory effect of cytokines is much higher than that of normal people. The present study shows that the cytokines can affect the adhesion of mononuclear cells to endothelium via the regulation of ARPs expression and then interfere with atherogenesis.

**KEY WORDS** Cytokines; Coronary heart disease; Mononuclear cell; Adhesive related protein

**摘要** 为研究白细胞介素-1、肿瘤坏死因子、白细胞介素-6和 $\alpha$ -干扰素等细胞因子对冠心病单核细胞粘附相关蛋白表达的调节作用,采用免疫组织化学法显示白细胞分化抗原CD11b、CD44和体外连接蛋白Vn在单个核细胞表面的分布,用图像分析仪进行定量,并用统计学析因分析的方法对实验结果进行多因素的分析。结果显示,CD11b、CD44和Vn阳性区域为粉红至桃红色,多呈环状、半月状、帽状、斑片状及颗粒状,三种抗原在细胞表面的分布不同。图像分析结果显示白细胞介素-1、肿瘤坏死因子和白细胞介素-6作用后CD11b、CD44和Vn的表达增加,其中冠心病患者较对照组增加更加明显( $P < 0.001$ ), $\alpha$ -干扰素的作用不明显。以上提示,冠心病时白细胞介素-1、肿瘤坏死因子和白细胞介素-6对粘附相关蛋白表达的上调作用明显增强,表明冠心病病人粘附蛋白表达对某些细胞因子的敏感性升高,细胞因子可通过调节单核细胞表面粘附相关蛋白的表达,而影响单核细胞与内皮细胞的粘附,进而影响动脉粥样硬化的病变过程。

**关键词** 细胞因子; 冠心病; 单核细胞; 粘附相关蛋白

粘附相关蛋白为机体内与粘附功能相关的一群大分子<sup>[1,2]</sup>,主要介导细胞-细胞、细胞-间质的粘附。单核细胞的粘附与其表面的粘附相关蛋白CD44、CD11b和体外连接蛋白(vitronectin, Vn)等的表达量增加有关。我们以往

的研究发现,冠心病单核细胞表面的 CD44、CD11b 和 Vn 表达明显高于正常人<sup>[3]</sup>,而其表达的机制尚不清楚,为此我们观察了白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和  $\alpha$ -干扰素(interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )等细胞因子对上述三种抗原表达的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 单克隆抗体及试剂

抗 Vn 抗体为 Boehringer 公司产品,抗 CD11b 和抗 CD44 单克隆抗体为 Dako 公司产品。碱性磷酸酶标记免疫组化(ABC-AP)试剂盒为美国 Vector 产品;IL-1、IL-6、TNF 和 IFN- $\alpha$  均为北京 Biotin 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本收集与制备** 实验组为确诊为冠心病的患者 24 例,其中伴心绞痛者 16 例,伴陈旧性心肌梗塞者 3 例,伴高血压者 5 例。其中男 18 例,女 6 例,年龄 51~71 岁,平均年龄 63 岁。对照组为 24 例年龄在 24~77 岁(平均 59 岁)的健康人及排除心血管疾病的住院病人,两组年龄经统计学分析无显著性差异。取外周静脉血,常规肝素抗凝( $2.5 \times 10^4$  u/L),用密度梯度离心法分离外周血单核细胞。分离出的细胞用 Hank's 液离心漂洗一次,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  /L。将每份标本分为 5 管,0 管不加细胞因子,其余分别加入 IL-1( $1.0 \times 10^3$  u/L)、IL-6( $1.0 \times 10^3$  u/L)、TNF( $5.0 \times 10^3$  u/L)和 IFN- $\alpha$ ( $5.0 \times 10^3$  u/L),37℃ 孵育 4 h,取细胞进行涂片,ABC-AP 法免疫组织化学染色。

**1.2.2 定量检测** 每份标本测定 4 张涂片,每张涂片测定 50 个细胞,用 Quantimet 520+ 图像分析仪进行场测量,选择抗原总量(Sum 值)为定量参数。

### 1.3 分组及统计学处理

受试对象按析因设计进行分组,即实验因素分为 A、B、C 三项;A 因素为二个水平,即正常人群组和冠心病组。B 因素分三个水平,分别为 CD44、CD11b 和 Vn。C 因素为五个水平,分别为无细胞因子组(Blank)、IL-1、IL-6、TNF 和 IFN- $\alpha$  组。对实验结果进行析因分析,完全随机设计方差分析,并用 Scheffe 统计量行均数间两两比较,用 SPLM 软件(第四军医大学卫生统计学教研室研制)在微机上进行处理。

## 2 结果

### 2.1 单核细胞表面 CD44、CD11b 和 Vn 的分布

用碱性磷酸酶标记的 ABC 免疫组化试剂盒显示,抗原的阳性部位呈粉红色至桃红色,阳性细胞散在或成群分布。阳性部位主要位于细胞膜表面,偶见于质膜下的细胞质内。三种抗原在细胞表面的分布有所不同。CD44 阳性反应细胞较多,阳性反应区多呈环状,半月状,亦见有帽状及斑片状(图 1, Figure 1),胞质内偶见阳性反应。CD11b 阳性反应细胞较少,但阳性反应较强,且多呈深桃红色(图 2, Figure 2),阳性区多呈环状和斑片状,偶见有帽状及斑片状,胞质内可见较多的阳性反应区。决大多数单核细胞均呈 Vn 反应阳性,多呈粉红色,少数为桃红色,阳性反应区散在分布于整个细胞表面,呈点状或颗粒状,偶见有斑片状(图 3, Figure 3)。

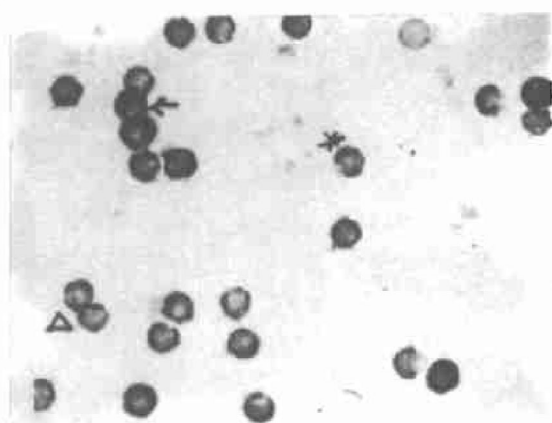


Figure 1. The distribution of CD44 on the mononuclear cells. Display a ring ( $\uparrow$ ), semilunar (\*), or spot-flat( $\Delta$ ) shape.

### 2.2 抗原的定量检测

从表 1(Table 1)中可见各细胞因子实验组与空白对照(Blank)组之间抗原表达量(Sum 值)的差异及不同抗原组(既 CD44、CD11b、Vn)之间 Sum 值的差异。不同细胞因子对不同抗原的上调作用不同,其中 IL-6 对 CD44 的上调作用最强,TNF 则对 CD11b 的上调作用最强;IL-6、TNF 均可上调 Vn 的表达,但在冠心

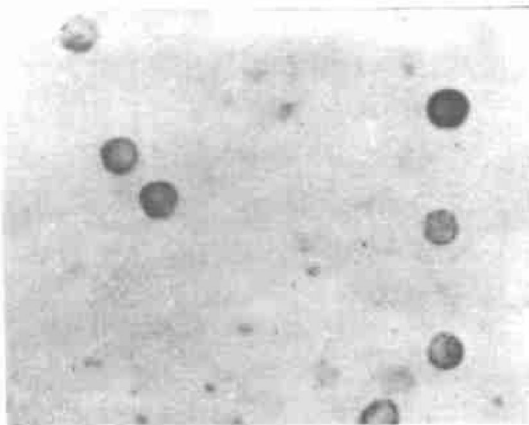


Figure 2. The distribution of CD11b on the mononuclear cells.

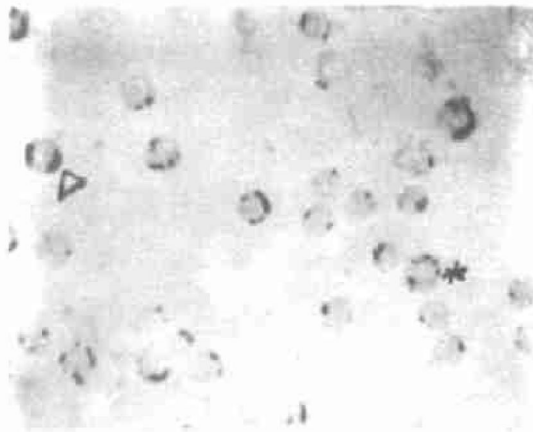


Figure 3. The distribution of Vn on the mononuclear cells. Display a drop granular (\*), seldom spot-flat (Δ) shape.

病时 IL-6 对 Vn 的上调作用明显增强。

2.3 各因素影响抗原表达的析因分析

析因分析结果见表 2(Table 2)。结果表明：  
①A 因素两水平之间有差异( $P<0.001$ )，表明两组单核细胞表面粘附相关蛋白表达量不同，冠心病组高于正常人群组。  
②B 因素 3 个水平之间有差异( $P<0.001$ )，表明 CD44、CD11b 和 Vn 三种抗原在细胞表面表达的量不同。  
③C 因素 5 个水平之间有差异( $P<0.001$ )，其中不加细胞因子组抗原表达量明显低于其它加细胞因子组(表 1, Table 1)，表明细胞因子对粘附相关蛋白的表达有上调作用。  
④A、C 两因素间有交互作用( $P<0.001$ )，表明 C 因素对 A 因素的两

Table 1. Sum value of CD11b, CD44, Vn from image analysis system ( $2 \times 3 \times 4$  factorial design) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

Group		CD44	CD11b	Vn
Control	Blank	300±16	61±18	58±19
	IL-1	904±39	319±42	100±12
	IL-6	1 096±131	407±61	122±15
	TNF	351±53	469±48	195±24
	IFN-α	630±14	136±14	103±1
CHD	Blank	562±25	94±6	100±7
	IL-1	921±48	197±11	352±16
	IL-6	1 310±96	318±29	272±34
	TNF	771±106	439±61	190±27
	IFN-α	591±37	79±18	161±16

Table 2. Result of factorial design variance analysis.

OV	df	$\bar{X}^2$	F	P
A	1	503217.36	7.0903	0.0142
B	2	3893320.27	454.3700	0.0000
C	4	563499.3904	65.7632	0.0000
A×B	2	62822.9308	7.3318	0.0011
A×C	4	37355.9027	1.3596	0.0029
B×C	8	225222.9762	26.2874	0.0000
A×B×C	8	67929.1600	7.9277	0.0000

个水平的上调作用是不同的。细胞因子上调冠心病组粘附蛋白表达的作用高于正常人群组，表明冠心病病人粘附蛋白表达对细胞因子的敏感性升高。  
⑤A、B 两因素间有交互作用( $P<0.001$ )，表明 B 因素对 A 因素的两个水平作用不同，即冠心病组粘附相关蛋白升高的幅度明显高于正常人组。  
⑥A、B、C 三因素间有交互作用( $P<0.001$ )，表明不同的细胞因子对于不同的粘附蛋白在正常人群和冠心病时期作用均不相同。

3 讨论

单核细胞参与动脉粥样硬化病变的过程已勿容置疑，而其机制尚不清楚，尤其是单核细胞是如何从血循环中进入到病变处，这一直是一个难解之谜。新近的研究表明，粘附蛋白和粘附分子在单核细胞的粘附过程中起着重要的作

用。其中研究较多的为 CD44、CD11b 和 Vn; 尤其是 CD11b, 有人已将其作为单核细胞粘附性升高的临床指标。有人提出, 可能有一种特殊的单核细胞由血流进入病灶中, 这种细胞可能是表面抗原发生变化了的细胞, 但这很难说明病灶中分化不同阶段的单核巨噬细胞是在骨髓中演变的还是病灶本身刺激的结果。

本实验观察到冠心病人和正常人外周血单核细胞表面均有粘附相关蛋白表达, 但冠心病组高于正常组; 当细胞因子作用于单核细胞后, 两组人群单核细胞表面的粘附蛋白的表达量均有升高, 但冠心病组升高的幅度大于正常人组, 表明冠心病单核细胞对细胞因子刺激的敏感性增强, 这种敏感性的增强可能是由于某些因素使冠心病单核细胞表面粘附相关蛋白处于一种轻度表达或潜在表达的敏感状态, 但在一般情况下并无过度表达, 一旦局部有细胞因子刺激, 处于敏感状态的单核细胞便大量表达粘附相关蛋白, 使单核细胞大量特异地粘附于动脉病变处。已有实验观察到, 在动脉粥样硬化斑块部位细胞因子增多<sup>[4~6]</sup>, 这一结果支持我们的推测。

结合目前的实验结果, 我们初步认为, 外周血单核细胞参与动脉粥样硬化病变的过程, 包括淋巴细胞的调节作用和单核细胞转变成巨噬细胞, 最终形成动脉粥样硬化病灶处的泡沫细胞。这些变化既需要体内环境因素的调节, 如血脂、血压及血液动力学的变化等, 也需要动脉粥

样硬化局部细胞因子的诱导; 亦不能排除某些遗传因素使粘附蛋白在单核细胞表面表达的敏感性升高, 即使如此如无机体内环境的变化和细胞因子的诱导, 也不会发生动脉粥样硬化的病变。因此, 从不同的阶段改变单核细胞转变的条件, 如改变机体内环境, 或用细胞因子及抗体调节粘附蛋白的表达, 有可能控制动脉粥样硬化病变的发生和进展。

#### 参考文献

- 1 Faruqi RM, Dicorleto PE. Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *Br Heart J*, 1993, **69**: S19.
- 2 安靓, 李进. 单核细胞的血管壁募集. *生理科学进展*, 1995, **26**(2): 121.
- 3 安靓, 李进. 冠心病个体核白细胞表面粘附相关蛋白的表达. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4**(1): 12.
- 4 Tipping PG. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atherosclerosis plaques. *Am J Pathol*, 1993, **142**: 172.
- 5 Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme[see comments]. *Am J Pathol*, 1995, **147**(2): 251.
- 6 Szekanecz Z, Shah MR, Pearce WH, et al. Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4; the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. *Agents Actions*, 1994, **42**(3~4): 159.

(1998-02-11 收稿, 1998-07-10 修回。编辑: 朱雯霞)