

吸烟鼠脑血管内皮细胞间粘附分子 1 的表达在动脉粥样硬化形成中的作用

柳忠兰, 孙大勇, 冯 昱, 拱忠影, 耿建红

(中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 吸烟在动脉粥样硬化形成中的影响; 原位杂交; 吸烟; 脑动脉粥样硬化; 内皮细胞; 细胞间粘附分子 1

[摘要] 为观察吸烟对大鼠脑血管内皮细胞超微结构、细胞间粘附分子 1 表达的影响, 建立大鼠吸烟动物模型, 将 75 只大鼠随机分为长期大量组、长期小量组、短期大量组、戒烟组 and 对照组, 免疫组织化学和原位杂交结合显微图像分析系统检测大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 的表达; 电镜观察内皮细胞超微结构的改变。结果发现, 吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 表达增加 ($P < 0.05$), 与吸烟量和时程存在剂量-效应关系; 内皮细胞超微结构改变显著。戒烟鼠细胞间粘附分子 1 表达下调 ($P > 0.05$), 内皮细胞超微结构病理改变明显恢复。结果提示, 吸烟致脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 表达上调可能是吸烟导致动脉粥样硬化的分子机制之一。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Effect of Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Atherosclerosis in Cerebral Vascular Endothelial Cell of Cigarette Smoking Rat

LIU Zhong-Lan, SUN Da-Yong, FENG Yu, GONG Zhong-Ying, and GENG Jian-Hong

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Cigarette Smoking; Cerebral Atherosclerosis; Endothelial Cell; Intercellular Adhesion Molecule-1; Ultrastructure; Electron Microscope

[ABSTRACT] **Aim** To investigate effect of cigarette smoking on morphology and expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-1 mRNA in vascular endothelial cells of rats' brains and to further explore influence of cigarette smoking on atherogenesis. **Methods** 75 male Wistar rats were randomly subgrouped into long-term massive, short-term massive, long-term trifle, anti-smoking and normal control group. Immunohistochemistry technique, in situ hybridization technique and pathologic image analyzing system were used to determine the expression of ICAM-1, ICAM-1 mRNA in rats' cerebral vascular endothelial cells. **Results** In contrast to normal control group, expression of ICAM-1, ICAM-1 mRNA in rats' cerebral vascular endothelial cells increased in smoking (103.7 ± 3.9 vs 99.7 ± 7.1 vs 92.6 ± 5.2 vs 94.8 ± 5.1 vs 84.2 ± 4.7 for the mean gray value of ICAM-1 mRNA staining in normal control, anti-smoking, short-term massive, long-term trifle, long-term massive group, respectively; $P < 0.05$), and ICAM-1, ICAM-1 mRNA were relevant to the duration and dose of smoking ($P < 0.05$). Expression of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA decreased after anti-smoking, and there was no significant difference compared with normal control group ($P > 0.05$). The structure of endothelial cells changed greatly in smoking, and partly recovered after anti-smoking. **Conclusion** The upregulation of expression of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA might be one of the important molecular mechanisms during the process of atherosclerosis in cigarette smoking rats.

吸烟是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成的可干预的危险因素之一。研究证明粘附分子在 As 的形成中起重要作用, 而吸烟对粘附分子表达的影响在 As 形成中的作用研究很少。本研究通过观察吸烟对大鼠脑血管内皮细胞超微结构变化以及对细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1,

ICAM-1) 及其 mRNA 表达的影响, 从分子水平探讨吸烟对 As 形成的机制。

1 材料和方法

1.1 吸烟模型

用角钢、有机玻璃及钢丝制成 $600 \text{ mm} \times 400 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ 吸烟鼠箱, 于鼠箱侧面斜对两侧各打双孔 (直径 10 mm, 间距 10 mm), 一侧双孔接双腔空气泵, 分别输入烟雾及空气; 一侧双孔通外界, 以确保箱内空气中氧浓度与外界相同。使用市售某品牌香烟。

1.2 实验动物及分组

[收稿日期] 2003-12-01

[修回日期] 2004-02-12

[基金项目] 卫生部科学研究基金 (98-1-196) 和辽宁省自然科学基金 (9810500303) 资助

[作者简介] 柳忠兰, 教授, 主要从事脑血管病发病机制研究, E-mail 为 liu_zhonglan@163.com。孙大勇, 硕士, 现在大连医科大学附属第一医院工作。冯昱, 硕士, 主要从事脑血管病研究。

健康雄性 Wistar 大鼠 75 只(中国医科大学实验动物中心提供), 体重 200~210 g。随机平均分为 5 组: 长期大量吸烟组(20 支/天, 吸 75 天)、长期少量吸烟组(8 支/天, 吸 75 天)、短期大量吸烟组(20 支/天, 吸 30 天)、戒烟组(20 支/天, 吸 45 天; 戒烟 30 天)及对照组(不吸烟)。

1.3 原位杂交检测细胞间粘附分子 1 mRNA

每组随机取 10 只大鼠, 常规灌注固定取脑, 于恒温冷切片机(-20°C)中行全脑连续冠状切片(厚 15 μm)。地高辛标记的多项寡核苷酸探针及地高辛检测试剂盒购于武汉博士得公司, 操作按说明书进行。DBA 充分显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 采用 OLYMPUS 数码相机进行图片采集, 退片, 苏木素复染。阴性对照: 杂交液中不加地高辛标记的探针; ④标本预先用 Rnase 处理。

1.4 细胞间粘附分子 1 免疫组织化学染色

一抗为兔抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体(Santa Cruz, USA), SABC 试剂盒购于博士得公司, 操作按说明书进行。阴性对照用 0.1 mol/L PBS 代替一抗。

1.5 透射电镜观察

每组余下 5 只大鼠。常规电镜样品制备程序固定, 取颈内、外动脉分叉处血管内皮组织, 脱水、包埋, 超薄切片, 醋酸铀和醋酸铅双重染色, 日立 H-600 透射电镜观察。

1.6 统计学处理

各组间进行方差分析及多重比较。

2 结果

2.1 细胞间粘附分子 1 及其 mRNA 的表达

与对照组相比, ICAM-1 mRNA、ICAM-1 染色平均灰度值在短期大量吸烟组、长期少量吸烟组和长期大量吸烟组明显降低($P < 0.05$); 与戒烟组相比, ICAM-1 mRNA、ICAM-1 染色平均灰度值在短期大量组和长期大量组明显降低($P < 0.05$); 且短期大量组与长期大量组及长期少量组与长期大量组之间表达有显著性差异($P < 0.05$), 见表 1、图 1 和 2(Table 1, Figure 1 and 2)。

2.2 血管内皮细胞超微结构变化

与正常对照组大鼠相比, 吸烟大鼠血管内皮细胞形态不完整, 胞浆基质疏松变淡, 线粒体空泡变性, 粗面内质网扩张, 内皮细胞间连接破坏, 靠管腔一侧异常微泡增多。上述变化以长期大量吸烟组为显著, 短期大量与长期少量组较轻微, 戒烟组改变不明显(图 3, Figure 3)。

表 1. 吸烟大鼠脑血管内皮细胞胞浆染色平均灰度

Table 1. The mean gray value of cerebral vascular endothelial cells in smoking rat ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	细胞间粘附 分子 1 mRNA	细胞间粘附 分子 1
对照组	104 $\pm$ 4	84 $\pm$ 4
戒烟组	100 $\pm$ 7	80 $\pm$ 7
短期大量吸烟组	93 $\pm$ 5 ^{ab}	73 $\pm$ 5 ^{ab}
长期少量吸烟组	95 $\pm$ 5 ^a	75 $\pm$ 5 ^a
长期大量吸烟组	84 $\pm$ 5 ^{abc}	64 $\pm$ 5 ^{abc}

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与戒烟组比较; c: $P < 0.05$, 与短期大量吸烟组和长期少量吸烟组比较。



图 1. 长期大量吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 mRNA 染色 (×400)

Figure 1. Expression of ICAM-1 mRNA on cerebral vascular endothelial cells in long-term massive smoking rat

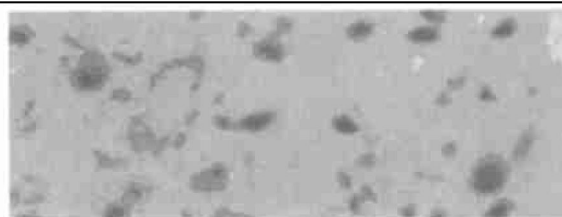


图 2. 长期大量吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 免疫组织化学染色 (×400)

Figure 2. Expression of ICAM-1 on cerebral vascular endothelial cells in long-term massive smoking rat by immunohistochemistry technique

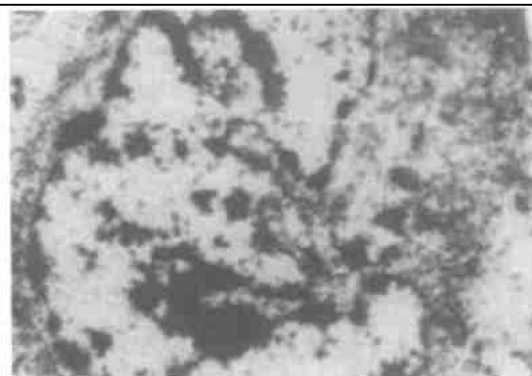


图 3. 长期大量吸烟大鼠血管内皮细胞电镜超微结构

Figure 3. Cerebral vascular endothelial cell morphology under electromicroscope in long-term massive smoking rat

3 讨论

动脉粥样硬化(As)被认为是一个慢性炎症过程,通过上调粘附分子如 ICAM-1、血管细胞粘附分子 1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)及 E-选择素的表达,使白细胞和巨噬细胞活动性、粘附力和转移力增强,是导致 As 的前提^[1,2]。在 As 形成早期,斑块区域 ICAM-1 表达增强。伴随 ICAM-1 高表达的同时,单核细胞和巨噬细胞明显地掺入到内皮组织中^[2]。故建议将血清中可溶性 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素作为考查 As 发展程度的临床指标^[2]。

正常情况下,ICAM-1 在脑组织微血管内皮细胞仅有少量表达。在脑组织受损,在内毒素及一些细胞因子刺激下,其在血管内皮表达明显增高^[3]。Schaberg 等^[4]报道吸烟可使肺小动脉内皮细胞 ICAM-1 表达增加。Adams 等^[5]发现吸烟能导致人类单核细胞与内皮细胞的粘附增强。本研究结果发现,除戒烟组外,各吸烟组 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 在脑动脉内皮细胞表达增加,其中长期大量吸烟组 ICAM-1 表达最多(染色最深)。不同的吸烟量和时程与 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 表达呈正相关。戒烟组 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 表达与对照组相比无显著性差异。透射电镜观察发现,长期大量吸烟组脑动脉内皮细胞改变最明显,内皮细胞的改变程度与吸烟量、时程呈正相关。戒烟组内皮细胞超微结构改变明显恢复。表明吸烟可以使脑动脉血管内皮细胞损害,脑动脉 ICAM-1 高表达,且随着吸烟时间、吸烟量增加,内皮细胞超微结构的改变及 ICAM-1 表达有加重和增加的趋势。戒烟后内皮细胞形态学改变明显恢复,ICAM-1 表达下降。

吸烟致血管内皮细胞超微结构改变及 ICAM-1 表达的确切机制尚不清楚。Davis 等^[6]发现尼古丁可使血管内皮细胞结构损害,使内皮细胞分泌和合成血管活性物质,刺激交感神经导致血管收缩而引起缺血。Petrik 等^[7]在动物实验中发现大量吸烟可促使颈内动脉内膜增厚。Simpson 等^[8]报道吸烟导致肢体动脉内皮细胞功能障碍。表明烟草中的有害物质致血管痉挛、缺血导致内皮细胞损伤,是 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 表达上调的主要原因。ICAM-1 表达上调可能是吸烟导致 As 的主要分子机制之一。

研究报道,高脂饮食大鼠血管壁内 ICAM-1 和 VCAM-1 表达较基础饮食大鼠显著增高^[9];自发性高血压大鼠缺血后血脑屏障内皮细胞 ICAM-1 mRNA 及免疫组织化学表达早且重于正常血压大鼠^[10]。

糖尿病死者视网膜及眼脉络膜血管 ICAM-1 表达均高于正常对照组^[11]。本研究结果与上述研究表明,各危险因素致 ICAM-1 升高在 As 的形成和进展中有重要意义。本研究中戒烟组大鼠 ICAM-1、ICAM-1 mRNA 表达较其他吸烟组明显下降,与正常对照组无显著性差异。内皮细胞超微结构仅有轻微改变。提示戒烟有利于血管内皮损害的修复。理论上应用 ICAM-1 单克隆抗体可抑制 ICAM-1 的作用,减轻白细胞浸润,减轻血管狭窄,防止脑血栓形成。Zhang 等^[12]报道应用抗 ICAM-1 单克隆抗体使大脑中动脉闭塞鼠的病灶体积缩小,白细胞浸润减轻。文献报道应用大豆异黄酮使 ICAM-1 表达降低。提示抑制 ICAM-1 表达,可减轻和控制 As 形成和发展。

戒烟、抗 ICAM-1 抗体及内皮细胞保护剂的应用可预防吸烟条件下 As 和脑血栓形成。哪种方法更方便、效果更好,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 全智华, 杨向东, 刘江华, 张彤. 氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡时细胞粘附分子 1 的表达时序. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (5): 385-387
- [2] Porsch Oezcuertuenez M, Kunz D, Kloer HU, Luley C. Evaluation of serum levels of solubilized adhesion molecules and cytokine receptors in coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 34: 1995-2001
- [3] Sobel RA, Mitchell ME, Fondren G. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reaction in the human central nervous system. *Am Pathol*, 1990, 136: 1309-316
- [4] Schaberg T, Rau M, Oerter R, Liebers U, Rahn W, Kaiser D, et al. Expression of adhesion molecules in peripheral pulmonary vessels from smokers and non-smokers. *Lung*, 1996, 174: 71-81
- [5] Adams MR, Jessup W, Celebmajer DS. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cell: Reversibility with oral L-arginine but not Vitamine C. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 29: 491-497
- [6] Davis GW, Sherton L, Eigenberg DA, Hignite CE. Lack effect of aspirin on cigarette smoke induced increase in circulating endothelial cells. *Haemostasis*, 1987, 17: 66-69
- [7] Petrik PV, Gelabert HA, Moore WS, Quinones BW, Law MM. Cigarette smoking accelerates carotid artery intimal hyperplasia in a dose-dependent manner. *Stroke*, 1995, 26: 1409-414
- [8] Simpson AJ, Gray RS, Moore NR, Booth NA. The effect of chronic smoking on the fibrinolytic potential of plasma and platelets. *British Journal of Haematology*, 1997, 97: 208-213
- [9] 张玉梅, 刘颖, 藤燕平, 邱隽, 崔洪斌. 大豆异黄酮对大鼠实验性粥样硬化动脉壁内粘附分子基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 11 (1): 13-16
- [10] Wang XK, Siren AL, Liu Y, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Mol Brain Res*, 1994, 26: 61-68
- [11] Mcleod DS, Lefer DJ, Merges C, Luffy GA. Enhanced expression of intercellular adhesion molecule 1 and P-selectin in the diabetes human retina and choroids. *Am J Pathol*, 1995, 147: 642-653
- [12] Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, Zhang ZG, Jiang N, Gautam SC. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res*, 1995, 682: 182-188

(此文编辑 文玉珊)