

细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义

梁 萍, 孙 雷¹, 唐建武¹, 王翀²

(阜新卫生学校内科学教研室, 辽宁省阜新市 123000; 1. 大连医科大学病理学教研室, 辽宁省大连市 116022; 2. 营口市中心医院干部病房, 辽宁省营口市 115000)

[关键词] 病理学; 动脉粥样硬化; 细胞间粘附分子 1; 血管细胞粘附分子 1; 肿瘤坏死因子 α

[摘要] 为研究细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人正常冠状动脉与冠状动脉粥样硬化组织中的表达及病理学意义, 采用免疫组织化学 SP 法, 分别检测细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人正常冠状动脉与冠状动脉粥样硬化组织中的表达情况。结果发现, 细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在动脉粥样硬化组织中的内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞均有表达。三者血脂纹期的表达分别为 50.0 ± 10.9 、 51.8 ± 6.0 和 13.9 ± 2.8 , 在纤维斑块期分别为 23.1 ± 7.3 、 37.2 ± 9.7 和 23.0 ± 6.0 , 在粥样斑块期分别为 17.5 ± 4.9 、 18.6 ± 5.5 和 38.0 ± 10.0 , 明显高于对照组 (2.2 ± 1.4 、 2.2 ± 1.2 和 7.8 ± 2.2 , 分别为 $P < 0.01$)。细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 与肿瘤坏死因子 α 呈正相关 (前者 $r = 0.344$, $P < 0.01$, 后者 $r = 0.52$, $P < 0.01$)。实验结果提示, 细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 在内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞高表达可能参与动脉粥样硬化发生发展过程中的某些环节。肿瘤坏死因子 α 的表达与细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达及动脉粥样硬化病变程度具有相关性。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, Tumor Necrosis Factor- α in Atherosclerosis Immunohistochemistry Examination

LIANG Ping, SUN Lei², TANG Jianwu², and WANG Chong

(1. Department of Internal Medicine, Fuxing Sanitary School, Fuxing 123000, 2. Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian 116022, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Intercellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Tumor Necrosis Factor- α

[ABSTRACT] **Aim** To estimate the expression and significance of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human normal coronary artery and coronary atherosclerosis. **Methods** SP immunohistochemical technique was utilized to measure the expression of ICAM-1, VCAM-1, TNF- α in normal coronary artery and coronary atherosclerosis respectively. Analyses were performed on SPSS 10.0. **Results**

The expressions of ICAM-1, VCAM-1 and TNF- α were on endothelial cell, smooth muscle cell and macrophage of atherosclerosis. They were expressed individually as 50.0 ± 10.9 , 51.8 ± 6.0 , 13.9 ± 2.8 in fatty streak period, 23.1 ± 7.3 , 37.2 ± 9.7 , 23.0 ± 6.0 in fibrous plaque period, 17.5 ± 4.9 , 18.6 ± 5.5 , 38.0 ± 10.0 in atheromatous plaque period. They were all significantly higher than those in healthy controls (all $P < 0.01$). There was positive correlation in ICAM-1, VCAM-1 and TNF- α ($r_1 = 0.344$, $P_1 < 0.01$; $r_2 = 0.52$, $P_2 < 0.01$). **Conclusion** The expression of ICAM-1, VCAM-1 and TNF- α in endothelial cell, smooth muscle cell and macrophage of experimental group implied they partook the certain link of progression in atherosclerosis. Expression of TNF- α was related to ICAM-1, VCAM-1 and degree of atherosclerosis.

近年来, 随着研究的逐步深入, 一些化学因子和细胞因子不断被检出, 认为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是炎症的观点被重新提出, As 的表现符合炎症的普遍规律^[1], 即可见组织细胞的变性和坏死、白细胞的粘附、渗出和平滑肌细胞 (smooth muscle

cell, SMC) 的增殖。细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 在白细胞粘附于血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 表面并进入内皮下及 SMC 增殖中起到重要作用^[2]。文献 [3, 4] 报道, 一些细胞因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等是细胞粘附分子表达的强效诱导剂, 加速了 As 发生和发展过程。我们应用免疫组织化学 SP 法, 分别检测 ICAM-1、VCAM-1

[收稿日期] 2003-11-21

[修回日期] 2004-06-14

[作者简介] 梁萍, 硕士研究生, 高级讲师。孙雷, 博士, 副教授。唐建武, 教授, 博士研究生导师。

和TNF- α 在人冠状As中的表达情况,以分析它们在As发病中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集57例2000~2002年间尸检冠状动脉蜡块标本,年龄21~76岁,平均 48.6 ± 17.2 岁。

1.2 常规病理学检查及分组

将HE染色切片在显微镜下观察,根据其基本病变的形成将病例分为4组:血管内膜腔面光滑、完整,主要由单层EC构成,中膜主要是由血管SMC构成;此为正常组,有11例。发现As病灶,且病灶处EC下有大量泡沫细胞聚集及较多基质;此为脂纹组,有8例。若病灶表层由大量胶原纤维、血管SMC等形成纤维帽,胶原纤维变性;纤维帽下方有不等量的泡沫细胞、SMC、细胞外基质及炎症细胞;个别可见脂质池及肉芽组织;此为纤维斑块组,有15例。若病灶为玻璃样变性,且在玻璃样变性的纤维帽深部,有大量粉红色的无定形物质,其中可见胆固醇结晶及钙化;粥样处中膜SMC受压萎缩、弹性纤维破坏,中膜变薄;此为粥样斑块组,有23例。

1.3 试剂

鼠抗人ICAM-1单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司,兔抗人VCAM-1多克隆抗体及兔抗人TNF- α 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,SP超敏试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。三种抗体均为浓缩型,其工作浓度为1:100。

1.4 免疫组织化学检测

1.4.1 切片 将蜡块连续切片,片厚5 μ m。

1.4.2 染色 采用SP法,石蜡切片脱蜡和水化后,3% H_2O_2 -甲醇消化内源性过氧化物酶的活性,修复抗原(其中VCAM-1采用煮沸热修复,ICAM-1采用胰酶修复,TNF- α 不需修复),滴加0.5%小牛血清白蛋白封闭非特异性抗体,滴加稀释的一抗,滴加生物素化的二抗,滴加链霉菌抗生物素蛋白——过氧化物酶,DAB显色。苏木素轻度复染,脱水、透明,中性树胶封片。显微镜下观察结果。

1.4.3 检测判定方法 在胞膜或胞浆处有棕黄色或棕褐色颗粒状物质,呈网格状或环状沉淀者为阳性细胞。在高倍显微镜下(10×40)任选10个视野,分别计数ICAM-1、VCAM-1和TNF- α 的阳性细胞数,计算平均值。

1.5 统计学方法

应用SPSS10.0统计软件中的秩和检验及相关

检验。

2 结果

2.1 粘附分子和肿瘤坏死因子在冠状动脉中的分布特点

检测发现,ICAM-1在EC、SMC和巨噬细胞的细胞膜及部分胞浆中表达,在脂纹期表达最高。VCAM-1在脂纹期的EC和进展性纤维斑块SMC的胞浆内表达明显。TNF- α 在巨噬细胞、EC和SMC的胞浆中表达,在各期病变中表达量逐渐增加。

2.2 冠状动脉中表达粘附分子和肿瘤坏死因子的阳性细胞数

在冠状As病变各期中,ICAM-1和VCAM-1表达的阳性细胞数均在脂纹期最多,与正常冠状动脉比较差异非常显著($P < 0.001$)。在纤维斑块期与粥样斑块期有逐渐减少的趋势,与正常冠状动脉比较仍有显著性差异($P < 0.01$)。两种粘附分子在冠状As病变各期的表达均有显著性差异(表1, Table 1)。从正常冠状动脉、到As病变的脂纹期、纤维斑块和粥样斑块,TNF- α 的表达呈递增趋势,病变各期与正常组相比均有显著性差异($P < 0.01$),病变各期之间两两比较,TNF- α 的表达也有差异(表1, Table 1, $P < 0.05$)。

表1. 冠状动脉表达细胞间粘附分子1、血管细胞粘附分子1和肿瘤坏死因子 α 的阳性细胞数(个/每视野, $\bar{x} \pm s$)

Table 1. The numbers of cells of ICAM-1, VCAM-1, and TNF- α per sight expressed in coronary artery and every period of atherosclerosis

分组(期)	例数	ICAM-1	VCAM-1	TNF- α
正常组	11	2.2 ± 1.4	2.2 ± 1.2	7.8 ± 2.2
脂纹期	8	50.0 ± 10.9^c	51.8 ± 6.0^c	13.9 ± 2.8^a
纤维斑块	15	23.1 ± 7.3^{bc}	37.2 ± 9.7^{bc}	23.0 ± 6.0^{bc}
粥样斑块	23	17.5 ± 4.9^{bf}	18.6 ± 5.5^{bh}	38.0 ± 10.0^{dh}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, 与正常组比较; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, 与脂纹期比较; h: $P < 0.05$, 与纤维斑块期比较。

2.3 粘附分子与肿瘤坏死因子表达的相关性

对全部病例ICAM-1、VCAM-1与TNF- α 的表达进行相关性检验。结果发现,ICAM-1和VCAM-1的表达与TNF- α 的表达呈正相关(前者 $r = 0.344$, $P < 0.01$; 后者 $r = 0.52$, $P < 0.01$)。

3 讨论

动脉内皮损伤引起 EC 表面粘附性改变, 表达粘附分子, 促进单核细胞粘附, 是 As 形成的始动环节^[5]。单核细胞迁移进入内皮下层, 转化为巨噬细胞, 摄取脂质转化为泡沫细胞, 并向淋巴细胞提供抗原, 触发局部免疫反应; 同时释放多种细胞因子, 促进 SMC 表型转化和增殖, 形成纤维斑块^[6]。

粘附分子以配体-受体形式发挥作用, 导致细胞间或细胞与基质间的粘附其中 ICAM-1 和 VCAM-1 均为免疫球蛋白超家族成员, ICAM-1 主要表达于单核细胞、EC 和 SMC 等细胞表面, 其配体为淋巴细胞功能相关抗原 1 (lymphocyte function-related antigen 1, LFA-1) 和巨噬细胞分化抗原 1 (macrophage differentiation antigen 1, MAC-1); 而 VCAM-1 只在活化的血管 EC 表达, 配体为极晚抗原 4 (very late antigen 4, VLA-4)。正常状态下, 它们呈低表达或不表达。当病变局部的细胞因子如 TNF- α 、白细胞介素 1 和 γ 干扰素等释放时, 血管 EC 被激活, 表达 ICAM-1 和 VCAM-1^[7]; 促进单核细胞与 EC 粘附和迁移^[8], 进而形成 As。本实验应用免疫组织化学 SP 法检测人正常冠状动脉与冠状 As 组织中 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达发现, As 组织中 ICAM-1 及 VCAM-1 表达均较正常组显著增高, 具有统计学意义 ($P < 0.01$), 进一步证明粘附分子在 As 的发生发展中起着重要作用, 与文献 [9-11] 报道一致。ICAM-1 在脂纹期表达量最大, 主要表达于 EC, 可能与单核细胞向内皮的粘附及迁移有关; 而 SMC 和巨噬细胞表达 ICAM-1 可能有助于单核细胞在组织中的游走。VCAM-1 主要表达于 As 形成早期的 EC, 作用与 ICAM-1 相似, 可能更进一步促进单核细胞向内皮粘附和迁移。在进展期病变中, 动脉腔面内皮表达 VCAM-1 逐渐降低, 在粥样斑块时呈最低水平或消失, 主要以 SMC 表达为主, 这时其作用是促进已迁入病灶的单核细胞激活分化成巨噬细胞, 进而聚集脂质而转变成泡沫细胞形成 As; 并促进 T 淋巴细胞激活, 增加与细胞间的相互作用。形成更多的巨噬细胞, 逐渐使 SMC 从血管中层向内膜下移行和增殖, 促使病变进一步发展。

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一种主要由单核巨噬细胞释放的细胞因子, 对多种细胞的生长、分化和功能具有抑制或刺激的多重效应, 还能以自分泌的机制对产生的细胞进行有效的调节, 其主要生物学活性为引起炎症反应和抗肿瘤^[12]。同时血管 EC、血管 SMC 亦可分泌 TNF- α , 可能与 As 的形成与发展有密切关系^[13]。研究发现, TNF- α 在 As 中表达明显高于正常动脉壁, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在

As 各期病变中 TNF- α 的表达呈逐渐增高的趋势, 并且增加的幅度具有统计学意义 ($P < 0.05$), 即其增高程度与 As 的严重程度一致, 表明 TNF- α 参与 As 的发生并促进其发展。经相关分析显示 TNF- α 与 ICAM-1 和 VCAM-1 在 As 中的表达均呈正相关, 因而提示 TNF- α 的表达与 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达以及 As 病变程度具有相关性。

总之, As 的发生发展是一个复杂的过程, 而对粘附分子及细胞因子在 As 发病中的重要性认识仍处于初始阶段, 许多机制尚不明确, 有待进一步研究和探讨。随着对粘附分子及其相关细胞因子在 As 发病中研究的不断深入, 利用基因工程手段研制各种 ICAM-1、VCAM-1 单抗和抑制粘附分子表达合成的药物, 以及封闭粘附分子有关配体的人工合成药物有可能为临床防治 As 提供新的途径。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115-126
- [2] Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*, 1998, **351**: 88-92
- [3] Hamilos DL, Leunig DY, Wood R. Eosinophil infiltration in nonallergic chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (CHS/MP) is associated with endothelial VCAM-1 upregulation and expression of TNF- α . *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, **15**: 443-450
- [4] Mullol J, Xaubet A, Loper E. Eosinophil activation by epithelial cells of the respiratory mucosa, comparative study of normal mucosa and inflammatory mucosa. *Med Clin Barc*, 1997, **31** (1): 6-11
- [5] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362** (6423): 801
- [6] O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1993, **92** (2): 945-951
- [7] Cybulyk ML, Fries JN, Williams AJ. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherosclerosis. *Science*, 1991, **251**: 788-795
- [8] Tingsgaard PK, Larsen PL, Bock T. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on the vascular endothelium in nasal polyps before, during and after topical glucocorticoid treatment. *Acta Otolaryngol*, 1998, **118** (3): 404-408
- [9] 邹飞雁, 邓仲端, 瞿智玲, 倪娟. 脂质过氧化损伤诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达细胞间粘附分子 1. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 109-111
- [10] 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*, 2003, **11** (1): 13-16
- [11] 高琳琳, 翟同钧, 陈融, 王建丽, 李莉, 胡维诚, 等. 外膜炎症诱发载脂蛋白 E 基因敲除鼠冠状动脉粥样硬化病灶. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 415-418
- [12] Costa JJ, Matossian K, Resnick MB. Human eosinophils can express the cytokine tumor necrosis factor- α and macrophage inflammatory protein α . *J Clin Invest*, 1993, **91**: 2 673-684
- [13] 孙宁, 陈小毅, 吴枫. 在促癌剂 TPA 协同下人胚鼻咽上皮的 EB 病毒体外转染和形态学改变. *中华肿瘤杂志*, 1995, **17** (1): 15

(此文编辑 胡必利)