

诱导型环氧合酶在人冠状动脉粥样硬化组织中的表达分布

李洪涛¹, 陈倩², 吴宗贵¹, 梁春¹, 潘晓明¹, 樊民¹, 陆慧琦³, 屠小卿³

(1. 上海长征医院心内科, 上海市 200003; 2. 解放军总医院老年心内科, 北京市 100853;

3. 上海长征医院病理科, 上海市 200003)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化; 斑块; 诱导型环氧合酶; 环氧合酶 2

[摘要] 为探讨诱导型环氧合酶在人冠状动脉不同动脉粥样硬化病变类型间的分布。收集 15 例尸检的人冠状动脉共 45 个标本, 根据 HE 染色病理特征及 AHA 标准分为 3 组, 其中正常冠状动脉对照 3 个; 纤维斑块或 (I) 型病变 (稳定斑块) 标本 22 个; 粥样硬化斑块伴有不同程度炎症反应的复合斑块或 V 型病变 (不稳定斑块) 冠状动脉标本 20 个。分别采用免疫组织化学染色和逆转录聚合酶链反应方法, 检测诱导型环氧合酶蛋白和 mRNA 在以上不同类型标本中的分布表达。结果发现, 诱导型环氧合酶主要表达分布于动脉粥样硬化组织斑块区, 在复合斑块中诱导型环氧合酶的表达明显高于纤维斑块 (诱导型环氧合酶灰度值 147.0 ± 1.1 比 56.2 ± 4.4 , $P < 0.01$), 而在非斑块区和正常冠状动脉中均未检测到诱导型环氧合酶的表达。结果提示, 诱导型环氧合酶参与了动脉粥样硬化病理发生以及斑块稳定性中炎症反应的调控过程, 抑制斑块局部诱导型环氧合酶的高表达, 有望成为治疗动脉粥样硬化及稳定斑块的重要靶点。

[中图分类号] 541.3

[文献标识码] A

Distribution of Induced Cyclooxygenase Expression in Atherosclerotic Coronary Artery

LI Hong-Tao¹, CHEN Qian², WU Zong-Gui¹

(1. Department of Cardiology, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003; 2. Department of Geriatric Cardiology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Plaque; Cyclooxygenase 2; COX-2

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the distribution of induced cyclooxygenase (COX-2) expression in human coronary arteries with different atherosclerotic lesions. **Methods** 45 coronary arteries specimens from 15 autopsy cases were divided into 3 groups according to pathologic features of HE staining and AHA definition respectively, which were 3 healthy coronary arteries as control, 22 fibrotic plaque or type (I) lesion specimens (representing stable plaque), and 20 complicated plaque or type V lesion specimens (representing unstable plaque). RT-PCR were performed for mRNA analysis, and immunohistochemical staining were used for location of protein. **Results** COX-2 was found in the areas of plaques but not in healthy or nonatherosclerotic vascular walls. COX-2 expression in complicated plaques was significantly higher than in fibrous plaques (COX-2 expression 147.0 ± 1.1 vs 56.2 ± 4.4 , $P < 0.01$). **Conclusions** These findings suggests that COX-2 might play a role in pathogenesis of atherosclerosis, and modulation of inflammatory process involved in plaque stability. Inhibition of COX-2 over expression in plaque areas might be a potential approach to atherosclerosis treatment and plaque stabilization.

目前动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种炎症反应性疾病的观点已得到普遍的认同^[1]。炎症反应是内在和外危险因素致 As 发病, 尤其是斑块不稳定发生破裂的中介和中心环节, 它贯穿于从白细胞粘附引起内皮损伤到粥样斑块破裂过程的各个阶段。诱导型环氧合酶 (cyclooxygenase 2, COX-2) 在各种炎症性疾病的发生中均起着极为重要的作用^[2]。近年的病理研究证实, 在人颈总动脉及主动脉 As 病

变中存在 COX-2 的高表达^[3,4], 抑制 COX-2 可明显减少 LDLR^{-/-} 小鼠早期 As 病变的形成^[5]。这表明 COX-2 在 As 病理发生机制中起重要的作用^[6]。有关 COX-2 在人冠状动脉不同 As 病变类型间分布表达的研究尚不多见, 为此我们在已收集的人尸检冠状动脉标本中就此进行了研究。

1 材料和方法

1.1 标本来源

选取 2000~2002 年间于上海长征医院病理科尸检的人冠状动脉, 共 15 例 (男性 10 例、女性 5 例), 年龄 25~76 (平均 62.5 ± 13.9) 岁。其中 1 例死于外伤、3 例死于急性心肌梗死 (均为男性)。生前

[收稿日期] 2004-03-20

[修回日期] 2004-09-01

[作者简介] 李洪涛, 博士研究生, 主要从事炎症与动脉硬化关系的基础研究。陈倩, 博士后, 主要从事老年心脏病学研究。吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事炎症与动脉粥样硬化关系方面的研究, 本文通讯作者, 联系电话 021-63610109-73201, E-mail 为 zong-gw@memmail.com.cn。

患冠心病者 10 例, 其中稳定型心绞痛 4 例、不稳定型心绞痛和心肌梗死 6 例。

1.2 组织块处理及分组

分离所有病例的主要冠状动脉, 包括左冠状动脉前降支、回旋支, 右冠状动脉。标本经固定、脱钙、石蜡包埋后, 切片按常规方法进行 HE 染色。根据病史、光镜观察结果及 HE 染色病理特征, 参照 AHA 组织学分类标准^[7]将标本分为复合斑块组、纤维斑块组和正常对照组。其中复合斑块相当于 V 型病变, 为表面破损、伴有血栓形成、或伴有炎细胞浸润的斑块; 无上述表现者为纤维斑块, 可伴有或不伴有脂核, 并有不同程度的钙化, 相当于 II 型病变。部分标本液氮冷冻后用于逆转录聚合酶链反应。

1.3 免疫组织化学染色

3 个正常冠状动脉、20 个纤维斑块和 22 个复合斑块标本采用 ABC 免疫组织化学染色试剂盒 (Vector 公司) 进行常规免疫组织化学染色。组织切片脱蜡至水, 微波炉加热暴露抗原, 3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶, 3% 兔血清封闭非特异抗原, 羊抗人 COX-2 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司) 为一抗, 兔抗羊 IgG 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司) 为二抗, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素衬染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测

提取冷冻冠状动脉标本的总 mRNA, 以 GAPDH 作为内参照, 进行逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检

测。引物序列如下: GAPDH (522 bp) 的正义链为 5'-TTAGCACCCTGGCCAAGG-3', 反义链为 5'-CT-TACTCCITGGAGGCCATG-3'; COX-2 (276 bp) 的正义链为 5'-CCTGGTCTGATGATGTATGC-3', 反义链为 5'-GTGTCAGGCAGAAGGGGATG-3'。GAPDH 的反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃ 45 s, 循环 25 次, 72℃ 延伸 5 min; COX-2 的反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃ 30 s, 循环 35 次, 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物 10 μL 经 2% 琼脂糖凝胶电泳后照像。计算机软件分析条带信号的面积和密度, 以同一样品的 GAPDH 信号值校正后比较。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以百分率表示, 分别采用方差分析和 χ^2 方检验进行比较。

2 结果

2.1 冠状动脉的显微结构

正常冠状动脉可见内膜光整, 内弹力板无增厚, 中膜由平滑肌细胞和成纤维细胞构成; 纤维斑块镜下表现为: 内膜下脂质沉积伴纤维细胞增生和纤维化, 少见成纤维细胞及增生的平滑肌细胞, 偶见炎性细胞浸润和新生的毛细血管; 复合斑块表现为: 斑块周边伴有明显的成纤维细胞, 平滑肌细胞增生及大量巨噬细胞、淋巴细胞浸润, 局部区域可见内膜损伤、血小板聚集及新生的毛细血管。

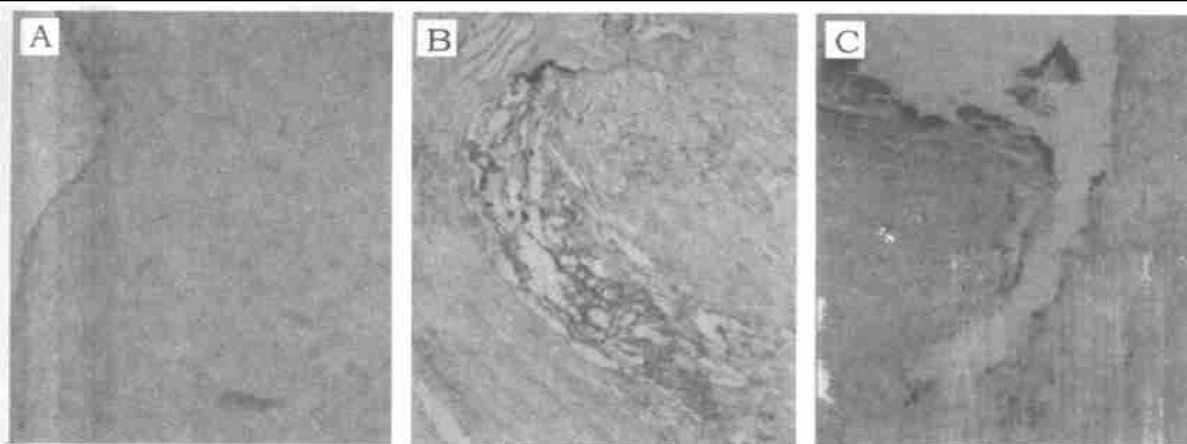


图 1. 冠状动脉标本环氧合酶 2 染色 A 为正常冠状动脉 (×200); B 为纤维斑块 (×40); C 为复合斑块 (×40)

Figure 1. COX-2 staining in coronary arteries

2.2 环氧合酶 2 的免疫组织化学检测结果

环氧合酶 2 染色阳性主要见于增殖的成纤维细胞, 平滑肌细胞以及浸润的炎性细胞, 定位于胞浆;

阳性细胞超过 50% 定为 + + +, 6% ~ 50% 为 + +, 5% 以下或轻度染色为 +, 无染色为阴性 (-)。正常冠状动脉组的 3 个标本中, COX-2 染色均呈阴性 (阳

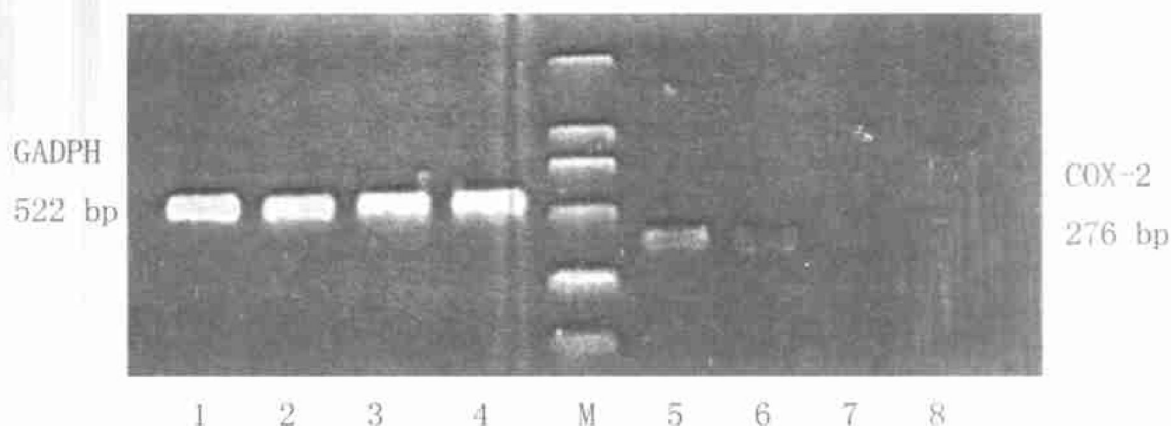


图 2. 冠状动脉标本环氧合酶 2 逆转录聚合酶链反应结果 1 和 5 为复合斑块, 2 和 6 为纤维斑块, 3 和 7 为非斑块区, 4 和 8 为正常冠状动脉

Figure 2. RT-PCR of COX-2 mRNA expression in different atherosclerotic lesions

性率为 0, 图 1A, Figure 1A)。22 个纤维斑块组的标本中仅有 5 个标本 COX-2 染色呈局灶性“+”(阳性率 22.7%), 其余均为阴性(图 1B, Figure 1B)。20 个复合斑块组的标本中, 5 个伴有轻度炎症, 15 个伴有重度炎症。轻度炎症组中, COX-2 染色呈 + ~ ++; 重度炎症组中, COX-2 染色均为 ++ ~ +++ (阳性率为 100%, 图 1C, Figure 1C)。复合斑块组 COX-2 染色阳性率明显高于纤维斑块组和正常冠状动脉组 ($P < 0.01$), 各组冠状动脉标本中 COX-2 表达的比较见表 1 (Table 1)。

表 1. 不同类型冠状动脉病变中环氧合酶 2 的表达

Table 1. The expression of COX-2 in different atherosclerotic lesions

分 组	—	+	++	+++	合计	阳性率
正常动脉	3	0	0	0	3	0
纤维斑块	17	5	0	0	22	22.7%
复合斑块						
轻度炎症	0	1	4	0	5	100%
重度炎症	0	0	7	8	15	100%
合计	20	6	11	8	45	55.6%

2.3 环氧合酶 2 的逆转录聚合酶链反应检测结果

如图 2 (Figure 2) 所示, 正常冠状动脉及粥样硬化冠状动脉非斑块区域未见 COX-2 mRNA 表达, 而在斑块区域可见 COX-2 mRNA 的表达, 其中复合斑块中 COX-2 mRNA 的表达明显高于纤维斑块, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2)。

表 2. 各组中环氧合酶 2 灰度值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2. The expression of COX-2 in different atherosclerotic lesions

分 组	COX-2 灰度值	GADPH 灰度值	校正 COX-2 灰度值
正常动脉	0	244.8 ± 29.9	0
非斑块区	0	217.8 ± 5.1	0
纤维斑块	56.2 ± 4.4	222.6 ± 7.6	25.3 ± 1.6 ^a
复合斑块	147.0 ± 1.1	221.6 ± 0.4	66.4 ± 1.1 ^a

a: $P < 0.001$, 与正常动脉和非斑块区比较。

3 讨 论

环氧合酶 (COX) 是花生四烯酸 (AA) 合成前列腺素 (PG) 过程的限速酶, 现已发现存在两种形式的 COX, 即组成型的 COX-1 和诱导型的 COX-2, 前者主要负责维护正常的生理功能, 后者多由炎症细胞因子诱导并在炎症部位表达。某些细胞因子 (如 IL-1 α 、TNF- α 、IL-6、血小板源生长因子以及血小板活化因子) 和机械刺激 (如血管的血流和纵向牵张力) 均可刺激 COX-2 在不同细胞或组织中表达。COX-2 主要存在于内质网中, 催化 AA 合成 PGG₂ 和 PGH₂, 再经不同的酶产生一系列具有生物效应的产物, 如在内皮细胞中由前列环素合成酶产生 PGI₂; 在其他组织中, 由各自的合成酶产生 PGE₂、PGD₂ 和 PGF₂ 等, 血小板则通过 COX-1 和血栓素合成酶产生 TXA₂^[8]。

动脉粥样硬化 (As) 过程是一个由众多炎症细胞及细胞因子参与在内的慢性炎症反应过程, 这些细胞因子包括 IL-1、IFN- α 、ox-LDL、自由基、内毒素、血小板衍生生长因子、以及粘附分子、趋化因子等等。基础研究证实, As 组织中的内皮细胞、血管平滑肌细胞以及炎症细胞受到炎症细胞因子刺激时, 均可

诱导 COX-2 的表达^[9]。Shiokoshi 等^[10]人发现 IL-1 β 可刺激大鼠血管平滑肌细胞表达 COX-2 并产生 TXA₂, 同时使 iNOS 和 NO 表达产生降低; CD44 可介导 RAW 264.7 巨噬细胞表达 COX-2^[11]; 动物实验和对人类标本的研究也发现了 COX-2 参与 As 进程的证据: 免疫组织化学和原位杂交的研究发现, Apo E 缺失小鼠的 As 病变处有 COX-2 的高表达^[12]。对人主动脉和颈总动脉标本的病理研究发现, 在正常动脉的内皮和中膜的血管平滑肌处有 COX-1 mRNA 和蛋白表达, 但无 COX-2 表达; 在 As 病变处既有 COX-1 也有 COX-2 的高表达, 且主要集中于斑块肩部的巨噬细胞和脂质核心周边, 内皮细胞和内膜、中膜的平滑肌细胞也有 COX-2 表达; 同时 As 病人尿中排泄的 TXA₂ 和 PGI₂ 代谢产物均较正常人升高^[3, 4, 13]。

这些研究结果提示 COX-2 不仅参与 As 的发生, 而且可能影响斑块的稳定性。但目前尚缺乏 COX-2 与不同斑块类型(相对稳定的纤维斑块和不稳定的复合斑块)间关系的更为细致的研究。为此我们在所收集的人冠状动脉 As 标本中, 重点观察了 COX-2 在纤维斑块和复合斑块中的表达分布。结果发现 COX-2 表达主要分布于 As 组织斑块区, 在富含炎症的复合斑块(不稳定斑块)中 COX-2 的表达明显高于纤维斑块(稳定斑块), 而在非斑块区和正常冠状动脉中均未检测到 COX-2 的表达。此研究结果进一步支持 COX-2 可能影响和/或调控斑块稳定性这一推论。粥样斑块中炎症介质和炎症细胞的异常增加是不稳定斑块的重要特征之一, 炎症可引起 COX-2 在斑块局部的高表达, 而后者参与炎症反应的进一步调控, 也可能互为因果。研究发现 COX-2 及其产物具有促进炎症反应的作用, 例如表达 COX-2 的巨噬细胞产生 PGE₂, 后者可以诱导炎症细胞因子 IL-6 产生; LDL 通过 COX-2 的表达介导人单核细胞产生趋化因子; CD40 配体的产生与 COX-2 及其产物 PGE₂ 大量增加有关, 说明 PG 可调节 CD40-CD40L 系统的炎症反应^[12]。研究还发现 COX-2 和 PGE₂ 能促进基质金属蛋白酶(MMP)活化和释放, 后者对巨噬细胞迁移具有重要作用, MMPs 释放可增加 As 斑块的不稳定性^[14]。这可能是 COX-2 影响和/或调控斑块稳定性的重要机制, 抑制斑块局部 COX-2 的表达, 有望成为防治 As 及稳定斑块的重要靶点。

但在另一方面, 我们应该注意抑制 COX-2 可能破坏 PGI₂ 和 TXA₂ 之间的平衡, 并促进 As 进展、血栓形成, 增加心血管事件的发生。COX-2 表达及活性上调对于预适应晚期的心肌顿抑和心肌梗死具有

保护作用, 而抑制 COX-2 可使这种保护作用完全丧失^[15]。这说明 COX-2 在心血管中的作用还十分复杂, 仍需进一步深入细致的研究。

综上所述, COX-2 参与了 As 病理发生以及斑块稳定性中炎症反应的调控过程。临床方面, 对 PGE₂ 及其代谢产物的检测可能对 As 进展尤其是斑块稳定性具有诊断性意义, 对 COX-2 进行有效干预则有望成为抗 As 新的治疗手段。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Koki A, Khan NK, Woerner BM, Dannenberg AJ, Olson L, Seibert K, et al. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol*, 2002, **507**: 177-184
- [3] Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1999, **155** (4): 1 281-291
- [4] Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Macloof J, Creminon C, et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (3): 646-655
- [5] Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*, 2002, **105** (15): 1 816-823
- [6] 翁少翔, 单江, 徐耕, 马骥. 小白菊内酯抑制胎牛血清诱导血管平滑肌细胞增殖及信号转导机理. *中国药理学与毒理学杂志*, 2002, **16** (5): 331-335
- [7] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*, 1995, **92** (5): 1 355-374
- [8] Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol*, 1999, **128** (6): 1 121-132
- [9] Massy ZA, Swan SK. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis: friend or foe? *Neph Dial Tran*, 2001, **16** (12): 2 286-289
- [10] Shiokoshi T, Ohsaki Y, Kawabe J, Fujino T, Kikuchi K. Downregulation of nitric oxide accumulation by cyclooxygenase-2 induction and thromboxane A₂ production in interleukin-1 β -stimulated rat aortic smooth muscle cells. *J Hypertens*, 2002, **20** (3): 455-461
- [11] Sun LK, Wahl P, Bilic G, Wuthrich RP. CD44-mediated cyclooxygenase-2 expression and thromboxane A₂ production in RAW 264.7 macrophages. *Inflamm Res*, 2001, **50** (10): 496-499
- [12] Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2002, **13** (5): 497-504
- [13] Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Macloof J, Creminon C, et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (3): 646-655
- [14] Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio M, De Cesare D, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E₂-dependent plaque instability. *Circulation*, 2001, **104** (8): 921-927
- [15] Bolli R, Shimura K, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Guo Y, et al. Discovery of a new function of cyclooxygenase(COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviate ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res*, 2002, **55** (3): 506-519

(此文编辑 胡必利)