

2 型糖尿病患者动脉粥样硬化动脉内膜巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的改变

孟 馨, 张 锦

(中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 对动脉粥样硬化斑块形成的作用; 免疫组织化学; 2 型糖尿病; 动脉内膜; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在 2 型糖尿病患者和非糖尿病患者动脉粥样硬化动脉内膜中的表达与分布。方法 采用免疫组织化学方法分别检测 13 例 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化动脉内膜(5 例脂纹期动脉内膜和 8 例纤维斑块期动脉内膜)、15 例非糖尿病患者动脉粥样硬化动脉内膜(6 例脂纹期动脉内膜和 9 例纤维斑块期动脉内膜)及 7 例健康人正常动脉内膜巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的表达和分布, 并利用计算机图像分析仪对免疫组织化学染色切片进行灰度扫描, 作相对定量分析。结果 正常动脉内膜未见巨噬细胞炎性蛋白 1 α 阳性表达, 平均灰度值为 234.27 ± 8.04 。巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在非糖尿病患者不同期的动脉粥样硬化动脉内膜中呈不同程度的表达, 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在脂纹期动脉内膜平均灰度值为 168.40 ± 7.69 , 主要分布在内皮细胞及泡沫细胞中; 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在纤维斑块期动脉内膜平均灰度值为 173.67 ± 6.56 , 主要分布在泡沫细胞, 而内皮细胞仅有弱的巨噬细胞炎性蛋白 1 α 染色。在糖尿病患者脂纹期及纤维斑块期动脉内膜中, 内皮细胞及泡沫细胞中皆有较强的巨噬细胞炎性蛋白 1 α 染色, 脂纹期动脉内膜巨噬细胞炎性蛋白 1 α 平均灰度值为 132.73 ± 6.01 , 纤维斑块期动脉内膜巨噬细胞炎性蛋白 1 α 平均灰度值为 138.68 ± 9.41 。结论 正常动脉内膜未见巨噬细胞炎性蛋白 1 α 阳性表达。巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在非糖尿病患者脂纹期动脉内膜中的表达明显增多, 在纤维斑块期动脉内膜中的表达逐渐减弱。巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在糖尿病患者脂纹期动脉内膜中的表达显著增高, 与非糖尿病患者脂纹期动脉内膜中的表达相比有显著性差异 ($P < 0.05$); 在糖尿病患者纤维斑块期动脉内膜中仍有较强的表达, 与非糖尿病患者纤维斑块期动脉内膜中的表达相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Expression and Distribution of Macrophage Inflammatory Protein-1 α in Atherosclerotic Tunica Intima of Artery From Type 2 Diabetics

MENG Xin, and ZHANG Jin

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

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Tunica Intima of Artery; Atherosclerosis; Macrophage Inflammatory Protein-1 α ; Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To detect the expression and distribution of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in atherosclerotic tunica intima of artery from type 2 diabetics and non-diabetics in order to try to find out the effect of MIP-1 α on the formation and development of atherosclerosis in type 2 diabetics. **Methods** We used the immunohistochemistry method to detect the expression and distribution of MIP-1 α in atherosclerotic tunica intima of artery from 13 type 2 diabetics, 15 non-diabetics and normal tunica intima of artery from 7 healthy people, respectively. Then computer image analyzer was used in relative quantitative analysis. **Results** MIP-1 α was absent in normal arteries with average gray value of 234.27 ± 8.04 . There was different expression of MIP-1 α in different-stage tunica intima of artery from non-diabetics with atherosclerosis: With the progression of atherosclerosis, the immunoreactivity of MIP-1 α increased with average gray value of 168.40 ± 7.69 in fatty streaks and 173.67 ± 6.56 in fibrous plaques. MIP-1 α was mainly in endothelial cells and foam cells during fatty streaks, while MIP-1 α was mainly in foam cells and there was little expression in endothelial cells during fibrous plaques. Average gray value of MIP-1 α in fatty streaks from type 2 diabetics was 132.73 ± 6.01 . There was a significant difference between average gray value in fatty streaks from non-diabetics and average gray value in fatty streaks from type 2 diabetics ($P < 0.05$). Average gray value of MIP-1 α in fibrous plaques from type 2 diabetics was 138.68 ± 9.41 . There was a significant difference between average gray value in fibrous plaques from non-diabetics and average gray value in fibrous plaques from type 2 diabetics ($P < 0.05$). There were strong expression of MIP-1 α in endothelial cells and foam cells during two stages of type 2 diabetics. **Conclusions** MIP-1 α was absent in normal arter

ies. Expression of MIP-1 α in fatty steaks from non-diabetics increased obviously, but expression of MIP-1 α in fibrous plaques from non-diabetics decreased gradually. Expression of MIP-1 α in fatty steaks from diabetics increased significantly and there was a significant difference between average gray value in fatty steaks from non-diabetics and average gray value in fatty steaks from type 2 diabetics ($P < 0.05$). There was still strong expression of MIP-1 α in fibrous plaques from type 2 diabetics and there was a significant difference between average gray value in fibrous plaques from non-diabetics and average gray value in fibrous plaques from type 2 diabetics ($P < 0.05$).

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 是一种包括炎症细胞浸润、平滑肌细胞增殖、细胞外基质增加及血栓形成等多种病理过程的慢性炎症疾病。其中, 外周血单核细胞粘附于血管内皮细胞并迁入内皮下间隙, 摄取脂质转化为泡沫细胞是 As 形成的重要早期事件^[1], 在此过程中趋化因子发挥了极其重要的作用。巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α) 属于 CC 型趋化因子, 是招募单核细胞进入血管壁的重要趋化因子。糖尿病患者由于 As 而发生的冠心病、缺血性或出血性脑血管病、肢端坏疽等并发症均明显高于非糖尿病人群, 是当今糖尿病患者致死致残的重要原因, 确切机制尚不清楚。本研究采用免疫组织化学方法, 检测 MIP-1 α

在 2 型糖尿病患者和非糖尿病患者动脉粥样硬化动脉内膜中的表达与分布, 探讨 MIP-1 α 在 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化形成和发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 材料

兔抗人 MIP-1 α 多克隆抗体、免疫组织化学 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒及 APES 购自武汉博士德公司。

1.2 受试者资料

受试者资料见表 1, 其中 13 例 2 型糖尿病患者均符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准。

表 1. 受试者一般资料

	糖尿病患者		非糖尿病患者		
	脂纹期 (<i>n</i> = 5)	纤维斑块期 (<i>n</i> = 8)	正常动脉 (<i>n</i> = 7)	脂纹期 (<i>n</i> = 6)	纤维斑块期 (<i>n</i> = 9)
男 (例)	3	6	4	4	6
女 (例)	2	2	3	2	3
年龄 (岁)	54 \pm 12	67 \pm 13	36 \pm 16	56 \pm 11	64 \pm 9
动脉名称	股动脉 (<i>n</i> = 4) 肠系膜上动脉 (<i>n</i> = 1)	股动脉 (<i>n</i> = 8)	股动脉 (<i>n</i> = 4) 肠系膜上动脉 (<i>n</i> = 3)	股动脉 (<i>n</i> = 3) 肠系膜上动脉 (<i>n</i> = 2) 肾动脉 (<i>n</i> = 1)	股动脉 (<i>n</i> = 6) 腹主动脉 (<i>n</i> = 2) 肾动脉 (<i>n</i> = 1)
损伤原因	外伤、肿瘤	下肢坏疽	外伤、肿瘤	外伤、肿瘤	外伤、动脉瘤、肿瘤
术式	截肢术 肿瘤切除术	截肢术	截肢术 肿瘤切除术	截肢术 肿瘤切除术 肾切除术	动脉瘤切除术 截肢术 肾切除术

1.3 标本的处理

将术中获得的新鲜标本在离体 30 min 内用 OCT 包埋, 放入液氮中迅速冷冻形成冻块, 取出后用铝箔包好, 编号后存入 - 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。实验前于恒温冰冻切片机制成 6 μ m 厚的冰冻切片, 贴于涂有防脱片剂 APES 的载玻片上, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 冲洗, 准备用于 HE 染色、油红 O 染色及免疫组织化学检测。

1.4 组织学检查

冰冻切片经 HE 染色后在光学显微镜下行病理分期: 非糖尿病组正常动脉 7 例, 脂纹期 6 例, 纤维

斑块期 9 例; 糖尿病组脂纹期 5 例, 纤维斑块期 8 例。

1.5 油红 O 染色

固定后的冰冻切片用 60% 异丙醇浸泡 30 s; 油红 O 稀释液 55 $^{\circ}$ C 浸泡 40 min; 60% 异丙醇浸泡 10 s; 苏木素染色 2 min; 自来水冲洗 5 min; 甘油明胶封片。

1.6 免疫组织化学检测

根据武汉博士德公司提供的技术指导说明进行 (SABC 法)。30% 过氧化氢+ 纯甲醇 50 份混合, 将切片室温浸泡 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶。

蒸馏水洗(3×5 min)。滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗。每张切片滴加兔抗人 MIP-1 α 多克隆抗体(1:200) 20 μ L, 4℃过夜。PBS 冲洗(3×5 min)。滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 20℃20 min。PBS 冲洗(3×5 min)。滴加 SABC, 20℃20 min。PBS 冲洗(5×5 min)。DAB 显色 15~20 min, 苏木素复染, 中性树胶封片。用 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析。

2 结果

2.1 油红 O 染色

健康人正常动脉内膜油红 O 染色阴性, 非糖尿病患者及糖尿病患者动脉内膜均可见油红 O 染色阳性(图 1, Figure 1)。



图 1. 动脉粥样硬化动脉内膜油红 O 染色 (×400)

Figure 1. Oil red O stain in tunica intima of artery with atherosclerosis

2.2 免疫组织化学检查

7 例健康人正常动脉内膜未见棕褐色细颗粒状物沉积, 即未见到 MIP-1 α 阳性表达(图 2, Figure 2)。非糖尿病患者 MIP-1 α 在脂纹期动脉内膜中的表达明显增多, 主要分布在内皮细胞及泡沫细胞中; MIP-1 α 在纤维斑块期动脉内膜中的表达逐渐减弱, 主要分布在泡沫细胞, 而内皮细胞仅有弱的 MIP-1 α 染色(图 3, Figure 3)。糖尿病患者脂纹期及纤维斑块期动脉内膜中内皮细胞及泡沫细胞中皆有较强的 MIP-1 α 染色(图 4, Figure 4)。

2.3 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 免疫沉积物灰度值分析

非糖尿病组正常动脉内膜 MIP-1 α 平均灰度值为 234.27 \pm 8.04, 脂纹期动脉内膜平均灰度值为 168.40 \pm 7.69, 纤维斑块期动脉内膜平均灰度值为 173.67 \pm 6.56。糖尿病组脂纹期动脉内膜平均灰度值为 132.73 \pm 6.01; 纤维斑块期动脉内膜平均灰度

值为 138.68 \pm 9.41。



图 2. 正常动脉内膜巨噬细胞炎性蛋白 1 α 免疫组织化学染色 (×400)

Figure 2. MIP-1 α expression in normal arteries with immunohistochemistry

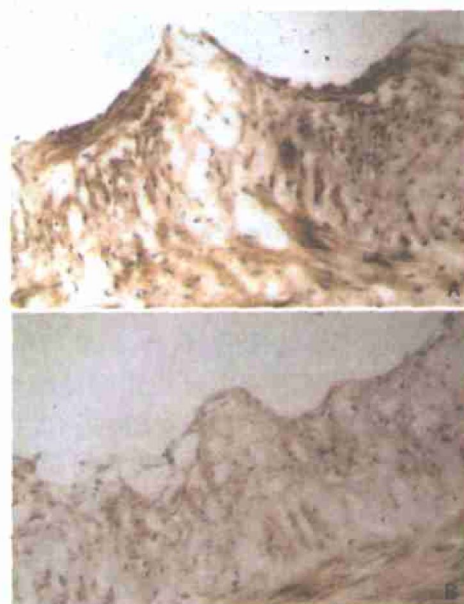


图 3. 非糖尿病动脉内膜巨噬细胞炎性蛋白 1 α 免疫组织化学染色 (×400) A 为脂纹期, B 为纤维斑块期。

Figure 3. MIP-1 α expression in tunica intima of artery from non-diabetics with immunohistochemistry

3 讨论

动脉粥样硬化(As)病变是由于血管内皮和平滑肌细胞受各种因素损害而产生的过度的炎症性——纤维增殖性反应^[2]。外周血单核细胞粘附于内皮并迁入内皮下间隙, 摄取脂质转化为泡沫细胞是 As 形成的重要早期事件, 在此过程中单核细胞受多种趋化因子的招募, 其中单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)对单核细胞的趋化作用已被许多研究者所证实^[3,4]。文献[5]报道, 同

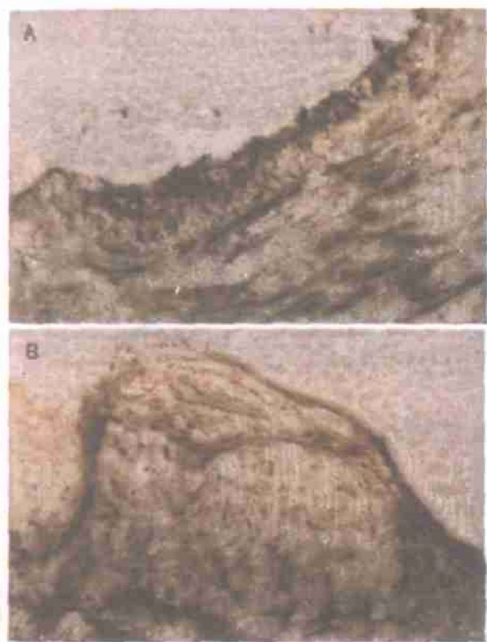


图4. 糖尿病动脉内膜巨噬细胞炎症蛋白1 α 免疫组织化学染色($\times 400$) A为脂纹期, B为纤维斑块期。

Figure 4. MIP-1 α expression in tunica intima of artery from diabetics with immunohistochemistry

时敲除 MCP-1 基因和低密度脂蛋白受体基因的小鼠在喂饲高胆固醇饮食后,其 As 病变与单纯敲除低密度脂蛋白受体基因的小鼠相比明显减轻,但动脉的病变并未完全消失,主动脉壁内仍有巨噬细胞浸润,说明在单核细胞迁入内皮下间隙过程中,除 MCP-1 外,还有其他趋化因子的参与。MIP-1 α 与 MCP-1 同属于 CC 型趋化因子,其趋化作用的靶细胞是 T 淋巴细胞和单核/巨噬细胞,亦参与单核细胞的募集及泡沫细胞的形成^[6,7]。已有研究表明,低密度脂蛋白及同型半胱氨酸可以诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达 MIP-1 α ^[8,9]。体内实验更明确表明 MIP-1 α 可引起单核细胞及淋巴细胞的浸润,并能活化血管内皮细胞,而且在食饵性动脉粥样硬化斑块中有大量存在 MIP-1 α ,由此可见, MIP-1 α 在动脉粥样硬化的发生中亦起着重要作用。

糖尿病是临床上一种常见病和多发病,血管并发症是糖尿病患者的主要致残及致死原因。流行病学调查资料表明,糖尿病患者发生 As 及危及生命的心血管并发症的危险性较正常人增加了 3~4 倍。Hayes 等^[10]证实在 As 病变中表达 MIP-1 α ,那么, MIP-1 α 在糖尿病患者 As 病变中表达与分布如何,尚未见文献报道。本研究结果发现,正常动脉内膜未见 MIP-1 α 阳性表达。MIP-1 α 在非糖尿病患者脂纹期动脉内膜中的表达明显增多,在纤维斑块期动脉

内膜中的表达逐渐减弱。MIP-1 α 在糖尿病患者脂纹期动脉内膜中的表达显著增高,与非糖尿病患者脂纹期动脉内膜中的表达相比有显著性差异($P < 0.05$);在糖尿病患者纤维斑块期动脉内膜中仍有较强的表达,与非糖尿病患者纤维斑块期动脉内膜中的表达相比有显著性差异($P < 0.05$)。

我们通过免疫组织化学方法观察到,非糖尿病患者早期及晚期 As 中表达 MIP-1 α 的细胞类型是不一样的,在早期 As 中内皮细胞及泡沫细胞是 MIP-1 α 的主要来源,而晚期 As 中泡沫细胞是 MIP-1 α 的主要来源,此结果与其他报道一致^[11];这可能是由于内皮细胞表达 MIP-1 α 启动单核细胞迁至内皮下间隙。糖尿病患者早期及晚期 As 中表达 MIP-1 α 的细胞类型均是内皮细胞及泡沫细胞,说明高血糖是导致内皮细胞产生 MIP-1 α 增加的因素,高糖环境下刺激内皮细胞产生 MIP-1 α 增加是促发 As 形成的原因之一,其机制可能与高糖的直接作用或促使蛋白糖基化进而促进内皮细胞产生 MIP-1 α 有关。

[参考文献]

- [1] Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*, 1993, **71** (6): 9B-14B
- [2] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362** (2): 801-811
- [3] Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Action of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur J Immunol*, 1995, **25** (1): 64-68
- [4] Reape TJ, Groot PH. Chemokine and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **147** (2): 213-225
- [5] Gu L, Okada Y, Cliton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor deficient mice. *Mol Cell*, 1998, **2**: 275-281
- [6] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*, 1999, **103** (6): 773-778
- [7] Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 α induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol*, 2000, **164** (6): 3392-402
- [8] 瞿智玲, 邓仲端, 倪娟. 天然及氧化型极低密度脂蛋白诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎症蛋白1 α . *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 13-15
- [9] 王淑秀, 邓仲端, 倪娟, 瞿智玲. 同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎症蛋白1 α . *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 101-104
- [10] Hayes IM, Nicola JJ, Sewah T, Smith C, Paterson JR, Earnshaw JJ, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for cc chemokines. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1998, **18** (3): 397-403
- [11] Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein 1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein 1 monoclonal antibody. *Hum Pathol*, 1993, **24** (5): 534-539

(此文编辑 文玉珊)