

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0494-03

缺血性脑血管病患者颈内动脉斑块稳定性 与氧化型低密度脂蛋白有关

石怀银, 韦立新, 孙璐, 李冰

(中国人民解放军总医院病理科, 北京市 100853)

[关键词] 内科学; 脑缺血; 斑块稳定性; 动脉粥样硬化; 颈动脉; 氧化型低密度脂蛋白

[摘要] 目的 探讨缺血性脑血管病患者颈内动脉斑块的形态学改变以及氧化型低密度脂蛋白表达情况及其与斑块稳定性的关系。方法 对8例有缺血性脑血管病症状的死者进行尸体解剖, 并对其颈内动脉进行连续取材, 光镜观察斑块形态, 选取稳定及不稳定斑块各20块进行免疫组织化学染色, 观察二者氧化型低密度脂蛋白含量的差异和分布情况。并通过图像分析系统对纤维帽厚度以及氧化型低密度脂蛋白阳性区域进行定量。结果 8例缺血性脑血管病组共121个颈内动脉取材块中, 不稳定斑块占21.5% (26/121); 稳定斑块为78.5% (95/121)。纤维帽厚度在不稳定组和稳定组分别为 0.2 ± 0.1 mm和 0.5 ± 0.2 mm, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。免疫组织化学染色显示不稳定斑块和稳定斑块中均有氧化型低密度脂蛋白表达, 但不稳定斑块阳性面积明显多于稳定斑块, 分别为 19.4 ± 3.3 和 14.3 ± 2.5 ($P < 0.01$)。结论 缺血性脑血管病患者颈内动脉斑块由稳定和 unstable 斑块组成, 不稳定纤维帽较薄而且斑块内氧化型低密度脂蛋白阳性区域明显多于稳定斑块, 提示氧化型低密度脂蛋白可能是斑块不稳定的重要因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship between Plaque Stability and Plaque Morphology as well as the Content of Oxidized Low Density Lipoprotein

SHI Hua-Yin, WEI Li-Xin, SUN Lu, and LI Bing

(Department of Pathology, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia; Atherosclerosis; Carotid Artery; Oxidized Low Density Lipoprotein; Plaque Stability

[ABSTRACT] **Aim** To observe the plaque morphological characteristics and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) expression in the carotid arteries of brain ischemia autopsy cases. **Methods** Serial sections of the carotid arteries of the 8 cases with cerebral ischemia were taken and the morphology of the plaques were observed microscopically. Twenty stable and unstable plaques were randomly selected to do the immunohistochemical staining for ox-LDL. Computer image analysis system was used to measure the thickness of fibrous cap and the ox-LDL content of the stable and unstable plaques. **Results** 26 (21.5%) of the 121 carotid artery plaques in the 8 cases were unstable plaques; while 95 plaques belong to stable plaques (78.5%) ($P < 0.01$).

The thickness of the fibrous cap in unstable and stable plaques were 0.2 ± 0.1 mm and 0.5 ± 0.2 mm respectively ($P < 0.01$).

The immunohistochemical staining for ox-LDL were positive in both unstable and stable plaques. But the positive area was significantly larger in unstable plaque than that in stable plaques (19.4 ± 3.3 and 14.3 ± 2.5 respectively, $P < 0.01$).

Conclusion the carotid arteries consist of unstable and stable plaques. The unstable plaque had a relatively thinner fibrous cap than that of stable plaque and the ox-LDL positivity area was larger in unstable plaque than in stable plaque. This indicates that ox-LDL may bear a close correlation with plaque stability.

研究表明, 动脉粥样硬化程度与斑块稳定性有密切关系。斑块越不稳定, 越容易破裂。斑块破裂后, 由于胶原和粥样物质暴露, 很容易导致血栓形成而引起心脑血管意外^[1-3]。对颈动脉旋切标本进行

研究发现, 缺血性脑血管病患者颈动脉斑块均有破裂、斑块内出血及血栓形成^[4]。文献中有关颈动脉斑块与缺血性脑血管病关系的尸检研究很少^[5]。我们观察了8例缺血性脑血管病人尸体的颈内动脉, 对斑块形态、稳定性与不稳定性斑块的比例、斑块纤维帽厚度以及氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)与斑块稳定性的关系做了研究。

[收稿日期] 2005-03-14 [修回日期] 2005-07-03

[作者简介] 石怀银, 硕士, 副主任医师, 副教授, 从事临床病理诊断和心脑血管病的病理研究, 联系电话为 010-66937954, E-mail 为 shihuaiyin@sina.com。韦立新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。孙璐, 主治医师。

1 材料与方法

1.1 标本来源

8 例颈动脉组织取自尸检病例(死者生前有脑血管病病史)。其中 5 例为短暂性脑缺血发作患者, 3 例为轻度脑卒中患者。其中男性 7 例, 女性 1 例, 年龄 61~70 岁。尸检时将颈内动脉完整切除, 10% 甲醛固定, EDTA 脱钙。

1.2 组织处理和切片观察

将固定和脱钙的颈内动脉标本每隔 4 mm 连续取材, 对取材块进行常规脱水、包埋和浸蜡。切片厚度为 5 μm 并做常规 HE 染色。显微镜下观察 HE 切片, 观察指标包括斑块形态、纤维帽厚度以及斑块内粥样坏死中心大小等。脂质中心大小和纤维帽厚度通过图像分析系统测定(MPIAS 500 型, 同济医科大学清平影像工程公司)。纤维帽厚度测定以脂质核心距腔缘最近处为准。根据光镜及图像分析测定结果, 按国际上通用的标准, 将脂质核心大于斑块面积 40% 的斑块定义为不稳定斑块。而脂质核心小于斑块面积 40% 的斑块定义为稳定斑块。选取稳定及不稳定斑块各 20 块进行免疫组织化学染色。

1.3 免疫组织化学染色方法

免疫组织化学染色采用 ABC 法, 抗体为兔抗人丙二醛一载脂蛋白 B 抗体(由奥地利 Karl-Franzens 大学医学生物研究所制备, 稀释度为 1:50)。组织切片经脱蜡、水化、抗原修复等步骤后滴加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 滴加生物素化二抗, 20 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 最后通过 DAB 显色, 以细胞浆呈棕黄色为阳性。

1.4 氧化型低密度脂蛋白阳性面积的定量

氧化型低密度脂蛋白免疫组织化学染色结果的定量也采用图像分析系统, 图像采集首选斑块中阳性细胞较多的区域, 40 倍显微镜下采集图像并分析每张图像中 ox-LDL 阳性区域占整个图像的面积比, 以 5 个测定视野的平均数作为平均阳性面积比。数据的统计采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 斑块内脂质核心大小的定量测定结果

按有无脂质中心及脂质中心大小将斑块分为 3 类: ①不含脂质坏死中心或脂质坏死中心小于斑块面积的 10%; ②斑块脂质中心占斑块的 11%~40%; ③脂质中心超过斑块的 40%。前两种为稳定斑块, 第三种为不稳定斑块(图 1, Figure 1)。8 例缺血性脑血管病组共 121 个组织块中, 21.5% 为不稳定斑块(26/121), 稳定斑块占 78.5%(95/121)。

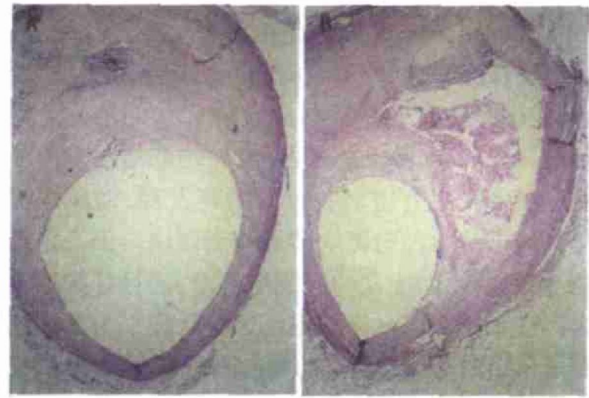


图 1. 斑块的形态特点(HE $\times 10$) A 为稳定斑块, 主要由纤维组织构成, 脂质核心无或很小; B 为不稳定斑块, 脂质核心较大, 占斑块面积的 40% 以上, 纤维帽较薄。

Figure 1. Morphological characteristics of plaque

2.2 斑块纤维帽厚度的测定结果

与稳定性斑块相比, 不稳定斑块的纤维帽明显较薄, 通过图像分析系统对含脂质核心斑块的纤维帽厚度进行测定, 不稳定斑块纤维帽厚度平均为 0.2 ± 0.1 mm, 稳定斑块平均为 0.5 ± 0.2 mm, 两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 斑块中氧化型低密度脂蛋白的表达情况

不稳定斑块中巨噬细胞内含有大量的氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL), 免疫组织化学染色呈强阳性, 主要分布在斑块两侧的“肩部”; 而稳定斑块中仅有少量的 ox-LDL 阳性细胞(图 2, Figure 2)。不稳定斑块内 ox-LDL 阳性面积比为 19.4 ± 3.3 , 而稳定斑块内仅为 14.3 ± 2.5 , 二者差异显著($P < 0.01$)。

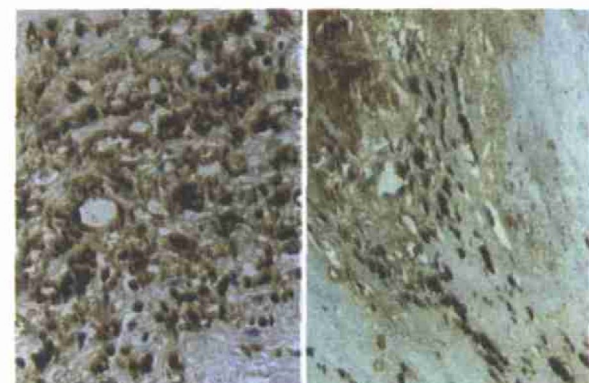


图 2. 斑块中氧化型低密度脂蛋白表达情况(ABC $\times 10$)

A 为稳定斑块, 斑块“肩部”仅少量 ox-LDL 阳性的泡沫细胞; B 为不稳定斑块, 可见“肩部”大量 ox-LDL 阳性的泡沫细胞。

Figure 2. Ox-LDL immunohistochemical staining in plaque

3 讨论

3.1 斑块形态与斑块稳定性的关系

以往认为,管腔狭窄越明显,动脉粥样硬化程度越重,越容易导致缺血性脑血管病症状的发生。但近年的研究表明,除动脉狭窄外,斑块的结构也与脑缺血症状的发生有密切关系。研究发现,动脉粥样硬化斑块可分为稳定斑块和不稳定斑块。不稳定斑块脂质核心较大,表面的纤维帽较薄,而且纤维帽中富含巨噬细胞和T淋巴细胞。这些巨噬细胞能分泌一些蛋白溶解酶类(如金属蛋白酶),溶解纤维帽中的胶原等基质成分而使纤维帽逐渐变薄,直至斑块破裂。斑块破裂后,由于表面粗糙和一些促凝血物质的暴露导致血栓形成,并可能脱落形成栓子,引起心肌缺血或缺血性脑血管病的发生^[6]。近年来对颈内动脉斑块的研究较多,但主要是通过影像学检查或对一些外科切除标本的研究,通过对比观察影像资料和内膜切除标本,对斑块形态和成分进行了形态分析^[7,8],但由于内膜切除标本存在一定的不完整性,因此观测结果就有一定的局限性。文献中通过对尸检颈动脉材料进行的研究较少,本研究通过对尸检颈内动脉的连续取材,发现缺血性脑血管病患者颈内动脉内的确存在着一些不稳定斑块,这些斑块纤维帽厚度比稳定斑块薄,所含的脂质核心大。在本组病例中,我们未发现有明显的大血栓形成,但确实发现部分不稳定斑块的表面有溃疡和破裂,而且少数破裂的斑块表面有小的血栓形成。另外,不稳定斑块内粥样坏死脂质中心周围的吞噬细胞明显多于稳定斑块,这些组织细胞多数聚集在斑块的“肩部”,即脂质坏死中心靠近腔面的左右角。

3.2 氧化型低密度脂蛋白与斑块稳定性的关系

研究表明:ox-LDL可以促进泡沫细胞的形成,同时由于对ox-LDL的不断摄取超过其清除能力,最终引起泡沫细胞坏死,导致了细胞外脂质核心的形成。Ox-LDL还可以趋化单核细胞,抑制组织细胞的游走,损伤内皮细胞,促进血栓形成,刺激内皮细胞释放巨噬细胞趋化蛋白1和巨噬细胞集落刺激因子等。这些作用都可以促进动脉粥样硬化的发生发展^[9,10]。体内的低密度脂蛋白中含有大量的不饱和脂肪酸,在自由基或其他氧化剂的作用下产生脂类自由基,并引起连锁的自由基链反应,最终生成多种活性醛。这些醛类和LDL中的载脂蛋白apoB结合,产生新的抗原决定簇,形成ox-LDL。以往的研究中

多以载脂蛋白B代替ox-LDL作为检测指标,本研究中使用的抗MDA-载脂蛋白B可以更精确的对ox-LDL进行定性和定量分析。本研究表明:ox-LDL是不稳定斑块脂质核心的主要组成部分,但由于脂质核心内无明显的细胞成分,无法对其进行精确的定量分析。在斑块内的其他部位,不稳定斑块组ox-LDL的表达明显高于稳定斑块组,提示ox-LDL含量多少与斑块的稳定性有密切关系。Tsimikas等^[11]通过静脉注射标记的ox-LDL特异性抗体,并通过影像学检查,也发现脂质丰富的斑块结合更多的ox-LDL抗体。本研究还发现:ox-LDL在斑块中分布不均匀,主要位于斑块的肩部,同时不稳定斑块组肩部的ox-LDL的表达程度高于稳定组的相应部位。ox-LDL的主要成分为胆固醇酯,体温下以液态形式存在,易流动,斑块较软,易破裂。对于不稳定性斑块,纤维帽的肩部是斑块最易发生破裂的地方,肩部细胞成分和数量的改变,新生血管形成,炎细胞浸润是降低斑块稳定性的重要机制,而ox-LDL在斑块内的主要表达部位在肩部,表明他们之间可能存在某种关系。

[参考文献]

- [1] Conti CR. Updated pathophysiologic concepts in unstable coronary artery disease. *Am Heart J*, 2001, **141** (2 Suppl): S12-14
- [2] Vimani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*, 2002, **44** (5): 349-356
- [3] Forrester JS. Prevention of plaque rupture: a new paradigm of therapy. *Ann Intern Med*, 2002, **137** (10): 823-833
- [4] Colledge JG, Greenhalgh R, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke*, 2000, **31**: 774-781
- [5] 石怀银, 韦立新, 周定标. 缺血性脑血管病患者颈内动脉狭窄程度的观察. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 561-563
- [6] Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*, 2003, **89** (9): 993-997
- [7] Luo Y, Polissar N, Han C, Yarnykh V, Kerwin WS, Hatsukami TS, et al. Accuracy and uniqueness of three in vivo measurements of atherosclerotic carotid plaque morphology with black blood MRI. *Magn Reson Med*, 2003, **50** (1): 75-82
- [8] Mitsumori LM, Hatsukami TS, Ferguson MS. In vivo accuracy of multisequence MR imaging for identifying unstable fibrous caps in advanced human carotid plaques. *J Magn Reson Imaging*, 2003, **17** (4): 410-420
- [9] Salvayre R, Auge N, Benoit H, Negre-Salvayre A. Oxidized low density lipoprotein induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1585** (2-3): 213-221
- [10] Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (10): 1649-654
- [11] Tsimikas S. Noninvasive imaging of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerotic plaques with tagged oxidation-specific antibodies. *Am J Cardiol*, 2002, **90** (10C): 22L-27L

(此文编辑 胡必利, 朱雯霞)