

人动脉粥样硬化病变中组织因子和白细胞介素 18 的表达

周虹, 黄体钢, 刘红梅, 甄琴, 畅继武, 陈剑秋

(天津医科大学第二医院心脏科, 天津市 300211)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化; 组织因子; 白细胞介素 18; 炎症; 凝血

[摘要] 目的 探讨炎症与凝血机制在动脉粥样硬化发病机制中的相互作用。方法 用 HE 染色方法观察人动脉粥样硬化病理变化, 用免疫组织化学法研究人动脉粥样硬化病变中凝血因子组织因子和促炎细胞因子白细胞介素 18 的表达。结果 2 例正常动脉的内皮细胞未见组织因子抗原表达, 组织因子在 iv 型病变 ($n=6$) 的内皮细胞中有 3 例表达, ①型病变 ($n=8$) 的内皮细胞中有 5 例表达, ② v 型病变的内皮细胞中几乎都表达; 各期病变中的巨噬细胞和平滑肌细胞均表达组织因子; 有白细胞介素 18 表达的标本共 14 例 (14/40, 占 35%), 白细胞介素 18 阳性表达的病变中组织因子也有表达。结论 动脉粥样硬化病变与组织因子、白细胞介素 18 表达密切相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Expression of Tissue Factor and Interleukin-18 in Human Atherosclerotic Lesions

ZHOU Hong, HUANG Ti-Gang, LIU Hong-Mei, ZHEN Qin, CHANG Ji-Wu, and CHEN Jian-Qiu

(Department of Cardiology, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Tissue Factor; Interleukin-18; Inflammation; Coagulation

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the relationship between inflammation and coagulation in the pathogenesis of atherosclerosis. **Methods** The expression and distribution of tissue factor (TF) and interleukin-18 (IL-18) in the human normal coronary arteries and atherosclerotic plaques were studied using HE staining and immunohistochemistry. **Results** The expression of TF was not detected in the endothelial cells of normal arteries. But the endothelial cells overlying atherosclerotic plaques as early as in the type iv lesions began to express TF (3/6) with 5/8 in the type ① lesions. In the type ② v lesions almost all endothelial cells expressed TF. TF present in all macrophages and smooth muscle cells in all stages of atherosclerosis. There was some IL-18 positive areas in the specimens (14/40, 35%), TF present in all the IL-18 positive areas. **Conclusion** The expression of TF is closely associated with the development of atherosclerosis.

组织因子 (tissue factor, TF) 启动外源性凝血途径, 是凝血和止血的主要调节因子, 而且还具有许多非凝血功能^[1]。有研究表明 TF 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成血栓的关键因素^[2], TF 还通过其诸多非凝血功能在 As 发病机制中发挥重要作用^[1]。白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 主要由活化巨噬细胞和库否细胞产生, 能诱导 Th1 细胞产生 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ), 后者有致 As 作用^[3,4]。目前在 As 的发病机制研究中关于 TF 和 IL-18 之间是否存在相互关系尚未见报道。本研究拟探讨 TF 和 IL-18 在人 As 病变中的表达, 现予报道。

1 材料和方法

1.1 标本取材

共 40 份人动脉标本。尸检 3 例 (20 份标本),

均为男性, 年龄分别为 25、27 及 49 岁, 既往体健, 皆为非心源性意外死亡, 死亡后 24 h 内经家属同意后 进行尸检。20 份标本中主动脉 4 份, 肺动脉 1 份, 冠状动脉 13 份, 颈总动脉 1 份, 头臂干动脉 1 份。④ 外科手术病人 16 例 (17 份标本), 男 13 例, 女 3 例, 年龄 45~77 岁。其中 13 例 (14 份标本) 为天津泰达心血管病医院行主动脉—冠状动脉旁路移植术病人, 皆为择期手术, 其中 6 例行冠状动脉内膜切除术。取术中多余内乳动脉 2 份, 桡动脉 3 份, 冠状动脉斑块内膜 6 份, 主动脉斑块内膜 3 份。另有 3 例为本院外科因双下肢闭塞症而截肢的病人, 皆患有高血压、糖尿病并有吸烟史。取术中多余股动脉标本 3 份。④另天津胸科医院病理室提供尸检标本 3 份, 皆为冠状动脉斑块。所有标本取材后立即用 10%~15% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 并常规行 HE 染色, 在初步观察基础上选择蜡块行连续切片, 每个蜡块至少连续切 6 张, 行免疫组织化学染色。

1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 试剂

PBS、枸橼酸盐及浓缩型 DAB 试剂

[收稿日期] 2006-10-18

[修回日期] 2007-03-10

[作者简介] 周虹, 博士, 主治医师, 研究方向为内科心血管病学。黄体钢, 博士, 教授, 研究方向为内科心血管病学。刘红梅, 博士研究生, 研究方向为内科心血管病学。

盒(北京中山生物技术有限公司)。(4)一抗:鼠抗人巨噬细胞(CD68)单克隆抗体(货号 ZM-0060)和鼠抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(货号 ZM-0003)均购自北京中山生物技术有限公司。鼠抗人 TF 单克隆抗体(Americandiagnostica 公司,货号 4509)。鼠抗人 IL-18 单克隆抗体购自 MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO LTD (货号 D043-3)。(四)阳性对照:鼠抗人巨噬细胞(CD68)单克隆抗体为扁桃体,阳性部位为细胞质;鼠抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体为平滑肌,阳性部位为细胞质;鼠抗人 TF 单克隆抗体为卵巢肿瘤,阳性部位为细胞质、细胞膜。阴性对照用 PBS 液代替一抗。免疫组织化学染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司的美国 ZYMED 公司 SP-9002 染色试剂盒(Histostain™-Plus Kits),为过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒(货号 SP-9002),染色试剂盒中二抗为生物素标记山羊抗小鼠 IgG。

1.2.2 染色方法 采用经典的 SP 法,严格按照试剂盒要求的流程染色,采用抗原微波热修复, DAB 显色,中性树胶封片。

2 结果

2.1 病理形态学变化

按 Stary 等^[5]在美国心脏病协会(AHA)血管病变委员会上提出的标准行病理分期,按此标准把 iv、①、②型病变统称为早期病变,③、④、v 型病变统称为晚期病变。本研究 40 份人动脉标本中正常动脉标本(HE 染色镜下见仅有局部轻度内膜增厚,无脂质沉积)2 份;早期病变 21 份,其中 iv 型病变 6 份,①型病变 8 份,②型病变 7 份(图 1A);晚期病变 17 份,其中 ③型病变 3 份,④a 型病变 2 份,④b 型病变 4 份,④c 型病变 6 份,v 型病变 2 份(图 1B)。

2.2 组织因子的表达

2 例正常动脉标本皆呈阳性表达,阳性部位在外膜和中膜平滑肌细胞,内皮细胞未见 TF 阳性表达。早期病变:iv 型病变有 3 份标本呈阳性表达(3/6,占 50.0%),阳性部位为大多数内皮细胞及一些内膜平滑肌细胞,偶尔有巨噬细胞浸润,中膜平滑肌细胞及外膜也呈阳性表达;①型病变有 5 份标本呈阳性表达(5/8,占 62.5%),阳性部位主要在内皮、巨噬细胞、泡沫细胞及内膜平滑肌细胞;②型病变几乎所有标本呈阳性表达,阳性部位主要在内皮、巨噬细胞、泡沫细胞及内膜平滑肌细胞(图 2),并伴有细胞外基质阳性。晚期病变:③、④、v 型病变几乎所有

标本都呈阳性表达,阳性部位在内皮细胞、巨噬细胞、泡沫细胞、纤维帽处平滑肌细胞、脂核及血栓等部位(图 3)。

2.3 白细胞介素 18 的表达

早期病变仅 2 份标本 IL-18 表达阳性,阳性部位在外膜。晚期病变共 12 例 IL-18 表达阳性,阳性部位主要在外膜、巨噬细胞、内皮、内膜平滑肌细胞、纤维帽及血栓处(图 4)。

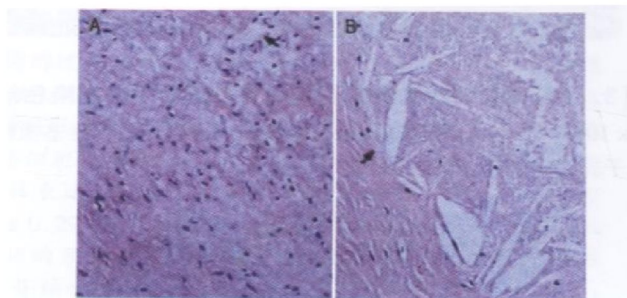


图 1. ②型病变和 Va 型病变标本 HE 染色结果 (×100)

A 为 ②型病变,见内膜增厚,细胞外脂质融合(箭头所示),平滑肌细胞被这些细胞外脂质所包绕分割;B 为 Va 型病变,见胶原和平滑肌细胞组成帽覆盖脂核,内膜脂质沉积形成胆固醇结晶。

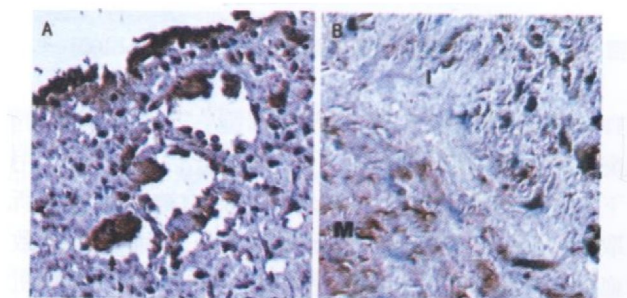


图 2. ②型病变者冠状动脉左前降支组织因子免疫组织化学染色结果 A 为内皮细胞、巨噬细胞中组织因子表达 (×200), B 为平滑肌细胞中组织因子表达 (×400)。

3 讨论

尽管复合病变多见于 ③和 ④型病变,但是病变表面的破裂、血肿以及血栓形成也可发生于任何一种病变类型,甚至发生于没有明显病变的内膜^[5]。文献[6]报道急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)中有 1/4 的病例未发生斑块破裂,未破裂的斑块一般不含脂质,而含有蛋白聚糖,组织学表现包括斑块糜烂、钙化结节等,其发生不良心血管事件的病理机制可能与炎症和血栓形成有关^[7]。本研究 iv、①型病变即有一些内皮细胞表达 TF,这都支持病变的致栓能力并不需要以斑块破裂为必要前提,而与内膜表面的特性发生改变有关,如内皮细胞在各种致病因素的作用下自身可产生

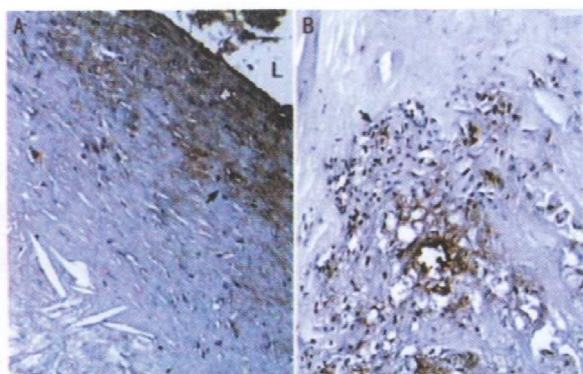


图 3. (Ⅱ型)病变者冠状动脉组织因子免疫组织化学染色结果 (×100) A 为内皮细胞、平滑肌细胞、血栓、纤维帽处基质组织因子表达, B 为巨噬细胞组织因子表达。

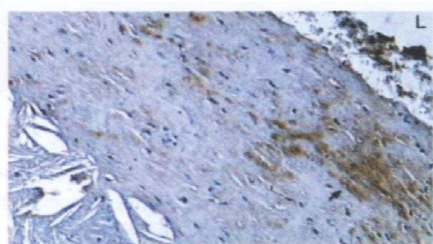


图 4. (Ⅱ型)病变者冠状动脉白细胞介素 18 表达 (×100)

TF 等促凝因素。已发现内皮细胞在斑块内存在的炎症介质如白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 等作用下 TF 表达明显增加^[8]; 或者内皮细胞被炎症细胞所取代, 这些炎症细胞产生促凝因子^[6], 从而最终导致血栓形成。所以 As 病变表面的内皮细胞在炎症机制作用下表达 TF 可能是未破裂斑块引起临床 ACS 的病理机制之一。

本研究中含有崩解坏死的粥样性病变共有 18 例 (18/40, 占 45%)。在所有这些粥样性病变的周围都有巨噬细胞的标记抗原 CD68 表达 (表达率为 100%), 而且这些粥样性病变的 TF 表达率也是 100%。已知引起临床不良心血管事件的根本原因是斑块本身被激活而不是斑块所致的管腔狭窄, 而使斑块激活的因素目前认为主要是炎症反应, 炎症和免疫功能的激活通过两种途径促进血栓形成, 即促进斑块破裂以及诱导 TF 表达^[9]。脂质、细胞因子、微生物或一些抗原可激活斑块内的炎症细胞, 巨噬细胞被激活后能合成释放许多水解酶, 如基质金属蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶^[10], 这些蛋白酶可水解基底膜及细胞外基质, 使纤维帽变薄, 很易发生斑块破裂。本研究各期病变中巨噬细胞均表达 TF, 所以富含巨噬细胞的斑块不但破裂的危险性增加, 而且因巨噬细胞可产生 TF 而致栓性也增加。

近年认为, 平滑肌细胞同内皮细胞、巨噬细胞一样, 通过炎症与凝血之间的相互作用, 在 As 病变的形成和进展、支架内再狭窄和血管桥失效等新出现的病变类型中, 起重要作用^[11]。本研究中各期病变中均见平滑肌细胞表达 TF, 所以平滑肌细胞也是 As 病变中 TF 的重要来源。

本研究结果表明, As 病变中有促炎介质 IL-18 表达 (表达率为 35%), 晚期病变阳性表达率明显高于早期病变 (分别为 70.6% 和 9.5%)。有研究^[12]表明在不稳定性粥样斑块中 IL-18 mRNA 水平明显增加, 用 IL-18 结合蛋白阻断 IL-18 传导通路可阻止斑块进展并稳定斑块成份, 减少炎症细胞数量和脂质含量, 并增加平滑肌细胞数及胶原的含量。在动物实验模型中, IL-18 可使粥样硬化病变面积增加并使 T 淋巴细胞数量增加^[13]。本研究中凡是 IL-18 阳性表达的病变, TF 也呈阳性表达, 说明炎症因子 IL-18 与凝血因子 TF 之间可能存在相互作用。

本研究的局限性在于: 未测定 As 病变内 TF 活性; 未检测病变内 T 淋巴细胞、肥大细胞抗体, 也未对这些细胞进行形态学识别; 标本例数较少, 未能与临床事件结合进行综合分析。

[参考文献]

- [1] Eilertsen KE, Sterud B. Tissue factor: (patho) physiology and cellular biology [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2004, **15**: 521-538.
- [2] Ardissino D, Merlini PA, Bauer KA, Bramucci E, Ferrario M, Coppola R, et al. Thrombogenic potential of human coronary atherosclerotic plaques [J]. *Blood*, 2001, **98** (9): 2726-2729.
- [3] Smitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation (Part I) [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 1917-1923.
- [4] 李后开, 戴敏. 内皮细胞炎症反应在动脉粥样硬化研究中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 607-610.
- [5] Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1995, **92**: 1355-374.
- [6] Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor [J]. *Circulation*, 2004, **109** (suppl iv): ②-⑩.
- [7] Naghavi M, Libby P, Falk E, Ward Casscells S, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 1664-672.
- [8] Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor NF- κ B, and Egr-1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 25032-039.
- [9] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, **420**: 868-874.
- [10] Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1359-366.
- [11] Lavezzani AM, Ottaviani G, Matturri L. Biology of the smooth muscle cells in human atherosclerosis [J]. *APMIS*, 2005, **113**: 112-121.
- [12] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chavtchko Y, et al. Expression of interleukin 18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability [J]. *Circulation*, 2001, **104**: 1598-603.
- [13] Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin 18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon gamma [J]. *Circ Res*, 2002, **90**: E34-E38.

(此文编辑 许雪梅)