

[文章编号] 1007-3949(2008)16-07-0537-04

• 实验研究 •

## 人冠状动脉粥样硬化斑块内白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 表达与斑块稳定性有关

刘娟<sup>1</sup>, 陈丽琴<sup>2</sup>, 苏秀兰<sup>3</sup>, 陈良光<sup>1</sup>, 李时荣<sup>4</sup>

(内蒙古医学院 1. 附属人民医院心内科, 2. 法医学系, 3. 临床实验中心, 4. 病理学中心, 内蒙古呼和浩特市 010059)

[关键词] 病理学与病理生理学; 冠状动脉粥样硬化; 斑块; 白细胞介素 6; 白细胞介素 18; 肿瘤坏死因子  $\alpha$

[摘要] 目的 探讨人冠状动脉粥样硬化斑块中白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达水平与斑块稳定性的关系, 以及白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  之间的相关性。方法 选取 104 例冠状动脉组织蜡块标本, 在光学显微镜下观察, 并结合 SmartScape 图像分析系统对冠状动脉粥样硬化斑块面积、脂核面积和纤维帽厚度进行测量分析, 将其分为正常血管组、稳定斑块组和不稳定斑块组。采用免疫组织化学技术检测冠状动脉粥样硬化斑块中白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  的表达水平。结果 稳定斑块组与不稳定斑块组斑块面积差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 而斑块脂核面积和纤维帽厚度在两组间差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。正常血管中白细胞介素 6 和 18 无表达, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  无表达或极少量表达; 在不稳定斑块组白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达水平明显高于稳定斑块组 ( $P < 0.01$ ), 尤其是在纤维帽的肩部和脂质核心。白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达具有相关性, 且各因子间呈正相关关系。结论 白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达水平可反映冠状动脉粥样硬化斑块的稳定性, 并且它们之间的表达具有相关性。检测这些因子可帮助临床医生预测冠心病危险事件的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Expressions of Interleukin-6 and 18, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Related to Stability of Plaque in Human Coronary Atherosclerosis Plaque

LIU Juan<sup>1</sup>, CHEN Li-Qin<sup>2</sup>, SU Xi-Lan<sup>3</sup>, CHEN Liang-Guang<sup>1</sup>, and LI Shi-Rong<sup>4</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Forensic Medicine, 3. Clinical Experiment Center, 4. Pathology Center, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China)

[KEY WORDS] Coronary Atherosclerosis; Plaque; Interleukin 6; Interleukin 18; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

[ABSTRACT] **Aim** To probe the relationship between plaque stability and expression levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 18 (IL-18) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in human coronary atherosclerosis. And to investigate the correlation of IL-6, IL-18 and TNF- $\alpha$ . **Methods** One hundred and four autopsy samples of coronary paraffin sections were selected and divided into unstable plaque group, stable plaque group and normal coronary group by means of SmartScape biology microscope analysis system. Plaque area, lipid core area and fibrous cap thickness in the three groups were measured and analyzed. The expression levels of IL-6, IL-18 and TNF- $\alpha$  in plaque of human coronary atherosclerosis were measured by immunohistochemical technique. **Results** There was no statistically and significant difference between the unstable plaque group and the stable plaque group in the area of coronary atherosclerosis plaque ( $P > 0.05$ ), but the lipid core area and fibrous cap thickness were statistically and significantly different between them ( $P < 0.05$ ). IL-6, IL-18 were not expressed, and TNF- $\alpha$  was little or not expressed in the normal coronary group. The expression levels of IL-6, IL-18 and TNF- $\alpha$  were higher in the unstable plaque group than in the stable plaque group, especially in the shoulder of fibrous cap and lipid core ( $P < 0.01$ ). There was positive correlation among the expression of IL-6, IL-18 and TNF- $\alpha$ . **Conclusions** The expression levels of IL-6, IL-18 and TNF- $\alpha$  in plaque of human coronary atherosclerosis was not only related to plaque stability but also correlated among one another.

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndromes, ACS) 约占冠状动脉粥样硬化性心脏病的 30% ~

40%, 是导致冠心病患者发生不良预后及猝死的主要原因。研究<sup>[1]</sup>表明, 冠状动脉粥样硬化斑块破裂、继发血栓形成是 ACS 发生的主要原因, 并且斑块破裂几乎全部发生在不稳定性斑块的基础上, 因此早期预测易破的不稳定性斑块对冠心病危险性诊断及治疗具有重要意义。本实验应用免疫组织化学技术对人冠状动脉粥样硬化斑块中白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor-

[收稿日期] 2008-04-03

[修回日期] 2008-07-10

[作者简介] 刘娟, 副主任医师, 主要研究方向为冠心病的防治, E-mail 为 mneyliuj@126.com。陈丽琴, 博士, 副教授, 主要研究方向为早期心肌梗死的死后诊断方法, E-mail 为 lqchenyj@163.com。通讯作者 李时荣, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 idlshrong@yahoo.com.cn。

$\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的蛋白表达情况进行检测, 以探讨它们与斑块稳定性的关系及其彼此间的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

浓缩型兔抗人 IL-18 多克隆抗体(编号 BA1215)、浓缩型兔抗人 TNF- $\alpha$  多克隆抗体(编号 BA0131)及即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒(编号 SA1022)系武汉博士德生物工程有限公司生产; 浓缩型鼠抗人 IL-6 单克隆抗体(编号 501101)系 Biolegend 生物工程有限公司产品; 即用型 SP 超敏试剂盒(编号 KII-9710)系福州迈新生物工程有限公司生产; SmartScape 2002 生物显微镜图像分析系统(型号 S/Ni SV-0002393)。

### 1.2 标本来源

内蒙古医学院法医学系 1993~2007 年间尸检的人冠状动脉石蜡包埋组织标本, 共 104 例, 其中 76 例经病理诊断证实有冠状动脉粥样硬化, 其中男 64 例, 女 12 例, 年龄 31~75 岁, 平均  $49.28 \pm 11.31$  岁; 另 28 例经病理诊断证实为正常冠状动脉(正常血管组), 其中男 20 例, 女 8 例, 年龄 28~60 岁, 平均  $43.50 \pm 10.36$  岁, 临床排除肿瘤、感染性疾病。两组间性别与年龄差异无显著性( $P > 0.05$ )。

### 1.3 冠状动脉粥样硬化斑块形态参数测量和标本分组

用生物显微镜图像分析系统对斑块面积、脂核面积和纤维帽厚度进行测量。斑块面积为内弹力膜所包围的面积与管腔面积之差; 脂核面积为斑块内、纤维帽下由界限明显的白色淡染区域所构成, 其内可见胆固醇结晶、泡沫细胞、炎细胞及坏死物质, 利用图像分析系统中多边形面积进行测量; 纤维帽厚度测量选取覆盖于脂核之上纤维帽最厚处进行测量。参考文献[2]将冠状动脉石蜡组织块标本分为不稳定斑块组、稳定斑块组和正常血管组。

### 1.4 免疫组织化学法检测白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 表达

(1) IL-18 和 TNF- $\alpha$  采用 SABC 法: 标本  $4 \mu\text{m}$  厚切片, 置于经 APES 处理的载玻片上,  $90^\circ\text{C}$  烤箱 40 min; 常规脱蜡水化;  $3\% \text{H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化物酶; PBS 工作液(pH 7.4)冲洗; 微波抗原修复, 根据抗体要求 TNF- $\alpha$  不用作抗原修复; 滴加一抗工作液(IL-18 稀释浓度为 1:50, TNF- $\alpha$  稀释浓度为 1:75),  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜; 然后滴加二抗工作液(生物素标记的山羊抗小鼠或兔 IgG),  $37^\circ\text{C}$  恒温箱孵育 40 min; 加链

酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物, DAB 显色剂显色, 二甲苯透明, 中性树脂封片。阴性对照用 PBS 代替一抗, 其余步骤相同。(2) IL-6 采用 SP 法: 大部分步骤同 SABC 法, 不同之处为用 SP 试剂盒中 A 试剂室温孵育 15 min, 以清除内源性过氧化物酶; 滴加一抗工作液(IL-6 稀释浓度为 1:50),  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜; 滴加二抗工作液(试剂 C),  $37^\circ\text{C}$  恒温箱孵育 40 min; 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,  $37^\circ\text{C}$  恒温箱孵育 20 min。阴性对照亦为 PBS 代替一抗。(3) 阳性结果判断: 凡在细胞膜或胞质处有棕黄色或棕褐色着色即为阳性细胞, 阴性对照片无棕黄色着色。参照文献[3]将斑块最易发生破裂的纤维帽肩部作为图像分析系统视野, 采取 SmartScape 生物显微镜图像分析系统对 IL-6 和 18 及 TNF- $\alpha$  阳性细胞染色进行测量, 400 倍光镜下选取 3 个视野, 测量阳性区域面积占参考面积(400 倍光镜下所构成的视野面积为  $1.094 \text{ mm}^2$ ) 的百分比并取其平均值作为分析指标。

### 1.5 统计分析

利用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。服从正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验; 不服从正态分布的资料以中位数和四分位间距( $M \pm Q$ )表示, 采用秩和检验( $H$  检验与  $U$  检验); 相关性分析采用 Spearman 法。

## 2 结果

### 2.1 冠状动脉粥样硬化斑块病理形态观察

76 例冠状动脉粥样硬化标本中, 不稳定性斑块 41 例, 稳定性斑块 35 例。正常血管组未见动脉粥样硬化斑块形成; 稳定斑块组则见脂质核心很小或无, 斑块由大量胶原组成, 胶原纤维内平滑肌细胞较多, 淋巴样细胞和巨噬细胞很少; 不稳定斑块组见斑块为偏心性斑块, 含有大的脂质坏死核心, 纤维帽很薄, 有的斑块内可见出血, 纤维帽内见较多淋巴样细胞和巨噬细胞浸润, 平滑肌细胞很少, 尤其在纤维帽的肩部(图 1)。

### 2.2 各组间斑块形态参数比较

正常血管组未见动脉粥样硬化斑块形成, 仅对不稳定斑块组与稳定斑块组的斑块面积进行比较, 结果表明两组间差异无显著性( $P > 0.05$ )。正常血管组无脂核和纤维帽形成; 不稳定斑块组脂核面积较大、纤维帽薄; 而稳定斑块组与不稳定斑块组相反, 表现为脂核面积小、纤维帽较厚, 两组相比差异有显著性( $P < 0.01$ , 表 1)。

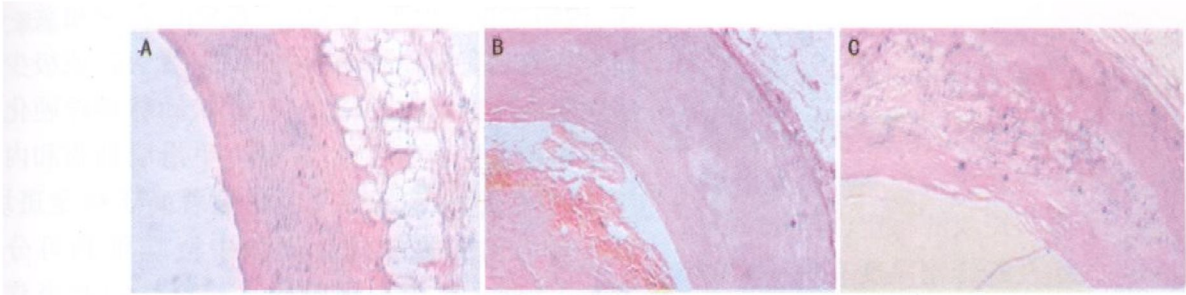


图 1. 冠状动脉粥样硬化斑块病理形态观察(HE, × 100) A 为正常血管组, B 为稳定斑块组, C 为不稳定斑块组。

表 1. 稳定斑块组和不稳定斑块组斑块面积( $\bar{x} \pm s$ )、脂核面积及纤维帽厚度(M ± Q)

分 组	n	斑块面积 ( $\mu\text{m}^2$ )	脂核面积 ( $\mu\text{m}^2$ )	纤维帽厚度 ( $\mu\text{m}$ )
稳定斑块组	35	1.97 ± 0.90	0.44 ± 0.41	142.00 ± 106.90
不稳定斑块组	41	2.18 ± 0.88	1.08 ± 0.57 <sup>a</sup>	56.00 ± 28.00 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与稳定斑块组比。

2.3 白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  在斑块中的表达

正常血管中 IL-6 和 IL-18 无表达, TNF- $\alpha$  无表达或极少量表达; 稳定斑块和不稳定斑块中, IL-6、IL-18 和 TNF- $\alpha$  均有表达, 但不稳定斑块中表达水平明显高于稳定斑块, 尤其是在纤维帽的肩部和脂质核

心。IL-6 主要表达在淋巴细胞的胞质中及细胞膜上, 呈棕褐色染色; IL-18 主要表达在巨噬细胞的胞质中, 呈棕黄色絮状或颗粒状, 血管内皮细胞的胞质中也有表达; TNF- $\alpha$  表达在血管内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞的胞质中, 呈棕黄色絮状 ( $P < 0.01$ , 表 2 和图 2)。

表 2. 各组白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达水平比较(M ± Q)

组 别	n	IL-18	IL-6	TNF- $\alpha$
正常血管组	28	0	0	0.00% ± 0.11%
稳定斑块组	35	0.21% ± 0.16%	0.23% ± 0.50%	1.94% ± 1.09%
不稳定斑块组	41	2.14% ± 2.49% <sup>a</sup>	3.75% ± 3.00% <sup>a</sup>	5.86% ± 5.18% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与稳定斑块组比较。

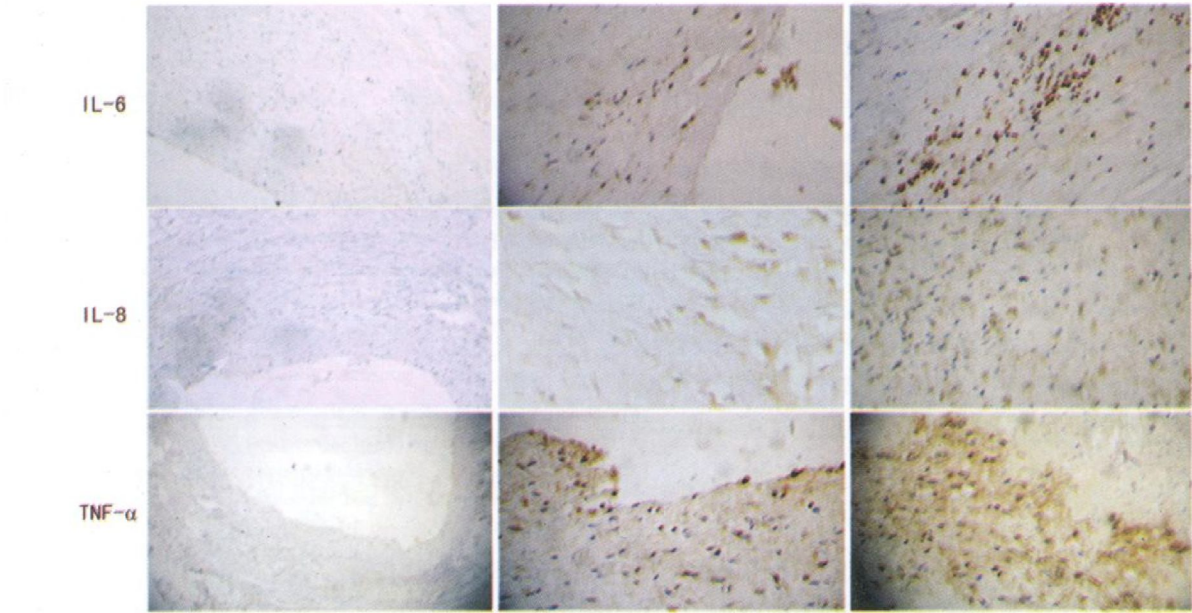


图 2. 白细胞介素 6、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  免疫组织化学染色图片 左为正常血管组(× 100), 中为稳定斑块组(× 400), 右为不稳定斑块组(× 400)。

2.4 白细胞介素 6 和 18 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达的相关性

在冠状动脉粥样硬化斑块中, IL-6 与 IL-18( $r =$

0.723,  $P < 0.01$ ) 和 TNF- $\alpha$ ( $r = 0.689$ ,  $P < 0.01$ ) 表达呈正相关关系, IL-18 与 TNF- $\alpha$  表达亦呈正相关关系( $r = 0.749$ ,  $P < 0.01$ )。



### 3 讨论

本实验利用图像分析系统对斑块形态参数进行测量,结果表明不稳定斑块组斑块面积与稳定斑块组差异无显著性,两组斑块脂核面积和纤维帽厚度差异有显著性,进一步表明斑块的稳定性与斑块的面积无关,而与脂核大小及纤维帽厚度有关。大的偏心性脂核由于圆周径应力作用于斑块肩部,使斑块不稳定<sup>[4]</sup>;纤维帽越薄,抗血流机械强度减弱,尤其是纤维帽的肩部,使斑块更易发生破裂<sup>[5]</sup>。

炎症反应是ACS的病因之一,ACS多发生在不稳定斑块破裂基础上<sup>[6]</sup>。本实验检测人冠状动脉粥样硬化斑块和稳定斑块中IL-6、IL-18和TNF- $\alpha$ 蛋白表达,结果表明这几种因子在不稳定斑块中的表达显著增高,提示它们与斑块稳定性有关。

IL-6在活化淋巴细胞中广泛表达,在冠状动脉粥样硬化斑块中,IL-6通过诱导肝合成急性期蛋白如C反应蛋白上调粘附分子,促使单核细胞趋化蛋白1分泌,使更多单核细胞进入血管内皮下成为巨噬细胞,吞噬低密度脂蛋白,并分泌一系列蛋白溶解酶,特别是基质金属蛋白酶<sup>[7]</sup>,削弱纤维帽,从而使斑块易发生破裂。陈燕等<sup>[8]</sup>比较了19例不稳定型心绞痛及23例稳定型心绞痛患者血中IL-6水平,发现不稳定型心绞痛患者IL-6水平异常增高。本研究结果表明IL-6主要表达在淋巴细胞质中及胞膜上,在不稳定性斑块中表达水平显著高于稳定性斑块,而在正常血管中不表达,表明IL-6表达水平增高与粥样硬化斑块的不稳定有关。

IL-18以前体形式存在于单核/巨噬细胞和淋巴细胞等细胞表面。IL-18导致动脉粥样斑块发生破裂的可能机制是IL-18可诱导 $\gamma$ 干扰素产生,从而抑制平滑肌细胞表达前胶原蛋白基因,阻止胶原蛋白合成;它还能提高基质金属蛋白酶的活性,胶原蛋白含量减少,使纤维帽变薄,斑块易发生破裂。Blankenberg等<sup>[9]</sup>研究冠状动脉旋切标本时发现,ACS患者粥样斑块中IL-18的表达水平明显增加。本研究发现IL-18主要表达在巨噬细胞中,少数内皮细胞也有表达,并且在不稳定性斑块中表达明显高于稳定性斑块,正常血管未见表达,表明IL-18在冠状动脉粥样斑块发展及斑块破裂中起重要作用。

TNF- $\alpha$ 来源广泛,包括免疫细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等,具有多种生物活性。余丹青等<sup>[10]</sup>通过血管内超声将冠状动脉粥样硬化斑块分为稳定斑块组和不稳定斑块组,并测量血中TNF- $\alpha$ 浓度,发现TNF- $\alpha$ 水平在不稳定斑块组中明显高于稳定斑块

组,说明TNF- $\alpha$ 水平与斑块不稳定性密切相关。本研究检测到正常冠状动脉中TNF- $\alpha$ 无表达或极少量表达于内皮细胞的胞质中,在冠状动脉粥样硬化斑块组织中主要表达在巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞,且在不稳定斑块中表达显著高于稳定斑块。其机制为动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞可分泌TNF- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ 对内皮细胞的直接毒性引起炎症反应,使血管内皮损伤,上调粘附分子,形成更多的巨噬细胞,产生更多的TNF- $\alpha$ ,其结果使稳定性斑块向不稳定发展。

研究<sup>[11]</sup>发现内皮细胞受损,激发炎症反应,活化的巨噬细胞分泌IL-18,而IL-18分泌反过来又会刺激巨噬细胞与活化的内皮细胞分泌IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 等细胞因子,从而形成炎症反应环,最终使斑块中脂核增大、纤维帽变薄,斑块趋于不稳定。本研究结果表明IL-6、IL-18和TNF- $\alpha$ 这几种细胞因子间的表达呈正相关关系,验证了文献报道这几种因子具有相关性。

综上所述,IL-6、IL-18和TNF- $\alpha$ 在斑块中表达水平与斑块稳定性有关,在不稳定性斑块中的表达显著高于稳定性斑块和正常冠状动脉,且这几种因子间具有正相关关系。检测这些因子有助于临床医生预测冠心病危险事件的发生,为早期干预和降低其死亡提供新方法。

#### [参考文献]

- [1] 李海文,杨志明,萧传实. 冠状动脉粥样硬化斑块稳定性鉴别的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(6): 581-585.
- [2] 韦立新. 重视冠心病的病理学研究[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(3): 132-135.
- [3] 郭爱桃,石怀银,韦立新,等. 人冠状动脉粥样硬化斑块内细胞成分与斑块稳定性关系[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(22): 2093-096.
- [4] Vimani R, Burke AP, Kolodgie FD, et al. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions [J]. J Intern Cardiol, 2002, 15(6): 439-446.
- [5] Vimani R, Burke AP, Kolodgie FD, et al. Pathology of the thin cap fibrous ather: a type of vulnerable plaque [J]. J Intern Cardiol, 2003, 16(3): 267-272.
- [6] Naruko T, Ueda M, Haze K, et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2002, 106(23): 2894-900.
- [7] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase: structure, function, and biochemistry [J]. Circulation, 2003, 92(8): 827-839.
- [8] 陈燕,常志文. 冠心病患者中白细胞介素-6和白细胞介素-10浓度变化[J]. 新医学, 2004, 7(35): 413-414.
- [9] Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P, et al. Interleukin 18 and the risk of coronary heart disease in European men: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (PRIME) [J]. Circulation, 2003, 108(20): 2453-459.
- [10] 余丹青,陈纪言,周颖玲,等. 冠状动脉粥样硬化斑块稳定性与肿瘤坏死因子相关研究[J]. 岭南心血管病杂志, 2002, 10(8): 332-335.
- [11] Tenger C, Sundborger A, Jawien J, et al. IL-18 accelerate atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(4): 791-796.

(此文编辑 许雪梅)