

# 乙酰肝素酶与冠状动脉粥样硬化斑块稳定性的关系

郭 勇<sup>1</sup>, 韦立新<sup>2</sup>, 郭爱桃<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军 161 中心医院病理科, 湖北省武汉市 430010; 2. 中国人民解放军总医院病理科, 北京市 100853)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 乙酰肝素酶; 免疫组织化学; 急性冠状动脉综合征

[摘要] 目的 探讨乙酰肝素酶在人体冠状动脉稳定性斑块和不稳定性斑块中的分布及其在不稳定性斑块形成中的可能作用。方法 选取经临床和病理证实的急性冠状动脉综合征病例进行免疫组织化学检测并通过计算机分析系统进行量化分析。结果 不稳定性斑块组乙酰肝素酶的聚集程度明显高于稳定性斑块组。结论 乙酰肝素酶与斑块不稳定性存在一定联系, 可能参与了斑块的去稳定过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Relation Between Heparanase and Stabilization of the Coronary Atherosclerotic Plaques

GUO Yong, WEI Li-Xin, and GUO Ai-Tao

(Department of Pathology, 161 Central Hospital of the People's Liberation Army of China, Wuhan 430010, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Heparanase; Immunohistochemistry; Acute Coronary Syndrome

[ABSTRACT] Aim To analyse the relation between heparanase (HPA) and stabilization of atherosclerotic plaques in human coronary arteries; and to investigate the role of HPA in creating vulnerable sites in atherosclerotic plaques. Methods

Samples of coronary arteries were obtained at autopsies of 36 patients with acute coronary syndrome. Eighty randomly selected blocks were studied by immunohistochemistry using antibody against HPA. Computer-aid planimeter was used for quantitative analysis. Results In unstable plaques, percentage of immunoreactive areas for HPA was significantly higher than that in stable plaques. Conclusions HPA in coronary atherosclerotic plaque is an important factor in determining stabilization of the plaques.

冠状动脉粥样硬化斑块破裂继发血栓形成成为主要病理学改变的急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)严重危害着患者的生命。近年来,国内外学者经研究发现不稳定性斑块因具有较大偏心性脂质核心、纤维帽较薄(厚度小于 65  $\mu\text{m}$ )并形成薄弱的肩部、大量的炎细胞浸润、平滑肌纤维较少、斑块的肩部及基底部新生的微血管比较多而易于破裂,稳定性斑块则相反。因此,观察稳定性斑块和不稳定性斑块之间的差异,寻找致使斑块稳定性下降的原因,可为临床 ACS 的防治提供重要的理论依据。一些国内学者接受了动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症的观点,并探讨阐述了其中的炎症机制<sup>[1,2]</sup>。乙酰肝素酶(heparanase, HPA)在炎症反应中起重要作用,但在动脉粥样硬化的研究中甚少。本研究以人体冠状动脉标本为研究材料,从病理组织学角度观察 HPA 在稳定性斑块和不稳

定性斑块中表达的差异,分析其对斑块稳定性的影响和作用机制,为 ACS 的临床防治提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 病例的选择

选取中国人民解放军总医院 2004 年 7 月至 2005 年 12 月死亡前有明确稳定型心绞痛或 ACS(包括不稳定型心绞痛及急性心肌梗死)病史的尸检病例,共收集 36 例。其中男性 33 例,年龄 59~105 岁,平均  $83.70 \pm 8.26$  岁;女性 3 例,年龄 79~87 岁,平均  $83.67 \pm 4.16$  岁。其中稳定型心绞痛 13 例,不稳定型心绞痛 7 例,急性心肌梗死 16 例。

### 1.2 组织标本处理和研究对象的选择

分离所有病例冠状动脉的左主干、左前降支、左旋支和右冠状动脉。室温下以 12.5% 中性乙二胺四乙酸(EDTA)二钠水溶液脱钙 1 周左右,以 5 mm 厚度连续取材。经脱水、石蜡包埋,以 5  $\mu\text{m}$  厚度切片,进行苏木素—伊红(HE)染色。然后按照美国心脏学会新的 As 组织病理学分型<sup>[3,4]</sup>方法,筛选出结构清楚、属于  $\text{TC}$  v 型的晚期病变共 572 个组织块作为研究对象。

[收稿日期] 2008-06-02 [修回日期] 2008-08-20

[作者简介] 郭勇, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病理, E-mail 为 guoyong301@sina.com。通讯作者韦立新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 weik301@263.net。郭爱桃, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向为生殖病理及心血管病理。

### 1.3 实验分组

参照 Morteza 等<sup>[5]</sup>定义不稳定性斑块的主要特征: 巨噬细胞大量聚集的炎性活动斑块; ④脂质核心超过斑块体积的 40% 或脂质核心较小但伴有纤维帽厚度在 100  $\mu\text{m}$  以下的斑块; ④内皮细胞损伤并伴有血小板聚集的斑块; 纤维帽存在裂隙或破损的斑块。具备以上一种或一种以上特征划分为不稳定性斑块。进一步将上述组织块分为稳定性斑块组(共计 423 块)和不稳定性斑块组(共计 149 块)。根据切片编号顺序, 利用 Excel 软件的随机数发生器, 在稳定性斑块组及不稳定性斑块组中各随机抽取 40 个组织块, 对每个斑块组织进行 HPA 的免疫组织化学染色。

### 1.4 免疫组织化学染色方法

兔抗人 HPA 多克隆抗体和即用型 SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司; 免疫组织化学采用三步法, 步骤参照试剂盒, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树胶封片, 镜下观察。

### 1.5 结果分析和判定

观察阳性物质在斑块内的分布特点, 以最易发生破裂的斑块肩部作为主要的研究点。HPA 的免疫组织化学染色结果判定: 用高倍视野(400 倍)选取斑块肩部阳性表达最集中的 3 个区域, 利用 IMAGEPROPLUS4.0 多媒体彩色病理图文分析系统, 进行阳性面积比的测定, 并取其平均值作为分析指标。

### 1.6 统计学处理

稳定性斑块组与不稳定性斑块组肩部 HPA 免疫组织化学阳性面积比较采用  $t$  检验, 数据的统计处理运用 SPSS 软件包和 EXCEL 数据分析软件。

## 2 结果

### 2.1 稳定性斑块及不稳定性斑块的形态学观察

在光镜下观察 HE 染色结果, 稳定性斑块脂质核心较小, 纤维帽比较厚, 部分稳定性斑块已经纤维化, 脂质核心消失; 不稳定性斑块往往在大的脂质核心上面覆盖着比较薄的纤维帽, 纤维帽可出现裂隙, 斑块内尤其是斑块的肩部见大量的炎细胞浸润, 以巨噬细胞和泡沫细胞为主, 斑块的肩部最为薄弱, 易发生破裂(图 1)。

### 2.2 稳定性斑块和不稳定性斑块中乙酰肝素酶的分布

乙酰肝素酶(HPA)在不稳定性斑块和稳定性斑块均有表达(图 2)。HPA 阳性物质在斑块的肩部、基底部和纤维帽均有分布。阳性细胞主要为巨噬细

胞, 巨噬细胞源性泡沫细胞及内皮细胞也有表达。阳性物质主要在细胞质内分布。图像分析结果表明不稳定性斑块组肩部 HPA 阳性面积比( $77.85\% \pm 13.16\%$ )明显高于稳定性斑块组( $37.85\% \pm 16.50\%$ ,  $P < 0.001$ )。

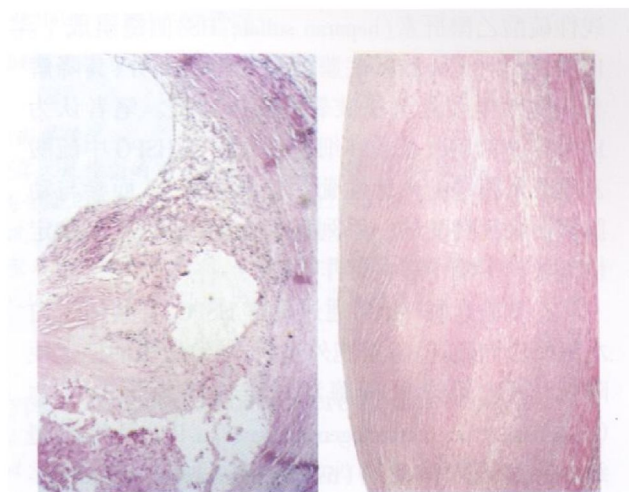


图 1. 不稳定性斑块(左,  $\times 20$ )与稳定性斑块(右,  $\times 10$ )HE 染色结果

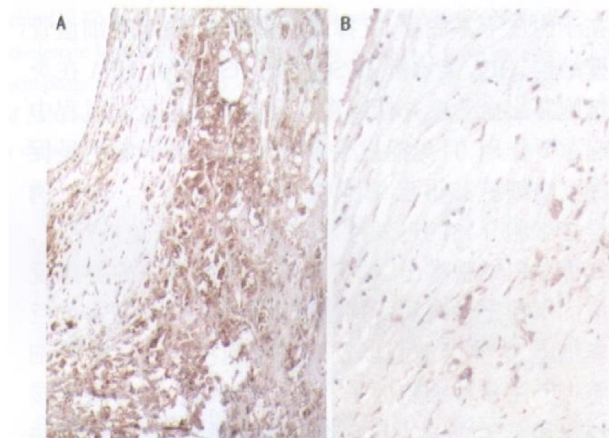


图 2. 免疫组织化学染色结果( $\times 50$ ) A 为不稳定性斑块, B 为稳定性斑块。

## 3 讨论

动脉粥样硬化性心脏病是中老年人的常见病, 在我国近年发病率也逐渐增加。动脉粥样硬化早期病变形成的脂纹是一种可逆性变化, 可以消退, 但是晚期斑块一旦形成, 则难以恢复正常。不过, 对于晚期斑块而言, 既可继续发展为形态及构成不稳定而易于破裂的不稳定性斑块, 又可逐渐退变纤维化而稳定性增加。因此, 研究如何预防不稳定性斑块的出现和防止不稳定性斑块的稳定性进一步降低将对临床冠心病的防治有着重大的意义。

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)是广泛存在于各种组织细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和细胞表面的蛋白聚糖类,也是基底膜(basement membrane, BM)的结构组成部分。HSPG 主要由一个蛋白核心和数个与之共价连接的线性硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)侧链组成<sup>[6]</sup>。HSPG 作为 ECM 和基底膜的重要组成部分,其降解是动脉粥样硬化斑块破裂的重要前提。笔者认为 HPA 裂解细胞外基质和细胞基底膜中 HSPG 中硫酸乙酰肝素侧链的内源性葡萄糖醛酸酶,从而参与动脉粥样硬化病变的一系列病理生理过程,在不稳定性斑块的形成中起关键作用。

乙酰肝素酶(HPA)通过降解 HSPG,与其他蛋白水解酶协同破坏、降解胞外基质,导致斑块的稳定性降低;通过促进尿激酶型纤维溶解酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, u-PA)及组织型纤维溶解酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)的释放,从而激活纤维溶解酶原,活化基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP),而 MMP 促使胶原降解进一步导致斑块稳定性下降;HSPG 主要存在于内皮下基底膜,支撑着血管内皮,稳定毛细血管壁结构,HPA 能水解 HSPG 中的 HS,因此 HPA 在炎细胞穿出血管壁并持续渗出到炎症反应区的过程中起重要作用,且炎症发生前多种细胞因子常明显促进巨噬细胞和淋巴细胞中 HPA 的表达<sup>[7]</sup>。HPA 诱导 T 细胞介导的迟发性超敏反应和自身免疫反应,促进以白细胞渗出、粘附和趋化作用为主的炎症反应。不稳定性斑块特别是斑块的肩部常见较多的巨噬细胞、T 淋巴细胞以及肥大细胞浸润。这些炎细胞可分泌多种细胞因子和蛋白溶解酶,直接或间接地作用于斑块中的其它细胞和间质成分<sup>[8]</sup>,使斑块形态发生改变而易于破裂。肝素和肝素衍生物以及几种 HPA 抑制剂被证实有抗炎活性,进一步表明炎

症时 HPA 参与了炎细胞扩散外渗的过程。本研究表明 HPA 在动脉粥样硬化病变中的巨噬细胞、巨噬细胞源性泡沫细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和淋巴细胞内均有表达,且不稳定性斑块组斑块肩部 HPA 的表达明显高于稳定性斑块组,提示 HPA 参与了斑块的去稳定过程。HPA 在动脉粥样硬化中研究甚少,最近国外学者提出 HPA 可能是一个促进动脉粥样硬化发展和心血管疾病并发症发生新的危险因素<sup>[9]</sup>。本研究提示 HPA 与斑块不稳定性存在一定联系,可能参与了斑块的去稳定过程。HPA 与斑块不稳定性是否存在因果关系尚待进一步深入研究和证实,通过抑制 HPA 活性有可能成为治疗动脉粥样硬化的一个新策略。

#### [参考文献]

- [1] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(2): 93-95.
- [2] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(3): 249-252.
- [3] Sary HC, Chandler AB, Glagov JR, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. *Circulation*, 1994, 89(5): 2 462-478.
- [4] Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of the advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. *Circulation*, 1995, 92(5): 1 355-374.
- [5] Morteza N, Peter L, Erling F, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I [J]. *Circulation*, 2003, 108: 1 664-672.
- [6] Eccles SA. HPSE: breaking down barriers in tumors [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 735-736.
- [7] Sasaki M, Ito T, Kashima M, et al. Erythromycin and clarithromycin modulation of growth factor-induced expression of HPSE mRNA on human lung cancer cells in vitro [J]. *Mediator Inflamm*, 2001, 10(5): 259-267.
- [8] Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, et al. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques [J]. *J Atheroscler Thromb*, 1994, 1(suppl1): s10-13.
- [9] Cohen-Mazor M, Sela S, Mazor R, et al. Are primed polymorphonuclear leukocytes contributors to the high heparanase levels in hemodialysis patients [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(2): 651-658.

(此文编辑 许雪梅)