

CD34在人冠状动脉粥样硬化病变中的表达

宋京郁, 狄纯婵, 李 慧, 沈宇佳

(延边大学基础医学院病理学教研室, 吉林省延吉市 133000)

[关键词] 冠状动脉粥样硬化; CD34 血管发生; 免疫组织化学

[摘要] 目的 探讨 CD34 在人冠状动脉粥样硬化病变中的表达及其与冠状动脉粥样硬化病变类型、管腔狭窄之间的关系及其意义。方法 选用 53 例尸检病例的 312 块冠状动脉组织标本。光镜下诊断冠状动脉粥样硬化病变及其类型, 用免疫组织化学计数冠状动脉粥样硬化病变中 CD34 阳性内皮细胞微血管和 CD68 阳性巨噬细胞。结果 冠状动脉粥样硬化病变内膜 CD34 阳性微血管随着冠状动脉粥样硬化病变进展和管腔狭窄程度的加重而增多, 分别呈正相关 ($r = 0.344$ $r = 0.285$ $P < 0.01$), CD34 阳性微血管在早期和进展期病变之间差异有显著性 ($P < 0.05$); 冠状动脉粥样硬化病变内膜 CD34 阳性微血管在正常胆固醇和高胆固醇组之间差异有显著性 ($P < 0.01$); 冠状动脉粥样硬化病变内膜 CD68 阳性巨噬细胞主要分布在 CD34 阳性微血管周围, CD34 阳性微血管和浸润的 CD68 阳性巨噬细胞之间呈正相关 ($r = 0.303$ $P < 0.01$)。结论 人冠状动脉粥样硬化病变内膜 CD34 阳性微血管随着冠状动脉粥样硬化病变进展和管腔狭窄程度的加重而增多, CD68 阳性巨噬细胞浸润和高胆固醇血症促进粥样斑块内血管发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of CD34 in Human Coronary Atherosclerotic Lesion

SONG Jing-Yu, DI Cun-Dan, LI Hui and SHEN Yu-Jia

(Department of Pathology, College of Basic Medicine Yanbian University, Yanji 133000 China)

[KEY WORDS] Coronary Atherosclerosis, CD34, Angiogenesis, Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of CD34 in human coronary atherosclerotic lesions and the correlation between the expression of CD34 and the lesion types of coronary atherosclerosis, the degree of luminal stenosis and its significance. **Methods** 312 of coronary artery tissue samples were selected in 53 cases of autopsy. Coronary atherosclerotic lesion and its types were diagnosed by light microscope and CD34-positive microvessels and CD68-positive macrophages in coronary atherosclerotic lesion were counted by immunohistochemistry. **Results** CD34-positive microvessels in intima of coronary atherosclerotic lesions were increased with progress of coronary atherosclerotic lesions and aggravation of luminal stenosis with positive correlation ($r = 0.344$ $r = 0.284$ $P < 0.01$), respectively, and the number of CD34-positive microvessels had significant differences between early lesions (type IV-④) and advanced lesions (⑤-Ⅵ, $P < 0.05$); The number of CD34-positive microvessels had significant difference between normal cholesterol and hypercholesterolemia ($P < 0.05$); CD68-positive macrophages in intima of coronary atherosclerotic lesions mainly distributed around the CD34-positive blood microvessels and had positive correlation with CD34-positive microvessels ($r = 0.303$ $P < 0.01$).

Conclusion CD34-positive neomicrovessels in intima of human coronary atherosclerosis are increased along with the progress of coronary atherosclerotic lesions and the aggravation of luminal stenosis and the increased infiltration of CD68-positive macrophages and hypercholesterolemia facilitate angiogenesis in atheromatous plaque of coronary atherosclerosis.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是动脉壁的慢性炎症性疾病。新生血管形成是最初通过血管祖细胞和/或内皮细胞介导的形成新血管的过程, 发生一个稳定的新血管管腔^[1]。血管发生在几个疾病中与炎症紧密关联, 包括风湿性关节炎、动脉粥样硬化、癌和血液恶性肿瘤等。在 As 中新生血管形成突

出形式的血管发生是从毛细血管后静脉内皮细胞 (endothelial cell, EC) 萌芽来介导而最初形成新毛细血管^[2]。单核/巨噬细胞和淋巴细胞的积聚是在人类和实验性 As 中的一个显著特征, 通过分泌炎症介质、细胞因子和生长因子有助于 As 斑块的始发和进展^[3,4]。目前, 在人类冠状动脉 As 病变中, 关于 CD34 阳性 EC 的微血管与冠状动脉 As 病变类型、管腔狭窄之间相关性的特点, 尚未见报道。本研究旨在探讨 CD34 在人冠状动脉 As 病变中的表达及其与冠状动脉 As 病变类型、管腔狭窄之间的关系及意义。

[收稿日期] 2010-07-06 [修回日期] 2010-08-20

[基金项目] 吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目 (吉教科合字 [2009] 第 26 号)

[作者简介] 通讯作者宋京郁, 教授, 博士, 主要研究方向为心血管病理学, Email 为 jysong0618@ybu.edu.cn; 狄纯婵, 李慧, 沈宇佳, 硕士研究生, 主要研究方向为心血管病理学。

1 材料与方法

1.1 材料

321例尸检材料中,选取临床诊断为冠心病的53例,对冠状动脉进行组织病理学检查。检测人类EC抗CD34小鼠单克隆抗体购于Novocastra公司,人类巨噬细胞/单核细胞的抗CD68小鼠单克隆抗体购于Dako公司。

1.2 组织病理学检查

所有尸检的心脏标本固定于10%中性福尔马林。根据美国心脏协会(American heart association, AHA)冠状动脉切片分类方案^[5],从每个心脏中取6个冠状动脉标本,即右心室支前右冠状动脉、锐角支前右冠状动脉、左前降支、第二对角支前左前降支、钝圆支前左旋支和钝圆支。石蜡包埋的所有标本以5 μ m的厚度连续切片。组织学标本用HE、EVG和Masson's三色染色。遵循AHA分类^[5],用光学显微镜把每个标本分类为冠状动脉As病变类型(iv~v型)及观测病变特点,并把冠状动脉As病变又分为两个种类:iv~Ⅳ型为早期病变,Ⅴ~v型为进展期病变。根据冠状动脉管腔狭窄程度分级为4级:iv级狭窄是指切片狭窄面积为0%~25%,Ⅴ级为26%~50%,Ⅳ级为51%~75%,Ⅲ级为>76%者。在高倍镜下,计数冠状动脉As病变内膜CD68-阳性巨噬细胞数及CD34-阳性EC的微血管数。两个人采用双盲法独立地进行了所有形态测定检查。

1.3 免疫组织化学染色

参考文献[6]的标准两步技术进行免疫组织化学染色,抗人CD34、CD68小鼠单克隆抗体的工作浓度分别为1:200和1:400。非免疫的兔和小鼠IgG用于替代第一抗体作为阴性对照。用苏木素复染,脱水、透明、封片和镜下观察。

1.4 统计学分析

所有收集和检测的资料采用SPSS 13.0统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析检验;选择Bivariate过程行相关分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 冠状动脉粥样硬化病变类型中CD34-阳性内皮细胞的微血管数

冠状动脉内膜弥漫性增厚中,未见CD34-阳性EC的微血管。冠状动脉As病变内膜CD34-阳性EC的微血管数随着冠状动脉As病变的进展而增多,尤其是CD34-阳性EC的血管数在早期和进展期

病变之间有显著性差异($P < 0.01$),并与冠状动脉As病变类型呈正相关($r = 0.344, P < 0.01$)。CD34-阳性EC的微血管数在正常胆固醇组($n = 75, 26.76 \pm 2.64$)明显低于高胆固醇组($n = 63, 34.14 \pm 3.41$),差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 冠状动脉粥样硬化管腔狭窄程度级别中CD34-阳性内皮细胞的微血管数

冠状动脉As病变内膜CD34-阳性EC的微血管数随着冠状动脉管腔狭窄程度的加重而增多,并在Ⅰ级($n = 16, 50.81 \pm 6.04$)狭窄和Ⅱ级($n = 26, 17.42 \pm 1.64$)、Ⅲ级($n = 96, 27.73 \pm 2.34$)狭窄之间差异均有统计学意义($P < 0.05$),而且CD34-阳性EC的微血管数与冠状动脉管腔狭窄程度呈正相关($r = 0.285, P < 0.01$)。

2.3 冠状动脉粥样硬化病变内膜中浸润的CD68-阳性巨噬细胞数和CD34-阳性内皮细胞的微血管数之间的关系

CD34-阳性EC的微血管多数定位于炎症或巨噬细胞浸润的区域和易破裂倾向的薄纤维帽粥瘤肩部区,CD68-阳性巨噬细胞浸润在冠状动脉As病变内膜CD34-阳性EC的微血管周围(图1),并冠状动脉粥样硬化病变内膜中浸润的CD68-阳性巨噬细胞数和CD34-阳性EC的微血管数呈正相关($r = 0.303, P < 0.01$,图2)。

3 讨论

CD34分子于1984年被美国科学家Civin发现,属于钙粘蛋白家族,人类CD34基因位于染色体1q32,是一种分子量为105~120 kDa高度糖基化的iv型跨膜蛋白,选择性的表达于人类及其他哺乳动物造血干细胞(human stem cell HSC)、祖细胞(progenitor cell PC)和血管EC^[7]。在众多血管EC标记物中,CD34更具敏感性和特异性,易于观察。在As中新生血管形成突出形式的血管发生是从毛细血管后静脉EC萌芽来介导而最初形成新毛细血管^[2]。已公认的血管发生是冠状动脉和颈动脉致As过程的一个特征。斑块血管发生在As的发展中起一个重要作用。血管滋养管(vasa vasorum, VV)血管发生和中膜的浸润对内膜的发育和扩大提供营养,因此,在早期病变中可以防止细胞死亡并有助于斑块的增长和稳定。内膜新生血管的表达直接与粥样斑块的发展阶段、斑块破裂的危险有关,随后出现症状性疾病、缺血性神经事件和心肌梗死发生的时刻^[8]。新血管形成的分子机制是大部分与缺氧

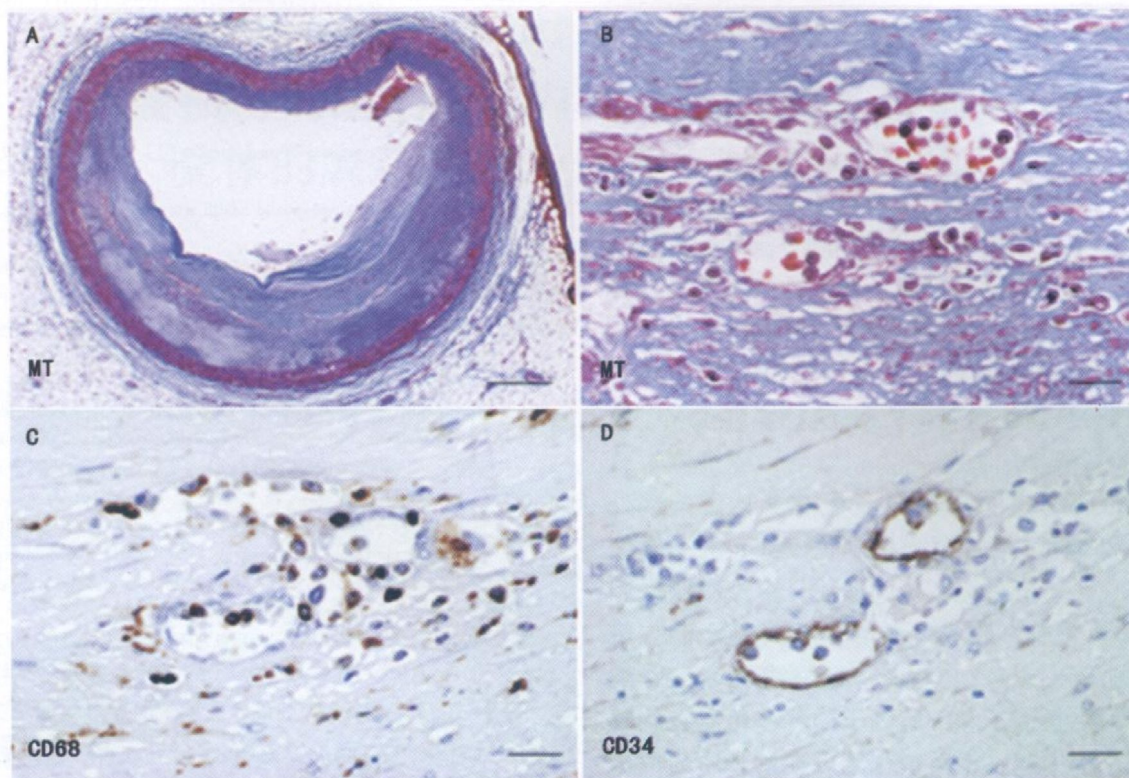


图 1 在冠状动脉粥样硬化病变内膜中 CD34 和 CD68 的免疫组织学表达。图 A、B 为 Masson's 三色染色; 图 C 为 CD68 免疫组织化学染色, CD68 表达在新生血管周围单核/巨噬细胞; 图 D 为 CD34 免疫组织化学染色, CD34 表达在新生血管的 EC; 图 B、C、D 为图 A 连续切片长方形框内的放大图。图 A 刻度条为 500 μm , 图 B、C、D 刻度条为 50 μm 。

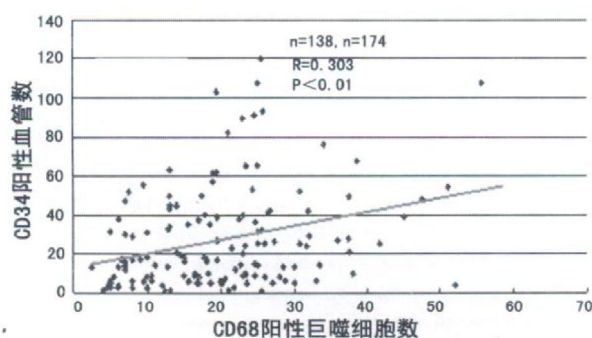


图 2 冠状动脉粥样硬化中 CD-34 阳性微血管数和 CD68 阳性巨噬细胞数之间的相关关系

诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 介导的缺氧有关^[2-9], 而最近研究表明主要与炎症和 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 活化介导不依赖缺氧的途径也有关^[10]。本研究结果表明, 在冠状动脉内膜弥漫性增厚中, 未见 CD34 阳性 EC 的微血管, 冠状动脉 As 病变内膜明显增厚致冠状动脉 As 病变越发展, 管腔狭窄程度越加重, CD34 阳性 EC 的微血管越多, CD34 阳性 EC 的微血管数在早期和进展期病变之间有显著性差异, 说明冠状动

脉 As 进展期病变更明显地促进冠状动脉 As 斑块内血管发生和粥样斑块并发症的发生。

As 发生在 VV 相对缺乏时, 因为这减少从血管壁中脂蛋白的流出量。自从缺氧的主要结果是增加血管形成以来, 斑块内血管可增殖与这个有效刺激有关。VV 的外膜新生血管形成发生在血管损伤发展前的实验性高胆固醇血症性冠状动脉, 特别是通过二级脉管的增加和正常 VV 模式的紊乱而发生, 这可以是早期 As 重塑过程的一部分^[11]。高胆固醇血症在冠状动脉和颈动脉斑块进展的早期与 VV 的增生有关。William 等^[12]第一次证明, 在高胆固醇猴子中存在的 As 通过 VV 诱导血流量的增加和通过去除高脂饮食引发的斑块的退化减少对冠状动脉中膜和内膜的 VV 密度和血流量。高胆固醇水平与血清 VEGF 表达的增加有关并在 EC 和平滑肌细胞上引起生长因子受体的上调。此外, 在促氧化细胞变化响应而产生的 ox-LDL 能加重炎症反应, 提示高脂水平、炎症与可能血管发生之间的一个连接^[13]。体外研究已表明, 用 ox-LDL 刺激 HUVEC 上调粘附分子 (包括 ICAM-1, E 选择素和 P 选择素、I β 6) 等炎症蛋白、组织因子等血栓形成因子和 MMP-2、MMP-

9等重塑蛋白,其中多数也是血管发生的刺激者^[14]。本研究结果表明,冠状动脉As病变内膜CD34阳性EC的微血管数在高胆固醇组明显多于正常胆固醇组,提示冠状动脉As病变的进展过程中,高胆固醇血症不仅促进和加重冠状动脉As病变,而且也促进冠状动脉As病变内膜的血管发生。

血管发生依赖于浸润炎症细胞分泌的各种细胞因子和生长因子的联合活化。新生血管形成通常伴有显著的T细胞和巨噬细胞浸润为特征的慢性免疫和炎症应答^[15]。晚期血管发生的抑制能中断阳性反馈周期,当新生血管形成时,炎症应答永存于连续周期,抑制斑块内血管发生和减少巨噬细胞对斑块的稳定性有有益的效应^[16]。在中膜-内膜连接处的巨细胞和CD68阳性巨噬细胞是VEGF的主要细胞来源。在脉管炎中新VV的形成是由炎细胞来调节,而不是血管壁细胞^[17]。炎细胞局灶性浸润与斑块内新生血管形成区和出血的相互关系提示巨噬细胞和白细胞生长因子和细胞因子的释放可以在调整血管形成过程中起一个关键作用。在富脂质易损斑块部位的微血管粘附分子的表达和新生血管形成可维持炎症细胞的浸润,有助于斑块的不稳定作用。已表明巨噬细胞浸润、斑块内出血和伴高微血管密度破裂倾向的薄纤维帽病变之间的非常相关性,同时这些特征在钙化或玻璃样变的人类动脉斑块中不常见,提示新生血管形成、炎症和血栓形成之间的连接^[18]。斑块新生血管的表型在决定斑块稳定性中也可以是重要的,如新血管网络、伴有弱完整性、无平滑肌细胞/周皮细胞覆盖的未成熟血管分别充当炎细胞浸润部位、炎细胞渗漏和斑块内出血的作用^[15-19]。人类冠状动脉As病变内膜CD68阳性巨噬细胞数随着冠状动脉As病变进展和管腔狭窄程度的加重而增多,表明巨噬细胞浸润始终始发和加重冠状动脉As病变的进展,大量巨噬细胞在斑块肩部区浸润和脂质坏死核心的增大与冠状动脉As病变进展、不稳定斑块破裂及并发症的发生有关^[20]。本研究结果表明,冠状动脉As病变内膜CD34阳性EC的微血管多数常定位于炎症或巨噬细胞浸润的区域和易破裂倾向的薄纤维帽粥样瘤肩部区,CD68-阳性巨噬细胞主要分布在CD34阳性EC的微血管周围,CD34阳性EC的微血管和浸润的CD68阳性巨噬细胞之间呈正相关,提示人冠状动脉As病变内膜CD68阳性巨噬细胞浸润促进冠状动脉As斑块内血管发生,炎症和血管发生是相辅相成的。

总之,人冠状动脉病变内膜CD34阳性微血管随着冠状动脉粥样硬化病变进展和管腔狭窄程度的

加重而增多,CD68阳性巨噬细胞浸润和高胆固醇血症促进粥样斑块内血管发生。

[参考文献]

- [1] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature* 1997; **386**: 671-674
- [2] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. *Nat Med* 2003; **9**: 653-660
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature* 1993; **362**: 801-809
- [4] Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, et al. Immune mechanisms in atherosclerosis [J]. *Arteriosclerosis* 1989; **9**: 567-578
- [5] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of 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]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 1512-1531
- [6] Sun J, Yoshida S, Nakashima Y, Chen Y-X, et al. Interleukin-10 expression is positively correlated with oxidized LDL deposition and inversely with T-lymphocyte infiltration in atherosclerotic intimas of human coronary arteries [J]. *Pathol Res Pract* 2006; **202**: 141-150
- [7] Civin CI, Strauss LC, Brovall C, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. ④ A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KC-1a cells [J]. *J Immunol* 1984; **133** (1): 157-165
- [8] Slevin M, Krupinski J, and Badimon L. Controlling the angiogenic switch in developing atherosclerotic plaques: Possible targets for therapeutic intervention [J]. *J Angiogenesis Res* 2009; **1** (4): 1-10
- [9] Senozza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences [J]. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**: 47-53
- [10] Frantz S, Vincent KA, Feron O, et al. Innate immunity and angiogenesis [J]. *Circ Res* 2005; **96**: 15-26
- [11] Ziello JE, Jovin D, Huang Y. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia [J]. *J Biol Med* 2007; **80**: 51-60
- [12] Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: response to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis [J]. *Circ Res* 1988; **62**: 515-523
- [13] Trape J, Morales C, Molina R, et al. Vascular endothelial growth factor serum concentration in hypercholesterolemic patients [J]. *Scand J Clin Invest* 2006; **66**: 261-267
- [14] Garbin U, Fratta Pasini A, Stranieri C, et al. Effects of nebirolon on endothelial gene expression during oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mediators Inflamm* 2008; **2008**: 367-390
- [15] Renu V, Manj, Frank D, Kolodziej, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplatelet hemorrhage [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 2054-2061
- [16] Moulton KS, Vakili K, Zurawski D, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100** (8): 4736-4741
- [17] Khan M, Pelengaris S, Cooper M, et al. Oxidized lipoproteins may promote inflammation through the selective delay of engulfment but not binding of apoptotic cells by macrophages [J]. *Atherosclerosis* 2003; **171**: 21-29
- [18] O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, et al. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol* 1994; **145**: 883-894
- [19] Katsargyris A, Konaris C, Bastounis E, et al. Toll-like receptor modulation: a novel therapeutic strategy in cardiovascular disease? [J]. *Expert Opin Ther Targets* 2008; **12**: 329-346
- [20] 宋京郁, 孙东植, 李太升, 等. CD68阳性巨噬细胞在人冠状动脉粥样硬化病变中的分布特点及其意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (8): 657-660

(此文编辑 李玲玲)