

细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 促进兔动脉粥样硬化斑块内血管新生

毛洋¹, 刘小琼², 王洪梅³, 季晓平¹, 赵玉霞², 张运¹, 张蕾¹

(1. 山东大学国家教育部与卫生部心血管功能与重构重点实验室 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012;

2. 山东大学国家教育部与卫生部心血管功能与重构重点实验室 山东大学齐鲁医院中医科, 山东省济南市 250012;

3. 济南市口腔医院, 山东省济南市 250001)

[关键词] 细胞间黏附分子 1; 血管细胞黏附分子 1; 动脉粥样硬化; 血管新生; 斑块

[摘要] **目的** 探讨细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)与兔动脉粥样硬化斑块内血管新生的相关性。**方法** 25 只纯种雄性新西兰大白兔给予球囊拉伤及 1% 胆固醇饲料喂养建立腹主动脉动脉粥样硬化模型, 分别于建模后第 4、6、8、10、12 周末随机选取 5 只实验兔行安乐死, 取腹主动脉组织脱水, 包埋制石蜡切片。石蜡切片进行 HE 染色以及免疫组织化学染色, 分析小鼠抗兔巨噬细胞抗体 11、ICAM-1、VCAM-1、血小板内皮细胞黏附分子 1 的表达。**结果** 从 4 周到 12 周, 斑块体积逐渐增大, 巨噬细胞数量、ICAM-1 与 VCAM-1 的表达量也逐渐增加。通过 HE 染色与血小板内皮细胞黏附分子 1 标记, 第 8 周斑块内可见新生血管出现, 并且新生血管的数量在第 10 周与第 12 周逐渐增多。相关性分析显示 ICAM-1 与 VCAM-1 的表达与斑块内的血管新生密切相关。**结论** ICAM-1、VCAM-1 与斑块内血管新生密切相关, 它们促进了动脉粥样硬化斑块的进展和不稳定。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Regulation of Plaque Neovascularization by Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 at the Advanced Stages of Atherosclerosis

MAO Yang¹, LIU Xiao-Qiong², WANG Hong-Mei³, JI Xiao-Ping¹, ZHAO Yu-Xia², ZHANG Yun¹, and ZHANG Lei¹

(1. The Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research, Chinese Ministry of Education and Chinese Ministry of Health, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 3. Jinan Stomatologic Hospital, Jinan, Shandong 250001, China)

[KEY WORDS] Intercellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Atherosclerosis; Angiogenesis; Plaque

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationships between intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and intraplaque angiogenesis. **Methods** Twenty-five New Zealand white rabbits underwent balloon-induced abdominal aortic wall injury and were fed with a diet of 1% cholesterol to establish a rabbit model of atherosclerosis. In week 4, 6, 8, 10 and 12 after balloon injury every 5 rabbits were euthanasia respectively. Tissue samples were taken from the abdominal aorta. Some segments were embedded in paraffin and cut into 5 μ m thick sections for staining with H&E and reacted with platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, i. e. CD31), rat anti-rabbit macrophage antibody-11 (RAM-11), ICAM-1, and VCAM-1. **Results** From week 4 to week 12, the expression of ICAM-1 and VCAM-1 increased with the development of atherosclerotic plaque in the abdominal aorta of rabbits. Intraplaque neovessels appeared in week 8. There were positive correlations between ICAM-1, VCAM-1, and intraplaque angiogenesis. The correlation between ICAM-1, VCAM-1 and RAM-11 were also positive. **Conclusion** ICAM-1 and

[收稿日期] 2013-08-26

[基金项目] 国家 973 项目基金(2012CB518603); 国家自然科学基金(81270351, 60971023)

[作者简介] 毛洋, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展机制, E-mail 为 maoyangs@163.com。刘小琼, 博士, 研究方向为中医药与动脉粥样硬化关系, E-mail 为 xiaoqiongliu0811@163.com。通讯作者张蕾, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展机制, E-mail 为 leilybao@163.com。

VCAM-1 could induce intraplaque angiogenesis, and therefore they play important roles in the development and vulnerability of atherosclerotic plaques in rabbits.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)中不稳定斑块的破裂进而继发血栓形成是引起急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的主要原因^[1]。在As斑块的发展过程中伴随着新生血管的形成,斑块内新生血管大多具有渗透性高、脆性大等特点,炎性因子与红细胞透过斑块内新生血管渗出至斑块内,加重了斑块的炎症反应和斑块内出血的风险,从而加速了稳定斑块向不稳定斑块的转化。黏附分子是免疫球蛋白超家族的重要成员,是炎症因子的一个重要组成部分^[2],早期研究发现在风湿等炎症性疾病中可溶性血管细胞黏附分子1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)有促进炎症部位血管新生的作用^[3]。但是细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、VCMA-1与斑块进展及斑块内新生血管的关系以及动态演变过程尚未明确。本研究拟动态观察As进展期4周至12周中斑块内ICAM-1、VCAM-1和新生血管的变化趋势以及它们之间的相关性,从而证明ICAM-1与VCAM-1有促进斑块内血管新生的重要作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

纯种雄性新西兰大白兔,购自山东省农业科学院。

1.2 试剂和药品

小鼠抗兔巨噬细胞抗体11(rat anti-rabbit macrophage antibody-11, RAM-11)(Dako公司, M0633); ICAM-1抗体(Santa公司, G-5; sc-8439); VCAM-1抗体(Santa公司, E-10; sc-13160); 血小板内皮细胞黏附分子1(platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, 即CD31)(英国Abcam公司); 小鼠超敏二步法免疫组织化学染色检测试剂(中杉金桥公司); 联苯二胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(中杉金桥公司); 胆固醇(武汉市天益生物化学试剂有限公司)。

1.3 仪器

日本Olympus BX51型光学显微镜, 德国Leica RM2243型石蜡切片机, 德国Leica TP1020型自动脱水机, 德国Leica AUTOSTAINER XL型自动染色机, 德国Leica HI1220型烘片机。

1.4 动物模型的建立

3月龄纯种新西兰雄性大白兔25只, 采用球囊损伤腹主动脉后, 给予高脂饲料(1%胆固醇, 每只每天120~140g)饲养至12周。并分别于球囊拉伤后4周末、6周末、8周末、10周末、12周末处死5只实验动物。

1.5 标本采集

分别于球囊拉伤、高脂饲养后4周末、6周末、8周末、10周末、12周末对5只实验兔实施安乐死, 进行病理学研究。开腹截取自腹主动脉瓣上至髂总动脉分叉处的主动脉全长, 生理盐水冲洗干净后, 4%甲醛固定处理, 石蜡包埋, 病理学切片。

1.6 主动脉粥样硬化斑块病理学观察

腹主动脉石蜡切片, 烤片, 脱蜡, 苏木素染色, 流水冲洗, 1%盐酸酒精脱水, 流水冲洗, 伊红染色, 梯度乙醇脱水透明并中性树胶封片。HE染色观察主动脉粥样硬化斑块形态。

1.7 免疫组织化学染色

用免疫组织化学法检测腹主动脉粥样硬化斑块中ICAM-1、VCAM-1、CD31的表达。免疫组织化学染色用超敏二步法: 3% H₂O₂、5%牛血清白蛋白封闭, DAB显色, 以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照, 光镜下所见黄褐色颗粒为阳性, 用IPP 6.0彩色显微图像分析软件进行半定量分析。每组随机选取5张DAB染色切片, 测定阳性染色积分光密度值(integral optical density, IOD), 取5张切片的平均值作为每组的IOD值。IOD值越高表明组织内RAM-11、ICAM-1、VCAM-1的含量越高。测定CD31表达量: 每组随机选取5张DAB切片, 计数每张切片斑块内CD31表达的环形个数, 取5张切片的平均值作为每组的CD31表达量。

1.8 统计学处理

Image Pro Plus软件分析免疫组织化学染色IOD值。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0统计软件进行组间配对样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动脉粥样硬化斑块的病理学观察

在As早期, 球囊拉伤实验兔腹主动脉石蜡切片HE染色显示, 斑块随着喂养时间的延长逐渐增大, 纤维帽变薄, 斑块稳定性变差(图1)。斑块内RAM-

11 免疫组织化学染色代表了斑块内巨噬细胞的数目及其分布(图 2)。4 周时仅内膜有少量巨噬细胞

存在,10 周、12 周巨噬细胞数目较 4 周有明显增多 ($P < 0.05$;图 2、表 1)。

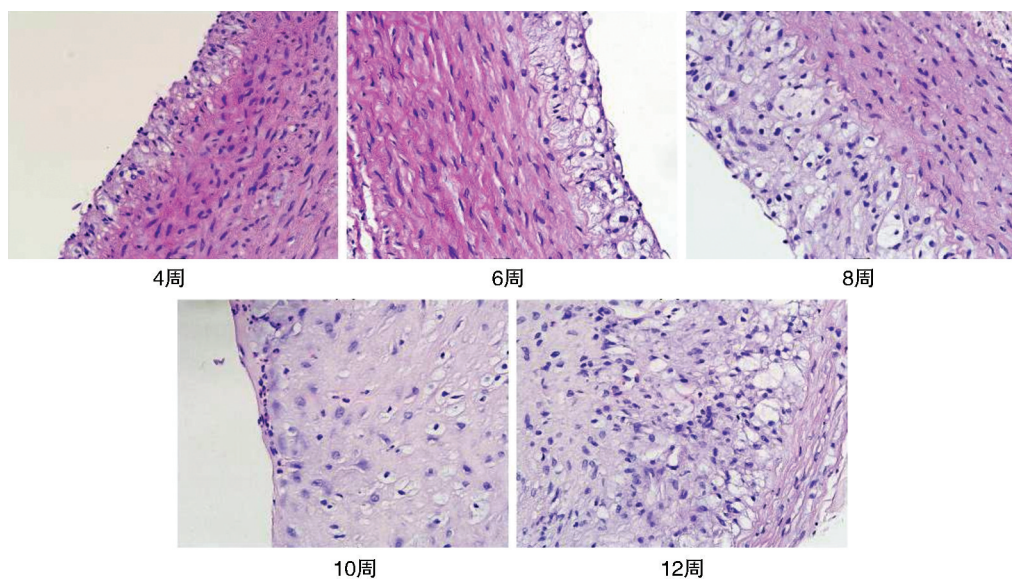


图 1. HE 染色显示从 4 周到 12 周斑块逐渐增大(×400)

Figure 1. The HE staining of plaques from week 4 to week 12 detected by optical microscopy (×400)

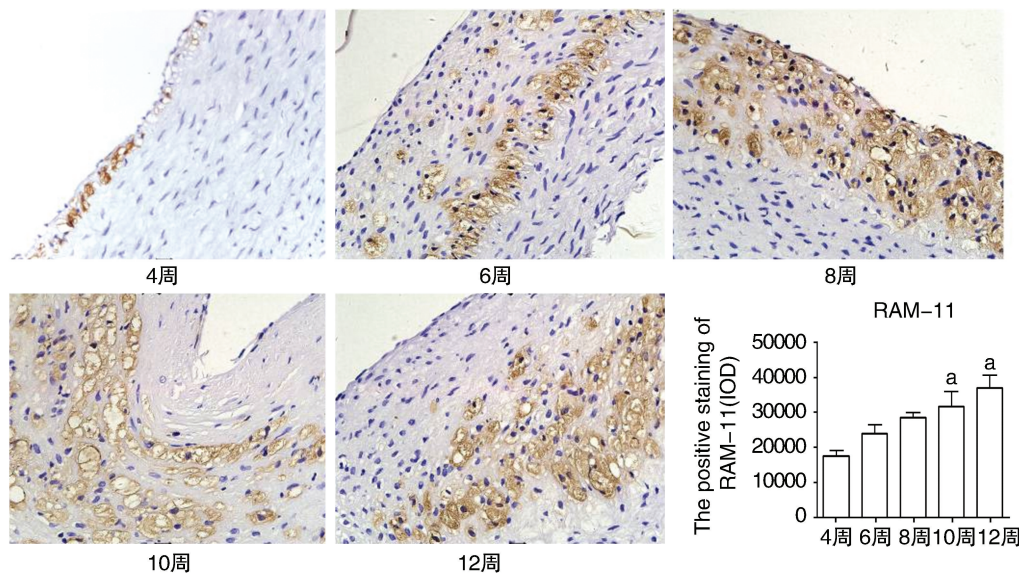


图 2. 免疫组织化学染色显示 4 周到 12 周斑块内巨噬细胞 RAM-11 着色(×400) a 为 $P < 0.05$,与 4 周比较。

Figure 2. RAM-11 dye in macrophage was detected by immunohistochemical staining (×400)

表 1. 免疫组织化学法检测各周斑块内 RAM-11、ICAM-1、VCAM-1 的 IOD 值及 CD31 表达的个数

Table 1. Expression of RAM-11, ICAM-1, VCAM-1 and CD31 detected by immunohistochemical staining

项 目	4 周	6 周	8 周	10 周	12 周
RAM-11	17487.78 ± 7368.35	23805.07 ± 11051.26	31523.42 ± 24625.47	28338.12 ± 8645.26 ^a	36976.53 ± 20046.81 ^a
ICAM-1	8582.68 ± 1009.05	11104.94 ± 920.74 ^a	15014.84 ± 3331.87 ^a	25101.02 ± 2093.43 ^a	25470.53 ± 2155.34 ^a
VCAM-1	11955.59 ± 2454.42	18177.69 ± 3109.61 ^a	21656.22 ± 2987.17 ^a	29800.85 ± 3094.02 ^a	37794.40 ± 3644.07 ^a
CD31	0	0	5.0 ± 2.3 ^a	42.0 ± 10.8 ^a	25.0 ± 2.6 ^a

a 为 $P < 0.05$,与 4 周比较。

2.2 免疫组织化学法测定 VCAM-1 在动脉粥样硬化斑块内表达

从4周至12周,与4周相比,6、8、10、12周 As 斑块中 VCAM-1 的表达量逐渐增加($P < 0.05$; 表

1)。免疫组织化学染色可见 VCAM-1 主要表达在血管内皮细胞、单核细胞和由平滑肌层迁移过来的平滑肌细胞(图3)。

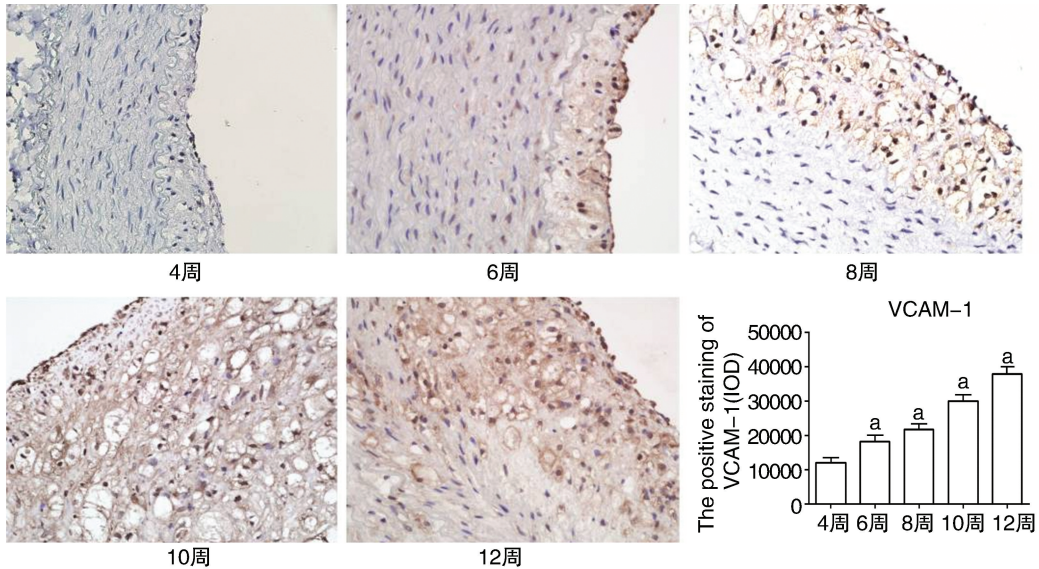


图3. 免疫组织化学染色显示4周到12周斑块内 VCAM-1 表达($\times 400$) a 为 $P < 0.05$, 与4周比较。

Figure 3. VCAM-1 expression in plaques was detected by immunohistochemical staining ($\times 400$)

2.3 免疫组织化学法测定 ICAM-1 在动脉粥样硬化斑块内表达

从4周至12周,与4周相比,6、8、10、12周 As

斑块内 ICAM-1 的表达量逐渐增加($P < 0.05$; 表1)。免疫组织化学染色可见 ICAM-1 主要表达在血管内皮细胞、巨噬细胞、单核细胞(图4)。

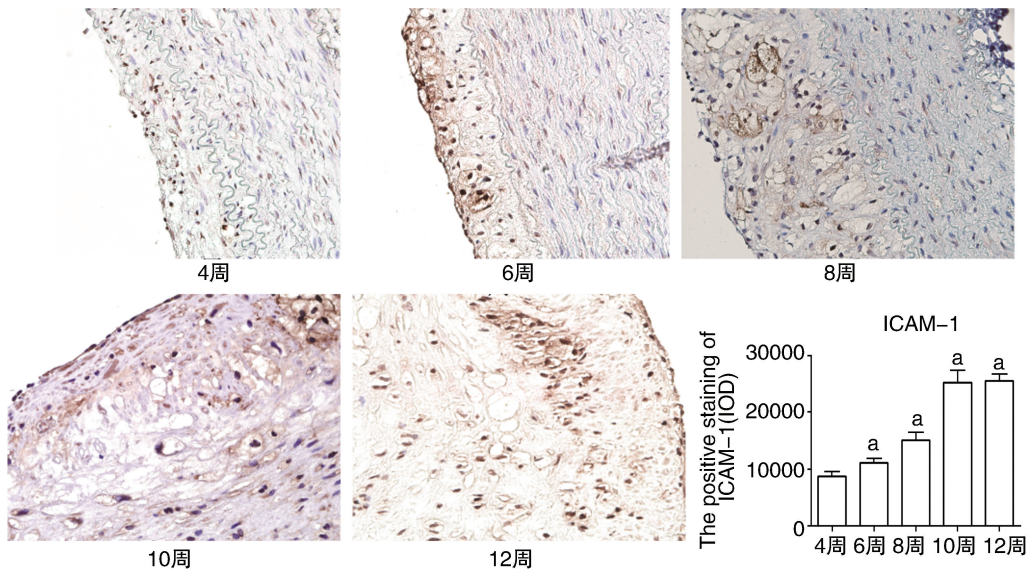


图4. 免疫组织化学染色显示4周到12周斑块内 ICAM-1 表达($\times 400$) a 为 $P < 0.05$, 与4周比较。

Figure 4. ICAM-1 expression in plaques was detected by immunohistochemical staining ($\times 400$)

2.4 动脉粥样硬化斑块内新生血管的情况

在 HE 染色、免疫组织化学染色(CD31 着色)中可见在球囊拉伤造模后第8周左右 As 斑块中出现

新生血管,并且随着斑块进展,斑块内新生血管(黑色箭头)的数量逐渐增多。8周时斑块内新生血管多出现在靠近内弹力板处,而12周新生血管逐渐向

斑块内生长(图 5)。

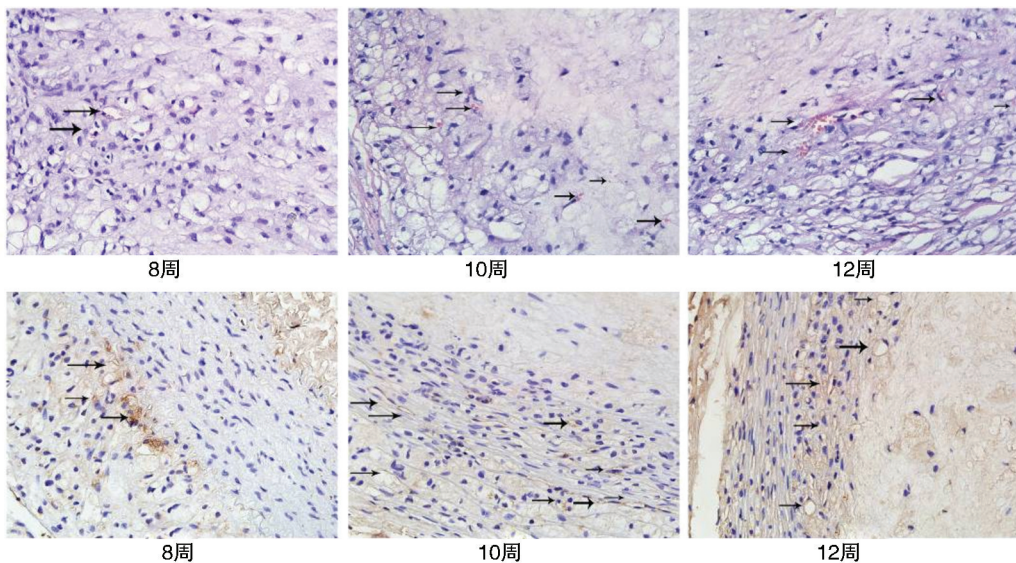


图 5. HE 染色与免疫组织化学染色显示 8 周到 12 周斑块内新生血管的出现($\times 400$) 上为 HE 染色,下为免疫组织化学染色(CD31 着色)。

Figure 5. Neovessels expression in plaques was detected by immunohistochemical staining and HE staining ($\times 400$)

2.5 相关性分析

相关性分析显示,ICAM-1 与巨噬细胞在斑块内的积聚密切相关($r = 0.492, P < 0.05$),而 VCAM-1 与巨噬细胞在斑块内的聚集更加相关($r = 0.526, P < 0.05$)。相关性分析亦显示 ICAM-1、VCAM-1 与斑块内血管新生密切相关($r = 0.550, P < 0.05; r = 0.762, P < 0.05$)。

3 讨论

目前认为,As 从发生发展到转归的全过程就是一个慢性的炎症过程,众多炎症细胞和炎症介质参与其中^[4,5],但炎症参与 As 过程的作用机制至今尚未完全阐明。炎症细胞黏附于血管内皮细胞,并穿越血管内皮细胞向内膜下渗出是炎症最重要的特征^[6]。本研究发现,在新西兰兔 As 模型中,由于机械及高脂对血管内皮细胞的损伤,使其高表达 VCAM-1 与 ICAM-1,在 As 斑块发生发展过程中(4~12 周),斑块内 VCAM-1 与 ICAM-1 的表达量逐渐上升,12 周的表达量分别是 4 周的 3.1 倍与 2.9 倍。在 As 斑块中,内皮细胞表达细胞黏附分子 ICAM-1、VCAM-1,促进炎症细胞尤其是单核细胞的迁移与浸润,可吸引大量单核细胞进入内皮下成为泡沫细胞而促进 As 发生、发展^[7]。巨噬细胞是斑块中最活跃的炎症细胞^[8],其在促进易损斑块形成方面起关键作用。本研究发现,斑块内巨噬细胞与

VCAM-1、ICAM-1 的表达趋势一致,斑块内巨噬细胞在 4~12 周也逐渐增多,12 周是 4 周的 2.1 倍。相关性分析显示 VCAM-1、ICAM-1 与斑块内巨噬细胞的生长密切相关(VCAM-1 与 RAM-11 的相关性为 $r = 0.526, P < 0.05$; ICAM-1 与 RAM-11 的相关性为 $r = 0.492, P < 0.05$),说明二者促进了巨噬细胞在斑块中的积聚,加重了斑块的炎症反应。因此,VCAM-1 与 ICAM-1 可促进 As 斑块的发生、发展,使斑块内巨噬细胞增多,从而导致斑块不稳定。

正常血管壁上的滋养血管网只限定在外膜与中膜外层,当血管壁发生了动脉粥样硬化,这些血管网将更加丰富,并延伸到有动脉粥样硬化病变的内膜。研究发现,在斑块内的新生血管周围有大量的巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞,这些细胞均能刺激血管新生。VCAM-1、ICAM-1 作为黏附分子免疫球蛋白超家族的重要成员,与血管新生的关系一直以来广受关注。体外研究表明 sVCAM-1 具有促血管新生的作用,通过配体 VLA-4 结合于内皮细胞进而通过 p38 与 FAK 通路发挥促血管新生的作用^[9],并且 ICAM-1 能够调节血管内皮生长因子 A 介导的血管新生^[10]。在有关人颈动脉斑块内新生血管的研究显示,在斑块内新生血管中 VCAM-1、ICAM-1 的表达量都是增加的^[11]。但是关于 VCAM-1、ICAM-1 与 As 斑块内血管新生的关系目前还尚不明确。本研究发现,从实验 4 周开始,斑块内的巨噬细胞、泡沫细胞及 VCAM-1 与 ICAM-1 表达水平随

As 进展不断增多,而斑块内新生血管则出现在球囊拉伤后第 8 周,说明 VCAM-1、ICAM-1 的表达早于新生血管的出现;相关性分析也显示斑块内巨噬细胞增多、ICAM-1、VCAM-1 表达与斑块内血管新生密切相关,通过二者与 CD31 的相关系数($r = 0.550$, $P < 0.05$; $r = 0.762$, $P < 0.05$)表现出来。因此我们推测斑块内广泛大量表达的 VCAM-1 与 ICAM-1 能够促进 As 斑块进展期新生血管的形成。近年的研究发现,As 斑块内的新生血管大多为不成熟血管,具有渗透性高、脆性大等特点^[12],这意味着这些新生血管极有可能是炎性细胞深入病灶的通路,促进了炎性因子表达增多;而黏附分子(VCAM-1、ICAM-1)的高表达,又可能进一步刺激新生血管的形成,并由此激发了正反馈机制,促进斑块的发生发展,甚至诱发斑块出血和斑块破裂。

总之,我们通过动态观察 As 进展期(4~12 周)斑块内 VCAM-1、ICAM-1 表达增高及与新生血管、巨噬细胞的相关性,证明了 VCAM-1 与 ICAM-1 促进了 As 进展及斑块内的血管新生与斑块的不稳定。本研究为抑制斑块内血管新生、稳定与逆转斑块治疗提供了可能的靶点。

[参考文献]

- [1] 杨然,王显. 急性冠状动脉综合征易损斑块的发病机理与早期检测[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 284-286.
- [2] 梁萍,孙雷,唐建武,等. 细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(4): 427-429.
- [3] Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of disease: angiogenesis in inflammatory diseases[J]. Nat Clin Pract Rheuma-

tol, 2007, 3(11): 635-643.

- [4] 李晶,裘毅钢,张蓉,等. 炎症因子在人动脉粥样硬化组织的表达分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 215-217.
- [5] Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis[J]. Circ J, 2010, 74(2): 213-220.
- [6] Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis[J]. Clin Sci, 2013, 125(5): 221-235.
- [7] Fenyó IM, Gafencu AV. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis[J]. Immunobiology, 2013, 218(11): 1376-384.
- [8] Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis[J]. Rheumatology, 2009, 48(1): 11-22.
- [9] Nakao S, Kuwano T, Ishibashi T, et al. Synergistic effect of TNF- α in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through $\alpha 4$ integrins[J]. J Immunol, 2003, 170(11): 5704-711.
- [10] Langston W, Chidlow Jr JH, Booth BA, et al. Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1 governs VEGF-A-mediated eNOS activity and angiogenesis[J]. Free Radical Biol Med, 2007, 42(5): 720-729.
- [11] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, et al. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content[J]. Circulation, 1996, 93(4): 672-682.
- [12] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage[J]. Arterio Thromb Vasc Biol, 2005, 25(10): 2054-061.

(此文编辑 曾学清)