

冠心病单个核白细胞表面粘附相关蛋白的表达

安 靓 李 进 黄 剑 刘小蓉

(第一军医大学组织胚胎学教研室 中国人民解放军细胞生物学实验室, 广州 510515)

Study on the Expression of Adhesion Related Proteins on Mononuclear Cells in patients with Coronary Heart Disease

AN Jing, LI Jin, HUANG Jian and LIU Xiao-Rong
(Department of Histology and Embryology, First Medical University of PLA, Guangzhou 510515, China)

Aim Observed the expressive quantity and distribution of adhesion related proteins (ARP) in the mononuclear cells among the patients with coronary heart disease (CHD) and normal people.

Methods Display the distribution of CD11b, CD44 and Vn on the mononuclear cells by means of immunohistochemistry and morphological metrology methods.

Results The positive area of CD11b, CD44 and Vn shows pink or dark pink colour, and display a ring shape, semilunar shape, cap shape, spot-flate shape and granular shape. Quantitative analysis indicate that the Sum and Ar value increased obviously in the CHD.

Conclutions The Expression of the ARP is higher in CHD group then in normal. There is a obvious difference among the three kind of proteins in expressive quantity which from high to low is CD44, Vn, CD11b. In CHD group the increase of the three ARP are different in degree, the first is CD11b, the next is Vn and then it is CD44.

KEY WORDS Mononuclear cell; Adhesion related proteins; Coronary heart disease; Morphological metrology

摘要 采用免疫组织化学与形态计量学的方法,观察了正常人和冠心病外周血单个核细胞表面 Vn、CD44 和 CD11b 三种有代表性的粘附相关蛋白的分布及量的变化。结果表明,冠心病组单个核细胞粘附相关

蛋白的表达量明显高于正常人群组,三种粘附相关蛋白的表达量亦有明显差异,其表达量依次为,CD44, Vn, CD11b。在冠心病组,三种粘附相关蛋白升高的程度不同,其中 CD11b 升高最为明显,其次为 Vn 和 CD44。作者对粘附相关蛋白表达在动脉粥样硬化过程中的机制和意义进行了讨论。

关键词 单个核细胞; 粘附相关蛋白; 冠心病; 形态计量学

单个核白细胞(主要是单核细胞)粘附于动脉内皮表面是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的最早期的病理变化^[1~3]。单个核白细胞在粘附后,其生物学功能将发生一系列的改变,如产生生长因子、细胞因子及趋化因子,通过旁分泌和自分泌的途径进一步促进单个核白细胞的粘附,并诱导平滑肌细胞的增殖和迁移;单个核白细胞粘附后,随即迁入内皮下层,转化为巨噬细胞,吞噬脂质而成为泡沫细胞,构成 As 早期病灶处的主要细胞成分。近来的研究表明,迁入内皮下层的单核-巨噬细胞还可进一步分裂和增殖^[4],从而参与 As 进展期的增生性病变。此外,单个核白细胞的粘附可能在经皮冠状动脉内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后的动脉再狭窄和再闭塞的发生过程中起着一定的作用。因此,深入研究单个核白细胞粘附的机制,不仅对进一步揭示 As 的发生过程具有重要意义,而且也可寻找有效控制 As 的发生和 PTCA 后动脉再狭窄的手段提供理论依据和实验资料。

关于单个核白细胞粘附的机制目前尚不清楚。近年的研究表明,粘附相关蛋白在这一过程中起着重要作用^[5~7]。为此,我们采用免疫组织化学与形态计量学的方法,观察了正常人和冠

心病人外周血单个核白细胞膜表面 Vn, CD44 和 CD11b 三种有代表性的粘附相关蛋白的分布及量的变化, 为探讨单个核白细胞在冠心病发生中的作用及单个核白细胞粘附的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 观察对象

实验组为临床诊断为冠心病的患者 24 例, 其中伴心绞痛者 16 例, 伴陈旧性心肌梗塞者 3 例, 伴高血压者 5 例, 男 18 例, 女 6 例, 最大年龄 71 岁, 最小年龄 51 岁。对照组为 24 例年龄在 24~77 岁的健康人及排除心血管疾病的住院病人。

1.2 标本制备

取外周静脉血, 常规肝素抗凝 (25 kU/L); 用密度梯度离心法分离外周血单个核白细胞。分离出的细胞用 Hank's 液离心漂洗一次, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度至 1×10^6 个/L, 离心, 取细胞进行涂片。免疫组织化学碱性磷酸酶标记 ABC (ABC-AP) 法染色。普通光镜观察。

1.3 单克隆抗体与试剂

抗 Vn 和 CD11b 单克隆抗体分别为 Boehringer 和 DAKO 公司产品, 抗 CD44 单克隆抗体为王小宁博士提供。淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品, 碱性磷酸酶标记免疫组织化学 (ABC-AP) 试剂盒为美国 Vector 产品。

1.4 定量检测

每份标本测定 4 张涂片, 每张涂片测定 50 个细胞, 用 Quantimet 520 图像分析仪进行现场测量, 选择 OD 值 (平均光密度值), Ar (阳性反应面积), Sum (抗原总量值) 和 Pr (阳性细胞率) 4 项指标为定量参数。

1.5 统计学处理

受试对象按析因分析法进行实验设计。实验为 A、B 两因素。A 因素为不同人群组, 在两个水平上进行实验, 即正常人组和冠心病组。B 因素为不同的抗原, 在三个水平上进行实验, 即 Vn, CD44 和 CD11b。对实验结果进行析因分析, 完全随机设计方差分析, 并用 Scheffe 统计量行均数间两两比较, 用 SPLM 软件 (第四军医大学卫生统计学教研室研制) 在微机上进行处理。

2 结果

2.1 抗原的分布

用碱性磷酸酶标记的 ABC 免疫组织化学显示抗原的阳性部位呈粉红色至桃红色, 阳性部位主要位于细胞膜表面, 偶见于质膜下的细胞质内 (Figure 1)。三种抗原在细胞表面的分布有所不同。CD44 阳性细胞较多, 阳性反应区多呈环状, 半月状, 亦见有帽状及斑片状, 胞质内偶见阳性反应。CD11b 阳性反应细胞较少, 但阳性反应较强, 且多呈深桃红色, 阳性区多呈环状和斑片状, 偶见有帽状及半月状, 胞质内可见较多的阳性反应区。绝大多数单个核白细胞均呈 Vn 反应阳性, 多呈粉红色, 少数为桃红色, 阳性反应区散在分布于整个细胞表面, 呈点状或颗粒状, 偶见有斑片状。

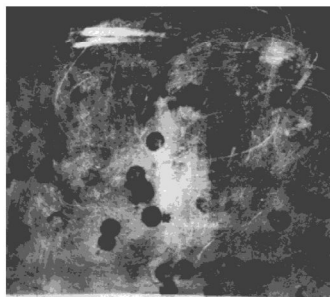


Figure 1. ABC-AP immunohistochemical method display the distribution of adhesive related proteins (CD44) on the area of positive reaction shows semilunar shape (Δ), cap shape (\triangle), and spot-flate shape (\circ).

2.2 抗原的定量检测

2.2.1 图象分析定量参数统计结果见 Table 1, 2, and 3.

2.2.2 方差分析结果 (1) A 因素两水平之间有差异, 其中 Sum 和 Ar 二指标较为敏感 ($P < 0.001$)。表明冠心病病人组和正常人组单个核白细胞表面粘附相关蛋白表达的量有明显的差异, 冠心病病人组高于正常人组。OD 值和 Pr

Table 1. Statistical table from image analysis on expression of Vn ($\bar{x} \pm s$).

Target	control group	CHD group
Sum	300±16	562±25
Ar	814±32	941±30
OD	7.2±0.1	7.3±0.2
Pr	81.5±7.7	91.0±4.4

Table 2. Statistical table from image analysis on expression of CD44 ($\bar{x} \pm s$).

Target	control group	CHD group
Sum	61±18	94±6
Ar	66±13	118±6
OD	7.6±0.7	8.5±0.1
Pr	14.0±2.2	20.0±2.6

Table 3. Statistical table from image analysis on expression of CD11b ($\bar{x} \pm s$).

Target	control group	CHD group
Sum	70±3	100±7
Ar	114±11	157±14
OD	6.8±0.4	6.8±0.3
Pr	62.0±5.2	84.0±3.8

值两组之间未见统计学差异。(2)B因素三水平之间差异显著,方差分析除OD值有统计学差异($P<0.05$)外,其余三项,即Sum值、Ar值和Pr值组间的差异有非常显著性统计学意义($P<0.0001$)。表明三种抗原在单个核白细胞表面表达的量及分布不同,表达量最高为CD44,Vn次之,CD11b较少。(3)A因素与B因素之间有交互作用,其中Sum值和Ar值的交互作用较明显($P<0.001$)。表明抗原表达量之间的差异与不同的人群组有非常密切的关系。三种抗原在二人群组升高的程度亦不同,其中CD11b在冠心病时升高明显,Vn次之,CD44升高不明显。

3 讨论

单个核白细胞表面有CD11b、CD44和Vn

分布,三种抗原均与单个核白细胞粘附于内皮表面有关。据报道,内皮细胞可表达ICAM-1、Vn的受体及CD44分子的配体,从而介导单个核白细胞粘附于内皮表面。CD11b又称为Mac-1,是一种多功能的受体,除与ICAM-1结合外,还可与补体C₃、纤维蛋白原和因子X等结合。内皮表面粘附受体表达的量与内皮细胞所处的功能状态有关,许多研究已证明内皮细胞功能的变化可影响其变化可影响其对单个核白细胞的粘附作用。本实验的研究提示,单个核白细胞本身的变化在其粘附过程中亦不容忽视。本实验观察到冠心病病人外周血中单个核白细胞表面的粘附相关蛋白表达较正常人明显升高,说明单个核白细胞在粘附于内皮之前生物特性已开始变化,然而这种变化是发生于外周血中还是骨髓中,尚不清楚。实验中发现,所研究的三种粘附蛋白在冠心病患者其表达的量均有升高,但升高的程度不同,CD11b升高较为明显,Vn次之,CD44升高不明显。这种差异可能与三种抗原表达的机制不同有关,对这一问题的深入研究,可以进一步揭示各种粘附蛋白的表达与As病程的关系,探讨其表达的规律,为As的诊断与治疗提供线索。

关于细胞表面抗原的定量方法,以往常用体视学方法,也有人用ELISA法,近年来越来越多的人开始使用流式细胞仪和图像分析仪。流式细胞仪因其出结果快而准,且标本制备较方便而广被接纳。但流式细胞仪也存在着难以给出细胞的许多形状因子,不能直观地描述抗原在细胞表面分布特点等问题。本文采用图像分析仪对实验结果进行处理,同时选择4项指标作为定量参数进行测试分析,较好地发挥了图像分析仪可对同一样本的多项指标同时测定的优势。分析结果表明,选择多项指标进行测定,使得结果更加灵敏可靠,有利于对结果进行更加准确与客观的分析。

参考文献

- 1 Van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, et al. Atherosclerotic lesion in human in situ immunophenotypic

- analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest*, 1989, **61**: 166.
- 2 Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, et al. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum Pathol*, 1987, **18**: 375.
 - 3 安 颢. 实验性大鼠动脉粥样硬化动脉壁单核细胞形态观察. *中华病理学杂志*, 1990, **19**(1): 7.
 - 4 Katsuda S, Cottrere MD, Ross R, et al. Human atherosclerosis. V. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesion of young adults. *Am J Pathol*. 1993, **142**: 1 787.
 - 5 Cybulsky MI, Gimbrone MAJ. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science (Wash)*, 1991, **251**: 788.
 - 6 Niculescu F, Rus HG, Vlaicu R, et al. Immunohistochemical localization of c5b-9, S-protein, C3b and apolipoprotein B in human arterial tissues with atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1987, **65**: 1.
 - 7 Guettier C, Hinglais N, Bmneval P, et al. Immunohistochemical localization of S protein/vitronectin in human atherosclerotic versus arteriosclerotic arterise. *Virchows A Pathol Anat*, 1989, **414**: 309.
- (1995-12-05 收到, 1996-02-06 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅱ)

二磷酸尿苷葡萄糖醛酸	uridine diphosphaglucuronic acid, UDPGU
儿茶酚氧位甲基转移酶	catechol-O-methyl transferase, COMTase
三乙醇胺	triethanolamine, TEA
三氯醋酸	trichloroacetic acid, TCA
三硝酸甘油酯	trinitroglycerin, TNG
三磷酸鸟苷	guanosine triphosphate, GTP
三磷酸尿苷	uridine triphosphate, UTP
三磷酸胞苷	cytidine triphosphate, CTP
三磷酸腺苷	adenosine triphosphate, ATP
三磷酸次黄嘌呤核苷	inosine triphosphate, ITP
三乙烯磷酸胺	triethylene phosphoramine, TEPA
三磷酸肌醇酯	myoinositol triphosphate, MITP
三磷酸腺苷酶	adenosine triphosphatase, ATPase
三磷酸脱氧胞苷	deoxycytidine triphosphate, DOCTP
下肢血栓性静脉炎	thrombophlebitis of leg
下肢浅血管静脉炎	phlebitis of superficial vessels of lower extremities
下肢深血管静脉炎	phlebitis of deep vessels of lower extremities
下肢静脉血栓形成	phlebothrombosis of leg, PTL
大分子物质	macromolecular substance, MMS
大脑局部缺血	cerebral ischemia, CI
小血栓形成	microthrombosis, MT
天然高分子化合物	natural high molecular compound, NHMC
不饱和酸	unsaturated acid, USA
不完全抗体	incomplete antibody, ICAb (glutinin)
不完全抗原	incomplete antigen, ICAg (haptent)
不典型增生	atypical hyperplasia

(胡必利编写)