论著

文章编号:1000-5404(2009)11-1066-03

动脉粥样硬化病变中黏附分子ICAM-1、VCAM-1及E-selectin的表达

苏 敏[1],钟翠平[2] ([1]贵阳医学院组织胚胎学教研室,贵阳 550004;[2]复旦大学上海医学院人体解剖与组织胚胎学系,上海 200032)

摘 要:目的 研究动脉粥样硬化主动脉管壁内ICAM-1、VCAM-1及E-selectin的表达情况,探讨这些分子与动脉粥样硬化发生及彼此之间可能的关系。**方法** 收集尸检证实主动脉粥样硬化的标本,常规石蜡切片,特异性免疫组化染色,观察ICAM-1、VCAM-1和E-selectin阳性反应细胞的数量及分布,测定阳性产物表达的平均灰度值。**结果** ICAM-1、VCAM-1、E-selectin阳性细胞主要分布在动脉粥样硬化主动脉内膜及外膜内,阳性细胞数较正常主动脉明显增多($P<0.01$);阳性产物的平均灰度值与正常主动脉相比明显降低($P<0.01$);ICAM-1阳性反应产物的平均灰度值变化与VCAM-1及E-selectin之间呈显著正相关($r=0.611$, $r=0.718$, $P<0.01$),VCAM-1阳性反应产物的平均灰度值变化与E-selectin之间呈显著正相关($r=0.728$, $P<0.01$)。**结论** 黏附分子ICAM-1、VCAM-1、E-selectin参与了动脉粥样硬化病变形成的过程。

关键词: 动脉粥样硬化;细胞间黏附分子-1;血管细胞黏附分子-1;E-选择素

中图法分类号: R341; R363.21; R543.12 **文献标识码:** A

Expressions of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in artherosclerosis aorta

SU Min[1], ZHONG Cui-ping[2] ([1]Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004; [2]Faculty of Anatomy, Histology and Embryology, Shanghai Medical School, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To study the expressions of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin on the aorta of artherosclerosis and explore the relationship between these molecules and artherosclerosis (AS). Methods Human arterial specimens were collected from 18 cadavers, including 5 with normal arterial tunica intima (control) and 13 with pathologically identified AS (AS group). Analysis were carried out in consecutive sections by immunohistochemical staining for ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. Results ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin positive cells were mainly located in the tunica intima and adventitia of AS aorta. More positive cells were observed obviously in AS group than in control ($P<0.01$). There was a decrease in the intensity of positive staining of the 3 proteins when AS had happened ($P<0.01$). The intensity of ICAM-1 expression was positively correlated with those of VCAM-1 and E-selectin ($r=0.611$, $r=0.718$, $P<0.01$). The changes of VCAM-1 intensity had a positive correlation with that of E-selectin ($r=0.728$, $P<0.01$). Conclusion Adhesion molecules, ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin are involved in the process of AS.

Key words: artherosclerosis; intercellular adhesion molecule-1; vascular cell adhesion molecule-1; E-selectin

近年来研究认为,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种炎症反应性疾病。尽管AS发生的因素是多方面的(脂质代谢异常、血流动力学负荷、遗传或感染等),但最终都导致慢性炎症的病理过程,表现为组织细胞的变性坏死,白细胞的黏附、渗出和平滑肌细胞增的殖等[1]。在这一过程中,活化的血管内皮细胞分泌一些黏附分子,如细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)以及E-选择素(E-selectin)等可能介导了内皮细胞与白细胞、血小板间的起始黏附,它们在AS发展过程中起着重要作用[2-5]。本实验通过观察黏附分子ICAM-1、VCAM-1及E-selectin在AS动脉管壁的表达及分布特点,探讨该分子在AS发生过程中可能的作用,为AS发病机制的研究提供形态学依据。

作者简介:苏 敏,女,贵州省遵义市人,硕士,副教授,主要从事实验组织学方面的研究,发表论文8篇。电话:(0851)6908567, E-mail: summ30@163.com

通信作者:钟翠平,E-mail: cpzhong@shmu.edu.cn

收稿日期:2008-09-08;修回日期:2008-10-19

1　材料与方法

1.1　取材与制片

经尸检取人主动脉血管标本 18 例,其中 5 例内膜形态结构未见明显改变,作为正常组,其余 13 例主动脉病变较明显,均处于纤维粥样斑块期,作为病变组。用 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚的连续切片,HE 染色和免疫组化染色,光镜观察。免疫组织化学单染法观察特异性分子 ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 的表达情况。

1.2　免疫组化染色主要步骤

切片脱蜡至水,10% 甲醇-过氧化氢室温 10 min,羊血清封闭 30 min,微波修复抗原后,加兔抗多克隆抗体(由博士德生物工程有限公司提供)ICAM-1(工作浓度 1∶100)、VCAM-1(工作浓度 1∶100)及 E-selectin(工作浓度 1∶200),37 ℃ 1 h,4 ℃孵育过夜,滴加羊抗兔 IgG 37 ℃ 30 min,再用 SABC 复合物结合 30 min,DAB-H_2O_2 液显色,根据具体情况进行苏木精复染,常规上行脱水,中性树胶封片。同型对照用兔血清代替一抗进行,阴性对照用 PBS 缓冲液替代一抗进行。

1.3　细胞计数及图像分析

运用 BioMias 图像分析系统进行阳性细胞计数及其平均灰度值检测:选取正常和病变的主动脉标本切片各 3 张,每张切片间隔 40 μm。在 40 倍物镜下,每张切片随机选取 5 个视野,分别计数 ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 阳性细胞数量,并做平均灰度值测定。

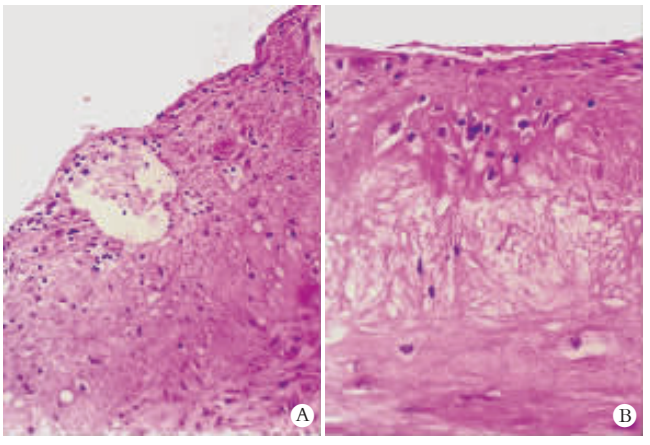
1.4　统计学分析

测定结果运用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正常组与病变组间比较用 t 检验,病变组各变量间的关系作直线相关分析。

2　结果

2.1　HE 染色结果

病变主动脉内皮隆起变形,内膜增厚,形成纤维粥样斑块。斑块处内皮下层大量纤维增生,其间可见散在平滑肌纤维和大量泡沫细胞。深部为大量空隙状或针样脂质沉积(图 1)。

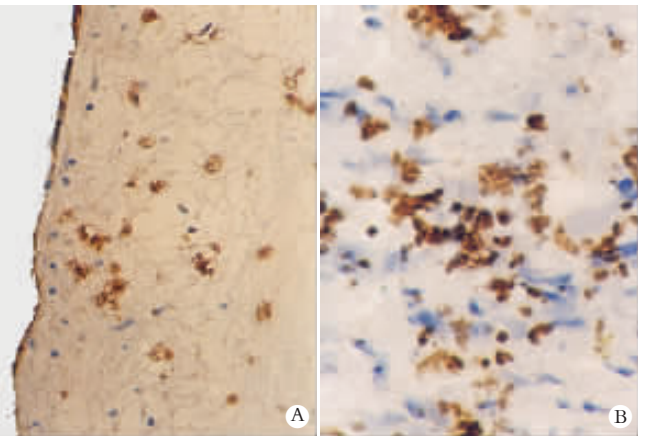


A:AS 主动脉内膜受损　(×100);B:AS 主动脉内膜纤维粥样斑块　(×400)

图 1　AS 主动脉内膜病理学观察　(HE)

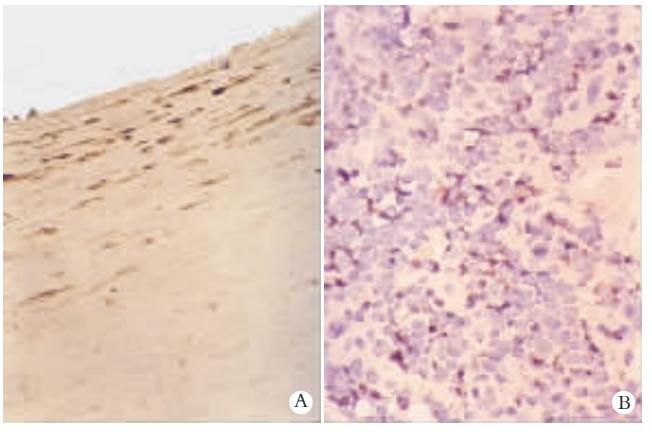
2.2　免疫组化染色结果

ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 阳性免疫反应产物呈棕黄色细颗粒状。ICAM-1、VCAM-1 阳性产物主要分布在主动脉内膜的内皮、内皮下斑块以及外膜微血管内皮处,阳性细胞主要为内皮细胞、内皮下层内的泡沫细胞以及外膜中一些聚集成群的阳性细胞(图 2,3)。E-selectin 阳性产物主要表达在主动脉内皮及外膜中的小血管内皮处,阳性细胞主要为内皮细胞(图 4)。中膜处均未见明显阳性产物分布。



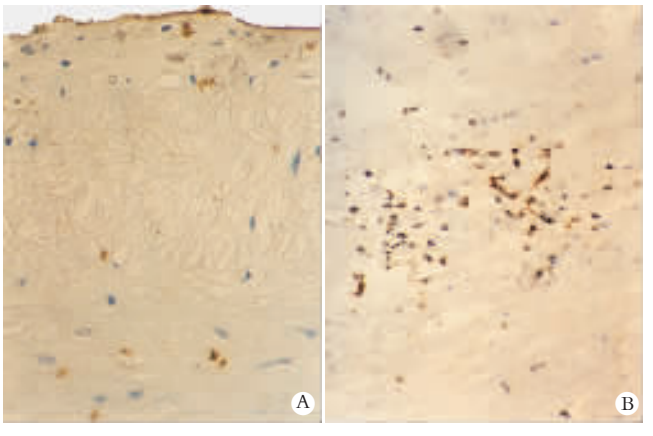
A:内膜阳性反应细胞　(×100);B:外膜阳性反应细胞　(×400)

图 2　AS 主动脉 ICAM-1 免疫组化染色观察　(SABC)



A:内膜阳性反应细胞;B:外膜阳性反应细胞

图 3　AS 主动脉 VCAM-1 免疫组化染色观察　(SABC ×400)



A:内膜阳性反应细胞　(×100);B:外膜阳性反应细胞　(×400)

图 4　AS 主动脉 E-selectin 免疫组化染色观察　(SABC)

2.3 ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 阳性细胞计数及平均灰度值测定

由表1可知,AS 主动脉管壁 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 阳性反应细胞数较正常主动脉明显增多,阳性反应产物的平均灰度值也较正常情况明显减低,差异有统计学意义($P<0.01$)。提示在动脉粥样硬化情况下,主动脉管壁 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 的表达较正常情况增强。

表1 正常主动脉和病变主动脉 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 阳性细胞数/视野及平均灰度值的比较($\bar{x}\pm s$)

黏附分子	正常主动脉		病变主动脉	
	细胞计数/视野	平均灰度值	细胞计数/视野	平均灰度值
ICAM-1	22.10±4.63	90.82±9.59	58.20±8.68[a]	50.91±7.65[a]
VCAM-1	69.90±12.64	146.55±14.36	112.00±22.15[a]	103.29±11.80[a]
E-selectin	18.70±3.97	156.05±6.71	49.60±16.47[a]	73.64±7.24[a]

a:$P<0.01$,与正常主动脉比较

2.4 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 表达的平均灰度值直线相关分析

直线相关分析发现,ICAM-1 阳性反应产物平均灰度值与 VCAM-1 之间呈显著正相关($r=0.611$,$P<0.01$),ICAM-1 阳性反应产物平均灰度值与 E-selectin 之间呈显著正相关($r=0.718$,$P<0.01$)。VCAM-1 阳性反应产物平均灰度值与 E-selectin 之间呈显著正相关($r=0.728$,$P<0.01$)。

3 讨论

在 AS 病变过程中,黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 均发挥了重要作用。ICAM-1 与 VCAM-1 是存在于细胞表面的一种糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族的一员,它们作为 LFA-1 和 VLA-4 的配体存在于内皮细胞表面。正常情况下,静止的内皮细胞表面 ICAM-1 和 VCAM-1 表达微弱甚至不表达,然而当细胞活化时通过与配体相互作用参与 T 细胞-T 细胞、T 细胞-基质及杀伤细胞-靶细胞之间的相互作用,与炎症免疫反应密切相关[6,7]。Davies 等[8]研究证明,AS 发生过程的不同时期,黏附分子的表达量也不同,其中 ICAM-1、VCAM-1 在 AS 患者的脂纹期主要表达于动脉内皮细胞表面,可促进 AS 早期血液中游走的单核细胞向内皮细胞黏附,进入炎症部位,而随着病变的进展,黏附分子在内皮的表达逐渐减弱,而在纤维斑块中其表达增强,提示 ICAM-1、VCAM-1 是 AS 早期的病理变化及斑块进展的潜在机制,并与 AS 的严重程度有关。本实验观察到在纤维粥样斑块期,ICAM-1、VCAM-1 在内皮细胞有持续表达,这可能提示细胞黏附不仅是 AS 病变的早期现象,还可能贯穿了整个 AS 的形成和发展过程。另外,本实验观察到在纤维粥样斑块期,ICAM-1、VCAM-1 还表达于外膜结缔组织大量炎性细胞浸润处及外膜的小血管内皮,一方面提示外膜的小血管腔可能是病变部位单核细胞的另一来源,另一方面在炎性细胞处的表达可能与促进了单核细胞在组织中的游走,促进 T 淋巴细胞激活密切相关,这样既增加与细胞间的相互作用,又促使病损进一步发展。

E-selectin 是属于选择素家族的一种细胞间黏附分子,其在细胞因子激活的内皮细胞表达,是内皮受损的标志[4]。E-selectin 在血管内皮细胞与白细胞的黏附过程中起着重要作用,主要介导白细胞与血管壁黏附的第一阶段——可逆性黏附阶段。炎症发生时,血管内皮受损,内皮细胞受到炎症性细胞因子的刺激,表达大量的 E-selectin,其通过与白细胞表面的糖蛋白结合,诱导内皮细胞与白细胞的黏附[8,9],在进展期病变中表达较少。而本实验观察到主动脉管壁 AS 病变斑块期 E-selectin 表达也明显较正常主动脉增强,这可能说明了 E-selectin 同 ICAM-1、VCAM-1 分子相似,不仅参与了 AS 早期病变形成,还对病变的进展起到了促进作用。同时,在 AS 情况下,黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 与 E-selectin 阳性产物的表达在量上呈较强的正相关关系($r=0.611$,$r=0.718$,$r=0.728$,$P<0.01$),提示当 ICAM-1 表达增强时,VCAM-1 和 E-selectin 的表达也呈增加趋势,说明在 AS 形成早期的细胞黏附过程及斑块的形成是多种黏附分子共同作用的结果。

参考文献:

[1] Aird W C. Endothelial cell heterogeneity and atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(1): 69-75.

[2] Kondo K, Kitagawa K, Nagai Y, *et al*. Associations of soluble intercellular adhesion molecule-1 with carotid atherosclerosis progression [J]. Atherosclerosis, 2005,179(1): 155-160.

[3] Brake D K, Smith E O, Mersmann H, *et al*. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291(6): C1232-C1239.

[4] Burns M P, DePaola N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(1): H194-H204.

[5] 方玉强,黄 岚,赵晓辉, 等. 内皮脂肪酶对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达的影响及量效关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1615-1617.

[6] 饶 丹,姜 红,曾秋棠. 黏附分子细胞间黏附分子-1/E-选择素与冠心病[J]. 心血管病学进展, 2005,26(3): 278-281.

[7] Singh R J, Mason J C, Lidington E A,*et al*. Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3[J]. Cardiovasc Res, 2005, 67(1): 39-49.

[8] Davies M J, Gordon J L, Gearing A J, *et al*. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis[J]. J Pathol, 1993, 171(3): 223-229.

[9] Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, *et al*. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization *via* endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(3): 512-518.

(编辑 汪勤俭)