维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0701-03

慢性静脉功能不全粘附分子 CD11b/CD18、ICAM-1 表达及意义

周晓宏[1],乔正荣[2],梁 栋[1]

(1.重庆市璧山县人民医院外科,重庆 402760;2.重庆市第八人民医院,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 CVI 粘附分子表达与皮肤损伤的关系。方法:采用 ELISA 法,免疫组织化学法(SP 法)和电镜超微结构研究 32例 CVI 患者和 8 例正常对照组。结果:①class2~3 级 EC-ICAM-1 和 PMN-CD11b 阳性表达率显著高于 class1 级和对照组($P<0.05$),class2~3 级和 class1 级 PMN-CD18 阳性表达率明显高于对照组($P<0.05$);②相关分析显著,ICAM-1 表达与 CD11b 和 CD18 表达呈显著正相关;③电镜超微结构证明:PMN 与 Ecs 粘附导致皮肤微血管病变。结论:CVI 血浆 TNFα、IL-1β 增高,上调 ICAM-1 和 CD11b/CD18 表达,并介导 PMN 粘附于 ECs,导致 ECs 和组织损伤,可能是静脉溃疡重要的发病机制之一。

【关键词】粘附分子;ICAM-1;CD11b/CD18;静脉功能不全

【中国图书分类法分类号】R645.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-07-01

Expression of adnesion molecules ICAM-1.CD11b/CD18 in chronic venous insufficiency and their clinical implication

ZHOU Xiaohong, et al

(*Department of Surgery, Bishan People Hospital*)

【Abstract】*Objective*: Explore the relationship between AMS expression and skin damage. *Metheds*: The study employed ELISA method, immunohistochemical method and electron minroscope analysis. *Results*: The results showed that the index of EC-ICAM-1 and PMN-CD11b plsitively expression increased remarkably in class 2~3 compared with that in class 1 and contrast group. The index of PMN-CD18 expression in class 2~3 and class 1 was greatly higher than that in contrast groups ($P<0.05$). The expression of ICAM-1 was positively correlated with that of CD11b/CD18. Electron microcopy showed that the change microvessel was mainly PMN adhesion with ECs and trapped in microvessels. *Conclusions*: It was suggested that activated monocyte to release TNF α and IL-1β, to upregulate ICAM-1 and CD11b/CD18, to mediate PMN adhesion with Ecs, and to cause Ecs and skin tissue damage. It may be one of important mechanism of venous ulcer.

【Key words】Adhesion molecules; ICAM-1; CD11B/CD18; Venous insufficiency

慢性静脉功能不全(Chronic Venous insufficiency,CVI)其皮肤营养障碍的发病机制尚不清楚,下肢皮肤微循环中白细胞聚集可能起重要作用,内皮细胞(endothelial cells,Ecs)和白细胞粘附分子表达增加可能导致白细胞聚积。本研究采用 ELISA 法、免疫组织化学法(SP 法)和电镜超微结构观察,探讨 CVI 粘附分子表达与皮肤损伤的关系,为临床诊治提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

随机选择经静脉造影和超声多谱勒确诊的下肢 CVI 患者 32 例,男 21 例,女 11 例,年龄 23~70 岁,平均 52.83±12.06 岁。病程 1~40 年,平均 21.39±13.32 年。临床表现为浅静脉曲张(32/32)、小腿胀痛(24/32)、轻度肿胀(15/32)、足靴区色素沉着(8/32)、静脉性溃疡(10/32)。按国际心脏血管外科协会 Porters 标准进行临床分级[1],将全组病例分为 Class 人民服务级,皮肤外观正常组 14 例,Class2~3 级营养障碍组 18 例。另随机选择 8 例正常成年人作为对照组,男 4 例,女 4 例,年龄 34~67 岁,平均 57.88±11.03 岁,均无下肢动静脉病史及表现。选择病例时虽具有下肢 CVI 症状,但有直肢严重水肿,血栓性静脉炎,静脉血栓形成,动脉疾病,糖尿病等任何一项者则不入选。

1.2 检测方法

1.2.1 试剂 CD11b/CD18 单抗 北京帮定生物医学有限公

作者介绍:周晓宏(1966-),男,主治医师,主研方向:血管普外。

维普资讯 http://www.cqvip.com

司，ICAM-1 单抗 0.1ml，1:50－100 北京中山公司；S－P 试剂盒：北京中山公司；人 IL－1β ELISA 试剂盒、人肿瘤坏死因子 α 定量 EIA 试剂盒：海南华美生物医学公司进口分装。

1.2.2 检测方法 （1）标本收集：①皮肤标本：术中切取 32 例下肢静永曲张患者皮肤标本 0.5cm×0.2cm，并分为 3 组，其中正常组 14 例，取足靴区皮肤外观相对正常处；色素沉着组 8 例，取足靴区最明显处；溃疡组 10 例取溃疡边缘 0.5cm 处。②静脉血标本：采足靴区曲张静脉血 5ml，分别置入血清管 2ml，抗凝瓶 3ml，无菌分离血浆，细胞涂片，－30℃冷冻保存，待检测。（2）检测方法：ABC-ELISA 法。原理：本实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗人 TNF-α 单抗包被于酶标板上，标准品和样品中的 TNF-α 与单抗结合，加入生物素化的抗人 TNF-α，形成免疫复合物连接在板上，辣根地氧化酶标记的 Streptavidin 与生物素结合，加入酶底物 TMB，出现蓝色，加终止液硫酸，颜色变黄，在 450mm 处测 OD 值，TNF-α 浓度与 OD 值成正比，可通过绘制标准曲线求出标本中 TNF-α 浓度。③SP 免疫组织化不法：采用过氧化物酶标记的链霉卵白素(Streptavidin/peroxidase,SP)免疫组化染色方法[3,4]。④电镜超微结构观察：电镜标本 0.5cm×0.2cm，2% 戊二醛和锇酸固定，脱水，618 树脂包埋，超薄切片，醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色，H－600 型透射电镜观察。

1.3 统计学分析

实验数据采用 Statistica(Ver 5.0)软件，由计算机处理，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，$P<0.05$ 为显著性意义。

2 结 果

2.1 Porter 临床分级粘附分子 CD11b、CD18 和 I-CAM-1 表达变化（表 1）

Class2-3 级 EC-ICAM-1 阳性表达率显著高于 Class1 级和对照组（$P<0.05$）；Class1 级 EC-I-CAML-1 阳性表达率显著高于对照组（$P<0.05$）；Class2-3 级和 Class1 级 PMN-CD18 阳性表达率均明显高于对照组（$P<0.05$）；Class2-3 级PMN-CD11b 阳性表达率显著高于 Class1 级和对照组（$P<0.05$）。

表 1 Porter 临床分级粘附分子 CD11b、CD18 和 ICAM-1 表达的的变化（$\bar{x}\pm s$/HPF）

组别	例数	粘附分子		
		PMN－CD_{11b}	PMN－CD_{18}	EC－$ICAM_{-1}$
NS	8	0.05±0.01	0.04±0.01	0.15±0.09
Class1	14	0.07±0.03	0.11±0.03[b]	0.33±0.19[c]
Class2~3	18	0.16±0.02[a]	0.12±0.03[b]	0.70±0.14[d]
F		36.45	16.82	39.11
P		<0.01	<0.01	<0.01

a 与 NS 和 Class1 级比较 $P<0.05$ b 与 NS 比较 $P<0.05$
c 与 NS 比较 $P<0.05$ d 与 NS 和 Class1 级比较 $P<0.05$

2.2 ICAM-1 与 CD11b、CD18 和 TNFα 相关分析（表 2）

表 2 ICAM-1 与 CD11b、CD18 和 TNFα 相关分析

variable	CD_{11b}	CD_{18}	TNFα
ICAM-1	$r=0.8454$	$r=0.5639$	$r=0.3772$
	$P=0.0001$	$P=0.036$	$P=0.184$

相关分析显示 ICAM-1 表达与 CD11b、CD18 呈显著正相关，r 值分别为 $r=0.8454$（$P=0.000$）和 $r=0.5639$（$P=0.036$）

相关分析显示 ICAM-1 表达与 CD11b、CD18 呈显著正相关，r 值分别为 $r=0.8454$（$P=0.0001$）和 $r=0.5639$（$P=1.036$）。

2.3 电镜超微结构观察

class1 级：早期微血管改变，毛细血管内 PMN 与 Ecs 粘附，毛细血管周围有 PMN 浸润，微血管内大量 PMN 聚集，阻塞血管腔。毛细血管 Ecs 线粒体、高尔基复合体肿胀，内质网扩大、空泡化。2、Class 2~3 级：中晚期微血管改变：微血管内 PMN 与 Ecs 粘附，Ecs 胞质局部坏死断裂，PMN 胞膜破裂。毛细血管 Ecs 坏死缺损，腔内 RBC 聚集，腔外沉着大量胶原蛋白样物质，基质内含大量漏出的 RBC。

3 讨 论

皮肤营养障碍和溃疡占 CVI 2%~5%，但其确切的发生机制仍不清楚，早在 1917 年 John Homans 提出郁血性溃疡（stasis ulcer）的概念，Homans 理论认为郁血和缺氧导致溃。事实上，溃疡发病机制比 Homans 理论更为复杂，也是治疗效果较差的原因。目前郁血性溃疡的概念已废弃，公认静脉性溃疡（venous ulcer）这一名词更为恰当，但深静脉和交通支瓣膜功能不全导致的静脉高压是如何形成溃疡的确切病理生理机制仍不清楚。近年来，CVI 皮肤微循环中白细胞聚集（trapped leukocyte theory）受到重视，白细胞和血管 Ecs 的粘附介导于细胞膜特异性受体即粘附分子（Adhesion Molecules，AMs），AMs 在炎症反应、免疫反应、血管损伤和血栓形成方面起关键作用，AMs 的缺乏，过度表达和功能不良在多种疾病的病理生理中有重要作用，对 AMs 的评价，有助于心脑和血管疾病发病机制的全新认识，抗粘附治疗的观点将成为疾病新的治疗方法[2-5]。本文研究表明 CVI Class2~3 级其 ECICAM-1 阳性表达率显著高于 Class1 级和对照组（分别为 70%±14%，

维普资讯 http://www.cqvip.com

33%±19%和 15%±9%，$P<0.01$，Class2~3 级中性粒细胞（polymorphonuclear,PMN）CD11b（16%±2%）和 CD18（12%±3%）较对照组（分别为 5%±1%和 4%±1%）明显增高（$P<0.05$）。并且相关分析显示，ICAM-1 表达与 CD11b 和 CD18 存在显著正相关，r 值分别为 0.8454（$P=0.0001$）和 0.5639（$P=0.036$）。结果表明粘附分子 ICAM-1、CD11b、CD18 表达并介导白细胞和 Ecs 粘附增加可能是 CVI 皮肤营养障碍的发病机制，AMs 的表达反映 EC 和白细胞的激活状态，CVI 皮肤 Ecs 中 ICAM-1 表达增高，可能导致 CD11b、CD18 表达阳性的 PMN 在微血管内聚积。Wely 等报告[6] Ecs ICAM-1 表达在 CVI 和对照组分别为 83%（呈强阳性）和 40%（呈弱阳性）也支持这一观点。Wely 等认为[6] CVI 患者 Ecs 和白细胞激活不仅是慢性溃疡的自然结果，而且是被损伤缺氧皮肤释放细胞因子和化学诱导剂所致，并且促进静脉溃疡形成。白细胞 CD11b/CD18 是与细胞骨架蛋白相连的跨膜细胞表面蛋白，由一条 α 链与 β 链以非共价健相连，与细胞外信号交换，ICAM-1 与白细胞粘附关键点在第 3 和第 4 功能区之间，其亲和力随 ICAM-1 糖基化降低程度而增高，ICAM-1 通过 α-肌动蛋白与细胞骨架相连，固定 ICAM-1 在 EC 上，从而促进白细胞的粘附和转移。ICAM-1 及配体 CD11b/CD18 在 PMN 与血管 Ecs 后期牢固粘附和穿越 Ecs 迁移中发挥关键性作用[7-9]，并受多种炎症介质及细胞因子的调控。外研究表明[10,11]用 TNF、IL-1 等细胞因子刺激 HUVEC（human unbilical vein endothelial cells）使 HUVEC 表面 ICAM-1、E-selectin 等粘附分子表达显著增强，在 LPS、TNF 或 IL-1 等作用下 PMN 表达的 CD11b/CD18 等粘附分子表达上调。Bienvenu 等[12]报告抗 ICAM-1 和 CD18 Ab 能显著减少低切应力下白细胞的粘附，表明白细胞的切应赖性粘附与白细胞表面 CD11b/CD18 和血管 Ecs 表面 ICAM-1 的相互作用有关。细胞内的酪氨酸磷酸化和非选择性 Ca^{2+} 通道开放，Ca^{2+} 内流，可能是 CD11b/CD18 表达上调的胞内信号传导途径。Thomas 等[13,14]报告在正常肢体下垂时大约 20%白细胞从循环血消失，聚积在皮肤毛细血管内，这种聚集现象在 CVI 肢体比正常人多 24%，Thomas 认为循环中减少的白细胞聚集于溃疡区毛细血管内，因而白细胞激活学受到重视。

由此可见，ICAM-1、CD11b/CD18 表达显著增高并介导的 PMN 细胞粘附于 Ecs，导致 Ecs 和组织损伤可能是静脉溃疡重要的发病机制之一，其可能机制[15,17]有①Savase 模式：激活 PMN 释放弹性蛋白酶与 EC 膜结合，引起 EC 损伤和血管破坏，弹性蛋白酶在循环和浸润 PMN 组织中增高已被实验证实；②H_2O_2 模式：在缺氧时可诱导黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶（XO），激活 PMN 主要氧化物为 H_2O_2，渗入 Ecs，分解 ATP 为黄嘌呤和次黄嘌呤，在 XO 作用下产生超氧阴离子（O_2），使 Fe^{3+} 变为 Fe^{2+}，并与 H_2O_2 反应生成羟自由基（HO），损伤 Ecs，而 ICAM-1 和 CD11b/CD18 结合是 EC 内过氧化物升高的必须条件；③微血管内白细胞聚集，白细胞粘附增多，形成微血栓，栓塞毛细血管，使组织灌流减少、缺血，同时，粘附白细胞释放 TNFα、IL-1β 等可直接损伤 Ecs 和皮肤组织。我们的电镜超微结构观察也证实 PMN 在微血管内与 Ecs 粘附聚积和 Ecs 的损伤（早期 Ecs 细胞器肿胀，空泡化，中晚期 Ecs 坏死、缺损）。总之，静脉溃疡发生是多种因素综合作用的结果，事实上，微血管内白细胞聚积、激活理论的解释更为合理，其中粘附分子表达起关键作用，因此开展白细胞和 Ecs 粘附分子表达的研究，其临床意义在于可望用药物干预，下调 Ecs 和白细胞表面粘附分子的表达，预防和治疗 CVI。

参 考 文 献

[1] Porter J, Rutherford RB, Clagett G, et al. Reporting standards in venous disease[J]. JVasc Surg, 1988; 8(2): 172.

[2] Pujita H, Morita I a, Murota SI.A possible menhanism for vascular endothelial cell injury elicited by activated Leukocytes [J].Arch Biochem Biophys, 1994; 309(1): 62-69.

[3] Carlos TM, Harlan JM.Membrans Proteins involved in phagocyte adherence to endothelium[J]. Immunol Rev, 1990; 114:5.

[4] Miakgoba MW, Bernard A, Sander ME.Cell adhesion/signalling: Biology and clinical applications[J]. Eur J Clin Invest, 1992; 22: 443.

[5] Bennett CF.Regulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecule expression with synthetic oligonueleotides[J].J cell Biochem, 1994; 18A: E021.

[6] Wey1 A, Vanscheidt W, Weiss JM, et al. Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin and their ligands VLA-4 and LFA-1 in chronic venous leg ulcers [J].J Am Acad Dermatol, 1996; 34: 418-23.

[7] Rosen SD, Bertozzi CR.The selectins and their ligand [J].Curr Opin cell Biol, 1994; 6: 663.

[8] Dransfield I, Cabanss C, Craig A, et al. Divalent cation regulation of the function of leukocyte integrin LFA-1[J]. J cell Biol, 1992; 116:219.

[9] Rouslathi E. Integrin[J]. J Clin Invest, 1991; 87:1.

[10] Beekhuizen H, Corsel van Tilburg AJ, Blokland I, et al. Characterization of the adherence of human monocytes to cytokine-stimulated human macrovascular endothelial cells[J]. Immunology, 1991; 74:661.

（下转第 717 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

分叉内锁式人工关节由于在现有的人工关节假体上经设计，预先制作出 4 个不同方位的预制孔和相应的内锁钉，在手术中内锁钉与假体进行机械结构性组合使假体杆柄上发出的多个分枝形成顺向分叉，把假体与骨质之间机械性的连接起来，形成多平面、多方向、多点位锚固内锁，用机械结构的改变使股骨上端成为多向固定方式来解决松动、下沉、旋转等问题。经初步分析，作者认为在机械结构力学上，分叉内锁式人工关节杆柄优于目前传统的假体杆柄。

分叉内锁式人工关节的假体杆柄以多处不同平面和方向的分叉为特点，分叉改变了现在假体的自身形态，以此来适应股骨近端多变而不规则的髓腔。在改变假体自身形态来适应髓腔的同时，从多平面、多方面地加强了假体在髓腔中的稳定性，同时传导和吸收了在动态下的来自各方的微动应力，以控制早期微动和晚期松动的可能发生，达到更好的治疗目的。特别是目前，假体松动问题已明显威胁手术的效果和还没有更好的人工假体的情况下，分叉内锁式人工关节的重要性更加突出。

在假体上设计预制孔，先有影响假体强度之虑，经有关结构力学专家初步分析指出；斜行钻孔与假体杆柄受力方向基本上相同，就好像在建筑体上合理的开门、开窗一样，不影响整体结构。

内锁钉不是承重载体，仅是控制假体蠕动的装置。

在理论上讲内锁钉与假体选用同批号材料，较紧密配合，内锁钉在假体中内置体长，假体入骨体内较短仅 1~2cm，故剪切力小，应力小。安置分叉内锁式人工关节内锁钉的杆柄后，承受身体的主要载荷仍然是股骨近端的骨质和假体的主体杆柄，维持假体的主体稳定性仍然是髓腔内壁骨质与假体杆柄之间的嵌合强度。内锁钉在此只消除假体杆柄与髓腔内壁之间在人体运动中所产生的最早期的微量蠕动达到防止松动的目的。内锁钉不是主要的承重载体，仅是辅助装置，因而不会产生应力集中在内锁钉上。因此，断钉的可能性极小。从力学比较上分析，斜行内锁方式与机体载荷传导方向一致为顺生物力学方向，使应力得以顺向分散，钉体断裂的机会极少。因此，斜行内锁优于横行内锁方式。

分叉锁式人工关节的制作，仅需在现有的人工假体杆柄部位改制而成。按一定的设计要求钻孔和配制相同材料的内锁钉。特别是加入 WTO 后能有我们自己的受知识产权所保护的医疗器械，在今后的国内、外的骨科领域是非常重要。因为真正属于我们自己的骨科器械本身就不多。

作者经结合自己和别人的经验，接合解剖和目前国内外人工关节假体的特点综为一体，并在结构和力学上有特别的考虑，希望在表述个人观点的同时能起到抛砖引玉的作用。并期望能获得更多新的知识和帮助，给关节置换防止松动问题带来一个新的思路和新的治疗方法。

同时这种斜行分叉内锁方式可适合于肘关节和膝关节人工假体。

参 考 文 献

[1] 王震宇，戴尅戎. 股骨距与股骨上段有效髓腔的几何形态学研究[J]. 中华骨科杂志，1994；14(7)：436-440.

[2] 高中礼，刘云霞，刘 鹏，等. 股骨上段髓腔几何形态和研究及临床意义[J].骨与关节损伤杂志，2001；16(4)：297-299.

[3] 刘志宏，冯建民，王 毅.人工髓关节置换术，失败原因分析[J]. 中华骨科杂志，2000；20(12)：723-727.

[4] 张永刚，卢世璧，王继芳.全髋关节置换术后无菌性松动的研究进展[J].中华骨科杂志，1996；16(5)：290-294.

[5] 何爱珊，廖威明，李佛保，等.HA 梯度涂层复合 BMP 人工股骨柄的研究[J].中华骨科杂志，2005；25(7)：400-403.

（上接第 703 页）

[11] Tedder TF, Pizeueta P.L-selectin deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory site[J]. J Exp Med, 1995; 181:2259.

[12] Bienvenu K, Russell J, Granger DN. Platelet-activating factor promotes shear rate dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules[J]. J Lipid Mediat, 1993; 8: 95.

[13] Thomas PRS, Nash GB, Dormandy JA. White cell accumulation in dependent legs of patient with venous hyertension[J].Br Med J, 1988; 296: 1693.

[14] Moyses C, Cederholm SA, Michel CC. Haemodynamic and accumulation of white cell in the feet during the venous stasis [J].Int J Microcirc Clin Exp, 1987; 5:311.

[15] Gabourg JP, Anderson DC, Kubes P.Molecular mechanisms involved in superoxide induced leukocyte endothelial cell interactions in vivo [J]. Am J Physiol, 1994; 363: H637-642.

[16] Gabourt JP, Woodman DN, Graner P, et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of super oxide [J]. Am J Physiol, 1993; 265: H862.

[17] Suzkui M, Asako H, Skubes P, et al.Neutrophil derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules[J].Microvasc Res, 1991; 42: 125-138.