

[文章编号] 1007-3949(2011)19-11-0901-05

• 实验研究 •

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 在人粥样硬化冠状动脉中的表达及与动脉粥样硬化进展的关系

魏静静^{1,2}, 孙雷¹, 张树辉², 李静¹, 于霄¹

(1. 大连医科大学病理学教研室, 辽宁省大连市 116044; 2. 上海中医药大学附属岳阳医院病理科, 上海市 200437)

[关键词] 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体; 白细胞介素 1β; 冠状动脉粥样硬化; 动脉粥样斑块

[摘要] 目的 观察人动脉粥样硬化冠状动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 和白细胞介素 1β (IL-1β) 表达及相互关系。方法 以 63 例尸检标本中获得的冠状动脉标本为研究对象, 包括 15 例正常冠状动脉、26 例冠状动脉狭窄程度 ≤50% 和 22 例冠状动脉狭窄程度 >50%, 用免疫组织化学的方法检测 LOX-1、IL-1β 和 CD68 和平滑肌肌动蛋白在各组冠状动脉中的表达情况。结果 正常冠状动脉 LOX-1、IL-1β 呈阴性表达, 粥样硬化冠状动脉 LOX-1、IL-1β 的表达阳性率分别为 47.5% (23/48) 和 18.8% (9/48), 两者主要表达于内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞和泡沫细胞。冠状动脉狭窄程度 ≤50% 组斑块 (61.5%) LOX-1 的表达要高于正常组 (0) 和狭窄程度 >50% 组 (31.8%, $P=0.029$), LOX-1 在动脉粥样硬化冠状动脉内膜的表达强度要高于中膜 ($P=0.044$), 且与 IL-1β 表达呈正相关 ($r=0.519, P=0.001$)。结论 LOX-1 主要表达于动脉粥样硬化病变进展初期的内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞和泡沫细胞, LOX-1 在内膜中的作用要强于中膜。LOX-1 与 IL-1β 表达成正相关提示其共同作用参与动脉粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Expression of Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 and Interleukin-1β in Human Coronary Artery and Their Relationship with Atherosclerosis Development

WEI Jing-Jing^{1,2}, SUN Lei¹, ZHANG Shu-Hui², LI Jing¹, and YU Xiao¹

(1. Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Department of Pathology, Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

[KEY WORDS] Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; Interleukin-1β; Atherosclerosis; Atherosclerosis plaque

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and interleukin-1β (IL-1β) in normal human coronary artery and atherosclerosis and the relationship between LOX-1 and IL-1β. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of LOX-1, IL-1β, CD68 and smooth muscle actin on the tissue containing 15 normal coronary artery, 48 atherosclerotic coronary arteries. **Results** The expression of LOX-1 and IL-1β in normal coronary artery was negative. Positive expression rates of LOX-1 and IL-1β were 47.5% (23/48) and 18.8% (9/48) in atherosclerotic coronary arteries, respectively. The expression mainly locates in the membrane of endothelial cells, macrophages smooth muscle cells and foam cells. Positive expression rates of LOX-1 were higher in atherosclerosis coronary artery with stenosis ≤50% group (61.5%) than stenosis >50% group (31.8%). The expression of LOX-1 in intima was stronger than in media ($P=0.044$), and a positive association existed between LOX-1 and IL-1β in atherosclerosis ($r=0.519, P=0.001$). **Conclusions** Besides endothelial cells, LOX-1 is also expressed on smooth muscle cells and monocyte/macrophages, although the expression level is relatively low. It may appear in the early stages of atherogenesis. Positive association between LOX-1 and IL-1β in atherosclerotic coronary artery suggests that they play an important role in development and progression of atherosclerosis.

[收稿日期] 2010-10-22

[作者简介] 魏静静, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的基础研究, E-mail 为 weijing002@126.com。通讯作者孙雷, 博士, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发生机制, E-mail 为 sunlei100@yahoo.com.cn。张树辉, 博士, 副主任医师, 研究方向为分子病理学, E-mail 为 shzhang@126.com。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一个复杂的病理生理过程。动脉管壁炎症在动脉粥样硬化过程的起始、进展和最终阶段都发挥着重要的作用^[1]。多项研究提示氧化型低密度脂蛋白 (oxidized lowdensity lipoprotein, ox-LDL) 在高血压、糖尿病和动脉粥样硬化形成中起着关键作用, 而内皮细胞摄取 ox-LDL 特异性受体为血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 (lectin-like oxidized lowdensity lipoprotein receptor-1, LOX-1), 其可表达在参与粥样硬化形成的多种细胞表面, 能结合、内吞并降解 ox-LDL, 介导 ox-LDL 对内皮细胞的损害, 并参与内皮细胞活化和功能失调等动脉粥样硬化形成的早期事件^[2, 3]。多项研究证实 ox-LDL、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 8 (IL-8)、切应力、血管紧张素 II 和 Toll 样受体等多种因素可诱导并上调内皮细胞 LOX-1 的表达^[3-7]。但既往的研究多集中在动物或离体细胞实验, 对冠状动脉中 LOX-1 与白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的表达及相互关系的研究较少^[8]。本实验旨在观察 LOX-1、IL-1 β 在粥样硬化冠状动脉中的表达及与动脉粥样硬化发生发展中的关系。

1 材料和方法

1.1 材料与分组

选取 2005 ~ 2007 年大连医科大学病理学与法医学教研室的尸检冠状动脉标本 63 例, 其中基本正常冠状动脉 15 例, 冠状动脉粥样硬化 48 例, 患者年龄 8 ~ 87 岁, 平均 51.7 ± 15 岁。冠状动脉标本包括左冠状动脉前降支、回旋支、右冠状动脉。所有标本经 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, HE 染色。光镜下观察切片, 根据管腔狭窄程度、病史和镜下病理特征及冠状动脉粥样硬化组织病理学分类标准^[9] 将标本分为 3 组。正常冠状动脉组 15 例, 均为非心源性死亡病例; 冠状动脉狭窄程度 $\leq 50\%$ (中度狭窄组) 26 例, 其中 5 例为心源性死亡, 21 例为非心源性死亡; 冠状动脉狭窄程度 $> 50\%$ (重度狭窄组) 22 例, 其中 12 例为心源性死亡, 10 例为非心源性死亡。

1.2 试剂

兔抗人 LOX-1 多克隆抗体 (浓缩型, 工作浓度 1:150)、鼠抗人 IL-1 β 抗体 (浓缩型, 工作浓度 1:100) 均购自 Santa Cruz 生物技术有限公司。鼠抗人平滑肌细胞 α -actin 单克隆抗体 (即用型)、鼠抗人单核巨噬细胞 CD68 单克隆抗体 (即用型)、SP 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学

采用 SP 法, 石蜡切片脱蜡和水化后, 3% H_2O_2 -甲醇消化内源性过氧化物酶的活性, 修复抗原 (LOX-1、IL-1 β 和 CD68 采用微波修复), 0.5% 小牛血清白蛋白封闭非特异性抗体, 滴加一抗, 滴加生物素化的二抗, 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, DAB 显色, 水洗, 苏木素复染, 脱水、透明、中性树胶封片。

1.4 结果判定

LOX-1、IL-1 β 阳性结果的判定: 参照文献 [5] 的免疫组织化学反应结果的结果判定标准, 综合考虑切片中阳性细胞所占观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两相指标, 半定量判定结果。根据切片中阳性细胞占计数细胞百分比分为 4 级: $\leq 5\%$ 为 0 分; 6% ~ 25% 为 1 分; 26% ~ 50% 为 2 分; $\geq 51\%$ 为 3 分。根据显色程度判定阳性程度: 基本不着色为 0 分; 淡黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分; 棕褐色为 3 分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分相乘, 为最后得分。0 ~ 1 分为阴性 (-); 2 ~ 3 分为弱阳性 (+); 4 ~ 6 分为中等阳性 (++) ; 6 分以上为强阳性 (+++)。巨噬细胞的判定依据 CD68 染色阳性细胞为巨噬细胞, 平滑肌细胞的判定依据 α -actin 染色阳性细胞为平滑肌细胞。

1.5 统计学分析方法

应用 SPSS 11.5 统计分析软件中的秩和检验、非参数等级相关性 (spearman) 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 冠状动脉内膜 LOX-1 及 IL-1 β 的表达情况

正常对照组内膜无 LOX-1、IL-1 β 表达 (图 1); 而在粥样硬化冠状动脉内膜中 LOX-1、IL-1 β 的表达增强, 经 CD68 和 α -actin (图 2) 标记分别定位为巨噬细胞、平滑肌细胞及泡沫细胞, 且多集中在斑块的纤维帽及肩部区域 (图 3)。在中度狭窄组的冠状动脉内膜中 LOX-1、IL-1 β 的表达阳性率分别为 61.5% (16/26) 和 30.8% (8/26), 与正常对照组比较差异存在显著性 ($P < 0.05$); 且 LOX-1 以 II 级狭窄组表达强度较高, 而 IL-1 β 以 I 级狭窄组表达强度较高; 重度狭窄组内膜的 LOX-1、IL-1 β 表达阳性率分别为 31.8% (7/22) 和 4.5% (1/21) (图 4), 与正常对照组比较差异存在显著性 ($P < 0.05$), 与中度狭窄组比较差异无显著性 (P 值分别为 0.409, 0.020)。

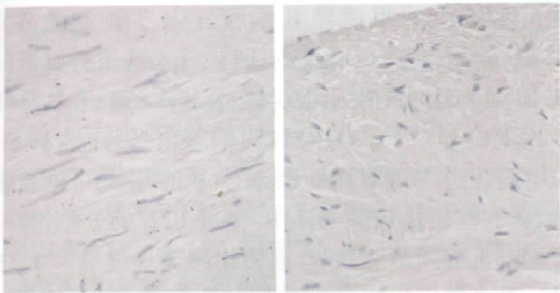


图 1. 氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 在正常冠状动脉中的表达 (×200) 左为 IL-1β, 右为 LOX-1。
Figure 1. Expression of IL-1β and LOX-1 in coronary artery of normal group (×200)

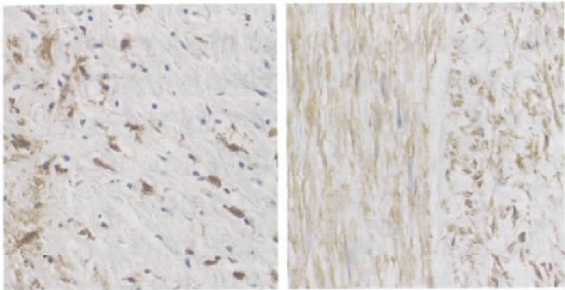


图 2. CD68 及 actin 在中度狭窄组冠状动脉内膜的表达 (×200) 左为 CD68 的表达, 右为 actin 的表达。
Figure 2. Expression of CD68 and actin in coronary artery intima of group moderate stenosis (×200)

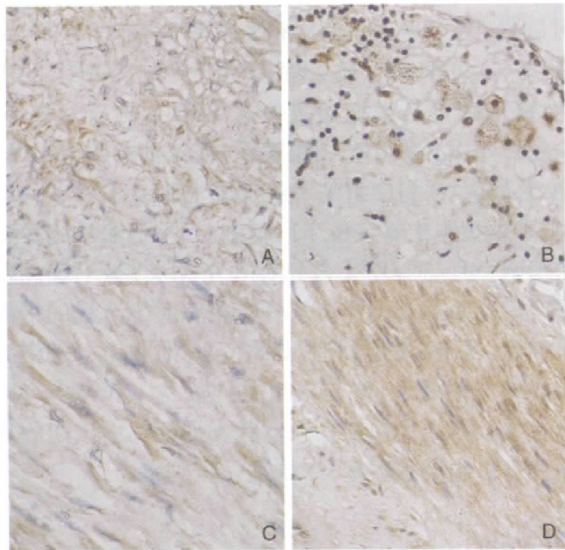


图 3. 氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 在中度狭窄组冠状动脉中的表达 (×200) A 为 IL-1β 在内膜的表达, B 为 IL-1β 在中膜的表达, C 为 LOX-1 在内膜的表达, D 为 LOX-1 在中膜的表达。
Figure 3. Expression of IL-1β and LOX-1 in coronary artery of group moderate stenosis (×200)

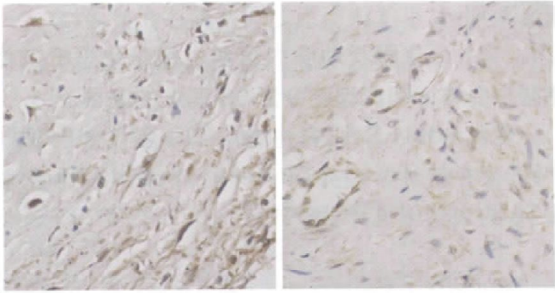


图 4. 氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 在重度狭窄组冠状动脉中的表达 (×200) 左为 IL-1β 的表达, 右为 LOX-1 的表达。
Figure 4. Expression of IL-1β and LOX-1 in coronary artery of group severe stenosis (×200)

2.2 粥样硬化冠状动脉内膜 LOX-1 和 IL-1β 表达的相关性

粥样硬化冠状动脉内膜 LOX-1 和 IL-1β 表达强度频率见表 1。非参数等级相关性 (spearman) 检验分析, 两者之间呈正相关 ($r = 0.519, P = 0.001$)。镜下观察显示两者的表达在区域上存在关联性, 即 As 初期主要表达于内皮细胞, 而在 As 粥样进展初期主要集中在粥样斑块的肩部的巨噬细胞、泡沫细胞和纤维帽区域的平滑肌细胞。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 在粥样硬化冠状动脉内膜的表达

Table 1. Expression of LOX-1 and IL-1β in intima of coronary artery atherosclerosis

LOX-1 的表达强度	IL-1β 的表达强度			
	-	+	++	+++
-	24	1	0	0
+	13	4	0	0
++	1	1	1	2
+++	1	0	0	0

2.3 粥样硬化冠状动脉中膜氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 的表达情况

LOX-1、IL-1β 在正常的冠状动脉中膜均无表达, 在 As 组冠状动脉中膜中有表达, 阳性率分别为 29.2% (14/48) 和 20.8% (10/48), 与正常对照组比较 P 值分别为 0.019 和 0.057; 且以中度狭窄组表达较明显, 两者的阳性率分别为 42.3% (11/26) 和 34.6% (9/26), 与正常对照组比较 P 值分别为 0.004 和 0.011, 与重度狭窄组比较 (3/22, 1/22) 的 P 值分别为 0.027 和 0.010。中度狭窄组的表达与

正常对照组、重度狭窄组之间差异存在显著性。

2.4 粥样硬化冠状动脉内膜和中膜氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 表达的差异

内膜 LOX-1 阳性表达的频率和强度显著强于中膜,存在统计学差异 ($P=0.044$);而内膜和中膜 IL-1β 的表达无统计学差异 ($P=0.796$;表 2)。

表 2. 氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1β 分别在动脉粥样硬化病变冠状动脉内膜和中膜的表达

Table 2. Expression of LOX-1 and IL-1β in the intima and media of coronary artery atherosclerosis

分 组	阳性细胞表达强度				阳性率	P 值
	-	+	++	+++		
LOX-1 内膜	25	17	5	1	47.9%	
LOX-1 中膜	34	12	2	0	29.2%	0.044 ^a
IL-1β 内膜	39	6	1	2	18.8%	
IL-1β 中膜	38	6	3	1	20.8%	0.796

a 为 $P<0.05$,与 LOX-1 内膜比较。

3 讨 论

LOX-1 是一种 50 kDa 大小的 II 型膜蛋白,属于 C 型植物血凝素分子家族,可与多种配体结合,包括修饰的脂蛋白(ox-LDL、乙酰化低密度脂蛋白等)、多聚阴离子化合物(多聚肌酐酸、爱兰苔胶)、阴离子磷脂和一些细菌、凋亡的细胞等结合^[10]。在血管内皮细胞,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)、巨噬细胞、血小板、成纤维细胞均有 LOX-1 表达。Kataoka 等^[11]发现在正常人主动脉内膜检测不到 LOX-1,而在早期 As 斑块中的内皮细胞和进展期斑块中的平滑肌细胞、巨噬细胞中可见 LOX-1 高表达,提示 LOX-1 促进平滑肌细胞和巨噬细胞吞噬脂质,并转化为泡沫细胞。本实验结果显示,正常冠状动脉无 LOX-1 表达,在病变组的冠状动脉内膜及中膜表达增强,且主要位于粥样斑块的肩部以及纤维帽,经 CD68 和 α-actin 标记分别定位为巨噬细胞、平滑肌细胞及泡沫细胞,且 LOX-1 在中度狭窄组(I-II 级狭窄)中的作用要强于重度狭窄组(III-IV 级狭窄),上述结果进一步支持 LOX-1 的激活通过与底物 ox-LDL 结合可导致粥样斑块的纤维帽变薄、脂核增大、炎症反应等,进而使斑块不稳定、破裂、血栓形成,最终导致急性冠状动脉综合征的发生^[12]。

在斑块的炎症反应中,白细胞介素是一类多效

能炎症因子,它可诱导 B 细胞分化、T 细胞激活、VSMC 增殖,促进巨噬细胞迁移、分泌基质金属蛋白酶 10 及表达低密度脂蛋白受体,促进 VSMC 表达急性时相蛋白等^[12-16]。国内魏钧伯等^[17]研究显示 ox-LDL 可促进 VSMC IL-6 转录水平的增加并持续表达,认为在斑块局部 ox-LDL 促进 IL-6 的分泌,参与了局部炎症网络的调节,促使粥样斑块进展。IL-1β 是一种来源广泛的多功能细胞因子,在生物、理化因素的诱导下,可由单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞等产生,参与多种炎症反应,促进组织损伤。以往的研究表明,IL-1β 表达于内皮细胞可能使其表达血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)促进单核细胞向内皮细胞黏附,而在平滑肌细胞表达则通过诱导 SMC 表达单核细胞趋化蛋白 1 和核因子 κB 参与动脉粥样硬化斑块形成^[13]。在正常的兔主动脉壁中未见 IL-1β 的阳性表达,在 As 模型兔的内膜平滑肌细胞查见 IL-1β 的阳性表达^[15]。另外在巨噬细胞、成纤维细胞和泡沫细胞也可见其表达,这可能与调节脂质代谢诱导基质金属蛋白酶有关^[14, 15]。研究表明,IL-1β 与 TNF-α、CD40-L 等的作用下,表达有活性的基质金属蛋白酶,通过降解斑块的纤维帽使稳定斑块变成为不稳定斑块,最终可发生破裂从而引发急性冠状动脉综合征^[12]。Hofnagel 等^[16]发现经过白细胞介素 1(IL-1)、IL-1β 和 TNF-α 孵育的 VSMC LOX-1 的表达明显增多,应用过氧化体增殖物激活型受体-γ(PPAR-γ)可抑制上述炎症因子介导的 LOX-1 的表达,提示感染与炎症通过促进 LOX-1 的表达在 As 中发挥作用。本实验结果显示,在正常对照组中 IL-1β 无表达,在病变组的冠状动脉内膜及中膜表达增强,阳性细胞主要定位于巨噬细胞、平滑肌细胞及泡沫细胞。且与 LOX-1 表达存在正相关,镜下观察发现两者均表达于粥样斑块纤维帽和肩部区域的平滑肌细胞、巨噬细胞和泡沫细胞等,推测 IL-1β 作为重要的炎性因子,与 LOX-1 共同表达上调参与 As,但有关 LOX-1、IL-1β 在动脉粥样硬化中作用的具体分子机制尚未清楚,尚待进一步研究。

[参考文献]

[1] 范剑峰, 汤圣兴. 与动脉粥样硬化有关的炎性标记物 [J]. 中华高血压杂志, 2009, 17: 300-302.
[2] Chen XP, Zhang TT, Du GH. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis [J]. Cardiovasc Drug Rev, 2007, 25: 146-161.

- [3] Mattaliano MD, Wooters J, Shih HH, et al. ROCK2 associates with lectin-like oxidized LDL receptor-1 and mediates oxidized LDL-induced IL-8 production [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298: C1180-1187.
- [4] 杨慧宇, 杨志明, 边云飞, 等. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(6): 465-469.
- [5] Shih HH, Zhang S, Cao W, et al. CRP is a novel ligand for the oxidized LDL receptor LOX-1 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: H1643-1650.
- [6] Kang BY, Khan JA, Ryu S, et al. Curcumin reduces angiotensin II-mediated cardiomyocyte growth via LOX-1 inhibition [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55: 417-424.
- [7] Ishiyama J, Taguchi R, Yamamoto A, et al. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 209: 118-124.
- [8] Qiu Y, Yanase T, Hu H, et al. Dihydrotestosterone suppresses foam cell formation and attenuates atherosclerosis development [J]. *Endocrinology*, 2010, 151: 3 307-316.
- [9] 李玉林. 病理学. 第六版. [J]. 北京: 人民卫生出版社. 2004, 135.
- [10] Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, et al. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69: 36-45.
- [11] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 1999, 99: 3 110-117.
- [12] Missiou A, Rudolf P, Stachon P, et al. TRAF5 deficiency accelerates atherogenesis in mice by increasing inflammatory cell recruitment and foam cell formation [J]. *Circ Res*, 2010, 107: 757-766.
- [13] 李 静, 孙 雷, 庄永杰, 等. 单核细胞趋化蛋白 1 和核因子 κ B 与巨噬细胞浸润及动脉粥样硬化斑块形成的关系 [J]. *大连医科大学学报*, 2007, 29: 14-17.
- [14] Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, et al. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2009, 120: 2 462-469.
- [15] Liu P, Zhang C, Zhao YX, et al. Gax gene transfer inhibits vascular remodeling induced by adventitial inflammation in rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 212: 398-405.
- [16] Hofnagel O, Luechtenborg B, Stolle K, et al. Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1 789-795.
- [17] 魏钧伯, 魏 盟, 蔡 绳, 等. 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 介导氧化型低密度脂蛋白促进血管平滑肌细胞表达白细胞介素 6 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(2): 165-168.
- (此文编辑 李小玲)