

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0337-04

• 实验研究 •

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化早期血管外膜血管细胞黏附分子 1 和细胞间黏附分子 1 的表达

徐芳¹, 刘颖², 季健³, 胡维诚^{1,3}

(滨州医学院 1 病理生理学教研室, 2 附属医院手足外科, 山东省滨州市 256603)

3 山东大学医学院病理生理学教研室, 山东省济南市 250012)

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

[摘要] 目的 探讨血管外膜血管细胞黏附分子 1 和细胞间黏附分子 1 在动脉粥样硬化病灶形成及发展中的作用。方法 6 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠, 高脂饮食喂养 2、4 和 8 周, 选取升主动脉制备连续切片, 部分切片行 Movat 染色, 观察组织形态学变化并测量外膜厚度的变化; 部分切片用免疫组织化学法观察不同阶段血管外膜及内膜血管细胞黏附分子 1 和细胞间黏附分子 1 表达的动态变化。结果 6 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和各个时间点的 C57BL/6 小鼠均未观察到内膜损伤的任何迹象, 主动脉外膜厚度亦无显著变化, 外膜均无血管细胞黏附分子 1 的表达; 高脂喂养 2 周后, 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管外膜厚度增加, 但在内膜仍无肉眼可见病灶, 此时外膜血管细胞黏附分子 1 呈现弱阳性表达; 高脂喂养 4 周和 8 周后, 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管外膜厚度逐渐增加, 内膜出现泡沫细胞, 纤维斑块, 外膜及内膜损伤处血管细胞黏附分子 1 表达增强。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随着高脂喂养时间延长, 主动脉外膜及内膜细胞间黏附分子 1 的表达也增加, 但 C57BL/6 小鼠血管外膜细胞间黏附分子 1 表达量少且稳定, 各时间点之间无明显差异。结论 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随着高脂喂养时间延长血管外膜血管细胞黏附分子 1 和细胞间黏附分子 1 的表达增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Vascular Adventitial VCAM-1 and ICAM-1 at the Early Stage of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice

XU Fang¹, LIU Ying², JI Jian³, and HU Weicheng^{1,3}

(1 Department of Pathophysiology, Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603 China; 2 Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603 China; 3 Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250012 China)

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

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of vascular adventitial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on atherosclerotic lesion formation. **Methods** Apolipoprotein E Knockout (ApoE^{-/-}) mice and wild-type C57BL/6 black mice of 6 weeks were used in this experiment. All animals were fed hyperlipidic diet for 2, 4 and 8 weeks. The ascending aorta was removed with the heart attached for serial sectioning. Some sections were stained by Movat method in order to observe the morphological changes of the tissues and measure the thickness of vascular adventitia. Some sections were stained with immunohistochemistry to observe the changes in the expression of vascular adventitial ICAM-1 and VCAM-1 at different stages. **Results** ApoE^{-/-} mice of 6 weeks and C57BL/6 mice at any time point did not show any changes of adventitial thickness, nor expression of VCAM-1, nor intimal lesion formation. After hyperlipidic diet for 2 weeks in ApoE^{-/-} mice, the adventitial thickness increased and the expression of VCAM-1 was found in the adventitia when there was no visible intimal lesion formation. After hyperlipidic diet for 4 weeks the foam cells were showed in the intima and the atherosclerotic lesion developed after hyperlipidic diet for 8 weeks in ApoE^{-/-} mice. The adventitial thickness and the expression of VCAM-1 in adventitia and intimal lesion of ApoE^{-/-} mice increased. The expression of ICAM-1 in the adventitia and the intima of ApoE^{-/-} mice increased gradually with increasing duration of the hyperlipidic diet. However the expression of ICAM-1 was infrequent and stable in C57BL/6 mice.

Conclusion The expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the adventitia of ApoE^{-/-} mice increased gradually with increasing duration of the hyperlipidic diet.

[收稿日期] 2010-03-09 [修回日期] 2010-04-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (30470700)

[作者简介] 徐芳, 博士研究生, 讲师, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail为 xufang1979@163.com。刘颖, 主治医师, 研究方向为血管损伤与修复。通讯作者胡维诚, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail为 huweicheng@sdu.edu.cn。

动脉粥样硬化过程是一个慢性炎症的过程^[1]。动脉粥样硬化过程中涉及内膜炎细胞的聚集、细胞迁移和增殖及细胞外基质的聚集等诸多环节均依赖于黏附分子的作用。细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 是介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间相互作用的黏附分子中的一种, 主要介导单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞与内皮细胞粘附, 促淋巴细胞聚集, 促进动脉粥样硬化病变部位的白细胞与血管平滑肌细胞黏附及滞留, 有助于动脉粥样硬化形成过程中慢性炎症反应, 还参与细胞的增殖和迁移。血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 主要介导单核细胞、淋巴细胞与内皮细胞粘附, 有助于动脉粥样硬化病灶的形成和发展^[2,3]。近来有研究显示动脉粥样硬化的炎症反应不仅出现在内膜, 在病变早期也可出现外膜炎症, 并可导致内膜增生^[4]。本研究通过检测载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化病灶发展的不同阶段血管外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 的动态表达, 探讨血管外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 在动脉粥样硬化病灶形成及发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

6 周龄 C57BL/6 和 ApoE^{-/-} 小鼠购于北京大学医学部。山羊抗小鼠 ICAM-1 单克隆抗体购于美国 R&D 公司, 兔多克隆抗体 VCAM-1 购于武汉博士德生物技术公司, 山羊即用型 SP 免疫组织化学试剂盒及兔即用型 SP 免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 标本制备

选择 6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠 ($n = 5$), 分别给予高脂饮食 (基础饲料 84.75%, 饱和脂肪 15.00%, 胆固醇 0.25%) 喂养 2、4 和 8 周。腹腔注射戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉小鼠, 打开胸腔, 暴露心脏, 剪开颈总动脉由心尖部以 100 mmHg 灌注 PBS 20 s 后, 再予 4% 多聚甲醛持续灌注 4 min 以固定主动脉。迅速剥离整个主动脉及心脏, 将心底及主动脉用 4% 多聚甲醛固定, 将心脏在升主动脉水平从大血管分离出来, 把心脏从左右心耳底缘 1~2 mm 水平分开, 后作石蜡包埋制备连续切片。

1.3 Movat 染色

参照文献 [5] 进行。每张切片随机选取 5 个视野, 显微镜下观察采集图像。由图像分析系统 Image-Pro Plus Version 5.1 进行血管外膜厚度测量。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水, 3% 过氧化氢孵育 15 min 以消除内源性过氧化物酶; 微波抗原修复; 兔 (山羊) 血清封闭, 37℃ 孵育 20 min, 滴加一抗 (ICAM-1 为 1:70, VCAM-1 为 1:10), 4℃ 过夜, 滴加生物素标记的二抗, 37℃ 孵育 15 min, 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37℃ 孵育 15 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片。显微镜下观察采集图像。由图像分析系统 Image-Pro Plus Version 5.1 分析阳性细胞数。

1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉外膜和内膜变化

ApoE^{-/-} 小鼠在高脂喂养之前动脉内膜无任何病灶形成, 其组织形态与同周龄 C57BL/6 小鼠无差别, 血管外膜厚度也无显著性差异。ApoE^{-/-} 小鼠血管外膜厚度随着高脂喂养时间延长逐渐增加, 高脂喂养 4 周后, 动脉内膜出现泡沫细胞, 高脂喂养 8 周后内膜动脉粥样硬化病灶进一步发展。而 C57BL/6 小鼠血管外膜厚度在各检测点没有显著变化, 在高脂喂养的各个时间点均未观察到内膜损伤的任何迹象 (图 1 和表 1)。

表 1. 不同时间点血管外膜厚度变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, μm)

时 间	C57BL/6 小鼠	ApoE ^{-/-} 小鼠
高脂喂养前	25.49 \pm 2.34	26.43 \pm 3.32
高脂喂养 2 周	25.70 \pm 2.42	50.51 \pm 5.54 ^{ab}
高脂喂养 4 周	26.37 \pm 2.06	76.88 \pm 6.17 ^{ac}
高脂喂养 8 周	25.83 \pm 1.94	112.93 \pm 4.32 ^{ad}

a 为 $P < 0.05$ 与 C57BL/6 小鼠比较; b 为 $P < 0.05$ 与高脂喂养前比较; c 为 $P < 0.05$ 与高脂喂养 2 周比较; d 为 $P < 0.05$ 与高脂喂养 4 周比较。

2.2 血管细胞黏附分子 1 和细胞间黏附分子 1 的表达变化

6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠和各个时间点的 C57BL/6 小鼠主动脉外膜细胞均无 VCAM-1 的表达, 高脂喂养 2 周后, ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 VCAM-1 呈现弱阳性表达; 高脂喂养 4 周后, 主动脉外膜 VCAM-1 表达增强, 内膜损伤处 VCAM-1 呈现阳性表达; 高脂喂养 8 周后, 主动脉外膜和内膜损伤处 VCAM-1 呈

现强阳性表达。各时间点 ApoE^{-/-}小鼠和 C57BL/6 小鼠主动脉外膜及内膜均有 ICAM-1 的表达, 随着高脂喂养时间延长, ApoE^{-/-}小鼠主动脉外膜滋养

血管及内膜 ICAM-1 的表达增加, 但在 C57BL/6 小鼠 ICAM-1 表达量少且稳定 (图 2 和表 2)。

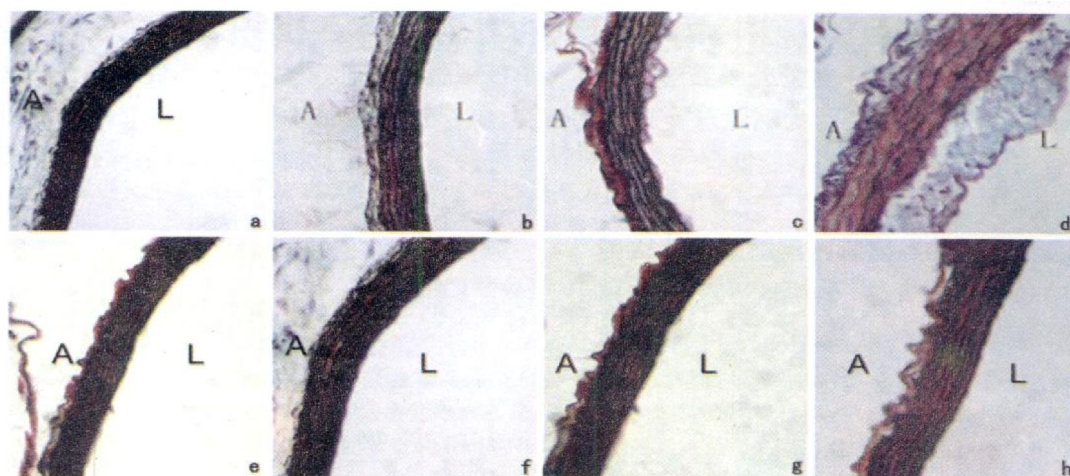


图 1. 动脉粥样硬化病灶的形态学变化 ($\times 400$) 上图从左至右为高脂喂养前、高脂喂养 2 周、4 周及 8 周 ApoE^{-/-} 小鼠, 下图从左至右为高脂喂养前、高脂喂养 2 周、4 周及 8 周 C57BL/6 小鼠。

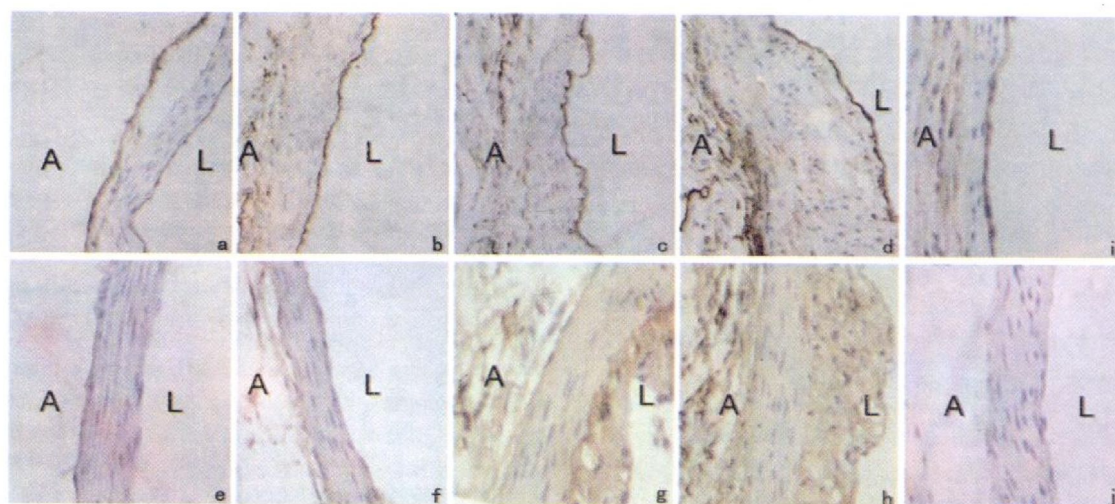


图 2. ICAM-1 和 VCAM-1 的表达 ($\times 400$) a-d 分别为高脂喂养前、高脂喂养 2 周、4 周及 8 周 ApoE^{-/-} 小鼠 ICAM-1 免疫组织化学染色, e-h 分别为高脂喂养前、高脂喂养 2 周、4 周及 8 周 ApoE^{-/-} 小鼠 VCAM-1 免疫组织化学染色, i 和 j 分别为 C57BL/6 小鼠 ICAM-1 和 VCAM-1 免疫组织化学染色。

表 2 ApoE^{-/-} 小鼠 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

时间	ICAM-1 表达水平		VCAM-1 表达水平	
	外膜	内膜	外膜	内膜
高脂喂养前	1 级	1 级	0 级	0 级
高脂喂养 2 周	1 级	1 级	1 级	0 级
高脂喂养 4 周	2 级	2 级	2 级	2 级
高脂喂养 8 周	3 级	3 级	3 级	3 级

注: 0 级为无阳性细胞, 1 级为阳性细胞数 $< 25\%$, 2 级为阳性细胞数 $25\% \sim 50\%$, 3 级为阳性细胞数 $> 50\%$ 。

3 讨论

长期以来关于动脉粥样硬化的研究焦点一直集中在血管内膜和中膜及其之间的相互关系上, 而血管外膜的作用长期被忽视。近来有些研究报道已经提出血管外膜炎症和外膜细胞的增殖迁移都参与了病灶的形成和进展^[4-6-8]。我们在前期研究工作中发现 ApoE^{-/-} 小鼠冠状动脉主干和心肌内冠状动脉小分支部分外膜区域有炎性细胞聚集, 从而诱发该段动脉粥样硬化病灶形成和延伸^[9-10]。在血管内膜

动脉粥样硬化病灶形成之前,外膜首先出现单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)的表达,随之病灶形成^[6]。细胞黏附分子在介导炎症反应中发挥着重要作用,参与动脉粥样硬化病灶的形成和发展。然而大量的研究只是检测了动脉粥样硬化过程中血管内膜黏附分子的表达,只有少数研究报道了血管外膜黏附分子的表达。Okamoto等^[11]施行猪冠状动脉球囊血管成形术后,血管内皮细胞出现类似高脂饮食的变化,术后 2 h 损伤血管外膜中首先出现 VCAM-1 mRNA 和蛋白的表达,3 天后动脉内膜内皮细胞中才检测到 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。Davies 等^[12]在动脉粥样硬化血管外膜滋养血管也发现了 VCAM-1 蛋白及 mRNA 的表达,这可能有利于炎细胞向血管外膜浸润。对实验性股动脉周围无菌性炎症小鼠观察发现 ICAM-1 和 VCAM-1 首先在外膜表达,随着股动脉周围炎性细胞数目的增多,内膜出现白细胞附壁及 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达^[13]。本研究发现, ApoE^{-/-} 小鼠在内膜没有任何病灶形成之前,外膜已经检测到 VCAM-1 的表达,随着高脂喂养时间增加,主动脉外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达增多,内膜病灶形成。而 C57BL/6 小鼠主动脉外膜未见 VCAM-1 表达, ICAM-1 表达量少且稳定,各时间点之间无明显变化。前期实验结果已发现动脉粥样硬化病灶形成早期就出现外膜炎^[6,9,10],结合本研究结果发现动脉粥样硬化病灶形成早期血管外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达伴随着外膜炎细胞的浸润,由此推测血管外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达可能调节了外膜炎细胞的聚集、粘附,从而参与了动脉粥样硬化病灶形成和发展。对动脉粥样硬化血管外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 作用的观察提示其在病灶形成过程中发挥着重要作用。一旦血管外膜炎过程被启动,外膜细胞释放的细胞因子可能有利于趋化因子和黏附分子的表达,中性粒细胞、巨嗜细胞、淋巴细胞、肥大细胞等多种炎细胞聚集在外膜组织和外膜滋养血管中,除了炎细胞浸润,外膜还有明显成纤维细胞增殖^[6],从而导致外膜表现出组织学、生物化学和功能特性的改变,直接或间接地来调节血管对损伤和应激的反应能力。本研究中,随着高脂喂养时间延长, ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达增多,外膜厚度增加。外膜炎

细胞可以从血管外膜进入中膜通过旁分泌作用于平滑肌细胞,外膜炎细胞释放的细胞因子和炎症因子也可随着滋养血管到达中膜影响平滑肌细胞的增殖和迁移^[14],从而导致内膜增生,内皮细胞损伤^[15],黏附分子表达进一步增加,进而又吸引大量单核细胞,形成自我增殖的恶性循环。由此可以推测,血管外膜 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达可能有助于外膜炎过程从而促使动脉粥样硬化病灶的形成和发展。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammation disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **160** (2): 305-310
- [3] 梁萍, 孙雷, 唐建武. 细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在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
- [4] Rayner K, Van Eersel S, Groot PH. Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the ApoE knockout mouse [J]. *Vasc Res*, 2000, **37**: 93-102
- [5] 李莉, 翟同钧, 陈融, 等. Movat 五色套染法的改进及应用 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2002, **18** (6): 660-662
- [6] Xu F, Ji J, Li L, et al. Adventitial fibroblasts are activated in the early stages of atherosclerosis in the apolipoprotein E knockout mouse [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **352** (3): 681-688
- [7] Bobryshev YV, Lord RS. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm [J]. *Atherosclerosis*, 2001, **154**: 15-21
- [8] 胡鹏, 李建军, 陈莉, 等. 脂多糖诱导的血管外膜炎对兔股动脉内膜增生的影响及机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 330-332
- [9] Hu W, Polinsky P, Sadoun E, et al. Atherosclerotic lesions in the common coronary arteries of ApoE knockout mice [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2005, **14** (3): 120-125
- [10] 王建丽, 高春荣, 胡维诚, 等. 载脂蛋白 E 基因剔除小鼠冠状动脉外膜炎的演变过程 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2004, **42** (5): 518-521
- [11] Okamoto E, Couse T, Leon HD, et al. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries [J]. *Circulation*, 2001, **104** (18): 2228-235
- [12] Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM and E-selectin in human atherosclerosis [J]. *J Pathol*, 1993, **171**: 223-229
- [13] 高琳琳, 翟同钧, 陈融, 等. 外膜炎诱发载脂蛋白基因剔除小鼠冠状动脉粥样硬化病灶 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 415-418
- [14] Wilcox JN, Scott NA. Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis [J]. *Int J Cardiol*, 1996, **54**: 21-35
- [15] Sun WY, Lu XS, Bi YW, et al. Study of adventitial inflammation and inflammatory factors in pathogenesis of allograft arteriosclerosis in rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, **89** (35): 2504-508

(此文编辑 文玉珊)