

阻断 CD40-CD40 配体系统对动脉粥样硬化的影响

张 峻, 陈纪林, 顾 晴, 关 婷, 陈 曦

(中国医学科学院心血管病研究所 中国协和医科大学阜外心血管病医院冠心病诊疗中心, 北京市 100037)

[关键词] 内科学; 阻断炎症信号抑制动脉粥样硬化; 免疫组织化学法; CD40-CD40 配体; 动脉粥样硬化; 炎症; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] 目的 探讨阻断 CD40-CD40 配体系统对动脉粥样硬化的影响。方法 18 只载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分为阳性对照组($n=10$)和抗 CD40 配体抗体组($n=8$), 并以近交系 C57BL/6 小鼠作为正常对照。测定血脂、可溶性血管细胞粘附分子 1 和可溶性细胞间粘附分子 1 浓度。观察主动脉组织病理形态学改变, 免疫组织化学法测定斑块部位巨噬细胞、平滑肌细胞和 CD4⁺ T 细胞百分率。Western 杂交分析测定基质金属蛋白酶 9 的蛋白表达。结果 抗 CD40 配体抗体治疗可明显降低可溶性血管细胞粘附分子 1 和可溶性细胞间粘附分子 1 浓度($P<0.01$), 对血脂无明显影响($P>0.05$); 可减轻动脉粥样硬化病变, 减少斑块部位巨噬细胞和 CD4⁺ T 细胞, 增加平滑肌细胞数量($P<0.05$), 降低基质金属蛋白酶 9 的表达($P<0.01$)。结论 阻断 CD40-CD40 配体系统可使血清可溶性粘附分子浓度下降, 抑制炎症反应, 从而减轻动脉粥样硬化病变, 对血脂无影响。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Inhibition of CD40-CD40 Ligand System on Atherosclerosis

ZHANG Jun, CHEN Ji-Lin, GU Qin, GUAN Ting, and CHEN Xi

(Center of Coronary Heart Disease, Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] CD40-CD40 Ligand; Atherosclerosis; Inflammation; Apolipoprotein E Gene Knockout Mice; Adhesion Molecule; Matrix Metalloproteinase-9

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effects of inhibition of CD40-CD40 ligand system on development of atherosclerosis and the stability of lesions. **Methods** Eighteen male apolipoprotein E gene knockout mice were divided into positive control group ($n=10$) and anti-CD40 ligand antibody group ($n=8$). Serum lipids, soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 were detected. The aortas were taken for histomorphometry observation. The positive percentage of macrophage cells, smooth muscle cells and CD4⁺ T cells were determined by immunohistochemistry, and the expression of matrix metalloproteinase-9 were measured by Western blotting. **Results** Anti-CD40 ligand treatment could lower the levels of serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 ($P<0.01$). It had no impact on serum lipids ($P>0.05$). Compared with positive control group, anti-CD40 ligand group showed a reduction in plaque area, plaque/intima size ratio, vascular thickness ($P<0.05$). Inhibition CD40-CD40 ligand also could reduce the amount of macrophage cells and CD4⁺ T cells, increase the amount of smooth muscle cells ($P<0.05$). The expression of matrix metalloproteinase-9 decreased in anti-CD40 ligand antibody group ($P<0.01$). **Conclusions** Inhibition of CD40-CD40 ligand could decrease vascular inflammation, prevent development of atherosclerosis. It had no impact on serum lipids.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是动脉血管的一种慢性炎症, As 斑块的发展进程就是炎症反应的过程^[1]。研究表明 CD40 和 CD40 配体系统作为重要的炎症信号通路可能是 As 发病的关键环节, 与斑块的发生和发展密切相关^[2-6]。本研究以载脂蛋白 E 基因敲除小鼠作为 As 动物模型, 观察阻断 CD40-CD40 配体信号系统对斑块的进展、斑块的稳

定性等多方面的作用, 为防治 As 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠抗 CD40 配体抗体购自美国 SouthernBiotech 公司; 7060 型全自动生化分析仪为日本 HITACHI 公司产品; 血清可溶性血管细胞粘附分子 1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)和可溶性细胞间粘附分子 1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)试剂盒购自美国 LIFEKEY 公司; 巨噬细胞抗体购自博士德公司; CD4⁺ T 细胞抗体购自英国 Serotec 公司; 基质金属蛋白酶 9(matrix

[收稿日期] 2005-06-22 [修回日期] 2005-11-21

[作者简介] 张峻, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的炎症机制, E-mail 为 zhangjunr-cv@263.com。通讯作者陈纪林, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究, 尤其是动脉粥样硬化的血栓与炎症机制研究。顾晴, 博士, 主要从事冠心病的基础与临床研究。陈曦, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的基础研究。

metalloproteinase-9, MMP-9) 多克隆抗体和平滑肌肌动蛋白抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的抗山羊 IgG(0.8 g/L) 抗体购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 实验分组

8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 18 只, 由北京维通利华实验技术有限公司提供。予以西方饮食(常规小鼠饲料+ 20% 脂肪+ 0.15% 胆固醇) 喂养, 建立实验性 As 模型, 随机分为两组: 阳性对照组 10 只, 0.5 mL 生理盐水腹腔注射, 每周 2 次; 抗 CD40 配体抗体组 8 只, 0.5 mL 抗 CD40 配体抗体(250 μg) 腹腔注射, 每周 2 次。高脂饮食喂养和治疗共 16 周。取健康雄性近交系 C57BL/6 小鼠 6 只作为正常对照。

1.3 生物化学指标测定

小鼠麻醉后摘除眼球取血, 用 7060 型全自动生化分析仪测定血清总胆固醇、甘油三酯; 采用酶联免疫吸附法测定 sVCAM-1 和 sICAM-1。

1.4 病理形态学观察

动物麻醉后, 剪开胸腔, 以 4℃ 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L) 灌洗主动脉至灌流液清亮为止, 游离主动脉, 剥离外膜脂肪组织。纵行剖开主动脉, 置于 10% 福尔马林液中固定, 油红 O 染色后摄像, 采用病理和细胞图像分析系统 TD200 测量斑块面积和内膜面积, 计算斑块/内膜面积比。取胸主动脉, 分为 3 段, 每段分别切取 4 μm 厚的标本制成病理切片, 行苏木素-伊红染色、弹力纤维染色; 将动脉等距分成 5 点(包括内膜最厚处), 采用图像分析系统测量血管横断面的管壁厚度、斑块截面积, 取均值。

1.5 免疫组织化学分析

取 4 μm 厚的胸主动脉组织横截面切片做巨噬细胞、平滑肌肌动蛋白、CD4⁺ T 细胞的免疫组织化学染色, 采用图像分析系统计算阳性百分率。

1.6 Western 杂交分析

将液氮保存的腹主动脉组织进行 Western 杂交分析, 测定 MMP-9 的蛋白含量^[7]。辣根过氧化物酶标记的抗山羊 IgG(0.8 g/L) 抗体 1:1 000 稀释。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析, 两组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂水平变化

正常对照组实验前后血脂水平无明显变化。阳

性对照组和抗 CD40 配体抗体组高脂饮食喂养 16 周后, 甘油三酯水平无明显改变, 总胆固醇水平较实验前显著升高($P < 0.01$)。抗 CD40 配体抗体治疗对血脂水平无明显影响, 见表 1。

表 1. 各组小鼠的血脂水平 (mmol/L)

	正常对照组	阳性对照组	抗 CD40 配体抗体组
甘油三酯			
实验前	1.19 ± 0.46	3.41 ± 0.90 ^a	3.01 ± 1.00 ^a
实验后	1.42 ± 0.53	2.85 ± 0.55 ^a	3.10 ± 0.89 ^a
胆固醇			
实验前	2.79 ± 0.26	16.06 ± 6.56 ^b	17.04 ± 6.41 ^b
实验后	3.26 ± 1.01	26.77 ± 8.47 ^{bc}	28.64 ± 6.77 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与实验前比较。

2.2 血清粘附分子浓度变化

抗 CD40 配体抗体组血清 sVCAM-1 和 sICAM-1 浓度分别为 406.15 ± 86.98 μg/L 和 491.60 ± 128.79 μg/L, 显著低于阳性对照组的 780.61 ± 128.47 μg/L 和 743.72 ± 109.42 μg/L($P < 0.01$)。

2.3 病理形态学变化

正常对照组主动脉内膜光滑平整, 管壁呈半透明状; 阳性对照组管壁病变最明显, 斑块面积、斑块/内膜面积比显著大于抗 CD40 配体抗体组($P < 0.05$), 见表 2。正常对照组动脉内膜无脂纹和斑块形成, 弹力板完整; 阳性对照组有明显斑块形成, 含大量泡沫细胞, 富含脂质, 可见胆固醇结晶, 管壁厚度、斑块截面积显著大于抗 CD40 配体抗体组($P < 0.01$), 弹力板变性、断裂。抗 CD40 配体抗体组病变减轻, 斑块较小, 泡沫细胞和脂质减少, 弹力板基本完整(表 2 和图 1)。

2.4 免疫组织化学分析结果

抗 CD40 配体抗体组斑块中的巨噬细胞、CD4⁺ T 细胞阳性百分率显著低于阳性对照组($P < 0.05$), 而平滑肌细胞含量则明显增加(表 2 和图 2)。

表 2. 小鼠主动脉斑块病理学指标和免疫组织化学分析结果

指 标	阳性对照组	抗 CD40 配体抗体组
斑块面积 (mm ²)	9.41 ± 3.95	3.17 ± 1.58 ^a
斑块/内膜面积比	43.77% ± 15.63%	16.38% ± 6.84% ^b
管壁厚度 (μm)	110.61 ± 21.40	52.65 ± 10.75 ^b
斑块截面积 (μm ²)	35 699 ± 5 043	18 290 ± 7 673 ^b
平滑肌细胞阳性率	7.66% ± 4.04%	18.41% ± 4.26% ^a
巨噬细胞阳性率	33.23% ± 14.29%	15.88% ± 7.65% ^a
CD4 ⁺ T 细胞阳性率	2.71% ± 1.12%	0.77% ± 0.52% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与阳性对照组比较。

2.5 基质金属蛋白酶 9 蛋白的表达

阳性对照组 MMP-9 蛋白的表达为 4.30 ± 0.78 , 抗 CD40 配体抗体组为 2.22 ± 0.86 , 较阳性对照组显著减少 ($P < 0.01$), 见图 3。

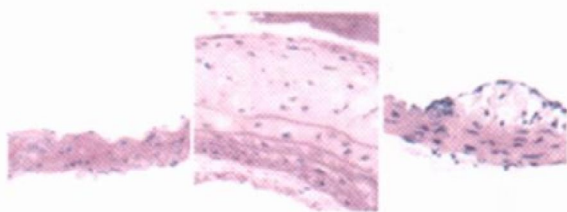


图 1. 小鼠主动脉组织切片 ($\times 200$) 左为正常对照组, 中为阳性对照组, 右为抗 CD40 配体抗体组

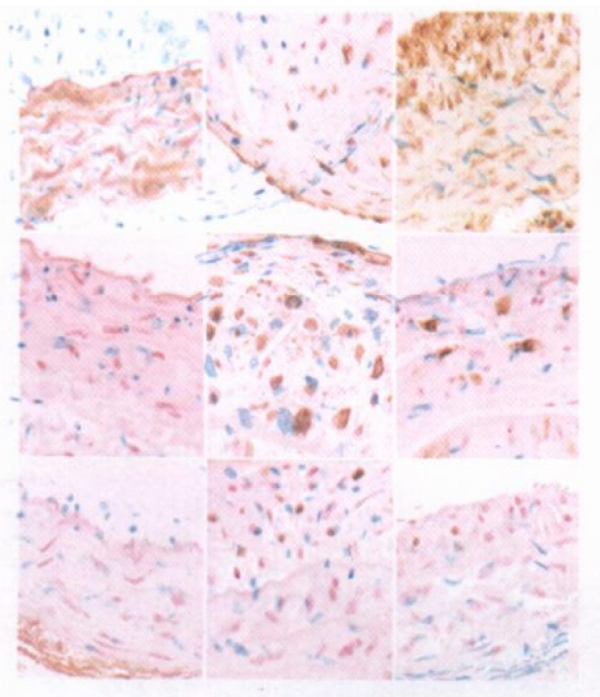


图 2. 小鼠主动脉粥样硬化病变的免疫组织化学分析 ($\times 400$) 左为正常对照组, 中为阳性对照组, 右为抗 CD40 配体抗体组; 上为平滑肌细胞, 中为巨噬细胞, 下为 CD4⁺ T 细胞。



图 3. 小鼠主动脉组织的基质金属蛋白酶 9 蛋白表达 1 为阳性对照组, 2 为抗 CD40 配体抗体组, 3 为正常对照组。

3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 作为一种多因素的慢性炎症性疾病, 涉及多种炎症细胞和炎症因子^[1]。CD40-

CD40 配体系统是炎症过程中重要的信号通路, 位于细胞因子网络的上游, 可调节多种炎症反应, 它广泛表达于 As 斑块的巨噬细胞、平滑肌细胞、T 细胞等, 其作用几乎贯穿了 As 斑块发生、发展和破裂的全过程, 被认为可能是这一炎症进程的关键环节^[2]。动物实验发现 CD40-CD40 配体通路与 As 病变和斑块结构等具有相关性^[3,4]; 临床研究也证实这一系统与 As 的发病和严重程度的关系^[5,6], 而许多抗 As 的治疗都可能直接或间接的通过这一途径发挥作用^[8,9]。因此, 抑制 CD40-CD40 配体信号通路在 As 防治中的作用及其机制越来越多地引起研究者的关注。尽管动物实验发现可以通过干预这一途径延缓 As 病变的进展、改变 As 斑块的结构, 但也有研究结果并不完全符合该观点^[3,10], 且尚少有系统性研究对干预 CD40-CD40 配体系统影响 As 病变进行阐明。

本研究目的在于观察阻断 CD40-CD40 配体系统对 As 斑块的进展、斑块的稳定性的作用, 并探讨其对 As 危险因素的影响, 这是对该问题进行的较为全面和系统性地研究。本研究选用 As 病变与人类极为相似的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠^[11] 作为实验动物模型, 予以高脂饮食喂养加速 As 的形成, 应用抗 CD40 配体抗体进行干预治疗 16 周, 并设立对照组。首先通过主动脉大体标本和组织切片两个角度观察 As 病变的情况, 研究显示, 抗 CD40 配体抗体治疗后尽管有斑块形成, 但与阳性对照组相比, 斑块面积、斑块/内膜面积比值以及血管壁厚度、斑块的截面积均显著缩小。因此, 较长时间阻断 CD40-CD40 配体系统后能够明显抑制 As 斑块的进展, 但不能完全阻止病变的发生。

进一步观察了干预治疗对于斑块稳定性的影响。由于斑块的稳定性相对于其大小, 对斑块破裂并发急性血栓的影响更大, 临床意义也更为重要, 因此稳定斑块已经成为治疗 As 的重要靶点。稳定性斑块的特点是炎症细胞浸润少, 脂质含量少, 胶原含量多, 纤维帽完整。抗 CD40L 抗体治疗后, 斑块组成成分发生改变, 斑块内的炎症细胞, 包括巨噬细胞、CD4⁺ T 细胞显著减少, 脂质成分亦减少, 而构成纤维帽并合成胶原的平滑肌细胞数量增加, 从而可能使斑块趋于稳定。这一作用与 CD40 信号通路活化 T 细胞, 促进粘附分子表达, 增加白细胞粘附与聚集, 促进平滑肌细胞凋亡等机制有关^[2,12]。斑块的稳定性还同其中的 MMP 含量密切相关, 它能够降解细胞外基质, 引起斑块的破裂^[13], 其中 MMP-9 在斑块中含量较多, 活性较强^[14], 还有促进斑块增长的作用^[15]。本研究即通过检测其含量了解斑块的稳

定性。在给予抗 CD40 配体抗体治疗后, 主动脉 MMP-9 的表达明显减少, 因此通过抑制 CD40-CD40 配体信号通路, 能够通过减少细胞外基质的降解, 稳定斑块。这与已有的报道结果相吻合^[2, 16]。同时注意到, 由于斑块内存在巨噬细胞和 T 细胞, 这些细胞均表达 MMP, 并能够通过释放细胞因子促进 MMP 的表达, 而抗 CD40 配体抗体治疗后斑块内巨噬细胞和 T 细胞数量明显减少, 这也会导致 MMP-9 蛋白含量的下降。

此外, 还对阻断 CD40-CD40 配体系统对 As 危险因素的影响进行了研究。首先检测了干预治疗对 sVCAM-1 和 sICAM-1 水平的影响。VCAM-1 和 ICAM-1 这两种粘附分子在 As 炎症过程的各个阶段都起着重要的作用^[17], 血清 sVCAM-1 和 sICAM-1 的水平是局部和全身炎症反应的可靠标志物, 是 As 发病的相关因素^[18]。在给予抗 CD40 配体抗体后, sVCAM-1 和 sICAM-1 水平明显下降, 并且与抑制斑块进展的程度相关, 因此阻断 CD40 信号可能通过减少粘附分子的表达、抑制炎症反应阻遏了 As 的进展。Peng 等^[19]的研究也发现了这一现象。其次, 测定了血脂代谢的变化情况。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠予以高脂饮食后, 血总胆固醇显著升高, 而甘油三酯无显著变化; 抗体治疗组与模型对照组之间差异没有显著性。说明在此动物模型中, 高胆固醇血症是形成 As 的主要机制, 而 CD40 信号通路对胆固醇增高并没有作用, 它对 As 的影响并不通过这一途径起作用。

本研究证实, CD40 信号通路在 As 的发生发展中起着重要的作用, 阻断 CD40-CD40 配体系统能够减少粘附分子的表达、抑制炎症反应、减轻 As 的病变更程度。上述结果可能为通过应用这一途径进行 As 的干预治疗提供新的方向和理论依据。

[参考文献]

- [1] Libby P, Rifkin BR, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2002, **105** (9): 1 135-143
- [2] Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2002, **106** (8): 896-899

- [3] Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97** (13): 7 464-469
- [4] Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97** (13): 7 458-463
- [5] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes[J]. *N Engl J Med*, 2003, **348** (12): 1 104-111
- [6] Boren D, Riggers U, Holzmeister J, Grill M, Lippek F, Settmacher U, et al. Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions[J]. *Am J Cardiol*, 2001, **87** (1): 21-27
- [7] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆试验指南[M]. 第二版, 科学出版社, 1998
- [8] Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, et al. Elevation of plasma high density lipoprotein concentration reduces interleukin 12 induced expression of E-selectin in an In Vivo model of acute inflammation[J]. *Circulation*, 2001, **103** (2): 108-112
- [9] Semb AG, Wissen S, Ueland T, Smilde T, Waele T, Tripp MD, et al. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41** (2): 275-279
- [10] Wang CY, Mazer SP, Minamoto K, Takuma S, Honma S, Yellin M, et al. Suppression of murine cardiac allograft arteriopathy by long-term blockade of CD40-CD154 interactions[J]. *Circulation*, 2002, **105** (13): 1 609-614
- [11] Yutaka N, Andrew SP, Elaine WR, Jan LB, Russell R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (1): 133-140
- [12] Hess S, Gottfried E, Smola H, Grunwald U, Schuchmann M, Engelmann H. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line[J]. *Eur J Immunol*, 1998, **28** (11): 3 594-604
- [13] Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity[J]. *Atherosclerosis*, 1997, **130** (1-2): 61-70
- [14] Galis ZS, Sukhova GK, Kranshofer PK, Clard S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteases[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, **92** (1): 402-406
- [15] Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Cammelliet P, Moons L. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth[J]. *Circulation*, 2004, **109** (11): 1 408-414
- [16] 李江, 赵水平, 彭道泉, 李全中, 聂塞. 西立伐汀对 THP-1 细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 533-536
- [17] Guray U, Erbay AR, Guray Y, Yilmaz MB, Boyaci AA, Sasmaz H, et al. Levels of soluble adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis[J]. *Int J Cardiol*, 2000, **96** (2): 235-240
- [18] Mulvihill NT, Foley JB, Walsh MA, Crean PA. Relationship between intracoronary and peripheral expression of soluble cell adhesion molecules[J]. *Int J Cardiol*, 2001, **77** (2-3): 223-229
- [19] Peng DQ, Zhao SP, Li YF, Li J, Zhou HN. Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome[J]. *Clin Chim Acta*, 2002, **319** (1): 19-26

(此文编辑 文玉珊)