文章编号:1000-5404(2009)13-1281-03

论著

肝X受体激动剂对ApoE基因敲除小鼠主动脉壁C-反应蛋白和CD40配体表达及平滑肌细胞含量的影响

程 军,李金平,田 卓,胡厚源 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨肝X受体(liver X receptor,LXR)激动剂T0901317对高脂饲养ApoE基因敲除(apolipoprotein E gene knockout,ApoE$^{-/-}$)小鼠在动脉粥样硬化病变形成的早期动脉壁内C-反应蛋白(CRP)和CD40配体(CD40L)表达及平滑肌细胞含量的影响。**方法** 8周龄雄性ApoE$^{-/-}$小鼠12只,按随机数字表法分入LXR激动剂T0901317组和二甲基亚砜(DMSO)溶剂对照组,每组6只。均给予高脂饲养8周,在高脂饲养的后4周,分别给予LXR激动剂T0901317 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}或相当剂量的DMSO腹腔注射。麻醉处死小鼠后,取小鼠主动脉,以石蜡包埋,行主动脉根部连续切片,采用免疫组化法检测主动脉壁内CRP、CD40L和平滑肌细胞α-actin的表达,以Image Pro Plus 6.0软件进行图像分析。**结果** LXR激动剂组动脉壁CRP表达水平较对照组明显减少($P<0.05$),LXR激动剂组动脉壁CD40L表达水平较对照组明显减少($P<0.05$),动脉粥样硬化斑块内平滑肌细胞α-actin表达水平与对照组比较没有统计学差异($P>0.05$)。**结论** LXR激动剂可能通过抑制ApoE$^{-/-}$小鼠动脉壁中CRP和CD40L的表达,减轻血管壁的炎症反应,从而发挥抗动脉粥样硬化形成的作用。

关键词: 肝X受体;ApoE基因敲除小鼠;C-反应蛋白;CD40配体;平滑肌细胞;炎症
中图法分类号: R-332; R543.5; R977.6 **文献标识码:** A

Effects of liver X receptor agonist on the expressions of C-reactive protein and CD40 ligand and contents of smooth muscle cells in the aorta of ApoE gene knockout mice

CHENG Jun, LI Jin-ping, TIAN Zhuo, HU Hou-yuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of liver X receptor agonist on the expressions of C-reactive protein and CD40 ligand and smooth muscle cell α-actin in the aorta of ApoE gene knockout mice with earlier atherosclerosis. **Methods** Male ApoE gene knockout mice (8-week old) were divided randomly into control group and T0901317 treatment group ($n=6$ in each group). The mice in T0901317 group were administered intraperitoneally with T0901317 at the dose of 20 mg·kg^{-1}·d^{-1} for 4 weeks. Mice in the control group were only given equivalent amount of dimethyl sulfoxide (DMSO). The expressions of C-reactive protein and CD40 ligand and smooth muscle cell α-actin were detected by immunological histochemical method. **Results** The expressions of C-reactive protein and CD40 ligand in the atherosclerotic plaque in the aortic wall were significantly lower in T0901317 group as compared with those in the DMSO control group ($P<0.01$ and $P<0.05$). No difference was found in the content of smooth muscle cell α-actin in the atherosclerotic plaque ($P>0.05$). **Conclusion** Liver X receptor agonist may reduce the formation of atherosclerotic lesions by inhibiting the inflammation and the expressions of C-reactive protein and CD40 ligand in the aorta of ApoE gene knockout mice.

Key words: liver X receptor; ApoE gene knockout mice; C-reactive protein; CD40 ligand; smooth muscle cell; inflammation

肝X受体(Liver X Receptor, LXR)属于核受体超家族成员,用来调节胆固醇和脂类代谢。近年研究表明,LXR激活有独立于调节血脂外的抗动脉粥样硬化作用[1],但其抗动脉粥样作用的机制目前尚不清楚。因此,我们通过高脂饲养建立载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E gene knockout,ApoE$^{-/-}$)小鼠动脉粥样硬化模型,观察LXR激动剂T0901317对ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉壁C反应蛋白(CRP)、CD40配体(CD40L)及平滑肌细胞α-actin的表达的影响,探讨

基金项目:国家自然科学基金(30770851)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770851)
作者简介:程 军,男,湖北省孝感市人,硕士,主治医师,主要从事动脉粥样硬化的基础与临床方面的研究。E-mail:08chengjun666@sina.com
通信作者:胡厚源,电话:(023)68765167,E-mail:houyuanhu@hotmail.com
收稿日期:2008-10-05;修回日期:2008-12-24

T0901317 抗动脉粥样硬化形成的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LXR 激动剂 T0901317(Calbiochem 公司),大鼠抗小鼠 CD40L 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),兔抗 CRP 多克隆抗体、兔抗平滑肌细胞 α-actin 多克隆抗体、SABC 大鼠 IgG 二抗工作盒、SABC 兔 IgG 二抗工作盒、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司,二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司),Nikon Eclipse E200 数码照相机(日本),胆固醇(成都科龙化工公司)。

1.2 实验动物分组

雄性 ApoE$^{-/-}$ 小鼠 12 只,8 周龄,购自北京大学实验动物中心,按随机数字表法分入 LXR 激动剂干预组和溶剂 DMSO 对照组,每组 6 只。小鼠均给予高脂饲养 8 周,在高脂饲养的后 4 周,LXR 激动剂组予 LXR 激动剂(以高浓度溶于 DMSO 中)20 mg·kg^{-1}·d^{-1}腹腔注射,对照组给予相当剂量的 DMSO 腹腔注射。高脂饲料含有 0.21% 胆固醇和 21% 脂肪。

1.3 实验动物标本取材及制备

小鼠麻醉处死后,先后以生理盐水及 4% 多聚甲醛从左心室灌注主动脉,将主动脉从心脏根部至髂动脉分叉处离断取出,4% 多聚甲醛固定。从主动脉根部开始至 600 μm 处,行连续石蜡切片,切片厚 4 μm。

1.4 免疫组织化学染色

组织化学染色用 SABC 法(兔抗 CRP 多克隆抗体 1∶100 稀释,大鼠抗小鼠 CD40L 单克隆抗体 1∶200 稀释,兔抗平滑肌细胞 α-actin 多克隆抗体 1∶100 稀释),DAB 显色,以磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为阴性对照,光镜下所见黄褐色颗粒为阳性。取主动脉根部石蜡切片,分别行 CRP、CD40L 和 α-actin 免疫组化染色,每项 3 张切片。

1.5 图像的采集和分析

具体方法参考文献[2-4]。400 倍视野下,以数码图像设备采集 CRP、CD40L 和平滑肌细胞 α-actin 的免疫组化染色图片,经 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统进行累积光密度值测定,同时测血管壁和粥样硬化斑块面积,计算平均光密度,从而对目标蛋白的表达进行半定量。平均光密度值 = 累积光密度值/血管壁面积(计算 CD40L 和 α-actin 表达时用斑块面积)。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 LXR 激动剂对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉壁 CRP 表达的影响

免疫组化染色结果显示,LXR 激动剂组主动脉壁 CRP 表达与对照组(图 1D、H)相比显著减少($P = 0.001$),提示 LXR 激动剂可降低 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉壁 CRP 表达水平(表 1,图 1A、E)。

2.2 LXR 激动剂对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化斑块内 CD40L 表达的影响

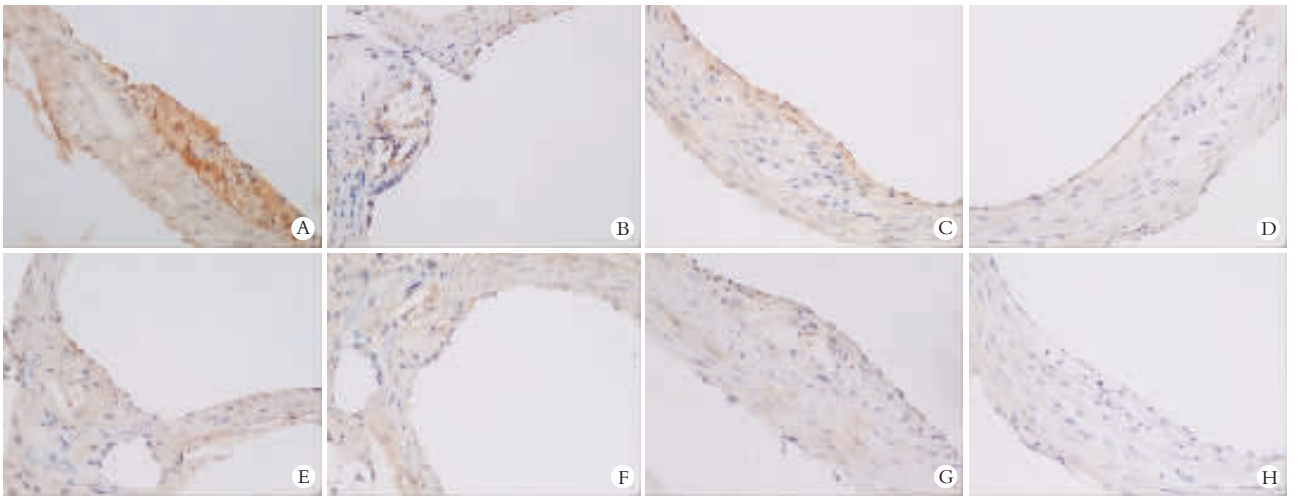
免疫组化染色结果显示,LXR 激动剂组主动脉壁 CD40L 表达与对照组(图 1D、H)相比显著减少($P = 0.002$),提示 LXR 激动剂可降低 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉壁粥样斑块内 CD40L 的表达水平(表 1,图 1B、F)。

2.3 LXR 激动剂对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化斑块内平滑肌细胞 α-actin 表达的影响

免疫组化染色结果经图像软件分析,LXR 激动剂组主动脉粥样斑块内平滑肌细胞 α-actin 表达与对照组(图 1D、H)相比没有显著改变($P = 0.075$),提示 LXR 激动剂对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化斑块内平滑肌细胞的含量没有显著影响(表 1,图 1C、G)。

表 1 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉壁 CRP 和斑块内 α-actin 表达的平均光密度值比较($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	CRP	CD40L	α-actin
对照组	0.038 5 ± 0.005 4	0.025 0 ± 0.007 0	0.014 3 ± 0.008 8
LXR 激动剂组	0.014 1 ± 0.002 7	0.012 7 ± 0.002 7	0.006 7 ± 0.003 5
P 值	0.001	0.002	0.075



A:DMSO 组主动脉 CRP 染色;B:DMSO 组主动脉 CD40L 染色;C:DMSO 组主动脉 α-actin 染色;D:ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉免疫组化染色阴性对照;E:T0901317 组主动脉 CRP 染色;F:T0901317 组主动脉 CD40L 染色;G:T0901317 组主动脉 α-actin 染色;H:ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉免疫组化染色阴性对照

图 1 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉免疫组织化学染色 (SABC,苏木精复染 ×400)

3　讨论

前期研究表明[1],LXR 激动剂抑制 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化形成。为研究 LXR 激动剂的抗动脉硬化机制,本实验进一步观察了 LXR 激动剂对主动脉壁中 CRP 和斑块内 CD40L 和平滑肌细胞 α-actin 表达的影响。CRP 是机体非特异性炎症反应的敏感标志物。然而更多的证据表明,CRP 有促动脉粥样硬化的作用[3]。CRP 分泌部位以往认为仅在肝脏,近来研究显示,在动脉粥样斑块和血管壁中亦有 CRP mRNA 和蛋白存在,并且在炎症因子作用下,平滑肌细胞和内皮细胞可以合成和分泌 CRP[4]。CRP 能对炎症细胞和血管细胞产生重要的影响,从而参与动脉粥样硬化形成和心血管疾病的发展。研究表明,在单核/巨噬细胞中,CRP 诱导 MMP-1 等炎症介质和因子表达增加[5]。在内皮细胞中,CRP 诱导 VCAM-1 等黏附分子、MMP-1 和 MMP-10 等基质金属蛋白酶表达增加[6,7]等。

在 ApoE$^{-/-}$小鼠模型中,转入人 CRP 基因可加速动脉粥样斑块的形成,其体内 eNOS 活性下降,表明体内 CRP 水平与内皮依赖性血管舒张功能呈现负相关[8,9]。目前认为 CRP 不仅是炎症反应的标志物,还直接参与到动脉粥样硬化的发生和发展过程中,是重要的致动脉粥样硬化因子[3]。本实验免疫组化显示,高脂饲养 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉壁有 CRP 表达,与对照组相比,LXR 激动剂组 CRP 表达水平明显降低,提示 LXR 激动剂可减少动脉壁 CRP 表达。因此,LXR 激动剂可能通过抑制血管壁的炎症反应和 CRP 的表达,而发挥其抗动脉粥样硬化作用。

白细胞分化抗原配体(CD40L)是三聚体的跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子家族,与其受体 CD40 结合作为炎症信号通路重要组成部分参与动脉粥样硬化形成、斑块失稳定和血栓形成过程[10]。研究表明,在动脉粥样硬化斑块中,内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞均有 CD40 和 CD40L 表达[10]。CD40 与 CD40L 相互作用可促进细胞产生和大量黏附分子(VCAM-1 和 ICAM-1 等)、细胞因子(IL-1、IL-6 等)、MMPs 和组织因子等的表达,并可促进血小板 P-selectin 表达和提高白细胞氧化活性等[11,12]。CD40-CD40L 参与小鼠动脉粥样硬化斑块的形成和发展,应用抗 CD40L 抗体阻断 CD40-CD40L 通路后,不仅能够抑制小鼠动脉粥样硬化病变的进展,而且可使斑块更趋于稳定,如巨噬细胞和脂质减少,平滑肌和胶原纤维增加等[13]。本实验采用免疫组化方法,观察到 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化斑块中有 CD40L 表达,且与对照组相比,T0901317 组粥样硬化斑块内 CD40L 的表达显著减少。因此 LXR 激动剂可能通过抑制斑块内 CD40L 表达和抑制炎症反应而发挥其抗动脉粥样硬化作用。

在动脉粥样硬化病变发展过程中,除内皮损伤、脂质沉积、单核细胞泡沫化外,动脉壁血管平滑肌细胞迁移和增殖也是影响动脉粥样硬化发展的重要因素之一。平滑肌细胞标记抗原 α-actin 表达越多,平滑肌细胞的数量越多。本实验观察到,ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样斑块内 α-actin 的表达呈阳性,但 T0901317 组与对照组相比无显著差异($P>0.05$),说明 LXR 激动剂对动脉粥样斑块内平滑肌细胞的增殖没有显著影响。本研究表明,LXR 激动剂可能通过抑制 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉壁中 CRP 和 CD40 配体的表达,减轻血管壁炎症反应,从而发挥抗动脉粥样硬化形成的作用。

参考文献:

[1] 颜　伟,胡厚源, 周　林, 等. 两种 LXR 激动剂对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化影响的对照研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(5):381－384.

[2] 李金平, 程　军, 田　卓, 等. 南蛇藤素对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉壁 MIF 及 MMP-9 表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2008,30(9):827－830.

[3] Pepys M B, Hirschfield G M, Tennent G A ,*et al*. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease[J]. Nature, 2006, 440(7088): 1217－1221.

[4] Jialal I, Devaraj S, Singh U, *et al*. Sources of CRP in atherosclerotic lesions[J]. Am J Pathol,2006,168(3):1054－1055.

[5] Williams T N, Zhang C X, Game B A, *et al*. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway: an implication of CRP involvement in plaque destabilization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24 (1): 61－66.

[6] Liang Y J , Shyu K G, Wang B W, *et al*. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB pathway and induces vascular cell adhesion molecule-1 expression through CD32 in human umbilical vein endothelial cells and aortic endothelial cells[J]. J Mol Coll Cardiol, 2006, 40(3):412－420.

[7] Montero I, Orbe J, Varo N, *et al*. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(7):1369－1378.

[8] Paul A, Ko K W, Li L, *et al*. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 2004, 109(5):647－655.

[9] Schwartz R, Osborne-Lawrence S, Hahner L, *et al*. C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization in vivo in mice[J]. Circ Res, 2007, 100(10): 1452－1459.

[10] Lutgens E, Lievens D, Beckers L, *et al*. CD40 and its ligand in atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(4):118－123.

[11] Phipps R P, Koumas L, Leung E, *et al*. The CD40-CD40 ligand system: a potential therapeutic target in atherosclerosis[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(6):773－777.

[12] Li G, Sanders J M, Bevard M H, *et al*. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury[J]. Am J Pathol,2008,172(4):1141－1152.

[13] Lutgens E, Gorelik L, Daemen M J, *et al*. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis[J]. Nat Med, l999, 5(11):1313－1316.

(编辑　张　维)