维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0692-05

CD40-CD40L 系统与斑块稳定性的相关性研究

陈朝婷,冯向飞,盛 净

(上海市交通大学附属第九人民医院老年科,上海 200011)

【摘 要】目的:研究 CD40-CD40L 系统在兔腹主动脉粥样硬化斑块进展过程中的表达以及与斑块稳定性的相关性。方法:50 只健康新西兰大白兔,随机均分为 10 组:正常对照 1~5 组(C1~5 组)、动脉粥样硬化模型 1~5 组(AS1~5 组)。C1~5 组分别予兔标准饲料喂养至 8 周、10 周、12 周、14 周、16 周取腹主动脉标本;AS1~5 组均在高脂饲养 1 周后予腹主动脉球囊导管损伤术造模,并分别持续高脂饮食至 8 周、10 周、12 周、14 周、16 周取标本。各组均于实验前及取标本前检测血清 C 反应蛋白(CRP),各组腹主动脉标本通过免疫及特殊染色定位、光镜下摄片并计算机图像分析软件测定斑块内 CD40、CD40L、MMP-1 阳性染色的面积占血管内膜面积百分比值及胶原/脂质含量比值,分析 CD40-CD40L 系统的表达与斑块稳定性的相关性。结果:AS1~5 组均形成腹主动脉粥样硬化斑块。与 C1~5 组对应比较,AS1~5 各组血清 CRP 均显著增高($P<0.01$),斑块内 CD40、CD40L、MMP-1 的表达显著增加($P<0.01$)。在动脉粥样硬化进程中,CD40、CD40L 表达与 CRP、MMP-1 表达呈正相关,与胶原/脂质含量比值负相关。结论:斑块中 CD40-CD40L 系统表达随着动脉粥样硬化进展而逐渐增高,其高表达与斑块的不稳定性增加密切相关。

【关键词】动脉粥样硬化;CD40-CD40 配体;斑块;稳定性

【中国图书分类法分类号】R541.4;Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-20

The study of correlation between CD40-CD40L system and atherosclerotic plaque stability

CHEN Chaoting, et al

(*the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of CD40-CD40L system on rabbit aorta plaque and correlation with plaque stability during atherosclerotic process. *Methods*: 50 healthy rabbits were devided into 10 groups in random: five controlled groups (C1~5 group)and five AS model groups (AS1~5 group). Rabbits in C1~5 group were fed on regular diets until 8 weeks, 10 weeks.12weeks, 14weeks and 16weeks to get the aorta specimen respectly.Correspondingly rabbits in AS1~5 groups were given high lipid diets continously until 8weeks, 10weeks, 12weeks, 14weeks and 16weeks, during which each AS group was conducted balloon injury at the end of the first week to promote the establishment of AS models. All the groups were detected serum CRP individually at beginning and before specimen obtained.Immunohistochemistry and special stain was used to detect the intima expression proportion of CD40, CD40L, MMP-1 as well as contant of collagen and lipid photographed under microscope and measured by computer.Then the collagen/lipid ratio were calculated.Finally correlation between CD40-CD40L expression and plaque stability were analyzed. *Results*: All atherosclerotic plaques were successfully established on all rabbits'abdominal aorta in the 5 AS groups.Compared with C1~5 groups correspondantly, the expression of CD40, CD40L, MMP-1 were significantly increased ($P<0.01$)in every AS model group.Meanwhile serum CRP levels were higher than those of each C group($P<0.01$)evidently. The correlation between CD40-CD40L system and CRP as well as MMP-1 is positive.While negative correlation is between CD40-CD40L level and collagen/lipid ratio. *Conclusion*: The expression levels of CD40-CD40L on plaque lesions were increasingly high with atherosclerosis processing.High expression of CD40-CD40L system has close relation to plaque vulnerability.

【Key words】Atherosclerosis; CD40-CD40 ligand; Paque Stability

由于动脉粥样硬化斑块失稳定导致急性冠脉综合征发生,是冠心病高致死率和致残率的主要原因。近年的研究发现 CD40-CD40L 系统在动脉粥样硬化(AS)形成和发展的慢性炎症免疫过程中有重要作用[1]。作为启动和调节免疫应答的主要介质CD40及其配体 CD40L,广泛表达于动脉粥样硬化相关炎

作者介绍:陈朝婷(1972-),女,主治医师,硕士,
主要研究方向:老年心脑血管疾病的临床诊治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

症免疫细胞表面，两者结构互补相互作用，上调多种促炎介质，诱导基质金属蛋白酶的基因大量表达，对促进斑块的形成和失稳定起着关键作用。本研究通过动态分析兔腹主动脉粥样硬化进展过程中斑块内 CD40-CD40L 系统的表达，并检测斑块稳定性相关指标 CRP、MMP-1 的表达和斑块内胶原/脂质含量比，探讨 CD40-CD40L 系统与斑块稳定性的相关性。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康新西兰大白兔 50 只，雌雄不限，体重 2.0~3.0kg/ 只（由上海组织工程实验动物中心提供），随机均分为 10 组：正常对照 1~5 组（C1~5 组）、动脉粥样硬化模型 1~5 组（AS1~5 组）。C1~5 组分别予兔标准饲料喂养 8 周、10 周、12 周、14 周、16 周取标本，AS1~5 组给予高脂饲养（兔饲料 200g/d，含 0.5%的胆固醇和 6%的花生油）及 1 周后腹主动脉球囊损伤术，并分别持续高脂饮食至 8 周、10 周、12 周、14 周、16 周取标本，各组兔饮水不限。

1.2 兔腹主动脉球囊损伤术

AS1~5 各组兔在 1 周适应性高脂饮食喂养下，常规称重后，给予速眠新（剂量按 0.1~0.2ml/kg 体重）肌注麻醉后，腹部向上固定于手术台，右侧下肢备皮，常规消毒铺巾。自右侧膝部以上纵行切开皮肤 3~4cm 至髋部，钝性分离皮下筋膜和肌肉组织，游离出右侧股动脉。于股动脉近端和远端分置血管夹后，纵向切开血管壁约 3mm，以 3F 球囊导管向近端插入 20cm 至腹主动脉膈水平，用压力泵向球囊内注入生理盐水膨胀球囊后维持压力 6~8 个大气压，缓慢回拉球囊有轻度阻力，回到血管切口处时抽空球囊后重复上述过程 3 次使腹主动脉内皮剥脱，退出导管，以 7/0 无损伤线缝合血管壁切口，清创后逐层关闭并缝合皮肤，局部给予碘酒消毒缝合口。术中出现血管痉挛时局部给予 2%利多卡因注射液浸润，待管径恢复后继续手术。术后予青霉素肌注 3 日预防感染。

1.3 CRP 指标测定

各组均于实验前及取标本前空腹下取耳缘静脉血 2ml 利用固相酶联免疫吸附实验（ELISA）方法检测血清 C 反应蛋白（CRP）值的变化。

1.4 免疫组化染色

1.4.1 主要仪器与试剂　英国 SHANDON 全封闭式程控组织处理机，德国 SLEE4050 手摇石蜡切片机，英国 SHANDON 冰冻切片机，日本 Nikon 生物光学显微镜、偏振镜、落时荧光显微镜；兔抗 CD40 及 CD40L 多克隆抗体（武汉博士德生物工程有限公司），鼠抗兔 MMP-1 单克隆抗体（Biomeda 公司），羊抗兔二抗多聚物－HRP（Dako 公司），DAB（华美生物工程公司）；天狼星红苦味饱和酸液（Sirius Red）、O.C.T 复合物、油红 O 原液等试剂均由九院组织工程实验室提供。

1.4.2 标本制备　静脉气栓法处死实验兔，取腹部正中切口，分离出腹主动脉，自剑下至髂总动脉分叉处剪取腹主动脉，剥离血管外脂肪组织，0.9%生理盐水冲净并吸干水分，以 10%中性福尔马林缓冲液固定，常规步骤石蜡包埋，连续横断切片行免疫组化染色。

1.4.3 CD40、CD40L、MMP-1 的免疫组化染色　石蜡包埋组织制成 5μm 切片；二甲苯及梯度酒精脱蜡至水；PBS 缓冲液漂洗后以 3%过氧化氢甲醇溶液 37℃，10min 阻断内源性过氧化物酶活性；PBS 液再漂洗后以 0.05%胰蛋白酶，37℃，30min 进行酶消化；0.5%BSA（牛血清白蛋白）封闭非特异性抗原；吸去多余血清，分别滴加适当工作浓度的一抗（分别为抗 CD40、抗 CD40L、抗 MMP-1 抗体），37℃，1h；漂洗之后 4℃冰箱孵育过夜；滴加适当浓度的羊抗兔二抗多聚物－HRP，37℃，30min；DAB 液稀释后显色 3~5min，适时中止反应。苏木素核衬染，盐酸乙醇分化，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片后光镜下摄片。对照片以 PBS 代替一抗，其余步骤均同上述。对照片均为阴性，实验片阳性染色呈深棕色。

1.4.4 胶原染色及偏振镜检　石蜡切片常规脱蜡至水；人苏木素液染核 5min；蒸馏水洗 3 次，3min/ 次；天狼星红（Sirius Red）苦味饱和酸液染 15~30min；无水乙醇直接脱水，二甲苯透明，中性树胶封片后即于偏振光显微镜下以相同时间曝光拍摄。胶原纤维紧密排列呈强烈鲜红色具折光性。

1.4.5 脂质的油红 O 染色　动脉组织制成 4um 冰冻切片；以 4%多聚甲醛固定后行油红 O（原液过滤后与蒸馏水以 6:4 稀释）染色 10min；60%乙醇分色；苏木素核衬染；明胶封片后光镜下观察摄片，可见脂质呈鲜红滴状。

1.4.5 图像分析处理　分别将 CD40、CD40L、MMP-1、胶原和脂质的免疫组化染色切片在高倍镜（×100）下观察，采用 Image pro plus4.5 图像分析软件进行图像输入、增强、分割、二值化处理、识别与分析、数据分析输出等步骤，逐步测算出各阳性染色面积与血管中膜面积的比值。

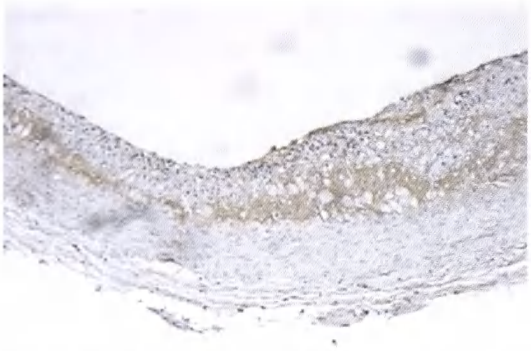
1.4.6 统计学分析　应用 SPSS11.0 统计软件包进行数据分析处理。组内比较采用配对 t 检验；组间比较以 one-way ANOVA 进行分析：各造模组与对照组间比较行多组方差分析及 Dunnett t 检验；各造模组间比较采用方差分析及 S-N-K 检验。

2 结　果

2.1 一般观察

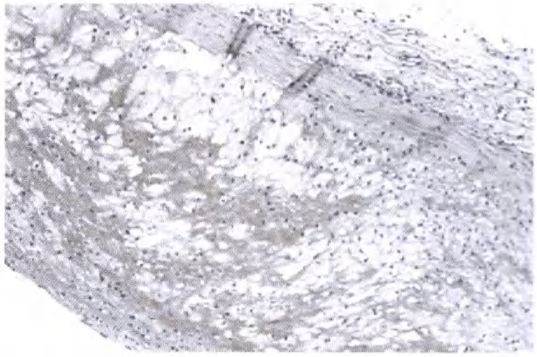
各组实验兔中，AS2 组 1 兔因球囊损伤术后不进食高脂饲料而退出实验；AS5 组 1 兔于第 15 周死亡，解剖发现大量腹水和肝脂肪沉积黄色变，腹主动脉迂曲严重，管腔内粥样物质遍布腹主动脉全程。其余各组兔均完成实验。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图中可见斑块内 CD40L 阳性染色反应呈深棕色，CD40L 主要表达于斑块的肩部和底部。

图 1A AS 组 CD40L 在斑块内的表达(光镜×100)



图中可见斑块内 CD40 阳性染色反应呈深棕色，CD40 广泛表达于斑块内。

图 1B AS 组 CD40 在斑块内的表达(光镜×100)

2.2 各对照组与各造模组实验前及取标本前血清 CRP 值变化(见表 1)

各期对照组取标本前血清 CRP 值较实验初无显著性改变($P>0.05$)；AS 各组内对照及与同期对照组间比较，CRP 值前后差异非常显著($P<0.01$)。

2.3 各对照组与各模型组斑块内 CD40-CD40L 的表达(见图 1A/B 及表 2)

CD40 及 CD40L 在 AS 斑块内的免疫染色定位如图 1A 和 1B 中所示：阳性染色呈深棕色，动脉壁其它部位不表达，CD40L 主要表达在斑块的肩部和底部（图 1A），而 CD40 在斑块中广泛表达（图 1B）。

各模型组 CD40 及 CD40L 阳性染色占内膜面积百分比均较同期各对照组非常显著增高（$P<0.01$），随着 AS 时程递增 CD40-CD40L 表达在 AS3、4、5 各组间呈显著上升趋势($P<0.01$)(见表2)，

表 1 各对照组与各造模组血清 CRP 值的变化(mmol/L) ($\bar{x}\pm s$)

	C 组			AS 组	
	实验前	取标本前		实验前	取标本前
C1 组	183.86±4.39	189.75±6.58	AS1 组	186.69±6.58	236.16±4.30*#
C2 组	184.32±8.42	184.26±5.62	AS2 组	188.11±5.07	245.84±4.37*#
C3 组	184.71±5.64	190.42±7.12	AS3 组	187.31±8.16	255.62±4.37*#
C4 组	186.57±8.78	187.82±8.65	AS4 组	187.24±7.63	270.49±4.46*#
C5 组	185.39±5.16	188.78±1.94	AS5 组	185.89±2.95	300.31±4.74*#

与同期各对照组比较差异非常显著 $P<0.01$；* 组内比较前后差异非常显著 $P<0.01$；

表 2 造模各组与各对照组免疫组化和特殊染色阳性面积百分比值($\bar{x}\pm s$)

组别	阳性染色面积比值%			
	CD40	CD40L	MMP-1	脂质
C1 组	7.84 ± 0.72	8.89 ± 1.31	3.56 ± 0.19	4.81 ± 1.06
C2 组	7.91 ± 0.48	9.13 ± 1.25	3.68 ± 0.17	4.65 ± 1.48
C3 组	7.39 ± 0.33	8.87 ± 1.34	3.70 ± 0.31	4.70 ± 1.23
C4 组	7.85 ± 0.48	9.13 ± 1.19	3.76 ± 0.19	5.02 ± 1.77
C5 组	8.01 ± 0.50	9.00 ± 1.78	3.80 ± 0.23	4.89 ± 1.64
AS1 组	23.97 ± 2.69#	26.59 ± 3.34#	10.54 ± 1.75#§	15.74 ± 2.33#
AS2 组	24.99 ± 2.16#	28.50 ± 3.03#	12.43 ± 1.73#§	18.54 ± 1.45#
AS3 组	27.56 ± 1.88#§	32.91 ± 2.01#§	16.10 ± 1.24#§	22.40 ± 3.02#§
AS4 组	30.75 ± 1.48#§	37.28 ± 1.32#§	18.39 ± 1.24#§	32.05 ± 2.74#§
AS5 组	36.90 ± 1.35#§	44.53 ± 1.47#§	21.19 ± 1.40#§	38.22 ± 2.85#§

#AS 各组与同期各对照组比较，差异非常显著 $P<0.01$；§AS 各组间比较，差异非常显著 $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 AS 各组 CRP、MMP-1、胶原与 CD40、CD40L 的 Pearson 相关系数

r 值	CRP		MMP-1		胶原/脂质	
组别	CD40	CD40L	CD40	CD40L	CD40	CD40L
AS1 组	0.968#	0.959#	0.938$	0.977#	-0.912$	-0.939$
AS2 组	0.970$	0.964$	0.962$	0.997#	-0.956$	-0.994#
AS3 组	0.969#	0.992#	0.897$	0.929$	-0.934$	-0.948$
AS4 组	0.986#	0.960#	0.972#	0.966#	-0.974#	-0.989#
AS5 组	0.986$	0.999#	0.961$	0.986$	-0.979$	-0.997#

相关系数显著性检验 $P<0.01$；$相关系数显著性检验 $P<0.05$

可能 AS 病变进展到后期有关。

2.4 各组斑块内 MMP-1、胶原和脂质含量比较

从表 2 中可见，斑块内 MMP-1、胶原和脂质含量在各造模组与同期各对照组间差异非常显著（$P<0.01$）；随 AS 时程延长，MMP-1 表达水平在各模型组间呈显著增高趋势（$P<0.01$）；胶原含量在各模型组间差异不显著（$P>0.05$），脂质含量在 AS3~5 组组间差异非常显著（$P<0.01$）。

2.5 AS 各组 CRP、MMP-1、胶原/脂质比与 CD40-CD40L 系统的相关性分析（见表 3）

对不同时程 AS 各组 CRP、MMP-1、胶原/脂质比分别与 CD40、CD40L 行 Pearson 相关分析发现，CRP 及 MMP-1 与 CD40、CD40L 均呈正相关，而胶原/脂质比与 CD40、CD40L 呈负相关。提示 CRP、MMP-1、胶原/脂质比作为反应斑块易损性指标与 CD40-CD40L 系统的表达密切相关。

3 讨 论

近年来随着动脉粥样硬化斑块破裂导致严重心脏性事件的发生，斑块的稳定性研究受到重视。研究发现，最初认为在免疫系统发挥信号转导作用的白细胞分化抗原 40 及其配体（CD40-CD40L），作用几乎贯穿动脉粥样硬化（AS）形成、发展和演变的全过程，对斑块失稳定起着重要作用[1]。

CD40 是表达于 B 细胞发育和分化的各个阶段细胞表面的 I 型跨膜糖蛋白，属 TNF 受体超家族成员；CD40L 即 CD154，是 CD40 配体，为主要表达于成熟的活化 $CD4^+$T 淋巴细胞的 II 型跨膜糖蛋白，属 TNF 超家族[2]。近年研究发现，正常动脉无 CD40L，仅在内皮细胞有少量 CD40 表达，但两者在斑块的肩部即斑块最容易破裂处表达最多[3]。CD40 与 CD40L 在单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞等众多参与动脉粥样硬化的细胞表面表达，两者互补结合，促使相关细胞产生系列活性炎症介质，同时正反馈促进自身表达，并诱导内皮、平滑肌和巨噬细胞大量表达和释放基质金属蛋白酶（MMPs）[4]，促进斑块降解。而阻断 CD40-CD40L 信号系统的相互作用可以抑制 AS 的发生与发展[5]。

在斑块破裂之前，对斑块的易损性综合评价有利于防治急性冠脉综合征导致严重心脏性事件的发生和不良预后。大量研究认为，不稳定斑块具有薄的纤维帽、较大的脂核和较多的炎症细胞浸润[6]。目前公认，血清炎症标志物、胶原降解相关酶的含量、纤维帽厚度和脂质核心面积的比值（the cap/core rate）是评价斑块易损程度的指标[7-9]。

炎症是动脉粥样硬化斑块形成和失稳定的重要因素，炎症标志物血浆 C 反应蛋白（CRP）作为急性冠脉综合征的独立预测因子，对预测易损斑块破裂有重要临床价值[7,10]。基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinases，MMPs）是一族可消化细胞外基质的重要蛋白酶类。MMPs 家族中的一个重要成员 MMP-1 即间质胶原酶，可以降解 III、I、II、X 和 VII 型胶原、明胶以及蛋白多糖，通过消化纤维帽成分破坏斑块结构而加速其破裂，对造成斑块不稳定起主要作用[12]。通过尸解实验分析发现，MMP-1 阳性表达与斑块破裂之间存在明显的正相关关系，即 MMP-1 表达含量越高之处，斑块越容易破裂[12]。

薄的纤维帽和大的脂核都是不稳定斑块的主要特征。细胞外基质胶原含量多少直接影响纤维帽的厚度和强度，不稳定斑块的细胞外基质胶原含量减少削弱斑块抗破裂的能力，而脂核比例>40%时斑块也易于破裂[13,14]。因而，斑块的胶原/脂质比从结构上反映了斑块的稳定性[8]。

本实验通过高脂饮食联合球囊导管血管内膜损伤术造模兔腹主动脉 AS 斑块，研究 AS 不同进程

维普资讯 http://www.cqvip.com

中斑块内 CD40-CD40L 系统的表达，发现各模型组斑块内 CD40-CD40L 系统的表达水平显著高于同期对照组($P<0.01$)，而随着 AS 进展时程延长，模型组 AS3、4、5 组斑块内 CD40-CD40L 系统的表达显著升高($P<0.01$)。提示 CD40-CD40L 系统作用于动脉粥样硬化形成和发展的全过程，在斑块形成的中后期表达剧增可能与其促炎的正反馈机制有关。同时发现各模型组血浆 CRP 值、MMP-1 表达较同期对照组非常显著增高($P<0.01$)，且与 CD40-CD40L 系统的表达呈正相关，证实 CD40-CD40L 系统通过其信号传导作用扩大斑块内炎症反应，促进 MMP-1 高表达，从而降解胶原组分削弱纤维帽厚度，增加 AS 斑块的易损性，是 AS 免疫炎症反应扩大化和导致 AS 斑块失稳定的关键环节。持续高脂饮食诱导下，各模型组斑块结构中脂质和胶原含量均高于正常组($P<0.01$)，但胶原/脂质比则随斑块内的 CD40-CD40L 表达增高而下降，呈负相关效应，提示 AS 斑块结构逐渐向失稳定发展的病理过程与 CD40~CD40 逐步增高过程相吻合。

本实验中发现，随着动脉粥样硬化进展，斑块内 CD40-CD40L 系统高表达预示着 AS 慢性免疫炎症反应程度加剧和斑块易损性的增高，提示 CD40-CD40L 系统具有预测易损斑块防治急性冠脉综合征的临床价值。本研究未对动脉粥样硬化过程进行干预实验以反证 CD40-CD40L 系统对斑块的影响，尚待深入研究。

(通讯地址：山东省淄博市临淄区闻韶北 31 楼 1 单元 201 室 冯向飞(收)转 陈朝婷，联系电话：13583363972 冯向飞)

参 考 文 献

[1] Hansson GK.Immune mechanism in atherosclerosis[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2001,21:1876-1890.

[2] Hakkinen T,Karkolak,Yla Herttuala S,et al.Macrophages, smoothmuscle cells,endothelial cells,and T cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic le sions.Colocal ization with epitopes of oxidized low density lipoprotein, scavenger receptor,and CD16[J].Virchows Arch,2000;437:396-405.

[3] Mach F,Schonbeck U,Sukhova GK,et al.Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells,smooth muscle cells,and macrophages:implications for CD40 CD40 ligand signaling in atherosclerosis[J].Proc Natl Acad Sci USA,1997;94:1931-1936.

[4] Schonbeck U,Mach F,Sukhoa GK,et al.Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth cells by T lymphocytes:a role for CD40 signaling in plaque rupture [J].Circ Res,1997;81:448-454.

[5] Schonbeck U,Sukhova GK,Shimizu K,et al.Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000;97:7458-7463.

[6] Davies MJ.Pathophysiology of acute coronary syndromes [J]. Heart,2000,83(4):361-366.

[7] Yeh ET,Anderson HV,Pasceri V,et al.C-reactive protein:linking inflammation to cardiovascular complication[J].Circulation,2001,104: 974.

[8] Rekhter M.Vulnerable atherosclerotic plaque:emerging challenge for animal models[J].Curr Opin Cardiol,2002;17(6):626-632.

[9] Loree HM,Tobias BJ,Gibson LJ,et al.Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,1994;14(2):230-234.

[10] SaroT,TanakaA,NambaM,et al.Saro T,Tanaka A,Namba M,et al. C reactive protein and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction[J].Circulation,2003;108(3):282-285.

[11] 余丹青，陈纪言，李 光，等.基质金属蛋白酶与冠状动脉斑块稳定性相关研究[J].中国循环杂志，2003;18:105-107.

[12] 郭爱桃，韦立新，石怀银，等.基质金属蛋白酶-1 与冠状动脉粥样硬化斑块破裂的关系[J].中华病理学杂志，2000;29(4):263-266.

[13] Moreno PR,Lodder RA.Detection of lipid pool,thin fibrous cap,and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near infracted spectroscopy[J].Circulation,2002;105:923.

[14] Zaman AG,Helft G,Worthly SG.The role of plaque erupture and thrombosis in coronary artery diseases[J].Atherosclerosis,2000; 149:251-266.