

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0601-03

南蛇藤素对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块内 CD40 配体表达、巨噬细胞和平滑肌细胞数量的影响*

程 军, 李金平, 田 卓, 胡厚源[△]
(第三军医大学西南医院心内科, 重庆 400038)

[摘要] 目的: 探讨南蛇藤素对高脂饲养 ApoE 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-})主动脉粥样硬化斑块内 CD40 配体表达、巨噬细胞和平滑肌细胞数量的影响。方法: 8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠 12 只, 随机分为南蛇藤素组或二甲基亚砜(DMSO)溶剂对照组, 每组各 6 只。均给以高脂饲养 8 周, 在高脂饲养的后 4 周, 分别给予南蛇藤素 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹或相当剂量的 DMSO 腹腔注射(ip)4 周。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。免疫组化法检测主动脉粥样硬化斑块内 CD40 配体、CD68 和平滑肌 α -actin 表达水平, 以 Image Pro Plus 6.0 软件进行图像分析。结果: 与对照组相比, 南蛇藤素组主动脉粥样硬化斑块内 CD40 配体表达显著减少($P < 0.05$); 巨噬细胞的阳性率显著降低($P < 0.05$); 而两组间动脉粥样硬化斑块内平滑肌细胞的阳性率没有显著差异($P > 0.05$)。结论: 南蛇藤素可能通过减少 ApoE^{-/-}小鼠粥样斑块内 CD40 配体的表达和巨噬细胞的聚集, 抑制动脉粥样硬化斑块中炎症反应, 而发挥稳定动脉粥样硬化斑块的作用。

[关键词] 动脉硬化; 南蛇藤素; ApoE 基因敲除小鼠; CD40 配体; 巨噬细胞; 平滑肌细胞

[KEY WORDS] Arteriosclerosis; Celastrol; ApoE gene knockout mice; CD40 ligand; Macrophages; Smooth muscle cells

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

1999 年, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的炎症学说被提出后, 有关 AS 发病过程中的炎症反应受到越来越多的关注^[1]。南蛇藤素(celastrol)又名雷公藤红素(tripterine), 是从中药雷公藤提取的三萜类单体成分, 研究表明, 南蛇藤素有抗炎、抗氧化、调节免疫、调节细胞增殖和凋亡等作用^[2-4]。本课题组前期研究表明, 南蛇藤素抑制高脂饲养载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-})动脉粥样硬化病变成形(另文发表), 因此本研究旨在观察南蛇藤素对动脉粥样硬化斑块内炎症因子表达和炎症细胞数量的影响, 并以免疫组化方法检测小鼠主动脉粥样硬化斑块内白细胞分化抗原 40(CD40)配体(CD40L)、CD68 和平滑肌 α -actin 的表达水平。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂和设备 南蛇藤素(Celbiochem), 大鼠抗小鼠 CD40L 单克隆抗体(Santa Cruz), 大鼠抗小鼠 CD68 单克隆抗体(Serotec), 兔抗小鼠平滑肌 α -actin 多克隆抗体、SABC 兔 IgG II 抗工作盒、SABC 大鼠 IgG II 抗工作盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma), Nikon Eclipse E200 数码照相机(Nikon), Image Pro Plus 6.0 图像分析软件(Media cyber), 胆固醇

(成都科龙化工公司)。

1.2 动物分组和给药 ApoE^{-/-}小鼠 12 只, 雄性, 8 周龄, 购自北京大学动物实验中心, 随机分为南蛇藤素干预组和溶剂 DMSO 对照组, 每组各 6 只。全部小鼠均给予高脂饲养 8 周, 在高脂饲养的后 4 周, 治疗组予南蛇藤素(以高浓度溶于 DMSO 中)2 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ip, 对照组给予相应剂量 DMSO, ip 处理 4 周。高脂饲料含有 0.21% 胆固醇和 21% 脂肪。

2 方法

2.1 实验动物分组标本取材、制备 乌拉坦麻醉处死小鼠后, 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 μ m 处, 行连续石蜡切片, 切片厚 4 μ m。

2.2 免疫组化染色 免疫组化用 SABC 法, 大鼠抗小鼠 CD40L 单克隆抗体 1:200 稀释、大鼠抗小鼠 CD68 单克隆抗体 1:200 稀释、兔抗小鼠平滑肌 α -actin 多克隆抗体 1:100 稀释, DAB 显色, 苏木素复染, 以磷酸盐缓冲液替代 I 抗作为阴性对照; 光镜下所见动脉粥样硬化内黄褐色颗粒为阳性着色, 细胞核被染成蓝色。取主动脉根部石蜡切片, 分别行 CD40L、CD68 和 α -actin 免疫组化染色, 每项 3 张切片。

2.3 图像的采集和分析^[5] 400 倍视野下, 以数码图像设备采集 CD40L 的免疫组化染色图片, 经 Image Pro Plus 6.0 软件图像分析系统进行累积吸光度值(A)测定, 同时测定动脉粥

[收稿日期] 2008-01-11 [修回日期] 2008-06-18

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30770851)

Δ 通讯作者 Tel: 023-68765167; E-mail: houyuanhu@hotmail.com

粥样硬化斑块面积,计算出平均吸光度(mean absorbance, MA), MA = 累积吸光度/斑块面积,从而对 CD40L 的表达进行半定量。

400 倍视野下,选取细胞分布均匀的动脉粥样硬化斑块,以数码图像设备采集 CD68 和 α -actin 免疫组化染色图片,蓝色的细胞核显示清楚且周围有棕褐色颗粒的为巨噬细胞或平滑肌阳性细胞,经图像分析系统测定巨噬细胞和平滑肌阳性细胞率,阳性率 = 阳性细胞的细胞核总数/动脉粥样硬化斑块内全部细胞核总数。

3 统计学处理

计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),统计分析采用 SPSS 13.0 软件进行组间独立样本 *t* 检验。

结 果

1 南蛇藤素对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块内 CD40L 表达的影响

南蛇藤素组动脉粥样硬化斑块内 CD40L 表达与对照

组相比有明显减少($P < 0.01$),其平均吸光度值分别为(0.0152 ± 0.0014)与(0.0250 ± 0.0070)。提示南蛇藤素可降低 ApoE^{-/-}小鼠主动脉壁 CD40L 的表达(图 1A1、A2)。

2 南蛇藤素对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞数量的影响

南蛇藤素组主动脉 AS 斑块内巨噬细胞阳性率较对照组明显减少($P < 0.01$),其平均阳性率为(36.5 ± 3.0)%与(62.5 ± 5.0)%。提示南蛇藤素治疗可降低 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞的聚积(图 1B1、B2)。

3 南蛇藤素对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块中平滑肌数量的影响

南蛇藤素组主动脉 AS 斑块内平滑肌阳性率较对照组无明显差异($P > 0.05$),其平均阳性率为(10.2 ± 1.5)%与(12.0 ± 1.9)%。提示南蛇藤素治疗对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块内平滑肌细胞增殖数量没有明显影响(图 1C1、C2)。

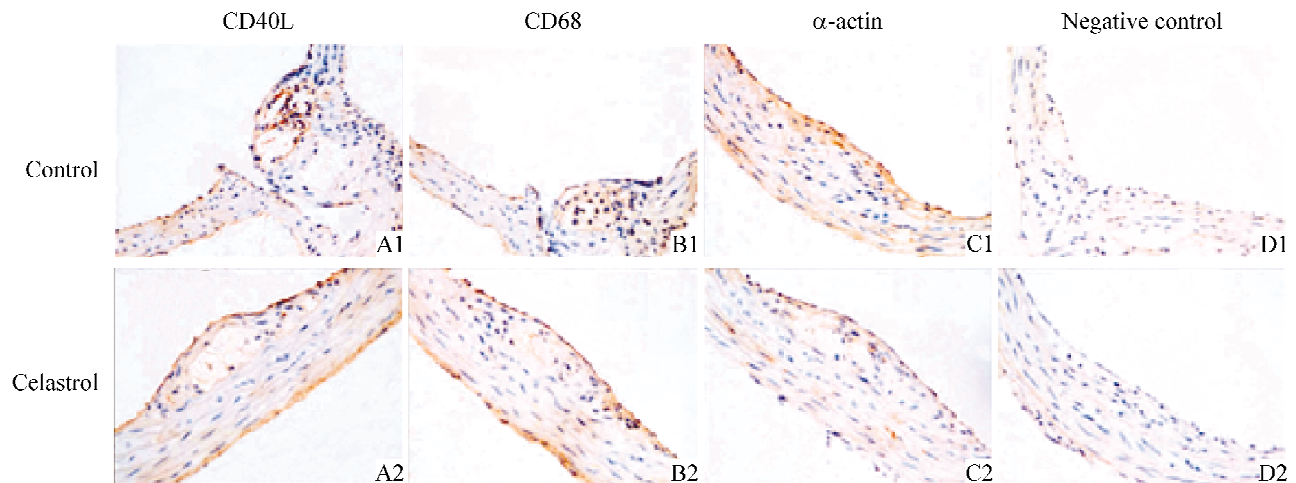


Fig 1 Immunohistochemical analysis of CD40L, CD68 and smooth muscle cell α -actin expression in the atherosclerotic plaques of ApoE gene knockout mice (original magnification, $\times 400$). CD40L and CD68 expression decreased in celastrol treatment group compared with DMSO control group (A1、A2、B1、B2). But smooth muscle cell α -actin expression was not significantly different in both groups.

图 1 两组 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块内 CD40L、CD68 和平滑肌细胞 α -actin 免疫组织化学染色

讨 论

白细胞分化抗原 40 (CD40) 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^[6]。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^[7]。CD40 与 CD40L 相互作用可促进细胞产生和表达大量的黏附分子 (E-selectin、VCAM-1 和 ICAM-1 等)、细胞因子 (IL-1、IL-6、IL-12、IFN- γ 和 TNF 等) 以及 MMPs 和 TF 等,并可促进血小板 P-Selectin 表达和提高白细胞氧化活性等^[8,9]。这些均可导致动脉粥样硬化斑块失稳定或破溃,最终引发血管内血栓。

有研究显示,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^[10]。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,与文献报道一致^[6]。且与 DMSO 组相比,南蛇藤素组 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块内 CD40L 的表达显著减少。因此南蛇藤素还可能通过抑制斑块内 CD40L 表达,抑制炎症反应及 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的发展。

巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块内的主要炎症细胞^[11]。有研究显示,在急性冠脉综合征患者的动脉粥样硬化斑块内,尤其在斑块的“肩部”,聚集着较多巨噬细胞和泡沫细胞,且巨噬细胞的数目与稳定性斑块相比有成倍的增加^[12]。巨噬细胞能产生自由基和许多降解组织的蛋白酶,如弹性蛋白酶和基质金属蛋白酶,可降解纤维帽中的胶原蛋白,从而导致斑块破裂和血栓形成^[13]。动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞

的数量与斑块破裂的危险性呈现正相关,巨噬细胞的聚集是不稳定性斑块的重要标志和干预靶标^[14]。

本实验也检测了斑块中 CD68 的表达以反映巨噬细胞的数量,结果显示,与 DMSO 组相比,南蛇藤素组动脉粥样硬化斑块内 CD68 的表达水平明显降低,提示南蛇藤素可减少巨噬细胞在斑块内的聚集。

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(VSMCs)的迁移和增殖也是影响动脉粥样硬化发展的重要因素之一。VSMCs 也可摄取脂质而演变为肌源性泡沫细胞。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^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块内 α -actin 的表达呈阳性,但南蛇藤素干预组与 DMSO 对照组相比无显著差异。说明南蛇藤素对动脉粥样硬化斑块内平滑肌细胞的数量没有显著影响。

因此,本实验结果表明,南蛇藤素可能通过减少 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块中 CD40L 的表达和巨噬细胞聚集,抑制 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块内炎症反应,从而发挥稳定动脉粥样硬化斑块的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 任宏生,朱兴雷,张兴华,等. 氯吡格雷对兔髂腹动脉球束损伤后新生内膜的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007,23(12):2479-2482.
- [2] Pinna GF, Fiorucci M, Reimund JM, et al. Celastrol inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in Crohn's disease biopsies[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(3):778-786.
- [3] Allison AC, Cacabelos R, Lombardi VR, et al. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2001, 25(5):1341-1357.
- [4] Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials [J]. Cell, 2007, 130(5):769-774.
- [5] 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.
- [6] Lutgens E, Lievens D, Beckers L, et al. CD40 and its ligand in atherosclerosis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(4):118-123.
- [7] Math F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications of CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(5):1931-1936.
- [8] Phipps RP, Koumas L, Leung E, et al. The CD40-CD40 ligand system: a potential therapeutic target in atherosclerosis [J]. Curr Opin Invest Drugs, 2001, 2(6):773-777.
- [9] Li GH, Sanders JM, Bevard MH, 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.
- [10] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling [J]. Nature, 1998, 394(6689):200-203.
- [11] Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(11):2255-2264.
- [12] Lutgens E, Suylen RJ, Faber BC, et al. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(12):2123-2130.
- [13] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2005, 3(1):63-68.
- [14] Broz P, Marsch S, Hunziker P, et al. Targeting of vulnerable plaque macrophages with polymer-based nanostructures [J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(6):190-196.