

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01065

颈动脉粥样硬化斑块 CD40、MMP9 的表达及意义

王静华¹, 丁素菊^{1*}, 邓本强¹, 吴涛¹, 陈欢², 张生生², 焦炳华²

1. 第二军医大学长海医院神经内科, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的: 观察 CD40 及基质金属蛋白酶-9(MMP9) 在人颈动脉粥样硬化斑块中的表达, 探讨 CD40 在斑块稳定性中的作用及可能机制。方法: 将因颈动脉粥样硬化狭窄(>70%) 行颈动脉内膜切除术的 28 例手术标本分为有临床卒中事件组($n=15$) 和无临床卒中事件组($n=13$), 另设尸检无动脉粥样硬化的正常颈动脉($n=8$) 作为对照组, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR) 检测各组斑块中 CD40 和 MMP9 mRNA 水平, Western 印迹检测各组 CD40 和 MMP9 蛋白表达水平, 并对 CD40 与 MMP9 基因的表达作相关性分析。结果: 无临床卒中事件组和有临床卒中事件组的 CD40、MMP9 基因的表达较正常对照组明显增高($P<0.01$), 有临床卒中事件组明显高于无临床卒中事件组($P<0.01$), CD40 与 MMP9 mRNA 表达有正的直线相关关系($r=0.964, P<0.01$)。正常颈动脉中 MMP9 和 CD40 蛋白基本不表达; 颈动脉粥样硬化斑块中 MMP9 和 CD40 蛋白表达较正常颈动脉明显增高; 有卒中事件组颈动脉斑块 MMP9 和 CD40 蛋白表达高于无卒中事件组。结论: 颈动脉粥样硬化斑块中 CD40、MMP9 表达增高, 可能与斑块的稳定性密切相关。

[关键词] CD40 抗原; 基质金属蛋白酶 9; 颈动脉疾病; 动脉硬化; 斑块稳定性

[中图分类号] R 543.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1065-04

Expression of CD40 and matrix metalloproteinase 9 in carotid atherosclerotic plaques and its significance

WANG Jing-hua¹, DING Su-ju^{1*}, DENG Ben-qiang¹, WU Tao¹, CHEN Huan², ZHANG Sheng-sheng², JIAO Bing-hua²

1. Department of Neurology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of CD40 and MMP9 in carotid atherosclerotic plaques, so as to assess the role of CD40 in the stability of the plaque and the possible mechanism. **Methods:** The expression of CD40 and MMP9 mRNA and protein in carotid atherosclerotic plaques obtained from carotid eversion endarterectomy (CEE) of 28 patients with high-grade stenosis (>70%) (stroke group, $n=15$; non-stroke group, $n=13$) and 8 normal postmortem arteries (control group) were detected by real-time quantification polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting. The correlation between expression of CD40 and MMP9 was analyzed. **Results:** The expression of CD40 mRNA and MMP9 mRNA in the non-stroke group and stroke group was significantly higher than that in control group ($P<0.01$); and that of the stroke group was significantly higher than that of the non-stroke group ($P<0.01$). There was a linear correlation between expression of CD40 and MMP9 mRNA ($r=0.964, P<0.01$). Extremely rare expression of CD40 and MMP9 protein was found in the normal carotid artery; the protein expression was evidently higher in the carotid artery atherosclerosis than in the normal carotid artery, and the expression in carotid artery atherosclerosis in the stroke group was higher than that in the non-stroke group. **Conclusion:** The increased expression of CD40 and MMP9 in the carotid atherosclerotic plaques may be closely related to the stability of plaques.

[KEY WORDS] CD40 antigen; matrix metalloproteinase-9; carotid artery diseases; atherosclerosis; plaque stability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1065-1068]

[收稿日期] 2008-02-26 **[接受日期]** 2008-05-30

[基金项目] 上海市科学技术发展基金(03DZ19708); 第二军医大学博士研究生创新性科学研究资助项目. Supported by Foundation for Science and Technology Development of Shanghai Municipal Government(03DZ19708) and Innovative Scientific Research Foundation for Doctorate Candidate of Second Military Medical University.

[作者简介] 王静华, 博士生. E-mail: bhfy@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070621, E-mail: dingsuju@hotmail.com

动脉粥样硬化(AS)是一种慢性炎症性疾病,其中免疫调节起着至关重要的作用^[1-2]。CD40-CD40L在抗原呈递和自身免疫性疾病中起重要作用,可能参与了动脉粥样硬化的发生和发展^[3],是目前心血管病相关研究的热点,但其在急性脑梗死中的作用研究尚少。本研究采用实时荧光定量PCR和免疫印迹法观察人颈动脉粥样硬化斑块中CD40及基质金属蛋白酶9(MMP9)的表达及二者的相关性,探讨其表达与临床缺血性脑卒中事件的关系,揭示CD40与斑块稳定性的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源及分组 2005年12月至2006年12月在本院血管外科因颈动脉粥样硬化狭窄(>70%)行颈动脉内膜切除术患者的颈动脉粥样硬化斑块标本,取一部分液氮保存,另一部分用4%多聚甲醛液固定12~24h,石蜡包埋。共收集标本28例,其中男16例,女12例,年龄49~73岁,平均(61.46±7.84)岁。根据患者有无发生急性缺血性脑卒中事

件分为有临床卒中事件组和无临床卒中事件组。其中有临床卒中事件组15例,男8例,女7例,年龄49~73岁,平均(61.33±8.76)岁;无临床卒中事件组13例,男8例,女5例,年龄51~71岁,平均(61.62±6.99)岁。另收集同期性别、年龄相匹配的尸检正常颈动脉8例作为对照组。各组性别、年龄、危险因素无统计学差异。

1.2 主要试剂及仪器 石蜡包埋标本核酸提取试剂盒购自Ambion公司;逆转录试剂盒为MBI Fermentas公司产品;Real-time PCR试剂盒为Toyobo公司产品;用Primer Express软件设计人β-actin、MMP9、CD40基因编码区(CDS)的real-time PCR引物各1对(表1),委托上海生工生物工程服务有限公司合成;核酸定量检测仪为Eppendorf公司产品;7300 Real-time PCR仪为ABI公司产品。鼠抗人CD40单克隆抗体购自Bender MedSystems公司;鼠抗人MMP9单克隆抗体购自Santa Cruz公司;Western印迹试剂盒购自Santa Cruz公司;蛋白电泳及转膜装置为Bio-Rad公司产品。

表1 Real-time PCR引物
Tab 1 Primers of real-time PCR

Gene name	Primer	Sequence	Length(bp)	GC(%)	Tm(°C)
β-actin	Forward	5'-CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-3'	108	54.55	73.18
	Reverse	5'-CGC AAC TAA GTC ATA GTC CGC C-3'			
MMP9	Forward	5'-CCC TGG AGA CCT GAG AAC CA-3'	80	60.00	61.90
	Reverse	5'-CCA CCC GAG TGT AAC CAT AGC-3'			
CD40	Forward	5'-TTC GCT TTC ACC GCA AGG A-3'	80	52.63	57.57
	Reverse	5'-TGT GCC AGC CAG GAC AGA A-3'			

1.3 Real-time PCR检测CD40、MMP9 mRNA的表达 用美国Ambion公司的RNA抽提试剂盒(cat#1975)进行RNA抽提。按照说明书操作步骤提取石蜡包埋标本的RNA。整个过程在无酶状态下进行,采用滤筒洗脱的方式提取RNA。采用紫外分光光度法测定RNA样品在波长260nm和280nm处的光密度(D)值,根据D₂₆₀/D₂₈₀比值判断RNA样品的纯度,选择D₂₆₀/D₂₈₀比值为1.8~2.0的RNA样品。用逆转录试剂盒在冰上进行操作:取1μg模板RNA,1.5μl随机引物,用ddH₂O补足体积至18μl,混匀;70℃水浴5min,混匀;加6μl的5×buffer,1.5μl Rnasin(RNA抑制剂),3μl dNTP,1.5μl RTase(逆转录酶),使总体积为30μl;25℃放置10min,之后42℃加热60min,最后72℃加热10min,冰上使其冷却;合成好的cDNA放-20℃或以下保存。扩增反应总体积为20μl,包括3μl模板,10μl SYBR,20mmol/L的上下游引物各

0.4μl,6.2μl ddH₂O;按照Real-time PCR仪机器说明书进行40个循环(95℃10s,60℃60s)。

1.4 免疫印迹法检测CD40、MMP9蛋白的表达 取对照组、无卒中事件组和卒中事件组的颈动脉标本,抽提总蛋白,用Bradford法进行蛋白定量,取50μg上样,于12%的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,用槽式转膜仪将蛋白转移到PVDF膜上,用5%BSA(TBST配制)在摆动平台中室温摇1h封闭。将膜放入可热封闭的塑料袋中,加入用TBST稀释的(1:1000)一抗鼠抗人CD40单抗或鼠抗人MMP9单抗或β-actin抗体,室温振荡1h后,置于4℃冰箱过夜。次日打开塑料袋,以TBST漂洗3次,同法加入兔抗鼠HRP标记的二抗,室温孵育1.5h后,用TBST洗膜3次,每次振摇10min。取Western印迹试剂盒中的A液与B液,按1:1的比例混匀后,滴于PVDF膜上,并将膜用透明塑料保鲜膜包裹,反应2min。暗室条件下曝光、显影、定影,用水冲洗

胶片。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用最小显著差法(LSD),判断变量之间关系,采用相关分析(Pearson)和回归分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CD40、MMP9 mRNA 的表达差异 对照组、无卒中事件组和有卒中事件组 CD40 mRNA 的相对表达量分别为: 0.30 ± 0.14 、 1.03 ± 0.38 和 2.43 ± 0.44 ;MMP9 mRNA 的相对表达量分别为: 0.38 ± 0.12 、 1.87 ± 0.38 和 7.08 ± 1.47 。如图 1 所示,无卒中事件组和有卒中事件组颈动脉 CD40、MMP9 mRNA 水平较正常对照组明显增高($P < 0.01$);而有卒中事件组高于无卒中事件组($P < 0.01$)。CD40 mRNA 与 MMP9 mRNA 表达之间有正的直线相关关系($r = 0.964$, $P < 0.01$),MMP9 与 CD40 mRNA 的线性回归关系具有显著统计学意义($F = 449.957$, $P < 0.01$,图 2)。

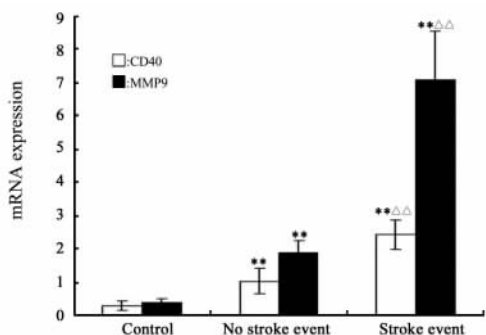


图 1 颈动脉斑块中 CD40 和 MMP9 mRNA 的表达
Fig 1 CD40 and MMP9 mRNA levels in carotid plaques
** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs non-stroke group

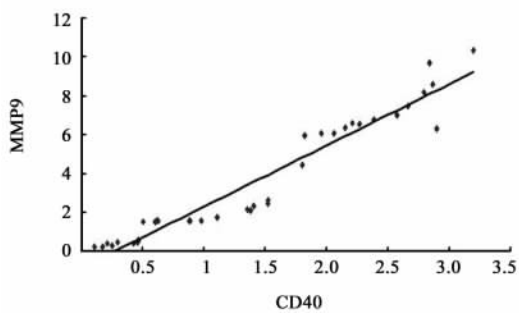


图 2 颈动脉斑块中 CD40 与 MMP9 mRNA 相关性
Fig 2 Correlation between CD40 mRNA and MMP9 mRNA in carotid plaque

2.2 各组 CD40、MMP9 蛋白表达的差异 正常颈动脉中 MMP9 和 CD40 基本不表达;颈动脉粥样硬化斑块中 MMP9 和 CD40 表达较正常颈动脉明显增高;有卒中事件组颈动脉斑块 MMP9 和 CD40 表达明显高于无卒中事件组(图 3)。

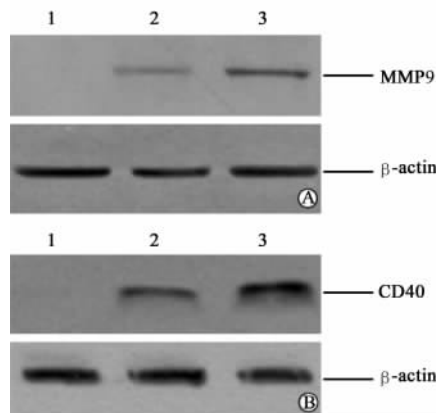


图 3 Western 印迹检验斑块中 CD40 和 MMP9 的表达
Fig 3 Western blotting analysis of MMP9 (A) and CD40 (B) expression
1:Control; 2:Non-stroke event; 3:Stroke event

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病^[1-2],CD40-CD40L 参与了其发生和发展^[3]。在动脉粥样硬化斑块中的上皮细胞、单核-巨噬细胞和平滑肌细胞上均有 CD40 和 CD40L 表达^[4],而在正常动脉组织中没有或低表达。CD40/CD40L 能诱导人类血管内皮细胞表达黏附分子,如 E-选择素、血管细胞黏附分子-1、细胞间黏附分子-1 等,并刺激释放趋化因子和细胞因子,如白介素-8、调节活化正常 T 细胞表达和分泌的趋化因子或巨噬细胞炎症蛋白 1α ,这些分子可能参与动脉粥样硬化斑块形成。应用特异性单克隆抗体阻断 CD40-CD40L 之间的相互作用可明显抑制动脉粥样斑块的形成^[5]。另外,CD40L 还可通过 CD40 激活斑块中巨噬细胞、内皮细胞及平滑肌细胞,分泌产生在 AS 及斑块稳定中起关键作用的成分,如趋化因子、黏附分子、细胞因子(IL-6、TNF- α 、INF- γ)、MMP 和组织因子等^[6]。本研究显示在颈动脉粥样硬化斑块中 CD40 的转录和表达水平均明显增高,并且在有临床卒中事件的不稳定斑块中增高更加显著,提示 CD40 参与了颈动脉粥样硬化斑块的形成,并且与斑块不稳定相关。因此,可以认为,CD40-CD40L 不但参与动脉粥样硬化斑块的形成,更重要的是其可能参与使斑块不稳定、破裂,导致血栓形成^[7-8]。

细胞外基质降解是斑块不稳定的主要原因。MMP 是一类蛋白酶家族,主要由成纤维细胞、心肌细胞及斑块中巨噬细胞、血管平滑肌细胞合成与分泌。MMP 能特异性降解细胞外基质和斑块纤维帽,其表达增加、活性增强可使斑块稳定性降低,导致斑块破裂^[9]。与 AS 关系密切的是 MMP1、MMP2 和 MMP9,MMP1 特异性降解 I、II 和 III 型胶原,MMP2 和 MMP9 降解变性的胶原(明胶)和弹性蛋白。本研究显示有临床急性缺血性脑卒中组患者颈动脉粥样斑块中的 MMP9 逆转录水平和蛋白表达水平明显高于无临床卒中事件组和正常颈动脉组,与 Alvarez 等^[10]研究结果类似。结果提示 MMP 可能是导致动脉粥样硬化斑块不稳定的主要因素。MMP 受炎症因子(TNF- α 、表皮生长因子、血小板衍生因子等)的激活^[11]。体外及动物实验研究^[12]结果显示,CD40-CD40L 也能激活 MMP,阻断 CD40-CD40L 能抑制 MMP 的表达。本研究结果显示人颈动脉粥样硬化斑块中 CD40 与 MMP9 表达有紧密相关性,随着 CD40 增高,MMP9 也增高,且有卒中事件组的表达高于无卒中事件组,提示二者表达升高与斑块不稳定有关。

本组研究结果表明 CD40-CD40L 系统可能参与了颈动脉粥样硬化形成和斑块不稳定,进一步深入研究 CD40-CD40L 系统在动脉粥样硬化斑块稳定性中的作用及相关机制,有望为治疗和预防动脉粥样硬化和卒中中找到干预的新靶点。

[参考文献]

[1] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*,1999,340:115-126.
 [2] Hansson G K,Robertson A K,Söderberg-Nauclér C. Inflammation

and atherosclerosis[J]. *Annu Rev Pathol*,2006,1:297-329.
 [3] Lutgens E, Daemen M J. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*,2002,12:27-32.
 [4] Mach F, Schönbeck U, Sukhova G K, Bourcier T, Bonnefoy J Y, Pober J S, 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.
 [5] Schönbeck U, Sukhova G K, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97:7458-7463.
 [6] Danese S, Fiocchi C. Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease[J]. *Crit Rev Immunol*,2005,25:103-121.
 [7] Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability[J]. *Circ Res*,2001,89:1092-1103.
 [8] Tedgui A. The role of inflammation in atherothrombosis: implications for clinical practice[J]. *Vasc Med*,2005,10:45-53.
 [9] Johnson J L. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*,2007,5:265-282.
 [10] Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis[J]. *J Vasc Surg*,2004,40:469-475.
 [11] Peterson J T, Li H, Dillon L, Bryant J W. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat[J]. *Cardiovasc Res*,2000,46:307-315.
 [12] Nagashima H, Aoka Y, Sakomura Y, Uto K, Sakuta A, Aomi S, et al. Matrix metalloproteinase 2 is suppressed by trapidil, a CD40-CD40 ligand pathway inhibitor, in human abdominal aortic aneurysm wall[J]. *J Vasc Surg*,2004,39:447-453.

[本文编辑] 贾泽军

欢迎订阅

《第二军医大学学报》 ISSN 0258-879X
 CN 31-1001/R
 上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948
 CN 31-1002/R
 上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725