

[文章编号] 1007-3949(2001)-05-0409-04

•临床研究•

## CD40 配体高表达与不稳定型心绞痛之间的关系

严金川, 吴宗贵, 张玲珍, 李莉, 仲人前, 孔宪涛

(第二军医大学附属长征医院心内科, 上海市 200003)

[主题词] 抗原, CD40; 配体; 冠状动脉综合征, 急性; 动脉粥样硬化; 心绞痛, 不稳定型; 患者

[摘要] 为了探讨不稳定型心绞痛患者外周血单核细胞表达 CD40 配体及血清可溶性 CD40 配体变化的临床意义。应用间接免疫荧光流式细胞术和双抗夹心酶联免疫测定法分别对正常对照组 16 例、稳定型心绞痛 20 例、不稳定型心绞痛 20 例患者血单核细胞表达 CD40 配体及血清可溶性 CD40 配体水平进行检测。并观察血清可溶性 CD40 配体与冠状动脉病变程度的关系。结果发现, (1) 不稳定型心绞痛组血单核细胞表达 CD40 配体明显较稳定型心绞痛组和对照组高 ( $P < 0.01$ ), 稳定型心绞痛组与对照组相比无差异 ( $P > 0.05$ )。 (2) 不稳定型心绞痛组血清可溶性 CD40 配体水平明显较稳定型心绞痛组和对照组高 ( $P < 0.01$ ), 而稳定型心绞痛组与对照组相比亦有明显差异 ( $P < 0.05$ )。 (3) 经皮冠状动脉腔内成形术后血清可溶性 CD40 配体明显高于术前 ( $P < 0.01$ ), 但血单核细胞表达 CD40 配体无差异 ( $P > 0.05$ )。 (4) 血清可溶性 CD40 配体水平与冠状动脉病变的复杂狭窄数相关 ( $r = 0.54, P < 0.01$ ), 而与狭窄的程度和范围无关。此结果提示, 血清可溶性 CD40 配体升高对冠状动脉斑块的不稳定或破裂起重要作用, 且可能是冠状动脉病变的活动性标志物。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

### The Relation of High Expression of CD40 Ligand with Unstable Angina

YAN Jin-Chuan, WU Zhong-Gui, ZHANG Ling-Zhen, LI Li, ZHONG Ren-Qian, and KONG Xian-Tao

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**MeSH** Antigen, CD40; Ligands; Coronary Syndromes, Acute; Atherosclerosis; Angina, Unstable; Patients

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the clinical implications of the expression of CD40 ligand (CD40L) on peripheral blood monocytes and sera soluble CD40L (sCD40L) changes in patients with unstable angina. **Methods** 16 normal controls and 40 patients including 20 with SA (8 patients by PTCA), 20 with UA entered in this study. The expression of CD40L on monocytes was analyzed by indirect immunofluorescence flow cytometry and sera sCD40L levels were measured by ELISA. **Results** (1) The expression of CD40L on monocytes in UA were higher compared with SA and controls ( $P < 0.01$ ), while no significant difference was found between SA and controls ( $P > 0.05$ ). (2) Patients with UA had significantly raised sCD40L sera levels when compared with patients with SA and controls ( $P < 0.01$ ). Values also differed significantly between patients with SA and controls. (3) PTCA induced a marked rise in sCD40L levels in all patients, while the expression of CD40L on monocytes showed no significant difference between patients with PTCA before and after. (4) A significant correlation was observed between sCD40L sera concentrations and the number of complex lesions ( $r = 0.54, P < 0.01$ ). sCD40L, however, was not significantly associated with disease extent and range. **Conclusions** The enhanced level of serum soluble CD40L may play an important role in coronary plaque instability and disruption, and may represent a marker of coronary disease activity.

CD40 受体与 CD40 配体 (CD40 ligand, CD40L) 是一对互补跨膜糖蛋白, 分别属于肿瘤坏死因子受

[基金项目] 上海市医学科技发展基金重大课题项目 (20001ZD002)

[作者简介] 严金川, 男, 汉族, 江苏镇江人, 1965 年 10 月出生, 博士; 主治医师, 主要从事急性冠状动脉综合征发病机制研究。现在东南大学附属中大医院心内科工作。邮编: 210009, 电话: 025-3247258。吴宗贵, 男, 汉族, 江西人, 1953 年 2 月出生; 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 心内科主任, 主要从事急性冠状动脉综合征临床研究。E-mail: zhonggui@public4.sta.net.cn。李莉, 女, 上海人, 1962 年 9 月出生, 副教授, 从事流式细胞技术。

体和超家族成员, 在体液免疫和细胞免疫中是一条重要的细胞信号转导途径。近年来研究发现, 这一对受体-配体参与了动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生和发展<sup>[1]</sup>。CD40L 可激活 As 斑块中细胞分泌产生在 As 及其斑块稳定中起关键作用的成分, 如粘附分子、细胞因子、基质金属蛋白酶、组织因子等<sup>[2,3]</sup>。因此, CD40-CD40L 在 As 的致病机制中可能是始动因素。本文对稳定型心绞痛 (stable angina, SA)、不稳定型心绞痛 (unstable angina, UA) 和正常对照组分别检测血中单核细胞表达 CD40L 及血清可

溶性 CD40L (soluble CD40L, sCD40L) 水平变化。并观察 sCD40L 与冠状动脉病变程度之间的关系, 以期揭示 CD40L 在 UA 发病中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

冠心病患者 40 例, 入选参照 1989 年 Braunwald 诊断标准。UA、SA 最终均经冠状动脉造影证实, 其中 SA (8 例行经皮冠状动脉腔内成形术) 和 UA 各 20 例 (6 例 SA 患者演变为 UA 再次住院)。对照组 16 例, 来自健康人群自愿者。冠状动脉造影采用 Sullivan 评分法。对直径减少 > 30% 的冠状动脉进行评估, 将其分为复杂狭窄和光滑狭窄, 复杂狭窄特征为形态不规则、边缘断裂、溃疡或血栓形成。无上述表现者为光滑狭窄。所有受试者近期均无感染疾病和肿瘤, 各组临床资料详见表 1。

### 1.2 标本采集及处理

对照组一次性抽取全血 2 mL, 冠心病患者在胸痛发生后 6 h 内抽取全血 12 mL, 其中 2 mL 在 4℃ 1500×g 离心 5 min, 血清-70℃保存。10 mL 全血肝素抗凝, 30 min 内采用密度梯度法分离单个核细胞, 附壁分离收集单核细胞, PTCA 患者分别于 PTCA 前和 PTCA 后 6 h 采血一次各 12 mL, 其中 2 mL 分离血清, 10 mL 分离单核细胞。

### 1.3 检测方法

1.3.1 单核细胞表达 CD40L 的检测 采用我院流式细胞室建立的间接免疫荧光法。将细胞悬于 PBS 中, 4℃ 600×g 离心 3 min, 去上清, 加 50 μL 第一抗体于样品管中, 对照组加 50 μL PBS, 4℃下孵育 30 min, PBS 洗二次后, 加入 50 μL PE 标记的二抗, 4℃孵育 30 min, PBS 洗二次, PBS 重悬细胞, 立即上流式细胞仪检测。用平均荧光强度 (MFI) 代表细胞表达 CD 水平。上述抗体均购自美国 Pharmingen 公司。

1.3.2 血清 sCD40L 检测 血样本-70℃冻存, 采用 sCD40L 试剂盒 (Bender Medsystems), 按照试剂盒说明严格操作, 511 型酶标分析仪测定。

### 1.4 统计学处理

数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间计量资料采用方差分析, 组间两两比较采用 Newman-Keuls 检验。并行相关分析。

## 2 结果

### 2.1 各组临床资料比较

各组临床资料比较见表 1 (Table 1)。可见各组患者在性别、年龄、血脂及临床用药情况中均无显著差异, 吸烟因素在 UA 患者与 SA 和对照组有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

表 1. 各组临床资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Characteristic of the study groups

Index	Control group	SA group	UA group
n	16	20	20
Age (years)	51.0 ± 10.4	62.4 ± 8.4	59.7 ± 11.3
Sex (men/women)	12/4	18/6	13/7
Smoking (%)	21	23	47.1 <sup>b</sup>
TC (mmol/L)	4.9 ± 0.8	5.0 ± 1.0	5.1 ± 0.9
HDL (mmol/L)	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.7
TG (mmol/L)	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.9
Drugs (%)			
Calcium antagonist	0	19	26
Nitroglycerin	0	13	21
ACEI	0	9	8
β-blockers	0	82	78
HMG-COARI	0	61	64
Asprin	0	90	93

b,  $P < 0.01$  compared with control and SA group.

### 2.2 心绞痛患者血单核细胞表达 CD40 配体及血清可溶性 CD40 配体水平

各组血单核细胞表达 CD40L 及血清 sCD40L 水平见表 2 (Table 2)。可见 UA 组血清 sCD40L 水平明显高于 SA 组和对照组 ( $P < 0.001$ ), SA 组也较对照组高 ( $P < 0.01$ )。UA 组血单核细胞表达 CD40L 明显较 SA 和对照组高 ( $P < 0.001$ ), SA 与对照组相比无差异。表 3 (Table 3) 为 6 例 SA 患者演变为 UA 后, 血清 sCD40L 水平的变化。

表 2. 对照组和心绞痛患者血单核细胞表达 CD40 配体和血清可溶性 CD40 配体水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. The monocytes expression CD40L and sera sCD40L levels among control and patients with angina

Groups	sCD40L (μg/L)	CD40L (MFI)
Control	3.87 ± 0.13	12.8 ± 3.6
SA	5.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	14.0 ± 4.2 <sup>a</sup>
UA	13.6 ± 3.2 <sup>cd</sup>	27.4 ± 5.8 <sup>cd</sup>

a,  $P > 0.05$ ; b,  $P < 0.01$ ; c,  $P < 0.001$ ; compared with control group.  
d,  $P < 0.001$  compared with SA group

表 3. 稳定型心绞痛患者发展为不稳定型心绞痛后血清可溶性 CD40 配体水平变化 ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. The changes of sCD40L levels in patients with SA developing to UA

Groups	sCD40L ( $\mu\text{g/L}$ )
Patients with SA	$5.12 \pm 1.33$
SA developing to UA	$9.72 \pm 4.17^a$

a:  $P < 0.01$  compared with SA

表 4. 稳定型心绞痛患者经皮冠状动脉腔内成形术前后血清可溶性 CD40 配体及血单核细胞表达 CD40 配体的变化

Table 4. Sera sCD40L levels and CD40L expression in monocytes before and after PTCA ( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Parameter	Before PTCA	After PTCA
sCD40L ( $\mu\text{g/L}$ )	$4.27 \pm 0.14$	$8.06 \pm 1.51^b$
CD40L (MFI)	$13.5 \pm 3.6$	$12.7 \pm 3.9^a$

a:  $P > 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ , compared with before PTCA.

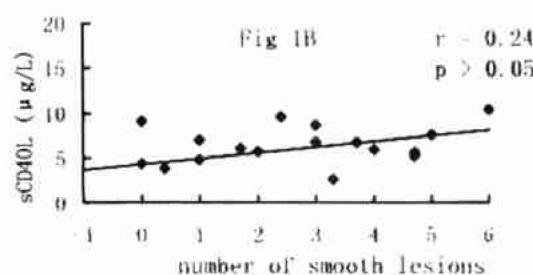
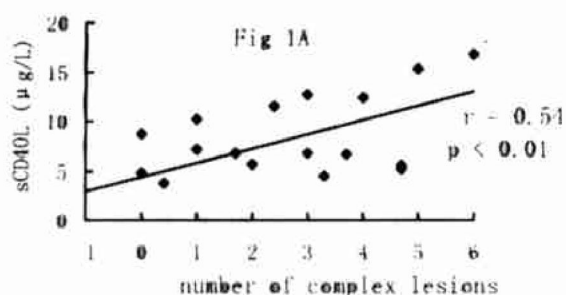


图 1. 血清可溶性 CD40 配体水平与冠状动脉病变的关系

Figure 1. The correlation between number of complex lesions and sCD40L

### 2.3 稳定型心绞痛患者经皮冠状动脉腔内成形术前后血清可溶性 CD40 配体及血单核细胞表达 CD40 配体的变化

8 例稳定型心绞痛患者经皮冠状动脉腔内成形术后血清 sCD40L 水平明显升高, 而血单核细胞表达 CD40L 无改变(表 4, Table 4)。

### 2.4 血清可溶性 CD40 配体水平与冠状动脉病变复杂数的关系

血清可溶性 CD40 配体水平与冠状动脉病变的关系见图 1 (Figure 1)。可见平均血清 sCD40L 水平与复杂狭窄数显著相关(图 1A, Figure 1A;  $r = 0.54$ ,  $P < 0.01$ ), 而与狭窄的程度和范围无关(图 1B, Figure 1B)。

## 3 讨论

冠状动脉粥样硬化是缺血性心脏病的常见原因, 而粥样斑块破裂及伴随附壁血栓则是急性冠状动脉综合症的主要发病机制<sup>[4]</sup>。斑块破裂是多种因素决定的, 包括斑块内部和外部因素, 寻找能反应不稳定斑块特点的敏感特异性标志, 达到早期预测急性冠状动脉综合症已成为当今的研究热点, 尤其是血清学指标。

众多研究发现, CD40-CD40L 在人的内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞表面均存在, 特别在 As 斑块中 CD40 及 CD40L 表达明显增加<sup>[5]</sup>。最近我们证实, CD40 和 CD40L 在人的主动脉 As 斑块中表达明显增加, 而动脉壁的其它部分不表达。存在 As 斑块的细胞还可通过 CD40-CD40L 这一对配体与受体的相互作用, 导致自身活化, 表达和分泌一些有利于免疫应答发生、炎症反应、血凝和血栓形成的蛋白质、细胞因子及酶类<sup>[6]</sup>。从而进一步促发斑块破裂, 引起 ACS 的发生。本研究中我们对不稳定型心绞痛患者血单核细胞表达 CD40L 及血清 sCD40L 检测发现: 不稳定型心绞痛组血单核细胞表达 CD40L 及血清 sCD40L 水平均明显高于对照组和稳定型心绞痛组, 稳定型心绞痛组患者 sCD40L 高于对照组, 而稳定型心绞痛血单核细胞表达 CD40L 与对照组无差异。PTCA 患者前后 sCD40L 有明显差异, 而单核细胞表达 CD40L 无差异。这说明不稳定型心绞痛患者血清 sCD40L 升高不是单核细胞表达升高分泌入血所致, 可能是斑块中释放的。体外实验我们已证实细胞因子 IL-1、INF- $\gamma$  和 TNF 均能明显刺激人的内皮细胞和单核细胞表达 CD40L<sup>[7]</sup>。因此, 不稳定型心绞痛患者血单核细胞 CD40L 表达升高可能是由于患者血中存在刺激单核细胞高表达 CD40L 的成

分,如细胞因子、炎症因子等。详细机制有待进一步深入研究。

本研究中还发现稳定型心绞痛演变为不稳定型心绞痛后患者血清 sCD40L 随之升高。血清 sCD40L 水平与冠状动脉病变的复杂狭窄(冠状动脉复杂狭窄特征为:形态不规则、边缘断裂、溃疡或血栓形成)数量成正相关,而与狭窄的程度和范围无关。因此,我们推测:正常人血清中 sCD40L 存在一个基础水平量,稳定型心绞痛患者斑块能不断释放一定量的 sCD40L,而不稳定型心绞痛患者由于斑块的不稳定,其 sCD40L 释放明显增加,经皮冠状动脉腔内成形术后,由于对斑块人为的挤压、撕裂,导致斑块不稳定, sCD40L 释放增加。这一推论尚需进一步证实, Aukrust 等<sup>[8]</sup>和 Lee 等<sup>[9]</sup>也发现不稳定型心绞痛患者血中 sCD40L 水平明显升高,而且,患者循环血中血小板表达 CD40L 增加,这与我们的结果有部分相似。

CD40-CD40L 在细胞免疫和体液免疫中是一条重要的细胞信号转导途径,多种细胞因子可以促进人内皮细胞、单核细胞表达 CD40、CD40L。而易损斑块中存在活化的 T 淋巴细胞,后者产生细胞因子 (INF- $\gamma$  和 TNF 等),激活巨噬细胞、内皮细胞和平滑肌细胞高表达 CD40L。动物模型中亦证实应用特异性抗体阻断 CD40-CD40L 的反应,可明显减轻粥样斑块形成<sup>[10]</sup>。因此,血清 sCD40L 水平可能是冠状动脉病变活动性标志物,有望成为预测 ACS 及斑块稳定与否的敏感血清学指标,本研究中由于病例数较少,存在一定的缺陷,研究工作有待进一步深入。

#### 参考文献

- [1] Laman JD, Desmet BJGL, Schoneveld A, et al. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis [J]. *Immunol Today*, 1997, **18**: 272-277
- [2] Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes [J]. *Circ Res*, 1997, **81**: 448-454
- [3] Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40 [J]. *Circulation*, 1997, **96**: 396-399
- [4] Shah PK, Forrester JS. Pathophysiology of acute coronary syndromes [J]. *Am J Cardiol*, 1991, **68** (Suppl C): 6-23
- [5] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implication for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 1931-1936
- [6] Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: A key role in atherosclerosis [J]? *Atherosclerosis*, 1998, **137** (Suppl): S89-S95
- [7] 严金川, 吴宗贵, 陈金明, 等. 细胞因子对人单核细胞表达 CD40 和 CD40L 的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2001, **22** (2): 127-129
- [8] Aukrust P, Muller F, Ueland Thor BS, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 614-620
- [9] Lee Y, Halee W, Cholle S, et al. CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome [J]. *Cardiology*, 1999, **92**: 11-16
- [10] Mach F, Schonbeck U, Galina KS, et al. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling [J]. *Nature*, 1998, **394** (9): 200-203

(此文 2001-02-10 收到, 2001-09-24 修回)

(此文编辑 胡必利)