

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0533-04

·实验研究·

西立伐他汀对 THP-1 细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 表达的影响

李江¹, 赵水平, 彭道泉, 李全忠, 聂赛

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 药理学; 西立伐他汀的药理作用; 逆转录-聚合酶链反应; CD40; 基质金属蛋白酶 9; THP-1 细胞株; 动脉粥样硬化

[摘要] 通过观察他汀类药物对单核细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 的表达是否存在抑制作用, 初步探讨他汀类药物可能的非调脂的抗动脉粥样硬化机制。将培养的 THP-1 细胞中加入不同浓度的西立伐他汀, 运用 RT-PCR 法检测 CD40 及基质金属蛋白酶 9 mRNA, 酶联免疫吸附测定法测定培养基的基质金属蛋白酶 9 的浓度。结果发现, 西立伐他汀抑制 THP-1 细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 mRNA 的表达, 并呈浓度依赖性。西立伐他汀在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时, CD40 及基质金属蛋白酶 9 的表达无明显降低, 但在 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, CD40 mRNA 的表达下调 55%、89%, 基质金属蛋白酶 9 mRNA 的表达亦明显下降(0.453 \pm 0.13 比 0.073 \pm 0.01 和 0.009 \pm 0.001)。培养基的基质金属蛋白酶 9 浓度在西立伐他汀 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时分别从 0.469 \pm 0.06 降低至 0.243 \pm 0.04 和 0.039 \pm 0.01 ($P < 0.05$)。结果提示, 西立伐他汀能抑制 THP-1 细胞 CD40 表达以及基质金属蛋白酶的表达和分泌, 提示他汀类药物可减轻动脉粥样斑块炎症, 防止斑块破裂, 从而减少急性冠状动脉事件的发生。

[中图分类号] R96

[文件标识码] A

Effect of Cerivastatin on Expression of CD40 and Matrix Metalloproteinase-9 in THP-1 Cells

LI Jiang, ZHAO Shu-Ping, PENG Dao-Quan, LI Quan-Zhong, and NIE Sai

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Cerivastatin; CD40; Matrix Metalloproteinase 9; RT-PCR; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of cerivastatin on expression of matrix metalloproteinase (MMP-9) and CD40 in THP-1 cells. **Methods** THP-1 cells were incubated with increasing concentration of cerivastatin. MMP-9 and CD40 mRNA were detected by RT-PCR, MMP-9 concentration in media were assayed by ELISA. **Results** Cerivastatin inhibited the expression of CD40 and MMP-9 concentration dependently. At 0.01 $\mu\text{mol/L}$, the mRNA levels of CD40 and MMP-9 were not significantly decreased. But expression of CD40 and MMP-9 mRNA were significant down regulated at 1 to 10 $\mu\text{mol/L}$; Level of MMP-9 concentration in media decreased from 0.469 \pm 0.06 to 0.243 \pm 0.04 and 0.039 \pm 0.01 respectively at 1 or 10 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). **Conclusions** Cerivastatin inhibited the expression of CD40 and MMP-9 in THP-1 cells, decrease the MMP-9 concentration in media, it suggest that HMG-CoA reductase inhibitors may suppress inflammatory signaling and plaque disruption which responsible for clinical acute coronary syndrome.

研究提示, 炎症与免疫在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS) 的发生发展中起重要作用^[1], CD40-CD40 配体(CD40 ligand, CD40L) 通路在 AS 的炎症免疫调节中的作用已日益明确^[2], 它几乎贯穿 AS 发生发展乃至斑块破裂的全过程, 粥样斑块内单核-巨噬细胞、T 淋巴细胞等炎性细胞均可表达 CD40 和 CD40L^[3], CD40-CD40L 的相互作用可产生一系列的免疫炎性反应, 包括促进粘附分子、细胞因子如基质

金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP) 等物质的产生, 从而促进 AS 的慢性炎症过程。近年来, 应用他汀类药物的大规模临床试验均已证实可减少冠心病临床事件及心血管病死亡率, 且所获得的益处与降胆固醇不成比例, 提示这可能与改善内皮功能、稳定斑块等调脂外作用有关^[4]。本研究旨在体外观察他汀类药物对单核细胞 CD40、MMP-9 的表达是否存在抑制作用, 进一步探讨他汀类药物的非调脂性抗 AS 作用的机制。

[收稿日期] 2003-01-17

[修回日期] 2003-06-27

[作者简介] 李江, 男, 1971 年出生, 湖南省永州市人, 内科学博士, 主治医师, E-mail 为 lijiaang@chinalipid.com, 联系电话 13975128898。赵水平, 男, 1954 年出生, 教授, 博士研究生导师, 心内科主任。彭道泉, 男, 1964 年出生, 副教授。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及干预试验

人单核细胞系 THP-1 由南华大学医学院病理生理教研室赠予。THP-1 细胞株用 RPMI 1640 培养液培养,其中含 10% 的小牛血清,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。2~3 天换液一次,待细胞生长汇合成片后接种至 25 cm 培养瓶,并加入干扰素 γ (1.0×10^5 U/L) 于 37 °C 孵育 12 h,去除贴壁的细胞,调节细胞密度 2×10^9 /L 用于实验。实验共分五组每组 4 份标本,分别加入不同浓度(终末分别为 0、0.01、0.1、1、10 μ mol/L)的西立伐他汀(纯品由拜耳制药有限公司赠予),并加入无血清培养基,37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h 后收集细胞。

1.2 逆转录-聚合酶链反应

1.2.1 总 RNA 提取 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿(Gibco 公司)一步抽提法。

1.2.2 逆转录合成 cDNA 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L、10 \times 逆转录缓冲液 2 μ L、10 mmol/L dNTP 2 μ L、RNAsin 0.5 μ L、AMV 0.6 μ L、oligo(dT) 15 Primer 1 μ L,补去离子水至 20 μ L,42 °C 孵育 1 h,95 °C 5 min 灭活 AMV,终止反应。

1.2.3 聚合酶链反应扩增 反应总体系为 10 μ L,cDNA 2 μ L、Taq 酶(5 MU/L) 0.2 μ L、10 \times 缓冲液 1 μ L、dNTP 0.25 μ L、Mg²⁺ (Promega 公司) 0.8 μ L、上下游引物各 0.5 μ L,补去离子水至 10 μ L 体积。内对照 GAPDH 和 CD40 引物同体系的反应参数为预变性 95 °C 180 s、94 °C 60 s、60 °C 30 s、72 °C 55 s、30 个循环。内对照 β -actin 和 MMP-9 引物 PCR 的同体系的反应参数为预变性 95 °C 180 s、94 °C 50 s、56 °C 60 s、72 °C 60 s、30 个循环。CD40^[ACCESSION: XM_057372] 引物正义: 5'-TGCCAGCCAGGACAGAACT-3' (177-196); 反义: 5'-GGGACCACAGACAACATCAG-3' (602-621),PCR 扩增片段为 420 bp。MMP-9^[ACCESSION: NM_004994] 引物正义: 5'-CCCGACCAAGGATACAG-3' (1183-1200); 下游引物为: 5'-GGCTTCTCTCGGTACTG -3' (2015-2032),PCR 扩增片段为 849 bp。引物均由上海生工公司合成。选 GAPDH 和 β -actin 为半定量内对照,扩增片段分别为 306 bp、542 bp。PCR 产物点样于 1.5% 琼脂糖凝胶上,EB 染色,应用 Gel Doc 2000(Bio Rad 公司)扫描分析仪,将电泳结果胶进行光密度扫描,并计算曲线中各峰下面积及其与内对照的比值 rCD40 或 rMMP-9 (rCD40 = CD40 的峰下面积/GAPDH 的峰下面积; rMMP-9 = MMP-9 的峰下面积/ β -actin 的峰下面积),将表达量化。

1.3 上清液基质金属蛋白酶 9 的测定

采用夹心酶联免疫吸附测定法(enzyme linked-immunosorbent assay, ELISA),试剂盒(human MMP-9

kit, Quantikine) 为美国 R&D System 公司提供,MMP-9 的浓度单位为 μ g/L,灵敏度小于 0.156 μ g/L,批内和批间测定的变异系数分别为 1.0% 和 6.9%。本试剂盒中 MMP-9 抗体与 MMP-1、MMP-2 和 MMP-3 无交叉反应。

1.4 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用小样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为统计学显著性差异。

2 结果

2.1 西立伐他汀对 THP-1 细胞 CD40 mRNA 表达的影响

当西立伐他汀浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10 μ mol/L 时,THP-1 细胞 CD40 mRNA 的表达见图 1 (Figure 1),相对半定量值(CD40 峰下面积/GAPDH 的峰下面积)见表 1 (Table 1)。与对照组相比,当西立伐他汀浓度分别为 1 和 10 μ mol/L 时,THP-1 细胞 CD40 mRNA 的表达量分别降低了 55% 和 89% ($P < 0.05$)。

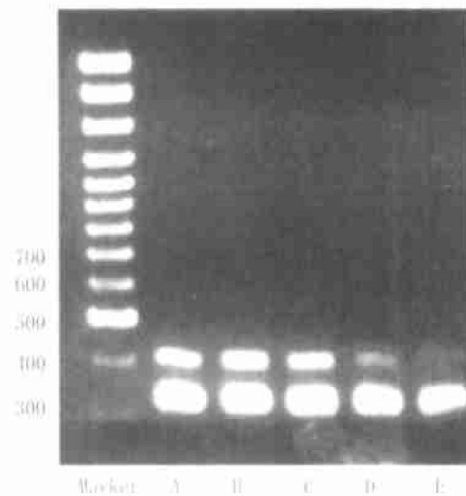


图 1. THP-1 细胞 CD40 表达的逆转录-聚合酶链反应电泳图 Marker: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; CD40 扩增产物为 420 bp; GAPDH 扩增产物(内对照)为 306 bp。A 为对照;B、C、D、E 分别为西立伐他汀 0.01、0.1、1、10 μ mol/L。

Figure 1. RT-PCR analysis for CD40 expression in THP-1 cells

2.2 西立伐他汀对 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的影响

当西立伐他汀浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10 μ mol/L 时,THP-1 细胞 MMP-9 mRNA 的表达见图 2 (Figure 2),相对半定量值见表 2 (Table 2)。与对照组相比,当西立伐他汀浓度分别为 0.1、1 和 10 μ mol/L

L 时, THP-1 细胞 MMP-9 mRNA 的表达量分别降低了 59.6%、83.9% 和 98.0% ($P < 0.05 \sim P < 0.001$)。

表 1. 不同浓度西立伐他汀对 THP-1 细胞 CD40 的 mRNA 水平的作用

Table 1. The Effect of different concentration of cerivastatin on expression of CD40 mRNA in THP-1 cells

| 西立伐他汀浓度($\mu\text{mol/L}$) | CD40 mRNA 表达 (半定量值) |
|------------------------------|-------------------------------|
| 对照 | 0.333 \pm 0.11 |
| 0.01 | 0.321 \pm 0.12 |
| 0.1 | 0.243 \pm 0.09 ^a |
| 1 | 0.148 \pm 0.05 ^a |
| 10 | 0.036 \pm 0.01 ^a |

a: $P < 0.05$, 与对照组比较

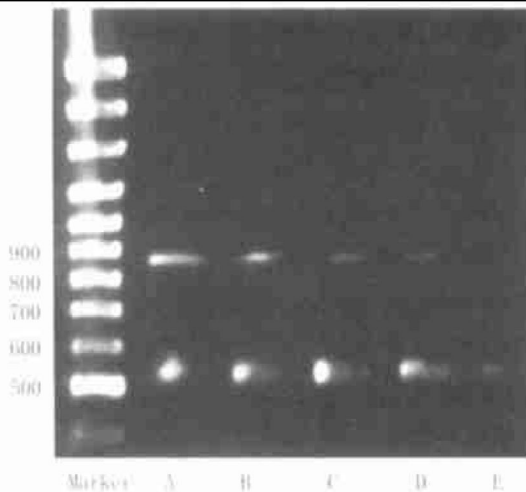


图 2. 基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的逆转录-聚合酶链反应电泳图 Marker: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; CD40 扩增产物为 849 bp; β -actin 扩增产物(内对照)为 542 bp。A 为对照; B、C、D、E 分别为西立伐他汀浓度 0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 。

Figure 2. RT-PCR analysis for MMP-9 expression in THP-1 cells

表 2. 不同浓度西立伐他汀对 THP-1 细胞 MMP-9 的 mRNA 水平的作用

Table 2. The Effect of different concentration of cerivastatin on expression of MMP-9 mRNA in THP-1 cells

| 西立伐他汀浓度($\mu\text{mol/L}$) | MMP-9 mRNA 表达 (半定量值) |
|------------------------------|--------------------------------|
| 对照 | 0.453 \pm 0.13 |
| 0.01 | 0.444 \pm 0.11 |
| 0.1 | 0.183 \pm 0.03 ^a |
| 1 | 0.073 \pm 0.01 ^b |
| 10 | 0.009 \pm 0.001 ^c |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, 与对照组比较

2.3 西立伐他汀对 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9

蛋白表达的影响

西立伐他汀抑制 THP-1 细胞 MMP-9 蛋白表达, 其作用亦呈浓度依赖性。培养基上清液 MMP-9 的浓度随西立伐他汀的浓度增加而减低。与基础值相比, 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时分别降低 48% 和 91% (0.469 \pm 0.06 比 0.243 \pm 0.04、0.039 \pm 0.01, $P < 0.05$)。

表 3. 不同浓度西立伐他汀对 THP-1 细胞基质金属蛋白酶 9 的蛋白表达水平的作用

Table 3. The Effect of different concentration of cerivastatin on MMP-9 concentration in media

| 西立伐他汀浓度($\mu\text{mol/L}$) | MMP-9 ($\mu\text{g/L}$) |
|------------------------------|-------------------------------|
| 对照 | 0.469 \pm 0.06 |
| 0.01 | 0.463 \pm 0.07 |
| 0.1 | 0.386 \pm 0.06 |
| 1 | 0.243 \pm 0.04 ^a |
| 10 | 0.039 \pm 0.01 ^a |

a: $P < 0.05$, 与对照比较。

3 讨论

CD40-CD40L 信号通路的作用在动脉粥样硬化的炎症调节中已日益明确^[2]。体内及体外研究均提示, CD40 信号通路参与动脉粥样硬化斑块内主要细胞成分如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及巨噬细胞等炎症反应调节。CD40 是肿瘤坏死因子受体超家族成员, 其分子质量为 (45~50) $\times 10^3$, CD40 是一种磷酸化糖蛋白, 它可在一系列细胞表面表达, 包括 B 淋巴细胞、血小板、单核细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞及内皮细胞^[3], CD40-CD40L 的相互作用可产生一系列的免疫炎症反应, 包括促进粘附分子、细胞因子如白细胞介素、基质金属蛋白酶、组织因子等物质的产生, 从而促进动脉粥样硬化的慢性炎症发展过程。因此有人认为 CD40 通路可能是动脉粥样硬化发生发展过程中免疫炎症调节的上层机制。动物试验^[9]证实 CD40L 抗体可阻断 CD40L 与 CD40 的结合, 从而延缓动脉粥样硬化的发生发展。已有研究显示他汀类药物存在调脂外作用, 其中包括抑制炎症和稳定动脉粥样硬化斑块^[7]等。Sparrow 等^[8]通过在体动物实验证实, 他汀类药物具有与降胆固醇无关的直接抑制急性或慢性炎症的作用。本研究发现了西立伐他汀可明显抑制 THP-1 细胞上 CD40 mRNA 的表达, 其抑制作用呈剂量依赖性, 因此我们认为它可能减少了与 CD40L 的结合的 CD40 糖蛋白受体的表达, 降低了 CD40-CD40L 的交联作用, 从而抑制了一系列的引起动脉粥样硬化发生发展的免疫

炎症反应,这可能是他汀类药物抗动脉粥样硬化的一个中心环节。

急性冠状动脉事件主要是不稳定斑块破裂,血栓形成,引起管腔闭塞所致^[10]。斑块是否易于破裂主要取决于其本身的性质而非其大小。不稳定斑块的特征是含有较大的脂质核心,纤维帽薄,并由许多炎症细胞(主要是单核/巨噬细胞及巨噬细胞源性泡沫细胞)浸润。炎症细胞是MMP的主要来源,MMP是一种Zn²⁺和Ca²⁺依赖性的酶家族,能特异性的与细胞外基质各成分相结合并降解胞外基质。MMP-9为明胶酶(Gelatinase)主要降解IV型胶原和弹性纤维,在促使斑块破裂上起着重要作用^[11]。

已有证实MMP与斑块破裂的关系十分密切^[12-15]。Bellosta等^[16]体外细胞培养巨噬细胞发现,氟伐他汀还可明显抑制其MMP-9的活性。本研究的结果也显示西立伐他汀抑制THP-1细胞表达和分泌MMP-9,并呈剂量依赖性。因此,我们认为他汀类药物在减少炎症细胞浸润、抑制其分泌MMP,防止胶原蛋白和弹性蛋白降解,从而对维持纤维帽的完整,稳定斑块无疑有着重要的作用。

有研究显示CD40可诱导单核细胞分泌MMP^[17],本研究发现西立伐他汀同时抑制了MMP-9和CD40的表达,因此我们认为西立伐他汀对MMP-9的抑制可能是通过抑制CD40来实现的,但其具体机制尚不明确。HMG-CoA还原酶抑制剂可阻断胆固醇和一些类异戊二烯中介物的前体—甲羟戊酸的生成,这些类异戊二烯中介物,如法尼焦磷酸(FPP)和牛儿基牻牛儿焦磷酸酯(GGPP)均是参与细胞信号的许多蛋白转录后异戊二烯化的底物。Bellosta等^[16]体外细胞培养巨噬细胞发现,氟伐他汀可明显抑制其MMP-9的活性,这种作用可被加入的甲羟戊酸所逆转,因此认为他汀类药物并未直接阻断巨噬细胞蛋白酶的分泌,而是通过抑制甲羟戊酸的合成介导的。最近有研究显示^[18]辛伐他汀可抑制THP-1细胞的迁移和MMP-9的分泌,并且证实是通过抑制牛儿基牻牛儿焦磷酸酯,而非法尼焦磷酸酯实现的。另外,国外有研究显示血小板抑制剂trapidil亦可抑制THP-1细胞CD40、MMP-9的表达^[19],也提示CD40、MMP-9的表达调节与调脂无关。他汀类药物抑制CD40的机制目前尚无研究报道,我们推测可能也是通过类异戊二烯合成减少所致。最近,Shu等^[20]研究显示激活PPAR α 和 γ 也可减少THP-1细

胞MMP-9的表达,他汀类药物对CD40的抑制是否通过激活PPAR γ 来发挥作用,以及作用机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Eng J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Laman JD, De Smet BJ, Schoneveld A, Van Meurs M. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Immunol Today*, 1997, **18** (6): 272-277
- [3] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (5): 1 931-936
- [4] Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implication for cardiovascular event reduction. *JAMA*, 1998, **279** (20): 1 643-650
- [5] Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, 1996, **348** (9034): 1 079-082
- [6] Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundi S, Hassing H, Patel S, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (1): 115-121
- [7] Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Kotliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ, et al. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (13): 7 464-469
- [8] Peter Libby. Current concept of the pathogenesis of the acute coronary syndrome. *Circulation*, 2001, **104** (3): 365-372
- [9] Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*, 1995, **91** (8): 2 125-131
- [10] Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaque by an in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (18): 15F-20J
- [11] Galis ZS, Sukhova GK, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymology: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *Methodol Commun*, 1995, **9** (9): 974-980
- [12] Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence of the increased collagenolysis by interstitial collagenase-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaque. *Circulation*, 1999, **99** (19): 2 503-509
- [13] Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor suppresses accumulation of macrophages expressing matrix metalloproteinase and tissue factor in atheroma of WHHL rabbits. *Circulation*, 1998, **98** (1): 41-47
- [14] Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (11): 1 671-678
- [15] Najma M, Brad W, Greenfield AF. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinase. *J Immunology*, 1996, **156** (10): 3 952-960
- [16] Wong B, Lumma WC, Smith AM, Sisko JT, Wright SD, Cai TQ. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. *J Leukoc Biol*, 2001, **69** (6): 959-962
- [17] Kato Y, Tsuda T, Hosaka Y. Effect of trapidil on effector functions of monocyte related to atherosclerotic plaque. *Eur J Pharmacol*, 2001, **428** (5): 371-379
- [18] Shu H, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, et al. Activation of PPAR α or γ reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **267** (4): 345-349

(此文编辑 胡必利)