

高胆固醇血症患者血小板膜表达 CD40 配体

陈亚锋¹, 刘昌慧, 韩其蔚

(武汉大学人民医院老年医学科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内科学; 高胆固醇血症血小板活化机制; 流式细胞术; 高胆固醇血症; CD40 配体; 炎症

[摘要] 研究高胆固醇血症患者血小板膜表达 CD40 配体, 以探讨高胆固醇血症促动脉粥样硬化、血栓形成的机制。选择 25 例高胆固醇血症患者及 25 例年龄性别相匹配的健康对照者, 采用流式细胞术测定血小板膜 CD40 配体和 P 选择素的表达, 用酶联免疫吸附法测定血浆单核细胞趋化蛋白 1 水平。结果发现, 高胆固醇血症患者血小板膜 CD40 配体和 P 选择素的表达及血浆单核细胞趋化蛋白 1 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), CD40 配体表达与总胆固醇 ($r = 0.41$, $P = 0.02$) 及低密度脂蛋白胆固醇 ($r = 0.56$, $P = 0.01$) 呈正相关, P 选择素的表达与低密度脂蛋白胆固醇也呈正相关 ($r = 0.79$, $P = 0.01$)。结果提示, 高胆固醇血症患者血小板膜表达 CD40 配体增加, 高胆固醇血症可能是通过激活 CD40 配体而促进炎症反应、血栓形成, 加速动脉粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

现有证据表明动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是动脉血管的慢性炎症性疾病^[1], 高胆固醇血症是 As 最重要的危险因素之一, 在 As 发生发展中也参与了炎症反应。高胆固醇血症诱导炎症因子产生, 促进动脉血管损害, 导致 As 的形成和发展, 同时高胆固醇血症也参与诱导血小板活化、高凝状态的形成。然而高胆固醇血症的促炎症反应和高凝状态的形成机制并不完全清楚。最近研究表明 CD40-CD40 配体 (CD40 L) 相互作用在 As、血栓形成、炎症反应中起到重要作用。本文研究高胆固醇血症患者对 CD40 L 系统的作用, 旨在探讨高胆固醇血症活化血小板、促炎症反应的机制。

1 对象与方法

1.1 病例选择

高胆固醇血症患者选取总胆固醇 (total cholesterol, TC) ≥ 5.20 mmol/L (200 mg/dL) 或低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) ≥ 3.64 mmol/L (140 mg/dL) 25 例, 其中男 23 例, 女 2 例, 年龄 43.5 ± 5.6 岁; 选取年龄性别相匹配的健康体检者 25 例为对照组, TC < 5.20 mmol/L, 其中男 23 例, 女 2 例, 年龄 41.3 ± 7.2 岁。所有入选者均未服用药物, 经病史及常规检查排除高血压、糖尿病、冠心病、脑血管病及肝肾功能不全, 且嗜烟者除外。

1.2 流式细胞术检测血小板 P 选择素和 CD40 配体的表达

清晨空腹肘正中静脉采血, 枸橼酸钠抗凝, 2 h 内离心 ($1500 \times g$, 10 min)。取上部富含血小板血浆, PBS 洗涤 2 次后重悬于 Hepes-Tyrod's 缓冲液中, 调整血小板计数 $300 \times 10^9/L$, 血小板悬液每份取 250 $\mu L \times 3$ 分装 3 个试管中, 分别加入异硫氰酸荧光素 (FITC) P 选择素、FITC-CD40 L、FITC-IgG 各 10 μL , 室温下避光反应 30 min, PBS 洗涤 2 次, 1% 多聚甲醛固定后, 流式细胞仪 (美国 Beckman coulter) 测定, 上机前以标准荧光微球调整仪器, 使变异系数稳定在 2% 以内, 上机后收集 10000 个细胞, 用平均荧光强度 (MFI) 代表细胞表达 CD 水平, 放射免疫计数器 nuticycle 分析系统计算。

1.3 血浆单核细胞趋化蛋白 1 水平测定

静脉血枸橼酸钠抗凝, 离心 ($1500 \times g$, 10 min) 后分离血浆, $-70^\circ C$ 保存, 标本收集完后进行批量检测, 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 试剂盒购自上海太阳生物技术公司, 按试剂盒说明操作。

1.4 统计学处理

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本间比较用 t 检验, 两变量间的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 两组观察指标比较

高胆固醇血症患者血小板膜 CD40 L 和 P 选择素的表达及血浆 MCP-1 水平明显高于对照组 (表 1,

[收稿日期] 2003-08-31

[修回日期] 2004-02-25

[作者简介] 陈亚锋, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事冠心病基础与临床研究, E-mail 为 chenyl7201@yahoo.com.cn。刘昌慧, 主任医师, 教授, 主要从事冠心病研究。韩其蔚, 主任医师, 教授, 主要从事内分泌疾病研究。

Table 1)。

表 1. 高胆固醇血症患者与对照者临床及生物化学指标比较
($\bar{x} \pm s$, $n = 25$)

Table 1. The comparison in clinical data and biochemical variables between hypercholesterolemia patients and controls

指 标	对照组	高胆固醇血症组
年龄 (岁)	43.5 ± 5.6	41.3 ± 7.2
男/女	23/2	23/2
总胆固醇 (mmol/L)	4.24 ± 0.78	6.18 ± 1.54 ^b
LDLC (mmol/L)	2.26 ± 0.53	4.17 ± 0.85 ^b
甘油三酯 (mmol/L)	1.02 ± 0.32	1.27 ± 0.41
CD40 L	8.85 ± 2.37	14.26 ± 3.34 ^b
P 选择素	0.87 ± 0.56	2.52 ± 0.94 ^b
MCP-1 (ng/L)	89.7 ± 35.2	106.5 ± 53.2 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 直线相关分析

CD40 L 表达与总胆固醇($r = 0.41$, $P = 0.02$)及低密度脂蛋白胆固醇($r = 0.56$, $P = 0.01$)呈正相关,P 选择素表达与低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 也呈正相关($r = 0.79$, $P = 0.01$)

3 讨论

CD40 L 也称 CD154, gp39, 是一种 C_{D} 型跨膜糖蛋白, 其结构类似肿瘤坏死因子 α , 属肿瘤坏死因子 α 家族。CD40 L 主要表达与成熟活化的 CD4^+ T 细胞, 也可表达于 B 细胞、自然杀伤细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞及非造血系统起源的内皮细胞等, 近年发现也表达于活化的血小板膜上^[2]。CD40 是肿瘤坏死因子受体家族成员, 主要表达于 B 细胞、单核细胞、内皮细胞及血管平滑肌细胞等, CD40 与 CD40 L 结合后激活第二信使系统包括蛋白酪氨酸激酶、蛋白激酶 A 及磷脂酶 C 等, 这些信号最终激活特定的转录因子(如核因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$), 从而激活相应的基因表达, 导致多种炎症反应^[3]。CD40 L 能激活多种细胞的 CD40 信号而产生相应的生物学效应, 它是体内炎症免疫反应的标志。CD40-CD40 L 信号系统不仅参与免疫反应调节, 还可促进动脉粥样硬化的发生发展。阻断 CD40-CD40 L 系统可抑制 As 的发生发展, 改变斑块的生物学特性和结构, 增加斑块的稳定性^[4,5]。尽管在 As 性疾病中 CD40-

CD40 L 活化的研究较多, 但在无症状的高胆固醇血症患者中 CD40 信号系统的作用却少见报道。

在本研究中, 高胆固醇血症患者血小板膜上 CD40 L 表达上调, 而且 CD40 L 与总胆固醇及 LDLC 正相关, 表明高胆固醇血症促进血小板表达 CD40 L, 激活 CD40-CD40 L 信号系统。

血小板膜表达 CD40 L 后, CD40 L 片断可脱落进入血液循环形成可溶性的 CD40 L (sCD40 L), sCD40 L 是 CD40 L 的活性形式, 估计循环血液中 95% 以上的 sCD40 L 来源于血小板^[6]。本研究证实, 高胆固醇血症诱导体内血小板膜表达 CD40 L, 同时血小板膜 P 选择素表达增高, 而且 P 选择素表达水平与 LDLC 呈正相关, P 选择素表达增高是血小板活化指标。最近 Inwald 等^[7]研究证实 CD40 L 可激活血小板, 使血小板表达 P 选择素增加, 表明 CD40 L 升高可能是血小板活化的机制之一。血小板不仅参与了血管内血栓形成, 而且也参与了炎症反应, 在 As 中起到重要作用。血浆 MCP-1 水平增高, 可能是由于血小板膜表面的 CD40 L 与血管内皮细胞、单核巨噬细胞的 CD40 结合, 从而促进炎症反应, 产生炎症介质有关。MCP-1 是一重要的炎症因子, 对单核细胞或巨噬细胞有趋化或激活作用, 诱导其产生炎症因子、粘附分子等。MCP-1 与 As 的发生发展关系密切, 可吸引单核细胞粘附并浸润动脉壁, 促进粥样斑块的形成。

高胆固醇血症特别是高 LDLC 血症是 As 最重要的危险因素, 参与炎症反应和促血栓形成, 导致 As 发生发展, 本研究推测这一过程可能是通过激活 CD40-CD40 L 系统而起作用的, 这一机制可为临床治疗提供新的思路。

[参考文献]

[1] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115-126

[2] Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998, **391**: 591-594

[3] Grewal IS, Flavell RA. CD40 ligand. *Immunol Rev*, 1997, **16**: 59-70

[4] Phipps RP. Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6 930-932

[5] 李江, 赵水平, 彭道泉, 李全忠, 聂赛. 西立伐汀对 THP-1 细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 533-536

[6] Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. CDL stabilizes arterial thrombi by a β 3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med*, 2002, **8**: 247-252

[7] Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Cir Res*, 2003, **92**: 1 041-048

(此文编辑 文玉珊)