

吡格列酮对高脂饮食兔主动脉 CD40L 表达的影响

楚罗湘¹, 姜德谦, 刘照云

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 吡格列酮的抗炎及抗动脉粥样硬化作用; 免疫组织化学; 吡格列酮; 高脂血症; CD40L; 凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1

[摘要] 目的 探讨吡格列酮对高脂饮食兔主动脉 CD40L 表达的影响。方法 设立正常饮食、高脂饮食及高脂饮食加吡格列酮干预三组, 比较主动脉病理形态学改变、血脂变化, 采用免疫组织化学检测兔主动脉 CD40L 的表达, 采用逆转录聚合酶链反应检测兔主动脉凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达。结果 吡格列酮能减轻高脂饮食所致的内膜增厚和平滑肌细胞增殖, 吡格列酮还能明显升高高密度脂蛋白胆固醇水平。高脂饮食刺激兔主动脉 CD40L 的表达, 吡格列酮能显著减轻这种作用。高脂饮食能上调兔主动脉表达凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达, 而吡格列酮能显著抑制这种作用。结论 吡格列酮能减轻高脂饮食兔主动脉 CD40L 的表达, 其作用可能与抑制凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达有关, 提示吡格列酮可通过抑制高脂血症患者炎症信号通路而达到抗动脉硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Pioglitazone on the Expression of CD40L in High-Cholesterol Diet Rabbit Aorta

CHU Luo Xiang, JIAN De-Qian, and LIU Zhao-Yun

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

[KEY WORDS] Pioglitazone; Hyperlipidemia; CD40L; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; Atherosclerosis; High-Cholesterol Diet

[ABSTRACT] **Aim** To test the hypothesis that Pioglitazone decrease CD40L expression in hypercholesterolemia rabbit aorta. **Methods** 15 male healthy New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: control group ($n=5$) was fed with normal diet for eight weeks; high cholesterol group was fed with high cholesterol diet for eight weeks; Pioglitazone treatment group ($n=5$) was fed with high cholesterol diet for eight weeks supplemented with Pioglitazone [$3 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] from the fourth week of cholesterol diet. CD40L was detected by immunohistochemistry, lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) mRNA was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Aortic intimal hyperplasia and smooth muscle cells proliferation in rabbits fed with high cholesterol diet were decreased. Pioglitazone could improve high density lipoprotein and decrease the expression of CD40L and LOX-1 mRNA in hypercholesterolemia rabbits aorta.

Conclusions Pioglitazone can inhibit the upregulation of LOX-1 in hypercholesterolemia rabbits aorta and decrease CD40L expression. These observation provide novel insight into a potential novel antiinflammatory and antiatherosclerosis pathway of thiazolidinediones.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一个免疫调节的慢性炎症反应过程, 炎症通路已经作为治疗 As 的一个新靶点, CD40L 和 CD40 是炎症反应中参与免疫调节的一对重要的共刺激分子, 它们几乎作用于 As 的形成、进展和斑块破裂的全过程。吡格列酮是一种合成的过氧化物增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR γ) 激动剂, 近来的研究发现 PPAR γ 激动剂不仅通过调节代谢而

且能抑制血管的炎症反应而具有抗 As 作用。本研究旨在观察吡格列酮对 As 兔主动脉 CD40L 表达的影响, 初步探讨其可能的分子机制, 从而为 PPAR γ 激动剂抗动脉硬化的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

15 只 3 月龄健康雄性纯种新西兰大白兔购自中南大学湘雅二医院动物中心, 体重 $2.5 \pm 0.4 \text{ kg}$, 清洁级, 单笼饲养在恒温空调房中。吡格列酮购自杭州中美华东制药有限公司; 逆转录聚合酶链反应 (transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂

[收稿日期] 2005-08-29

[修回日期] 2006-04-26

[作者简介] 楚罗湘, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病, E-mail 为 chuluox@yahoo.com.cn。姜德谦, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病。刘照云, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病。

盒购自 Fermentas 公司;兔凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)引物由上海博亚生物技术有限公司合成;CD40L 多克隆抗体购自博士德公司;其余试剂为国产分析纯。

1.2 高脂模型的建立及吡格列酮的干预

15 只雄性健康新西兰大白兔单笼饲养 1 周后,随机选 10 只兔予高脂饮食,其余 5 只正常饮食。高脂饮食为正常粗颗粒饲料添加 1% 胆固醇、7.5% 蛋黄粉和 8% 猪油。高脂饮食兔每只每天进食 120 g 高脂饲料,自由饮水,于第 4 周随机选 5 只在高脂饮食基础上给予吡格列酮 3 mg/(kg·d) 口服。8 周末在深麻状态下处死动物,取主动脉弓和胸主动脉上段立即放入液氮缸内保存,用于 RT-PCR 检测。取胸主动脉中下段 2 cm,立即以 10% 中性甲醛缓冲液固定,制成石蜡切片,用于免疫组织化学检测 CD40L 或通过苏木精—伊红染色观察形态学改变。

1.3 血脂和脂蛋白测定

饲养前和 8 周末经兔耳中央动脉取空腹血 5 mL,血浆置 -70℃ 保存。在日立 7600-020 全自动生化仪上测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和甘油三酯(triglyceride, TG)浓度。

1.4 逆转录聚合酶链反应

使用 Trizol 试剂盒从兔主动脉组织中提取总 RNA,逆转录获得 cDNA。LOX-1 mRNA 上游引物 5'-CAA GAG GCT CTG AAG AGA ATG G-3',下游引物 5'-TAT GCA CAG GTG CCT GAA GG-3',产物为 344 bp; GAPDH mRNA 上游引物 5'-GCG CCT GGT CAC CAG GGC TGC TT-3',下游引物 5'-TGC CGA AGT GGT CGT GGA TGA CCT-3',产物为 465 bp。取 1.5 μL cDNA 和相应引物在 Taq 合成酶作用下扩增,先预变性 4 min,共扩增 35 个循环,每个循环包括 94℃ 变性 40 s → 58℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1 min,最后在 72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物通过含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳,应用 Gel Doc2000 凝胶分析系统扫描分析,通过软件分析光密度值。

1.5 免疫组织化学分析

石蜡切片常规脱腊至水,正常山羊血清封闭,加入 1:50 CD40L 多克隆抗体,37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 min × 3 次,加入二抗孵育 20 min,滴加 SABC,以 DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,中性树脂封片。棕黄色为阳性,背景为紫蓝色。图像分析采用 MPIAS-500 高清晰度真彩病理图文分析系统对切片

进行分析,随机选定 8 个视野检测其平均吸光度,以反应 CD40L 表达的强度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件包进行统计,对主要指标进行正态性检验。治疗前后采用配对 *t* 检验,三组间比较采用 One-Way ANOVA 分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉病理形态学改变

肉眼下,对照组主动脉内膜光滑,未见粥样硬化斑块;高脂饮食组主动脉内膜有严重的粥样硬化病变,斑块多融合成片,密布内膜面;吡格列酮组粥样斑块散在分布,病变较高脂饮食组减轻。HE 染色显示,对照组血管内膜光滑、连续、内皮完整;高脂饮食组血管内膜明显增厚,内膜中大量巨噬细胞浸润,内有脂质沉积,形成泡沫细胞,并有平滑肌细胞增殖;吡格列酮组内膜增厚和平滑肌细胞增殖较高脂饮食组减轻(图 1)。

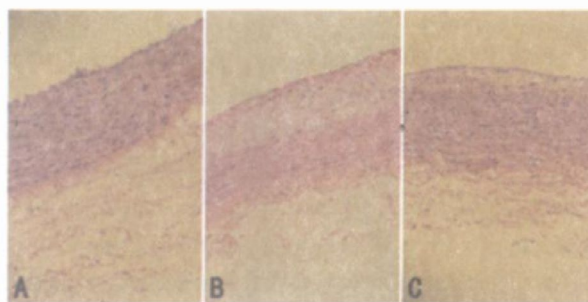


图 1. 兔主动脉 HE 染色 A 为对照组, B 为高脂饮食组, C 为吡格列酮组。

2.2 血脂水平变化

0 周时各组血脂水平均无明显差异。8 周末高脂饮食组 TC、LDLC、HDLC 和 TG 均明显高于正常对照组($P < 0.01$)。吡格列酮干预后 TG 有所下降,但无统计学意义;HDLC 明显升高,与高脂饮食组比较有显著性差异($P < 0.05$);而 TC 和 LDLC 无明显改变(表 1)。

表 1. 血脂水平变化

分 组	TC	LDLC	TG	HDLC
正常对照组	0.86 ± 0.16	0.23 ± 0.04	0.46 ± 0.07	0.45 ± 0.08
高脂饮食组	26.42 ± 2.23 ^a	22.4 ± 2.04 ^a	2.14 ± 0.26 ^a	1.35 ± 0.19 ^a
吡格列酮组	25.98 ± 2.17 ^a	23.01 ± 1.58 ^a	2.37 ± 0.17 ^a	1.71 ± 0.31 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高脂饮食组比较。

2.3 吡格列酮对兔主动脉 CD40L 表达的影响

对照组无 CD40L 表达。高脂饮食组可见 CD40L 大量表达, CD40L 主要表达于 As 斑块处, 动脉壁其它部位几乎无 CD40L 表达, 在单核巨噬细胞、内皮细胞的胞膜和胞质均有表达。吡格列酮组 CD40L 表达较高脂饮食组明显减少(图 2)。以平均吸光度对 CD40L 的表达加以量化, 吡格列酮组与高脂饮食组之间有显著性差异(0.35 ± 0.11 比 0.83 ± 0.16 , $P < 0.01$)。

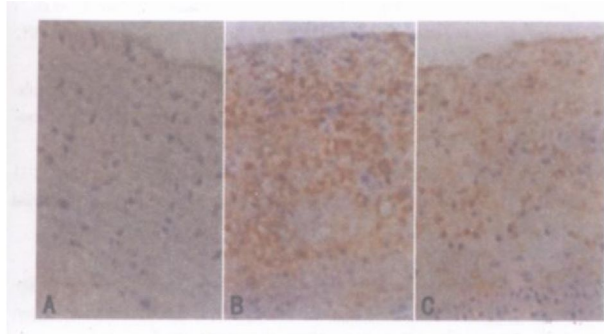


图 2. CD40L 在兔主动脉上的表达 ($\times 400$) A 为对照组, B 为高脂饮食组, C 为吡格列酮组。

2.4 吡格列酮对兔主动脉凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的影响

兔 LOX-1 mRNA 和 GAPDH mRNA 片段分别为 344 bp 和 465 bp(图 3)。高脂饮食组 LOX-1 mRNA 的表达与对照组比较明显增强(0.12 ± 0.05 比 0.69 ± 0.18 , $P < 0.01$), 吡格列酮干预能明显降低高脂饮食引起的 LOX-1 mRNA 表达(0.32 ± 0.14 比 0.69 ± 0.18 , $P < 0.01$)。

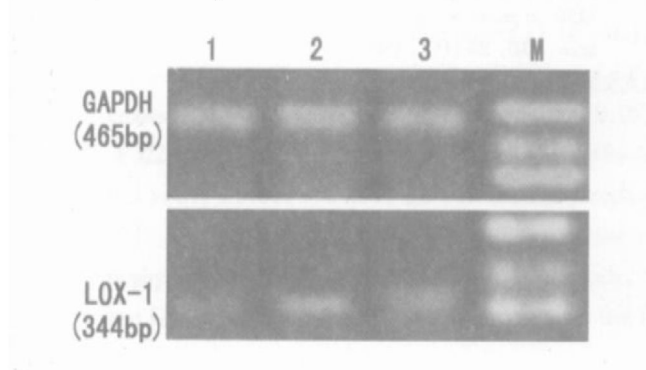


图 3. 凝血酶样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的逆转录聚合酶链反应产物琼脂糖凝胶电泳 1 为对照组, 2 为高脂饮食组, 3 为吡格列酮组。

3 讨论

炎症反应和免疫介导在 As 的发生中起重要作用, CD40/CD40L 信号通路在免疫反应的启动中起着重要的作用, CD40L 通过与 CD40 结合发挥生物学

效应, 而且 CD40L 与 CD40 结合后, 又进一步增加 CD40L 的表达。CD40L 主要表达在 T 淋巴细胞, 有研究发现 CD40L 和 CD40 还可表达于肥大细胞、内皮细胞、平滑肌细胞, 单核巨噬细胞及树突状细胞中^[1], 近来发现在实验动物和人的 As 病变处 CD40/CD40L 表达明显增加^[2]。有研究发现 CD40L 高表达与不稳定型心绞痛密切相关^[3]。还有证据表明 CD40L 单克隆抗体可延缓 As 的进程和斑块的形成, 甚至稳定已形成的斑块^[4]。目前认为 CD40L 和 CD40 相互结合可激活内皮细胞, 促进单核细胞的聚集和泡沫细胞的形成, 加速平滑肌细胞的增殖和迁移, 影响斑块的不稳定性, 还能刺激产生多种粘附分子、细胞因子、基质金属蛋白酶和促凝物质, 参与 As 的全过程。

高血脂是 As 的主要危险因素, LDLC 氧化修饰形成氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 它在 As 的形成中起着极为重要的作用。ox-LDL 促进粥样斑块处泡沫细胞的形成, 它还刺激促炎信号的表达, 如氧自由基的产生, 肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 等细胞因子的表达, 趋化分子和粘附分子的表达, 上调血管紧张素 II 、组织因子和纤溶酶原激活物抑制剂 1^[5]。所有这些均促进和加速 As。1997 年 Sawamura 等^[6]首次在牛内皮细胞上发现 ox-LDL 的受体, 即 LOX-1, 它是一种 I^{II} 型单链跨膜蛋白, 属于 C 型选择素家族, 它可在内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞上表达, 但它与巨噬细胞上的清道夫受体(CD36、SR-BI)不同, 它是 ox-LDL 的特异性受体, 能特异性结合 ox-LDL, 调节它的生物学功能。有研究证明 ox-LDL 通过 LOX-1 受体上调血管细胞粘附分子 1、细胞间粘附分子 1、E 选择素及单核细胞趋化蛋白 1 的表达, 促使单核细胞向内皮细胞聚集^[7]。许多与动脉硬化有关的刺激因子能上调 LOX-1 的表达。本研究结果发现高脂饮食能上调 LOX-1 mRNA 的表达, 这与其它研究一致^[8]。

最近有报道高血脂症可促进 CD40L 和 CD40 在内皮细胞、血小板和单核细胞中表达^[9]。研究进一步发现 ox-LDL 通过 LOX-1 受体使内皮细胞 CD40L 和 CD40 表达增加, 因为特异性的 LOX-1 阻断抗体能显著降低 ox-LDL 刺激的人冠状动脉内皮细胞 CD40L 和 CD40 的表达^[10]。ox-LDL、CD40L 和 CD40 共同表达于早期 As 病变处的多种细胞中, ox-LDL 是促进 CD40/CD40L 炎症通路的起始信号。

过氧化体增殖物激活型受体(PPAR)是一种配体激活的核受体转录因子, 它和视黄醛组成的异二聚体作用于靶基因增强子调节元件, 促进相应的基

因转录^[11]。PPAR γ 受体激动剂具有多种生理效应。一些证据表明 PPAR γ 通过抑制促炎基因的表达起着抗炎作用,在本研究发现 PPAR γ 激动剂吡格列酮能抑制高脂饮食喂养下兔主动脉粥样斑块处 CD40L 的表达。吡格列酮能抑制兔主动脉粥样斑块处 LOX-1 mRNA 表达。已有一些研究证实了 PPAR 配体对 LOX-1 表达的影响,Chiba 等^[12]证实 PPAR γ 激动剂能抑制 TNF- α 刺激的牛主动脉内皮细胞表达 LOX-1 受体,而 PPAR α 激动剂没有这种作用。Mehta 等^[13]证实 PPAR γ 激动剂吡格列酮能抑制超氧离子的产生及与氧化还原敏感的转录因子如核因子 κ B 等,从而能下调促炎因子和促动脉硬化刺激因子的表达。因此推测 ox-LDL 通过 LOX-1 受体激活 CD40/CD40L 信号通路,而吡格列酮可能通过抑制血管细胞 LOX-1 受体表达而减低 ox-LDL 刺激下的 CD40L 和 CD40 表达。吴歆华等^[14]也发现罗格列酮降低 As 大鼠巨噬细胞 CD40 及 CD40L 表达。还有研究表明另一种 PPAR γ 激动剂罗格列酮能降低 Ⅱ型糖尿病和冠状动脉疾病患者血清 sCD40L 的浓度^[15]。这些研究均提示 PPAR γ 激动剂能抑制 CD40/CD40L 炎症信号通路。

总之,本研究证实高脂饮食能刺激兔主动脉 CD40L 表达增加,激活 CD40/CD40L 炎症信号通路,这种作用可能是通过 LOX-1 受体来实现的,而吡格列酮可能通过下调高脂血症刺激下 LOX-1 mRNA 的表达,抑制 CD40/CD40L 信号通路的激活,这将阻断它们介导的与炎症有关的血管损伤,最终抑制高脂血症患者 As 的进程。

[参考文献]

- [1] Hakkinen T, Karkola K, Ylä-Herttuala S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16(Fc γ RIII) [J]. *Virchows Arch*, 2000, **437** (4): 396-405
- [2] Schönebeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability [J]. *Circ Res*, 2001, **89**: 1 092-103
- [3] 严金松, 吴宗贵, 张铃珍, 李莉, 仲人前, 孔宪涛. CD40L 配体高表达与不稳定型心绞痛之间的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9**: 409-412
- [4] Schönebeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution established atherosclerosis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 7 458-463
- [5] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis [J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, **20**: 707-727
- [6] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Morisaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoproteins [J]. *Nature*, 1997, **386**: 73-77
- [7] Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein 1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells [J]. *Circulation*, 2000, **101**: 2 889-895
- [8] Li D, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 116-122
- [9] Garlicks CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, et al. Up-regulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2001, **104**: 2 395-400
- [10] Dayuan Li, Ling Liu, Hongjiang Chen, Tatsuya Sawamura, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 816-821
- [11] Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, **12**: 335-363
- [12] Chiba Y, Ogita T, Ando K, Fujita T. PPAR γ ligands inhibit TNF- α induced LOX-1 expression in cultured endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **286**: 541-546
- [13] Mehta JL, Hu B, Chen JW. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003, **23**: 2203
- [14] 吴歆华, 吴宗贵, 张华. 辛伐他汀和罗格列酮对 As 大鼠 CD40 和 CD40L 表达的影响 [J]. *上海医学*, 2005, **28** (5): 281-283
- [15] Marx N, Imhof A, Froehlich J. Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2003, **107** (15): 1 954-957

(此文编辑 文玉珊)