

CD40-CD40 配体与动脉粥样硬化的研究进展

陈凤英¹, 高 炜² 综述, 唐朝枢³ 审校

(1. 内蒙古医学院附属第一医院心内科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010050; 北京大学 2. 附属第三医院心内科;
3. 基础医学部病理生理学系心血管研究所, 北京市 100083)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 综述; CD40; CD40L

[摘要] 动脉粥样硬化是多种因素导致的慢性疾病, 严重威胁人类的健康。炎症介质 CD40-CD40L 被发现广泛存在于与动脉粥样硬化相关的各种细胞及血小板中, 可促进其他炎症因子释放, 增加内皮的促凝活性, 诱导基质金属蛋白酶表达, 与氧化型低密度脂蛋白协同作用促进动脉的粥样硬化和斑块的不稳定, 在介导动脉粥样硬化和急性冠状动脉综合症的病理过程中起关键作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

近年来的研究认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症反应过程^[1]。炎症介质 CD40-CD40L 被发现广泛存在于与 As 相关的各种细胞及血小板中^[2, 3], 在介导 As 和急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)血栓形成、炎症反应、平滑肌细胞增殖及血管重塑中起关键作用, 阻断这一系统的作用, 可为防治 As 和 ACS 提供新的思路^[4]。

1 CD40-CD40L 系统

1.1 CD40-CD40L 的分子结构

CD40-CD40L 是一对互补的肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)和肿瘤坏死因子受体(tumour necrosis factor receptor, TNFR)超家族跨膜糖蛋白, 在抗原呈递和自身免疫疾病中起重要作用。CD40 基因位于第 20 号染色体, 即 20q11-20q13.2。人 CD40 分子是由 277 个氨基酸残基组成的 I 型跨膜蛋白, 另有一个 21 个氨基酸的前导序列, 包括胞外区、跨膜区和胞内区。其胞外区与神经生长因子受体(neuronal growth factor receptor, NGFR)、TNFR、Fas 以及 CD27 高度同源。CD40 主要表达于 B 细胞、单核细胞、树突状细胞、内皮细胞、纤维母细胞和上皮细胞也表达 CD40, 其功能与炎症的放大和调节有关。人类 CD40L 基因位于 X 染色体, 即 Xq26.3-Xq27.1。CD40L 也称 gp39 或 CD154, 是含 261 个氨基酸的^①型跨膜蛋白, 其三维结构类似于 TNF- α 。CD40L 主要表达于成熟的活化 CD4⁺ T 细胞, B 细胞、单核/巨噬细胞、自然杀伤细胞、血管的内皮细胞和平滑肌细胞等也可表达。CD40 与其配体 CD40L 结合后激活蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine

kinase PTK, 包括 lyn, syk 和 Jak3)、磷脂酶 Cr2 和蛋白激酶 A 等, 这些信号最终激活了特定的转录因子如核转录因子 NF- κ B 及相应的基因表达^[5]。

1.2 血小板源性 CD40L

CD40 和 CD40L 以无活性的形式大量存在于血小板中, 而且均有一种天然的可溶性形式, 能够产生远距离的生物学效应。当血小板被 ADP、凝血酶和胶原等激活后, 无活性的 CD40L 可迅速产生可溶性 CD40L(sCD40L), 在转化的过程中伴有 α 颗粒内容物的释放, 包括血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、转化生长因子(transforming growth factor-beta, TGF- β)、血小板第 4 因子(platelet factor 4, PF4)、血小板反应素(thrombospondin, TSP)、正常 T 细胞表达和分泌因子(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES)、P 选择素等^[3, 6]。CD40L 和 sCD40L 均为三聚体的三维结构, 具有多种生物学功能: ①作为肿瘤坏死因子超家族成员可与其受体 CD40 结合; ②具有赖氨酸-精氨酸-谷氨酸结构(KGD motif)保证分化产生 sCD40L, 并使其与膜 GPIIb/IIIa 受体结合, 这一过程可被 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂阻断^[6, 7]; ③CD40L 及 sCD40L 与其受体结合后通过其细胞内信号转导途径发挥效应。

2 CD40-CD40L 与动脉粥样硬化

Lutgens 等^[8]研究发现在 CD40L 基因敲除和应用 CD40L 抑制剂的载脂蛋白 E^{-/-}小鼠 As 斑块中富含平滑肌细胞和胶原, 但仅含少数的巨噬细胞和 T 淋巴细胞, 斑块稳定, 认为 CD40 与 CD40L 的相互作用参与 As 的发生发展。早在 1997 年 Mach 等在正常动脉组织内没有发现 CD40L, 仅内皮细胞有少量 CD40 表达。而在 As 斑块内的 CD4⁺ T 细胞表达 CD40L, 同时发现斑块内的内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞也表达 CD40 与 CD40L。在斑块的肩部最多, 因此认为 CD40-CD40L 与斑块的稳定性密切相关。严金川等^[9]研究 CD40-CD40L 共同表达于人的单核细胞、内皮细胞表面及动脉粥样斑块中, TNF、IFN- γ 、IL-1 和 IL-6 可促进 CD40-CD40L

[收稿日期] 2005-07-12 [修回日期] 2006-04-05

[作者简介] 陈凤英, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础和临床研究, 联系电话为 0471-6923836, E-mail 为 fychen432@sina.com。高炜, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制、介入治疗后再狭窄的防治研究、心血管病的基因治疗和细胞治疗, 联系电话为 010-62017691-2549, E-mail 为 dr_gaowei@yahoo.com。唐朝枢, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脑血管疾病发病和防治的基础研究, 联系电话为 010-82802182, E-mail 为 tangchaoshu@263.net.cn。

的表达。Kotowicz 等^[10]在体外实验中也发现人血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞在无血清条件下也能表达 CD40-CD40L, 在 IL-1B、TNF- α 、INF- α 及 α -LDL 刺激下其表达明显增强。CD40-CD40L 的相互作用也可以促进这些细胞的粘附分子、细胞因子、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 和组织因子(tissue factor, TF) 等的表达。

动物实验也显示 CD40-CD40L 参与 As 的形成和发展。Mach 等^[11]用低密度脂蛋白受体缺陷(LDLR^{-/-}) 鼠给予高胆固醇饮食诱发动脉粥样硬化, 同时给予 CD40L 单克隆抗体连续注射 12 周, 可使主动脉粥样硬化病变范围减少 59%, 腹主动脉脂质区减少 79%, 而且, 斑块内 VCAM-1 的表达显著降低, 巨噬细胞含量减少 3 倍, 平滑肌细胞和胶原含量则增加 2.8 倍, 斑块更趋于稳定。Lutgens 等^[12]研究发现 CD40L 和载脂蛋白 E 双基因缺陷鼠生长至 23 周时主动脉弓斑块总面积比载脂蛋白 E 单基因敲除鼠减小 550%, 还有 2 只 CD40L 和载脂蛋白 E 双基因缺陷鼠甚至完全无病变。在斑块成分方面, 两组动物早期病变无显著差别; 而在晚期 CD40L 和载脂蛋白 E 双基因缺陷鼠斑块面积小, 脂质核心减少 54%, 纤维帽厚度增加 500%, 胶原和平滑肌细胞含量增加, 而巨噬细胞和 T 细胞数分别减少 50.2% 和 71.6%。用 CD40L 抗体分别在早期和晚期连续处理载脂蛋白 E^{-/-} 鼠 12 周, 发现不论治疗开始早晚, CD40L 抗体对早期斑块的形态影响不大, 但对晚期斑块影响显著, 包括斑块中 T 细胞含量显著减少, 胶原含量、平滑肌细胞数目和纤维帽厚度显著增加, 表明 CD40-CD40L 的相互作用对于 As 的起始是必不可少的, 主要体现在斑块从早期向晚期的进展过程中, 阻断该系统可使晚期斑块更加稳定。此外, 用 CD40L 抗体治疗后还能增加病变区 TGF- β 1 的表达, 具有抑制炎症、增强细胞外间质合成的能力, 有利于斑块向稳定的方向发展。

3 CD40-CD40L 与急性冠状动脉综合征

可溶性 CD40L 在动脉粥样硬化和血栓形成的疾病中发挥着重要的作用。近年研究认为血小板源 CD40L 可作为急性冠状动脉血栓形成的标志物, ACS、介入治疗、外周血管栓塞和心肺外科手术等情况下的血栓形成和炎症反应过程中 sCD40L 水平均明显增高。Aggarwal 等^[13]发现介入干预的罪犯血管开口处血浆 sCD40L 高于外周血。Cippollone 等^[14]也发现血浆 sCD40L 升高水平与再狭窄相关。国内外均有报道在 ACS 患者血浆中 sCD40L 高于稳定型心绞痛患者血小板源 sCD40L 的产生和促血栓的形成与血小板 GP IIb/IIIa 的作用密切相关。Nannizzi Alaimo 等^[15]发现 GP IIb/IIIa 受体拮抗剂呈浓度依赖性地减少活化血小板 sCD40L 的释放, 其拮抗剂可以直接阻断活化的但还未聚集的血小板 GP IIb/IIIa 受体, 这提示 GP IIb/IIIa 与 CD40L 分化和 sCD40L 产生直接相关, CD40-CD40L 具有促进血小板聚集和血栓形成的作用^[6]。Urbich 等^[16]发现重组 CD40L(rCD40L) 可以阻断 VEGF 诱导的内皮细胞迁移, 抑制血管损伤后内皮细胞再生, 促使平滑肌细胞活化和增殖, 提示 CD40L 在再狭窄中也发挥重要的作用。

4 CD40-CD40L 致病机制

4.1 促进炎症介质表达

可溶性 CD40L 与血管内皮细胞和血小板表面 CD40 结合后激活多种炎症反应, 能促进 As 斑块内血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞释放细胞因子 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 及 TNF。rCD40L 能诱导内皮细胞和血管平滑肌细胞 IL-1B 前体的释放, 并激活细胞凋亡调控基因白细胞介素 1 β 转换酶(ICE 或 caspase 1), 对 IL-1 前体的加工使 IL-1 的活性及表达增加。CD40 与 CD40L 的相互作用也使粘附分子 E-selectin、VCAM-1、ICAM-1 和 TF、MCP-1 的表达增高, 增加 T 淋巴细胞与内皮细胞的粘附。Longo 等^[17]认为细胞保护基因 A20 可以阻断 CD40-CD40L 介导的内皮细胞活化和凋亡, 下调其通过核因子 κ B 引起的 E-selectin、VCAM-1、ICAM-1 的表达。Sanguigni 等^[18]研究认为他汀类药物通过抑制 CD40-CD40L 介导的炎症反应而发挥作用。

4.2 增加内皮细胞促凝活性

在动脉粥样硬化斑块中的内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞均大量表达 TF, 这是斑块破裂后导致局部血栓形成的关键因素。Sanguigni 等^[19]认为人 rCD40L 能诱导内皮、平滑肌和巨噬细胞 TF 表达, 并伴随着细胞促凝活性增强, 这种效应可被 CD40L 抗体抑制。在 CD40L 基因敲除鼠模型上可观察到血栓形成障碍, 给予 rCD40L 后可促进斑块中血栓形成。CD40L 不仅使内皮细胞 TF 表达增强且血栓调节素表达下调, 这就增强了内皮细胞凝血活性, 同时降低了其纤溶活性, 从而有利于局部血栓形成。

4.3 与氧化型低密度脂蛋白的协同作用

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 是 As 的重要发病因子, 可增强单核细胞和 T 淋巴细胞与内皮细胞的附着力, 使其向内皮下移行, 诱导内皮细胞表达多种粘附分子和血管紧张素(ANG) (angiotension, Ang II), 促进血管平滑肌细胞增殖、迁移和诱导斑块中炎症细胞释放多种细胞因子。近年研究发现 CD40-CD40L 途径可介导 ox-LDL 的上述促 As 效应。Dayuan 等^[20]发现 ox-LDL 能通过低密度脂蛋白受体(LDL receptor-1, LOX-1) 上调 CD40、CD40L mRNA 和蛋白的表达, 其作用呈浓度和时间依赖性。而用蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 抑制剂孵育后再次暴露在 ox-LDL 的作用下 CD40 和 CD40L 表达明显降低, 表明 PKC 是 ox-LDL 诱导 CD40-CD40L 表达的信号通路。

4.4 导致斑块不稳定

动脉粥样硬化斑块局部 MMP 的表达异常增高, 致使基质合成与降解失衡, 是斑块由稳定向不稳定方向发展、最后导致斑块破裂的关键因素之一。研究发现 CD40 与 CD40L 相互作用可诱导人内皮、平滑肌/巨噬细胞间质胶原酶(MMP-1)、基质溶解素(MMP-3) 和胶原酶 B(MMP-9) 等表达的增强。内皮和平滑肌细胞中无活性的胶原酶 A(MMP-2) 在 CD40L 作用后也以激活的形式被释放。而且 CD40-CD40L 诱导效应比 TNF- α 或 IL-1B 的效应还强。Wu 等^[21]发现 CD40-CD40L 激活单核/巨噬细胞可以使 MMP12 的表达显著增加, 而对 MMP 天然抑制物 TIMP1 和 TIMP-2 的表达无明显影响,

从而有利于局部基质降解, 导致斑块不稳定。Belton 等^[22] 在载脂蛋白 E^{-/-} 鼠用高胆固醇饮食诱导的 As 斑块中用免疫组织化学的方法检测到环氧化物酶 1 (cyclooxygenase 1, COX-1)、COX-2 和 CD40L 的高表达, 使用 COX-1 拮抗剂 SC-560 可以降低 CD40L 表达, 提示 CD40 与 CD40L 相互作用促进 As 斑块中 COX 的表达。COX 及其前列腺素产物可通过多种机制促进 As 及斑块的不稳定, 如增加血管的通透性, 促进炎症细胞的趋化、聚集和粘附^[23], PGE2 还能促进 T 细胞 MMP 的合成, 导致斑块的不稳定。

4.5 CD40-CD40L 的信号转导途径

研究发现 CD40-CD40L 发挥生物学效应的信号转导通路, 是 PKC α 而不是 PKC β 和 PKC γ 在发挥作用^[19]。Marzio 等^[24] 用 sCD40L 处理的巨噬细胞能迅速激活 P38 和细胞外信号调节激酶 EPK1/2, 而用丝裂素原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 抑制剂可阻断 sCD40L 诱导的细胞因子的产生。Ray 等^[25] 观察到 CD40-CD40L 诱导 B 淋巴细胞凋亡和核因子 κ B 活化的作用可被天然和合成的过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR γ) 激动剂阻断, 而 PPAR γ 激动剂升高 F γ B β 和 F β B β 蛋白水平的作用能被 CD40-CD40L 阻断。综合研究结果表明 PKC、MAPK 和 PPAR γ 是其主要的信号转导途径。

5 前景与展望

CD40L 在血栓形成、As 和 RS 等疾病中起最直接的调控作用, 通过干扰或抑制 CD40-CD40L 作用对防止晚期 As 病变进展、促斑块的稳定和预防 RS 具有潜在治疗价值。但仍有许多问题有待研究, 如 sCD40L 是由循环血液中活化的血小板产生还是局部血小板产生? sCD40L 是急性血栓形成时产生并促进血栓的进一步加重还是再狭窄后产生? 体外实验研究 GP IIb/IIIa 受体拮抗剂可以阻断 sCD40L 的释放是否也能阻断急性冠状动脉血栓如 ACS 或 PCI 时 sCD40L 的释放? 抗血小板制剂的效应是为防止血栓的形成和随后的缺血事件的发生还是可以用于防止 As 的进展? 使用 GP IIb/IIIa 受体拮抗剂是 PCI 后短时 (< 20 h) 抑制血栓的形成还是可长期 (一年或更长) 预防不良事件? 这些均需要更深入的研究。

[参考文献]

[1] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (2): 93-95

[2] Hakkinen T, Karkola K, YlirHerttuala S. Macrophages, smooth muscle cell, 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 gamma III) [J]. *Virchows Arch*, 2000, 437 (4): 396-405

[3] Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, and Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation[J]. *Cir Res*, 2003, 92 (9): 1 041-048

[4] Urbich C, Dimmeler S. CD40 and vascular inflammation[J]. *Can J Cardiol*, 2004, 20 (7): 681-683

[5] Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 67 (1): 2-17

[6] Langer F, Ingersoll SB, Amirhosravi A, Meyer T, Siddiqui FA, Ahmad S, et

al. The role of CD40 in CD40L and antibody-mediated platelet activation[J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93 (6): 1 137-146

[7] Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin dependent mechanism[J]. *Nat Med*, 2002, 8 (3): 247-252

[8] Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12 (1): 27-32

[9] 严金川, 吴宗贵, 仲人前, 张铃珍, 孔先涛. CD40-CD40L 共同表达于内皮细胞及动脉粥样斑块中[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 19 (8): 1 021-024

[10] Kotowicz K, Dixon GLJ, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes[J]. *Immunology*, 2000, 100 (4): 441-448

[11] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling[J]. *Nature*, 1998, 394 (6689): 200-203

[12] Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Koteliensky VE, et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 1999, 5 (11): 1 313-316

[13] Aggarwal A, Schneider DJ, Terrien EF, Sobel BE, Dauerman HL. Increased coronary arterial release of interleukin-1 receptor antagonist and soluble CD40 ligand indicative of inflammation associated with culprit coronary plaques[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93 (1): 6-9

[14] Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, et al. Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty[J]. *Circulation*, 2003, 108 (22): 2 776-782

[15] Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of Glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 Ligand during platelet stimulation[J]. *Circulation*, 2003, 107 (8): 1 123-128

[16] Urbich C, Dembach E, Aicher A, Zeiher A M, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species[J]. *Circulation*, 2002, 106 (8): 981-986

[17] Longo CR, Arvelo MB, Patel VI, Daniel S, Mahiou J, Grey SF, et al. A20 protects from CD40-CD40 ligand-mediated endothelial cell activation and apoptosis[J]. *Circulation*, 2003, 108 (9): 1 113-118

[18] Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, et al. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 Ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients[J]. *Circulation*, 2005, 111 (24): 412-419

[19] Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, et al. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45 (1): 35-42

[20] Li DY, Liu L, Chen HJ, Sawamura T, Mehta J L. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40-CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells[J]. *Arter Thromb Vas Biol*, 2003, 23 (5): 816-821

[21] Wu L, Fan J, Matsumoto S, Watanabe T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269 (3): 808-815

[22] Belton OA, Duffy A, Toomey S, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2003, 108 (24): 3 017-023

[23] 邓平, 赵水平. 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化炎症中的意义和他汀类药物的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (2): 241-245

[24] Marzio PD, Sherry B, Thomas EK, Franchin G, Schmidtmayerova H, Bukrinsky M. Beta-chemokine production in CD40L-stimulated monocyte-derived macrophages requires activation of MAPK signaling pathways[J]. *Cytokine*, 2003, 23 (3): 53-63

[25] Ray DM, Akbilyk F, Bernstein SH, Phipps RP. CD40 engagement prevents peroxisome proliferator activated receptor agonist-induced apoptosis of B lymphocytes and B lymphoma cells by an NF- κ B-dependent mechanism[J]. *Immunology*, 2005, 174 (7): 4 060-069

(此文编辑 朱雯霞)