

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0081-04

•实验研究•

环氧合酶抑制剂和重组人 CD40 配体对人 iv 型胶原 α_2 (iv) 链启动子活性表达的影响

樊民¹, 李岚², 王皓³, 高春芳³, 李洪涛¹, 任雨笙¹, 吴宗贵¹

(中国人民解放军上海第二军医大学长征医院 1. 心内科,

3. 实验诊断科, 上海市 200003; 2. 中国人民解放军 411 医院内四科)

[关键词] 内科学; CD40 配体; 环氧合酶; 阿斯匹林; 胶原; 启动子; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨重组人 CD40 配体及环氧合酶抑制剂对人 iv 型胶原 α_2 (iv) 链启动子活性的作用。方法 体外培养人血管平滑肌细胞, 人 iv 型胶原 α_2 (iv) 链基因启动子重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 扩增和酶切鉴定后, 通过脂质体转染血管平滑肌细胞, 重组人 CD40 配体刺激转染后细胞, 酶联免疫吸附法检测 CAT 报告基因表达以及阿斯匹林(环氧合酶 1 抑制剂)和 NS-398(环氧合酶 2 抑制剂)对其的影响。结果 重组人 CD40 配体使 CAT 报告基因表达下降; 阿斯匹林和 NS-398 均可以增加 CAT 报告基因表达, 并逆转重组人 CD40 配体诱导的 CAT 报告基因表达下降, NS-398 的作用强于阿斯匹林($P < 0.05$)。结论 重组人 CD40 配体对人 iv 型胶原 α_2 (iv) 链启动子活性的作用部分与环氧合酶通路有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Cyclooxygenase Inhibitor and Recombinant Human CD40 Ligand on Human α_2 (iv) Collagen Promoter

FAN Min, LI Lan, WANG Hao, GAO Chun Fang, LI Hong-Tao, REN Yu-Shen, and WU Zong-Gui

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese People's Liberation Army, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] CD40 Ligand; Cyclooxygenase; Aspirin; Collagen; Promoter; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effects of cyclooxygenase (COX) inhibitor and recombinant human CD40 ligand (rhCD40L) on human α_2 (iv) collagen promoter. **Methods** After amplification and identification, pCOLH₂2.4 and pCOLH₂1.6, a plasmid containing PCAT3-enhancer, were transfected into human vascular smooth muscle cell (VSMC) using Lipofectamin transfection reagent. The expression of target gene and protein were measured by CAT enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The effects of COX inhibitor and rhCD40L on CAT activity were evaluated after transfection. **Results** Compared with the control group, the CAT activities were inhibited by rhCD40L. NS-398 and aspirin could reverse the CAT activities inhibited by rhCD40L; the effect of NS-398 was stronger than that of aspirin. **Conclusion** rhCD40L could inhibit the activities of human α_2 (iv) collagen promoter by COX pathway partly.

高春芳等^[1,2]前期已经构建了人 iv 型胶原 α_2 (iv) 链基因启动子重组体并讨论了影响其活性的一些因素, 我们选取 CAT 报告基因活性较高的重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 为研究对象, 研究重组人 CD40 配体 (recombinant human CD40 ligand, rhCD40L) 和环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 抑制剂对胶原启动子活性的影响。CD40 及其配体 CD40L 在致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 炎症反应中起着

至关重要的作用, COX 是炎症反应中的一个关键酶, 研究发现阿斯匹林 (COX-1 抑制剂) 和选择性 COX-2 抑制剂可延缓 As 进程并对 As 斑块的稳定性产生影响。本实验通过研究 rhCD40L 和 COX 抑制剂 (阿斯匹林和 NS-398) 对人 iv 型胶原 α_2 (iv) 链启动子活性的影响, 从转录水平上阐明它们对 As 进程影响的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

主要仪器包括超净工作台、倒置相差显微镜、CO₂ 培养箱、离心机和紫外分光光度计等。主要试剂: 脂质体转染试剂 (Lipofectamine) 购自 Invitrogen 公

[收稿日期] 2006-07-21 [修回日期] 2007-02-12

[基金项目] 国家 973 子项目 (2005CB523309)

[作者简介] 樊民, 博士, 主要从事冠心病临床和基础研究。李岚, 硕士, 主要从事内分泌疾病研究。通讯作者吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事炎症与动脉粥样硬化关系研究。

司, CAT ELISA 试剂盒购自 Roche 公司, rhCD40L 购自美国 R&D 公司, NS-398 购自美国 Sigma 公司, 限制性内切酶 KpnI 和 Nhe IV 购自 Roche 公司, 人 iv 型胶原 $\alpha_2(\text{iv})$ 链基因启动子重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 由第二军医大学长征医院实验诊断科高春芳教授提供, pCMVSP6 质粒由第二军医大学免疫教研室提供。

1.2 细胞培养和鉴定

组织贴块法行人脐动脉血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 原代培养^[3,4]。培养基为含 10% 新生牛血清和 10% 胎牛血清的 DMEM, 待细胞长成“峰、谷”交错的致密细胞层, 可进行传代培养。取第 3~6 代 VSMC 用于实验。VSMC 的鉴定采用倒置相差显微镜观察活细胞的形态和生长方式以及抗 α 肌动蛋白免疫细胞化学染色检测^[5]。

1.3 质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 的转化、扩增与鉴定

常规制备 JM109 大肠杆菌的感受态细菌并转化 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 质粒; 质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 的扩增与抽提按华舜生物公司小量柱离心式质粒抽提纯化试剂盒操作手册进行; 以特异性限制性内切酶行质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 酶切鉴定; 以分光光度计法定量对所提取的质粒行核酸定量。

1.4 质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 转染人脐动脉血管平滑肌细胞

采用脂质体介导的基因转染技术, 以质粒 pCMVSP6 作为阴性对照, 同时转染 β 半乳糖苷酶 (β -gal) 表达质粒 pSV β -gal (PROMEGA) 作为内对照。脂质体转染试剂 (Lipofectamine) 购自 Invitrogen 公司, 操作按说明书。

1.5 细胞转染后干预

将孔内液体更换为无血清培养基, CO₂ 孵箱静置 5 h 后, 在孔内分别加入终浓度为 100、400 $\mu\text{mol/L}$ 的阿斯匹林和 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NS-398 以及 0.4 mg/L 的 rhCD40L, 并补加血清至 2%, 继续培养 24 h 后测报告基因 CAT 活性。

1.6 CAT 酶联免疫吸附法测定

终止培养的细胞以预冷的 PBS 洗 3 次, 以裂解缓冲液裂解细胞, 进行蛋白定量 (UV280 法)、 β -gal 活性测定 (测活法) 和 CAT ELISA 测定^[1,2]。CAT ELISA 测定参考 CAT ELISA kit (Roche) 说明书进行。所有实验重复三遍, 每次 2 复孔。 β -gal 活性作为内对照以保持转染效率相同条件下比较 CAT 表达量, CAT

测定结果用相应蛋白含量及 β -gal 活性校正后, 以未加入任何细胞因子或药物孔的 CAT 值为 1, 实验孔与之比值作为实验孔 CAT 的相对表达量。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各处理组间比较采用方差分析、SNK 法两两比较。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的鉴定

倒置相差显微镜观察可见活细胞呈 VSMC 典型生长方式, 即细胞呈梭形, 平行生长, 束状排列, 密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状 (图 1)。抗肌动蛋白免疫组织化学染色可见细胞染成棕黄色, 证实为血管平滑肌细胞 (图 2)。

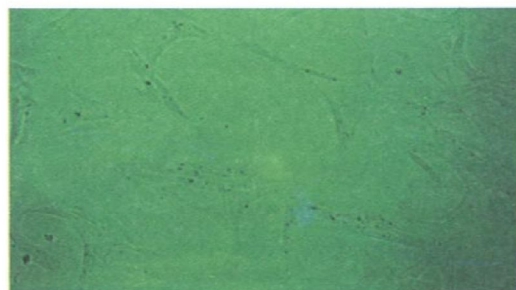


图 1. 人脐动脉平滑肌细胞 ($\times 400$)

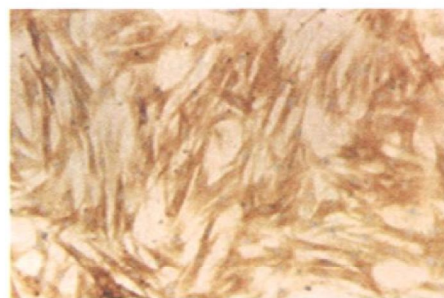


图 2. 平滑肌细胞免疫组织化学染色 ($\times 400$)

2.2 不同药物作用下转染重组体的细胞报告基因表达水平

将 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 重组体转染靶细胞 24 h 后, 撤血清培养 5 h, 分别加入空白对照、0.4 mg/L rhCD40L、100 $\mu\text{mol/L}$ 阿斯匹林和 100 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 培养 24 h, 结果表明 NS-398 和阿斯匹林可增加 pCOLH₂2.4 及 pCOLH₂1.6 的 CAT 表达 ($P < 0.05$); 而 rhCD40L 使 pCOLH₂2.4 及 pCOLH₂1.6 的 CAT 表达下降 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. pCOLH₂2.4 及 pCOLH₂1.6 重组体转染至血管平滑肌细胞后不同药物作用时 CAT 相对表达量 (n=6)

分 组	pCOLH ₂ 2.4	pCOLH ₂ 1.6
对照组	1	1
阿斯匹林组	1.47 ± 0.08 ^a	1.42 ± 0.07 ^a
NS-398 组	1.56 ± 0.12 ^a	1.53 ± 0.11 ^a
rhCD40L 组	0.62 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.03 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 不同浓度的重组人 CD40 配体对转染重组体的细胞报告基因表达水平的影响

将 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 重组体转染靶细胞 24 h 后, 无血清培养 5 h, 分别加入终浓度为 0.1、0.2 和 0.4 mg/L 的 rhCD40L, 补血清至 2%, 培养 24 h 后测 CAT 表达量发现, rhCD40L 可抑制胶原启动子表达, 且呈剂量依赖性, 0.4 mg/L 的 rhCD40L 对启动子活性抑制作用最强 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2. 不同浓度的重组人 CD40 配体对转染重组体的细胞报告基因表达水平的影响

分 组	pCOLH ₂ 2.4	pCOLH ₂ 1.6
对照组	1	1
0.1 mg/L rhCD40L 组	0.83 ± 0.06	0.81 ± 0.05
0.2 mg/L rhCD40L 组	0.74 ± 0.04 ^a	0.75 ± 0.07 ^a
0.4 mg/L rhCD40L 组	0.62 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.03 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.4 NS-398、阿斯匹林与重组人 CD40 配体共同作用对转染重组体细胞报告基因表达的影响

将 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 重组体转染靶细胞 24 h 后, 无血清培养 5 h, 加入终浓度为 0.4 mg/L 的 rhCD40L, 补血清至 2%, 并分别与 100 μmol/L 的 NS-398 和 100 μmol/L 的阿斯匹林共同培养 24 h 后, 测 CAT 相对表达量发现, 0.4 mg/L 的 rhCD40L 可明显抑制胶原启动子的表达 ($P < 0.01$), 而阿斯匹林和 NS-398 可不同程度地逆转此种表达抑制作用 ($P < 0.05$), 且 NS-398 的作用强于阿斯匹林 ($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

高春芳等^[1,2]前期以正常献血员全血基因组 DNA (Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit) 为模板, PCR 扩增得到 5 个具有相同 3' 端的长短分别为 0.2、0.4、0.7、1.6 和 2.4 kb 的片段分别作为启动子, 与

表 3. 不同药物与重组人 CD40 配体共同作用对转染重组体细胞报告基因表达的影响

分 组	pCOLH ₂ 2.4	pCOLH ₂ 1.6
对照组	1	1
rhCD40L 组	0.62 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.03 ^a
阿斯匹林+ rhCD40L 组	0.78 ± 0.04 ^b	0.80 ± 0.07 ^b
NS-398+ rhCD40L 组	0.93 ± 0.06 ^{bc}	0.97 ± 0.04 ^{bc}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.05$, 与重组人 CD40 配体组比; c 为 $P < 0.05$, 与阿斯匹林+ 重组人 CD40 配体组比。

不含启动子的载体 pCAT3-Enhancer 分别组成重组体 pCOLH₂0.2、pCOLH₂0.4、pCOLH₂0.7、pCOLH₂1.6 和 pCOLH₂2.4, 这些重组体经酶切鉴定正确, 即载体均为 4.3 kb 的 pCAT3-enhancer, 插入的启动子长短分别为 0.2、0.4、0.7、1.6 和 2.4 kb, 相应于人前胶原 α₁ (iv) 基因上游 -129~+58 bp、-339~+58 bp、-616~+58 bp、-1476~+58 bp、-2292~+58 bp 序列。经测序, 插入片段与 GenBank 库序列 (Accession No. AF004877) 一致。我们选取 CAT 报告基因活性较高的重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 为研究对象, 研究 rhCD40L 和 COX 抑制剂对胶原启动子活性的影响。

CD40 和 CD40L 在 As 发生和斑块稳定性中的作用近年来日益引起人们的重视。病理研究发现无论早期还是晚期复杂 As 病变中都有 CD40 和 CD40L 的表达, 尤其在斑块易破裂的肩部及破裂的斑块中更为显著^[6,7]。除了限制病变的进展外, 抗 CD40 治疗改变了 As 斑块的组成, 形成了能够促进斑块稳定的形态, 如减少了巨噬细胞和脂质的相对含量, 并同时增加了平滑肌细胞和胶原的含量^[8]。这表明 CD40 系统不仅作为 As 的始动因素, 还是影响 As 斑块稳定性的一个重要因素。一些研究发现选择性 COX-2 抑制剂和阿斯匹林均有斑块稳定作用, 如 Cipollone 等^[9]证明在人有症状的颈动脉斑块中 COX-2 表达增加, 并且有证据显示这种增加可能与基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 诱导的斑块破裂有关。我们前期也发现在人冠状动脉 As 斑块有高表达, 且复合斑块高于纤维斑块^[10]。而其他研究者发现给予 COX-2 抑制剂 rofecoxib 的低密度脂蛋白受体缺失小鼠, As 的范围较对照组 (给予 COX-1 抑制剂吲哚美辛) 明显降低了 25%~50%^[11]。Cyrus 等^[12]发现小剂量阿斯匹林显著降低炎症因子水平伴动脉壁中核因子 κB 活性降低, 降低动脉粥样硬化斑块程度, 同时斑块中巨噬细胞减少、平滑肌细胞增加和胶原含量增加。

胶原含量是影响 As 斑块稳定性的决定因素之一,虽然有关 CD40 系统和 COX 系统与斑块易损性之间的关系研究不少,但有关它们影响胶原合成的直接证据尚不多见,为此我们进行了相应的研究。启动子是基因转录起始所必需的一段 DNA 序列,位于结构基因的上游,是 DNA 分子上可与 RNA 聚合酶特异结合而使转录起始的部位。细胞因子对胶原蛋白基因的激活途径包括与细胞膜上的受体结合,通过信号传导系统,激活核转录因子与胶原基因启动子上的顺式作用元件结合,启动胶原 mRNA 的合成。启动子的激活是信号传导途径的最后一站。本实验针对启动子激活这一环节,在转录水平研究 CD40 系统和 COX 系统对胶原蛋白合成的调控。Horton 等^[13]发现离体情况下 CD40L 完全抑制人血管平滑肌细胞中前胶原表达,但认为这种作用与胶原转录无关而与 MMP 有关。Hui 等^[14]研究发现 NS-398 诱导胶原 α_1 (iv) 表达而外源性前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2) 抑制胶原 α_1 (iv) 表达;转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 诱导 COX-2 mRNA、COX-2 蛋白和 PGE_2 合成;外源性 PGE_2 显著抑制 TGF- β_1 介导的胶原 α_1 (iv) 诱导表达。Han 等^[15]发现 NS-398 逆转衰老引起的皮肤成纤维细胞中 COX-2、 PGE_2 、MMP-1、p38 表达增加和基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 及前胶原降低。我们研究发现 rhCD40L 抑制 iv 型胶原 α_2 (iv) 启动子表达,阿斯匹林和 NS-398 增加 iv 型胶原 α_2 (iv) 启动子活性,同时可以逆转 rhCD40L 对 iv 型胶原 α_2 (iv) 启动子活性的抑制作用,说明 rhCD40L 诱导 iv 型胶原 α_2 (iv) 启动子表达在某种程度上与 COX 有关;而 NS-398 的抑制作用强于阿斯匹林则提示 rhCD40L 的这种效应

可能与 COX-2 的关系更密切。

[参考文献]

- [1] 王皓,高春芳,万伟东,赵文静,孔宪涛. 人 α_2 (iv) 型胶原基因启动子活性研究[J]. 第二军医大学学报, 2000, **21** (8): 711-714.
- [2] 高春芳,李德岩,万伟东,王皓,赵文静,孔宪涛. ELISA 分析人 α_2 (iv) 型胶原基因序列特异性 DNA 结合蛋白[J]. 第二军医大学学报, 2000, **21** (8): 708-710.
- [3] 田雪梅,李进. 人脐动脉血管平滑肌细胞的培养[J]. 解剖科学进展, 1999, **5** (1): 85-86.
- [4] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:西安世界图书出版公司, 1996: 235-240.
- [5] 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1993: 235-249.
- [6] Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability [J]. *Circ Res*, 2001, **89** (12): 1 092-103.
- [7] Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, **12** (1): 27-32.
- [8] Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (13): 7 458-463.
- [9] Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Zucchelli M, et al. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E_2 -dependent matrix metalloproteinase activity [J]. *Circulation*, 2004, **109** (12): 1 482-488.
- [10] 李洪涛,陈倩,吴宗贵,梁春,潘晓明,樊民,等. 诱导型环氧合酶在人冠状动脉粥样硬化组织中的表达分布[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (5): 533-536.
- [11] Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2002, **105** (15): 1 816-823.
- [12] Cyrus S, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2002, **106** (10): 1 282-287.
- [13] Horton DB, Libby P, Schonbeck U. Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 329-336.
- [14] Hui AY, Dannenberg AJ, Sung JJ, Subbaramaiah K, Du B, Olinqa P, et al. Prostaglandin E_2 inhibits transforming growth factor β_1 -mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells [J]. *J Hepatol*, 2004, **41** (2): 251-258.
- [15] Han JH, Roh MS, Park CH, Park KC, Cho KH, Kim KH, et al. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts [J]. *Mech Ageing Dev*. 2004, **125** (5): 359-366.

(此文编辑 许雪梅)