

血小板 CD40 配体对内皮细胞表达组织因子的影响

唐雪元¹, 王建辉², 郑兰香², 伍勇², 陈勇³, 赖少娟², 龙潺¹

(中南大学湘雅三医院 1. 血液科, 2. 检验科; 3. 湖南省现代优生技术重点实验室, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血小板; CD40 配体; 内皮细胞; 组织因子

[摘要] 目的 探讨活化血小板 CD40 配体对内皮细胞表达组织因子、组织因子抑制物的影响及其分子机制。方法 建立活化血小板与人脐静脉内皮细胞的共孵育体系(细胞比例 10:1), 观察内皮细胞组织因子及其抑制物表达的变化, 以及阻断 CD40-CD40 配体相互作用对上述效应的影响。结果 活化血小板与脐静脉内皮细胞共育 8 h 后, 内皮细胞组织因子 mRNA 及蛋白表达显著增高, 而应用抗 CD40 配体的抗体和抗 CD40 抗体可分别抑制其表达 ($P < 0.05$)。但是组织因子抑制物 mRNA 无明显变化。结论 活化血小板可通过其表达的 CD40 配体分子诱导内皮细胞产生组织因子, 但不能增强内皮细胞组织因子抑制物的表达, 此效应对不稳定性斑块的形成可能具有促进作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of CD40 Ligation in Platelets on the Expression of Tissue Factor in Human Endothelial Cells

TANG Xue-Yuan, WANG Jian-Hui, ZHENG Lan-Xiang, WU Yong, CHENG Yong, LAI Shao-Juan, and LONG Chan

(The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

[KEY WORDS] Platelet; CD40 Ligand; Endothelial Cells; Tissue Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of CD40 ligand from activated platelets on the expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in human vascular endothelial cells (hUVEC) and its molecular mechanism. **Methods** Activated platelets and human umbilical vein endothelial cells were co-incubated in the same system, and then the expression of tissue factor and its inhibitor in endothelial cells and the effects of blocking CD40-CD40L signal pathway on their expression were observed. **Result** After 8 hours of the co-incubation of activated platelets and human umbilical vein endothelial cells, tissue factor mRNA and its protein expression level in hUVEC were raised. Nevertheless these effects could be attenuated by CD40L monoclonal antibody and CD40 monoclonal antibody added into media before platelets being induced ($P < 0.05$), but tissue factor pathway inhibitor mRNA expression level in hUVEC was not changed. **Conclusions** Activated platelets could induce the expression of tissue factor in endothelial cells by the expression of CD40L, but could not enhance the expression of tissue factor pathway inhibitor. This indicates that these effects may play a promoting role in unstable plaque formation and the development of atherosclerosis.

组织因子(tissue factor, TF)作为外源性凝血途径的启动因子在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病机理中充当了重要的角色^[1]。很多因素可以诱导 TF 表达增加, 其中 CD40 配体(CD40 ligation, CD40L)与 CD40 这一对免疫系统细胞间信号传递途径是近年来发现的重要机制之一^[2]。CD40L 主要表达于 CD4⁺ T 淋巴细胞, 与其受体 CD40 结合后发挥炎症效应和免疫介导效应, 并且使粘附分子、细胞因子、组织因子等的表达增加^[3]。研究发现活化血小板能够表达 CD40L^[4], 而且其结构特征与 T 淋巴细胞表

达的完全相同^[5]。因此, 本研究采用活化血小板与内皮细胞共孵育的方法来观察血小板 CD40L 对内皮细胞 TF 及组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 血小板的提取与活化

取 3.8% 枸橼酸钠抗凝健康人 ($n = 3$) 静脉血 5 mL, 加入 1 mg/L 前列腺素 E1(Sigma 产品)以防止制备过程中血小板自动活化。离心取上部富含血小板血浆, 离心、洗涤, 重悬于无血清 RPMI 1640 培养基中, 调整血小板计数 $2 \times 10^8/L$ 。以 CD40L 表达水平作为确定血小板活化程度。向血小板悬液中加入 ADP(Sigma 产品) $10 \mu\text{mol/L}$, 37°C 孵育 15 min, 即为活化血小板。流式细胞术测定血小板表达 CD40L 的

[收稿日期] 2008-03-03 [修回日期] 2008-07-07

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(02JJY-3023); 湖南省卫生厅项目(Y02-052)

[作者简介] 唐雪元, 博士, 副教授, 主要研究方向为血栓性疾病病因发病学基础, E-mail 为 xiangyatangxy@yahoo.com.cn。通讯作者郑兰香, 教授, 主要研究方向为动脉粥样硬化形成机制, E-mail 为 lan8618366@yahoo.com.cn。

阳性百分率。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养、鉴定及处理

取健康新生儿脐带 25~30 cm, 用胰蛋白酶消化法提取人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC), 于 DMEM 培养基(含 20% 胎牛血清, 5 μ g/L 内皮细胞生长添加物)中进行原代及传代培养, hUVEC 的鉴定根据 α 1 因子相关抗原免疫组织化学染色阳性。将传代的内皮细胞按 10^8 /L 接种于六孔培养板内, 至汇合状态时按每组 3 复孔进行下列诱导实验: PBS 洗涤细胞 2 次, 分别加入: ①无血清 RPMI1640(阴性对照); ②ADP(10 μ mol/L) + RPMI1640; ③CD40L 单抗(10 mg/L) + ADP 诱导血小板悬液(血小板激活后先加 CD40L 单抗共育 20 min 以抑制血小板 CD40L 的活性再与内皮细胞共育); ④CD40 单抗(10 mg/L) + ADP 诱导血小板悬液; ⑤ADP(10 μ mol/L) 诱导的血小板悬液; ⑥阳性对照脂多糖(5 mg/L); ⑦静息血小板悬液, 各 2.5 mL, 置培养箱孵育 10 h。其中 ①组先加 CD40 单抗与内皮细胞共育 2 h 以阻断 hUVEC 表面的 CD40 分子, 然后吸除 CD40 单抗培养基, PBS 液洗涤 2 遍, 再加 ADP 诱导血小板悬液共孵育。

1.3 流式细胞术检测脐静脉内皮细胞组织因子的表达

各组细胞加入 2 mL 1% 福尔马林溶液固定 30 min 后, PBS 洗涤 2 次, 加入 50 μ L PBS 混匀细胞后, 向各组分别加入 10 μ L FITC-TF 单克隆抗体, 阴性对照加 FITC-IgG 10 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, PBS 洗涤两次, 4% 多聚甲醛固定后测定。上机收集 10 000 个细胞, 荧光强度以对数放大, 结果以 TF 阳性细胞百分率表示。

1.4 脐静脉内皮细胞组织因子 mRNA 和组织因子途径抑制物 mRNA 表达的检测

应用 RT-PCR 法进行检测, Trizol(Gibco) 提取各组细胞总 RNA, 紫外分光光度计上测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.9, 符合 RNA 样品纯度要求。分别取 1 μ g RNA 在 20 μ L 反应体系中逆转录合成 cDNA, 用去离子水稀释 cDNA 产物到 100 μ L 后, 从中取 10 μ L cDNA 于 20 μ L 反应体系中进行 PCR 扩增。TF 引物上游 5'-TTC CTA AGC CTC CGG GAT GT-3', 下游 5'-GCC AGG ATG ATG ACA AGG ATG-3', 产物为 299 bp。TFPI 引物上游 5'-GGA TGC CTG CTG GGC AAT ATG AA-3', 下游 5'-CAT TTC CCC CAC ATC CAC TG-3', 产物为 292 bp。 β -actin 引物上游 5'-CGC GAG AAG ATG ACC CAG AT-3', 下游 5'-GCA CTG TGT GTT GGC GTA CAG G-3', 产物为 550 bp, 以 1.5% 琼脂糖

凝胶电泳, 经紫外成相系统扫描成像并半定量分析。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先作单因素方差分析, 然后进行两两均数比较的 *t* 检验, 多组均数比较应用完全随机设计的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板 CD40 配体表达强度

静息期血小板 CD40L 阳性百分率为 4.5% \pm 2.6%, 活化血小板 CD40L 阳性百分率 32.4% \pm 3.5%, 两者比较差异显著($P < 0.01$)。

2.2 内皮细胞的鉴定

光学显微镜下, 培养 6 天后细胞铺满底板, 呈典型的铺路石样排列, 折光性强(图 1)。通过 α 1 因子相关抗原免疫组织化学染色, 显微镜下细胞质被染成棕黄色, 细胞核为蓝色, 证明该细胞上存在有内皮细胞特有的 α 1 因子相关抗原, 由此证实该细胞属内皮细胞(图 2)。



图 1. 培养第 6 天的内皮细胞

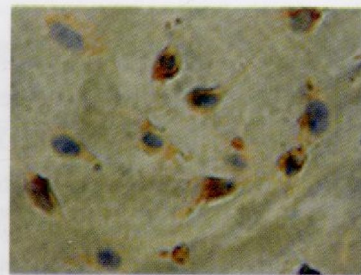


图 2. α 1 因子相关抗原免疫组织化学染色

2.2 脐静脉内皮细胞组织因子 mRNA 的表达

琼脂糖凝胶电泳显示, 未经诱导的 hUVEC 几乎没有 TF 的表达, 受脂多糖作用后表达明显增强; 加入静息血小板与未经诱导的内皮细胞 TF 表达几乎为零, 而活化血小板使 TF mRNA 表达增强的程度与脂多糖刺激组相当。如果先向诱导血小板悬液中加入 CD40L 单抗, 再与 hUVEC 反应, 则其对 hUVEC 的

刺激效果又受到显著抑制。同样,活化血小板刺激 hUVEC 之前先向培养基中加入 CD40 单抗,也能明显抑制 TF mRNA 的表达,但与对照组相比,CD40L 单抗或 CD40 单抗并不能完全阻断活化血小板的刺激效应(图 3)。脂多糖诱导组、活化血小板诱导组的相对光密度值明显要高于其它各组,而 CD40L 或 CD40 单抗组抑制作用均不够完全(图 4)。

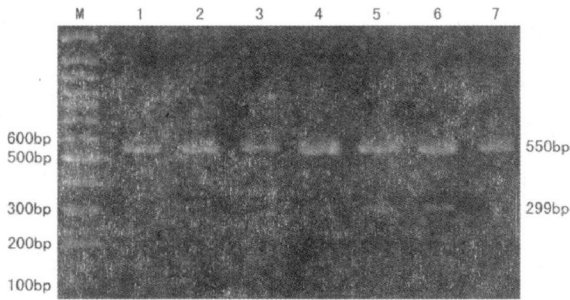


图 3. 组织因子 mRNA 逆转录聚合酶链反应凝胶电泳图
1 为阴性对照组, 2 为 ADP 组, 3 为活化血小板+ CD40L 单抗组, 4 为 CD40 单抗+ 活化血小板组, 5 为活化血小板组, 6 为脂多糖组, 7 为静息血小板组, M 为 100 bp DNA Ladder Marker。

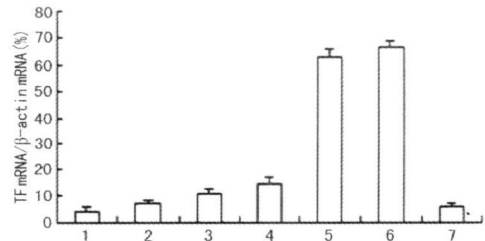


图 4. 组织因子 mRNA 相对光密度均数比较 1 为阴性对照组, 2 为 ADP 组, 3 为活化血小板+ CD40L 单抗组, 4 为 CD40 单抗+ 活化血小板组, 5 为活化血小板组, 6 为脂多糖组, 7 为静息血小板组, M 为 100 bp DNA Ladder Marker。

2.2 血小板 CD40 配体对脐静脉内皮细胞表达组织因子的影响

活化血小板与脂多糖均能显著增强 hUVEC 分泌 TF 蛋白。预先使用 CD40L 或 CD40 单抗后,同样能明显抑制上述刺激效应,但抑制效应不完全。而静息期血小板与单纯 ADP 对 TF 蛋白表达影响不显著(表 1 和图 5)。

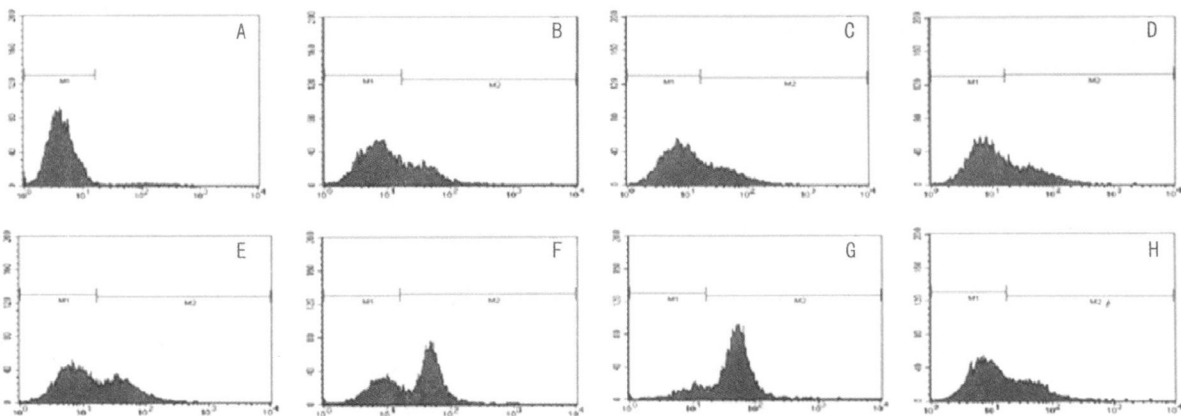


图 5. 组织因子流式细胞术分析图 横坐标为鼠抗人 TF 单克隆抗体荧光强度, 荧光强度与 TF 蛋白含量成正比; 纵坐标为受检细胞数。M2 区域为 TF 阳性细胞所在区域。A 为对照(加 FITC-IgG 单抗); B 为阴性对照组; C 为 ADP 组; D 为活化血小板+ CD40L 单抗组; E 为 CD40 单抗+ 活化血小板组; F 为活化血小板组; G 为加脂多糖组; H 为加静息血小板组。

表 1. 不同条件下脐静脉内皮细胞组织因子的表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 别	TF 阳性细胞百分率
阴性对照组	27.79% \pm 1.96%
ADP 组	28.30% \pm 3.22%
活化血小板+ CD40L 单抗组	33.55% \pm 1.69% ^a
CD40 单抗+ 活化血小板组	39.45% \pm 1.99% ^a
活化血小板组	64.05% \pm 4.12% ^b
脂多糖组	77.48% \pm 3.68% ^b
静息血小板组	33.24% \pm 1.92%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

2.3 脐静脉内皮细胞组织因子途径抑制物 mRNA 的表达

未经诱导的 hUVEC45 表达 TFPI, 加入静息血小板或活化血小板后对 TFPI mRNA 的表达无明显改变。而在诱导血小板悬液中加入 CD40L 单抗或者在活化血小板刺激 hUVEC 之前先向培养基中加入 CD40 单抗再一起孵育或者单纯加 ADP, TFPI mRNA 的表达也无明显变化(图 6 和 7)。

3 讨论

在 As 斑块形成过程中, TF 作为 因子、因子的受体充当了一个极其重要的角色。TF 是一种广

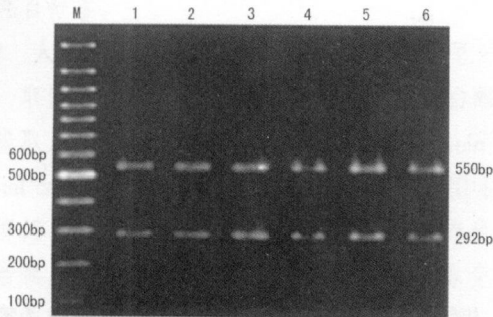


图6. 组织因子途径抑制物 mRNA 逆转录聚合酶链反应凝胶电泳图 1 为阴性对照组, 2 为 ADP 组, 3 为活化血小板 + CD40L 单抗组, 4 为 CD40 单抗 + 活化血小板组, 5 为活化血小板组, 6 为静息血小板组, M 为 100 bp DNA Ladder Marker。

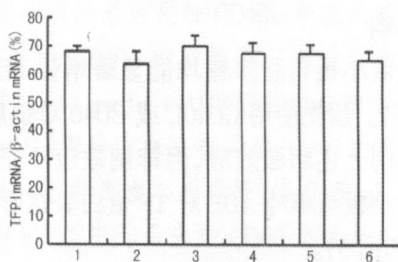


图7. 组织因子途径抑制物 mRNA 相对光密度均数比较 ($n = 3$) 1 为阴性对照组, 2 为 ADP 组, 3 为活化血小板 + CD40L 单抗组, 4 为 CD40 单抗 + 活化血小板组, 5 为活化血小板组, 6 为静息血小板组, M 为 100 bp DNA Ladder Marker。

泛存在于人体细胞中分子量为 47 kDa 的细胞膜糖蛋白, 是生理性和病理性凝血的启动者^[5,6]。正常情况下, 内皮细胞表面并不表达 TF, 但如果炎症细胞浸润增加, 局部 T 淋巴细胞经 CD40L 分子与 CD40 结合可使内皮细胞、巨噬细胞分泌大量 TF^[7], 启动外源性凝血途径并且反过来使得斑快脂质体中的内皮细胞脱落导致血栓形成^[8]。新近研究还发现, 活化血小板也能表达免疫调节分子 CD40L, 并且血液中超过 95% 的可溶性 CD40L 来源于血小板^[9]。在急性心肌梗死血栓斑块中血小板大量聚集, 可溶性 CD40L 显著增加^[3], 并且其分布与内皮 TF 表达共消长, 提示血小板可能与 TF 的表达有关。

在本研究中, 采用活化血小板与能表达 CD40 的内皮细胞共孵育后, TF mRNA 及蛋白表达都明显增强, 而采用相应 CD40 或 CD40L 单抗后, 此效应受

到显著抑制, 说明阻断 CD40L-CD40 信号途径, 可有效抑制活化血小板对内皮细胞表达 TF 的诱导作用。本研究结果还发现, 虽然活化血小板能诱导 TF 的表达, 但使用 CD40L 单抗、特别是 CD40 单抗后, 其抑制作用并不完全, 提示 CD40L-CD40 相互作用可能不是活化血小板诱导内皮细胞表达 TF 的唯一途径, 其他表达在血小板表面的膜性分子也可能参与了此过程。

Ottl 等^[10] 研究发现, As 患者体内 TFPI 的表达也增加, 因此本研究进一步分析血小板 CD40L 对内皮细胞 TFPI mRNA 表达的影响。结果发现, 活化血小板并不能够改变内皮细胞 TFPI mRNA 的表达, 从而从另一个角度说明了血小板 CD40L-内皮细胞 CD40 信号传递途径主要与 As 局部血栓斑块的形成有关。因此, 是否可以通过阻断 CD40-CD40L 这条信号传递途径减少 TF 的表达来预防 As 斑块局部血栓的形成有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, et al. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Thromb Haemost*, 1997, **78** (2): 200-204.
- [2] Grau AJ, Lichy C, Amin J, et al. Stroke and the CD40-CD40 ligand system: at the hinge between inflammation and thrombosis [J]. *Stroke*, 2003, **34** (6): 1417-418.
- [3] Hakkinen T, Karkola K, Yla-Herttuala S. Macrophages, smooth muscle cell, 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 [J]. *Virchows Arch*, 2000, **437** (4): 396-405.
- [4] Freedman JE. CD40-CD40L and platelet function [J]. *Circulation Research*, 2003, **92** (5): 944-952.
- [5] Viles-Gonzalez JF, Anand SX, Zafar MU, et al. Tissue factor coagulation pathway: A new therapeutic target in atherothrombosis [J]. *Cardiovasc Pharmac*, 2004, **43** (5): 669-676.
- [6] Brummett-Ziedins, Vossen CY, Saulius Butenas, et al. Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, **3** (11): 2497-505.
- [7] Van Der Wal AC, Li X, de Boer OJ. Tissue factor expression in the morphologic spectrum of vulnerable atherosclerotic plaques [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2006, **32** (1): 40-47.
- [8] Yuko Kamikuraa, Hideo Wadab, Tsutomu Noborib, et al. Elevated levels of leukocyte tissue factor mRNA in patients with venous thromboembolism [J]. *Thromb Res*, 2005, **116** (4): 307-312.
- [9] Danese S, Katz JA, Saibeni S, et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients [J]. *Gut*, 2003, **52** (10): 1435-441.
- [10] Ottl I, Andrassy M, Zieglsberger D, et al. Regulation of monocyte pro-coagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 [J]. *Blood*, 2001, **97** (12): 3721-726.

(此文编辑 陈临溪, 文玉珊)