

# OX40-OX40L 信号对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉斑块中亲环素 A 表达的影响

伍超, 严金川, 逯朝阳, 徐丽华, 王中群, 袁伟

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] OX40-OX40L 信号; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 亲环素 A; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 观察 OX40-OX40L 信号对载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠颈动脉粥样硬化斑块内亲环素 A (CyPA) 表达的影响。**方法** 采用颈动脉硅胶圈植入法快速诱导 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化斑块形成, 48 只雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分成抑制组、刺激组、对照组, 刺激组腹腔注射鼠抗 OX40 200 μg, 抑制组腹腔注射鼠抗 OX40L 200 μg, 对照组腹腔注射 IgG2b 200 μg, 均每周一次, 连续 6 周。分别采用免疫组织化学、Western blot 和 qRT-PCR 检测小鼠颈动脉斑块内 CyPA 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉置管并 6 周高脂饮食后, 对照组可见斑块形成, 部分内膜和中膜增厚, 弹力板变形, 刺激组颈动脉斑块面积与对照组相比显著增加, 而抑制组颈动脉斑块面积明显减少。与对照组相比, 刺激组颈动脉斑块内 CyPA 蛋白和 mRNA 表达明显增强, 而抑制组颈动脉斑块内 CyPA 蛋白和 mRNA 表达明显减弱。**结论** OX40-OX40L 信号能调控 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉斑块中 CyPA 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of OX40-OX40L Signal on the Expression of Cyclophilin A in Atherosclerotic Plaque of ApoE<sup>-/-</sup> Mice

WU Chao, YAN Jin-Chuan, LU Zhao-Yang, XU Li-Hua, WANG Zhong-Qun, and YUAN Wei

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] OX40-OX40L Signal; Apolipoprotein E Gene Knockout Mice; Cyclophilin A; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate effect of OX40-OX40L signal on the expression of cyclophilin A (CyPA) in atherosclerotic plaque of apolipoprotein E gene knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice. **Methods** Atherosclerotic plaque model was produced by perivascular carotid collar placement in ApoE<sup>-/-</sup> mice. 48 male ApoE<sup>-/-</sup> mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine. Subsequently, the right common carotid artery was separated, and Silicone Collar was placed on the right common carotid artery. ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomly allocated to inhibition group (intraperitoneal injection of anti-OX40L 200 μg, once a week, 6 weeks), stimulation group (intraperitoneal injection of anti-OX40 200 μg, once a week, 6 weeks) and control group (intraperitoneal injection of IgG2b 200 μg, once a week, 6 weeks), mice were sacrificed after high fat diet and intraperitoneal injection of antibodies was received for 6 weeks. The expression of CyPA protein and mRNA levels in atherosclerotic plaque were detected by immunohistochemistry, Western blot, qRT-PCR, respectively. **Results** Dealing with perivascular carotid collar placement and high fat diet in ApoE<sup>-/-</sup> mice after 6 weeks, plaque formation, part of intima and media thickening and elastic lamina deformation were detected in control. Compared with control group, the carotid sections of plaque area of stimulation group were significantly increased, while those in inhibition group were significantly decreased, the expressions of CyPA protein and mRNA were significantly increased in atherosclerotic plaque ( $P < 0.05$ ). However, after intraperitoneal injection of anti-OX40L to inhibit OX40-OX40L ligand, the expressions of CyPA protein and mRNA were significantly decreased in atherosclerotic plaque ( $P <$

[收稿日期] 2014-01-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81170279, 81370409); 江苏省自然科学基金及创新团队基金(BK2011486, LJ201116); 江苏省六大人才高峰项目(W5-074); 镇江市心血管病重点实验室项目(SS2012002)

[作者简介] 伍超, 硕士研究生。王中群, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化研究。通讯作者严金川, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事急性冠状动脉综合征的基础与临床研究, E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。

0.05)。**Conclusion** The expression of CyPA in ApoE<sup>-/-</sup> mice is modulated by the OX40-OX40L signal.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是多种炎症细胞和细胞因子参与的血管慢性非特异性炎症过程<sup>[1,2]</sup>。其中肿瘤坏死因子超家族成员中的 OX40-OX40L 是 As 形成过程中重要的共刺激分子<sup>[3]</sup>。OX40L 是 OX40 的特异性配体,主要表达在巨噬细胞、活化的 B 细胞、血管平滑肌细胞以及血管内皮细胞上<sup>[4]</sup>。已有研究显示,OX40 能够活化血管平滑肌细胞产生炎症细胞因子、趋化因子及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)等,进而启动并加剧 As 的炎症反应<sup>[5]</sup>。我们前期研究显示,OX40-OX40L 相互作用能促进载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E gene knockout, ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠斑块的形成与发展,诱导淋巴细胞激活与增殖,并激活淋巴细胞活化 T 细胞核因子 C1 表达<sup>[6,7]</sup>。亲环素 A (cyclophilin A, CyPA)是一种氧化应激诱导的分泌因子,对炎症细胞有趋化作用,诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多,促进巨噬细胞和平滑肌细胞增殖和迁移并激活炎症信号通路参与 As 形成。在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的 As 斑块中发现大量 CyPA 表达,而 ApoE<sup>-/-</sup> Ppia<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样斑块明显减小<sup>[8]</sup>。CyPA 还可调节泡沫细胞 MMP-2、MMP-9 的表达,增加 As 斑块血栓形成,提示 CyPA 与 As 斑块不稳定性相关<sup>[9,10]</sup>。既然 OX40-OX40L 和 CyPA 均与斑块的形成关联,它们之间是否存在联系尚不清楚。因此,本研究以 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 斑块为模型,体内干预 OX40-OX40L 轴后,观察斑块形成及 CyPA 的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

8 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,体重约 20 g,购自美国 Jackson 实验室。硅胶管购自 Dow Corning 公司;高脂饲料(0.3% 胆固醇,15% 可可脂)购自上海斯莱克公司;同型对照 IgG2b 购自 Multiscience 公司;抗 CyPA 多克隆抗体、鼠抗 OX40 和抗 OX40L 购自 Abcam 公司;Trizol mRNA 提取液和 PCR 引物购自 Sangon 公司;β-actin 抗体购自 Proteintech Group 公司;逆转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒购自 TaKaRa 公司;PCR 上下游引物由上海捷瑞生物公司合成;羊抗兔 HRP 标记的二抗购自康为试剂公司;防脱载玻片和盖玻片购自世泰实验器材有限公司。

1.2 实验分组

48 只 8 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠腹腔注射麻醉后,切开皮肤,分离出右侧颈动脉,用 0.4 mm 硅胶圈(内径 0.3 mm)快速包绕颈动脉(外径 0.36 mm)使颈动脉狭窄 30% 诱导 As 斑块模型形成。随机分三组:抑制组、刺激组 and 对照组,刺激组腹腔注射鼠抗 OX40 200 μg,每周一次,连续 6 周;抑制组腹腔注射鼠抗 OX40L 200 μg,每周一次,连续 6 周;对照组腹腔注射 IgG2b 200 μg,每周一次,连续 6 周。高脂饮食喂养 6 周,并同时腹腔注射功能性抗体进行干预。

1.3 标本收集

6 周后,小鼠脱颈处死后,取硅胶管内颈动脉,部分用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋,用于 HE 染色和免疫组织化学分析;部分颈动脉 -70℃ 冻存用于 Western blot 和 RT-PCR。

1.4 免疫组织化学分析

颈动脉石蜡切片进行 HE 染色和免疫组织化学分析,HRP 标记二抗,光学显微镜观察可见颈动脉内斑块的变化和 CyPA 呈现棕黄色表达。颈动脉斑块面积和内膜/中膜比用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析,免疫组织化学结果判断依据阳性细胞密度及免疫显色强度综合计分。每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,每视野计数 100 个细胞,计算 CyPA 阳性细胞百分率。阳性细胞少于 5% 记 0 分,5% ~ 25% 记 1 分,26% ~ 49% 记 2 分,50% ~ 75% 记 3 分,大于 75% 记 4 分;显色强度记 0 ~ 3 分:细胞内无着色记 0 分,细胞内淡黄色记 1 分,棕黄色者记 2 分,棕褐色记 3 分;将两项指标评分相加,分 4 级:阴性(-)为 0 ~ 1 分,弱阳性(+)为 2 ~ 3 分,中等阳性(++)为 4 ~ 5 分,强阳性(+++)大于 5 分。

1.5 qRT-PCR 检测 CyPA 表达

-70℃ 冰冻的颈动脉置于冰上研磨,提取总 RNA,按试剂盒方法进行扩增,CyPA 上游引物 5'-TGG TGA CTT TAC ACG CCAT-3',下游引物 5'-CTT CCA CAA TGT TCAT GCC TT-3'。β-actin 上游引物 5'-CCT GAG CGC AAG TAC TCT GT GT-3',下游引物 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'。扩增条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 5 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,CyPA PCR 进行 40 个循环,β-actin PCR 进行 35 个循环。结果采取 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析。

1.6 Western blot 检测 CyPA 表达

冰冻的颈动脉置于冰上研磨,超声提取总蛋白,用 Bradford 法进行蛋白定量,取 50 μg 上样,于 12%

聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶在摆动平台中室温摇 1 h 封闭。将膜封闭,加入用 TBST 稀释的(1:1000)一抗兔抗鼠的多克隆抗体 CyPA(1:1000)和  $\beta$ -actin(1:3000)抗体,室温振荡 1 h 后,置于 4℃ 冰箱过夜。次日,以 TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,再加入羊抗兔 HRP 标记的二抗(1:1000),室温孵育 1 h 后,用 TBST 漂洗 3 次,每次 15 min。取试剂盒中的 A 液与 B 液,按 1:1 的比例混匀后,滴于 PVDF 膜上封闭 2 min。ECL 显色系统定影显色,观察杂交条带,同时运用 Champchemi 分子成像系统扫描条带并读取灰度值。

1.7 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析, $P$

$<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干预 OX40-OX40L 信号后 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉斑块形态变化

对照组 6 周高脂饮食后,斑块明显增加,部分内膜和中膜增厚,弹力板变形。与对照组相比,腹腔注射抗 OX40 刺激 OX40-OX40L 信号 6 周后颈动脉斑块面积明显增加,内膜/中膜比例明显增大( $P < 0.05$ ),而腹腔注射抗 OX40L 抑制 OX40-OX40L 信号 6 周后颈动脉斑块面积明显减少,内膜/中膜比例明显降低( $P < 0.05$ ;图 1)。

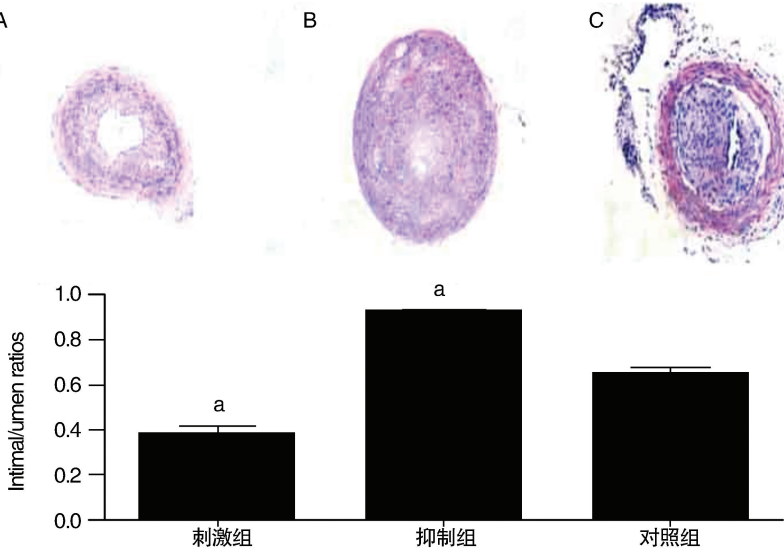


图 1. 颈动脉 HE 染色 (  $\times 100$ , 上图) 和内膜/管腔比值(下图) ( $n = 6$ ) A 为抑制组, B 为刺激组, C 为对照组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比。

Figure 1. Carotid artery HE staining (  $\times 100$ , above) and intimal/lumen ratio(below) ( $n = 6$ )

2.2 干预 OX40-OX40L 信号后 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠斑块中 CyPA 的表达

腹腔注射抗 OX40 刺激 OX40-OX40L 信号 6 周后,小鼠颈动脉斑块中 CyPA 表达较对照组明显增

强( $P < 0.05$ )。而腹腔注射抗 OX40L 抑制 OX40-OX40L 信号 6 周后,小鼠颈动脉斑块中 CyPA 表达较对照组明显减弱( $P < 0.05$ ;表 1 和图 2)。

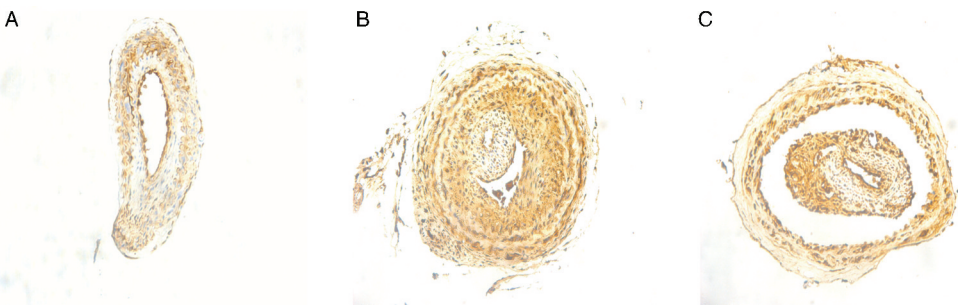


图 2. 免疫组织化学分析颈动脉斑块 CyPA 的表达 (  $\times 100$ ,  $n = 6$ ) A 为抑制组, B 为刺激组, C 为对照组。

Figure 2. The CyPA expression in carotid artery plaques by immunohistochemical analysis(  $\times 100$ ,  $n = 6$ )

表 1. 颈动脉斑块中 CyPA 的免疫组织化学分析( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 1. Immunohistochemical analysis of CyPA in carotid artery plaque( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分 组	CyPA 阳性细胞率	免疫显色强度	表达强度
对照组	48.4% $\pm$ 1.6%	淡黄色	中表达
刺激组	81.2% $\pm$ 8.3% <sup>a</sup>	棕黄色	高表达
抑制组	2.1% $\pm$ 10.6% <sup>a</sup>	褐黄色	低表达

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比。

2.3 干预 OX40-OX40L 信号后 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉斑块中 CyPA mRNA 和蛋白的表达

与对照组相比,腹腔注射抗 OX40 刺激 OX40-OX40L 信号 6 周后 CyPA 蛋白(约 1.38 倍,  $P < 0.05$ )和 mRNA(约 1.67 倍,  $P < 0.05$ )表达明显增加;而腹腔注射抗 OX40L 抑制 OX40-OX40L 信号 6 周后 CyPA 蛋白(约 0.29 倍,  $P < 0.05$ )和 mRNA(约 0.54 倍,  $P < 0.05$ )表达明显减少(图 3)。

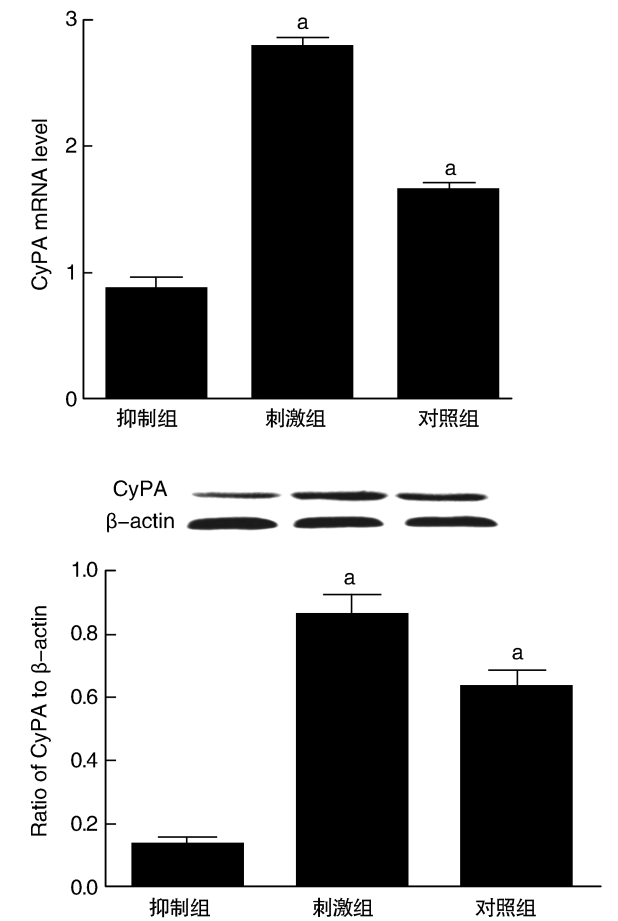


图 3. 干预 OX40-OX40L 信号后小鼠颈动脉斑块内 CyPA 的蛋白和 mRNA ( $n=10$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比。  
Figure 3. Expression of CyPA mRNA and protein in carotid artery plaques by intervention of OX40-OX40L signal

3 讨 论

As 是很多病理因素共同参与的复杂病理过程,包括炎症细胞浸润和脂质沉积,其中炎症细胞的相互作用起关键作用,特别是 T 细胞介导的免疫应答是一系列炎症反应的中心环节<sup>[11,12]</sup>,在 As 的形成及斑块进展中起关键作用。OX40-OX40L 是肿瘤坏死因子受体-配体超家族成员之一,近年来研究发现 OX40-OX40L 为促进 As 形成的关键共刺激分子,可以促进 T 细胞分化、增殖和分泌大量的炎症因子,从而促进 As 斑块发展。我们前期研究发现,与 OX40-OX40L 同一家族的 CD137-CD137L 通过活化 T 细胞核因子 1(NFATc1)调控 As 斑块的形成<sup>[13]</sup>,并且应用特异性抗体抗 OX40L 阻断 OX40-OX40L 轴可抑制小鼠 As 斑块的发展<sup>[6]</sup>。众多研究表明,OX40-OX40L 是促进 As 斑块发生、发展和破裂的一个信号级联反应。

CyPA 属亲免疫蛋白家族,是最早发现的一种亲环素酶,具有高度保守性,广泛分布在原核及真核生物的绝大多数组织中,CyPA 在外界刺激下可由血管平滑肌细胞分泌至细胞外。Sato 等<sup>[14]</sup>通过对血管平滑肌细胞来源的 CyPA 转基因小鼠模型进行研究,表明血管平滑肌细胞来源的细胞外 CyPA 提高了血管平滑肌细胞的增殖及迁移,进而加剧了粥样硬化斑块的形成。同时对单核细胞炎症性募集,造成斑块内大量炎症细胞聚集,使斑块不稳定<sup>[15,16]</sup>。我们在体内研究证实,在急性冠状动脉综合征患者血清中高表达 CyPA, CyPA 水平与冠状动脉复杂狭窄相关, CyPA 是急性冠状动脉综合征冠状动脉斑块不稳定的独立预测因素<sup>[17]</sup>;同时我们也发现急性冠状动脉综合征患者 OX40L 表达明显增加,OX40L 水平升高提示患者预后不良,发生主要不良心血管事件增加<sup>[18]</sup>。动物模型中也证实 OX40-OX40L 相互作用能促进 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠斑块的形成与发展,并诱导淋巴细胞激活<sup>[6]</sup>。因此,我们推测 CyPA 可能与 OX40-OX40L 轴存在内在关联。

本研究采用腹腔注射抗体分别刺激和抑制 OX40-OX40L 信号,观察 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉斑块形成及 CyPA 表达的变化。与对照组相比,腹腔注射抗 OX40 抗体刺激 OX40-OX40L 信号可见颈动脉斑块形成明显增加,斑块中 CyPA 表达增强;而腹腔注射抗 OX40L 抑制 OX40-OX40L 信号,颈动脉斑块形成受到抑制,斑块中 CyPA 表达明显减弱;并进一步在分子水平证实 OX40-OX40L 轴可以在转录和蛋白水平调控 CyPA 表达。综上所述,As 是慢性非特



异性炎症,本研究从模型鼠体内证实了 CyPA 是受 OX40-OX40L 信号调控的下游分子并促进 As 的发生、发展。这为阻断 OX40-OX40L 通路治疗冠心病提供新的源头防治靶点。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340 (2): 115-126.
- [2] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime [J]. Nat Med, 2002, 8 (11): 1 211-217.
- [3] Compaan DM, Hymowitz SG. The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex[J]. Structure, 2006, 14 (8): 1 321-330.
- [4] Brocker T, Gulbranson Judge A, Flynn S, et al. CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles[J]. Eur J Immunol, 1999, 29 (5): 1 610-616.
- [5] Wang X, Ria M, Kelmenson PM, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influence atherosclerosis susceptibility [J]. Nat Genet, 2005, 37 (4): 365-372.
- [6] Yan J, Su H, Xu L, et al. OX40-OX40L Interaction promotes proliferation and activation of lymphocytes via NFATc1 in ApoE-deficient mice[J]. PLoS One, 2013, 8 (4): 1-7.
- [7] Yan JC, Xu LJ, Wang CP, et al. Effects of OX40-OX40L interaction on the nuclear factor of activated T cells c1 in ApoE-deficient mice [J]. Inflammation, 2014, 37 (1): 205-213.
- [8] Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, et al. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Exp Med, 2011, 208 (1): 53-66.
- [9] 廖明芳, 景在平, 丁茹, 等. 动脉粥样硬化血栓形成疾病的发病机制进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 26 (2): 106-109.
- [10] 唐其东, 吴平生, 侯玉清, 等. 血浆基质金属蛋白酶 2 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 水平变化与急性冠状动脉综合征的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (5): 391-394.
- [11] 李庆, 陈珂, 徐修才, 等. 急性冠脉综合征患者外周免疫细胞的变化及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21 (21): 2 611-615.
- [12] 夏妍, 杨永宗. IFN $\gamma$  在动脉粥样硬化形成中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28 (2): 118-121.
- [13] 严金川, 杨海兵, 苏红玲, 等. CD137-CD137L 相互作用对小鼠 NFATC1 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28 (7): 1 181-186.
- [14] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Circulation, 2008, 117 (24): 3 088-098.
- [15] 袁伟, 严金川, 梁仪, 等. 亲环素 A 启动单核细胞炎症性募集的机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (9): 971-976.
- [16] 冯莉萍, 宋涛, 夏豪. 动脉粥样硬化斑块内新生血管与斑块稳定性之间的关系研究[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16 (8): 1 174-176.
- [17] Yan J, Zang X, Chen R, et al. The clinical implications of increased cyclophilin A levels in patients with acute coronary syndromes [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413 (7): 691-695.
- [18] Yan J, Gong J, Chen G, et al. Evaluation of serum soluble OX40 ligand as a prognostic indicator in acute coronary syndrome patients[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411 (21-22): 1 662-665.

(此文编辑 文玉珊)