

OX40-OX40L 相互作用对小鼠平滑肌细胞亲环素 A 表达的影响

逯朝阳, 严金川, 伍超, 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 配体; 血管平滑肌细胞; 亲环素 A; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 观察 OX40-OX40 配体 (OX40L) 相互作用对小鼠主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 亲环素 A (CyPA) 表达的影响。**方法** 小鼠 VSMC 采用组织块贴壁法原代培养; 应用实时荧光定量 PCR 和流式细胞术检测 OX40L mRNA 和蛋白表达水平; 细胞内、外 CyPA 水平分别采用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 方法检测。**结果** 肿瘤坏死因子 α + 脂多糖联合处理小鼠 VSMC, 细胞 OX40L mRNA 和蛋白表达呈时间依赖性, mRNA 表达在 24 h (5.967 ± 0.252 比 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$) 达到高峰, 蛋白表达在 36 h (61.900 ± 2.551 比 20.967 ± 0.451 , $P < 0.05$) 增加最显著; 可溶性 OX40 处理 VSMC 后, CyPA mRNA 表达呈时间依赖性并在 90 min 达到高峰 (1.799 ± 0.098 比 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$), 2 h 后细胞培养上清中可检测到高水平的 CyPA (1.119 ± 0.059 比 0.281 ± 0.038 , $P < 0.05$), 而细胞内 CyPA 表达较对照组无明显差异; 抗 OX40L 预处理细胞可显著抑制可溶性 OX40 诱导的 CyPA mRNA (1.105 ± 0.091 比 1.799 ± 0.098 , $P < 0.05$) 及蛋白 (0.635 ± 0.040 比 1.119 ± 0.059 , $P < 0.05$) 表达。**结论** OX40-OX40L 相互作用可影响 VSMC CyPA 的分泌。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

Effect of OX40-OX40 Ligand Interaction on the Expression of Cyclophilin A in Mice Vascular Smooth Muscle Cells

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

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

[KEY WORDS] OX40 Ligand; Vascular Smooth Muscle Cell; Cyclophilin A; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of OX40-OX40 ligand (OX40L) interaction on the expression of cyclophilin A (CyPA) in mice aortic vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** Patch-attaching method was used for primary culture of mouse aortic VSMC. The expression of OX40L mRNA and protein in VSMC were measured by real-time quantitative PCR (RT-PCR) and flow cytometry (FCM), respectively. The levels of CyPA inside and outside of the VSMC was determined by RT-PCR and Western blot. **Results** The expression of OX40L mRNA and protein was time-dependently induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α) plus lipopolysaccharide (LPS), the mRNA expression peaked at 24 h (5.967 ± 0.252 vs 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$), and the expression of protein peaked at 36 h (61.900 ± 2.551 vs 20.967 ± 0.451 , $P < 0.05$). The expression of CyPA mRNA was time-dependently induced by soluble OX40 (sOX40), and peaked at 90 minute (1.799 ± 0.098 vs 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$). And abundant CyPA was gained in supernatant at 2 h (1.119 ± 0.059 vs 0.281 ± 0.038 , $P < 0.05$), whereas, we didn't observe the change of CyPA protein inside the VSMC compared to the control. Notably, the sOX40 revulsive elevations of mRNA (1.105 ± 0.091 vs 1.799 ± 0.098 , $P < 0.05$) and protein (0.635 ± 0.040 vs 1.119 ± 0.059 , $P < 0.05$) can be blocked by anti-OX40L monoclonal antibody. **Conclusion** OX40-OX40 ligand interaction could affect the secretion of CyPA in VSMC.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种由多种炎症细胞和细胞因子参与的动脉血管的慢性非

[收稿日期] 2013-11-22

[基金项目] 国家自然科学基金 (81170279、81370409); 江苏省自然科学基金 (BK2011486); 江苏省科教兴卫工程 (LJ201116); 镇江市心血管病重点实验室项目 (SS2012002)

[作者简介] 逯朝阳, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 luzhaoyang_923@126.com。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基础与临床研究, E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。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。

特异性炎症性疾病^[1-3]。随着其机制研究的深入,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体-配体家族在 As 发生、发展中的作用成为众多学者关注的焦点。OX40-OX40 配体(OX40-OX40L)是肿瘤坏死因子超家族中的重要成员之一^[4],近年来研究提示 OX40-OX40L 这一对受体-配体参与了 As 斑块的形成和发展。我们在动物模型中证实, ApoE^{-/-}小鼠斑块形成过程中亲环素 A(cyclophilin A, CyPA)表达显著增高,而阻断 OX40-OX40L 轴能明显抑制 ApoE^{-/-}小鼠的斑块形成^[5],并且斑块中 CyPA 表达明显减少。CyPA 是一种氧化应激诱导分泌的炎症因子,通过刺激炎症细胞的迁移,促使活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多,增进巨噬细胞和平滑肌细胞的增殖及激活炎症信号通路;CyPA 可在不稳定斑块中高表达,并从中扮演促炎和促 As 发生分子,参与 As 斑块发生、发展^[6]。我们在动物模型中也发现沉默表达 ApoE^{-/-}小鼠斑块中 CyPA 能明显抑制斑块的形成,并减少斑块中炎症因子的表达^[7]。因此,推测 As 斑块形成过程中 CyPA 可能是受 OX40-OX40L 轴调控的下游分子。为证实这一设想,我们在细胞水平通过激活和抑制 OX40-OX40L 轴后,观察 CyPA 是否受该轴的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠,体重 20~22 g,由江苏大学动物中心提供。DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自 Gibco 公司,可溶性 OX40(soluble OX40, sOX40)蛋白购自 R&D 公司,抗 OX40L 单克隆抗体、PE(phycoerythrin)标记的抗鼠 CD252(OX40 配体)抗体、PE 标记的抗鼠 IgG2b K 同型对照抗体均购自 eBioscience 公司, α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体购自 Santa Cruz 公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)二抗购自北京中杉金桥公司,CyPA 多克隆抗体购自 Abcam 公司, β -actin 抗体购自 Proteintech Group 公司,羊抗兔二抗购自 Vazyme 公司, TNF- α 购自 Peprotech 公司,II 型胶原酶、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)由 Sigma 公司提供,Trizol 试剂购自 Inventrogen 公司,逆转录试剂盒及荧光定量试剂盒均购自 TaKaRa 公司。PCR 上下游引物由上海捷瑞生物公司合成。八连管购自 Thermo 公司,ECL 发光液、Ultrafree-0.5 超滤离心管均购自 Millipore 公司,细胞培养瓶、培养板及培养皿均购自 Corning 公司。

其他试剂均为国产分析纯。

1.2 血管平滑肌细胞分离、培养及鉴定

取正常的 C57BL/6J 小鼠 2~3 只,颈椎脱臼致死,75% 乙醇浸泡消毒 5 min,固定后剪开胸腹部,分离并剪下胸主动脉,PBS 清洗去除血凝块,置 II 型胶原酶中 37°C 5~7 min,去除血管外膜纤维脂肪组织。纵行剪开血管,轻刮血管内膜 2~3 遍,然后将血管剪成约 1 mm² 大小碎片。将组织块转入并均匀贴壁于细胞培养瓶底面,加入 5 mL 含 20% FBS 的 DMEM 培养基,倒置 1 h 后翻转,置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,待细胞从组织块周围游离后,每隔 3 天更换培养基。待细胞相互汇合,铺满瓶底后,消化传代,免疫荧光染色法鉴定其纯度,留取 3~8 代细胞进行实验。

1.3 血管平滑肌细胞 OX40L 的诱导

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中培养,待其贴壁后,饥饿 24 h,用含 10% FBS + TNF- α (终浓度 10 μ g/L) + LPS(终浓度 100 μ g/L)的 DMEM 培养基分别培养细胞 0、4、8、12、24、36、48 h 后,收获细胞用于 OX40L mRNA 和蛋白的检测。

1.4 激活/抑制 OX40-OX40L 轴

VSMC 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中培养,待其贴壁后,饥饿 24 h,用含 10% FBS + TNF- α (终浓度 10 μ g/L) + LPS(终浓度 100 μ g/L)的 DMEM 培养基培养细胞 36 h 后,随机分为 3 组:(1)对照组:无血清 DMEM 处理;(2)sOX40 组:用溶于 DMEM 的 sOX40(终浓度 1 mg/L)处理;(3)抗 OX40L + sOX40 组:用溶于 DMEM 的抗 OX40L(终浓度 1 mg/L)预处理 30 min 后加入 sOX40(终浓度 1 mg/L)处理。各组加入不同试剂后孵育,90 min 及 2 h 分别收获细胞及上清液用于 CyPA mRNA 和蛋白的检测。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

按实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-PCR)试剂盒提供的方法进行,OX40L 上游引物:5'-CCTGATACTCTCTGCGAACACC-3',下游引物:5'-AAGAACCTGTGTCCCGTCCA-3',产物长度 158 bp;磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物:5'-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3',下游引物:5'-TGTGAGG-GAGATGCTCAGTG-3',产物长度 200 bp;CyPA 上游引物:5'-TGGTGACTTTACACGCCAT-3',下游引物:5'-CTTCCACAATGTTTCATGCCTT-3',产物长度 230

bp。RT-PCR 扩增条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 5 s,59℃ 30 s,95℃ 10 s,65℃ 5 s,40 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析。

1.6 流式细胞术检测

收集不同处理时间点的细胞进行免疫荧光染色,并事先预留一个未处理细胞孔以作同型对照组,消除细胞表面 Fc 端受体对荧光抗体的非特异性吸附。流式细胞仪检测前处理过程如下:将 OX40L 单克隆抗体及其同型对照抗体按照使用说明书进行稀释,使其终浓度达到 5 mg/L。收集各处理组细胞 1×10^6 个,PBS 洗涤 1 遍,分别加入稀释后抗体 100 μ L,4℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 遍,洗去未吸附抗体。取细胞悬液用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司,CELLQuest 分析软件)检测血管平滑肌细胞表面 OX40L 蛋白表达量。各个处理组 OX40L 的表达以扣除同型对照组非特异性吸附值为准。

1.7 Western blot 分析

取上述收集的细胞裂解物标本(总蛋白 100 μ g)与样本缓冲液作用,94℃ 变性 5 min 后,12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离蛋白,再以 350 mA 恒流转印至二氟化树脂(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜;膜置于含 5% 脱脂牛奶的 TBS/T 室温封闭 1 h。再分别用相应的兔抗鼠 CyPA(1:500)、兔抗鼠 β -actin 抗体(1:3000)4℃ 孵育过夜。次日用 TBS/T 洗涤 3 次,每次 15 min;采用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔 IgG(1:10000)37℃ 孵育 1 h,TBS/T 洗涤 3 次,每次 15 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。细胞上清蛋白提取:收集细胞上清,以 800 g 离心力离心 10 min,去除细胞碎片,经 Ultrafree-0.5 超滤离心管浓缩 100 倍,余步骤同上。

1.8 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 17.0 进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单向方差分析及 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α + LPS 处理 VSMC OX40L mRNA 及蛋白表达的时效性

TNF- α + LPS 处理 VSMC 不同时间点后,细胞 OX40L mRNA 及蛋白表达上调,并且呈时间依赖性

(图 1、图 2)。RT-PCR 结果显示:与 0 h 相比,OX40L mRNA 在 24 h 升高最显著(5.967 ± 0.252 比 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$, $n = 3$);流式细胞术分析结果显示:TNF- α + LPS 处理 VSMC 后,细胞表面 OX40L 表达明显上调,与 0 h 相比,在 36 h 升高最明显(61.900 ± 2.551 比 20.967 ± 0.451 , $P < 0.05$, $n = 3$)。

2.2 激活/抑制 OX40-OX40L 轴对 VSMC CyPA 表达的影响

与对照组相比,sOX40(1 mg/L)处理 VSMC 90 min 后,细胞内 CyPA mRNA 合成明显升高(1.799 ± 0.098 比 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$, $n = 3$);细胞培养 2 h 后条件培养基(conditioned medium,CM)上清中 CyPA 蛋白的表达也显著上调(1.119 ± 0.059 比 0.281 ± 0.038 , $P < 0.05$, $n = 3$)。而采用抗 OX40L 单抗(1 mg/L)预处理细胞 30 min 后加入 sOX40(1 mg/L),CyPA mRNA(1.105 ± 0.091 比 1.799 ± 0.098 , $P < 0.05$, $n = 3$)表达及细胞上清中 CyPA 蛋白(0.635 ± 0.040 比 1.119 ± 0.059 , $P < 0.05$, $n = 3$)水平均明显受到抑制(图 3)。而处理前后,总细胞裂解(total cell lysates,TCL)CyPA 蛋白表达无明显差异。

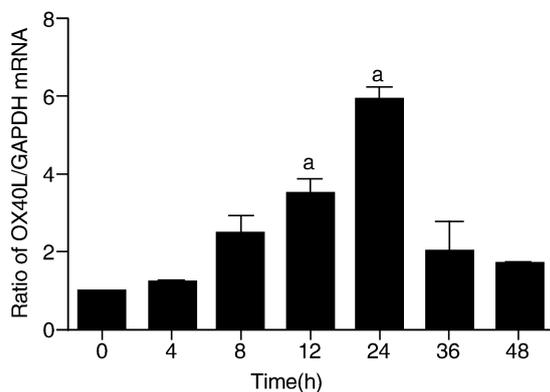


图 1. TNF- α + LPS 处理 VSMC OX40L mRNA 表达的时效性($n = 3$) a 为 $P < 0.05$,与 0 h 比较。

Figure 1. Time course of TNF- α plus LPS induced expression of OX40L mRNA in mouse VSMC ($n = 3$)

3 讨论

动脉粥样硬化的发生、发展是多种炎症细胞及细胞因子共同参与、相互作用的复杂病理过程,其中炎症细胞的相互作用起关键作用^[8],OX40-OX40L 作为肿瘤坏死因子受体-配体家族中的成员

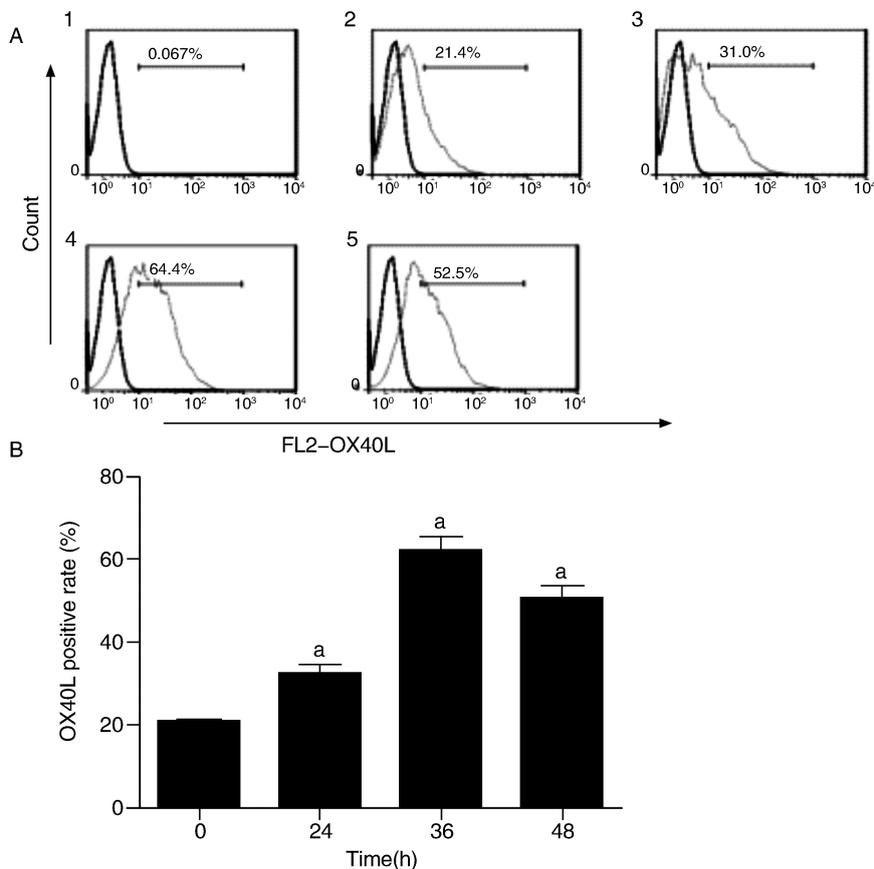


图 2. TNF-α + LPS 处理 VSMC OX40L 蛋白表达的时效性 (n = 3) A 为流式细胞术结果图, B 为根据流式细胞术结果作的统计图。1 为同型对照组, 2 为对照组, 3 为 TNF-α + LPS 处理 24 h, 4 为 TNF-α + LPS 处理 36 h, 5 为 TNF-α + LPS 处理 48 h。a 为 P < 0.05, 与 0 h 比较。

Figure 2. Time course of TNF-α plus LPS induced expression of OX40L protein in mouse VSMC (n = 3)

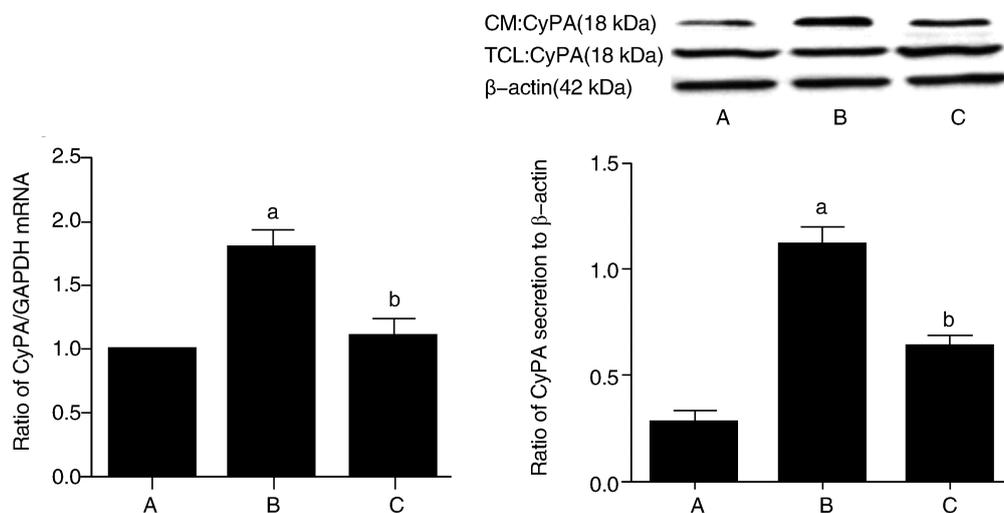


图 3. 激活/抑制 OX40-OX40L 轴对小鼠 VSMC CyPA mRNA 及蛋白表达的影响 (n = 3) A 为对照组, B 为 sOX40 组, C 为抗 OX40L + sOX40 组。a 为 P < 0.05, 与对照组比较; b 为 P < 0.05, 与 sOX40 组比较。

Figure 3. The effect of stimulation/inhibition of OX40-OX40L axis on expression of CyPA mRNA and protein in mouse VSMC (n = 3)

之一, 与 As 的发生、发展关系极为密切。研究表明: 敲除 OX40L 基因可明显抑制 ApoE^{-/-} 基因缺陷小

鼠 As 斑块的进展;而应用抗 OX40L 阻断 OX40-OX40L 轴后,可明显抑制低密度脂蛋白受体基因缺陷小鼠 As 斑块的形成^[9]。

亲环素 A 是一种高度保守的多功能蛋白质,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 VSMC 分泌至细胞外。Sato 等^[10]通过对 VSMC 来源的 CyPA 转基因小鼠模型进行研究,表明 VSMC 来源的细胞外 CyPA 提高了 VSMC 的增殖及迁移,进而加剧了粥样硬化斑块的形成。我们体内研究证实,在急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者血清中高表达 CyPA, CyPA 水平与冠状动脉狭窄相关, CyPA 是 ACS 冠状动脉斑块不稳定的独立预测因素^[11]。我们在动物模型中也证实,刺激 OX40-OX40L 轴,在 ApoE^{-/-}小鼠斑块形成过程中, CyPA 表达增加。有学者研究^[12,13]表明,刺激 OX40-OX40L 轴可诱导淋巴细胞激活与增殖,激活淋巴细胞活化 T 细胞核因子 C1(nuclear factor of activated T cell C1, NFATC1)表达;而阻断该轴能明显抑制 ApoE^{-/-}小鼠的斑块形成^[5],并且斑块中 CyPA 表达明显减少。因此,我们推测 As 斑块形成过程中 CyPA 可能是受 OX40-OX40L 轴调控的下游分子。

本实验中我们以 C57BL/6J 小鼠平滑肌细胞为模型,通过炎症刺激因子 TNF- α + LPS 刺激 VSMC 上调 OX40L 表达后,在细胞水平分别以 sOX40 和抗 OX40L 激活或抑制 OX40-OX40L 轴后,观察小鼠 VSMC 表达和分泌 CyPA 的变化。结果发现:激活细胞 OX40-OX40L 轴后, VSMC 内 CyPA mRNA 的合成及细胞上清分泌 CyPA 均明显上调。抗 OX40L 抑制细胞 OX40-OX40L 轴后, VSMC 内 CyPA mRNA 及细胞上清中 CyPA 的分泌显著降低;而刺激前后细胞内 CyPA 蛋白表达未见明显差异,提示 CyPA 的促炎作用是通过分泌到细胞外起作用,其详细机制有待进一步探讨。上述结果表明:激活/抑制 VSMC OX40-OX40L 轴可调控 CyPA 的分泌, CyPA 可能是该轴的下游分子。

[参考文献]

- [1] 李晶, 裘毅钢, 张蓉, 等. 炎症因子在人动脉粥样硬化组织的表达分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 215-217.
- [2] 杨树, 郭富强. CXC 趋化因子配体 16 及其受体与动脉

粥样硬化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(9): 852-856.

- [3] 马晔, 关瑞锦. 基质细胞衍生因子 1 及其受体 4 与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(3): 323-324.
- [4] Compaan DM, Hymowitz SG. The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex[J]. Structure, 2006, 14(8): 1321-330.
- [5] Xu L, Yan J, Wang B, et al. Effect of the costimulatory molecules OX40-OX40 ligand interaction on the expression of NFATC1 in leukocytes of apolipoprotein E-deficient mice [J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2011, 39(6): 526-530.
- [6] Sato K, O'Dell MR, Liao DF, et al. Cyclophilin A is a novel pro-inflammatory cytokine that accelerates development of atherosclerosis[J]. Circulation, 2008, 118(18): S309-S310.
- [7] Yan J, Li Y, Wang C, et al. Regression of atherosclerotic plaques after lentivirus-mediated RNA interference of cyclophilin A in ApoE^{-/-} mice[J]. Int J Cardiol, 2013, 169(5): e87-e90.
- [8] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1685-695.
- [9] van Wanrooij EJ, van Puijvelde GH, de Vos P, et al. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low density lipoprotein receptor deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(1): 204-210.
- [10] Sato 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): 3088-098.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 徐良洁, 严金川, 王标, 等. NFATC1 与 OX40-OX40L 在 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化中的表达及意义[J]. 江苏医药, 2011, 37(12): 1384-387.

(此文编辑 曾学清)