

人冠状动脉粥样硬化病灶内 CD40L 水平与 病灶结构变化的关系

耿俊梅¹, 万昌武², 乐翠云³, 刘江金³, 王 玉², 黄 江³

(贵州医科大学 1.病理学教研室, 2.法医学教研室, 3.法医司法鉴定中心, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 冠状动脉粥样硬化; CD40L; 基质金属蛋白酶 9; 病灶结构

[摘要] **目的** 观察人冠状动脉粥样硬化病灶结构变化、CD40L、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白表达水平,探讨 CD40/CD40L 信号在人冠状动脉粥样硬化发生发展中的作用。**方法** 收集不同程度粥样硬化的人冠状动脉血管 60 例作为实验组,以 12 例无病变的人冠状动脉为对照组,常规 HE 染色观察两组人群冠状动脉的组织结构并用图像分析软件检测病灶结构的相关指标,免疫组织化学染色检测 CD40L、MMP-9 蛋白表达水平,分析 CD40L、MMP-9 表达水平与动脉硬化病灶结构变化之间的关系。**结果** 发生粥样硬化的冠状动脉 CD40L 表达均增强,其表达主要分布于斑块肩部和底部的泡沫细胞。同时病灶内 MMP-9 表达水平增高并与 CD40L 水平、病灶大小尤其是坏死灶的大小呈正相关,MMP-9 表达水平与纤维帽厚度无明显相关性。随着 MMP-9 水平增高,纤维帽厚度/内膜最大厚度比值降低。**结论** 人冠状动脉粥样硬化病灶内 CD40L、MMP-9 表达水平明显增强,CD40L 可能通过促进 MMP-9 表达,使血管病灶内细胞外基质分解加强,从而促进病变的进展及坏死灶的扩大,使粥样病灶稳定性下降。

[中图分类号] R361.1⁺2

[文献标识码] A

Relationship between CD40L level and lesion structure in human coronary atherosclerotic lesions

GENG Jun-Mei¹, WAN Chang-Wu², LE Cui-Yun³, LIU Jiang-Jin³, WANG Yu², HUANG Jiang³

(1.Department of Pathology, 2.Department of Forensic Medicine, 3.Medicolegal Expertise Center, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] Coronary artery atherosclerosis; CD40L; Matrix metalloproteinase-9; Lesion structure

[ABSTRACT] **Aim** To observe the structural changes of human coronary atherosclerotic lesions and the expression of CD40L and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) protein, and to explore the role of CD40/CD40L signaling in the development of human coronary atherosclerosis. **Methods** 60 cases of human coronary artery with different degrees of atherosclerosis were collected as experimental group, and 12 cases without pathological changes were as control group. HE staining was used to observe the histological structure of coronary artery in the two groups, and image analysis software was used to detect the related indexes of the lesion structure. The expression levels of CD40L and MMP-9 protein were detected by immunohistochemical staining. The relationship between the expression of CD40L and MMP-9 and the structural changes of atherosclerotic lesions were analyzed. **Results** The expression of CD40L protein was enhanced in all the atherosclerotic coronary artery, and it was mainly expressed in the foam cells of the plaques shoulder and bottom. Moreover, the expression level of MMP-9 protein in the lesion was increased and it was positively correlated with the CD40L expression and the lesion size especially the necrosis size. There was no correlation between the expression level of MMP-9 and the thickness of fibrous cap. The ratio of fibrous cap thickness to the maximum intimal thickness was decreased with the increase of MMP-9 level. **Conclusions** The expressions of CD40L and MMP-9 protein are significantly enhanced in the human coronary atherosclerotic lesions. CD40L may promote the expression of MMP-9, to strengthen the extracellular matrix decomposition in vascular lesions, so as to promote the development of lesions and the enlargement of necrotic fo-

[收稿日期] 2017-01-03

[修回日期] 2017-01-16

[基金项目] 贵州省高校工程技术研究中心建设项目(黔科合 KY 字[2013]114)

[作者简介] 耿俊梅,硕士研究生,研究方向为分子病理学,E-mail 为 505604870@qq.com。通讯作者万昌武,教授,硕士研究生导师,研究方向为分子病理学,E-mail 为 2886503694@qq.com。

ci, thus the stability of atherosclerotic lesions is decreased.

冠状动脉粥样硬化占冠状动脉病变的 95%~99%,是引发冠心病的最主要原因。目前许多研究显示冠状动脉粥样硬化血管的结构改变,尤其是斑块稳定性的改变是冠心病发病及发展的重要因素^[1],但导致斑块稳定性变化的原因及机制至今未能完全阐明。Mach 等^[2-3]研究发现,CD40/CD40L 系统参与动脉粥样硬化病灶内的炎症反应、粥样斑块形成和血栓形成的多个环节,其他学者的研究也得出类似的结论^[4-6],但此类研究大多基于动物模型、人体影像学观察或血清学检测等间接研究得出的结果。本研究旨在通过尸体检验收集人体冠状动脉血管组织,直接检测冠状动脉粥样硬化灶内 CD40/CD40L 通路表达水平,分析其与冠状动脉血管结构变化的关系,深入探讨 CD40/CD40L 通路在人体冠状动脉病变中的作用,为冠心病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 病例材料收集

收集贵州医科大学法医司法鉴定中心 2014 年 1 月至 2015 年 12 月经尸体解剖证实有冠状动脉粥样硬化的病例为实验组,以同期非自然死亡且无冠状动脉粥样硬化者为对照组。病例纳入标准:(1)死亡 48 h 以内或冰冻保存 7 日以内解剖的尸体;(2)解剖检验及组织学检查确证冠状动脉存在动脉硬化病变。病例排除标准:(1)组织自溶、结构不清的病例;(2)具有恶病质或多器官功能障碍的病例;(3)脓毒血症、败血症等感染性炎症性疾病。按上述标准共收集冠状动脉血管组织 72 例,其中实验组 60 例,取肉眼检查见冠状动脉狭窄最重段血管组织;对照组 12 例,统一取冠状动脉前降支的血管组织。

1.2 仪器与试剂

光学显微镜(Olympus,日本),全自动切片扫描显微镜-数字切片扫描系统[MoticBA600,麦克奥迪(厦门)]。兔抗人 CD40L、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)单克隆抗体(CST,美国),PV-9001 兔超敏二步法免疫组织化学检测试剂、Tris/EDTA 修复液(pH 9.0)(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国)。

1.3 血管组织病理学观察与形态计量学分析

经中性福尔马林(体积分数 10%)固定的血管

组织,常规石蜡包埋切片,厚约 4 μm ,HE 染色,光镜下观察血管组织结构变化,并在显微镜下拍照,通过 IPP 6.0 图像分析软件检测冠状动脉管壁厚度、管腔狭窄程度[管腔狭窄程度=内膜面积/(内膜面积+管腔面积)]、粥样坏死灶的大小及继发病变的范围等指标。

1.4 血管壁 CD40L、MMP-9 蛋白表达测定

采用免疫组织化学染色 PV 两步法。经中性福尔马林(体积分数 10%)固定的血管组织,常规石蜡包埋,4 μm 厚度切片,脱蜡,水化,消除内源性过氧化物酶,采用 EDTA(质量分数 10%)修复液(pH 9.0)高压热修复抗原 3 min,分别加兔抗人 CD40L(1:100)、MMP-9(1:300)单克隆抗体,4℃ 孵育过夜,其后按照 PV9001 说明书步骤操作,采用 DAB 显色,Mayer 苏木素复染,脱水,透明,封片。光镜下 CD40L、MMP-9 在内膜中泡沫细胞的阳性表达为细胞质中有棕黄色着色,在 400 倍下随机选取 5 个视野拍照,以平均光密度值反应蛋白表达水平。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行处理,正态计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示;多组间均数比较采用 F 检验,其中方差齐性采用 LSD 法,不符合方差齐性采用 Games-Howell 法;指标间相关分析,服从正态分布者采用 Pearson 积矩相关系数检验,不服从正态分布者采用 Spearman 秩相关系数检验,双侧检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 病例基本情况

按纳入及排除标准收集到实验组共 60 例,其中男 49 例,女 11 例,年龄 22~83 岁,平均 49.9 ± 13.7 岁,发病高峰年龄 35~55 岁;按血管病理变化分期:脂纹期 8 例,纤维斑块期 18 例,粥样斑块期 15 例,继发病变期 19 例。对照组 12 例,其中男 11 例,女 1 例,年龄 24~72 岁,平均 41.4 ± 14.3 岁。

2.2 冠状动脉的病理变化

对照组血管管壁薄,内膜、中膜、外膜各层结构厚度均匀一致,内膜平滑完整。实验组肉眼呈现从脂纹期到继发病变期的不同变化,病变使血管壁不同程度增厚、管腔不同程度狭窄,部分病灶内可见钙化、出血、血栓等;光镜下轻者仅见泡沫细胞增生,血管壁厚度及管腔无明显改变;重者出现明显

粥样坏死灶,甚至斑块内出血或血栓形成,血管壁显著增厚,管腔明显狭窄(图 1)。

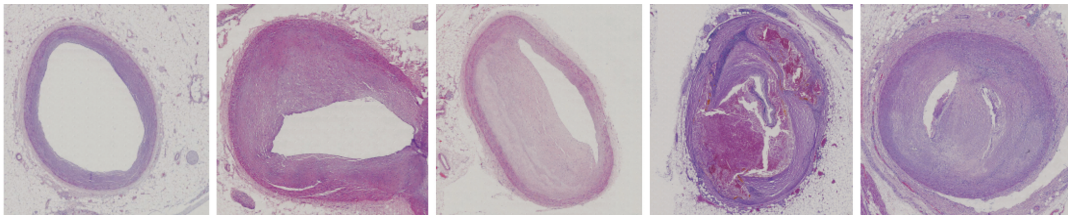


图 1. 冠状动脉粥样硬化的镜下变化(HE 染色,40×) 从左到右依次为脂纹期、纤维斑块期、粥样斑块期、继发病变期斑块内出血、继发病变期血栓形成。

Figure 1. Microscopic changes of coronary atherosclerosis (HE staining, 40×)

2.3 冠状动脉结构变化的形态计量学分析

图像分析显示,实验组冠状动脉内膜最大厚度、纤维帽厚度、坏死厚度及管腔狭窄程度各期比

较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,实验组各期上述指标均升高,且随病理分期的进展呈现递增趋势,以晚期病理变化为明显(表 1)。

表 1. 冠状动脉病变形态学指标比较

Table 1. Comparison of morphological indexes of coronary artery lesion

分 组	<i>n</i>	内膜最大厚度(μm)	纤维帽厚度(μm)	坏死厚度(μm)	管腔狭窄程度(%)
对照组	12	2.17±0.82	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
脂纹期	8	3.79±2.15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.25±0.16
纤维斑块期	18	8.44±3.75 ^{ab}	4.50±3.40 ^{ab}	0.00±0.00	0.45±0.18 ^a
粥样斑块期	15	11.17±4.14 ^{ab}	4.12±2.47 ^{ab}	3.99±2.53 ^{abc}	0.59±0.17 ^{ab}
继发病变期	19	15.42±4.91 ^{abcd}	5.07±2.46 ^{ab}	6.99±4.59 ^{abc}	0.77±0.14 ^{abcd}

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与脂纹期比较;c 为 $P<0.05$,与纤维斑块期比较;d 为 $P<0.05$,与粥样斑块期比较。

2.4 冠状动脉 CD40L、MMP-9 蛋白的表达水平

对照组血管壁未见 CD40L 蛋白表达。在实验组,随着脂纹期到继发病变期的不同变化,可见 CD40L 阳性表达量逐渐增多,表现为病灶肩部及底部泡沫细胞胞浆中棕黄色颗粒(图 2)。检测血管 CD40L 蛋白阳性表达光密度值,与对照组比较,实验组显著增高($P<0.05$);进一步按病理变化分级统计,显示实验组粥样斑块期、继发病变期 CD40L 明显高于对照组,且继发病变期 CD40L 明显高于脂纹期、纤维斑块期(表 2)。

对照组可见 MMP-9 蛋白少量表达于中膜平滑肌细胞及内膜的泡沫细胞,呈棕黄色。实验组可见 MMP-9 大量表达于泡沫细胞,以粥样斑块边缘、纤维帽下明显,少量表达于中膜平滑肌细胞(图 2)。检测血管 MMP-9 蛋白阳性表达光密度值,与对照组比较,实验组显著增高($P<0.05$);进一步分析,显示实验组纤维斑块期、粥样斑块期、继发病变期 MMP-9 表达水平明显高于对照组,且粥样斑块期、继发病变期明显高于纤维斑块期(表 2)。

表 2. 冠状动脉病灶 CD40L、MMP-9 蛋白表达的光密度值

Table 2. Optical density of CD40L and MMP-9 protein expression in coronary artery lesion

分 组	<i>n</i>	CD40L	<i>n</i>	MMP-9
对照组	6	0.0010±0.0005	5	0.0010±0.0003
脂纹期	5	0.0021±0.0006	5	0.0015±0.0007
纤维斑块期	11	0.0027±0.0012	12	0.0025±0.0012 ^a
粥样斑块期	14	0.0033±0.0013 ^a	15	0.0046±0.0016 ^{abc}
继发病变期	13	0.0049±0.0019 ^{abcd}	12	0.0051±0.0021 ^{abcd}

因实验过程中掉片或染色不佳等,一些样本未进入统计分析,故表中样本数少于实际例数。a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与脂纹期比较;c 为 $P<0.05$,与纤维斑块期比较;d 为 $P<0.05$,与粥样斑块期比较。

2.5 CD40L、MMP-9 蛋白表达与冠状动脉病灶结构改变的相关性分析

CD40L、MMP-9 蛋白表达与坏死厚度、继发病变面积、内膜最大厚度呈正相关($P<0.05$;表 3)。CD40L 与 MMP-9 亦呈正相关($r=0.592,P=0.000$)。将对照组、实验组各期的坏死厚度/内膜最大厚度、

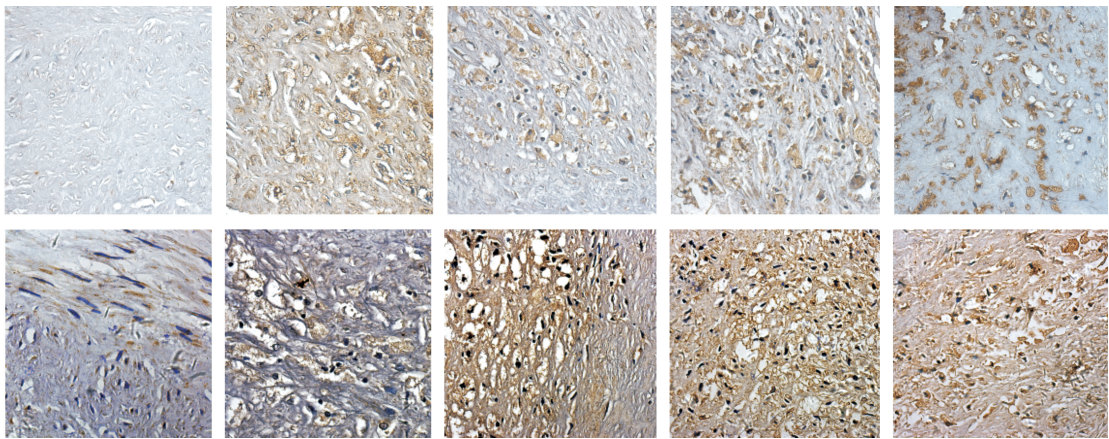


图 2. 冠状动脉粥样硬化 CD40L、MMP-9 蛋白表达(免疫组织化学染色,400×) 上排图为 CD40L,下排图为 MMP-9。从左到右依次为对照组、实验组脂纹期、纤维斑块期、粥样斑块期、继发病变期。

Figure 2. Expression of CD40L and MMP-9 protein in coronary atherosclerosis(immunohistochemical staining, 400×)

纤维帽厚度/内膜最大厚度比值、CD40L 及 MMP-9 蛋白表达水平作折线图,对照组与脂纹期无纤维帽形成,进入纤维斑块期才出现纤维帽,在粥样斑块期与继发病变期略有下降;CD40L 及 MMP-9 蛋白表达水平从对照组到继发病变期呈现逐渐上升的趋势(图 3)。

表 3. CD40L、MMP-9 与冠状动脉结构参数的相关性分析
Table 3. Correlation analysis of CD40L, MMP-9 and coronary artery structural parameters

参 数	CD40L		MMP-9	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
坏死厚度	0.660	0.000	0.519	0.000
继发病变面积	0.539	0.000	0.377	0.004
内膜最大厚度	0.586	0.000	0.271	0.042

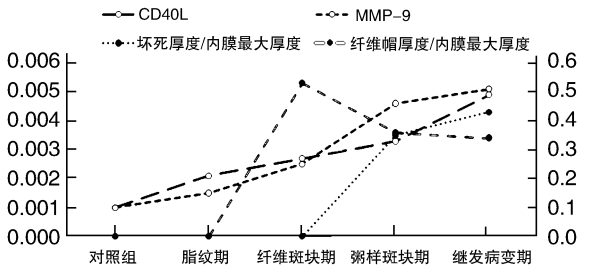


图 3. CD40L、MMP-9 和冠状动脉结构参数的折线图 左纵轴数值为 CD40L、MMP-9 光密度值,右纵轴数值为坏死厚度/内膜最大厚度、纤维帽厚度/内膜最大厚度比值。

Figure 3. Line graph of CD40L, MMP-9 and coronary artery structural parameters

3 讨 论

冠状动脉粥样硬化的基本病变是血管壁内脂

质沉积、内膜表面纤维组织增生及病灶内发生粥样坏死,病变导致血管壁增厚、管腔狭窄,上述病变进行性发展可直接导致血管闭塞,或继发病灶内出血、血栓形成、血管痉挛等,均可导致血液通过量急剧减少而引发冠心病。但有研究发现冠心病的发生与冠状动脉的狭窄程度无必然关系,而与病变血管斑块的稳定性密切相关,而斑块的稳定性又与斑块的炎症反应水平相关^[7]。

CD40L 又称 T 细胞 B 细胞活化分子,属肿瘤坏死因子超家族成员,与其受体 CD40 是一对互补的跨膜糖蛋白,在机体的免疫应答中起重要作用^[8]。CD40L⁺T 细胞可与 CD40L⁺内皮细胞、B 细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞及单核巨噬细胞等相互作用产生多种生物学效应^[9],如促进 T 细胞游走与黏附,增加 T 细胞金属蛋白酶的产生和 CD40L 的表达,促进成纤维细胞的基质增多及产生白细胞介素 6,参与局部组织重建,活化巨噬细胞诱导其分泌促炎因子等。

对急性冠状动脉综合征患者的血清学研究显示,患者血清 CD40L 水平明显升高^[10]。有学者在主动脉及颈动脉粥样硬化斑块内检测出 CD40L 表达,并认为其可能是不稳定斑块的标志物^[11-13]。研究显示,在动物实验中应用抗血小板药物及特异性单克隆抗体抗 CD40L 阻断 CD40/CD40L 信号可明显抑制动脉粥样硬化病变的进展^[14]。本研究显示对照组血管壁均无 CD40L 表达,而在冠状动脉硬化患者,无论病变处于哪一期均可见 CD40L 表达,阳性表达的细胞主要是病灶内泡沫细胞,阳性细胞主要分布于粥样斑块的肩部及底部,这一结果直接证实冠状动脉粥样硬化时病灶内 CD40/CD40L 信号系统表达增强。本研究结果还显示 CD40L 表达水平随着病人冠状动脉粥样病

变的不断进展而增强,尤其与血管病灶大小特别是坏死区大小呈正相关,而与纤维帽厚度/内膜最大厚度比值无相关性,但随着 CD40L 水平增高,纤维帽厚度/内膜最大厚度比值有降低趋势。提示 CD40/CD40L 信号系统在血管病灶的发展尤其是坏死灶的形成与扩大过程中发挥作用。

有研究表明 CD40/CD40L 信号可活化巨噬细胞,诱导其合成并分泌 MMP^[15-16]。生理状态下血管平滑肌细胞同时微量表达 MMP 与组织金属蛋白酶抑制物,二者 1:1 共价结合,共同调节细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成与降解,维持 ECM 的动态平衡^[17-18]。血清学检测发现急性冠状动脉综合征患者血清 MMP-9 表达明显增强^[19-20]。本研究结果显示冠状动脉粥样硬化血管组织内 MMP-9 水平增高,且与 CD40L 水平存在正相关关系,与血管病灶大小、坏死区大小、纤维帽厚度/内膜最大厚度比值均存在相关性,提示 CD40/CD40L 信号作用促进 MMP-9 表达增强,后者通过降解 ECM 使纤维帽强度减弱,坏死灶形成及扩大,斑块变得易损而稳定性降低。

总之,本研究证实人冠状动脉粥样硬化病灶内 CD40L、MMP-9 表达水平明显增强,推测 CD40L 促进 MMP-9 表达,使血管病灶内 ECM 分解加强,从而促进病变的进展及坏死灶的扩大,粥样硬化病灶稳定性下降。

[参考文献]

- [1] Souza CF, Doi H, Mintz GS, et al. Morphological changes and clinical impact of unstable plaques within untreated segments of acute myocardial infarction patients during a 3-year follow-up: an analysis from the HORIZONS-AMI trial [J]. *Coron Artery Dis*, 2015, 26 (6): 469-475.
- [2] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expression on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implication for CD40/CD40L ligand signaling in atherosclerosis [J]. *Practice Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(5): 1 931-936.
- [3] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling [J]. *Nature*, 1998, 394(6689): 200-203.
- [4] Eivazi S, Bagheri S, Hashemzadeh MS, et al. Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1 668-678.
- [5] Chen C, Chai H, Wang X, et al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells [J]. *Blood*, 2008, 112 (8): 3 205-216.
- [6] Hassan GS, Merhi Y, Mourad W. CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases [J]. *Immunobiology*, 2012, 217(5): 521-532.
- [7] Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability [J]. *J Intern Med*, 2015, 278(5): 483-493.
- [8] Zhang B, Wu T, Chen M, et al. The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease [J]. *Immunol Lett*, 2013, 153(1-2): 58-61.
- [9] Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, et al. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(5): 438-448.
- [10] Gremmel T, Frelinger AL 3rd, Michelson AD. Soluble CD40 ligand in aspirin-treated patients undergoing cardiac catheterization [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (8): e0134 599.
- [11] 严金川, 吴宗贵, 仲人前, 等. CD40/CD40L 共同表达于人内皮细胞及人动脉粥样斑块中 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 19(8): 1 021-024.
- [12] Setianto BY, Hartopo AB, Achadiono DN, et al. Association between levels of circulating soluble CD40 ligand on admission and in-hospital events among acute coronary syndrome patients [J]. *Acta Med Indones*, 2011, 43(2): 82-87.
- [13] Grufman H, Schiopu A, Edsfeldt A, et al. Evidence for altered inflammatory and repair responses in symptomatic carotid plaques from elderly patients [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 177-182.
- [14] 张峻, 陈纪林, 顾晴, 等. 抗血小板药物与阻断 CD40 信号对动脉粥样硬化的影响 [J]. *中国循环杂志*, 2008, 23(1): 57-61.
- [15] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappa B signaling pathways [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12 (8): 695-708.
- [16] 李建军, 马清峰, 张静, 等. 高血压患者颈动脉粥样硬化与其血清 CD40/CD40L 及 MMP-9 水平的关系 [J]. *微循环学杂志*, 2014, 24(1): 32-34.
- [17] Mittal R, Patel AP, Debs LH, et al. Intricate functions of matrix metalloproteinases in physiological and pathological conditions [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231 (12): 2 599-621.
- [18] Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis [J]. *Matrix Biol*, 2015, S44-S46: 247-254.
- [19] 康彬, 陈树涛, 冯津萍. 探讨 MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 及 ICTP 与冠心病的相关性 [J]. *中国医学创新*, 2015, 12(12): 18-21.
- [20] 马清峰, 李建军, 熊亮, 等. 血清 CD40、CD40L 和基质金属蛋白酶-9 水平与颈动脉内膜中层厚度的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(8): 1 947-949.

(此文编辑 曾学清)