

· 短篇论著 ·

诱导型环氧合酶抑制剂对重组人 CD40 配体抑制人 I 型胶原 α2(I) 链启动子活性的影响

Effects of NS-398 on inhibitory effect of rhCD40L against human alpha 2 (I) collagen promoter activity

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*}

(1. 第二军医大学长征医院心内科, 上海 200003; 2. 中国人民解放军 411 医院内 4 科, 上海 200081; 3. 长征医院实验诊断科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 观察诱导型环氧合酶(COX-2)抑制剂 NS-398 对重组人 CD40 配体(rhCD40L)抑制人 I 型胶原 α2(I) 链启动子活性的影响, 探讨 NS-398 治疗 AS 的可能机制。 **方法:** 体外培养人血管平滑肌细胞(VSMCs), 人 I 型胶原 α2(I) 链基因启动子重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 扩增和酶切鉴定后转染 VSMCs, 用不同浓度 rhCD40L (0.1、0.2、0.4 μg/ml)、100 μmol/L NS-398 以及 rhCD40L(0.4 μg/ml)+NS-398(100 μmol/L)作用于转染后细胞, ELISA 检测各组细胞 CAT 目的基因的表达, 以未加任何细胞因子或药物处理的成功转染后细胞为对照组。 **结果:** 与对照组相比, NS-398 增加 pCOLH₂2.4、pCOLH₂1.6 CAT 基因的表达($P<0.05$); rhCD40L 抑制 I 型胶原基因启动子活性, 且呈剂量依赖性, 0.4 μg/ml 的 rhCD40L 对启动子活性抑制作用最强($P<0.05$); 而 NS-398 可以逆转 0.4 μg/ml rhCD40L 的抑制作用($P<0.05$)。 **结论:** NS-398 增加 I 型胶原基因启动子活性, 在转录水平上促进 I 型胶原的表达; rhCD40L 抑制人 I 型胶原 α2(I) 链启动子活性可能与 COX-2 通路有关。

[关键词] CD40 配体; 诱导型环氧合酶; 胶原; 转录启动子

[中图分类号] R 541.4 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0914-03

CD40-CD40L 在致动脉粥样硬化(AS)炎症反应中起着至关重要的作用, 环氧合酶(COX)是 AS 炎症反应中的一个关键酶。研究^[1]发现选择性 COX-2 抑制剂可以延缓 AS 进程并对 AS 斑块的稳定性产生影响。胶原是 AS 斑块的重要组成部分, 在维持斑块稳定性方面起着重要作用, AS 后期胶原含量下降直接导致斑块由稳定变为不稳定。胶原启动子是胶原转录合成的启动环节, 前期研究^[2-3]已经构建了人 I 型胶原 α2(I) 链基因(CAT 基因)启动子重组质粒, 并讨论了影响其活性的一些因素。本研究选取 CAT 报告基因活性较高的重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 为研究对象, 进一步研究 COX-2 抑制剂(NS-398)对重组人 CD40 配体(rhCD40L)抑制 CAT 基因表达的影响, 探讨 NS-398 对 AS 进程影响的可能机制。

1 材料和方法

1.1 仪器及试剂 主要仪器: 超净工作台、倒置相差显微镜、CO₂ 培养箱、离心机、紫外分光光度计等。主要试剂: 脂质体转染试剂盒(Lipofectamine)购自 Invitrogen 公司, CAT ELISA 试剂盒购自 Roche 公司, rhCD40L 购自美国 R&D 公司, 诱导型环氧合酶(COX-2)抑制剂 NS-398 购自美国 Sigma 公司, 限制性内切酶 *Kpn* I、*Nhe* I 购自 Roche 公司, 人 I 型胶原 α2(I) 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学教研室提供。

1.2 血管平滑肌细胞培养和鉴定 组织贴块法行人脐动脉血管平滑肌细胞(VSMC)原代培养^[4-5]。培养液为含 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。VSMC 的鉴定: 倒置相差显微镜观察活细胞的形态和生长方式; 抗 α-肌动蛋白免疫细胞化学染色^[6]鉴定细胞。取第 3~6 代 VSMC 用于后续实验。

1.3 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 的转化、扩增和鉴定 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 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 质粒转染人 VSMC 及转染后处理 采用脂质体介导的基因转染技术, 以质粒 pCMVSP6 作为阴性对照。脂质体转染试剂盒(Lipofectamine)购自 Invitrogen 公司, 操作参照说明书。将 pCOLH₂2.4、pCOLH₂1.6 重组质粒转染靶细胞 24 h 后, 换用无血清培养基, CO₂ 孵箱静置培养 5 h, 在孔内分别加入不同浓度(0.1、0.2、0.4 μg/ml) 的 rhCD40L、终浓度为 100 μmol/L 的 NS-398 以及 rhCD40L(0.4 μg/ml)+NS-398(100 μmol/L)共同作用, 并补加血清至 2%, 继续培养 24 h 后测报告基因 CAT 活性。

[基金项目] 国家“973”计划子项目(2005CB523309)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects (973 Program, 2005CB523309)。

[作者简介] 樊 民, 博士, 主治医师。

E-mail: fanmin@medmail.com.cn

* Corresponding author. E-mail: zgwu@medmail.com.cn

1.5 CAT ELISA 测定 参考 CAT ELISA kit(Roche)说明书进行。所有实验重复 3 遍,每次 2 复孔。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。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析,SNK 法两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 VSMC 的鉴定 倒置相差显微镜观察活细胞的形态和生长方式;可见 VSMC 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 1A)。经 α -肌动蛋白免疫染色,可见细胞染成棕黄色,染色阳性,证实为血管平滑肌细胞(图 1B)。

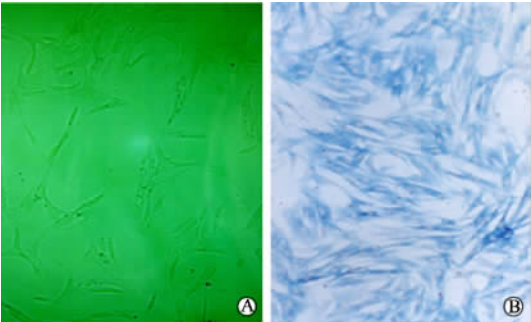


图 1 人脐动脉 VSMC 的鉴定(×400)

A:倒置相差显微镜;B:抗 α -肌动蛋白免疫细胞化学染色

2.2 转染及处理后细胞 CAT 报告基因的表达 由表 1 可知,NS-398 可以增加 pCOLH₂2.4、pCOLH₂1.6 CAT 基因的表达($P < 0.05$);rhCD40L 可以抑制 I 型胶原基因启动子活性,且呈剂量依赖性,0.4 $\mu\text{g/ml}$ 的 rhCD40L 对启动子活性抑制作用最强,有明显统计学差异($P < 0.05$);而 NS-398 可以逆转此种表达抑制作用($P < 0.05$)。结果提示 NS-398 增加 I 型胶原基因启动子活性,在转录水平上诱导 I 型胶原的表达。

表 1 NS-398 和 rhCD40L 对转染
重组质粒后细胞报告基因表达的影响

组 别	CAT 基因的相对表达	
	pCOLH ₂ 2.4	pCOLH ₂ 1.6
对照组	1	1
rhCD40L		
0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.83±0.06	0.81±0.05
0.2 $\mu\text{g/ml}$	0.74±0.04*	0.75±0.07*
0.4 $\mu\text{g/ml}$	0.62±0.04*	0.64±0.03*
NS-398	1.56±0.12*	1.53±0.11*
NS-398+0.4 $\mu\text{g/ml}$		
rhCD40L	0.93±0.06△	0.97±0.04△

* $P < 0.05$ 与对照组相比;△ $P < 0.05$ 与 0.4 $\mu\text{g/ml}$ rhCD40L 相比

3 讨 论

CD40 和 CD40L 在 AS 病变中高表达,尤其在易破裂的斑块肩部及破裂的斑块中更为显著。CD40L 可促进 AS 相关细胞(如巨噬细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞)分泌表达趋化因子、黏附分子、细胞因子、基质金属蛋白酶及促凝因子,并通过 CD40 诱导斑块相关细胞表达基质金属蛋白酶与组织因子,从而诱发急性冠脉事件^[7-8]。除了限制病变的进展外,抗 CD40 治疗能够改变 AS 斑块的组成,形成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^[9]。这表明 CD40-CD40L 系统不仅是 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^[10-11]发现 COX-2 与斑块易损性有关;也有研究^[12]发现给予 COX-2 抑制剂 rofecoxib 的 LDLR 缺失小鼠,AS 范围较对照组明显降低了 25%~50%。

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。启动子的激活是信号转导途径的最后一站。I 型胶原是 AS 形成中细胞外基质的主要成分,其前胶原由 2 条 $\alpha 1$ 链和 1 条 $\alpha 2$ 链构成,由 $\alpha 1(\text{I})$ 和 $\alpha 2(\text{I})$ 基因共同编码。高春芳等^[2-3]前期构建了一组人 I 型胶原 $\alpha 2(\text{I})$ 链基因启动子重组体,发现其中重组质粒 pCOLH₂2.4 和 pCOLH₂1.6 表达 CAT 报告基因活性最高,所以本研究选取这二者作为本实验的研究对象,针对启动子激活这一环节,在转录水平研究 rhCD40L 及 NS-398 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,认为这种作用与胶原转录无关而与 MMP 有关。Hui 等^[14]发现 NS-398 诱导胶原 $\alpha 1(\text{I})$ 表达,而外源性 PGE₂ 抑制胶原 $\alpha 1(\text{I})$ 表达;TGF- β_1 诱导 COX-2 mRNA,COX-2 蛋白和 PGE₂ 合成;外源性 PGE₂ 显著抑制 TGF- β_1 介导的胶原 $\alpha 1(\text{I})$ 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、PGE₂、MMP-1、p38 表达的增加和 TIMP-1、前胶原表达的降低。

本研究发现 rhCD40L 抑制 I 型胶原 $\alpha 2(\text{I})$ 启动子表达,NS-398 增加 I 型胶原 $\alpha 2(\text{I})$ 启动子活性,同时可以逆转 rhCD40L 对 I 型胶原 $\alpha 2(\text{I})$ 启动子活性的抑制作用,说明 rhCD40L 诱导 I 型胶原 $\alpha 2(\text{I})$ 启动子表达在某种程度上与 COX-2 有关。

[参 考 文 献]

[1] Linton M F, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2002, 13: 497-504.

[2] 王 皓,高春芳,万伟东,等. 人 $\alpha 2(\text{I})$ 型胶原基因启动子活性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2002,22:58-61.

[3] 陈 倩,吴宗贵,高春芳,等. OX-LDL 对血管平滑肌细胞增殖及人 I 型胶原 $\alpha 2(\text{I})$ 基因启动子活性的影响[J]. 第二军医大学学报,2003,24:1204-1207.

[4] 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,1999,5:85-86.

[5] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 1996:43-58.

[6] 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: 71-95.

[7] Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability [J]. Circ Res,2001,89: 1092-1103.

[8] Lutgens E, Daemen M J. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med,2002,12: 27-32.

[9] Schonbeck U, Sukhova G K, Shimizu K, et al. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000, 97: 7458-7463.

[10] Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, et al. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E2-dependent matrix metalloproteinase activity[J]. Circulation,2004,109: 1482-1488.

[11] 樊民,李 岚,吴宗贵,等. CD40 配体通过诱导型环氧化酶途径诱导单核巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶[J]. 第二军医大学学报,2006,27:845-847.

[12] Burleigh M E, Babaev V R, Oates J A, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice[J]. Circulation,2002,105: 1816-1823.

[13] Horton D B, 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 A Y, Dannenberg A J, Sung J J, et al. Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2004,41: 251-258.

[15] Han J H, Roh M S, Park C H, et al. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts[J]. Mech Ageing Dev,2004,125: 359-366.

[收稿日期] 2007-03-10 [修回日期] 2007-07-09

[本文编辑] 贾泽军