

辛伐他汀对 IFN- γ 诱导的人外周血单个核细胞 OX40L 表达的影响 *

刘 彬 王凤军 苏丹颖 张惊宇 陈修芬 于美婷 初婷婷 刘 欧 侯丹慧 张双彦

(哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨经 IFN- γ 刺激后,人外周血单个核细胞 OX40L 表达的变化,以及辛伐他汀对单个核细胞 OX40L 表达的影响。方法 将实验标本随机分为 2 组,分别干扰素- γ (IFN- γ)刺激组、辛伐他汀干预组。应用 RT-PCR 及 Western blotting 技术,观察 IFN- γ 诱导的人外周血单个核细胞 OX40L 表达情况及辛伐他汀对人单个核细胞 OX40L 表达的影响。结果 1. 1000 U/ml IFN- 与人单个核细胞共同培养 24h 后,OX40L mRNA 和蛋白水平的表达明显增加。2. 预先给予 10 mol/L 的辛伐他汀干预 1h 可以明显降低 IFN- 诱导的 OX40L 表达。结论 IFN- 可诱导人单个核细胞 OX40L 表达。辛伐他汀可以抑制 IFN- 诱导人单个核细胞 OX40L 表达的增强,从而可能抑制了 OX40L 信号通路介导的与炎症有关的血管损伤,延缓动脉粥样硬化的进程。

关键词 :辛伐他汀 OX40 配体 动脉粥样硬化

中图分类号 :R543.5 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)27-5230-04

The Effect of Simvastatin on Levels of OX40L in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)*

LIU Bin, WANG Feng-jun, SU Dan-ying, ZHANG Jing-yu, CHEN Xiu-fen,

YU Mei-ting, CHU Ting-ting, LIU Ou, HOU Dan-hui, ZHANG Shuang-yan

(Department of Neurology, the Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of simvastatin on serum levels of soluble OX40L (sOX40L) in PBMCs. **Methods:** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, and the effects of simvastatin on OX40L expression were evaluated by RT-PCR and western blot. **Results:** OX40L mRNA and protein levels increased after stimulation with 1000 U/ml IFN- γ , where simvastatin could antagonize this increase at a concentration of 10 mol/L. **Conclusions:** Simvastatin treatment induced down-regulation of OX40L mRNA and protein expression in a concentration-dependent manner in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). IFN- γ up-regulates the expression of the mRNA and protein of OX40L and this up-regulation could be reversed in present of simvastatin.

Key words: Simvastatin; OX40 ligand; Atherogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R543.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)27-5230-04

前言

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是常见病、多发病,严重威胁人类的健康。AS 是脂质代谢、血凝因素、炎性细胞因子、血液动力学等多种因素相互作用的综合结果。目前认为 AS 是一种由于免疫调节异常所导致的炎症性疾病^[1-3],OX40/OX40L 是机体炎症反应中一对重要的信号通路,近年来的研究表明,OX40/OX40L 也参与 AS 的发生和发展,并且在机体的免疫应答中起着非常重要的作用。

大量的研究表明,炎症在 AS 发生、发展和演变过程中起着重要作用^[4]。炎症是 AS 的始动因子,炎症导致血管局部中性粒细胞和单核细胞的浸润,从而促进了脂质的沉积,导致 AS 脂纹等早期病变的发生。炎症反应是 AS 易损斑块最显著特征之一。单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞通过细胞因子、黏附分子和炎症介质参与了这种炎症反应。作为目前临床应用最广泛的调脂药物,他汀类药物-3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,通过竞争性抑制胆固醇合成的限速酶从而降低血中胆固醇浓度。本研究旨在通过体外实验观察辛伐他汀对

OX40L 信号通路影响,进一步探讨其抗动脉粥样硬化机制,为防治动脉粥样硬化性脑梗死提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

清晨抽取健康成人空腹外周静脉血 10 mL,保存在试管中,并经高压蒸汽消毒及 0.2% EDTA-K2 处理;10% RPMI-DMEM 培养基(Gibcobl);胎牛血清(Gibcobl);二甲基亚砷(DMSO)(Sigma);胰蛋白酶(Sigma);Trizol(上海生物工程技术有限公司);焦磷酸二乙脂(DEPC)(Sigma);琼脂糖(Sigma);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(北京索来宝公司);PCR 引物(上海生物工程技术有限公司);辛伐他汀原粉(Sigma);IFN-(Sigma)等。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 (1)干扰素- γ (IFN- γ)刺激组:IFN- γ (1000 U/mL)与人单个核细胞共同培养 24 小时。置于 37℃含 5% CO₂ 的饱和水汽培养箱中培养。

(2)辛伐他汀干预组:辛伐他汀(10.0 mol/L)、IFN- γ (1000

* 基金项目:黑龙江省科技攻关项目(2009-2012),合同编号:GC10C305-2

作者简介:刘彬(1967-)男,博士,副主任医师,主要研究方向:脑血管病,电话:13030000673 E-mail: ican58@163.com

(收稿日期:2012-04-08 接受日期:2012-05-01)

U/mL)与人单个核细胞共同培养 24 小时。置于 37℃含 5% CO₂ 的饱和水汽培养箱中培养。

1.2.2 RT-PCR 检测 OX40L 的 mRNA 表达 总 RNA 的抽提；RNA 的沉淀、洗涤、溶解；RNA 的定量；cDNA 合成；PCR 扩增，5 μL 5× Buffer (含镁离子) 2μ TaqDNA 聚合酶 5 μL 5 mol/L 上游引物 5 μL 5 mol/L 下游引物 1 μL 10mmol/L dNTPs，2.5 μL 上述 cDNA 合成反应液 加蒸馏水补足反应体积至 50 L，按下列条件扩增：94℃3 分钟一个循环，94℃30 秒→60℃ 50 秒→72℃ 30 秒，循环 35 次。最后 72℃延伸 10 分钟。取扩增产物 10 μL 与 2 μL 上样缓冲液混合后，上样电泳((2%琼脂糖凝胶含 0.5 g/ml 溴乙啶)，电泳与标准分子量比较鉴定扩增产物。在凝胶成像系统中分析电泳带的灰度值，测定电泳条带吸光度值以 β-actin 为内参照，计算 OX40、OX40L 的相对含量，结果以条带吸光度值与 β-actin 条带吸光度值的比值表示。

1.2.3 Western blot 检测 OX40L 蛋白表达 (1)外周血单个核细胞中总蛋白的提取 离心收集 PBMCs 细胞沉淀加入 500 μL 单去污细胞膜裂解液、冰浴彻底裂解细胞 30 min，12000 rpm (4℃)离心 5-10 min。弃沉淀，将离心后的上清(即蛋白)分装转

移到 0.5 mL 的离心管中放于 -80℃保存 (2)按 Harlow 等的方法，制备蛋白质样本 分离 DNA 沉淀蛋白；洗涤蛋白；复溶蛋白 (3)铺胶 (4)电泳 (5)转膜 (6)封闭 (7)杂交反应 (8)显影 (9)扫描分析

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS13.0 统计软件包分析处理，计量资料均以均数±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示，两样本均数采用 t 检验和单因素方差分析。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对 IFN-γ 诱导的人单个核细胞 OX40L mRNA 表达的影响

IFN-γ (1000 U/mL) 与人单个核细胞共同培养 24 小时，OX40L mRNA 表达较对照组明显增加 (P<0.01)。辛伐他汀 (10.0 M) 与 IFN-γ (1000 U/mL) 及人单个核细胞共同培养 24 小时，辛伐他汀可明显降低 IFN-γ 所致的 OX40L mRNA 表达，且与单纯 IFN-γ 刺激组比较有显著差异(P<0.05)，见(表 1、图 1)。

表 1 辛伐他汀对 IFN-γ 诱导的人单个核细胞 OX40L mRNA 表达的影响($\bar{X} \pm SD$)
Table 1 The effect of simvastatin on the expression OX40L mRNA induced by IFN-γ in PBMCs

组别(Group)	n	OX40L mRNA 表达(The expression of OX40L mRNA)	
		OX40L/β -actin(OD 比值)	
对照组(Control)	3	0.92± 0.03	
IFN-γ 组(IFN-γ)	3	1.13± 0.05 #	
辛伐他汀组(Simvastatin)	3	0.28± 0.03 #	
IFN-γ+ 辛伐他汀组(IFN-γ+ Simvastatin)	3	0.99± 0.04 *	

注:计量资料以均数±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示，与对照组比较 # P<0.01，与 IFN-γ 组比较 * P<0.05。
Note: Quantitative data are presented as ($\bar{X} \pm SD$),compared with control # P<0.01,compared with IFN-γ* P<0.05.

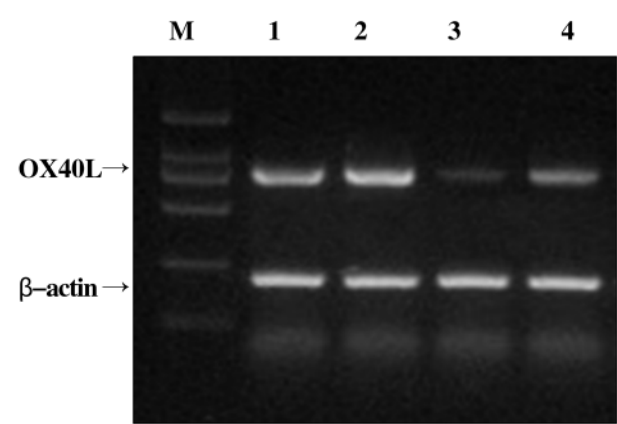
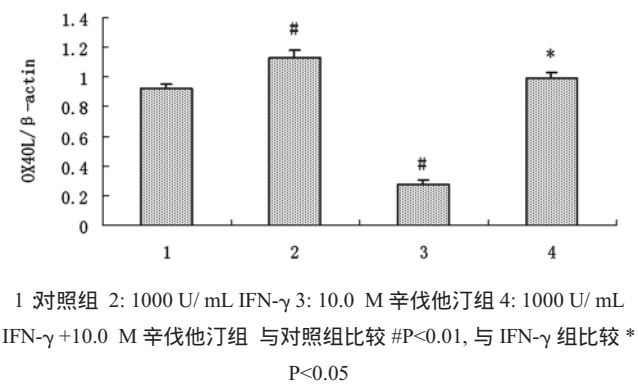


图 1 辛伐他汀对 IFN-γ 诱导的人单个核细胞 OX40L mRNA 表达的影响
M: 标记物 1 对照组 2: 1000 U/mL IFN-γ 3: 10.0 M 辛伐他汀组 4: 1000 U/mL IFN-γ+10.0 M 辛伐他汀组

Fig.1 The effect of simvastatin on the expression OX40L mRNA induced by IFN-γ in PBMCs



1 对照组 2: 1000 U/mL IFN-γ 3: 10.0 M 辛伐他汀组 4: 1000 U/mL IFN-γ +10.0 M 辛伐他汀组 与对照组比较 #P<0.01, 与 IFN-γ 组比较 * P<0.05

的影响

IFN-γ (1000 U/mL) 与人单个核细胞共同培养 24 小时，OX40L 蛋白表达较对照组明显增加(P<0.01)。辛伐他汀 (10.0 M) 与 IFN-γ (1000 U/mL) 及人单个核细胞共同培养 24 小时，辛伐他汀可明显降低 IFN-γ 所致的 OX40L 蛋白表达，且与单纯 IFN-γ 刺激组比较有显著差异(P<0.05) (表 2、图 2)。

3 讨论

2.2 辛伐他汀对 IFN-γ 诱导的人单个核细胞 OX40L 蛋白表达

表 2 辛伐他汀对 IFN- γ 诱导的人单个核细胞 OX40L 蛋白表达的影响 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 2 The effect of simvastatin on the expression OX40L protein induced by IFN- γ in PBMCs

组别(Group)	n	蛋白表达(The expression of protein)	
		OX40L/ β -actin(OD)	
对照组(Control)	3	0.76 $\pm$ 0.06	
IFN- γ 组(IFN- γ)	3	0.91 $\pm$ 0.03 #	
辛伐他汀组(Simvastatin)	3	0.30 $\pm$ 0.04 #	
IFN- γ + 辛伐他汀组(IFN- γ + Simvastatin)	3	0.79 $\pm$ 0.04 *	

注 计量资料以均数士标准差 ($\bar{X} \pm SD$)表示 ,与对照组比较 # $P<0.01$, 与 IFN- γ 组比较 * $P<0.05$ 。
Note: Quantitative data are presented as ($\bar{X} \pm SD$),compared with control # $P<0.01$,compared with IFN- γ * $P<0.05$.

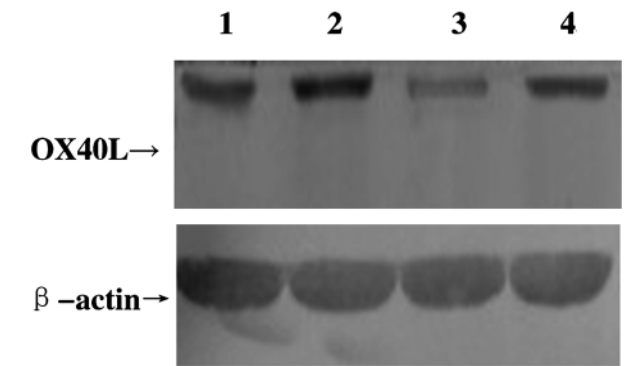
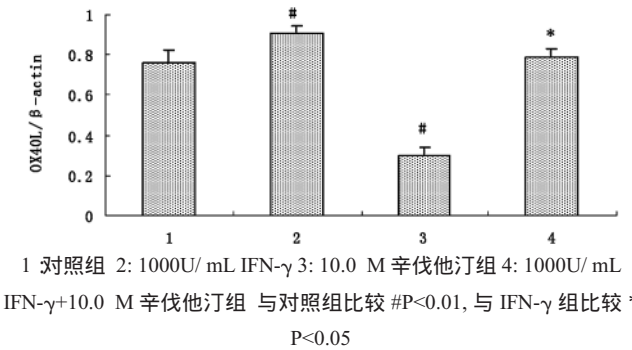


图 2 辛伐他汀对 IFN- γ 诱导的人单个核细胞 OX40L 蛋白表达的影响
1 对照组 2: 1000 U/ mL IFN- γ 3: 10.0 M 辛伐他汀组 4: 1000 U/ mL
IFN- γ +10.0 M 辛伐他汀组
Fig.2 The effect of simvastatin on the expression OX40L protein induced
by IFN- γ in PBMCs



1 对照组 2: 1000U/ mL IFN- γ 3: 10.0 M 辛伐他汀组 4: 1000U/ mL
IFN- γ +10.0 M 辛伐他汀组 与对照组比较 # $P<0.01$, 与 IFN- γ 组比较 *
 $P<0.05$

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种慢性的血管炎症反应 ,炎症、炎症细胞及炎症因子的作用贯穿于 AS 的整个病理过程^[5]。粥样斑块的破裂和随后发生的血栓是导致急性心肌梗死的最主要的原因。动脉炎症过程不仅存在 AS 的形成和进展中 ,而且在粥样发生血栓性并发症时起重要作用。

他汀类药物自上世纪八十年代晚期开始应用于临床以来 ,已成为调脂治疗的主要药物。多年来的临床及基础研究均证实了他汀类药的良好降脂 ,尤其是降低胆固醇的作用 ,并能够有效的降低心血管事件的发病率和死亡率 ,被 4S(Scandinavian Simvastatin Survival Study)及其后的研究所证实^[6-8]。因此 ,作为 AS 性疾病的一、二级预防药物他汀类药已被广泛应用于临床。然而 ,随后的研究发现 ,他汀类药不仅具有降脂作用 ,还具有多

种非降脂作用 ,即他汀类药的多向性效应。其多向性效应表现为 (1) 抗炎作用 :临床研究资料显示他汀类能够调节炎症过程 ,抑制炎症细胞因子 ,趋化因子和粘附分子的表达 ,降低 C-反应蛋白(CRP)的水平。但进一步对比发现他汀类药物降低 CRP 的效果也存在差别 (2)预防和减轻动脉粥样硬化 ,稳定动脉粥样硬化斑块 :研究发现他汀类药物降低斑块体积的作用很微弱 ,但在参与斑块稳定的代谢过程中占有重要的地位^[9,10]。(3) 对内皮功能的影响 :高血脂和氧化应激引起的血管内皮细胞功能失调是动脉粥样硬化的始动病因 ,在这个过程中 ,一氧化氮(NO)扮演了一个重要角色。循环中足量的他汀通过降低脂质胆固醇的生物合成来增加内皮依赖的 NO 释放。(4)对凝血、纤溶系统的影响 :他汀类还可下调血小板因子(PF4)和血小板 β 球蛋白(β -TG)的表达 ,抑制血小板活化 ,干扰血小板聚集后诱发的凝血过程^[11-13]。新近研究表明他汀类药物不但能抑制动脉硬化化的进展 ,而且能加速其转归过程^[14]。

OX40/OX40L 是机体炎症反应中一对重要的信号通路,也是机体免疫应答过程中一对重要的协同刺激分子 ,参与了 T 细胞的活化、增殖和迁移 ,以及生发中心的形成和 DC 的分化成熟 ,在介导肿瘤免疫应答和自身免疫性疾病的发生发展中具有重要作用^[15]。人的 OX40L 又称 gp34 ,是分子量 34KD 的 II 型跨膜糖蛋白 ,其相应基因定位于人染色体 1q25 属 TNF 超家族。OX40L 也只表达在活化细胞表面 ,人 OX40L 主要表达于成熟 DC、活化的 B 细胞、血管内皮细胞(VEC)、脐带静脉血管内皮细胞(HUVEC) ,巨噬细胞以及某些组织器官包括心、骨骼肌、睾丸和肺 ,其表达时相也是在细胞活化后 24~48 小时出现。

大量研究表明 ,OX40 及 OX40L 在动脉硬化的发病机制中起到了一定的促进作用^[16-19]。因此干预 OX40L 有望成为未来治疗动脉粥样硬化的新的靶点。本研究证实辛伐他汀能够减弱 IFN- γ 诱导人单个核细胞 OX40L 的表达增强作用 ,并且这种作用与辛伐他汀呈现明显的时间和浓度依赖性(本文结果未展示) ,但其具体作用机制和路径还需进一步观察。总之 ,辛伐他汀能够下调 OX40L 的表达 ,从而抑制了 OX40L 信号通路介导的与炎症有关的血管损伤 ,延缓了动脉粥样硬化的进程。这些结果或许可以有助于阐明他汀类药物在抑制动脉粥样硬化中的抗炎机制。

参考文献(References)

[1] Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease [J]. N Engl J Med,

- 1999,340:115-126
- [2] Gotsman, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis[J]. *Circulation Research*,2008,103 (11):1220-1231
- [3] P.S. Olofsson, L.A. Soderstrom, D. Wagsater, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice [J]. *Circulation*,2008,117 (10):1292-1301
- [4] Hansson GK. Inflammation atherosclerosis and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*,2005,352:1685-1695
- [5] Gotsman, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis[J]. *Circulation Research*,2008,103(11):1220-1231
- [6] Dersen TR, Kjekshus J, Pyorala K, et al. Effect of Simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S)[J]. *Am J Cardiol*,1998,81:333-335
- [7] Ughan CJ, Gotto AM, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis[J]. *J Am Coll Cardiol*,2000,35:1-10
- [8] Epherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 1995,333:1301-1307
- [9] Libby P, Aikawa M. Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability [J]. *Clin Cardiol*,2003,26(1S1): 111-114
- [10] Rosenson RS, Brown AS. Statin use in the acute coronary syndromes: cellular mechanism and clinical evidence[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2002,13(6):625-630
- [11] Di Virgilio, Chiozzi D, Ferrari, et al. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells[J]. *Blood*,2001,97:587-600
- [12] Szczeklik A, Munsial J, Undas, et al. Inhibition of thrombin generation by Simvastatin and lack of additive of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia [J]. *J Am Coll Cardiol*,1999,33:1286-1293
- [13] Kaneider NA, Egger P, Dunzendorfer S, et al. Rho-GTPase-dependent platelet-neutrophil interaction affected by HMG-CoA reductase inhibition with altered adenosine nucleotide release and function[J]. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*,2002,22:1029-1035
- [14] Feig JE, Shang Y, Rotllan N, et al. Statins promote the regression of atherosclerosis via activation of the CCR7-dependent emigration pathway in macrophages[J]. *PloS one*,2011,6(12):e28534
- [15] Gotsman, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis [J]. *Circulation research*,2008,103:1220-1231
- [16] Nakano, M. Fukumoto, Y. Satoh, K, et al. Shimokawa, OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization [J]. *Cardiovascular research*,2010, 88:539-546
- [17] Yan J, Wang C, Du R, et al. OX40-OX40 ligand interaction may activate phospholipase C signal transduction pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Chemico-biological interactions*,2009, 14, 180(3):460-464
- [18] VanWanrooij EJ, van Puijvelde GH, de Vos P, et al. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfrsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2007,27:204-210
- [19] Wang X, Ria M, Kelmenson PM, Eriksson P, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility[J]. *Nat Genet*,2005,37:365-372

(上接第 5224 页)

- [10] Yang JC, Shan J, Ng KF, et al. Morphine and methadone have different effects on calcium channel currents in neuroblastoma cells [J]. *Brain Res*,2000,870(1-2):199-203
- [11] Ramkumar V, El-Fakahany EE. Prolonged morphine treatment increases rat brain dihydropyridine binding sites: possible involvement in development of morphine dependence [J]. *European Journal Pharmacology*,1988,146(1):73-83
- [12] Belozertseva IV, Danysz W, Bessalov AY. Effects of short-acting NMDA receptor antagonist MRZ 2/576 on morphine tolerance development in mice [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*,2000,361(6):573-577
- [13] Mc Carthy KD, Partlow LM. Preparation of pure neuronal and non-neuronal cultures from embryonic chick sympathetic ganglia: a new method based on both differential cell adhesiveness and the formation of homotypic neuronal aggregates [J]. *Brain Res*,1976,114 (3):391-414
- [14] Nishizaki T, Matsuoka T, Nomura T, et al. Store Ca^{2+} depletion enhances NMDA responses in cultured human astrocytes[J]. *Biochem Biophys Res Com*,1999,259 (3):661-664
- [15] Biber K, Laurie DJ, Berthele A, et al. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia [J]. *J Neurochem*,1999,72(4):1671-1680
- [16] Iino M, Goto K, Kakegawa W, et al. Glia-synapse interaction through Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in Bergmann glia [J]. *Science*,2001, 292 (5518):926-929
- [17] Smith JP, Cunningham LA, Partridge LD. Coupling of AMPA receptors with the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in cultured rat astrocytes [J]. *Brain Res*,2000,887(1):98-109
- [18] Seifert G, Zhou M, Steinhäuser C. Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes [J]. *J Neurophysiol*,1997,78 (6):2916-2923
- [19] Yamamoto H, Mikita S, Yano I, et al. Studies on the physical dependability of analgesics. 2. Relationship between transformation of intramitochondrial structures in adrenocortical cells and corticosterone biosynthesis in morphine addicted rats [J]. *Jpn J Pharmacol* 1973,23(2):217-225
- [20] Wang D, Tolbert LM, Carlson KW, et al. Nuclear Ca^{2+} /calmodulin translocation activated by mu-opioid(OP3)receptor[J]. *J Neurochem*, 2000,74(4):1418-1425
- [21] Hauser KF, Stiene Martin A, Mattson MP, et al. Mu-Opioid receptor-induced Ca^{2+} mobilization and astroglial development: morphine inhibits DNA synthesis and stimulates cellular hypertrophy through a Ca^{2+} -dependent mechanism[J]. *Brain Res*,1996,720(1-2):191-203