

# 白细胞介素-35 对可溶性 CD40 配体诱导人脐静脉血管内皮细胞活化的作用

郭巍巍 陈杰 钱雷 李明

**【摘要】** 目的:探讨白细胞介素(IL)-35 对可溶性 CD40 配体(sCD40L)诱导人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)活化的作用及 IL-35 和 sCD40L 在冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)发病过程中的作用。 方法:入选 43 例冠心病患者,其中不稳定型心绞痛 20 例(UA 组),急性 ST 段抬高型心肌梗死 23 例(STEMI 组),20 例健康体检者设为对照组,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血清 IL-35 和 sCD40L 水平,并分析两者的相关性。体外培养 HUVEC,分为空白组、sCD40L 组、IL-35 + sCD40L 组,ELISA 法检测细胞培养上清 E-选择素、可溶性细胞间黏附分子(sICAM-1)的水平;比色法检测 HUVEC 中丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性;DCFH-DA 荧光探针法检测 HUVEC 中氧自由基(ROS)活性。 结果:与对照组相比,UA 组和 STEMI 组外周血清 sCD40L 水平显著升高,IL-35 水平显著降低( $P$  均 $<0.05$ ),且两者呈负相关( $r = -0.443, P < 0.05$ )。体外培养 HUVEC,与 sCD40L 组相比,IL-35 + sCD40L 组培养上清中 E-选择素、sICAM-1 水平以及 HUVEC 中 MDA 水平、ROS 活性均显著降低, HUVEC 中 SOD 活性显著升高( $P$  均 $<0.05$ )。 结论:冠心病患者外周血清 IL-35 水平显著降低,sCD40L 水平显著升高,IL-35 对 sCD40L 活化 HUVEC 有抑制作用。

**【关键词】** 白细胞介素-35;可溶性 CD40 配体;冠状动脉粥样硬化性心脏病;人脐静脉血管内皮细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.04.015

## The effect of IL-35 on the activation of human umbilical vein endothelial cells induced by sCD40L

GUO Weiwei<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup>, QIAN Lei<sup>3</sup>, LI Ming<sup>3</sup>. 1. Department of Interventional, People's Hospital of Binhai County, Jiangsu 224500; 2. Department of Cardiology, People's Hospital of Binhai County, Jiangsu 224500; 3. Laboratory Medicine, People's Hospital of Binhai County, Jiangsu 224500, China

**【Abstract】 Objective:** To explore the effect of interleukin (IL)-35 on the activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by soluble CD40 ligand (sCD40L) and the role of IL-35 and sCD40L in the pathogenesis of coronary heart disease (CHD). **Methods:** IL-35 and sCD40L serum levels were measured by ELISA from 20 healthy subjects and 43 patients with CHD, including 20 cases with unstable angina pectoris (UA) and 23 cases with acute myocardial infarction (AMI). Pearson correlation was used to identify the relationship between IL-35 and sCD40L. HUVEC were cultured in vitro and divided into three groups: control group, sCD40L group and IL-35 + sCD40L group. Concentration of E-selectin and soluble intracellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in the cell culture supernatants was measured by ELISA. Colorimetric assay was used to evaluate malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity levels in HUVEC. Intracellular reactive oxygen species (ROS) was determined by means of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay.

**Results:** Compared with the control group, sCD40L levels significantly increased, while the level of IL-35 significantly decreased in the UA and AMI group (all  $P < 0.05$ ), and the level of IL-35 in the patients with CHD was negatively correlated with sCD40L ( $r = -0.443$ ,  $P < 0.05$ ). In the IL-35 + sCD40L group, the concentration of E-selectin and sICAM-1 in culture supernatants, and intracellular MDA and ROS activity levels decreased significantly, while the SOD activity increased, comparing with the sCD40L group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions:** IL-35 levels in peripheral blood of patients with CHD decreased, while the sCD40L levels increased. IL-35 was found to inhibit HUVEC activation induced by sCD40L.

**【Key words】** Interleukin-35; Soluble CD40 ligand; Coronary heart disease; Human umbilical vein endothelial cells

血管内皮细胞活化是冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)患者早期重要的病理生理改变<sup>[1-2]</sup>,活化的血管内皮细胞释放多种炎症因子、血管活性物质以及大量的氧自由基,促进冠心病的发生发展<sup>[3]</sup>。CD40/CD40 配体(CD40L)分布于内皮细胞和血小板,可通过多种信号通路活化血管内皮细胞,使其过表达黏附分子、炎症因子以及氧自由基等,与冠心病的发生密切相关<sup>[4]</sup>。白细胞介素(IL)-35 是由调节性 T 细胞(Treg)等分泌的新型抗炎因子,可以抑制脂多糖(LPS)对血管内皮细胞的活化,从而抑制血管内皮细胞炎症因子的表达,减轻炎症反应<sup>[5]</sup>,但尚不明确 IL-35 是否可抑制 sCD40L 对血管内皮细胞的活化。本研究检测冠心病患者外周血清中可溶性 CD40 配体(sCD40L)和 IL-35 的水平,并分析 IL-35 对 sCD40L 活化血管内皮细胞的抑制作用,探讨 IL-35 在冠心病发病中的作用。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选择 2018 年 2 月至 2018 年 8 月在江苏省滨海县人民医院心内科诊断的冠心病患者 43 例,其中不稳定型心绞痛患者 20 例(UA 组),急性 ST 段抬高型心肌梗死患者 23 例(STEMI 组),所有患者行冠状动脉造影检查,诊断和分型均符合《心脏病学》诊断标准<sup>[6]</sup>;同时选取年龄、性别匹配的 20 例健康体检者作为对照组。排除标准:合并感染性疾病、瓣膜性心脏病、扩张型心肌病、脑卒中、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤以及使用类固醇类药物的患者。本研究经医院伦理委员会批准(批准号 01/2018),所有参加者签署知情同意书。

### 1.2 试剂

细胞因子 IL-35 购自美国 Bio-rad 公司;sCD40L 购自武汉艾美捷科技有限公司;sCD40L、IL-35、E-选择素、可溶性细胞间黏附因子(sICAM-1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;DMEM 培养基、胎牛

血清(FBS)、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、氧自由基(ROS)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 血液标本采集

AMI 患者在入院时采集外周静脉血 3 mL,其余患者在入院次日清晨空腹采集静脉血 3 mL,置于肝素钠抗凝管,3 000 r/min 离心 2 min,收集血清,储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.4 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的培养

取剖宫产孕妇分娩的健康新生儿脐带 20 cm,采用胰酶消化法获得血管内皮细胞,将其接种于含 20% FBS 的 DMEM 完全培养基,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱,待细胞长至 80% 融合状态后,选取第 2~5 代细胞用于实验。流式细胞仪检测内皮细胞表面标记 CD31,纯度达 85% 以上。实验分为空白组、sCD40L 组和 IL-35 + sCD40L 组。sCD40L 组加入 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L,IL-35 + sCD40L 组加入 20 ng/mL IL-35 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L,培养 24 h 后收集细胞,PBS 洗涤 2 次,上清液储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.5 ELISA 法检测外周血清中 IL-35、sCD40L 水平及细胞培养上清液中 E-选择素、sICAM-1 水平

使用 ELISA 试剂盒检测外周血清中 IL-35、sCD40L 水平及细胞培养上清液中 E-选择素、sICAM-1 的水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.6 比色法检测 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD 活性

取对数生长期的 HUVEC 以  $1 \times 10^5/\text{mL}$  的细胞密度接种于 96 孔培养板内,培养方法及分组同 1.4,培养后弃上清,按照试剂盒说明书检测 HUVEC 的 MDA 水平及 SOD 活性。

### 1.7 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)荧光探针法检测 HUVEC 中 ROS 活性

将血管内皮细胞接种于 6 孔板,初始密度为

4×10<sup>5</sup>/孔,培养方法及分组同 1.4,每孔加入 2 mL 无血清培养液以及 20 μmol/L DCFH-DA 溶液,混匀,于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 30 min 后用培养液轻轻洗涤细胞 2 次,荧光显微镜观察拍照(激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm),ImageJ 软件计算平均荧光强度值(IOD)。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差表示,两组间比较采用 student's *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;偏态分布采用中位数表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验或 Kruskal-Wallis 检验;线性相关

分析采用 Spearman 分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组患者外周血清 IL-35 和 sCD40L 水平比较

3 组患者年龄、性别、高血压史、糖尿病史、吸烟史均无统计学差异,见表 1。ELISA 试剂盒检测外周血清 IL-35 及 sCD40L 的水平。与对照组相比,UA 组、AMI 组 IL-35 水平均降低,且 STEMI 组降低更为显著;而 sCD40L 水平显著升高,且 STEMI 组升高更明显,差异均有统计学意义(*P* 均<0.05),结果见表 2。

表 1 3 组患者临床资料比较

组别	年龄/岁	女性/例(%)	高血压史/例(%)	糖尿病史/例(%)	吸烟史/例(%)
对照组	60.2±8.1	12(60.0)	9(45)	5(25.0)	12(60.0)
UA 组	60.3±9.2	12(60.0)	11(55.0)	6(30.0)	13(65.0)
STEMI 组	63.8±7.8	15(65.2)	6(54.5)	3(27.2)	8(72.7)
<i>P</i> 值	0.775	0.941	0.673	0.812	0.937

表 2 3 组患者外周血清 IL-35 和 sCD40L 水平比较

组别	sCD40L/ng·mL <sup>-1</sup>	IL-35/pg·mL <sup>-1</sup>
对照组	0.91(0.41~1.41)	133.12(103.5~164.43)
UA 组	2.03(1.61~2.45) <sup>(1)</sup>	67.17(44.92~85.66) <sup>(1)</sup>
STEMI 组	2.78(1.59~3.97) <sup>(1)(2)</sup>	43.62(27.24~66.43) <sup>(1)(2)</sup>
<i>P</i> 值	0.034	0.027

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup>*P*<0.05;与 UA 组比较,<sup>(2)</sup>*P*<0.05

2.2 冠心病患者外周血清 IL-35 与 sCD40L 的相关性分析

冠心病患者外周血清 IL-35 水平与 sCD40L 水平呈负相关(*r*=-0.443,*P*<0.01),见图 1。

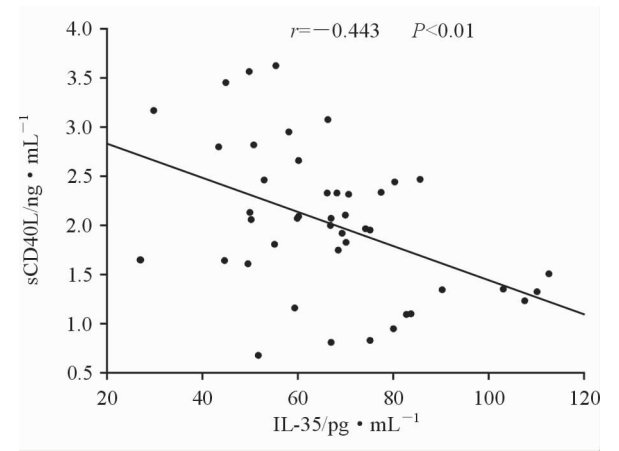


图 1 血清 IL-35 与 sCD40L 相关性分析

2.3 IL-35 对 HUVEC 分泌 E-选择素、sICAM-1 的干预作用

ELISA 法检测 3 组 HUVEC 培养上清中 E-选择素、sICAM-1 的水平。与空白组相比,sCD40L 组 E-选择素、sICAM-1 水平均显著增加(*P* 均<0.05);与 sCD40L 组相比,IL-35 + sCD40L 组 E-选择素、sICAM-1 水平均显著降低(*P* 均<0.05),见表 3。

表 3 3 组 HUVEC 培养上清中 E-选择素、sICAM-1 水平比较

组别	E-选择素/pg·mL <sup>-1</sup>	sICAM-1/ng·mL <sup>-1</sup>
空白组	35.07±1.75	1.73±0.41
sCD40L 组	142.03±20.36 <sup>(1)</sup>	6.17±2.11 <sup>(1)</sup>
IL-35 + sCD40L 组	82.78±9.81 <sup>(2)</sup>	3.42±1.32 <sup>(2)</sup>
<i>P</i> 值	0.001	0.027

注:与空白组比较,<sup>(1)</sup>*P*<0.05;与 sCD40L 组比较,<sup>(2)</sup>*P*<0.05

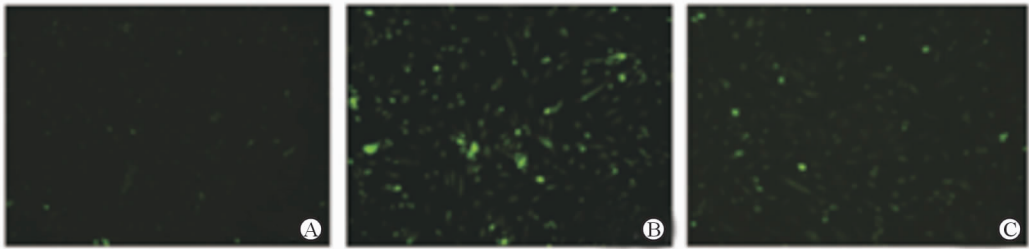
2.4 IL-35 对 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD 活性的影响

比色法检测 3 组 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD 活性。与空白组相比,sCD40L 组 HUVEC 中 MDA 水平显著升高,SOD 活性显著下降(*P* 均<0.05);与 sCD40L 组相比,IL-35 + sCD40L 组 HUVEC 中 MDA 水平显著下降,SOD 活性显著升高(*P* 均<0.05),见表 4。

表 4 3 组 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD 活性比较

组别	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	SOD/ $\times 10^3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$
空白组	12.07 $\pm$ 0.89	55.43 $\pm$ 9.41
sCD40L 组	24.53 $\pm$ 1.78 <sup>(1)</sup>	43.15 $\pm$ 3.67 <sup>(1)</sup>
IL-35 + sCD40L 组	17.62 $\pm$ 1.11 <sup>(2)</sup>	47.96 $\pm$ 1.91 <sup>(2)</sup>
P 值	0.017	0.038

注:与空白组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与 sCD40L 组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$



注:A 为空白组;B 为 sCD40L 组;C 为 IL-35+sCD40L 组  
图 2 3 组 HUVEC 中 ROS 荧光强度比较( $\times 200$ )

3 讨论

血管内皮细胞活化在冠心病的发展过程中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>,血管内皮细胞具有阻止巨噬细胞浸润和泡沫细胞形成、调节凝血和阻止血栓形成的功能。活化的血管内皮细胞可分泌多种生物活性物质如 E-选择素、细胞间黏附分子和 ROS 等,导致动脉粥样硬化等疾病的发生<sup>[3]</sup>,慢性炎症反应是导致血管内皮细胞活化的主要因素,并贯穿于整个冠心病的发生发展过程。炎症反应的激活以及促炎/抗炎因子的失衡与动脉粥样硬化的发生、斑块的破裂、血栓的形成等密切相关,促进了稳定型心绞痛向 UA,加剧了疾病进展<sup>[8]</sup>。

CD40/CD40L 的相互作用可以调节氧化应激,影响免疫系统、心血管系统等信号通路,与冠心病的发生密切相关<sup>[9]</sup>。CD40L 与 CD40 相互作用促进单核细胞、巨噬细胞等黏附于血管内皮细胞,诱导细胞间黏附分子(ICAM-1)、E-选择素等的表达,增加氧自由基的生成,导致氧化应激<sup>[10]</sup>;同时,CD40 通过与 CD40L 的相互作用调控多种基质金属蛋白酶的表达,促进动脉粥样斑块的破裂<sup>[11]</sup>。sCD40L 是 CD40L 水解形成的具有生物活性的可溶性片段,与 CD40L 具有相同的生物学功能<sup>[12]</sup>。Yuan 等<sup>[4]</sup>研究表明,循环血液中 sCD40L 能刺激泡沫细胞的形成,促进动脉粥样硬化的发展,增加粥样斑块的不稳定性,加速冠心病的发展。Heeschen 等<sup>[13]</sup>研究表明,sCD40L 对冠心病具有一定的预测价值。Fouad 等<sup>[14]</sup>研究发现,UA 及急性心肌梗死患者外周血清 sCD40L 水平显著高于稳定型心绞痛

2.5 IL-35 对 HUVEC 中 ROS 活性的影响

DCFH-DA 荧光探针法检测 3 组 HUVEC 中 ROS 活性。与空白组相比,sCD40L 组 HUVEC 中 ROS 活性显著升高(13.45 $\pm$ 4.12 对 3.65 $\pm$ 2.08, $P<0.05$ );与 sCD40L 组相比,IL-35+sCD40L 组 HUVEC 中 ROS 活性显著降低(7.09 $\pm$ 3.06 对 3.65 $\pm$ 2.08, $P<0.05$ ),见图 2。

及健康体检者。本研究结果与上述研究一致,显示 STEMI 患者与 UA 患者外周血清 sCD40L 水平显著升高,且 STEMI 患者升高更显著。

IL-35 是 IL-12 家族的新成员,由两个亚基组成,其主要生物学功能是:(1)抑制血管炎症反应;(2)促进 Treg 细胞活化,增强其抑制功能;(3)抑制辅助 T 细胞(Th)1、Th17 等细胞的增殖;(4)促进抗炎因子如 IL-10 的产生,抑制促炎因子如 IL-17 的产生<sup>[15]</sup>。本研究表明,冠心病患者外周血 IL-35 水平显著降低,且 STEMI 患者降低更为显著,这与 Lin 等<sup>[16]</sup>研究结果一致。Mor 等<sup>[17]</sup>研究表明,冠心病患者外周血 Treg 比例下降,其抑制功能也明显下调。IL-35 可能通过加重炎症反应参与冠心病的发生。

本研究显示 IL-35 与 sCD40L 水平呈负相关,IL-35 能显著抑制 sCD40L 诱导的内皮细胞 E-选择素、sICAM-1 的分泌。E-选择素和 ICAM-1 是血管内皮细胞活化的标志,血管内皮细胞活化后分泌大量的 E-选择素和 ICAM-1,两者通过与细胞间受体结合,促进白细胞、单核细胞、T 细胞紧密黏附于血管内皮细胞,加重血管内皮细胞的功能障碍,影响动脉粥样斑块的稳定性<sup>[18]</sup>,促进冠心病的发生发展。

MDA 和 SOD 可反映机体脂质过氧化、受自由基攻击的损伤程度和机体清除氧自由基的能力。在生理状态下,氧自由基生成和清除维持平衡状态;在病理状态下,这一平衡被打破,细胞受损或活化,产生过量的氧自由基,使机体处于氧化应激状

态。本研究显示,IL-35 明显降低血管内皮细胞脂质过氧化物水平,上调内皮细胞清除氧自由基的能力,从而抑制 sCD40L 对血管内皮细胞的活化。

综上所述,本研究发现,冠心病患者外周血 IL-35 水平显著降低,而 sCD40L 水平显著升高,两者呈负相关。IL-35 能抑制 sCD40L 诱导的血管内皮细胞的活化,其机制主要通过降低血管内皮细胞脂质氧化及血管内皮细胞氧自由基的水平,上调血管内皮细胞清除氧自由基的能力。结果表明,IL-35 和 sCD40L 在冠心病的发生发展过程中起着重要的作用,调控 IL-35 和 sCD40L 可能是治疗冠心病的新途径。

### 参 考 文 献

- [1] Chen J, Li JH, Zhao SJ, et al. Clinical significance of costimulatory molecules CD40/CD40L and CD134/CD134L in coronary heart disease: a case-control study[J]. *Medicine* (Baltimore), 2017, 96(32):e7634.
- [2] Gutiérrez E, Flammer AJ, Lerman LO, et al. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(41):3175-3181.
- [3] 马彩云, 柳景华, 马芹, 等. 冠心病与血管内皮细胞标志物关系的研究[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2016, 24(2): 104-106.
- [4] Yuan M, Fu H, Ren L, et al. Soluble CD40 ligand promotes macrophage foam cell formation in the etiology of atherosclerosis[J]. *Cardiology*, 2015, 131(1):1-12.
- [5] Sha XJ, Meng S, Li XY, et al. Interleukin-35 inhibits endothelial cell activation by suppressing MAPK-AP-1 pathway[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(31):19307-19318.
- [6] 陈灏珠. 心脏病学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007:275-278.
- [7] 李影, 刘素芬, 齐强, 等. 急性冠脉综合征患者内皮损伤的临床研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2016, 9(16): 176-177.
- [8] Li H, Sun K, Zhao R, et al. Inflammatory biomarkers of coronary heart disease[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2018, 10:185-196.
- [9] Bäck M, Weber C, Lutgens E. Regulation of atherosclerotic plaque inflammation[J]. *J Intern Med*, 2015, 278(5): 462-482.
- [10] Chakrabarti S, Rizvi M, Pathak D, et al. Hypoxia influences CD40-CD40L mediated inflammation in endothelial and monocytic cells[J]. *Immunol Lett*, 2009, 122(2):170-184.
- [11] 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.
- [12] 邹美娜, 毕国荣. 可溶性 CD40 配体与心脑血管疾病关系的研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2016, 24(4):5-8.
- [13] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes[J]. *ACC Curr J Rev*, 2003, 12(3):12-13.
- [14] Fouad HH, Al-Dera H, Bakhoun SW, et al. Levels of sCD40 ligand in chronic and acute coronary syndromes and its relation to angiographic extent of coronary arterial narrowing[J]. *Angiology*, 2010, 61(6):567-573.
- [15] Bobryshev YV, Sobenin IA, Orekhov AN. Novel Anti-inflammatory interleukin-35 as an emerging target for anti-atherosclerotic therapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(9): 1147-1151.
- [16] Lin Y, Huang Y, Lu Z, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e52490.
- [17] Mor A, Luboshits G, Planer D, et al. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(21): 2530-2537.
- [18] 刘红利, 位庚, 李红蓉, 等. 通心络对活化血小板诱导人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. *中成药*, 2016, 38(9): 2035-2038.

(收稿:2018-12-19 修回:2019-06-03)

(本文编辑:胡晓静)