

CD40-肿瘤坏死因子受体相关因子抑制剂在动脉粥样硬化治疗中的研究进展

王洁 周鹏

【摘要】 CD40-CD40 配体(CD40L)信号通路与动脉粥样硬化相关,在动脉粥样硬化起始、发展和并发症中起重要作用。CD40/CD40L 是一对互补的跨膜糖蛋白,广泛表达于免疫细胞、内皮细胞、血小板、平滑肌细胞等,参与免疫、炎症反应、血栓形成等多种病理生理过程。动脉粥样硬化启动 CD40 的表达,激活下游信号通路,上调炎症反应和血栓形成相关基因的表达,阻断该信号通路是抗动脉粥样硬化的策略之一。

【关键词】 CD40;动脉粥样硬化;巨噬细胞;血小板;免疫治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.01.001

动脉粥样硬化是心血管疾病的重要病理基础,病变后期因斑块破裂或出血致血栓形成,导致心肌梗死、卒中等心脑血管急性缺血事件。以他汀类为代表的调脂药物,作为心血管疾病的二级预防,在临床上广泛应用。近期的大型临床试验证实瑞舒伐他汀不仅可降低血脂正常患者的低密度脂蛋白胆固醇水平,而且明显减少患者发生心脑血管并发症的风险^[1]。然而,在临床中尚未实现将低密度脂蛋白胆固醇降低至足以消除动脉粥样硬化的目标^[2]。临床迫切需要调脂药物之外的抗动脉粥样硬化药物。

动脉粥样硬化被认为是慢性炎症性疾病^[3],对炎症反应通路的调控是强有力的治疗策略^[4]。最新的 CANOTS III 期试验是抗炎药物初次用于临床的探索,结果表明抗白细胞介素(IL)-1 β 抗体卡那奴单抗(canakinumab)降低了既往有心肌梗死患者的主要复合终点(非致死性心肌梗死、非致死性卒中或心血管死亡)的发生率^[5]。但该药物仅在发生心肌梗死后的患者中进行了试验,对动脉粥样硬化的早期形成是否有干预作用仍不清楚。

CD40-CD40L 是近年的研究热点,该通路的抑制剂从单克隆抗体到小分子靶向药物,主要作用于动脉粥样硬化早期阶段,即对斑块形成起抑制作

用,是动脉粥样硬化早期预防和治疗的潜在药物。

1 CD40/CD40L 抑制剂

CD40 是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,除 B 细胞外,CD40 也在 T 细胞、树突状细胞、单核细胞、血小板、巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞上诱导表达。目前发现 4 种 CD40L 受体:整合素蛋白 α M β 2 (Mac-1)、 α IIb β 3、 α 5 β 1,以及经典受体 CD40。

研究发现,动脉粥样硬化疾病的动物模型,高脂饮食的载脂蛋白 E(ApoE)小鼠在经抗 CD40L 单克隆抗体治疗后,动脉粥样硬化斑块的数量及严重程度均较对照组减轻,且动脉粥样硬化斑块中促炎 M1 型巨噬细胞的数量减少,与斑块形成相关的炎症介质如血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的表达均减少,表明 CD40/CD40L 通路在斑块形成的炎症免疫应答中起重要的作用,抗 CD40L 单克隆抗体治疗通过消退现有斑块及增加斑块的稳定性,改善动脉粥样硬化^[6]。基础研究深入到基因水平,Lutgens 等^[7]的研究表明,CD40L 基因敲除的 ApoE⁻ 小鼠动脉粥样硬化病变体积更小,表现为更加稳定的斑块表型,其特征是脂质积累少,病变处炎性细胞浸润较少。进一步使用特殊的干扰小 RNA(siRNA)对 ApoE⁻ 小鼠的 CD40 进行沉默,可显著降低小鼠动脉粥样硬化病变的严重程度^[8]。动物实验结果表明 CD40/CD40L 抑制剂在抗动脉粥样硬化中的有效作用,但由于该信号通路与免疫系统激活密切相关,导致早期的临床试验并未用于动脉粥样硬化性疾病的

基金项目:国家自然科学基金(81641058);四川省科技厅项目(2015JY0275);北京力生心血管健康基金项目(LHJJ20157620)

作者单位:610500 成都医学院第一附属医院心内科

通信作者:周鹏,E-mail:ap216g@163.com

治疗。

CD40/CD40L 抑制剂在免疫系统疾病和肿瘤中进行了临床试验,应用抗 CD40 抗体治疗狼疮性肾小球肾炎,患者血尿明显减轻,但由于抗 CD40 抗体治疗引发血小板聚集物的不稳定而导致血栓栓塞和心肌梗死等急性栓塞事件,该试验被迫提前终止^[9]。在白血病、淋巴瘤等血液肿瘤治疗中使用 CD40 抑制剂,其抗肿瘤效果未能达到预期目标,不良反应较多,包括免疫抑制和血栓风险,临床试验也被迫提前终止^[10-11]。由于该通路的下游通路有多条,且与血小板、巨噬细胞、内皮细胞、免疫细胞等多种细胞相互作用,应针对特异性的下游通路和细胞研发抑制剂。

2 CD40 与巨噬细胞

巨噬细胞是斑块内最丰富的免疫细胞。共刺激分子是炎症反应途径重要的调节因子,CD40/CD40L 信号通路在动脉粥样硬化起始、发展中有重要作用^[12]。因不同的活化信号驱动巨噬细胞表型转化,巨噬细胞分为促炎 M1 型巨噬细胞和抗炎 M2 型巨噬细胞^[13]。CD40 主要表达在 M1 型巨噬细胞上,CD40 与 CD40L 结合产生促炎性因子和趋化因子,如 TNF、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、趋化因子配体 2(CCL2)等,造成与动脉粥样硬化斑块形成相关的局部炎症环境^[14]。

2.1 CD40-TNF 受体相关因子 (TRAF) 通路

研究发现,CD40 信号通过与 TRAF 结合发挥作用,在动脉粥样硬化形成中起重要作用^[15]。TRAF 共有 7 类,即 TRAF1、2、3、4、5、6、7,CD40 可结合其中 5 类,包括 TRAF1、2、3、5、6。Missiou 等^[16]的研究表明,TRAF1 缺乏小鼠通过限制单核细胞与血管壁的黏附抑制动脉粥样硬化,表明 TRAF1 通路在动脉粥样硬化的起始阶段起到促进作用。与 TRAF1 通路的作用完全不同的是 TRAF2、3、5 通路,CD40 与其相互作用在趋化其他种类的免疫细胞,如 B 细胞、树突状细胞中具有重要的作用,主要与 CD40 介导的免疫功能密切相关。TRAF5 缺乏的小鼠通过促进巨噬细胞摄取低密度脂蛋白和炎症细胞释放的介质,促进泡沫细胞的形成,加速动脉粥样硬化的进展^[17]。TRAF5 通路是所有通路中唯一抗动脉粥样硬化的保护路径。CD40 的 C 端尾部有 1 个近端结合位点 TRAF6,已证明 TRAF6 是与动脉粥样硬化和再狭窄相关的信号通路,缺乏 CD40-TRAF6 相互作用的小鼠白细胞

向内皮细胞募集减少,斑块处巨噬细胞含量降低^[18]。CD40/CD40L 抑制剂具有抗动脉粥样硬化的作用,与阻断下游 TRAF1 和 TRAF6 通路密切相关,特别是 TRAF6 通路。与此同时,下游通路 TRAF2、TRAF3、TRAF5 也被抑制,进而导致免疫抑制。TRAF6 通路的发现,为抗动脉粥样硬化的特异性治疗提供了方向。

2.1.1 TRAF6 抑制剂的发现 研究人员发现,小分子抑制剂(SMIs)可选择性阻断 CD40 与 TRAF6 之间的相互作用,且不影响 CD40 与 TRAF2/3/5 之间的相互作用,从而保留 CD40 介导的免疫功能,如免疫球蛋白的类型转换和 T 细胞增殖^[19-23]。使用 SMIs 治疗可阻断 ApoE⁻ 小鼠早期动脉粥样硬化的发展,并阻止已存在的动脉粥样硬化的进展,还可通过增加胶原含量和更小的坏死核心来改善斑块的稳定性特征^[23]。动物实验结果提示,特异性通路的阻断可成为抗动脉粥样硬化的新途径。同样,在饮食诱导的肥胖模型中,通过 SMIs 阻断 CD40 与 TRAF6 的相互作用,可降低脂肪组织炎症反应、骨质疏松和胰岛素敏感性^[21],进一步表明了 TRAF6 通路抑制剂在糖脂代谢中的作用,其具体机制值得进一步探索。TRAF6 抑制剂抗动脉粥样硬化的主要机制是降低经典单核细胞表达 CD40 和整合素,抑制单核细胞向血管壁的募集,主要是在动脉粥样硬化的起始阶段起作用。

2.1.2 TRAF6 抑制剂纳米颗粒靶向巨噬细胞 纳米颗粒作为药物的载体,在心血管疾病中应用广泛。Duijvenvoorden 等^[24]直接在 ApoE⁻ 小鼠中注射以重组高密度脂蛋白(r-HDL)纳米颗粒为载体的他汀类药物,通过共聚焦成像技术,显示该纳米载体药物在动脉粥样硬化斑块中富集,准确定位于斑块中的巨噬细胞。类似的,研究人员通过将 TRAF6 抑制剂整合到 r-HDL 纳米颗粒中,将 TRAF6 抑制剂特异性靶向作用于巨噬细胞。动物实验验证,TRAF6 抑制剂纳米颗粒治疗 6 周可明显减轻 ApoE⁻ 小鼠早期动脉粥样硬化的发生,这种疗法可以阻断 CD40 与 TRAF6 的相互作用,尤其是阻断巨噬细胞在动脉粥样硬化起始阶段的重要作用。接受治疗的小鼠动脉粥样病变部位巨噬细胞数量减少,斑块过渡到更稳定的表型^[22]。该抑制剂尚未用于人体,其安全性已在非人类灵长类动物体内得到验证,表明以纳米颗粒为载体的 rHDL-TRAF6 抑制剂是安全的,并且在非人类灵长类动

物中具有有良好的生物分布,在小鼠和非人类灵长动物中均未观察到纳米颗粒的毒性作用^[25]。该纳米颗粒的靶向作用及分布需要进一步的实验验证,评估以纳米颗粒为载体的 TRAF6 抑制剂的有效性、靶向性、安全性是未来的研究方向。

3 CD40/CD40L 抑制剂对血小板的作用

在血小板中,CD40L 至少与 2 个受体相互作用,包括 CD40 和 α II b β 3 整合素,通过与 α II b β 3 整合素结合,激活 TRAF-2/Rac1/P38 途径,诱导 P 选择素的表达和血小板的活化,导致血小板脱颗粒和聚集^[26]。血小板 CD40/CD40L 在介导血小板诱导的动脉粥样硬化炎症反应中起关键作用^[27]。

α 5 β 1 整合素是一种血小板可溶性 CD40L (sCD40L)受体。Simic 等^[28]首次使用抗 α 5 β 1 阻断抗体,证实 α 5 β 1 整合素在血小板活化中的作用,显示 sCD40L 与 α 5 β 1 相互作用可导致血小板活化,该阻断剂的应用降低了血小板的活化,减轻了动脉粥样硬化中的炎症反应。另一种治疗策略是利用 CD40L 与 Mac-1 的相互作用,也称为 CD11b/CD1 整合素,它在神经滋养细胞、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞和巨噬细胞中大量表达^[29]。腹腔内应用一种小肽可防止 CD40L 与 Mac-1 的相互作用,并通过减少炎症反应部位的白细胞活化来减轻小鼠动脉粥样硬化^[30]。CD40/CD40L 抑制剂在血小板抗动脉粥样硬化中的作用目前研究较少,主要集中在动物实验。通过活体显微镜监测,发现缺乏 CD40 的血小板导致白细胞向颈动脉的募集减少,伴随 VCAM-1、血小板内皮细胞黏附分子、P-选择素的表达减少,表明血小板 CD40 通过激活白细胞对内皮细胞的募集和活化,在动脉粥样硬化的炎症反应中起关键作用,从而促进动脉粥样硬化的发生和发展^[31]。

4 展望

CD40/CD40L 抑制剂的免疫抑制和血栓风险限制了其临床应用。CD40-TRAF6 小分子抑制剂特异性阻断 CD40 下游 TRAF6,而保留 CD40 与 TRAF2、3、5 之间的免疫作用,免疫抑制风险下降,同时不影响血小板之间的相互作用,血栓风险下降,为抗动脉粥样硬化治疗开辟了新途径。

在动脉粥样硬化的进程中,血管内皮损伤和炎症反应导致内皮通透性增加,利用纳米技术,将 CD40-TRAF6 小分子抑制剂制备为 rHDL 纳米颗粒,该纳米颗粒仅对斑块处巨噬细胞有亲和力,而

不被体内淋巴细胞吸收^[32]。靶向 TRAF6 的纳米免疫疗法是未来抗动脉粥样硬化免疫疗法的研究方向。

血小板 CD40/CD40L 在介导血小板诱导的动脉粥样硬化炎症反应中起关键作用。血小板 CD40 通过激活白细胞和活化内皮细胞在炎症反应中起关键作用,通过增加 VCAM-1、血小板内皮细胞黏附分子、VE-钙黏蛋白和 P-选择素的表达,促进动脉粥样硬化。血小板 CD40 通路抑制剂在抗动脉粥样硬化中作用机制需要进一步探索。

CD40-TRAF 抑制剂尚未应用于临床,药物的安全性、有效性、靶向性需要更多的实验验证。随着研究的深入,需要解决免疫治疗导致的免疫抑制和感染问题,权衡药物的益处和风险,这将成为未来科研的热点和难点。

参 考 文 献

- [1] Khara AV, Demler OV, Adelman SJ, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein particle number, and incident cardiovascular events; an analysis from the Jupiter trial (justification for the use of statins in prevention; an intervention trial evaluating rosuvastatin) [J]. *Circulation*, 2017, 135(25):2494-2504.
- [2] Lobatto ME, Calcagno C, Millon A, et al. Atherosclerotic plaque targeting mechanism of long-circulating nanoparticles established by multimodal imaging [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(2):1837-1847.
- [3] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Herz*, 2019, 44(2):107-120.
- [4] Lutgens E, Atzler D, Döring Y, et al. Immunotherapy for cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(48):3937-3946.
- [5] Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(12):1119-1131.
- [6] Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, et al. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(13):7458-7463.
- [7] Lutgen E, Cleutjens KB, Heeneman S, et al. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(13):7464-7469.
- [8] Hueso M, De Ramon L, Navarro E, et al. Silencing of CD40 in vivo reduces progression of experimental atherogenesis through an NF- κ B/miR-125b axis and reveals new potential mediators in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 255:80-89.
- [9] Perper SJ, Westmoreland SV, Karman J, et al. Treatment with a CD40 antagonist antibody reverses severe proteinuria and loss of saliva production and restores glomerular

- morphology in murine systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol*, 2019, 203(1):58-75.
- [10] Furman RR, Forero-Torres A, Shustov A, et al. A phase I study of acetuzumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(2):228-235.
- [11] Advani R, Forero-Torres A, Furman RR, et al. Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody acetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(26):4371-4377.
- [12] Jansen MF, Hollander MR, Van Royen N, et al. CD40 in coronary artery disease: a matter of macrophages[J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111(4):38.
- [13] Ma B, Yang Y, Li Z, et al. Modular bioinformatics analysis demonstrates that a Toll-like receptor signaling pathway is involved in the regulation of macrophage polarization[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5):4313-4320.
- [14] Honold L, Nahrendorf M. Resident and monocyte-derived macrophages in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2018, 122(1):113-127.
- [15] Lim GB. Nanoimmunotherapy targeting CD40-TRAF6 signalling to reduce atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(6):317.
- [16] Missiou A, Köstlin N, Varo N, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1) deficiency attenuates atherosclerosis in mice by impairing monocyte recruitment to the vessel wall[J]. *Circulation*, 2010, 121(18):2033-2044.
- [17] Missiou A, Rudolf P, Stachon P, et al. TRAF5 deficiency accelerates atherogenesis in mice by increasing inflammatory cell recruitment and foam cell formation[J]. *Circ Res*, 2010, 107(6):757-766.
- [18] Seibold K, Ehrenschrwender M. P62 regulates CD40-mediated NF- κ B activation in macrophages through interaction with TRAF6[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(1):330-335.
- [19] Chen J, Song Y, Bojadzic D, et al. Small-molecule inhibitors of the CD40-CD40L costimulatory protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(21):8906-8922.
- [20] Zarzycka B, Seijkens T, Nabuurs SB, et al. Discovery of small molecule CD40-TRAF6 inhibitors [J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55(2):294-307.
- [21] Chatzigeorgiou A, Seijkens T, Zarzycka B, et al. Blocking CD40-TRAF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(7):2686-2691.
- [22] Seijkens T, Van Tiel CM, Kusters P, et al. Targeting CD40-induced TRAF6 signaling in macrophages reduces atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(5):527-542.
- [23] Van Den Berg SM, Seijkens TT, Kusters PJ, et al. Blocking CD40-TRAF6 interactions by small-molecule inhibitor 6860766 ameliorates the complications of diet-induced obesity in mice[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(5):782-790.
- [24] Duivenvoorden R, Tang J, Cormode DP, et al. A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3065.
- [25] Lameijer M, Binderup T, van Leent MMT, et al. Efficacy and safety assessment of a TRAF6-targeted nanoimmunotherapy in atherosclerotic mice and non-human primates[J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(5):279-292.
- [26] Kojok K, Akoum SE, Mohsen M, et al. CD40L priming of platelets via NF- κ B activation is CD40-and TAK1-dependent [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(23):e03677.
- [27] Jin R, Xiao AY, Song Z, et al. Platelet CD40 mediates leukocyte recruitment and neointima formation after arterial denudation injury in atherosclerosis-prone mice [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(1):252-263.
- [28] Simic D, Bogdan N, Teng F, et al. Blocking $\alpha 5 \beta 1$ integrin attenuates sCD40L-mediated platelet activation[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017, 23(6):607-614.
- [29] Rosetti F, Mayadas TN. The many faces of Mac-1 in autoimmune disease [J]. *Immunol Rev*, 2016, 269(1):175-193.
- [30] Wolf D, Hohmann JD, Wiedemann A, et al. Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis—but does not affect immunity and thrombosis in mice [J]. *Circ Res*, 2011, 109(11):1269-1279.
- [31] Gerdes N, Seijkens T, Lievens D, et al. Platelet CD40 exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(3):482-490.
- [32] Tang J, Baxter S, Menon A, et al. Immune cell screening of a nanoparticle library improves atherosclerosis therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(44):E6731-E6740.

(收稿:2019-06-22 修回:2019-11-10)

(本文编辑:丁媛媛)