

LDLR 缺失促进 CD11b⁺ Ly6C⁺ 单核细胞的分化和 CD11c⁺ 树突状细胞的成熟

童明宏¹, 张伟伟³, 王向明², 张欢欢¹, 陶荣霞¹, 李盈¹, 丁素玲³, 杨向东³

(上海交通大学医学院附属同仁医院 1.检验科,2.神经内科,上海市 200336;
3.复旦大学附属中山医院心血管研究所,上海市 200032)

[关键词] 动脉粥样硬化; 低密度脂蛋白受体; 不成熟髓系细胞; 共同髓系祖细胞; 单核巨噬细胞; 树突状细胞; 炎症

[摘要] 目的 研究低密度脂蛋白受体敲除(LDLR^{-/-})对小鼠 CD11b⁺髓系免疫细胞增殖和分化的影响,探索异常免疫细胞反应在动脉粥样硬化发生中的炎症相关新机制。方法 6~8 周龄的 LDLR^{-/-}小鼠和对照野生型(WT)C57 小鼠分别给予普通饮食和高脂饲养 12 周。采用流式细胞术分析外周血、脾脏和骨髓中免疫细胞亚群,尤其是 CD11b⁺Gr-1⁺髓系免疫细胞、CD11b⁺Ly6C⁺单核巨噬细胞和 CD11b⁺CD11c⁺树突状细胞表达情况,同时检测 Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺共同髓系祖细胞(CMP)在 LDLR^{-/-}小鼠骨髓内表达情况。最后应用¹²⁵I 标记 anti-CD11b 作为分子探针,在体无创监测 LDLR^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化斑块的炎症微环境。结果 (1)在普通饮食和高脂饲养状态下,LDLR 缺失均可显著增加 LDLR^{-/-}小鼠外周血和脾脏内 CD11b⁺和 CD11b⁺Gr-1⁺髓系细胞的表达。(2)LDLR^{-/-}小鼠外周血和肝脏中 CD11b⁺Ly6C⁺单核巨噬细胞的表达增加;CD11b⁺CD11c⁺树突状细胞在 LDLR^{-/-}小鼠脾脏中的表达增加。(3)普通饮食状态下,CMP 的百分比在 LDLR^{-/-}小鼠骨髓中较 WT 小鼠增加,但在高脂饲养时减少。(4)以 CD11b 为炎症分子靶标,可用 SPECT/CT 实时监测 LDLR^{-/-}小鼠动脉粥样斑块。结论 LDLR 缺失显著增加 CD11b⁺Gr-1⁺髓系免疫细胞的增殖和动员,促进 LDLR^{-/-}小鼠单核巨噬细胞的分化和树突状细胞的成熟。以 CD11b⁺髓系细胞为靶标,可以在体监测动脉粥样斑块的炎症微环境。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

LDLR deficiency promotes the differentiation of CD11b⁺Ly6C⁺ monocytes and maturation of CD11c⁺ dendritic cells

TONG Ming-Hong¹, ZHANG Wei-Wei³, WANG Xiang-Ming², ZHANG Huan-Huan¹, TAO Rong-Xia¹, LI Ying¹, DING Su-Ling³, YANG Xiang-Dong³

(1. Clinical Laboratory, 2. Department of Neurology, Affiliated Tong Ren Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200336, China; 3. Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Low density lipoprotein receptor; Immature myeloid cell; Common myeloid progenitor; Mononuclear macrophage; Dendritic cell; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** To identify the role of low density lipoprotein receptor (LDLR) on the proliferation and differentiation of CD11b⁺ myeloid subsets, particularly CD11b⁺Gr-1⁺ immature myeloid cells with LDLR deficiency mice; To explore the mechanism of abnormal immune cell reaction in the pathogenesis of atherosclerosis. **Methods** 6-8 weeks old LDLR^{-/-} mice and control wild type (WT) C57 mice were fed with normal diet and high-fat diet for 12 weeks. Flow cytometry was used to analyze the subsets of immune cells in peripheral blood, spleen and bone marrow, especially the ex-

[收稿日期] 2017-01-17

[修回日期] 2017-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(91439121、81370402);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20130071110042);上海市长宁区科学技术委员会项目(CNKW2013J09)

[作者简介] 童明宏,硕士,副主任技师,研究方向为免疫学和分子生物学技术,E-mail 为 tongmh2010@sohu.com。通讯作者杨向东,博士研究生导师,教授,研究方向为动脉粥样硬化性心血管疾病发病与防治,E-mail 为 Yang.xiangdong@zs-hospital.sh.cn。

pressions of CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid immune cell, CD11b⁺Ly6C⁺ mononuclear macrophage and CD11b⁺CD11c⁺ dendritic cell. Simultaneously the expression of Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺ common myeloid progenitor (CMP) was detected in LDLR^{-/-} mouse bone marrow. Using ¹²⁵I marker anti-CD11b as a molecular probe, inflammatory microenvironment of LDLR^{-/-} mice aortic atherosclerotic plaque was monitored noninvasively in vivo. **Results** (1) Under the condition of normal diet and high-fat diet, LDLR deficiency markedly enhanced the expressions CD11b⁺ and CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid cells in peripheral blood and spleen of LDLR^{-/-} mice. (2) The expression of CD11b⁺Ly6C⁺ mononuclear macrophages increased in peripheral blood and liver of LDLR^{-/-} mice; The expression of CD11b⁺CD11c⁺ dendritic cells increased in the spleen of LDLR^{-/-} mice. (3) Under normal diet, the percentage of CMP was increased in LDLR^{-/-} mice bone marrow compared with WT mice, but decreased under high-fat diet. (4) Using CD11b as the molecular target of inflammation, SPECT/CT could be used to monitor the atherosclerotic plaque of LDLR^{-/-} mouse in real time. **Conclusion** LDLR deficiency significantly increases the proliferation and mobilization of CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid immune cells, and promotes the differentiation of mononuclear macrophage and maturation of dendritic cell in LDLR^{-/-} mice. With CD11b⁺ myeloid cells as a target, the inflammatory microenvironment of atherosclerotic plaques can be monitored in vivo.

低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 为一种膜镶嵌式单链糖蛋白膜受体, 可识别 LDL 颗粒上的载脂蛋白 B100, 也可辨认乳糜微粒残体及中间密度脂蛋白上的载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE), 在脂质代谢和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生中有着重要的作用。美国德克萨斯大学 Ishibashi 等^[1-2] 应用同源重组的方式敲除小鼠 LDLR 基因的第 4 号外显子, 成功构建了 LDLR^{-/-} 小鼠模型。与载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 (ApoE^{-/-}) 相比, LDLR^{-/-} 小鼠血浆胆固醇主要存在于 LDL, 其脂蛋白分布更接近人类。正常饮食下, 成年 LDLR^{-/-} 小鼠血浆胆固醇约为 2 g/L, 通过高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 诱导, LDLR^{-/-} 小鼠血浆胆固醇能迅速上升至 10 g/L 左右, 出现与 ApoE^{-/-} 小鼠相似的 As 病变, 但 LDLR^{-/-} 小鼠的动脉粥样硬化病变程度较 ApoE^{-/-} 小鼠略轻^[3]。既往研究应用 ApoE^{-/-} 和 LDLR^{-/-} 小鼠进行 As 相关的基础和临床药物研究, 多关注这两种 As 敏感基因敲除小鼠的异常血脂变化^[4]。

我们在前期研究发现 ApoE 缺失显著增加 ApoE^{-/-} 小鼠外周血 CD11b⁺Gr-1⁺ 髓系细胞和 CD11b⁺Gr-1⁻ 单核细胞, 而这些髓系细胞可诱导向巨噬细胞分化, 其参与的炎症反应在 As 的发生发展中起着关键的作用^[5]。但是 CD11b⁺Gr-1⁺ 髓系细胞在 LDLR^{-/-} 小鼠的表达情况如何, 目前尚未有文献报道。本文以 HFD 诱导 LDLR^{-/-} 小鼠建立 As 模型, 应用流式细胞技术分析不同 CD11b⁺ 髓系细胞亚群在 LDLR^{-/-} 小鼠体内表达, 并分选骨髓来源 CD11b⁺ 细胞, 体外培养诱导巨噬细胞分化。研究结果为深入了解 As 的炎症相关发病机制和更好的应用 LDLR^{-/-} 小鼠提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 6~8 周龄 LDLR^{-/-} 小鼠 (体重 20 g) 和野生型 (wild type, WT) C57 小鼠 (对照组) 各 20 只, 均为雄性, 由北京维通利华实验动物中心提供。LDLR^{-/-} 和 WT 小鼠各设 2 组, 分别给予普通饮食和 HFD, HFD 含胆固醇 0.15%, 脂肪 21%, 饲养 12 周。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/LG 培养基 (Gibco 公司), 标准胎牛血清 (Hyclone 公司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS; 武汉博士德公司)。FITC-anti-CD11b、PerCPcy5.5-anti-Gr-1 (Ly6G/Ly6C)、PE-anti-CD11c、PE-anti-Ly6C 和 FITC-anti-F4/80 等荧光标记抗体 (购自 BD Bioscience 和 eBioscience 公司)。骨髓系祖细胞 (common myeloid progenitor, CMP) 分析采用的 FITC-anti-Lin、PE-cy7-anti-Sca-1、APC-cy7-anti-CD34 和 APC-anti-cKit 流式分析抗体订自 Biolegend 公司。倒置相差显微镜和相机为 Nikon 产品, 流式分析室 BD FACSAria™ II 流式细胞仪为 BD 公司生产。

1.3 流式细胞术检测髓系细胞亚群和髓系祖细胞

麻醉处死小鼠, 从心室抽取血液约 1 mL, 抗凝处理, 用红细胞裂解液 10 mL 裂解红细胞, 离心后流式缓冲液 200 μL 重悬细胞备用。脾脏组织剪取小块 (黄豆大小), 在 40 μm 滤网上研磨后, PBS 冲洗过滤收集单个细胞。股骨采用含 2% 胎牛血清的 PBS 冲洗骨髓腔, 经 40 μm 滤网过滤收集洗脱液。细胞计数后 (1×10¹⁰ cell/L), 按照 1:100 的浓度, 分别加入所需荧光标记抗体, 冰上孵育 40~45 min。PBS 洗涤细胞后, 离心重悬在含 DAPI 的 200 μL PBS 中。流式分析比较骨髓、脾脏和外周血 CD11b⁺

Gr-1⁺ 髓系细胞、CD11b⁺ Ly6C⁺ 单核巨噬细胞、CD11b⁺CD11c⁺ 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的百分比变化。CMP 采用 Lin⁻ Sca-1⁻ CD34⁺ cKit⁺ 进行分析。

1.4 CD11b⁺ 髓系细胞的磁珠分选和诱导巨噬细胞分化

小鼠处死后取股骨,用预冷 PBS 冲洗骨髓腔,经 40 μm 滤网过滤收集洗脱液,1200 r/min 离心 5 min。弃上清,加入红细胞裂解液重悬细胞,室温放置 5 min。再加入含 2% 胎牛血清的 PBS 终止裂解,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 含 2% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞,参照抗体说明书加磁珠抗体 (anti-CD11b micro-beads, 德国 Miltenyi), 4℃ 孵育 40 min。用 PBS 洗涤 1~2 次,经分离柱分离出 CD11b⁺ 细胞。离心后加入培养基重悬细胞,计数后按 100 万个细胞/孔加入 6 孔板中培养。根据实验需要,先加入粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (60 μg/L, 24 h) 孵育,再加入氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) (80 mg/L, 48 h) 诱导吞噬脂质和泡沫化。

1.5 主动脉斑块油红 O 染色

小鼠处死后剪开右心房,采用 1 mL 注射针头经心尖先后注射 10 mL PBS 及 5 mL 多聚甲醛进行灌注。灌注后在体视显微镜下将主动脉全长分离取下,置于 4% 多聚甲醛中固定 6 h,后转移至 20% 蔗糖溶液中保存。用眼科剪将主动脉纵行剪开,水洗,再用 60% 异丙醇浸泡 10 min。然后用新鲜配制的油红 O 工作液染色 30 min,60% 异丙醇漂洗 3~5 min,至背景近乎透明。置于黑色不反光绒布上拍照。每组小鼠选取 3 只小鼠进行染色。主动脉血管斑块/血管面积采用 ImageJ 软件进行分析。

1.6 ¹²⁵I-Anti-CD11b 的制备

在中山医院核医学科完成,以 Iodogen 方法进行。简述如下:在涂有 Iodogen (约 10 μg) 的反应管中依次加入 100 μL rat anti mouse CD11b (BD Bioscience, 0.2 g/L)、50 μL 含 Na¹²⁵I 的 0.1 mol/L PBS (40 Ci/L),轻轻混匀,室温条件下反应 10 min。采用甲醇和水的混合溶液 (甲醇:水 = 85:15) 作为展开剂,以 Whatman 3 mm 层析试纸为固定相测定标记率,¹²⁵I-Bevacizumab 的 Rf = 0, Na¹²⁵I 的 Rf = 0.8。2 组小鼠 (每组 3 只) 每只分别通过尾静脉注射 1 mCi 左右的 ¹²⁵I-Anti-CD11b 水溶液,3 h 后腹腔注射 100 μL 2.5% 巴比妥钠麻醉,经 micro SPECT/CT (Nano-SPECT/CT[®], 复旦大学附属肿瘤医院) 全身显像。每只小鼠在进行 SPECT 显像之前首先进行 CT 扫

描,CT 扫描参数选取 256 数选取进的帧分辨率、45 kVp 的球管电压和 0.15 mA 电流以及 500 毫秒/帧的曝光时间,小鼠全身扫描时间约为 7 min,在采集图像的同时通过 Nucline 1.02 软件 (匈牙利 Mediso 公司) 进行实时图像 3D 重建。CT 扫描结束后,进行同机 SPECT 扫描,SPECT 扫描选用 4 个高分辨 9 孔板配合锥形准直器同时实现图像的高分辨及高灵敏度,扫描参数选择 1 mm/pixel 的分辨率及 256×256 的矩阵排列以及 24 个投影和每次投影 60 s 的扫描时间,小鼠全身扫描约需 24 min。扫描完成后,图像通过 InVivoScope 1.44 软件 (美国 Bioscan 公司) 进行 3D-OSEM 重建,重建算法选择 4 个子集及 6 次迭代计算,重建分辨率为 0.4 mm/pixel。

1.7 统计分析

数据使用 SPSS 16.0 软件进行分析,资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用独立样本 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析 (ANOVA) 法, *P* < 0.05 代表统计学上有显著性差异。

2 结果

2.1 LDLR 缺失促进多个 CD11b⁺ 髓系细胞亚群的动员

首先将 LDLR^{-/-} 小鼠和对照组 WT 小鼠分为普通饮食和 HFD 饮食 12 周 4 组 (每组各 8~10 只小鼠)。为了明确 LDLR 缺失对免疫细胞,尤其是髓系细胞表达的作用,我们应用流式细胞技术 (FACS),比较分析了不同髓系免疫细胞亚群在 HFD 和普通饮食饲养的 LDLR^{-/-} 和 WT 小鼠外周血的表达情况 (图 1A)。FACS 结果显示 CD11b⁺ 髓系细胞 (图 1B): 普通饮食 LDLR^{-/-} 小鼠高于 WT 小鼠 (13.08% ± 3.26% 比 6.54% ± 1.55%, *P* < 0.05), 高脂饮食 LDLR^{-/-} 小鼠高于 WT 小鼠 (13.14% ± 3.67% 比 7.42% ± 2.02%, *P* < 0.05); CD11b⁺ Gr-1⁺ 不成熟髓系细胞 (immature myeloid cell, IMC) (图 1C): 普通饮食 LDLR^{-/-} 小鼠高于 WT 小鼠 (5.70% ± 1.65% 比 2.27% ± 0.78%, *P* < 0.05), 高脂饮食 LDLR^{-/-} 小鼠高于 WT 小鼠 (6.09% ± 1.99% 比 3.08% ± 1.09%, *P* < 0.05)。FACS 检测也发现 CD11b⁺ CD11c⁺ DC 在 LDLR^{-/-} 小鼠的脾脏中较 WT 小鼠有显著的增加 (图 1D), 高脂饮食 LDLR^{-/-} 小鼠高于 WT 小鼠 (3.83% ± 1.16% 比 2.62% ± 0.84%, *P* < 0.05)。

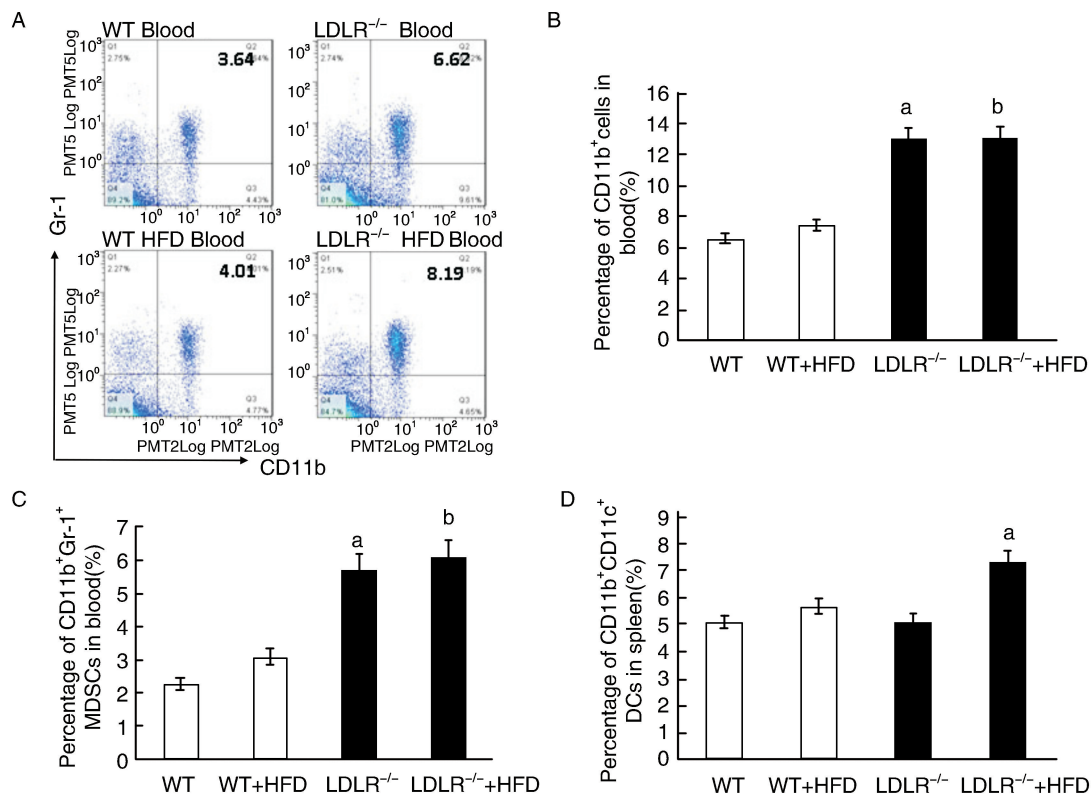


图 1. 流式细胞分析检测 LDLR^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠 CD11b⁺ 髓系细胞亚群的表达 ($n=10$) A 为流式代表图, B 为外周血 CD11b⁺ 细胞, C 为外周血 CD11b⁺Gr-1⁺ 细胞, D 为脾脏 CD11b⁺CD11c⁺ DC 细胞。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.05$, 与对照 WT 组比较。

Figure 1. The expression of CD11b⁺ myeloid cells in LDLR^{-/-} and WT mice by FACS ($n=10$)

2.2 LDLR 缺失对小鼠骨髓和脾脏 CD11b⁺ 髓系细胞表达的影响

众所周知,骨髓和脾脏因其有大量的造血干细胞,是髓系免疫细胞的一个最重要的细胞库。流式分析结果显示,在普通饮食条件下 CD11b⁺Gr-1⁺IMC 的百分比在 LDLR^{-/-} 小鼠的脾脏和骨髓中较 WT 小鼠略微增加,但二者之间无显著差别(图 2A-D)。但是在 HFD 饲养 12 周后,结果显示 LDLR^{-/-} 小鼠的脾脏内 CD11b⁺Gr-1⁺IMC 的百分比较 WT 小鼠显著升高(图 2A、B),骨髓内 CD11b⁺Gr-1⁺IMC 的百分比较 WT 小鼠仅略微升高(图 2C、D)。

进一步研究髓系祖细胞在骨髓和脾脏内的表达,流式分析结果发现在普通饮食状态下,LDLR^{-/-} 小鼠骨髓内 Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺CMP 较 WT 小鼠略微增加,但是 HFD 饲养下, Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺CMP 在 WT 小鼠骨髓内略微增加,在 LDLR^{-/-} 小鼠骨髓内反而略微减少(图 2E)。HFD 饲养下脾脏内 CMP 的百分比在 LDLR^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠均减少(图 2F)。这些结果提示 LDLR^{-/-} 小鼠在外周血中较高水平的 CD11b⁺ 髓系细胞和 CD11b⁺Gr-1⁺IMC, 可能不是由骨髓和脾脏内 Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺

CMP 数量增加所引起。

2.3 LDLR^{-/-} 促进 CD11b⁺Ly6C⁺ 单核巨噬细胞的分化和动员

因为单核细胞可以向巨噬细胞分化和吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞,我们进一步分析了 CD11b⁺Ly6C⁺ 单核巨噬细胞在 LDLR^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠的外周血、肝脏、脾脏的表达情况。流式结果显示在 HFD 条件下,CD11b⁺Ly6C⁺ 单核细胞在 LDLR^{-/-} 小鼠的外周血的百分比较 WT 小鼠有显著的增加(13.05%±3.62%比 8.67%±2.04%, $P<0.05$;图 3A); CD11b⁺Ly6C⁺ 单核细胞的百分比在 LDLR^{-/-} 小鼠的肝脏中略为增加(图 3B)。流式结果也证实,具备促动脉粥样硬化效应的 CD11c⁺CD80⁺ 成熟型 DC 在高脂饮食 LDLR^{-/-} 小鼠的脾脏的百分比较 WT 小鼠有显著的增加(3.83%±0.92%比 2.62%±0.84%, $P<0.05$;图 3C)。我们进一步从 WT 小鼠骨髓分离 CD11b⁺IMC,用 80 mg/L ox-LDL 孵育 48 h,镜下结果证实其可向巨噬细胞分化;流式分析结果肯定了 ox-LDL 孵育促进 CD11b⁺F4/80⁺ 巨噬细胞的分化(图 3D)。

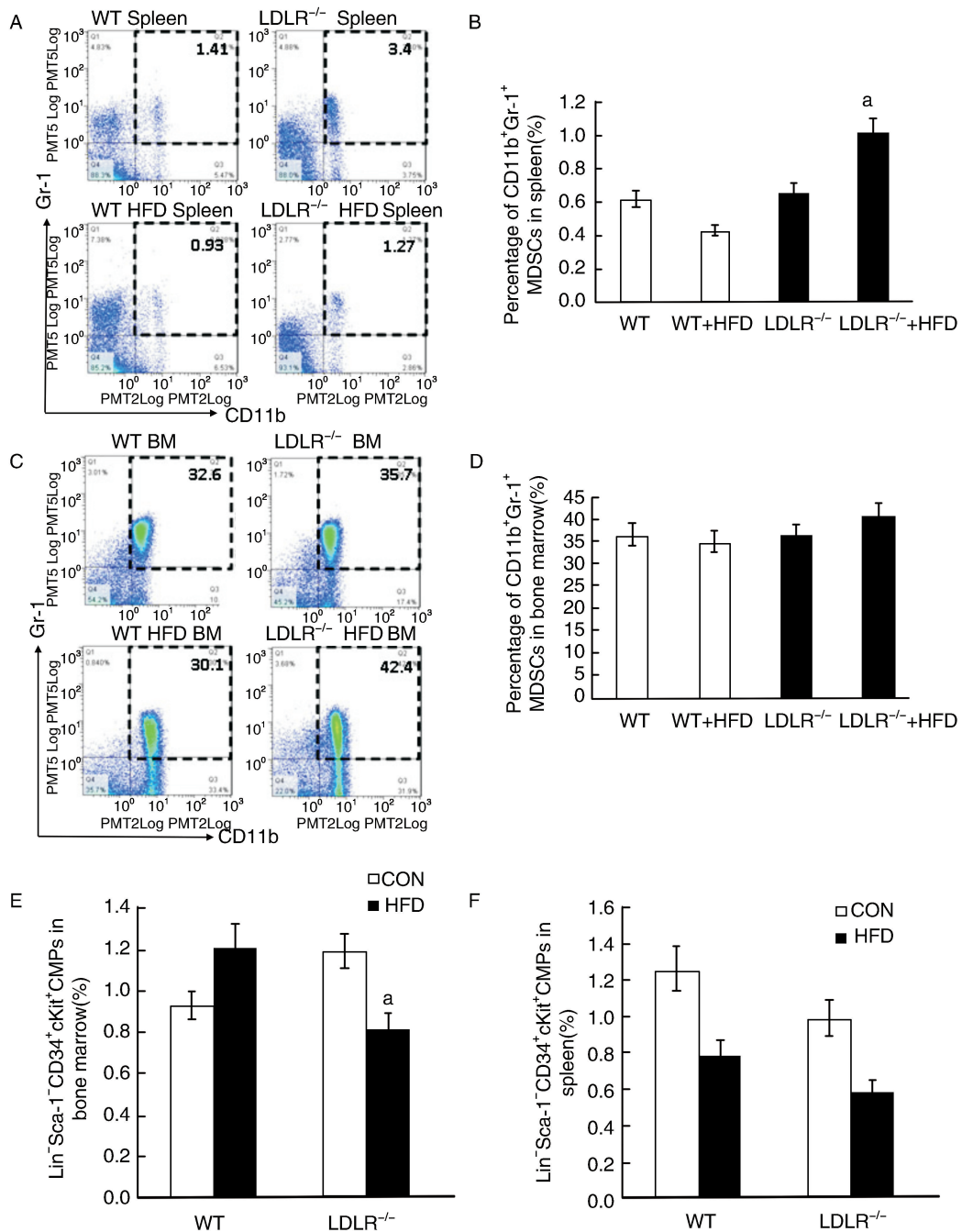


图 2. CD11b⁺髓系细胞的前体细胞和 CMP 在 LDLR^{-/-}小鼠和 WT 小鼠的表达 (n = 10) A 为流式细胞分析脾脏的代表图, B 为脾脏 CD11b⁺Gr-1⁺IMC, C 为流式细胞分析骨髓的代表图, D 为骨髓 CD11b⁺Gr-1⁺IMC, E 为骨髓 Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺CMP, F 为脾脏 Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺cKit⁺CMP. CON 为普通饮食. a 为 P < 0.05, 与对照组比较。

Figure 2. The expression of CD11b⁺immature myeloid cells and CMP in the bone marrow and spleen of LDLR^{-/-} and WT mice (n = 10)

2.4 SPECT/CT 显像 LDLR^{-/-}小鼠斑块炎性微环境

鉴于 CD11b⁺髓系免疫细胞在 LDLR^{-/-}小鼠的高表达,我们推测其在 LDLR^{-/-}小鼠斑块内会有高表达。首先应用 HFD 饲养 LDLR^{-/-}小鼠和 WT 小鼠 12 周制备 As 小鼠模型。应用¹²⁵I 标记 anti-CD11b 经小鼠尾动脉

注射,经 SPECT/CT 扫描 HFD 饲养的 LDLR^{-/-}和 WT 小鼠(每组各扫描 3 只)。LDLR^{-/-}小鼠在主动脉弓部(椭圆圈内)放射性摄取比 WT 小鼠明显增高(图 4A)。主动脉油红 O 染色结果显示 LDLR^{-/-}小鼠较 WT 小鼠的血管斑块显著增加(图 4B)。

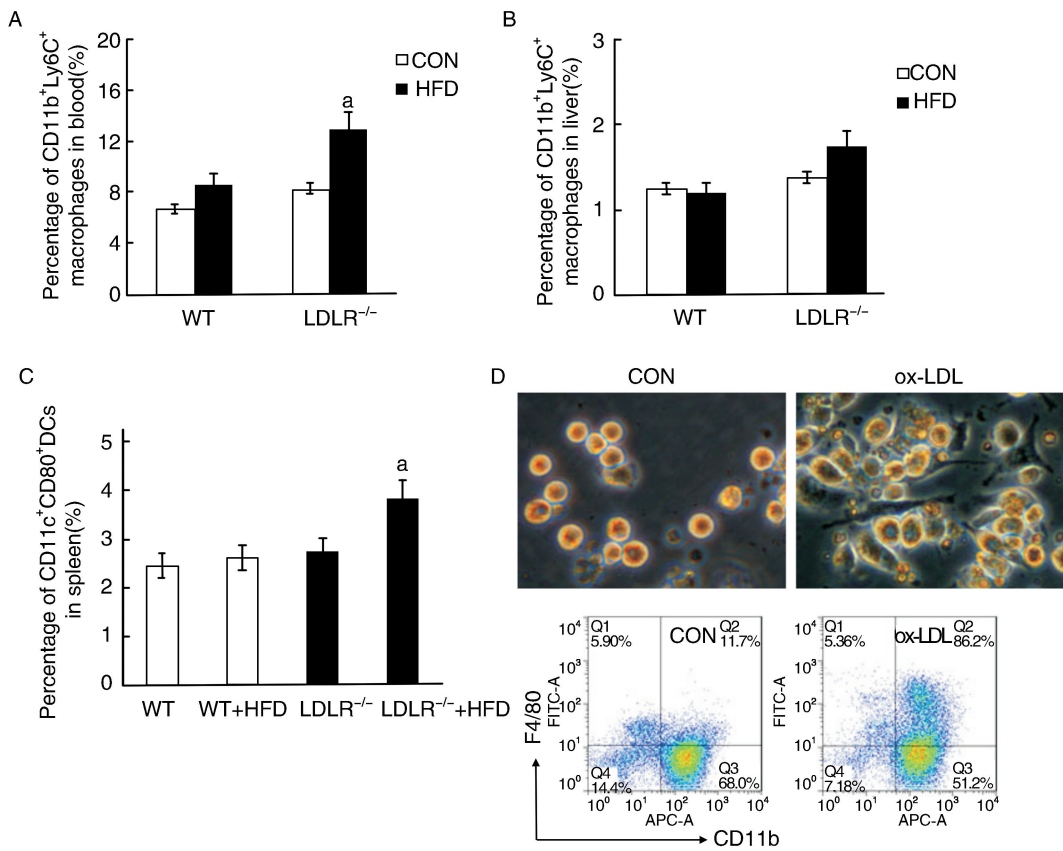


图 3. CD11b⁺Ly6C⁺单核巨噬细胞在 LDLR^{-/-}小鼠和 WT 小鼠的表达及其向巨噬细胞的分化 (n = 10) A 为外周血, B 为肝脏, C 为脾脏, D 为诱导分化的巨噬细胞(400×)。CON 为普通饮食。a 为 P<0.05, 与对照组比较。

Figure 3. The expression and differentiation of CD11b⁺Ly6C⁺ monocyte/macrophages in LDLR^{-/-} and WT mice (n = 10)

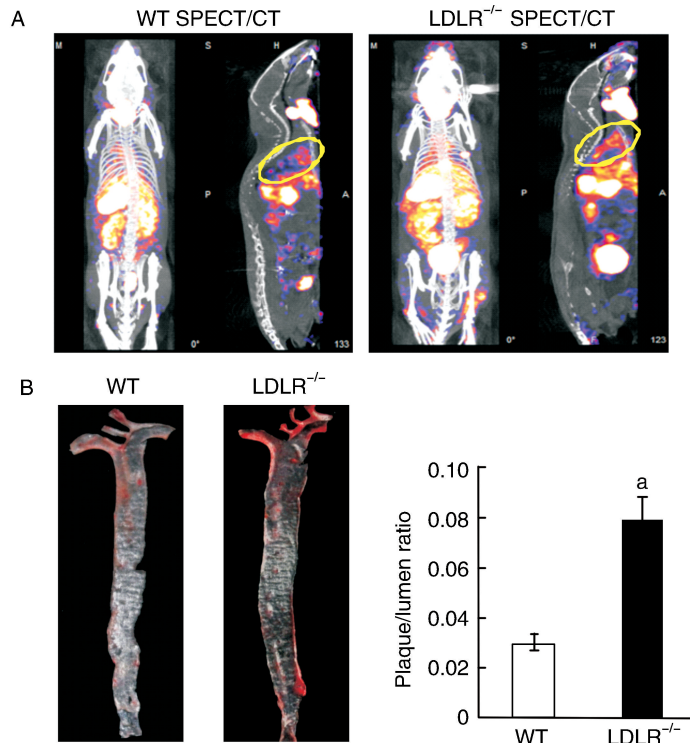


图 4. SPECT/CT 活体显像 LDLR^{-/-}小鼠和 WT 小鼠 As 斑块及主动脉油红 O 染色分析 (n = 3) A 为 SPECT/CT 活体显像 LDLR^{-/-}小鼠斑块, B 为主动脉油红 O 染色。a 为 P<0.05, 与对照组比较。

Figure 4. Inflammatory CD11b⁺ cells in atherosclerotic plaques detected by SPECT/CT imaging and oil red O staining (n = 3)

3 讨论

动脉粥样硬化是心脑血管疾病发病的重要原因之一,其发病机制的研究一直是热点。上世纪 90 年代 Ross 提出动脉粥样硬化发生的“炎症-反应学说”中,脂质代谢失衡和血管壁炎症反应是 As 的关键驱动因素,贯穿 As 发生发展整个过程^[6-7]。LDL 是主要的促 As 脂蛋白,LDLR 是主要的负责清除血液中低密度脂蛋白胆固醇的细胞表面膜受体。LDLR 为一种膜镶嵌式蛋白质,全长有 839 个氨基酸,也是一类单链糖蛋白膜受体,可识别 LDL 颗粒上的载脂蛋白 B100,也可辨认乳糜微粒残体及中间密度脂蛋白上的 ApoE^[8-9]。LDLR^{-/-}和 ApoE^{-/-}小鼠是目前广泛应用的研究 As 发病和防治的模式动物,是常用家族性高胆固醇血症动物模型。既往研究主要关注 LDLR^{-/-}小鼠模型在 HFD 饲料喂养下发生的严重高胆固醇血症和 As 病变^[4],而对 LDLR 缺失引起的免疫细胞异常增殖和分化研究甚少。

近期研究发现,髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)通过促进诱导型一氧化氮合酶表达,活性氧产生,抑制 CD4⁺T 淋巴细胞增殖,诱导调节性 T 细胞分化,促进血管新生等,抑制机体对肿瘤的免疫应答和逃逸^[10-11]。MDSC 由 CMP 发育分化而来,主要包括 Ly6G⁺粒系细胞亚群和 Ly6C⁺单核细胞亚群,可诱导分化成中性粒细胞、单核巨噬细胞和 DC 等。目前人类 MDSC 表面特异性标志物尚未完全明确,多应用 HLA⁻DR⁻CD33⁺(相当于 Ly6C⁺单核细胞亚群)或者 CD11b⁺CD14⁻CD33⁺(相当于 Ly6G⁺单核细胞亚群)鉴别该细胞群。小鼠约占 5%的脾脏细胞和 30%~50%的骨髓细胞表达 CD11b⁺Gr-1⁺免疫细胞标识,也被称为不成熟髓系细胞^[10-11]。既往有研究报告,急性结肠炎、皮肤炎和腹腔注射脂多糖等,都可以早期动员大量小鼠骨髓和脾脏内 IMC 趋化到炎症组织^[12]。分离骨髓 CD11b⁺Gr-1⁺IMC,体外以粒细胞巨噬细胞集落刺激因子培养,可诱导 CD11b⁺Ly6C^{high}巨噬细胞分化。研究发现 ApoE^{-/-}显著增加小鼠外周血 CD11b⁺Gr-1⁺髓系细胞和 CD11b⁺Gr-1⁻单核细胞, ApoE^{-/-}小鼠脾脏和骨髓中 CD11b⁺Gr-1⁺IMC 的高增殖能力并不依赖于 HFD^[5]。在本研究中,我们进一步研究证明 LDLR^{-/-}也可促进多个 CD11b⁺髓系细胞亚群的动员,无论是普通饮食还是 HFD,CD11b⁺髓系细胞和 IMC 在 LDLR^{-/-}小鼠的外周血中较 WT 小鼠有显著的增加;这与 ApoE^{-/-}显著增加小鼠外周

血 IMC 有相同之处,说明循环和外周组织大量 CD11b⁺髓系细胞和 IMC 细胞的动员是 ApoE^{-/-}小鼠和 LDLR^{-/-}小鼠这两种 As 敏感小鼠的一个重要的生物学特性。最近 Foks 等^[13]研究发现 CD11b⁺Gr-1⁺IMC 可以通过诱导单核型 MDSC 表达干扰素 γ 和一氧化氮,抑制 Th1 和 Th17 淋巴细胞,进而显著减轻(达到 35%)LDLR^{-/-}小鼠的 As 病变。这与我们发现 ApoE^{-/-}小鼠和 LDLR^{-/-}小鼠外周血高表达 CD11b⁺Gr-1⁺IMC 似有不一致的地方,分析其原因可能在于 Foks 等研究主要从单核型 MDSC 可以抑制 T 淋巴细胞反应来解释其抗 As 发展的作用机制,而忽视了单核型 MDSC 在巨噬细胞分化和吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞中的重要作用。

树突状细胞是目前所知抗原提呈能力最强的专职抗原提呈细胞,在识别外源性抗原、内源性抗原及诱导免疫应答和免疫耐受中发挥至关重要的作用。研究证实 DC 也可吞噬脂质形成泡沫细胞。CD11c-DTR 小鼠在注射白喉毒素诱导清除循环和血管内 DC 后,血管 As 病变明显减轻,表明 DC 是 As 早期病变脂质沉积的重要参与免疫细胞^[14]。本研究也发现 CD11b⁺CD11c⁺DC 在 LDLR^{-/-}小鼠的脾脏中较 WT 小鼠有显著的增加,并向成熟型 CD11c⁺CD80⁺DC 发展,提示 DC 的分化和成熟与 LDLR^{-/-}和高脂血症均有一定关联。本研究也分析了高血脂水平对骨髓和脾脏造血干细胞的影响。我们的研究发现在普通饮食状态下,LDLR^{-/-}小鼠骨髓内 Lin⁻Sca-1⁻CD34⁺eKit⁺CMP 较 WT 小鼠略微增加;但在 HFD 饲养下,WT 小鼠骨髓内 CMP 数量略微增加,LDLR^{-/-}小鼠骨髓内 CMP 反而略微减少。HFD 饲养下脾脏内 CMP 的百分比在 LDLR^{-/-}小鼠和 WT 小鼠均减少。这些结果提示 LDLR^{-/-}小鼠在外周血中较高水平的 CD11b⁺髓系细胞和 IMC 可能不是通过直接增加骨髓和脾脏造血微环境中 CMP 的数量而引起。我们在前述研究中报道了 ApoE^{-/-}促进 IMC 增殖可能与其增加 IMC 自 G1 周期进入增殖期 S 期有关^[5]。LDLR^{-/-}小鼠的 IMC 可能具有同样的细胞周期调控机制,其分子机制有待进一步研究。

As 是脂代谢和炎症免疫反应异常的疾病。我们对 ApoE^{-/-}和 LDLR^{-/-}这两种 As 敏感小鼠的研究结果,结合其他研究者的发现,都提示髓系抑制细胞在 As 发生发展中具有多面性的作用,单纯把这群异质性细胞定义为促进或者抑制 As 的免疫细胞,可能都有一定片面性。调节 CD11b⁺IMC 的增殖和分化,尤其是巨噬细胞和 DC 的分化或泡沫化,可能成为检测和防治动脉硬化斑块内炎症微环境的一个

靶标。

[参考文献]

- [1] Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein in receptor-negative mice [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(5): 1 885-993.
- [2] Ishibashi S, Herz J, Maeda N, et al. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(10): 4 431-435.
- [3] Getz GS, Reardon CA. Do the ApoE^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice yield the same insight on atherogenesis? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(9): 1 734-741.
- [4] Véniant MM, Withycombe S, Young SG. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in ApoE^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(10): 1 567-570.
- [5] 童明宏, 孙奋勇, 罗瑞萍, 等. 载脂蛋白 E 缺失促进不成熟髓系细胞的增殖和向单核细胞极化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(8): 779-783.
- [6] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809.
- [7] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [8] 胡琴, 张运. 基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(8): 725-727.
- [9] 商允菊, 戴学栋, 荆文, 等. 脂代谢相关基因在低密度脂蛋白受体基因缺失幼龄小鼠肝脏中的表达分析 [J]. *中华病理学杂志*, 2008, 37(3): 725-727.
- [10] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3): 162-174.
- [11] Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222(1): 162-179.
- [12] Yang XD, Ai W, Asfaha S, et al. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b⁺ Ly6G⁺ immature myeloid cells [J]. *Nat Med*, 2011, 17(1): 87-95.
- [13] Foks AC, Van Puijvelde GH, Wolbert J, et al. CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid-derived suppressor cells reduce atherosclerotic lesion development in LDLr deficient mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 111(3): 252-261.
- [14] Paulson KE, Zhu SN, Chen M, et al. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2010, 106(2): 383-390.

(此文编辑 曾学清)