

apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块不规则趋化因子和分子标志物 CD11c 的表达

许增祥¹, 卢林明¹, 张允贵¹, 张根葆²

皖南医学院¹ 病理学教研室² 病理生理学教研室, 安徽芜湖 241002

通信作者: 张根葆 电话: 0553-5739474, 电子邮件: wnyxy066@126.com

摘要: **目的** 探讨 apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块处趋化因子 Fractalkine (FKN) 和分子标志物 CD11c 的表达与动脉粥样硬化 (AS) 严重程度的关系。**方法** 高脂饲养 apoE^{-/-}小鼠 12 周, 建立动物模型, 同时以普食饲养的 apoE^{-/-}小鼠作为对照组。实验结束后, 检测小鼠血脂、颈总动脉斑块面积和血管狭窄程度, 评价实验动物 AS 严重程度。然后, 应用免疫组织化学的方法检测斑块处 FKN、CD11c 的表达情况。**结果** 与对照组相比, 实验组 AS 斑块面积和血管狭窄率均升高 (约 4 倍和 2 倍); 实验组 FKN 表达升高, 是对照组的 2 倍多; 实验组斑块内 CD11c 阳性细胞数是对照组的近 4 倍, 两组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 在 AS 斑块发生、发展过程中, 趋化因子 FKN 表达升高, 并且斑块处的树突状细胞增多, 可能在 AS 的发病过程中发挥重要作用。

关键词: 不规则趋化因子; 树突状细胞; 动脉粥样硬化; CD11c

中图分类号: R 363.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2013)05-0519-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.05.007

Expressions of Fractalkine and CD11c on Common Carotid Artery Atherosclerotic Plaques from apoE^{-/-} Mice

XU Zeng-xiang¹, LU Lin-ming¹, ZHANG Yun-gui¹, ZHANG Gen-bao²

¹ Department of Pathology, ² Department of Pathophysiology, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241002, China

Corresponding author: ZHANG Gen-bao Tel: 0553-5739474, E-mail: wnyxy066@126.com

ABSTRACT: Objective To explore the association of fractalkine (FKN) and CD11c expressions on common carotid artery atherosclerotic plaques from apoE^{-/-} mice with the severity of atherosclerotic lesions. **Methods** Totally 24 apoE^{-/-} mice were divided into two groups and fed on a high-fat diet or a normal diet for 12 weeks. Then the blood lipids as well as the plaque area and vascular stenosis rate of the common carotid artery were measured to evaluate the severity of atherosclerotic lesions of the animals. Moreover, immunohistochemical staining was performed to examine the levels of FKN and CD11c expression. **Results** The plaque areas and vascular stenosis rates of the common carotid artery in the experimental group were remarkably larger than those in control group (about 4-fold and 2-fold, respectively). The level of FKN expression in the experimental group was 2 times of that in the control group ($P < 0.05$), and the number of CD11c⁺ cells in the plaques in the experimental group was about 4 times of than in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expressions of chemokine and FKN remarkably increase in apoE^{-/-} atherosclerotic plaques, suggesting that chemokine and FKN may play important roles in the development of atherosclerosis.

Key words: fractalkine; dendritic cells; atherosclerosis; CD11c

Acta Acad Med Sin, 2013, 35(5): 519-523

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种与脂质代谢紊乱相关的免疫炎症性疾病。在粥样斑块中巨噬细胞和 T 细胞是主要成分。有研究显示树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 也存在于 AS 斑块内, 在 AS 发病过程中由不成熟状态逐步发生成熟, 影响 AS 的起始和进展^[1]。未成熟 DCs 不表达 CD11c, 但可低水平表达一些黏附分子, 成熟后可表达 CD11c 和一些协同刺激信号, 如 MHC II、CD83、CD86 等。DCs 作为免疫反应的枢纽, 是体内激活初始 T 细胞的主要抗原提呈细胞。它主要来源于血液中的单核细胞。单核细胞是 AS 斑块中泡沫细胞的前体细胞, 在向炎症部位迁移的过程中需要趋化因子和黏附分子的参与。趋化因子 Fractalkine (FKN) 是目前发现的 CX3C 家族中的唯一成员, 研究提示 FKN 在 AS 的炎症机制中可能发挥作用。本研究以高脂饲养的 apoE^{-/-} 小鼠为动物模型, 观察在 AS 斑块中 FKN 表达和 DCs 浸润的情况, 并探讨 FKN 在趋化 DCs 进入血管内膜参与 AS 的可能机制。

材料和方法

材料 6~8 周龄雄性 apoE^{-/-} 小鼠 24 只, 购自北京大学医学部 (许可证号: SCXK 京 2002-0001); 按照完全随机法平均分为实验组和对照组, 实验组饲以高脂饲料 (含 5% 的猪油、1% 胆固醇); 对照组饲以普通饲料。每只小鼠每天给予 5 g 饲料, 自由饮水, 水为 pH 值 2.8~3.0 消毒水。即用型免疫组织化学试剂盒 (SP 法)、多克隆兔抗小鼠 FKN 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 多克隆兔抗小鼠 CD11c 抗体购自深圳达科为生物技术有限公司。

血清脂质测定 饲养 12 周后, 麻醉后摘眼球取血, 离心, 收集血清, 采用酶法并用全自动生化分析仪测定血清中三酰甘油、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的浓度。

苏丹 IV 大体染色 每组各取 3 只小鼠, 选取左侧颈总动脉开始段约 1 cm; 磷酸盐缓冲液中仔细分离血管周围的结缔组织, 用细铁丝穿过血管段, 小心剪开血管。苏丹 IV 染色步骤: 70% 酒精 2 min, 苏丹 IV 染液 40 min, 80% 酒精 20 min, 自来水冲洗 1 h。将血管内皮向上平铺在载波片上, 拍照。

HE 染色 选取 apoE^{-/-} 小鼠左侧相同部位颈总动脉约 1 cm 长血管条, 石蜡包埋后, 连续切片, 蜡片厚度为 5 μm, 待有斑块后连续切片约 100 张, 每隔

10 张选取 1 张, 行 HE 染色。在高倍镜图像下, 应用 Image J 软件测量血管原管腔面积和现管腔面积, 血管狭窄率评价: 血管狭窄率 = (原管腔面积-现管腔面积) / 原管腔面积, 每条血管观察 10 个动脉断面, 取其平均值。

免疫组织化学染色 SP 法检测斑块处 FKN 及 CD11c (DCs 标记物) 阳性细胞的表达, FKN 抗体浓度 1:150, CD11c 抗体浓度 1:100, 按免疫组织化学试剂盒说明书操作, 最后用二氨基联苯胺在显微镜下控制着色, 苏木素衬染。阳性结果判定: 细胞质或细胞膜出现清晰淡黄色至棕褐色颗粒着色为阳性信号。结合染色强度和阳性细胞数进行分级。2 人双盲法观察切片, 低倍镜下选取染色最强的部位, 高倍镜下观察, 每张切片随机选取 10 个高倍镜视野。按着色程度计分: 细胞着色与背景相似者计为 0 分; 着色浅、略高于背景者计为 1 分; 中度色、明显高于背景者计为 2 分; 强染、着色很深者计为 3 分。按阳性细胞比例计分: 视野中阳性细胞数 < 5% 计 0 分, 5% ~ < 25% 计 1 分, 25% ~ < 50% 计 2 分, 50% ~ < 75% 计 3 分, ≥ 75% 计 4 分。两项计分相乘后分为 4 级: 0 分为阴性 (-), 1~4 分为弱阳性 (+), 5~8 分为阳性 (+ +), 9~12 分为强阳性 (+ + +)。若两个人观察结果相差 3 分则重新评定。计数 CD11c⁺ 细胞数量时, 以着色至少略高于背景者为准, 随机数 10 个高倍镜视野, 不足 10 个高倍镜视野的数整张切片; 所得数据取平均值。

统计学处理 应用统计学软件 SPSS 12.0 进行统计分析, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

血脂测定结果 高脂饲养 apoE^{-/-} 小鼠 12 周后, 摘眼球取血, 采用酶法并用全自动生化分析仪测得血清中三酰甘油、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的浓度均高于普食组 (P < 0.05) (表 1)。

AS 病变程度分析结果

苏丹 IV 染色结果: apoE^{-/-} 小鼠颈总动脉经苏丹 IV 染色后显示为红色, 结果显示, 实验组动物斑块面积百分数 (12.42 ± 1.25)% 是对照组 (3.74 ± 1.02)% 的近 4 倍。实验组颈总动脉斑块面积明显增大 (图 1A、1B)。

HE 染色结果: 每条血管观察 10 个动脉横断面, 计

表 1 apoE^{-/-}小鼠血脂测定结果 ($n=12$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)
Table 1 The blood lipids of apoE^{-/-} mice ($n=12$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别 Group	三酰甘油 Triglyceride	总胆固醇 Total cholesterol	高密度脂蛋白胆固醇 High-density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇 Low-density lipoprotein cholesterol
普食组 Normal diet group	0.48 ± 0.24	10.14 ± 0.74	0.47 ± 0.07	7.08 ± 0.76
高脂饮食组 High-fat diet group	0.86 ± 0.17 ^a	18.36 ± 3.12 ^a	0.56 ± 0.17	17.41 ± 3.17 ^a

与普食组比较, ^a $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ compared with normal diet group

算其血管狭窄率, 并取平均值。实验组血管狭窄率为 (38.58 ± 3.82)% ($n=8$), 是对照组 (13.39 ± 2.74)% ($n=9$) 的近 3 倍。与对照组相比, 实验组血管狭窄程度更加严重 ($P < 0.05$) (图 1C/1D)。

CD11c⁺ 细胞的分布 实验组 CD11c⁺ 细胞数目 18.46 ± 5.17 较对照组 4.62 ± 1.91 明显升高 ($P < 0.05$) (图 2A、2B)。CD11c⁺ 细胞在斑块肩部和内皮下有聚集倾向, 而对照组阳性细胞数少, 且散在分布。

FKN 的表达 随机选取 10 个不同高倍镜视野, 对细胞染色强度和阳性细胞数目进行打分, 对二者的乘积进行比较, 结果显示实验组不规则趋化因子的表达明显升高 (5.31 ± 1.58 比 2.27 ± 0.79) ($P < 0.05$) (图 2C、2D)。

讨 论

DCs 是体内最强的抗原提呈细胞之一, 是免疫反应的枢纽。研究显示 AS 斑块内的 DCs 多聚集在受紊乱血流影响、易于发生 AS 病变的部位^[2]; 并且 90% 以上是与 T 细胞并存于有炎症浸润新生内膜处^[3]。另有研究显示, DCs 不仅参与 AS 的形成和发展, 而且还可能与斑块的稳定性有关^[4]。因此, 有学者认为 DCs 可能成为未来 AS 防治的一个新靶点。但迄今为止,

DCs 在 AS 斑块形成、发展过程中的作用仍未明确。大部分 DCs 来自于血液中的单核细胞, 单核细胞在血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 表面发生滚动、黏附、迁移, 是由于激活的 ECs 表达的一系列选择素、黏附分子和内皮下产生的趋化物的作用。有研究表明斑块处存在的氧化性脂蛋白就是对 DCs 有较强趋化作用的物质^[5-6]。

不规则趋化因子 FKN 或 CX3CL1 是 1997 年新发现的一种化学趋化因子, 它有两种存在形式, 即膜型

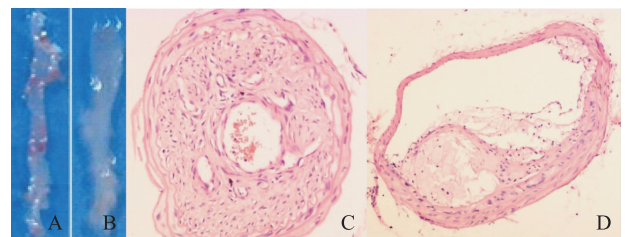


图 1 apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块分布
Fig 1 Atherosclerotic lesions in the common carotid artery of apoE^{-/-} mice

A. 实验组苏丹IV染色 ($\times 100$); B. 对照组苏丹IV染色 ($\times 100$); C. 实验组 HE 染色 ($\times 100$); D. 对照组 HE 染色 ($\times 100$)
A. Oil red O staining in the experimental group ($\times 100$); B. Oil red O staining in the control group ($\times 100$); C. hematoxylin and eosin staining in the experimental group ($\times 100$); D. hematoxylin and eosin staining in the control group ($\times 100$)

图 1 apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块分布

Fig 1 Atherosclerotic lesions in the common carotid artery of apoE^{-/-} mice

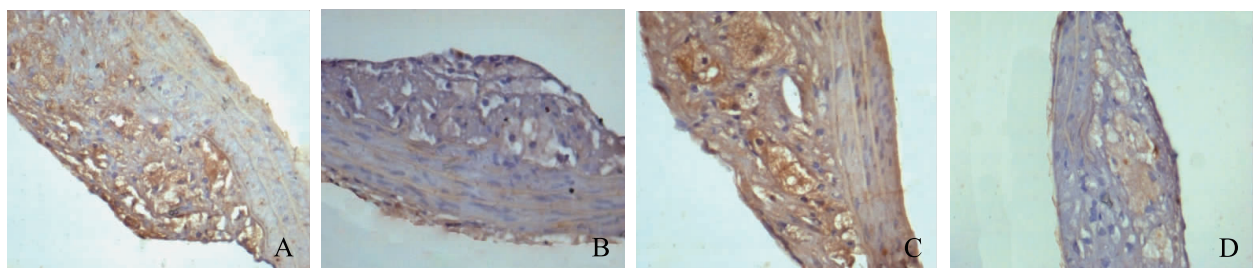


图 2 apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块 CD11c⁺ 细胞分布和不规则趋化因子的表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$)
Fig 2 Expressions of CD11c⁺ and fractalkine on atherosclerotic lesions of the common carotid artery from apoE^{-/-} mice (Immunohistochemical staining, $\times 400$)

图 2 apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块 CD11c⁺ 细胞分布和不规则趋化因子的表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$)
Fig 2 Expressions of CD11c⁺ and fractalkine on atherosclerotic lesions of the common carotid artery from apoE^{-/-} mice (Immunohistochemical staining, $\times 400$)

图 2 apoE^{-/-}小鼠颈总动脉斑块 CD11c⁺ 细胞分布和不规则趋化因子的表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$)
Fig 2 Expressions of CD11c⁺ and fractalkine on atherosclerotic lesions of the common carotid artery from apoE^{-/-} mice (Immunohistochemical staining, $\times 400$)

和可溶型。在人类功能紊乱的 ECs 上已发现有 FKN 的强表达^[7-8]，此外，FKN 还表达在平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMCs)^[9]、DCs^[10] 和巨噬细胞^[11] 等。本研究在高脂饲养的 apoE^{-/-} 小鼠颈总动脉 AS 斑块内可发现有 FKN 的高表达，可能是以上这些细胞表达的结果。FKN 的唯一受体 CX3CR1 则可表达于 T 细胞和 NK 细胞^[12-13]、血液中的单核细胞^[14]。在冠心病患者与健康人的比较中，发现 CX3CR1⁺ 细胞出现率更高^[15]。FKN/CX3CR1 的作用可能在 AS 发病机制中发挥重要作用。首先，ECs 表达的 FKN 能诱导白细胞与之发生黏附，同时，病灶处的 SMCs 表达的可溶性 FKN 通过微循环环境促进 T 细胞和巨噬细胞迁移进入病灶处^[16-17]。其次，细胞学研究显示内皮细胞 FKN 的表达可促进 DCs 的成熟和 CX3CR1 的表达；利用 RNA 干扰技术抑制 DCs CX3CR1 表达后，进而可抑制 DCs 和 ECs 的相互作用，故 FKN/CX3CR1 在 DCs 和 ECs 相互作用中发挥一定作用^[18]。另外，单核细胞和 SMCs 相互作用可以上调一些炎症细胞因子的表达，如肿瘤坏死因子 α 、白介素 1 β 、白介素 6、CX3CR1 和基质金属蛋白酶，并且依赖于 FKN/CX3CR1 间的相互作用^[19]。再者，FKN 还具有延长 AS 病变部位单核巨噬细胞和 SMCs 生存周期的作用^[20]。本研究显示，在 apoE^{-/-} 小鼠颈总动脉 AS 斑块内 CD11c 和 FKN 表达均升高，而 CD11c 是 DCs 的分子标志，这可能为 FKN 参与趋化 DCs 进入斑块处发挥作用提供了体外研究证据。

研究 FKN/CX3CR1 相互作用的目的在于探讨 DCs 进入内膜参与 AS 的可能机制，以便能更好地借助 DCs 的某些特性干预 AS 的发病过程，例如制作疫苗；或者从控制 DCs 进入病变部位的角度，应用 CX3CR1 的拮抗剂（如药物 AZ12201182）可抑制 FKN 的某些作用，如延长病变部位一些细胞的寿命和加速细胞有丝分裂；或阻断 FKN 引起的表皮调节素 mRNA 的表达^[21]。所有这些可更好地研究 FKN/CX3CR1 这对趋化因子/受体的作用，或许可为 AS 的防治提供了一个较好的靶点。

参 考 文 献

- [1] Link A, Bohm M. Potential role of dendritic cells in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(4):708-709.
- [2] Millonig G, Niederegger H, Rabl W, et al. Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(4):503-508.
- [3] Bobryshev YV, Lord RS. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 37(3):799-810.
- [4] Bobryshev YV, Lord RSA. Co-accumulation of dendritic cells and natural killer T cells within rupture-prone regions in human atherosclerotic plaques [J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(6):781-785.
- [5] Xu ZX, Yang YZ, Feng DM, et al. OxHDL promotes maturation and migration of bone marrow derived dendritic cells from C57BL/6J mice [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2008, 23(4):224-229.
- [6] 许增祥, 杨永宗, 彭茜, 等. 氧化修饰低密度脂蛋白对 C57BL/6J 小鼠骨髓源性树突状细胞成熟和迁移的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(7):1036-1039.
- [7] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX sub 3 C motif (Itr) [J]. *Nature*, 1997, 385(6617):640-644.
- [8] Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, et al. Inflammatory agents regulate *in vivo* expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(6):937-944.
- [9] Ludwig A, Berkhout T, Moores K, et al. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity [J]. *J Immunol*, 2002, 168(12):604-612.
- [10] Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(8):2551-2559.
- [11] Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, et al. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(6):923-929.
- [12] Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion [J]. *Cell*, 1997, 91(4):521-530.
- [13] Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, et al. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(37):23799-23804.
- [14] Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX (3) CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion [J]. *Mol Cell*

- Biol, 2000, 20(11):4106-4114.
- [15] Apostolakis S, Krambovitis E, Vlata Z, et al. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators [J]. *Thromb Res*, 2007, 121(3):387-395.
- [16] Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(8):1413-1419.
- [17] Zernecke A, Weber KS, Erwig LP, et al. Combinatorial model of chemokine involvement in glomerular monocyte recruitment: role of CXC chemokine receptor in infiltration during nephrotoxic nephritis [J]. *J Immunol*, 2001, 166(9):5755-5762.
- [18] Liu X, Lu G, Shen J. Silencing CX3CR1 production modulates the interaction between dendritic and endothelial cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1):481-488.
- [19] Butoi ED, Gan AM, Manduteanu I, et al. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(12):2026-2035.
- [20] Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival [J]. *Blood*, 2009, 113(4):963-972.
- [21] Gemma EW, Thomas CC, Alison EJ, et al. Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signaling [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(4):825-835.

(收稿日期: 2012-10-16)