

## 基础与实验研究

趋化因子受体 6 基因敲除对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠  
动脉粥样硬化斑块形成的影响

张小娟, 任满意, 曹晓青, 张春盛, 刘同宝

## 摘要

目的: 探讨趋化因子受体 6 (CCR6) 基因敲除对 ApoE 基因敲除 (ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠主动脉粥样硬化斑块形成的影响及其作用机制。

方法: 杂交培育 CCR6 基因敲除 (CCR6<sup>-/-</sup>) ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 20 只作为实验组, 普通 CCR6<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 20 只作为对照组, 给予高脂饮食。12 周后将小鼠处死进行取材固定, 主动脉根部冰冻切片进行苏木素伊红 (HE) 染色、油红 O 染色及巨噬细胞和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的免疫组化染色, 对斑块的形态、面积及组成进行观测。并培育巨噬细胞, 进行了噶啉蓝比色实验及细胞迁移实验, 对机制进一步分析。

结果: 实验组与对照组相比斑块面积显著减小 [(8.3 ± 1.9) % vs (16.1 ± 2.0) %,  $P < 0.05$ ]; 实验组与对照组相比主动脉根部脂质沉积 [(14.4 ± 2.1) % vs (28.5 ± 3.4) %] 及主动脉大体脂质沉积 [(4.9 ± 2.8) % vs (13.6 ± 3.2) %] 均提示实验组脂质沉积显著减小 ( $P < 0.05$ ); 实验组与对照组相比斑块内巨噬细胞 [(18.9 ± 2.8) % vs (35.7 ± 4.5) %] 及 MCP-1 表达减少 [(16.3 ± 2.2) % vs (23.1 ± 5.6) %]。差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

结论: CCR6 通过影响脂质沉积、巨噬细胞增殖迁移促进动脉粥样硬化的形成。

关键词 动脉粥样硬化; 趋化因子受体 6; 巨噬细胞; 单核细胞趋化蛋白 1

Effect of Chemokine Receptor 6 Knock-out on Atherosclerosis Plaque Formation in ApoE<sup>-/-</sup> Mice

ZHANG Xiao-juan, REN Man-yi, CAO Xiao-qing, ZHANG Chu-sheng, LIU Tong-bao.

Department of Cardiology, Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan (250014), Shandong, China

Corresponding Author: LIU Tong-bao, Email: liutongbao@medmail.com.cn

## Abstract

Objective: To explore the effect of chemokine receptor 6 (CCR6) on atherosclerosis plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice.

Methods: Our research included 2 groups, Experimental group,  $n=20$  CCR6<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mice and Control group,  $n=20$  CCR6<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mice. Both groups received high-fat diet for 12 weeks, and then, the aortic roots were collected for HE staining, the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in macrophages for immune-histochemistry staining, the macrophages were cultured for migration study, and the results were compared between 2 groups.

Results: The plaque areas in Experimental group was significantly smaller than those in Control group, (8.3±1.9) % vs (16.1±2.0) %,  $P < 0.05$ . The Experimental group had less lipid deposition in aortic root, (14.4±2.1) % vs (28.5±3.4) %, and less lipid deposition in aorta (4.9±2.8) % vs (13.6±3.2) %, all  $P < 0.05$ . The Experimental group showed less macrophages and lower MCP-1 expression in plaques, (18.9±2.8) % vs (35.7±4.5) % and (16.3±2.2) % vs (23.1±5.6) %, all  $P < 0.05$ .

Conclusion: CCR6 promotes atherogenesis plaque formation by lipid deposition and macrophage migration in ApoE<sup>-/-</sup> mice.

Key words Atherosclerosis; Chemokine receptor 6; Macrophage; Monocyte chemoattractant protein-1

(Chinese Circulation Journal, 2014,29:300.)

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种以脂质斑块在动脉壁聚积为特征的疾病, 伴有动脉管壁增厚变硬、血管弹性减退及管腔缩窄。随着研究的深入, 人们发现动脉粥样硬化是一种巨噬细胞介导

作者单位: 250014 山东省济南市, 山东大学医学院 山东省胸科医院 心内科

作者简介: 张小娟 副主任医师 硕士 主要从事冠心病临床研究 Email: zkj13791050365@163.com 通讯作者: 刘同宝 Email: liutongbao@medmail.com.cn

中图分类号: R541 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2014) 04-0300-04 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2014.04.016

的,多种炎症因子参与的炎症性疾病<sup>[1]</sup>。血液中脂质在管壁过度沉积造成内皮细胞损伤,单核细胞浸润,当单核细胞从损伤的内皮细胞之间移行至内膜下后,在各种炎症介质的刺激下活化为巨噬细胞,又是动脉粥样硬化发生发展的关键步骤<sup>[2]</sup>。

巨噬细胞迁移的过程以及导致其迁移的趋化因子及其受体已经成为关注的焦点。趋化因子通过特异性地偶联其在靶细胞表面的 G 蛋白偶联受体而调节白细胞的迁移。在众多的趋化因子和受体中,趋化因子受体 6 (chemokine receptor 6, CCR6) 及其配体 CC 趋化因子配体 20 (C-C chemokine ligand 20, CCL20) 被认为具备稳定内环境的功能,新近发现它们同样能在炎症中发挥作用<sup>[3]</sup>。本研究利用 CCR6 基因敲除 (CCR6<sup>-/-</sup>) 及载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠分析 CCR6 在动脉粥样硬化发生过程中发挥的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物来源、饲养及分组

动物模型的建立:于 2012-03 至 2013-06,将清洁级 6 周龄雌性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠(维通利华,北京,中国)和 CCR6<sup>-/-</sup> 小鼠(Jackson Labs, Bar Harbor, Maine 04609 USA)进行杂交培养,饲养于山东大学实验动物中心。

分组:20 只 8 周龄的杂交培育 CCR6<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠纳入实验为实验组,对照组为 20 只普通 CCR6<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠。两组小鼠均给予高脂饲料(含胆固醇 0.15%,脂肪 21%)喂养 12 周后,将小鼠处死并行血清血脂及主动脉病理学检查。

### 1.2 检测指标

苏木素伊红(HE)染色:取冰冻切片常规做 HE 染色,从每只小鼠主动脉根部连续切片,每间隔 5 张取 1 张,共取 3 张切片。在光学显微镜下观察斑块大小,用多功能彩色病理图像分析系统软件(ImagePro-Plus soft-ware)分别测出斑块面积及血管内、外膜长度,回归标准圆形后计算斑块面积与血管管腔面积之比。

油红 O 染色:制备冰冻切片,常规行油红 O 染色,在光学显微镜下观察斑块内脂质含量的多少。完整取下小鼠主动脉,剥离主动脉外膜,抛开主动脉行油红 O 染色,ImagePro-Plus soft-ware 计算脂质与血管面积之比。

免疫组化染色:冰冻切片晾干 30 min,入蒸馏水中水化 30 min,再入 0.3% 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液内室温 100 min。然后血清封闭 1 h,以减少非特异

性反应。抗单核—巨噬细胞标志物抗体(Monocyte/Macrophage Marker, MOMA-2, 1:200)检测组织切片中巨噬细胞表达<sup>[4]</sup>,抗单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)抗体(1:100)检测组织切片中 MCP-1 表达。在光学显微镜下观察棕黄色颗粒为阳性表达,采用 ImagePro-Plus soft-ware 做图像数字采集及半定量分析。

### 1.3 细胞实验

细胞培养:小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞购自 American Type Culture Collection(ATCC, 美国标准生物品收藏中心),用含有 10% 胎牛血清(杭州四季青公司)的 RPMI1640(GIBCO, Life Technologies, 上海,中国)培养基在 37℃、5% 的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱中培养,2~3 d 细胞长满,即可传代培养。

蛋白质印迹法(Western blot):细胞经过裂解后,4℃,12 000 g 离心 10 min,二辛可宁酸法蛋白检测(bicinchoninic acid protein assay, BCA)法定量检测蛋白质浓度<sup>[5]</sup>。加入蛋白上样缓冲液,煮沸使蛋白质变性。相同蛋白含量的提取液加入积层胶 90 V,分离胶 120 V,电泳分离细胞蛋白,200 mA 将胶上的蛋白质转移至聚偏二氯乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗(兔抗小鼠 MCP-1 浓度 1:1000),4℃ 孵育 6~12 h。TBST(Tris 25 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.5%, pH=7.6)洗膜 3 次,每次 5~10 min。加入二抗(山羊抗兔二抗 1:20 000),室温孵育 2 h,Tris 盐水吐温缓冲液(TBST)洗膜 3 次。最后加入显影液,印记曝光于 X 光片上后,进行图像分析。

噻唑蓝比色(MTT)实验:将 RAW264.7 细胞消化成单细胞悬液,以每孔 5 000 个细胞的浓度将经小分子干扰 RNA(siRNA)干扰的细胞和对照组细胞分别加入 96 孔板,每孔 200 μl。12 h 后每孔均加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,继续孵育 4 h 后,弃上清液,加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO),震荡 10 min 使结晶物充分溶解,选择 490 nm 波长检测每孔吸光度,并绘制生长曲线。

细胞迁移(Transwell)实验:24 孔板内每孔加有 600 μl 的培养基(含 10% 血清),后在细胞迁移的内室分别加入经或未经 siRNA 处理的 RAW264.7 细胞(100 μl,含 0.1% 血清),放入培养箱,12 h 后,取出细胞迁移,用棉签擦去聚碳酸膜(PVPF 膜)靠近内室那一面的细胞,另一面的细胞用甲醛室温固定 30 min,结晶紫染色 20 min,用清水洗 3 遍以上,后在显微镜下观察细胞,计数。

CCR6 siRNA 干扰实验:CCR6 siRNA 试剂盒购

自 Selleck (Houston, TX 77054 USA), 500  $\mu$ l Opti-MEM (GIBCO) 稀释 siRNA (转染细胞的终浓度为 33 nM), 500  $\mu$ l Opti-MEM 稀释 1.0  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Life Technologies, 上海), 轻轻吹吸 3 次混匀, 室温下静置 5 min。混合转染试剂和 siRNA 稀释液, 室温下静置 20 min。转染复合物加入到 6 孔细胞板中, 1 ml/孔转染 6 h 后换新鲜培养基。

## 1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。测量数据以均值  $\pm$  标准差表示, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 趋化因子受体 6 基因敲除抑制斑块形成

HE 染色结果表明, 对照组可见小鼠主动脉根部形成大面积斑块, 占管腔面积为  $[(16.1 \pm 2.0)\%]$ , 实验组亦可见斑块形成, 但斑块面积  $[(8.3 \pm 1.9)\%]$  显著少于对照组 (图 1), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 趋化因子受体 6 基因敲除抑制斑块内脂质沉积

油红 O 染色发现: 对照组可见小鼠主动脉根部形成大面积斑块, 内含大量红染脂质, 占斑块面积的  $(28.5 \pm 3.4)\%$ ; 实验组亦可见斑块形成, 但斑块内红染脂质  $(14.4 \pm 2.1)\%$  显著少于对照组 (图 2A), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。主动脉大体仍然可以发现: 对照组斑块中的红染面积  $[(13.6 \pm 3.2)\%]$  显著大于实验组  $[(4.9 \pm 2.8)\%]$  (图 2B), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 趋化因子受体 6 基因敲除抑制斑块内巨噬细胞聚集

单核-巨噬细胞表面特异性标志抗原抗体染色结果: 对照组可见小鼠主动脉根部单核-巨噬细胞  $[(35.7 \pm 4.5)\%]$  表达强阳性, 实验组主动脉根部单核-巨噬细胞  $[(18.9 \pm 2.8)\%]$  显著减少 (图 3), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 趋化因子受体 6 siRNA 抑制巨噬细胞增殖迁移

噻唑蓝比色实验结果显示, CCR6 siRNA 干预 6 h 后, 实验组与对照组相比  $[(129.4 \pm 12.2) \text{ vs } (113.8 \pm 9.4)]$  和 CCR6 siRNA 干预 12 h  $[(147.2 \pm 13.5) \text{ vs } (126.7 \pm 15.3)]$ , 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞迁移实验结果显示, CCR6 siRNA 干预 24 h 后, 实验组与对照组相比能够显著抑制巨噬细胞的迁移  $(183.4 \pm 19.3 \text{ vs } 122.8 \pm 8.7)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

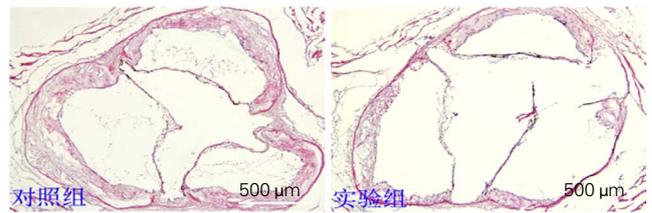
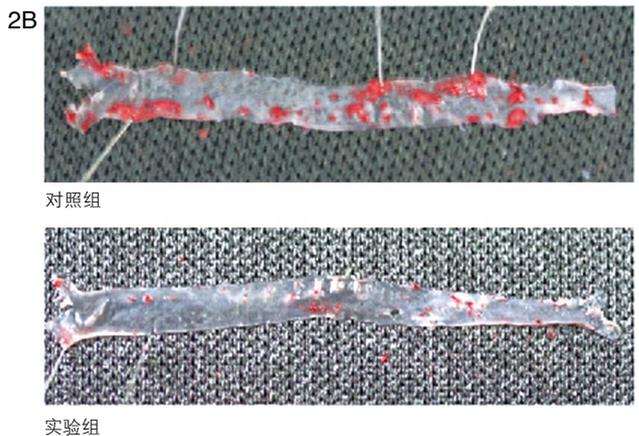
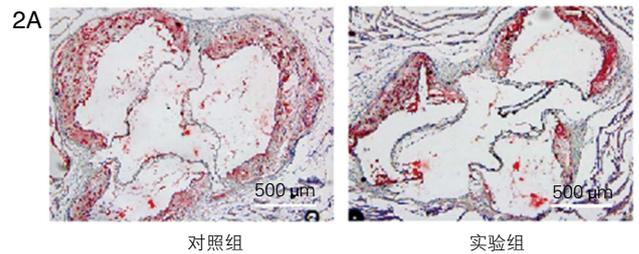
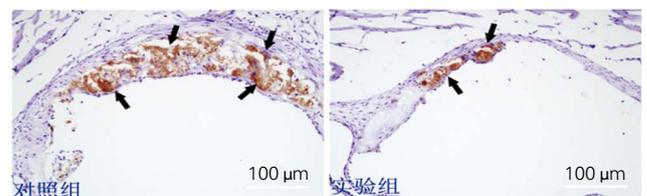


图 1 两组小鼠 ( $n=20$ ) 主动脉根部苏木素伊红染色结果



注: 2A: 主动脉根部(红色部分为阳性染色区域) 2B: 主动脉大体

图 2 两组小鼠 ( $n=20$ ) 油红 O 染色结果

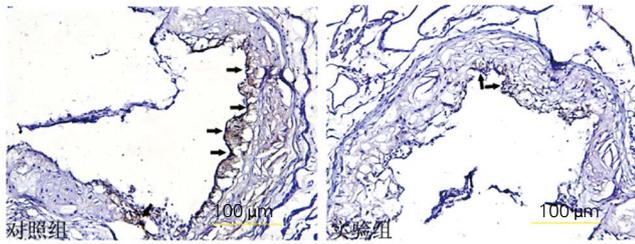


注: 箭头指示阳性染色区域

图 3 两组小鼠 ( $n=20$ ) 主动脉根部单核-巨噬细胞免疫组化染色结果

### 2.5 趋化因子受体 6 基因敲除抑制单核细胞趋化蛋白 1 表达

MCP-1 免疫组化研究结果表明, 实验组小鼠主动脉根部 MCP-1  $[(16.3 \pm 2.2)\%]$  表达显著低于对照组  $[(23.1 \pm 5.6)\%]$  (图 4), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: 主动脉根部单核细胞趋化蛋白 1 免疫组化染色结果(箭头指示阳性染色区域)

图 4 趋化因子受体 6 促进单核细胞趋化蛋白 1 表达

### 3 讨论

趋化因子(chemokines)是由小分子分泌蛋白组成的一个大的细胞因子超家族,能趋化细胞作定向移动,在各种生物学反应中发挥着重要作用。趋化因子受体是异三聚体 G 蛋白耦联受体,有 7 个跨膜区。根据受体结合的趋化因子种类的不同将受体分为 4 类:CR、CCR(CCR12CCR9)、CXCR(CXCR12CXCR5)及 CX3CR。

CCR6 是巨噬细胞炎症蛋白 3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ /CCL20)的受体,CCR6 表达于多种白细胞亚型,包括树突状细胞、B 细胞、TH17 细胞、NK 细胞、中性粒细胞等<sup>[4,5]</sup>。Ruth 等<sup>[6]</sup>的研究表明,CCL20-CCR6 在体外实验中能导致单核细胞的趋化;而 Le Borgne 等<sup>[7]</sup>的研究进一步表明,CCL20-CCR6 能够在体内导致皮炎小鼠单核细胞的聚集。经静脉注射 CCL20 同样引起单核巨噬细胞的聚集。对于静止的单核巨噬细胞和中性粒细胞来说,CCR6 的表达是低水平的,但是在动脉粥样硬化相关细胞因子的刺激下 CCR6 的表达水平会迅速升高。最近研究甚至表明,CCR6 在具有促炎作用的 M1 型和抗炎作用 M2 型两种巨噬细胞上表达水平相当。与健康动脉相比,无论是人的还是小鼠的动脉粥样硬化的冠状动脉和颈动脉中,CCR6 和 CCL20 的表达均明显升高<sup>[8,9]</sup>。

本研究中,我们利用 CCR6<sup>-/-</sup> 敲基因小鼠第一次证明 CCR6 直接参与了动脉粥样硬化的发生发展。本研究完成 CCR6<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> 双敲小鼠模型的构建,利用 HE 染色证明,与对照组相比,实验组小鼠斑块面积明显减少,这说明 CCR6 的存在能够促进斑块的增长。对主动脉根部及主动脉大体进行油红 O 染色,与对照组相比,实验组小鼠斑块内脂质沉积明显减少,表明 CCR6 的存在直接或间接参与了脂质的转运。

为了进一步研究 CCR6 影响斑块形成及发展的机制,我们对斑块内的巨噬细胞进行了免疫组化染

色,发现与对照组相比,实验组小鼠斑块内巨噬细胞含量明显减少,这证明了 CCR6 在斑块内能够促进巨噬细胞的迁移。为了进一步明确 CCR6 对巨噬细胞增殖迁移的促进作用,我们在体外应用 CCR6 的 siRNA 阻断 CCR6 的表达,结果表明阻断 CCR6 后巨噬细胞增殖迁移活性均受到显著影响。最后我们在体内和体外检测了 MCP-1 的表达,结果显示阻断 CCR6 后 MCP-1 表达显著减少,在体内体外均证明了这一结论。有研究表明,CCR6 与其配体 CCL20 的结合能够干扰血糖代谢并促进糖尿病的疾病,而 CCR6 阻断后能够明显抑制糖尿病的进展。此外作为趋化因子,CCR6 参与多种细胞因子的代谢,所以其与内分泌存在关系,在以后的实验中我们将进一步在这一领域做出研究。

动脉粥样硬化已经成为严重威胁人类健康的疾病<sup>[10,11]</sup>,上述所有结果共同表明,CCR6 在动脉粥样硬化的形成和发展过程中发挥了举足轻重的作用。这一发现将为动脉粥样硬化性疾病的防治提供新的依据。

### 参考文献

- [1] Ghattas A, Griffiths HR, Devitt A, et al. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: Where are we now? *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62: 1541-1551.
- [2] Lu X, Kakkar V. Inflammasome and atherogenesis. *Curr Pharm Des*, 2014, 20: 108-124.
- [3] Barth T, Schmidt D, Botteron C, et al. An early reduction in Treg cells correlates with enhanced local inflammation in cutaneous leishmaniasis in CCR6-deficient mice. *PLoS One*, 2012, 7: e44499.
- [4] Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 1994, 32: 5-8.
- [5] Twentymen PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*, 1987, 56: 279-285.
- [6] Ruth JH, Shahrara S, Park CC, et al. Role of macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, 2003, 83: 579-588.
- [7] Le Borgne M, Etchart N, Goubier A, et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity*, 2006, 24: 191-201.
- [8] Yilmaz A, Lipfert B, Cicha I, et al. Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques. *Exp Mol Pathol*, 2007, 82: 245-255.
- [9] Calvayrac O, Rodriguez-Calvo R, Alonso J, et al. CCL20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by LDL in vascular smooth muscle cells: role of NF- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 2733-2741.
- [10] 华先平, 杨勇, 娄国平, 等. 瑞舒伐他汀对颈动脉粥样硬化患者颈动脉内中膜厚度及血清炎症因子的影响. *中国循环杂志*, 2011, 26: 198-201.
- [11] 柯元南. 动脉粥样硬化的抗栓和抗凝治疗. *中国循环杂志*, 2007, 22: 476-478.

(收稿日期:2013-11-20)

(编辑: 漆丽萍)