

## 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块中血小板因子 4 和 Toll 样受体 2 的表达

金海燕, 彭 茜, 顾洪丰, 唐雅玲, 周 浩, 孙 慧, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 受体, Toll 样; 血小板因子 4; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察高脂饲养的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块表达 Toll 样受体 2 和血小板因子 4 的情况, 探讨血小板因子 4 对内皮细胞 Toll 样受体 2 表达的影响。方法 高脂饲料喂养载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 12 周, 建立动脉粥样硬化模型。安乐死处死动物, 原位灌注固定, 取主动脉于 10% 中性缓冲福尔马林中固定, 石蜡包埋连续切片, HE 染色观察动脉粥样硬化斑块形态, 免疫组织化学检测斑块中 Toll 样受体 2 和血小板因子 4 的表达。结果 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂水平明显增高, 主动脉 HE 染色可见动脉粥样硬化病变。在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉富含脂质斑块中 Toll 样受体 2 表达上调, 其中血管内皮细胞、巨噬细胞表达 Toll 样受体 2 明显增多。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉斑块中也发现有血小板因子 4 表达, 主要在内皮细胞和动脉粥样硬化斑块肩部。结论 1. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠粥样斑块中 Toll 样受体 2 表达上调, 并且 Toll 样受体 2 主要表达在粥样斑块的内膜细胞和巨噬细胞上。2. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块中可见血小板因子 4 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Platelet Factor 4 and Toll-Like Receptor 2 are Expressed in Atherosclerotic Plaques of Apolipoprotein E<sup>-/-</sup> Mice

JIN Hai-Yan, PENG Qian, GU Hong-Feng, TANG Ya-Lin, ZHOU Hao, SUN Hui, and YANG Yong-Zong

(The Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Toll-Like Receptor 2; Platelet Factor 4; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate a potential role of Toll-like receptor 2 (TLR2) and platelet factor 4 (PF4) in atherosclerosis. We assessed their expression in murine atherosclerotic plaques. **Methods** Twenty apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice at the age of 12 weeks were fed by high fat diet, ten C57BL/6 mice at the age of 8 weeks were fed by standard laboratory chow for 12 weeks, then all of the animal were euthanized. Blood was sampled from the eye, the serum lipids was enzymatically detected. The thoracic and abdominal aorta was fixed by in situ liquid flow. Thoracic aorta was fix in 10% formalin, paraffin imbedding, serial sections, and HE staining. Aortic lesions of high fat diet-fed apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice were examined for TLR2 and PF4 expression by immunohistochemistry. **Results** Aortic atherosclerotic lesions in all apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice expressed TLR2, whereas aortic tissue obtained from control C57BL/6J mice showed no TLR2 expression. Serial sections immunostaining showed TLR2 localizing with macrophages and endothelial cells in murine atherosclerotic lesions. Furthermore, PF4 expression in murine atherosclerotic plaques were also observed. **Conclusions** TLR2 is expressed by macrophages and endothelial cells in murine atherosclerotic lesions, and we find that PF4 is also expressed in the plaques. They may play a role to enhance and sustain the innate immune and inflammatory responses.

已有资料表明, Toll 样受体 (Toll like receptors, TLR) 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成密切相关<sup>[1,2]</sup>, 活化的 TLR2 可使 C57BL/6 小鼠动脉内膜增厚, 促进泡沫细胞形成, 增加载脂蛋白 E 基因敲除 (E<sup>-/-</sup>) 小鼠 As 病变面积<sup>[3,5]</sup>。而血小板因子 4 (platelet factor 4, PF4) 可通过促进单核细胞与内皮

细胞黏附<sup>[6]</sup>, 影响脂蛋白吞噬而参与 As 形成<sup>[7]</sup>。但 As 形成中 PF4 与 TLR2 的关系尚未充分研究, 本研究选用 As 病变与人类极为相似的载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠作为动物模型<sup>[8]</sup>, 高脂饮食喂养加速 As 形成, 选用观察载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠 As 斑块表达 TLR2 和 PF4 的情况, 以探讨 PF4 对内皮细胞 TLR2 表达的可能影响。

[收稿日期] 2007-05-08 [修回日期] 2007-06-11

[基金项目] 湖南省科技项目 (06C692) 资助

[作者简介] 金海燕, 硕士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化疾病防治, 联系电话 0734-8281586, E-mail 为 yhjinh@163.com。彭茜, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化防治, 联系电话 0734-8281277。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化疾病防治, 联系电话 0734-8281288, E-mail 为 yzyanghy@163.com。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein

cholesterol, HDLC)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司。羊抗 TLR2 一抗、大鼠抗小鼠 Mac-3 一抗和兔抗 vWF 一抗均购自 Santa Cruz 公司。兔抗 PF4 一抗购自 PeroTech 公司。生物素化抗大鼠二抗购自 BD 生物公司。即用型免疫组织化学超敏 Ultra Sensitive TMSP(兔和羊)试剂盒、鼠组织免疫组织化学染色试剂盒、苏木素复染液以及 DAB 显色试剂盒均购自福州迈新公司。其他试剂为国产分析纯。ELX800 型系美国 Biotek 公司产品。数码 CCD 成像系统系日本 Nikon 公司产品。离心机系德国 eppendorf 公司产品。切片机为 Finesse325 型,系英国 Thermo shandon 公司产品。

## 1.2 实验动物与分组

12 周龄雄性载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠 20 只和 8 周龄 C57BL/6 小鼠 10 只,购自北京大学医学部实验动物中心。载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠给予高脂饲料喂养, C57BL/6 小鼠给予普通饲料喂养,共 12 周。实验结束腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(50 μg/g)麻醉,眼眶采血后行安乐死,原位灌注,自主动脉弓至髂总动脉将主动脉取出,于 10% 中性缓冲福尔马林液中固定,石蜡包埋,HE 染色,镜下观察并拍照保存。

## 1.3 血脂检测

血液凝固后 3 kr/min 离心 10 min,全自动生物化学分析仪酶法检测血清 TC、HDLC 和 TG 水平。通过公式计算低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平。

## 1.4 免疫组织化学检测

主动脉标本石蜡包埋,5 μm 厚连续切片,切片常规脱蜡至水,采用兔抗 vWF 多克隆抗体标记内皮细胞、大鼠抗小鼠 Mac-3 抗体标记巨噬细胞、羊抗 TLR2 多克隆抗体标记组织中 TLR2,兔抗 PF4 多克隆抗体标记 PF4,按即用型 SP 试剂盒说明书行免疫组织化学染色,DAB 显色,镜下控制显色时间,苏木素复染 10 min,1% 盐酸酒精分化,流水冲洗返蓝 15 min 以上,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,数码 CCD 成像系统观察并拍照。兔或羊 IgG 替代一抗做阴性对照,抗原呈颗粒状或弥漫性着色,着色强度不同,分布亦不均匀,以能辨认有棕色颗粒或棕黄色着色的细胞为阳性细胞。

## 1.5 统计学分析

实验所得所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS11.5 统计分析软件进行统计处理,采用 t 检验,以  $P < 0.05$  判定差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠血清血脂水平变化

实验结束检测血脂水平,结果如表 1 所示。从表 1 可见,与 C57BL/6 小鼠相比,载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠血清 TC、TG 和 LDLC 水平明显升高( $P < 0.05$ ),而 HDLC 水平明显降低( $P < 0.05$ )。

表 1. 小鼠血清脂质含量 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

指 标	C57BL/6 小鼠	载脂蛋白 E <sup>-/-</sup> 小鼠
n	10	20
TC	0.39 ± 0.91	0.94 ± 0.22 <sup>a</sup>
TG	6.19 ± 0.37	11.74 ± 3.56 <sup>a</sup>
HDLC	3.84 ± 0.56	0.53 ± 0.06 <sup>a</sup>
LDLC	3.06 ± 2.15	11.01 ± 4.13 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 C57BL/6 小鼠相比。

### 2.2 主动脉病理形态学变化

C57BL/6 小鼠血管内膜光滑,连续性好,中膜平滑肌细胞排列整齐,管壁厚薄均匀(图 1A)。而载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉切片 HE 染色后光镜下可见血管内膜增生普遍,粥样斑块病变部位向管腔内突起,由细胞构成凸起的纤维帽,纤维帽较薄,其下可见粉染的无定形物质以及大量梭形胆固醇结晶,部分肌纤维分离断裂。还有由几个泡沫细胞组成的脂质条纹。另外,在动脉血管分支处也可以见到斑块。

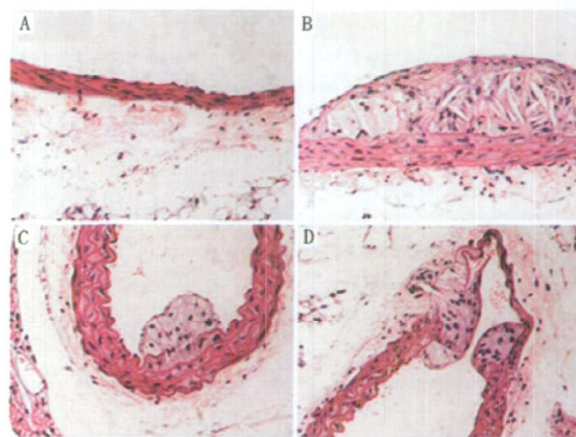


图 1. 高脂喂养载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化斑块病变(40×) A 为 C57BL/6 小鼠的正常血管。B 为载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉粥样斑块,内膜增生明显,有典型纤维帽结构以及梭状胆固醇结晶。C 为载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉脂纹斑块,其内膜增生,并有数个泡沫细胞构成脂纹。D 为载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉分支处斑块。

### 2.3 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠粥样斑块表达血小板因子 4

免疫组织化学检测小鼠主动脉切片,结果见图 2。C57BL/6J 小鼠血管未见 PF4 抗原阳性(图 2A),载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉斑块可见 PF4 阳性染色



(图 2B), 其中主要是血管内皮细胞表达 PF4(图 2C), 另外在斑块肩部表达 PF4 增强(图 2D)。

#### 2.4 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠粥样斑块 Toll 样受体 2 表达

如图 3 所见, C57BL/6 小鼠主动脉血管上未见 TLR2 阳性染色(图 3A)。载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉斑块出现较丰富 TLR2 表达(图 3B), 表达部位主要在斑块肩部、富含脂质的斑块和胆固醇结晶周围。

#### 2.5 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管 Toll 样受体 2 的表达

为了解载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠斑块中各类细胞表达 TLR2 的情况, 对连续切片进行不同抗原免疫染色, 以 vWF 染色检测内皮细胞, Mac-3 检测巨噬细胞, 同时检测 TLR2 抗原表达, 结果见图 4。发现载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉斑块内皮细胞(图 4B)以及巨噬细胞(图 4C)阳性部位与 TLR2 抗原染色(图

4A) 相对应。

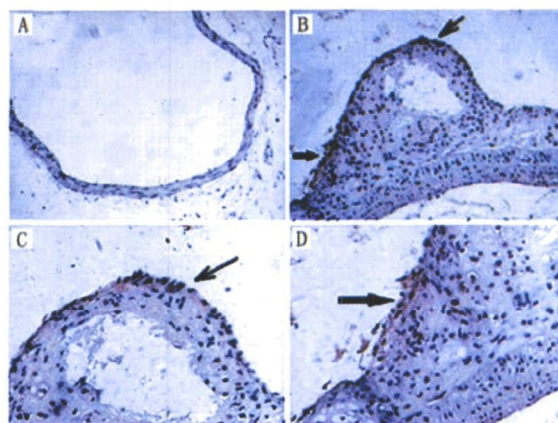


图 2 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠粥样斑块表达血小板因子 4

A 为 C57BL/6 小鼠主动脉, 未见 PF4 表达(20 $\times$ )。B 为载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉斑块上表达 PF4(20 $\times$ )。C 为载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉斑块内皮细胞表达 PF4(40 $\times$ )。D 为载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉斑块肩部 PF4 抗原染色阳性(40 $\times$ )。

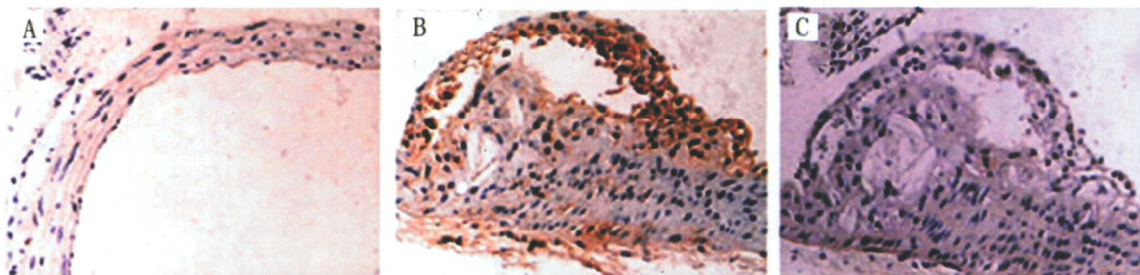


图 3 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠粥样斑块表达 Toll 样受体 2(40 $\times$ ) A 为 C57BL/6 小鼠主动脉血管, 未检测到 TLR2 表达。B 为载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉, 富含脂质斑块上表达 TLR2, 胆固醇结晶部位和斑块肩部可见 TLR2 阳性。C 为羊 IgG 检测阴性对照。

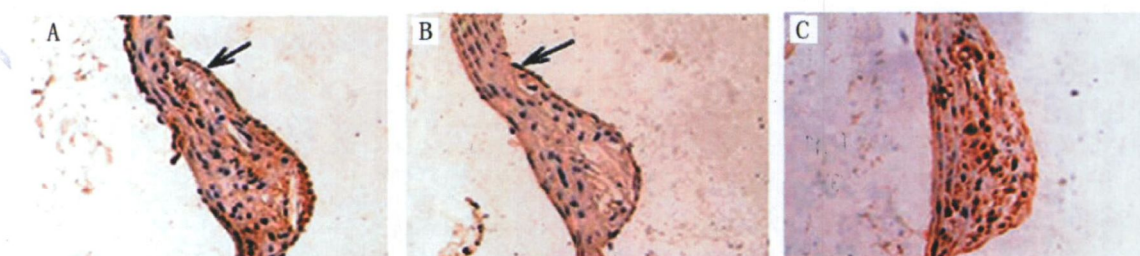


图 4 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉斑块中内皮细胞和巨噬细胞表达 Toll 样受体 2 A 为载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉斑块表达 TLR2。B 和 C 分别是载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠主动脉连续切片中斑块部位 vWF 和 Mac-3 抗原检测, 代表内皮细胞和巨噬细胞。箭头所示为内皮细胞以及 TLR2 在相应部位的表达。

### 3 讨论

动脉粥样硬化(As)是一种血管慢性炎症疾病, TLR 在天然免疫和炎症性疾病当中的重要作用受到广泛关注, 有人认为 TLR 架起了天然免疫与 As 形成之间的桥梁<sup>[9]</sup>。

2002 年 Edfeldt 等<sup>[2]</sup>发现在人动脉粥样斑块上主要表达的是 TLR1、TLR2 和 TLR4 这三种受体, 还

有研究则报道载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠粥样斑块只表达 TLR4, 而不表达 TLR2<sup>[10]</sup>。本实验结果显示载脂蛋白  $E^{-/-}$  小鼠粥样斑块上出现 TLR2 表达。关于 TLR 在动脉粥样硬化中的作用, 关注较多的是 TLR4<sup>[11]</sup>, 但是目前研究热点渐渐转向 TLR2<sup>[4,5]</sup>。TLR2 所识别的配体非常广泛, 包括革兰阳性菌脂磷酸壁、细菌脂蛋白以及酵母聚糖等。在所发现的 11 个 TLR 家族成员中, 只有 TLR2 具有同 TLR1 或 TLR6 构成异

型二聚体(heterodimerize)的独特功能,这说明TLR2对其配体具有相对广泛的特性。最近发现CD36是TLR2发挥功能的协同受体<sup>[12]</sup>,提示在内源性脂质和天然免疫之间可能存在着新的促炎症途径。本实验发现TLR2主要表达在胆固醇结晶周围,也说明上述可能性不无存在。有研究显示非肠道菌群来源内毒素可促使人冠状动脉内皮细胞表达TLR2,并通过TLR2依赖的信号途径促进内皮细胞释放IL-8<sup>[11]</sup>。还有动物实验得出,给予TLR2刺激物促使小鼠TLR2活化,可以增加载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块面积,并使C57BL/6野生鼠炎症因子分泌增加,并促进其新生内膜形成<sup>[13]</sup>。这表明TLR2在血管病变当中传递信号以促进炎症产生。连续切片的免疫组织化学检测发现,TLR2表达在斑块巨噬细胞和内皮细胞相应部位,表明其促进炎症反应和损伤修复有关。

血小板因子4(PF4)是血小板 $\alpha$ 颗粒释放的一种蛋白质,属于C-X-C趋化因子家族成员。在载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠上发现血小板黏附于单核细胞后,才发生单核细胞附壁,这些黏附的血小板则可向血管细胞释放PF4。PF4是较早发现的细胞因子之一,但是对它的功能却仍然没有明确的定义。早期的研究主要集中于PF4的促凝作用,但是进一步的深入研究后发现PF4具有多种其他功能,包括抑制血管新生以及造血功能,对中性粒细胞发挥趋化作用,以及通过血栓调节蛋白/蛋白C系统促进抗凝等作用。最近很多研究显示PF4是一种促动脉粥样硬化的血小板分子。它可以趋化单核细胞并促进其分化为巨噬细胞,还有研究显示PF4减少LDL降解<sup>[14]</sup>,并增强巨噬细胞对ox-LDL的吞噬和酯化作用<sup>[15]</sup>。另外,Pitsilos等<sup>[7]</sup>报道在人As斑块内皮细胞(包括新生血管内皮)和巨噬细胞上表达PF4,而且动脉粥样斑块处PF4的多少与冠状动脉临床疾病具有相关性,这提示在As病变发展和临床疾病进程中PF4发挥作用。本实验证实PF4表达在载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠主动脉粥样斑块上也支持PF4可能促动脉粥样硬化的观点。近期有人报道PF4还可以促进内皮细胞活化,通过核因子 $\kappa$ B途径刺激炎症因子E选择素表达<sup>[16]</sup>。本实验发现斑块表达PF4和TLR2,而且血管

内皮细胞上这两种抗原均表达,提示两者可能存在一定联系,具体过程有待进一步的实验研究。

#### [参考文献]

- [1] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (29): 10 679-684.
- [2] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, **105** (10): 1 158-161.
- [3] Schoneveld AH, Oude Nijhuis MM, van Middelaaar B, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, **66** (1): 162-169.
- [4] Erridge C, Spickett CM, Webb DJ. Non-enterobacterial endotoxins stimulate human coronary artery but not venous endothelial cell activation via Toll-like receptor 2 [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, **73** (1): 181-189.
- [5] Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GL. Chlamydia pneumoniae induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2 [J]. *Infect Immun*, 2007, **75** (2): 753-759.
- [6] von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE, et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium [J]. *Blood*, 2005, **105** (3): 924-930.
- [7] Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters [J]. *Thromb Haemost*, 2003, **90** (6): 1 112-120.
- [8] 王双, 杨永宗, 唐雅玲, 唐朝克, 易光辉, 孙玉慧. 化合物48/80对载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉斑块的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 292-296.
- [9] Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis [J]. *J Immunol*, 2004, **173** (10): 5 901-907.
- [10] Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL [J]. *Circulation*, 2001, **104** (25): 3 103-108.
- [11] 马林, 丁彦春, 崔晓琼, 姜华, 王虹艳, 曲鹏. Toll样受体4-核因子 $\kappa$ B信号通路在血管成形后再狭窄过程中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (7): 596-600.
- [12] Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides [J]. *Nature*, 2005, **433** (7025): 523-527.
- [13] T Kaisho, S Akira. Toll-like receptor function and signaling [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, **117** (5): 979-987.
- [14] Sachais BS, Kuo A, Nassar T, Morgan J, Kariko K, Williams KJ, et al. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface [J]. *Blood*, 2002, **99** (10): 3 613-622.
- [15] Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (8): 6 187-193.
- [16] Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappa B-dependent manner [J]. *Blood*, 2005, **105** (9): 3 545-551.

(此文编辑 胡必利)