

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0189-04

• 实验研究 •

脂多糖动员骨髓 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系抑制细胞及其吞噬氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞

杨向东², 姜宜成¹, 沈成兴¹, 肖纯³, 蒋益波¹, 姚玉宇¹, 朱琪¹, 陆文彬¹

(1. 东南大学附属中大医院心内科, 南京 210009; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001;

3. 湖南省旺旺医院心肺中心, 湖南省长沙市 410001)

[关键词] 脂多糖; 动脉粥样硬化; 髓系抑制性细胞; 单核细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 泡沫细胞

[摘要] 目的 研究小鼠骨髓来源的未成熟 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞在急性炎症脂多糖刺激下动员释放, 及其诱导分化成巨噬细胞样细胞后吞噬氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞。方法 小鼠腹腔注射脂多糖 5 μg/g 体重, 24 h 后采用流式细胞术分析骨髓、脾脏, 和外周血中 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞, CD11b⁺ Gr-1⁺ 单核细胞, 和 CD11b⁺ Gr-1⁺ 粒细胞的百分比的变化。体外泡沫细胞形成实验取小鼠骨髓单个核细胞以 DMEM 培养基 + 胎牛血清培养, 以粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子诱导分化 48 h 加入 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h 以形成脂质负荷泡沫细胞。油红 O 染色鉴定泡沫细胞。结果 (1) 脂多糖腹腔注射可以显著促进 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞从骨髓动员并释放到外周组织; 脾脏和循环中 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞和 CD11b⁺ Gr-1⁺ 单核细胞显著增加。(2) 从骨髓分离的 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞以粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子诱导分化后形成单核/巨噬细胞样细胞, 继而加入氧化型低密度脂蛋白孵育, 可以形成脂质负荷细胞(泡沫细胞)。油红 O 染色可见泡沫细胞的胞浆中有红染的大型脂滴, 核被胞浆内脂滴挤压在一侧。结论 急性炎症刺激脂多糖可以动员小鼠骨髓 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞的向循环和外周组织释放。CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系前体细胞可被诱导分化并吞噬氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Bone Marrow Derived CD11b⁺ Gr-1⁺ Myeloid Suppressor Cells Mobilize by Lipopolysaccharide Stimulation and Transform into Foam Cells with Oxidized Low Density Lipoprotein Phagocytizing

YANG Xiang-Dong², JIANG Yicheng¹, SHEN Cheng-Xing¹, XIAO Chun³, JIANG Yibo¹, YAO Yu-Yu¹, ZHU Qi¹, and LU Wen-Bin¹

(1. Department of Cardiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Institute of Cardiovascular Diseases, University of South China, Changsha 421001, China; 3. Cardiopulmonary Center, Hunan Wangwang Hospital, Changsha, 410001, China)

[KEY WORDS] Lipopolysaccharide; Atherosclerosis; Myeloid Derived Suppressor Cells; Monocyte; Oxidized Low Density Lipoprotein; Foam Cell

[ABSTRACT] **Aim** To study the mouse bone marrow-derived immature CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid progenitor cells in mice stimulated by acute inflammatory LPS and induced to differentiate into macrophage-like cells phagocytized oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to form into foam cells. **Methods** Mice were injected with lipopolysaccharide (LPS) (5 μg/g weight IP), 24 hours later flow cytometry was used to analyze bone marrow, spleen and peripheral blood CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid precursor cells, CD11b⁺ Gr-1⁺ mononuclear cells and CD11b⁺ Gr-1⁺ granulocyte changed in proportion. Experimental in vitro formation of foam cells: mononuclear cells obtained from mice bone marrow were cultured in DMEM + fetal bovine serum (FBS) medium, co-cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for 48 hours to differentiate into monocyte/macrophage-like cells, then co-cultured with ox-LDL (100 mg/L) for 48 hours to form lipid burdened foam cells. Oil red O staining identified foam cells. **Results** (1) LPS intraperitoneal injection can promote the CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid precursor cells from bone marrow to mobilize significantly and to release into the peripheral tissue; the amount of CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid precursor cells and CD11b⁺ Gr-1⁺ mononuclear cells in spleen and circulating pool increased significantly. (2) CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid precursor cells which were isolated from bone marrow were co-cultured with GM-CSF differentiated into monocyte/macrophage-like cells and then were

[收稿日期] 2009-12-15

[修回日期] 2010-02-10

[基金项目] 江苏省科教兴卫重点工程 (RC2007104)

[作者简介] 杨向东, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病相关基因的克隆及功能研究和细胞凋亡机制, Email为 XDY7@263.net; 姜宜成, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及治疗, Email为 jiangyicheng@chinaaren.com。通讯作者沈成兴, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治, Email为 shenchengx2@hotmail.com。

incubated with ox-LDL to form lipid burdened cells (foam cells). Oil red O staining showed the cytoplasm of foam cells with red-dyed large lipid droplets, nuclear were squeezed by the lipid droplets to the corner. **Conclusion** A acute inflammatory stimulus LPS can mobilize the mouse bone marrow $CD11b^+ Gr1^+$ myeloid precursor cells to release to the circulation and peripheral tissue. $CD11b^+ Gr1^+$ myeloid precursor cells can be induced to differentiate and phagocytize ox-LDL to form into foam cells.

泡沫细胞是动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 病变内出现的特征性病理细胞, 在早期病变脂质条纹和中晚期血管斑块的形成中起重要作用。研究泡沫细胞的成因及转归机制对探讨 As 病因学和预防、治疗有十分重要的意义。目前认为血管斑块中的泡沫细胞来源多样, 如血液单核细胞, 血管中膜平滑肌细胞以及树突状免疫细胞, 其中单核细胞可能是最主要的前体细胞^[1]。脾脏被认为是一个重要的单核细胞储存池, 在急性炎症反应期和损伤刺激下, 大量的 $CD11b^+ Ly6C^+$ 单核细胞被动员并募集到炎症局部, 参与组织修复^[2]。目前对这些单核细胞的前体细胞的了解还是很少, 骨髓中单核系髓定向干细胞被认为是可能的前体细胞。髓系抑制细胞 (myeloid derived suppressor cells MDSC) 是来源于骨髓的一大类异质细胞的总称, 以其来源和在脾脏及外周组织中对 T 淋巴细胞的免疫抑制, 介导肿瘤细胞的免疫逃避的特性而命名。MDSC 在骨髓细胞中的比例达到 30% ~ 50%, 目前比较认可的细胞表面识别标志是 MDSC 高表达 $CD11b$ 和 $Gr1$ ^[3-5]。尚未有文献报道 MDSC 与动脉硬化及泡沫细胞形成的关系, 因而, 本研究拟采用脂多糖 (lipopolysaccharide LPS) 刺激, 观察 MDSC 自骨髓到外周组织的动员以及建立 MDSC 来源的泡沫细胞模型。

1 主要材料和方法

1.1 材料

健康 6 周龄 SD 级昆明小鼠 20 只, 体重 18~22 g 均为雄性, 由东南大学医学院实验动物中心提供 (许可证标号: SYXK (苏) 2009-0015)。DMEM/LG 培养基 (Gibco 公司), 标准胎牛血清 (Hyclone 公司), 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein ox-LDL) (广州奕源生物科技有限公司), 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor GM-CSF)、LPS、油红 O (西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司), PerCP Cy5.5 Rat antimouse Ly-6G and Ly 6C 即 anti- $Gr1$ 、PE Rat anti mouse $CD11b$ 、FITC Rat antimouse $Ly6C$ 、Biotin anti-F4/80 (美国 eBioscience 公司), HE 染色试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司) 倒置相差显微镜及相机 (Nikon)。

1.2 髓系抑制细胞的分离及培养

健康 6 周龄 SD 级雄性昆明小鼠 1 只/次, 采取脱颈法处死小鼠, 分离股骨, 采用含 2% PBS 冲洗骨髓腔, 收集洗脱液; 离心后采用红细胞裂解液 (RBC lysis BD) 裂解红细胞后, 按照 1:100 的浓度, 加入 APC-anti- $CD11b$ 和 PercP-anti- $Gr1$, 避光冰上孵育 60 min。PBS 洗涤细胞 2 次, 细胞用滤网过滤, 重悬在含 DAPI 的 1 mL PBS 中。采用流式细胞仪分选 $CD11b^+ Gr1^+$ MDSC, 分选好的细胞, 按照 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 加入 GM-CSF 50 μ g/L, 置于 37℃、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。48 h 后更换新的培养基并加入 ox-LDL 100 mg/L 继续培养 48 h。在本研究中曾尝试采用常规的 Ficoll 梯度离心分离骨髓单个核细胞, 进行泡沫细胞形成实验。

1.3 脂多糖刺激促进 $CD11b^+ Gr1^+$ 髓系抑制细胞释放到外周组织

健康 6 周龄 SD 级雄性昆明小鼠 8 只, 对照组注射生理盐水, 实验组 4 只小鼠给予一次 LPS (5 μ g/g 体重, 腹腔注射), 24 h 后, 分别收集血液、脾脏和骨髓细胞。从心脏采集约 1 mL 动脉血。剪下小块脾脏, 在滤网上研磨后, PBS 冲洗收集。脾脏和血液均采用红细胞裂解液裂解红细胞。骨髓细胞收集方法同上。加入 Anti- $CD11b$ 和 anti- $Gr1$ 孵育, 流式细胞仪分析方法同上。

1.4 单核细胞和泡沫细胞鉴定

$CD11b^+ Gr1^+$ MDSC 与 GM-CSF 共同培养 48 h 后进行 HE 染色及 F480/DAPI 染色观察及鉴定, 诱导分化细胞与 ox-LDL 继续培养 48 h 后进行油红 O⁺ 苏丹素染色观察。

2 结果

2.1 脂多糖炎性刺激快速动员骨髓 $CD11b^+ Gr1^+$ 髓系抑制细胞的动员并释放到外周组织

为观察骨髓和外周组织 $CD11b^+ Gr1^+$ MDSC 在急性炎性刺激下的应急反应, 采用一次腹腔注射 LPS, 24 h 后流式细胞仪分析小鼠骨髓、脾脏和外周血中表达细胞表面标志 $CD11b$ 和 $Gr1$ 的髓系细胞的百分比。流式细胞学分析 (图 1) 显示骨髓中 $CD11b^+ Gr1^+$ MDSC 的百分比从 42% 显著减少到 32%, 外周血中 $CD11b^+ Gr1^+$ MDSC 的比例升高超

过 12 倍 (从 3% 到近 40%), 而脾脏中 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 有近 3 倍的增高 (从 4% 到 11%)。髓系细胞的两个主要亚群: $CD11b^+ Gr-1^-$ 单核细胞从骨髓到外周血和脾脏均有不同程度的增高; 而 $CD11b^+ Gr-1^+$ 粒细胞无论是在外周血还是脾脏, 其比例均无显著改变 (图 2)。该实验结果显示 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 和 $CD11b^+ Gr-1^-$ 单核细胞是主要的应对 LPS 急性刺激的自然免疫细胞。骨髓中 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 的动员增加外周循环中 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 的比例及对脾脏单核细胞储存池的补充。

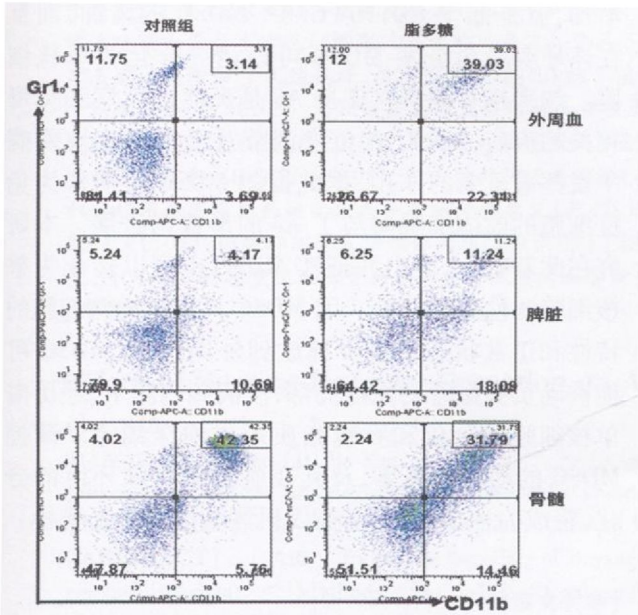


图 1. 脂多糖刺激骨髓 $CD11b^+ Gr-1^+$ 髓系抑制细胞动员释放的流式细胞图。

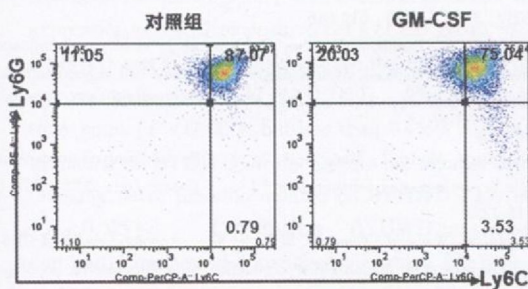


图 2. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子诱导 $CD11b^+ Gr-1^+$ 髓系抑制细胞分化的流式细胞图。

2.2 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子促进 $CD11b^+ Gr-1^+$ 髓系抑制细胞的分化

为进一步验证 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 可以被诱导转化为单核细胞, 采用流式细胞仪分选 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 并与 $50 \mu g/L$ GM-CSF 共同培养 48 h, 流式细胞分析细胞表型改变。GM-CSF 刺激 48 h 后, $Ly6C^+ Ly6G^+$ 的粒细胞比例从 11.05% 升高至

20.03%, $Ly6C^+ Ly6G^+$ 的单核细胞比例从 0.79% 升高至 3.53%。采用相差显微镜观察, 可见贴壁生长的具有不规则外形的单核细胞/巨噬细胞样细胞 (图 3), HE 染色可见典型的肾形或马蹄形细胞核 (图 4)。进一步采用巨噬细胞表面标志 F4/80 染色贴壁生长的单核/巨噬细胞样细胞, 显示分化的细胞高表达单核/巨噬细胞的细胞标志 (图 5)。以上结果提示骨髓来源的 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 可以在生长因子 GM-CSF 刺激下, 分化成单核/巨噬细胞。

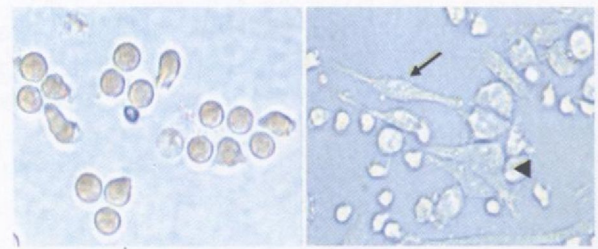


图 3. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子诱导 $CD11b^+ Gr-1^+$ 髓系抑制细胞分化后的细胞形态学 左为对照组, 右为 GM-CSF 组。

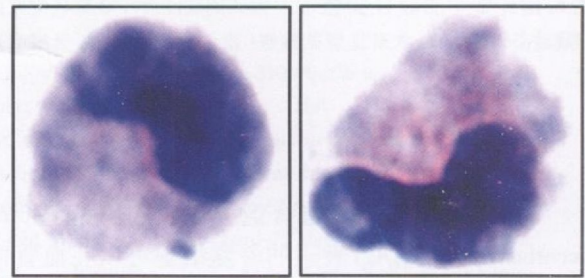


图 4. 单核/巨噬细胞样细胞的 HE 染色图 左为单核样细胞, 右为巨噬细胞样细胞。

2.3 $CD11b^+ Gr-1^+$ 髓系抑制细胞来源的泡沫细胞模型的建立

从骨髓分离的 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 在 GM-CSF 诱导分化成单核/巨噬细胞后, 继续与 ox-LDL 孵育 48 h 观察其对 ox-LDL 的吞噬蓄积并形成泡沫细胞^[6]。 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 来源的单核/巨噬细胞在吞噬 ox-LDL 后可以蓄积脂质在胞浆内形成大的融合脂滴, 油红 O 染色证实该细胞具有典型的泡沫细胞的特征 (图 6)。在采用 FicoII 分离的骨髓单个核细胞进行泡沫化细胞形成实验时, 观察到少量的成纤维细胞样细胞, 它们具有比单核细胞更大的体积, 而且也不会吞噬脂质形成泡沫细胞, 其来源可能是骨髓中的间充质干细胞, 在分离骨髓单个核细胞时一起被分选出来了。

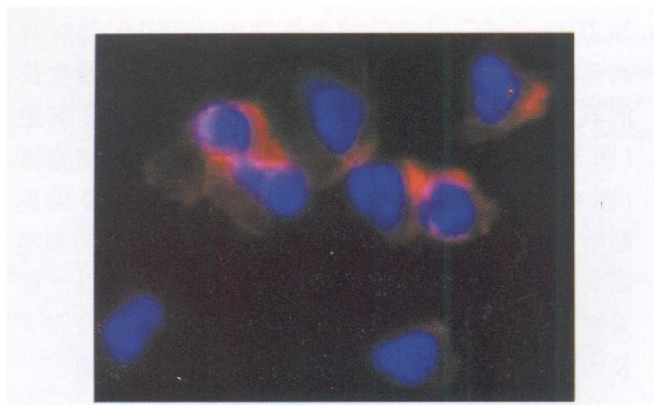


图5. 单核/巨噬细胞的 F480 荧光染色图 F480/DAPI 荧光染色贴壁生长的单核/巨噬细胞, F480 (红色) 显示细胞膜表面高表达单核/巨噬细胞的细胞标志; DAPI (蓝色) 为细胞核。

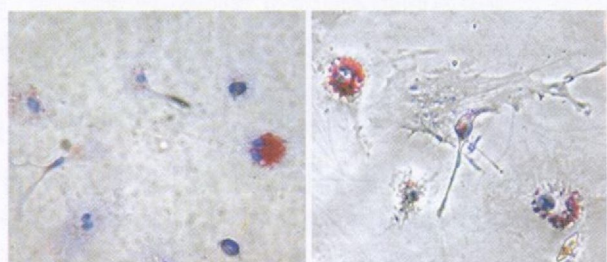


图6. 泡沫细胞油红 O 染色 泡沫细胞经油红 O 染色胞浆内脂滴被染成红色, 苏木素复染见胞核 (蓝色) 被脂滴挤压至细胞边缘。

3 讨论

Ohtsu 小组曾经报道有组胺酸脱羧酶 (histidine decarboxylase, HDC) 表达的骨髓细胞可以在血管内膜损伤局部检测到。从这些骨髓来源的细胞, 有的可以检测到表达巨噬细胞的表面标志 (Mac-1), 或者可以检测到平滑肌细胞的表面标志 α -SMA, 这些发现提示这些骨髓来源的前体细胞可以在血管病变局部转化成巨噬细胞或平滑肌样细胞^[7]。在我们前期相关实验中, 发现骨髓来源的 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 高表达 HDC (未发表资料), 这提示骨髓中的 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 可能是参与血管壁损伤反应的巨噬细胞的前体细胞。本实验通过 GM-CSF 刺激骨髓来源的 MDSC 分化, 流式细胞分析和形态学鉴定证实 MDSC 可以诱导分化成单核/巨噬细胞 (Ly6C⁺ Ly6G⁺ 和表达 F480)。进一步采用氧化修饰低密度脂蛋白孵育骨髓来源的 MDSC 转化的单核/巨噬细胞, 成功建立了泡沫细胞模型。

$CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 是来源于骨髓的一类细胞的总称, 首先被发现大量存在于荷瘤小鼠的外周血和淋巴器官^[8], 后来又陆续在急慢性感染和自身免疫疾病中被发现^[2,9], 最近因其在肿瘤免疫逃避中

的重要作用而引起众多的关注。MDSC 呈现出未成熟细胞的特征, 具备向 Ly6C⁺ 粒细胞或者 Ly6C⁺ 单核细胞或者树突状细胞分化的能力。在肿瘤微环境中, MDSC 可以转化为肿瘤相关的巨噬细胞 (tumor associated macrophage, TAM)。MDSC 在 As 的发病机制中扮演的角色尚不明了, MDSC 是否可以转化为动脉硬化斑块中泡沫细胞亦没有报道。LPS 是动脉硬化发生中重要的相关因子, 因而本研究采用 LPS 刺激, 观察到大量 MDSC 从骨髓动员, 释放到外周循环中。虽然 $CD11b^+ Gr-1^+$ 单核细胞的比例也增加, 但是低于 $CD11b^+ Gr-1^+$ MDSC 的增加, 而且在体外实验也证实 MDSC 可以诱导分化为单核细胞。越来越多的研究支持 As 是炎症性疾病和免疫相关的疾病, MDSC 在免疫调节及慢性炎症性疾病中发挥着重要的作用, 据此推测 MDSC 可能作为免疫细胞的前体细胞参与了 As 的形成与进展。本研究在此基础上, 提出并证实 MDSC 也可以转化为单核细胞源性泡沫细胞。因 MDSC 具有未成熟细胞的特性和正常状态下极少释放到外周组织, MDSC 可能被动员到血管的炎症局部, 浸润到内膜下, 经历向单核细胞的分化和吞噬脂质形成泡沫细胞。调控 MDSC 的动员和募集, 及其在血管斑块微环境的分化, 将成为一个研究 As 病因机制和治疗的新靶标。

[参考文献]

- [1] Gabrilovich DI & Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol* 2009; 9 (3): 162-174
- [2] Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites [J]. *Science* 2009; 325 (5940): 612-616
- [3] Movahedi K, Guillemin M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity [J]. *Blood* 2008; 111 (8): 4233-244
- [4] Dolcetti L, Marigo I, Mantelli R, et al. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation [J]. *Cancer Lett* 2008; 267 (2): 216-225
- [5] Bronte V, Wang M, Overwijk WW, et al. Apoptotic death of CD8⁺ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1⁺ /Gr-1⁺ cell [J]. *J Immunol* 1998; 161 (10): 5313-320
- [6] YANG Xiang-Dong, LI Hong-Xia, WANG Shu, et al. Oxidized low density lipoprotein induced foam cell formation and apoptosis in U937 cells mediated by CD36, one kind of scavenger receptor B1 [J]. *Chin J Arterioscler* 2000; 8 (4): 315-318
- [7] Sasaguri Y, Wang KY, Tanimoto A, et al. Role of histamine produced by bone marrow-derived vascular cells in pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res* 2005; 96 (9): 974-981
- [8] Pericle F, Kiken RA, Bronte V, et al. Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes [J]. *J Immunol* 1997; 159 (6): 2580-585
- [9] Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development [J]. *J Clin Invest* 2007; 117 (5): 155-166

(此文编辑 李玲玲)