

动脉粥样硬化中巨噬细胞增殖调控的研究进展

张欣, 张晓卉 综述, 尹新华 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 细胞增殖

[摘要] 巨噬细胞是机体免疫系统的重要组成部分, 在动脉粥样硬化及相关的心血管疾病中发挥至关重要的作用。传统观点认为巨噬细胞来源于血液单核吞噬系统并不可再生, 但新近研究表明组织内巨噬细胞具有增殖能力并发挥关键作用。目前已知细胞周期调节物、骨髓生长因子和氧化型低密度脂蛋白与动脉粥样硬化中巨噬细胞增殖关系密切。本文就动脉粥样硬化中巨噬细胞增殖调控加以综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Research Progress of Regulation of Macrophage Proliferation in Atherosclerosis

ZHANG Xin, ZHANG Xiao-Hui, and YIN Xin-Hua

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Macrophages; Cell Proliferation

[ABSTRACT] Macrophage, an important component of the immune system, plays a crucial role in atherosclerosis and related cardiovascular diseases. Conventional wisdom holds that macrophages are derived from blood mononuclear phagocytic system and not renewable, but recent studies have shown that tissue macrophage can proliferate and has played a key role. Cell cycle regulators, bone growth factors and oxidized low density lipoprotein are closely related with macrophages in atherosclerosis. This article briefly reviews regulation of macrophage proliferation in atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)及其相关心血管疾病是发达国家的主要死亡原因^[1]。随着对As自身免疫机制研究的深入,巨噬细胞(macrophage, M ϕ)在其病理生理过程中的作用成了研究热点^[2]。目前观点认为,As、再狭窄和旁路移植术后动脉硬化是一种慢性炎症反应病变,而病变血管内细胞过度增殖是其发病的关键因素^[3]。M ϕ 作为主要的增殖细胞类型发挥重要作用。

1 M ϕ 分类及其在 As 中的作用

1.1 M ϕ 分类

M ϕ 分布于全身组织并具有多重生物学功能,在抗感染、变态反应、自身免疫、动脉硬化、纤维化及创伤修复等病理生理过程中发挥重要作用。研究发现不同组织 M ϕ 表型及功能不同,如肺泡 M ϕ 、腹腔 M ϕ

及肝库吞噬细胞在抗原表达、吞噬活性、分泌功能上存在显著差异。而同一组织不同 M ϕ 亚型功能也有不同,如肺间质 M ϕ 在获得性免疫反应中起重要作用、并具有较强的增殖及吞噬能力,而肺血管 M ϕ 抗肿瘤活性相对较强。可见 M ϕ 分类及功能表达复杂多变,为研究疾病的发生发展提供新思路^[2]。

1.2 M ϕ 在 As 中的作用

在 As 发展过程中, M ϕ 是促进斑块进展、造成斑块不稳定的关键因素。其机制包括 M ϕ 吞噬氧化型低密度脂蛋白、凋亡细胞及胆固醇结晶;参与细胞外基质合成、促进血管新生及肉芽肿的形成并释放炎症因子促进斑块胶原缺失、纤维帽变薄、脂核扩大等^[4]。同时研究还发现高同型半胱氨酸血症促进 As^[5],单核巨噬细胞趋化蛋白增加、巨噬细胞募集增多促进 As 进展^[6]。最新研究报道,As 斑块中 M ϕ 可分为 M1/M2/Mox Mha/M4 四个不同亚型,

[收稿日期] 2013-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81370319)

[作者简介] 张欣, 硕士, 研究方向为冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 zx311219@163.com。通讯作者尹新华, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 xinhua_yin@163.com。

并以 M1/M2 亚型为主^[7]。其中 M1 型主要分泌肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 (interleukin, IL) 如 IL-1 β 、IL-6 和 IL-12 等促炎因子, 促进斑块膨胀, 增加其不稳定性; 而 M2 亚型分泌转化生长因子 β 、IL-10 和 γ 干扰素等细胞因子发挥抗炎作用, 同时清除凋亡细胞和坏死组织。M1/M2 的动态平衡影响斑块稳定性, 但其分子机制尚不明确^[8]。其原因可能是各 M ϕ 亚型对内皮细胞、血管平滑肌细胞、淋巴细胞及细胞外基质的影响各异, 不同程度影响 As 进程及斑块稳定性^[9]。

2 M ϕ 的增殖现象

细胞增殖是指通过细胞分裂增加细胞数量的过程, 是生物繁殖及维持细胞数量和机体正常功能的基础。通常来讲, 大多数哺乳动物细胞终末分化后增殖能力减低, 但仍有证据显示单核吞噬细胞系统具有自我复制能力, 来维持组织内固有 M ϕ 数量及功能^[10]。研究发现, 细胞增殖是 As 及再狭窄等阻塞性血管性疾病的主要原因, 而血管平滑肌细胞、内皮细胞及白细胞是主要的增殖细胞类型^[3]。早在 1990 年, GORDON 等人证明 As 斑块中 M ϕ 增殖标志物表达增高, 并提示 M ϕ 是 As 斑块内膜的主要增殖细胞类型 (46% 单核/M ϕ , 9.7% 血管平滑肌细胞, 14.3% 内皮细胞和 13.1% T 淋巴细胞); 而血管平滑肌细胞是中膜的主要增殖细胞类型 (44.4% 血管平滑肌细胞, 20% 内皮细胞, 13% 单核/M ϕ , 14.3% T 淋巴细胞)^[11], 且内膜细胞增殖比例远远大于中膜 (分别是 1.61% + 0.35%、0.05% + 0.03%)。

2011 年 Jenkins 等^[10]人首次证明组织内 M ϕ 增殖并增强 T 淋巴细胞介导的炎症反应。2013 年 Clinton 等人于 Nature Med 发表文章证明 M ϕ 补给依赖于组织内 M ϕ 增殖而非单核细胞浸润。实验还发现, 病变血管增殖标志物 5-溴脱氧尿核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 阳性率为 92% \pm 1% 且经流式细胞仪技术鉴定为 Lin⁻CD11b⁺CD11c^{-/low}F4/80^{high} 成熟 M ϕ 。去除血液中单核细胞后 As 病变面积、M ϕ 量及 M ϕ 增殖标记物不受影响; 而利用特殊喂养方式发现循环血单核细胞数量与组织 M ϕ 量存在显著差异 [单核细胞含量: 血液 (30% \pm 5%), 脾脏 (26% \pm 4%) 和动脉 (25% \pm 6%); 而组织 M ϕ 含量较低 (5% \pm 2%)]。刺激细胞增殖则 M ϕ 含量增加, 病变加重; 但一定时间内 M ϕ 量并无明显改变, 考虑可能由于细胞增殖与凋亡相抗衡的结果。该研究证明 M ϕ 数量及功能的

维持不依赖于单核细胞, 还可能源自组织 M ϕ 前体如定向分化祖细胞等; 且细胞增殖是 As 的特征性改变, 有可能成为治疗新靶点^[12] (图 1)。

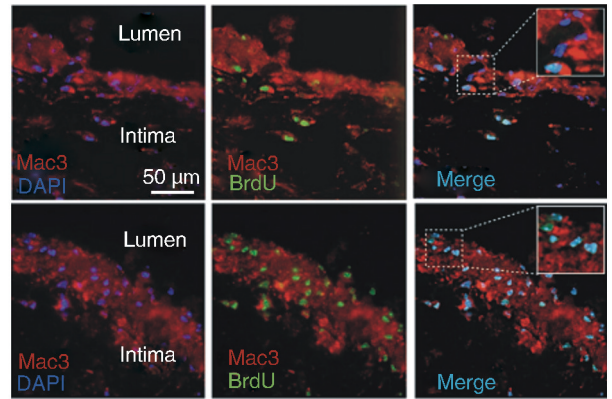


图 1. 免疫荧光显示含 BrdU 渗透泵植入术后 ApoE^{-/-} 小鼠喂高胆固醇饮食 1 周 (上图) 和 4 周 (下图) BrdU⁺ Mac3⁺ 巨噬细胞在主动脉根部病变

Figure 1. Immunofluorescence showing BrdU⁺ Mac3⁺ macrophages in aortic root lesions in ApoE^{-/-} mice consuming an HCD 1 and 4 weeks after implantation of BrdU-containing osmotic pumps

3 As 中 M ϕ 增殖调控的影响因素

多项研究提示载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E knockout, ApoE^{-/-}) As 模型中, M ϕ 增殖现象较为显著^[13]。且目前发现细胞周期调节物、骨髓生长因子和氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 与 As 中 M ϕ 增殖密切相关。

3.1 细胞周期调节物

细胞周期调节物通过调节 M ϕ 增殖在 As 进展中起重要作用^[3]。例如内源性 p53 及细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI) 失活后其抑制斑块内单核/M ϕ 聚集、促进凋亡能力减低, 并导致致病性 M ϕ 比例增加, 从而使细胞过度增殖、细胞凋亡减少、创伤修复功能低下促进 As 病变进展。

3.1.1 p53 基因 研究报道, 内源性 p53 可限制 As 进展。p53 失活内膜 M ϕ 增殖、加速 As 病变进展, p53^{-/-}/ApoE^{-/-} 双基因敲除小鼠 p53 骨髓重建能抑制内膜细胞增殖^[14]。而予以外源性 p53 基因的 Super-p53/ApoE^{-/-} 小鼠, 内膜细胞增殖、As 病变不受影响^[15]。以上结果说明 p53 抑制细胞增殖作用, 但利用不同的实验模型及处理方法得出的结论不尽一致。如 p53^{-/-} 的 ApoE * 3-莱顿转基因鼠骨

髓修复后, As 病变加重, 但细胞增殖无影响^[16]。ApoE^{-/-}小鼠 Cre-loxP 处理致 Mφp53 基因失活可导致致病性 Mφ 含量比例增加, 虽无明显细胞增殖现象但病变处胆固醇聚积减少^[17]。

3.1.2 p21 细胞周期抑制蛋白 (p21^{Cip1}) CKI 包括两大家族: Kip/Cip 家族 (包括 p21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}) 和 INK 家族 (包括 p15^{INKB}、p16^{INKA}、p18^{INKC}、p19^{INKD}), p21^{Cip1} 作为 p53 下游最重要的细胞增殖调节蛋白受到广泛关注^[3]。Merched 等^[18]报道 ApoE^{-/-}小鼠 p21^{Cip1} 缺失时, Mφ 促炎性细胞因子释放减少, 吞噬能力及低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 和清道夫受体 B I 上调而抑制 As。与 ApoE^{-/-}小鼠相比, p21^{Cip1}^{-/-}/ApoE^{-/-}双基因敲除小鼠斑块相对更稳定, 但细胞增殖比例却不受影响。p21^{Cip1} 缺失时 Mφ 吞噬乳胶微粒和凋亡细胞的能力增加, 这说明 p21^{Cip1} 促进 As 病变是由于降低了 Mφ 的吞噬活性。然而, Akyurek 等人^[19]却发现 ApoE^{-/-}小鼠 p21^{Cip1} 缺失促进 As; 但只敲除 p21^{Cip1} 时 As 作用不明显, 只有 p21^{Cip1} 和 ApoE 双基因敲除时病变才显著。为了进一步证明 p21^{Cip1} 的生长抑制作用, Tanner 等人发现 p21^{Cip1} 缺失时, p16^{Ink4a}、视网膜母细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, RB) 和 p53 等生长抑制因子代偿性上调抑制 Mφ 增殖^[20]。

此外有研究发现, p27^{Kip1} 失活可导致内膜 Mφ 异常增殖, 促进 ApoE^{-/-}小鼠 As 进展^[13]; ApoE^{-/-}小鼠 MφRB 和生长抑制因子缺失则促进致病性 Mφ 增殖及 As 进展^[21]。可见 CKI 调节 Mφ 增殖及 As 进展机制仍有待研究。

3.1.3 Ink4/Arf 基因多态性 随着对 As 遗传易感性研究的深入, 基因多态性成为人们关注的热点。2007 年发现染色体 9p21 附近的 Ink4/Arf 基因位点是人类发生 As 病变的独立危险因素。这一基因位点包括细胞周期依赖性激酶抑制基因 2A (cyclin dependent kinase inhibitor, CDKN2A) (编码 p16^{Ink4a} 和 Arf; 人 p14^{Arf}, 鼠 p19^{Arf}) 和 CDKN2B (编码 p15^{Ink4b}), 以及反义引物非编码 RNA (ANRIL; 沉默 Ink4/Arf)^[22]。研究发现, 低密度脂蛋白受体基因敲除 (LDL receptor knockout, LDLR^{-/-}) 小鼠内膜细胞增殖增加, As 病变加重^[23]。ApoE^{-/-}/p19^{Arf}^{-/-}双基因敲除小鼠 As 病变加重, 但内膜细胞增殖不受影响, 推测其可能是 p16^{Ink4a} 代偿性功能上调所致^[24]。为了进一步证明其生长抑制作用, Kuo 等人利用 LDLR^{-/-}小鼠 p16^{Ink4a}^{-/-}/p19^{Arf}^{-/-}双基因敲除骨髓重建, 结果发现其内膜 Mφ 增殖显著增加, As 进展加速^[25]。

此外研究也发现, p16^{Ink4a} 失活时 Mφ 内炎症信号通路减弱; 但 LDLR^{-/-}小鼠 p16^{Ink4a}^{-/-}骨髓重建 As 病变没有明显改变^[26], 提示 p16^{Ink4a} 减弱 Mφ 炎症信号的影响不足以逆转 As 病变。且 9p21.3 单倍体各 Mφ 中基因表达有所不同, 其累积生物学效应可能增加对冠心病和心肌梗死易感性^[27]。

3.2 骨髓生长因子与氧化型低密度脂蛋白

巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 和粒巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 是髓样细胞增殖的关键调节物^[28]。As 及心绞痛患者中 M-CSF 表达增加, 并且 C 反应蛋白也可诱导 M-CSF 释放和 Mφ 增殖^[29]。

研究发现, ApoE^{-/-}小鼠 M-CSF 缺失抑制 As 病变, M-CSF 干预股动脉内膜可加速内膜病变^[30]。以上结果说明 M-CSF 促进细胞增殖, 加重 As。外源性予以 LDLR^{-/-}小鼠 GM-CSF 可显著地刺激内膜细胞增殖; 予以抗 GM-CSF 抗体, 细胞增殖被抑制^[31]。且 GM-CSF 与 ox-LDL 相互作用共同调节 Mφ 增殖。ox-LDL 诱导 Mφ 增殖, 并增加 Mφ 对 M-CSF 和 GM-CSF 的敏感性。当 ox-LDL 诱导 Mφ 泡沫化时, GM-CSF 上调 Mφ 清道夫受体表达发挥至关重要的作用^[32]。

4 不足及展望

As 是多因素共同导致的复杂病变, Mφ 在其发展中发挥基石作用。传统观点认为免疫细胞是从血液循环系统募集到病变区域^[2], 而新近研究证明单核细胞减少时, 内膜 Mφ 并不减少但增殖现象明显增加并促进 As 早期斑块形成^[31]。但目前实验研究仍存在不足, 尚无 Mφ 增殖基因敲除模型。进一步了解 Mφ 增殖的分子机制仍需进一步研究, 调节 Mφ 增殖可能为临床抗 As 及阻塞性血管性疾病提供新的治疗策略。

[参考文献]

- [1] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. *PLoS Med*, 2006, 3: e442.
- [2] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 723-737.
- [3] Fuster JJ, Fernandez P, Gonzalez-Navarro H, et al. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86: 254-264.
- [4] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2011, 145: 341-355.
- [5] 姜怡邓, 杨安宁, 王菊, 等. 高同型半胱氨酸血症对 ApoE^{-/-}

- 鼠心肌酶谱的影响及与 P53 基因的相关性分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(1): 16-21.
- [6] 仲英洁, 张子为, 徐郁, 等. 阿托伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化和钙化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 305-310.
- [7] Butcher MJ, Galkina EV. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta[J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 44
- [8] Lee CW, Hwang I, Park CS, et al. Macrophage heterogeneity of culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction or stable angina[J]. *Am J Clin Pathol*, 2013, 139(3): 317-322.
- [9] Laufer EM, Winkens MH, Narula J, et al. Molecular imaging of macrophage cell death for the assessment of plaque vulnerability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 1 031-038.
- [10] Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation[J]. *Science*, 2011, 332: 1 284-288.
- [11] Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, et al. Cell proliferation in human coronary arteries [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87: 4 600-604.
- [12] Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(9): 1 166-172.
- [13] Diez-Juan A, Perez P, Aracil M, et al. Selective inactivation of p27(Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis [J]. *Blood*, 2004, 103: 158-161.
- [14] Mercer J, Figg N, Stoneman V, et al. Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice[J]. *Circ Res*, 2005, 96: 667-674.
- [15] Sanz-Gonzalez SM, Barquin L, Garcia-Cao I, et al. Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75: 803-812.
- [16] van Vlijmen BJ, Gerritsen G, Franken AL, et al. Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE3-Leiden transgenic mice[J]. *Circ Res*, 2001, 88: 780-786.
- [17] Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, et al. Macrophage p53 controls macrophage death in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207: 399-404.
- [18] Merched AJ, Chan L. Absence of p21Waf1/Cip1/Sdi1 modulates macrophage differentiation and inflammatory response and protects against atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2004, 110: 3 830-841.
- [19] Akyurek LM, Boehm M, Olive M, et al. Deficiency of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396: 359-363.
- [20] Tanner FC, Boehm M, Akyurek LM, et al. Differential effects of the Cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1, p21Cip1, and p16Ink4 on vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Circulation*, 2000, 101: 2 022-025.
- [21] Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, et al. Macrophage retinoblastoma deficiency leads to enhanced atherosclerosis development in ApoE-deficient mice [J]. *FASEB J*, 2006, 20: 953-955.
- [22] Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 196-206.
- [23] Merched AJ, Williams E, Chan L. Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 1 608-614.
- [24] Gonza lez-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinue A, et al. p19 (ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55: 2 258-268.
- [25] Kuo CL, Murphy AJ, Sayers S, et al. Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 2 483-492.
- [26] Wouters K, Cudejko C, Gijbels MJ, et al. Bone marrow p16INK4a-deficiency does not modulate obesity, glucose homeostasis or atherosclerosis development [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e32440.
- [27] Christa Z, Martina G, Sabine F, et al. Expression pattern in human macrophages dependent on 9p21.3 coronary artery disease risk locus [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2): 244-249.
- [28] Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 533-544.
- [29] Devaraj S, Yun JM, Duncan-Staley C, et al. C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85: 262-267.
- [30] Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, et al. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice; the critical role of the SDF-1-CXCR4 system [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 283-289.
- [31] Zhu SN, Chen M, Jongstra-Bilen J, et al. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions [J]. *J Exp Med*, 2009, 206: 2 141-149.
- [32] Biwa T, Sakai M, Shichiri M, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plays an essential role in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2000, 7: 14-20.

(此文编辑 许雪梅)