

兔后肢高血流切应力诱导的侧支血管 CCR2 的表达及其与单核/巨噬细胞的关系

蔡百桢¹, 叶峰², 罗明英³, 蔡维君⁴

(1. 中南大学湘雅附三医院 ICU, 湖南省长沙市 410003; 2. 重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所, 重庆市 400010; 3. 昆明医科大学人体解剖与组织胚胎学系, 云南省昆明市 650500; 4. 中南大学湘雅医学院组织胚胎学系, 湖南省长沙市 410003)

[关键词] 侧支血管; 血流切应力; CC 类趋化因子受体 2

[摘要] **目的** 检测兔后肢高血流切应力诱导的侧支血管 CC 类趋化因子受体 2 (CCR2) 的表达及其与单核/巨噬细胞的关系。**方法** 10 只新西兰大白兔, 左侧行单纯股动脉结扎, 右侧将兔股动脉结扎并将股动脉远端吻合到伴行的股静脉上, 7 天后处死动物, 结合共聚焦免疫荧光术分别观察单纯结扎和动静脉吻合侧 CCR2、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 和 CD11b (巨噬细胞标志物) 在侧支血管的表达变化, 兔前肢大小相似的正常血管用作正常对照。**结果** 正常血管 CCR2 和 MCP-1 的表达非常弱, 仅在外膜和靠近近膜的中膜有少量表达, CD11b 在外膜有少量表达; 单纯股动脉结扎侧, 侧支血管 CCR2 和 MCP-1 不仅在血管外膜和中膜处表达增加, 同时在内皮细胞也有表达, 而 CD11b 在外膜的表达也增多; 动静脉吻合侧 CCR2 和 MCP-1 在血管壁各层呈高水平表达, CD11b 在外膜的表达明显增加。与单纯股动脉结扎相比, 其免疫荧光强度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** CCR2 在兔后肢高血流切应力诱导的侧支血管的表达增加, 通过 MCP-1/CCR2 通路使单核细胞向成熟形式的巨噬细胞聚集, 从而促进侧支血管生长。

[中国分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of CCR2 in Collateral Vessels Induced by High Fluid Shear Stress in Rabbit Hindlimb and Its Relationship with Monocyte and Macrophage

CAI Bai-Zhen¹, YE Feng², LUO Ming-Ying³, and CAI Wei-Jun⁴

(1. Department of ICU of Third Affiliated Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha, Hunan 410003, China; 2. Department of Toxic Hepatitis Institute of Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Department of Anatomy and Histoembryology, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China 4. Department of Histoembryology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410003, China)

[KEY WORDS] Collateral Vessel; Fluid Shear Stress; CC Chemokine Receptor 2

[ABSTRACT] **Aim** To detect the expression of CC chemokine receptor 2 (CCR2) in collateral vessels induced by high fluid shear stress in rabbit hindlimb and its relationship with monocyte and macrophage. **Methods** Ten rabbits were operated on left femoral artery ligation, on the right side, the femoral artery was ligated unilaterally and its distal end was anastomosed with femoral vein. After 7 days, the animals were sacrificed. The expression of CCR2, MCP-1 and CD11b was detected by confocal immunofluorescence. Forelimb vessel was used as normal controls. **Results** In normal arteries, the expressions of CCR2 and MCP-1 were very weak and only presented in tunica media and adventitia, CD11b was low in the adventitia. In only ligated-side collateral vessels, the expressions of CCR2 and MCP-1 were increased in all layers of vessel wall, and the expression of CD11b in adventitia was increased. In ligation plus anastomosed, the expressions of CCR2, MCP-1 and CD11b were significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** The

[收稿日期] 2015-03-19

[修回日期] 2015-04-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (81370248, 31270028)

[作者简介] 蔡百桢, 护师, 研究方向为血管生物学, E-mail 为 bzhcai@126.com。通讯作者罗明英, 博士, 讲师, 研究方向为侧支血管机制研究, E-mail 为 luomingying0403@163.com。通讯作者蔡维君, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为侧支血管机制研究, E-mail 为 caiweijun@mail.csu.edu.cn。

expression of CCR2 was up-regulated in collateral vessel growth induced by high fluid shear stress in rabbit hind limb, promoting the collateral vessel growth through MCP-1/CCR2 pathway that enables monocytes accumulation to mature form of macrophage.

促进侧支血管生长是治疗冠状动脉粥样硬化引起的心肌梗死、心源性猝死和周围动脉阻塞引起的缺血性疾病的理想策略。侧支血管生长的理论主要集中在血流切应力、炎症(巨噬细胞)和生长因子,而血流切应力被公认为是侧支血管生长的驱动因素。血流切应力的增加激活血管内皮细胞黏附分子、炎症因子和趋化因子等多种重要生物活性物质的表达增加,刺激细胞迁移和增殖,从而促进侧支血管生长^[1-2]。其中趋化因子的生物活性主要是通过与其靶细胞表面相应的趋化因子受体结合而发挥作用,CC类趋化因子受体2(CC chemokine receptor 2, CCR2)作为单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)的特异性受体,是一类表达于不同类型细胞上的含有7个跨膜区的G蛋白偶联受体^[3-4]。MCP-1与CCR2结合后,受体变构并与G蛋白结合,激活细胞内信号通路从而发挥生物学作用^[5]。但CCR2在高切应力诱导侧支血管生长中的表达变化以及与单核细胞/巨噬细胞的关系在侧支血管生长中的作用研究并未见文献报道。本研究采用兔后肢股动脉结扎并行结扎侧远端和伴行股静脉侧-侧吻合的高血流切应力诱导侧支血管生长模型,结合共聚焦免疫荧光术观察CCR2在侧支血管生长过程中的表达变化及其与单核/巨噬细胞之间的关系,从而阐明其在侧支血管生长中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型

10只成年新西兰大白兔,雌雄不分,3%戊巴比妥钠1 mL/kg耳缘静脉注射麻醉,于腹股沟韧带深面稍下方暴露双侧股动脉,左侧行单纯股动脉结扎,右侧行动静脉吻合术,即结扎股动脉后随之将结扎的股动脉远侧端经侧-侧吻合连接到相伴行的股静脉上。术后消毒缝合皮肤,给予抗生素治疗。兔前肢大小相似的正常血管用作正常对照。

1.2 取材

7天后处死动物,快速取下带有侧支血管的股薄肌,置液氮中速冻,OCT复合物包埋,-80℃保存待用。

1.3 共聚焦免疫荧光染色

用Leica冰冻切片机切片,片厚10 μm ,切片用4%多聚甲醛固定15 min后,5%BSA封闭,封闭后分别加入一抗CCR2(1:200, Sigma公司)、MCP-1(1:100, Santa Cruz公司)、CD11b(1:200, Chemicon公司),湿盒中4℃冰箱过夜,然后加入生物素化的二抗(1:200),室温孵育2 h后加入链霉亲和素偶联的Cy2(1:500)和偶联荧光素Rodamin的actin(1:600)+DAPI(1:500),室温孵育1 h,其中除1%BSA孵育30 min之外,其余各步均需用0.01 mol/L PBS洗3次,每次5 min。防荧光淬灭剂封片,Nikon激光共聚焦显微镜拍片。用5%BSA代替一抗作为阴性对照,其余各步骤均同,以排除二抗的非特异性染色。

1.4 定量分析

Nikon共聚焦显微镜下摄片后,采用EZ-C1 3.70 FreeViewer图像分析软件分别对单纯股动脉结扎侧和动静脉吻合侧的CCR2、MCP-1和CD11b的免疫荧光强度进行测量,单位以 $\text{AU}/\mu\text{m}^2$ 表示。

1.5 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用SNK-q检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

用CD11b作为巨噬细胞标志物检测其在侧支血管中的变化。CD11b在正常小动脉血管外膜有少量表达(图1A);在单纯结扎侧,CD11b在侧支血管外膜表达增多(图1B);在动静脉吻合侧,外膜有大量巨噬细胞聚集(图1C)。其荧光强度的差异具有统计学意义($P < 0.05$;图2)。

CCR2在正常血管表达非常弱,仅在血管外膜和靠近外膜的中膜有少量表达(图1D);在单纯结扎侧,CCR2除了在血管壁外膜和中膜的表达上调外,同时在内皮细胞也有表达(图1E);在动静脉吻合侧,其在血管壁各层结构的免疫荧光强度都呈强阳性(图1F)。其荧光强度的差异具有统计学意义($P < 0.05$;图2)。

MCP-1在正常血管表达非常微弱,仅在外膜可见有少量表达(图1G);在单纯结扎侧,MCP-1在血

管外膜和中膜的表达明显增加,同时在内皮细胞的表达增强(图 1H);在动静脉吻合侧,MCP-1 在血管壁各层结构的免疫荧光染色呈强阳性(图 1I)。其荧光强度的差异具有统计学意义($P < 0.05$;图 2)。

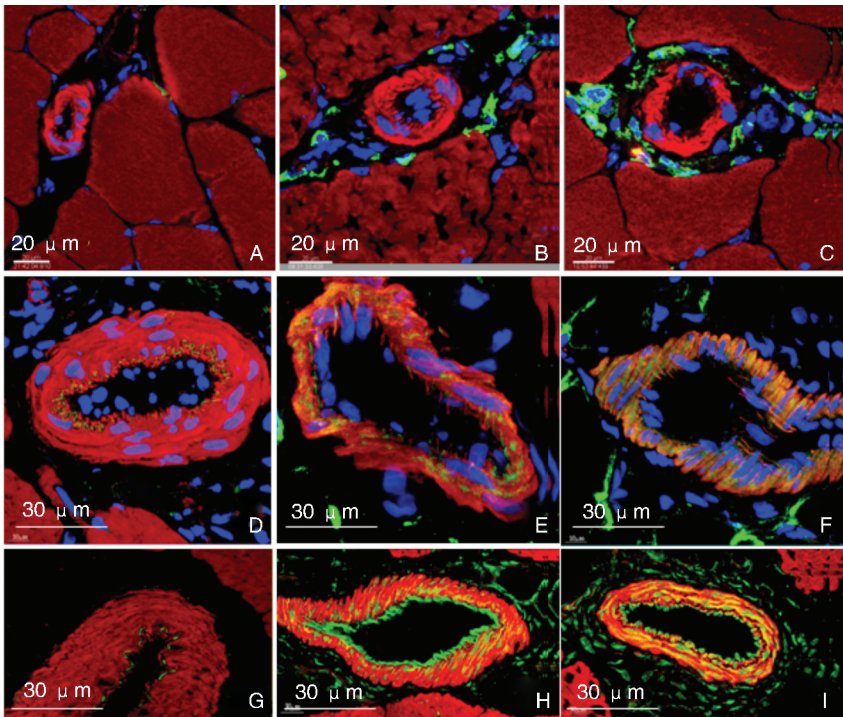


图 1. CD11b、CCR2 和 MCP-1 的免疫荧光染色
Figure 1. Immunofluorescence staining of CD11b, CCR2 and MCP-1

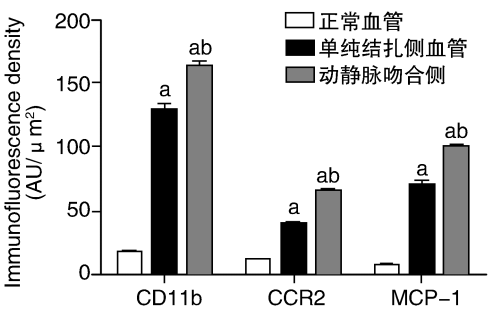


图 2. CD11b、CCR2 和 MCP-1 在正常血管、单纯结扎和动静脉吻合侧的免疫荧光强度比较 a 为 $P < 0.05$, 与正常血管比较; b 为 $P < 0.05$, 与单纯结扎侧血管比较。
Figure 2. The histograms showing the quantitative analysis of immunofluorescence intensity of CD11b, CCR2 and MCP-1 in normal, femoral artery ligation with and ligation plus anastomosed

3 讨论

血流切应力被公认为是侧支血管生长的驱动因素。当一根动脉血管发生阻塞时,血流通过早先存在的微动脉系统从高压部位流向低压区域,从而导致血流切应力增加。Pipp 等^[6]在兔后肢股动脉结扎实验中观察到,结扎后血流切应力的提高

使内皮细胞激活,从而导致炎症分子和细胞因子等血管活性物质表达上调。本研究也观察到,单纯股动脉结扎侧 CCR2、MCP-1 和 CD11b 的表达较正常血管上调。然而,机体血管的这种自然适应性生长,只能部分地恢复血流^[7]。目前的解释是在侧支血管这种适应性生长过程中,增高的血流切应力维持的时间过短,因而不能触发强烈的侧支血管反应,因此一个持续而又高水平的血流切应力是侧支血管生长的关键。在本研究中我们通过结扎的股动脉远侧端和伴行的股静脉行侧-侧吻合形成动静脉短路,从而使原来存在的微小动脉处于持续的高血流切应力的作用下,结果引起了强烈的侧支血管生长反应。实验结果观察到与单纯股动脉结扎相比,动静脉吻合侧 CCR2、MCP-1 和 CD11b 的表达明显增多,这进一步证实了持续而又高水平的血流切应力是侧支血管生长的关键。

MCP-1 是趋化因子 CC 家族的成员,能趋化吸引单核细胞在内皮周围的聚集和黏附,促进黏附分子的表达导致炎症反应^[8]。而细胞趋化因子的作用发挥则是通过与靶细胞上的特异性受体结合从而启动细胞内信号转导。趋化因子受体是一组 G 蛋白耦联的细胞表面受体,表达于不同类型的白细

胞,这类趋化因子信号的调控机制同样建立在单核细胞和巨噬细胞表面功能性的 CCR 基础上,而 CCR2 作为 MCP-1 的特异性受体已得到证实^[9]。Bush 等^[10]研究发现 MCP-1/CCR2 通路对动脉血管壁巨噬细胞的浸润以及血管水肿的形成有重要的作用。同样,MCP-1/CCR2 在动脉粥样硬化斑块内血管平滑肌细胞增殖和迁移过程中发挥关键作用^[11-12]。有研究发现,与单纯结扎的血管适应性生长相比,持续和提高的血流切应力显著改变侧支血管许多基因的表达,这些基因涉及黏附分子、细胞骨架蛋白重排等,以控制侧支血管生长^[13]。这与我们的实验结果相一致,动静脉吻合侧 CCR2 和 MCP-1 在侧支血管表达都明显增加,且部位呈一致性,而 CD11b 在血管外膜的聚集也增多,这说明 CCR2 与单核细胞/巨噬细胞的聚集密切相关,通过 MCP-1/CCR2 通路可使单核细胞和它们成熟形式的巨噬细胞聚集,从而调节侧支血管生长。本研究观察到,在血流切应力作用下,CCR2 在侧支血管的表达及其与单核/巨噬细胞的关系,为后续可通过给予 CCR2 激动剂或抑制剂干预进一步观察在高剪切应力下对单核/巨噬细胞浸润在侧支血管中的作用机制提供了初步的实验依据。

[参考文献]

- [1] Yang BL, Wu S, Wu X, et al. Effect of shunting of collateral flow into the venous system on arteriogenesis and angiogenesis in rabbit hind limb[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2013, 46 (1): 1-10.
- [2] Troidl C, Jung G, Troidl K, et al. The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013, 11 (1): 5-12.
- [3] Kraemer S1, Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, et al. Hetero-oligomerization of chemokine receptors: diversity and relevance for function[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20 (20): 2 524-536.
- [4] 陈淑华, 卢元珺, 肖献忠. 趋化因子受体 XCR1 及其配体研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33 (1): 57-61.
- [5] Kolattukudy PE1, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway[J]. *Circ Res*, 2012, 110 (1): 174-189.
- [6] Pipp F, Boehm S, Cai WJ, et al. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (9): 1 664-668.
- [7] Ito WD, Arras M, Winkler B, et al. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion[J]. *Circ Res*, 1997, 80 (6): 829-837.
- [8] Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation[J]. *N Engl J Med*, 1998, 338 (7): 436-445.
- [9] Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of neovascularization[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28 (11): 1 928-936.
- [10] Bush E, Maeda N, Kuziel WA. et al. CC Chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension[J]. *Hypertension*, 2000, 36 (3): 360-363.
- [11] 杨 阳, 彭道泉. 单核细胞表型与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (8): 702-706.
- [12] Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (10): 1 412-418.
- [13] Eitenmüller I, Volger O, Kluge A, et al. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion[J]. *Circ Res*, 2006, 99 (6): 656-662.

(此文编辑 文玉珊)