

# 斑块内泡沫细胞外迁功能障碍的研究进展

王中群<sup>1</sup>, 李丽华<sup>2</sup>, 严金川<sup>1</sup>, 叶斐<sup>1</sup>, 邵晨<sup>1</sup>

(江苏大学附属医院 1. 心内科, 2. 病理科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 糖基化终末产物; 清道夫受体; 泡沫细胞; 细胞迁移; 动脉粥样硬化

[摘要] 泡沫细胞的形成及外迁受抑是动脉壁斑块恶性重塑的关键环节, 糖基化终末产物 (AGE) 则是糖尿病加速动脉粥样硬化进展的重要推手。基于国内外最新进展及本课题组已有成果, 文章阐述了清道夫受体 CD36 在介导 AGE 关键活性成分羧甲基赖氨酸抑制泡沫细胞外迁中的作用及机制, 希冀为今后靶向泡沫细胞外迁机制的治疗策略提供新的切入点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Research progress of the dysfunction in foam cell emigration from plaques

WANG Zhong-Qun<sup>1</sup>, LI Li-Hua<sup>2</sup>, YAN Jin-Chuan<sup>1</sup>, YE Fei<sup>1</sup>, SHAO Chen<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Advanced glycation end products; CD36; Foam cell; Cell migration; Atherosclerosis

[ABSTRACT] The formation and inhibited emigration of foam cells are the key events in malignant remodeling of artery plaques. Advanced glycation end products (AGE) play an important role in the course of diabetes-accelerating atherosclerotic progression. Based on the latest international research progress and our existing results, this paper elaborated the mechanism of CD36 modulating foam cell emigration from plaques inhibited by Nε-carboxymethyl-Lysine, which would provide a new starting point for the treatment strategy of targeting foam cell migration mechanism in the future.

最近十年我国糖尿病发病率增长迅猛, 已超越印度成为世界第一大高发国<sup>[1]</sup>。每年因糖尿病及其并发症而造成的直接经济损失高达 260 亿美元, 占全国医疗费用总支出的 18.2%。在美国, 糖尿病死亡病例中动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 约占 80%, 糖尿病并发症住院患者中有心血管疾病者占 75%<sup>[1-2]</sup>。在我国, 糖尿病住院患者动脉粥样硬化性心脑血管病并发症发病率虽比西方国家低, 但已成为我国致死、致残率最高, 危害最大的糖尿病慢性并发症<sup>[3]</sup>。鉴于糖尿病状态下 As 发生时间早、进展速度快、累及范围广、长期预后差等临床特点以及糖尿病患病率迅猛增加所带来的沉重社会负担, 深入研究糖尿病性动脉粥样硬化的发病机制并进而有针对性加以干预就显得尤为迫切。

## 1 泡沫细胞迁移

在 As 发病机制的研究中, 目前已经明确内皮下间隙募集来的巨噬细胞吞噬氧化、乙酰化、酶修饰的低密度脂蛋白形成泡沫细胞 (foam cells) (细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值 > 50%) 是 As 形成与发展的关键环节<sup>[4]</sup>。有关泡沫细胞的最终命运, 已有的大部分研究多倾向于认为其发生凋亡、坏死、崩解形成纤维帽下的坏死核心, 亦即动脉壁斑块就是泡沫细胞的“最后坟墓”<sup>[5]</sup>。但随着对 As 病因发病机制理解的深入以及实验动物学、临床病理学的发展, 人们逐渐开始认识到动脉壁病灶内泡沫细胞的外迁和单核巨噬细胞的迁入是一个动态过程<sup>[6]</sup>。一个健康的巨噬细胞在吞噬修饰的脂蛋白或其他

[收稿日期] 2017-05-05

[修回日期] 2017-05-28

[基金项目] 国家自然科学基金 (81370408), 江苏省自然科学基金 (BK20131246), 江苏省卫生厅项目 (Q201308, QNRC2016836), 镇江市社会发展项目 (SH2015038, SH2015023), 卫生部核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室开放课题 (KF201504), 江苏大学临床专项 (JDL CZX001)

[作者简介] 王中群, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 wangtsmc@aliyun.com。

坏死物质后应该能有效地迁出病灶,从而维持血管壁的良性重塑。但如果血管壁内皮下间隙募集的单核巨噬细胞越来越多,而外迁的荷脂巨噬细胞或泡沫细胞却越来越少,就会导致其大量蓄积与崩解,促进斑块的形成与血管壁的恶性重构。这方面最直接的证据来自对激光显微切割及小鼠斑块移植模型的研究<sup>[7-8]</sup>。将实验性 As 斑块移植到正常野生型小鼠体内,移植 3 天就发现病变斑块泡沫细胞大量减少。快速消失的泡沫细胞主要流向局部淋巴结,而且外迁入淋巴结的泡沫细胞还保留着泡沫化的形态。而另一方面将 As 斑块移植到高脂饲养的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,泡沫细胞外迁却明显受阻,病灶在移植后继续恶性演进。由此可见深入研究泡沫细胞外迁异常的机制意义重大,如果能将泡沫细胞外迁功能障碍的相关通路阻断就可能高效促进斑块消退及动脉粥样硬化性心脑血管疾病的康复。

已有的研究显示,细胞迁移时首先形成板状伪足/丝状伪足等细胞前沿突起;继之突起结构通过局部黏着斑,与基质表面黏着,胞体内容向前流动;最后细胞尾部解除黏附、缩进胞体从而完成一个运动单元<sup>[9]</sup>。细胞迁移的每一个步骤,都包含着诸如肌动蛋白等细胞骨架蛋白聚合/解聚的动态平衡。已知不同的诱导因子通过不同的信号转导通路,如局灶黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、Rho、Rac、Cdc42 等,介导肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体(actin-related proteins 2 and 3 complex, Arp2/3 complex);Arp2/3 复合体调节肌动蛋白细胞骨架的聚合/解聚和重新组装,控制着细胞迁移进程<sup>[10]</sup>。但在糖尿病动脉粥样硬化状态下,究竟是什么因素通过什么样的机制,抑制了斑块内泡沫细胞的外迁而加速了病程的演变,现有的研究尚不能给出一个明确的答案。

## 2 CD36 在羧甲基赖氨酸抑制泡沫细胞外迁中的作用

本课题组前期研究发现晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)的主要活性成分羧甲基赖氨酸(N $\epsilon$ -carboxymethyl-Lysine, CML)可上调清道夫受体 CD36 的表达,增加细胞内脂质的蓄积和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,削弱泡沫细胞迁移能力<sup>[11-12]</sup>。已知 AGE 是糖毒性的最重要记忆性代谢产物,在糖尿病及其多种并发症的演变进程中作用显著<sup>[13-16]</sup>。但迄今为止有关 AGE 在 As 细胞迁移中的作用研究仍主要局限在

血液单核巨噬细胞及血管壁平滑肌细胞向内皮下间隙募集的相关机制<sup>[17]</sup>,对泡沫细胞外迁过程中 AGE 是否发挥了作用、通过何种途径发挥作用这一问题的研究目前仍属空白。结合课题组已有研究成果以及 Grosheva 等<sup>[18]</sup>关于细胞膜上游离胆固醇含量增加可促进细胞骨架蛋白聚合的结论,我们推测糖基化终末产物 CML 有可能通过 CD36 的介导,影响细胞膜上游离胆固醇和/或细胞 ROS 含量,进而影响细胞骨架肌动蛋白聚合状态和细胞迁移,但要证实这一推测尚需体内外多方研究的继续深入。

已知巨噬细胞清道夫受体 CD36 除了可以摄取各种修饰的低密度脂蛋白形成泡沫细胞外,在单核细胞捕获及泡沫细胞外迁过程中也发挥了关键作用<sup>[19-20]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)-CD36 激发的氧化应激信号能迅速诱导肌动蛋白聚合和结合性黏附的发生,增加细胞的铺展而抑制 As 斑块内泡沫细胞的外迁;抑制该信号的传递可使受限的泡沫细胞重新动员起来<sup>[19]</sup>。多项研究证实,CD36 是一个可表达于多种细胞的单链跨膜糖蛋白,通过与体内不同配基例如 AGE 等的结合,发挥不同的生理及病理作用。假如能够加速糖尿病动脉粥样硬化进展的 AGE 关键成分 CML 也可经 CD36 介导而影响斑块内泡沫细胞的外迁,那么在这一过程中 CML 与另一受体糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)的关系如何? CML 与其他配体在影响受体 CD36 介导的泡沫细胞外迁方面是发挥了协同作用还是拮抗作用? FAK、PI3K、小 GTP 酶(Rho、Rac、cdc42)三大信号在 CML 致泡沫细胞迁移受抑过程各自发挥了多大作用,机制如何?现有的研究尚不得而知。

## 3 CD36 介导羧甲基赖氨酸抑制泡沫细胞外迁的新模型

在泡沫细胞外迁的在体研究中,多年来一直局限于主动脉弓斑块移植模型和腹腔巨噬细胞外流模型<sup>[6,15]</sup>。但斑块移植模型所固有的免疫排斥问题与操作的复杂性问题限制了其应用的推广,腹腔巨噬细胞外流模型所应用的腹腔环境也不能真实的模拟在体斑块环境。有鉴于此,新近出现的模式动物斑马鱼(zebra fish)糖尿病及 As 模型的成功建立<sup>[21-23]</sup>为我们在体研究泡沫细胞外迁提供了理想的操作平台。斑马鱼与人类基因高度相似(具有 87% 以上的同源性),体型小(一月龄时只有 1~2 cm

长,适合激光共聚焦显微镜活体观察)、生长速度快、价格低廉。最为关键的是斑马鱼受精卵发育后的 30 天以内幼鱼通体透亮,15~20 天以内获得性免疫尚未形成,这两大优势使得在体动态观察基因工程处理的移植性巨噬细胞脂质摄取及迁移成为可能。Stoletov 等<sup>[22]</sup>发现用荧光标记的高胆固醇饲料饲喂斑马鱼幼鱼 10 天即可形成 As 的早期病变脂纹,并首次在活动物体体内观察到脂纹内外源性小鼠巨噬细胞呈时间依赖性的方式吞噬荧光脂质。鉴于斑马鱼幼鱼的生理特性及现代荧光标记方法的进展,如果将构建好的 CD36 高表达及沉默表达细胞株移植入斑马鱼体内,观察其在斑马鱼血管壁脂纹内吞噬脂质形成泡沫细胞后外迁的时空特征将会是泡沫细胞外迁模型的一大进步。

本课题组前期对 AGE 关键成分 CML 在糖尿病动脉粥样硬化发病机制中的作用进行了系统研究,利用内、外源性 CML 成功复制出了糖尿病动脉粥样硬化晚期钙化病变<sup>[13-14,24]</sup>。另在卫生部核医学重点实验室开放课题资助下成功合成了新型分子探针-CML 的 18F 标记示踪剂,进行了小鼠生理情况下 18F-CML 的 microPET 核素显像<sup>[25]</sup>。这些都为后续 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠糖尿病动脉粥样硬化模型的受体显像奠定了基础。通过 CML 的核素富集区我们可定位其受体上调区域,进而可通过对靶标部位的病理取

材、双染三染的综合应用发现泡沫细胞外迁部位及相关信号机制。更进一步的,如果我们将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 18F-CML microPET 核素显像与斑马鱼细胞迁移激光共聚焦三维重构有机结合在一起,将会从不同侧面更加完整的理解泡沫细胞外迁机制。

4 CD36 介导羧甲基赖氨酸致斑块内泡沫细胞外迁受抑新假说的提出

综合国内外研究进展及本课题组已有实验结果,我们提出了“清道夫受体 CD36 通过影响细胞游离胆固醇-活性氧水平并经由相关信号通路介导 CML 致斑块内泡沫细胞外迁受抑”的研究假说(图 1)。简言之,糖尿病高血糖状态下产生的内源性糖基化终末产物关键活性成分 CML 与食物来源的外源性 CML 经过多重代谢后沉积于血管壁内皮下间隙,与斑块内巨噬细胞源性泡沫细胞表面的清道夫受体 CD36 发生作用后,通过胞内游离胆固醇和 ROS 途径分别影响 FAK、PI3K、小 GTP 酶(Rho、Rac、Cdc42)三大信号相关性 Arp2/3 复合体的变化;继之,下游的纤维型肌动蛋白聚合/解聚状态失衡,泡沫细胞铺展(cell spreading)而迁徙能力进一步下降,加速斑块内泡沫细胞崩解的速度,最终推动糖尿病加速性动脉粥样硬化心脑血管不良事件的发生。

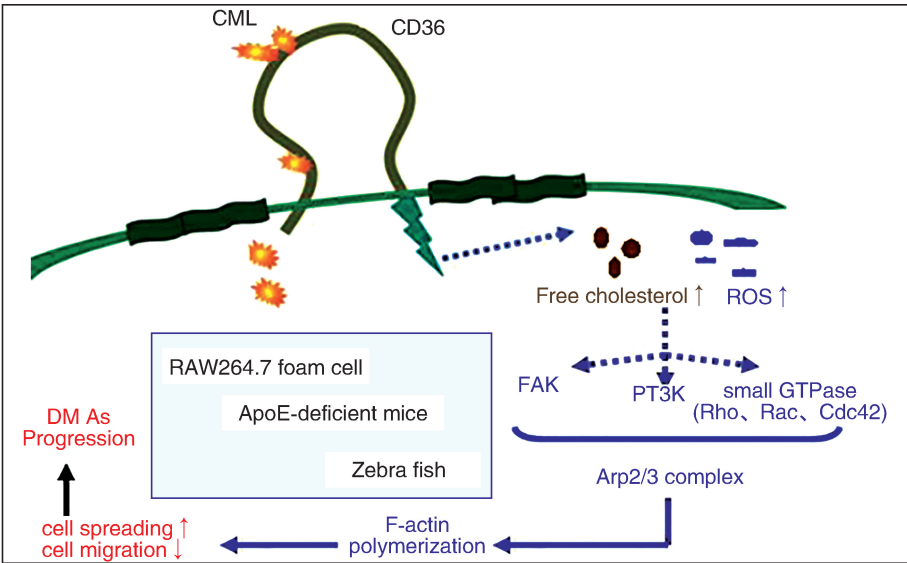


图 1. CML/CD36 抑制斑块内泡沫细胞外迁加速糖尿病动脉粥样硬化进展的机制

Figure 1. CML/CD36 inhibits foam cell emigration from plaques and thus accelerates the progression of diabetic atherosclerosis

5 结语与展望

基于上述假说,未来如能以 RAW264.7 源性泡

沫细胞、糖尿病 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠和 As 斑马鱼为载体,借助 microPET、细胞移植及现代荧光标记方法,从体内体外两个水平多角度完整地阐述 CD36 介导羧甲



基赖氨酸 CML 致斑块泡沫细胞外迁受抑进而启动糖尿病动脉粥样硬化发生发展及恶性演进的机制, 将为深入挖掘斑块泡沫细胞外迁机制提供更完善的实验依据, 也将为基于斑块消退的治疗策略提供新的切入点。

#### [参考文献]

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1 090-101.
- [2] Yamagishi S, Nakamura N, Suematsu M, et al. Advanced glycation end products: a molecular target for vascular complications in diabetes[J]. *Mol Med*, 2015, 21 (S1): S32-S40.
- [3] 吕树铮, 王立新. 糖尿病合并冠心病流行病学现状与研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2009, 11(12): 910-911.
- [4] Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 84: 1-7.
- [5] Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C (high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 2012, 125(2): 364-374.
- [6] Curtiss LK. Reversing atherosclerosis[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(11): 1 144-146.
- [7] Trogan E, Feig JE, Dogan S, et al. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (10): 3 781-786.
- [8] Llodrá J, Angeli V, Liu J, et al. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11 779-784.
- [9] Cybulsky MI, Cheong C, Robbins CS. Macrophages and dendritic cells: partners in atherogenesis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 637-652.
- [10] Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(8): 610-615.
- [11] 李丽华, 严金川, 王中群, 等. 羧甲基赖氨酸对 RAW264.7 源性泡沫细胞迁移的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2013, 15(9): 969-972.
- [12] Wang Z, Li L, Yan J. Effect of N-carboxymethyl-lysine on migration from RAW264.7-derived foam cells[J]. *Heart*, 2013, 99(S3): E50-E50
- [13] Wang Z, Li L, Du R, et al. CML/RAGE signal induces calcification cascade in diabetes [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2016, 8: 83(1-12).
- [14] Wang Z, Yan J, Li L, et al. Effects of Nε-carboxymethyl-Lysine on ERS-mediated apoptosis in diabetic atherosclerosis[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(3): e478-483.
- [15] 王中群, 李丽华, 严金川, 等. 糖基化终末产物与动脉粥样硬化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23 (1): 94-100.
- [16] 丁英鹏, 孙玉慧, 杜荣增, 等. ghrelin 通过 PI3K/Akt 信号通路促进 RAW264.7 源性泡沫细胞迁移[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(5): 440-446.
- [17] Rao J, Ye Z, Tang H, et al. The RhoA/ROCK pathway ameliorates adhesion and inflammatory infiltration induced by AGEs in glomerular endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39 727.
- [18] Grosheva I, Haka AS, Qin C, et al. Aggregated LDL in contact with macrophages induces local increases in free cholesterol levels that regulate local actin polymerization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1 615-621.
- [19] Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(1): 136-145.
- [20] Nègre-Salvayre A, Augé N, Camaré C, et al. Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 118-133.
- [21] Schlegel A. Zebrafish models for dyslipidemia and atherosclerosis research [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7: 159.
- [22] Stoletov K, Fang L, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 952-960.
- [23] Olsen AS, Sarra MP Jr, Leontovich A, et al. Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression[J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 485-491.
- [24] Wang Z, Jiang Y, Liu N, et al. Advanced glycation end-product N-epsilon -carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 387-396.
- [25] Xu H, Wang Z, Wang Y, et al. Biodistribution and elimination study of Fluorine-18 labeled Nε-Carboxymethyl-Lysine following intragastric and intravenous administration [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57897(1-11).

(此文编辑 许雪梅)