

STAT4 基因敲除通过 miR-9 促进泡沫细胞形成及动脉粥样硬化

许莉莉, 丁素玲, 张伟伟, 朱小伟, 朱宝玲, 邹云增, 杨向东, 葛均波

(上海市心血管病研究所 复旦大学附属中山医院心内科, 上海市 200032)

[关键词] 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 泡沫细胞; STAT4 通路

[摘要] **目的** 探究动脉粥样硬化斑块发生发展过程中信号转导与转录激活因子4(STAT4)信号通路在巨噬细胞分化及泡沫细胞形成中的作用及调控机制。**方法** 将 STAT4 基因敲除(STAT4^{-/-})小鼠与载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠进行杂交,筛选出 ApoE/STAT4 纯合子双基因敲除(DKO)小鼠,研究新型动脉粥样硬化相关小鼠模型的易感性和机制。将 3 月龄小鼠分为野生型(WT)、STAT4^{-/-}、ApoE^{-/-}、DKO 共 4 组,经过 12 周高脂胆固醇饮食喂养,分别采用油红 O 染色及石蜡切片 HE/Masson 染色检测动脉斑块形成情况。采用流式细胞术分析小鼠外周血、骨髓及脾脏髓系细胞各亚群比例。从小鼠骨髓分离 CD11b⁺髓系细胞进行体外培养,采用巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)进行诱导,流式分析巨噬细胞不同亚型分化情况。采用实时定量聚合酶链反应(PCR)及 Western blot 分别检测基因表达水平及蛋白水平。**结果** ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块局部的 CD11b⁺细胞中可检测到 STAT4 表达。ApoE^{-/-}及 DKO 小鼠经 12 周高脂喂养,油红 O 染色阳性的主动脉斑块主要分布在主动脉根部至髂动脉分叉处,DKO 小鼠的斑块较 ApoE^{-/-}小鼠明显增多;HE 及 Masson 染色显示 DKO 小鼠的主动脉斑块较 ApoE^{-/-}小鼠具有更薄的纤维帽及更大的脂质核心,且斑块中的纤维更稀疏,排列也相对更紊乱。体外细胞实验显示 STAT4 基因敲除可促进 CD11b⁺Gr-1⁺未成熟髓系细胞的异常动员、巨噬细胞的 M1 极化以及泡沫化。STAT4 基因缺失通过磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸激酶(Akt)/核因子 κB(NF-κB)通路下调 miR-9 的表达,上调酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶(ACAT-1)表达,进而促进巨噬细胞的脂质蓄积及泡沫细胞形成,最终加速动脉粥样硬化斑块的发生发展。**结论** STAT4 通过调控免疫炎症反应及脂质代谢,在巨噬细胞分化及泡沫细胞形成过程中发挥关键作用。STAT4 相关信号通路可作为未来动脉粥样硬化性疾病的潜在治疗靶点。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

STAT4 deficiency exacerbates foam cell formation and atherosclerosis via MiR-9-dependent pathway in ApoE^{-/-} mice

XU Lili, DING Suling, ZHANG Weiwei, ZHU Xiaowei, ZHU Baoling, ZOU Yunzeng, YANG Xiangdong, GE Junbo
(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; macrophages; foam cells; STAT4

[ABSTRACT] **Aim** The aim of the present study is to determine the function of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) signal in macrophage differentiation and foam cell formation during the development of atherosclerosis. **Methods** STAT4 knockout (STAT4^{-/-}) mice were crossed with Apolipoprotein E knockout mice (ApoE^{-/-}) to establish a novel atherosclerosis related mice model- APOE/STAT4 double knockout (DKO) mice. WT, STAT4^{-/-}, ApoE^{-/-} and DKO mice (3-month-old adult mice) were challenged with high-fat diet for 12 weeks. The extent of atherosclerosis was determined by oil-red staining and HE staining. Changes in subsets of immune cells were evaluated by flow cytometry. Macrophage differentiation was induced from the CD11b⁺ myeloid cells directly isolated from the bone marrow of transgenic mice with macrophage colony stimulating factor (M-CSF) incubation. Realtime polymerase chain reaction

[收稿日期] 2020-02-04

[修回日期] 2020-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(91439121,81521001,81500262);科技部重点研发计划(2016YFC1101102);上海市基础研究项目(19JC1411400);上海市青年科技英才扬帆计划(18YF1404800)

[作者简介] 许莉莉,博士,住院医师,研究方向为冠心病基础及临床,E-mail 为 lilixu1991@163.com。通信作者葛均波,博士,教授,院士,研究方向为冠心病发病机制、早期诊断及治疗方案优化,E-mail 为 jbg@zs-hospital.sh.cn。

(RT-PCR) and Westernblot were applied to detect the expression levels of related genes and protein. **Results** The expression of STAT4 was identified in CD11b⁺ myeloid cells in atherosclerotic plaque. Genetic deletion of STAT4 significantly exacerbated atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice as evidenced by significant increases of oilred O-positive lipid-rich lesion, vascular inflammation, and necrotic core lesion in atherosclerotic plaques of DKO mice compared to ApoE^{-/-} mice. The accelerated atherosclerotic process is associated with abnormal mobilization and differentiation of macrophages from CD11b⁺Gr-1⁺ immature myeloid cells and with the enhanced formation of macrophages-derived foam cells in DKO mice. Furthermore, the mechanism studies revealed that the disruption of STAT4 signal leads to the inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/serine-threonine kinases (Akt)/nuclear factor kappa B (NF-κB)/miR-9 signaling pathway and consequently up-regulates the expression of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1), an enzyme that esterifies cholesterol and promotes its storage in macrophages and foam cells. **Conclusion** The results suggest that the STAT4 signal plays important roles in both immune responses and cholesterol metabolism during the differentiation of macrophages. Targeting STAT4 related signals may develop a novel pharmacotherapeutic target for the treatment of atherosclerotic diseases.

动脉粥样硬化是一类主要累及大中动脉的慢性炎症性疾病^[1-2]。研究显示巨噬细胞在动脉粥样硬化发生发展各阶段均发挥关键作用^[3-5]。巨噬细胞具有高度异质性,根据表型、功能及诱导条件不同分为 M1 型和 M2 型^[6-7]。M1 型巨噬细胞可加重炎症反应,促进动脉粥样硬化斑块的发生发展;而 M2 型巨噬细胞则与抗炎反应及斑块消退相关^[8]。骨髓来源的单核细胞被动员释放至血液,在组织局部分化为巨噬细胞并发生极化。CD11b⁺Gr-1⁺ 未成熟髓系细胞是骨髓中的异质性细胞群,主要包括 CD11b⁺Ly6G⁺ 及 CD11b⁺Ly6C⁺ 两大亚群,分别分化为粒细胞及单核/巨噬细胞^[8-10]。本课题组研究发现,内源性组胺缺失可促进 CD11b⁺Gr-1⁺ 未成熟髓系细胞增殖和激活,但在急性心肌梗死中却抑制其向巨噬细胞分化^[11],具体机制尚不明确。

组胺是一类传统炎症因子,内源性组胺合成依赖于组氨酸脱羧酶(histidine decarboxylase, HDC)介导的组氨酸脱羧作用^[12-13]。在动脉粥样硬化的冠状动脉外膜可检测到组胺蓄积^[14]。Wang 等^[15]报道 HDC 基因敲除小鼠可通过影响炎症调控因子表达最终抑制动脉粥样硬化。之前基因芯片结果显示,内源性组胺缺失可显著下调 CD11b⁺Gr-1⁺ 髓系细胞中信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)4 和 6 的表达。STAT6 基因缺失可显著抑制组胺调控的 M1 极化;而 STAT4 信号通路似乎并不直接参与组胺介导的巨噬细胞分化调控^[14]。作为 STAT 家族一员,STAT4 参与介导多种细胞因子如白细胞介素 12(interleukin-12, IL-12), γ 干扰素(interferon-γ, IFN-γ)等的下游信号通路^[16-17]。本团队拟探究 STAT4 在调控髓系细胞增殖分化以及斑块发展中的潜在作用。

在动脉硬化早期巨噬细胞的脂质稳态失衡导

致细胞内胆固醇蓄积,进而导致泡沫细胞形成^[8]。促动脉粥样硬化的脂蛋白通过清道夫受体 A(scavenger receptor-A, SR-A)、CD36 等吞噬,转运至胞内体,胆固醇酯被水解成游离胆固醇和脂肪酸;部分游离胆固醇被再次酯化,最终存储在胞质网的脂质小体里,该过程由巨噬细胞中的酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶(acyl coenzyme A cholesterol acyltransferase-1, ACAT-1)催化。巨噬细胞中 ACAT-1 缺乏可导致游离胆固醇水平升高以及胆固醇外流减少^[18-19]。而 ACAT-1 过表达可导致巨噬细胞内胆固醇酯蓄积^[20]。富含大量胆固醇的泡沫细胞形成是动脉粥样硬化早期的关键事件^[21-22]。人斑块局部的巨噬细胞发现 ACAT-1 表达水平与泡沫细胞形成密切相关^[23]。MicroRNAs 是一类非编码 RNA,通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 端结合下调靶基因的表达水平^[24-25],参与脂质代谢等多种病理生理过程^[26-28]。Xu 等^[29]发现 miR-9 可通过下调 ACAT-1 表达进而调控细胞内胆固醇稳态。

本研究通过将 STAT4 基因敲除(STAT4^{-/-})小鼠与载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠进行杂交,筛选建立 ApoE/STAT4 双基因敲除(double knockout, DKO)的新型动脉粥样硬化易感小鼠模型,探究 STAT4 在动脉粥样硬化斑块形成过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型构建及干预

将 ApoE^{-/-} 小鼠(C57 背景)与 STAT4^{-/-} 小鼠(Balb/c 背景)进行杂交,通过鼠尾 DNA 进行基因型鉴定,筛选建立 DKO 小鼠,并通过至少 6 代回交纯化,获取 C57/B6 背景的 DKO 小鼠。以年龄(3 月龄)和性别匹配的 ApoE^{-/-} 小鼠作为研究对照。WT

(Balb/c 背景)、STAT4^{-/-}、ApoE^{-/-}小鼠和 DKO 小鼠(每组至少 10 只)均接受 12 周高脂高胆固醇饲料(含 0.15% 胆固醇及 21% 脂肪)饲养。所有动物实验均通过复旦大学上海医学院动物伦理机构批准。

1.2 动脉粥样硬化斑块定量测定

将主动脉纵向切开,置于 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)中固定 8 h,随后进行油红 O 染色。染色后的血管条置于黑色不反光绒布上拍照,并运用 ImageJ 软件统计斑块面积。另外将血管条进行福尔马林固定及石蜡包埋,垂直长轴连续切片,切片厚度为 5 μm,并进行 HE 及 Masson 染色。运用 ImageJ 软件统计血管内膜/中膜厚度比值以及血管斑块面积。利用抗 STAT4 抗体(abcam)进行免疫组化染色。

1.3 脂质测定

收集小鼠外周血,离心(4 200 r/min)15 min,分离上清。采用酶比色法测定血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平。

1.4 流式细胞术及体外细胞培养

采用含 2% 胎牛血清 PBS (HyClone) 分离、重悬

小鼠双侧股骨、脾脏来源的髓系细胞,采用红细胞裂解液(BD Biosciences)去除红细胞;外周血中所有有核细胞通过红细胞裂解液进行收集。利用 40 μm 滤网(BD Biosciences)过滤细胞,制备单细胞悬液。根据需要加入流式抗体孵育,并进行流式检测[EPICS ALTRA(Beckman Coulter), Amnis Imaging Stream Mark II(Merck Millipore)]。采用 FlowJo 7 软件(Tree Star)进行流式数据分析。同时分离 CD11b⁺细胞用于体外细胞培养。

1.5 Western blot 蛋白印迹法

提取体外培养细胞中的蛋白,SDS-PAGE 法转位至 PVDF 膜上,一抗封闭并且孵育过夜,加入相应的二抗检测条带。使用的一抗有甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH (ab8245, Abcam)、磷酸肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) (ab44718, Abcam)、丝氨酸苏氨酸激酶 (serine-threonine kinases, Akt) (ab54461, Abcam)、核因子 κB (nuclear factor kappa B, NF-κB) (ab37291, Abcam) 和 ACAT-1 (ab39327, Abcam)。

1.6 实时定量 PCR

基因表达水平采用 SYBR-Green 荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 方法进行检测。PCR 引物设计见表 1。

表 1. Real-time PCR 引物

Table 1. Real-time PCR primers

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
iNOS	AGGGAATCTTGGAGCGGAGTT	GCAGCCTCTTGTCTTTGACC
IL-23	CCCGTATCCAGTGTGAAGATG	AGATGTCAAGTCAAGCAGGTG
Arg-1	GCAGAGGTCCAGAAGAATGG	AGCATCCACCCAAATGACAC
IL-10	CATACTGCTAACCGACTCCTT	AATGCTCCTTGATTCTGG
PI3K	GTGCCCTCTTTCGTTGTTGT	TGGGTCTACTTGCCTTCCAT
Akt	GTTGCCACACGCTTACTG	CACAATCTCCGCACCATAGA
ACAT-1	CAGCACACTGAACGATGGAG	AGCACAACCACACTGAATGC

1.7 泡沫细胞形成的检测

在含 15% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养骨髓和脾脏来源的 CD11b⁺Gr-1⁺髓系细胞,20 μg/L 巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)和 60 mg/L 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)孵育培养 48 h。采用油红 O 染色检测泡沫细胞形成。根据不同类型细胞表面标记采用流式检测髓系细胞不同亚群分化情况。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测基因和蛋白水平。

1.8 细胞内胆固醇水平测定

参考先前发表的文献^[29],采用 Amplex Red 胆固醇检测试剂盒(Molecular Probes/Invitrogen)进行检测。为了测定细胞总胆固醇(TC)和游离胆固醇(FC),用氯仿/甲醇(体积比 2:1)抽提细胞;氯仿相层经分离、干燥,之后溶解在分析反应缓冲液(100 mmol/L 磷酸钾、pH 7.4、50 mmol/L NaCl、5 mmol/L 胆酸和 0.1% Triton X-100)中。通过测定各样品中 TC 和 FC 含量的差异得到胆固醇酯(CE)的含量。用蛋白质测定试剂盒(Bio-Rad)测定蛋白质含量。

1.9 统计学分析

研究数据来自至少 3 次独立重复试验,每组至少 5 只小鼠,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用 Student's *t* 检验,4 组数据比较采用 one-way-ANOVA,分析采用 GraphPad Prism 软件。 $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 STAT4 基因缺失上调高脂喂养小鼠 CD11b⁺Gr-1⁺未成熟髓系细胞比例

为了进一步探究 STAT4 信号通路在斑块形成中的作用,首先证实 STAT4 在斑块局部的表达。免疫组化染色结果显示,在高脂喂养 12 周的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块肩部及血管外膜均可检测到 STAT4 蛋白表达(图 1A)。接着采用 STAT4^{-/-}小

鼠探索 STAT4 基因敲除对斑块形成及免疫细胞亚群的影响。2 月龄 STAT4^{-/-}小鼠进行 12 周高脂喂养,油红 O 染色结果显示,STAT4^{-/-}小鼠和 WT 小鼠的主动脉均未见显著动脉粥样硬化斑块,但在 STAT4^{-/-}小鼠的主动脉根部可见少许脂纹样改变(图 1B、C)。主动脉切片 HE 和 Masson 染色结果显示,STAT4^{-/-}小鼠动脉内膜/中膜及斑块/管腔面积比值较 WT 小鼠略有增加(图 1D、E)。

血脂分析结果显示,STAT4^{-/-}小鼠血清中的 TG、TC 水平较 WT 小鼠略有提高,而二者的 LDLC 及 HDLC 水平无显著差异(图 2A-D)。有趣的是,流式分析结果显示高脂喂养的 STAT4^{-/-}小鼠外周血及骨髓中 CD11b⁺Gr-1⁺髓系细胞及 CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞比例较 WT 小鼠明显提高,提示 STAT4 通路在高脂诱导的髓系细胞激活和分化中可能发挥一定作用(图 2E、F)。

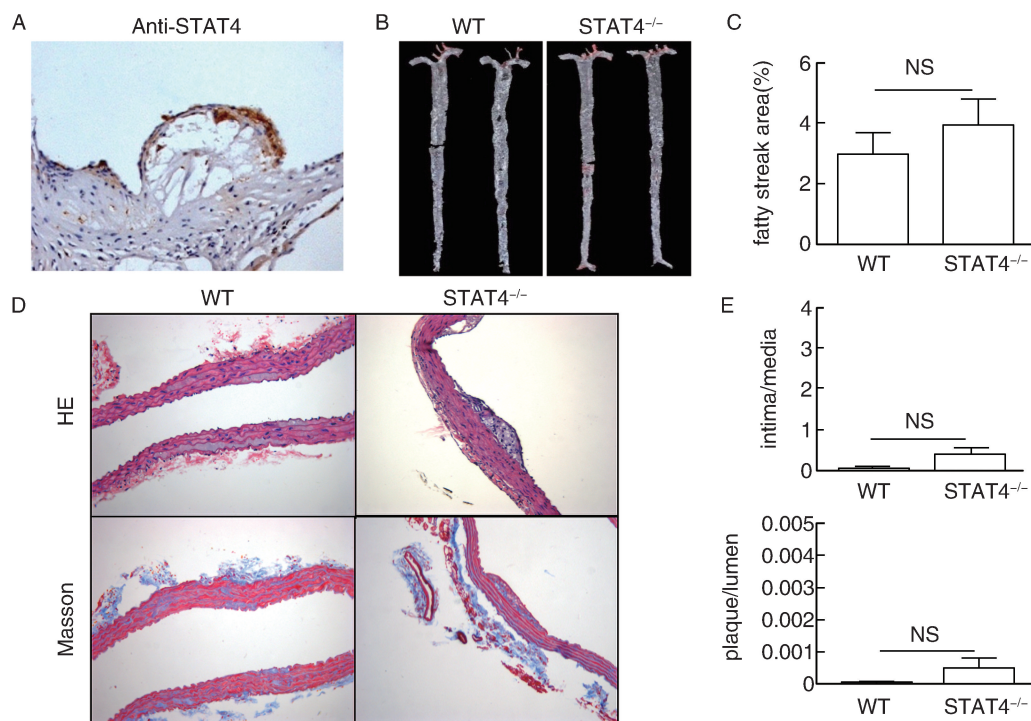


图 1. STAT4 基因缺失小鼠动脉粥样硬化斑块未见显著增加 STAT4 蛋白表达($n=3, 100\times$); B、C 为油红 O 染色显示高脂喂养的 STAT4^{-/-}及 WT 小鼠主动脉斑块($n=5$); D、E 为高脂喂养的 STAT4^{-/-}及 WT 小鼠主动脉切片 HE 和 Masson 染色($n=5, 100\times$)。

Figure 1. No significant plaque in HFD-fed STAT4^{-/-} mice

2.2 STAT4 基因缺失促进 DKO 小鼠动脉粥样硬化斑块形成

基于前期研究结果,将 ApoE 基因敲除所致的高胆固醇血症和 STAT4 基因敲除所致的增强固有免疫反应结合起来,构建 ApoE/STAT4 双基因敲除

(DKO)小鼠,预期建立一种新型动脉粥样硬化易感模型。DKO 小鼠的外形、发育及年龄与正常 C57/B6 小鼠并无显著差异。2 月龄 WT、STAT4^{-/-}、ApoE^{-/-}以及 DKO 小鼠分别接受 12 周的高脂饲料喂养。高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠和 DKO 小鼠的大动

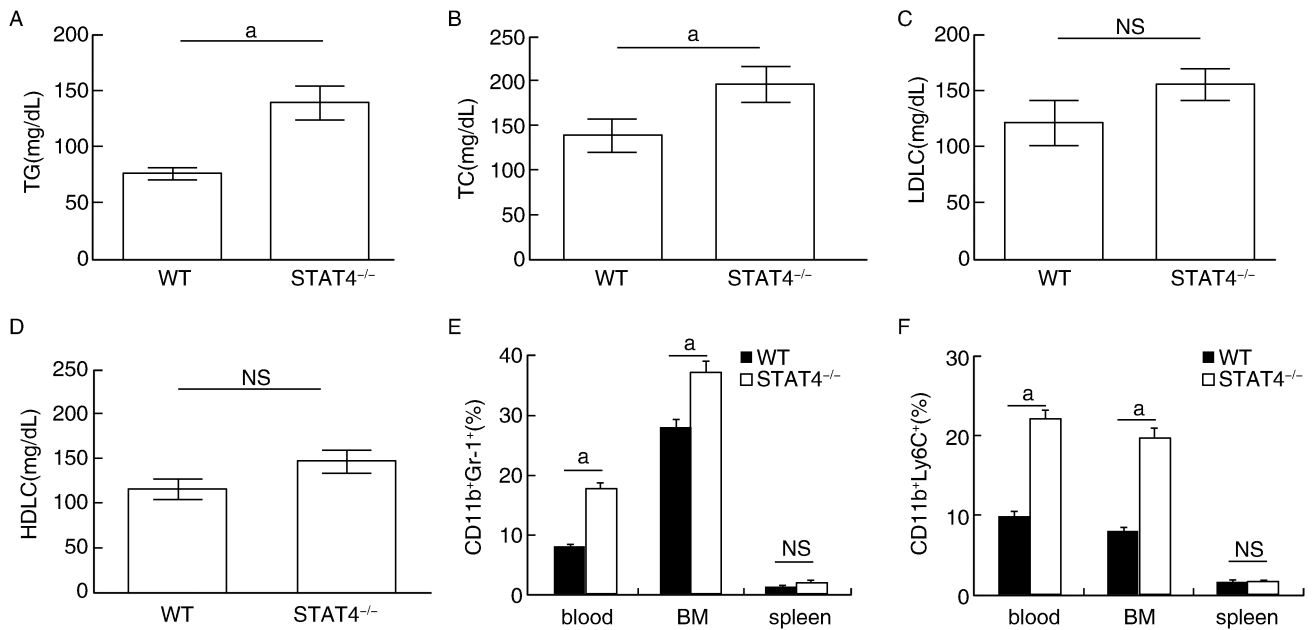


图2. STAT4 基因缺失上调高脂喂养小鼠 CD11b⁺Gr-1⁺ 未成熟髓系细胞比例。A-D 为 STAT4^{-/-} 及 WT 小鼠外周血 TG、TC、LDLC、HDLc 水平 ($n=10$, a 为 $P<0.05$); E 为流式分析显示高脂喂养的 STAT4^{-/-} 及 WT 小鼠外周血、骨髓和脾脏中的 CD11b⁺Gr-1⁺ 未成熟髓系细胞水平 ($n=10$, a 为 $P<0.05$); F 为流式分析显示高脂喂养的 STAT4^{-/-} 及 WT 小鼠外周血、骨髓和脾脏中的 CD11b⁺Ly6C⁺ 单核细胞水平 ($n=10$, a 为 $P<0.05$)。

Figure 2. STAT4 deficiency increases CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid cells in HFD-fed mice

脉均检测到明显的动脉粥样硬化斑块且主要分布于主动脉弓及髂动脉分叉处,油红染色结果显示DKO组小鼠的动脉粥样硬化斑块较另外3组明显增多、增大(图3A、B)。主动脉切片HE和Masson染色结果显示,DKO小鼠的内膜/中膜比值及斑块/管腔比值较ApoE^{-/-}小鼠明显提高,前者斑块表现为更薄的纤维帽(约ApoE^{-/-}小鼠的70%)、更大的脂质核心(约ApoE^{-/-}小鼠的2倍)、更多的炎症细胞浸润、更少的胶原成分且排列更加紊乱,而这些均为易损斑块的典型病理特征(图3C、D)。与STAT4^{-/-}小鼠CD11b⁺Gr-1⁺髓系细胞增多情况类似,流式分析数据显示,与ApoE^{-/-}小鼠相比,DKO小鼠外周血和骨髓中的CD11b⁺Gr-1⁺髓系细胞和CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞水平均明显提高(图3E-F)。免疫荧光染色结果进一步证实了STAT4在CD11b⁺细胞及ApoE^{-/-}小鼠斑块局部的表达(图3G)。综合以上结果,STAT4基因缺失可加重高胆固醇血症导致的动脉粥样硬化,该过程可能与CD11b⁺髓系细胞比例上调有关。

2.3 STAT4 基因缺失促进 DKO 小鼠 CD11b⁺Ly6C^{high}M1 型巨噬细胞分化

接着,进一步探究STAT4基因缺失对CD11b⁺髓系细胞不同亚群分化的影响。流式分析结果显

示,DKO小鼠外周血中的CD11b⁺Ly6C^{high}M1型巨噬细胞水平较ApoE^{-/-}小鼠明显升高(图4A、B)。DKO小鼠骨髓来源的髓系细胞中可检测到M1极化相关基因诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素23(interleukin-23, IL-23)表达上调和M2极化相关基因白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)表达下调(图4C、D)。以上结果提示STAT4基因缺失可促进DKO小鼠髓系细胞向CD11b⁺Ly6C^{high}M1型巨噬细胞分化。

2.4 STAT4 基因敲除通过抑制 PI3K/Akt 通路上调 ACAT-1 表达,促进泡沫细胞形成

为了进一步探究ApoE基因敲除状态下STAT4通路在髓系细胞分化和泡沫细胞形成中的作用,从ApoE^{-/-}和DKO小鼠的骨髓分离CD11b⁺髓系细胞,采用M-CSF(终浓度20 μg/L)、ox-LDL(终浓度60 mg/L)孵育培养48 h,体外诱导分化为巨噬细胞。流式分析结果显示,STAT4基因敲除显著促进髓系细胞向CD11b⁺Ly6C^{high}M1型巨噬细胞分化,而轻度降低CD11b⁺CD206⁺M2型巨噬细胞水平(图5A)。油红O染色结果显示,DKO组CD11b⁺髓系细胞来源的泡沫细胞较ApoE^{-/-}组明显增多(图5B)。DKO组细胞内胆固醇水平较ApoE^{-/-}组明显升高,进一步证实前者更多的泡沫细胞形成(图5C),为了探究

STAT4 下游的机制,对高脂小鼠骨髓和脾脏来源的 CD11b⁺Gr-1⁺未成熟髓系细胞进行基因芯片分析,结果发现 STAT4 基因缺失可导致 PI3K/Akt 通路下调以及 ACAT-1 表达水平上调。RT-PCR 结果也显示,与 ApoE^{-/-}小鼠相比,DKO 小鼠骨髓来源的 CD11b⁺髓系细胞中 PI3K/Akt 信号通路明显下调,而 ACAT-1 表达水平明显上调(图 5D)。Western blot 分析结果进一步证实了这一点(图 5E、F)。同时采用胰岛

素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1, PI3K/Akt 通路激动剂)对 CD11b⁺髓系细胞进行预处理,Western blot、油红 O 染色以及细胞内胆固醇分析结果显示,PI3K/Akt 通路激活可削弱 STAT4 基因缺失造成的 ACAT-1 表达上调以及泡沫细胞形成增加效应(图 5G、H)。以上结果提示,STAT4 缺失可通过抑制 PI3K/Akt 通路上调 ACAT-1 表达,进而促进细胞内脂质蓄积及泡沫细胞形成。

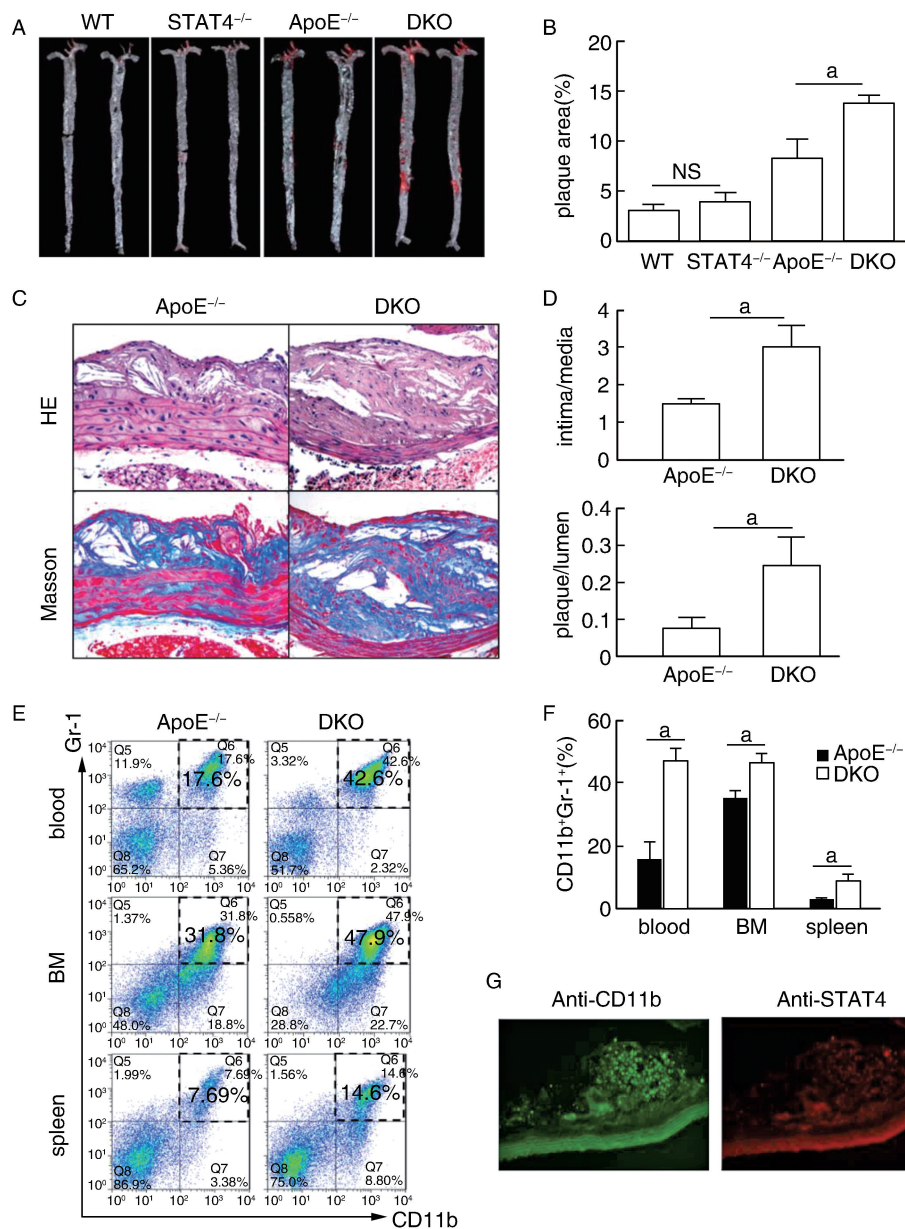


图 3. STAT4 基因缺失促进 DKO 小鼠动脉粥样硬化斑块形成 A、B 为油红 O 染色显示 WT、STAT4^{-/-}、ApoE^{-/-} 和 DKO 小鼠的斑块数量和大小 (n=10, 200×, a 为 P<0.05); C、D 为高脂喂养的 ApoE^{-/-} 及 DKO 小鼠主动脉切片 HE 和 Masson 染色 (n=10, 200×, a 为 P<0.05); E、F 为流式分析显示高脂喂养的 ApoE^{-/-} 及 DKO 小鼠外周血、骨髓和脾脏中的 CD11b⁺Gr-1⁺ 未成熟髓系细胞水平 (n=10, a 为 P<0.05); G 为免疫荧光染色显示 ApoE^{-/-} 小鼠斑块局部 CD11b 和 STAT4 表达 (200×)。

Figure 3. Disruption of STAT4 signaling exacerbates atherosclerosis in DKO mice

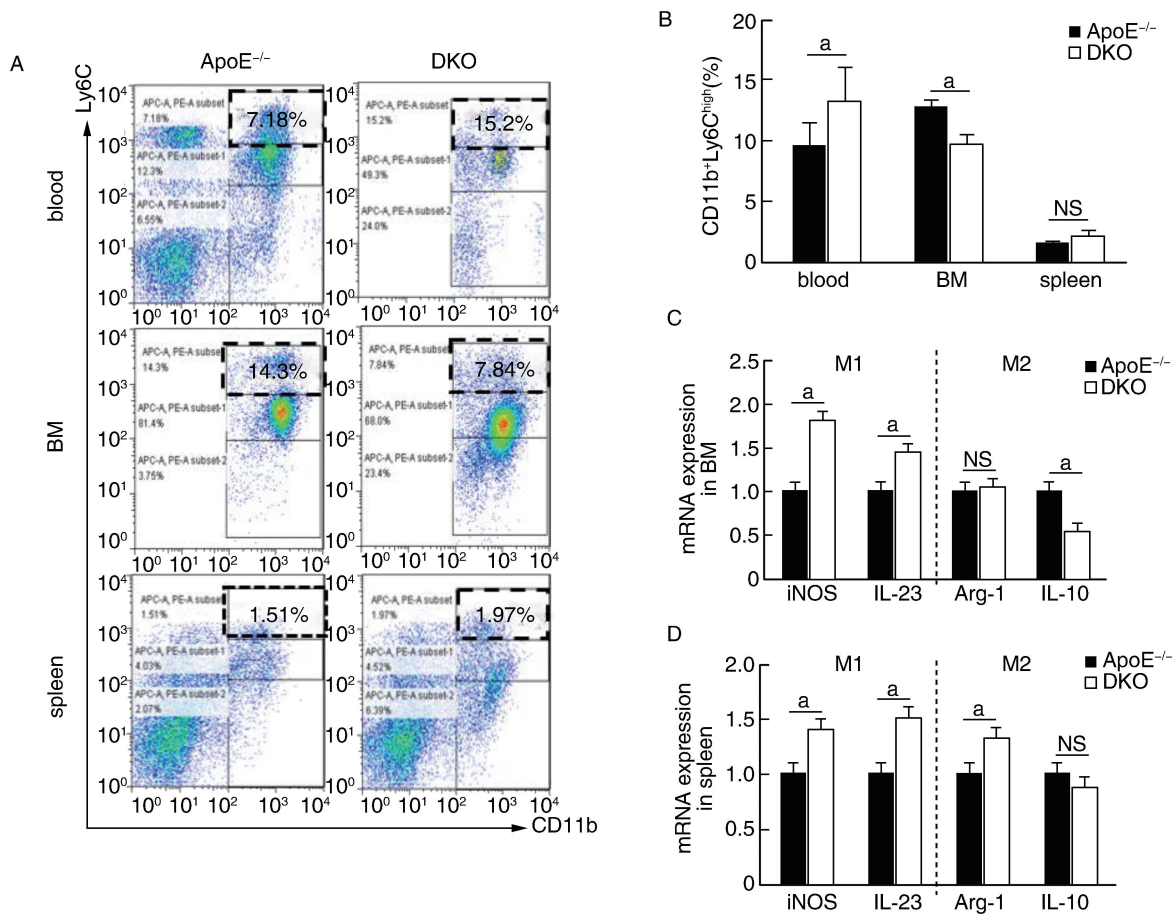


图 4. STAT4 基因缺失促进 DKO 小鼠 CD11b⁺Ly6C^{high} M1 型巨噬细胞分化 A、B 为流式分析显示高脂喂养的 ApoE^{-/-} 及 DKO 小鼠外周血、骨髓和脾脏中的 CD11b⁺Ly6C^{high} M1 型单核细胞水平 (n=10, a 为 P<0.05); C、D 为 RT-PCR 检测 ApoE^{-/-} 及 DKO 小鼠骨髓和脾脏来源的髓系细胞中 M1 极化相关基因 (iNOS、IL-23) 和 M2 极化相关基因 (Arg-1、IL-10) 的表达 (n=10, a 为 P<0.05)。

Figure 4. STAT4 deficiency promoted CD11b⁺Ly6C^{high} M1 macrophage differentiation in DKO mice

2.5 STAT4 缺失通过调控 miR-9 上调 ACAT-1 表达, 进而促进泡沫细胞形成

近来有报道, 人细胞系中 ACAT-1 是 miR-9 的一个调控靶点; ACAT-1 3'UTR 上 miR-9 的调控位点非常保守。拟探究 miR-9 是否参与 STAT4 调控 ACAT-1 表达的过程。DKO 组 CD11b⁺髓系细胞中的 miR-9 较 ApoE^{-/-} 组明显减少 (图 6A)。荧光素酶检测结果显示, miR-9 可直接作用于小鼠 ACAT1-WT-3'UTR, 而不是结合位点突变体 ACAT1-MUT-3'UTR (图 6B)。Western blot 结果进一步证实, miR-9 可抑制小鼠的 ACAT-1 表达 (图 6C)。小鼠有 3 种不同的 miR-9 转录位点, 分别位于 3、7、13 号染色体。RT-PCR 结果显示, 3 种 miR-9 前体 (pre-miR-9s) 中, pre-miR-9-2 在 DKO 组 CD11b⁺髓系细胞来源的巨噬细胞中是显著下调的 (图 6D), 提示 pre-miR-9-2 在 STAT4 信号通路中的潜在作用。Akt 通路激活可导致一系列蛋白的磷酸化, 包括糖原合酶激酶-3b、6-磷酸果糖-2-激酶、NF-κB 抑制因子 (IκB) 等。

IκB 磷酸化使得 NF-κB 可转移至核仁, 与靶基因结合, 最终激活靶基因^[30]。发现, 小鼠 pre-miR-9-2 的启动子区有一个 NF-κB 的结合位点 (图 6E)。在人类和大鼠的 pre-miR-9-2 启动子区均有类似结合位点。免疫共沉淀结果证实小鼠 CD11b⁺髓系细胞来源的巨噬细胞中 NF-κB 可结合至 pre-miR-9-2 的启动子区 (图 6F)。荧光素酶检测结果显示, 内源性 NF-κB 可激活 pre-miR-9-2 野生型启动子区而不是突变型启动子区, 该效应可被 NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082 所削弱 (图 6E、6G)。在 STAT4 基因敲除的 CD11b⁺髓系细胞来源的巨噬细胞中, NF-κB 向核内转移减少, 同时 pre-miR-9-2 表达水平降低, 该现象可通过 IGF-1 (PI3K/Akt 通路激动剂) 干预逆转 (图 6H)。另外, 油红 O 染色及细胞内的胆固醇测定结果显示, miR-9 过表达可减少 STAT4 缺失诱导的泡沫细胞形成, 进一步证实 miR-9 在 STAT4 通路调控泡沫细胞形成中的作用 (图 6I、J)。

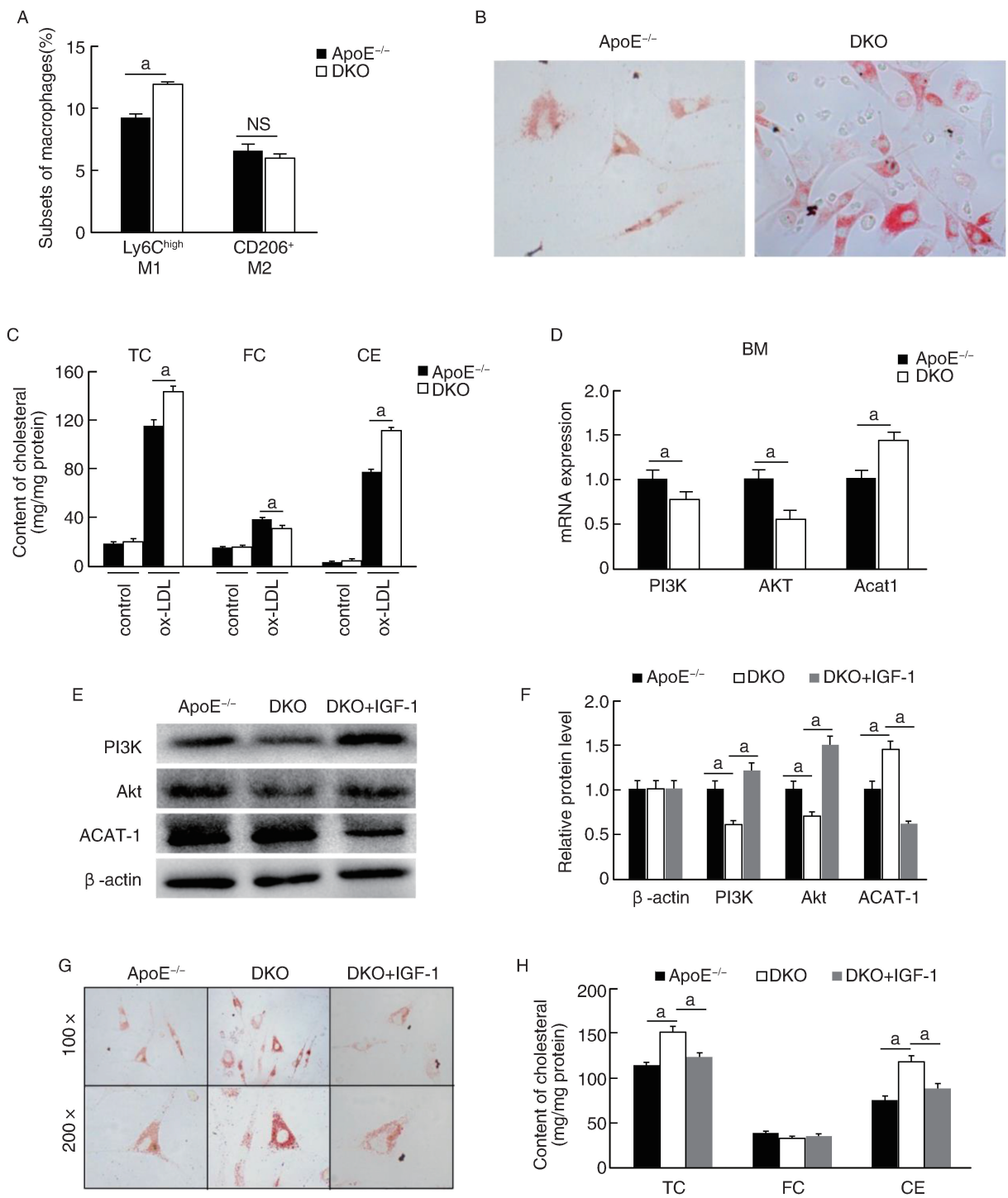


图 5. STAT4 基因敲除通过抑制 PI3K/Akt 通路上调 ACAT-1 表达, 促进泡沫细胞形成 A 为流式分析显示体外实验 ApoE^{-/-} 和 DKO 组 CD11b⁺Ly6C^{high} M1 型巨噬细胞和 CD11b⁺CD206⁺M2 型巨噬细胞分化情况 (n=5, a 为 P<0.05); B 为油红 O 染色显示 ApoE^{-/-} 和 DKO 小鼠 CD11b⁺ 髓系细胞来源的泡沫细胞形成情况 (n=5, 100×, a 为 P<0.05); C 为 ApoE^{-/-} 和 DKO 组细胞内 TC、FC 和 CE 水平检测 (n=5, a 为 P<0.05); D 为 RT-PCR 结果显示 ApoE^{-/-} 和 DKO 小鼠骨髓来源的 CD11b⁺ 髓系细胞 PI3K/Akt/ACAT-1 表达水平 (n=5, a 为 P<0.05); E、F 为 Western blot 证实 ApoE^{-/-} 和 DKO 小鼠骨髓和脾脏来源的 CD11b⁺ 髓系细胞 PI3K/Akt/ACAT-1 表达水平 (n=5, a 为 P<0.05); G 为油红 O 染色显示 ApoE^{-/-}、DKO 和 DKO+IGF-1 组泡沫细胞形成情况 (n=5, a 为 P<0.05); H 为 ApoE^{-/-}、DKO 和 DKO+IGF-1 组细胞内 TC、FC 和 CE 水平检测 (n=5, a 为 P<0.05)。

Figure 5. STAT4 deletion inhibited PI3K/Akt signaling and up-regulated ACAT-1 expression in DKO mice to promote the formation of foam cells

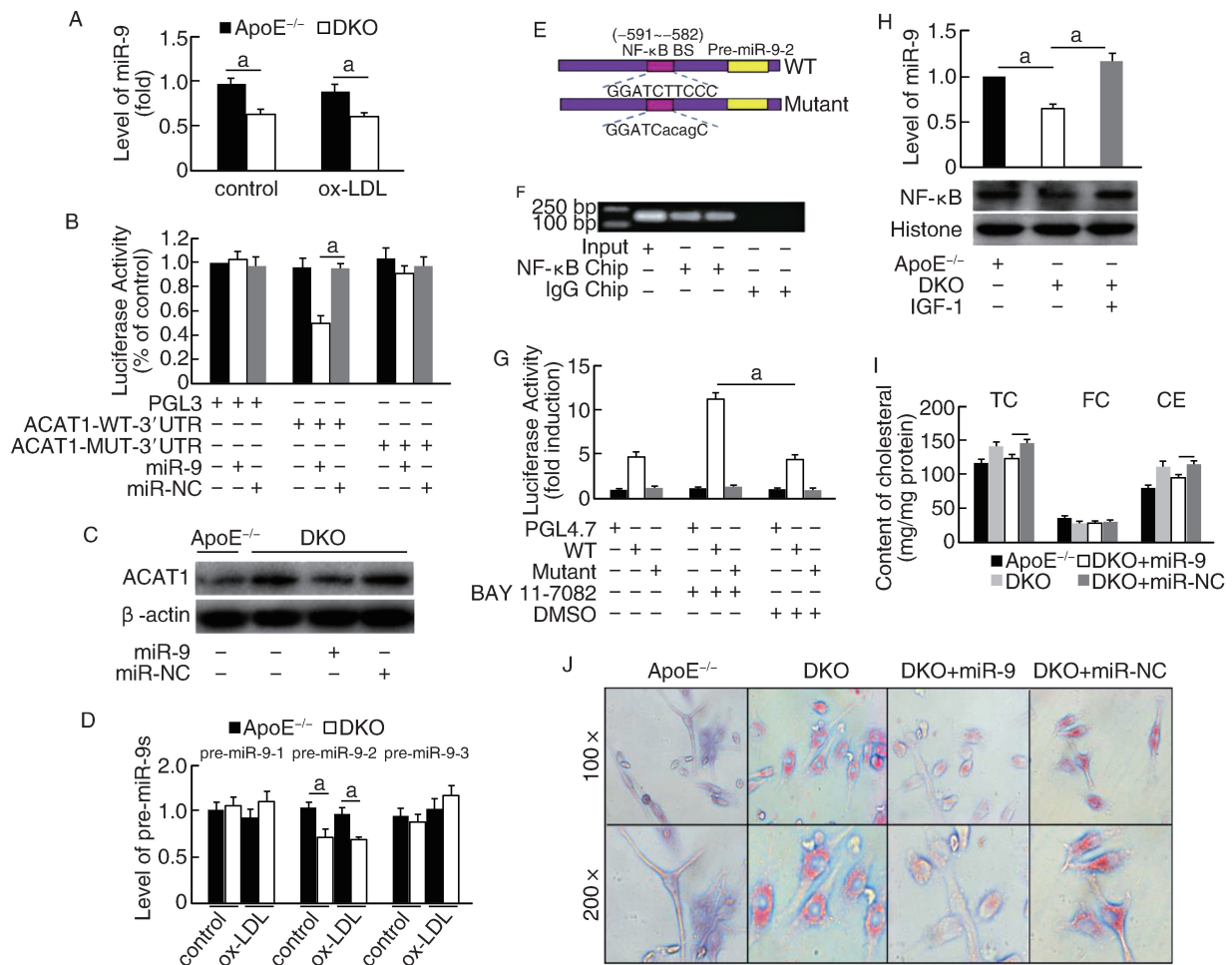


图 6. STAT4 缺失通过调控 miR-9 上调 ACAT-1 表达,进而促进泡沫细胞形成 A 为 ApoE^{-/-}和 DKO 小鼠来源的 CD11b⁺髓系细胞中 miR-9 表达 ($n=3$, a 为 $P<0.05$); B 为荧光素酶检测显示 miR-9 可抑制野生型 ACAT-1 的 3'UTR (ACAT1-WT-3'UTR) 而不是突变型 ACAT-1 的 3'UTR (ACAT1-MUT-3'UTR) 表达 ($n=5$, a 为 $P<0.05$); C 为 Western blot 显示 miR-9 可抑制小鼠 ACAT-1 表达 ($n=5$, a 为 $P<0.05$); D 为 RT-PCR 显示 CD11b⁺髓系细胞来源的巨噬细胞中不同的 pre-miR-9s 水平 ($n=5$, a 为 $P<0.05$); E 为 NF-κB 在小鼠 pre-miR-9-2 启动子区域的最佳结合位点; F 为免疫共沉淀结果显示 CD11b⁺髓系细胞来源的巨噬细胞中 NF-κB 结合至 pre-miR-9-2 启动子区域; G 为荧光素酶检测结果显示内源性 NF-κB 可激活 pre-miR-9-2 野生型启动子区, 而该作用可被 NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082 所削弱 ($n=5$, a 为 $P<0.05$); H 为在 STAT4 敲除的 CD11b⁺髓系细胞来源巨噬细胞中, NF-κB 向核内转移及 pre-miR-9-2 水平降低, 该效应可被 IGF-1 所逆转 ($n=5$, a 为 $P<0.05$); I 为 ApoE^{-/-}、DKO、DKO+miR-9 和 DKO+miR-NC 组细胞内 TC、FC 和 CE 水平检测 ($n=5$, a 为 $P<0.05$); J 为油红 O 染色显示 ApoE^{-/-}、DKO、DKO+miR-9 和 DKO+miR-NC 组泡沫细胞形成情况 ($n=5$, a 为 $P<0.05$)。

Figure 6. STAT4 deletion up-regulated ACAT-1 expression and promoted foam cell formation by inhibiting the pro-transcription regulation of NF-κB on the expression of miR-9

3 讨论

STAT4 基因缺失可促进 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系细胞向 M1 型巨噬细胞分化, 进而促进动脉粥样硬化斑块形成。STAT4 基因敲除抑制 PI3K/Akt 通路, 减少 NF-κB 向核内转运, 下调 miR-9 转录, 最终促进 ACAT-1 表达 (有报道其能促进巨噬细胞来源的泡沫细胞形成)。研究发现, 免疫炎症反应和高胆固醇血症二者协同作用, 促进动脉粥样硬化斑块形成, PI3K/Akt/NF-κB/miR-9/ACAT-1 介导的 STAT4

信号通路在其中发挥一定作用。巨噬细胞具有异质性及可塑性, 根据周围环境调整形态及代谢状态, 包括促进愈合/生长的功能 (M2 型) 以及抑制/杀死功能 (M1 型)^[31-32]。众所周知, 在同一斑块病变中可同时存在 M1 和 M2 型巨噬细胞。早期斑块病变主要为 M2 型巨噬细胞, 参与吞噬和组织损伤的修复^[32-33]。在动脉斑块发展过程中, M2 型巨噬细胞逐步被 M1 型巨噬细胞替代, 导致血管局部环境不稳定, 减少胞葬作用, 诱发血管壁的二次坏死, 进而促进晚期动脉粥样硬化斑块形成。许多研究

支持 M1 型巨噬细胞是破裂斑块区域的主要巨噬细胞类型,在不稳定斑块中尤其丰富^[5,34-35]。然而,巨噬细胞的来源以及调控巨噬细胞分化的内在分子机制尚不明确。本研究结果提示 STAT4 基因缺失可激活高脂环境下骨髓来源 CD11b⁺ 未成熟髓系细胞,促进 M1 型巨噬细胞分化,最终加速动脉粥样硬化斑块的进展。

之前的多项研究主要着眼于 STAT4 与 Th1 细胞之间的关系,提示 STAT4 通路在 Th1 细胞的功能及分化中的重要作用^[36-37]。STAT4 基因敲除小鼠来源的淋巴细胞在 IL-12 刺激下无法产生高水平的 IFN γ (Th1 细胞特征)。然而,少有研究探索 STAT4 与髓系细胞的关系。近来有研究报道,STAT4 缺失可通过调控巨噬细胞进而抑制 ApoE^{-/-} 小鼠的动脉粥样硬化进展^[33]。该研究中的某些结论与本文似乎有些矛盾。本研究发现,在体实验中 STAT4 基因缺失可促进 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系细胞的增殖和转移,以及髓系细胞向 Ly6C^{high} M1 型巨噬细胞分化;体外细胞实验同样证实了这一点。本研究不排除 STAT4 基因缺失对骨髓来源的其他细胞(如 T 细胞等)的影响以及在动脉粥样硬化斑块形成过程中的重要作用。另外,基因背景不同以及小鼠高脂喂养起始年龄不同同样对免疫炎症反应和斑块形成有影响。

本研究还发现,高脂喂养的 DKO 小鼠腹部脂肪较 ApoE^{-/-} 小鼠明显增多,提示肥胖在这个动脉粥样硬化易感模型中可能发挥一定作用。另外发现,STAT4 基因敲除可负向调控 PI3K/Akt 通路,抑制 NF- κ B 向核内转移,从转录水平减少 miR-9,最终增加巨噬细胞中的 ACAT-1 表达,促进细胞内脂质蓄积及泡沫细胞形成。另有研究报道 PI3K/Akt/ACAT-1 信号通路在调控巨噬细胞中的作用:ARIA (凋亡调控因子通过调控 IAP 表达) 缺失可上调 PI3K/Akt 通路,减少 ACAT-1 表达,从而减少泡沫细胞形成。本研究发现,miR-9 通过作用于 ACAT-1 调控巨噬细胞形成泡沫细胞。已有数项研究提示 miR-9 在泡沫细胞形成中的作用^[38-39]。MiR-9 在 ACAT-1 3'UTR 有非常保守的结合区域。在人细胞系中,miR-9 同样作用于 ACAT-1^[29],与本研究在小鼠 Ly6C^{high} M1 型巨噬细胞中的发现一致。采用 PI3K/Akt 信号激活剂 IGF-1 进行干预可显著促进 NF- κ B 向核内转运,提示 PI3K/Akt 是 NF- κ B 的上游,这一点也在其他研究中被证实^[30,40]。NF- κ B 转运至核仁,与靶基因结合、激活靶基因(包括 miRNA)进而发挥作用。有研究报道,NF- κ B 可通

过 miR-146a 参与免疫反应调控^[41]。本研究结果显示,NF- κ B 通过调控 miR-9 转录参与巨噬细胞来源的泡沫细胞形成。STAT4/PI3K/Akt/NF- κ B/miR-9/ACAT-1 通路在泡沫细胞形成过程中的作用拓宽了我们对动脉粥样硬化病理生理过程的认识,提供了动脉粥样硬化预防的潜在治疗靶点。

尽管 STAT4 基因缺失在 ApoE^{-/-} 背景下促进动脉粥样硬化而在野生型背景下未见到显著斑块形成,但 STAT4 基因敲除均显著影响野生型和 ApoE^{-/-} 背景 CD11b⁺ Gr-1⁺ 髓系细胞和 CD11b⁺ Ly6C^{high} M1 型巨噬细胞的分化。这些发现提示 STAT4 参与固有免疫反应调控,可进一步探索 STAT4 在其他免疫相关疾病中的作用。已有报道组胺和组胺受体在动脉粥样硬化形成过程中的重要作用;组胺导致的 STAT4 表达水平变化促使本研究探索 STAT4 在动脉粥样硬化中的作用。二者之间的详细关系将在未来工作中进一步进行研究。

综上,本研究发现了 STAT4 信号通路在调控固有免疫反应和动脉粥样硬化中的作用及具体分子机制;另外,通过结合增强的固有免疫反应和高胆固醇血症建立了一个新型动脉粥样硬化易感模型。本研究将为未来动脉粥样硬化治疗靶点选择提供有价值的科学信息。

[参考文献]

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [2] Paoletti R, Gotto AJ, Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy[J]. *Circulation*, 2004, 109(23 Suppl 1): I20-I26.
- [3] Zeller I, Srivastava S. Macrophage functions in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2014, 115(12): e83-e85.
- [4] Koelwyn GJ, Corr EM, Erbay E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(6): 526-537.
- [5] Moore KJ, Koplev S, Fisher EA, et al. Macrophage trafficking, inflammatory resolution, and genomics in atherosclerosis: JACC Macrophage in CVD Series (Part 2)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(18): 2181-2197.
- [6] Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity[J]. *J Innate Immun*, 2014, 6(6): 716-726.
- [7] 白瑞娜, 郝瑞席, 冯志博, 等. 巨噬细胞与动脉粥样硬化——亚型及功能[J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(5): 393-395.
- [8] Koltsova EK, Hedrick CC, Ley K. Myeloid cells in atherosclerosis: a delicate balance of anti-inflammatory and proinflammatory mechanisms[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(5): 371-380.
- [9] Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice[J]. *J Immunol*, 2008, 181

- (8): 5791-5802.
- [10] Chistiakov DA, Kashirskikh DA, Khotina VA, et al. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: the role of myeloid cells [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(11): 1-12.
- [11] Chen J, Hong T, Ding S, et al. Aggravated myocardial infarction-induced cardiac remodeling and heart failure in histamine-deficient mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44007.
- [12] Jutel M, Watanabe T, Klunker S, et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors[J]. *Nature*, 2001, 413(6854): 420-425.
- [13] Obara I, Telezhkin V, Alrashdi I, et al. Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177: 580-599.
- [14] Xu L, Cheng D, Huang Z, et al. Histamine promotes the differentiation of macrophages from CD11b⁺ myeloid cells and formation of foam cells through a Stat6-dependent pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 263: 42-52.
- [15] Wang KY, Tanimoto A, Guo X, et al. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein E knockout mice independently of serum cholesterol level[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(4): 800-807.
- [16] Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6 [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2577-2584.
- [17] Yokota N, Burne-taney M, Racusen L, et al. Contrasting roles for STAT4 and STAT6 signal transduction pathways in murine renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 285(2): F319-F325.
- [18] Bell FP, Gammill RB, St JL. U-73482: a novel ACAT inhibitor that elevates HDL-cholesterol, lowers plasma triglyceride and facilitates hepatic cholesterol mobilization in the rat[J]. *Atherosclerosis*, 1992, 92(2-3): 115-122.
- [19] Terasaka N, Miyazaki A, Kasanuki N, et al. ACAT inhibitor pacitimibe sulfate (CS-505) reduces and stabilizes atherosclerotic lesions by cholesterol-lowering and direct effects in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190(2): 239-247.
- [20] Matsuo K, Akakabe Y, Kitamura Y, et al. Loss of apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) protects blood vessels from atherosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(6): 3784-3792.
- [21] Wang D, Yang Y, Lei Y, et al. Targeting foam cell formation in atherosclerosis; therapeutic potential of natural products[J]. *Pharmacol Rev*, 2019, 71(4): 596-670.
- [22] Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(11): 1153-1165.
- [23] Miyazaki A, Sakashita N, Lee O, et al. Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerotic lesions and cultured human monocytes-macrophages[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(10): 1568-1574.
- [24] Bartel DP. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [25] Dong H, Lei J, Ding L, et al. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(8): 6207-6233.
- [26] Najafi-shoushtari SH, Kristo F, Li Y, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis[J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1566-1569.
- [27] Rotllan N, Fernandez-herando C. MicroRNA regulation of cholesterol metabolism[J]. *Cholesterol*, 2012, 2012: 847-849.
- [28] Van RE, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease; opportunities and obstacles [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(11): 860-872.
- [29] Xu J, Hu G, Lu M, et al. MiR-9 reduces human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 to decrease THP-1 macrophage-derived foam cell formation[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(11): 953-962.
- [30] Li W, Wang H, Kuang CY, et al. An essential role for the Id1/PI3K/Akt/NFkB/survivin signalling pathway in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells in vitro[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1-2): 135-145.
- [31] Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells[J]. *Science*, 2010, 327(5966): 656-661.
- [32] Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis[J]. *Immunity*, 2017, 47(4): 621-634.
- [33] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 176-185.
- [34] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2011, 145(3): 341-355.
- [35] 谭艳美, 孟磊, 汪江波, 等. 巨噬细胞极化与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2): 207-212.
- [36] Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, et al. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells[J]. *J Exp Med*, 1997, 185(5): 817-824.
- [37] Varikuti S, Oghumu S, Natarajan G, et al. STAT4 is required for the generation of Th1 and Th2, but not Th17 immune responses during monophosphoryl lipid A adjuvant activity[J]. *Int Immunol*, 2018, 30(8): 385.
- [38] Chen T, Huang Z, Wang L, et al. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 131-139.
- [39] Forrest AR, Kanamori-katayama M, Tomaru Y, et al. Induction of microRNAs, miR-155, miR-222, miR-424 and miR-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation [J]. *Leukemia*, 2010, 24(2): 460-466.
- [40] Li B, Cheung PY, Wang X, et al. Id-1 activation of PI3K/Akt/NFkappaB signaling pathway and its significance in promoting survival of esophageal cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(11): 2313-2320.
- [41] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33): 12481-12486.