

巨噬细胞移出动脉粥样硬化斑块调控机制

蒲强红¹, 吕秋菊², 王莉莉³

(1. 乐山职业技术学院, 四川省乐山市 61400; 2. 中山大学附属第三医院, 广东省广州市 510630; 3. 重庆医科大学, 重庆市 400016)

[关键词] 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; CCR7; UNC5b; PlexinD1

[摘要] 巨噬细胞对动脉粥样硬化斑块的发生发展及不稳定起着关键作用, 减少斑块中巨噬细胞累积对逆转斑块起着尤为重要的作用。诱导巨噬细胞移出斑块是减少斑块中巨噬细胞数量的主要策略之一。文章以诱导巨噬细胞移出斑块的受体 CCR7 及抑制巨噬细胞移出斑块的受体 UNC5b、PlexinD1 及氧化应激为主线, 介绍相关调控机制研究进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Egression of Macrophages from Regressive Plaques in Atherosclerosis

PU Qiang-Hong¹, LV Qiu-Ju², and WANG Li-Li³

(1. Leshan Vocational & Technical College, Leshan, Sichuan 614000; 2. The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510630; 3. Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Macrophage; CCR7; UNC5b; PlexinD1

[ABSTRACT] Macrophages plays an important role in atherosclerotic plaque development, progression and destabilization, then reduction of macrophages in plaque promotes the regression of atherosclerotic plaques. Emigration of macrophages from plaques is one approach for reduction of macrophages in plaques, so this paper reviewed activated receptor CCR7, inhibited receptors UNC5b and PlexinD1, oxidative stress in egression of macrophage from plaque.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是累及大、中动脉内膜的慢性进展性炎症疾病, 常造成冠心病、中风等缺血性心血管疾病。巨噬细胞对动脉粥样硬化斑块的发生发展及不稳定起着关键作用^[1-3]。动脉粥样硬化斑块的消退也同时伴随着斑块中巨噬细胞的减少, 反之, 斑块的进展伴随着巨噬细胞的增多^[3]。斑块中巨噬细胞累积可能是血液中单核细胞游入斑块增多, 另外也许是巨噬细胞游出斑块减少, 因为斑块微环境中炎症因子可破坏巨噬细胞移出斑块能力^[4]。巨噬细胞滞留将促进斑块的炎症反应, 从而推动动脉粥样硬化发展。任何阶段动脉粥样硬化斑块都处于高度活跃的动态变化过程, 具体表现为动脉壁内膜中脂质沉积及巨噬细胞聚集始终是一种动态过程^[5]。诱导巨噬细胞移出斑块对动脉粥样硬化斑块消退起着极其重要的作用, 本文主要就巨噬细胞移出斑块的调控机

制研究进展做一综述。

1 巨噬细胞与动脉粥样硬化斑块的形成

多种危险因素, 如高脂血症、高血压、高血糖、吸烟等, 引起血管内皮细胞和单核细胞损伤, 从而使两者细胞表面表达大量细胞黏附分子, 血管内皮细胞上 E 选择素、P 选择素及单核细胞上 L 选择素结合其配体介导单核细胞在血管内皮细胞上最初的滚动性黏附。血管内皮细胞释放趋化因子如单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 使其细胞膜上血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adherent molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子 1 (intercellular adherent molecule-1, ICAM-1) 活化, 分别与白细胞表面的整合素结合, 如

[收稿日期] 2013-04-27

[作者简介] 蒲强红, 博士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化治疗研究, E-mail 为 puqh81@yahoo.com.cn。吕秋菊, 硕士研究生, 医师, 研究方向为内分泌性疾病诊治研究, E-mail 为 22641201@qq.com。王莉莉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化治疗研究, E-mail 为 68203080@qq.com。

极迟抗原 4 (very late antigen-1, VLA-4) 和淋巴细胞功能相关抗原 1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1), 引发牢固性黏附^[6]。一旦完成牢固性黏附, 单核细胞便跨过血管内皮迁移入血管内膜。渗入内膜的单核细胞在巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, MCSF) 作用下分化为巨噬细胞^[7]。巨噬细胞通过清道夫受体, 如 CD36, 大量吞噬脂质, 继而转化为巨噬细胞源性泡沫细胞。同时, 巨噬细胞也释放趋化因子, 诱导中膜平滑肌细胞迁移入内膜, 后者也可吞噬脂质, 转化为平滑肌细胞源性泡沫细胞。泡沫细胞聚集于内膜, 形成动脉粥样硬化早期病变脂纹 (fatty streak)。随着动脉粥样硬化继续发展, T 细胞表达 γ 干扰素 (IFN- γ)、CD40 活化巨噬细胞, 活化的巨噬细胞进一步分泌细胞因子、生长因子促进平滑肌细胞的迁移和增殖^[8]。后者大量合成和分泌胶原纤维, 覆盖在斑块表面, 形成动脉粥样硬化纤维斑块期。随着炎症持续存在, 巨噬细胞释放基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 降解胶原, 另一方面释放 NO, 诱导泡沫细胞凋亡, 从而促使动脉粥样硬化进展为粥样斑块期^[9,10]。由于粥样斑块不稳定, 易引起许多继发性病变, 如血栓、斑块破裂、斑块内出血、动脉瘤等, 导致心肌梗死、脑出血、脑梗死等严重心血管疾病发生。故巨噬细胞对动脉粥样硬化斑块的形成、发展及转归均起着关键作用。

2 进展性与消退性斑块中巨噬细胞表达基因差异

Feig 等^[11]采用基因芯片技术比较动脉粥样硬化小鼠移植模型中进展性与消退性斑块的基因表达差异发现, 消退性斑块巨噬细胞与细胞迁移相关基因表达上调, 如肌球蛋白、肌动蛋白、肌联蛋白等, 此外还有代表 M2 亚型巨噬细胞活化的基因, 如精氨酸酶 1 (arginase1)、CD163、C 凝集素受体等; 但是参与细胞间黏附的基因则表达下调, 如钙粘蛋白 (cadherins)、粘着斑蛋白 (vinculin); 涉及细胞周期的基因亦表达下降, 如组蛋白、细胞周期素等。上述结果提示消退性斑块中巨噬细胞迁移力增强、M2 型抗炎巨噬细胞增多, 但巨噬细胞间黏附降低、分裂增殖减慢。研究证实调控巨噬细胞移出斑块的受体趋化因子受体 7 (chemokine receptor 7, CCR7)、UNC5b、PlexinD1 及氧化应激主要通过干预 Rho-GT-Pase 信号通路来调控细胞骨架微丝 (肌球蛋白、肌

动蛋白等组成) 重组, 继而影响巨噬细胞迁移。

3 趋化因子受体 7 介导巨噬细胞移出斑块的机制

CCR7 属于趋化因子受体超家族成员之一, 为 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体。与其特异性配体趋化因子 19 (chemokine ligand 19, CCL19) 与 21 (chemokine ligand 21, CCL21) 结合后, 发挥促进树突状细胞成熟、调节树突状细胞的存活和淋巴细胞归巢等作用。近年来发现 CCR7 可能在动脉粥样硬化斑块消退过程中发挥关键作用。

动脉粥样硬化斑块移植模型发现消退性斑块中巨噬细胞 (也含巨噬细胞源性泡沫细胞, 因其使用 CD68⁺ 作为表面分子标记) 表达 CCR7 受体上调, 但进展性斑块中则相反; 如用抗体阻断 CCL19 及 CCL21 激动 CCR7, 则斑块面积及巨噬细胞无变化, 表明 CCR7 是巨噬细胞移出斑块的关键受体^[12]。但是随后研究发现 CCR7 基因敲除的动脉粥样硬化小鼠, 也观察到斑块面积及巨噬细胞降低^[13]。两项研究产生不同结果的原因可能是试验设计不一致造成, 前者选用动脉粥样硬化斑块移植模型, 后者选用 CCR7 基因敲除模型。尽管如此, 两项研究都证实同样观点即 CCL19 及 CCL21 激动其受体 CCR7 可增强巨噬细胞迁移力。随后研究基本支持 CCR7 促进巨噬细胞游出斑块, 如 HDLC 促进斑块中巨噬细胞移出, 可能原因亦是 HDLC 增加巨噬细胞表达 CCR7^[14]。CCL19 及 CCL21 激动 CCR7 促进巨噬细胞迁移的机制目前认为主要是激活 Rho-GTPase 通路, 即上调 CDC42-GTP、Rac1-GTP 水平等, 促进肌动蛋白等微丝细胞骨架重组, 继而增强巨噬细胞迁移力^[15]。

调脂治疗增加斑块内巨噬细胞膜上 CCR7 数目的信号通路可能有二: 一是他汀类药物, 如强效降胆固醇药阿托伐他汀及瑞舒伐他汀, 独立于其降胆固醇作用, 首先通过增强类固醇反应元件结合蛋白 (sterol response element binding protein, SREBP) 基因表达, 后者再结合 CCR7 基因上游调控区的类固醇反应元件, 继而增强 CCR7 基因表达^[16]。二是除 SREBP 通路可增加 CCR7 表达外, 肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 通路亦可。LXR 激动剂 T0901317 激动其受体, 促进反式作用因子 LXR 进入核结合 CCR7 基因上游调控区的肝 X 受体反应元件, 亦能增强 CCR7 基因表达^[17]。

4 UNC5b 和 PlexinD1 受体抑制巨噬细胞移出斑块的机制

受体 UNC5b 和 PlexinD1 分别是神经导向因子 Netrin-1 和 Semaphorin 3E 的主要作用受体。最初发现其主要在神经系统发育起着重要作用,随后诸多研究证实 UNC5b 和 PlexinD1 被其各自配体激活后也在神经系统外其他组织器官起着重要作用,如肿瘤生成、血管生成、器官发育等。

van Gils 等^[18]首先报道动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞膜 UNC5b 受体数目增多,其配体 Netrin-1 亦分泌增加;体外试验表明如用 Netrin-1 激动其受体 UNC5b,可对抗 CCL19 及 CCL21 激动其受体 CCR7 后引起的巨噬细胞迁移。体内试验敲除 Netrin-1 基因后,LDLR^{-/-}小鼠主动脉的动脉粥样硬化斑块显著缩小,巨噬细胞数目减少。该小组随后发现动脉粥样硬化进展性斑块中巨噬细胞 PlexinD1 及配体 Semaphorin 3E 表达上调,但消退性斑块中两者则表达下调,形态学证据表示 PlexinD1 受体亦可能发挥抑制巨噬细胞迁移作用。体外试验证实 PlexinD1 被 Semaphorin 3E 激动后,同 UNC5b 受体作用一样,亦可对抗 CCL19 激动其受体 CCR7 后引起的巨噬细胞迁移^[19]。有趣的是,受体 UNC5b 和 PlexinD1 降低巨噬细胞迁移力的信号通路正好也是 CCR7 所使用的。UNC5b 和 PlexinD1 被其配体激动后,则发挥抑制 Rho-GTPase 通路作用,即降低 CDC42-GTP、Rac1-GTP 水平等,从而抑制细胞骨架微丝系统重组,降低巨噬细胞迁移力。故斑块炎性微环境中巨噬细胞表达的受体 UNC5b 与 PlexinD1 是 CCR7 的拮抗剂,发挥抑制巨噬细胞游出斑块的作用。

那么,斑块的炎性微环境下巨噬细胞为何表达 UNC5b 和 PlexinD1 上调,其机制是什么?研究提示巨噬细胞内炎症因子 ox-LDL 累积是关键因素。如将清道夫受体 CD36 基因敲除后,则巨噬细胞中 UNC5b 表达下降。故其可能机制是 ox-LDL 结合其受体 CD36 后,活化 NF- κ B,后者入核结合 UNC5b 基因的上游调控区,增强 UNC5b 基因表达^[18]。除了 NF- κ B 直接诱导 UNC5b 基因表达外,NF- κ B 还可间接通过增强下游的转录因子缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-induced factor 1 α , HIF-1 α) 表达,继而上调 UNC5b 基因表达^[20]。至于 PlexinD1 数目上调是否亦由同样信号通路介导尚不清楚。

5 氧化应激抑制巨噬细胞移出斑块的机制

氧化应激是指活性氧生成与清除系统之间功能失衡造成活性氧生成速率大于清除速率,导致活性氧蓄积。以往研究发现氧化应激对动脉粥样硬化的发生发展具有重要作用^[21,22],但具体机制并不十分清楚。氧化应激抑制巨噬细胞移出斑块可能是其中之一。活性氧可直接氧化灭活蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-2 (Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase) 活性位点中关键氨基酸残基半胱氨酸,SHP-2 的失活引发粘着斑激酶 (FAK) 持续磷酸化,降低 CDC42-GTP、Rac1-GTP、RhoA-GTP 水平,扰乱细胞骨架微丝系统重组,降低巨噬细胞迁移力,使得巨噬细胞滞留于斑块内^[23,24]。既然他汀类药物具有抗氧化应激作用^[25],那么他汀类药物的此作用是否参与巨噬细胞移出斑块,目前仍不清楚。

巨噬细胞合成过多活性氧机制可能是 ox-LDL 结合其受体 CD36 后,引起 NADPH 氧化酶活性增高,造成后者大量生成活性氧^[23]。有趣的是,氧化应激引起活性氧增多亦可反过来直接氧化 LDL 生成 ox-LDL,使得 ox-LDL 水平上升。因此氧化应激和 ox-LDL 相互交织,构成一个正反馈环。此外,因氧化应激亦可活化 NF- κ B,故氧化应激是否也能间接通过 ox-LDL 上调 UNC5b、PlexinD1 等受体数目,从而抑制斑块内巨噬细胞游出,尚需试验证实。

6 结 语

因此,可将调控巨噬细胞移出斑块的因子分为两类:一类是促进巨噬细胞移出的因子:趋化因子受体 CCR7;另一类是抑制巨噬细胞移出的因子:神经导向因子受体 UNC5b 及 PlexinD1、活性氧。研究提示 ox-LDL 结合其受体 CD36 引起 UNC5b 及 PlexinD1、活性氧表达上升,那么 ox-LDL 是否亦可与 CD36 受体结合后经某种细胞内信号途径引起 CCR7 受体表达下调呢?此外,以往实验证实调脂治疗能增加 CCR7 的表达,但能否降低 UNC5b 及 PlexinD1 受体表达尚不清楚。由于巨噬细胞数量减少是动脉粥样硬化斑块发生消退的重要前提,且以往研究提示消退性斑块中巨噬细胞数目减少并不主要是巨噬细胞凋亡或自噬引起的,而是巨噬细胞游出斑块造成的^[26],故开发增强巨噬细胞迁移力,诱导其游出斑块的药物将是目前强效降胆固醇药的有效补充疗法,可起到进一步逆转斑块,减少斑块不稳定引发继发性病变的作用。

[参考文献]

- [1] Gui T, Shimokado A, Sun Y, et al. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery[J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 693083.
- [2] Andres V, Pello OM, Silvestre-Roig C. Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23: 429-438.
- [3] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2011, 145(3): 341-355.
- [4] 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 U S A*, 2004, 101:11 779-784.
- [5] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 2009; 597-598.
- [6] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 842-851.
- [7] Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice[J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(5): 1 687-699.
- [8] 吴甜, 郭韧, 张毕奎. CD40/CD40L 基因及其多态性与动脉粥样硬化的研究进展[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2012, 37(4): 413-418.
- [9] Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52: 410-428.
- [10] Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 1 624-630.
- [11] Feig JE, Vengrenyuk Y, Reiser V, et al. Regression of atherosclerosis is characterized by broad changes in the plaque macrophage transcriptome[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e39790.
- [12] 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 U S A*, 2006, 103: 3 781-786.
- [13] Luchtfeld M, Grothusen C, Gagalick A, et al. Chemokine receptor 7 knockout attenuates atherosclerotic plaque development[J]. *Circulation*, 2010, 122: 1 621-628.
- [14] Feig JE, Rong JX, Shamir R, et al. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells[J]. *PNAS*, 2011, 108: 7 166-171.
- [15] Schieffer B, Luchtfeld M. Emerging role of chemokine receptor 7 in atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(8): 211-216.
- [16] Feig JE, Shang Y, Rotllan N, et al. Statins promote the regression of atherosclerosis via activation of the CCR7-dependent emigration pathway in macrophages[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e28534.
- [17] Feig JE, Pineda-Torra I, Sanson M, et al. LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 4 415-424.
- [18] van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13: 136-143.
- [19] Wanschel A, Seibert T, Hewing B, et al. Neuroimmune guidance cue semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(5): 886-893.
- [20] Ramkhalawon B, Yang Y, van Gils JM, et al. Hypoxia induces Netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques mechanism for macrophage retention and survival[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 1 180-188.
- [21] 李震霄, 邹洪梅, 孟晓萍. 氧化应激促进动脉粥样硬化机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(8): 702-705.
- [22] 张志辉, 周胜华, 祁述善, 等. 氧化应激、炎症与冠心病患者冠状动脉斑块的关系[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2006, 31(4): 556-559.
- [23] Park YM, Febbraio M, Silverstein RL, et al. 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.
- [24] Aflaki E, Balenga NAB, Luschni-Schratl P, et al. Impaired Rho GTPase activation abrogates cell polarization and migration in macrophages with defective lipolysis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(23): 3 933-947.
- [25] 葛金文, 刘吉勇, 朱惠斌, 等. 阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔氧化应激/炎症反应的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(12): 979-983.
- [26] Williams KJ, Feig JE, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis insights from the clinical and experimental literature[J]. *Nat Clin Prac Cardiovasc Med*, 2008, 5: 91-102.

(此文编辑 许雪梅)