

仰明明,牛婷,刘擎,等. MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 14-20.

Yang MM, Niu T, Liu Q, et al. Matrix metalloproteinase-12 knockout regulates macrophages in the blood and white fat in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 14-20.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.03.003

# MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化

仰明明<sup>1</sup>, 牛婷<sup>1</sup>, 刘擎<sup>1</sup>, 张潇涵<sup>2</sup>, 蒋灵笔<sup>1</sup>, 李豪斌<sup>1</sup>, 王丽京<sup>1</sup>, 李江超<sup>1\*</sup>

(1. 广东药科大学基础学院血管生物学研究所, 广州 510006; 2. 广东省中医院珠海分院病理科, 广东珠海 519015)

**【摘要】** 目的 MMP12(matrix metalloproteinase-12) 又称巨噬细胞弹性蛋白酶, 几乎能分解各种细胞外基质成分和血管成分, 且和单核细胞募集有关。还发现 MMP12 参与肿瘤细胞的侵袭及转移, 此外, MMP12 还与脂肪组织密切相关。本研究旨在探讨 MMP12 敲除(MMP12<sup>-/-</sup>) 小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化。方法 利用 PCR 对 MMP12<sup>-/-</sup> 小鼠进行基因型鉴定。用同窝 MMP12<sup>+/+</sup> 雄性小鼠做对照, 检测两组小鼠的血常规并进行分析; 进一步利用流式细胞术检测巨噬细胞标记物, 了解巨噬细胞的变化; 最后, 利用免疫组化等方法来观察 MMP12 缺失后脂肪组织中巨噬细胞的变化。结果 (1) 鉴定 MMP12<sup>-/-</sup> 小鼠基因型并扩群; (2) 与同窝 MMP12<sup>+/+</sup> 雄性小鼠相比, MMP12<sup>-/-</sup> 雄性小鼠的红细胞计数、血红蛋白量、血小板计数、单核细胞数以及其百分数等参数均下降, 具有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 淋巴细胞百分数和嗜酸性细胞百分数, 显著上升 ( $P < 0.05$ ), 其绝对计数无统计学差异; (3) 流式结果提示: 巨噬细胞的特异标记物 CD11b 与 F4/80 双阳性细胞的比例在血液中显著下降, 其绝对计数也降低; (4) H&E 染色和免疫组化的结果显示: 与同窝 MMP12<sup>+/+</sup> 雄性小鼠相比, MMP12<sup>-/-</sup> 雄性小鼠的白色脂肪组织中的 CD68 表达明显提高。结论 提示巨噬细胞的变化可能与 MMP12 敲除有关。其意义在于发现 MMP12 可能调控了巨噬细胞的分化, 血液中巨噬细胞减少, 白色脂肪中的巨噬细胞增多。

**【关键词】** MMP12; 巨噬细胞; 基因工程小鼠; 白色脂肪

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 03-0014-07

## Matrix metalloproteinase-12 knockout regulates macrophages in the blood and white fat in mice

YANG Mingming<sup>1</sup>, NIU Ting<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>1</sup>, ZHANG Xiaohan<sup>2</sup>, JIANG Lingbi<sup>1</sup>,  
LI Haobin<sup>1</sup>, WANG Lijing<sup>1</sup>, LI Jiangchao<sup>1\*</sup>

(1. Vascular Biology Research Institute, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China. 2. Department of Pathology, Zhuhai Branch of Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Zhuhai 519015)

**【Abstract】 Objective** Matrix metalloproteinase-12 (MMP12) also known as macrophage elastase, is capable of decomposing almost all extracellular matrix components and is required for monocyte recruitment. MMP12 has been found to be involved in cancer invasion and metastasis. In addition, MMP12 is also closely related to adipose tissue. This study

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81773118, 81472336, 31471290); 广东省科技计划(2014A020212313, 2016KCXTD019)。

**【作者简介】** 仰明明(1993—), 男, 研究生, 专业: 病理学与病理生理学。E-mail: yangmingming34@163.com

**【通信作者】** 李江超(1976—), 男, 副研究员, 研究方向: 肿瘤微环境。E-mail: lijiaochao@gdpu.edu.cn

investigated whether MMP12 regulates the macrophages in blood and white fat in MMP12 knockout (MMP12<sup>-/-</sup>) mice.

**Methods** MMP12<sup>-/-</sup> mice were raised and genotyped, and littermate MMP12<sup>+/+</sup> male mice were used as controls. The routine blood indexes of the two groups of mice were analyzed, and the macrophage markers were detected by flow cytometry. Pathology using HE staining and immunohistochemistry was performed to determine the macrophages in adipose tissue after MMP12 deletion. **Results** (1) The genotype of MMP12<sup>-/-</sup> mice and expansion was identified. (2) Compared with those of littermate MMP12<sup>+/+</sup> male mice, parameters including RBC count, HGB level, PLT count, and monocyte count and percentage were significantly reduced in MMP12<sup>-/-</sup> male mice. However, the proportions of lymphocytes and eosinophils were significantly increased compared with those of control mice, but their absolute counts did not differ significantly. (3) Further result suggested that the proportion of macrophage-specific marker CD11b and F4/80 double positive cells was significantly decreased in the blood, and their absolute count was also reduced. (4) The pathology using HE staining and immunohistochemistry confirmed that macrophage (CD68<sup>+</sup>) expression was significantly increased in the white adipose tissue of MMP12<sup>-/-</sup> male mice. **Conclusions** These results suggest that macrophage changes may be related to MMP12 knockout. The significance is that MMP12 may regulate the development of macrophages, the macrophages are reduced in the blood and increased in white fat.

**[Keywords]** MMP12; macrophage; genetically engineered mouse; white fat

MMP12 (matrix metalloproteinase-12), 于 1975 年首次在小鼠腹腔的巨噬细胞培养基中发现<sup>[1]</sup>, 是 MMPs 家族的重要成员, 是一种广泛底物酶。MMP12 也称为巨噬细胞弹性蛋白酶 (macrophage elastase), 是主要通过巨噬细胞、单核细胞等炎性细胞主动分泌的一种内切蛋白酶, 几乎能分解全部细胞外基质成分和血管成分, 尤其对富含弹性纤维的血管、肺等组织作用明显, 并且是单核细胞募集所必需的<sup>[2-3]</sup>。最早关于 MMP12 基因敲除小鼠的报道发现巨噬细胞 MMP12 敲除后降解细胞外基质的能力明显减弱<sup>[4]</sup>。这种基因工程小鼠可用于免疫学、自身免疫研究、炎症和代谢组学研究及酶缺乏症等表型研究。同时来自 MMP12<sup>-/-</sup> 小鼠的巨噬细胞或骨髓细胞显示异常生理功能<sup>[3, 5-6]</sup>。

巨噬细胞 (macrophage) 属于单个核吞噬系统 (mononuclear phagocyte system) 中的一类细胞, 由于其功能的异质性, 在器官发育、清除病原体、介导炎症反应、组织重塑和修复中均发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。不同组织的微环境对其增殖、分化、激活和极化产生不同影响, 使其呈现出不同表型, 发挥不同生物学功能<sup>[8]</sup>。巨噬细胞一般可分为经典活化的 M1 型巨噬细胞和旁路活化的 M2 型巨噬细胞<sup>[9]</sup>。M1 型巨噬细胞能够帮助宿主抵御病毒和微生物的感染, 抑制肿瘤, 产生多种炎症因子, 从而激活免疫反应; M2 型巨噬细胞能够促进细胞碎片的清除、血管生成、基质重塑, 损伤组织的修复<sup>[10]</sup>, 在肿瘤组织中利于肿瘤的生长<sup>[11]</sup>。

传统观点认为巨噬细胞由成体骨髓单核细胞分化而来的, 即骨髓中的造血干细胞分化为单核细

胞, 巨噬细胞再从单核细胞分化而来。此外, 巨噬细胞还可能来源于卵黄囊和胎肝单核细胞<sup>[12]</sup>, 且这些来源的巨噬细胞在出生前已存在组织中, 然而不同组织中巨噬细胞确切的来源目前尚不明确<sup>[13]</sup>。

目前, 已知 MMP12 主要是由巨噬细胞主动分泌的一种内切蛋白酶, 但小鼠缺失 MMP12 后, 血液以及白色脂肪中巨噬细胞的具体影响尚不明确。最近一些文献报告显示: 在吸烟患者中, 巨噬细胞弹性蛋白酶 (MMP12) 能够抑制白色脂肪组织扩张<sup>[14]</sup>。并且 Heinecke 等人发现, MMP12 缺失在一定条件下能改变巨噬细胞的浸润与极化。如: 在高脂喂养的小鼠中敲除 MMP12 有助于巨噬细胞向 M2 型分化<sup>[15]</sup>。

本研究对 MMP12 基因缺失小鼠的血常规及巨噬细胞进行了初步分析, 发现 MMP12 能影响血液细胞的发育或分化: 与 MMP12<sup>+/+</sup> 小鼠相比, MMP12<sup>-/-</sup> 小鼠血液中的巨噬细胞显著下降, 但脂肪组织中 CD68 表达明显增加。结果初步表明 MMP12 可以改变外周血以及白色脂肪中的巨噬细胞。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

B6.129X-Mmp12<sup>tm1.1Sds</sup>/J 基因小鼠, 背景是 C57BL/6 J 小鼠, 编号: 004855, 购自美国 Jackson 实验室; C57BL/6 J 小鼠购自广东省医学实验动物中心 [SCXK (粤) 2013 - 0002]。实验动物均在 SPF 级的环境中饲养 [SYXK (粤) 2017-0125], 饲养相对温度维持 22℃ ~ 28℃, 相对湿度维持 40% ~

60%,每天昼夜明暗交替为 12 h/12 h,并每天晚上 8:00 ~ 10:00 为紫外灯照射杀菌时间。本研究中小鼠相关实验获得广东药科大学动物伦理委员会的批准许可,动物福利伦理批准号为:gdpulac2017006,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

## 1.2 主要试剂与仪器

PCR 引物购自上海生工生物有限公司;流式细胞术检测抗体:CD45-precip5.5 (B218549)、CD11b-FITC (B22-4362)、F4/80-Bv421 (B242663),购自 Biolegend 公司;免疫组化检测抗体 CD68 (BA3638),购自 BOSTER 公司;DAB 显色试剂盒,货号:8059S,购自 Cell Signaling Technology 公司;红细胞裂解液,货号:GAS-010,购于 Life Technologies 公司;琼脂糖粉购于西班牙 Biowest 公司;牛血清白蛋白(BSA)购自上海生工。

苏木素和伊红购于北京世济合力生物科技有限公司;中性树胶,购于广州市秀威贸易有限公司;柠檬酸、柠檬酸三钠购于天津大茂化学试剂厂;无水乙醇、甲醇、二甲苯、氯化钠、氯化钾、30%过氧化氢等购于广州化学试剂厂;包埋盒、载玻片、盖玻片均购于江苏世泰实验器材有限公司;EDTA·K2抗凝管采集血样,进行血常规,流式采血使用 ACD 抗凝 (Sigma)。

独立送回风净化笼具(苏杭实验动物设备厂);PCR 仪(美国应用生物系统公司),PCR Mix 购自美国 Thermo Fisher 公司;利用全自动五分类血液分析仪进行检测分析,其型号 XT-2000i,SYSMEX 日本;检测时,设置小鼠血样程序进行检测。流式细胞仪型号为:BD FACSCantoTM II。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 MMP12 基因的鉴定 PCR 方法

MMP12 小鼠基因鉴定:野生型条带:引物 1:5'-GCTAGAAGCAACTGGGCAAC-3',引物 3:5'-ACATCCTCACGCTTCATGTC-3',扩增条带为 1064 bp。MMP12<sup>-/-</sup>突变条带:引物 3:5'-CACGAGACTAGTGAGACGTG-3',引物 4:5'-ACATCCTCACGCTTCATGTC-3',扩增条带为 1400 bp。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s,58℃ 50 s,72℃ 1 min;循环 38 次;72℃ 延伸 10 min,4℃ 冷却扩增产物。引物 3 和引物 4 是鉴定突变型条带,扩增条带为 1400 bp,引物 1 和引物 2 是鉴定野生型条带,扩增条带为 1064 bp。在配置好的 1.2% 琼脂糖凝胶中,利用

TAE 电泳缓冲液进行电泳。设定条件:150 V,20 min。再将凝胶放置在凝胶成像系统里,电脑成像系统里观察 PCR 的电泳结果<sup>[16]</sup>。

### 1.3.2 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠血常规检测

取 24 周龄的 MMP12<sup>-/-</sup>雄性小鼠和 MMP12<sup>+/+</sup>雄性小鼠(体重 30 ~ 35 g)各 6 只。麻醉约 1 min,眼眶取血 200 μL 到 1 mL 的 EDTA·K2 抗凝管中待测,使用 XT-2000i 血细胞分析仪(Sysmex)进行血细胞的分类计数分析,在广东动物监测所进行检测。注意上机前 4℃ 放置。

### 1.3.3 病理学研究

小鼠颈椎脱臼处死,取小鼠的白色脂肪。10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,镜检。免疫组化:一抗为兔多克隆抗体 CD68 (Boster,BA3638),1:100,4℃ 过夜孵育;二抗为过氧化辣根酶标记山羊抗兔 IgG,1:100,37℃ 1 h,DAB 显色 2 min,苏木精复染 20 s。

### 1.3.4 流式细胞术检测

小鼠麻醉后眼眶取血,收集新鲜血液置抗凝管中。从血液样本中,各取 100 μL 血浆原液加入标记好的流式管中,然后分别加入流式荧光抗体 CD45-precip5.5、CD11b-FITC、F4/80-Bv421 震荡混匀,室温下,避光孵育 30 min。最后加入 1 mL 1% 预冷的多聚甲醛液固定混匀,2~8℃ 避光保存。在 24 h 之内进行全血法流式细胞术检测分析,在进行分析前,以白细胞中的单核细胞进行巨噬细胞的设区域设门,检测标本阳性率和荧光强度<sup>[17]</sup>。

## 1.4 统计学方法

实验涉及的数据统计方法:采用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用 Gradprim 5.0 软件,采用 *t* 检验,以 \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 以及 \*\*\**P*<0.001 为具有统计学意义。

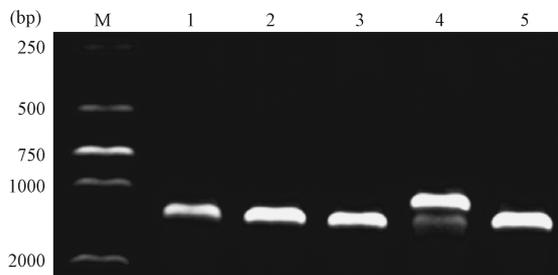
## 2 结果

### 2.1 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠的鉴定

将 MMP12<sup>+/+</sup>雄鼠和 MMP12<sup>-/-</sup>雌鼠杂交,获得的子代有三种情况 MMP12<sup>+/+</sup>、MMP12<sup>+/-</sup> 和 MMP12<sup>-/-</sup>,经鉴定后得到实验鼠突变型小鼠 MMP12<sup>-/-</sup> 有一条条带,为 1400 bp;野生型小鼠 MMP12<sup>+/+</sup> 为 1064 bp 一条条带;两条条带都为杂合子小鼠 MMP12<sup>+/-</sup>,结果如图 1。

### 2.2 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠的血常规检测

血常规检测结果显示,白细胞计数、中性粒细



注: M: DNA marker2000; 阳性 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠为 1#、2#、3#、5#, 杂合子 MMP12<sup>+/-</sup>小鼠为 4#。

图 1 MMP12 基因 PCR 鉴定图

Note. M: DNA marker2000; positive mice MMP12<sup>-/-</sup> are 1#, 2#, 3#, 5# mice, and heterozygous MMP12<sup>+/-</sup> mice are 4#.

Figure 1 PCR identification of MMP12 gene

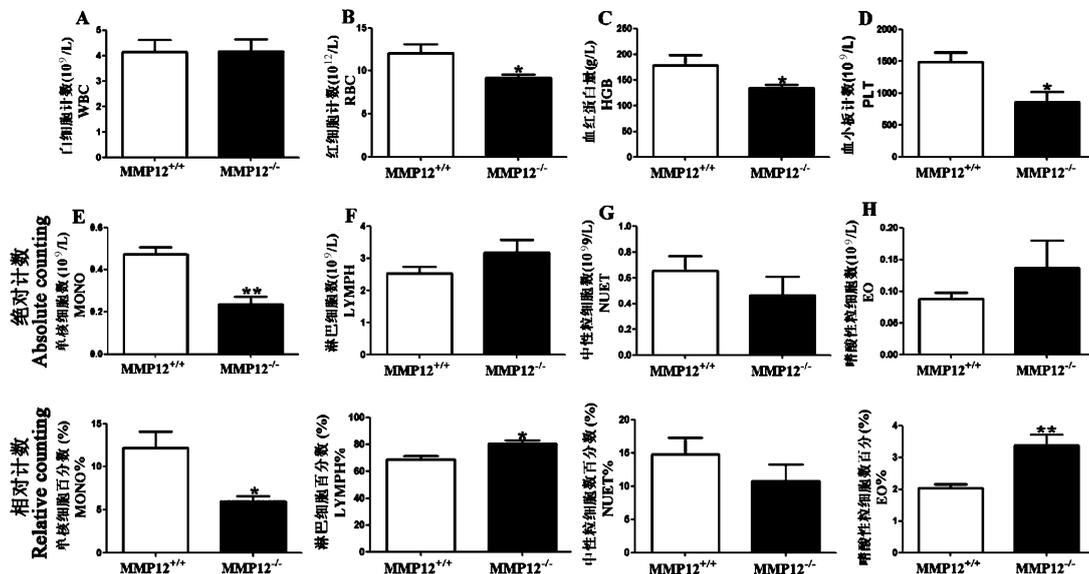
胞数以及百分数无显著差异(图 2A 以及 2G)。但 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠的红细胞计数、血红蛋白量、血小板计数、单核细胞数以及其百分数与 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠相比,均有下降趋势且具有显著性差异(\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, 图 2B、2C、2D 以及 2E)。淋巴细胞数和嗜酸性细胞数变化不大。但其百分数与 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠相比,显著性上升(\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, 图 2F 与 2H)。

### 2.3 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠外周血中的巨噬细胞下调

由上述血常规检测结果可知,与同周龄的 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠相比, MMP12<sup>-/-</sup>小鼠的单核细胞数以及其百分数,均有降低趋势且具有显著差异。证明 MMP12 能影响单核细胞的分化,而巨噬细胞由单核细胞分化而来,所以我们假设 MMP12 影响单核细胞的分化而导致巨噬细胞的改变<sup>[18]</sup>。为了进一步验证该假设,我们采用全血法流式细胞术检测巨噬细胞。因为 CD11b 与 F4/80 是巨噬细胞表面特异性的标记,可利用二者双阳性的细胞来识别和判断巨噬细胞的变化。所以,我们利用流式细胞术检测白细胞内 CD11b 与 F4/80 双阳性细胞来确定巨噬细胞的变化。简单来说,将白细胞中单核细胞群进行设区域设门再进行分析(图 3A)。检测结果显示:与 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠相比,实验组 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠白细胞中 CD11b 与 F4/80 双阳性细胞百分比明显下降(图 3B 与 3C),且有显著性差异(\**P*<0.05, 图 3D)。

### 2.4 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠脂肪组织中的巨噬细胞增多

小鼠颈椎脱臼处死,取小鼠的腹部白色脂肪。4%中性甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,免

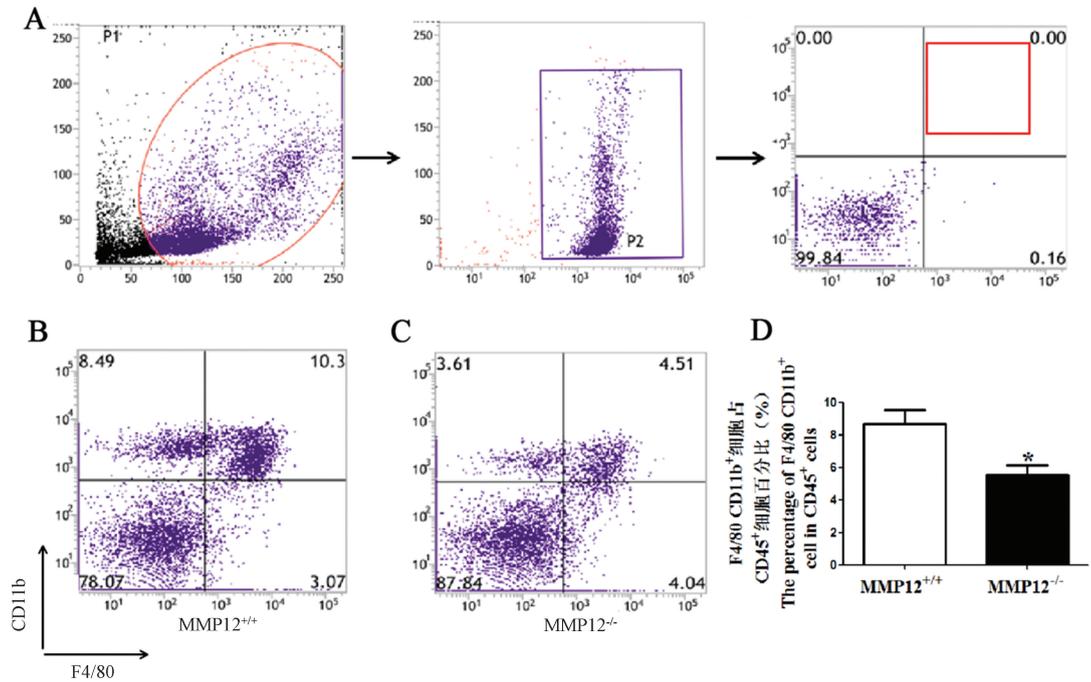


注:A: 白细胞总数计数; B: 红细胞计数; C: 血红蛋白量; D: 血小板计数; E: 单核细胞数(上), 百分数(下); F: 淋巴细胞数(上), 百分数(下); G: 中性粒细胞数(上), 百分数(下); H: 嗜酸性粒细胞数(上), 百分数(下)。\* *P*<0.05; \*\* *P*<0.01; \*\*\* *P*<0.001。

图 2 血常规中的各项指标

Note. A: White blood cell count. B: Red blood cell count. C: Hemoglobin amount. D: Platelet count. E: Monocyte count (top) and percentage (bottom). F: Lymphocyte number (top) and percentage (bottom). G: Neutrophil number (top) and percentage (bottom). H: Eosinophil count (top) and percentage (bottom). \* *P*<0.05; \*\* *P*<0.01; \*\*\* *P*<0.001.

Figure 2 Routine blood examination indicators



注:A:血液巨噬细胞设门分析示意图;B:对照小鼠血液中的 CD11b 与 F4/80 双阳性细胞百分比流式代表图;C: MMP12<sup>-/-</sup>小鼠血液中的 CD11b 与 F4/80 双阳性细胞百分比代表图;D:两组小鼠血液中巨噬细胞百分比统计图,即 CD11b 与 F4/80 双阳性细胞的变化,\* $P < 0.05$ 。

图 3 MMP12<sup>-/-</sup>与对照小鼠外周血中巨噬细胞流式检测图

Note. A: Schematic diagram of blood macrophage gating analysis. B: The percentage of CD11b and F4/80 double-positive cells in the control mouse blood. C: The percentage of CD11b and F4/80 double-positive cells in MMP12<sup>-/-</sup> mouse blood. D: Statistical analysis of the percentage of macrophages in the blood of the two groups of mice, reflecting the changes in CD11b and F4/80 double-positive cells, \* $P < 0.05$ .

Figure 3 Flow cytometry of macrophages in peripheral blood of the MMP12<sup>-/-</sup> and control mice

疫组化染 CD68。镜检可得,24 周的 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠单个白色脂肪细胞面积远大于 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠,且有显著性差异(\*\* $P < 0.001$ )。与 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠相比,24 周的 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠的白色脂肪组织中大量 CD68 表达,对巨噬细胞的数量进行统计,且有显著性差异(\*\* $P < 0.01$ ),结果如图 4。

## 2.5 MMP12 敲除对巨噬细胞的影响

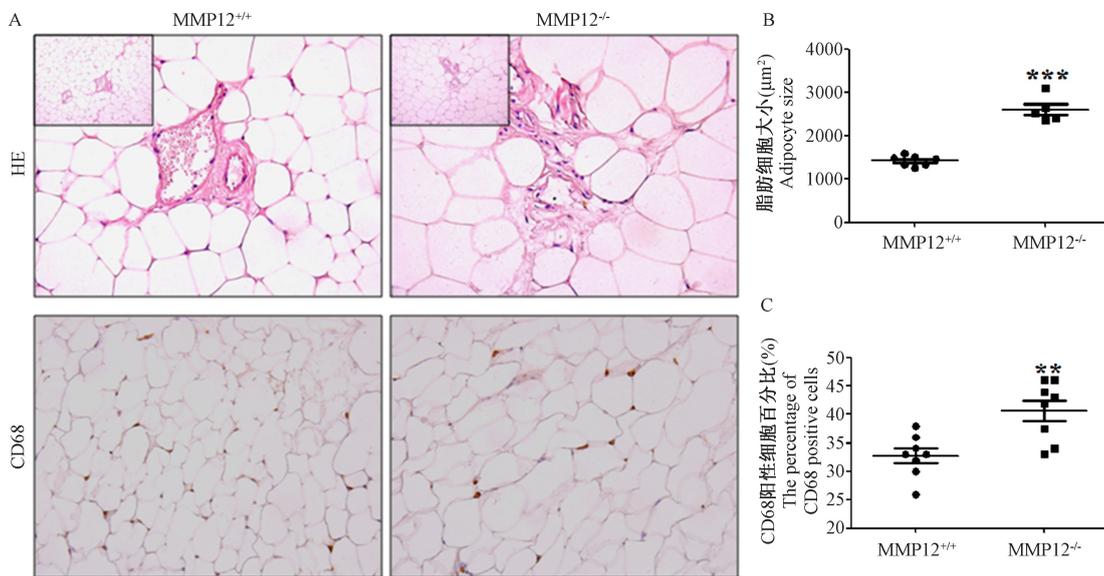
上述结果提示巨噬细胞的变化可能与 MMP12 敲除有关。结果是 MMP12 敲除导致血液中单核细胞和巨噬细胞减少,白色脂肪中的巨噬细胞增多,图 5 为其总结图。

## 3 讨论

MMP12 主要由巨噬细胞、单核细胞等炎性细胞分泌的一种内切蛋白酶,几乎能分解全部细胞外基质成分和血管成分。本研究利用 MMP12 敲除小鼠,检测小鼠血液的血常规,流式检测其巨噬细胞

的标记物。结果发现与正常小鼠相比,单核细胞和巨噬细胞数目及其百分数血液内含量降低,但是腹下白色脂肪内的巨噬细胞含量增多。提示 MMP12 敲除会引起血液内巨噬细胞数量变化和巨噬细胞在脂肪组织内的分布。

MMP12 缺失小鼠血液内单核细胞的数量减少,巨噬细胞大部分属于单核细胞来源,所以我们进一步利用流式细胞仪检测巨噬细胞变化。在本次实验中,我们对 24 周 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠和 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠进行检测,没有考虑其他时间点小鼠单核和巨噬细胞的变化,假设 MMP12 影响了血液细胞的发育,那么其他时间点我们认为是一致的,但是在本研究我们没有检测。在流式实验设门时,以白细胞中的单核细胞进行设区域设门,选取巨噬细胞表面特异性标记物 CD11b 与 F4/80 双阳性的细胞认为是巨噬细胞。研究结果显示:与 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠对比,MMP12<sup>-/-</sup>小鼠白细胞中 CD11b 与 F4/80 双阳性细

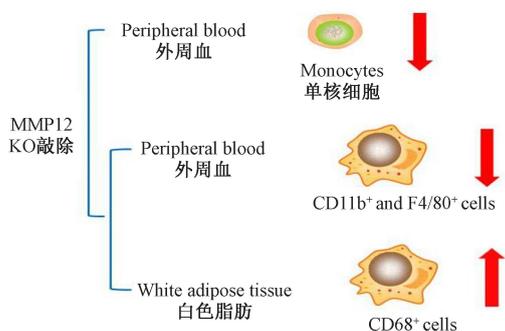


注:A: MMP12<sup>-/-</sup>与对照小鼠脂肪组织的 HE 和 IHC-CD68 染色;B: MMP12<sup>-/-</sup>与对照小鼠脂肪细胞的大小, \*\*\*  $P < 0.001$ ;C: MMP12<sup>-/-</sup>与对照小鼠脂肪组织中巨噬细胞表达量, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 MMP12<sup>-/-</sup>与对照小鼠脂肪组织的 HE 和 IHC 染色(× 40)

Note. A: MMP12<sup>-/-</sup> and control mouse adipose tissue subjected to HE and IHC-CD68 staining. B: MMP12<sup>-/-</sup> and control mouse fat cell size, \*\*\*  $P < 0.001$ . C: The level of macrophages in adipose tissue of MMP12<sup>-/-</sup> and control mice, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 4 Histology of MMP12<sup>-/-</sup> and control mouse adipose tissues. HE and IHC staining



注:箭头代表此细胞上升或下降趋势。

图 5 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠巨噬细胞检测总结

Note. The arrow represents the rising or falling trend in the level of these cells.

Figure 5 Summary of MMP12<sup>-/-</sup> mouse macrophage detection

胞百分比有明显下降趋势,且有显著性差异,与上述结果 MMP12 敲除小鼠的血液单核细胞下降趋势是一致的。这提示 MMP12 可以通过影响单核细胞的分化来改变巨噬细胞。

近年来,越来越多的证据表明:MMP12 与脂代谢有关<sup>[19]</sup>。Heinecke 等人<sup>[15]</sup>已经发现 MMP12 缺失将促进脂肪组织的扩增和提高胰岛素的敏感性,且在高脂喂养的条件下,敲除 MMP12 将导致小鼠的体重和体脂的增加。但 MMP12 敲除小鼠白色脂

肪中巨噬细胞变化尚不清楚,在本研究中,我们取 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠和 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠白色脂肪 HE 染色,免疫组化染 CD68。镜检可得,24 周的 MMP12<sup>-/-</sup>小鼠单个白色脂肪细胞面积远大于 MMP12<sup>+/+</sup>小鼠,且白色脂肪组织中 CD68 大量表达。不足之处在于,我们没有对高脂情况下脂肪组织中 CD68 表达进行检测,但是国外研究也已经证实高脂条件下饲养的 MMP12 敲除小鼠脂肪内巨噬细胞的确是增多。

MMP12 缺失可以减少外周血中的巨噬细胞数,增加白色脂肪中的巨噬细胞数量。目前,我们没有检测血液和脂肪中巨噬细胞各个亚型是如何变化的,只证明 MMP12 通过影响单核细胞的分化而改变巨噬细胞。然而,这一过程是如何引起变化的,其分子机制仍有待深入研究。

总之,我们发现巨噬细胞的变化可能与 MMP12 敲除有关,其意义在于发现了 MMP12 敲除可下调外周血中巨噬细胞数量及上调白色脂肪中巨噬细胞数量。这对于深入研究 MMP12 调控巨噬细胞变化机制有一定的意义<sup>[20]</sup>。

参考文献:

[ 1 ] Rodriguez-Pla A, Martinez-Murillo F, Savino P. J, et al. MMP-12, a novel matrix metalloproteinase associated with giant cell arteritis [ J ]. Rheumatology ( Oxford ), 2009, 48 ( 11 ): 1460

- 1461.
- [ 2 ] Liu M, Sun H, Wang X, et al. Association of increased expression of macrophage elastase ( matrix metalloproteinase 12 ) with rheumatoid arthritis [ J ]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50( 10 ) : 3112-3117.
- [ 3 ] Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice [ J ]. *Science*, 1997, 277( 5334 ) : 2002-2004.
- [ 4 ] England KA, Price AP, Tram KV, et al. Evidence for early fibrosis and increased airway resistance in bone marrow transplant recipient mice deficient in MMP12 [ J ]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301( 4 ) : L519-526.
- [ 5 ] Houghton AM, Grisolan JL, Baumann ML, et al. Macrophage elastase ( matrix metalloproteinase-12 ) suppresses growth of lung metastases [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 12 ) : 6149-6155.
- [ 6 ] Wang X, Liang J, Koike T, et al. Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits [ J ]. *Am J Pathol*, 2004, 165( 4 ) : 1375-1383.
- [ 7 ] Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation [ J ]. *Front Immunol*, 2014, 5:514.
- [ 8 ] Gordon S, Pluddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions [ J ]. *Immunol Rev*, 2014, 262( 1 ) : 36-55.
- [ 9 ] Den Breems N Y, Eftimie R. The re-polarisation of M2 and M1 macrophages and its role on cancer outcomes [ J ]. *J Theor Biol*, 2016, 390:23-39.
- [ 10 ] Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage [ J ]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13:e23.
- [ 11 ] Yeung OW, Lo CM, Ling CC, et al. Alternatively activated ( M2 ) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma [ J ]. *J Hepatol*, 2015, 62( 3 ) : 607-616.
- [ 12 ] Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K. Most tissue-resident macrophages except microglia are derived from fetal hematopoietic stem cells [ J ]. *Immunity*, 2015, 43( 2 ) : 382-393.
- [ 13 ] Munro DAD, Hughes J. The origins and functions of tissue-resident macrophages in kidney development [ J ]. *Front Physiol*, 2017, 8:837.
- [ 14 ] Tsuji T, Kelly NJ, Takahashi S, et al. Macrophage elastase suppresses white adipose tissue expansion with cigarette smoking [ J ]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 51( 6 ) : 822-829.
- [ 15 ] Lee JT, Pamir N, Liu NC, et al. Macrophage metalloelastase ( MMP12 ) regulates adipose tissue expansion, insulin sensitivity, and expression of inducible nitric oxide synthase [ J ]. *Endocrinology*, 2014, 155( 9 ) : 3409-3420.
- [ 16 ] Li J, Zhang X, Liu Q, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate among myeloid cells contributing to tumor growth in matrix metalloproteinase 12 knockout mice [ J ]. *Cell Immunol*, 2018, 327:1-12.
- [ 17 ] Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes [ J ]. *Diabetes*, 2008, 57( 12 ) : 3239-3246.
- [ 18 ] Nesbit M, Schaidt H, Miller TH, et al. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells [ J ]. *J Immunol*, 2001, 166( 11 ) : 6483-6490.
- [ 19 ] Bauters D, Van Hul M, Lijnen HR. Macrophage elastase ( MMP-12 ) in expanding murine adipose tissue [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830( 4 ) : 2954-2959.
- [ 20 ] Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages [ J ]. *Front Immunol*, 2015, 6:212.

[ 收稿日期 ] 2018-11-07