

张立魁,杨灵波,王学宁. 主动脉夹层中巨噬细胞表型变化研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 62-70.  
Zhang LK, Yang LB, Wang XN. Phenotypic changes of macrophages in aortic dissection [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 62-70.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.009

## 主动脉夹层中巨噬细胞表型变化研究

张立魁,杨灵波,王学宁\*

(山西白求恩医院,太原 030032)

**【摘要】** 目的 探讨  $\beta$ -氨基丙腈( $\beta$ -aminopropionitrile, BAPN)联合血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导主动脉夹层小鼠主动脉中的巨噬细胞表型变化的情况。方法 通过主动脉夹层相关的转录组芯片,寻找相关的核心基因及相关的生物学功能及信号通路情况;进一步利用 CIBERSORT 分析主动脉中各型细胞的比例;将清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,随机分为 BAPN 腹腔注射组,Ang II 腹腔注射组,BAPN 和 Ang II 联合注射组,生理盐水腹腔注射组,每组 10 只。BAPN 注射剂量:100 mg/(kg·d),Ang II 注射剂量:4 mg/(kg·d),BAPN 和 Ang II 联合剂量为 100 mg/(kg·d) 和 4 mg/(kg·d)。每日按实验方法对不同组别小鼠给予药物处理,给药 2 周,构建小鼠主动脉夹层模型;随后利用免疫荧光、蛋白质免疫印迹和酶联免疫吸附实验研究主动脉夹层中 M1 和 M2 型巨噬细胞的表型变化。结果 通过分析 GSE147026 发现主动脉夹层相关的差异基因共 930 个,生物学功能主要涉及白细胞与细胞的粘附、细胞外结构组织、巨噬细胞激活、细胞外基质组织、白细胞迁移;分子功能主要集中在膜微区、膜筏、粘着斑、细胞-底物结、胶原蛋白细胞外基质;生物学过程主要集中在整合蛋白结合、Toll 样受体结合、清道夫受体活性、受体活性、细胞外基质结构成分等。使用 CIBERSORT 分析显示,幼稚 B 细胞、M1 巨噬细胞在主动脉夹层组织中表现出更高的浸润水平,活化 NK 细胞在正常主动脉组织表现出更高的浸润水平,M0 和 M2 巨噬细胞在主动脉夹层组织中表现出较高的浸润水平,但差异无统计学意义,余其他细胞类型在正常主动脉和主动脉夹层组织中并没有显著差异。iNOS、CD206、IL-6 和 IL-10 蛋白表达相较于正常组而言,在 BAPN+Ang II 组最高,BAPN 次之,Ang II 最少。结论 主动脉夹层小鼠主动脉组织中均有 M1 型和 M2 型巨噬细胞的蓄积,其中 BAPN+Ang II 组蓄积量最多,BAPN 次之,Ang II 最少。

**【关键词】** 主动脉夹层;生物信息学;巨噬细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0062-09

## Phenotypic changes of macrophages in aortic dissection

ZHANG Likui, YANG Lingbo, WANG Xuening\*  
(Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan 030032, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of BAPN combined with AngII (BAPN + Ang II) on the phenotypic changes of macrophages in the aorta of mice with aortic dissection. **Methods** Searching for relevant core genes and related biological functions and signaling pathway profiles through transcriptome microarrays related to aortic dissection. We then applied CIBERSORT to analyze the proportion of various types of cells in the aorta. Last, we conducted immunofluorescence, Western blot, and enzyme-linked immunosorbent assays to study the phenotypic changes of M1 and M2 macrophages in aortic dissection. **Results** GSE147026 found a total of 930 differential genes related to aortic dissection. The biological functions of these genes involve mainly the adhesion of leukocytes to cells, extracellular structure organization, macrophage activation, extracellular matrix organization, and leukocyte migration. Their molecular functions

**【基金项目】** 山西省应用基础研究项目面上自然基金项目(201701D121152);山西省留学人员科技活动项目(2019-29)。

**【作者简介】** 张立魁(1989—)男,硕士研究生,研究方向:小鼠主动脉夹层模型构建及机制研究。E-mail: sxddyxwzk@163.com

**【通信作者】** 王学宁(1977—)男,硕士生导师,研究方向:动脉粥样硬化、主动脉及外周血管病变。E-mail: wangxuening\_2004@126.com

are concentrated mainly in the membrane; microdomains, membrane rafts, adhesion spots, cell-substrate junctions, and collagen extracellular matrix, and their biological processes focus mainly on integrin binding, Toll-like receptor binding, scavenger receptor activity, receptor activity, and extracellular matrix structure components. The CIBERSORT analysis revealed that naive B cells and M1 macrophages exhibited higher infiltration levels in aortic dissection tissues, activated NK cells displayed higher infiltration levels in normal aortic tissues, and M0 and M2 had higher infiltration levels in aortic dissection tissues; however, these differences did not reach statistical significance. No other cell types presented a significantly different level of abundance between normal aorta and aortic dissection. Compared with the normal group, the protein expression levels of iNOS, CD206, IL-6 and IL-10 were the highest in the BAPN+Ang II group, followed by the BAPN group, with the Ang II group having the lowest levels. **Conclusions** Both M1 and M2 macrophages accumulate in the aorta of aortic dissection mice; their relative accumulation levels in our groups were as follows: Among them, the BAPN + AngII group had the largest accumulation, followed by BAPN and the least AngII.

**【Keywords】** aortic dissection; bioinformatics; macrophages

主动脉夹层(aortic dissection, AD)是指由于各种原因引起血管内皮的损伤,血液经损伤内膜进入中膜,导致主动脉壁层的分离并随后形成有或没有连通的真腔和假腔的一类疾病<sup>[1]</sup>。据统计急性主动脉夹层的发生率估计为 2.6~3.5/100000,起病急骤,死亡率高,21%的患者在入院前死亡,68.2%在入院 48 h 内死亡,1 周内病死率高达 90%<sup>[2-3]</sup>。虽然我国目前尚未有 AD 的流行病学数据,从既往研究报告推断,AD 发生率呈逐年上升趋势。除了由遗传突变引起的家族性疾病(马凡氏综合症和 Loeys-Dietz 综合症)外<sup>[4]</sup>,AD 发作之前的情况,或者 AD 发作之后的急性或慢性期,分子发病机理在很大程度上是未知的。关于 AD 相关的诊断和治疗干预方法的病理生理,正在研究中。

一项基于人类 AD 组织中 3000 多个基因 cDNA 微阵列数据显示,炎症反应,细胞外基质代谢,增殖反应和蛋白质合成的基因在 AD 发生发展中发生了变化<sup>[5]</sup>。另外更全面的生物信息学分析显示,AD 疾病发生的信号调节网络中,Janus kinase-2(JAK2)处在核心位置<sup>[6]</sup>。动物实验揭示了巨噬细胞和成纤维细胞可通过白介素 6(interleukin-6, IL-6)和单核细胞/巨噬细胞趋化因子 MCP-1 等促炎细胞因子产生炎症反应参与 AD 的发病机制<sup>[7]</sup>。在 AD 的不同阶段之间,巨噬细胞的浸润活性和位置是不同的。总的来说,巨噬细胞首先在主动脉外膜中积聚并浸润介质,在亚急性和早期组织阶段,巨噬细胞主要集中在外周脂肪组织中;在急性期巨噬细胞(CD68<sup>+</sup>)集中在血肿中,内膜和中层邻近血肿<sup>[8]</sup>。除此之外,巨噬细胞除驱动主动脉的病理性破裂之外,也参与 AD 中发生的组织修复过程<sup>[9]</sup>。因此,鉴定对 AD 的发病机理和修复有贡献的特定巨噬细胞群对于研究 AD 发生发展至关重要。

该研究通过分析 AD 相关的转录组数据,探索 AD 相关的细胞群体变化,同时分析 AD 相关差异基因所执行的生物学功能和信号通路。在此基础上,我们利用 Ang II 和 BAPN 构建的 AD 小鼠模型,探索巨噬细胞分型在 AD 发生中的具体变化,为研究巨噬细胞在 AD 扮演的角色提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只购自山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2019-0004],动物饲养于山西医科大学实验动物中心[SYXK(晋)2019-0007],体重(19.5±0.42)g,鼠龄 6~8 周。实验动物使用、操作许可由山西白求恩医院(山西医学科学院)实验动物伦理委员会批准通过(SBQDL-2021-002),动物护理和本研究的所有实验都遵循国家实验室动物中心和山西白求恩医院(山西医学科学院)实验动物中心的指导方针,并按实验动物使用的 3R 原则,尽量动物替代、减少动物用量、降低动物痛苦伤害,给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

苏木素(G1120,索莱宝 中国);伊红(G1120,索莱宝 中国);OCT 冰冻切片包埋剂胶(4583,索莱宝 中国);0.1% Triton X-100(T8200,索莱宝 中国);5%山羊血清(SL038,索莱宝 中国);CD68(1:250, abcam, ab216526),iNOS(1:250, abcam, ab178945),CD206(1:250, abcam, ab64693);羊抗小鼠 FITC(1:500, SF132, 索莱宝 中国);羊抗兔 RBITC(1:500, SR134, 索莱宝 中国);DAPI(C0065, 索莱宝 中国);RIPA 裂解液(P0013B, 碧云天 中国);BCA 试剂盒(23225, 赛默飞 美国);TGX Stain-Free™ 预制胶(5678081, 伯乐 美国);CD68(1:1000, ab216526

abcam England); iNOS (1 : 1000, ab178945 abcam England); CD206 (1 : 1000, ab64693 abcam England); 羊抗小鼠 (1 : 10000, SE132, 索莱宝 中国); 羊抗兔 HRP (1 : 10000, SE134, 索莱宝 中国); 增强的化学发光检测试剂盒 (PE0010, 索莱宝 中国); IL-6 (E-EL-M2453c, 伊莱瑞特 中国); IL-10 (E-EL-M0046c, 伊莱瑞特 中国)。显微成像系统 (Scope A1, 蔡司 德国); 凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad 美国); 酶标仪 (Elx808, 伯腾 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 AD 相关的转录组数据

本研究从 NCBI 公共基因组学数据库 Gene Expression Omnibus (GEO) 下载 AD 相关的 mRNA 转录组数据集, 检索词为: aortic Dissection, expression profiling by array, homo sapiens, 截止时间为 2021. 04. 15。

#### 1.3.2 差异基因分析及相关生物学功能和信号通路注释

研究使用 R 4.0.2 edgeR 包, 利用经验贝叶斯方法用于对 mRNA 转录组数据集进行归一化处理, 当  $\log |FC| \geq 1$  和  $P < 0.05$ , 认为基因为 AD 相关差异基因。之后, 采用 R 4.0.2 clusterProfiler 包, 对差异基因进行生物学功能注释 (gene ontology, GO) 和信号通路注释 (kyoto encyclopedia of genes, KEGG)。

#### 1.3.3 AD 血管内环境细胞分析

CIBERSORT 是一种分析工具, 具有 547 个标记基因的基因表达矩阵, 基于反卷积算法, 可以用于量化 mRNA 转录组数据集的免疫细胞组成部分<sup>[10]</sup>。研究从 CIBERSORT 网站 (<http://cibersort.stanford.edu/>) 下载带注释的基因矩阵 LM22, 可定义 22 种免疫细胞亚型, 包括 7 种 T 细胞、幼稚 B 细胞、记忆 B 细胞、浆细胞、静息 NK 细胞、活化的 NK 细胞、单核细胞、M0、M1、M2 巨噬细胞、静息的树突状细胞、活化的树突状细胞、静息的肥大细胞、活化的肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞。使用 R. 4.0.2 CIBERSORT 包分析来自 TCGA 和 GEO 队列的 AD 血管内环境的免疫细胞组分。

#### 1.3.4 AD 动物模型造模

清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只。将小鼠随机分为 BAPN 腹腔注射组, Ang II 腹腔注射组, BAPN 和 Ang II 联合注射组, 生理盐水腹腔注射组, 每组

10 只。BAPN 注射剂量: 100 mg/(kg · d), Ang II 注射剂量: 4 mg/(kg · d), BAPN 和 Ang II 联合剂量为 100 mg/(kg · d) 和 4 mg/(kg · d)。每日按实验方法对不同组别小鼠给予药物处理, 给药 2 周, 每 8 h 观察 1 次小鼠, 每 2 d 记录 1 次体重, 直至实验结束。待实验结束后, 使用戊巴比妥钠静脉麻醉小鼠后, 取静脉血, 离心后, 冻存至 -80℃ 冰箱。随后颈椎脱臼法处死小鼠, 体视显微镜下分离主动脉, 从主动脉根部剥离动脉至髂动脉分支处, 小心去除动脉外膜的疏松结缔组织, 观察夹层形成情况, 随后一部分用 4% 甲醛固定, 另一部分冻存至 -80℃ 冰箱。

#### 1.3.5 苏木精 - 伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE)

4% 多聚甲醛灌注固定主动脉组织, 石蜡包埋。切成 5 μm 厚度的切片。切片烤片后, 脱蜡、水化, 苏木素染色 5 min, 盐酸酒精分化数秒, 氨水浸泡 15 min, 伊红染色 2 min, 蒸馏水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

#### 1.3.6 免疫荧光染色 (immunofluorescence, IF)

用 OCT 冰冻切片包埋剂胶固定出主动脉, 由病理科专业人员用冰冻切片机切 6 μm 厚度冰冻切片。冰冻切片组织丙酮固定 10 min, PBS 洗 3 次, 0.1% Triton X-100 通透 10 min, 5% 山羊血清封闭 30 min, 去除封闭血清, CD68 (1 : 250), iNOS (1 : 250), CD206 (1 : 250) 一抗 4℃ 孵育过夜, 羊抗小鼠 FITC (1 : 500) 和羊抗兔 RBITC (1 : 500) 二抗室温孵育 30 min, DAPI 室温染核 5 min, 用抗荧光淬灭封片剂封片, 于显微成像系统观察。

#### 1.3.7 免疫蛋白印迹 (Western blot)

使用 RIPA 裂解液提取主动脉蛋白, BCA 试剂盒测定样品的蛋白浓度。TGX Stain-Free™ 预制胶恒压 250 V, 电泳 25 min, 待染料前沿移行到距离凝胶底部 2~3 mm 时停止, 利用湿转法, 恒流 200 mA 将蛋白转移至 PVDF 膜上 (时间可根据目的蛋白分子量适当调整)。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, CD68 (1 : 1000), iNOS (1 : 1000), CD206 (1 : 1000) 4℃ 摇床过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 之后使用羊抗小鼠 (1 : 10000) 和羊抗兔 HRP (1 : 10000) 二抗室温孵育 30 min, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。利用增强的化学发光检测试剂盒检测蛋白质信号。使用凝胶成像仪成像并进行半定量分析。

### 1.3.8 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

主动脉组织用冷 PBS(0.01 mol/L;pH = 7.2~7.4)洗涤去除血液。将干净的组织切成小块,并在冰上的 PBS 中匀浆。收集组织匀浆并在 4℃ 下以 3000 r/min 离心 5 min。根据制造商的说明,使用 ELISA 试剂盒对上清液进行了 IL-6 和 IL-10 的检测。使用酶标仪于 450 nm 波长处检测 OD 值。建立标准曲线,定量计算主动脉组织中 IL-6 和 IL-10 的含量。

### 1.4 统计学方法

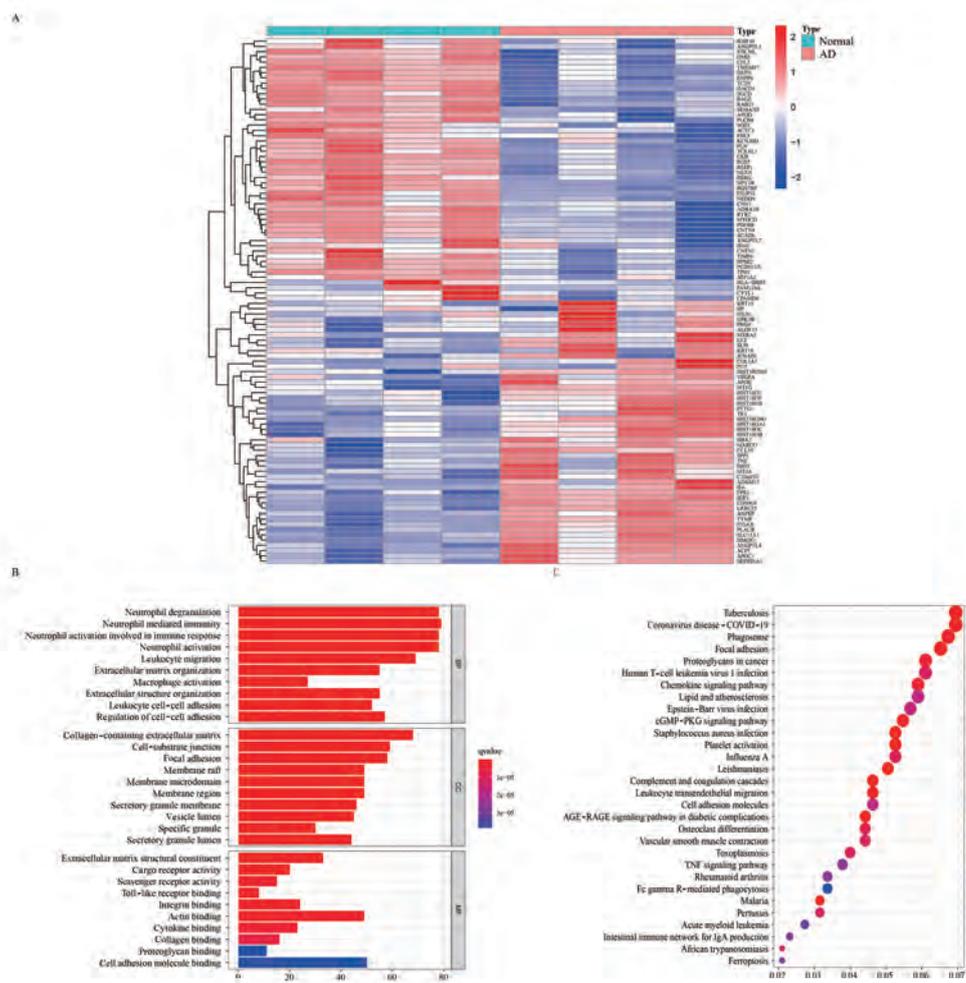
使用 R4.0.2 软件进行统计分析。经验贝叶斯方法用于对 mRNA 转录组数据集进行归一化处理,当  $\log |FC| \geq 1$  和  $P < 0.05$ ,认为基因为 AD 相关

差异基因。计量资料数据采用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。方差齐时,两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐时,两两比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料采用频数或构成比(%)表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AD 相关差异基因及相关 GO 分析和 KEGG 分析

研究根据材料和方法中描述的检索词,纳入 AD 相关 mRNA 转录组数据集为 GSE147026,4 例正常主动脉组织,4 例 AD 组织。以  $\log |FC| \geq 1$  和  $P < 0.05$  为条件,筛选出上调基因(AD 组高于正常组)515 个,下调基因(AD 组低于正常组)415 个(图 1A)。



注:A:AD 及正常对照组中差异基因的筛选;B:差异表达基因的 GO 富集分析;C:差异表达基因的 KEGG 富集分析。

图 1 GSE147026 差异基因筛选和相关生物学功能及信号通路分析

Note. A, Screening of differentially expressed genes in AD and normal control tissues. B, GO enrichment analysis of differentially expressed genes. C, KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes.

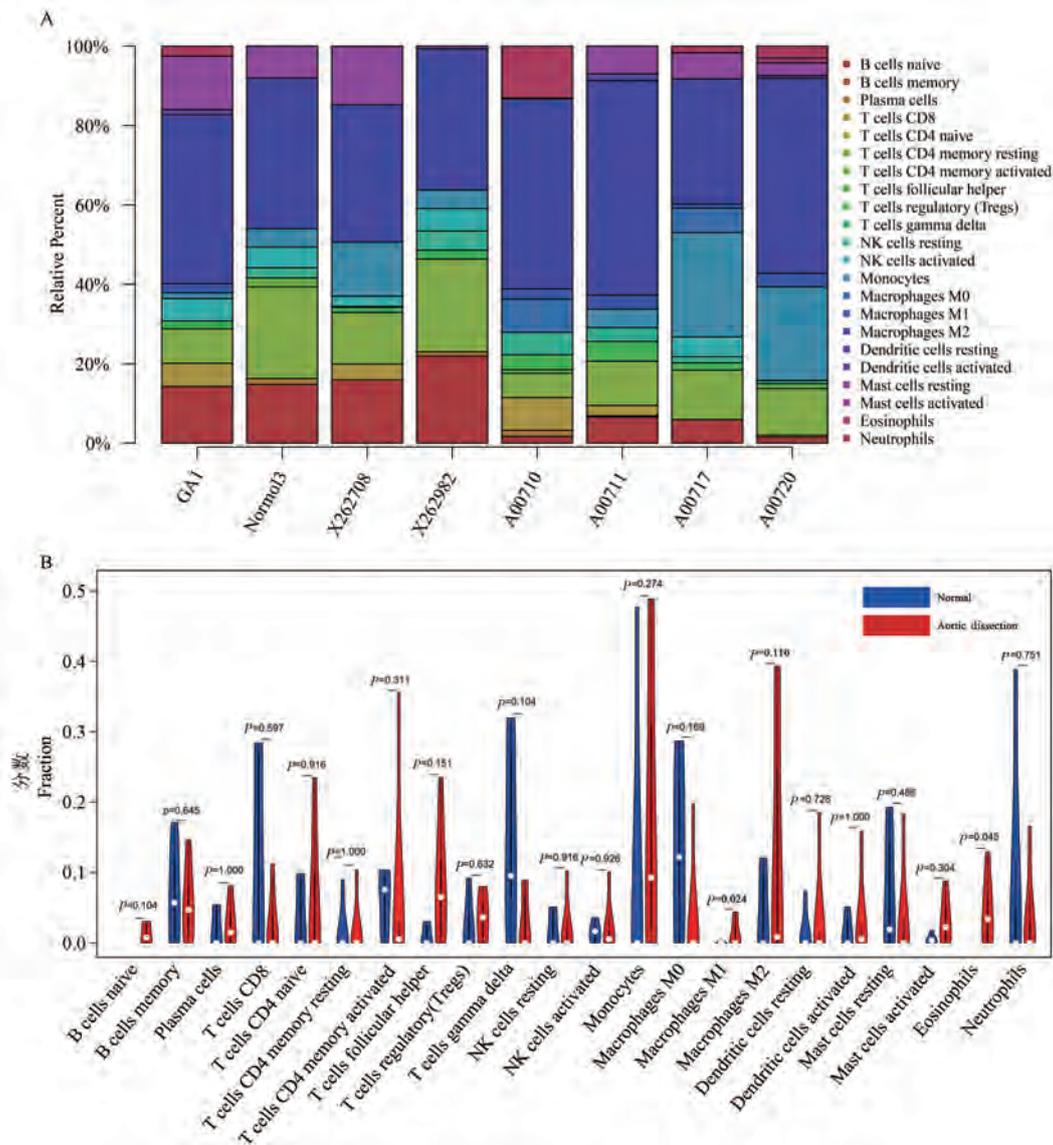
Figure 1 GSE147026 differentially expressed genes screening, related biological function and signal pathway analysis

GO 分析和 KEGG 分析,以  $P < 0.05$  为筛选条件。其中 GO 分析包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP)。930 个差异基因细胞组分主要集中在白细胞与细胞的粘附、细胞外结构组织、巨噬细胞激活、细胞外基质组织、白细胞迁移;分子功能主要集中在膜微区、膜筏、粘着斑、细胞-底物结、胶原蛋白细胞外基质;生物学过程主要集中在整联蛋白结合、Toll 样受体结合、清道夫受体活性、受体活性、细胞外基质结构成分等 (图 1B)。930 个差异基因 KEGG 分析主要集中在 IgA 的肠道免疫

网络、Fc $\gamma$ R 介导的吞噬作用、类风湿关节炎、TNF 信号通路、血管平滑肌收缩、细胞粘附分子、cGMP-PKG 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、趋化因子信号通路等 (图 1C)。

## 2.2 AD 主动脉的免疫细胞构成

研究根据材料和方法中描述的检索词,纳入 AD 相关 mRNA 转录组数据集:分别为 GSE147026,4 例正常主动脉组织,4 例 AD 组织。经验贝叶斯法对转录组数据集进行矫正后,使用 CIBERSORT 对主动脉血管内细胞成分进行注释,并以条形图显示结果,其中不同颜色代表不同的



注: A:各样本中不同免疫细胞亚群的组成情况; B:主动脉夹层组织与正常主动脉组织中免疫细胞浸润水平差异。

图 2 主动脉夹层血管壁中细胞类型分析

Note. A, Composition of different immune cell subpopulations in each sample. B, Different infiltration level of immune cell in AD tissue and normal aortic tissue.

Figure 2 Analysis of cell types in the vessel wall of aortic coarctation

细胞亚群(图 2A)。此外,GSE147026 中(图 2B),幼稚 B 细胞 ( $P = 0.029$ )、M1 巨噬细胞 ( $P = 0.044$ )在 AD 组织中表现出更高的浸润水平,活化 NK 细胞( $P=0.055$ )在正常主动脉组织表现出更高的浸润水平,M0 ( $P = 0.186$ )和 M2 ( $P = 0.178$ )在 AD 组织中表现出较高的浸润水平,但差异无统计学意义,其余细胞类型在正常主动脉和 AD 中没有显著差异。

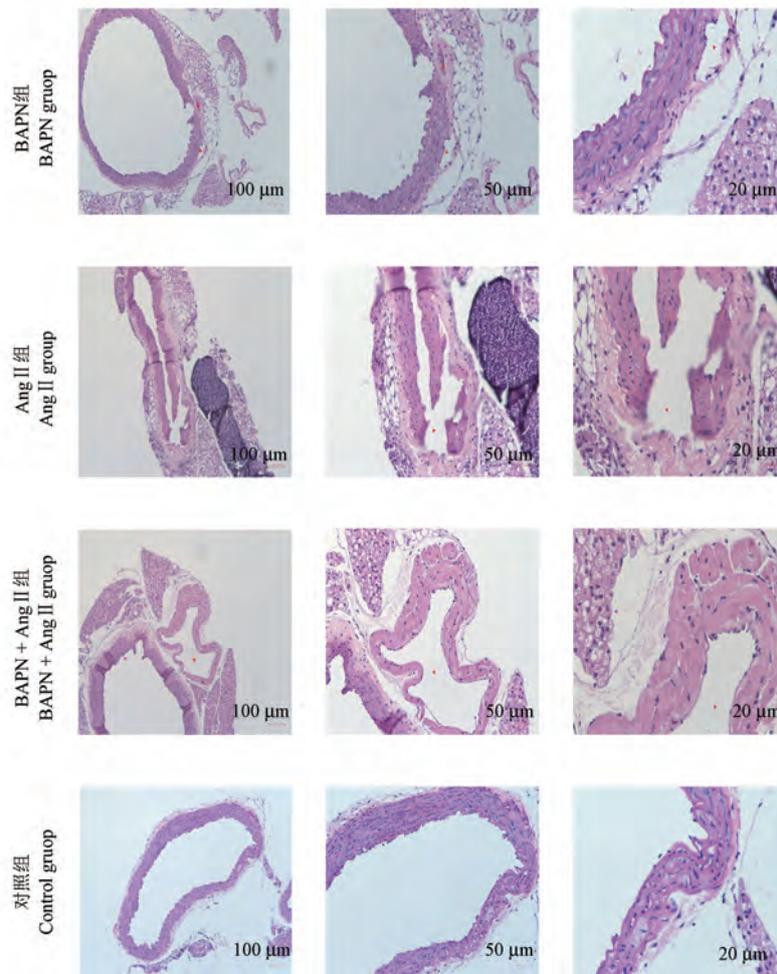
### 2.3 AD 小鼠模型主动脉病理形态学

对照组未发现肉眼可见的主动脉夹层形成,血管壁结构完整,平滑肌细胞排列整齐;各实验组主动脉可见明显扩张及壁内血肿;BAPN+Ang II 组假腔中血细胞充盈,血管壁增厚,血管外膜中炎症细胞浸润较 BAPN 组和 Ang II 组明显,BAPN 组次之,Ang II 组最轻(图 3)。

### 2.4 AD 小鼠模型主动脉巨噬细胞分布

为了深入研究 BAPN、Ang II 以及 BAPN 联合 Ang II 诱导 AD 小鼠巨噬细胞极化情况。我们使用 CD68 和 iNOS 标记 M1 型巨噬细胞,CD68 和 CD206 标记 M2 型巨噬细胞。小鼠主动脉免疫荧光显示,BAPN 组 M1 型和 M2 型巨噬细胞浸润较 Ang II 浸润丰富,相对于 BAPN+Ang II 组较少(图 4A、4B),BAPN+Ang II 诱导 AD 小鼠 M1 型和 M2 型巨噬细胞浸润最丰富(图 4C),对照组 M1 型和 M2 型巨噬细胞浸润最少(图 4D)。

利用 Western blot 及 ELISA 进一步检测小鼠主动脉巨噬细胞表面 marker 及分泌蛋白,探究 AD 小鼠巨噬细胞极化情况(图 5A~5E)。研究发现 iNOS ( $P = 0.0007$ )、CD206 ( $P = 0.0020$ )、IL-6 ( $P = 0.0006$ )和 IL-10 ( $P = 0.0001$ )蛋白表达在 BAPN+



注:红色箭头:主动脉夹层病变部分。

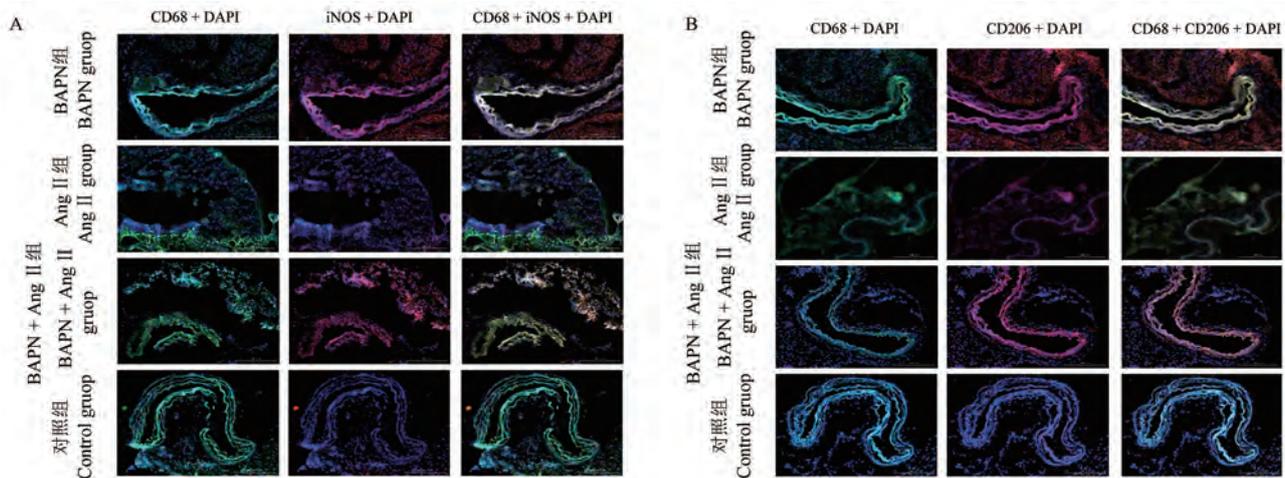
图 3  $\beta$ -氨基丙腈联合血管紧张素 II、 $\beta$ -氨基丙腈、血管紧张素 II 诱导主动脉夹层小鼠病理组织分析

Note. Red arrow, Diseased part of aortic dissection.

Figure 3 Histological analysis of aorta tissue from control or AD mice induced by BAPN+Ang II, BAPN and Ang II

Ang II 诱导组表达相较对照组而言最高; iNOS ( $P=0.0006$ )、CD206 ( $P=0.0265$ )、IL-6 ( $P=0.0023$ ) 和 IL-10 ( $P=0.0002$ ) 蛋白表达在 BAPN 诱导组表达相较对照组而言高表达, 但较 BAPN+Ang II 诱导组表

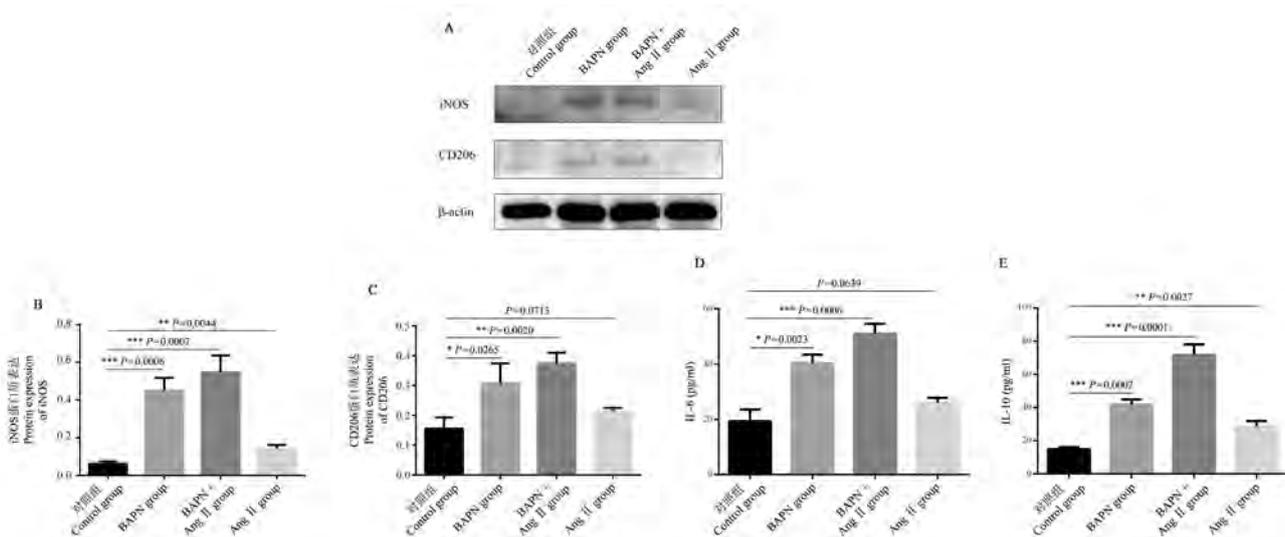
达较低; iNOS ( $P=0.0044$ )、CD206 ( $P=0.0713$ )、IL-6 ( $P=0.0639$ ) 和 IL-10 ( $P=0.0027$ ) 蛋白表达在 Ang II 诱导组表达相较对照组而言高表达, 但较 BAPN+Ang II 和 BAPN 诱导组表达均低。



注: A: 对照组及主动脉夹层组中 CD68 阳性细胞免疫荧光染色; B: 对照组及主动脉夹层组中 CD206 阳性细胞免疫荧光染色。

**图 4** β-氨基丙腈联合血管紧张素 II、β-氨基丙腈、血管紧张素 II 主动脉夹层小鼠模型血管壁中 M1、M2 型巨噬细胞分布  
Note. A, Immunofluorescent staining of CD68 in normal control aorta tissues or AD tissues induced by BAPN + Ang II, BAPN and Ang II. B, Immunofluorescent staining of CD206 in normal control aorta tissues or AD tissues induced by BAPN+Ang II, BAPN and Ang II.

**Figure 4** Distribution of M1 and M2 macrophage in AD tissue induced by BAPN+Ang II, BAPN and Ang II



注: A~C: 免疫蛋白印迹检测 β-氨基丙腈联合血管紧张素 II 组织及正常主动脉组织中 iNOS 和 CD206 的表达; D~E: 酶联免疫吸附试验检测主动脉夹层组织及正常主动脉组织中炎症因子的表达。与相应组别比, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ 。

**图 5** β-氨基丙腈联合血管紧张素 II、β-氨基丙腈、血管紧张素 II 主动脉夹层小鼠模型血管壁中 M1、M2 型巨噬细胞相关分子标志物及分泌细胞因子分析

Note. A~C, Immunoblot analysis of the protein expression of iNOS and CD206 in AD and normal aorta tissues. D~E, ELISA of cytokines in AD aorta tissues or normal aorta tissues homogenates. Compared with the corresponding group, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ .

**Figure 5** Expression of M1 and M2 macrophage marker in normal aorta tissues or AD tissues induced by BAPN+Ang II, BAPN and Ang II

### 3 讨论

Ang II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统的主要效应肽,短时间内可引起血管收缩,提高血压,增加血流对血管壁的冲击<sup>[11]</sup>;诱导平滑肌细胞(VSMC)过度肥大、细胞外基质(ECM)过度分泌,导致炎性细胞浸润,破坏血管,诱导主动脉夹层的形成<sup>[12]</sup>。据 Gavazzi 以 Tieu 等<sup>[7]</sup>的报道,选用 7~30 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,微量缓释泵灌注 Ang II,其 AD 发生率分别为 23% 和 25%。 $\beta$ -氨基丙腈( $\beta$ -aminopropionitrile, BAPN)通过抑制胶原纤维的交联来诱导主动脉夹层<sup>[13]</sup>,Van 等<sup>[14]</sup>使用含 0.25%  $\beta$ -氨基丙腈的饲料饲养小鼠,建立了小鼠 AD 模型,报道 AD 发生率为 64.7%。本研究采用 BAPN 联合 Ang II 腹腔注射较文献报道饲料喂养、给水灌胃在剂量方面更易控制;较微量泵而言,虽然不能模拟持续给药过程,但每隔 8 h 给药一次,操作更简单,造模费用更低,无须特殊仪器。之后通过分析人 AD 组织转录组芯片以及体内采用单独 Ang II、BAPN 以及 Ang II 和 BAPN 联合干预 C57BL/6 小鼠,探究不同干预情况下巨噬细胞在 AD 中的表型变化。

本研究通过分析 AD 相关转录组芯片,分析发现差异表达基因中炎症相关疾病的表达在 AD 组中显著升高;GO 分析发现白细胞与细胞的粘附、巨噬细胞激活、细胞外基质组织、白细胞迁移等介导炎症相关细胞功能的差异基因富集均显著升高,同时 KEGG 分析也提示差异基因中炎症相关信号通路的富集也显著增加,这些结果证明在 AD 发生中炎症活化显著增强,提示炎症在 AD 发生中扮演着重要的角色。本研究进一步分析在 AD 发生中免疫细胞浸润数量是否发生改变,通过探究发现包括单核/巨噬细胞等多种免疫细胞在 AD 发生中浸润增加,其中 M1 型巨噬细胞在 AD 组织中的增加最为显著,这进一步确证了巨噬细胞等免疫细胞在 AD 的发生发展中的重要作用。

随后我们通过体内实验进一步验证前期的分析结果。BAPN 是赖氨酰氧化酶抑制剂,可诱导主动脉壁囊性内侧变性<sup>[15]</sup>,Ang II 通过 AT1 受体,将巨噬细胞招募至主动脉<sup>[16]</sup>,分化为 M1 和 M2 型巨噬细胞,形成炎症微环境<sup>[17]</sup>,促进 AD 的发生发展。我们利用 Ang II 及 BAPN 构建 AD 小鼠模型,发现 AD 小鼠模型中 M1 和 M2 型巨噬细胞均增高,BAPN+Ang II 组最高,BAPN 次之,Ang II 最少。这

些结果证明在 AD 发生发展中巨噬细胞的浸润显著增加,进一步提示巨噬细胞在 AD 的病理进程中的重要介导作用。

Jain 等<sup>[18]</sup>研究证实,Ang II 通过激活 JAK2/STAT5 诱导血管平滑细胞的 RANKL 表达,而巨噬细胞通过 RANKL 对动脉瘤疾病的发展至关重要。Sun 等<sup>[19]</sup>研究表明,炎症可能是主动脉瘤发病的常见机制,特别是,在主动脉瘤患者的胸主动脉样本中普遍观察到巨噬细胞的浸润,但关于巨噬细胞在 AD 中的表型变化相关研究较少。血管修复与心血管疾病(CVD)、动脉瘤、川崎病(KD)、主动脉夹层(AD)、深静脉血栓形成(DVT)等其他血管生成性疾病多种生理和病理过程相关<sup>[20]</sup>。血管新生在血管修复中往往涉及细胞增殖,迁移,分化,管形成和血管生成因子调控等过程。近年来研究发现巨噬细胞可根据局部微环境信号分化为组织特异性巨噬细胞,包括 M1(经典激活)或 M2(交替激活)两个亚型。M1 型巨噬细胞由脂多糖(LPS)或干扰素(IFN)- $\gamma$  激活,在组织中发挥促炎作用,加剧组织损伤,其特异性标记物包括诱导型 NO 合成酶(iNOS)、白细胞介素-12(IL-12)<sup>[21]</sup>。M2 型巨噬细胞由 IL-4、IL-13、免疫复合物、糖皮质激素、转化生长因子(TGF)- $\beta$  介导极化激活。在创伤愈合和组织重建中,M2 型巨噬细胞释放一系列抗炎产物发挥作用<sup>[22]</sup>。因此,我们的研究证实了不同表型巨噬细胞在 AD 组织中的浸润情况,M1/M2 巨噬细胞共同作用,影响着 AD 的发展。我们提出假设,在 AD 的发生中,M1 型巨噬细胞介导炎症的发生,促进 AD 的发展;M2 型巨噬细胞的升高释放抑炎因子,促进组织的修复,这可能是机体在病理条件下的一种代偿性的保护机制。这也为后续的一步机制探究及靶点干预提供潜在的研究思路。

在这项研究中,AD 小鼠主动脉均有 M1 型和 M2 型巨噬细胞浸润,其中 BAPN+Ang II 组蓄积量最多。然而该项研究仍有一定的局限性,首先,基于动物的模型不能完全模拟人中 AD 的发病机理。其次,我们不能排除其他炎症细胞参与 AD 的诱导。综上所述,通过本研究,我们建立了基于 BAPN+Ang II 腹腔注射高效诱导小鼠 AD 模型,这为研究后续 AD 的治疗手段提供了有力的帮助。同时,通过对机制的探究,我们初步发现了 AD 的发生和发展与 M1 和 M2 型巨噬细胞浸润有着密切相关,这也为后续深入研究 AD 的发病机制及其干预手段提供了理论支持。

## 参考文献:

- [ 1 ] Lu HY, Hsu HL, Li CH, et al. Hydrogen sulfide attenuates aortic remodeling in aortic dissection associating with moderated inflammation and oxidative stress through a NO-dependent pathway [J]. *Antioxidants(Basel)*, 2021, 10(5): 682.
- [ 2 ] Melvinsdottir I, Lund S, Agnarsson B, et al. The incidence and mortality of acute thoracic aortic dissection; results from a whole nation study [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2016, 50(6): 1111-1117.
- [ 3 ] Nienaber CA, Clough RE. Management of acute aortic dissection [J]. *Lancet*, 2015, 385(9970): 800-811.
- [ 4 ] Aoki H, Majima R, Hashimoto Y, et al. Ying and Yang of Stat3 in pathogenesis of aortic dissection [J]. *J Cardiol*, 2021, 77(5): 471-474.
- [ 5 ] Müller B, Modlich O, Prissack HB, et al. Gene expression profiles in the acutely dissected human aorta [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2002, 24(4): 356-364.
- [ 6 ] Pan S, Wu D, Teschendorff AE, et al. JAK2-centered interactome hotspot identified by an integrative network algorithm in acute Stanford type A aortic dissection [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89406.
- [ 7 ] Tieu BC, Lee C, Sun H, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3637-3651.
- [ 8 ] Wang X, Zhang H, Cao L, et al. The role of macrophages in aortic dissection [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 54.
- [ 9 ] Ulndreaj A, Li A, Chen Y, et al. Adventitial recruitment of Lyve-1-macrophages drives aortic aneurysm in an angiotensin-2-based murine model [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(10): 1295-1309.
- [ 10 ] Newman AM, Steen CB, Liu CL, et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 773-782.
- [ 11 ] Lane BA, Uline MJ, Wang X, et al. The association between curvature and rupture in a murine model of abdominal aortic aneurysm and dissection [J]. *Exp Mech*, 2021, 61(1): 203-216.
- [ 12 ] Li B, Wang Z, Hong J, et al. Iron deficiency promotes aortic medial degeneration via destructing cytoskeleton of vascular smooth muscle cells [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(1): e276.
- [ 13 ] 刘瑜婷, 高艳香, 王姗姗, 等.  $\beta$ -氨基丙腈饮水联合血管紧张素 II 埋泵建立小鼠主动脉夹层模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(4): 399-403.
- [ 14 ] Van Dorp DR, Malleis JM, Sullivan BP, et al. Teratogens inducing congenital abdominal wall defects in animal models [J]. *Pediatr Surg Int*, 2010, 26(2): 127-139.
- [ 15 ] Kanome T, Watanabe T, Nishio K, et al. Angiotensin II upregulates acyl-CoA: cholesterol acyltransferase-1 via the angiotensin II Type 1 receptor in human monocyte-macrophages [J]. *Hypertens Res*, 2008, 31(9): 1801-1810.
- [ 16 ] Wu Z, Ruan Y, Chang J, et al. Angiotensin II is related to the acute aortic dissection complicated with lung injury through mediating the release of MMP9 from macrophages [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(3): 1426-1436.
- [ 17 ] Tanaka T, Kelly M, Takei Y, et al. RANKL-mediated osteoclastogenic differentiation of macrophages in the abdominal aorta of angiotensin II-infused apolipoprotein E knockout mice [J]. *J Vasc Surg*, 2018, 68(6): 48-59.
- [ 18 ] Jain RK, Skelton Iv WP, Pond GR, et al. Angiotensin blockade modulates the activity of PD1/L1 inhibitors in metastatic urothelial carcinoma [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2021, 19(6): 540-546.
- [ 19 ] Sun LL, Li WD, Lei FR, et al. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4568-4587.
- [ 20 ] Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, et al. Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(2): 81-93.
- [ 21 ] Enderlin Vaz da Silva Z, Lehr H, Velin D. *In vitro* and *in vivo* repair activities of undifferentiated and classically and alternatively activated macrophages [J]. *Pathobiology*, 2014, 81(2): 86-93.
- [ 22 ] Hallowell RW, Collins SL, Craig JM, et al. mTORC2 signalling regulates M2 macrophage differentiation in response to helminth infection and adaptive thermogenesis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14208.

[ 收稿日期 ] 2021-09-04