

向晨莹,钟嘉俊,郝琰琰,等. 冠状动脉左前降支结扎对巨噬细胞消除模型构建的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (2): 141-150.

Xiang CY, Zhong JJ, Hao YY, et al. Effect of ligation of left anterior descending coronary artery on establishment of macrophage elimination model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 141-150.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.02.001

冠状动脉左前降支结扎对巨噬细胞消除模型构建的影响

向晨莹¹, 钟嘉俊², 郝琰琰³, 布威麦热姆·热杰普⁴, 聂宇^{1*}, 廉虹^{1*}

(1. 北京协和医学院, 中国医学科学院阜外医院, 国家心血管病中心, 心血管疾病国家重点实验室, 北京 100037;
2. 温州医科大学附属第一医院心脏外科, 浙江 温州 325000; 3. 山西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 太原 030001; 4. 新疆医科大学第一附属医院心脏外科, 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 为深入了解巨噬细胞在心肌再生过程中的作用机制, 探讨 CD11b^{DTR} 新生小鼠构建心肌梗死模型后消除巨噬细胞的可行性。**方法** 将 1 日龄 CD11b^{DTR} 小鼠结扎冠状动脉左前降支后注射白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 消除巨噬细胞, 建立巨噬细胞消除的心肌梗死模型, 进而探究巨噬细胞在心梗过程中的作用。**结果** 将出生 1 d 的 CD11b^{DTR} 小鼠结扎心脏冠脉左前降支构建心梗模型后, 注射 DT 无法实现巨噬细胞的显著消除; 增加给药频率或给药浓度仍无法明显消除巨噬细胞; 同时增加给药频率和浓度虽然取得了明显的巨噬细胞消除效果, 但是 DT 组小鼠成活率明显下降, 成活小鼠生存状态极差, 无法用于后续实验。**结论** CD11b^{DTR} 小鼠在生理情况下注射 DT 后能显著消除心脏中巨噬细胞; 但是 CD11b^{DTR} 小鼠进行冠状动脉结扎后, 无法通过注射 DT 得到巨噬细胞消除的心梗模型小鼠, 可能是冠状动脉结扎使 DT 无法正常输送至心脏, 继而无法有效作用于心脏内的巨噬细胞的原因所导致。

【关键词】 巨噬细胞; 消除; 流式细胞术; 冠状动脉; 结扎; 心肌梗死

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 02-0141-10

Effect of ligation of left anterior descending coronary artery on establishment of macrophage elimination model

XIANG Chenying¹, ZHONG Jiajun², HAO Yanyan³, RAJAP Bvmaram⁴, NIE Yu^{1*}, LIAN Hong^{1*}

(1. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China. 2. Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000. 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001. 4. Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Corresponding author: NIE Yu. E-mail: nieyuniverse@126.com; LIAN Hong. E-mail: lianhong@fuwaihospital.org

【基金项目】 国家自然科学基金 (81970243, 81900343), 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (CIFMS) (2021-I2M-C&T-A-011)。Funded by the National Natural Science Foundation of China (81970243, 81900343), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2021-I2M-C&T-A-011)。

【作者简介】 向晨莹 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 炎症与心肌再生。Email: 2459115496@qq.com

【通信作者】 聂宇 (1980—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 心血管再生医学。Email: nieyuniverse@126.com;

廉虹 (1982—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 心肌病和心肌再生。Email: lianhong@fuwaihospital.org。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate the mechanisms of macrophage activity in the process of myocardial regeneration and explore the feasibility of eliminating macrophages after constructing a myocardial infarction model in CD11b^{DTR} newborn mice. **Methods** CD11b^{DTR} mice were injected with DT to eliminate macrophages on their day of birth after ligation of the left anterior descending branch of the coronary artery. This established a myocardial infarction model with macrophage elimination to explore the role of macrophages in the process of myocardial infarction. **Results** After ligating the left anterior descending branch of the coronary artery of CD11b^{DTR} mice on their day of birth to construct the myocardial infarction model, DT injection failed to significantly eliminate their macrophages. Macrophages could not be eliminated by increasing the administration frequency or concentration. Increasing the administration frequency and concentration at the same time had an obvious macrophage elimination effect, but the survival rate of the DT group mice decreased significantly, and the survival state of the surviving mice was very poor. Thus, this method cannot be used for subsequent experiments. **Conclusions** Mice injected with DT under physiological conditions showed significant macrophage elimination in the heart. However, after coronary artery ligation of CD11b^{DTR} mice to create a myocardial infarction model, macrophage elimination could not be obtained by injecting DT, which may be caused by the fact that coronary artery ligation prevented the DT from being delivered to the heart normally, preventing it from effectively acting on macrophages in this organ.

[Keywords] macrophages; elimination; flow cytometry; coronary artery; ligation; myocardial infarction

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

目前全球由于心力衰竭面临死亡威胁的患者数量日益增加^[1-2]。心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 所致的心肌损伤往往引起心肌细胞大量丢失^[3], 导致心脏舒缩功能障碍。心脏通常从左心室开始衰竭, 首先表现为肺循环的淤血与外周灌注不足^[3], 发展到终末阶段则表现出局部心肌坏死和不可逆的纤维化。梗死区发生心室重塑和肥大, 同时非梗死区心肌细胞代谢紊乱与功能障碍, 最终导致心力衰竭。

哺乳动物成年个体的心脏自我更新能力极为有限, 且随着年龄递增, 心肌细胞增殖速度进一步减慢^[4-5]。但是在如硬骨鱼类和两栖类等低等生物中发现其心脏一直保持再生能力^[6-7]。2013 年 Porrello 等^[8]通过在 1 日龄小鼠身上实施冠状动脉左前降支 (left anterior descending coronary artery, LAD) 永久结扎术, 观察到 2 周后小鼠心脏受损区域的纤维化减少, 且 3 周后小鼠 95% 以上的受损心肌得到了修复, 心脏舒缩功能也已基本恢复, 说明新生小鼠心脏仍具有较强的心肌再生能力。因此, 利用 1 日龄小鼠心肌梗死模型, 开展心肌再生修复相关机制研究, 被认为是人类攻克心血管疾病这一世界医学难题的有效途径之一^[9]。

心肌梗死后, 梗死区的心肌细胞大量死亡, 诱发炎症。此后, 巨噬细胞的募集和浸润, 能够吞噬凋亡心肌细胞, 同时分泌抑炎因子使炎症逐渐消退^[10], 是心脏损伤后心肌组织再生和修复的关键环节。如果心肌梗死后的炎症持续发生不消退, 则会

诱发心肌组织纤维化, 不利于损伤区的修复^[11-12]。新生小鼠经历心梗手术后, 巨噬细胞的浸润有利于血管生成, 可直接或间接促进心肌再生^[13-15]。Li 等^[15]研究发现巨噬细胞可通过分泌抑瘤素 M (oncostatin M, OSM), 作用于其共受体 gp130, 继而激活 Src-Yap 信号通路直接促进心肌细胞增殖。Jia 等^[16]发现 IL35 的转录激活可促进 CX3CR1⁺Ly6C^{low} 巨噬细胞的募集和细胞外基质的沉积, 改善心梗后的心室重构; 并指出心脏驻留巨噬细胞来源的 Legumain 能有效促进凋亡心肌细胞的清除和降解, 继而调控心肌组织修复^[17]。课题组前期发现分离新生小鼠心脏 (经心尖切除损伤) 中的巨噬细胞, 通过尾静脉注射移植到成年心肌梗死损伤小鼠体内, 可有效改善心功能, 减少心肌梗死面积, 并伴随心肌细胞增殖的显著增加^[18]。以上研究证实, 巨噬细胞在心肌组织再生修复中的作用和机制值得进一步探讨^[19]; 但目前尚未有基于 CD11b^{DTR} 基因工程小鼠, 通过结扎冠状动脉左前降支构建新生小鼠心梗后消除巨噬细胞模型的报道。

为了制备 CD11b^{DTR} 新生小鼠心梗后消除巨噬细胞模型, 本研究引入了 CD11b^{DTR} 基因编辑小鼠品系, 该小鼠体内的 CD11b⁺ 细胞可表达白喉毒素受体 (diphtheria toxin receptor, DTR), 注射白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 后可与白喉毒素受体结合进入 CD11b⁺ 细胞, 实现 CD11b⁺ 细胞的特异性敲除^[18], 从而分析巨噬细胞敲除对于新生小鼠 MI 后再生的影响。综上所述, 本文拟通过建立 CD11b^{DTR}

新生小鼠的 MI 模型,利用流式细胞术检测分析心肌损伤后炎症发生部位巨噬细胞的激活和募集的情况,进而判断该模型是否能够应用于巨噬细胞调控心肌再生的相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只雄性及 20 只雌性 2 ~ 6 月龄 SPF 级 CD11b^{DTR} 小鼠,体重 20 ~ 24 g,引进于 The Jackson Laboratory 公司 (Strain#: 006000)。10 只雄性及 20 只雌性 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,体重约 20 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2021-0006】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由阜外医院动物实验中心提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃,饲养于北京协和医学院国家心血管病中心阜外医院动物实验中心【SYXK (京) 2022-0020】。所有操作均在中国医学科学院阜外医院国家心血管病中心进行,均符合中国医学科学院阜外医院实验动物管理和使用委员会伦理要求 (FW-2021-0032)。

1.1.2 主要试剂与仪器

流式细胞术中使用的流式抗体包括: CD45 (APC/Cyanine7, cat103115, Biolegend)、CD11b (PE, cat101208, Biolegend)、Ly6G (BV421, cat127627, Biolegend)、F4/80 (APC, cat123116, Biolegend)。单阳管使用缓释微球 (UltraComp eBeads™ Compensation Beads, 01-2222-42, Invitrogen)。GoldBand DL2000 DNA Marker 购自上海翊圣生物科技有限公司。

流式细胞仪为 Cytex 公司的多光谱流式分析仪 Cytex® Aurora,该仪器最高可配置 5 个激光器,3 个散射光和 64 个荧光检测通道,可同时实现多色分析。PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

手术器械购自深圳瑞沃德公司和上海手术器械厂,包括:精细剪 (S18002-09, 瑞沃德)、眼科镊 (F12006-10, 瑞沃德)、眼科剪 (B11037-08, 瑞沃德)、显微镊 (WA3080, 上海金钟)、显微剪 (WAB040, 上海金钟)、显微针持 (WA2050, 上海金钟)、医用无菌带线缝合针使用规格为 8-0/10-0, 购自宁波医用缝针有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CD11b^{DTR} 小鼠的基因型鉴定

CD11b^{DTR} 小鼠所用鉴定引物序列: olMR1801 : 5'-GGGACCATGAAGCTGCTGCCG-3', olMR1802 : 5'-TCAGTGGGAATTAGTCATGCC-3', olMR8744 : 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3', olMR8745 : 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3', 其中 olMR1801 和 olMR1802 用于鉴定转基因序列是否存在, olMR8744 和 olMR8745 作为阳性对照。

鼠尾组织于 100 μL 50 mmol/L NaOH 中 95℃ 下处理 30 min 后加入 30 μL 1 mol/L (pH = 7.0) Tris-HCl 中和,涡旋摇匀,15 000 r/min 离心 2 min 即得到鼠尾 DNA。PCR 体系为: Vazyme mix 10 μL, olMR1801 0.6 μL, olMR1802 0.6 μL, olMR1844 0.6 μL, olMR1845 0.6 μL, H₂O 5.6 μL, DNA 2 μL, 总体系为 20 μL。PCR 程序为: 预变性 94℃ 3 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 60℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 变性-退火-延伸经历 30 个循环, 终延伸 72℃ 10 min, 4℃ 保存。基因型鉴定结果中阳性对照序列大小为 200 bp, 转基因序列存在情况下条带大小为 625 bp。

1.2.2 新生小鼠心肌梗死手术

将出生 1 d 的小鼠放置在冰上,冷冻麻醉约 2 ~ 3 min 至小鼠四肢活动迟钝,呼吸减缓,擦干小鼠后用胶带将小鼠固定在手术操作台上,手术体位调整为右侧卧位 45° ~ 60°,首先在左侧第四肋间隙处用显微剪由此剪开皮肤以及皮下组织,之后用显微镊适当撑开肋间隙,充分暴露手术视野,保持撑开的同时用显微针持夹紧 10-0 缝线沿左心耳下缘结扎冠状动脉左前降支 (可见一个相对较粗的“人”字形血管),若结扎成功可观察到血管闭塞,心肌层变白,之后迅速用 8-0 缝线缝合肋间隙和皮肤。手术结束后将小鼠置于 37℃ 加热台上加热复温至小鼠体表颜色红润,恢复活动后放回母鼠笼中。

1.2.3 心脏组织细胞悬液制备以及流式细胞术

取乳鼠心脏,将其放入裂解液 (Collagenase type II 500 U/mL, 2 mg/mL; 蛋白酶 XIV 1.2 μL/mL; 溶剂为 HBSS; 总用量为每个心脏 1 mL) 中并用显微剪剪成约 1 mm³ 的组织碎块,37℃ 酶解孵育 60 min, 1000 r/min 离心 5 min 后,用红细胞裂解液室温下裂解 5 min,加 1 mL PBS 终止消化,用 PBS 洗 3 次,每次清洗流程为用手轻微震荡混匀后离心弃上清,再加入新的 PBS,最后弃上清,加入 100 μL PBS 将沉淀重悬即得到心脏细胞悬液。从其中取适量细

胞悬液不作染色处理,作为流式分析的空白对照管。

按 1:100 的比例加入流式抗体,包括:CD45-APC/Cyanine7、CD11b-PE、Ly6G-BV421、F4/80-APC,均为细胞表面抗体,4℃染色 30 min;染色后避光用 PBS 洗 3 次,弃上清用适量体积的 PBS 重悬为染色细胞悬液,用滤网过滤后上机检测。单阳管制作方法:4 种抗体对应 4 个单阳管,将微球充分涡旋均匀,向每个 1.5 mL 的 EP 管内滴入一滴,再分别在每个对应管内加入 1 μL 相应的抗体,轻微震荡混匀,室温孵育 15 ~ 30 min,加入 1 mL PBS 清洗,2000 r/min 离心 5 min,清洗 3 次后留 200 ~ 400 μL 液体,滤网过滤后等待上机。加入流式抗体染色后的实验流程均需注意避光。

1.2.4 白喉毒素药物注射

根据说明书按 1 mL 生理盐水溶解 1 mg 白喉毒素粉末,配制白喉毒素原液,然后按 1 mL 生理盐水稀释 1.5 μL 原液,配成 0.0015 mg/mL 的白喉毒素工作液(浓度 1.5 ng/μL)。给药方式为:出生 1 d 和 2 d 的乳鼠通过颈背部皮下注射,出生后第 3 天及以后的乳鼠采用腹腔注射的方式给药,给药剂量均按 10 μL/g 小鼠体重注射。给药时间为在新生小

鼠 1 日龄时实施心梗手术后进行第 1 次给药,后续每隔 1 d 给药 1 次,即在心梗后第 0、2、4 天给药。

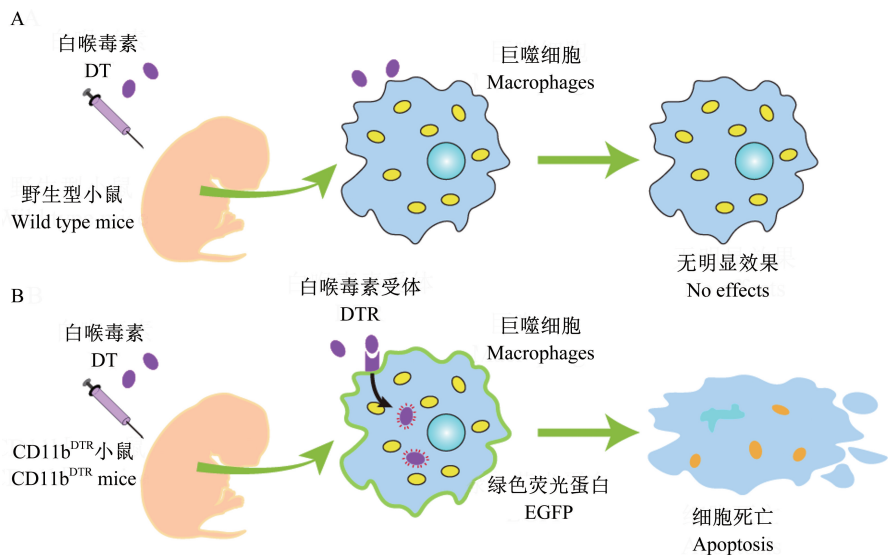
1.3 统计学分析

用 GraphPad Prism 8.4.0 软件进行数据分析和作图,用 Adobe Illustrator 2020 软件进行图像处理,两组之间比较均采用 Student's *t* 检验。经统计学分析的数据呈正态分布,以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。*P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 转基因小鼠巨噬细胞敲除原理介绍

CD11b^{DTR} 小鼠是在 C57BL/6J 品系小鼠基因组中随机插入 CD11b-DTR-EGFP cDNA 序列的转基因小鼠,其中 CD11b 启动子只在髓系的巨噬细胞内表达,所以是巨噬细胞特异性启动子,DTR 是 DT 的受体,EGFP 是绿色荧光标记蛋白,有利于目标细胞的直接观测。根据图 1 结果可知该小鼠体内的 CD11b⁺细胞可表达 DTR,外源注射的 DT 可与 CD11b⁺细胞表面 DTR 靶向结合,进入巨噬细胞中,DT 通过自身毒性作用而杀死巨噬细胞,从而实现巨噬细胞的特异性敲除。



注:A:野生型小鼠体内巨噬细胞表面无 DTR,在注射 DT 后无明显现象;B:CD11b^{DTR} 小鼠由于 CD11b 阳性细胞表面携带 DTR,因此在此注射 DT 后,其体内的 DT 得以通过与 DTR 结合进入巨噬细胞内发挥毒性作用,导致巨噬细胞群体的特异性敲除。

图 1 CD11b^{DTR} 小鼠消除巨噬细胞作用原理示意图

Note. A. There is no DTR on the surface of macrophages in wild type mice, therefore there is no obvious phenomenon after DT injection. B. CD11b^{DTR} mice carry DTR on the surface of CD11b positive cells, so after DT injection, DT in their bodies can enter macrophages to play a toxic role by binding with DTR, leading to specific knockout of macrophages.

Figure 1 Schematic diagram of the mechanism of CD11b^{DTR} mice to eliminate macrophages

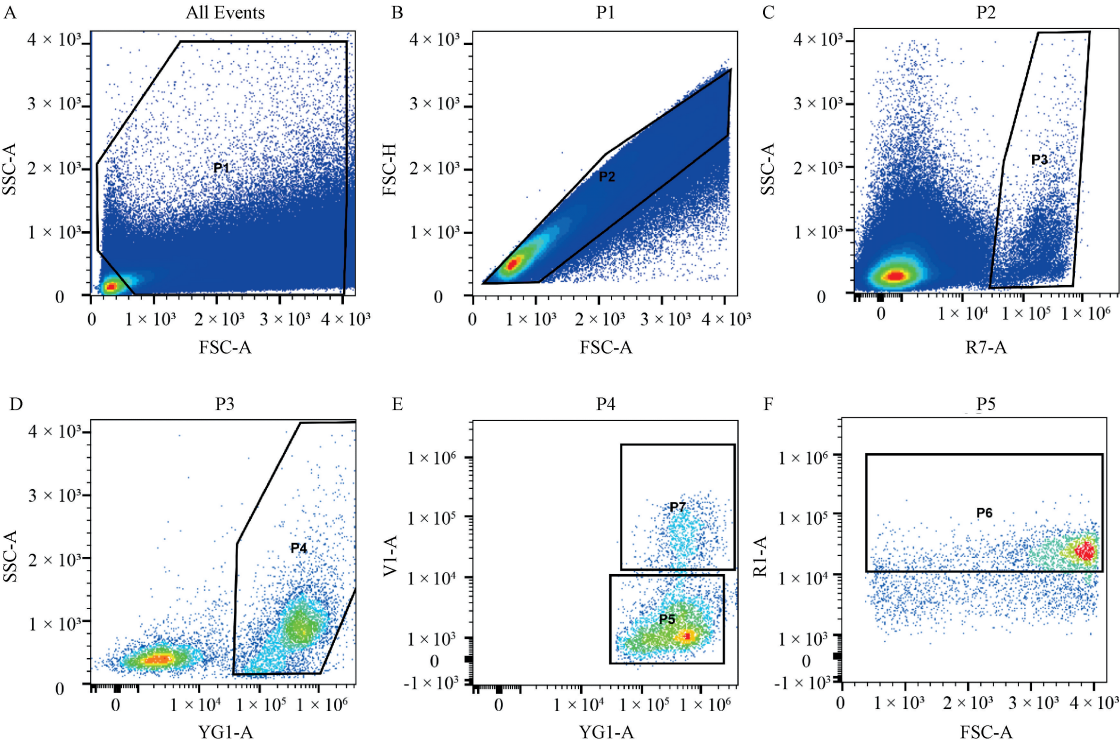
2.2 流式细胞术实验方法建立

选择流式细胞术作为检测巨噬细胞是否被消除的主要方法。如图 2,为筛选出巨噬细胞群体,先从总细胞群体(P1)中用 FSC-A 和 FSC-H 框选出单细胞群体(P2),以此排除粘连细胞群,再从单细胞群体中筛选出 CD45⁺的炎症细胞群(leukocytes),在此基础上,分离出 CD11b⁺髓系细胞群(P4),其中大多数为单核-巨噬细胞和中性粒细胞,再划分出 CD11b⁺Ly6G⁻单核-巨噬细胞群(myloid cells),最终由 F4/80 的信号强弱确定 CD11b⁺Ly6G⁻F4/80⁺巨噬细胞群(macrophages)^[20]。计算方式 1:统计 Count (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻F4/80⁺)/Count (all Events) × 100%^[20];计算方式 2:统计 Count (CD45⁺CD11b⁺

Ly6G⁻)/Count (all Events) × 100%,以此比例来表征巨噬细胞群体。同时由 Count (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺)/Count (all Events) × 100%来统计中性粒细胞群体。下文结果计算方式均同上。

2.3 未结扎冠状动脉小鼠的巨噬细胞消除实验

1 日龄的 CD11b^{DTR} 新生小鼠进行颈背部注射 DT,之后每隔 1 d 给药 1 次,即在 1、3、5 日龄给药,在第 8 天取小鼠心脏心室肌部分制成单细胞悬液,并进行流式分析。结果如图 3 所示,给药组的巨噬细胞占比(0.04 ± 0.00)%相对于对照组(0.24 ± 0.09)%显著下降($P < 0.01$)。结果说明,未结扎冠状动脉的 CD11b^{DTR} 新生小鼠心脏的巨噬细胞可以通过 DT 实现消除。

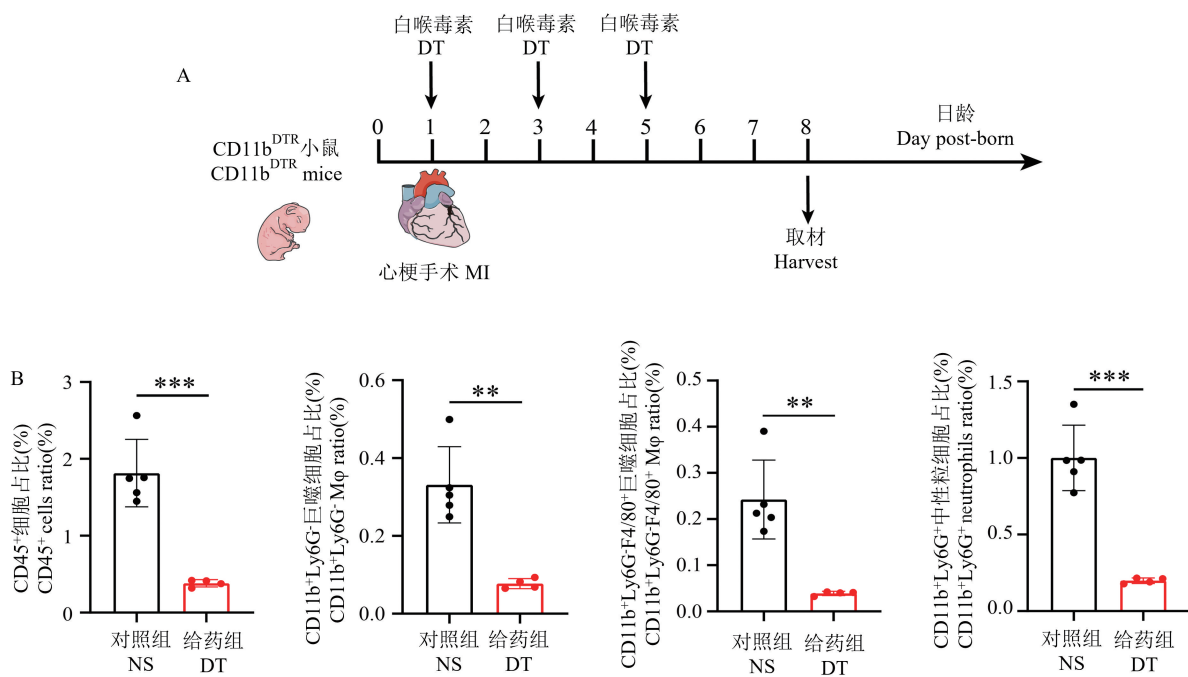


注:A:由 FSC-A,SSC-A 圈中细胞区域(P1);B:利用 FSC-A,FSC-H 从 P1 细胞群中排除粘连体(得到 P2 细胞群);C:利用 CD45 的表达(APC/Cy7 对应 R7 通道)对炎症细胞进行圈门(得到 P3 细胞群);D:利用 CD11b 的表达(PE 对应 YG1 通道)对髓系细胞进行圈门(得到 P4 细胞群);E:利用 Ly6G 的表达(BV421 对应 V1 通道)对中性粒细胞和单核-巨噬细胞进行圈门(Ly6G 信号强的细胞群为中性粒细胞,Ly6G 信号弱的细胞群为单核-巨噬细胞);F:利用 F4/80 的表达(APC 对应 R1 通道)对巨噬细胞进行圈门(得到 P6 细胞群);分别统计每个门中细胞的个数,并分析每群细胞占比,进行组间比较。

图 2 流式细胞术圈门方法

Note. A. The cell region (P1) was determined by FSC-A and SSC-A. B. FSC-A and FSC-H were used to exclude adhesions from P1 cell group (P2 cell group was obtained). C. The expression of CD45 (APC/Cy7 corresponds to R7 channel) was used to find inflammatory cells (P3 cell population was obtained). D. The expression of CD11b (PE corresponds to YG1 channel) was used to find myeloid cells (P4 cell group was obtained). E. The expression of Ly6G (BV421 corresponds to V1 channel) was used to find neutrophils and monocytes macrophages (neutrophils were the cells with strong Ly6G signal, monocytes macrophages were the cells with weak Ly6G signal). F. The expression of F4/80 (APC corresponds to R1 channel) was used to find the macrophages (P6 cell group was obtained). Count the number of cells in each gate, and analyze the proportion of cells in each group for comparison between groups.

Figure 2 Loop gate method of flow cytometry



注:A:1、3、5日龄给药消除巨噬细胞的实验流程图;B:NS组和DT组各类群细胞占比结果柱状图, $n(\text{对照组}):n(\text{给药组})=5:4$;与NS组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图3 未结扎冠状动脉小鼠给药消除巨噬细胞结果图

Note. A. The experimental flow chart of eliminating macrophages by administration at the 1st, 3rd and 5th day of age. B. Histogram of the percentage results of various groups of cells in NS group and DT group. $n(\text{NS group}):n(\text{DT group})=5:4$. Compared with NS group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Results of administration of drugs to eliminate macrophages in mice without coronary artery ligation

2.4 结扎冠状动脉小鼠的巨噬细胞消除实验

在CD11b^{DTR}新生小鼠1日龄时实施MI手术,术后即给第1次药,后续每隔1d给药1次,即在1、3、5日龄给药。每次给药的同时统计小鼠的体重和存活率。在第8天取小鼠心脏结扎线及以下部分制作单细胞悬液,并进行流式分析。流式结果如图4所示,DT组巨噬细胞占比(1.99 ± 0.22)%相对于NS组(2.29 ± 0.40)%不具有显著性差异($P > 0.05$)。根据多次重复实验的结果,实验组相对于对照组,CD45⁺炎症细胞群占比没有明显差别或实验组的炎症细胞群稍微上调,巨噬细胞群体所占比例有减少的趋势或水平较为接近,但并没有显著减少,中性粒细胞群体的占比也没有明显变化的趋势,消除效果普遍不够理想。

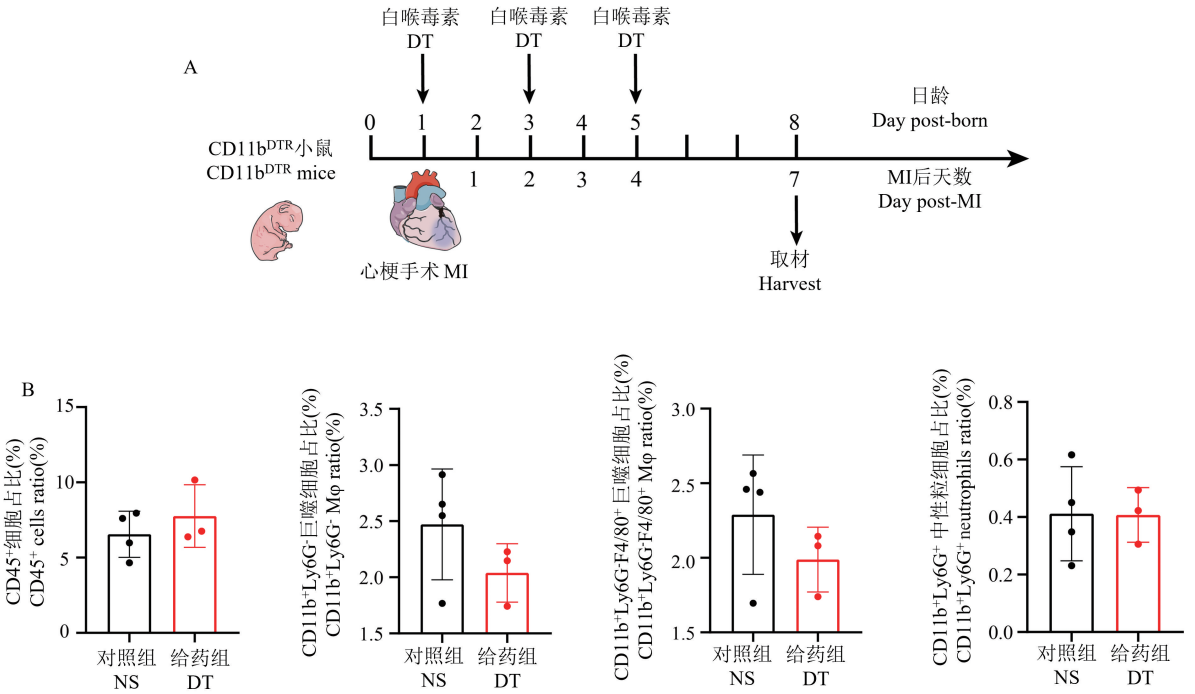
2.5 结扎冠状动脉并增加给药频率的巨噬细胞消除实验

由于2.4部分结果巨噬细胞消除效果不够理想,猜测原因是DT剂量不足。因此实验选择由原来的1、3、5日龄给药增加频率为1~7日龄每天进行相同浓度的DT药物注射,对照组使用生理盐水

按实验组相同的频率进行注射。结果如图5所示,给药组的巨噬细胞比例(1.28 ± 0.29)%相对于对照组(1.18 ± 0.26)%并未显著降低($P > 0.05$)。因此,巨噬细胞仍未被成功消除,反而引发了轻微炎症,即中性粒细胞和巨噬细胞群都出现了轻微上调(见图5)。

2.6 结扎冠状动脉同时增加给药频率和浓度的巨噬细胞消除实验

根据2.5部分结果CD11b^{DTR}消除巨噬细胞实验结果仍然不理想,我们在2.5部分增加给药频率(连续7d给药)的基础上,将药物浓度由原来的15 ng/g增加至30 ng/g。结果如图6所示,未做手术组仅需正常给药即实现消除,而MI手术组的正常剂量给药组(DT-15 ng/g)的巨噬细胞仍未实现消除且有轻微增加的趋势[给药组:(2.11 ± 0.14)%,对照组:(1.97 ± 0.12)%, $P < 0.05$]。MI手术后的小鼠在30 ng/g给药的情况下才有较为明显的消除效果[给药组:(1.24 ± 0.12)%,对照组:(1.97 ± 0.12)%, $P < 0.05$],死亡率为50%,且生存状态差,无法用于开展后续实验。

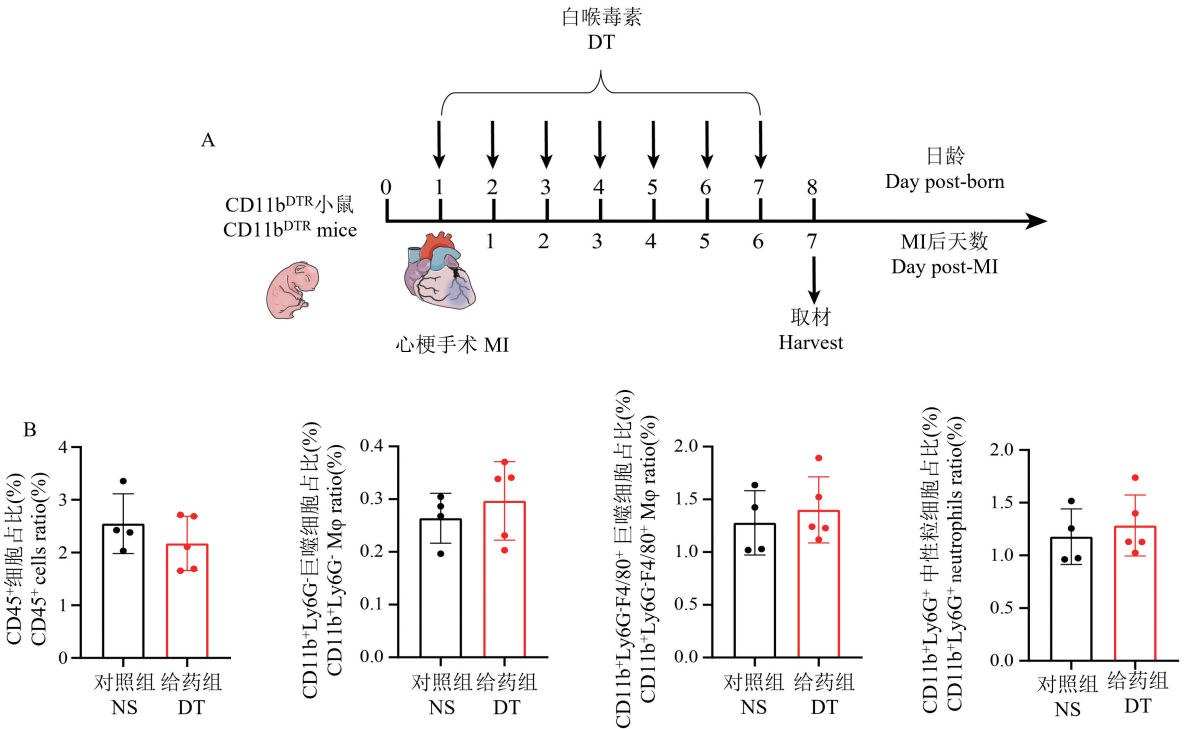


注:A:1、3、5 日龄给药消除巨噬细胞的实验流程图;B:NS 组和 DT 组各类群细胞占比结果柱状图, $n(\text{对照组}):n(\text{给药组})=4:3$ 。

图 4 1、3、5 日龄给药消除巨噬细胞结果图

Note. A. The flow chart of the experiment of eliminating macrophages by administration of 1, 3, 5 day old. B. Histogram of the percentage results of various groups of cells in NS group and DT group. $n(\text{NS group}):n(\text{DT group})=4:3$.

Figure 4 Results of 1, 3, 5 day old administration to eliminate macrophages

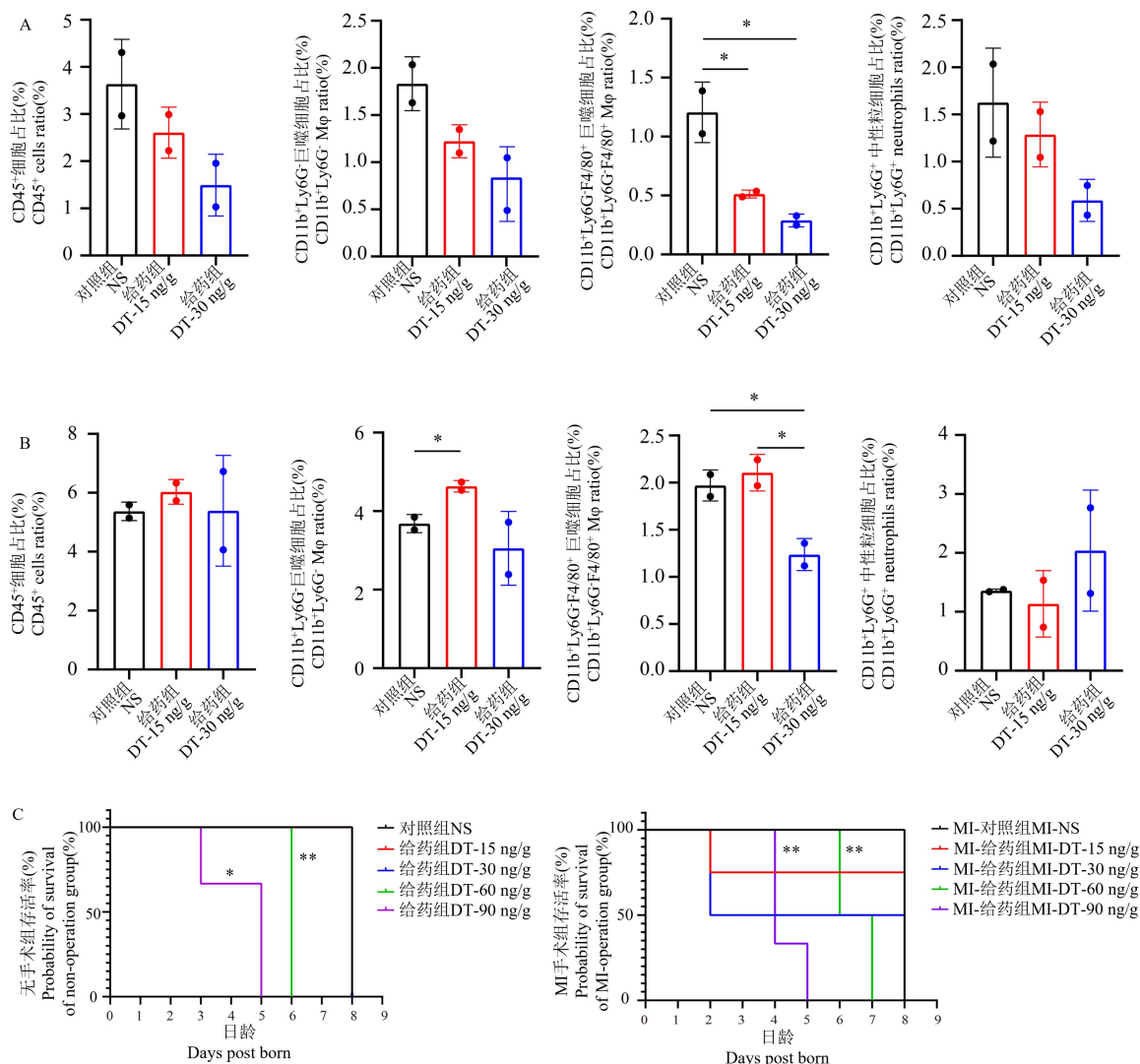


注:A:1 ~ 7 日龄给药消除巨噬细胞的实验流程图;B:NS 组和 DT 组各类群细胞占比结果柱状图, $n(\text{对照组}):n(\text{给药组})=4:5$ 。

图 5 1 ~ 7 日龄给药消除巨噬细胞结果图

Note. A. The experimental flow chart of administration of drugs to eliminate macrophages from 1 ~ 7 day old. B. Histogram of the percentage results of various groups of cells in NS group and DT group. $n(\text{NS group}):n(\text{DT group})=4:5$.

Figure 5 Results of administration of drugs from 1 ~ 7 day old to eliminate macrophages



注:A;无手术组的NS组和DT组各类群细胞占比结果柱状图;B;MI手术组的NS组和DT组各类群细胞占比结果柱状图;C;无手术组和MI手术组的存活率, $n(\text{对照组}):n(\text{DT-15 ng/g组}):n(\text{DT-30 ng/g组}):n(\text{DT-60 ng/g组}):n(\text{DT-90 ng/g组})=2:2:2:0:0$;MI手术组中 $n(\text{NS组}):n(\text{DT-15 ng/g组}):n(\text{DT-30 ng/g组}):n(\text{DT-60 ng/g组}):n(\text{DT-90 ng/g组})=2:2:2:0:0$;与NS组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图6 无手术组、MI手术组、1~7日龄给药消除巨噬细胞结果图

Note. A. Histogram of the percentage results of various groups of cells in NS group and DT group without operation. B. Histogram of the percentage results of various groups of cells in NS group and DT group in MI-operation group. C. Survival rate of non-operation group and MI-operation group, $n(\text{NS group}):n(\text{DT-15 ng/g group}):n(\text{DT-30 ng/g group}):n(\text{DT-60 ng/g group}):n(\text{DT-90 ng/g group})=2:2:2:0:0$. In the MI-operation group, $n(\text{NS group}):n(\text{DT-15 ng/g group}):n(\text{DT-30 ng/g group}):n(\text{DT-60 ng/g group}):n(\text{DT-90 ng/g group})=2:2:2:0:0$. Compared with NS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Results of eliminating macrophages by administration from 1 day old to 7 day old in non-operation group and MI-operation group

3 讨论

CD11b^{DTR}小鼠不进行冠状动脉结扎时,注射DT后能够显著消除心脏中巨噬细胞;CD11b^{DTR}小鼠进行冠状动脉结扎后,则注射DT无法在新生小鼠心肌组织中消除巨噬细胞。

在心肌梗死发生过程中,冠状动脉阻塞导致严重缺血,进而导致心肌细胞不可逆的死亡已成为共识。而死亡心肌细胞的内容物大量泄漏会导致炎症的发生。中性粒细胞通常是首先被招募到炎症区域的,其产生的各种促炎细胞因子和趋化因子等在炎症部位发挥作用。随后巨噬细胞被招募到炎

症发生区域,其中主要是抗炎型的巨噬细胞起到清除细胞碎片和消除炎症的作用^[21]。MI 发生后,持续严重的炎症常导致心室重构失败和心功能恶化,而炎症反应被及时控制则有利于心肌再生^[22],因此巨噬细胞浸润有利于心肌梗死后的心脏恢复。Aurora 等^[13]证明巨噬细胞在 1 日龄新生小鼠心肌梗死后的再生过程或成年小鼠心梗后的瘢痕形成中发挥了双重作用:一方面促进了 1 日龄小鼠的再生过程,如血管生成,而在成年小鼠中的研究结果表明,巨噬细胞主要介导了纤维化和瘢痕形成。2019 年,仰明明等^[23]证明了巨噬细胞与 MMP 家族之间存在作用,提示巨噬细胞可能受 MMP 家族成员的调控,影响心肌梗死后的细胞外基质结构,并最终导致纤维化。2020 年 Li 等^[15]同时使用了 AR 和 MI 模型,揭示了由巨噬细胞分泌的肿瘤抑制素 (oncostatin M, OSM) 与其受体 OSMR 介导激活 gp130,进而激活一系列通路,如 STAT3、Erk/MAPK、mTORC1、Hippo、Notch 等,同时 gp130 又独立于 Hippo 通路刺激 Src 激活 YAP 信号,实验证明 gp130-Src-Yap 参与对心肌细胞增殖的调控,促进幼年和成年心脏的再生和修复,为急性炎症反应中巨噬细胞参与心脏修复提供了进一步例证。

在已有研究的基础上,尝试针对 CD11b^{DTR} 新生小鼠构建心肌梗死模型后消除巨噬细胞,结果发现:1 日龄 CD11b^{DTR} 小鼠(无损伤)给药 15 ng/g DT 即实现了巨噬细胞成功消除。在对 1 日龄 CD11b^{DTR} 小鼠实施冠状动脉左前降支结扎手术后,注射 DT 不能够将心脏中的巨噬细胞显著消除;如果增加给药频率和给药浓度(30 ng/g),虽然初步取得了较为理想的巨噬细胞消除效果,但给药组小鼠成活率明显下降,无法应用于后续实验。

基于上述结果,分析新生小鼠心肌梗死模型建立后无法用 DT 消除巨噬细胞可能有 3 个原因:首先,DT 通过腹腔/皮下注射的方法进入小鼠体内,先弥散进入相应部位的组织液中,之后通过血液循环分配至全身,心脏等脏器均有包膜包被保护,因此注射进入体内的 DT 无法直接进入心脏内发挥作用,而是主要通过冠状动脉供给。而冠状动脉结扎严重降低梗死部位的血液灌注,并使缺乏血供的血管分支内皮细胞逐渐死亡^[24]。因此在梗死区,小鼠心脏内局部 DT 浓度不足导致巨噬细胞无法被显著消除。其次,由于最终检测的是心脏中残留的巨噬细胞,而心梗手术过程会导致较为剧烈的炎症反

应,使心脏损伤部位募集大量的巨噬细胞,如脾的巨噬细胞通过免疫调节机制代偿募集于心脏部位,因此造成在正常工作浓度 DT 的作用下,巨噬细胞的减少趋势不明显的结果。最后,尝试增加 DT 的注射量期望消除更多的巨噬细胞,但是由于 DT 本身有一定的毒性,增加 DT 的注射量造成了小鼠的大量死亡,因此我们无法通过增加 DT 注射量的方法得到心梗后巨噬细胞消除的小鼠模型。综上所述,心梗模型建立后,通过注射 DT 的方法无法实现 CD11b^{DTR} 小鼠巨噬细胞的消除模型。

后续的实验,可以考虑使用缓释微球进行心肌原位注射,延长药物作用的时间,减少作用部位药物浓度剧烈波动带来的副作用^[25];或利用 CAR (chimeric antigen receptor)-T 工具特异性消除巨噬细胞^[26],继而探讨巨噬细胞在新生小鼠心肌梗死后心肌再生中的作用与机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture [J]. *Lancet*, 2015, 385(9970): 812–824.
- [2] Sadek H, Olson EN. Toward the goal of human heart regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 7–16.
- [3] Heallen TR, Kadow ZA, Kim JH, et al. Stimulating cardiogenesis as a treatment for heart failure [J]. *Circ Res*, 2019, 124(11): 1647–1657.
- [4] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(5923): 98–102.
- [5] Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 433–436.
- [6] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078–1080.
- [7] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188–2190.
- [8] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(1): 187–192.
- [9] Lam NT, Sadek HA. Neonatal heart regeneration: comprehensive literature review [J]. *Circulation*, 2018, 138(4): 412–423.
- [10] Steffens S, Van Linthout S, Sluijter JPG, et al. Stimulating pro-reparative immune responses to prevent adverse cardiac remodelling: consensus document from the joint 2019 meeting of the ESC Working Groups of cellular biology of the heart and myocardial function [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(11): 1850–1862.
- [11] Han C, Nie Y, Lian H, et al. Acute inflammation stimulates a

- regenerative response in the neonatal mouse heart [J]. *Cell Res*, 2015, 25(10): 1137–1151.
- [12] Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, et al. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy [J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 405–409.
- [13] Aurora AB, Porrello ER, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3): 1382–1392.
- [14] Chen B, Li R, Hernandez SC, et al. Differential effects of Smad2 and Smad3 in regulation of macrophage phenotype and function in the infarcted myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2022, 171: 1–15.
- [15] Li Y, Feng J, Song S, et al. Gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Circulation*, 2020, 142(10): 967–982.
- [16] Jia D, Jiang H, Weng X, et al. Interleukin-35 promotes macrophage survival and improves wound healing after myocardial infarction in mice [J]. *Circ Res*, 2019, 124(9): 1323–1336.
- [17] Jia D, Chen S, Bai P, et al. Cardiac resident macrophage-derived legumain improves cardiac repair by promoting clearance and degradation of apoptotic cardiomyocytes after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2022, 145(20): 1542–1556.
- [18] Li Y, Li H, Pei J, et al. Transplantation of murine neonatal cardiac macrophage improves adult cardiac repair [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(2): 492–494.
- [19] Cardoso AC, Pereira AHM, Sadek HA. Mechanisms of neonatal heart regeneration [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2020, 22(5): 33.
- [20] Simões FC, Cahill TJ, Kenyon A, et al. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 600.
- [21] Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2): 117–129.
- [22] Liu R, Nie Y, Lian H, et al. Extending the time window of mammalian heart regeneration by thymosin beta 4 [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(12): 2417–2424.
- [23] 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.
- [24] Tang YP, Liu Y, Fan YJ, et al. To develop a novel animal model of myocardial infarction: a research imperative [J]. *Anim Model Exp Med*, 2018, 1(1): 36–39.
- [25] Nkanga CI, Fisch A, Rad-Malekshahi M, et al. Clinically established biodegradable long acting injectables: an industry perspective [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 167: 19–46.
- [26] Rurik JG, Tombácz I, Yadegari A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury [J]. *Science*, 2022, 375(6576): 91–96.

[收稿日期] 2022–10–14