DOI: 10.14188/j.1671-8852.22024.0148
文章编号 1671-8852(2025)04-0463-06

趋化因子配体5通过诱导巨噬细胞极化促进主动脉夹层发生

袁 铭 王 乐
武汉大学中南医院心血管外科/心脏大血管外科微创诊疗湖北省工程研究中心/武汉市结构性心脏病微创诊疗临床医学研究中心 湖北 武汉 430071

摘要 目的：探究趋化因子配体5(CCL5)在主动脉夹层(AD)发生发展中的作用。方法：收集临床健康主动脉组织(来自临床健康捐献者)及夹层主动脉组织(来自AD患者)进行检测。使用3周龄C57BL/6小鼠分别喂食含或不含0.25%氨基丙腈(BAPN)的纯净水2周，并继续观察2周后，收集主动脉样本进行检测。使用原代细胞提取、蛋白质免疫印迹、实时荧光定量PCR、免疫荧光技术探究CCL5在AD发生中的作用。结果：相较于正常主动脉组织，CCL5在AD患者及小鼠AD模型的主动脉组织中，蛋白及mRNA表达上调；免疫荧光证实CCL5与M1型巨噬细胞共定位；体外实验证实CCL5通过CCR1受体促进小鼠骨髓原代巨噬细胞M1极化。结论：CCL5可能通过作用于CCR1受体诱导巨噬细胞向M1方向极化从而诱导AD的发生。

关键词 CCL5；主动脉夹层；巨噬细胞极化
中图分类号 R34
文献标识码 A
开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

C-C motif chemokine ligand 5 promotes aortic dissection by inducing macrophage polarization

YUAN Ming, WANG Le
Dept. of Cardiovascular Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University; Hubei Engineering Research Center for Minimally Invasive Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Surgery; & Wuhan Minimally Invasive Diagnosis and Treatment Clinical Medical Research Center for Structural Heart Disease, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the role of CCL5 in the development and progression of aortic dissection (AD). **Methods:** The healthy aortic tissues (from clinical health donors) and aortic tissues with AD (from patients with AD) were collected clinically for testing. Three-week-old C57BL/6 mice were fed with purified water containing or without 0.25% aminoacetonitrile (BAPN) for two weeks and were observed for two weeks before collecting aortic samples for testing. The effects of CCL5 on the development of AD were explored using primary cell extraction, protein immunoblotting, real-time fluorescence quantitative PCR, and immunofluorescence. **Results:** Compared with those in normal aortic tissues, CCL5 protein and mRNA expression were upregulated in the aortic tissue of

课题来源：国家自然科学基金资助项目(编号：82200534)
作者简介：袁铭，男，1998—，医学硕士生，主要从事心血管相关疾病的基础研究，E-mail：mingyuan@whu.edu.cn
通信作者：王乐，男，1965—，副主任医师，主要从事心血管外科的临床、科研及教学研究，E-mail：wangleznh@126.com

AD patients and mouse AD models; Immunofluorescence confirmed co-localization of CCL5 with M1 macrophages; *In vitro* experiments confirmed that CCL5 promoted M1 polarization of primary mouse bone marrow-derived macrophages through the CCR1 receptor. **Conclusion:** CCL5 might induce macrophage polarization towards the M1 direction, thus inducing the occurrence of AD.

Key Words CCL5; Aortic Dissection; Macrophage Polarization

主动脉夹层(aortic dissection,AD)作为一种侵袭性血管疾病,死亡率极高[1]。主动脉中层结构的完整对于主动脉功能的维持至关重要。炎症是AD发生的关键因素,AD的进展中存在大量炎性细胞如巨噬细胞的浸润,炎性因子的累积导致主动脉中层与内膜的进行性破坏进而诱导夹层的破裂。炎性巨噬细胞的转化及浸润可发生在AD进展的不同时期。高血压、退行性病变或某些遗传因素会激活体内多种调节系统如肾素-血管紧张素系统,多种炎症因子刺激下的巨噬细胞表现出促炎M1表型,可以分泌更多的炎性因子及基质金属蛋白酶(MMPs),导致主动脉内膜损伤,破坏主动脉结构,乃至AD的发生[2-5]。趋化因子配体5(C-C motif chemokine ligand 5,CCL5)是趋化因子CC亚家族中的一员[6],其主要表达于炎性巨噬细胞及肿瘤相关巨噬细胞中,发挥致炎及促肿瘤转移的作用[7-8]。CCL5主要通过与细胞膜受体CCR1、CCR3、CCR5结合[9],激活胞内致病信号通路,诱导疾病发生。例如CCL5与CCR5的结合可以通过活化NF-κB通路介导血管损伤;与CCR1的结合通过激活Erk通路介导前列腺癌细胞侵袭[10-11]。

CCL5致炎作用广泛,参与了多种心血管疾病的发生和进展。据报道[12]CCL5可被WWP2转录调节,介导高表达Ly6c的一组巨噬细胞群的浸润与侵袭,促进心肌纤维化发生;CCL5中和抗体的预处理可以显著减缓心肌梗死后的巨噬细胞浸润及心功能下降[13]。然而,CCL5在AD中的作用却鲜有报道,本研究旨在明确CCL5与AD之间的关系,探索CCL5在AD中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 人体组织标本获取 本研究中收集了2023年9月20日—11月30日间8例临床来自器官捐献者的正常主动脉组织及AD患者的主动脉组织。器官捐献者已排除所有可能的心血管相关基础疾病,疾病主动脉组织取自因夹层撕裂而接受急诊手术患者,夹层撕裂处组织用于取材及后续鉴定。所有收集的人体组织均保存于4%甲醛或液氮中以进行后续检测。所有实验流程均遵循《赫尔辛基宣言》进行,人类心血管组织获取获得了武汉大学中南医院伦理委员会的批准(批准号:2023187)。

1.2 小鼠原代骨髓来源巨噬细胞(BMDM)提取 在无菌操作台中使用七氟醚麻醉C57BL/6小鼠,将其两侧下肢取出,将双下肢表面肌肉剥离干净后切掉其两端使骨髓完全暴露。随后使用无菌PBS(Biosharp,中国)冲洗骨髓,收集冲洗液并用40 μm筛网过滤,随后将所得溶液以500 *g*转速离心3 min,弃去上清液后加入红细胞裂解液(Biosharp,中国)吹打混匀,等待3 min后再次进行离心(500 *g*,3 min),所得沉淀使用完全培养基(DMEM高糖培养基(Gibco,美国)+胎牛血清(碧云天,中国))进行重悬并铺板,在第1,3,5天分别更换带有巨噬细胞集落刺激因子M-CSF(30 ng·mL^{-1},MCE,美国)的完全培养基以获得BMDM,第7天后细胞即可用于实验。所有动物实验均获得了武汉大学中南医院伦理委员会的批准(ZN2022124)。

1.3 小鼠AD模型的建立 选用3周龄C57BL/6小鼠进行造模。对照组小鼠喂食纯净水,造模组小鼠喂食掺入0.25%氨基丙腈(BAPN,索莱宝,中国)的纯净水。水罐均采用锡纸避光处理,每两日更换一次饮用水,造模时间持续2周。最后一次给药后观察2周以确定小鼠死亡率,随后对存活小鼠进行主动脉取材。

1.4 小鼠原代骨髓来源巨噬细胞处理方法 ①对于CCL5的细胞干预:使用重组CCL5蛋白(recombinant CCL5,MCE,美国),浓度为100 ng·mL^{-1}。②对于M1,M2型巨噬细胞的诱导:使用脂多糖(200 ng·mL^{-1},MCE,美国)与干扰素-γ(2.5 ng·mL^{-1},MCE,美国)刺激原代巨噬细胞12 h以获得M1型巨噬细胞;使用白细胞介素4(IL-4,10 ng·mL^{-1},MCE,美国)刺激原代巨噬细胞12 h以获得M2型巨噬细胞。

1.5 蛋白质免疫印迹 使用RIPA裂解液(碧云天,中国)消化相关组织及细胞,完全消化后加入5×loading buffer(碧云天,中国)混匀,在95 ℃中加

热 10 min 以获得蛋白样品。根据所需蛋白分子量选择不同百分比的凝胶进行电泳，将分离完成的凝胶覆盖上 PVDF 膜(默克，美国)进行转印。随后使用脱脂牛奶进行封闭，根据所需蛋白分子量裁剪条带并进行一抗孵育，4 ℃孵育 12 h。随后，将膜与 HRP 缀合的抗小鼠或抗兔 IgG 二级抗体(1∶10 000，ABclonal，中国)进一步孵育。用化学发光检测试剂盒(Abbkine，中国)成像蛋白带，并用 ImageJ 软件量化蛋白带的强度。本研究所用的抗体如下：抗 CCL5 抗体(1∶1 000，E9S2K，CST，美国)，抗 GAPDH 抗体(1∶3 000，10494-1-AP，Proteintech，美国)，抗 INOS 抗体(1∶1 000，ab178945，abcam，美国)，抗 ARG1 抗体(1∶1 000，93668，CST，美国)，抗 IL-1β 抗体(1∶1 000，A16288，Abclonal，中国)，抗 MMP2 抗体(1∶1 000，A19080，Abclonal，中国)。

1.6　免疫荧光实验　用 4% 甲醛固定附着在细胞载玻片上的处理过的原代巨噬细胞。使用吐温 80(碧云天，中国)将细胞通透处理，使用溶解有 0.1% 吐温 20(碧云天，中国)的 2%BSA(碧云天，中国)溶液封闭 1 h，随后与一抗在 4 ℃下孵育 12 h。PBST(PBS＋0.4% 吐温-80)洗涤后，将载玻片与 Alexa Fluor 594 标记或 DyLight 488 标记的抗兔或抗小鼠二级抗体(1∶200，Abbkine，中国)在室温下孵育 2 h。随后，用 4，6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)(Abbkine，中国)对载玻片进行复染，并应用正置荧光显微镜(Olympus，日本)和共聚焦显微镜(Leica，德国)捕获荧光图像。使用 ImageJ 软件进行图像共定位分析，将图像拆分为红、绿、蓝三通道，将多幅图像变成图像栈后使用 Plot profile 明确图像共定位情况。

1.7　RNA 提取与实时荧光定量 PCR　根据试剂商的方案，使用 TRIzol(Vazyme，中国)从细胞和主动脉组织中提取总 RNA。使用 HiScript Ⅲ RT SuperMix(＋gDNA wiper)试剂盒(Vazyme，中国)合成 cDNA，随后在 BIO-RAD CF96 系统上使用 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒(Abclonal，中国)进行 qRT-PCR。所使用的引物序列如表 1 所示。

表 1　引物序列

GENE	Sequence (5′—3′)	Organism
CCL5 FP	TTTCGGGTGACAAAGCTTGC	Human
CCL5 RP	GCAGTCGTCCACAGGTCAAG	Human
CCL5 FP	AAGATCTCTGCAGCTGCCCT	mouse
CCL5 RP	GAGCCATATGGTGAGGCAGG	mouse
INOS FP	AATCTTGGAGCGAGTTGTGG	mouse
INOS RP	CAGGAAGTAGGTGAGGGCTTG	mouse
ARG1 FP	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	mouse
ARG1 RP	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	mouse

1.8　统计学分析　采用 GraphPad prism 8.0 软件进行统计分析，正态分布数据，使用 t 检验进行组间差异分析，$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　CCL5 在人与小鼠 AD 组织中上调　为了验证 CCL5 在 AD 组织中的表达，本研究收集了临床健康捐献者及 AD 患者的主动脉组织。结果显示，CCL5 的蛋白水平在 AD 中显著升高(图 1A、1B)，在 mRNA 水平也出现了类似的结果(图 1C)。随后，使用 BAPN 构建小鼠 AD 模型并绘制生存曲线(图 1D)，结果与人体组织样本一致，夹层组小鼠主动脉组织在蛋白及 mRNA 水平均出现了 CCL5 的显著上调(图 1E～1G)。

2.2　CCL5 与 M1 型巨噬细胞具有显著共定位　AD 的发生主要取决于大量的炎症浸润及动脉壁的稳定性降低，其中巨噬细胞的 M1 方向极化和平滑肌细胞的表型转换起到主要的促进作用。为了确定 CCL5 在 AD 中的体外作用，本研究对来自人体的 AD 组织进行了免疫荧光分析。CCL5 与巨噬细胞(CD68)而不是平滑肌细胞(α-SMA)发生显著共定位(图 2A、2B)，表现为 CCL5(红)与 CD68(绿)出现图像重叠并显示出淡黄色。进一步研究发现 CCL5 与 M1 型巨噬细胞(iNOS)而不是 M2 型巨噬细胞(ARG1)具有显著共定位(图 2C、2D)，CCL5(红)与 iNOS(绿)表现出明显重叠。

2.3　CCL5 介导 M1 型巨噬细胞极化　为了确定 CCL5 在调控巨噬细胞极化中的作用，本研究分别使用 LPS＋IFN-γ 和 IL-4 诱导 M1/M2 型巨噬细胞极化，结果显示 CCL5 在 M1 型巨噬细胞中存在显著高表达(图 3A)。由于 CCL5 是一种游离于血浆中的分泌蛋白，本研究使用 CCL5 重组蛋白刺激原代巨噬细胞，结果显示 CCL5 可诱导巨噬细胞的 M1 方向极化，且 CCL5 重组蛋白的预处理显著减缓了 IL-4 诱导的巨噬细胞 M2 极化(图 3B、3C)。炎性巨噬细胞分泌的炎性因子与基质金属蛋白酶在 AD 的形成和发展中起到至关重要的作用，CCL5 与其主要受体的结合可能是介导这一过程的关键因素。使用其 3 种主要受体的拮抗剂(BX471-CCR1、SB200726-CCR3、MARAVIROC-CCR5)探究

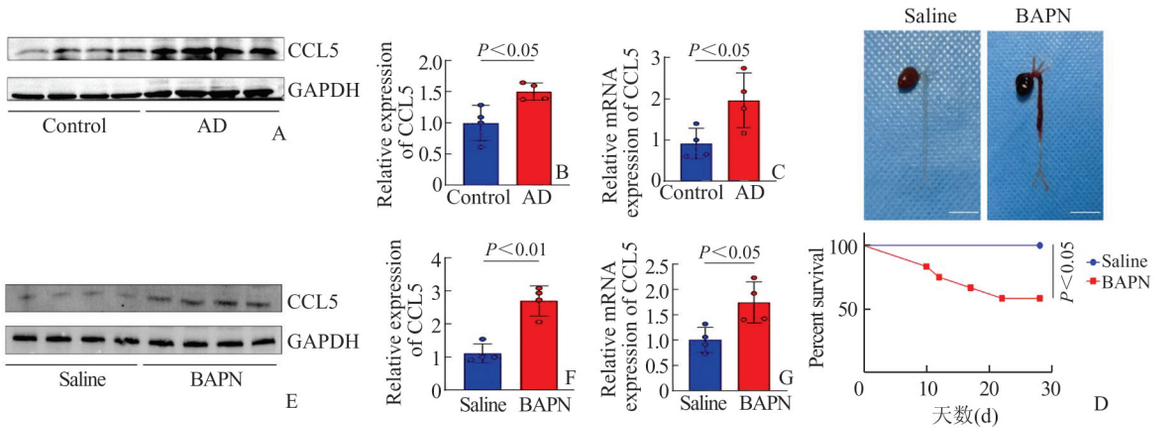


图1 CCL5在人与小鼠AD组织中表达情况

A、B. 健康(Control)及AD人体主动脉组织的CCL5蛋白质免疫印迹结果及统计分析(n=4);C. 健康(Control)及AD人体主动脉组织CCL5的mRNA水平差异分析(n=4);D. 对照组(Saline)与BAPN组小鼠主动脉组织解剖图示及生存曲线;E、F. 对照(Saline)及BAPN组小鼠主动脉组织的CCL5蛋白质免疫印迹结果及统计分析(n=4);G. 对照(Saline)及BAPN组小鼠主动脉组织CCL5的mRNA水平差异分析(n=4);P<0.05代表具有统计学意义

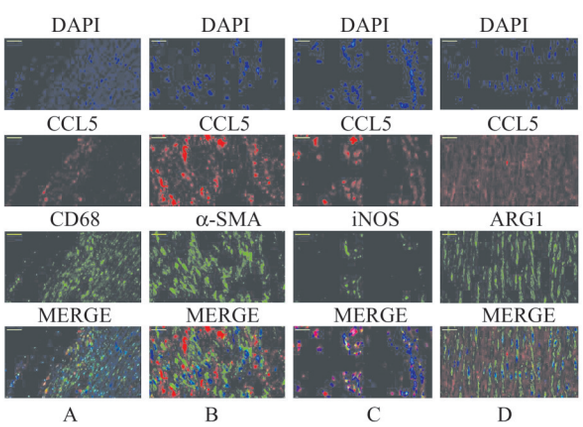


图2 人体AD主动脉组织中CCL5与各类细胞标志物的荧光共定位图

A~D. 人体AD主动脉组织中CCL5与CD68、α-SMA、iNOS、ARG1的荧光共定位照片,图中标尺:50 μm

CCL5介导AD的下游因素,结果显示,BX471的预处理显著减弱了CCL5介导的巨噬细胞炎性因子及基质金属蛋白酶的分泌(图3D~3F)。综上,CCL5可能通过与CCR1结合诱导巨噬细胞M1极化并分泌相关炎性介质诱导AD的发生,针对CCL5或其受体CCR1的干扰可能是治疗AD的有效手段。

3 讨论

本研究发现CCL5在AD的发生发展中具有促进作用。CCL5在人及小鼠AD组织中均出现上调,并且CCL5可能通过与CCR1受体结合,诱导巨噬细胞的M1极化,加深主动脉区域的炎症浸润与基质降解,CCL5及其受体CCR1的拮抗可能是预防AD的重要措施。

CCL5由于其促炎及促细胞迁移的功能,在多种心血管疾病中均有参与。在Chagas心脏病中CCL5通过与CCR1受体结合介导免疫细胞浸润与心肌损伤[14]。CCL5还与高血压严重程度相关,CCL5参与血管紧张素2(angiotensin 2,AngⅡ)诱导的巨噬细胞在血管中的聚集,并参与内皮功能障碍与血管氧化应激的发生[15]。在一项关于肺动脉高压的研究[16]中,肺动脉高压患者来源平滑肌细胞中CCL5显著升高,CCL5的全身敲除通过恢复BMPR2信号转导减弱平滑肌细胞的增殖及迁移,从而逆转肺动脉高压形成。在AD的病理过程中,诸如平滑肌细胞表型转换、巨噬细胞浸润及内皮炎症等均参与其发病过程。作为AD破裂的重要危险因素,CCL5在血管内高压中的促进作用使其成为AD的潜在危险因素。本研究确认了CCL5在AD患者及小鼠模型中上调并可能作为AD的致病因素。

M1/M2型巨噬细胞的比例失调在AD的进展中发挥广泛的促进作用,当前研究认为M1型巨噬细胞起到促炎的破坏作用,M2型巨噬细胞起到修复及再生作用。据报道[17]AT1R可以结合AngⅡ诱导YAP磷酸化,进而促进M1型巨噬细胞极化从而引发AD,表明AngⅡ诱导下的巨噬细胞M1极化对AD的促进作用。而在BAPN诱导的AD模型中,有报道称NEU1的巨噬细胞特异性缺失可以有效地减少主动脉区域的炎症及动脉壁破坏,而这与巨噬细胞的M2极化显著相关[18]。多种趋化因子及其受体被报道参与巨噬细胞极化进程,如CCR2的敲除通过减少巨噬细胞募集与减少炎症生成来缓解

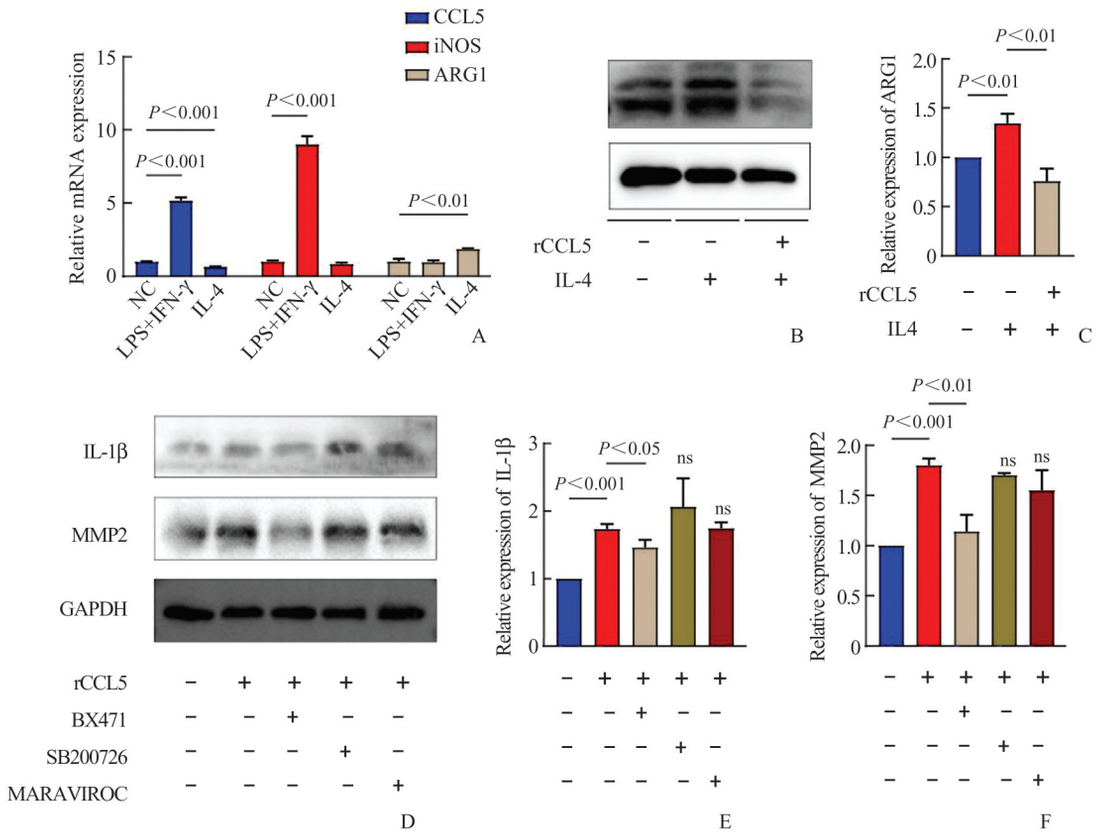


图 3　CCL5 在调控巨噬细胞极化中的作用

A. qPCR 结果显示 CCL5 在不同分化方向的巨噬细胞中的相对表达(n=3)；B、C. CCL5 介导 M1 型巨噬细胞极化的蛋白质免疫印迹及统计分析(n=3)；D～F. CCL5 受体相关拮抗剂预处理后，CCL5 重组蛋白诱导巨噬细胞产生 IL-1β 及 MMP2 的蛋白质免疫印迹及统计分析(n=3)；P<0.05 代表差异存在统计学意义；ns 代表差异无统计学意义

肝纤维化[19]。CCL7 可能通过 JAK/STAT 通路的激活促进巨噬细胞 M1 极化从而诱导腹主动脉瘤形成[20]。本研究结果表明 CCL5 在 AD 中与 M1 型巨噬细胞共定位，CCL5 可诱导 M1 型巨噬细胞形成。

趋化因子与其受体的结合是完成其生物功能的关键步骤，CCL5 受体相关抑制剂因其广泛的抗炎效果，在多种疾病中均起到保护作用。如 CCR1 受体拮抗剂 BX471 拮抗 CCL6-CCR1 轴传导，从而实现抗气道炎症及嗜酸粒细胞分化[21]。CCR5 受体拮抗剂因其抑制艾滋病病毒繁殖的能力已被 FDA 批准为临床治疗艾滋病用药[22]。本研究结果证明 CCL5 在促进 AD 发展的过程中主要依靠与 CCR1 结合完成其生物学作用，CCR1 的药理学抑制(BX471)减缓了 CCL5 导致的巨噬细胞 M1 极化及相关炎症介质释放，如果将 BX471 用于体内实验，我们预计会得到更为确切的结果。

总之，本研究证实 CCL5 是一种在 AD 中高度表达的趋化因子配体，CCL5-CCR1 轴可能在 AD 的进展中起到重要作用。

参考文献

[1] SHEN Y H, LEMAIRE S A, WEBB N R, et al. Aortic aneurysms and dissections series: Part Ⅱ[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(4): e37-e46.

[2] CIFANI N, PROIETTA M, TRITAPEPE L, et al. Stanford-a acute aortic dissection, inflammation, and metalloproteinases: A review[J]. Ann Med, 2015, 47(6): 441-446.

[3] WANG X H, ZHANG H P, CAO L, et al. The role of macrophages in aortic dissection[J]. Front Physiol, 2020, 11: 54.

[4] LUO F, ZHOU X L, LI J J, et al. Inflammatory response is associated with aortic dissection[J]. Ageing Res Rev, 2009, 8(1): 31-35.

[5] VAN DORST D C H, DE WAGENAAR N P, VAN DER PLUIJM Ⅰ, et al. Transforming growth factor-β and the renin-angiotensin system in syndromic thoracic aortic aneurysms: Implications for treatment[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2021, 35(6): 1233-1252.

[6] ALDINUCCI D, BORGHESE C, CASAGRANDE N. The CCL5/CCR5 axis in cancer progression[J]. Cancers, 2020, 12(7): 1765.

[7] JONGSTRA-BILEN J, TAI K, ALTHAGAFI M G, et al. Role of myeloid-derived chemokine CCL5/RANTES at an early stage of atherosclerosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2021, 156: 69-78.

[8] XU W H, WU Y H, LIU W R, et al. Tumor-associated macrophage-derived chemokine CCL5 facilitates the progression and immunosuppressive tumor microenvironment of clear cell renal cell carcinoma[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(13): 4884-4900.

[9] HUANG R L, GUO L, GAO M H, et al. Research trends and regulation of CCL5 in prostate cancer[J]. OncoTargets Ther, 2021, 14: 1417-1427.

[10] SINGH S, BRUDER-NASCIMENTO A, BELIN DE CHANTEMELE E J, et al. CCR5 antagonist treatment inhibits vascular injury by regulating NADPH oxidase 1[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 195: 114859.

[11] KATO T, FUJITA Y, NAKANE K, et al. CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxane-resistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling [J]. Cytokine, 2013, 64(1): 251-257.

[12] CHEN H M, CHEW G, DEVAPRAGASH N, et al. The E3 ubiquitin ligase WWP2 regulates pro-fibrogenic monocyte infiltration and activity in heart fibrosis[J]. Nat Commun, 2022, 13: 7375.

[13] MONTECUCCO F, BRAUNERSREUTHER V, LENGLET S, et al. CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice[J]. Eur Heart J, 2012, 33(15): 1964-1974.

[14] BATISTA A M, ALVARADO-ARNEZ L E, ALVES S M, et al. Genetic polymorphism at CCL5 is associated with protection in Chagas′ heart disease: Antagonistic participation of $CCR1^{+}$ and $CCR5^{+}$ cells in chronic chagasic cardiomyopathy[J]. Front Immunol, 2018, 9: 615.

[15] MIKOLAJCZYK T P, NOSALSKI R, SZCZEPANIAK P, et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension[J]. FASEB J, 2016, 30(5): 1987-1999.

[16] NIE X W, TAN J X, DAI Y A, et al. CCL5 deficiency rescues pulmonary vascular dysfunction, and reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent BMPR2 activation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 116: 41-56.

[17] WANG X H, ZHANG H P, GE Y Y, et al. AT1R regulates macrophage polarization through YAP and regulates aortic dissection incidence[J]. Front Physiol, 2021, 12: 644903.

[18] WANG Q, CHEN Z Y, PENG X P, et al. Neuraminidase 1 exacerbating aortic dissection by governing a pro-inflammatory program in macrophages[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 788645.

[19] SEKI E, DE MINICIS S, INOKUCHI S, et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2009, 50(1): 185-197.

[20] XIE C P, YE F M, ZHANG N, et al. CCL7 contributes to angiotensin Ⅱ-induced abdominal aortic aneurysm by promoting macrophage infiltration and pro-inflammatory phenotype[J]. J Cellular Molecular Medi, 2021, 25(15): 7280-7293.

[21] DU X F, LI F, ZHANG C, et al. Eosinophil-derived chemokine (hCCL15/23, mCCL6) interacts with CCR1 to promote eosinophilic airway inflammation[J]. Sig Transduct Target Ther, 2021, 6: 91.

[22] VICENTI I, DRAGONI F, MONTI M, et al. Maraviroc as a potential HIV-1 latency-reversing agent in cell line models and *ex vivo* CD4 T cells[J]. J Gen Virol, 2021, 102(1): 102.

(2024-03-04收稿)
编辑 沈建国