

C57BL/6 小鼠动脉粥样硬化中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 和 TGF- β 的表达及其意义

陈越峰 陶琳琳 王庆航 朱 洁 周碧蓉

摘要 目的 通过建立 C57BL/6 小鼠动脉粥样硬化模型探讨 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 在动脉粥样硬化发病及治疗过程中的作用。方法 24 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 正常对照组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组。正常对照组给予基础饲料, 其余组给予高脂饲料。高脂饲养 4 周后, 阿托伐他汀组继续高脂饲养并加用阿托伐他汀干预, 3 组共观察 16 周。苏木精染色观察血管病变情况, 流式细胞仪检测外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的表达情况, ELISA 法检测外周血 TGF- β 浓度。结果 ① 动脉粥样硬化组的动脉血管的内膜显著增生, CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞比例显著低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。阿托伐他汀组的动脉血管较动脉粥样硬化组病变明显减轻。阿托伐他汀组的 CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞比例较动脉粥样硬化组有显著提升 ($P < 0.01$), 与正常对照组差异无统计学意义。② 动脉粥样硬化组 TGF- β 浓度较正常对照组明显降低 ($P < 0.01$)。阿托伐他汀组的 TGF- β 的浓度显著高于动

脉粥样硬化组 ($P < 0.01$); 较正常对照组略低, 差异无统计学意义。结论 CD4⁺ CD25⁺ Treg 及其分泌的 TGF- β 具有抑制动脉粥样硬化发展的作用, 有望成为治疗动脉粥样硬化的新靶点。

关键词 调节性 T 细胞; 动脉粥样硬化; 流式细胞仪; 阿托伐他汀

中图分类号 R 541.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0888-04

动脉粥样硬化是一种血管壁有大量脂质沉积的慢性炎症疾病, 好发于大动脉并伴随有免疫细胞的浸润, 如巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和 T 淋巴细胞^[1]。研究^[2] 证明免疫反应在动脉粥样硬化的发展中起着重要的作用, 但是其相关的机制并不明确。CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是一种具有抑制功能的 T 细胞亚群, Treg 在红斑狼疮、白血病以及动脉粥样硬化的病理过程中发挥着重要的作用^[3]。Treg 数量的减少将会破坏机体自身免疫耐受调节^[4]。转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β) 是 CD4⁺ CD25⁺ Treg 主要产生的一种细胞因子^[5]。Treg 在动脉粥样硬化中的作用已经成为当前研究的热点。该研究通过建立

2015-02-09 接收

基金项目: 安徽医科大学第一附属医院博士启动基金; 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2011A158)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心血管内科, 合肥 230022

作者简介: 陈越峰, 男, 硕士研究生;

周碧蓉, 女, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: zhoubirong1@hotmail.com

nine (3-MA) or chloroquine (CQ). The cell viability was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The change of autophagy-related protein LC3 was analysed by Western blot assay. **Results** MTT assay demonstrated that TM could time-dependently induce the death of HepG2 cells and L-02 cells, and the cell viability of HepG2 cells was significantly restrained when it was administrated in combination with 3-MA or CQ, the cell survival rates of 24 h were: 3-MA + TM (60%), CQ + TM (72%), TM (86%) respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). However, it had no significant effect with L-02 cells because of its cell survival rates of 24 h were: 83%, 84% and 83%. Flow cytometry apoptosis experiment found that: TM + 3-MA, CQ + TM and TM group on HepG2 cell apoptosis rates were 15%, 11% and 7% respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). But for L-02 cell group, the apoptosis rates were 16%, 17%, 16% which had no obvious difference. According to the results of Western blot, TM could cause increased autophagy, and autophagy inhibitor CQ could lead to increased autophagy tide. **Conclusion** The cell viability of HepG2 cells, not the L-02 cells, can be significantly restrained by TM combined with different autolysosome inhibitor 3-MA or CQ. So the autophagy can protect the hepatocarcinoma cell line HepG2 under the state of endoplasmic reticulum stress, and it can't provide the same protection to L-02 cell line.

Key words autophagy inhibitors; endoplasmic reticulum stress; liver neoplasms; liver cell

C57BL/6 小鼠模型探讨动脉粥样硬化发病过程中的 $CD4^+CD25^+$ Treg 及相关因子 TGF- β 的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 动物分组和模型建立 24 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,实验初始体重为 (25 ± 5) g,由安徽医科大学动物中心提供。适应性饲养 1 周,随机分为 3 组:正常对照组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组,每组 8 只。其中正常对照组给予基础饲料,动脉粥样硬化组和阿托伐他汀组给予高脂饲料(含 81.85% 基础饲料、0.15% 胆固醇、18% 猪油);饲养 4 周后,阿托伐他汀组继续用高脂饲料并加用阿托伐他汀干预[阿托伐他汀溶于无菌生理盐水中,按 $2.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃]^[6]。各组小鼠均自由饮水。动物模型制备时间为 16 周。

1.2 主要药物和试剂 阿托伐他汀片购自美国辉瑞公司;小鼠 Treg 流式试剂盒购自美国 eBioscience 公司;小鼠 TGF- β 试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司;小鼠外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;苏木精试剂盒购自北京海德生物公司;猪油为市售使用猪油。

1.3 组织标本留取 16 周饲养结束后,小鼠禁食 12 h 后处死,用水合氯醛 $1 \text{ mg}/\text{kg}$ 腹腔注射麻醉,固定于手术台上,剖开胸腔、腹腔、心包,先后用 0.9% 生理盐水及 4% 多聚甲醛从左心室逆行灌注固定主动脉后,自心脏根部至膈主动脉分叉处离断后取出,10% 的中性福尔马林固定,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,主动脉根部开始,行连续石蜡切片,切片厚度为 $5 \mu\text{m}$,每张切片取 2 个组织面,每隔 10 张取 1 张切片,每只小鼠取 4 张,行 HE 染色。

1.4 流式细胞仪检测 小鼠内眦静脉采血 0.3 ml,生理盐水稀释至 1 ml,取一支 15 ml 离心管,加入 1 ml 分离液置于 $18 \sim 22^\circ\text{C}$ 条件下。将血液样本小心加于分离液液面上。 $18 \sim 22^\circ\text{C}$, $1\,500 \text{ r}/\text{min}$ 离心 20 min。离心后,用吸管小心吸出分离液上层(包含白细胞的细胞层) 0.5 cm 以上的上清液,弃去。用吸管小心吸取分离液层、白细胞层及红细胞层置于另一新离心管内。所得离心管中加入 10 ml 细胞洗涤液混匀。 $18 \sim 22^\circ\text{C}$, $1\,200 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min。弃上清液,重复 1 次,细胞计数。每管加入细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的淋巴细胞悬液,1 号管加入 $0.125 \mu\text{g}$

CD4 FITC 及 $0.06 \mu\text{g}$ CD25 PE 抗体,各管加入相应的同型对照。加入预冷的流式细胞染色缓冲液 500 μl 洗涤细胞, $1\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min,沉淀细胞,弃上清液。用 500 μl 的流式细胞仪染色缓冲液重悬细胞,上机检测。

1.5 外周血 TGF- β 浓度 小鼠内眦静脉采血 0.3 ml, $3\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心后取得血清,使用 ELISA 法测定 TGF- β 细胞因子浓度,按照试剂盒说明书步骤。根据标准品的浓度以及相对应的光密度(optical density, OD) 450 值分析作出细胞因子的标准曲线图,根据酶标仪检测得到标本的吸光值(检测波长为 450 nm),用标准曲线二次方程式计算 TGF- β 的浓度。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 形态学改变 小鼠主动脉根部组织学特征:实验 16 周后小鼠主动脉做切片及 HE 染色,正常对照组动脉血管壁外部和内壁的弹性板完整、清晰、内皮细胞的核心染色排列均匀(图 1A)。其余各组动脉血管壁均有不同程度的变化。其中,动脉粥样硬化组血管壁不均匀增厚,血管壁有炎症细胞浸润,脂质沉积(图 1B)。与动脉粥样硬化组比较,阿托伐他汀组的血管壁增厚,少量炎症细胞浸润,病变明显减轻(图 1C)。

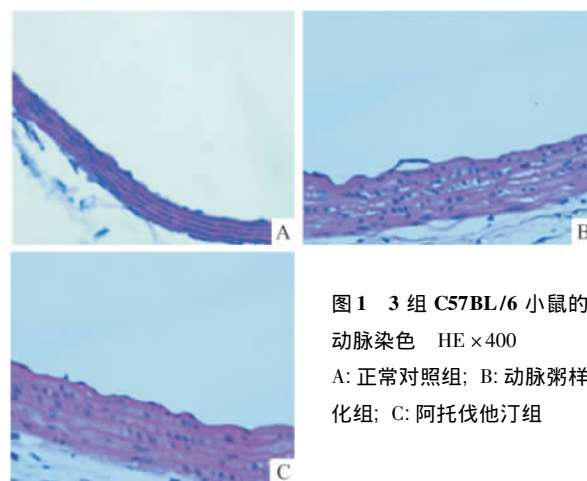


图 1 3 组 C57BL/6 小鼠的主动脉染色 HE $\times 400$
A: 正常对照组; B: 动脉粥样硬化组; C: 阿托伐他汀组

2.2 流式细胞仪检测外周血 Treg 及 TGF- β 的浓度 动脉粥样硬化组的 $CD4^+CD25^+$ Treg/ $CD4^+T$

表1 各组小鼠外周血 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞和 TGF- β 的浓度($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	动脉粥样硬化组	阿托伐他汀组	F 值
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/CD4 ⁺ (%)	10.25 \pm 1.19	6.45 \pm 1.24 ^{**}	9.75 \pm 1.17 ^{##}	30.23
TGF- β 浓度(ng/ml)	18.32 \pm 3.83	8.55 \pm 3.26 ^{**}	16.93 \pm 3.67 ^{##}	28.30

与正常对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与动脉粥样硬化组比较: ^{##} $P < 0.01$

细胞的比例显著低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。阿托伐他汀组的 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞的比例较动脉粥样硬化组有显著的提升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与正常对照组比较差异无统计学意义。动脉粥样硬化组 TGF- β 浓度显著低于正常对照组,阿托伐他汀组的 TGF- β 的浓度显著高于动脉粥样硬化组,差异有统计学意义,见表1、图2。

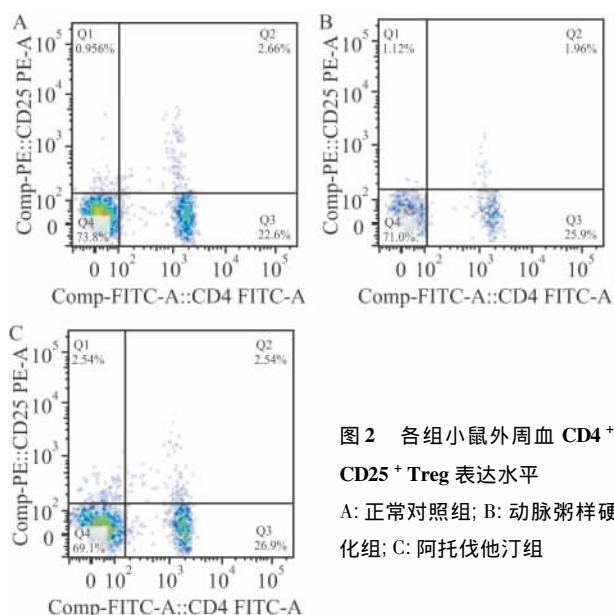


图2 各组小鼠外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平
A: 正常对照组; B: 动脉粥样硬化组; C: 阿托伐他汀组

3 讨论

动脉粥样硬化病变形成过程中免疫反应贯穿始终。失衡的免疫内环境加速动脉粥样硬化的进展。Treg 是一类 CD4⁺T 细胞亚群,是免疫反应系统重要组成部分。Treg 维持机体的免疫耐受,调节免疫系统平衡,控制自身免疫性疾病以及动脉粥样硬化的病理过程^[7]。

本研究显示,C57BL/6 小鼠在饲养 16 周后,动脉粥样硬化组的小鼠血管病变明显加重,CD4⁺CD25⁺Treg 数量较正常对照组明显下降,差异有统计学意义,证明 CD4⁺CD25⁺Treg 可以有效抑制小鼠的动脉粥样硬化的病变。研究^[8]证明输注 CD25 特异性抗体 PC61 可以显著增加斑块面积及炎症细

胞浸润,证明 CD4⁺CD25⁺Treg 可抑制动脉粥样硬化的发展,本实验结果与上述研究一致。阿托伐他汀是一种 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,对抑制动脉粥样硬化病变的发展进程和稳定斑块具有重要的作用,能够明显降低心脑血管的发生率和死亡率,在临床上已经得到验证^[9]。本实验显示阿托伐他汀干预后,与动脉粥样硬化组比较,阿托伐他汀组小鼠的动脉血管病变明显减轻,CD4⁺CD25⁺Treg 数量明显上升。研究^[10]表明可能是因为阿托伐他汀能抑制树突状细胞的成熟,而不成熟的树突状细胞能够诱导 Treg 的形成,使 Treg 增多,从而抑制动脉粥样硬化病变的发展,进一步证明 CD4⁺CD25⁺Treg 在动脉粥样硬化中的作用。研究^[11]证明体外实验中 TGF- β 可以促进 Treg 的成熟,协助 Treg 的存活和功能发挥。阻断 TGF- β 信号通路会活化效应 T 细胞,抑制 Treg 的成熟,减少 Treg 数量,大幅降低 Treg 的免疫抑制的能力^[12]。本实验结果显示动脉粥样硬化组的 TGF- β 浓度较正常对照组显著降低,而经过阿托伐他汀的治疗后,动脉粥样硬化病变的程度明显减轻,显示 TGF- β 对动脉粥样发展起到抑制作用。本研究显示动脉粥样硬化发展和治疗的过程中 CD4⁺CD25⁺Treg 比例的变化与 TGF- β 的浓度变化呈一致性,推测 CD4⁺CD25⁺Treg 能够抑制动脉粥样硬化发展的作用机制可能是因为分泌 TGF- β 这样具有免疫抑制作用的细胞因子,可能 TGF- β 的水平不足导致诱导分化 Treg 的能力下降,从而致使 Treg 的数量减少,Treg 数量不足,分泌 TGF- β 不足,机体对炎症反应抑制减弱,从而加重病变。经过阿托伐他汀干预后,Treg 的数量上升,上调 TGF- β 浓度,促使动脉粥样硬化的病变减轻。因此,TGF- β 对 Treg 的数量和功能都具有重要的作用,CD4⁺CD25⁺Treg 及其分泌的 TGF- β 可以有效抑制动脉粥样硬化的发展。

综上所述,Treg 参在动脉粥样硬化的形成和发展中发挥着重要作用。研究结果为应用 Treg 治疗动脉粥样硬化提供新的方向,有望成为治疗动脉粥样硬化的新靶点。

参考文献

- [1] Hansson G K. Inflammation ,atherosclerosis ,and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med* 2005 ,352(16) : 1685 – 95.
- [2] Ait-Oufella H , Taleb S , Mallat Z , et al. Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis [J]. *Semin Immunopathol* 2009 , 31(1) : 23 – 33.
- [3] Ji Q W ,Guo M , Zheng J S , et al. Downregulation of T helper cell type 3 in patients with acute coronary syndrome [J]. *Arch Med Res* 2009 ,40(4) : 285 – 93.
- [4] Okeke E B ,Okwor I ,Mou Z , et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine *Escherichia coli* infection [J]. *Shock* 2013 ,40(1) : 65 – 73.
- [5] He S ,Li M ,Ma X , et al. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells protect the proinflammatory activation of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2010 ,30 (12) : 2621 – 30.
- [6] 秦彦文 ,方 微 ,王绿娅 等. 阿托伐他汀对小鼠实验性动脉粥样硬化病变形成的抑制作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志* , 2006 ,8(6) : 408 – 11.
- [7] Li X L ,Liu Y ,Cao L L , et al. Atorvastatin-modified dendritic cells *in vitro* ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated Treg cells and shifted Th1/Th17 to Th2 cytokines [J]. *Mol Cell Neurosci* 2013 ,56: 85 – 95.
- [8] Ait-Oufella H , Salomon B L , Potteaux S , et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice [J]. *Nat Med* 2006 ,12(2) : 178 – 80.
- [9] Nakamura K , Sasaki T , Cheng X W , et al. Statin prevents plaque disruption in apoE-knockout mouse model through pleiotropic effect on acute inflammation [J]. *Atherosclerosis* 2009 ,206(2) : 355 – 61.
- [10] Xu H ,Li X L ,Yue L T , et al. Therapeutic potential of atorvastatin-modified dendritic cells in experimental autoimmuneneuritis by decreased Th1/Th17 cytokines and up-regulated T regulatory cells and NKR-P1(+) cells [J]. *J Neuroimmunol* 2014 ,269 (1 – 2) : 28 – 37.
- [11] Maria A , English K A , Gorham J D. Appropriate development of the liver Treg compartment is modulated by the microbiota and requires TGF- β and MyD88 [J]. *J Immunol Res* ,2014 ,2014: 279736.
- [12] Cheng X ,Yu X ,Ding Y J , et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome [J]. *Clin Immunol* 2008 ,127 (1) : 89 – 97.

Expression and significance of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells and TGF – β in C57BL/6 mice model of atherosclerosis

Chen Yuefeng ,Tao Linlin ,Wang Qinghang , et al

(*Dept of Cardiology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate effects and mechanism on CD4⁺ CD25⁺ Treg in C57BL/6 mice model of atherosclerosis. **Methods** Twenty-four male C57BL/6 mice were assigned to three groups: control group , atherosclerosis group and atorvastatin group. Control group was given normal diet , and the rest groups were given high fat diet. After 4 weeks of high fat diet , atorvastatin group was continued to keep high fat diet and given drugs. The mice were observed for 16 weeks. Vasculopathy was analyzed by hematoxylin-eosin staining. Expression of CD4⁺ CD25⁺ Treg in peripheral blood was analyzed by flow cytometry. Concentration of TGF- β was analyzed by ELISA. **Results** ① Hyperplasia of intima was observed in AS group , and the percentage of CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T cell was significantly lower than that of the control group($P < 0.01$) . Atorvastatin could significantly reduce the intimal thickness. The percentage of CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T cell was significantly higher than that of AS group($P < 0.01$) . Atorvastatin group and control group had no significant difference. ② AS group's concentration of TGF- β was significantly lower than the control group($P < 0.01$) . Atorvastatin group's concentration of TGF- β was significantly higher than that of AS group($P < 0.01$) . Atorvastatin group and control group had no significant difference. **Conclusion** Our data provides evidence to show CD4⁺ CD25⁺ Treg and autocrine secretion of TGF- β can inhibit the development of atherosclerosis , and they will be a new therapeutic target of atherosclerosis.

Key words regulatory T cell; atherosclerosis; flow cytometry; atorvastatin