

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化早期血管外膜成纤维细胞表型转化为肌成纤维细胞

徐芳¹, 刘颖², 王蔚琛¹, 蔡虹静¹, 刘巍¹, 胡维诚¹

(1. 滨州医学院病理生理学教研室, 山东省烟台市 264003; 2. 滨州医学院附属医院, 山东省滨州市 256603)

[关键词] 成纤维细胞; 血管外膜; 表型转化; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨动脉外膜成纤维细胞表型转化与早期动脉粥样硬化病灶形成的关系。**方法** 选择6周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠, 高脂喂养 2、4 和 8 周后, 在各个时间点处死动物后选取升主动脉制备连续切片, 用免疫组织化学方法观察不同时间血管外膜 α 平滑肌肌动蛋白及转化生长因子 β_1 的表达变化。体外培养高脂喂养 2 周的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和 C57BL/6 小鼠动脉外膜成纤维细胞, 免疫荧光染色检测 α 平滑肌肌动蛋白的表达, 通过透射电镜观察细胞超微结构, Western Blot 检测 α 平滑肌肌动蛋白及转化生长因子 β_1 蛋白的表达。**结果** 体内实验发现载脂蛋白 E 基因敲除小鼠高脂喂养 2 周、4 周后血管外膜检测到 α 平滑肌肌动蛋白的阳性表达, 8 周后呈现弱阳性, 随高脂喂养时间增加, 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉外膜细胞转化生长因子 β_1 表达增强。而 C57BL/6 小鼠血管外膜细胞一直未检测到 α 平滑肌肌动蛋白及转化生长因子 β_1 的阳性表达。体外实验观察到载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管外膜成纤维细胞部分表现为 α 平滑肌肌动蛋白阳性, 肌丝明显增多, α 平滑肌肌动蛋白及转化生长因子 β_1 蛋白表达水平都明显高于野生型 C57BL/6 小鼠 ($P < 0.05$), 而 C57BL/6 小鼠血管外膜成纤维细胞则表现为 α 平滑肌肌动蛋白阴性, 超微结构无明显改变。**结论** 动脉粥样硬化病灶形成早期血管外膜成纤维细胞表型即转化为肌成纤维细胞。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Differentiation into Myofibroblasts of the Adventitial Fibroblasts at the Early Stage of Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice

XU Fang¹, LIU Ying², WANG Wei-Chen¹, CAI Hong-Jing¹, LIU Wei¹, and HU Wei-Cheng¹

(1. Department of Pathophysiology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 2. Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China)

[KEY WORDS] Fibroblasts; Adventitia; Phenotypic Transformation; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between the phenotypic differentiation of adventitial fibroblasts and the early atherosclerotic lesion formation. **Methods** ApoE^{-/-} mice and wild-type C57BL/6 black mice of 6 weeks were used in this experiment. All animals were fed hyperlipidic diet for 2, 4 or 8 weeks. The ascending aorta was removed for serial sectioning. Some sections were stained with immunohistochemistry to observe the expression of α -smooth muscle-actin (α -SM-actin) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) in the adventitia at different time points. In addition the arterial adventitial fibroblasts derived from ApoE^{-/-} mice and C57BL/6 mice after hyperlipidic diet for 2 weeks were cultured. The expression of α -SM-actin was examined by immunofluorescence staining and Western Blot. The ultrastructural changes were observed by transmission electromicroscope. The expression of TGF- β_1 protein was verified by Western Blot. **Results** In vivo the adventitia exhibited positive expression of α -SM-actin after hyperlipidic diet for 2 and 4 weeks but weakly positive staining for α -SM-actin expression after hyperlipidic diet for 8 weeks. TGF- β_1 expression

[收稿日期] 2013-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470700), 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(BS2011YY038), 山东省高等学校科技计划项目(J111LF83)

[作者简介] 徐芳, 博士研究生, 副教授, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 xufang1979@163.com。刘颖, 主治医师, 研究方向为血管损伤与修复, E-mail 为 ly_1510@163.com。通讯作者胡维诚, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 huweicheng@sdu.edu.cn。

increased gradually in the adventitia with increasing duration of the hyperlipidic diet. However there was no α -SM-actin and TGF- β_1 expression in the adventitia of C57BL/6 mice all the time. In vitro part cells of ApoE^{-/-} mice showed positive α -SM-actin and obvious increase of filaments. But that was not found in C57BL/6 mice. The protein levels of α -SM-actin and TGF- β_1 were higher than C57BL/6 mice ($P < 0.05$). **Conclusion** The adventitial fibroblasts were differentiated into myofibroblasts at the early stage of atherosclerosis.

成纤维细胞作为动脉外膜最主要的细胞成分,在环境因素发生改变时具有调整其表型的能力^[1,2]。在血管内皮损伤的模型中,外膜表现出了显著增厚,其主要就是由于外膜成纤维细胞转化成肌成纤维细胞聚集引起的^[3]。但是关于动脉粥样硬化早期血管外膜成纤维细胞表型转化的报道甚少,本研究将通过整体动物及体外实验观察载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠血管外膜成纤维细胞表型的变化,探讨血管外膜成纤维细胞表型转变在早期动脉粥样硬化病灶形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 鼠购于北京大学医学部。DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司。兔多克隆抗体转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 购于美国 Santa Cruz 公司;抗小鼠波形蛋白 (vimentin) 抗体、抗小鼠结蛋白 (desmin) 抗体及抗小鼠 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SM-actin) 抗体购于美国 NeoMarkers 公司;鼠组织免疫组织化学试剂盒购于福州迈新试剂公司;兔即用型 SP 免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司;链霉亲和素-生物素-异硫氰酸酯 (strept avidin-biotin complex-fluoresceine isothiocyanate, SABC-FITC) 及链霉亲和素-生物素-cy3 (strept avidin-biotin complex-cy3, SABC-cy3) 试剂盒购于武汉博士德公司。DAPI 购于美国 Sigma 公司。

1.2 标本制备

6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠,分别给予高脂饲料(基础饲料 84.75%,饱和脂肪 15%,胆固醇 0.25%) 喂养 2 周、4 周和 8 周。在各个时间点处死动物后取升主动脉用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋制备连续切片。

1.3 免疫组织化学染色

选取部分切片进行免疫组织化学染色检测 α -SM-actin 和 Vimentin 的表达,按鼠组织免疫组织化学试剂盒说明书操作。按兔即用型 SP 免疫组织化学试剂盒说明检测 Desmin 的表达。部分切片进行

免疫荧光染色检测 TGF- β_1 的表达,按 SABC-cy3 试剂盒说明书操作,显微镜下观察采集图像。

1.4 血管外膜成纤维细胞的培养

6 周龄野生型 C57BL/6 小鼠和 ApoE^{-/-} 小鼠,高脂喂养 2 周后,颈椎脱臼处死,无菌开胸取出整条主动脉,仔细清除血细胞及血管周围脂肪组织,解剖显微镜下小心剥离外膜。用眼科剪将组织剪碎成约 1 mm³ 小块,接种到培养瓶中,加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37°C、5% CO₂ 干涸培养 2~4 h 待组织块贴牢后轻轻翻转培养瓶继续静置培养,观察大部分组织块周围爬出细胞,融合成片时,用 0.25% 胰蛋白酶消化并采用差速贴壁法纯化两次。选取第 3~5 代细胞,进行后续实验。

1.5 免疫荧光染色检测体外培养成纤维细胞中 Vimentin、 α -SM-actin 和 Desmin 的表达

取对数生长期细胞,0.25% 的胰酶将细胞消化成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^8 cells/L,接种于带爬片的 6 孔板中,静置培养 48 h 待细胞长至亚融合状态后,血清饥饿 24 h,然后更换含有 10% 胎牛血清的 DMEM,继续培养 24 h,弃去培养液,取出细胞爬片。PBS 冲洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 20 min。然后 PBS 冲洗 3 遍,3% 过氧化氢室温孵育 15 min,以消除内源性过氧化物酶。之后 Vimentin 免疫荧光染色按 SABC-FITC 试剂盒进行, α -SM-actin 及 Desmin 免疫荧光染色按 SABC-cy3 试剂盒进行。

1.6 透射电镜观察细胞超微结构

取对数生长期的细胞,用 0.25% 胰酶消化细胞成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^9 cells/L,接种于新培养瓶中,后静置培养 48 h 待细胞长至亚融合状态,血清饥饿 24 h,更换含 10% 胎牛血清的 DMEM,继续培养 24 h,然后收集细胞[约 $(15 \sim 20) \times 10^6$ 个培养细胞],经过固定、漂洗、脱水、渗透包埋与聚合、切片、染色后透射电镜下观察细胞超微结构。

1.7 Western Blot 检测 α -SM-actin 及 TGF- β_1 蛋白的表达

收集细胞加入 100 μ L 细胞裂解液,冰上孵育 20 min,10000 \times g 离心 5 min,取各组细胞的裂解液 10 μ L,各加入 5 μ L 上样缓冲液,混匀。水中煮沸 3~5 min,10000 \times g 离心 1 min,冰上放置,上样。经

电泳、考马斯亮兰染色、脱色,转膜,封闭后加入一抗 α -SM-actin 或 TGF- β_1 , 4℃ 杂交过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃ 孵育 1 h, 洗膜, 化学发光法显色。结果作半定量分析。

1.8 统计学分析

检测结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用软件 SPSS 11.5 进行分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色检测血管外膜 α -SM-actin 的表达

各个时间点的 ApoE^{-/-} 小鼠血管外膜大部分细胞呈现 Vimentin 阳性表达, Desmin 始终呈阴性, 而中膜细胞对 Vimentin、Desmin、 α -SM-actin 三种单抗均呈

阳性反应。高脂喂养 2 周的 ApoE^{-/-} 小鼠血管外膜部分细胞检测到 α -SM-actin 阳性表达, 此时并无可见内膜病灶形成, 高脂喂养 4 周后内膜出现泡沫细胞, 血管外膜 α -SM-actin 阳性表达增多, 但 8 周后外膜 α -SM-actin 呈弱阳性表达, 此时内膜动脉粥样硬化病灶进一步发展, 内膜 α -SM-actin 表达呈阳性。而 C57BL/6 小鼠血管外膜细胞只检测到 Vimentin 阳性表达, 始终未检测到 α -SM-actin 阳性表达(图 1)。

2.2 免疫荧光染色检测 TGF- β_1 表达

6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠(高脂喂养前)和各个时间点的 C57BL/6 小鼠主动脉外膜细胞均无 TGF- β_1 的表达, 高脂喂养 2 周后, ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜细胞呈现 TGF- β_1 弱阳性表达。高脂喂养 4 周后, 主动脉外膜细胞 TGF- β_1 表达增强, 此时内膜损伤处呈现 TGF- β_1 弱表达, 高脂喂养 8 周后主动脉外膜和内膜损伤处呈现 TGF- β_1 强阳性表达(图 2)。

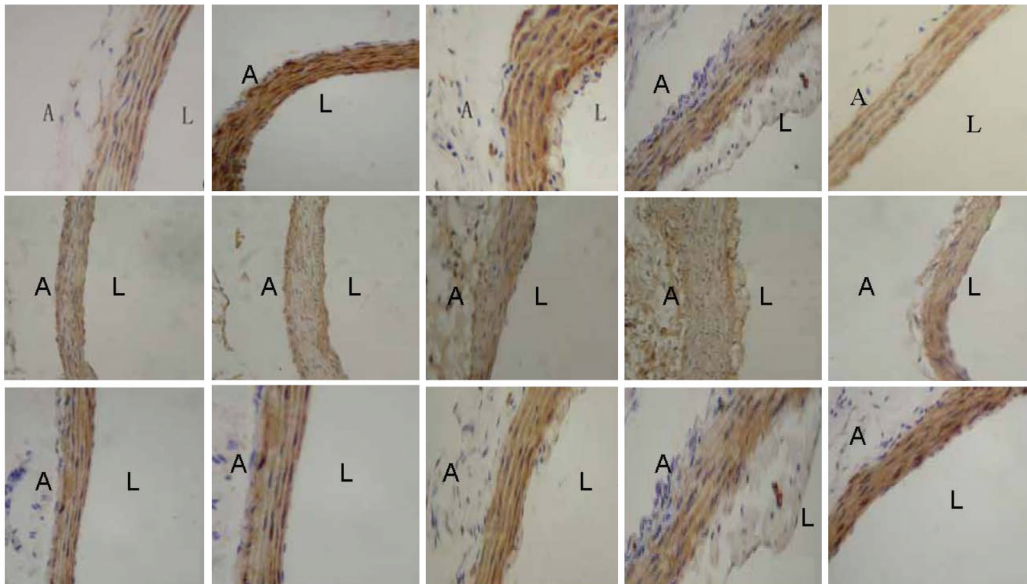


图 1. α 平滑肌肌动蛋白(上)、波形蛋白(中)、结蛋白(下)免疫组织化学染色($\times 400, n = 5$) 从左到右依次为高脂喂养前和高脂喂养 2 周、4 周、8 周 ApoE^{-/-} 小鼠以及 C57BL/6 小鼠; A 为外膜, L 为管腔。

Figure 1. Immunohistochemical staining for α -SM-actin, vimentin and desmin

2.3 免疫荧光染色检测体外培养成纤维细胞 Vimentin、 α -SM-actin 和 Desmin

ApoE^{-/-} 小鼠血管外膜成纤维细胞除了 Vimentin 染色阳性外, 还有部分细胞表现为 α -SM-actin 染色阳性, 但 Desmin 染色一直呈阴性。C57BL/6 小鼠血管外膜成纤维细胞仅表现为 Vimentin 染色阳性, 而 Desmin 和 α -SM-actin 均呈阴性反应(图 3)。

2.4 透射电镜观察细胞超微结构

C57BL/6 小鼠血管外膜细胞主要表现出典型成纤维细胞的特征, 细胞呈梭形或者不规则形, 有

多个较长的胞质突起, 核为卵圆形, 偶见微管微丝。而 ApoE^{-/-} 小鼠血管外膜细胞有部分细胞的超微结构发生改变, 可见肌丝明显增多, 呈现出肌成纤维细胞的特征(图 4)。

2.5 α -SM-actin 及 TGF- β_1 蛋白的表达

ApoE^{-/-} 小鼠成纤维细胞 α -SM-actin (5.102 ± 0.896) 及 TGF- β_1 (7.573 ± 1.043) 蛋白表达水平都明显高于 C57BL/6 小鼠 (0.126 ± 0.521 和 0.279 ± 0.769), 差异有显著性 ($P < 0.05$; 图 5)。

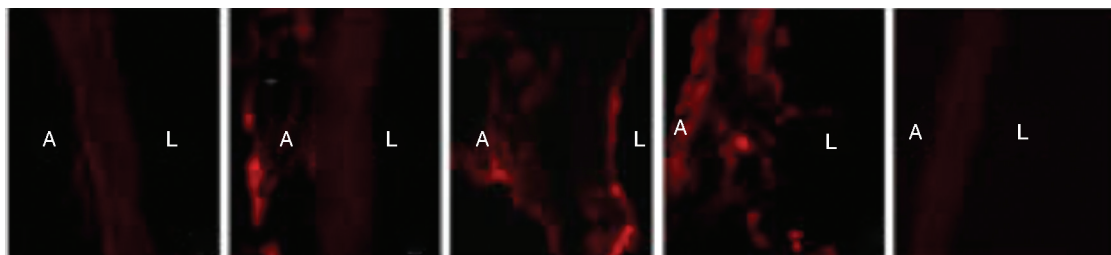


图 2. 转化生长因子 β_1 免疫荧光染色 ($\times 400, n = 5$) 从左到右依次为高脂喂养前和高脂喂养 2 周、4 周、8 周 ApoE^{-/-} 小鼠以及 C57BL/6 小鼠; A 为外膜, L 为管腔。

Figure 2. Immunofluorescence staining for TGF- β_1 ($\times 400, n = 5$)

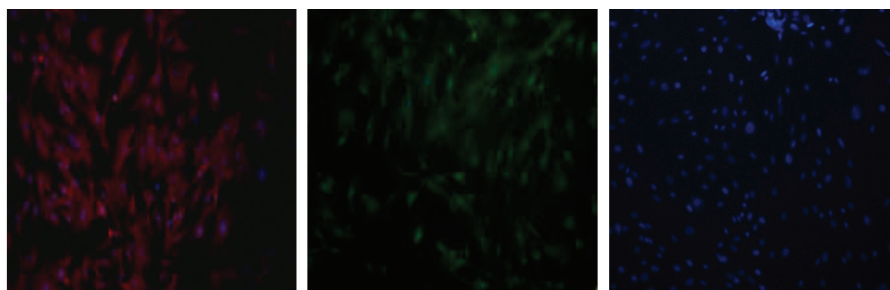


图 3. 体外培养成纤维细胞 α 平滑肌肌动蛋白 (左)、波形蛋白 (中)、结蛋白 (右) 免疫荧光染色 ($\times 100, n = 5$)

Figure 3. Immunofluorescence staining for α -SM-actin, vimentin, desmin in fibroblasts of ApoE^{-/-} mice in vitro

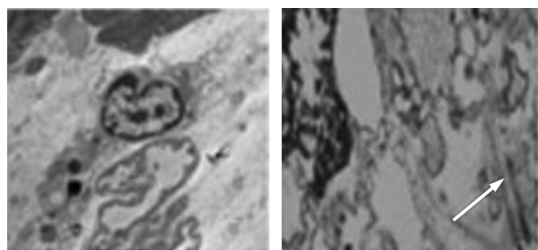


图 4. 体外培养成纤维细胞超微结构 ($n = 5$) 左为 C57BL/6 小鼠, 右为 ApoE^{-/-} 小鼠。

Figure 4. Ultrastructure of fibroblasts in vitro

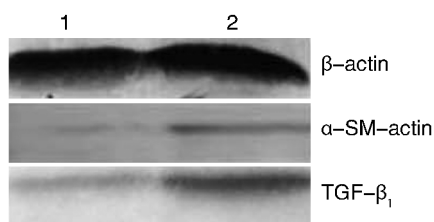


图 5. Western Blot 检测 α 平滑肌肌动蛋白及转化生长因子 β_1 蛋白的表达 ($n = 3$) 1 为 C57BL/6 小鼠, 2 为 ApoE^{-/-} 小鼠。

Figure 5. Expression of α -SM-actin and TGF- β_1 protein examined by Western Blot ($n = 3$)

3 讨论

血管外膜长期以来被认为只是充当内皮损伤

始动脉粥样硬化病灶形成的“配角”,随着研究的深入,越来越多的证据显示外膜可以通过由外而内的作用影响血管中膜及内膜。外膜是多种血管活性因子的主要来源,是血管重塑过程中的重要参与者。血管外膜发生的变化(如结缔组织生成增多、炎症反应以及细胞改变等)可能是即将发生的血管疾病的信号。在对损伤的反应过程中,外膜细胞可表现出不同的结构和功能行为,有报道在中度和重度球囊损伤实验模型中外膜的成纤维细胞表型转化为肌成纤维细胞^[4]。动脉损伤后早期血管外膜成纤维细胞逐渐转化为肌成纤维细胞^[5]。成纤维细胞的表型转化和增殖活性改变参与并促进了血管桥再狭窄的发生过程^[6]。在移植性血管病模型中发现新生内膜增生之前外膜即出现大量 α -SM-actin 阳性的肌成纤维细胞^[7]。但是关于动脉粥样硬化早期血管外膜成纤维细胞表型转化的报道甚少。本实验观察了 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化病灶形成过程中血管外膜成纤维细胞表型的变化。结果发现高脂喂养 2 周和 4 周后的 ApoE^{-/-} 小鼠血管外膜细胞发生了表型改变,其在逐渐获得 α -SM-actin 表达的同时,Desmin 染色持续阴性, Vimentin 则持续呈阳性表达。Vimentin 为间质细胞标记物, Desmin 则是高分化平滑肌细胞的标记物,结果显示所测细胞为成纤维细胞,并表现出向肌成纤维细胞转化的

特征。体外培养成纤维细胞结果也证实 ApoE^{-/-}小鼠血管外膜部分细胞的超微结构发生改变,可见肌丝明显增多,呈现出肌成纤维细胞的特征。免疫荧光染色除 Vimentin 染色阳性外,还有部分细胞表现为 α -SM-actin 染色呈阳性,但 Desmin 染色一直呈阴性,结果说明 ApoE^{-/-}小鼠血管外膜细胞仍保持了成纤维细胞的表型特点,但有部分转化为肌成纤维细胞,而非典型平滑肌细胞。肌成纤维细胞是一种具有平滑肌细胞样特点的成纤维细胞。它也能分泌细胞外基质和多种生物活性因子参与组织修复,一旦创伤愈合,肌成纤维细胞迅速回转到成纤维细胞或进入凋亡。本研究结果显示高脂喂养 8 周后的 ApoE^{-/-}小鼠血管外膜呈现 α -SM-actin 弱阳性表达,这可能表示肌成纤维细胞向内膜迁移,或又转为成纤维细胞,或进入凋亡。

许多生长因子,如血小板源生长因子(PDGF)、TGF- β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等都参与了成纤维细胞表型转化的过程。其中 TGF- β_1 参与了多种细胞的增殖及分化,其可诱导大鼠腹膜间皮细胞转化^[8]。大鼠肺动脉高压的肺组织中 TGF- β_1 表达水平也显著增高^[9]。TGF- β_1 是目前公认的能直接诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞进行表型转化的诱导因子^[10]。我们在实验中也观察到 ApoE^{-/-}小鼠随着高脂喂养时间延长,主动脉外膜 TGF- β_1 的表达增加,从而促使成纤维细胞转化为肌成纤维细胞。体外实验结果也显示 ApoE^{-/-}小鼠血管外膜成纤维细胞中 TGF- β_1 蛋白表达水平明显高于 C57BL/6 小鼠。成纤维细胞转化为肌成纤维细胞后又分泌基质蛋白、细胞因子等,进行大量增殖,并且迁移到新生内膜中,可促进平滑肌细胞和内皮细胞的增殖^[11,12]。增多的细胞外基质又可进一步促进成纤维细胞增殖及表型转化来参与血管重塑^[13]。因此成纤维细胞转化为肌成纤维细胞后将有助于动脉粥样硬化病灶形成。

本研究结果提示动脉粥样硬化病灶形成早期血管外膜成纤维细胞即出现表型转变为肌成纤维细胞的特性,从而影响外膜和血管中膜及内膜之间的交互对话,参与动脉粥样硬化病灶的形成及进展,这可能成为抑制不良血管重塑的干预靶点^[14]。

[参考文献]

[1] Jin X, Fu GX, Li XD, et al. Expression and function of osteopontin in vascular adventitial broblasts and pathologi-

cal vascular remodeling[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e23558.

- [2] Siow RC, Churchman AT. Adventitial growth factor signaling and vascular remodelling: potential of perivascular gene transfer from the outside-in [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(4): 659-668.
- [3] Ruan CC, Zhu DL, Chen QZ, et al. Perivascular adipose tissue-derived complement 3 is required for adventitial broblast functions and adventitial remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30 (12): 2568-574.
- [4] Li G, Chen SJ, Oparil S, et al. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid artery [J]. Circulation, 2000, 101(12): 1362-365.
- [5] 聂如琼, 王景峰, 伍卫, 等. 损伤动脉外膜重塑和成纤维细胞表型的变化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(4): 288-290.
- [6] 邱志兵, 陈鑫, 万松, 等. 猪静脉桥血管重建中平滑肌细胞和成纤维细胞表型转化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 532-536.
- [7] Ji J, Xu F, Li L, et al. Activation of adventitial broblasts in the early stage of the aortic transplant vasculopathy in rat [J]. Transplantation, 2010, 89(8): 945-953.
- [8] 刘小贤, 张浩, 孙剑, 等. TGF- β_1 对大鼠腹膜间皮细胞转分化的影响及其机制 [J]. 中南大学学报(医学版), 2010, 35(2): 159-164.
- [9] 朱蓉, 贺亮, 徐军美, 等. 高血流性肺动脉高压大鼠肺组织中 TGF- β_1 和 CTGF 的动态变化及意义 [J]. 中南大学学报(医学版), 2012, 37(10): 1013-020.
- [10] Gao PJ, Li Y, Sun AJ, et al. Differentiation of vascular myo broblasts induced by transforming growth factor-beta1 requires the involvement of protein kinase Calpha [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35 (9): 1105-112.
- [11] Coen M, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: an underestimated player in arterial pathology [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2391-396.
- [12] 徐芳, 刘颖, 石磊, 等. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化早期血管外膜成纤维细胞增殖活性增强 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8): 1503-508.
- [13] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myo broblast [J]. Wound Repair Regen, 2005, 13 (1): 7-12.
- [14] Hinz B, Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives [J]. F1000 Biol Rep, 2010, 11(2): 78-83.

(此文编辑 许雪梅)