

学校编码: 10384

密级:

学号: 24520141153490

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人 CD163+巨噬细胞通过 IL-17A 调节动脉粥样硬化的研究

Study on human CD163 + Macrophages Regulating
Atherosclerosis by IL-17A

丁 丁

指导教师姓名: 王焱

专业名称: 内科学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩日期: 2017年5月

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

目的：研究冠心病患者病变血管局部巨噬细胞 CD163 (Cluster of Differentiation 163)的表达水平，探索CD163在动脉粥样硬化中的可能调节作用及机制。

方法：以厦门大学附属心血管病医院心内科2015年4月至2016年10月收治的急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome ,ACS)、稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)患者为研究对象，以冠状动脉正常者(control group,CON)为对照，记录患者的基线情况，包括年龄、血压、血脂、降钙素原、C反应蛋白、心电图、冠脉造影结果；用抽吸导管或指引导管抽取ACS患者急诊PCI 即刻、稳定性心绞痛冠状动脉狭窄 $\geq 75\%$ 行PCI即刻及非冠心病者冠状动脉血液，进行以下研究：①分离血清，ELISA法检测IL6、IL10、IL-4、IL-13、IL17、TNF- α 、G-CSF、IFN- γ 蛋白质水平；②去除上清，裂解红细胞后得到白细胞，提取总蛋白，western blot法检测各组样本CD163的表达水平；③为了证实CD163的水平变化主要来源于巨噬细胞，用贴壁法分离各组单核细胞，提取细胞蛋白质及RNA后，进一步证实CD163及细胞因子的表达水平。

结果：①一般资料：与 SAP 组和 CON 组相比，ACS 组高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平显著降低，进一步分析结果显示，可能与 SAP 组患者服用他汀者较 ACS 组多有关。②ACS 组患者血浆中 sCD163 及 IL-17 水平较 SAP 和 CON 组明显降低，G-CSF、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-13、IL-10 水平三组之间无明显差别；③ ACS 组患者中其动脉粥样硬化斑块病变局部巨噬细胞 CD163 水平有下降趋势，但与对照组相比无统计学差异；在 SAP 组中，巨噬细胞的 CD163 水平显著增加，且明显高于对照组；④冠状动脉斑块局部组织细胞中，与 SAP 组和 CON 组相比，ACS 组 INF- γ 、IL-6、IL-13 及 IL 17A 的基因水平均显著增高；抗炎因子 IL-10 的水平在 SAP 组显著高于 ACS 组及 CON 组。

结论：①ACS 患者病变血管局部血液及组织细胞中 CD163 的水平显著下降，而 SAP 患者斑块局部组织巨噬细胞 CD163 的蛋白质水平显著高于 ACS 组和 CON 组，推测 CD163 水平与动脉粥样硬化的进展有关，可能具有稳定斑块、发

挥抗动脉粥样硬化作用；②巨噬细胞 IL-10 可能通过上调 CD163 水平，促使 CD163 阳性巨噬细胞分泌 IL-17A，从而发挥抗动脉粥样硬化作用。

关键词：动脉粥样硬化；CD163；巨噬细胞；IL-17A；IL-10

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Objective: To study the expression of CD163 in localized macrophages of patients with coronary heart disease and to explore the possible regulatory role of CD163 in atherosclerosis and its possible molecular mechanism.

Methods: The patients were treated with acute coronary syndromes and stable angina pectoris from April 2015 to October 2016. The patients with coronary artery disease were treated with normal coronary artery. The baseline of the patients was recorded, including age, Blood pressure, blood lipids, procalcitonin, C-reactive protein, electrocardiogram, coronary angiography; the use of microcatheter and aspiration catheter extraction ACS patients with emergency PCI immediately, stable angina coronary artery stenosis $\geq 75\%$ The levels of IL-6, IL-10, IL-4, IL-13, IL-17, TNF- α , GCS-F and INF- γ were detected by ELISA, and the supernatant was removed by ELISA. , And the expression of CD163 was detected by western blot method. (3) In order to confirm that the level of CD163 was mainly derived from macrophages, mononuclear cells were isolated by adherent method, Protein and RNA, and further confirmed the expression of CD163 and cytokines.

Results: ① General information: compared with SAP group and CON group, ACS group HDL-C levels were significantly reduced, further analysis showed that SAP patients taking statins than ACS group increased. ② The levels of sCD163 and IL-17 in plasma of patients with ACS were significantly lower than those in SAP and CON groups, and the levels of G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-13 and IL- (P <0.05). ③ There was no significant difference in the level of CD163 in local macrophages in patients with acute coronary artery disease (ACS), but there was no significant difference compared with the control group. In the SAP group, the level of CD163 in macrophages (P <0.05). Compared with SAP group and CON group, the gene levels of INF- γ , IL-6, IL-13 and IL-17A in ACS group were significantly higher than those in control group (P <0.05) The level of anti-inflammatory factor IL-10 in SAP group was significantly higher than that in ACS group and CON group.

Conclusion: ① The level of sCD163 in blood and tissue cells of patients with ACS was significantly decreased, while the level of CD163 protein in local macrophages of SAP patients was significantly higher than that of ACS and CON group, suggesting that CD163 may play a role of anti-atherosclerosis progression in atherosclerosis; (2) IL-10 may promote CD163-positive macrophages to secrete IL-17A by upregulating CD163 levels, thereby exerting anti-atherosclerotic effects.

Key Words: atherosclerosis ;CD163 ;macrophage ;IL-17 A;IL-10

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言	1
第二章 实验材料和方法	11
2.1 研究对象及实验材料	11
2.1.1 研究对象.....	11
2.1.2 主要试剂.....	12
2.1.3 实验设备及耗材.....	13
2.1.4 主要溶液的配制.....	13
2.2 方法	15
2.2.1 实验研究对象的基本临床资料.....	15
2.2.2 记录冠状动脉造影术.....	16
2.2.3 本实验标本的收集及处理.....	16
2.2.4 酶联免疫法吸附法（enzyme-linked immunosorbent assay ELISA）	16
2.2.5 细胞培养与蛋白质提取.....	18
2.2.6 蛋白浓度检测（BCA 法）	18
2.2.7 Western Blotting 技术	19
2.2.8 细胞样本 RNA 提取(Trizol 法).....	21
2.2.9 RNA 浓度、纯度测定以及逆转录	22
2.2.10 PCR.....	23
2.2.11 Real Time PCR	23
2.2.12 激光共聚焦显微镜技术.....	25
2.2.13 统计学分析.....	25
第三章 实验结果	27
3.1 研究对象	27

3.2 一般资料	27
3.3 CD163 在人冠状动脉动脉粥样硬化过程中表达的变化	29
3.4 冠状动脉病变局部炎症因子表达变化	33
结论.....	36
第四章 讨论	37
附录.....	41
参考文献	42

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Materials and Methods	11
2.1 Experimental Materials	11
2.1.1 Sample source.....	11
2.1.2 Major reagents and sources	12
2.1.3 Laboratory equipment and supplies	13
2.1.4 The main configure solution	13
2.2 Methods	15
2.2.1 The basic clinical data of this study.....	15
2.2.2 Coronary angiography	16
2.2.3 Sample collection and handling	16
2.2.4 enzyme-linked immunosorbent assay	16
2.2.5 Cell culture techniques and protein extraction	18
2.2.6 Protein concentration detection technique (BCA method)	18
2.2.7 Western Blotting	19
2.2.8 Cell Sample Total RNA Extraction (Trizol Method)	21
2.2.9 Determination of RNA Concentration and Purity	
Reverse transcription.....	22
2.2.10 PCR	23
2.2.11 Real Time PCR.....	23
2.2.12 Laser confocal technology	25
2.2.13 Statistical Analysis	25

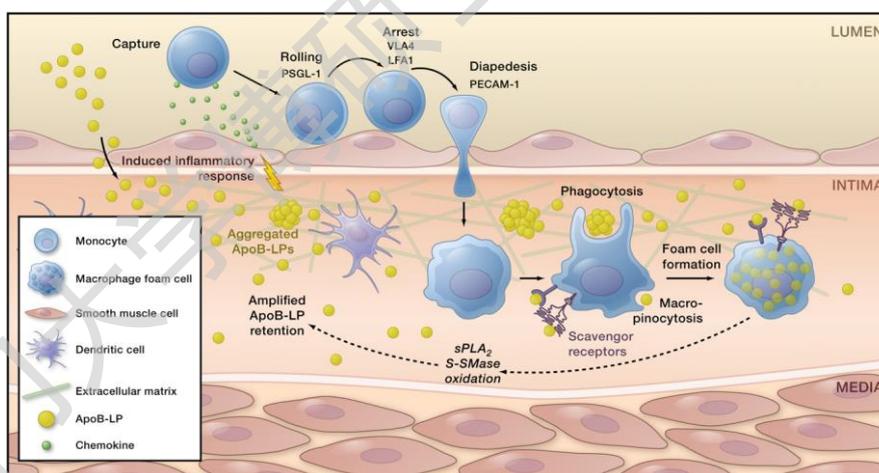
Chapter 3 Experimental Results	27
3.1 Object of study	27
3.2 General information	27
3.3 Expression of CD163 in human coronary atherosclerosis.	29
3.4. Changes of local inflammatory factors in coronary arteries	33
Conclusions	36
Chapter IV Discussion.....	37
Appendix.....	41
References	42

第一章 前言

1.1 概述

动脉粥样硬化所致的冠心病是全球死亡率最高的疾病，在美国，冠心病的死亡率占总死亡的 46.2%，在中国，不管是城市还是农村，心血管疾病的死亡率也高居首位，分别占总死亡的 42.5% 和 44.6%，其主要死因也是冠心病。在过去的 100 多年，针对胆固醇的治疗已使冠心病的死亡率明显降低，但是由于冠心病的形成机制复杂，尽管采取了各种治疗手段（冠脉罪犯血管病变的干预、冠心病一级及二级预防），我国冠心病的发病率还在不断攀升，因此在寻找新的治疗途径的同时，研究动脉硬化的形成机制并寻求新的治疗靶点成为当今医学界的焦点问题。

目前认为，动脉粥样硬化是免疫介导的炎症性疾病，多种细胞参与，涉及多个信号途径。其中在动脉粥样硬化发生、进展及动脉粥样硬化斑块破裂中，巨噬细胞都起着关键作用。



Cell, 2011, 145(3):341-355

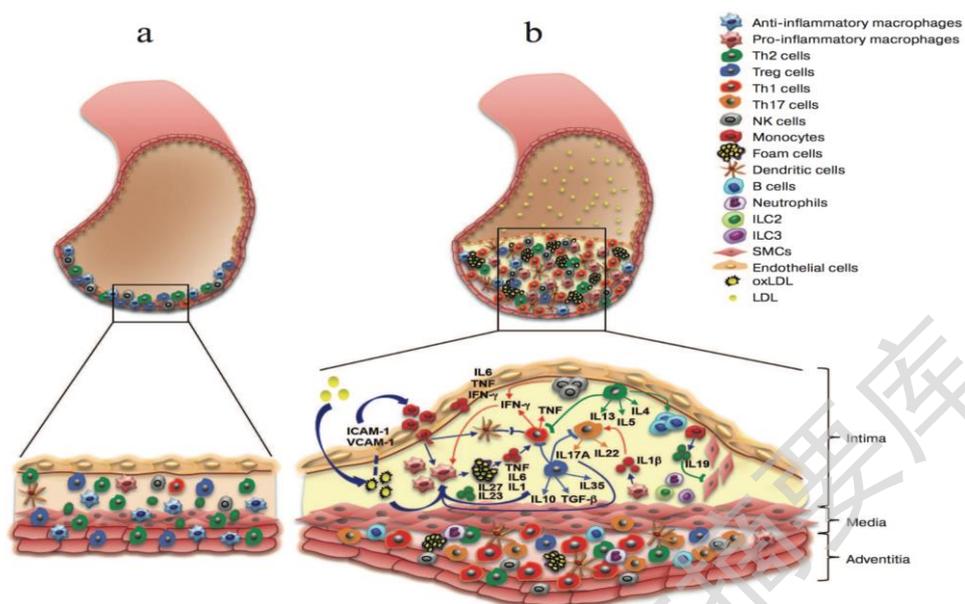
图 1.1 单核巨噬细胞与动脉粥样硬化

当血液中的胆固醇水平增高，超过了机体的处理能力而沉积在血管内，可激活血管内皮细胞分泌炎症因子和粘附分子，从而吸引血液中的单核细胞通过受损的血管内皮进入血管内膜层；在血管内膜，低密度脂蛋白-胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 被氧化修饰成为氧化修饰低密度脂蛋白 (oxygenized low density lipoprotein, ox-LDL)；在此微环境中，单核细胞被诱

导分化成为表达清道夫受体 CD36 的巨噬细胞^[1]，并可吞噬 ox-LDL，成为泡沫细胞。随着泡沫细胞的聚集，动脉管壁逐渐形成了动脉粥样硬化各期的病理生理改变，故针对巨噬细胞的研究有可能为动脉粥样硬化的发病机制拓宽思路及靶向性治疗寻找新的途径。

1.2 动脉粥样硬化与免疫炎症反应

炎症在动脉粥样硬化的发生及进展中均起重要作用。主动脉壁的慢性炎症过程与动脉内膜胆固醇沉积，先天性和获得性免疫应答有关，由各种促炎细胞因子介导^[2]。促炎细胞因子和抗炎细胞因子之间的平衡是决定动脉粥样硬化斑块稳定性的主要因素。巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后可形成泡沫细胞，通过分泌致炎因子如肿瘤坏死因子（TNF）、白介素-6（IL-6）、白介素-1（IL-1）激活 T 淋巴细胞诱导其分泌细胞因子，其中由 T 辅助细胞产生的细胞因子分为两类：由 I 型 T 辅助细胞产生的细胞因子（Th1）和由 II 型 T 辅助细胞产生的细胞因子（Th2）。由 Th1 细胞产生细胞因子包括干扰素- γ （IFN- γ ）和肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）：IFN- γ 作为动脉粥样硬化中的致病因子，可通过激活巨噬细胞，T 淋巴细胞，NK 细胞，B 细胞和血管平滑肌细胞（SMCs）发挥促炎作用，还可增加巨噬细胞上的清道夫受体-A（scavenger receptor-A ,SR-A）表达，促进胞内 oxLDL 沉积及泡沫细胞的形成；TNF- α 是参与细胞内稳态和免疫应答调节的促炎细胞因子，促进内皮细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1 ,ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1 ,VCAM-1)和单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemotactic protein 1,MCP-1）的表达。Th2 相关细胞因子包括 IL-4，IL-5 和 IL-13。Th2 细胞被认为具有抗炎特性，可抵抗 Th1 细胞在动脉粥样硬化和其他血管疾病发展过程中的作用。IL-4 和 IL-5 通过调节 B 细胞参与动脉粥样硬化进展，IL-4 还可通过 STAT6 激活 GATA3 转录因子促进 Th2 细胞产生 IL-4，IL-5 和 IL-13。IL-13 和 IL-4 通过相同的信号途径（IL-4R α / IL-13R α 1 和 STAT6）起作用，例如调节 B 单核细胞，树突状细胞和成纤维细胞的功能。Th17 淋巴细胞可以产生 IL-17A、IL-21 和 IL-22，在巨噬细胞、嗜中性粒细胞以及 T 细胞活化中起重要作用。而 Treg 细胞分泌的 IL-10 可与 IL-17A 共同调节巨噬细胞。



Biochemistry (Mosc). 2016. 81(11): 1358-1370

图 1.2 免疫系统与动脉粥样硬化

1.3 CD163+巨噬细胞与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化作为血管壁的慢性炎症过程，进展缓慢且病理过程复杂，从动脉粥样硬化斑块的初始形成直至斑块破裂，均与脂质过氧化反应及免疫炎症反应密切相关。动脉管壁由三层组成，于血管外膜存在少量的免疫细胞^[2]。在动脉粥样硬化发生的初始阶段，由于血管内皮损伤及炎症因子的浸润，免疫细胞在血管壁聚居，并发生免疫炎症反应，与动脉粥样硬化斑块的形成相关，伴随着炎症反应的加剧，动脉粥样硬化斑块不断增大，则加重动脉粥样硬化的进展直至斑块破裂^[2]。

AS 斑块局部存在巨噬细胞、T 淋巴细胞、树突状细胞等多种免疫细胞^[3]，单核巨噬细胞作为免疫反应中最重要的细胞，在动脉粥样硬化发生发展过程中起关键作用^[4, 5]。当血液中的胆固醇水平增高，超过了机体的处理能力而沉积在血管内，可激活血管内皮细胞分泌炎症因子和粘附分子，招募单核细胞进入动脉内膜后分化成为巨噬细胞，并可吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞^[6]，在斑块进展的过程中巨噬细胞可释放基质蛋白酶降解纤维帽中的胶原组织，并可上调 TNF- α 水平诱导平滑肌细胞凋亡，促使纤维帽变薄诱导斑块破裂。不仅如此巨噬细胞可通过

膜表面清道夫受体(scavenger receptors,SR) 以及膜 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)吞噬斑块中细胞碎片及 ox-LDL^[7]。除了致炎作用外, 新近研究表明, 巨噬细胞依据其不同表型, 还具有抗炎症作用^[8]。

1.3.1 巨噬细胞的分类及异质性

根据巨噬细胞的表面标记物、特殊产物及生理功能, 巨噬细胞被分为不同表型^[9]: ①M1 巨噬细胞, 即经典途径激活的巨噬细胞, 由 ox-LDL、胆固醇结晶、等诱导分化, 产生 Th1 细胞因子, 如 IFN- γ 和肿瘤坏死因子, 能被脂多糖识别, M1 巨噬细胞高表达白介素-12(interleukin-12, IL-12)和白介素-23(interleukin-23, IL-23), 低表达 IL-10, 并分泌致炎因子 TNF、IL-6、IL-1 β 。还可使吞噬能力降低、促进泡沫细胞生成、自噬能力下降及使纤维膜变薄; ②M2 巨噬细胞, 即选择性激活的巨噬细胞, 有三种亚型: M2a 巨噬细胞被 TH2 细胞因子 IL4 和 IL13 诱导; M2b 巨噬细胞亚型是由免疫复合物结合 IL-1b 和脂多糖诱导; M2c 巨噬细胞是由 IL-10 和转化生长因子 (TGF- β) 或者糖皮质激素诱导。M2b 巨噬细胞高表达致炎因子 IL-1、IL-6 和 TNF, 除此之外, 其他 M2 巨噬细胞都具有抗炎因子特征, 尤其是 M2C 亚群, 特异表达清道夫受体 CD163, 通过产生少量 IL12 和大量 IL10 和 TGF- β 发挥抗炎症作用, M2 巨噬细胞还能清除细胞碎片和凋亡细胞, 具有促血管新生和促纤维化, 促进组织修复和愈合; ③M4 巨噬细胞, 由 CXCL4 诱导产生, 具有致炎以及抑制吞噬功能的作用; ④M(hb)和 M(hem)巨噬细胞, 由 Hb/Hp 复合物或亚铁血红素刺激诱导, 具有清除血红蛋白和胆固醇, 抑制泡沫细胞产生及抑制氧化应激作用。其中 M2c、M(hb)和 M(hem)巨噬细胞均高表达 CD163。

1.3.2 CD163 与动脉粥样硬化

1.3.2.1 CD163 分子结构

CD163 (Cluster of Differentiation 163) ^[10]分子量为 130kDa, 以富含半胱氨酸结构域为特征, 于 1987 年被发现, 是一种迄今为止仅在单核巨噬细胞系统细胞膜上发现的单链跨膜糖蛋白分子, 属于富含半胱氨酸的清道夫受体 (Scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 超家族成员, 可特异地识别血红蛋白结合珠蛋白复合物 (Hemoglobin: haptoglobin complexes, Hb :Hp complexes), 是体内游离血红蛋白的特异清道夫受体。CD163 分子结构中包括 9 个 B 类 SRCR 结构域的胞外段、

一个跨膜片段和一个胞质尾区所组成^[11]。研究发现 CD163 具有三个亚型，均具有吞噬 Hb-Hp 的能力，短胞质尾的亚型负责清除人体中大部分配体^[12]。跨膜片段之后的 42 个氨基酸为共有序列，包括 Hb-Hp 复合体结合区域、保守一致的钙离子结合位点以及某些抗体结合区域，研究证实在 CD163 与 Hb-Hp 复合体结合过程中是钙离子依赖性的^[11, 13, 14]。当发生炎症时可通过激活 ADAM17/TACE 途径使 CD163 从细胞膜脱落形成游离 CD163，以可溶性的分子（sCD163）的形式存在于血液和组织液中^{[15][16]}。

1.3.2.2 CD163 阳性巨噬细胞与人动脉粥样硬化研究现状

Takao SATO 等^[17]通过对冠状动脉粥样硬化斑块研究发现：急性冠脉综合征和稳定性心绞痛患病者，其动脉粥样斑块局部聚集的巨噬细胞膜表面的 CD163 分子表达明显增加，提示 CD163 阳性巨噬细胞在 AS 斑块过程中可能具有重要的作用，而 da Rocha RF 等^[18]通过对人动脉粥样硬化早期斑块、进展期斑块、健康志愿者外周血研究发现，动脉粥样硬化患者外周血和斑块中 M1、M2 相关基因表达较健康志愿者均显著升高；经过对不同程度颅内动脉粥样斑块进行免疫组化发现发生脑血管栓塞的部位聚集着大量的 M1 巨噬细胞（表达 CD68, CD11c），而在未发生栓塞的斑块部位以 M2 巨噬细胞（表达 CD163）为主。另外 Kyu Yong Cho 等^[19]对临床患者颈动脉粥样斑块部位内膜切除斑块进行研究发现：有症状患者斑块以 M1 相关标记蛋白表达显著升高，而无症状患者巨噬细胞膜 CD163 水平较有症状患者明显升高，提示 CD163+巨噬细胞可能具有稳定斑块的作用。

sCD163 水平与冠心病危险因素如糖尿病、高空腹血糖以及 CRP 等密切相关^[20]。研究发现血清中 sCD163/sTWEAK 的比例与外周动脉疾病中动脉粥样硬化血栓形成的程度有明显关系^[21]。且 sCD163 和 IMT(颈动脉内膜厚度)之间呈正相关^[22]，提示 sCD163/sTWEAK 比例有望成为检测临床动脉粥样硬化程度的潜在标志物。

1.3.2.3 CD163+巨噬细胞表达的影响因素

①炎症因子：微环境中巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）诱导巨噬细胞表面 CD163 的表达；Th2 相关细胞因子 IL-4、IL-13、IL-10、糖皮质激素可使巨噬细胞表面 CD163 的表达增加；而 Th1 相关细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 以及氧化应激不仅使 CD163 基因表达下调，并可能通过 ADAM17/TACE 途径使 pro-TNF α 、

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库