

CCR2⁺ 巨噬细胞与病理性心肌重构的研究

夏红霞 唐其柱 袁园 周恒

摘要 心肌重构被认为是导致临床心力衰竭(heart failure, HF)的决定因素,心肌重构是指心脏的大小、形状、功能和(或)结构因负荷或损伤而发生变化,即基因组表达、分子、细胞和间质的改变。这种重构可以是生理性的(如运动训练可引起),也可以是病理性的(如心脏在MI后、高血压或梗阻性主动脉瓣疾病引起的压力超负荷而发生重构)。心脏损伤后,单核细胞和组织驻留巨噬细胞发生了显著的表型和功能变化,在组织修复、再生和纤维化过程中具有关键调节作用。心肌重构的过程中,免疫细胞亚群的积累导致心脏细胞成分的改变,并促进心力衰竭的发展。本综述将围绕 CCR2⁺ 巨噬细胞的起源、在心脏中的浸润以及在病理性心肌重构中的作用展开阐述。

关键词 CCR2 CCL 巨噬细胞 心室重构

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.09.003

病理性心肌重构影响心力衰竭的发展和预后,病理性心肌重构特征是解剖重构(左心室扩张、左心室肥大)、组织重构(心肌细胞肥大、心肌间质纤维化、毛细血管数量减少)、分子重构(促肥大和促炎症途径的激活)、代谢和神经激素重构(交感神经和肾素-血管紧张素-醛固酮系统的过度激活)^[1]。单核细胞在免疫系统中起着至关重要的作用,它通过直接清除病原体或产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-2等细胞因子,以一种非抗原特异性的方式保护机体器官免受有害病原体的侵害。单核细胞被认为是炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-12)的核心来源,也是此类细胞因子的主要靶点,少量的趋化因子就足以将单核细胞从血液招募到各种组织中,并激活它们分化成巨噬细胞。在心脏免疫细胞亚群中,巨噬细胞是通过表达C-C趋化因子受体2(CCR2)在病理性心肌重构中发挥着特别重要的作用。本文对CCR2⁺单核细胞来源的巨噬细胞在参与病理性心肌重构中的角色做出阐述,旨在寻求防治心肌重构的新策略,从而促进心力衰竭治疗的进步。

一、心脏巨噬细胞亚群的区分

心脏中存在多个常驻巨噬细胞亚群,这些亚群可

通过其细胞表面标志物的不同表达予以区分。在2014年,遗传命运图谱研究使Epelman等证明CCR2的表达与否是将单核细胞来源的心脏巨噬细胞与胚胎来源的心脏巨噬细胞区分开来的标志^[2]。在同一年,通过流式细胞术和遗传谱系追踪,研究人员确定小鼠心脏含有两个常驻巨噬细胞群:一个单核细胞衍生的巨噬细胞群(MHC- II^{hi} CCR2⁺)和一个单核细胞群(MHC- II^{lo} CCR2⁺),心脏受损后选择性地招募单核细胞和MHC- II^{hi} CCR2⁺单核细胞衍生的巨噬细胞^[3]。实际上,所有源自循环单核细胞的巨噬细胞都属于CCR2⁺表型,且比心脏中其他类型巨噬细胞有更多促炎基因的表达^[4]。

有研究人员联合使用遗传命运图谱、长期异生研究和单细胞RNA测序技术又细化了这一分类,将其细分为4个心脏单核-吞噬细胞亚群:一个不依赖血液单核细胞维持的亚群TIMD4⁺LYVE1⁺MHC- II^{lo} CCR2⁻,一个部分由单核细胞替代的亚群TIMD4⁻LYVE1⁻MHC- II^{hi} CCR2⁻,和两个全部由单核细胞替代的亚群CCR2⁺MHC- II^{hi} ^[5]。对于人类心脏中巨噬细胞的组成,Bajpai等^[6]也进行了研究,他从缺血性和扩张型心肌病患者心肌活检样本中发现,CCR2⁻巨噬细胞、CCR2⁺巨噬细胞以及CCR2⁺单核细胞。根据其表达的HLA-DR(人类MHC- II 同源物),最终分为3组,即CCR2⁺HLA-DR^{lo}单核细胞、CCR2⁻HLA-DR^{hi}巨噬细胞和CCR2⁺HLA-DR^{hi}巨噬细胞,人心脏中巨噬细胞与小鼠比较,其区别是缺乏与小鼠中CCR2⁻MHC- II^{lo} 巨噬细胞相对应的群体。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81530012);湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2021Q035)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科、代谢与相关慢病湖北省重点实验室

通信作者:唐其柱,教授,博士生导师,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

二、CCR2⁺巨噬细胞的起源

心脏驻留 CCR2⁻巨噬细胞起源于胚胎,源于卵黄囊或胎肝造血祖细胞,通过原位增殖在心脏中维持一定数量,具有促进冠状动脉发育、心脏再生和促进房室结内电传导的功能^[2,7,8]。心脏驻留 CCR2⁺巨噬细胞来源于造血祖细胞,通过单核细胞募集和局部增殖来维持和扩大,即产生 CCL2 和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等趋化因子和细胞因子,将 CCR2⁺单核细胞吸引到受损心脏,然后分化为单核细胞来源的巨噬细胞,促发心脏氧化应激,从而导致心肌损伤并促进不良的心肌重构^[2,3,5,9]。

研究发现,CCR2⁻和 CCR2⁺巨噬细胞在不同的发育时间点进入心脏。CCR2⁻巨噬细胞在胎龄为 12.5 天时开始出现在心脏内,并定位于心外膜下间隙,而 CCR2⁺的心脏巨噬细胞在胎龄为 14.5 天左右时出现在心脏中,并定位于心内膜小梁^[10]。然而,流式细胞术和组织学实验表明,从出生后第 14 天开始,小鼠心脏中出现了数量更多的 CCR2⁺巨噬细胞^[10]。这些 CCR2⁺巨噬细胞来源于骨髓或髓外组织产生的单核细胞,并且在 3 周内其 50% 的数量由循环单核细胞补充,这一过程依赖于心脏中 CCL2/CCR2 信号表达^[5,11]。CCR2⁺巨噬细胞对心脏常驻巨噬细胞总量的贡献随着年龄的增长而增加^[12]。CCR2⁺心脏驻留巨噬细胞的进行性增加可能导致心力衰竭等心脏病理状况的进展,而心脏病理性进展与年龄增长呈正相关^[13]。

关于心脏驻留巨噬细胞增殖的相关机制,一种是 A 型清道夫受体(Sca1)的激活,该受体与氧化型低密度脂蛋白、革兰阴性和阳性细菌的细菌成分以及 β 淀粉样蛋白等在内的多种配体结合,导致癌基因 c-Myc 的细胞内激活^[11];另一种机制是心脏驻留巨噬细胞感应收缩心肌中的张力,导致丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)的激活,尤其是 MEK1/2 的激活;在体外实验中,抑制 MEK1/2 可减少张力诱导的巨噬细胞增殖,在小鼠冠状动脉结扎后 1 周时,持续抑制 MEK1/2 3 周,降低了心脏巨噬细胞周期和数量^[14]。然而,抑制 MEK1/2 对血液单核细胞没有影响。

三、CCL2/CCR2 轴

趋化因子是一类趋化细胞因子家族,在机体稳态和疾病状况下对白细胞转运起关键作用。根据其结构,趋化因子可分为 4 个亚家族:CC、CXC、CX3C 和 XC。CCL2/单核细胞趋化蛋白(MCP-1)是心肌疾病中 CC 趋化因子家族中研究最多的成员,在心脏

中,CCL2 由多种细胞表达和分泌,包括巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞。

CCR2 是 MCP-1/CCL2 的受体,CCL2 与 CCR2 相互作用后激活细胞内信号级联反应,这一过程是炎症 CCR2⁺单核细胞向受损心肌迁移所必需的。CCR2 激活的细胞内信号涉及 JAK2、STAT3、MAPK 和 PI₃K 的信号转导途径^[15]。心脏驻留的 CCR2⁺巨噬细胞也可能通过 MyD88 信号依赖方式促进 CCL2 的分泌,进而促进单核细胞募集^[4,16]。除了 CCL2 与 CCR2 的相互作用之外,一些细胞黏附分子如细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、P-选择素和 E-选择素等,对促进单核细胞血管黏附并浸润到心肌中起重要作用^[15]。实验证明,使用 CCR2⁻DTR 小鼠并注入 DT 后,CCR2⁺心脏驻留巨噬细胞被耗尽,导致心肌损伤后中性粒细胞和 CCR2⁺Ly-6C^{hi}单核细胞向心脏浸润减少,炎症细胞的减少致使炎症标志物 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 以及趋化因子 CCL2 和 CCL7 在心脏中的表达减少;药物阻断和基因敲除 CCR2 导致了类似的结果,表明 CCR2⁺心脏驻留巨噬细胞通过分泌 CCL2 趋化因子诱导炎症细胞浸润^[4]。

四、CCR2⁺巨噬细胞参与病理性心肌重构

CCR2⁺巨噬细胞富含调控 NLRP3 炎症小体和产生 IL-1β 的基因,可调节组织中 IL-1β 的释放,并触发炎症反应,表明这类巨噬细胞本质上是促炎性的。在临床上,CCR2⁺巨噬细胞丰度与接受植入左心室辅助装置的心力衰竭患者的左心室收缩功能恶化和心室扩张呈正相关,与疗效呈负相关^[6,17]。从这些患者心脏中采集的 CCR2⁺巨噬细胞,在暴露于坏死的心肌细胞后产生大量的炎症 IL-1β。给缺乏 CCR2⁺巨噬细胞(CCR2^{GFP/GFP})小鼠输注血管紧张素 II 后,心脏中几乎无 IL-1β 的产生^[2]。实际上,在 CCR2 缺乏的小鼠中,血管紧张素 II 诱导的炎症体激活和 IL-1β 的产生受到阻断,从而改善血管紧张素 II 诱发的心室重构^[18]。很多研究报道了 CCR2⁺单核细胞在横断性主动脉缩窄(TAC)术后早期(1 周内)被招募到小鼠心脏,随后的几周内招募数量逐渐减少,最终表明,CCR2⁺单核细胞招募有助于失代偿性心肌重构。

CCL2 在缺血性和非缺血性心肌纤维化的实验模型中显著上调,并在心力衰竭患者的心肌样本中过表达^[19,20]。在小鼠模型中,CCL2 基因敲除或予以药物抑制的研究显示,CCL2 及其受体 CCR2 在心肌纤维

化中发挥了重要作用。在心肌梗死的小鼠模型中, CCL2 基因敲除减少了肌纤维细胞的浸润^[21]。在给予短暂、重复的缺血/再灌注而诱导的缺血性非梗死性心肌病模型小鼠中, CCL2 基因缺失可减轻间质纤维化并改善心脏功能障碍, 用抗体中和 CCL2 可阻止小鼠缺血性心肌病的恶化进展^[20]。此外, 在糖尿病心肌病模型中, 抑制 CCR2 的表达可减轻心脏纤维化^[22]。CCL2^{-/-}小鼠减少了单核细胞向损伤心脏的浸润和间质纤维化, 并减轻了由心肌缺血引发的心功能不全^[20]。

在缺血性心肌病患者的心脏中可观察到持续的心肌细胞凋亡, 相较于 CCR2⁻巨噬细胞, CCR2⁺巨噬细胞吞噬凋亡细胞的效率降低了 2.5 倍, 进而不能清除原始凋亡的心肌细胞, 导致继发性坏死和 DAMPs 的释放, 进一步引发促炎反应并伴随着组织损伤^[2]。心脏中单核细胞来源的 MHC-II⁺CCR2⁺巨噬细胞产生 IL-10, 在自分泌环路中发挥作用, 促使以分泌 TGF- β 和骨桥蛋白为特征的促纤维化巨噬细胞极化, 导致成纤维细胞活化和胶原沉积, 随后造成心肌硬度增加和舒张功能障碍^[23]。

五、靶向 CCR2⁺巨噬细胞的治疗

研究人员多数使用 CCR2 基因敲除小鼠、给小鼠注射 CCL2 的中和抗体或 CCR2 拮抗剂等靶向 CCR2⁺巨噬细胞的方式, 探究其对不同心脏疾病中心肌重构的影响。用流式细胞术对已缺血再灌注的心肌进行分析, 发现注射了针对 CCR2 的特异性 siRNA (SiCCR2) 的小鼠心脏中单核细胞和巨噬细胞显著减少, 并使炎性 Ly-6C^{hi} 单核细胞数减少了 71%。在注射 SiCCR2 的小鼠中, 梗死面积/危险面积比值降低了 34%^[24]。另一项类似的研究结果显示, SiCCR2 处理的小鼠在冠状动脉结扎后第 4 天, 梗死区炎性细胞数量减少, Ly-6C^{hi} 单核细胞减少 41%, 促炎性细胞因子、IL-6、IL-1 β 、NF- κ B 和 TNF- α 的表达减少, IL-10 和精氨酸酶表达增加, 3 周后, 与对照组小鼠比较, SiCCR2 处理的小鼠左心室扩张减少, 心脏射血分数相对增加^[25]。

CCR2⁺单核细胞在压力超负荷时也被招募到心脏, 即无心肌细胞坏死的情况下, 单核细胞也会被招募到重构心脏之中^[15]。Patel 等^[26]报道了 TAC 后 1 周, 促炎性单核细胞和巨噬细胞数量扩增, 即扩增发生在左心室肥厚和心肌收缩功能障碍之前, 一旦左心室肥厚已然形成, 单核细胞的耗尽不会对心肌重构产生影响。研究发现, 小鼠 TAC 术后注入 CCR2 拮抗

剂 RS-504393 可阻止 TAC 后早期 CCR2⁺巨噬细胞聚集, 并抑制代偿性心肌肥厚, 而较长时间(4 周)输注 RS-504393 可缓解左心室扩张和收缩功能障碍^[27]。然而, Nemska 等^[28]研究报道, TAC 术后早期(第 3、7 和 14 天)小鼠心脏 CCR2 的 mRNA 水平有升高, 但当 TAC 后每天给予 RS-504393 并持续 14 天后, 并未影响到左心室质量的增加。在心肌炎患者的心脏中, CCL2、CCR2 mRNA 水平和 CCR2⁺细胞增加, 体内注射 SiCCR2 后使急性自身免疫性心肌炎小鼠心脏中 Ly-6C^{hi} 单核细胞数量减少了 69%; 诱导小鼠自身免疫性心肌炎后 14 天, 延迟注射 SiCCR2 减轻了心脏炎症和纤维化, 保护了心功能^[29]。这些结果不仅表明 CCR2⁺巨噬细胞与心力衰竭的病因有关, 而且证明了通过单分子靶向治疗可减弱 CCR2⁺巨噬细胞对不良心室重构影响。

六、展 望

病理性心肌重构损害心脏的收缩、舒张功能, 导致临床患者的预后不良, 最终结局是迈向心力衰竭, 如何减轻甚至逆转病理性心肌重构一直是人们开展研究的重要方向。对 CCR2⁺巨噬细胞靶向治疗虽然可以缓解病理性心肌重构, 但对 CCR2⁺巨噬细胞促进心肌重塑的详细机制还有待进一步探索, 原因是 CCR2 的表达不仅限于单核细胞和巨噬细胞, 也在内皮细胞、成纤维细胞、嗜碱性粒细胞和一些 T 淋巴细胞上表达, 靶向 CCR2⁺治疗也会影响其他表达 CCR2 的细胞, 因此需寻找细胞特异性基因敲除方法来对 CCR2⁺巨噬细胞展开详细研究, 以此找到更精确的靶向治疗方法, 为干预病理性心肌重构寻求更好的靶点或药物。

参考文献

- 1 Salah HM, Verma S, Santos-Gallego CG, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and cardiac remodeling [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2022, 15(5): 944-956
- 2 Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation [J]. Immunity, 2014, 40(1): 91-104
- 3 Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(45): 16029-16034
- 4 Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, et al. Tissue resident ccr2⁻ and ccr2⁺ cardiac macrophages differentially orchestrate monocyte recruitment and fate specification following myocardial injury [J]. Circ Res, 2019, 124(2): 263-278

- 5 Dick SA, Macklin JA, Nejat S, *et al.* Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction [J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(1): 29-39
- 6 Bajpai G, Schneider C, Wong N, *et al.* The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1234-1245
- 7 Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, *et al.* Macrophages facilitate electrical conduction in the heart [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 510-522, e520
- 8 Aurora AB, Porrello ER, Tan W, *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3): 1382-1392
- 9 Li W, Hsiao HM, Higashikubo R, *et al.* Heart-resident ccr2(+) macrophages promote neutrophil extravasation through tlr9/myd88/cxcl5 signaling [J]. *JCI Insight*, 2016, 1(12): e87315
- 10 Leid J, Carrelha J, Boukarabila H, *et al.* Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation [J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1498-1511
- 11 Zaman R, Hamidzadeh H, Epelman S. Exploring cardiac macrophage heterogeneity in the healthy and diseased myocardium [J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 68: 54-63
- 12 Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, *et al.* Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(11): 2151-2158
- 13 Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139-e596
- 14 Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, *et al.* Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure [J]. *Circ Res*, 2016, 119(7): 853-864
- 15 Yerra VG, Advani A. Role of ccr2-positive macrophages in pathological ventricular remodeling [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(3): 661
- 16 Lafuse WP, Wozniak DJ, Rajaram MVS. Role of cardiac macrophages on cardiac inflammation, fibrosis and tissue repair [J]. *Cells*, 2020, 10(1): 51
- 17 Alvarez-Argote S, O'Meara CC. The evolving roles of cardiac macrophages in homeostasis, regeneration, and repair [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7923
- 18 Bracey NA, Beck PL, Muruve DA, *et al.* The nlr3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β [J]. *Exp Physiol*, 2013, 98(2): 462-472
- 19 Li R, Frangogiannis NG. Chemokines in cardiac fibrosis [J]. *Curr Opin Physiol*, 2021, 19: 80-91
- 20 Frangogiannis NG, Dewald O, Xia Y, *et al.* Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/cc chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2007, 115(5): 584-592
- 21 Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, *et al.* Ccl2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts [J]. *Circ Res*, 2005, 96(8): 881-889
- 22 Tan X, Hu L, Shu Z, *et al.* Role of ccr2 in the development of streptozotocin-treated diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes*, 2019, 68(11): 2063-2073
- 23 Hulsmans M, Sager HB, Roh JD, *et al.* Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(2): 423-440
- 24 Leuschner F, Dutta P, Gorbатов R, *et al.* Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11): 1005-1010
- 25 Majmudar MD, Keliher EJ, Heidt T, *et al.* Monocyte-directed RNAi targeting ccr2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice [J]. *Circulation*, 2013, 127(20): 2038-2046
- 26 Patel B, Ismahil MA, Hamid T, *et al.* Mononuclear phagocytes are dispensable for cardiac remodeling in established pressure-overload heart failure [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170781
- 27 Patel B, Bansal SS, Ismahil MA, *et al.* Ccr2(+) monocyte-derived infiltrating macrophages are required for adverse cardiac remodeling during pressure overload [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3(2): 230-244
- 28 Nemska S, Gassmann M, Bang ML, *et al.* Antagonizing the cx3cr1 receptor markedly reduces development of cardiac hypertrophy after transverse aortic constriction in mice [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(6): 792-801
- 29 Leuschner F, Courties G, Dutta P, *et al.* Silencing of ccr2 in myocarditis [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(23): 1478-1488

(收稿日期: 2022-08-25)

(修回日期: 2022-09-08)

(接第 164 页)

- 19 乔虎军, 王国祥, 郝鑫. 转化生长因子 β /Smad 信号通路和骨关节炎研究进展 [J]. *中国运动医学杂志*, 2019, 38(2): 143-151
- 20 Xu T, Luo Y, Wang J, *et al.* Exosomal miRNA-128-3p from mesenchymal stem cells of aged rats regulates osteogenesis and bone fracture healing by targeting Smad5 [J]. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18(1): 47
- 21 Zhang W, Chen L, Wu J, *et al.* Long noncoding RNA TUG1 inhibits osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via Smad5 after irradiation [J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2198-2208
- 22 邱诗阳, 付希佳, 白晓雪, 等. miR-155 通过抑制 Smad5 调控成骨细胞骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(4): 538-544
- 23 Gu Y, Ma L, Song L, *et al.* miR-155 inhibits mouse osteoblast differentiation by suppressing Smad5 expression [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1893520
- 24 邱伟, 黄朝靖, 姜迪, 等. 骨质疏松性椎体压缩骨折行 PKP 术后骨延迟愈合的相关因素探 [J]. *颈腰痛杂志*, 2019, 40(1): 46-48
- 25 汤波, 陈演, 黄涛. 血清 H2S 水平与绝经后女性骨质疏松性脊柱骨折愈合的相关性分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(8): 984-989
- 26 郑哲, 刘会飞. 骨质疏松性椎体压缩性骨折患者骨代谢水平与椎体愈合程度的相关性 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(23): 3456-3459
- 27 郭登斌, 王春, 刘清平. miR-1, miR-206 与 IGF-1 在骨折延迟愈合患者血清中的表达关系及意义 [J]. *广东医学*, 2019, 40(10): 1487-1491

(收稿日期: 2022-08-03)

(修回日期: 2022-09-17)