

本文引文格式: 闵敬亮, 郭亚玲, 张辉, 等. CCL5 调控 IL-6/STAT5 信号通路促进大鼠颅内动脉瘤进展的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(6): 863-868.

【论著与临床报道】

CCL5 调控 IL-6/STAT5 信号通路促进大鼠颅内动脉瘤进展的研究

闵敬亮¹, 郭亚玲², 张辉¹, 王大巍¹

(1. 蚌埠医科大学第二附属医院神经外科, 安徽 蚌埠 233040;

2. 蚌埠医科大学第一附属医院肾脏内科, 安徽 蚌埠 233004)

摘要:目的 探明趋化因子配体 5(CCL5)激活 IL-6/STAT5 信号通路增加了颅内动脉瘤进展的分子机制。方法 构建颅内动脉瘤大鼠模型, 分为 NC 组(空白对照组)和颅内动脉瘤组(IA 组), 检测各组大鼠的颅内动脉瘤形成情况。TUNEL 和免疫荧光实验检测神经元细胞凋亡情况和 SM22- α 的表达。HE 和弹性纤维染色检测各组中血管内皮和弹性纤维变化。生物信息学筛选差异基因。随后构建 IA + Cyclic MKEY TFA 组(CCL5 抑制剂), 即 IA + TFA 组。ELISA 和 WB 检测 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 STAT5 的表达。结果 ELISA 实验显示, 相较于 NC 组, IA 组的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 STAT5 表达升高。生物信息学结果显示 CCL5 在 IA 组中表达升高。HE 染色和弹性纤维染色结果显示, 相较于 NC 组, IA 组中动脉瘤形成明显, 血管内壁增厚和弹性纤维减少, 相较于 IA 组, IA + TFA 组的血管内壁变薄且弹性纤维增多。TUNEL 结果显示, 相较于 NC 组, IA 组中的 TUNEL 阳性细胞率升高, 而相较于 IA 组, IA + TFA 组的 TUNEL 阳性细胞率降低。WB 结果显示, 相较于 IA 组, IA + TFA 组的 IL-6、STAT5 和 CCL5 表达降低。结论 CCL5 调控 IL-6/STAT5 信号通路促进了颅内动脉瘤进展。

关键词: 趋化因子配体 5; IL-6/STAT5 信号通路; 颅内动脉瘤; 趋化因子配体 5 抑制剂

中图分类号: R743.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2024)06-0863-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2024.06.005

Research on CCL5 regulating IL-6/STAT5 signaling pathway to promote the progression of intracranial aneurysms in rats

MIN Jingliang¹, GUO Yaling², ZHANG Hui¹, WANG Dawei¹

(1. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233040, Anhui, China; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanisms underlying the enhanced progression of intracranial aneurysms through the activation of the IL-6/STAT5 signaling pathway by chemokine ligand 5 (CCL5). **Methods** A rat model of intracranial aneurysms was established and divided into a normal control (NC) group and an intracranial aneurysm (IA) group. The formation of IA was assessed in rats from each group. TUNEL and immunofluorescence assay were conducted to evaluate neuronal apoptosis and the expression of SM22- α , respectively. HE and elastic fiber staining were used to examine changes in vascular endothelium and elastic fibers across the groups. Differential genes were screened by bioinformatics. Subsequently, an IA + Cyclic MKEY TFA group (CCL5 inhibitor), referred to as the IA + TFA group, was established. ELISA and WB were employed to detect the expression levels of IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8, and STAT5. **Results** ELISA results showed that the expression levels of IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8, and STAT5 were elevated in the IA group compared to the NC group. Bioinformatics results indicated that the expression of CCL5 was elevated

基金项目: 蚌埠医科大学自然科学重点项目(2023byzd102)

第一作者: 闵敬亮, 主治医师, 研究方向: 神经外科相关疾病诊疗及诊断, E-mail: minjingliang@163.com

通讯作者: 王大巍, 博士, 主任医师, 研究方向: 神经外科相关疾病诊疗及诊断, E-mail: 215835323@qq.com

in the IA group. HE and elastic fiber staining demonstrated that, compared to the NC group, the IA group exhibited significant aneurysm formation, thickening of the vascular intima, and a decrease in elastic fibers. In contrast, the IA+TFA group showed thinning of the vascular intima and an increase in elastic fibers compared to the IA group. TUNEL assays showed an elevated percentage of TUNEL-positive cells in the IA group compared to the NC group, whereas this percentage was reduced in the IA+TFA group compared to the IA group. WB results indicated reduced expressions of IL-6, STAT5, and CCL5 in the IA+TFA group compared to the IA group. **Conclusion** CCL5 promotes the progression of IA by regulating the IL-6/STAT5 signaling pathway.

Key words: chemokine ligand 5; IL-6/STAT5 signaling pathway; intracranial aneurysm; chemokine ligand 5 inhibitors

颅内动脉瘤(intracranial aneurysm, IA)是一种常见的脑血管疾病,发病率高达 3%。IA 破裂常常引起广泛的蛛网膜下腔出血,从而导致灾难性后果^[1-2]。到目前为止,还没有找到治疗 IA 的有效药物,能够抑制 IA 进展的唯一选择是血管内治疗或开颅手术夹闭。IA 的主要病理特征包括进行性血管平滑肌细胞(VSMC)死亡和细胞外基质(ECM)破坏导致 IA 的形成和破裂^[3-5]。因此,揭示 VSMC 损伤和 ECM 降解的分子机制对于开发预防 IA 进展的药物至关重要。通过基因测序发现趋化因子配体 5(CCL5)在 IA 模型中高表达。CCL5 是一种趋化因子,在免疫系统和心血管系统中发挥重要作用^[6-7]。然而 CCL5 在 IA 中的报道较少,因此本研究探究 CCL5 影响 IL6/STAT5 轴促进颅内动脉瘤进展的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 弹性纤维酶(默克集团有限公司,编号:39445-21-1)、 β -氨基丙腈(默克集团有限公司,编号:A3134)、异戊巴比妥(默克集团有限公司,编号:57-43-2)、Cyclic MKEY TFA(默克集团有限公司,编号:HY-P1949A)、IL-6 ELISA 试剂盒(索莱宝生物科技有限公司,编号:SEKM-0007)、IL-8 ELISA 试剂盒(合肥莱尔生物科技有限公司,编号:LE-M2500)、TNF- α ELISA 试剂盒(上海佰利莱生物科技有限公司,编号:BLL-S7398G)、IL-1 β ELISA 试剂盒(上海佰利莱生物科技有限公司,编号:BLL810363A)、STAT5 ELISA 试剂盒(合肥莱尔生物科技有限公司,编号:LE-H2198)、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,编号:P0013B)、BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,编号:P0010S)、HE 液(上海碧云天生物技术有限公司,编号:C0105S)、维多利亚蓝溶液(Solarbio 公司,编号:G1596)、TUNEL 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,编号:C1089)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,编号:P0018S)、SM22-a 抗体(艾博抗贸易有限公司,编号:ab14106,兔多克隆抗体)、CCL5 抗体(艾博

抗贸易有限公司,编号:ab307713,兔单克隆抗体)、IL-6 抗体(艾博抗贸易有限公司,编号:ab233706,兔单克隆抗体)、STAT-5 抗体(艾博抗贸易有限公司,编号:ab32364,兔单克隆抗体)、Multi-rAb HRP-山羊抗兔重组二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,编号:RGAR001)。

1.2 动物模型构建 购买雄性 Wistar 大鼠 15 只(上海凯学生物有限公司),体重在 150~170 g 之间。购买弹性纤维酶。将大鼠分为 3 组:空白对照组(无任何处理)、IA 诱导组(颈动脉瘤模型)、IA+TFA(颈动脉瘤模型+TFA 50 μ g/kg,腹腔注射)组。本研究经过本院伦理审查委员会批准(伦动科批字[2024]第 175 号)。IA 模型构建方法:各试验组按 30 mg/kg 体重的剂量经腹腔注射 3%异戊巴比妥麻醉大鼠。在对大鼠进行左侧颈内动脉结扎之前,向右侧基底池的脑脊液中注射弹性纤维酶。剪去大鼠颈部、上腹部的皮肤,在显微镜下进行手术操作,暴露左侧颈动脉,并对其进行分离。结扎颈总动脉,以模拟颈动脉瘤的形成。随后剪开腹中部纵行切口,逐层剥离,首先寻找左肾随后剥离结缔组织,并结扎左肾动脉,依次结扎右肾动脉。手术完成后,对伤口进行缝合,并给予适当的护理。并以 0.9%氯化钠联合 0.12% β -氨基丙腈(BAPN)喂养。IA+TFA 模型构建:在 IA 基础上,腹腔注射 Cyclic MKEY TFA 50 μ g/kg,以 4 周注射 1 次的频率,连续注射 4 次(总计 16 周)。所有模型待 16 周后麻醉处死大鼠后,剥离脑组织,拍照记录。

1.3 ELISA 实验 采用标准试剂盒检测细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 STAT5 水平。从大鼠尾静脉中采集血液样本,测定血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 STAT5 的表达水平。

1.4 Western Blot 实验检测 收集大鼠脑组织,用 RIPA 裂解液提取总蛋白裂解物,用于 Western Blot。使用 BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度。待定量后,每个样品(30 μ g)的裂解物用十二烷基硫酸钠-PAGE 分离,用电子印迹蛋

白转移系统(GenScrip)转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。然后用 5%脱脂牛奶包常温孵化 2 h, PVDF 膜与一抗 4 °C 孵育过夜, 与二抗在室温下孵育 1 h, 用 ECL 曝光液进行曝光, 使用 Bio-Rad 成像系统进行成像。

1.5 HE 染色和弹性纤维染色 制备 4 μm 厚石蜡包埋脑组织切片, 随后蜡块脱蜡后分别用 HE 液和维多利亚蓝溶液进行染色。图像通过光学显微镜拍摄。

1.6 TUNEL 染色 采用 TUNEL 试剂盒严格按照说明书进行细胞凋亡检测。脱蜡、水合后, 用酶在室温下孵育 20 min。切片用 PBS 洗涤 3 次后, 在 37 °C 下与 TUNEL 反应混合液染色 1h, 并与兔抗 SM22-a (1:1 000) 在 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后, DAPI 染色 1 h, 最后室温下孵育二抗。最后将切片封存, 在显微镜下拍照观察。

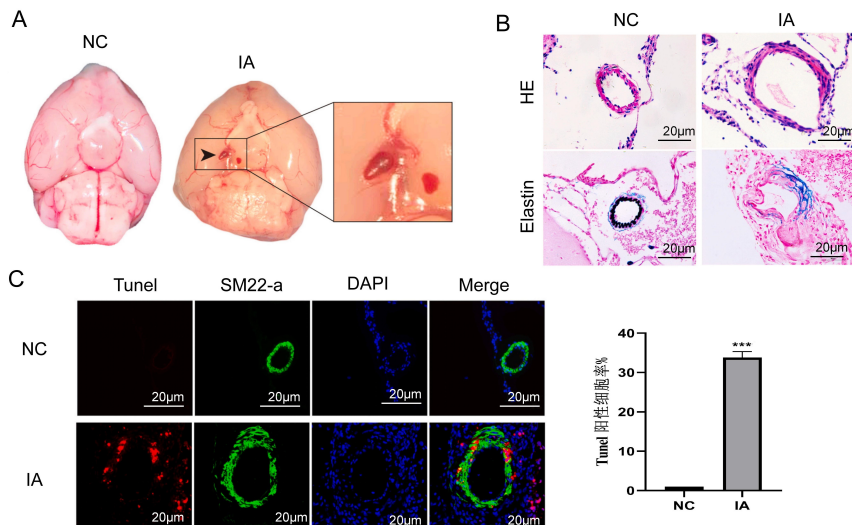
1.7 生物信息学 从使用 R 软件(版本 4.3.1)进行生物信息学分析。从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 GSE7543 基因芯片数据。用 R 包“LIMMA”筛选差异表达基因, 假发现率(FDR) <

0.05, |对数倍变化(Fc)| ≥ 1 。用热图显示差异表达基因。

1.8 统计学方法 实验数据使用 Graphpad Prism 8.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布的, 利用($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异用独立 *t* 检验进行分析。多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IA 模型构建 构建 IA 动物模型, 动物模型如图 1A 所示, 结果显示相较于 NC 组, IA 组的动脉瘤成型。HE 染色和弹性纤维染色检测动脉瘤, 结果显示相较于 NC 组, IA 中的血管内壁增厚不规则, 且纤维蛋白碎片减少, 见图 1B, 即胶质细胞的纤维化减少。而 TUNEL 实验检测动脉瘤切片样本中神经元凋亡情况, 结果显示相较于 NC 组(1.01 ± 0.001)%, IA 组中的 TUNEL 阳性的血管平滑肌细胞(利用 SM22-a 标记)数量增加(33.81 ± 1.52)%, $P < 0.001$, 见图 1C。



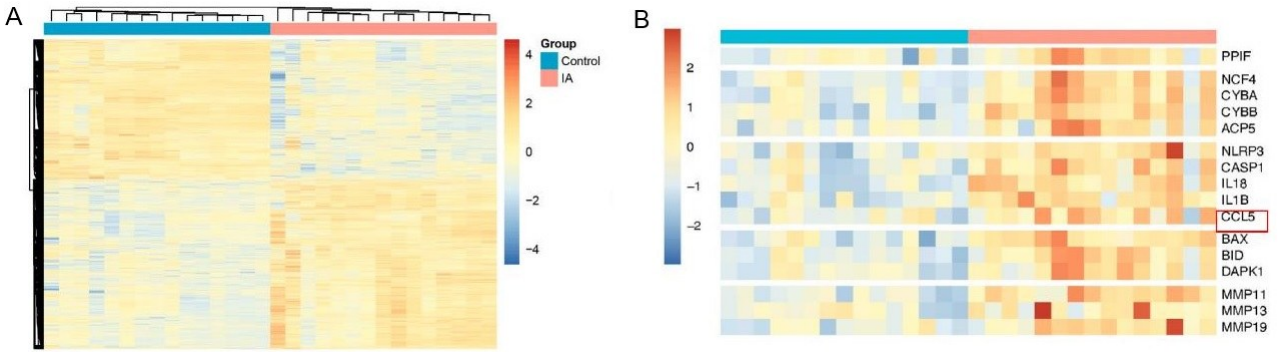
注:A. 各组大鼠脑部的典型图片;B. 各组大鼠切片的 HE 染色和弹性纤维染色情况($\times 400$);C. TUNEL 染色结果;*** $P < 0.001$ 。

图 1 IA 模型构建

2.2 CCL5 在 IA 组中高表达 为进一步检测 IA 的分子机制, 通过生物信息学显示, 相较于 NC 组, IA 组中 CCL5 表达升高, 见图 2A、图 2B。随后 ELISA 结果提示, 相较于 NC 组, IA 组中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 和 STAT5 ($P < 0.001$) 的表达升高, 见图 3。

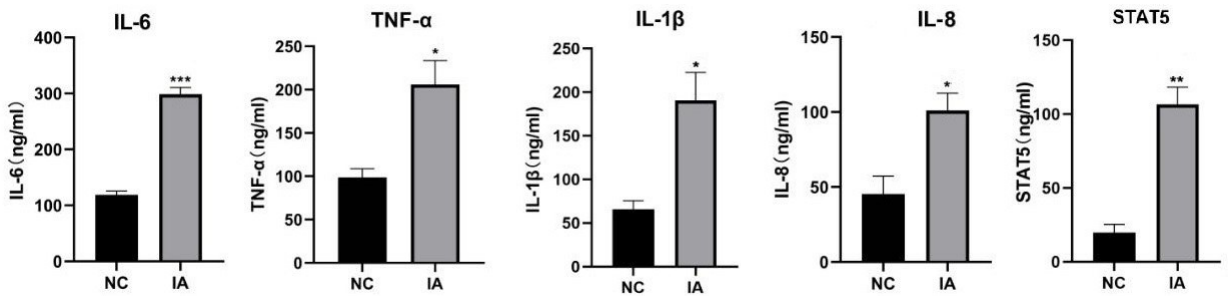
2.3 CCL5 抑制剂(Cyclic MKEY TFA)抑制 IL-6/STAT5 轴影响 IA 进展 为进一步探索 CCL5 对 IA 的影响机制, 在 IA 组基础上加入 CCL5 抑制剂, HE 和纤维蛋白染色检测血管瘤组织, 结果显示, 相较于 NC 组, IA 组中纤维蛋白减少, 而相较于 IA 组, IA + TFA 组的血管内壁厚度变薄且纤维蛋白增多, 见图

4A。TUNEL 实验检测血管瘤组织中神经元细胞凋亡情况, 结果显示, 相较于 NC 组(1.01 ± 0.001), IA 组中的 TUNEL 阳性细胞率升高[(32.13 ± 0.98)%, $P < 0.001$], 而相较于 IA 组, IA + TFA 组的 TUNEL 阳性细胞率降低[(15.01 ± 1.84)%, $P < 0.001$], 见图 4B。ELISA 检测外周血样本, 结果显示, 相较于 IA 组, IA + TFA 组中 IL-6、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 STAT5 的表达降低 ($P < 0.05$), 见图 5A。WB 结果显示, 相较于 IA 组, IA + TFA 组中 CCL5、IL-6 和 STAT5 的蛋白水平表达降低 ($P < 0.05$), 见图 5B。



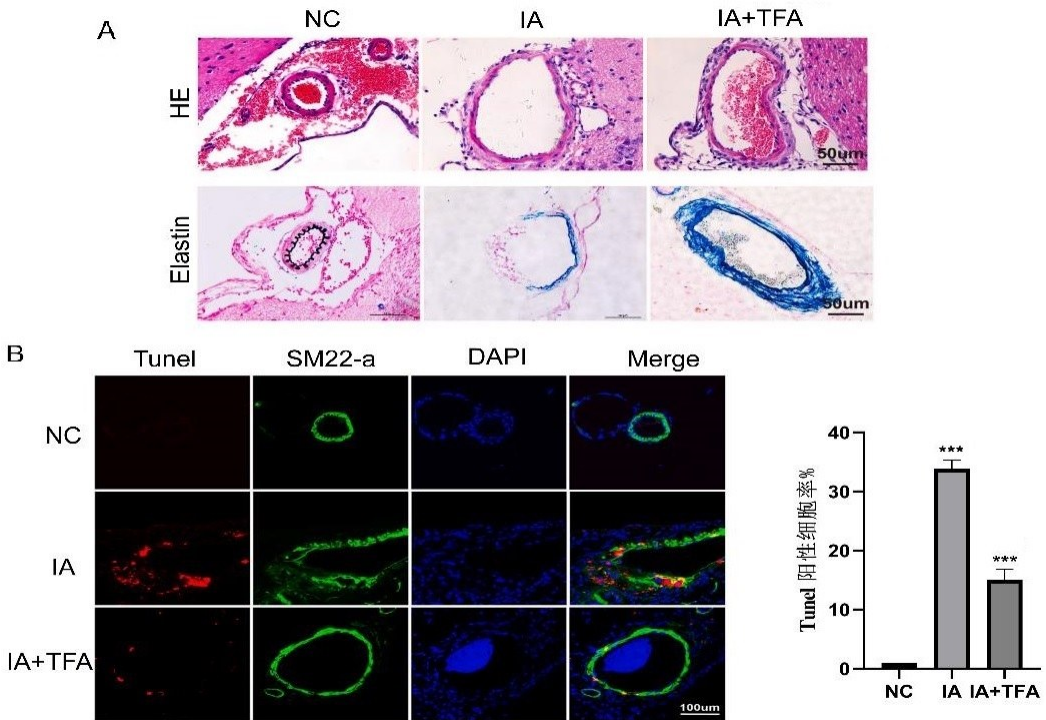
注:A. 热图分析差异基因;B. 热图显示炎症通路富集基因。

图 2 生物信息学筛选差异基因



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

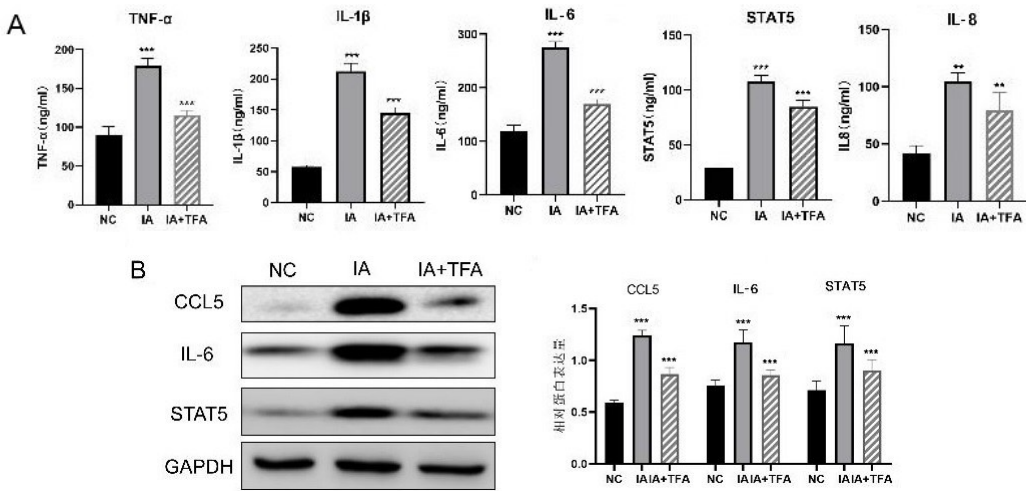
图 3 ELISA 检测 2 组样本中的炎症分子表达



注:A. HE 染色和纤维蛋白染色检测 3 组情况($\times 400$);

B. TUNEL 染色结果; *** $P < 0.001$ 。

图 4 TFA 抑制 IA 的纤维蛋白的降解



注: A. ELISA 检测各组 IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β 和 STAT5 的表达;
B. WB 检测各组中 CCL5、IL-6、STAT5 的表达。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

图 5 TFA 抑制 IL-6/STAT5 轴的表达

3 讨论

IA 是一种由于颅内动脉壁的异常扩张而形成的动脉瘤,其中 VSMC 死亡和 ECM 破坏是动脉瘤的主要诱因之一。通过生物信息学检测发现,CCL5 在颅内动脉瘤样本中过表达,且颅内动脉瘤组中的炎症因子的表达增加。

CCL5 属于趋化细胞因子或趋化因子家族。CCL5 可以促进 T 细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的趋化过程,随后将白细胞募集到炎症部位^[8-10]。此外,CCL5 在某些自然杀伤细胞(NK)的增殖和活化中也起着重要作用。CCL5 吸引免疫细胞,如 T 细胞和巨噬细胞,到炎症部位,从而促进炎症的发生和进展^[9-12]。此外,CCL5 还与血管内壁增生和纤维蛋白降解等过程密切相关^[13-14]。具体来说,CCL5 可以促进血管内皮细胞的增殖和迁移,从而增加血管内壁的厚度和阻力。从分子机制讲,CCL5 可以与靶细胞表面的受体结合,激活激酶和转录因子,促进基因的表达和蛋白质的合成。此外,CCL5 还可以与其他细胞因子和生长因子相互作用,形成复杂的网络,调节细胞的生长、分化和功能。例如,CCL5 可以激活 PKC δ ,这是一种在多种细胞类型中表达的 PKC 亚型^[15-16]。激活的 PKC δ 可以激活细胞生长、分化、代谢和趋化作用。在炎症过程中,PKC 的活化可以诱导炎症细胞如巨噬细胞和中性粒细胞的活化,进一步释放炎症介质,加剧炎症反应^[2,17-20]。

本组研究中,发现加入 CCL5 抑制剂后,可以抑制外周血样本 IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β 和 STAT5 的表达,同时也抑制了 IL-6 和 STAT5 的蛋白表达。这可能是 CCL5 通过与其受体的相互作用,影响 IL-6 介导的信号转导。这种影响可能改变 STAT5 的磷酸化状

态和活性。本研究中,发现 IA 组中 CCL5、IL-6 和 STAT5 表达升高,而 CCL5 抑制剂组中 CCL5、IL-6 和 STAT5 表达降低,且 CCL5 抑制剂组中纤维蛋白的降解。然而本研究也存在很多不足之处,首先未能详细阐明 CCL5 可能通过促进 IL-6/STAT5 轴的详细机制,其次只做了动物实验,未进行细胞学实验,因此需要在后续进一步完善相关检查。

总而言之,本研究显示沉默 CCL5 可能通过抑制 IL-6/STAT5 的表达从而抑制了 IA 的进展。因此 CCL5 抑制剂的进一步开发可能有助于颅内动脉瘤的治疗与诊断。

参考文献:

- [1] AJIBOYE N, CHALOUHI N, STARKE R M, et al. Unruptured cerebral aneurysms: evaluation and management [J]. *Sci World J*, 2015, 2015: 954954.
- [2] JIN J, DUAN J, DU L Y, et al. Inflammation and immune cell abnormalities in intracranial aneurysm subarachnoid hemorrhage (SAH): relevant signaling pathways and therapeutic strategies [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1027756.
- [3] WANG Z Y, MA J, YUE H Y, et al. Vascular smooth muscle cells in intracranial aneurysms [J]. *Microvasc Res*, 2023, 149: 104554.
- [4] BROWN R D Jr, BRODERICK J P. Unruptured intracranial aneurysms: epidemiology, natural history, management options, and familial screening [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(4): 393-404.
- [5] KLEPINOWSKI T, SKONIECZNA-Z YDECKA K, PALA B, et al. Gut microbiome in intracranial aneurysm growth, subarachnoid hemorrhage, and cerebral vaso-

- spasm: a systematic review with a narrative synthesis[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17:1247151.
- [6] LI S F, ZHANG Q, HUANG Z, et al. Integrative analysis of multi-omics data to identify three immune-related genes in the formation and progression of intracranial aneurysms [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(5):1001-1019.
- [7] WANG W, LI H, ZHAO Z, et al. The pathogenesis shared between abdominal aortic aneurysms and intracranial aneurysms: a microarray analysis[J]. *Neurosurg Rev*, 2018, 41(2):667-674.
- [8] DANGAJ D, BRUAND M, GRIMM A J, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables t cell engraftment and immune attack in solid tumors [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6):885-900. e10.
- [9] ZHOU S, LU H C, XIONG M. Identifying immune cell infiltration and effective diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis by bioinformatics analysis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:726747.
- [10] ZENG Z, LAN T X, WEI Y Q, et al. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments[J]. *Genes Dis*, 2022, 9(1):12-27.
- [11] CHEN L, XU G Y, SONG X X, et al. A novel antagonist of the CCL5/CCR5 axis suppresses the tumor growth and metastasis of triple-negative breast cancer by CCR5-YAP1 regulation[J]. *Cancer Lett*, 2024, 583:216635.
- [12] QIAN J J, DING L M, WU Q C, et al. Nanosecond pulsed electric field stimulates CD103(+) DC accumulation in tumor microenvironment via NK-CD103(+) DC cross-talk[J]. *Cancer Lett*, 2024, 593:216514.
- [13] KARGARPOUR Z, NASIRZADE J, PANAHIPOUR L, et al. Platelet-rich fibrin decreases the inflammatory response of mesenchymal cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21):11333.
- [14] KARGARPOUR Z, PANAHIPOUR L, MILDNER M, et al. Lipids of platelet-rich fibrin reduce the inflammatory response in mesenchymal cells and macrophages [J]. *Cells*, 2023, 12(4):634.
- [15] AGERE S A, AKHTAR N, WATSON J M, et al. RANTES/CCL5 induces collagen degradation by activating MMP-1 and MMP-13 expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1341.
- [16] SIEGEL R J, SINGH A K, PANIPINTO P M, et al. Extracellular sulfatase-2 is overexpressed in rheumatoid arthritis and mediates the TNF- α -induced inflammatory activation of synovial fibroblasts[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(10):1185-1195.
- [17] FRÖSEN J, CEBRAL J, ROBERTSON A M, et al. Flow-induced, inflammation-mediated arterial wall remodeling in the formation and progression of intracranial aneurysms[J]. *Neurosurg Focus*, 2019, 47(1):E21.
- [18] LIU C, YAO Z Y, WANG J N, et al. Macrophage-derived CCL5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells via the p65/STAT3-CSN5-PD-L1 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(6):1765-1781.
- [19] LI M, SUN X H, ZHAO J, et al. CCL5 deficiency promotes liver repair by improving inflammation resolution and liver regeneration through M2 macrophage polarization[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(7):753-764.
- [20] TIAN J, ASHIQUE A M, WEEKS S, et al. ILT2 and ILT4 drive myeloid suppression via both overlapping and distinct mechanisms[J]. *Cancer Immunol Res*, 2024, 12(5):592-613.

收稿日期:2024-05-05;修回日期:2024-08-19