

瘦素对动脉粥样硬化血管内皮细胞中 IL-6 表达的影响

曹蕊, 王先梅

(成都军区昆明总医院心血管内科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨瘦素在血管内皮细胞 (VECs) 对白细胞介素 6 (IL-6) 表达的影响. **方法** 采用原代细胞培养方法建立大鼠 VECs 细胞模型; 100 $\mu\text{mol/L}$ 瘦素刺激内皮细胞 0, 1, 3, 6, 12 h. 使用 ELISA 法检测各个分组细胞上清液 IL-6 的表达, real-time PCR 检测 IL-6 mRNA 的相对表达量. **结果** 与空白对照组相比, 瘦素刺激组 IL-6 的表达高于对照组 ($P < 0.05$), 且随着瘦素作用时间的延长 IL-6 蛋白及 IL-6 mRNA 的表达也随之增加 ($P < 0.05$). **结论** 瘦素时间依赖性诱导血管内皮细胞 IL-6 的表达.

[关键词] 动脉粥样硬化; 瘦素; 白细胞介素 6

[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0026-04

Effect of Leptin on Interleukin-6 Expression in Vascular Endothelial Cells

CAO Rui, WANG Xian - mei

(1) Dept. of Cardiovascular Medicine, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Postgraduate, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of leptin on the expression of Interleukin 6 in vascular endothelial cells. **Methods** Vascular endothelial cells were culture by primary cell culture, 100 $\mu\text{mol/L}$ leptin was used to stimulate endothelial cells for 0, 1, 3, 6, 12h. Then ELISA method was used to detect the expression of IL-6 protein, and the expression of IL-6 mRNA in vascular endothelial cells was detected with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR). **Results** Compared with the blank control group, the expression levels of IL-6 were higher in the leptin stimulation group, and the expression levels of IL-6 protein and mRNA were increased when the action time extended. **Conclusion** Leptin can increase the expression and secretion of IL-6 in vascular endothelial cells in time-dependent manner.

[Key words] Atherosclerosis; Leptin; IL-6

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是多种心脑血管疾病共同的病理生理基础, 是心脑血管疾病 (如冠心病、脑卒中等) 中最常见的基础性疾病, 如何有效地预防动脉粥样硬化的发生、发展, 降低患者的死亡率成为研究的重点.

近年大多数学者支持“内皮损伤反应学说”^[1,2]. 该学说核心思想指本病主要危险因素都会损伤内膜动脉, 继而产生内皮、内膜损伤做出的炎症-纤维增生性反应, 从而形成粥样硬化病变, 该学说现已得到广泛认可. 实验证明 IL-6 是反映

动脉粥样硬化演进的重要标志物, 过多的 IL-6 在体内发挥生物调节作用, 增加了心脑血管疾病的易感性和病变严重程度. 动脉粥样硬化患者血浆中的细胞因子 IL-6 的表达水平的研究, 在临床上有着较高的应用价值: 如对动脉粥样硬化发病机制的进一步剖析, 加深对该疾病的了解, 在诊断及预测疾病的进展及预后有着很大的意义.

瘦素 (Leptin) 被证明作为一个独立的危险因素和冠心病密切相关^[3-5]. 研究表明, 瘦素具有增加促炎因子 (TNF- α 、IL-6、IL-12) 分泌、刺激

[作者简介] 曹蕊 (1988~), 女, 陕西宝鸡市人, 在读硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化的防治工作.

[通讯作者] 王先梅. E-mail: xiaoxiao8813@163.com

中性粒细胞趋化、活性氧自由基的产生; 以及调节自然杀伤细胞分化、增殖、活化、细胞毒性等多项生物学效应. 但其诱导 IL-6 表达的作用并未阐明.

本研究旨在研究瘦素对血管内皮细胞 IL-6 表达的影响, 为动脉粥样硬化炎症反应提供新的靶向治疗依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 清洁级 SD 大鼠 (雄性), 体重为 (120 ± 40) g, 购自昆明医科大学动物中心.

主要实验试剂与设备 瘦素购自美国 Sigma 公司; 细胞培养基 DMEM、胎牛血清、内皮细胞生长因子购自美国 GIBCO; ELISA 试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒购自 Biotek; 孵箱 (Heal Force SMART CELL); 台式冰冻离心机 (Megafuge1.0R); 倒置显微镜 (Olympus BX41); 荧光显微镜 (日本 Olympus); 电热恒温水槽 (HH-2); 细胞培养板及培养皿购自美国 Corning 公司; 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-RAD CFX96-C1000).

1.2 方法

1.2.1 大鼠主动脉内皮细胞的培养及鉴定 取雄性 SD 大鼠乙醚麻醉, 酒精浸泡消毒, 无菌条件下快速分离胸主动脉, 置于 PBS 平衡盐液中. 清除主动脉周围的结缔组织和脂肪等, 使用提前配好的 PBS 液冲洗动脉管腔中残留的血液, 纵向剪开动脉管壁, 再次冲洗. 在另一培养皿中加入少量消化液, 消化 10 ~ 15 min 后加入 DMEM 培养液终止消化. 再将血管壁移入另一培养皿, 将内皮刮下用培养液反复冲洗, 用培养液混悬沉淀细胞, 将细胞密度调整至 1.5×10^5 个 /mL, 接种在培养皿, 并置于 37 °C 的孵箱中 24 h. 弃去培养液, 使用 PBS 液浸泡清洗残留培养液, 加入新的培养液, 2 d 换液 1 次, 当细胞长满培养皿时, 此时可进行细胞传代, 取 3 代或 4 代细胞用于实验.

1.2.2 VECs 形态学鉴定及免疫荧光检测胞浆 VIII 因子鉴定 取 2 代细胞, 消化处理后置入孵箱中, 于电镜下观察, 待细胞长满玻片, 取出进行实验.

将玻片置于湿盒内, 依次加入 4% 多聚甲醛、内源性过氧化物酶阻断剂、1% TritonX-100、兔抗鼠 VIII 因子 IgG 一抗, 4 °C 过夜. 并于次日加 FITC-羊抗兔 IgG 荧光二抗, 室温、避光 2 h 封片, 之后可在荧光显微镜下进行观察.

1.2.3 IL-6 水平测定 收集各组细胞上清液, 离心 10 min 去除颗粒和聚合物. 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 IL-6. ELISA 法测定严格按说明书操作.

使用实时荧光聚合酶链反应 (Real-Time PCR) 检测血管内皮细胞 IL-6 mRNA: 采用逆转录试剂盒. 取各个分组总 mRNA 2 μ L 逆转录成 cDNA, 之后取 5 μ L 逆转录产物进行实时荧光定量 PCR 扩增, 扩增条件为: 预变性 95 °C 2 min, 进入循环, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 40 次循环后延伸 72 °C 40 s. 通过对荧光信号和扩增循环数的分析, 计算模板 DNA 中 mRNA 的含量.

1.3 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 使用 SPSS 进行统计, 对数据进行 *t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 细胞形态学鉴定

3 d 左右组织块周围可见内皮细胞迁出, 细胞呈多角形、扁平、边界清晰, 胞质丰富, 细胞核呈圆形或椭圆形, 核居中, 偶可见双核. 10 d 左右逐渐融合, 互不重叠, 细胞排列呈“铺路石样”, 见图 1.

2.2 免疫细胞化学法鉴定结果 (对细胞进行 VIII 因子鉴定)

显微镜下可见细胞呈多边形, 核圆形或椭圆形, 边界清晰, 胞浆发绿色荧光, 见图 2.

2.3 瘦素对 IL-6 表达的影响

100 μ mol/L 瘦素刺激内皮细胞 0, 1, 3, 6, 12 h, 瘦素时间依赖性诱导血管内皮细胞 IL-6 的表达. 见表 1、表 2 及图 3、图 4. 与对照组相比, 各实验组均差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 各组两两之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 实验说明在血管内皮细胞中瘦素呈时间依赖性增加 IL-6 的表达.

如表 1 和图 3 显示, IL-6 表达量在 1 h 开始增加, 3 h, 6 h 呈逐渐上升趋势, 12 h 为最大表达量, 数据说明在血管内皮细胞中, 瘦素呈时间依赖性增加 IL-6 的表达.

如表 2 和图 4 显示, IL-6 mRNA 相对表达量在 1 h 开始增加, 3 h, 6 h 呈逐渐上升趋势, 12 h 为最大表达量, 数据说明在血管内皮细胞中, 瘦素呈时间依赖性增加 IL-6 mRNA 的表达.

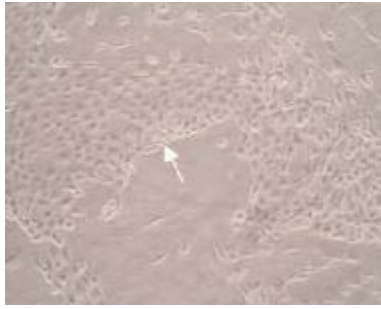


图 1 大鼠主动脉内皮细胞 (箭头所示) (×100)

Fig. 1 Aorta endothelial cell of the rat (arrow) (×100)

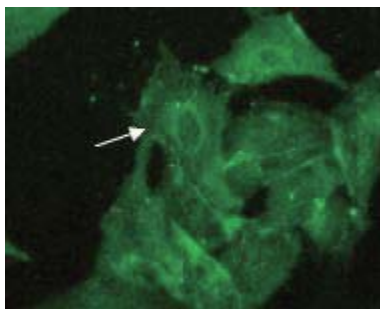


图 2 免疫胞化学法鉴定血管内皮细胞 VIII 因子 (箭头所示) (×100)

Fig. 2 VIII factor of endothelial cell with immunocytochemistry identification (arrow) (×100)

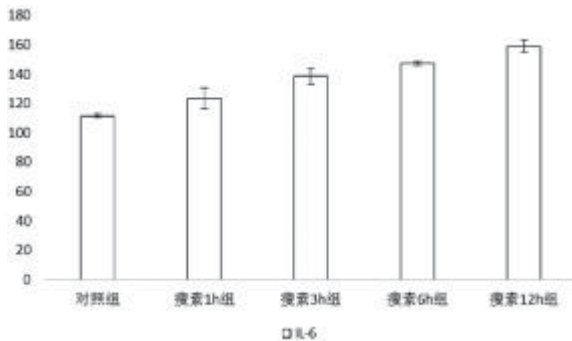


图 3 ELISA 检测细胞上清液 IL-6 含量结果 [pg/mL, (x̄ ± s), n = 3]

Fig. 3 The ELISA result for IL-6 content in cell supernatant [pg/mL, (x̄ ± s), n = 3]

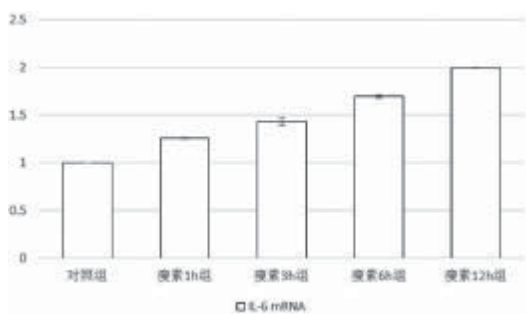


图 4 瘦素对 IL-6 mRNA 的影响 [(x̄ ± s), n = 3]

Fig. 4 The effect of leptin on IL-6 mRNA [(x̄ ± s), n = 3]

表 1 ELISA 检测细胞上清液 IL-6 含量结果

[pg/mL, (x̄ ± s), n = 3]

Tab. 1 The ELISA result for IL-6 content in cell supernatant [pg/mL, (x̄ ± s), n = 3]

| 变 量 | IL-6 |
|-----------|--------------------------------|
| 对照组 | 111.56 ± 1.372 |
| 瘦素 1 h 组 | 123.196 ± 7.05* |
| 瘦素 3 h 组 | 138.411 ± 5.203* [△] |
| 瘦素 6 h 组 | 147.179 ± 1.211* ^{△△} |
| 瘦素 12 h 组 | 159.067 ± 4.02* ^{△△} |

与对照组比较, *P < 0.05; 与瘦素 1h 组比较, [△]P < 0.05; 与瘦素 3h 组比较, ^{△△}P < 0.05.

表 2 瘦素对 IL-6 mRNA 的影响 [(x̄ ± s), n = 3]

Tab. 2 The effect of leptin on IL-6 mRNA [(x̄ ± s), n = 3]

| 变 量 | IL-6 mRNA 相对表达量 |
|-----------|------------------------------|
| 对照组 | 1.00 ± 0.00 |
| 瘦素 1 h 组 | 1.259 ± 0.009* |
| 瘦素 3 h 组 | 1.432 ± 0.037* [△] |
| 瘦素 6 h 组 | 1.695 ± 0.021* ^{△△} |
| 瘦素 12 h 组 | 1.998 ± 0.003* ^{△△} |

与对照组比较, *P < 0.05; 与瘦素 1h 组比较, [△]P < 0.05; 与瘦素 3h 组比较, ^{△△}P < 0.05.

3 讨论

血管内皮细胞对维持血管正常的生理功能具有很重要的生理意义^[6]: 如正常的内皮细胞可调节血管紧张度, 维持血管结构; 并且可以分泌抗凝、抗血小板物质和纤溶蛋白, 同时具有抗炎作用, 可防止中性粒细胞、单核细胞等炎症细胞向血管壁黏附聚集. 血管内皮细胞在病理因素刺激下发生内皮功能异常, 表现为血管张力调节障碍和黏附分子表达异常^[7-9].

瘦素被证明是动脉粥样硬化一项独立的危险因素, 大多数患者可检出血清高瘦素水平. 肥胖者更甚^[10]. 瘦素导致动脉粥样硬化的具体机制仍不清楚. 本实验通过对血管内皮细胞的培养, 尝试从细胞水平对其诱导动脉粥样硬化的机制进行阐述.

本研究通过离体组织体外分离细胞的方法培养大鼠主动脉血管内皮细胞, 实验中使用 100 ng/mL 瘦素分别刺激细胞 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h, 使用双抗体夹心 ELISA 法检测、实时荧光聚合酶链反应 (Real-Time PCR) 分别检测各组 IL-6、IL-6 mRNA. 实验结果显示瘦素呈时间依赖性促进

血管内皮细胞 IL-6 的表达. 实验证实瘦素可以增加血管内皮细胞 IL-6 mRNA 和蛋白水平, 且呈时间依赖性, 这可能与瘦素激活核因子 κ B (NF- κ B) 有关, 也许是瘦素诱导动脉粥样硬化的机制之一.

尽管瘦素诱导内皮细胞 IL-6 表达的全部机制仍然没有弄清楚, 但研究证明了瘦素可以直接上调体外培养的血管内皮细胞 IL-6 的表达和分泌, 我们的研究结果已经表明瘦素直接参与动脉粥样硬化的慢性炎症反应, 为肥胖相关性动脉粥样硬化的预防、诊断及治疗提供了重要的证据.

[参考文献]

- [1] EIJI HORIO, TSUYOSHI KADOMATSU, KEISHI MIYATA, et al. Role of endothelial cell derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4):790 - 800.
- [2] KYUNG-SUN HEO, EUGENE CHANG, NHAT-TU LE, et al. De-SUMOylation enzyme of sentrin/SUMO-specific protease 2 regulates disturbed flow induced SUMOylation of ERK5 and p53 that leads to endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2013, 112 (5):911 - 923.
- [3] JACOB SCHNEIDERMAN, KATRIN SCHAEFER, FRANK D, et al. Leptin locally synthesized in carotid atherosclerotic plaques could be associated with lesion instability and cerebral emboli[J]. *JAMA*, 2012, 9(1): e001 727.
- [4] AHMED ELKALIOUBIE, CHRISTOPHE ZAWADZKI, ALEXANDRE UNG, et al. Role of leptin on plaque stability: insights from the opal (OPTimized management of atherosclerosis in various localizations) carotid endarterectomy study[J]. *Circulation*, 2011, 124(11): A15 299.
- [5] MAUREEN MCMAHON, BRIAN J SKAGGS, LORI SAHAKIAN, et al. High plasma leptin levels confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus, and are associated with inflammatory oxidised lipids[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(9):1 619 - 1 624.
- [6] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8):272 - 276.
- [7] THORSTEN M LEUCKER, GE ZHI-DONG, JESSE PROCKNOW, et al. Two models of endothelial dysfunction:the importance of intrinsic cardioprotective properties of the coronary-endothelium[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(5):A419.
- [8] MI-HYUN NAM, JI-SUN O H, CHUNG-OUI HONG, et al. Pheophorbide-a prevents vascular endothelium dysfunction and down-regulates AGEs-induced proinflammatory cytokines[J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 594 - 596.
- [9] LIVIUS V, D'USCIO, TONGRONG H E, et al. Mechanisms of vascular dysfunction in mice with endothelium-specific deletion of the PPAR- gene [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(4):H1 001 - H1 010.
- [10] CANATAN H, BAKAN I, AKBULUT M, et al. Comparative analysis of plasma leptin level in both genders of patients with essential hypertension and healthy subjects [J]. *Endocr Res*, 2004, 30(1):95 - 105.

(2014 - 06 - 01 收稿)