

辛伐他汀对 C 反应蛋白和脂多糖诱导的单核细胞合成白细胞介素 6 的影响

陈学军¹, 李建军, 夏 玲, 王 晶, 李庚山

(武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 细胞生物学; 辛伐他汀的抗炎作用; 酶联免疫吸附试验; 白细胞介素 6; 单核细胞; C 反应蛋白; 脂多糖

[摘要] 通过研究辛伐他汀对 C 反应蛋白和脂多糖诱导的人外周血单核细胞合成白细胞介素 6 的影响, 探讨辛伐他汀的抗炎作用。采用密度梯度离心法分离人外周血单核细胞, 应用酶联免疫吸附试验观察 C 反应蛋白和脂多糖刺激单核细胞产生白细胞介素 6 的时间及剂量效应, 其峰值与辛伐他汀抑制剂组进行比较。结果发现, 白细胞介素 6 的合成随 C 反应蛋白和脂多糖浓度的升高而增加, 呈剂量依赖性; 20 mg/L C 反应蛋白和 10 μ g/L 脂多糖刺激白细胞介素 6 合成的开始时间分别是 4 h 和 2 h, 均呈时间依赖性, 在 24 h 达高峰, 其峰值分别是 904 ± 77 和 $1\,654 \pm 765$ ng/L。辛伐他汀 (10^{-8} mol/L ~ 10^{-6} mol/L) 呈剂量依赖性抑制 20 mg/L C 反应蛋白诱导的单核细胞白细胞介素 6 合成, 仅 10^{-6} mol/L 的辛伐他汀能抑制 10 μ g/L 脂多糖诱导的单核细胞白细胞介素 6 合成。结果提示, C 反应蛋白和脂多糖能诱导人单核细胞产生白细胞介素 6; 辛伐他汀抑制 C 反应蛋白及脂多糖诱导的单核细胞白细胞介素 6 合成; 辛伐他汀对单核细胞炎症反应的抑制提示该药物可用于预防和治疗冠心病。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Simvastatin on Interleukin-6 Synthesis in Monocytes Stimulated by C-Reactive Protein and Lipopolysaccharide

CHEN Xue-Jun, LI Jian-Jun, XIA Ling, WANG Jing, and LI Geng-Shan

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Inflammation; Simvastatin; Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Interleukin 6; Monocytes; C-Reactive Protein; Lipopolysaccharide

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of simvastatin on interleukin 6 (IL-6) production in human monocytes stimulated by C-reactive protein (CRP) and lipopolysaccharide (LPS), assess the influence of simvastatin on monocytes inflammatory reaction. **Methods** Monocytes were isolated by ficoll density gradient from blood of healthy volunteers. To measure interleukin 6 production (by ELISA) stimulated by 20 mg/L CRP and 10 μ g/L LPS at 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h or 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L CRP and 1 μ g/L, 2.5 μ g/L, 5 μ g/L, 10 μ g/L LPS at 24 h, the peaks to be compared with which inhibited by simvastatin (10^{-8} mol/L ~ 10^{-6} mol/L). **Results** Interleukin 6 could be produced after being stimulated with 20 mg/L CRP at 4 h and with 10 μ g/L LPS at 2 h. The effects of CRP and LPS were dose-dependent and time-dependent, reaching peaks at 24 h. The highest levels of monocytes IL-6 were 904 ± 77 ng/L, $1\,654 \pm 765$ ng/L in CRP and LPS groups, respectively. Simvastatin (10^{-8} mol/L ~ 10^{-6} mol/L) inhibited IL-6 production induced by 20 mg/L CRP in a dose-dependent manner. Only 10^{-6} mol/L simvastatin could inhibit IL-6 production induced by 10 μ g/L LPS. **Conclusion** C-reactive protein and LPS induce the production of IL-6 in human monocytes; simvastatin can inhibit the production of IL-6, it may be used in clinical prevention and treatment of coronary heart disease.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种脂质沉积性病变, 有研究表明全身性炎症在其发生发展中也起关键作用^[1,2]。白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 均是动脉粥样硬化的危险因

子, C 反应蛋白水平反映着动脉粥样斑块的易碎性和破裂的可能性^[2,3]。单核细胞受刺激后可分泌白细胞介素 6, 后者调节 C 反应蛋白的产生, 白细胞介素 6 可能是动脉粥样硬化发展的关键, 减少白细胞介素 6 的合成对心血管具有保护作用。脂多糖与单核细胞分化抗原 CD14 结合, 诱导单核细胞合成炎症因子、粘附分子和组织因子参与炎症反应。他汀类药物除具有调脂作用外, 还可改善内皮功能, 抗氧化、抗炎、抗增生、稳定斑块、抗凝。本实验通过诱导人外周血单核细胞的炎症反应, 观察辛伐他汀 (sim-

[收稿日期] 2002-09-09

[修回日期] 2003-03-12

[作者简介] 陈学军, 男, 1970 年出生, 湖北省天门市人, 主治医师, 硕士研究生在读, 从事心血管内科专业, 联系电话: 0716-8190675。李建军, 男, 1957 年出生, 留美博士后, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病。

vastation, Sim) 的抗炎作用, 为其抗动脉粥样硬化作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

淋巴细胞分离液(上海化学试剂二厂); RPMI-1640 培养基(Gibco); 24 孔培养板(Nunc); 脂多糖 011B4(Sigma); C 反应蛋白(Sigma); 辛伐他汀原粉(美国 Merck); 白细胞介素 6 酶联免疫吸附试验试剂盒(Genzyne)。

1.2 外周血单个核细胞的分离与培养

取健康志愿者外周静脉血, 用生理盐水 1:1 稀释。用尖头吸管轻轻铺于比重 1.077 淋巴细胞分离液表面, 稀释血与淋巴细胞分离液体积比为 2:1, 形成清晰界面。台式离心机 1 500 r/min 离心 25 min, 离心后单个核细胞悬于分层液面, 呈白膜状。用吸管轻轻将单个核细胞吸入另一管内, PBS 清洗 2 次(1 500 r/min, 5 min)。将清洗后的细胞重悬于 RPMI 1640 培养基(含 25 mmol/L HEPES, 1 nmol/L 谷氨酰胺, 10^5 u/L 青霉素和链霉素, 10% 胎牛血清)。台盼蓝拒染试验显示活细胞 > 95%。将细胞接种于培养皿中, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 2 h 后, 吸出培养基, 用 37℃ 预热的培养基清洗 5 次, 将未贴壁细胞洗脱, 瑞氏染色鉴定贴附细胞为单核细胞, 占 85%。将贴附细胞用细胞刮片轻轻刮下, 重悬于 RPMI 1640 培养基中, 调节细胞密度为 1×10^6 /L, 并接种于 24 孔培养板, 每孔 200 μ L。

1.3 试验分组

将实验分为 3 组: CRP(20 mg/L) 和脂多糖(10 μ g/L) 分别作用于人单核细胞不同时间(2 h、4 h、8 h、16 h 和 24 h) 对白细胞介素 6 浓度的影响; ④不同浓度 CRP(1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 和 20 mg/L) 和脂多糖(1 μ g/L、2.5 μ g/L、5 μ g/L 和 10 μ g/L) 分别作用于人单核细胞 24 h 对白细胞介素 6 浓度的影响; ④不同浓度(10^{-6} mol/L ~ 10^{-8} mol/L) 的辛伐他汀与单核细胞预先孵育 1 h, 再分别加入 CRP(20 mg/L) 和脂多糖(10 μ g/L) 作用 24 h, 观察辛伐他汀对单核细胞合成白细胞介素 6 的影响。

1.4 酶联免疫吸附试验

细胞培育后收集上清液, 按照试剂盒操作说明进行试验。将不同浓度的 IL-6 标准品(3 000 ng/L、2 000 ng/L、1 000 ng/L、500 ng/L、250 ng/L、125 ng/L、62.5 ng/L 和 31.25 ng/L) 及待测样品以每孔 100 μ L 加入酶标孔, 室温下孵育 120 min, 洗板 5 次。加

入酶结合物工作液(100 μ L/孔), 封住板孔, 室温孵育 30 min, 洗板 5 次。加入底物显色剂避光室温 30 min, 加终止液。酶标仪在 450 nm 波长下读取各孔吸光度值(absorbent values, A)。以浓度值为横坐标, 所测各标准吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。按样本孔测得的吸光度值从标准曲线上查得相应的浓度值, 以 ng/L 表示。每个待测值均作 6 个样本。

1.5 统计学处理

数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 用方差分析判断均数差异的显著性。

2 结果

2.1 C 反应蛋白和脂多糖诱导人单核细胞合成白细胞介素 6 的时间曲线

在 CRP(20 mg/L) 和脂多糖(10 μ g/L) 刺激单核细胞后, IL-6 分别在 4 h 和 2 h 开始升高, 随刺激时间延长 IL-6 合成增加, 均于 24 h 时达峰值, 其峰值分别是 904 ± 77 ng/L 和 $1 654 \pm 765$ ng/L (图 1, Figure 1)。脂多糖诱导单核细胞合成 IL-6 的作用强于 CRP, 反映其致炎作用较强。

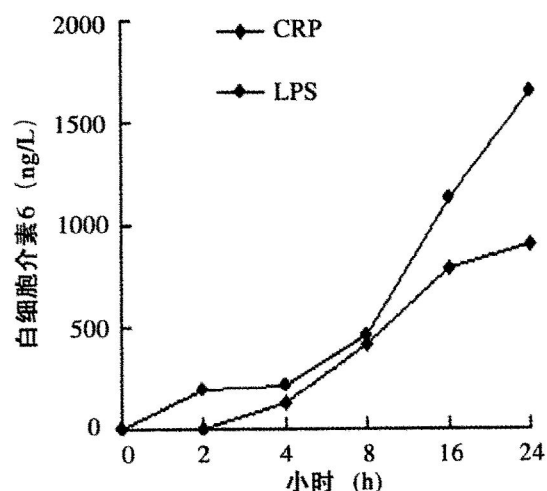


图 1. C 反应蛋白(20 mg/L) 和脂多糖(10 μ g/L) 作用于人单核细胞不同时间对白细胞介素 6 合成的影响($n=6$)

Figure 1. The time curves of human monocytes interleukin-6 production induced by 20 mg/L C-reactive protein or 10 μ g/L lipopolysaccharide ($n=6$)

2.2 C 反应蛋白和脂多糖诱导人单核细胞合成白细胞介素 6 的剂量效应

在不同浓度 CRP 和脂多糖刺激 24 h 后, IL-6 的产生随 CRP 和脂多糖浓度的升高而增高, 即呈剂量依赖性(表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度的 C 反应蛋白和脂多糖对单核细胞合成白细胞介素 6 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1. Dose dependent induction of monocyte interleukin 6 by C reactive protein and lipopolysaccharide

组 别	白细胞介素 6 (ng/L)
空白对照	79 \pm 6
C 反应蛋白 1 mg/L	150 \pm 30
C 反应蛋白 5 mg/L	698 \pm 52
C 反应蛋白 10 mg/L	765 \pm 83
C 反应蛋白 20 mg/L	904 \pm 77
脂多糖 1 μ g/L	193 \pm 52
脂多糖 2.5 μ g/L	366 \pm 53
脂多糖 5 μ g/L	800 \pm 150
脂多糖 10 μ g/L	1 654 \pm 765

2.3 辛伐他汀对 C 反应蛋白和脂多糖诱导的人单核细胞合成白细胞介素 6 的影响

低浓度辛伐他汀 (10^{-8} mol/L) 即能显著抑制 20 mg/L CRP 诱导的 IL-6 合成 ($P \leq 0.001$), 说明辛伐他汀对 CRP 诱导的抗炎作用有较强的争对性。仅高浓度辛伐他汀 (10^{-6} mol/L) 能抑制 10 μ g/L 脂多糖诱导的 IL-6 产生, 低中浓度辛伐他汀亦能减少脂多糖诱导的 IL-6 合成, 但其组间差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 不同浓度辛伐他汀对 C 反应蛋白 (20 mg/L) 或脂多糖 (10 μ g/L) 诱导的人单核细胞合成白细胞介素 6 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2. Effects of different concentration of simvastatin on monocyte interleukin 6 production induced by 20 mg/L C reactive protein or 10 μ g/L lipopolysaccharide

组 别	白细胞介素 6 (ng/L)
C 反应蛋白	904 \pm 77
C 反应蛋白+ 10^{-8} mol/L 辛伐他汀	469 \pm 135 ^a
C 反应蛋白+ 10^{-7} mol/L 辛伐他汀	372 \pm 41 ^a
C 反应蛋白+ 10^{-6} mol/L 辛伐他汀	156 \pm 37 ^a
脂多糖	1 654 \pm 765
脂多糖+ 10^{-8} mol/L 辛伐他汀	487 \pm 108
脂多糖+ 10^{-7} mol/L 辛伐他汀	472 \pm 95
脂多糖+ 10^{-6} mol/L 辛伐他汀	242 \pm 50 ^b

a: 与 C 反应蛋白组比较, $P \leq 0.001$, b: 与脂多糖组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病^[2], 持续

炎症过程最终会使稳定的动脉粥样硬化斑块变为不稳定的斑块, 不稳定斑块的特点为富含炎症细胞超过斑块修复能力, 易于破裂, 发生急性冠状动脉综合征者 90% 以上为不稳定斑块所致。

单核/巨噬细胞是人体最主要的炎性细胞, 同时也是动脉粥样硬化斑块的重要组成成份, 脂多糖是革兰氏阴性杆菌外膜的主要组成成份, 是单核细胞的刺激因子, 脂多糖通过与机体靶细胞(单核/巨噬细胞等)结合, 激活并释放一系列炎性介质, 肿瘤坏死因子、 γ -干扰素和白细胞介素等是脂多糖毒性作用的重要介质^[4]。脂多糖还可募集单核/巨噬细胞, 诱导泡沫细胞形成, 激活补体并具致凝作用; 脂多糖加速高胆固醇血症大白兔动脉粥样硬化的发展^[5]。

C 反应蛋白是一种能与肺炎球菌荚膜 C 多糖物质反应的急性期反应蛋白, C 反应蛋白与人类 IgG1 重链第三恒定区(CH3)的氨基酸排列顺序非常相似, 与补体 C1 和某些 HLA 抗原的氨基酸序列也有相似之处, C 反应蛋白具有与 IgG 和补体相似的调理和凝集作用, 刺激单核细胞表面的组织因子表达及其它细胞因子表达。大量证据表明 C 反应蛋白参与了动脉粥样硬化的发生、发展及预后, C 反应蛋白可用于不稳定型心绞痛的危险分层, CPR 与甘油三酯水平的内在联系与细胞因子的作用相关, 特别是白细胞介素 6 不仅调节 C 反应蛋白产生, 还可增加肝脏合成甘油三酯。

白细胞介素 6 是一种相对分子质量为 26 000 的糖蛋白, 其生物作用广泛, 白细胞介素 6 选择性表达于鼠和人的粥样斑块^[6,7], 能够加速鼠模型早期动脉硬化的形成, 通过以下机制促进动脉粥样硬化损害的发展: ①增加葡萄糖摄取, ②改变胰岛素敏感性, ③增加内皮细胞释放粘附分子, ④介导巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞, ⑤促进肝脏释放纤维蛋白原, 并有致凝血作用, ⑥增加胆固醇合成, 减少胆固醇分泌, ⑦上调编码卵磷脂胆固醇酰基转移酶及载脂蛋白 A-I 的基因表达^[8,9]。

在 60% 的不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)患者, 血循环中白细胞介素 6 水平升高, 而稳定型心绞痛患者却无明显变化^[10], 说明血浆白细胞介素 6 水平与粥样斑块的稳定性相关, 升高的白细胞介素 6 水平预示 UA 患者不稳定斑块的存在, 也预示着将来发生心肌梗死的危险性^[11], 农村健康研究表明, 高白细胞介素 6 水平预示着 5 年总病死率和心血管疾病病死率的增加, 血浆白细胞介素 6 ≥ 5 ng/L 者的病死率显著高于白细胞介素 6 < 5 ng/L 者。

最近的研究表明辛伐他汀具有调脂及抗动脉硬

化作用^[12], 1998 年 Williams 等研究显示粥样硬化的猴采用普伐他汀治疗, 降低巨噬细胞含量、钙化及新生血管形成并不影响病变大小, 其作用独立于降脂作用之外, 这提示他汀类药物可减少斑块炎症, 加强斑块稳定性。辛伐他汀通过对巨噬细胞中胆固醇酯化的抑制作用减少巨噬细胞活化和泡沫细胞形成; 还可抑制氧化型低密度脂蛋白的促鼠腹腔巨噬细胞生长作用; 在高胆固醇血症病人, 辛伐他汀降低单核细胞表面表达 CD11b 及减少单核细胞粘附到内皮^[13], 减轻微循环中中性粒细胞与内皮细胞的相互作用; 还可减少缺血一再灌注损伤时中性粒细胞渗出。动物实验表明, 辛伐他汀抑制载脂蛋白 E 缺失的高胆固醇喂养小鼠的血管壁白细胞滚动及粘附^[14], Pasci 发现 C 反应蛋白对内皮细胞分泌单核细胞趋化蛋白 1 有直接作用, 这种诱导效果不受阿斯匹林影响, 但被 5 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀显著抑制, Musical 等发现, 在总胆固醇 > 6.5 mmol/L 的男性患者, 经每日 300 mg 阿斯匹林治疗 2 周, 白细胞介素 6 水平无明显下降, 再予辛伐他汀每日 20~40 mg 治疗 3 月, 白细胞介素 6 从 4.6 ng/L 降至 2.7 ng/L, C 反应蛋白水平也降低。这些研究说明辛伐他汀是通过抑制血中或斑块中的炎性成份来达到抗动脉硬化作用的。

本文研究发现, 辛伐他汀呈剂量依赖性抑制 C 反应蛋白和脂多糖诱导的人单核细胞产生白细胞介素 6。因 C 反应蛋白与白细胞介素 6 均是动脉粥样硬化和冠心病的危险因子, 白细胞介素 6 刺激肝脏合成 C 反应蛋白, 辛伐他汀抑制白细胞介素 6 的合成有助于阻断两者间的级联放大效应。本实验从基础研究方面证明辛伐他汀能拮抗单核细胞的炎症反应, 他汀类药物可能通过抗炎作用及稳定斑块产生抗动脉粥样硬化效应, 从而在冠心病的预防和治疗中发挥作用。本研究证实: C 反应蛋白和脂多糖均能诱导单核细胞产生白细胞介素 6; ④辛伐他汀抑

制 C 反应蛋白和脂多糖诱导的白细胞介素 6 合成; ④辛伐他汀对单核细胞炎症反应的抑制提示该药物可用于预防和治疗冠心病。

[参考文献]

- [1] Libby P, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation*, 1999, **100** (11): 1 148-150
- [2] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [3] Maseri A. Inflammation, atherosclerosis and ischemic events-exploring the hidden side of the moon. *N Engl J Med*, 1997, **336** (14): 1 014-016
- [4] Foca A, Berlingheiri MC, Barreca GS, Placanica PM, Diana R, Liberto MC, et al. Kinetics of IL-8, MIP-1 alpha, TNF-alpha, IL-1-beta, IL-1ra, and IL-10 in human whole blood sample triggered by smooth and rough LPS. *New Microbiol*, 1998, **21** (2): 123-130
- [5] Lehr HA, Sagban TA, Thling C, Zahringer U, Hungerer KD, Blumrich M, et al. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation*, 2001, **104** (8): 914-920
- [6] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin 6 and interleukin 8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*, 1996, **127** (2): 263-271
- [7] Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokines*, 1994, **6** (11): 87-91
- [8] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin 6 the link? *Atherosclerosis*, 2000, **148** (2): 209-214
- [9] Skretting G, Gjernes E, Prydz H. Regulation of lecithin: Cholesterol acyltransferase by TGF-beta and interleukin 6. *Biochem Biophys Acta*, 1995, **1 255** (3): 267-272
- [10] Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, et al. Elevated levels of interleukin 6 in unstable angina. *Circulation*, 1996, **94** (5): 874-877
- [11] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin 6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 2000, **101** (15): 1 767-772
- [12] 覃军, 何作云, 李爱民. 辛伐他汀的调脂及抗动脉硬化作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 418-420
- [13] Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesives of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30** (5): 1 212-217
- [14] Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM, Trocha SD, et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2001, **103** (21): 2 598-603

(此文编辑 朱雯霞)