

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0559-03

• 实验研究 •

胰岛素对人外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 蛋白表达及分泌的影响以及普伐他汀的干预作用

潘晓明, 吴宗贵, 黄佐, 任雨笙, 张家友, 李洪涛

(上海长征医院内科, 上海市 200003)

[关键词] 内科学; 胰岛素对肿瘤坏死因子 α 蛋白表达及分泌的影响以及普伐他汀的干预作用; Western blot; 外周血单个核细胞; 胰岛素; 肿瘤坏死因子 α ; 普伐他汀

[摘要] 探讨胰岛素对培养的人外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 蛋白表达及分泌的影响, 以及普伐他汀对其的作用。健康人静脉血加入淋巴细胞分离液后离心提取人外周血单个核细胞培养, 加入不同浓度的胰岛素、普伐他汀及甲羟戊酸孵育 48 h, 采用 Western blot 及酶联免疫吸附法等方法, 观察人外周血单个核细胞中肿瘤坏死因子 α 蛋白表达水平及细胞培养上清中肿瘤坏死因子 α 蛋白水平。结果发现, 胰岛素可诱导人外周血单个核细胞及其培养上清中肿瘤坏死因子 α 蛋白水平显著升高, 且呈剂量依赖性, 加入普伐他汀后可使胰岛素刺激的人外周血单个核细胞及其培养液上清中肿瘤坏死因子 α 蛋白水平显著下降, 普伐他汀的这种作用可被甲羟戊酸所抑制。结果提示, 普伐他汀对糖尿病患者心血管系统的保护作用可能部分与其抑制胰岛素介导的炎症反应有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effects of Insulin on Expression and Secretion of Tumor Necrosis Factor- α Protein of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and the Intervention Effects of Pravastatin

PAN Xiao-Ming, WU Zong-Gui, HUANG Zuo, REN Yu-Sheng, ZHANG Jia-You, and LI Hong-Tao

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] Peripheral Blood Mononuclear Cell; Insulin; Tumor Necrosis Factor- α ; Pravastatin; Atherosclerosis; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of insulin on expression and secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) protein of human peripheral blood mononuclear cells and the effects of Pravastatin. **Methods** The human peripheral blood mononuclear cells were derived from healthy volunteer's vein blood by density centrifugation using Ficoll and cultured in RPMI 1640 medium containing 10% autologous serum, and then added human insulin, Pravastatin and mevalonate to continue culture for 48 h, the levels of TNF- α protein in cells and in supernatant were tested by Western blot and ELISA assay. **Results** Insulin stimulation resulted in significantly elevated levels of TNF- α protein in mononuclear cells and the supernatant of cells culture in dose-dependent, however, after incubated with insulin plus Pravastatin, the levels of TNF- α protein in cells and the supernatant were lower, which effects could be diminished by added mevalonate. **Conclusion** Insulin can increase the expression and secretion of TNF- α protein of human peripheral mononuclear cells and its effects can be inhibited by Pravastatin, which indicates that the cardioprotective effects of Pravastatin on diabetes patients might be partially associated with inhibiting inflammation mediated by insulin.

目前认为糖尿病是一个冠心病等危征。许多研究表明胰岛素抵抗及高胰岛素血症在冠心病的发生、发展过程中起着极为重要的作用^[1,2], 但是, 胰岛素致动脉粥样硬化的机制还有待于进一步研究。炎症是冠状动脉病变过程中的重要因素, 本研究拟探讨胰岛素对人外周血单个核细胞(peripheral blood

mononuclear cell, PBMC) 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 蛋白表达及分泌的影响, 并观察他汀类药物普伐他汀对该过程的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

RPMI 1640 培养基(Gibco BRL); 胰岛素(Sigma); 兔抗人 TNF- α 多抗(Santa Cruz); TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA) 检测试剂盒(Genzyme); 辣根过氧化物酶结合的抗兔 IgG 单抗(Santa Cruz); 荧光自显影试剂(Santa Cruz); 普伐他汀标准品(上海中美施贵宝公司惠赠); 垂直电泳仪(Bio-Rad); 垂直电转移槽

[收稿日期] 2003-12-08

[修回日期] 2004-04-10

[作者简介] 潘晓明, 医学博士, 讲师, 研究方向为冠心病防治, E-mail 为 xiaomingp@sh163.net。吴宗贵, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病防治。黄佐, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病防治。

(Bio-Rad); Bio-RAD 550 型酶联仪; 低温高速离心机 (Sigma)。

1.2 细胞培养

健康人静脉血加入淋巴细胞分离液后离心提取人 PBMC, 在含 10% 同源血清的 RPMI1640 培养基中培养后, 取 1.3×10^7 的人 PBMC 置于 12 孔培养板中培养(设 3 复孔, 每个剂量组 $n=3$) 24 h 后弃去培养基, 加入含 0.5% 同源血清的新鲜 RPMI1640 培养基培养 6 h 后, 分别加入含 1、10 和 100 pmol/L 胰岛素或含 100 pmol/L 胰岛素及普伐他汀(100 μ mol/L) 或 100 pmol/L INS、100 μ mol/L 普伐他汀及 100 μ mol/L 甲羟戊酸, 培养 48 h, 离心收集细胞及培养上清, 细胞用于 Western blot 检测 TNF- α 蛋白表达, 上清用于测定 TNF- α 水平。

1.3 Western blot 检测肿瘤坏死因子 α 蛋白

细胞分别与胰岛素、胰岛素+普伐他汀或胰岛素+普伐他汀+甲羟戊酸孵育 48 h, 离心后收集细胞, 加入 100 μ L 预冷的 RIPA 裂解液, 0 $^{\circ}$ C、30 min 后, 超声剪切 DNA, 离心收集裂解上清, 测定蛋白浓度, 加样, 于 12% SDS-聚丙酰胺凝胶中电泳后转移至醋酸纤维膜上, 与抗人 TNF- α 多抗孵育后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, PBS 漂洗后加入荧光 ECL 试剂作用 1 min, 然后测定相对荧光强度(以无血清培养的人 PBMC 所表达的 TNF- α 蛋白的荧光强度为 100%)。

1.4 肿瘤坏死因子 α 水平测定

细胞分别与胰岛素或胰岛素+普伐他汀或胰岛素+普伐他汀+甲羟戊酸孵育 48 h, 离心收集培养上清, 用双抗体夹心 ELISA 测定 TNF- α 蛋白水平, 检测方法严格按照说明书进行, 以 Lowry's 法测定的细胞内总蛋白含量校正。

1.5 统计学处理

所获参数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 3.0 统计软件进行 F 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 胰岛素对人外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 蛋白表达的影响

与对照组的细胞比较, 经胰岛素刺激后, 人 PBMC TNF- α 蛋白的表达水平明显升高, 其效应呈剂量依赖性(表 1, Table 1)。

2.2 胰岛素对人外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 分泌的影响

与对照组比较, 经胰岛素刺激后, 人 PBMC 培养

上清液中的 TNF- α 水平显著增加, 其效应亦呈剂量依赖性(表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度胰岛素对外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 蛋白表达及分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1. The effects of insulin in different concentrations on the level of TNF- α protein expression and secretion of PBMC

分 组	蛋白表达	分泌量 (μ g/g)
对照组	108% \pm 17%	213 \pm 32
胰岛素 1 pmol/L	130% \pm 14%	287 \pm 28 ^a
10 pmol/L	153% \pm 20% ^a	311 \pm 24 ^b
100 pmol/L	179% \pm 15% ^b	528 \pm 33 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 普伐他汀对胰岛素刺激的人外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 蛋白表达的影响

与胰岛素刺激的细胞比较, 胰岛素与普伐他汀共同孵育人 PBMC 后, 细胞 TNF- α 蛋白表达显著下降, 而胰岛素、普伐他汀及甲羟戊酸共同孵育人 PBMC 后, 细胞 TNF- α 蛋白再次呈高水平表达(表 2, Table 2)。

表 2. 胰岛素对外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 蛋白表达、分泌的影响及普伐他汀的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2. The effects of insulin on TNF- α protein expression and secretion of PBMC and Pravastatin intervention

分 组	蛋白表达	分泌量 (μ g/g)
对照组	107% \pm 18%	224 \pm 23
胰岛素组	186% \pm 13%	544 \pm 31
胰岛素+普伐他汀组	134% \pm 21% ^a	277 \pm 24 ^b
胰岛素+普伐他汀+甲羟戊酸组	181% \pm 19%	531 \pm 33

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与胰岛素组及胰岛素+普伐他汀+甲羟戊酸组比较。

2.4 普伐他汀对胰岛素刺激的人外周血单个核细胞肿瘤坏死因子 α 分泌的影响

与胰岛素刺激的细胞比较, 胰岛素与普伐他汀共同孵育的人 PBMC 上清液中 TNF- α 水平明显下降, 而胰岛素、普伐他汀及甲羟戊酸三者共同孵育人 PBMC 后, 上清液中 TNF- α 水平再次显著升高(表 2, Table 2)。

3 讨论

胰岛素抵抗及高胰岛素血症与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关, 而动脉粥样硬化斑块的形成以

及斑块的不稳定与病变局部的炎性细胞浸润有关,病理学检测证明,参与动脉粥样硬化形成及斑块破裂过程的主要炎性细胞是单核-巨噬细胞。高血压,胰岛素抵抗可增强单核细胞对血管内皮的粘附性^[3],TNF- α 则是参与炎性反应的主要细胞因子^[4,5],细菌脂多糖可诱导人外周血单核细胞 TNF- α 的合成及核因子 κ B 的活化^[6]。除此之外,TNF- α 还可抑制细胞对胰岛素的部分信号转导,与胰岛素抵抗的发生密切相关^[7]。因此,本研究通过培养人 PBMC(包括单核细胞及淋巴细胞)与胰岛素共同孵育,观察胰岛素对人 PBMC TNF- α 蛋白表达及分泌的影响。结果发现,胰岛素可刺激人 PBMC TNF- α 蛋白的表达及分泌,这种效应呈剂量依赖关系,提示胰岛素参与了动脉粥样硬化形成及发展过程中的炎症相关细胞的激活过程,且这种影响作用随着胰岛素水平的增加而增强。

多项临床试验研究表明,他汀类药物除了其有效的调脂作用外,还可改善冠心病患者的预后^[8,9],目前认为这种对冠心病预后的改善与其非降脂作用有关,其非降脂作用包括抑制炎症反应及保护内皮功能等。本研究通过胰岛素刺激时加入亲水性他汀类药物普伐他汀,观察他汀类药物对胰岛素刺激的人 PBMC TNF- α 蛋白表达及分泌的影响。结果发现,胰岛素与人 PBMC 共同孵育时加入普伐他汀后,TNF- α 蛋白表达及分泌水平显著下降,这种作用可被甲醛戊酸所抑制,提示普伐他汀可抑制胰岛素刺

激的人 PBMC TNF- α 蛋白的表达及分泌。该结果可能可以部分解释他汀类药物对冠心病,尤其是同时伴有胰岛素抵抗或糖尿病患者的一级预防或二级预防的作用机制。

[参考文献]

- [1] Haffner SM, D'Agostino RJ, Mykkanen L, Tracy R, Howard B, Rewers M, et al. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*, 1999, **22**: 562-568
- [2] Haffner SM, Mykkanen L, Festa A, Burke JP, Stern MP. Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation*, 2000, **101**: 975-980
- [3] 李伟,吴智勇. 高血压并胰岛素抵抗单核细胞粘附功能的变化. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (2): 162-164
- [4] Frystyk J, Ledet T, Moller N, Flyvbjerg A, Orskov H. Cardiovascular disease and insulin-like growth factor I. *Circulation*, 2002, **106**: 893-895
- [5] Grimbble RF. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, **5**: 551-559
- [6] 李凝旭,李建军,李庚山,王晶,徐红新,李夏,等. 细菌脂多糖诱导人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 的合成及核因子 κ B 的活化. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (4): 320-323
- [7] Tagami S, Inokuchi JJ, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 3 085-092
- [8] Herman WH, Alexander CM, Cook JR, Bocuzzi SJ, Musliner TA, Pedersen TR, et al. Effect of simvastatin treatment on cardiovascular resource utilization impaired fasting glucose and diabetes. Findings from the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Diabetes Care*, 1999, **22**: 1 771-778
- [9] Goldberg RB, Mellies MJ, Sacks FM, Moye LA, Howard BV, Howard WJ, et al. Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels: subgroup analyses in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*, 1998, **98**: 2 513-529

(此文编辑 文玉珊)

• 书讯 •

《动脉粥样硬化性心血管病——基础与临床》一书已经出版

由中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会主任委员、《中国动脉硬化杂志》主篇、南华大学病理生理学博士研究生导师杨永宗教授任主编、苏州大学博士研究生导师、中国工程院院士阮长耿教授、北京大学医学部博士研究生导师唐朝枢教授、南京医科大学博士研究生导师范乐明教授和广东省人民医院陈纪言主任医师任副主编,有 40 余位专家参与编写,科学出版社出版的《动脉粥样硬化性心血管病——基础与临床》一书已经面世,动脉粥样硬化研究领域的前辈、中国医学科学院基础医学研究所余铭鹏教授为该书作序。该书分为基础、临床和进展三篇,35 章 158 节 110 万字。该书在内容与结构上兼顾基础与临床,突出最新进展,全面、详实地介绍了动脉粥样硬化性心血管病的研究成果和发展方向,既可为广大医务工作者提供新的诊疗技术,又可在加深对有关疾病的病因和发病机制的认识过程中起到积极作用。该书由中国动脉硬化杂志编辑部代办发行,定价 118 元,个人购买,8 折优惠,每本 94 元(含邮费;第 4 期公布的价格作废,以此期价格为准)。凡需购买者,请汇款到中国动脉硬化杂志编辑部,地址是:湖南省衡阳市南华大学内,中国动脉硬化杂志编辑部,邮政编码 421001,联系人常玲。汇款时请在汇款单上注明购买《动脉粥样硬化性心血管病——基础与临床》,并请详细写明购书人的邮政编码、地址和姓名。