

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0199-04

•临床研究•

## C 反应蛋白直接刺激人单核细胞肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与白细胞介素 6 的表达

王海蓉, 黄从新, 江洪, 李建军, 李庚山

(武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内科学; C 反应蛋白; 单核细胞; 急性冠状动脉综合征; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 白细胞介素 6; 普伐他汀

[摘要] 目的 比较急性冠状动脉综合征患者与健康人外周血单核细胞对一定浓度的 C 反应蛋白或细菌脂多糖刺激的炎症反应, 并观察普伐他汀的干预效应。方法 采集并培养急性冠状动脉综合征患者(急性冠状动脉综合征组,  $n=15$ )和健康志愿者(健康组,  $n=15$ )的外周血单核细胞, 分别用 C 反应蛋白(终浓度为 20 mg/L)或细菌脂多糖(终浓度 10  $\mu$ g/L)直接刺激 24 h。或用不同浓度(1.5 和 10  $\mu$ mol/L)的普伐他汀预先孵育细胞 2 h, 再用 C 反应蛋白刺激。采用酶联免疫吸附试验法检测培养上清液中的肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 水平。结果 健康组受 C 反应蛋白刺激后肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 表达增加, 分别为  $558 \pm 152$  ng/L 和  $987 \pm 102$  ng/L; 受细菌脂多糖刺激后肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 增加显著, 分别为  $1\,054 \pm 371$  ng/L 和  $1\,854 \pm 467$  ng/L。急性冠状动脉综合征组受 C 反应蛋白刺激后肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 表达水平分别为  $1\,554 \pm 784$  ng/L 和  $3\,129 \pm 333$  ng/L; 受细菌脂多糖刺激后分别为  $1\,865 \pm 753$  ng/L 和  $3\,216 \pm 703$  ng/L。急性冠状动脉综合征组在 1.5 和 10  $\mu$ mol/L 普伐他汀干预后, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达分别下降 14%、36% 和 49%; 白细胞介素 6 表达分别下降 18%、26% 和 36%, 各亚组与 C 反应蛋白单独刺激组比较均有显著差异。健康组在普伐他汀干预后, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达分别下降 12%、28% 和 45%; 白细胞介素 6 表达分别下降 15%、22% 和 31%, 各组间比较均有显著差异。结论 C 反应蛋白与细菌脂多糖均能直接增加血单核细胞炎症因子的表达, 有可能促进急性冠状动脉综合征及其并发症的发生。普伐他汀有效降低 C 反应蛋白对单核细胞的致炎症效应。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Monocytes Isolated from Patients with Acute Coronary Syndrome

WANG Hai-Rong, HUANG Cong-Xin, JIANG Hong, LI Jiann Jun, and LI Geng-San

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

[KEY WORDS] C-Reactive Protein; Atherosclerosis; Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ; Interleukin 6; Pravastatin

[ABSTRACT] **Aim** The accumulating evidence suggests that C-reactive protein (CRP) may have direct inflammatory effects on the vascular wall and that statin therapy may have important non-lipid anti-inflammatory effects confirmed by decreasing serum inflammatory markers, such as CRP. However, the effect of pravastatin on tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) release in cultured human monocytes from patients with acute coronary syndrome (ACS) was not investigated. **Methods**

A prospective, human monocyte culture, pravastatin intervention study. Monocytes were isolated from blood of patients with acute coronary syndrome (ACS) and healthy volunteers by the Ficoll density gradient and stimulated by CRP (20 mg/L) or lipopolysaccharide (LPS, 10  $\mu$ g/L) for 24 h. Also 1  $\mu$ mol/L, 5  $\mu$ mol/L, and 10  $\mu$ mol/L pravastatin was coincubated with cells in the presence of CRP. Measurements of TNF $\alpha$  and IL-6 were performed from supernatants of cultured medium in duplicate, using a commercial assay kit. **Results** (1) CRP and LPS induced the release of TNF $\alpha$  and IL-6, with significantly elevated levels in cultured supernatants in ACS group and healthy group compared with their control group respectively. (2) A greater increase of TNF $\alpha$  and IL-6 induced by CRP and LPS were observed in the ACS group compared with the healthy group. Pravastatin inhibited significantly the production of TNF $\alpha$  and IL-6 in monocytes stimulated by CRP in a dose-dependent manner, a greater decrease was observed in ACS group compared with the control group ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** CRP and LPS could induce more TNF $\alpha$  and IL-6 release in human monocyte from patients with ACS than from healthy volunteer. Pravastatin could inhibit this response in a dose-dependent manner in ACS group better than in healthy volunteer, which may provide an insight into the mechanisms of anti-inflammatory actions of pravastatin.

[收稿日期] 2004-05-11

[修回日期] 2004-11-08

[作者简介] 王海蓉, 博士研究生, 研究方向为冠心病。通讯作者黄从新, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病和心律失常的介入治疗。李建军, 博士后, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病。

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者血清C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平较高,心源性死亡或心肌梗死风险性增大<sup>[1,2]</sup>。CRP作为炎症标记物之外,还可能直接参与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成过程。肝脏在白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)等细胞因子的刺激下分泌CRP。IL-6处于As炎症链中的中心环节。肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF $\alpha$ )与IL-6同样具有强力促炎症效应,在免疫调节、细胞发生和炎症反应中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。已有研究<sup>[4]</sup>证实,CRP与脂多糖能以剂量和时间依赖的方式激活健康志愿者的外周血单核细胞表达IL-6, 10  $\mu$ g/L脂多糖的效应强于20 mg/L CRP。我们的实验进一步调查CRP与脂多糖对ACS患者外周血单核细胞的影响,并采用普伐他汀进行干预实验,比较ACS患者和健康人对CRP的反应程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验仪器与试剂

3550型自动酶联仪(Beckman公司), 2500型CO2培养箱(美国NuAire公司), 淋巴细胞分离液(Gibco); RPMI1640培养基(Gibco); 24孔培养板(Costar); C-反应蛋白与细菌脂多糖(Sigma); TNF $\alpha$ 与IL-6酶联免疫吸附试剂盒(R&D)。

### 1.2 研究对象与分组

实验分ACS组与健康组两组。ACS组病例来自2003年7月~11月在我科住院的ACS患者,共15例,均经冠状动脉造影确诊,年龄 $56 \pm 10$ 岁,其中男性12例,伴高血压病者3例,无各种急性感染、肝肾功能异常,入院前未服用他汀类药物。健康组的15例为同期来我院体检的健康志愿者,年龄 $50 \pm 12$ 岁。

### 1.3 外周血单核细胞的分离与培养及分组处理

急性冠状动脉综合征(ACS)患者为住院当天,健康组为体检时,取外周静脉血,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。1500 r/min离心25 min,用吸管轻轻将处于分层液面白膜状的单个核细胞吸入另一管内, PBS清洗2次。将细胞重悬于RPMI1640培养基(含25 mmol/L HEPES, 1 nmol/L 谷胺酰胺, 10%胎牛血清)。台盼蓝拒染试验发现活细胞>95%。将细胞接种于培养皿中,用培养基清洗5次,将未贴壁细胞洗脱,瑞氏染色鉴定贴附为单核细胞,约占85%。

将贴附细胞用细胞刮片轻轻刮下,重悬于RPMI1640培养基中,调节细胞密度为 $5 \times 10^9$ /L,并接种于24孔培养板,每孔200  $\mu$ L。

每例受试者的单核细胞铺24孔板后,分别用CRP刺激(终浓度20 mg/L)或脂多糖刺激(终浓度10  $\mu$ g/L)24 h;对照孔用等量PBS孵育。提取细胞培养液上清,用于检测TNF $\alpha$ 与IL-6水平。

普伐他汀干预实验:3组浓度(1、5和10  $\mu$ mol/L)的普伐他汀预处理单核细胞2 h后CRP刺激24 h,随后检测细胞培养液上清中TNF $\alpha$ 与IL-6水平。

### 1.4 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白细胞介素6浓度的检测

肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )和IL-6的测定均采用商用酶联免疫吸附法检测。严格按照试剂盒(R&D Systems)使用说明书进行操作。基本操作步骤如下:从密封袋中取出所需板条,除空白孔外,分别将标本或不同浓度标准品(100  $\mu$ L/孔)加入相应孔中,用封板胶纸封住反应孔,室温25  $^{\circ}$ C孵育120 min,洗板4次,除空白孔外,加入检测剂工作液(100  $\mu$ L/孔),封住板孔室温孵育60 min,洗板4次;加入底物A和B各1滴,避光室温5 min;加入终止液1滴,混匀后即刻测量OD450值(5 min内),数据转换为ng/L。

### 1.5 统计学处理

资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较用方差分析,采用SPSS(11.0)软件进行处理。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 C反应蛋白和脂多糖直接刺激人外周血单核细胞合成肿瘤坏死因子 $\alpha$

两组在CRP和脂多糖刺激后TNF $\alpha$ 表达比只用PBS处理时显著升高(表1, Table 1;  $P < 0.001$ );两组比较,升高幅度也有差别。当用CRP刺激时,ACS组的TNF $\alpha$ 表达是健康组的2.7倍( $P < 0.01$ ;表1, Table1)。用脂多糖刺激时,ACS组的TNF $\alpha$ 表达是健康组的1.7倍( $P < 0.05$ ;表1, Table1)。

### 2.2 C反应蛋白和脂多糖直接刺激人外周血单核细胞合成白细胞介素6

两组外周血单核细胞在CRP和脂多糖刺激后IL-6表达比只用PBS处理时显著升高(表1, Table 1;  $P < 0.001$ );两组比较,升高幅度也有差别。当用CRP刺激时,ACS组的IL-6表达是健康组的4倍( $P < 0.01$ ;表1, Table1)。用脂多糖刺激时,ACS组的IL-6表达是健康组的1.8倍( $P < 0.05$ ;表1, Table1)。

表 1. C 反应蛋白与脂多糖刺激人单核细胞肿瘤坏死因子与白细胞介素 6 的表达 (ng/L)

Table 1. Comparison induction of TNF $\alpha$  and IL-6 in monocyte from healthy or patients with acute coronary syndrome by C-reactive protein and lipopolysaccharide

处理因素	健康组 (n= 15)		ACS 组 (n= 15)	
	TNF $\alpha$	IL-6	TNF $\alpha$	IL-6
PBS	27 $\pm$ 3	89 $\pm$ 8	69 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	179 $\pm$ 19 <sup>b</sup>
脂多糖	1054 $\pm$ 371 <sup>a</sup>	1854 $\pm$ 467 <sup>a</sup>	1865 $\pm$ 753 <sup>ab</sup>	3216 $\pm$ 703 <sup>ab</sup>
CRP	558 $\pm$ 152 <sup>a</sup>	987 $\pm$ 102 <sup>a</sup>	1554 $\pm$ 784 <sup>ab</sup>	3129 $\pm$ 333 <sup>ab</sup>

脂多糖的终浓度为 10  $\mu$ g/L, CRP 的终浓度为 20 mg/L; a:  $P < 0.001$ , 与 PBS 处理比较; b:  $P < 0.05$ , 与健康组比较。

### 2.3 普伐他汀对 C 反应蛋白诱导的人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与白细胞介素 6 表达的影响

C 反应蛋白 (CRP) 刺激之前先用 1、5 和 10  $\mu$ mol/L 普伐他汀孵育 2 h, 发现 ACS 患者的外周血单核细胞 TNF $\alpha$  表达较 CRP 单独刺激分别下降 14%、36% 和 49%; IL-6 表达分别下降 18%、26% 和 36%。各组与 CRP 单独刺激组比较均有显著差异 (表 2, Table 2)。健康组受 1、5 和 10  $\mu$ mol/L 普伐他汀预处理后, 外周血单核细胞 TNF $\alpha$  表达分别下降 12%、28% 和 45%; IL-6 表达分别下降 15%、22% 和 31%。各组与 CRP 单独刺激组比较均有显著差异 (表 2, Table 2)。

表 2. 普伐他汀对 C 反应蛋白诱导的急性冠状动脉综合征患者和健康者肿瘤坏死因子  $\alpha$  与白细胞介素 6 表达的影响

Table 2. Effect of Pravastatin on the release of TNF $\alpha$  and IL-6 from patients with ACS and healthy volunteer stimulated by CRP

处理因素	n	健康组		ACS 组	
		TNF $\alpha$	IL-6	TNF $\alpha$	IL-6
CRP	15	558 $\pm$ 102	987 $\pm$ 152	1865 $\pm$ 784	3129 $\pm$ 839
CRP+ Pra1	15	491 $\pm$ 55 <sup>a</sup>	839 $\pm$ 89 <sup>a</sup>	1560 $\pm$ 590 <sup>a</sup>	2557 $\pm$ 912 <sup>a</sup>
CRP+ Pra5	15	402 $\pm$ 47 <sup>a</sup>	770 $\pm$ 62 <sup>a</sup>	1140 $\pm$ 514 <sup>a</sup>	2306 $\pm$ 845 <sup>a</sup>
CRP+ Pra10	15	251 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	681 $\pm$ 54 <sup>a</sup>	910 $\pm$ 372 <sup>a</sup>	1994 $\pm$ 586 <sup>a</sup>

注: Pra1、Pra5、Pra10 分别表示普伐他汀的浓度为 1  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L 和 10  $\mu$ mol/L。a:  $P < 0.05$ , 与单用 CRP 处理比较。

## 3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 是一种慢性炎症性疾病。单核-巨噬细胞是 As 斑块的主要组成成分。脂多糖是革兰氏阴性杆菌外膜的主要成分, 能刺激单核细胞激活并释放炎症介质 (如 TNF $\alpha$  和 IL-6 等)<sup>[1]</sup>。脂多糖加重 As 形成机制包括激活内皮细胞表达黏附分子, 促进单核/巨噬细胞转化为泡沫细胞, 激活补

体, 促进凝血等。既往研究<sup>[1,4]</sup>证实, CRP 与脂多糖均能激活健康人外周血单核细胞表达 IL-6。

我们的实验进一步证实, ACS 患者的外周血单核细胞在 CRP 或脂多糖刺激下, TNF $\alpha$  和 IL-6 的表达均显著增加; 而且 ACS 组在 CRP 或脂多糖刺激下, 炎症因子分泌较健康组成倍增加: TNF $\alpha$  增加约 2.7 倍, IL-6 增加约 4 倍。

实验结果提示, 一定浓度的 CRP 与脂多糖类似, 均能直接激活单核细胞分泌炎症因子。机体受到某些感染, 例如肺炎衣原体或巨细胞病毒感染, 体内升高的 CRP 可能直接激活单核细胞向炎症表型转化, 单核细胞活化产生大量自由基, 脂质被修饰, 形成泡沫细胞, 促进斑块形成。

白细胞介素 6 (IL-6) 是调节 CRP 生成的主要因子, 容易形成正反馈效应, 使得单核细胞处于恶性循环状态。CRP 一方面作为炎症标记物, 其本身也能直接诱导血管内皮细胞释放黏附分子及炎症因子, 血管舒张功能下降; CRP 促进血管平滑肌增殖, 诱导单核/巨噬细胞向炎症表型转化, 并增加心肌细胞损伤<sup>[5]</sup>, 还刺激单核细胞组织因子的表达, 促进血栓形成, 在 As 及其并发症形成过程中发挥重要作用<sup>[6,8]</sup>。

流行病学资料发现, 他汀类药物降低血清 CRP 水平, 降低高 CRP 低胆固醇患者的死亡率<sup>[9]</sup>。我们的实验证实, ACS 组和健康组普伐他汀预处理后, 都能以剂量依赖的方式降低 CRP 诱导的 TNF $\alpha$  和 IL-6 的表达。健康组炎症因子的下降程度弱于 ACS 组, 提示 ACS 组对该药物的敏感性强于健康人。这与临床实验的结果相一致: 普伐他汀在预防冠状动脉事件中对 CRP 基线水平较高的病人更加有效<sup>[10,11]</sup>。

普伐他汀治疗 7 周能显著降低用脂多糖诱导的高胆固醇患者血单核细胞的 TNF $\alpha$  和 IL-6 水平<sup>[12]</sup>。普伐他汀治疗能降低 CRP 水平, 这一效应与其降脂程度无明显相关, 即普伐他汀具有非脂质依赖效应<sup>[13,14]</sup>。普伐他汀降低高胆固醇患者与 ACS 患者 TNF $\alpha$  和 IL-6 的机制一方面可能得益于普伐他汀的降脂作用, 另一方面也是普伐他汀抗炎作用的表现。

综上所述, CRP 刺激 ACS 患者单核细胞 TNF $\alpha$  和 IL-6 的表达效应强于健康人的表达; 普伐他汀虽然都能下调 CRP 诱导的 ACS 患者与健康人 TNF $\alpha$  和 IL-6 的表达, 但普伐他汀对 ACS 患者减轻炎症效应更为明显, 因而有助于钝化斑块。

### [参考文献]

- [1] Nakagomi A, Freedman SB, Geczy CL. Interferon and lipopolysaccharide potentiate monocyte tissue factor induction by C-reactive protein: relationship with age, sex, and hormone replacement treatment. *Circulation*, 2000, **101** (15): 1

- 785-791
- [2] Yu H, Rifai N. High sensitivity C-reactive protein and atherosclerosis: from theory to therapy. *Clin Biochem*, 2000, **33** (8): 601-610
- [3] Li JJ, Fang CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses*, 2004, **62** (4): 499-506
- [4] 陈学军, 李建军, 夏 玲, 王 晶, 李庚山. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 139-142
- [5] Ikeda U, Maeda Y, Yamamoto K, Shimada K. C-Reactive protein augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, 2002, **56** (1): 86-92
- [6] 白书玲, 李建军. C 反应蛋白与动脉粥样硬化. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (8): 765-768
- [7] Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor 1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation*, 2003, **107** (3): 398-404
- [8] Verma S, Li SH, Badierwa MV, Weisel RD, Fedak PWM, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin 6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*, 2002, **105** (16): 1 890-896
- [9] 高润霖. 他汀类药物在急性冠状动脉综合征的应用. *中华心血管病杂志*, 2003, **31** (8): 635-636
- [10] Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*, 1999, **100** (3): 230-235
- [11] Ridker PM. Are statins anti-inflammatory? Issues in the design and conduct of the pravastatin inflammation C-reactive protein evaluation. *Curr Cardiol Rep*, 2000, **2** (4): 269-273
- [12] Solheim S, Seljeflot I, Amesen H, Eikvar L. Reduced levels of TNF $\alpha$  in hypercholesterolemic individuals after treatment with pravastatin for 8 weeks. *Atherosclerosis*, 2001, **157** (3): 411-415
- [13] Rosenson RS, Tangney CC, Casey LC. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *Lancet*, 1999, **353** (4): 983-984
- [14] Monroe VS, Kerensky RA, Rivera E. Pharmacologic plaque passivation for the reduction of recurrent cardiac events in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41** (4 Suppl S): 23S-30S
- (此文编辑 胡必利)

## •会议信息•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0202-01

# 第三届全国临床检验实验室管理学术会议征文

一、时间: 2005 年 6 月

二、地点: 广东省深圳市

三、主办单位: 中华医院管理学会临床检验管理专业委员会

四、征文内容:

- 1、《临床实验室管理办法》实施经验及体会
- 2、实验室管理中面临的主要问题和对策
- 3、实验室信息与全自动化
- 4、实验室的安全管理
- 5、POCT 的应用管理
- 6、溯源和不确定度
- 7、室间质评和室内质量控制
- 8、临床实验室成本与效益分析
- 9、临床实验室的人力资源管理
- 10、临床实验室市场化发展与营销策略
- 11、《医疗事故处理条例》与临床实验室工作的关系
- 12、其他

凡涉及以上专题内容或与临床实验室管理有关的内容皆可投稿。

五、征文要求:

- 1、投稿截止日期为 2005 年 3 月 15 日
- 2、稿件要求提供 500 字左右摘要和全文, 请提供 A4 纸打印的文档及电子文档各一份(电子文档可用 3.5 英寸软盘或 CD-R 或电子邮件形式提供)。
- 3、投稿请写明作者姓名、单位、通讯地址、邮编及电话。
- 4、稿件寄至: 北京东城区大华路 1 号北京医院内, 卫生部临床检验中心王治国收; 邮编: 100730; 电话: 010-65273025, 65132266-2655

六、会议报名:

参加会议的代表请将报名回执及时寄回组委会, 也可通过网站直接报名, 网址: <http://www.clinet.com.cn>。

七、学术论文证书和学分:

向大会提交论文者都可获得大会论文证书。到会参加全部学术交流者, 可获国家级继续教育证书及学分 6 分。