

## 瘦素对巨噬细胞白细胞介素 1 $\beta$ 表达的影响

唐 澜<sup>1</sup>, 王 丽<sup>1</sup>, 付度关<sup>2</sup>, 赵 勇<sup>1</sup>, 曾和松<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030;

2. 湖北襄樊市第一人民医院心内科, 湖北省襄樊市 441000)

[关键词] 内科学; 瘦素; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 细胞培养; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞

[摘要] 目的 探讨瘦素对鼠源性巨噬细胞系 RAW264.7 细胞白细胞介素 1 $\beta$  表达的影响, 以阐明瘦素在动脉粥样硬化发生中的作用。方法 不同浓度的瘦素(1.25、2.5、5 和 10 nmol/L) 孵育 RAW264.7 细胞 4 h 后, 逆转录聚合酶链反应法检测巨噬细胞白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 的表达。并用该浓度梯度的瘦素分别孵育 RAW264.7 细胞 1、3、6、9 h 后, 采用双抗夹心酶联免疫吸附法检测各组培养上清白细胞介素 1 $\beta$  蛋白含量。结果 白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 表达水平随瘦素浓度增加逐渐增高(分别为  $0.107 \pm 0.102$ 、 $0.204 \pm 0.019$ 、 $0.718 \pm 0.083$ 、 $0.642 \pm 0.071$ ), 5 nmol/L 瘦素处理组达最高峰。各组培养上清白细胞介素 1 $\beta$  蛋白分泌水平随瘦素浓度增加逐渐增高, 5 nmol/L 瘦素处理组白细胞介素 1 $\beta$  蛋白分泌量达最高峰; 白细胞介素 1 $\beta$  蛋白分泌水平随瘦素刺激时间增加逐渐增高, 至 6 h 达最高峰( $P < 0.05$ )。RAW264.7 细胞经不同浓度瘦素处理后, 白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 和蛋白表达呈瘦素剂量依赖性增加。结论 瘦素可在体外促进 RAW264.7 细胞白细胞介素 1 $\beta$  表达和分泌, 这可能是瘦素直接致动脉粥样硬化的机制之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Effects of Leptin on the Expression of Interleukin-1 $\beta$ in Macrophages

TANG Lan, WANG Li, FU Du Guan, ZHAO Yong, and ZENG He Song

(Department of Cardiology, Tongji Affiliated Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science &amp; Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Leptin; Interleukin-1 $\beta$ ; Cell Culture; Atherosclerosis; Macrophage[ABSTRACT] Aim To investigate the effects of leptin on the expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in macrophages in vitro.

Methods RAW264.7 cells were incubated with leptin in different concentrations (1.25, 2.5, 5, 10 nmol/L) for 4 hours, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure the expression of IL-1 $\beta$  mRNA level; Meanwhile, RAW264.7 cells were incubated with these concentrations of leptin for 1, 3, 6 and 9 hours, then the expression of IL-1 $\beta$  in the medium was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Results The expression of IL-1 $\beta$  mRNA was promoted with the concentration of leptin ( $0.107 \pm 0.102$ ,  $0.204 \pm 0.019$ ,  $0.718 \pm 0.083$ ,  $0.642 \pm 0.071$ ), and reached the maximum level at 5 nmol/L of leptin. At the same time, the expression of IL-1 $\beta$  protein was promoted with the concentration and the time of leptin stimulating, and reached the maximum at 6th hour ( $P < 0.05$ ). The expression of IL-1 $\beta$  in both mRNA and protein levels in RAW264.7 cells incubated with leptin were increased with the leptin concentration.

Conclusion Leptin can increase the IL-1 $\beta$  expression of RAW264.7 cells directly and that might be one of mechanism of atherosclerosis induced by leptin.

瘦素 (leptin) 是脂肪组织分泌的一种多肽激素<sup>[1]</sup>, 主要参与机体能量代谢及体重的调节<sup>[2]</sup>。研究表明, 瘦素不仅影响机体能量平衡, 还对巨噬细胞吞噬作用和炎症前细胞活素表达起调节作用, 外源性瘦素可增强巨噬细胞吞噬作用, 促进炎症因子生成, 从而上调炎症免疫反应, 导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生, 但其作用机制仍有待进一步阐明。白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 是炎

症反应中最重要的一种细胞因子, 能趋化巨噬细胞、单核细胞和平滑肌细胞进入内膜共同作用形成斑块, 促进 As 形成。目前有关瘦素是否诱导巨噬细胞 IL-1 $\beta$  表达尚未见报道。本研究旨在探讨瘦素对鼠源性巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 IL-1 $\beta$  表达的影响, 以便深入研究 IL-1 $\beta$  并探究行之有效的治疗手段。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器和试剂

核酸电泳仪 (北京东方仪器厂), 超净工作台 YJ-1450 (江苏苏州净化设备公司), PCR 仪 (Biometre UNO  $\oplus$  USA), 超速离心机 (L8-80M) (Beckman USA), 可见紫外分光光度计 (U-2000) (Hitachi Jar

[收稿日期] 2005-11-19 [修回日期] 2006-08-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30470713)

[作者简介] 唐澜, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的防治。王丽, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的防治。通讯作者曾和松, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的防治, E-mail 为 zenghs@tjh.tjmu.edu.cn。

pan), 6 孔培养板 (Falcon USA), 24 孔培养板 (NUNC Denmark), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (江三利公司), HEPES (Gibco USA), RPMI1640 (Gibco USA), 胰蛋白酶 (Sigma USA), TRIzol 试剂 (Invitrogen USA), 逆转录酶 (Promega USA), TaqDNA 聚合酶 (dNTP MBI USA), DNA Marker (Promega USA), BCA 试剂 (Sigma USA), BSA (Gibco USA), ELISA 试剂盒 (Pierce USA), PCR 引物由北京赛百胜公司合成, 瘦素干粉剂 (USA)。

## 1.2 RAW264.7 细胞体外培养及实验分组

将鼠源性巨噬细胞株 RAW264.7 细胞以  $12.5 \times 10^9$  个/L 密度接种于 6 孔培养板中, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 每 2 天换液一次。待细胞生长至 80% 满时, 换用无血清培养基 Opti-MEM 继续培养 24 h 后, 将细胞分为不同浓度瘦素处理组 (1.25、2.5、5 和 10 nmol/L) 及空白对照组, 瘦素孵育数小时后检测相关指标。每组设复孔三个, 重复实验三次。

## 1.3 逆转录聚合酶链反应检测白细胞介素 $1\beta$ mRNA 表达

将上述分组的细胞及空白对照组用瘦素孵育 4 h 后, 据 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 各组取 4  $\mu\text{g}$  总 RNA 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 1  $\mu\text{L}$  进行 PCR 扩增。每组设复孔三个, 重复实验三次。IL- $1\beta$  引物序列为上游 5'-GAA GCT GTG GCA GCT ACC TAT GTC T-3', 下游 5'-CTC TGC TTG TGA GGT GCT GAT GTA C-3', 产物片段为 221 bp; PCR 反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  变性 45 s  $\rightarrow$   $55^\circ\text{C}$  退火 45 s  $\rightarrow$   $72^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 扩增 32 个循环。内参照  $\beta$ -actin 引物序列为上游 5'-ATG GGT CAG AAG GAC TCC TAT G-3', 下游 5'-ATC TCC TGC TCG AAG TCT AGA G-3', 产物片段为 530 bp; PCR 反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  变性 45 s  $\rightarrow$   $54^\circ\text{C}$  退火 45 s  $\rightarrow$   $72^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 扩增 30 个循环。PCR 反应结束后, 各取反应产物 10  $\mu\text{L}$  进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, GIS 凝胶电泳分析系统扫描并分析各组 IL- $1\beta$  mRNA 及  $\beta$ -actin mRNA 灰度值, 以二者的比值代表 IL- $1\beta$  mRNA 表达量。

## 1.4 酶联免疫吸附法检测 RAW264.7 细胞培养上清中白细胞介素 $1\beta$ 蛋白浓度

RAW264.7 细胞与不同浓度瘦素 (1.25、2.5、5、10 nmol/L) 分别孵育 1、3、6、9 h 后, 弃培养基, 换完全培养基再培养数小时, 取培养上清 50  $\mu\text{L}$ , 采用双抗夹心酶联免疫吸附试验方法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 严格按照试剂盒说明书操作, 检测样品中 IL- $1\beta$  含量, 每样品均设 3 个复孔, 重

复实验 3 次, 检测结果以 ng/L 表示。

## 1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度瘦素对 RAW264.7 细胞白细胞介素 $1\beta$ mRNA 表达水平的影响

RAW264.7 细胞与不同浓度 (1.25、2.5、5、10 nmol/L) 瘦素孵育 4 h 后, 逆转录聚合酶链反应检测出 IL- $1\beta$  mRNA 表达分别为  $0.107 \pm 0.012$ 、 $0.204 \pm 0.019$ 、 $0.718 \pm 0.083$ 、 $0.642 \pm 0.071$ , 与空白对照组 ( $0.107 \pm 0.012$ ) 比其表达水平增高 ( $P < 0.01$ ); 10 nmol/L 处理组与 5 nmol/L 处理组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。IL- $1\beta$  mRNA 表达水平随瘦素浓度增加逐渐增高, 5 nmol/L 瘦素处理组达最高峰 (图 1)。

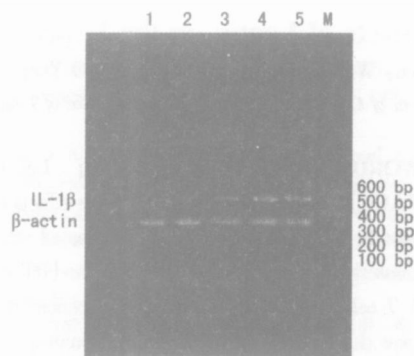


图 1. 不同浓度瘦素处理的 RAW264.7 细胞白细胞介素  $1\beta$  mRNA 表达 M 为 Marker, 1 为空白对照组, 2~5 分别为 1.25、2.5、5、10 nmol/L 瘦素处理组。

### 2.2 不同浓度瘦素对 RAW264.7 细胞白细胞介素 $1\beta$ 蛋白分泌的影响

RAW264.7 细胞与不同浓度 (1.25、2.5、5、10 nmol/L) 瘦素孵育不同时间 (1、3、6、9 h) 后, 采用双抗夹心酶联免疫吸附法检测培养上清中 IL- $1\beta$  蛋白含量 (ng/L), 结果发现, 瘦素处理组与相应空白对照组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ); 10 nmol/L 处理组与对应的 5 nmol/L 瘦素处理组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); 不同浓度瘦素处理组处理 9 h 与对应浓度瘦素处理 6 h 相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。各组培养上清 IL- $1\beta$  蛋白分泌量随瘦素浓度增加逐渐增高, 5 nmol/L 瘦素处理组 IL- $1\beta$  分泌量达最高峰; 另外 IL- $1\beta$  蛋白分泌水平随瘦素刺激时间增加逐渐增高, 至 6 h 达最高峰 (表 2)。

表 2. 各组培养上清中白细胞介素 1 $\beta$  蛋白含量 (ng/L)

瘦素浓度 (nmol/L)	孵育 1 h	孵育 3 h	孵育 6 h	孵育 9 h
空白对照组	312 $\pm$ 11	356 $\pm$ 7	436 $\pm$ 8	448 $\pm$ 6
1.25	499 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	571 $\pm$ 92 <sup>a</sup>	1 010 $\pm$ 48 <sup>a</sup>	1 022 $\pm$ 73 <sup>a</sup>
2.5	646 $\pm$ 48 <sup>a</sup>	824 $\pm$ 47 <sup>a</sup>	1 170 $\pm$ 48 <sup>a</sup>	1 149 $\pm$ 53 <sup>a</sup>
5	852 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	939 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	1 338 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	1 309 $\pm$ 14 <sup>a</sup>
10	868 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	1 045 $\pm$ 76 <sup>a</sup>	1 298 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	1 341 $\pm$ 10 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与相应空白对照组相比。

### 3 讨论

前期研究表明高瘦素血症是冠状动脉粥样硬化性心脏病的重要危险因素<sup>[2]</sup>。巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块的主要构成细胞, 外源性瘦素可增强巨噬细胞吞噬作用, 促进炎症前细胞活素生成, 从而上调炎症免疫反应, 导致 As 发生, 具体机制尚待研究。

大量研究已表明, 免疫反应在 As 发生中起重要作用, As 是一个慢性炎症反应过程<sup>[3]</sup>。白细胞介素 1 (interleukin 1, IL-1) 主要来源于激活的单核细胞, 存在两种多态结构类型, 分别是 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  两种不同的基因产物, 其生物学活性相似。IL-1 不仅是炎症反应中最重要的细胞因子及天然免疫中宿主炎症反应的介导体<sup>[4]</sup>, 还参与调控脂类代谢。IL-1 作用于单核巨噬细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞并进一步增加自身合成并诱导 IL-1 的合成。IL-1 还享有肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 的许多炎症特征, 在某些条件下 IL-1 可激发其它细胞因子如: TNF- $\alpha$ 、IL-6、血小板源生长因子、干扰素等的合成和分泌, 并协同产生生物学效应, 导致组织损伤及血管内膜增生<sup>[5]</sup>, 故 IL-1 在 As 中发挥着不可忽视的作用。

目前认为, 核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappaB, NF-

$\kappa$ B) 在 As 中起始作用<sup>[6]</sup>且可调控 IL-1 $\beta$  的表达<sup>[7]</sup>, 核因子  $\kappa$ B 是由细胞氧化还原状态控制的转录因子之一。研究发现, 瘦素能激活脐静脉内皮细胞内核因子  $\kappa$ B 的活性<sup>[8]</sup>, 正常情况下, 核因子  $\kappa$ B 与 IKK $\alpha$  相结合, 而处于无活性状态, 但在某些因素 (如  $\alpha$  干扰素等) 诱导下, 核因子  $\kappa$ B P65 蛋白形成并转至核 DNA 特定区域, 激活相关基因使其发生相应的转录和翻译, 从而调控相关细胞因子的表达<sup>[9]</sup>, 近年来人们发现瘦素可促进人体胰腺  $\beta$  细胞 IL-1 $\beta$  释放及表达。我们的研究表明, 在体外瘦素可直接促进巨噬细胞表达及分泌前炎症因子 IL-1 $\beta$ , 但瘦素调控巨噬细胞 IL-1 $\beta$  表达是否与调控核因子  $\kappa$ B 激活有关, 有待进一步研究, 这将为预防和诊治肥胖所致 As 提供重要的理论依据。

### [参考文献]

- [1] Harris RB. Leptin: much more than a satiety signal [J]. *Annu Rev Nutr*, 2000, **25**: 45-75
- [2] Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, et al. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS) [J]. *Circulation*, 2001, **54** (25): 3 052-056
- [3] Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art [J]. *Am J Cardiol*, 2003, **91** (3A): 3A-6A
- [4] 张占彬. 动脉粥样硬化中白细胞介素的研究进展 [J]. *甘肃科技*, 2003, **10** (19): 134-136
- [5] 史翠格, 胡刚, 汪洋. NF- $\kappa$ B 在动脉粥样硬化中的始动作用 [J]. *中国药理学通报*, 2004, **20** (4): 382-385
- [6] 史立宏, 王守训, 高尔. 核因子  $\kappa$ B 的活化与动脉粥样硬化的启动 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (11): 1 527-531
- [7] Bouloumié A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells [J]. *FASEB J*, 1999, **13** (10): 1 231-238
- [8] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B [J]. *Genes*, 2004, **18** (18): 2 195-224
- [9] Maedler K, Sergeev P, Elshes JA, Mathe Z, Bosco D, Berner T, et al. Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 $\beta$  in human islets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (21): 8 138-143

(此文编辑 许雪梅)