

白细胞介素 10 对巨噬细胞源泡沫细胞趋化因子表达的影响

王 飞, 戴亚蕾¹

(同济大学医学院免疫学教研室, 上海市 200092)

[关键词] 病理学与病理生理学; 白细胞介素 10; 泡沫细胞; 趋化因子; 动脉粥样硬化; 低密度脂蛋白

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素 10 对单核-巨噬细胞源性泡沫细胞转化过程中趋化因子表达的影响及其机制。**方法** 以佛波醇酯诱导 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞, 在氧化型低密度脂蛋白作用下形成泡沫细胞, 同时给予白细胞介素 10 干预, 采用逆转录聚合酶链反应和凝胶阻滞试验研究单核细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 5、白细胞介素 8 mRNA 的表达变化及白细胞介素 10 对核因子 κ B 活性的影响。**结果** 在白细胞介素 10 作用下, 泡沫细胞中单核细胞趋化蛋白 1 和巨噬细胞炎性蛋白 5 mRNA 相对表达量均显著降低, 且与作用时间成正相关, 而白细胞介素 8 相对表达量变化不明显。同时白细胞介素 10 能显著抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的核因子 κ B 活化。**结论** 白细胞介素 10 选择性抑制单核-巨噬细胞源性泡沫细胞形成中趋化因子 mRNA 的表达与有效地抑制核因子 κ B 活性密切相关。这对降低炎症反应, 减少泡沫细胞形成, 延缓动脉粥样斑块形成具有重要意义。

[中图分类号] 363

[文献标识码] A

The Effects of Interleukin-10 on Chemokine mRNA Expression in Monocyte-Macrophage Derived Foam Cells

WANG Fei, and DAI YaLei

(Department of Immunology, Medical College of Tongji University, Shanghai 200092, China)

[KEY WORDS] Interleukin-10; Foam Cell; Chemokine; Atherosclerosis; Low Density Lipoprotein

[ABSTRACT] **Aim** To investigate interleukin-10 (IL-10) affecting chemokine mRNA expression in monocyte-macrophage derived foam cells and its mechanism. **Methods** Macrophage was induced by phorbol myristate acetate (PMA) forming THP-1 cell, and then the cells were further stimulated by oxidized low density lipoprotein with or without IL-10. The influence by IL-10 on chemokine mRNA expression was observed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation was observed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** IL-10 could selectively inhibit monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein 5 (MIP-5) mRNA expression.

The effects were in dose-dependent fashion. However there was no effect on IL-8 mRNA expression. IL-10 could also significantly inhibit ox-LDL induced NF- κ B activation. **Conclusions** The inhibition on NF- κ B activation induced by IL-10 is responsible for decreasing MCP-1 and MIP-5 mRNA expression. The reduction of chemokine expression at the site of atherosclerotic plaque might cut down inflammatory cells recruitment and reduce the plaque further formation.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是以泡沫细胞形成为早期特征的慢性进行性疾病。单核-巨噬细胞是泡沫细胞的主要来源之一,在As形成过程中起关键作用,它不但通过脂蛋白受体摄取脂质,导致泡沫细胞形成,还能分泌多种趋化因子,引起细胞增殖及炎症反应,促进As的发生发展^[1,2]。单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)能激活单核细胞、血管平滑肌细胞并在其细胞表面表达组织因子,引起蛋白酶积聚,纤维沉积,斑块形成^[3]。白细胞介素8(interleukin 8, IL-8)导致基质金

属蛋白酶活性增加及其组织抑制物活力降低,致使斑块不稳定而破裂、血栓形成^[4]。近期发现巨噬细胞炎性蛋白5(macrophage inflammatory protein 5, MIP-5)在As斑块中也明显增高,亦参与了斑块的发生发展^[3]。白细胞介素10(interleukin 10, IL-10)是重要的炎症调控因子,具有重要的免疫调节、稳定抗炎作用。本研究通过佛波醇酯诱导形成巨噬细胞,再给予氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)致使泡沫细胞形成,并给予IL-10干预,旨在探讨IL-10对趋化因子的影响及其可能机制。

[收稿日期] 2006-07-18 [修回日期] 2007-01-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30671969);同济大学人才引进课题启动基金(03038)

[作者简介] 王飞,硕士研究生,研究方向为白细胞介素10对低密度脂蛋白诱导巨噬细胞产生趋化因子的干预机制。**通讯作者**戴亚蕾,教授,博士研究生导师,主要从事细胞因子在动脉粥样硬化中的炎症反应机制研究, E-mail 为 daiyl@mail.tongji.edu.cn.

1 材料和方法

1.1 主要试剂和药品

人单核细胞株 THP-1 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所;佛波醇酯、低密度脂蛋白、IL-10、苯甲

基磺酰氟(PMSF)均购自Sigma公司;Trizol RNA抽提试剂购自Invitrogen公司;RPMI1640细胞培养粉剂购自Gibco公司;L-谷胺酰胺、HEPES、丙酮酸钠和葡萄糖购自生工生物工程(上海)有限公司;EDTA、小牛血清均购自国药集团化学试剂有限公司;逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)引物由华诺公司合成;凝胶阻滞试验所用核因子 κ B双链寡核苷酸探针用IRDye 700标记,序列为5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 5'-G CCT GGG AAA CTC CCC TCA ACT-3'由美国LFCOR公司合成。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

将5.8 mg低密度脂蛋白加入1 mL CuSO_4 (10^{-3} mol/L)磷酸缓冲液(PBS)中,37℃水浴氧化12 h,转入透析袋内,在含0.1% EDTA的PBS缓冲液中透析24 h,每3 h换液一次。透析完成后经0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4℃保存备用^[5]。实验时使用浓度为100 mg/L。

1.3 细胞培养和分组

THP-1细胞培养于含10%小牛血清、 1.0×10^5 $\mu\text{g/L}$ 青霉素和100 g/L链霉素的RPMI1640培养基中,每2~3天换液或传代培养。实验时按 $1 \times 10^9/\text{L}$ 将细胞接种于35 mm^2 培养皿中,用佛波酯(2×10^{-7} mol/L)刺激24 h使其转化为巨噬细胞,分化后的细胞根据实验需要随机分组,加入不同药物刺激,继续培养至实验终点。

1.4 Little氏油红O染色法

细胞接种于放有盖玻片的35 mm^2 培养皿中,细胞培养结束后,弃培养液,用PBS冲洗3~5遍,经4%福尔马林固定30 min,ddH₂O冲洗,加入新配油红O溶液染色15 min,再用ddH₂O冲洗,苏木精轻度复染后干片,中性树脂胶封片。油镜下观察计数。以细胞内红色脂肪颗粒 ≥ 5 个定义为泡沫细胞。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测

使用Trizol试剂抽提细胞总RNA,微量分光光度计检测RNA样品纯度($\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280} > 1.6$)。逆转录试剂盒中以Oligo(dT)15为引物,用4 μg 总RNA为模板合成cDNA,反应体系20 μL 。再取合成cDNA 2 μL ,PCR扩增,反应体系为25 μL 。MCP-1扩增引物为5'-AAG CTT CTC GCA CTC TCG CCT-3'和5'-TCT AGA GGG TTG TGG AGT GAG-3',退火温度59℃,产物337 bp;IL-8扩增引物为5'-AAG CTT GTG TGT AAA CAT GAG-3'和5'-CTC GAG TAC AAC AGA CCC ACA-3',退火温度57℃,产物409 bp;MIP-5扩增引物为5'-ATG AAG GTC TCC GTG GCT GCC CTC

TC-3'和5'-GAA AAA GCT GAA GCC CTA CTC AAT ATA A-3',退火温度为59℃,产物341 bp; β -actin引物为5'-CAT GTC GTC CCA GTT GGT G-3'和5'-ACA GAG CCT CGC CTT TGC C-3',退火温度为59℃,产物300 bp。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,采用KODAK凝胶成像系统,以 β -actin校正作相对量分析。

1.6 电泳迁移率检测

核蛋白提取按照Dai等^[6]方法进行。用BCA法测定核蛋白浓度。取核蛋白10 μg 加入到20 μL 反应液中,其中含10 mmol/L Tris,50 mmol/L KCl,0.0025%吐温20,0.02 u polyIdC,25 mmol/L DTT,混合后冰上放置10 min,再加入已标记的核因子 κ B探针1 μL ,室温避光放置20 min后,经6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用LFCOR公司的Odyssey红外线显像系统进行扫描观察结果。

1.7 统计学处理

实验均重复3次以上。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 泡沫细胞形成情况

典型的泡沫细胞内可明显观察到被红染的脂肪颗粒(图1)。

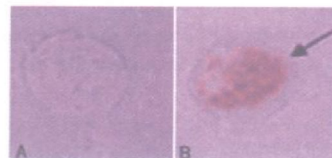


图1. 油红O染色后巨噬细胞及泡沫细胞的镜下形态 A为巨噬细胞,B为泡沫细胞,箭头所示为脂肪颗粒($\times 1000$)。

2.2 单核细胞、巨噬细胞和泡沫细胞中单核细胞趋化蛋白1、巨噬细胞炎性蛋白5及白细胞介素8 mRNA的表达

单核细胞趋化蛋白(MCP)1、MIP-5及IL-8 mRNA的表达在不同细胞中有显著的差别(图2),其中泡沫细胞内表达最强,其次为巨噬细胞内,单核细胞内表达量最低(表1)。

2.3 白细胞介素10对泡沫细胞表达单核细胞趋化蛋白1、巨噬细胞炎性蛋白5及白细胞介素8 mRNA的影响

随着IL-10浓度的升高,MCP-1 mRNA表达量逐渐降低并回到基线水平(图3),MIP-5 mRNA的表达量也发生了类似的变化(图略),而IL-8 mRNA的表

达受 IL-10 浓度的影响不明显, 趋与恒定水平。

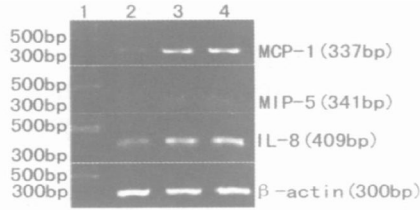


图 2. 单核细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 5 及白细胞介素 8 mRNA 在单核细胞、巨噬细胞和泡沫细胞中的表达 1 为 Marker, 2 为单核细胞, 3 为巨噬细胞, 4 为泡沫细胞。

表 1. 单核细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 5 及白细胞介素 8 mRNA 在单核细胞、巨噬细胞和泡沫细胞中的表达

| 分 组 | MCP-1 | MIP-5 | IL-8 |
|------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 单核细胞 | 0.19 ± 0.04 | 0.28 ± 0.02 | 0.13 ± 0.05 |
| 巨噬细胞 | 0.30 ± 0.03 ^a | 0.36 ± 0.02 | 0.77 ± 0.04 ^a |
| 泡沫细胞 | 0.33 ± 0.04 ^{ab} | 0.51 ± 0.03 ^{ab} | 0.89 ± 0.03 ^{ab} |

a 为 $P < 0.05$, 与单核细胞组比较; b 为 $P < 0.05$, 与巨噬细胞组比较。

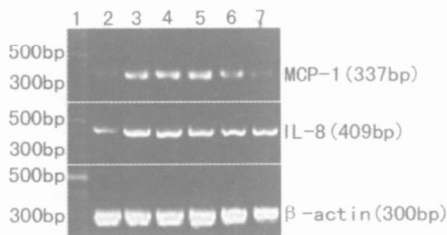


图 3. 白细胞介素 10 对泡沫细胞表达单核细胞趋化蛋白 1、白细胞介素 8 mRNA 的影响 1 为 Marker, 2 为巨噬细胞, 3 为泡沫细胞, 4 为泡沫细胞 + 2 mg/L IL-10, 5 为泡沫细胞 + 5 mg/L IL-10, 6 为泡沫细胞 + 10 mg/L IL-10, 7 为泡沫细胞 + 15 mg/L IL-10。

2.4 白细胞介素 10 对氧化型低密度脂蛋白诱导核因子 κ B 活化的影响

活化的核因子 κ B 在泡沫细胞核内含量明显高于巨噬细胞, 而在加入 IL-10 后核因子 κ B 活化量随作用时间延长而减少, 2 h 后趋于基线水平, 直至 24 h 无进一步变化(表 2 和图 4)。

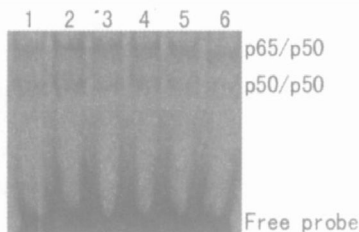


图 4. 白细胞介素 10 对泡沫细胞中核因子 κ B 活化的影响 1 为巨噬细胞, 2 为泡沫细胞, 3 为 IL-10 作用 15 min, 4 为 IL-10 作用 30 min, 5 为 IL-10 作用 2 h, 6 为 IL-10 作用 24 h。

表 2. 白细胞介素 10 对泡沫细胞中核因子 κ B 活化的影响

| 分 组 | p65/p50 平均光密度值 |
|---------------------|----------------------------|
| 巨噬细胞 | 3.300 ± 0.010 |
| 泡沫细胞 | 3.755 ± 0.050 ^a |
| 泡沫细胞 + IL-10 15 min | 3.425 ± 0.030 |
| 30 min | 3.350 ± 0.020 |
| 2 h | 3.160 ± 0.050 ^b |
| 24 h | 3.205 ± 0.040 ^b |

a 为 $P < 0.05$, 与巨噬细胞组比较; b 为 $P < 0.05$, 与泡沫细胞组比较。

2.5 白细胞介素 10 对氧化型低密度脂蛋白和脂多糖诱导的核因子 κ B 活化的影响

脂多糖与 ox-LDL 有协同作用, 能增强核因子 κ B 异源二聚体 p65/p50 的活化(图 5), 同样 IL-10 能有效地部分阻断脂多糖与 ox-LDL 的协同作用(表 3)。

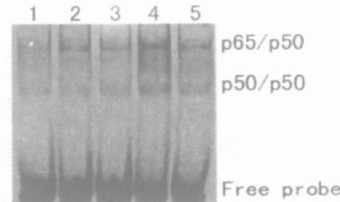


图 5. 白细胞介素 10 对脂多糖诱导泡沫细胞内核因子 κ B 活性的影响 1 为巨噬细胞, 2 为泡沫细胞, 3 为泡沫细胞 + 15 mg/L IL-10, 4 为泡沫细胞 + 10 mg/L 脂多糖, 5 为泡沫细胞 + 15 mg/L IL-10 + 10 mg/L 脂多糖。

表 3. 白细胞介素 10 对脂多糖诱导泡沫细胞内核因子 κ B 活性的影响

| 分 组 | p65/p50 平均光密度值 |
|--------------------|----------------------------|
| 巨噬细胞 | 2.780 ± 0.030 |
| 泡沫细胞 | 3.380 ± 0.020 |
| 泡沫细胞 + IL-10 | 2.745 ± 0.010 ^a |
| 泡沫细胞 + 脂多糖 | 4.645 ± 0.030 ^a |
| 泡沫细胞 + IL-10 + 脂多糖 | 3.555 ± 0.040 ^b |

a 为 $P < 0.05$, 与泡沫细胞组比较; b 为 $P < 0.05$, 与泡沫细胞 + 脂多糖组比较。

3 讨论

本研究结果发现, 佛波酯能诱导巨噬细胞活化, 产生趋化因子, ox-LDL 对巨噬细胞亦有刺激作用, 能进一步促进趋化因子表达。IL-10 对 CC 类趋化因子 MCP-1 和 MIP-5 mRNA 表达有显著地抑制作用。同时发现 IL-10 能抑制泡沫细胞中 ox-LDL 导致的核因子 κ B 活化, 表明 IL-10 对趋化因子的抑制作用部分是对核因子 κ B 活性的抑制而达到的, 从而降低趋

化因子 mRNA 转录及蛋白合成。IL-10 不仅能抑制由 ox-LDL 导致的核因子 κ B 的活化还能部分阻断脂多糖对核因子 κ B 的协同作用。然而在泡沫细胞形成中 IL-10 对 CXC 类趋化因子 IL-8 抑制作用不明显,可能与不同类型趋化因子的信号转导机制有关,有待于更深入的研究。

目前认为“炎症假说”是动脉硬化的主要发病机制。细胞因子、炎性细胞及免疫活性细胞出现于 As 早期损伤中,可促使血液中的单核细胞浸润到血管内皮间隙并进一步活化和分化为巨噬细胞,后者吞噬大量 ox-LDL 形成泡沫细胞,泡沫细胞的出现,是斑块病变早期的细胞学特征。ox-LDL 在 As 形成早期起到类似炎性介质的作用,Wolfgang 等^[7]发现 ox-LDL 能使单核细胞与内皮细胞紧密粘附,并迁移至血管内皮下分化成巨噬细胞。活化后的巨噬细胞一方面借助于细胞膜上的清道夫受体大量摄取 ox-LDL,造成胞内脂质聚集,胆固醇分布及代谢障碍;另一方面 ox-LDL 可以造成巨噬细胞内胆固醇外流途径受阻^[8],这两方面的因素促使胆固醇在巨噬细胞内蓄积,最终使巨噬细胞转化为泡沫细胞。IL-10 是一种可由多种细胞合成的抗炎因子。体外实验表明 IL-10 可以抑制单核细胞与内皮细胞的粘附,大鼠离体实验中也观察到 IL-10 可以抑制单核细胞与动脉壁的粘附。此外,单核细胞与内皮细胞共同培养时 IL-10 使 MMP-9 活性减弱而使 TIMP-1 的蛋白合成增加,从而抑制斑块破裂和血栓形成^[9]。小鼠 As 模型已证实 IL-10 能有效控制 As 发生发展,尤其能显著抑制泡沫细胞对脂肪颗粒的摄取,从而减少或延缓泡沫细胞的形成^[10,11]。在肺泡巨噬细胞中 IL-10 可以通过抑制核因子 κ B 的活性而抑制 TNF α 、IL-1 β 、MIP-1 α 和 MIP-2 mRNA 表达及蛋白合成^[12,13]。本实验证实 IL-10 选择性抑制泡沫细胞中 CC 类趋化因子 MCP-1 和 MIP-5 mRNA 的表达。通常细胞因子产生与核因子 κ B 活化密切相关,活化后的核因子 κ B 主要以 p60/p50 异源二聚体形式存在于细胞核内。利用 EMSA 实验进一步证实 IL-10 能有效地抑制泡沫细胞内核因子 κ B 的活化,这可能是 IL-10 直接降低 CC 类趋化因子 mRNA 转录的原因。血管下层斑块区趋化因子合成降低,可直接减少巨噬细胞在此聚集,减少巨噬细胞的活化和清道夫受体表达,降低 ox-LDL 的内吞,延缓泡沫细胞的形成。这表明抗炎因子 IL-10 在泡沫细胞形成期对 ox-LDL 所致的炎症

反应有一定的调控作用。同时还证实外源性炎症物质,如脂多糖能加速 ox-LDL 诱导的核因子 κ B 的活化,也能被 IL-10 所扭转。近期临床研究发现,在 As 患者中如血清中 IL-10 浓度偏高者,其病程及预后较好^[14],这进一步证实 IL-10 对 As 的发生发展有着重要的影响。

白细胞介素(IL) 10 作为临床药物治疗 As 尚需要进一步研究,尤其是 IL-10 对泡沫细胞形成的干预机制,如对泡沫细胞内脂质颗粒形成的干扰,巨噬细胞表面清道夫受体表达的影响等。IL-10 对清道夫受体表达的干预机制也成为我们的研究目标,为类似于 IL-10 药物的研发提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead [J]. *Cell*, 2001, **104** (4): 503-516.
- [2] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (12): 1 876-890.
- [3] Lee WH, Kim SH, Jeong EM, Choi YH, Kim DL, Lee B, et al. A novel chemokine, Leukotactin 1, induces chemotaxis, pro-atherogenic cytokines, and tissue factor expression in atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (2): 255-260.
- [4] Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin 8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque [J]. *Circulation*, 1999, **99** (3): 420-426.
- [5] 张国兵, 陈灏珠, 江智文, 温沁竹, 顾青, 王丰, 等. 巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中载脂蛋白 E 基因表达的变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 441-442.
- [6] Dai Y, Datta S, Novotny M, Hamilton T. TGF- β inhibits LPS-induced chemokine mRNA stabilization [J]. *Blood*, 2003, **102** (4): 1 178-185.
- [7] Wolfgang E, Weber PC, Weber C. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **136** (2): 297-303.
- [8] 冯翔, 凌文华. 氧化型低密度脂蛋白及溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (9): 1 246-249.
- [9] Mostafa M, Sylvie CM, Mounia O, Nathalie L, Marie-Paule J, Jear-Baptiste M, et al. Effects of interleukin 10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, **49** (4): 882-890.
- [10] Potteaux S, Esposito B, van Oostrom O, Brun V, Ardouin P, Groux H, et al. Leukocyte derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1 474-478.
- [11] Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, Fishbein MC, Kubo N, Cheroutre H, et al. Overexpression of interleukin 10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (10): 1 064-071.
- [12] Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, Malur A, Drazba J, Kavuru MS, et al. Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages [J]. *Cytokine*, 2000, **12** (9): 1 348-355.
- [13] Shanley TP, Vasi N, Denenberg A. Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation [J]. *Cytokine*, 2000, **12** (7): 1 054-064.
- [14] Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin 10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **44** (1): 44-49.

(此文编辑 文玉珊)