

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-02-0125-03

· 实验研究 ·

烟草烟雾对大鼠脑血管内皮细胞白细胞介素 10 表达的影响

刘 菲¹, 柳宗兰², 王一沙¹

(1. 沈阳医学院沈洲医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110002; 2. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 白细胞介素 10; 吸烟; 血管内皮细胞

[摘要] **目的** 观察不同吸烟量大鼠脑血管内皮细胞白细胞介素 10 的表达, 探讨烟草烟雾导致脑缺血的发病机制。**方法** 健康 Wistar 大鼠 60 只, 分为正常对照组、假暴露组、暴露卷烟烟气 30 天组、暴露卷烟烟气 30 天后停止暴露 30 天组(戒烟组)、暴露卷烟烟气 90 天高剂量组、暴露卷烟烟气 90 天低剂量组。通过免疫组织化学法观察大鼠脑血管内皮细胞白细胞介素 10 的表达。**结果** 正常对照组和假暴露组白细胞介素 10 的表达较多, 暴露卷烟烟气 90 天高剂量组白细胞介素 10 的表达明显低于其他各被动吸烟组, 戒烟组白细胞介素 10 的表达明显高于其他各被动吸烟组, 各被动吸烟组白细胞介素 10 的表达较正常对照组和假暴露组减少 ($P < 0.05$)。**结论** 烟草烟雾可致脑血管内皮细胞白细胞介素 10 的表达减少, 可能在缺血性脑血管病的发病中起重要作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Expression of Interleukin-10 on Cerebral Vascular Endothelial Cells in Smoking Rats

LIU Fei¹, LIU Zong-Lan², and WANG Yi-Sha¹

(1. Department of Neurology, Shenzhou Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110002, China;

2. Department of Neurology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Interleukin-10; Smoking; Vascular Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of interleukin-10 (IL-10) on cerebral vascular endothelial cells in smoking rats, and to discuss the mechanism of ischemia in brain caused by smoking. **Methods** 60 health Wistar rats were divided into 6 groups: normal control group, sham exposure group, exposed cigarette smoke 30 days group, exposed cigarette smoke 30 days then stopping exposure for 30 days group, exposed cigarette smoke 90 days high dose group and exposed cigarette smoke 90 days low dose group. The expression of IL-10 were observed in smoking rats by immunohistochemistry stain. **Results** The expression of IL-10 in normal control group and sham exposure group were more. The expression of IL-10 in exposed cigarette smoke 90 days high dose group were significantly lower than those in the other passive smoking groups. The expression of IL-10 in exposed cigarette smoke 30 days then stopping exposure for 30 days group were significantly higher than those in the other passive smoking groups. The expression of IL-10 in the passive smoking groups were significantly lower than those in control group and the sham exposure group ($P < 0.05$). **Conclusions** Smoking can decrease IL-10 expression in endothelial cell, which plays an important role in ischemic cerebral vascular disease.

脑梗死的发生与多种危险因素有关, 如性别、年龄、吸烟、肥胖、高血压、高血脂、糖尿病, 其中吸烟是脑卒中的独立危险因素。脑梗死的发生与动脉粥样硬化形成密切相关^[1]。在动脉硬化发病机制中, 炎症反应发挥着关键的作用。Fiorentino 等发现辅助

性 T 细胞 2 可分泌一种能抑制辅助性 T 细胞功能的因子, 称之为细胞因子合成抑制因子, 后改称为白细胞介素 10 (IL-10), 研究表明 IL-10 具有较强的抗炎作用^[2,3]。本研究通过观察不同吸烟量的大鼠脑血管内皮细胞 IL-10 的表达, 旨在探讨其在吸烟导致缺血性脑血管病发病机制中的可能作用。

[收稿日期] 2011-02-07

[作者简介] 刘菲, 硕士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为脑血管病的发病机制, E-mail 为 liufei126@126.com。柳宗兰, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病的发病机制。王一沙, 主任医师, 教授, 研究方向为脑血管病的发病机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

健康 Wistar 大鼠购于中国医科大学动物实验

中心;IL-10 单克隆抗体、SABC 试剂盒购于武汉博士德生物制品有限公司;实验用烟为市售某牌号卷烟,盒标焦油量 13 mg,烟碱量 1.3 mg,CO 12 mg。

1.2 动物分组

健康 Wistar 大鼠 60 只,分为 6 组:正常对照组 6 只,不做任何处理;假暴露组 6 只,放入同样烟仓,不吸烟;暴露卷烟烟气 30 天组 12 只,每次被动吸烟 10 支,每天 2 次;暴露卷烟烟气 30 天后停止暴露 30 天组(戒烟组)12 只,每次被动吸烟 10 支,每天 2 次,连续吸烟 30 天,戒烟 30 天;暴露卷烟烟气 90 天高剂量组 12 只,每次被动吸烟 10 支,每天 2 次;暴露卷烟烟气 90 天低剂量组 12 只,每次被动吸烟 4 支,每天 2 次。

1.3 暴露卷烟烟气染毒

自制被动吸烟染毒箱,体积为 $0.5\text{ m} \times 0.3\text{ m} \times 0.5\text{ m} = 0.75\text{ m}^3$,每日被动吸烟 2 次,每次 30 min,烟雾剂量 = 每支烟重(g) - 每支烟灰和烟蒂重(g) = $1.05(\text{g}) - 0.35(\text{g}) = 0.70(\text{g})$,每燃烧一支烟约有 0.70 g 烟草物质进入空气之中,烟雾浓度为 $0.70\text{ g}/0.75\text{ m}^3 = 0.93\text{ g}/\text{m}^3$ 。

1.4 切片制备

实验完毕后次日,大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后,经左心室-主动脉用 1% 肝素化生理盐水 100 mL 快速冲洗,冲洗液变清后,再以 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 150 mL 灌注固定(PBS 0.1 mol/L, pH7.4),开颅取脑,放入 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注液中固定。常规脱水,浸蜡,石蜡包埋,连续于石蜡切片机上自视交叉平面切取冠状切片,片厚 5 μm 。

1.5 免疫组织化学染色

石蜡切片经二甲苯、乙醇脱蜡后,用 PBS (0.1 mol/L) 反复冲洗 3 次,每次 5 min,再用蒸馏水冲洗,3% H_2O_2 孵育 10 s,微波抗原修复后 PBS 冲洗。滴加正常山羊血清,室温孵育 40 min 后倾去血清,滴加 IL-10 抗体(阴性对照组以 PBS 代替),4℃ 冰箱过夜。PBS 冲洗(5 s $\times$ 3)后,滴加生物素标记的二抗,37℃ 室温孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次。

滴加 SABC 工作液,37℃ 孵育 30 s, PBS 冲洗。DAB 显色,自来水充分冲洗。苏木素轻度复染,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在 40×10 倍光镜视野下,进行 IL-10 阳性细胞计数,每只鼠制作一张切片。每个切片分别随机取 5 个不重叠视野。阳性反应物为突出于背景的棕黄色沉积,未见明确棕黄色沉积或着色浅淡与背景几乎一致者

为阴性。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

正常对照组和假暴露组 IL-10 的表达较多,暴露卷烟烟气 90 天高剂量组 IL-10 的表达明显低于其他各被动吸烟组,戒烟组 IL-10 的表达明显高于其他给各被动吸烟组,各被动吸烟组 IL-10 的表达较正常对照组和假暴露组减少($P < 0.05$; 表 1 和图 1, Table and Figure)。

表 1. 各组 IL-10 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The numbers of IL-10 positive cells in the all groups

分 组	大鼠数(只)	阳性细胞数(个/5 个高倍视野)
正常对照组	6	22.0500 ± 1.0129
假暴露组	6	22.8400 ± 0.5389
暴露卷烟烟气 90 天高剂量组	10	3.7200 ± 4.0153^a
暴露卷烟烟气 90 天低剂量组	11	5.6800 ± 2.7236^{ab}
暴露卷烟烟气 30 天组	10	8.7000 ± 3.0875^{ab}
戒烟组	11	13.7600 ± 1.3575^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组或假暴露组比较;b 为 $P < 0.05$,与暴露卷烟烟气 90 天高剂量组比较。

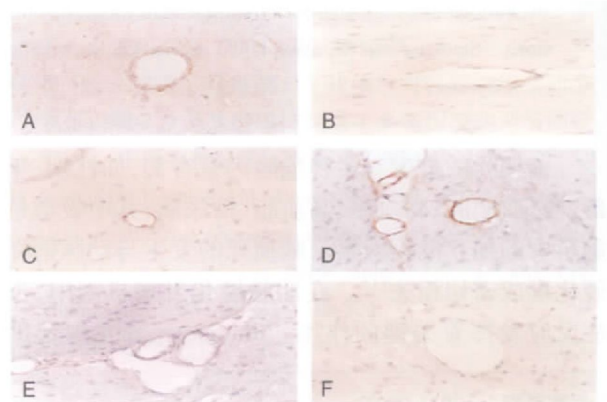


图 1. 免疫组织化学染色观察 IL-10 阳性细胞 A-F 分别为正常对照组、假暴露组、暴露卷烟烟气 30 天组、戒烟组、暴露卷烟烟气 90 天低剂量组、暴露卷烟烟气 90 天高剂量组。

Figure 1. IL-10 positive cells detected by immunohistochemistry stain

3 讨 论

缺血性脑血管病目前是直接威胁人类生命健康及生活质量的疾病。流行病学调查研究显示,吸烟是缺血性脑血管病的重要危险因素,但其引起脑梗死的发病机制目前尚不清楚。近年来认为脑血管张力的增加,血管壁本身的破坏,特别是动脉粥样硬化的形成才是脑缺血最重要、最直接的原因^[4,5]。

动脉粥样硬化的形成是一个复杂的过程,有多种类型的细胞及多种细胞因子、生长因子参与了这一过程。炎症反应在动脉粥样硬化发病机制中起关键性作用^[6]。目前研究表明,白细胞介素在慢性血管炎症中有重要作用^[7]。IL-10 以前被认为是细胞因子合成抑制因子,后来被认为是一种多效的免疫因子,在粥样硬化病变形成和稳定方面有着重要作用^[8]。IL-10 分子量为 30~40 kDa,成熟形式含有 160 个氨基酸,基因定位于 1 号染色体上^[9],可由 Th2 型 T 细胞、B 细胞、单核细胞、内皮细胞等多种细胞产生。IL-10 的抗动脉粥样硬化机制有:①抑制细胞因子等炎症介质,特别是 TNF- α 和 MCP-1。IL-10 还可促进 IL-1 受体拮抗剂释放,有利于抗动脉粥样硬化^[10]。②下调细胞黏附分子的表达,抑制单核细胞附壁,使泡沫细胞生成减少而发挥抗动脉粥样硬化作用^[11]。③抑制组织因子防止血栓形成^[12]。④抑制基质金属蛋白酶的合成,诱导基质金属蛋白酶抑制剂 1 的生成^[13]。⑤IL-10 可抑制动脉粥样硬化斑块中细胞凋亡从而稳定动脉粥样硬化斑块,而且在血管重塑和血管损伤方面起作用。⑥IL-10 可促进巨噬细胞胆固醇的逆向转运,从而增强其抗动脉粥样硬化作用^[14]。

本研究中,暴露卷烟烟气 90 天高剂量组 IL-10 的表达明显低于其他各被动吸烟组,戒烟组 IL-10 的表达明显高于其他各被动吸烟组,各被动吸烟组 IL-10 的表达较正常对照组和假暴露组减少。由此推测,吸烟可致内皮细胞 IL-10 表达下降,IL-10 的下降使血管内皮的炎症反应增强,从而加速了动脉粥样硬化的形成,进而最终导致脑内血栓形成。

吸烟引起脑血管病的发生是一个复杂、多因素共同作用的结果。本研究揭示烟草烟雾可能通过减少脑血管内皮细胞 IL-10 的表达从而进一步引起动脉粥样硬化的形成。最终导致血栓形成。目前,对于烟草烟雾致 IL-10 表达下降的机制尚不清楚,这为进一步研究吸烟与血栓的关系提出了新课题。

【参考文献】

- [1] 梁颖茵,朱建忠,陈松林,等. 颈动脉硬化与脑梗死的相关性及其诊断价值 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26 (18): 3 331-334.
- [2] 任大宾,孙仁宇. 白细胞介素 10 的抗炎功能及其分子机制 [J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2005, 25 (3): 175-178.
- [3] Li JJ, Guo YL, Yang YJ. Enhancing anti-inflammatory cytokine IL-10 may be beneficial for acute coronary syndrome [J]. Med Hypotheses, 2005, 65 (1): 103-106.
- [4] 万功山,柳宗兰,曲芸,等. 蛋白激酶 C 抑制剂对吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间黏附分子 1 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (11): 809-812.
- [5] 耿建红,柳宗兰,拱忠影,等. 吸烟对短暂性脑缺血发作患者血清可溶性细胞间黏附分子 1 水平和脑血流动力学的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (1): 55-57.
- [6] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340 (2): 115-126.
- [7] von der Thüsen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, et al. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential [J]. Pharmacol Rev, 2003, 55 (1): 133-166.
- [8] 谢高强,赵连成,李莹,等. 白介素 10 基因 -592A/C 多态性与颈动脉粥样硬化的关系 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2008, 8 (5): 305-309.
- [9] Peska S, Krause CD, Sarkar D, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors [J]. Ann Rev Immunol, 2004, 22: 929-979.
- [10] Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, 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): 1 064-071.
- [11] Mostafa ME, Chollet-Martin S, Oudghiri M, et al. Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TMP-1 secretion [J]. Cardiovasc Res, 2001, 49: 882-890.
- [12] 洪梅,魏文宁,杨锐,等. IL-10 对 IL-6 诱导外周血单个核细胞组织因子表达的调节作用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13 (3): 479-482.
- [13] Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, et al. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF-alpha in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10 [J]. Eur J Clin, 2002, 32 (11): 803-810.
- [14] Rubic T, Lorenz RL. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as antiatherosclerotic mechanisms of interleukin-10 [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69 (2): 527-535.

(此文编辑 文玉珊)