

阿托伐他汀对人 CD4 + T 淋巴细胞张力蛋白同源第 10 染色体丢失的磷酸酶基因表达的影响

王江友, 李浪, 苏强, 周游, 刘洋, 黄伟强

(广西医科大学第一附属医院心内科 广西心血管病研究所, 广西南宁市 530021)

[关键词] 阿托伐他汀; CD4 + T 淋巴细胞; 张力蛋白同源第 10 染色体丢失的磷酸酶基因

[摘要] **目的** 研究阿托伐他汀在体外对人 CD4 + T 淋巴细胞张力蛋白同源第 10 染色体丢失的磷酸酶基因 (PTEN) 表达的影响。**方法** 取 25 例健康志愿者的新鲜外周血, 免疫磁珠分选出 CD4 + T 淋巴细胞, 随机分为空白组、植物血凝素 (PHA) 刺激组、PHA + 1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组、PHA + 5 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组、PHA + 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 体外培养 48 h 后收集各组细胞及培养基上清液, 荧光定量 PCR 检测 PTEN mRNA 表达水平, Western blot 检测 PTEN 蛋白表达, ELISA 检测培养基上清液肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 及白细胞介素 10 (IL-10) 浓度。**结果** 与空白组比较, PHA 刺激后, CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA、蛋白的表达及上清液 TNF- α 、IL-6 浓度均升高 ($P < 0.05$), 而 IL-10 浓度升高无统计学差异 ($P > 0.05$)。与 PHA 刺激组比较, PHA + 5 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组、PHA + 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA、蛋白的表达和上清液 IL-10 浓度增加 ($P < 0.05$), 而 PHA + 1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组具有增高趋势 ($P > 0.05$), 并随着阿托伐他汀药物浓度的增加而增加; 各组上清液 TNF- α 、IL-6 浓度降低, PHA + 5 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组、PHA + 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组具有统计学差异 ($P < 0.05$)。直线相关性分析显示, TNF- α 、IL-6 的分泌水平与 PTEN 的表达量呈明显的负相关关系 ($r = -0.837$ 和 $r = -0.816$, $P < 0.01$), IL-10 的分泌水平与 PTEN 的表达量呈明显的正相关关系 ($r = 0.753$, $P < 0.05$)。**结论** 阿托伐他汀能够通过调控人 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN 表达发挥抗炎作用。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Atorvastatin on the Expression of Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome in Human CD4 + T Lymphocytes

WANG Jiang-You, LI Lang, SU Qiang, ZHOU You, LIU Yang, and HUANG Wei-Qiang

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University & Guangxi Institute of Cardiovascular Disease, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; CD4 + T Lymphocytes; Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of atorvastatin on the expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome (PTEN) involved in human CD4 + T lymphocytes in vitro. **Methods** Human CD4 + T cells obtained from healthy individuals were activated with phytohemagglutinin (PHA) and treated with atorvastatin. The levels of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RFQ-PCR) was used to measure the expression of PTEN mRNA in CD4 + T cells, which were assessed at the protein level by Western blot as well. **Results** Compared to the blank group, the stimulation of PHA obviously increased the mRNA and protein expression of PTEN and those serum TNF- α and IL-6 secretion ($P < 0.05$), while the level of IL-10 was different between two groups ($P > 0.05$). Compared with those of PHA stimulation group, different concentration atorvastatin significantly increased the protein level of PTEN expression and serum IL-10 secretion ($P < 0.05$), while serum TNF- α and IL-6 production were reduced ($P < 0.05$). Serum TNF- α and IL-6 secretion were negatively related to the expression of PTEN through the linear related analysis ($r = -0.837$ and

[收稿日期] 2013-08-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81160046 和 81260042); 广西硕士研究生科研创新项目 (YCSZ2013033)

[作者简介] 王江友, 硕士研究生, 研究方向为冠心病介入治疗。苏强, 博士研究生, 研究方向为冠心病介入治疗。通讯作者李浪, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗, E-mail 为 drlilang@163.com。

$r = -0.816, P < 0.01$), and IL-10 positive relation with the expression of PTEN ($r = 0.753, P < 0.05$). **Conclusion** The anti-inflammatory effects of atorvastatin are mediated by regulating the expression of PTEN in CD4⁺ T cells.

他汀类药物在动脉粥样硬化性疾病中发挥重要的作用,除降脂、调脂作用之外,还具有多效性,其中研究较多的是其具有的抗炎效应。研究显示^[1,2],阿托伐他汀能够抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞的增殖,调控 Th1/Th2 亚群的平衡,抑制 Th1 淋巴细胞分泌促炎因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等,促进 Th2 淋巴细胞分泌抗炎因子白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 等。但是阿托伐他汀调控 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌炎症因子的具体机制目前尚未明了。张力蛋白同源第 10 染色体丢失的磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome, PTEN) 是最常见的肿瘤抑制突变基因。近年来研究发现,PTEN 能够调控淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞,导致促炎因子 TNF- α 和 IL-6 分泌减少,抗炎因子 IL-10 分泌增加^[3-5]。植物血凝素 (phytohaemagglutinin, PHA) 是一种有丝分裂原,能激活小淋巴细胞转化为淋巴母细胞,继而分裂增殖,释放淋巴因子,并能提高巨噬细胞的吞噬功能。作为干扰素诱导剂可以刺激机体产生白细胞介素 2 和干扰素;还可以刺激机体产生非特异性抗体。本研究利用 PHA 作为激活 CD4⁺ T 淋巴细胞的刺激物,假设阿托伐他汀能够通过 PTEN 信号通路参与调控 CD4⁺ T 淋巴细胞的炎症效应,旨在了解阿托伐他汀对人 CD4⁺ T 淋巴细胞 PTEN 表达的影响,从而进一步阐明他汀类药物的免疫炎症机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

人淋巴细胞分离液 (北京索莱宝科技有限公司); Dynabeads[®] FlowComp[™] Human CD4 试剂盒 (Dyna, Norway); RPMI1640 培养基 (Hyclone, USA); Trizol A + 总 RNA 提取试剂 (天根生化科技 (北京) 有限公司); RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, LTU); Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox, USA); PTEN mRNA、GAPDH mRNA 引物 (上海生工生物工程技术有限公司); 兔抗人 PTEN 单抗 (Santa Cruz, USA); 羊抗兔荧光二抗 (LI-COR, USA); GAPDH 单抗 (碧云天生物技术有限公司); 荧光二抗 (KPL, USA); 蛋白

Marker (Fermentas, LTU); Human TNF- α Platinum ELISA、Human IL-6 Platinum ELISA 和 Human IL-10 Platinum ELISA (Ebioscience, USA); Step-one 荧光定量基因扩增仪 (ABI, USA); Odyssey 双色红外激光成像系统扫描仪。

1.2 细胞提取与分组

25 例健康志愿者, 男性 15 例, 女性 10 例, 年龄 25 ± 3 岁。新鲜外周血, 根据 Ficoll-Paque 密度梯度离心法提取外周血单个核细胞, 重悬于 1 mL 1640 培养基, 严格按照 Dynabeads[®] FlowComp[™] Human CD4 磁珠分选试剂盒说明书分选入 CD4⁺ T 淋巴细胞。从分选出的细胞中取 10 mL + 90 mL PBS 做细胞计数, 同时用 0.4% 台盼蓝染色观察并计算出活细胞存活率。存活率 > 90% 的 CD4⁺ T 淋巴细胞调整为 1×10^9 cells/L, 接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL。根据不同的干预条件分为①空白组: 加等量 1640 培养基; ②刺激组: 加 5 mg/L PHA; ③他汀类药物干预组: 先加 PHA 刺激 1 h 后再分别加入不同浓度阿托伐他汀 (终浓度为 0、1、5、10 μ mol/L)。用含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青链霉素、2 μ mol/L 谷氨酰胺的改良型 1640 培养基, 在 5% CO₂、37℃ 孵育 48 h, 分别离心取培养基上清和细胞用于后续实验。

1.3 荧光定量 PCR 检测 PTEN mRNA 相对表达量

按照 Trizol 操作说明提取细胞总 RNA, 并用 Nanodrop 测量其浓度, 同时用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 有无降解, 调整 RNA 的量为 1 g/L, 逆转录合成 cDNA。采用 SYBR Green I 荧光标记法检测 PCR 产物, 总反应体系为 20 μ L, 根据荧光定量 PCR 说明书分别加入不同组分, PTEN 引物: 上游 5'-CTA TTC CCA GTC AGA GGC GCT AT-3', 下游 5'-TGA ACT TGT CTT CCC GTC GTGT-3', GAPDH 引物: 上游 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3', 下游 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3', 按试剂盒说明设置反应体系及参数, 每个样本均做复孔检测, 同时每次反应均设置阴性孔。PCR 产物经过测序检测。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.4 Western blot 检测 PTEN 蛋白的相对表达量

分选出的 CD4⁺ T 淋巴细胞中加入 100 μ L 蛋白裂解液混匀, 然后在 4℃ 下 12000 r/min 离心 20 min, 提取上清转移至新离心管中, 然后用 BCA 法检测蛋白浓度, 内参为 GAPDH。配置 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干法转膜

40 min,用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,1:2500 一抗 4℃ 孵育过夜,脱色摇床上用 TBST 洗膜 5 min×5 次,1:5000 红外荧光二抗室温孵育 2 h 后在双色红外激光成像系统扫描成像。

1.5 ELISA 检测 TNF-α、IL-6 及 IL-10 浓度

将收集的血清标本及培养基上清和 ELISA 试剂盒常温下放置约 30 min,操作步骤按说明书进行。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验。PTEN 与 TNF-α、IL-10 之间的关系采用直线相关分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN mRNA 的相对表达量

与空白组比较,PHA 刺激组 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA 相对表达量增加(*P* < 0.05);与 PHA 刺激组比较,阿托伐他汀干预后 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA 相对表达量进一步上调,且随着药物浓度的增加上调程度越明显,PHA + 1 μmol/L 阿托伐他汀组具有增高趋势,但未达到统计学差异(*P* > 0.05),PHA + 5 μmol/L 阿托伐他汀组、PHA + 10 μmol/L 阿托伐他汀组均达到统计学差异(*P* < 0.05;表 1)。

表 1. PTEN mRNA 的相对表达量($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)
Table 1. The relative expression of PTEN mRNA

分 组	PTEN mRNA 相对表达量
空白组	1.54 ± 0.27
PHA 刺激组	2.58 ± 0.59 ^a
PHA + 1 μmol/L 阿托伐他汀组	2.96 ± 0.64 ^a
PHA + 5 μmol/L 阿托伐他汀组	3.59 ± 0.86 ^{ab}
PHA + 10 μmol/L 阿托伐他汀组	4.07 ± 0.96 ^{ab}

a 为 *P* < 0.05,与空白组比较; b 为 *P* < 0.05,与 PHA 刺激组比较。

2.2 PTEN 蛋白的相对表达量

PHA 刺激组 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN 蛋白相对表达量与空白组比较明显增多(0.30 ± 0.06 比 0.18 ± 0.07;*P* < 0.05);与 PHA 刺激组比较,阿托伐他汀干预后 PTEN 蛋白相对表达量增加,且随着药物浓度的增加上调程度越明显,而 PHA + 1 μmol/L 阿托伐他汀组(0.34 ± 0.08)具有增高趋势,但未达到统计学差异(*P* > 0.05),PHA + 5 μmol/L 阿托伐他汀组(0.67 ± 0.11)、PHA + 10 μmol/L 阿托伐他汀组(0.78 ± 0.12)均达到统计学差异(*P* < 0.05;图 1)。

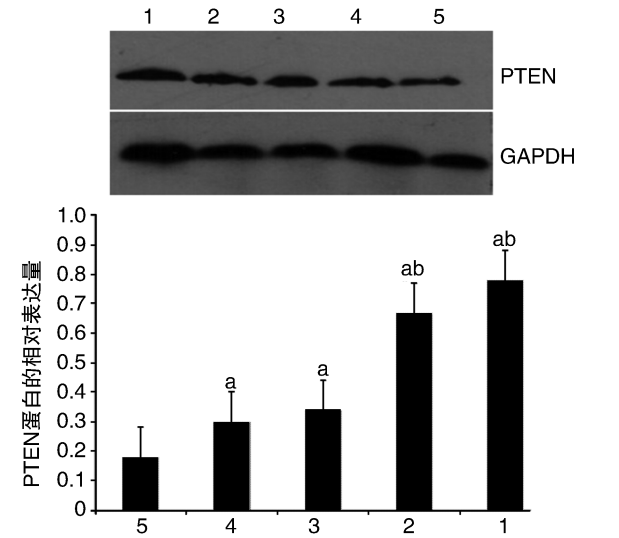


图 1. PTEN 蛋白的相对表达量 1 为 PHA + 10 μmol/L 阿托伐他汀组,2 为 PHA + 5 μmol/L 阿托伐他汀组,3 为 PHA + 1 μmol/L 阿托伐他汀组,4 为 PHA 刺激组,5 为空白组。a 为 *P* < 0.05,与空白组比较;b 为 *P* < 0.05,与 PHA 刺激组比较。

Figure 1. The relative expression of PTEN protein

2.3 TNF-α、IL-6 及 IL-10 浓度

与空白组比较,PHA 刺激组培养基上清 TNF-α、IL-6 浓度明显增加(*P* < 0.05),IL-10 浓度则无统计学意义(*P* > 0.05);与 PHA 刺激组比较,阿托伐他汀干预后 TNF-α、IL-6 浓度降低,IL-10 浓度升高,且随着药物浓度的增加变化越明显,在 PHA + 1 μmol/L 阿托伐他汀组具有下降趋势,但未达到统计学差异(*P* > 0.05),在 PHA + 5 μmol/L 阿托伐他汀组、PHA + 10 μmol/L 阿托伐他汀组均达到统计学差异(*P* < 0.05;表 2)。

表 2. 不同浓度阿托伐他汀对培养基上清 TNF-α、IL-6 及 IL-10 浓度的影响($\bar{x} \pm s$, ng/L, *n* = 5)

Table 2. Effects of different concentrations of atorvastatin on the expression of TNF-α, IL-6 and IL-10

分 组	TNF-α	IL-6	IL-10
空白组	56.86 ± 10.23	26.75 ± 9.73	0.89 ± 0.12
PHA 刺激组	178.53 ± 35.63 ^a	107.46 ± 20.45 ^a	0.97 ± 0.15
PHA + 1 μmol/L 组	157.37 ± 28.94 ^a	95.35 ± 12.56 ^a	1.85 ± 0.24 ^{ab}
PHA + 5 μmol/L 组	103.74 ± 18.56 ^{ab}	64.58 ± 10.47 ^{ab}	4.97 ± 0.58 ^{ab}
PHA + 10 μmol/L 组	89.58 ± 12.85 ^b	45.32 ± 8.45 ^b	7.12 ± 0.89 ^{ab}

a 为 *P* < 0.05,与空白组比较;b 为 *P* < 0.05,与 PHA 刺激组比较。

2.4 直线相关性分析

培养基上清 TNF-α、IL-6 浓度与 PTEN 蛋白的表达量(涵盖所有 25 例健康志愿者的 PTEN 蛋白表达变化量)呈明显的负相关关系(*r* = -0.837 和 *r* =

$-0.816, P < 0.01$), IL-10 浓度与 PTEN 蛋白的表达量呈明显的正相关关系($r = 0.753, P < 0.05$)。

3 讨论

他汀类药物已经广泛应用于冠心病的一级和二级预防。他汀类药物的临床益处除了降脂以外,还与能调节炎症、稳定斑块有关。他汀类药物能抑制 CD4 + T 淋巴细胞的增殖起到抑制炎症反应的作用^[1,2]。阿托伐他汀能够明显抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达^[6,7]。活化的辅助性 T 淋巴细胞(Th)根据分泌的细胞因子不同可分为两类:Th1 细胞主要分泌 TNF- α 、IL-6, Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10, Th2 细胞分泌的抗炎因子能抑制 Th1 细胞分泌的促炎因子。正常情况下, Th1/Th2 细胞趋于动态平衡,而冠状动脉粥样硬化主要是 Th1 细胞过度增殖导致 Th1/Th2 细胞失去平衡。本研究发现,通过 PHA 刺激 CD4 + T 淋巴细胞的活化后, CD4 + T 淋巴细胞分泌促炎因子 TNF- α 、IL-6 增加,抑炎因子 IL-10 没有明显变化。说明 Th1/Th2 细胞失去平衡,处于炎症激活状态。然而加入阿托伐他汀后, CD4 + T 淋巴细胞分泌促炎因子 TNF- α 、IL-6 浓度降低,抑炎因子 IL-10 升高,且随着药物浓度的增加变化越明显,呈药物浓度依赖趋势。证明阿托伐他汀能够促使 Th1/Th2 细胞趋向平衡,抑制炎症反应的发生。

PTEN 是最常见的肿瘤抑制突变基因。既往研究发现 PTEN 主要调控细胞的正常发育过程,包括细胞的生长、粘连、迁移、侵袭和凋亡^[8]。近年来研究发现, PTEN 高表达于淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞,并能够抑制核转录因子依赖的细胞因子家族,导致促炎因子 TNF- α 和 IL-6 分泌减少,抗炎因子 IL-10 分泌增加,参与多种病理生理状态下的炎症反应,并起到抗炎的作用^[3-5]。研究发现,在血管平滑肌细胞中,抑制 PTEN 表达能促进炎症反应,并且过表达 PTEN 能降低炎症因子水平^[9]。另有报道在小鼠缺血再灌注损伤模型中, PTEN 表达上调,降低核转录因子活性,并促使下游的 TNF- α 和 IL-6 分泌减少,从而减少缺血再灌注炎症损伤^[10,11]。本研究发现,通过 PHA 刺激 CD4 + T 淋巴细胞的活化后, CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA、蛋白表达量升高,说明 PTEN 高表达于 CD4 + T 淋巴细胞。加入阿托伐他汀干预后 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA、蛋白相对表达量进一步上调,且随着药物浓度增加上调的程度越明显。同时还发现,随着 CD4 + T 淋巴细胞 PTEN mRNA、蛋白相对表达量

的增加,促炎因子 TNF- α 和 IL-6 浓度降低,抗炎因子 IL-10 浓度升高,经过直线相关分析发现, TNF- α 、IL-6 浓度与 PTEN 蛋白的表达量呈明显的负相关关系, IL-10 浓度与 PTEN 蛋白的表达量呈明显的正相关关系。

综上所述, PTEN 高表达于活化的 CD4 + T 淋巴细胞,阿托伐他汀能够促进 PTEN 表达增加,从而调控 CD4 + T 淋巴细胞分泌抗炎因子与促炎因子平衡。可能是阿托伐他汀抑制 CD4 + T 淋巴细胞炎症反应的机制之一。

[参考文献]

- [1] Tawfik MK, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, et al. Atorvastatin restores the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators in rats with acute myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010, 14 (6): 499-506.
- [2] Cheng X, Ding Y, Xia C, et al. Atorvastatin modulates Th1/Th2 response in patients with chronic heart failure[J]. J Card Fail, 2009, 15 (2): 158-162.
- [3] Kim S, Choi HC. Metformin inhibits inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425 (4): 866-872.
- [4] Chen WJ, Lin KH, Lai YJ, et al. Protective effect of propylthiouracil independent of its hypothyroid effect on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits PTEN induction and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Circulation, 2004, 110 (10): 1313-319.
- [5] Günzl P, Bauer K, Hainzl E, et al. Anti-inflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL-10/DUSP regulation[J]. J Leukoc Biol, 2010, 88 (6): 1259-269.
- [6] 张利群, 孔宏亮, 周瀛, 等. 阿托伐他汀对大鼠心肌梗死后心肌纤维化及心肌肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19 (1): 47-49.
- [7] 王敬祥, 张月兰, 田文, 等. 阿托伐他汀在大鼠颈总动脉球囊损伤模型中对 NF- κ B 及其相关炎症因子的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (2): 135-139.
- [8] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2001, 114 (13): 2375-382.
- [9] Furgeson SB, Simpson PA, Park I, et al. Inactivation of the tumour suppressor, PTEN, in smooth muscle promotes a pro-inflammatory phenotype and enhances neointima formation[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86 (2): 274-282.
- [10] Ke B, Shen X D, Ji H, et al. HO-1 - STAT3 axis in mouse liver ischemia/reperfusion injury: Regulation of TLR4 innate responses through PI3K/PTEN signaling[J]. J Hepatol, 2012, 56 (2): 359-366.
- [11] Kamo N, Ke B, Busuttill RW, et al. PTEN-mediated Akt/ β -Catenin/Foxo1 signaling regulates innate immune responses in mouse liver ischemia/reperfusion injury[J]. Hepatology, 2013, 57 (1): 289-298.

(此文编辑 文玉珊)