

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-04-0334-05

## 白细胞介素 35 对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠炎症及动脉粥样硬化的影响

王庆航, 陈越峰, 陶琳琳, 朱洁, 聂玉梅, 周碧蓉

(安徽医科大学第一附属医院心血管内科, 安徽省合肥市 230022)

[关键词] 白细胞介素 35; 动脉粥样硬化; 白细胞介素 10; 转化生长因子  $\beta$ ; 白细胞介素 17

[摘要] 目的 研究白细胞介素 35(IL-35)对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化进程及其相关炎症因子 IL-10、转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )及 IL-17 的影响,探讨 IL-35 对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化的可能作用机制。方法 24 只 ApoE<sup>-/-</sup> 8 周龄实验小鼠,普通饲料饲养 1 周后随机平均分为正常对照组、动脉粥样硬化组及 IL-35 干预组 [每只小鼠腹腔内注射 IL-35 1.2 mg/(kg·d)],正常对照组继续给予普通饲料,其他各组均以高脂饲养建立动脉粥样硬化模型,造模给药 16 周后采集血标本及胸主动脉,HE 染色观察各组小鼠主动脉斑块形成并测定血管内膜中膜厚度,免疫组织化学染色法测定各组小鼠主动脉血管壁 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 的表达,ELISA 检测各组小鼠血清中 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 的水平。结果 与正常对照组相比,动脉粥样硬化组斑块形成明显,内膜中膜厚度显著增加( $P < 0.01$ ),IL-10 在血管壁表达显著增加( $P < 0.05$ ),而 TGF- $\beta$  在血管壁表达无统计学差异( $P > 0.05$ ),IL-10 和 TGF- $\beta$  在血清中水平显著降低( $P < 0.05$ ),IL-17 在血管壁表达和血清中水平显著升高( $P < 0.05$ );与动脉粥样硬化组比较,IL-35 干预组斑块明显改善,内膜中膜厚度显著减低( $P < 0.01$ ),IL-10 和 TGF- $\beta$  在血管壁表达和血清中水平显著升高( $P < 0.05$ ),IL-17 在血管壁表达和血清中水平显著降低( $P < 0.05$ )。结论 IL-35 具有延缓动脉粥样硬化进程的作用,这可能与其抑制促炎因子 IL-17、上调抗炎因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平有关。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

### Effect of Interleukin-35 on Atherosclerosis and Inflammation in ApoE<sup>-/-</sup> Mice

WANG Qing-Hang, CHEN Yue-Feng, TAO Lin-Lin, ZHU Jie, NIE Yu-Mei, and ZHOU Bi-Rong

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China)

[KEY WORDS] Interleukin-35; Atherosclerosis; Interleukin-10; Transforming Growth Factor  $\beta$ ; Interleukin-17

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of interleukin-35 (IL-35) in atherosclerosis, we observed the influence of IL-35 in atherosclerosis progression and the serum level variation of its related inflammatory factors, interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and IL-17, by establishing the animal models of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. **Methods** 24 ApoE<sup>-/-</sup> male healthy mice (8 weeks old) were randomly divided into three groups: control group, atherosclerosis group and IL-35 treatment group (every mouse received intraperitoneal injection of IL-35 (1.2 mg/kg, qd) after providing basic food for a week). Control group were provided basic food, the other two groups were provided fatty food to establish the animal models of atherosclerosis. The blood specimen and aorta vascular tissues were collected after 16 weeks. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the atherosclerotic plaque formation, and intima-media thickness was investigated. Expression of IL-10, TGF- $\beta$  and IL-17 in aortic arteries was detected by immunohistochemical staining. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the expression level of IL-10, TGF- $\beta$  and IL-17 in mice serum. **Results** Compared with the control group, atherosclerotic plaque in atherosclerosis group was obviously formed, and the intima-media was obviously thickened ( $P < 0.01$ ), the expression of IL-10 in aortic arteries were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while no changes were found in the expression of TGF- $\beta$  in aortic arteries ( $P > 0.05$ ), and the serum levels of IL-10 and TGF- $\beta$  were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the expression of IL-17 in aortic arteries and the serum levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the atherosclerosis

[收稿日期] 2015-06-24

[修回日期] 2015-10-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81300223);安徽省学术和技术带头人后备人选科研活动经费资助项目;安徽医科大学第一附属医院博士启动基金

[作者简介] 王庆航,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化,E-mail 为 1164968111@qq.com。通讯作者周碧蓉,博士,主任医师,研究方向为动脉粥样硬化基础与临床,E-mail 为 zhoubirong1@hotmail.com。

group, atherosclerotic plaque in IL-35 treatment group were improved, and the intima-media was obviously thinned ( $P < 0.01$ ), the expression of IL-10 and TGF- $\beta$  and the serum levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the expression of IL-17 and the serum levels were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** IL-35 may retard the pathogenesis of atherosclerosis by down-regulating the levels of inflammatory chemokines IL-17, up-regulating the levels of anti-inflammatory chemokines IL-10 and TGF- $\beta$ .

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种多因素参与的复杂病变,研究发现<sup>[1]</sup>抗炎因子与促炎因子失衡导致的炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展中发挥重要作用。白细胞介素 35(interleukin-35, IL-35)是最近发现的 IL-12 细胞因子家族成员之一<sup>[2]</sup>,可以通过上调调节性 T 细胞(T regulatory cell, Treg)相关细胞因子如 IL-10、转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )水平,同时抑制辅助性 T 细胞(T helper cells, Th)相关细胞因子如 IL-17 的分泌发挥抗炎作用<sup>[3-4]</sup>。有研究发现<sup>[5-6]</sup>IL-35 作为一种抗炎因子可以减缓动脉粥样硬化的进程,并可能作为治疗动脉粥样硬化的一个新靶点,但其作用机制尚未明确。本研究通过体外注射 IL-35 对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化的进程进行干预后,观察 IL-35 对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化进程的影响,以及对相关炎症因子 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 水平的改变,探讨 IL-35 在动脉粥样硬化中的可能作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性无特定病原(SPF)级 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,8 周龄,体重  $20 \pm 3$  g,购自北京维通利华实验动物有限公司,饲养在安徽医科大学实验动物中心 SPF 级实验室。

### 1.2 主要实验材料

重组人 IL-35(rIL-35)购自北京义翘神州生物技术有限公司;小鼠 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 ELISA 试剂盒购自上海森雄生物有限公司;免疫组化一抗 IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-17 抗体购自北京博奥森生物工程有限公司;PV6000、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其余由安徽医科大学第一附属医院中心实验室提供。

### 1.3 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化模型的制备

24 只 ApoE<sup>-/-</sup>8 周龄实验小鼠,普通饲料饲养 1 周后随机分为正常对照组、动脉粥样硬化组及 IL-35 干预组[每只小鼠腹腔内注射 IL-35 1.2 mg/(kg·d)],正常对照组给予普通饲料,其他各组均以高脂饲料

饲养。

### 1.4 血标本及胸主动脉的采集

实验结束后,从小鼠腹主动脉取血约 1 mL,静置离心,取血清放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。分别无菌取小鼠胸主动脉血管,置于 10% 中性甲醛溶液中浸泡固定 48 h,常规酒精脱水,石蜡包埋,5  $\mu\text{m}$  厚度连续切片,行 HE 染色和免疫组织化学染色。

### 1.5 内膜中膜厚度测量

Image-Pro Plus 软件分析动脉粥样硬化斑块内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT)反应损伤处血管内膜增生情况。

### 1.6 免疫组织化学分析 IL-10、TGF- $\beta$ 及 IL-17 的表达

Image-Pro Plus 软件分析各组主动脉壁 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 的表达,以胞膜和胞质黄染或棕黄为阳性,测定血管内目标物质的累积光密度值(IOD SUM)及测量区域的面积(area),计算平均光密度值(平均光密度值=累积光密度值/测量区域的面积),对目标蛋白表达进行定位和半定量分析。

### 1.7 ELISA 法测定血清 IL-10、TGF- $\beta$ 及 IL-17 水平

采用 ELISA 法检测外周血中 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 浓度,按照试剂盒说明书操作。

### 1.8 统计学分析

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料统计结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠主动脉血管组织 HE 染色结果

正常对照组中内皮细胞层连续,内皮下未见脂质沉积,平滑肌细胞排列整齐,紧密有序;动脉粥样硬化组中可见管壁布满斑块,内膜增生严重,可见大量泡沫细胞浸润,中外膜不规则增厚;IL-35 干预组中见散在薄斑块,内膜轻度增厚,少量泡沫细胞沉积,中外膜较动脉粥样硬化组薄(图 1)。与正常对照组比较,动脉粥样硬化组 IMT 值显著升高( $P < 0.01$ );与动脉粥样硬化组比较,IL-35 干预组 IMT 值显著降低( $P < 0.01$ ;图 1)。

2.2 免疫组织化学分析 IL-10、TGF-β 及 IL-17 在三组小鼠主动脉血管壁的表达

2.2.1 IL-10 在小鼠主动脉血管壁的表达 IL-10 阳性呈棕黄色颗粒,表现为胞膜胞质染色,正常对照组中未见明显棕黄色颗粒;动脉粥样硬化组中可见少量 IL-10 棕黄色颗粒沉积;IL-35 干预组中可见大量 IL-10 颗粒,明显多于动脉粥样硬化组(图 2)。

2.2.2 TGF-β 在小鼠主动脉血管壁的表达 TGF-β 阳性呈棕黄色颗粒,表现为胞膜胞质染色,正常对照组

中未见明显棕黄色颗粒;动脉粥样硬化组中可见少量 TGF-β 棕黄色颗粒沉积;IL-35 干预组中可见大量 TGF-β 颗粒,明显多于动脉粥样硬化组(图 2)。

2.2.3 IL-17 在小鼠主动脉血管壁的表达 IL-17 呈棕黄色颗粒,表现为胞膜胞质染色,正常对照组中未见明显棕黄色颗粒;动脉粥样硬化组中可见大量 IL-17 棕黄色颗粒沉积;IL-35 干预组中可见少量 IL-17 棕黄色颗粒,明显少于动脉粥样硬化组(图 2)。

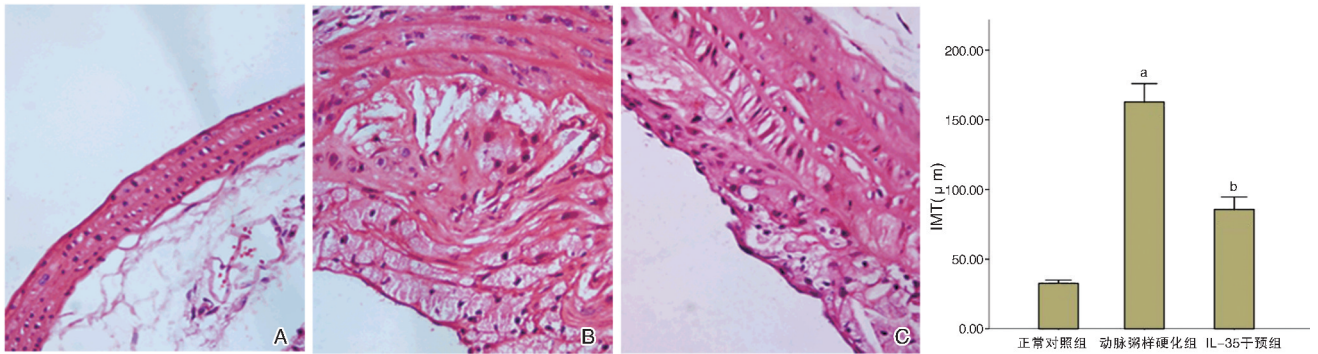


图 1. 三组小鼠主动脉血管 HE 染色结果(400×)及血管壁内膜中膜厚度 A 为正常对照组, B 为动脉粥样硬化组, C 为 IL-35 干预组。a 为 P<0.01, 与正常对照组比较; b 为 P<0.01, 与动脉粥样硬化组比较。

Figure 1. HE staining and IMT of aortic arteries in each group of mice(400×)

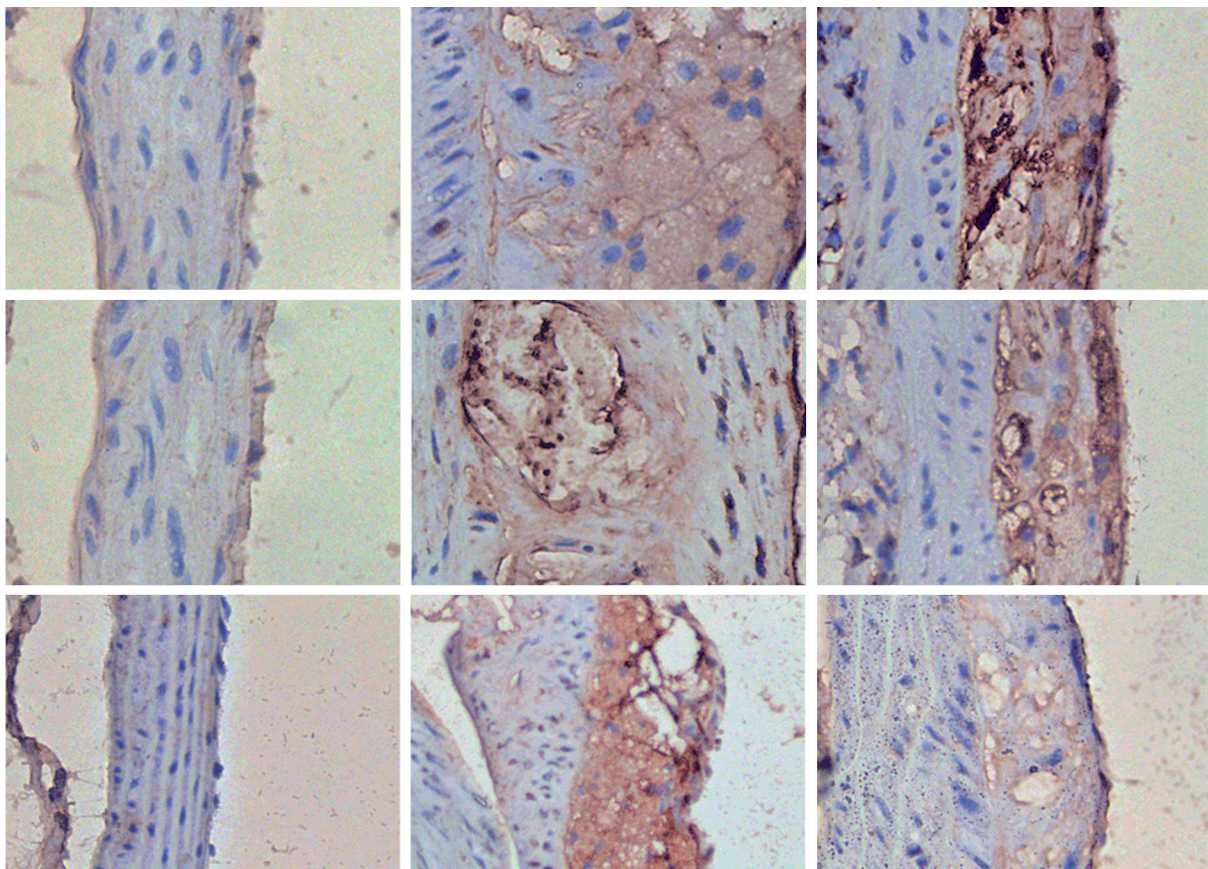


图 2. IL-10(上图)、TGF-β(中图)和 IL-17(下图)在三组小鼠主动脉血管壁的表达(400×) 左为正常对照组,中为动脉粥样硬化组,右为 IL-35 干预组。

Figure 2. Expression of IL-10, TGF-β and IL-17 in aortic arteries in each group of mice(400×)

2.2.4 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 在三组小鼠主动脉血管壁的平均光密度值 与正常对照组比较,动脉粥样硬化组主动脉斑块处 IL-10 平均光密度值显著增加( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$  平均光密度值差异无统计学意义( $P>0.05$ ),IL-17 平均光密度值显著增加( $P<0.05$ );与动脉粥样硬化组比较,IL-35 干预组 IL-10、TGF- $\beta$  平均光密度值均显著增加( $P<0.05$ ),IL-17 平均光密度值显著减低( $P<0.05$ ;图 3)。

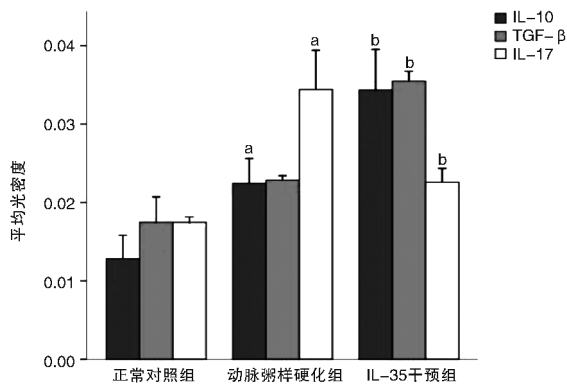


图 3. IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 在三组小鼠主动脉血管壁表达的平均光密度值 a 为  $P<0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与动脉粥样硬化组比较。

Figure 3. Mean density of IL-10, TGF- $\beta$  and IL-17 in aortic arteries in each group of mice

### 2.3 炎症因子 IL-10、TGF- $\beta$ 及 IL-17 在小鼠血清中的水平

与正常对照组相比,动脉粥样硬化组血清中 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平显著降低,IL-17 水平显著升高;与动脉粥样硬化组比较,IL-35 干预组血清中 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平显著升高,IL-17 水平显著降低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ;表 1)。

表 1. 炎症因子 IL-10、TGF- $\beta$  及 IL-17 在三组小鼠血清中的水平( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

Table 1. IL-10, TGF- $\beta$  and IL-17 levels in each group of mice( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

分 组	n	IL-10	TGF- $\beta$	IL-17
正常对照组	8	182.58 $\pm$ 3.97	120.79 $\pm$ 4.95	49.41 $\pm$ 2.53
动脉粥样硬化组	8	106.60 $\pm$ 9.01 <sup>a</sup>	83.49 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	65.10 $\pm$ 1.86 <sup>a</sup>
IL-35 干预组	8	197.87 $\pm$ 10.24 <sup>b</sup>	142.00 $\pm$ 4.80 <sup>b</sup>	54.21 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与正常对照组相比;b 为  $P<0.05$ ,与动脉粥样硬化组相比。

## 3 讨 论

动脉粥样硬化是多因素参与的复杂病变过程,

目前机制尚未完全明确,但在动脉粥样硬化病变过程中的各个阶段均可以检测到炎症细胞和炎症介质,提示炎症反应在动脉粥样硬化各个时期均起到重要作用。

IL-35 是最近发现的 IL-12 家族的细胞因子,是由 EBI3 和 IL-12p35 两个亚基构成的异二聚体,与 IL-12、IL-23、IL-27 共同组成 IL-12 家族<sup>[2-3]</sup>。IL-35 在小鼠中是由 Treg 细胞分泌的,对 Treg 细胞发挥抑制功能有重要作用<sup>[2]</sup>,且在多种疾病中发挥抗炎作用。有研究发现,冠心病患者血清中 IL-35 水平明显降低,且与其体内炎症水平及斑块的不稳定性有关,证实 IL-35 在动脉粥样硬化疾病中具有重要的调节作用<sup>[5]</sup>。

本实验结果显示,动脉粥样硬化组较正常对照组斑块形成和脂质沉积明显,内膜中膜明显增厚,予以 IL-35 干预后,与动脉粥样硬化组相比,斑块形成和脂质沉积受抑,内膜中膜增生减轻,说明 IL-35 具有延缓动脉粥样硬化进程的作用,并对斑块形成和内膜中膜增厚有明显的抑制作用。

抗炎因子与促炎因子失衡导致的炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展中发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>,其中炎症因子间的相互作用可以维持抗炎因子与促炎因子间的平衡。IL-35、IL-10 和 TGF- $\beta$  主要是由不同 Treg 细胞亚型分泌的具有抗炎作用的细胞因子,在抗炎和免疫抑制作用方面具有重要作用。研究发现 IL-10、TGF- $\beta$  是 Treg 细胞发挥抑制泡沫细胞形成的主要细胞因子,同时可以增加斑块稳定性,因此其在发挥抑制动脉粥样硬化形成的过程中具有重要作用。IL-17 是 Th17 细胞特征性的细胞因子,其主要生物学功能是促进炎症反应<sup>[10-11]</sup>。研究发现<sup>[12-13]</sup>,在动脉粥样硬化发生发展过程中,IL-17 可以通过诱导巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞的活化,释放多种细胞因子导致炎症反应,从而促进动脉粥样硬化的形成,同时 IL-17 还可以导致斑块易损性增加以及促进血小板的聚集促使急性冠状动脉综合征的发生<sup>[14-16]</sup>。有研究发现<sup>[3-4]</sup>,IL-35 作为一种抗炎因子在发挥抗炎作用的同时,还可以通过调节 IL-10、TGF- $\beta$  和 IL-17 的水平维持抗炎因子与促炎因子间的平衡。

本实验通过体外注射 IL-35 干预 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化进程,结果发现 IL-35 减轻了动脉粥样硬化病变程度,同时检测其相关炎症因子 IL-10、TGF- $\beta$  和 IL-17 的水平,通过免疫组织化学染色法发现,动脉粥样硬化组小鼠血管壁 IL-10、IL-17 表达增加,TGF- $\beta$  表达未见明显改变,予以 IL-35 干预

后,IL-10、TGF- $\beta$ 在血管壁表达水平显著升高,IL-17水平显著降低。通过ELISA法发现动脉粥样硬化组小鼠血清IL-10、TGF- $\beta$ 水平显著降低,血清IL-17水平显著升高,予以IL-35干预后,小鼠血清IL-10、TGF- $\beta$ 水平显著升高,血清IL-17水平显著降低。这可能是由于在小鼠动脉粥样硬化病变过程中体内血清抗炎因子减少,促炎因子增多,但在动脉粥样硬化斑块病变中局部炎症反应增强,抗炎因子与促炎因子失衡,与相关文献报道相一致<sup>[9]</sup>。本实验说明IL-35与IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-17之间相互作用影响动脉粥样硬化进程,同时IL-35可能通过上调抗炎因子IL-10和TGF- $\beta$ ,下调促炎因子IL-17的水平维持炎症因子间的平衡。

综上所述,体外注射IL-35干预ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化进程,动脉粥样硬化病变明显减轻,IL-10、TGF- $\beta$ 表达上调,IL-17表达下调,提示IL-35抗动脉粥样硬化机制可能与其调控IL-10、TGF- $\beta$ 及IL-17水平有关,但由于动脉粥样硬化形成机制复杂,IL-35抗动脉粥样硬化作用可能还涉及其他机制,对其深入研究可能为防止动脉粥样硬化提供新的途径。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115-126.
- [2] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function [J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 566-569.
- [3] Niedbala W, Wei XQ, Cai B, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(11): 3 021-029.
- [4] Wirtz S, Billmeier U, McHedlidze T, et al. Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1 875-886.
- [5] Lin Y, Huang Y, Lu Z, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52 490.
- [6] 台适,周胜华,刘启明,等.冠心病患者血浆白细胞介素-35水平及临床意义的探讨[J].*临床心血管病志*, 2014, 30(1): 81-84.
- [7] 李庆,王怡,周青,等.全反式维甲酸对早期动脉粥样硬化大鼠模型外周调节性T细胞与辅助性T细胞17平衡的影响[J].*中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(4): 299-304.
- [8] Zhendong Liu, Yingxin Zhao, Fang Wei, et al. Treatment with telmisartan/rosuvastatin combination has a beneficial synergistic effect on ameliorating Th17/Treg functional imbalance in hypertensive patients with carotid atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233: 291-299.
- [9] 陈玉林,菅颖,刘民杰,等.动脉粥样硬化小鼠辅助性T细胞17和调节性T细胞功能失衡的机制研究[J].*中华心血管病杂志*, 2013, 41(5): 416-421.
- [10] Wang L, Gao S, Xu W, et al. Allergic asthma accelerates atherosclerosis dependent on Th2 and Th17 in apolipoprotein E deficient mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 72: 20-27.
- [11] Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(3): 535-552.
- [12] Christian E, Roland K, Sultan C, et al. Inhibition of proinflammatory cytokine IL-17 reduces atherosclerotic lesion development in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Circulation*, 2007, 116(8): II\_145-II\_146.
- [13] Christian E, Lili C, Sultan C, et al. Pathogenic mechanisms of IL-17 in atherogenesis in vivo and in vitro studies [J]. *Circulation*, 2008, 118(3): S\_310.
- [14] Nada P, Athanassios V, Sang HL, et al. Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet [J]. *Mol Immunol*, 2009, 47: 37-45.
- [15] Devang NP, Carter AK, Steven RB, et al. Interleukin-17 stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NFkappaB and C/EBPbeta activation [J]. *J Bio Chem*, 2007, 282: 27 229-238.
- [16] Zhang S, Yuan J, Yu M, et al. IL-17A facilitates platelet function through the ERK2 signaling pathway in patients with acute coronary syndrome [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40 641.

(此文编辑 许雪梅)