

白细胞介素-6 对兔血管平滑肌细胞产生 C 反应蛋白的影响

黄根牙 肖爱梅 朱灿宏 唐利龙

【摘要】 目的:探讨白细胞介素-6(IL-6)能否诱导体外原代培养的兔血管平滑肌细胞(VSMCs)产生 C 反应蛋白(CRP)。 方法:体外原代培养新西兰兔腹主动脉 VSMCs。分别用白细胞介素(IL)-6(10 ng/ml)、IL-1 β 25 ng/ml 或 IL-6(10 ng/ml) + IL-1 β (25 ng/ml)刺激 VSMCs 48 h。对照组用等体积的 IL-6 的溶剂孵育 48 h。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹法(Western blot)分别检测培养细胞 CRP mRNA 和蛋白的表达情况。 结果:对照组的原代 VSMCs 未见 CRP 的产生。VSMCs 与 IL-6 单独孵育 48 h 后,CRP mRNA 的表达量是对照组的(3.50 \pm 1.17)倍,能产生少量 CRP,与对照组相比有差异。单独应用 IL-1 β 不能诱导 VSMCs 产生 CRP,但是在 IL-1 β 和 IL-6 的联合刺激下,CRP mRNA 表达量是对照组的(5.92 \pm 1.30)倍,CRP 的合成亦达最大值。 结论:IL-6 能诱导原代培养的兔 VSMCs 产生 CRP。尽管单独应用 IL-1 β 不能刺激 VSMCs 产生 CRP,但是它却能显著增强 IL-6 诱导 CRP 的表达。

【关键词】 C 反应蛋白;白细胞介素-6;动脉粥样硬化;血管平滑肌细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.02.015

Effect of interleukin-6 on induced C-reactive protein in rabbit vascular smooth muscle cells HUANG Gen-ya*, XIAO Ai-mei, ZHU Can-hong, TANG Li-long. Department of Geriatrics, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhengjiang 212002, China

【Abstract】 Objective: To investigate whether interleukin-6 (IL-6) can induce the primarily cultured rabbit vascular smooth muscle cells (VSMCs) to produce C-reactive protein (CRP). **Methods:** Rabbit primary VSMCs from abdominal aorta were cultured in vitro. Then IL-6 (10ng/ml), internukin-1 β (IL-1 β , 25ng/ml), IL-6 (10ng/ml) + IL-1 β (25ng/ml) were used respectively to stimulate the primary cells for 48h. The VSMCs were incubated with the solvent of IL-6 in the control group. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot were used to detect CRP mRNA and protein expression of the primary cells respectively. **Results:** Incubating with IL-6 alone after 48h, CRP mRNA level was (3.50 \pm 1.17) fold of the control and CRP was modestly produced. The difference was significant comparing with the control. Stimulating with the combination of IL-6 and IL-1 β , CRP mRNA level was (5.92 \pm 1.30) fold of the control and CRP was maximally produced, whereas incubation with IL-1 β alone did not induce CRP production. **Conclusion:** IL-6 can induce the primary rabbit VSMCs to produce CRP. IL-1 β can significantly enhance the induction of CRP by IL-6.

【Key words】 C-reactive protein; Interlukin-6; Atherosclerosis; Vascular smooth muscle cell

流行病学及循证医学研究证明,C 反应蛋白(CRP)无论是在健康人群、急性冠脉综合征或冠脉介入治疗术后再狭窄患者中都可以作为一项独立

危险因素,预测心血管疾病的发生、发展及预后^[1-4]。CRP 不仅是一个炎症标志物,而且还能直接参与动脉粥样硬化的发生、发展^[5-7]。他汀类降脂药对心血管病患者的保护作用除其降脂效果外,抗炎及降低 CRP 等降脂外效果也起了重要作用^[8,9]。动物实验研究证实,直接抑制 CRP 的合成对治疗急性心肌梗死也有一定的疗效^[8,10]。我们对兔腹主动脉瘤模型的研究证实,动脉瘤兔增高的血清高敏 C 反应蛋白

基金项目:国家自然科学基金(30770897/C03030201)

作者单位:212002 镇江,江苏大学附属人民医院老年医学科(黄根牙,肖爱梅,朱灿宏);510080 广州,中山大学附属第一医院心血管内科(唐利龙)

(hsCRP)来源于动脉瘤血管平滑肌细胞(VSMCs),而不是肝细胞^[14]。目前国内外对 VSMCs 产生 CRP 的机制研究较少。对于肝细胞株的研究显示,白细胞介素-6(IL-6)是 CRP 基因的基本诱导因子,而白细胞介素-1 β (IL-1 β)能协同 IL-6 通过调控多个转录因子诱导 CRP 基因转录^[12, 13]。本实验利用原代培养的新西兰大白兔 VSMCs,研究 IL-6 能否诱导 VSMCs 表达 CRP。

1 材料与方法

1.1 实验动物

所采用实验方案均符合美国国立健康学院颁布的实验动物管理和使用指南,也符合江苏大学实验动物管理和使用委员会的规定。5 只体重 2.0~2.5 kg 的普通级新西兰雄性大白兔(购于广州中医药大学实验动物中心),实验前 1 周适应性饲养于气温 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 、明暗交替(各 12 h)的动物房中,自由进食普通兔饲料,自由饮水。

1.2 主要试剂

杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM)干粉购于美国 Gibco 公司。胎牛血清购于杭州四季青生物工程有限公司。重组人 IL-6 和重组人 IL- β 均购于美国 Sigma-Aldrich。兔 CRP 免疫检测试剂盒购于美国 Immunology Consultants Laboratory。RT-PCR 试剂盒购于 Takara 生物大连有限公司。兔 CRP 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 兔腹主动脉 VSMCs 原代培养

兔腹主动脉 VSMCs 原代培养采用组织贴块培养法,培养和传代方法参见文献^[14]。相差显微镜下见培养细胞呈典型的平滑肌细胞特征性“峰”、“谷”状生长。抗 α -actin 单克隆抗体对细胞爬片进行免疫组织化学染色。镜下可见细胞浆内被染成淡黄色的丝状物与细胞长轴平行(阳性染色),胞核不着色。实验用阳性染色 $\geq 98\%$ 的 6~8 代细胞。

1.4 兔肝细胞原代培养

采用非灌注胶原酶消化法分离兔肝细胞,原代肝细胞培养方法参见文献^[15]。PAS 染色后,光镜下观察可见肝细胞胞质中充满粉红色糖原颗粒(阳性染色)。实验用阳性染色 $\geq 95\%$ 的 1 代细胞。

1.5 炎症细胞因子干预原代培养细胞

兔 VSMCs 传至第 5~7 代时接种于六孔板内,6~8 代 VSMCs 和 1 代肝细胞用于实验。细胞贴壁 80%时换用含 0.5% 牛血清白蛋白的培养基饥饿静止 24 h。5 只兔 VSMCs 和肝细胞均分为 IL-6 组、IL-1 β 组、IL-6 + IL-1 β 组和对照组。根据预实验结果,IL-6 刺激原代兔 VSMCs 表达 CRP 的最小剂量为 10

ng/ml,IL-1 β 增强 IL-6 表达 CRP 的最小剂量为 25 ng/ml。细胞静止 24 h 后换用含 1% 胎牛血清的培养基(每孔 2 ml),以上 3 个实验组分别加入 IL-6、IL-1 β 、IL-6 + IL-1 β ,使 IL-6 和 IL-1 β 的工作浓度分别达 10 ng/ml 和 25 ng/ml。对照组加入等体积的 0.5% 牛血清白蛋白(IL-6 和 IL-1 β 的溶剂),再置细胞于 5% CO_2 、95% 空气、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 48 h。

1.6 免疫印记(Western blot)

用 2% 十二烷基磺酸钠(SDS)缓冲液,冰上裂解细胞,对培养细胞进行全细胞蛋白质提取。对所提蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶(7.5% 分离胶和 4% 浓缩胶)电泳、转膜、封闭、抗原抗体反应(一抗用鸡抗兔 CRP 单克隆抗体,1:700;辣根过氧化物酶标记的二抗用羊抗鸡,1:2000)、化学发光及 X-光片曝光显影,最后定影观察结果。

1.7 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

Trizol 裂解细胞,常规方法提取细胞总 RNA 后,参照 RT-PCR 试剂盒提供的检测步骤说明进行操作。每个样品检测 3 次,取平均值。所用家兔 CRP 引物序列:上游 5'-GGGTGTTTGCTTGCTTAT-3',下游 5'-CCCAGGAA GTCCAGGTAT-3';扩增片段为 456 bp(基因库编码为 M13497)。以兔 β -actin 作为内对照,引物序列为:上游 5'-GTCCTTCCTGGGCATGGAG-3',下游 5'-GGC GTACAGGTCCTT GCG-3';扩增片段为 98 bp。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,溴化乙锭染色,ImageJ 1.37 系统进行图像分析。PCR 产物送天根生化科技(北京)有限公司进行测序分析。

1.8 统计学分析

采用 stata 7.0 软件包进行统计分析。先行正态性检验(矩法)和多个方差的齐性检验(Bartlett 法),定检验水准 $\alpha = 0.2$ (双侧)。所得数据均服从正态分布,且每种资料的各组方差均达到齐性,故这些资料的多样本比较用单因素方差分析(ANOVA)法,两两比较用 Scheffe's 法,定检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

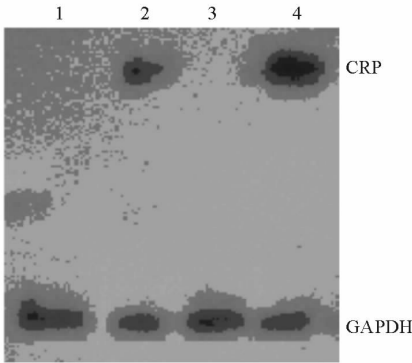
本研究以原代培养的肝细胞为阳性参照,研究 IL-6 体外能否刺激 VSMCs 产生 CRP。如表 1、图 1 和图 2 所示,静止的原代培养的兔腹主动脉 VSMCs 和肝细胞几乎不表达 CRP mRNA,或仅有微量表达。IL-6(10 ng/ml)与细胞孵育 48 h 后能诱导 VSMCs 和肝细胞表达 CRP mRNA,与对照组比较差异有显著性。单独用 IL-1 β (25 ng/ml)与细胞孵育 48 h 后亦能诱导肝细胞明显上调 CRP mRNA 的表达,但对

VSMCs CRP mRNA 的表达却无明显诱导作用。IL-6 (10 ng/ml)联合 IL-1 β (25 ng/ml)对刺激 VSMCs 和肝细胞表达 CRP mRNA 的作用最强,与 IL-6 组比较差异有显著性。Western blot 结果进一步在蛋白水平证实了上述结果,即静止的 VSMCs 未检测到 CRP 的产生,IL-6 能诱导少量 CRP 的产生,单独用 IL-1 β 不能刺激 CRP 的产生,但 IL-1 β 能显著增强 IL-6 诱导 VSMCs 产生 CRP(见图 3)。

表 1 各组 VSMCs 和肝细胞 CRP mRNA 表达量

组别	VSMCs	肝细胞
对照组	1	1
IL-6 组	3.50 \pm 1.17 ⁽¹⁾⁽²⁾	4.60 \pm 1.80 ⁽¹⁾⁽²⁾
IL-1 β 组	1.20 \pm 0.90 ⁽²⁾	2.30 \pm 1.10 ⁽¹⁾⁽²⁾
IL-6 + IL-1 β 组	5.92 \pm 1.30 ⁽¹⁾	8.70 \pm 2.70 ⁽¹⁾

注:细胞 CRP mRNA 的表达量用基础 CRP mRNA 的倍数表示。基础 CRP mRNA 水平(与内参 β -actin mRNA 的比值)是细胞未被炎症细胞因子刺激时 CRP mRNA 的表达水平。与对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与 IL-6 + IL-1 β 组比较,⁽²⁾ $P < 0.05$ 。



注:泳道 1 为未用细胞因子刺激 VSMCs;2 为 IL-6 刺激 VSMCs;3 为 IL-1 β 刺激 VSMCs;4 为 IL-6 + IL-1 β 刺激 VSMCs。

图 3 VSMCs 产生 CPR 的 Western blot 结果

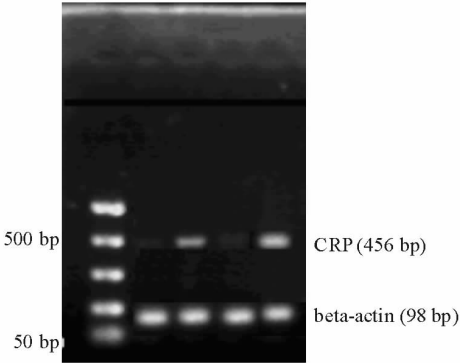
3 讨论

本研究发现,炎症细胞因子 IL-6 能刺激原代培养的兔腹主动脉 VSMCs 产生 CRP,单独用 IL-1 β 不能刺激 VSMCs 产生 CRP,但 IL-1 β 能显著增强 IL-6 诱导 CRP 的产生。

常见的心血管病都与慢性炎症密切相关,研究表明这些患者的血清和血管壁组织中 IL-6 和 IL-1 β 等炎症细胞因子以及 CRP 水平都显著增高^[16-18]。然而,对于上述患者高水平 hsCRP 的来源目前还存在很大的争议,hsCRP 究竟是来源于肝脏分泌还是病变血管本身产生。很多肝外组织细胞均可产生 CRP,并且肝外组织产生的 CRP 与血清 hsCRP 水平升高密切相关。2003 年 Jabs 等^[19]采用实时 PCR 和免疫组化技术研究发现,肾小管上皮细胞在条件培养基或 IL-6 的刺激下能表达 CRP mRNA 和蛋白。动脉粥样硬化的血管损伤部位、动脉瘤组织和病变的冠状动脉静脉移植物均能产生 CRP^[20-22]。我们对兔腹主动脉瘤模型的研究发现,手术应激急性期迅速增高的血清 CPR 主要来源于肝脏。急性期后,随着动脉瘤体的扩张,肝脏几乎不合成 CRP,而此时血清 hsCRP 水平逐渐升高,动脉瘤平滑肌 CRP mRNA 和蛋白的表达亦逐渐增高,进一步证实了动脉瘤组织确实能表达 CRP^[11]。

目前有关调节 CRP 合成的机制主要来源于对肝细胞珠的研究,共同的结论是:CRP 合成主要在肝脏,IL-6 是 CRP 基因的基本诱导因子,而 IL-1 β 能与 IL-6 协同作用,以增强 IL-6 的功能^[12, 13]。信号转导和转录激活因子 3 (STAT-3)、核因子- κ B (NF- κ B)和 C/增强子结合蛋白(C/EBP)家族均参与了细胞因子诱导的 CRP 基因的转录激活^[12, 13, 23]。目前,对肝外组织产生 CRP 的机制还不明确。我们通过牵拉离体的兔子腹主动、人内乳动脉和大隐静脉的 VSMCs 研究证实,在没有炎症

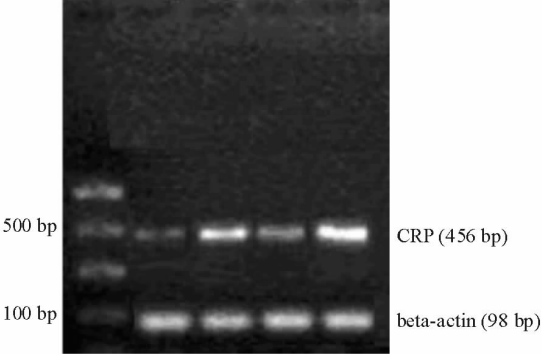
1 2 3 4 5



注:泳道 1 为 DNA marker;2 为未用细胞因子刺激 VSMCs;3 为 IL-6 刺激 VSMCs;4 为 IL-1 β 刺激 VSMCs;5 为 IL-6 + IL-1 β 刺激 VSMCs。

图 1 炎症细胞因子诱导体外培养的兔腹主动脉 VSMCs 表达 CPR mRNA

1 2 3 4 5



注:泳道 1 为 DNA marker;2 为未用细胞因子刺激 VSMCs;3 为 IL-6 刺激 VSMCs;4 为 IL-1 β 刺激 VSMCs;5 为 IL-6 + IL-1 β 刺激 VSMCs。

图 2 炎症细胞因子诱导体外培养的兔肝细胞表达 CPR mRNA

刺激条件下增高的机械张力能诱导 VSMCs 表达 CRP,机械张力能激活牵张激活离子通道,进而活化 NF- κ B 信号通路,在转录水平上调节 CRP 的表达^[11, 24]。本研究发现,IL-6 单独或联合 IL-1 β 确实能显著刺激 VSMCs 表达 CRP。

本研究所用 IL-6 的工作浓度达 10 ng/ml,是心脑血管疾病患者血清 IL-6 水平的 2000 多倍^[25]。我们在预实验中发现,IL-6<10 ng/ml 时难以诱导培养细胞表达 CRP。体内 VSMCs 所处的环境很复杂,因此,心脑血管疾病患者体内 VSMCs 表达 CRP 是否也是由 IL-6 诱导,或是由机械张力等其它刺激因子诱导的,还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Scirica BM, Morrow DA. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The Verdict Is Still Out [J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2128-2134.
- [2] Lusic I, Radonic V, Pavelin S, et al. Is C-reactive protein a better predictor of recurrent carotid disease following carotid endarterectomy than established risk factors for atherosclerosis? [J]. *Vasa*, 2006, 35(4): 221-225.
- [3] Duygu H, Zoghi M, Nalbantgil S, et al. High-sensitivity C-reactive protein may be an indicator of the development of atherosclerosis in myocardial bridging [J]. *Int J Cardiol*, 2008, 124(2): 267-270.
- [4] Amer MS, Elawam AE, Khater MS, et al. Association of high-sensitivity C-reactive protein with carotid artery intima-media thickness in hypertensive older adults[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2011, 5(5):395-400.
- [5] Wilson AM, Swan JD, Ding H, et al. Widespread vascular production of C-reactive protein (CRP) and a relationship between serum CRP, plaque CRP and intimal hypertrophy [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191 (1): 175-181.
- [6] Stumpf C, Hilgers KF. C-reactive protein: more than just a marker of inflammation? [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(9): 1748-1749.
- [7] 黄根牙, 顾新元, 唐利龙. C 反应蛋白致动脉粥样硬化的作用[J]. *国际心血管病杂志*, 2008, 35(6): 363-366.
- [8] Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein and atherothrombosis[J]. *J Periodontol*, 2008, 79(8 Suppl): 1544-1551.
- [9] Boonbaichaiyapruk S, Cheepudomwit S, Panjavenin P, et al. Effect of atorvastatin on LDL & hs-CRP in a selected Thai population[J]. *J Med Assoc Thai*, 2008, 91(8): 1189-1195.
- [10] Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, et al. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2006, 440(7088): 1217-1221.
- [11] Huang G, Wang A, Li X, et al. Change in high-sensitive C-reactive protein during abdominal aortic aneurysm formation [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(9): 1829-1837.
- [12] Kramer F, Torzewski J, Kamenz J, et al. Interleukin-1 β stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NF κ B- and C/EBP β -dependent autocrine interleukin-6 loop [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(9): 2678-2689.
- [13] Nishikawa T, Hagihara K, Serada S, et al. Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyte NF-1 α is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression[J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3492-3501.
- [14] 杨 征, 邱 敏, 吴 芹, 等. 家兔动脉血管平滑肌细胞培养方法的改进[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(5): 696-699.
- [15] 罗 文, 周晓东, 巩萧音, 等. 乳兔和成年兔肝细胞体外分离及培养的比较研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(12): 1427-1430.
- [16] Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(4): 649-659.
- [17] Hansson GK. Atherosclerosis—an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1): 2-10.
- [18] Lindeman JH, Abdul-Hussien H, Schaapherder AF, et al. Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114(11): 687-697.
- [19] Jabs WJ, Lögering BA, Gerke P, et al. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(1): 152-161.
- [20] Krupinski J, Turu MM, Martinez-Gonzalez J, et al. Endogenous expression of C-reactive protein is increased in active (ulcerated noncomplicated) human carotid artery plaques[J]. *Stroke*, 2006, 37(5): 1200-1204.
- [21] Vainas T, Lubbers T, Stassen FR, et al. Serum C-reactive protein level is associated with abdominal aortic aneurysm size and may be produced by aneurysmal tissue [J]. *Circulation*, 2003, 107(8): 1103-1105.
- [22] Jabs WJ, Theissing E, Nitschke M, et al. Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue [J]. *Circulation*, 2003, 108(12): 1428-1431.
- [23] Young DP, Kushner I, Samols D. Binding of C/EBP β to the C-reactive protein (CRP) promoter in Hep3B cells is associated with transcription of CRP mRNA[J]. *J Immunol*, 2008, 181(4): 2420-2427.
- [24] Huang G, Luo C, Gu X, et al. Mechanical strain induces expression of C-reactive protein in human blood vessels[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(1): 206-211.
- [25] Nishida H, Horio T, Suzuki Y, et al. Interleukin-6 as an independent predictor of future cardiovascular events in high-risk Japanese patients: Comparison with C-reactive protein [J]. *Cytokine*, 2011, 53(3): 342-346.

(收稿:2011-06-07 修回:2011-07-27)

(本文编辑:丁媛媛)