

高血脂小鼠 Th1/Th2 细胞因子的检测及相关性分析

阎国辉¹, 张 洋², 智 光¹, 苏玉虹², 李 会³, 佟 伟³, 潘兴瑜⁴

(1. 中国人民解放军总医院心内科, 北京市 100853; 辽宁医学院 2. 辽宁省重点实验室,
3. 免疫学教研室, 辽宁省锦州市 121001; 4. 中国医科大学免疫学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 高脂血症; Th1/Th2 细胞因子; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子 α ; 干扰素 γ ; 小鼠

[摘要] 目的 建立高脂血症动物模型, 探讨高脂血症相关免疫损伤和炎症反应机制。方法 将 40 只 BALB/C 小鼠随机分成高脂组和对照组, 观察脂质代谢变化, 同时采用流式细胞微球芯片捕获技术检测 Th1/Th2 细胞因子变化。结果 高脂组血清中白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 5、肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 水平分别为 3.75 ± 0.07 、 6.16 ± 0.55 、 18.70 ± 4.61 、 57.97 ± 6.57 及 6.17 ± 0.76 ng/L。与对照组比较, 高脂组总胆固醇、甘油三酯、白细胞介素 5 和肿瘤坏死因子 α 水平明显升高 ($P < 0.01$), 而干扰素 γ 、白细胞介素 2 和白细胞介素 4 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 白细胞介素 5 与肿瘤坏死因子 α 呈正相关 ($r = 0.79, P < 0.05$)。结论 免疫损伤、炎症反应机制在高血脂动脉硬化发病机制中具有重要作用, 并和高血脂协同致病。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Detection and Analysis of 5 Kinds of Th1/Th2 Cytokines in Hyperlipidemia Mice Model

YAN Guo-Hui¹, ZHANG Yang², ZHI Guang¹, SU Yu-Hong², LI Hui³, TONG Wei³, and PAN Xing-Yu⁴

(1. Department of Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853; 2. The Key Laboratory of Liaoning, 3. Department of Immunology, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001; 4. Department of Immunology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Hyperlipidemia; Th1/Th2 Cytokines; Interleukin; Tumour-Necrosis Factor- α ; Interferon γ ; Mouse

[ABSTRACT] Aim To establish a hyperlipidemia animal model and to study the immunologic injury and inflammatory mechanisms in the pathogenesis of hyperlipidemia. Methods 40 BALB/C mice were randomly divided into the hyperlipidemia group and normal control group. Hyperlipidemia group were fed with high-cholesterol diet (HCD); Control group were fed with normal diet. The changes of lipid metabolism and 5 kinds of Th1/Th2 cytokines were observed in two groups. Results

Interleukin 2 (IL-2), IL-4, IL-5, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and Interferon γ (IFN- γ) were 3.75 ± 0.07 , 6.16 ± 0.55 , 18.70 ± 4.61 , 57.97 ± 6.57 and 6.17 ± 0.76 ng/L in hyperlipidemia group. Compared with control group, the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), IL-5 and TNF- α were significantly higher in hyperlipidemia group ($P < 0.01$). But no difference was noted in the levels of IFN- γ , IL-2 and IL-4 ($P > 0.05$). And there was obviously positive correlation between IL-5 and TNF- α ($r = 0.79, P < 0.05$). Conclusion Immunologic injury and inflammatory mechanisms played an important role in the occurrence and development of hyperlipidemia and atherosclerosis.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是由多种因素和作用环节介导的慢性病理变化过程^[1,2], 国内外大量研究资料已证明, 高脂血症特别是高胆固醇血症是 As 和心脑血管病的重要危险因素之一。近年来, 不少文献报道高脂血症 As 的发生与免疫有关^[3], 本研究采用流式细胞微球芯片捕获技术 (cytometric bead array, CBA) 同时检测高血脂小鼠血清中 5 种 Th1/Th2 细胞因子变化, 分析 Th1/Th2 细胞因子变化特点及与脂质的相关性, 对了解高脂血症发生发展的机制及提出有效的防治措施有重要价值。

[收稿日期] 2006-08-31

[修回日期] 2007-02-20

[作者简介] 阎国辉, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病的诊断与治疗, E-mail 为 guohuiyan77@yahoo.com.cn。通讯作者智光, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的诊断与治疗, E-mail 为 zhiguang1950@yahoo.com.cn。张洋, 硕士研究生, 研究方向为遗传分子生物学与快速免疫诊断技术, E-mail 为 zhanghaihai19731017@sina.com。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Kit (Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit) (批号为 34387, BD 公司); 胆固醇 (批号为 01408, 沈阳市医药公司); 脱氧胆酸钠 (批号为 20020314, 北京奥博生物技术有限公司); 猪油; 丙基硫氧嘧啶片 (批号为 050204, 上海复晖药业有限公司); 酶法总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒 (由锦州医学院附属第一医院提供)。

1.2 实验动物

BALB/C 小鼠, 清洁级, 40 只, 雌雄各半, 体重 20 ± 2 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。

1.3 主要仪器和软件

流式细胞仪 (型号 FACSCalibur, 美国 BD 公司),

及其 CellQuest、BD CBA 数据分析软件;全自动生化仪(型号 RX2000,美国 TECHNICON 公司)。

1.4 动物模型制备及分组

动物饲养 1 周后随机分为高脂组和对照组,每组 20 只,每日给对照组饲以普通饲料,高脂组饲以高脂饲料(2% 胆固醇、10% 猪油、0.2% 丙基硫氧嘧啶片、0.5% 脱氧胆酸钠、87.3% 基础饲料)。饲养 30 天后,两组小鼠禁食(不禁水) 12 h,断头取血,室温凝固 4 h,离心 1 500 g × 15 min,收集上清,待测或-80℃保存。

1.5 脂质含量检测

以全自动生化仪采用直接测定法检测血清中 TC 和 TG 含量。

1.6 细胞因子检测

仪器调整:首先使用 BD CaliBRITE Beads 试剂通过 BD FASComp 软件设定仪器基本参数,再使用 BD CBA 试剂盒中的 Cytometer Setup Beads 设定本实验特定参数(设门、调节电压、补偿)。

④绘制标准曲线:使用 BD CBA 试剂盒中的细胞因子标准品按照梯度法稀释为 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 九个浓度再加上空白对照管,上机检测,并用 BD CBA 软件绘制各个细胞因子标准曲线图。

④制备样品及分析:取冻存血清 37℃水浴孵育,吸取 50 μL 置于待检管,同时加入 50 μL 捕获微球(为六种捕获微球混合产物),50 μL PE 标记的检测抗体,室温避光孵育 2 h,加入 1 mL 洗液,200 g 离心 5 min,洗 2 次,加入 300 μL 洗液,上机检测,使用 BD CellQuest 软件获取数据(图 1),用 BD CBA 软件进行数据分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1. 高脂组与对照组 Th1/Th2 细胞因子水平 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组 别	<i>n</i>	Th1			Th2	
		干扰素 γ	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-5
对照组	20	5.53 \pm 6.17	34.80 \pm 6.78	4.05 \pm 0.07	6.48 \pm 0.13	12.67 \pm 3.02
高脂组	20	6.17 \pm 0.76	57.97 \pm 6.57 ^a	3.75 \pm 0.07	6.16 \pm 0.55	18.70 \pm 4.61 ^a

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较。

2.2.3 Th1/Th2 细胞因子线性相关性分析 将 40 例作为整体进行 5 种 Th1/Th2 细胞因子相关性分析,结果发现 IL-5 与 TNF- α 呈显著正相关($r = 0.79$, $P < 0.05$)。

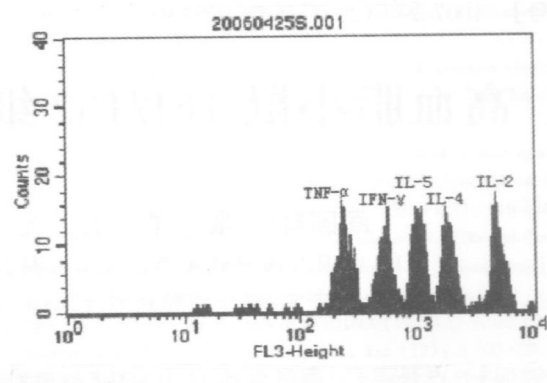


图 1. 血清中 Th1/Th2 细胞因子数据获取图

2 结果

2.1 两组血脂水平比较

高脂组 TG、TC 水平和对照组比较明显升高(0.99 \pm 0.10 mmol/L 比 0.69 \pm 0.03 mmol/L、2.84 \pm 0.17 mmol/L 比 2.11 \pm 0.07 mmol/L),尤其 TC 升高更显著($P < 0.01$)。表明以高脂饲料饲养小鼠 30 天能够成功提供高血脂模型,为进一步研究高血脂引发的 As 等心血管疾病研究提供可靠动物模型。

2.2 两组 Th1/Th2 细胞因子水平比较

2.2.1 绘制标准曲线 标准品终浓度分别为 5 000、2 500、1 250、625、312.5、156、80、40、20 和 0 ng/L 共 10 个点,应用 BD 公司 CBA 软件绘制白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)、IL-4、IL-5、肿瘤坏死因子 α (tumour-necrosis factor- α , TNF- α) 和干扰素 γ (interferon γ , INF- γ) 标准曲线并计算 Logistic 回归方程,结果发现曲线拟合适配度(R Square)均在 95% 以上(图 2)。

2.2.2 两组 Th1/Th2 细胞因子测定结果 IL-5 和 TNF- α 水平高脂组明显高于对照组($P < 0.01$),而干扰素 γ 、IL-2 和 IL-4 水平与对照组差异无显著性($P > 0.05$,表 1)。

3 讨论

细胞因子在调节机体抵抗外源性 & 内源性抗原时起重要作用,能调节多种细胞产生生理效应,在异

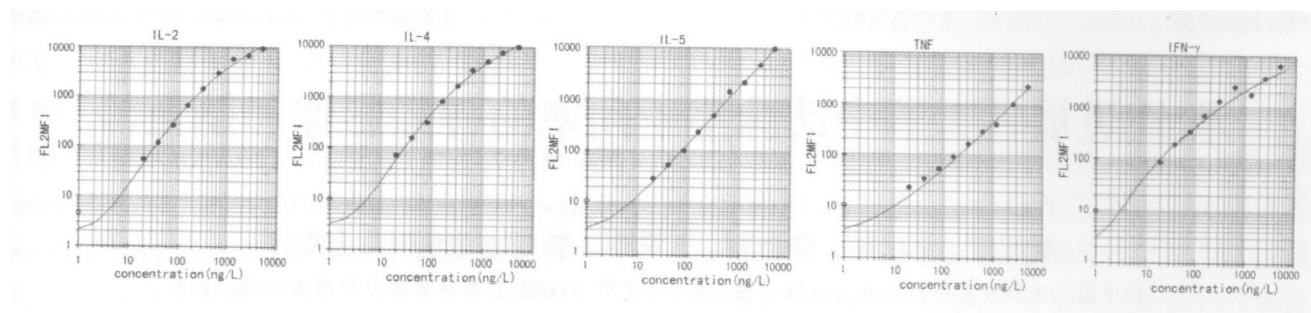


图 2. Th1/Th2 细胞因子标准曲线图

常情况下也可导致病理反应。检测细胞因子的技术大致可分为三类:生物活性检测法、免疫学细胞因子直接定量法和分子杂交检测法。但因分子杂交检测法及生物活性检测法所要求的实验室条件较高,目前多数医院采用的是免疫学细胞因子直接定量法,该方法每次检测一种细胞因子,操作简单、经济,但因细胞因子之间具有协同或抑制作用,即细胞因子之间具有网络关系,检测单一细胞因子不能阐释免疫动态演变关系,若同时检测多种细胞因子,则使用标本较多,需多次重复操作。且各种细胞因子之间标准品的产地、生产日期不同,因此对于多参数的免疫机制研究会产生偏倚。运用流式细胞仪 CBA 方法可以解决这一问题^[4]。

目前,根据所产生的细胞因子的功能不同,辅助性 T 淋巴细胞(Th)可分为 Th1 和 Th2 细胞。Th1 细胞产生 IL-2、干扰素 γ 和 TNF- α 等细胞因子,主要介导细胞免疫应答。Th2 细胞产生 IL-4、IL-6 和 IL-10 等,主要功能为促进 B 细胞发育和介导体液免疫应答。一般认为, Th1 细胞免疫应答增强宿主对感染的免疫性和防御功能;而 Th2 细胞应答则与感染的进展、持续性和慢性化有关,对感染有负性调节作用。传统观念认为由高血脂引起的 As 是一种脂质沉积性疾病,但近年来,不少文献报道高脂血症及其引起的 As 的发生与免疫有关^[2]。虽然炎症在其中的作用机制并不十分清楚^[5],但有研究发现,高脂血症损伤血管内皮细胞,引起内皮细胞剥离、巨噬细胞浸润、内膜平滑肌细胞增殖,同时增强白细胞活化能力和细胞表面粘附分子表达率,导致分泌细胞因子和白细胞与血管内皮细胞粘附力增加^[6-8]。又有研究者在对低密度脂蛋白氧化过程的研究中发现了许多抗氧化的新抗原,他们大多数与 IL-5 有关,其中 Th1/Th2 在抑制高脂 As 的氧化过程中起重要作用^[8,9]。在此基础上本研究发现,高脂组小鼠较对照组血清中 IL-5、TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$),而

IL-2、IL-4 和干扰素 γ 水平差异无显著性($P > 0.05$),说明 IL-5 和 TNF- α 与高脂血症的发生、发展有较密切的关系,提示高脂血症存在免疫功能紊乱;同时 IL-5、TNF- α 二者呈显著正相关($r = 0.79$, $P < 0.05$),说明二者之间可能与其他一些细胞因子间相互作用,互相调节,共同参与高脂血症的发病过程。可见,深入研究、探讨 IL-5 和 TNF- α 在高脂血症发病过程中的作用,有利于从细胞免疫学角度了解高脂 As 的发病机制及病理变化,提示我们通过调节高脂血症患者机体免疫功能可能达到延缓高脂 As 进展和防治心血管疾病的目的。

本研究使用流式细胞仪对细胞因子网络的了解有助于对疾病的免疫机制进行深入研究,精确性高、可重复性好,具有其它实验方法无法比拟的精确度和灵敏度,有科研及临床推广价值。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362** (6423): 801-809.
- [2] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **349** (2): 115-126.
- [3] 张红霞, 刘剑刚, 马鲁波, 史大卓. 高脂血症模型型白细胞粘附活化和白细胞介素 2、6 和 8 的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 99-102.
- [4] 张永宏, 闫惠平, 吴昊, 檀玉芬, 温韬, 陈新月. 应用 CBA 方法检测一例 SARS 患者血清 Th1/Th2 类细胞因子[J]. *中国免疫学杂志*, 2004, **20** (11): 775-776.
- [5] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, **352** (16): 1 685-695.
- [6] Blann AD, Seigneur M, Steiner M, Miller JP, McCollum CN. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral artery disease and hypercholesterolaemia: relationship to the location of atherosclerotic disease, smoking, and in the prediction of adverse events [J]. *Thromb Haemost*, 1998, **79** (6): 1 080-085.
- [7] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (4): 281-291.
- [8] Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2004, **114** (3): 427-437.
- [9] Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH, Lichtman AH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (5): 1 596-601.

(此文编辑 许雪梅)