

急性心肌梗死患者血清 IL-18 升高参与斑块破裂的机制

舒晓蓉, 谢双伦, 林永青, 陈煜阳, 王景峰, 聂如琼

(中山大学孙逸仙纪念医院心内科 广东省心电生理和心律失常重点实验室, 广东省广州市 510120)

[关键词] 白细胞介素 18; 急性心肌梗死; 斑块破裂; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子

[摘要] **目的** 观察急性心肌梗死患者血清白细胞介素 18(IL-18)的水平,探讨其导致动脉粥样斑块破裂的可能机制。**方法** 采用 ELISA 分别检测急性心肌梗死组($n=20$)、稳定型心绞痛组($n=20$)和正常对照组($n=20$)中血清 IL-18 和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)水平,用流式细胞术检测各组外周血单核细胞表面细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)的表达;在体外,分别通过实时定量聚合酶链反应和蛋白印迹法检测 IL-18 对人外周血单核细胞 EMMPRIN mRNA 和蛋白表达的影响。**结果** 急性心肌梗死组血清 IL-18、MMP-9 水平和外周血单核细胞表达的 EMMPRIN 均明显高于稳定型心绞痛组和正常对照组,且急性心肌梗死组患者血清 IL-18 水平与外周血单核细胞表达的 EMMPRIN 呈正相关($r^2=0.57, P<0.001$)。在体外,IL-18 能刺激外周血单核细胞 EMMPRIN 表达上调($P<0.05$)。**结论** IL-18 能够上调单核细胞 EMMPRIN 的表达,可能通过这一机制刺激 MMP-9 分泌,降低动脉粥样硬化斑块的稳定性,引起斑块破裂。

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

Increasing Level of Serum IL-18 in Patients with Acute Myocardial Infarction Participates in the Mechanism of Plaque Rupture

SHU Xiao-Rong, XIE Shuang-Lun, LIN Yong-Qing, CHEN Yu-Yang, WANG Jing-Feng, and NIE Ru-Qiong
(Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University & Key Laboratory of Electrophysiology and Arrhythmia of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

[KEY WORDS] Interleukin-18; Acute Myocardial Infarction; Plaque Rupture; Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of serum interleukin-18 (IL-18) in human acute myocardial infarction and its possible mechanism in the process of plaque rupture. **Methods** Serum levels of IL-18 and MMP-9 proteins were determined using commercially available enzyme-linked immunoassays in each group: acute myocardial infarction (AMI) group, stable angina pectoris (SAP) group and healthy control group ($n=20$, respectively). Flow cytometry was applied to assess extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression on the surface of monocytes of each group. In vitro experiment, quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR) and Western blot were performed to compare EMMPRIN expression of monocytes cultured in presence and absence of IL-18. **Results** In patients with AMI, serum level of IL-18 and MMP-9 and expression of EMMPRIN on monocytes markedly increased compared with patients with SAP and healthy control group. Furthermore, increased level of IL-18 was positively associated with elevated expression of EMMPRIN on monocytes in AMI group ($r^2=0.57, P<0.001$). The data proved that expression of EMMPRIN was enhanced in monocytes cultured in presence of IL-18 ($P<0.05$). **Conclusion** IL-18 stimulates monocytes to express EMMPRIN, which may induce secretion of MMP-9, contributing to atherosclerotic plaque instability and rupture.

斑块内炎症细胞聚集,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMP)分泌增加,降解斑块纤维帽的细胞外基质,导致斑块破裂,是急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)发生的关键性环

节^[1]。IL-18 是一种促炎因子,能刺激各种细胞因子分泌,调节炎症级联反应,参与斑块的形成与发展。IL-18 在斑块中表达增加,会导致斑块不稳定或破裂^[2,3]。研究表明,细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer,EMM-PRIN)能够刺激单核细胞和平滑肌细胞分泌 MMP^[2,4],也参与斑块的形成、进展和血栓形成过程^[5]。IL-18 和 EMMPRIN 都与动脉粥样硬化斑块之间有密切联系,且已有研究证实 IL-18 能够促进血管平滑肌细胞和心肌细胞分泌 EMMPRIN^[6,7],但两者之间是如何调节斑块破裂的过程目前尚不清楚。本研究旨在探讨 IL-18 是否通过调节 EMMPRIN 表达,刺激 MMP 分泌,从而导致斑块破裂,引起 AMI。

1 对象和方法

1.1 研究对象

连续入选 2012 年 10 月至 2013 年 10 月在中山大学孙逸仙纪念医院心内科住院的患者,AMI 患者和稳定型心绞痛(stable angina pectoris,SAP)患者各 20 例。入选标准:①AMI 组:持续胸痛的病史,心电图示 ST 段抬高,cTnT≥0.5 ng/L;②SAP 组:造影明确有冠状动脉病变的 SAP 患者;正常对照组为 20 名体检结果正常的健康医院职工。AMI 患者于入院后支架植入前采集全血标本,所有 AMI 患者都接受经皮冠状动脉介入(PCI)治疗,植入金属裸支架。血管重建成功的依据是:支架植入后冠状动脉造影显示 TIMI 血流Ⅲ级。排除标准:急/慢性炎症性疾病、免疫性疾病、肝肾功能不全、现患肿瘤或有肿瘤病史。两组患者的一般资料、临床生化指标和用药情况展示于表 1 中。本项研究通过了中山大学伦理委员会的批准,告知每个受试对象并得到其同意。

1.2 ELISA 检测血清 IL-18 和 MMP-9 水平

采集患者空腹静脉血,3000 r/min 离心 20 min 后取上层血清,-80℃保存直至检测。使用市售的 ELISA 试剂盒检测血清 IL-18 和 MMP-9 水平(R&D Systems,France)。IL-18 试剂盒产品批内变异系数<10%,批间变异系数<10%,检测下限为 12.5 ng/L。MMP-9 试剂盒产品批内变异系数<7%,批间变异系数<9%,检测下限为 0.005 μg/L。

1.3 流式细胞技术检测外周血单核细胞表面 EMM-PRIN 的表达

裂解红细胞后(红细胞裂解液,BioLegend,US),在外周血单个核细胞中加入 FITC 标记的 EMMPRIN 单克隆抗体(BD Pharmingen,USA)和

PerCP 标记的 CD14 单克隆抗体(Becton-Dickinson,USA),小鼠 IgG 作为同型对照以抵消非特异性荧光。借助 FACS Calibur 流式细胞仪(Becton-Dickinson,USA)进行细胞分选,特异性选择 CD14⁺并表达 EMMPRIN 的细胞,收集数据后用 Cell Quest 软件(Becton-Dickinson,USA)进行数据处理。

表 1. AMI 组和 SAP 组基本临床资料比较
Table 1. Comparison of basic clinical data in AMI group and SAP group

项 目	AMI 组(n=20)	SAP 组(n=20)	P 值
年龄(岁)	60.69±9.87	58.89±11.73	0.41
男性(例)	16(80.00%)	17(85.00%)	0.68
糖尿病(例)	11(55.00%)	8(40.00%)	0.34
高血压(例)	13(65.00%)	12(60.00%)	0.74
吸烟(例)	11(57.89%)	12(54.69%)	0.75
疼痛发作与采血 间隔时间(h)	5.2±7.9	-	
CK-MB 峰值(U/L)	360±120	-	
cTnT(ng/L)	3.58±1.43	-	
总胆固醇(mmol/L)	5.67±0.63	5.40±1.28	0.38
甘油三酯(mmol/L)	1.94±0.73	2.20±0.62	0.49
LDLC(mmol/L)	3.79±0.68	3.51±1.47	0.32
HDLC(mmol/L)	1.05±0.19	1.09±0.33	0.78
hs-CRP(μg/mL)	11.59±20.36	5.71±9.69	0.29
空腹血糖(mmol/L)	6.23±1.98	5.87±1.45	0.27
肌酐(μmol/L)	123.32±20.39	119.20±28.47	0.42
服药情况(例)			
ACEI	7	9	0.52
AT1 受体拮抗剂	4	5	0.71
硝酸酯	2	13	<0.001
阿司匹林	12	16	0.67
β受体阻滞剂	4	14	0.001
利尿剂	4	5	0.71
钙离子拮抗剂	1	4	0.15
降脂药	12	10	0.53

1.4 人外周血单核细胞的分离与培养

取正常人新鲜全血 20 mL,肝素抗凝,以 2000 r/min 离心 20 min,弃上层血浆,获得下层沉淀细胞约 10 mL。往沉淀细胞中加入 PBS 液,体积比为 1:1,混匀制成细胞悬液。另取一离心管,加入 LTS1077 淋巴细胞分层液(Sigma,US),用毛细吸管将细胞悬液小心而缓慢地加于其上,使稀释血液重叠于分层液上,细胞悬液与淋巴细胞分层液体积为 1:1。2000 r/min 离心 20 min 后,取中间白膜层。收集到的人外周血单核细胞用 RPMI 1640(含 10% 胎牛血清)培养基(Lonza,US),于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养。实验分为 6 组:空白对照组、IL-18 组、对照 IgG 组、对照 IgG + IL-18 组、IL-18 中和抗体组及 IL-18 + IL-18 中和抗体组。IL-18 刺激浓度为 10

μg/L,作用 24 h,实验重复 3 次。

1.5 实时定量聚合酶链反应检测单核细胞 EMM-PRIN mRNA 的表达

实时定量聚合酶链反应(QRT-PCR)按照试剂盒制造商给出的标准方法进行。用 Trizol 提取液提取人外周血单核细胞的全部 RNA。通过随机引物法,在逆转录酶催化下将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。EMMPRIN 基因作为靶基因,引物序列为:正向引物 5'-ACA TCC ACG CCA CCT ACC A-3',反向引物 5'-TGG AGC CAA GGT CTT CTA CG-3'。采用 20 μL 反应体系:2 μL 1:10 稀释的 cDNA,正向和反向引物各 2 μL,10 μL LightCycler 480 Green I Master (Roche) 和 4 μL 双蒸水。β-actin 的平行扩增作为参照,标准曲线由连续稀释的标准模板构建,实验重复 3 次,借助 LightCycler 480 分析软件分析原始数据。

1.6 蛋白印迹法检测单核细胞 EMMPRIN 蛋白的表达

收集并裂解培养的各组人外周血单核细胞,提取细胞中的全部蛋白质。采用 BCA 蛋白测定法测定蛋白质浓度。上样时,保证每个泳道的裂解液蛋白质含量一致,将裂解液与 5×SDS 样品缓冲液混合,煮沸 5 min,用 10%~15% SDS-PAGE 分离。转膜结束后 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。孵适当浓度一抗,置于摇床上 4℃ 过夜。次日用 TBST 清洗多余一抗,室温下孵二抗 1 h。TBST 清洗完多余二抗,最后借助化学发光试剂盒和照相胶片令条带显影,实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,正态资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Image J 图像处理软件对蛋白印迹条带进行灰度分析。多组数据分析用方差分析(ANOVA),并通过 LSD-t 法进行两两比较。用简单线性回归分析单核细胞胞膜 EMMPRIN 的表达和 IL-18 水平的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-18 和 MMP-9 水平比较

AMI 组 IL-18 和 MMP-9 水平(分别为 274.34 ± 87.13 ng/L 和 108.19 ± 29.05 μg/L)明显高于 SAP 组(分别为 207.86 ± 43.48 ng/L 和 46.72 ± 17.89 μg/L)和正常对照组(分别为 162.39 ± 69.64 ng/L 和 36.55 ± 19.31 μg/L; $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$;图 1)。

2.2 人外周血单核细胞 EMMPRIN 的表达

AMI 组单核细胞 EMMPRIN 的表达明显高于 SAP 组和正常对照组($P < 0.05$;图 2)。

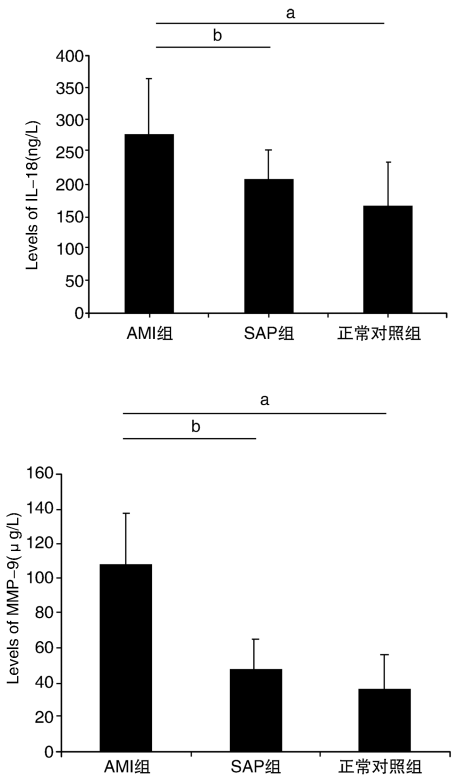


图 1. AMI 组、SAP 组和正常对照组血清 IL-18 与 MMP-9 水平 ($n = 20$) a 为 $P < 0.001$,与正常对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与 SAP 组相比。

Figure 1. Levels of IL-18 and MMP-9 in AMI, SAP, and control group ($n = 20$)

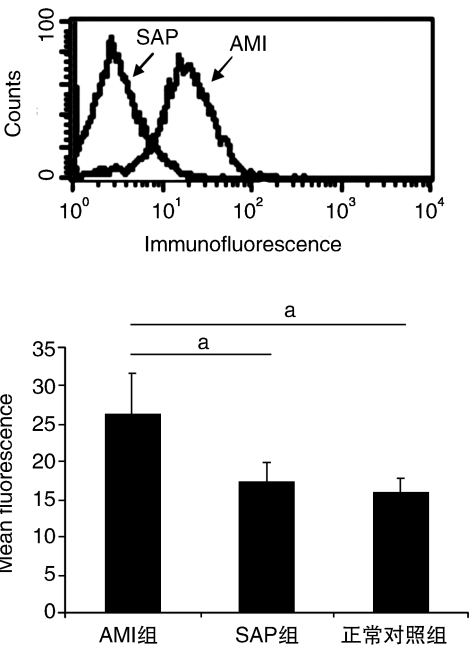


图 2. 各组单核细胞 EMMPRIN 的表达 ($n = 20$) a 为 $P < 0.05$,与 SAP 组或正常对照组相比。

Figure 2. EMMPRIN expression on monocytes in AMI, SAP and healthy control group ($n = 20$)

2.3 AMI 患者外周血单核细胞 EMMPRIN 的表达与血清 IL-18 水平的关系

通过简单线性回归分析发现,AMI 患者外周血单核细胞 EMMPRIN 的表达与血清 IL-18 水平呈正相关($r^2 = 0.57, P < 0.001$;图 3)。

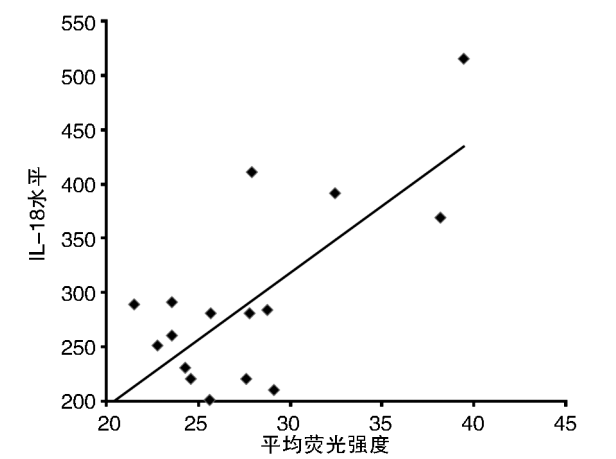


图 3. AMI 患者单核细胞 EMMPRIN 的表达与血清 IL-18 水平的线性回归分析

Figure 3. Linear regression analysis of serum IL-18 levels and EMMPRIN surface expression on monocytes in AMI patients

2.4 IL-18 诱导单核细胞表达 EMMPRIN

与空白对照组相比,对照 IgG 组、IL-18 抗体组和 IL-18 + IL-18 抗体组 EMMPRIN 的表达差异均无统计学意义,而 IL-18 组和对照 IgG + IL-18 组 EMMPRIN 的表达明显高于空白对照组($P < 0.05$)。证明单核细胞在 IL-18 刺激下,EMMPRIIN 的表达明显上调,而这种效应能明显被 IL-18 单克隆抗体拮抗(图 4)。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块破裂是导致 AMI 的主要原因。MMP 在调节细胞外基质降解和合成的平衡中发挥着重要的作用,其异常表达可能影响到斑块稳定性或会加速斑块破裂^[8]。动脉粥样硬化是血管的慢性炎症,免疫系统在这一过程中担当重要角色^[9]。IL-18 具有调节炎症反应和促动脉粥样硬化的作用,它通过诱导多种促炎因子、趋化因子以及黏附分子等调节炎症级联反应,对动脉粥样硬化的发生发展起着重要的推动作用^[10]。有研究发现,IL-18 在动脉粥样硬化斑块中高表达,IL-18 受体在斑块中的巨噬细胞和内皮细胞中也表达上调,增加

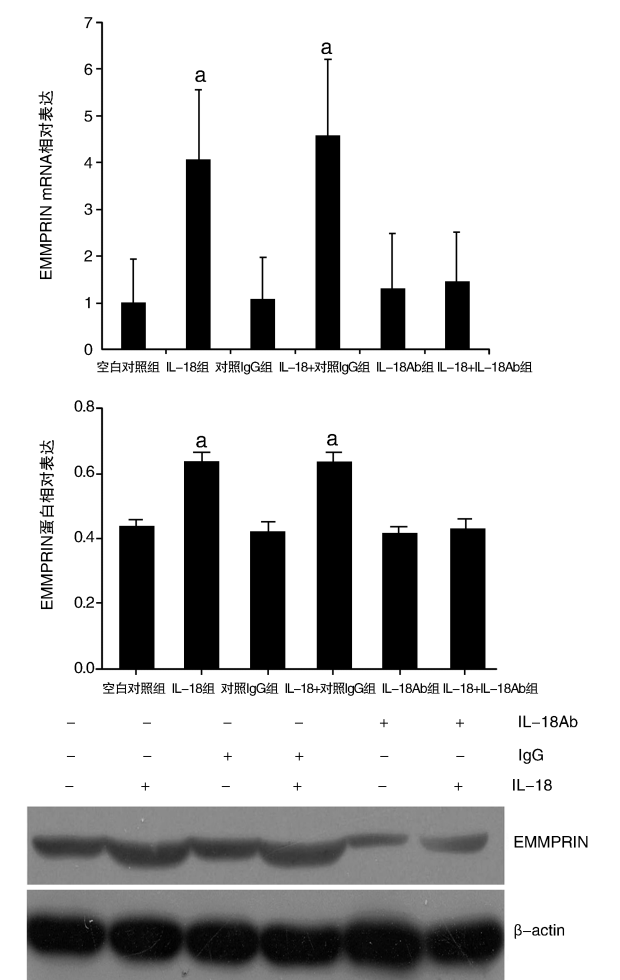


图 4. IL-18 诱导单核细胞分泌 EMMPRIN($n = 3$) a 为 $P < 0.05$,与空白对照组相比。

Figure 4. IL-18 induce EMMPRIN expression in monocytes ($n = 3$)

了斑块的不稳定性,导致急性缺血综合症的发生^[2]。近期发生心肌梗死的患者血清 IL-18 水平和 IL-18/IL-18 结合蛋白(IL-18 中和抗体)比值均明显高于对照组,提示心肌梗死时 IL-18 活性异常增强^[11]。本研究发现,AMI 患者血清 IL-18 和 MMP-9 的水平明显高于正常对照组和 SAP 组,这与 Zhang 等^[10]的研究一致。

EMMPRIIN 属 Ig 超家族成员,一种大小为 58 kDa 的跨膜糖蛋白,能通过介导同型 EMMPRIN 之间的相互作用,诱导肿瘤细胞、平滑肌细胞以及内皮细胞等合成 MMP,与细胞的浸润与迁移密切相关^[2,4,12]。研究发现,EMMPRIIN 能够刺激单核细胞和平滑肌细胞分泌 MMP,参与斑块破裂,引起 AMI^[2,4]。人动脉粥样硬化组织中有 EMMPRIN 表达,这可能与单核细胞的浸润、分化以及粥样斑块的不稳定性有关^[2]。本研究发现,AMI 患者单核细

胞表达 EMMPRIN 明显上调,与之相伴的是血清中 MMP-9 水平亦明显升高,与 Schmidt 等^[4]的发现一致。这些结果提示,EMMPRIN 可能通过诱导单核细胞分泌 MMP,降解斑块纤维帽的细胞外基质,导致斑块不稳定或破裂。

Venkatesan 等^[6]研究发现,IL-18 能够促进人血管平滑肌细胞分泌 EMMPRIN,调节平滑肌细胞的迁移行为,参与斑块的进展过程;亦有学者在心肌细胞上证明,IL-18 诱导 MMP-9 分泌的过程中,EMMPRIN 起到一定的调节作用^[7]。本研究在 AMI 患者中发现,人外周血单核细胞 EMMPRIN 的表达与血清中 IL-18 水平呈正相关。本研究进一步通过体外实验证明,IL-18 能促进外周血单核细胞表达 EMMPRIN。

总之,本研究发现 AMI 时血清 IL-18 水平与单核细胞 EMMPRIN 表达均升高,这与 AMI 密切相关,其中可能的机制是 IL-18 通过上调 EMMPRIN 表达,刺激 MMP-9 分泌,导致斑块破裂。因此,通过中和 IL-18 或者抑制 EMMPRIN 表达将有助于稳定动脉粥样硬化斑块,从而减少心血管事件的发生。

[参考文献]

[1] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85: 1-31.

[2] Yoon YW, Kwon HM, Hwang KC, et al. Upstream regulation of matrix metalloproteinase by emmprin; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 180 (1): 37-44.

[3] Bouki KP, Katsafados MG, Chatzopoulos DN, et al. Inflammatory markers and plaque morphology; an optical coherence tomography study[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 154 (3): 287-292.

[4] Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metallo-

proteinase activity in cardiovascular cells: Implications in acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2006, 113: 834-841.

[5] Joghetaei N, Stein A, Byrne RA, et al. The extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, CD147) —a potential novel target in atherothrombosis prevention [J]? *Thromb Res*, 2013, 131 (6): 474-480.

[6] Venkatesan B, Valente AJ, Reddy VS, et al. Resveratrol blocks interleukin-18-EMMPRIN cross-regulation and smooth muscle cell migration[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H 874-886.

[7] Reddy VS, Prabhu SD, Mummidi S, et al. Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299 (4): H1 242-254.

[8] Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, et al. Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity[J]. *Circulation*, 2004, 110: 337-343.

[9] Yamagami H, Kitagawa K, Hoshi T, et al. Associations of serum IL-18 levels with carotid intima-media thickness[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1 458-462.

[10] Zhang B, Wu KF, Cao ZY, et al. IL-18 increases invasiveness of HL-60 myeloid leukemia cells: Up-regulation of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression[J]. *Leuk Res*, 2004, 28: 91-95.

[11] Narins CR, Lin DA, Burton PB, et al. Interleukin-18 and interleukin-18 binding protein levels before and after percutaneous coronary intervention in patients with and without recent myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94: 1 285-287.

[12] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 434-439.

(此文编辑 文玉珊)