

脑动脉狭窄患者血清中炎性因子干扰素- γ 、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 的水平分析

梁建涛^{1,2}, 王振宇^{1 Δ}

(1. 北京大学第三医院神经外科, 北京 100191; 2. 首都医科大学宣武医院神经外科, 北京 100053)

[摘要] **目的:** 研究不同类型脑动脉狭窄患者血清中干扰素(interferon, IFN)- γ 、白细胞介素(interleukin, IL)-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 的水平, 分析这几种炎性因子在不同类型脑动脉狭窄患者血清中的变化规律。**方法:** 按脑动脉狭窄部位分为颅内狭窄组(26 例), 颅外狭窄组(30 例), 颅内、外混合狭窄组(27 例)及单纯大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)狭窄组(25 例), 另外包括对照人群 33 例。通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 的含量并采用 SPSS 11.5 统计分析软件进行分析比较。**结果:** 对血清中 3 种因子的检测发现, 颅内狭窄组、颅外狭窄组、混合狭窄组和 MCA 狭窄组血清中的 IFN- γ 和 IL-6 均显著高于对照组($P=0.000$), 但在各狭窄组间 IFN- γ 差异无统计学意义, 而颅内狭窄组的 IL-6 含量低于其他狭窄组($P<0.05$)。对 TNF- α 的检测发现, 只有颅内狭窄组和 MCA 狭窄组显著高于对照组($P<0.05$), 而颅外狭窄组和混合狭窄组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:** 上述实验结果提示 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 可能参与某些类型脑动脉狭窄的形成过程。

[关键词] 脑动脉疾病; 脑血管循环; 干扰素 γ ; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R743 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2011)06-0837-04

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2011.06.010

Serum levels of interferon- γ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients with cerebral arterial stenosis

LIANG Jian-tao^{1,2}, WANG Zhen-yu^{1 Δ}

(1. Department of Neurosurgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cerebral arterial stenosis and to compare serum levels of these inflammatory cytokines in different cerebral arteries stenosis groups. **Methods:** According to the stenotic site, patients with cerebral arteries stenosis were divided into intracranial stenosis group ($n=26$), extracranial stenosis group ($n=30$), intracranial and extracranial stenosis group ($n=27$), and group of stenosis in middle cerebral artery ($n=25$). And there were 33 samples in the control group. Blood serum IFN- γ , IL-6 and TNF- α levels were analyzed using enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). **Results:** Serum IFN- γ and IL-6 levels were significantly increased in all the stenosis groups ($P=0.000$) as compared with the control group. But serum IFN- γ level had no significant difference between the two optional stenosis groups. And IL-6 level in intracranial stenosis group was lower than those in the other stenosis groups ($P<0.05$). In addition, we found that TNF- α of intracranial stenosis group ($P=0.001$) and MCA stenosis group ($P=0.015$) significantly increased as compared with the control group and the other two stenosis groups. **Conclusion:** The results suggest that IFN- γ , IL-6 and TNF- α are possible to participate in the formation of certain cerebral arterial stenosis.

KEY WORDS Cerebral arterial diseases; Cerebrovascular circulation; Interferon-gamma; Interleukin-6; Tumor necrosis factor-alpha

动脉狭窄与动脉粥样硬化患者体内常常伴有严重的炎症水平, 而炎症反应则有多种炎性因子的共同参与, 促使疾病发生、发展, 如粥样硬化斑块破裂的危险与前炎症因子[白细胞介素(interleukin, IL)-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-

α]引发的炎症反应有关^[1]。TNF 基因位于主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的三类基因区, 不仅与热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)基因座位紧邻, 而且与血清补体成分编码基因也相互紧邻。MHC 免疫炎性

Δ Corresponding author's e-mail, byxwl@yahoo.cn

网络出版时间:2011-11-10 8:41:34 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20111110.0841.005.html>

基因会依赖多种 MHC 等位基因间的相互作用而发挥功能^[2], 同样也可参与炎症反应的发生并影响疾病过程中的细胞状态。血清高水平的 IFN- γ 可间接终止胶原合成从而削弱斑块的稳定性并导致血栓形成^[3]。本研究目的为探寻不同部位脑动脉狭窄患者体内干扰素(interferon, IFN)- γ 、IL-6 和 TNF- α 的水平, 主要采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对不同类型的脑动脉狭窄患者血清进行检测, 观察这几种炎症因子在不同部位脑动脉狭窄患者体内的变化规律。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2008 年在获得首都医科大学宣武医院医学伦

理委员会许可并经患者签署知情同意后, 从宣武医院神经外科缺血组陆续取得经数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)证实的脑动脉狭窄患者血样, 按动脉狭窄部位分为: 颅内狭窄组(In), 颅外狭窄组(Out), 颅内、外混合狭窄组(Mix)及单纯大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)狭窄组(MCA)^[4]。同期获得从宣武医院根据 DSA、磁共振血管造影(magnetic resonance angiography, MRA)、经颅多普勒超声(transcranial Doppler, TCD)及颈部血管超声中的一项或两项检查排除颅内、外动脉狭窄的对照人群(control)血样, 对照组年龄 44~67 岁。对各组间的年龄、性别比例、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病进行组间匹配后剔除部分样本以消除这些因素带来的误差, 各组情况具体见表 1。

表 1 不同组中血清 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 含量($\bar{x} \pm s$, ng/L)
Table 1 Serum IFN- γ , IL-6 and TNF- α in different groups ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Subgroup	Control	In	Out	Mix	MCA
<i>n</i>	33	26	30	27	25
IFN- γ *	30.550 \pm 6.643	42.935 \pm 5.114	44.995 \pm 8.751	40.147 \pm 6.022	41.259 \pm 6.807
IL-6*	5.885 \pm 3.053	19.982 \pm 5.404	23.145 \pm 6.774	25.145 \pm 5.800	25.511 \pm 5.500
TNF- α #	24.831 \pm 6.758	30.195 \pm 6.105	26.157 \pm 5.763	25.950 \pm 6.003	28.889 \pm 6.298

* $P=0.000$, compared with Control group, each stenosis group has significant difference (IFN- γ and IL-6); # compared with Control group, $P=0.0001$ between In group and Control group, and $P=0.015$ between MCA group and Control group (TNF- α). The other two stenosis groups had no statistical difference.

1.2 取材

室温无菌采集 4 mL 肝素抗凝血, 1 000 r/min 室温离心 10 min, EP 管中加入 Cocktail 蛋白酶抑制剂(1.25 mmol/L)5 μ L/支; 取上清液 1 mL 分两支(500 μ L/支)冻存于 -80 $^{\circ}$ C 待用。

1.3 ELISA 检测 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α

ELISA 试剂盒分别为: Human IFN- γ ELISA (SUNBIO, HE002), Human IL-6 ELISA (SUNBIO, HE003), Human TNF- α ELISA (SUNBIO, HE001), 其中 IFN- γ 灵敏度为 4 ng/L, IL-6 和 TNF- α 灵敏度为 2 ng/L。按照说明书备好所有试剂及标准品, 采用标准程序, 即每孔中加入 100 μ L 标准品/样本, 室温孵育 2 h, 去除液体, 洗涤 5 次; 每孔加入 100 μ L 生物素化的相应一抗, 室温孵育 1 h, 去除液体, 洗涤 5 次; 每孔加入 100 μ L 亲和素化-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP), 室温孵育 30 min, 去除液体, 洗涤 5 次; 每孔加入 100 μ L 四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB), 室温孵育 15 min, 每孔加入 50 μ L 终止液, 在 30 min 内于 450 nm 处读取光密度值(D)。按照相应因子标准溶液的浓度(横坐标)和光密度(纵坐标)绘制标准曲线, 计算每

份样本中相应细胞因子的浓度。

1.4 统计分析

所有统计资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计分析。各组之间先进行 Oneway-ANOVA 分析, 观察是否存在组间差异, 之后在软件中再选择 LSD 检验。所有资料在分析之前进行方差齐性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

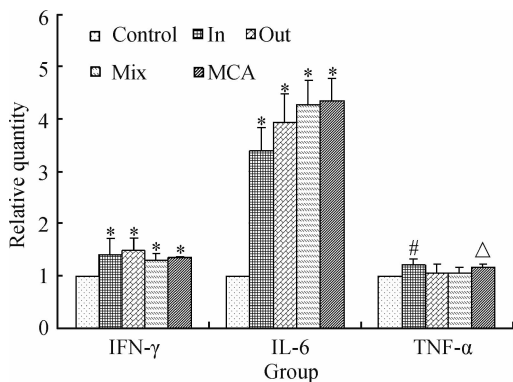
2.1 标准曲线

曲线方程为 $y = a + b \cdot x + c \cdot x^2 + d \cdot x^3$ 。对 IFN- γ 的检测: $a = 0.079$, $b = 0.004$, $c = -8.75 \times 10^{-6}$, $d = 7.40 \times 10^{-9}$, 相关系数 $r = 0.998$; 对 IL-6 的检测: $a = 0.089$, $b = 0.011$, $c = -6.22 \times 10^{-5}$, $d = 1.46 \times 10^{-7}$, 相关系数 $r = 0.996$; 对 TNF- α 检测: $a = 0.060$, $b = 0.004$, $c = -4.65 \times 10^{-6}$, $d = 2.41 \times 10^{-9}$, 相关系数 $r = 0.998$ 。

2.2 不同类型脑动脉狭窄患者与对照组血清中 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 的含量差异

各组血清 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 含量(单位 ng/

L)的数据统计结果见表1。对血清中所检测的3种细胞因子含量先进行SPSS 11.5 Oneway-ANOVA(单因素方差分析)后,再进行组间两两分析比较。以对照组血清相应检测因子的含量为1,其他组与对照组相比的相对含量如图1所示,结合表1的结果,可见各脑动脉狭窄组血清IFN- γ 及IL-6含量均显著高于对照组($P=0.000$),并且各狭窄组间的血清IFN- γ 差异无统计学意义($P>0.05$);颅内组的IL-6均显著低于其他各狭窄组(与颅外狭窄组比较 $P=0.032$,与混合狭窄组比较 $P=0.001$,与MCA狭窄组比较 $P=0.000$)。血清TNF- α 的含量只有颅内狭窄组($P=0.001$)和MCA狭窄组($P=0.015$)显著高于对照组,其他两狭窄组与对照组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。



Contents of IFN- γ and IL-6 in all cerebral arteries stenosis groups were significantly increased (* $P=0.000$) compared with control group. Content of TNF- α in MCA group ($\Delta P=0.001$) and In group (# $P=0.015$) significantly increased compared with Control group, but the contents of TNF- α in other two groups, including Out group and Mix group, hadn't statistical difference compared with Control group.

图1 各组血清中不同炎症因子含量比较

Figure 1 Comparison of three inflammatory factors in different groups

3 讨论

一些研究者发现,某些人群体内血清炎症因子如果含量较高,那么血管容易发生动脉粥样硬化^[5]。本研究在对不同类型脑动脉狭窄组几种炎症因子含量的研究中,发现各狭窄组的血清IL-6含量与对照组相比显著增加,同时,血清IFN- γ 含量在各狭窄组中也同样显著增加(表1,图1)。此外,与对照组相比,颅内狭窄组及MCA狭窄组的TNF- α 较其他两组明显增高($P<0.05$),提示IFN- γ 和IL-6可能参与各型脑动脉狭窄的形成,而TNF- α 则可能与颅内动脉狭窄或单纯MCA狭窄的关系更为密切一些。目前,已有文献报道炎症细胞因子在介导血管狭窄、动脉粥样硬化的发生中均起到了关键的作用^[6],其中IL-6、IFN- γ 和TNF- α 在动脉粥样硬化

发生的早期阶段尤为重要^[7]。IL-6、TNF- α 为前炎症因子,均可由血管内皮细胞、成纤维细胞、单核-巨噬细胞等产生,它们可激活单核-巨噬细胞、中性粒细胞等,增强这些细胞的吞噬功能,促进吞噬细胞释放炎症介质并参与炎症过程。而IFN- γ 为免疫干扰素,主要由活化的T细胞产生,自然杀伤细胞(nature killer, NK)也可产生。当IFN- γ 与特异受体结合后,可显示其独特功能,如激活巨噬细胞并促进其活性;促进多种细胞表达MHC-I类和MHC-II类分子,参与免疫反应;促进细胞免疫功能的增强,使杀伤性T细胞成熟并活化;激活血管内皮细胞、中性粒细胞和NK细胞等。IFN- γ 的这些功能反映出其含量的增加在某种程度上可加速炎症、免疫反应的过程。有资料显示,患者外周血中增加的一些炎症细胞因子可能是进行性动脉粥样硬化、血管狭窄的警告信号^[8]。我们的研究结果显示,IL-6、IFN- γ 和TNF- α 含量的增加与脑动脉狭窄存在一定的关系。那么究竟是炎症因子在体内含量的增加在先,还是脑动脉狭窄在先,亦或是二者处于相互促进、互为因果的关系尚需进一步深入的探究。

如本文前面所述,IL-6和IFN- γ 在各血管狭窄组均显著增加,而TNF- α 在颅外狭窄组和混合狭窄组并未明显增加($P>0.05$),提示IL-6和IFN- γ 参与各狭窄组的病理过程,但TNF- α 更容易参与颅内动脉血管狭窄的发生。同时,持久升高的IL-6还可通过一个非常重要的热休克蛋白转录因子——热休克基因转录因子1(heat shock transcription factor 1, HSF-1)影响hsp70的转录和表达,使其含量增加^[5,9],而增高的HSP70又将上调前炎症因子(IL-6和TNF- α)和IFN- γ 的表达并可能促进脂代谢障碍的发生^[5,10]。本课题组确实观察到了脑动脉狭窄组中存在高血清水平的HSP70和低血清含量的ApoE(数据待发表),这些可能会影响到脂代谢。已知HSP70的增加一定程度上会使细胞抗损伤的能力增强^[11],但在另外一些情况下(如血管狭窄已经形成时),HSP70的增高可能反而会促进炎症反应的发生^[10]。

此外,粥样斑块的破裂及其造成的血管狭窄和堵塞可能与IL-6和TNF- α 引发的炎症反应有关,异常增高的IL-6不仅是老年人动脉粥样硬化发生的危险因素,并且是粥样硬化斑块不稳定的危险因素^[1]。目前有观点认为,高水平的IL-6和TNF- α 是脑卒中发生的预报因子^[12],而脑卒中的病例中70%左右是由脑动脉狭窄所致的脑缺血引起的。本研究中4个脑动脉狭窄组中IL-6血清含量均显著

增高,而 TNF- α 仅在颅内狭窄组和 MCA 狭窄组中的增高具有统计学意义 ($P < 0.01$),提示颅内狭窄组和 MCA 狭窄组的患者发生中风的可能性会相对高一些。

目前对于脑动脉狭窄形成的机制尚未完全明了,普遍观点认为是多因素、多基因交互作用所致的结果,即一个特定的人群可能会携带一种或多种高危的基因型,而脑动脉狭窄的发生依赖于多种高危等位基因的相互作用^[13] 以及许多炎性因子间的交互作用^[6]。本研究将脑动脉狭窄分成不同的类型进行相关炎性因子的研究,可使我们进一步发现所研究的因素与不同亚类脑动脉狭窄的关系,提示参与不同类型脑动脉狭窄形成的主要炎性因子可能会有所差异。那么结合临床症状,是否检测到 IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 含量超出正常范围就意味着存在颅内动脉狭窄或单纯 MCA 狭窄? 而只检测到 IL-6 和 IFN- γ 含量增高是否意味着颅外动脉狭窄或混合狭窄的可能性大? 这些问题尚需进一步增加样本量进行相应的检测。

参考文献

[1] Ikeda U, Ito T, Shimada K. Interleukin-6 and acute coronary syndrome [J]. Clin Cardiol, 2001, 24(11): 701 - 704.

[2] Candore G, Lio D, Colonna Romano G, et al. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype; effect of multiple gene interactions [J]. Autoimmunity, 2002, 1(1 - 2): 29 - 35.

[3] Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis; the clot

thickens [J]. Circulation, 2001, 103(13): 1718 - 1720.

[4] 范常锋, 黄一宁. 2711 例社区居民脑血管狭窄的流行病学调查 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(1): 36 - 38.

[5] Giacconi R, Caruso C, Lio D, et al. 1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes- atherosclerotic patients [J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126(8): 866 - 873.

[6] Manginas A, Tsiavou A, Chaidaroglou A, et al. Inflammatory cytokine gene variants in coronary artery disease patients in Greece [J]. Coron Artery Dis, 2008, 19(8): 575 - 582.

[7] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(3): 360 - 376.

[8] Profumo E, Buttari B, Tosti ME, et al. Association of intracellular pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood with the clinical or ultrasound indications for carotid endarterectomy in patients with carotid atherosclerosis [J]. Clin Exp Immunol, 2008, 152(1): 120 - 126.

[9] Sakamoto M, Minamino T, Toko H, et al. Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy [J]. Circ Res, 2006, 99(12): 1411 - 1418.

[10] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine [J]. Nat Med, 2000, 6(4): 435 - 442.

[11] Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, et al. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response [J]. Mech Ageing Dev, 2006, 127(6): 517 - 525.

[12] Conway DS, Buggins P, Hughes E, et al. Relationship of interleukin-6 and C-reactive protein to the prothrombotic state in chronic atrial fibrillation [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(11): 2075 - 2082.

[13] Haskell WL. Cardiovascular disease prevention and lifestyle interventions; effectiveness and efficacy [J]. J Cardiovasc Nurs, 2003, 18(4): 245 - 255.

(2010-09-13 收稿)
(本 文 编 辑 : 任 英 慧)

· 消 息 ·

口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室获批建设

2011 年 10 月 9 日,教育部转发了《国家发展改革委办公厅关于口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室项目的复函》(发改办高技 <2011 > 2255 号),北京大学口腔医学院申报的“口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室”获批建设,这是北京大学医学部自 1985 年“天然药物及仿生药物国家重点实验室”获批建设以来的第二个国家级实验室,也是北京大学的第二个国家工程实验室。

该实验室将从口腔临床医疗实际需求出发,采用最新的科学与工程技术手段及材料,研究和开发以“精细、准确、高

效、自动”为目标的口腔数字化临床医疗技术、装备与材料;以高技术手段提高临床医疗质量和水平,提高医疗效率,从而尽可能地满足全社会日益增长的口腔医疗保健需求;力争建成对国内外开放的,环境、设备和能力水平一流的,集口腔医疗数字化技术与材料的应用研究、工程化开发、临床验证、标准研究、人才培养、国际交流和技术服务推广等多功能于一体的研究与开发平台,成为推动我国口腔数字化医疗技术和材料成果产业化的中间纽带与桥梁。

(北京 大 学 医 学 部 科 学 研 究 处)