

原发性高血压患者外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 与白细胞介素 6 水平及洛伐他汀干预实验

苟连平^{1,2}, 秦 俭¹, 吕 湛², 凡瞿明², 冯 静¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科, 400016; 2. 川北医学院附属医院心内科, 四川南充 637000)

[摘要] 目的 观察原发性高血压患者体外培养的外周血单核细胞(PBMC)分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)水平及洛伐他汀干预 TNF- α 、IL-6 水平的效果。方法 选取原发性高血压患者 31 例,健康自愿者 22 例作为对照组。体外培养外周血单核细胞后,①脂多糖刺激 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6;②洛伐他汀干预 PBMC。酶联免疫法测定细胞培养上清液中的 TNF- α 、IL-6 水平。结果 ①原发性高血压患者 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6 水平高于血压正常者 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6 水平($P < 0.05$);②脂多糖刺激后两组 TNF- α 、IL-6 均较自发分泌时明显升高($P < 0.05$)。与正常对照组相比,原发性高血压患者脂多糖刺激 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6 增加($P < 0.05$);③洛伐他汀干预后,两组均明显较脂多糖刺激和自发分泌时的 TNF- α 、IL-6 少($P < 0.05$)。结论 原发性高血压患者 PBMC 处于炎症激活状态,炎症可能参与原发性高血压的发生发展;洛伐他汀可以减轻其炎症反应。

[关键词] 洛伐他汀;高血压,原发性;单核细胞;肿瘤坏死因子;白细胞介素

[中图分类号] R972.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)09-1031-03

Increased Secretion of Tumour Necrosis Factor Alpha and Interleukin 6 Induced by Lovastatin in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Essential Hypertension

GOU Lian-ping^{1,2}, QIN Jian¹, LV Zhan², FAN Qu-ming², FENG Jing¹ (1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Northern Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China)

ABSTRACT Objective The study was to detect the level of tumour necrosis factor alpha(TNF- α) and interleukin 6(IL-6) in patients with essential hypertension(EH) before and after treatment with lovastatin. **Methods** 31 patients with EH were enrolled into lovastatin group, and 22 healthy volunteers into control group. PBMC(peripheral blood monocytes) were cultured *in vitro* and stimulated by lipopolysaccharide(LPS) and lovastatin. The concentrations of TNF- α and IL-6 were compared in PBMC culture supernatant. TNF- α and IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** ① The level of TNF- α and IL-6 of PBMC was significantly increased in patients with EH compared with that in the control subjects ($P < 0.05$). ② After stimulated by LPS, TNF- α and IL-6 had been upregulated in both groups ($P < 0.05$), moreover TNF- α and IL-6 of the EH group were higher than that of control group ($P < 0.05$). ③ TNF- α and IL-6 were dramatically inhibited by lovastatin in both groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Activated PBMC with increased TNF- α and IL-6 secretion may be involved in the pathogenesis of essential hypertensive. It is possible that lovastatin therapy EH via this inflammatory pathway.

KEY WORDS Lovastatin; Essential, hypertension; Peripheral blood mononuclear cell; Tumour necrosis factor; Interleukin

原发性高血压是以血压升高为主要表现的综合征,但其机制目前不完全清楚。研究表明,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP)、可溶性细胞间黏附分子与血压水平相关^[1]。CRP 是一种急性时相反应蛋白,可能是原发性高血压发生与发展的独立危险因素。2003 年欧洲高血压学会和欧洲心脏病学会制定的高血压指南中强调三酰甘油(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)和 CRP 作为心血管疾病分层的危险因素,提示原发性

高血压可能是一种炎症性疾病,但其触发因素不清楚。单核细胞是慢性炎症的重要参与者,分泌包含 TNF- α 、IL-6 在内的多种细胞因子和化学递质。人外周血单核细胞(PBMC)是否与原发性高血压病炎症有关,还不十分明了。为此,笔者分离 PBMC 后体外培养,分别观察其自发分泌,脂多糖刺激其分泌,洛伐他汀干预后脂多糖再刺激,并与正常人比较 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6 是否有差异,以探讨炎症反应在原发性高血压病中的地位及他汀类药物在防治原发性高血压病中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料 共选取 2006 年 9~12 月符合条件的高血压患者 31 例(男 20 例,女 11 例),同期职工体检血压正常的健康人 22 例(男 14 例,女 8 例),作为正常

[收稿日期] 2007-08-22

[作者简介] 苟连平(1972-),男,四川阆中人,讲师,硕士,从事动脉粥样硬化研究。电话:0817-2181783, E-mail: yypingping168@163.com。

组。原发性高血压的诊断按 JNC-7 标准:不同日期测 3 次血压,收缩压 ≥ 140 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg,或有明确的原发性高血压并服药治疗者。纳入条件:①血脂(胆固醇、TG)正常。②原发性高血压。排除条件:①继发性高血压、糖尿

病、冠心病、高血压心脏病、心力衰竭及炎症性、免疫性疾病;②吸烟;③肝肾功能不全;④正在服用对炎症有影响的药物(包括阿司匹林)。除高血压组血压较正常人组高外,性别构成、年龄、血脂差异无显著性(表 1)。

表 1 两组一般资料比较

组别	例数	性别		体重指数/ [kg · (m ²) ⁻¹]	收缩压/ mmHg	舒张压/ mmHg	TC/ (mmol · L ⁻¹)	TG/ (mmol · L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol · L ⁻¹)	HDL-C / (mmol · L ⁻¹)
		男	女							
高血压组	31	20	11	23.5 ± 3.7	159.3 ± 15.6 ^{*1}	93.6 ± 9.8 ^{*1}	4.35 ± 1.05	1.47 ± 0.51	2.61 ± 0.92	1.21 ± 0.41
正常组	22	14	8	23.3 ± 3.5	128.7 ± 8.9	80.2 ± 7.6	4.36 ± 1.04	1.48 ± 0.60	2.56 ± 0.80	1.22 ± 0.43

与正常组比较, ^{*1} $P < 0.05$

1.2 方法

1.2.1 PBMC 的分离与培养 入院次日晨 6:00 空腹抽取静脉血 5 mL,等体积 Hank's 液稀释此血液,徐徐加入至 5 mL 淋巴细胞分离液(Ficoll 液)界面上。2 000 r · min⁻¹离心 20 min,将单核细胞从乳白色层中吸出,反复用 Hank's 液洗涤 3 次(1 500 r · min⁻¹离心 5 min);将清洗后的细胞重悬于 RPMI 1640 培养基中,台盼蓝染色,计活细胞数 > 95%,细胞接种于培养皿中,置于 37 °C 5% 二氧化碳(CO₂)培养箱 2 h;用 37 °C 预热的培养基清洗 2 次,将未贴壁细胞洗脱,贴壁的为单核细胞;瑞氏染色鉴定贴壁细胞为单核细胞,占 85% 以上;将贴壁细胞用细胞刮片轻轻刮下,重悬于 RPMI 1640 培养基,调整细胞浓度为 1 × 10⁶ · mL⁻¹ 备实验用。

1.2.2 实验方法 ①自发分泌:无药物刺激下,PBMC 培养 24 h;②脂多糖(来自 Sigma)刺激分泌:PBMC 加脂多糖(20 μg · L⁻¹)培养 24 h;③洛伐他汀(购自 Sigma)干预后脂多糖再刺激分泌:PBMC 加洛伐他汀(10 μmol · L⁻¹)培养 1 h 后,再加脂多糖(20 μg · L⁻¹)培养 24 h。培养 24 h 后,测定上清液中 TNF-α、IL-6 水平。

1.2.3 标本保存及观察指标测定 PBMC 培养后收集上清液贮存 -70 °C 冰箱,标本收集全后,一次性用双抗体夹心酶联免疫(ELISA)法测定 TNF-α、IL-6 水平(试剂盒购自晶美生物工程公司)。

1.2.4 统计学方法 计量资料用均数 ± 标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验,同组干预前后比较采用配对 *t* 检验。α 水准定为 0.05, $P < 0.05$ 为差异有显著性。计数资料行 χ^2 检验。

2 结果

脂多糖刺激 PBMC 分泌时高血压组 TNF-α、IL-6 水平较正常组高 ($P < 0.05$);两组脂多糖刺激 PBMC 分泌后较自发分泌 TNF-α、IL-6 显著升高 ($P < 0.05$);

洛伐他汀干预 PBMC 后脂多糖再刺激分泌两组均较脂多糖刺激和自发分泌时 TNF-α、IL-6 明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2,3。

表 2 两组 PBMC 自发分泌、脂多糖刺激分泌、洛伐他汀干预后分泌 TNF-α 的比较

组别	例数	自发分泌	脂多糖刺激分泌	洛伐他汀干预后脂多糖再刺激分泌
				ng · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$
高血压组	31	271 ± 83 ^{*1}	3 450 ± 806 ^{*1*2}	1002 ± 11 ^{*3}
正常组	22	161 ± 60	2 213 ± 650 ^{*2}	901 ± 9 ^{*3}

与正常组比较, ^{*1} $P < 0.05$;与本组自发分泌比较, ^{*2} $P < 0.05$;与本组脂多糖刺激和自发分泌时比较, ^{*3} $P < 0.05$

表 3 两组 PBMC 自发分泌、脂多糖刺激分泌、洛伐他汀干预后分泌 IL-6 的比较

组别	例数	自发分泌	脂多糖刺激分泌	洛伐他汀干预后脂多糖再刺激分泌
				ng · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$
高血压组	31	312 ± 91 ^{*1}	3 651 ± 821 ^{*1*2}	1 241 ± 238 ^{*3}
正常组	22	180 ± 67	2 412 ± 710 ^{*2}	925 ± 226 ^{*3}

与正常组比较, ^{*1} $P < 0.05$;与本组自发分泌比较, ^{*2} $P < 0.05$;与本组脂多糖刺激和自发分泌时比较, ^{*3} $P < 0.05$

3 讨论

目前,关于原发性高血压的发病机制仍在不断探索中,除遗传因素、饮食因素、精神社会心理压力以及神经内分泌机制外,近年来发现炎症机制在高血压的发生、发展及转归中也扮演着极其重要的角色。在 ATFICA 大规模人群调查研究中,CHRYSOHOOU 等^[2]的研究结果显示,高血压前期人群中,CRP 水平升高者占 31%,有较高的 TNF-α 水平者占 32%,白细胞计数升高者占 10%,表明高血压前期状态即可能开始了炎症过程。而 BAUTISTA 等^[3]对 IL-6、TNF-α 等炎症指标与高血压发生的关系的部分交叉对照的研究发现,在校正年龄、性别、体重指数、家族史等指标后,IL-6、TNF-α 可能是导致血压升高的独立危险因素。IL-6 水平明显升高者发展为高血压的可能性为正常对照组的 2 倍以上。有人认为^[4],TNF-α 是收缩压的独立危险

因素。本研究发现,在原发性高血压患者与健康体检者血浆炎性标志物水平变化的对比研究中,结果显示原发性高血压患者血浆 TNF- α 、IL-6 等炎性细胞因子水平明显高于对照组,两组脂多糖刺激 PBMC 后较 PBMC 自发分泌时 TNF- α 、IL-6 显著升高($P < 0.05$)。这提示 TNF- α 、IL-6 在原发性高血压发病中扮演重要角色。

用经典的粘附法分离单核-巨噬细胞会不同程度激活单核细胞,影响单核细胞炎症因子的释放,而干扰实验结果。本课题直接分离 PBMC,避免操作对单核细胞的激活,因而得出的结论更具科学性。

TNF- α 、IL-6 致血压升高的机制如下:增多的 TNF- α 、IL-6 对血管内皮细胞(VEC)产生如下作用:直接细胞毒作用,促进中性粒细胞脱颗粒及氧化代谢,加速脂质过氧化,破坏内皮细胞的结构和功能完整性,使内皮细胞分泌血管活性物质失衡,舒血管物质(如一氧化氮)合成与释放减少,缩血管物质内皮素(ET)分泌增多,使血管调节因素失衡,从而间接促进了血管收缩,外周阻力增高,血压升高。高血压时血管内皮细胞受损大量释放 TNF- α 、IL-6 至血液循环,TNF- α 、IL-6 除参与免疫和炎性反应,加重血管壁损害外,亦可促进内皮细胞 c-sis、c-myc 和 c-fos 原癌基因的异常表达^[5]。同时大量释放的 TNF- α 、IL-6 可增加 ET 表达,ET 可促进以上原癌基因表达,导致 DNA 合成增加,血管内皮细胞增生,使血管壁增厚,管腔缩小,外周阻力增加,致血压升高。

本实验中,PBMC 用洛伐他汀培养 1 h 后,再加脂多糖培养 24 h。此时测定高血压组上清液中 TNF- α 、IL-6 水平,发现较脂多糖刺激 TNF- α 、IL-6 和自发分泌时 TNF- α 、IL-6 明显降低($P < 0.05$),这表明洛伐他汀既可抑制高血压炎性细胞的活性,也可降低脂多糖刺激的炎症因子水平,他汀类药物在防治原发性高血压病中起着重要的作用。研究报道,辛伐他汀治疗 6 周后,107 例高胆固醇患者外周血单核细胞 MCP-1、IL-8、IL-6、TNF- α mRNA 的表达及血清浓度水平下降^[6]。他汀类药物抑制炎症因子的机制还不十分清楚,可能与其抑制甲羟戊酸的生成有关。①甲羟戊酸是一系列类异戊二烯的前体成分。类异戊二烯可以在转录后水平修饰许多蛋白成分,使其“异戊二烯化”,介导蛋白质与细胞膜的锚定作用及蛋白质与蛋白质间的作用,从而影响相应的生化途径。②类异戊二烯是维持粒细胞中还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶的合成,也是活化的巨噬细胞产生过氧化氢(H_2O_2)的必要原料。③一些类异戊二烯从属于 rac 和 rho 蛋白,发挥其调节细胞

信号传导作用。④有研究表明他汀类药物抑制 κB 的激活,后者参与许多因子的激活。洛伐他汀下调巨噬细胞 κB 所调控的 iNOS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达^[7],由此可推测他汀类药物抑制炎症因子释放的机制可能部分与抑制 κB 的激活有关。⑤他汀类药物抑制 G 蛋白耦联受体激发的钙离子内流以及影响 ras 相似蛋白在单核细胞上的定位。近来的一项重要研究证实,一种改良后的非抑制羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶作用的他汀类药物具有强力地选择性地直接抗炎作用^[8],这也表明,单纯以抑制胆固醇合成作用来解释他汀类药物的多效性,还远远不够。随着对 TNF- α 、IL-6 等细胞因子及他汀类药物的深入研究,将为原发性高血压的治疗提供新的途径。

[参考文献]

- [1] WANG T J, GONA P, LARSON W G, *et al.* Multiple biomarkers and the risk of incident hypertension [J]. *Hypertension*, 2007, 49(3): 432-438.
- [2] CHRYSOHOOU C, PITSAVOS C, PANAGIOTAKOS D B, *et al.* Association between prehypertension status and inflammatory markers related to atherosclerotic disease; the ATTICA study [J]. *Am J Hyptertens*, 2004, 17(7): 568-573.
- [3] BAUTISTA L E, VERA L M, ARENAS I A, *et al.* Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein interleukin-6 and TNF- α) and essential hypertension [J]. *J Hum Hypertens*, 2005, 19(2): 149-157.
- [4] BOGDANSKI P, KUJAWSKA-LUCZAK M, LACKI J, *et al.* Evaluation of selected interleukins, tumor necrosis factor, insulin and leptin in obese patient with hypertension [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2003, 15(88): 347-351.
- [5] VANHOUTTE P M. Endothelium and control of vascular function [J]. *Hypertension*, 1989, 13(6 Pt 2): 658-667.
- [6] REZAIEMAJD A, MACA T, BUCEK, *et al.* Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2002, 22(7): 1194-1199.
- [7] PAHAN K, SHEIKH F G, NAMBOODIRI A M, *et al.* Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11): 2671-2679.
- [8] WEIZSCHMIDT G, WELZENBACH K, BRINKMANN V, *et al.* Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site [J]. *Nat Med*, 2001, 7(6): 687-692.