

· 临床研究 ·

25 例慢性心力衰竭患者炎症细胞因子的变化

刘家勉¹, 刘英才^{2△}

(1. 四川省乐山市人民医院心内科 614000; 2. 泸州医学院附属医院心内科, 四川 646000)

摘要:目的 观察慢性心力衰竭(CHF)患者外周血单个核细胞(PBMCs)核因子- κ B(NF- κ B)活化与炎症细胞因子表达的关系,探讨 CHF 的发病机制。方法 选取心功能Ⅲ、Ⅳ级 CHF 患者 25 例,健康者 25 例,分离 PBMCs,加入脂多糖(LPS),经体外培养 24 h 后,采用放射免疫法检测培养上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平,并测定外周血单个核细胞 NF- κ B 阳性细胞率。结果 CHF 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平均比健康对照组明显升高($P < 0.05$),CHF 组 NF- κ B 阳性细胞率显著高于健康对照组($P < 0.05$)。相关分析显示,PBMCs NF- κ B 阳性细胞率与培养上清液中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平呈显著正相关($r = 0.54, P < 0.000 1; r = 0.53, P < 0.000 1; r = 0.55, P < 0.000 1$)。结论 通过 NF- κ B 活化途径而刺激炎症细胞因子水平升高,诱导心肌炎症反应,这可能是心力衰竭发生和发展机制之一。

关键词:心力衰竭,充血性;单核细胞;NF- κ B;肿瘤坏死因子;白细胞介素 6

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)01-0053-02

Relationship between the secretion of cytokines and the activation of NF- κ B in peripheral mononuclear cells from 25 patients with chronic heart failure

Liu Jiamian¹, Liu Yingcai^{2△}

(1. Department of Cardiology, People's Hospital of Leshan, Sichuan 614000, China;

2. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the secretion of cytokines and the activation of NF- κ B in peripheral mononuclear cells (PBMCs) from patients with chronic heart failure (CHF). Explore the possible mechanism of CHF. **Methods** PBMCs isolated from 25 CHF patients and 25 healthy subjects were stimulated by LPS in vitro for 24 hs. The supernatant fluid were used to measure the level of TNF- α , IL-1 β , IL-6 by radioimmunoassay, and the activation of NF- κ B in PBMCs were measured by immunohistochemical method. **Results** The secretion of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and the activation of NF- κ B in PBMCs showed a significant difference between CHF and healthy ($P < 0.05$). The correlative analyses indicated that a positive correlation existed between the activation degree of NF- κ B and the level of cytokines in PBMCs. **Conclusion** In patients with CHF, the secretion of cytokines may be regulated by NF- κ B way. This property may be one of the mechanism for heart failure.

Key words: heart failure, congestive; monocytes; NF-kappa B; tumor necrosis factor; interleukin 6

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)的机制目前尚未完全清楚。近年来发现炎症细胞因子的大量分泌以及核因子- κ B (NF- κ B)的活化在 CHF 的发生和发展中起十分重要的促进作用^[1-7]。本文通过对 CHF 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)在脂多糖(LPS)的刺激下进行体外培养,观察 CHF 患者 PBMCs 分泌细胞因子水平和 NF- κ B 活性的变化,以及两者的关系,从而探讨 CHF 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择泸州医学院附属医院心内科 2007 年 6 月至 2007 年 12 月住院的 CHF 组患者 25 例,其中男 18 例,女 7 例,年龄(61.3±10.1)岁。心功能 NYHA 分级Ⅲ~Ⅳ级,Ⅲ级 19 例,Ⅳ级 6 例,经超声心动图测定 LVEF<45%。扩张性心脏病 16 例,缺血性心脏病 5 例(有典型性心绞痛表现或经冠状动脉造影明确有冠状动脉病变),高血压性心脏病 4 例;病程 6 个月至 12 年。健康对照组 25 例,其中男 18 例,女 7 例,年龄(60.4±9.6)岁,为泸州医学院附属医院门诊健康体检者。两组均排除风湿活动、自身免疫性疾病、肿瘤、感染、糖尿病等。近 1 周末服用 β 受体阻滞剂,已服用者需停药 1 周以上。

1.2 实验材料 Ficoll hypaque 淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司产品),胎牛血清(GIBCO 公司),PRMI-1640 培养基(GIBCO 公司),白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因

子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)放射免疫试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所),LPS(Sigma 公司),NF- κ B p65 试剂盒(武汉博士德公司)等。

1.3 实验方法 CHF 患者及健康体检者抽取空腹 12 h 肘静脉血 5 mL,应用淋巴细胞分离液(Ficoll hypaque,密度为 1.077)分离单个核细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(含 2 mmol/L 谷氨酰胺,100 IU/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素)悬浮细胞,加入 24 孔培养板。置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的孵育箱中,2 h 后加入 LPS(1 μ g/mL,细胞终浓度为 1×10⁶ 个/升)。刺激 24 h 后应用放射免疫法测定培养上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平,留取 PBMCs 检测 NF- κ B 活性。

1.4 细胞因子检测 培养上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 检测采用解放军总医院放免所试剂盒,由泸州医学院附属医院核医学科协助测定。

1.5 NF- κ B 检测 将培养后离心的 PBMCs 加入完全培养基洗涤两次,每次以 1 000 r/min 离心 10 min,末次离心后的细胞加入完全培养基调整细胞数为 1×10⁷ 个/毫升,用毛细吸管吸取 30 μ L 细胞悬液涂于用多聚赖氨酸处理过的玻片上,室温风干。将细胞涂片用纯丙酮固定 30 min,再次风干后将标本置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待测。PBMCs NF- κ B 免疫组化染色使用武汉博士德生物工程有限公司的 NF- κ B p65 试剂盒,采用生物素-链霉亲和素免疫组化染色法。NF- κ B 活性检测:随机选取 5

△ 通讯作者,电话:13882735770;E-mail:liuyingcai818@163.com。

个高倍视野,细胞核呈棕黄色定为 NF- κ B 阳性细胞,共计 500 个细胞,计算阳性细胞占总细胞细胞的百分率。

1.6 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS8.0 统计软件进行析因方差分析,相关分析采用直线相关分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞因子水平及 NF- κ B 活性比较 CHF 组各细胞因子水平及 NF- κ B 活性均明显升高,见表 1、封 3 图 1。

表 1 两组细胞因子及 NF- κ B 活性

检测项目	CHF 组	健康对照组
TNF- α (ng/L)	4.11 \pm 0.60*	3.12 \pm 0.58
IL-1 β (ng/L)	3.97 \pm 0.44*	3.53 \pm 0.27
IL-6(pg/L)	971.24 \pm 138.5*	774.11 \pm 140.2
NF- κ B 阳性细胞率(%)	37.53 \pm 6.80*	20.67 \pm 8.84

*: $P < 0.05$,与健康对照组比较。

2.2 相关性分析 PBMCs NF- κ B 阳性细胞率与培养上清液中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平呈显著正相关,见表 2。

表 2 PBMCs NF- κ B 阳性细胞率与细胞因子相关性

		TNF- α	IL-1 β	IL-6
NF- κ B	<i>r</i>	0.541 1	0.529 6	0.554 7
	<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

3 讨论

CHF 患者外周血中以及心肌局部有大量的炎症细胞因子分泌^[8]。炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 可通过一系列调控机制,如促进心肌细胞凋亡、左室重塑,使心肌 β -肾上腺素能受体失耦联等参与心力衰竭的进展^[9]。NF- κ B 是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子。多种炎症因子受到 NF- κ B 调控,包括 TNF- α 、IL-1、IL-2、一氧化氮合成酶(NOS)、IL-6 等。在多数细胞中,NF- κ B 与其抑制蛋白结合,当受到活化刺激后,NF- κ B 解离进入细胞核,与多种炎症因子启动子区域中 κ B 序列结合,参与炎症介质、黏附分子等转录^[10],诱导免疫细胞的活化、应激性反应及细胞凋亡等多种细胞活动。Anlonella 等^[6]发现 CHF 患者的外周血白细胞中活化的 NF- κ B 明显高于健康人群。急性冠状动脉综合征患者 PBMCs NF- κ B 活性显著高于稳定型冠心病和无心血管病的健康对照组^[11]。既往研究也证实 NF- κ B p65 在 CHF 患者的 PBMCs 中的表达较正常人明显增加^[12]。

PBMC 是 CHF 时炎症细胞因子的重要来源^[13]。细菌 LPS 是人 PBMCs 分泌细胞因子强大的诱导剂^[14],CHF 患者血浆 LPS 水平明显升高,故研究 PBMCs 分泌细胞因子水平,对反映 CHF 患者血液循环内炎症情况有重要意义。细胞核上表达 NF- κ B 的细胞数可作为判断 NF- κ B 活化标志^[15]。本研究结果显示,CHF 患者 PBMCs NF- κ B 阳性细胞率显著高于无心血管病史的健康体检者,提示 NF- κ B 的激活可能是心力衰竭的病理生理特征,可能与心力衰竭进程有关。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高,表明心力衰竭患者体内存在明显的炎症反应。相关分析显示,NF- κ B 阳性细胞率与 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平呈显著正相关,说明心力衰竭时 PBMCs 分泌细胞因子增加,NF- κ B 信号转导通路的转录调节是心力衰竭炎症激活的可能机制,并以此途径参与心力衰竭的进展,提示通过抑制 NF- κ B 活性、降低细胞因子转录可干预心力衰竭进程。

参考文献:

[1] Valen G, Yan ZQ, Hanson GK. Nuclear factor kappa-B

and the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 38(2): 307-314.

- [2] Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N, et al. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(3): 569-582.
- [3] Haudek SB, Bryant DD, Giroir BP. Differential regulation of myocardia NF- κ B following acute or chronic TNF- α exposure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(7): 1263-1271.
- [4] 吴锦晖,张新军,吴琳娜. NF- κ B 在慢性心力衰竭发病机制中的研究[J]. 华西医学, 2007, 22(4): 925-926.
- [5] Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, et al. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4[J]. J Infect Dis, 2001, 183(11): 1617-1624.
- [6] Anlonella E, Janko W, Anna C, et al. The activation of the NF- κ B system in chronic heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41: 157-162.
- [7] Matsushita H, Morishita R, Nata T, et al. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) mediated bcl2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation[J]. Circ Res, 2000, 86(9): 974-981.
- [8] Deswal A, Petersen N J, Feldman A M, et al. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trail (VEST)[J]. Circulation, 2001, 103: 2055-2059.
- [9] Sasayama S, Matsumori A, Kihara Y. New insights into the pathophysiological role of cytokines in heart failure [J]. Cardiovasc Res, 1999, 42: 557-564.
- [10] 郑仲谨,李磊. 核转录因子- κ B 在全身炎症反应综合征中的作用[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(4): 314-317.
- [11] 裘云仙,戴利成,程震峰,等. 急性冠状动脉综合征患者外周血单个核细胞群中 NF- κ B 细胞率和血浆 sICAM-1 水平的临床意义[J]. 检验医学, 2004, 19(5): 465-466.
- [12] 刘应才,刘东华,潘金生. 心力衰竭患者外周血单个核细胞核因子- κ B/p65 的表达及 IL-10 的影响[J]. 中国循环杂志, 2006, 21(6): 431-434.
- [13] Vredevoe DL, Widawski M, Fonarow GC, et al. Interleukin-6 expression and Natural Killer(NK) cell dysfunction and anergy in heart failure[J]. Am J Cardiol, 2004, 93(8): 1007-1011.
- [14] Banks J, Polle S, Nair SP, et al. Streptococcus sanguis secretes CD14-binding proteins that stimulate cytokine synthesis: a clue to the pathogenesis of infective (bacterial) endocarditis? [J]. Microb Pathog, 2002, 32: 105-116.
- [15] Wilson SJ, Leone BA, Anderson D, et al. Immunohistochemical analysis of the activation of NF-kappa B and expression of associated cytokines and adhesion molecules in human models of allergic inflammation[J]. J Pathol, 1999, 189: 265-272.

(收稿日期:2010-02-18 修回日期:2010-06-10)