

## · 基础论著 ·

## 高脂血症对炎性免疫应答的影响

马雅奎 王蓓蓓 韩俊燕 陈冰 李燕 李玉梅 曾辉 王宪波

**【摘要】目的** 观察高脂饮食对C57 BL/6和apoE基因敲除 (apoE<sup>-/-</sup>) 小鼠免疫应答的影响。**方法** 12周龄雌性C57BL/6和apoE<sup>-/-</sup>小鼠分别给予普通饲料和高脂饲料。4周后, 检测血脂水平、外周血粒细胞和单核细胞比例, 及其表面受体CD36的表达水平; 进一步采用脂多糖 (LPS) 刺激检测血浆细胞因子的水平。**结果** 4周高脂饮食导致C57 BL/6小鼠血浆总胆固醇 (TC) 和高密度脂蛋白 (HDL) 显著升高。apoE<sup>-/-</sup>小鼠TC、甘油三酯 (TG) 和低密度脂蛋白 (LDL) 水平显著升高, HDL显著下降; 高脂饮食可进一步升高其TC、TG、LDL和HDL水平。4周高脂饮食C57 BL/6小鼠外周血粒细胞和单核细胞比例无明显改变; apoE<sup>-/-</sup>小鼠外周血粒细胞的比例显著增多; 高脂饮食导致apoE<sup>-/-</sup>小鼠单核细胞的比例显著增多, 外周血粒细胞和单核细胞表面CD36的表达水平显著增高。采用LPS腹腔注射, 发现高脂饮食致野生型小鼠血浆IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1和IL-6水平显著升高; apoE<sup>-/-</sup>小鼠血浆IFN- $\gamma$ 和IL-6表达显著增加, 高脂饮食apoE<sup>-/-</sup>小鼠血浆IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1和IL-6水平显著升高。**结论** 长期的高脂饮食不仅导致高脂血症, 同时还引发了系统性炎症反应。

**【关键词】** 高脂血症; apoE基因; 基因敲除; 粒细胞; 单核细胞; 细胞因子

**Effect of hyperlipidaemia on systemic immune responses** MA Ya-luan, WANG Bei-bei, HAN Jun-yan, CHEN Bing, LI Yan, LI Yu-mei, ZENG Hui, WANG Xian-bo. The Institute of Basic Medical Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Corresponding author: WANG Xian-bo, Email: wangxianbo638@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of hyperlipidaemia on systemic immune responses of C57 BL/6 and apoE-deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice. **Methods** Total of 16 12 week-old homozygous female C57BL/6 and apoE<sup>-/-</sup> mice were fed with a chow diet and a high cholesterol Western diet (WD), respectively. After 4 weeks, the plasma levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density cholesterol protein (LDL) and high density cholesterol protein (HDL) of those mice were detected, respectively. The proportions of granulocytes and monocytes in the peripheral blood and their surface receptor CD36 were detected by flow cytometry. The serum levels of LPS induced cytokines were detected by ELISA and cytometric bead array (CBA) mouse inflammation kit. **Results** Four-week WD increased the levels of TC and HDL in wild type C57BL/6 mice. ApoE<sup>-/-</sup> mice showed increased levels of TC, TG and LDL-C and decreased HDL, and WD increased the levels of TC, TG, LDL and HDL in these mutant mice. WD did not change the proportions of granulocytes and monocytes in C57BL/6 mice. ApoE<sup>-/-</sup> mice showed an increased proportion of granulocytes, while an increased proportion of monocytes and elevated expression of CD36 on granulocytes and monocytes were observed after 4-week WD in apoE<sup>-/-</sup> mice. LPS injection induced elevated production of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1 and IL-6 in wild type C57BL/6 mice compared to the mice with a chow diet. ApoE<sup>-/-</sup> mice also displayed enhanced serum levels of IFN- $\gamma$  and IL-6 after LPS stimulation, while WD apoE<sup>-/-</sup> mice showed significantly increased serum levels of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1 and IL-6 in respond to LPS challenge. **Conclusions** Long-term WD did not only induced hyperlipidaemia, but also induced systemic immune responses.

**【Key words】** Hyperlipidaemia; ApoE gene; Gene knockout; Granulocyte; Monocyte; Cytokine

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.04.003

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81072938); 北京市自然科学基金 (No. 7102119); 中华人民共和国人力资源和社会保障部留学人员科技活动择优资助优秀类项目 (No. 2010)

作者单位: 100700 北京, 中国中医科学院中医基础理论研究所 (马雅奎、陈冰、李燕、李玉梅); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 (王蓓蓓、韩俊燕、曾辉), 中西医结合中心 (王宪波)

通讯作者: 王宪波, Email: wangxianbo638@163.com

高脂血症(hyperlipidemia)是一种慢性炎症性疾病<sup>[1-2]</sup>, 可以通过引发全身免疫异常, 触发和加速动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生, 进一步导致的心脑血管疾病。目前认为, 高脂血症向As发生、发展的过程是以炎性细胞因子、天然免疫细胞为基础的免疫损伤过程<sup>[2]</sup>。

同时, 临床研究发现高脂血症、肥胖患者重症感染的发生率和病死率均较高<sup>[3]</sup>, 提示患者有系统性免疫功能异常。因此, 研究高脂血症免疫应答机制, 对于指导临床用药, 改善和治疗重症感染有重要意义。本研究应用血脂敏感品系C57BL/6小鼠和apoE 基因敲除C57BL/6小鼠(apoE<sup>-/-</sup>小鼠), 探讨高脂血症对天然免疫应答的影响, 报道如下。

## 材料与方法

### 一、药物与试剂

抗小鼠CD11b-PerCPy5.5和Gr1-APC抗体为美国BD Pharmingen公司产品, 抗小鼠CD36-PE抗体为美国eBioscience公司产品, IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒和CBA小鼠炎症试剂盒购于美国BD公司。

### 二、动物的分组及处理

所有实验用鼠均购于北京大学实验动物中心, 并饲养于SPF条件下。实验采用12周龄C57BL/6和apoE<sup>-/-</sup>雌性小鼠, 体重(20  $\pm$  2) g。C57BL/6和apoE<sup>-/-</sup>小鼠采用配对比较法随机分为普食组、高脂组。每组均为8只, 所有实验独立重复3次。高脂食料含78.85%基础饲料, 0.15%胆固醇和21%脂肪。

4周后, 每组取4只小鼠, 异戊烷吸入麻醉下, 摘眼球采EDTA抗凝血, 离心后获取血浆, 用于血脂检测; 血细胞用于流式细胞仪检测。其余小鼠注射LPS(10 mg/kg), 刺激3 h后取血, 获取血浆用于细胞因子检测。

### 三、血脂水平测定

采用BECKMAN CX4全自动生化分析仪, 日本和光公司试剂, 常规测定各组小鼠血浆中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)水平。

四、外周骨髓系细胞、粒细胞和单核细胞及表面受体CD36的表达检测

血细胞加入获取血浆等量的PBS, 裂解红细胞后应用抗小鼠CD11b-PerCPy5.5、Gr-1-APC和CD36-PE抗体直接法标记。应用FACS Calibur流式

细胞仪(美国BD公司)检测。

### 五、细胞因子测定

血浆细胞因子用IL-1 $\beta$  ELISA试剂盒(美国BD公司)和CBA小鼠炎症试剂盒(美国BD公司)测定, 严格按试剂盒说明书进行。

### 六、统计学处理

本研究中所有动物实验均重复3次。应用SPSS 13.0统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 $t$ 检验进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义;  $P < 0.001$ 为差异具有显著性统计学意义。

## 结 果

### 一、各组小鼠血脂水平的比较

如表1所示, 4周高脂饮食导致野生型小鼠血浆中的TC和HDL水平显著增高( $t$ 分别为7.762和9.099,  $P$ 分别为0.00024和9.9E-05)。apoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂TC, TG和LDL水平显著高于野生小鼠, HDL水平显著降低( $t$ 分别为20.83、4.223、12.61和6.211,  $P$ 分别为8E-07、0.0055、1.5E-05和0.00008)。高脂饮食导致apoE<sup>-/-</sup>模型小鼠的TC、TG、LDL和HDL水平显著增高( $t$ 分别为5.030、5.828、6.899和2.484,  $P$ 分别为0.0024、0.0011、0.00046和0.0475)。

二、高脂饮食对外周血粒细胞和单核细胞比例的影响

4周的高脂饮食对野生型外周血粒细胞和单核细胞的比例无显著影响。apoE<sup>-/-</sup>小鼠外周血粒细胞比例显著高于野生小鼠( $t = 3.537$ ,  $P = 0.0123$ )。高脂饮食对apoE<sup>-/-</sup>模型小鼠外周血粒细胞比例影响不明显, 但单核细胞比例显著增高( $t = 4.646$ ,  $P = 0.00352$ ), 见表2。

三、高脂饮食对外周粒细胞和单核细胞CD36表达的影响

高脂饮食4周后, 野生型小鼠粒细胞CD36的表达水平下降( $t = 3.353$ ,  $P = 0.0154$ ), 但单核细胞CD36表达水平无显著变化。apoE<sup>-/-</sup>小鼠外周血粒细胞和单核细胞的CD36表达水平影响不明显。但高脂饮食显著提高apoE<sup>-/-</sup>小鼠粒细胞和单核细胞CD36表达( $t$ 分别为2.722和5.473,  $P$ 分别为0.0346和0.00155), 见表2。

四、血浆细胞炎症和抑炎细胞因子表达水平的比较

高脂血症及As是一种慢性炎症, 引发免疫反应强度较弱, 常规方法无法检测到血浆细胞因子的水平。为进一步探讨高脂饮食所造成免疫异常, 本研

表1 各组小鼠的血脂水平 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 (n=8)	TC	TG	LDL	HDL
野生普食组	1.58 ± 0.14	0.73 ± 0.17	0.29 ± 0.08	1.06 ± 0.09
野生高脂组	2.60 ± 0.23 <sup>bd</sup>	0.88 ± 0.16 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.09 <sup>d</sup>	1.68 ± 0.10 <sup>bd</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 普食组	12.58 ± 1.05 <sup>bc</sup>	1.26 ± 0.19 <sup>ac</sup>	2.10 ± 0.29 <sup>bd</sup>	0.69 ± 0.09 <sup>bc</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 高脂组	21.44 ± 3.37 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.18 <sup>b</sup>	5.36 ± 0.89 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.09 <sup>a</sup>

注: TC: 总胆固醇, TG: 甘油三酯, LDL: 低密度脂蛋白, HDL: 高密度脂蛋白。<sup>a</sup>表示与野生普食组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与野生普食对照组相比,  $P < 0.001$ ; <sup>c</sup>表示与apoE<sup>-/-</sup>高脂组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>表示与apoE<sup>-/-</sup>高脂组相比,  $P < 0.001$

表2 各组动物外周血粒细胞、单核细胞比例及其CD36的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 (n=8)	G (%)	Mo (%)	CD36-G (FMI)	CD36-Mo (FMI)
野生普食组	12.83 ± 1.38	6.68 ± 1.30	119.35 ± 16.48	515.66 ± 91.92
野生高脂组	21.13 ± 9.19	6.73 ± 1.09	86.44 ± 10.67 <sup>ad</sup>	394.70 ± 58.96 <sup>d</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 普食组	31.23 ± 10.31 <sup>a</sup>	5.98 ± 1.38 <sup>c</sup>	127.91 ± 12.74 <sup>c</sup>	525.47 ± 49.01 <sup>c</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 高脂组	31.33 ± 5.49 <sup>b</sup>	12.16 ± 2.28 <sup>a</sup>	154.11 ± 14.42 <sup>a</sup>	770.72 ± 75.03 <sup>a</sup>

注: G: 粒细胞, Mo: 单核细胞。<sup>a</sup>表示与野生普食组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与野生普食对照组相比,  $P < 0.001$ ; <sup>c</sup>表示与apoE<sup>-/-</sup>高脂组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>表示与apoE<sup>-/-</sup>高脂组相比,  $P < 0.001$

表3 各组动物的血浆细胞因子的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 (n=8)	IL-1 (pg/ml)	IL-12 p70 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
野生普食组	246.7 ± 70.9	77.9 ± 25.6	1651.5 ± 108.7	74.4 ± 30.3
野生高脂组	489.9 ± 69.4 <sup>a</sup>	114.8 ± 19.5	1612.5 ± 358.0 <sup>c</sup>	143.0 ± 11.5 <sup>a</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 普食组	333.8 ± 41.3 <sup>c</sup>	118.9 ± 36.2	2285.9 ± 1030.8	132.0 ± 21.4 <sup>ac</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 高脂组	634.5 ± 119.7 <sup>a</sup>	128.7 ± 47.8	3347.0 ± 689.6 <sup>a</sup>	207.7 ± 53.0 <sup>a</sup>

  

组别 (n=8)	IL-10 (pg/ml)	MCP-1 (FMI)	IL-6 (FMI)
野生普食组	438.1 ± 103.2	2384.2 ± 455.6	3306.9 ± 357.4
野生高脂组	420.5 ± 38.2 <sup>c</sup>	5175.2 ± 453.9 <sup>b</sup>	5965.7 ± 858.4 <sup>ad</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 普食组	685.2 ± 276.0	2289.5 ± 561.4 <sup>d</sup>	7539.0 ± 947.2 <sup>bd</sup>
apoE <sup>-/-</sup> 高脂组	780.5 ± 125.2 <sup>a</sup>	5708.1 ± 444.5 <sup>b</sup>	9827.6 ± 56.9 <sup>b</sup>

注: IL-1: 白细胞介素1, IL-12 p70: 白细胞介素12, TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ :  $\gamma$ 干扰素, IL-10: 白细胞介素10, MCP-1: 单核细胞趋化蛋白-1, IL-6: 白细胞介素6。<sup>a</sup>表示与野生普食组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与野生普食对照组相比,  $P < 0.001$ ; <sup>c</sup>表示与apoE<sup>-/-</sup>高脂组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>表示与apoE<sup>-/-</sup>高脂组相比,  $P < 0.001$

究采用LPS刺激, 用ELISA和CBA法检测各组动物血浆细胞因子的水平。结果显示, LPS刺激3 h后, 高脂饮食导致野生型小鼠IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1和IL-6表达显著增加( $t$ 分别为4.903、4.229、8.679和5.719,  $P$ 分别为0.0027、0.00551、0.00013和0.00124)。apoE<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠相比, 血浆IFN- $\gamma$ 和IL-6表达显著增加( $t$ 分别为3.102和8.361,  $P$ 分别为0.0211和0.00016)。4周的高脂饮食高脂饮食导致apoE<sup>-/-</sup>小鼠IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1和IL-6表达显著增加( $t$ 分别为4.748、2.645、7.872和4.824,  $P$ 分别为0.00316、0.0382、0.00022和0.00293), 见表3。

## 讨 论

现代医学研究认为, 高脂血症的前炎症状态与慢性持续的营养过剩有关, 伴随着炎症扩大至全身系统性炎症<sup>[1]</sup>。高脂血症可引起免疫细胞比例、表型和功能改变<sup>[4-7]</sup>。本研究中发现: 在免疫细胞比例

方面, 高脂饮食饲喂的C57BL/6小鼠TC升高, 但外周血粒细胞和单核细胞的比例无显著改变; apoE<sup>-/-</sup>小鼠外周血粒细胞比例显著升高, 高脂饮食后单核细胞比例显著增多; 在免疫细胞表型方面, 高脂饮食显著提高apoE<sup>-/-</sup>小鼠粒细胞和单核细胞CD36表达; 在免疫细胞功能方面, 无论是高脂血症敏感品系C57BL/6小鼠, 还是apoE<sup>-/-</sup>小鼠, 对于LPS刺激, 血浆IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1和IL-6水平均显著升高。因此, 高血脂引起了多方面的天然免疫异常。

值得注意的是, 高脂饮食饲喂的C57BL/6小鼠、普食饲喂的apoE<sup>-/-</sup>小鼠、高脂饲喂的apoE<sup>-/-</sup>小鼠的免疫异常并不相同。首先, 虽然C57BL/6小鼠仅仅接受高脂饮食饲喂4周, 虽然外周血粒细胞和单核细胞的比例无显著增高, 但对于LPS刺激, IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1和IL-6等炎性细胞因子分泌显著增加, 提示在高脂刺激短期内, 天然免疫反应已经增强。其次, 与高脂饮食饲喂的C57BL/6小鼠相比,



普食饲喂的apoE<sup>-/-</sup>小鼠在血粒细胞比例、LPS诱导血浆细胞因子IFN- $\gamma$ 和IL-6水平等方面均显著增高,这可能与apoE<sup>-/-</sup>小鼠由于基因缺陷,出生后即暴露于极高水平血脂有关<sup>[8]</sup>。第三,当apoE<sup>-/-</sup>小鼠在高脂饲喂后,仍出现了更严重的免疫异常,如单核细胞比例显著增高、粒细胞和单核细胞CD36表达上升、LPS刺激后血浆IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 水平进一步升高等,提示在更高的血脂压力下,天然免疫应答进一步增强,可能加剧全身免疫损伤程度。

临床研究发现高脂血症或肥胖患者的重症感染发生率显著增高,病死率也明显增高<sup>[3]</sup>,与本课题组在小鼠中的研究一致。有研究报道,高脂血症患者外周血单核细胞比例显著增高<sup>[5]</sup>,并且单核细胞出现功能性分化<sup>[5-7]</sup>。但上述改变的机制非常复杂。近期研究还发现,这种天然免疫的异常与单核细胞早期髓系造血的变化<sup>[9]</sup>,以及巨噬细胞向M1型和M2型分化有关<sup>[10-11]</sup>。此外,高血脂对于天然免疫系统内信号转导通路的影响尚需进一步研究。同时,本研究还发现高脂饮食还可导致胸腺萎缩,淋巴细胞的发育异常,这种异常可能对天然免疫应答有间接调节作用。而上述原因综合起来,可能导致系统性炎症反应加剧。

综上所述,长期的高脂饮食不仅导致高脂血症,还可引发系统性炎症反应。控制高脂血症所引发的炎症反应,不仅有助于减轻血管局部炎症反应,而且对降低机体系统性炎症反应、降低重症感染的发生率和病死率具有重要的意义。

马雅奎,王蓓蓓,韩俊燕,等. 高脂血症对炎症免疫应答的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(4): 491-494.

## 参考文献

- 1 Siasos G, Tousoulis D, Oikonomou E, et al. Inflammatory markers in hyperlipidemia: from experimental models to clinical practice. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(37): 4132-4146.
- 2 Federico A, D' Aiuto E, Borriello F, et al. Fat: a matter of disturbance for the immune system. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(38): 4762-4772.
- 3 Byard RW. The complex spectrum of forensic issues arising from obesity. *Forensic Sci Med Pathol*, 2012, 8(4): 402-413.
- 4 Raffai RL. Apolipoprotein E regulation of myeloid cell plasticity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(5): 471-478.
- 5 Swirski FK, Libby P, Aikawa E, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 195-205.
- 6 Mosig S, Rennert K, Krause S, et al. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in detoxification of oxidized LDL. *FASEB J*, 2009, 23(3): 866-874.
- 7 马雅奎, 王亚红, 韩俊燕, 等. 祛痰化瘀解毒法对高脂血症痰瘀互阻证患者单核细胞亚群异常的影响. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(1): 26-30.
- 8 Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, et al. Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(4): 338-351.
- 9 Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, et al. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 4138-4149.
- 10 Waldo SW, Li Y, Buono C, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 2008, 172(4): 1112-1126.
- 11 马雅奎, 蔺洁, 秦明照, 等. 单核-巨噬细胞亚型与动脉粥样硬化. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4(5): 658-660.

(收稿日期: 2013-05-16)

(本文编辑: 孙荣华)