

论著·基础研究

## 白细胞介素 16 对动脉粥样硬化的影响及其机制研究\*

戈 旺<sup>1,2</sup>, 王 博<sup>3</sup>, 闫凤连<sup>3</sup>, 徐国梅<sup>4</sup>, 靳 峰<sup>5</sup>, 张青青<sup>3</sup>, 马 群<sup>3</sup>, 司传平<sup>3△</sup>

(1. 青岛大学基础医学院免疫学系, 山东青岛 266071; 2. 济宁市妇幼保健计划生育服务中心, 山东济宁 272000; 3. 济宁医学院免疫学与分子医学研究所, 山东济宁 272067; 4. 济宁医学院附属医院心内科, 山东济宁 272029; 5. 济宁医学院附属医院神经外科, 山东济宁 272029)

**摘要:**目的 分析白细胞介素 16(IL-16)在动脉粥样硬化(AS)中的表达,初步探讨其在 AS 发病机制中的作用。方法 收集 2015 年 8 月至 2016 年 8 月在济宁医学院附属医院就诊并行冠状动脉造影检查确定为 AS 患者 30 例作为病例组,另选取同期该院 29 例体检健康者作为健康对照组。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血 IL-16 水平;逆转录聚合酶链式反应检测两组外周血单个核细胞 IL-16 的 mRNA 水平;免疫组化分析 AS 患者和 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉斑块组织 IL-16 表达情况;AS 小鼠腹腔注射重组 IL-16 后检测主动脉斑块变化。结果 病例组外周血 IL-16 和 IL-16 mRNA 水平高于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),AS 斑块中 IL-16 mRNA 高表达。小鼠 AS 斑块表达 IL-16,AS 小鼠腹腔注射 IL-16 后主动脉斑块面积缩小且稳定性增加。结论 IL-16 在 AS 患者外周血和 AS 小鼠斑块中均高表达,IL-16 可能对 AS 具有保护作用。

**关键词:**动脉粥样硬化; 动脉粥样硬化斑块; 白细胞介素 16

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.003

**中图法分类号:**R541.4

**文章编号:**1673-4130(2019)02-0136-04

**文献标识码:**A

## Study on effects and mechanism of interleukin 16 on pathogenesis of atherosclerosis\*

GE Wang<sup>1,2</sup>, WANG Bo<sup>3</sup>, YAN Fenglian<sup>3</sup>, XU Guomei<sup>4</sup>, JIN Feng<sup>5</sup>,  
ZHANG Qingqing<sup>3</sup>, MA Qun<sup>3</sup>, SI Chuanping<sup>3△</sup>

(1. Department of Immunology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Jining Maternal and Child Health Family Planning Service Center, Jining, Shandong 272000, China; 3. Institute of Immunology and Molecular Medicine, Jining Medical College, Jining, Shandong 272067, China; 4. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong 272029, China; 5. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong 272029, China)

**Abstract: Objective** To analyze the expression of interleukin 16 (IL-16) in atherosclerosis (AS) patients, and to study the roles of IL-16 in the pathogenesis of AS. **Methods** Thirty AS patients in Affiliated Hospital of Jining Medical College from August 2015 to August 2016 were randomly selected as the case group and twenty-nine healthy subjects were selected as the healthy control group. Peripheral blood of the subjects were collected. IL-16 levels were determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction was applied to analyze IL-16 mRNA level. IL-16 expression in the atherosclerotic plaque samples was detected with immunohistochemical analysis. IL-16 expression in aortic atherosclerotic plaque of AS patients and atherosclerotic ApoE<sup>-/-</sup> mice were analyzed by immunohistochemical staining. The aortic plaque changes of AS mice injected intraperitoneally with recombinant IL-16 were detected. **Results** Both IL-16 protein levels and IL-16 mRNA levels were higher in case group than those of healthy control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The IL-16 mRNA was highly expressed in the atherosclerotic plaque. The aortic plaque area of the mice underwent IL-16 intraperitoneal injection were decreased while the plaque stability increased. **Conclusion** IL-16 levels elevated in both AS patients and AS

\* 基金项目:山东省教育厅科技计划项目(J06L07);济宁医学院博士基金资助项目(600353002)。

作者简介:戈旺,男,主管技师,主要从事医学免疫学检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:chpsi@163.com。

本文引用格式:戈旺,王博,闫凤连,等.白细胞介素 16 对动脉粥样硬化的影响及其机制研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(2):136-

mice, which suggested that IL-16 might play a protective role against AS.

**Key words:** atherosclerosis; atherosclerotic plaque; interleukin 16

动脉粥样硬化(AS)是由血管壁中脂质滞留及其触发的免疫反应引起的一种慢性炎症性疾病。巨噬细胞、T 淋巴细胞等炎症细胞,以及多种细胞因子参与 AS 斑块形成及其稳定性下降<sup>[1-3]</sup>。白细胞介素 16(IL-16)可由 T 细胞、巨噬细胞和内皮细胞等分泌产生<sup>[4-5]</sup>。已有研究表明,IL-16 能够促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞、单核细胞及嗜酸性粒细胞的迁移,尤其对 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞具有强烈的趋化作用<sup>[6]</sup>。但是,也有研究发现 IL-16 具有抗炎作用,可增加人外周血单个核细胞中 FoxP3 的表达,并降低 T 细胞对活化信号的反应,从而发挥潜在的免疫负向调节作用<sup>[7]</sup>。IL-16 在 AS 相关疾病中的作用尚存在分歧。一方面,有研究提示 IL-16 可加剧 AS 进程使斑块趋向不稳定,从而引发卒中和心肌梗死等<sup>[8]</sup>;另一方面,IL-16 在斑块中的水平与卒中、心肌梗死等疾病呈负相关,提示 IL-16 可能具有维持斑块稳定性的作用<sup>[9]</sup>。目前,尚缺乏 IL-16 对于 AS 影响的直接证据,且 IL-16 影响 AS 的具体机制也不明确。本研究拟通过分析 AS 外周血 IL-16 水平和 AS 小鼠模型 IL-16 水平干预,初步探讨 IL-16 在 AS 患者和小鼠外周血和 AS 斑块中的表达水平,以及 IL-16 在 AS 发生、发展中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2015 年 8 月至 2016 年 8 月在济宁医学院附属医院就诊并行冠状动脉造影检查确定为 AS 的患者 30 例作为病例组,其中男 13 例,女 17 例,年龄 42~83 岁,平均 64 岁。全部病例均为新发病例。选取同期体检健康者 29 例作为健康对照组,其中男 12 例,女 17 例,年龄 36~75 岁,平均 62 岁。每位受试者空腹抽取静脉血 3 mL 入凝血管,另抽取 2 mL 入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血管备用。凝血管 2 000 r/min,离心 10 min 分离得到血清,-80 °C 保存备用。本研究经过济宁医学院附属医院伦理委员会批准,所有调查者签署知情同意书。济宁医学院附属医院病理科获取具有代表性 2 例 AS 患者颈总动脉斑块剥脱术后斑块标本备用。实验动物采用无特定病原体(SPF)级 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,养于 12 h 光照周期、恒温恒湿 SPF 环境。相关饲养及处置遵循实验动物福利原则及济宁医学院实验动物伦理委员会的要求。

**1.2 仪器与试剂** Cytation5 细胞成像酶标仪购自美国 BioTek 公司, Heraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机及 TRIzol 和逆转录试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司。FTC-200 PCR 仪购自英国 Fedbio 公司。显微镜型号为日本 OLYMPUS IX-ILL30。

IL-16 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司, SYBR Green Master Mix 购自 Vazyme 公司。兔抗人 IL-16 一抗、羊抗兔二抗及 CD3 抗体均购自英国 Abcam 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 ELISA 检测血清 IL-16 表达水平** 采用 ELISA 检测血清 IL-16 表达水平,参照 ELISA 检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)说明进行操作,绘制标准曲线,计算出 IL-16 血清水平。

**1.3.2 外周血单个核细胞 IL-16 的 mRNA 水平测定** 密度梯度法分离外周血单个核细胞。Trizol 法提取标本中单个核细胞总 RNA,逆转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR 检测(RT-qPCR)。总体系 10  $\mu$ L: SYBR Green Master Mix 5  $\mu$ L, Primer-Reverse 0.5  $\mu$ L, Primer-Forward 0.5  $\mu$ L, DDW 3  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L。PCR 反应程序为 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 40 个循环。每个样品均设置复孔并至少检测 3 次。结果分析采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法,其中  $\Delta\Delta$ Ct=(样本的 Ct 值-内参的 Ct 值)-(对照组 Ct 值-内参的 Ct 值)。

**1.3.3 重组小鼠 IL-16 的表达与鉴定** 构建 IL-16 和谷胱甘肽融合蛋白原核高表达载体 pGEX-IL16-GST,转化感受态细胞后鉴定并挑选成功转化菌落于 30 °C,空气浴摇床 80 r/min 培养过夜。待细菌浓度吸光度值达到 0.5 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG,37 °C 150 r/min 继续培养 1.5 h。离心收获细菌,提取细胞总蛋白,经 GST 吸附柱富集 IL-16+GST 融合蛋白,进一步经 Western blot 鉴定。

**1.3.4 免疫组化检测斑块中 IL-16 的表达** 从济宁医学院附属医院病理科收集患者颈总动脉内膜剥脱术后 AS 斑块石蜡切片;颈椎脱臼处死 AS 模型小鼠后,沿腹中线剪开皮肤和胸骨后取腹主动脉根部,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗去血凝块后迅速放于 4%多聚甲醛中固定 48 h,然后常规石蜡包埋切片。分别对切片进行 HE 染色和免疫组化染色,然后在显微镜(OLYMPUS IX-ILL30)下观察拍照。

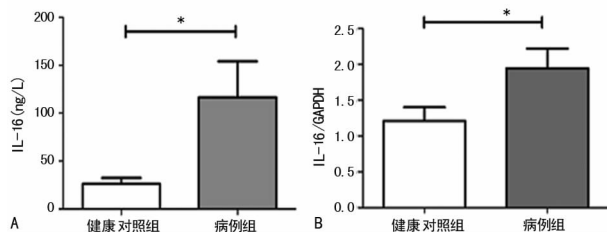
**1.3.5 IL-16 对 AS 小鼠斑块形成的影响** 采用 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠 20 只,雌雄各半,将其随机分为两组,每组 10 只。两组均给予 0.25%胆固醇和 15%可油喂食 8 周。实验组高脂喂养小鼠于第 4 周每周 1 次腹腔注射重组 IL-16(每只 2  $\mu$ g),连续注射 4 周;对照组小鼠同时给予腹腔注射同等剂量 PBS。两组均在 4 周后处死小鼠,取小鼠主动脉根部制备连续石

蜡切片。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计学软件进行分析,定量指标采用  $\bar{x} \pm s$  对数据进行基本统计学描述,利用两独立样本 *t* 检验对数据进行分析。检验水准  $\alpha=0.05, P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

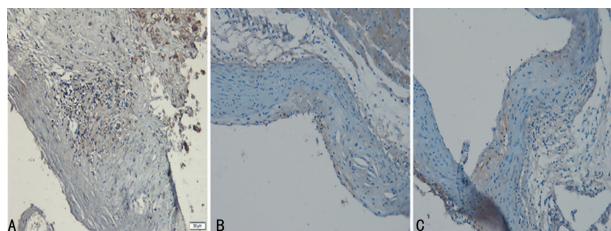
**2.1 病例组与健康对照组外周血 IL-16 水平比较** 应用 ELISA 检测研究对象外周血 IL-16 水平,病例组 IL-16 水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),见图 1A。病例组患者外周血单个核细胞中 IL-16 mRNA 水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),见图 1B。



注:A为ELISA检测外周血IL-16水平;B为RT-qPCR检测外周血单个核细胞中IL-16的mRNA水平;与健康对照组比较,\* $P<0.05$

**图 1 病例组和对照组外周血 IL-16 水平及单个核细胞中 IL-16 的 mRNA 水平比较**

**2.2 IL-16 在人和 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 AS 斑块中高表达** 通过免疫组化检测 AS 患者颈总动脉剥脱术后斑块中 IL-16 水平,发现 AS 患者 AS 斑块局部 IL-16 表达水平高于其周围非斑块区,见图 2A。免疫组化染色显示非高脂喂养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 IL-16 表达明显比高脂喂养 AS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 IL-16 表达水平低,见图 2B、2C。

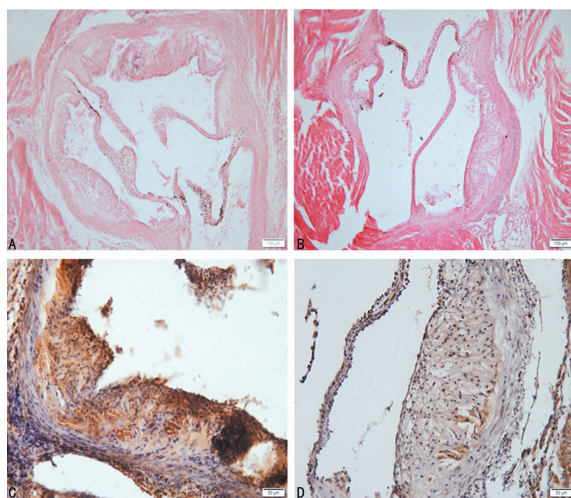


注:A为AS斑块局部IL-16表达水平;B为非高脂喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠IL-16表达水平;C为高脂喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠IL-16表达水平

**图 2 人颈总动脉剥脱术斑块应小鼠斑块 IL-16 免疫组化染色(200×)**

**2.3 腹腔注射 IL-16 可减小高脂喂养 AS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠斑块面积,提高斑块稳定性** HE 染色显示,与对照组高脂喂养 AS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔注射 PBS 的相比,注射重组 IL-16 可减小小鼠 AS 斑块的总面积,而且注射 PBS 对照组小鼠斑块中 CD3<sup>+</sup> 细胞数量明显多于注射 IL-16 小鼠主动脉斑块中 CD3<sup>+</sup> 细胞数量,见图 3。此外,与腹腔注射 PBS 的小鼠对照组 AS 斑块相比,腹腔注射 IL-16 的小鼠斑块相对稳定,并未破

裂,见图 3C、3D。



注:A为腹腔注射PBS的高脂喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠斑块HE染色(200×);B为腹腔注射IL-16的高脂喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠斑块HE染色(200×);C为腹腔注射PBS的高脂喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠斑块CD3<sup>+</sup>免疫组化染色(400×);D为腹腔注射IL-16的高脂喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠斑块CD3<sup>+</sup>免疫组化染色(400×)

**图 3 小鼠主动脉根部斑块 HE 染色和 CD3<sup>+</sup> 免疫组化染色**

## 3 讨 论

IL-16 在哮喘、过敏及风湿性关节炎等多种自身免疫性疾病中发挥促炎并加剧病情的作用<sup>[10-13]</sup>,但其在 AS 疾病中的作用尚存在分歧。一方面,李秀芹等<sup>[8]</sup>的研究发现冠心病患者 IL-16 水平较健康人群高,并据此认为体内升高的 IL-16 可能增加干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-15 等促炎细胞因子以及 CD40L 的表达,进而促进 AS 斑块的形成,促使斑块不稳定,导致冠状动脉血栓形成。另一方面,有研究报道 IL-16 在斑块中的水平可能与卒中、心肌梗死等 AS 相关疾病的发生呈负相关<sup>[9]</sup>。GRÖNBERG 等<sup>[14]</sup>的研究发现颈动脉斑块中高水平的 IL-16 与斑块的稳定性表型相关。这种稳定性表型以增加的弹性蛋白、胶原蛋白和 FoxP3 为特征,并在平均 21 个月的随访期内较少发生术后心血管事件。这提示 IL-16 可能具有维持斑块稳定和减轻疾病的作用。总之,目前的研究仅局限于观察 IL-16 和临床症状之间的关系,且研究结果存在分歧,缺乏 IL-16 影响 AS 斑块的直接证据。

本文在前人研究的基础上检测了临床患者 IL-16 的水平,证实 AS 患者外周血中 IL-16 蛋白水平及 mRNA 水平均明显高于健康人群,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),且在患者颈总动脉斑块局部发现 IL-16 高表达。提示 IL-16 与 AS 存在密切关系。为进一步研究 IL-16 对 AS 斑块的影响,本研究把诱导纯化的 IL-16 腹腔注射到 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠模型体内,发现 IL-16 可以有效地减小斑块形成、降低斑块内 CD3<sup>+</sup> 细胞的

含量、增加斑块稳定性。这提示 IL-16 在 AS 疾病中可能发挥保护性的作用。

IL-16 是一种具有多种功能的细胞因子。一般认为 IL-16 主要发挥促进炎症的作用,但也有研究发现 IL-16 具有抵抗炎症的作用。有研究者发现,IL-16 可增加 FoxP3 的表达,并降低 T 细胞对刺激的反应,具有潜在的免疫调节作用<sup>[9]</sup>。MCFADDEN 等<sup>[7]</sup>的研究表明 IL-16 优先吸引调节性 T 细胞的迁移,且被 IL-16 吸引的调节细胞表达更高水平的 FoxP3。本研究发现,IL-16 干预导致小鼠斑块局部 CD3 阳性水平显著降低,局部炎症减轻。提示 IL-16 在小鼠 AS 模型中可能更多地发挥抗炎作用,并且可能由此导致 AS 负荷的降低。

本研究结果表明,IL-16 可以减小斑块面积,减轻斑块局部炎症水平,发挥抵抗 AS 斑块形成、增加斑块稳定性的作用,提示 IL-16 在 AS 中可能发挥保护性的作用。AS 患者血清和斑块中 IL-16 的水平升高可能是由疾病导致的补偿性反应。本研究结果提示,IL-16 可能作为一种监测 AS 发展和预后的指标,也是治疗 AS 的新靶点。但本研究还存在一些不足之处,选取研究对象数量较少,后续研究会选择更大量的研究样本,以期临床提供更加可靠的参考。

#### 4 结 论

本研究通过检测 AS 患者外周血、AS 斑块组织及 AS 小鼠动脉斑块,证实 IL-16 在 AS 患者外周血和 AS 小鼠斑块中均高表达。通过腹腔注射 AS 小鼠重组 IL-16,发现 IL-16 可能具有稳定 AS 斑块的作用。

#### 参考文献

[1] ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.

[2] HANSSON G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16): 1685-1695.

[3] RAMJI D P, DAVIES T S. Cytokines in atherosclerosis: key players in all stages of disease and promising therapeutic targets[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26

(6): 673-685.

- [4] CENTER D M, KORNFIELD H, CRUIKSHANK W W. Interleukin-16[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(2): 1231-1234.
- [5] CRUIKSHANK W W, BERMAN J S, THEODORE A C, et al. Lymphokine activation of T4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes[J]. *J Immunol*, 1987, 138(11): 3817-3823.
- [6] SKUNDRIC D S. Chemotactic signaling and beyond: link between interleukin-16 and axonal degeneration in multiple sclerosis[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(11): 1761-1763.
- [7] MCFADDEN C, MORGAN R, RAHANGDALE S, et al. Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16[J]. *J Immunol*, 2007, 179(10): 6439-6445.
- [8] 李秀芹. 血浆网膜素-1、白介素-18 和白介素-16 水平与冠心病关系的研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [9] GRÖNBERG C, ASCIUTTO G, PERSSON A, et al. Endarterectomy patients with elevated levels of circulating IL-16 have fewer cardiovascular events during follow-up[J]. *Cytokine*, 2016, 85: 137-139.
- [10] MUROTA A, SUZUKI K, KASSAI Y, et al. Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Cytokine*, 2016, 78: 87-93.
- [11] 林志波, 黄海忠. 支气管哮喘儿童血清 IL-16、IL-35、MCP-1 的水平变化及临床意义[J]. *现代医院*, 2015, 15(2): 25-28.
- [12] 李阳阳, 赵明, 文连姬, 等. 白细胞介素-5 和白细胞介素-16 在变应性鼻炎患者血清中的表达及临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2015, 22(3): 135-137.
- [13] FARROKHI M, MASOUDIFAR A, DERAKHSHAN A, et al. The association of interleukin-16 gene polymorphisms with IL-16 serum levels and risk of multiple sclerosis[J]. *Immunol Invest*, 2017, 2: 1-9.
- [14] GRÖNBERG C, BENGTTSSON E, FREDRIKSON G N, et al. Human carotid plaques with high levels of interleukin-16 are associated with reduced risk for cardiovascular events[J]. *Stroke*, 2015, 46(10): 2748-2754.

(收稿日期: 2018-06-16 修回日期: 2018-09-27)