

## 动脉粥样硬化中 Toll 样受体 3 上调 $\beta$ 型干扰素的表达

万立松 胡何节 方征东 王晓天 孙小杰 葛新宝 程 灿

**摘要** 目的 观察动脉粥样硬化病变中 Toll 样受体 3 (TLR3) 与  $\beta$  型干扰素 (IFN- $\beta$ ) 表达的关系及影响。方法 下肢动脉硬化性闭塞症 (ASO) 患者 20 例, 健康对照组 20 例, 通过流式细胞术检测外周血单核细胞 TLR3 及 IFN- $\beta$  的表达。高脂饮食喂养 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠, 实验组使用聚肌胞苷酸 Poly(I:C) 腹腔注射, 对照组注射等剂量生理盐水。两日注射一次, 经 10 周后, 生化分析仪检测血浆中低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、三酰甘油、总胆固醇、葡萄糖 (Glu) 水平, ELISA 法检测血浆及动脉中 TLR3、干扰素调节因子 3 (IRF3)、IFN- $\beta$  及白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平。结果 下肢 ASO 患者外周血单核细胞 TLR3 及 IFN- $\beta$  在 ASO 组的表达阳性率均显著高于对照组; ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠中, 实验组血浆中 Glu 水平较对照组显著降低; 实验组血浆及动脉中 TLR3、IRF3、IFN- $\beta$  水平较对照组显著增加, IL-1 $\beta$  水平较对照组显著降低。结论 动脉粥样硬化病变中 TLR3 表达的增加诱导 IFN- $\beta$ , 并通过下调 IL-1 $\beta$  水平达到抗动脉粥样硬化的作用。

**关键词** 动脉粥样硬化; 单核细胞; Toll 样受体 3;  $\beta$  型干扰素

中图分类号 R 654.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1314-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.013

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是许多心血管疾病的发病基础, 现普遍推测 AS 的发病机制包

括脂质的堆积和慢性的免疫炎症反应。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 属于 I 型跨膜蛋白受体<sup>[1]</sup>。TLR3 的信号转导途径主要通过 TRIF 依赖途径<sup>[2]</sup>。TLR3 与配体结合后便通过自身的 Toll/白细胞介素 (interleukin, IL)-1 TIR 结构域与 TRIF 的 TIR 结构域结合, 并募集 TRIF 与 TLR3 结合<sup>[3]</sup>, 激动干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3), IRF3 诱导  $\beta$  型干扰素 (interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ ) 等的表达<sup>[4]</sup>。Guarda et al<sup>[5]</sup> 的研究表明: IFN- $\beta$  抑制 IL-1 $\beta$  前体的利用率和作为在巨噬细胞中加速 AS 病变最主要的促炎因子之一的 IL-1 $\beta$  的成熟, 并抑制人原始单核细胞中 IL-1 $\beta$  的生成。

该研究拟采用流式细胞术、ELISA 等方法检测血浆及动脉中的炎症因子, 初步了解 TLR3 在 AS 免疫炎症反应中的机制及治疗作用, 为下肢动脉硬化性闭塞症 (arteriosclerosis obliterans, ASO) 患者的免疫治疗奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病例资料

**1.1.1 ASO 组** 其中男 12 例, 女 8 例, 年龄 52 ~ 87 岁, 中位年龄 63 岁。有明显下肢皮温减低, 患侧下肢足背动脉搏动未触及, 间歇性跛行距离 < 200 m, 下肢动脉 CTA 见下肢动脉广泛性不规则狭窄及钙化影, 确诊为下肢 ASO 患者 (合并疾病: 合并糖尿病及冠心病患者 3 例; 合并糖尿病患者 1 例; 合并冠心病患者 5 例)。

**1.1.2 健康组** 其中男 11 例, 女 9 例, 年龄 46 ~ 79 岁, 中位年龄 59 岁。无明显下肢间歇性跛行症状,

2017-04-11 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1408085MH177)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 万立松, 男, 硕士研究生;

胡何节, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huhejie@hotmail.com

growth factor (PDGF) of rat distal PSMCs in each group. **Results** Normal rats lung tissue express TLR4, however TLR4 expression level in model group of COPD rats lung tissue obviously higher than normal group ( $P < 0.05$ ). The levels of IFN- $\gamma$ , IL-6 and PDGF in the PSMCs of LPS group were significantly higher than those in the control group. TLR4 expression level was positively related to the concentration of IFN- $\gamma$ , IL-6 and PDGF ( $r = 0.91, 0.89, 0.83, P < 0.05$ ). **Conclusion** TLR4 may participate in regulating the synthesis and secretion of PSMCs.

**Key words** chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary artery smooth muscle cell; Toll like receptor-4; synthesis and secretion function

双侧足背动脉搏动有力(无合并疾病)。所有程序遵守赫尔辛基宣言,所有患者和健康对照者以书面形式告知并同意参加本研究。

**1.2 实验小鼠** SPF级环境下使用高脂饮食喂养5周龄 ApoE<sup>(-/-)</sup>小鼠(苏州爱尔麦特科技有限公司)10周,共24只,雌鼠雄鼠各12只。所有实验动物的饲养及处理按照实验动物伦理要求进行操作。

**1.2.1 实验组** 14只 ApoE<sup>(-/-)</sup>小鼠(雌鼠7只,雄鼠7只)隔日行聚肌胞苷酸 Poly(I:C)20 μg (0.2 g/L)(美国 Abcam 公司)腹腔注射。10周后处死小鼠,取出外周血标本加 EDTA 后离心,吸取上清液后-80℃冻存。取出动脉标本后直接在-80℃中冻存待检测。

**1.2.2 对照组** 10只 ApoE<sup>(-/-)</sup>小鼠,雌鼠5只,雄鼠5只,隔日行0.9%生理盐水0.1 ml腹腔注射。10周后处死小鼠,取外周血血浆及动脉标本后冻存,方法同上。

### 1.3 方法

**1.3.1 流式细胞术检测 TLR3 及 IFN-β** 采静脉血0.2 ml,EDTA 抗凝,首先加入抗人 CD14 FITC 标记抗体 5 μl(0.2 g/ml,美国 eBioscience 公司)4℃避光孵育 15 min,后加入红细胞裂解液 600 μl(北京索莱宝生物科技公司),轻轻颠倒混匀后 4℃冰箱内避光静置 15 min,其间轻轻漩涡混匀两次。见溶液呈清亮透明状后 2 500 r/min 离心 10 min,小心吸弃上清液后重悬细胞,再次按上述方法离心后弃上清液。加入 0.5 ml 4% 多聚甲醛溶液(北京索莱宝生物科技公司)重悬细胞固定 10 min 后 2500 r/min 离心 10 min,弃上清液。破膜剂处理细胞后洗涤细胞,加入 0.9% 生理盐水 200 μl 重悬细胞,加入抗人 CD283(TLR3) PE 标记抗体 5 μl(0.2 g/ml,美国 eBioscience 公司)和抗人 IFN-β APC 标记抗体 5 μl

(0.2 g/ml,美国 Lifespan Bioscience 公司),同时对对照管加入 5 μl IgG1 PE 标记抗体(0.2 g/ml,美国 eBioscience 公司),4℃避光孵育 30 min 后待检测。

**1.3.2 流式细胞仪检测分析** 用 EXPO32 采集分析软件收集 50 000 个细胞。以 CD14-FITC 和 SSC 双参数散点图设门方法圈定 CD14 单核细胞群。每样品设同型对照(IgG1-PE),使同型对照的阳性率在 2% 以下,检测并分析单核细胞的 TLR3、IFN-β 的阳性表达率,结果以 TLR3、IFN-β 阳性百分率表示。

**1.3.3 小鼠血浆检测** 血清中高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、葡萄糖(glucose, Glu)水平的检测采用 iChem-340 全自动生化分析仪(深圳市库贝尔生物科技股份有限公司)。

**1.3.4 ELISA 法检测小鼠血浆及动脉中 TLR3、IRF3、IFN-β 及 IL-1β 水平** 加入 EDTA 的血浆待检测,等质量的动脉标本加入等量 PBS 匀浆后离心吸取同体积上清液后待检测。按照 ELISA 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)说明书步骤测定上清和血浆中的 TLR3、IRF3、IFN-β 及 IL-1β 水平。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较均采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ASO 组与对照组外周血单核细胞中 TLR3 阳性表达率比较** 与对照组(图 1B)相比,ASO 患者(图 2B)外周血单核细胞中 TLR3 表达阳性率显著增加,差异有统计学意义 [(7.080 ± 1.487)% vs (5.110 ± 1.466)%  $P < 0.001$ ]。

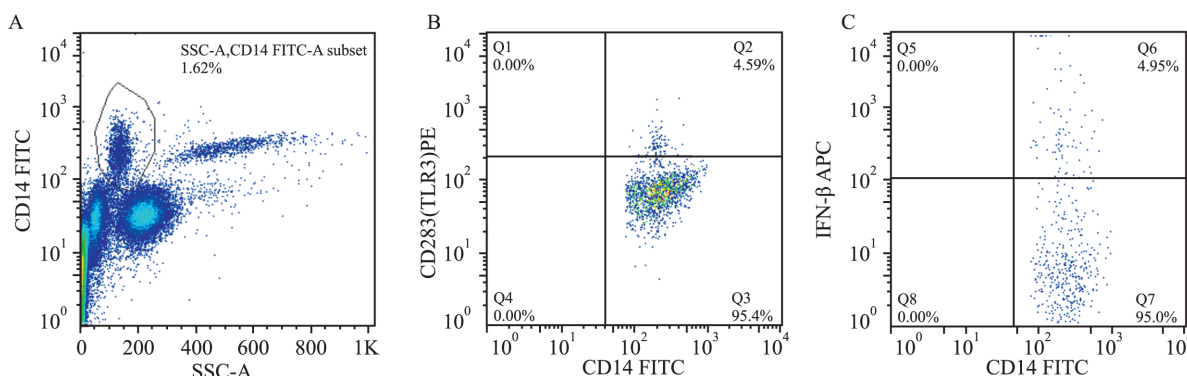


图1 流式细胞术检测人体对照组外周血单核细胞中 TLR3 和 IFN-β 表达阳性率

A:SSC-A、CD14-FITC 设门圈定 CD14 单核细胞群;B:CD14 单核细胞中 TLR3 表达阳性率(4.59%);C:CD14 单核细胞中 IFN-β 表达阳性率(4.96%)

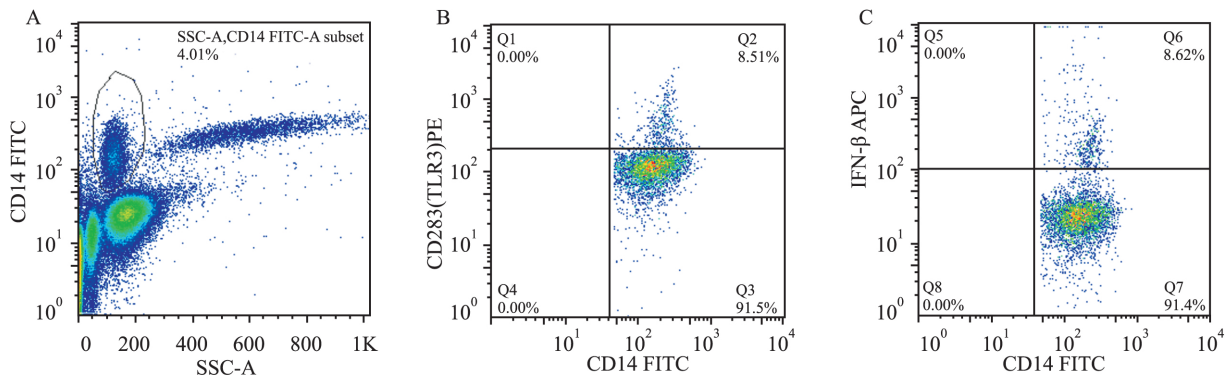


图2 流式细胞术检测 ASO 患者外周血单核细胞中 TLR3 和 IFN-β 表达阳性率

A:SSC-A、CD14-FITC 设门圈定 CD14<sup>+</sup> 单核细胞群; B:CD14<sup>+</sup> 单核细胞中 TLR3 表达阳性率(8.51%); C:CD14<sup>+</sup> 单核细胞中 IFN-β 表达阳性率(8.62%)

**2.2 ASO 组与对照组外周血单核细胞中 IFN-β 阳性表达率比较** 与对照组(图 1C)相比, AS 患者(图 2C)外周血单核细胞中 IFN-β 表达阳性率显著增加,差异有统计学意义 [(6.316 ± 2.264)% vs (4.021 ± 1.866)% *P* < 0.01]。

**2.3 实验组与对照组小鼠血浆中 Glu 水平比较** 与对照组 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠相比,实验组 LDL-C、HDL-C、TG、TC 水平差异无统计学意义;与对照组 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠相比,实验组 Glu 水平显著降低,差异有统计学意义(*P* = 0.0000),见表 1。

表1 小鼠血浆中 LDL-C、HDL-C、TG、TC、Glu 水平(*n* = 24  $\bar{x} \pm s$ )

项目	实验组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
LDL-C (mmol/L)	5.293 ± 0.945	5.390 ± 0.536	0.293	0.572
HDL-C (mmol/L)	4.082 ± 1.379	4.509 ± 1.791	0.661	0.536
TG (mmol/L)	2.599 ± 0.376	3.220 ± 1.177	1.861	0.078
TC (mmol/L)	8.793 ± 1.953	9.791 ± 1.768	1.283	0.213
Glu (mmol/L)	5.714 ± 0.268	8.534 ± 0.456	19.065	0.000

**2.4 实验组与对照组小鼠血浆及动脉中 TLR3、IRF3、IFN-β、IL-1β 水平比较** 与对照组 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠相比,实验组血浆及动脉中 TLR3 水平显著增加;与对照组 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠相比,实验组血浆及动脉中 IRF3 水平显著增加;与对照组 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠相比,实验组血浆及动脉中 IFN-β 水平显著增加;与对照组 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠相比,实验组血浆及动脉中 IL-1β 水平显著减少。见表 2。

### 3 讨论

下肢 ASO 是全身性 AS 在肢体局部的表现,是一种慢性炎症和免疫性疾病。现在普遍推测 TLR2 和 TLR4 促进动脉粥样硬化性疾病的发展。在许多

表2 小鼠血浆、动脉中 TLR3、IRF3、IFN-β、IL-1β 水平(*n* = 24  $\bar{x} \pm s$ )

项目	实验组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
血浆中 TLR3 (μg/L)	6.535 ± 0.788	3.516 ± 0.682	3.792	0.000
动脉中 TLR3 (μg/L)	6.853 ± 1.167	3.124 ± 0.323	8.753	0.000
血浆中 IRF3 (ng/L)	78.162 ± 9.387	59.382 ± 3.532	5.999	0.000
动脉中 IRF3 (ng/L)	82.828 ± 7.092	58.885 ± 4.604	9.333	0.000
血浆中 IFN-β (ng/L)	28.465 ± 2.649	21.962 ± 1.414	7.050	0.000
动脉中 IFN-β (ng/L)	27.730 ± 2.145	21.461 ± 1.721	7.638	0.000
血浆中 IL-1β (ng/L)	12.233 ± 2.059	16.936 ± 1.594	6.033	0.000
动脉中 IL-1β (ng/L)	59.883 ± 9.016	88.331 ± 4.964	9.013	0.000

研究<sup>[4-5]</sup>中显示 TLR3 可以产生许多阻止 AS 病变进程发展的因子。

Cole et al<sup>[6]</sup> 的研究发现 TLR3 基因的缺陷加速了动脉损伤中弹性内膜的破坏。Poly(I:C) 治疗后的小鼠动脉损伤程度较对照组明显减轻。Gao et al<sup>[7]</sup> 的研究表明树突状细胞(dendritic cells, DCs)在 AS 病变的动脉壁内聚集,并参与炎症免疫反应。TLR3 的配体 Poly(I:C) 能够诱导 DCs 成熟<sup>[8]</sup>。TLR3 的表达增加是否能够促进 DCs 的分化成熟,其在 DCs 中发挥免疫应答作用或免疫耐受作用的具体机制如何尚不十分清楚,有待进一步的研究发现。

本研究采用流式细胞术检测下肢 ASO 患者外周血单核细胞中 TLR3 及 IFN-β 的表达阳性率,ELISA 法检测 AS 小鼠模型血浆及动脉中炎症因子,初步了解 AS 中 TLR3 表达与 IFN-β 的关系及对 AS 的影响。结果表明:下肢 ASO 患者外周血单个核细胞中 TLR3 的表达阳性率及 IFN-β 表达阳性率均显著高于对照组。表明在下肢 ASO 病变进程中 TLR3 的表达增加,且 IFN-β 的表达也同样增加。AS 小鼠

模型血浆及动脉中 TLR3、IRF3、IFN- $\beta$  的表达显著增高, IL-1 $\beta$  的表达显著减少。其可能的机制是: 在 AS 病变进程中 TLR3 的表达上调, 诱导单核细胞分泌 IFN- $\beta$  并通过 IFN- $\beta$  抑制 IL-1 $\beta$  前体的利用率和 IL-1 $\beta$  的成熟, 并抑制人原始单核细胞中 IL-1 $\beta$  的生成。通过这一途径达到阻止 AS 病变进程进一步发展的目的。值得一提的是, Poly(I:C) 处理的小鼠血浆中 Glu 水平显著低于对照组小鼠, 这一变化的具体机制值得深入研究。

综上所述, AS 病变中可能通过 TLR3-TRIF 信号转导途径上调 IRF3, 并通过 IRF3 上调 IFN- $\beta$  的表达。IFN- $\beta$  的表达增加抑制了 IL-1 $\beta$  前体的利用率, 从而抑制 IL-1 $\beta$  的成熟及生成。通过这一通路阻止 AS 病变进程进一步发展。本研究为后续的 TLR3 受体激动剂 poly(I:C) 对 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠 AS 治疗作用的研究提供了实验基础。

### 参考文献

[1] Kuo W T, Lee T C, Yu L C. Eritoran suppresses colon cancer by altering a functional balance in toll-like receptors that bind lipopolysaccharide[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(16): 4684-95.

- [2] Monaco C, Terrando N, Midwood K S. Toll-Like receptor signaling: common pathways that drive cardiovascular disease and rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011, 63(4): 500-11.
- [3] Matsumoto M, Funami K, Tatematsu M, et al. Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 535: 149-65.
- [4] Patel A A, Lee-Lewis H, Hughes-Hanks J, et al. Opposing roles for interferon regulatory factor-3 (IRF-3) and type I interferon signaling during plague[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(7): e1002817.
- [5] Guarda G, Braun M, Staehli F, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation[J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 213-23.
- [6] Cole J E, Navin T J, Cross A J, et al. Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2372-7.
- [7] Gao W, Liu H, Yuan J, et al. Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- $\alpha$  mediated NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2318-27.
- [8] Han H D, Byeon Y, Kang T H, et al. Toll-like receptor 3-induced immune response by poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for dendritic cell-based cancer immunotherapy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 2(11): 5729-42.

## Toll-like receptor 3 increase the expression of interferon- $\beta$ in atherosclerosis

Wan Lisong, Hu Hejie, Fang Zhengdong, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the relationship and influence of Toll-like receptor 3 (TLR3) and interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) expression in atherosclerotic lesions. **Methods** In human subject, 40 subjects were enrolled. All subjects were divided into two groups: patients with arteriosclerosis obliterans (ASO) ( $n=20$ ), control group ( $n=20$ ). The positive rates of TLR3 and IFN- $\beta$  in human peripheral blood monocytes were measured by flow cytometry. ApoE<sup>(-/-)</sup> mice were fed in high-fat diet. The mice in experimental group were injected intraperitoneal (ip) by Poly(I:C), The mice in control group were injected ip by normal saline. Every dose was injected once every two days for 10 weeks. Levels of high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), glucose (Glu) in plasma were tested by biochemical analyzer. Levels of TLR3, IRF3, IFN- $\beta$  and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in plasma and aorta were tested by ELISA method. **Results** The expression rates of TLR3 and IFN- $\beta$  in ASO group were significantly higher than those in control group. In ApoE<sup>(-/-)</sup> mice, level of Glu in plasma in experimental group was significantly lower than that in control group, level of TLR3, IRF3, IFN- $\beta$  in plasma and aorta in experimental group were significantly higher than those in control group, level of IL-1 $\beta$  in plasma and aorta in experimental group was significantly lower than that in control group. **Conclusion** The increased expression of TLR3 in as induced expression of IFN- $\beta$ , which achieved the role of anti-arteriosclerosis by down-regulating the level of IL-1 $\beta$ .

**Key words** arteriosclerosis; monocytes; Toll-like receptor 3; interferon- $\beta$