

哮喘患者肺泡巨噬细胞 中 IL-6 mRNA 表达的研究

Investigation of Interleukin-6 mRNA Expression in Asthmatic Alveolar Macrophages

陈一强 施焕中 柳广南 钟小宁 梁国容 许辉
Chen Yiqiang Shi Huangzhong Liu Guangnan Zhong Xiaoning Liang Guorong Xu Hui

(广西医科大学一附院呼吸内科 南宁市滨湖路6号 530027)
(Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of
Guangxi Medical University, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530027)

摘要 应用逆转录酶链反应及索氏转移杂交技术分析过敏性支气管哮喘患者(激素治疗组9例,非激素治疗组12例)及正常对照组(10例)肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的mRNA表达。IL-6/ β -actin比值表示。结果发现未用激素治疗的哮喘患者AM的IL-6/ β -actin为 0.66 ± 0.32 ,显著高于正常对照者(0.34 ± 0.13 , $P < 0.01$)及激素治疗组(0.41 ± 0.15 , $P < 0.05$)。提示表达IL-6的AM在哮喘的发病机理中可能具有重要的作用,而皮质激素治疗哮喘的机制之一可能与其抑制AM表达及产生IL-6的能力有关。

关键词 白细胞介素-6 基因表达 巨噬细胞 哮喘

Abstract The interleukin-6 (IL-6) mRNA expression was analyzed in alveolar macrophage (AM) from allergic asthmatics treated with corticosteroid (9 cases) or not (12 cases), as well as normal subjects (10 cases). This was achieved by using reverse transcription-polymerase chain reaction and Southern blots techniques. The result was described by IL-6/ β -actin ratio and was found that the $\bar{x} \pm s$ of IL-6/ β -actin ratio in AM from asthmatics without corticosteroid treatment was 0.66 ± 0.32 , which significantly higher than that from either normal subjects (0.34 ± 0.13 , $P < 0.01$) or asthmatics treated with corticosteroid (0.41 ± 0.15 , $P < 0.05$). These results suggest that AM expression of IL-6 may be important in pathogenesis of human asthma, and that one respect of mechanisms of corticosteroid in asthma treatment may be inhibition of IL-6 and thus suppression of inflammation in airway.

Key words interleukin-6, gene expression, alveolar macrophage, asthma

已经明确知道以激活嗜酸性粒细胞及肥大细胞浸润为特征,累及大小气道的炎症反应可以导致哮喘患者的气道功能障碍。炎症细胞在气道的聚集,提示气道的炎症过程与局部产生的某些细胞因子有关。IL-6由于能刺激B淋巴细胞产生免疫球蛋白,并能促使T淋巴细胞活化、增殖及分化等^[1],从而介入炎症反应过程。本实验检测了哮喘患者及正常人肺泡巨噬细胞(AM)IL-6的mRNA表达情况,旨在探讨IL-6的哮喘发病机理中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究的对象

21例过敏性哮喘患者(男14例,女7例,年龄 41.6 ± 6.9 岁)及10例健康非过敏性体质正常人(A组男6例,女4例年龄 35.1 ± 2.8 岁)参与了本研究。全部受试者均无吸烟史。哮喘的诊断及其病情评价系根据病史,肺功能及其气道乙酰胆碱激发试验结果等资料综合判定。有无过敏性体质系根据一系列常见吸入性抗原皮肤试验确定。哮喘患者于实验时均有轻度症状发作,并分为2组:B组12例,本组患者必要时

1996-03-24 收稿。

给予 β 2-受体激动剂治疗。于实验前至少6个月无皮质激素用药史；C组9例，本组除了给予B组相同的治疗外，另给为期2周的强的松口服（0.6 mgkg⁻¹.d⁻¹）治疗。

1.2 分离AM

AM的收集是通过支气管肺泡灌洗来获得。100 mL 无菌生理盐水分5次注入并轻轻回收，收集的灌洗液离心后弃去上清液，将细胞加入无血清的RPMI-1640细胞培养液中，将细胞悬液移入直径为100 mm 塑料平皿并置于37℃含有5%CO₂的潮湿环境孵化15 min，将未粘附的细胞轻轻吸出弃去，低层粘附的细胞97%以上为AM。以冷生理盐水将AM洗涤2次。

1.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

细胞总RNA系根据LEMEUR等^[2]所报道的方法并加以改良提取，RNA经70%乙醇清洗之后再溶于300 μ L 无RNA酶的双蒸水中，以无水乙醇沉淀，真空干燥，最后溶于100 μ L 水中，并于260 nm 波长测其吸收光密度以定量。将RNA加样于2%溴乙锭染色的琼脂凝胶上电泳，然后观察其28 S及18 S RNA以确认RNA。每例受试者取1 μ g RNA 加入逆转录体系：逆转录酶2.5 U/ μ L，各种脱氧核苷酸1 mM，RNA酶抑制剂1 U/mL，自由引物2.5 mM，10X PCR缓冲液（KCL 500 mM 100 mM Tris-盐酸；pH值8.3），MgCl₂ 5 mM，反应总体积为20 μ L。将反应混合物置于42℃孵化20 min，然后于99℃灭活5 min，逆转录所生成的cDNA冻存于-20℃备用。

将cDNA分别置于加于IL-6或 β -actin特异性引物的两个反应体系中进行扩增。IL-6引物扩增386-bp的PCR产物，其顺序为：5'端，ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC，3'端，AGGTACTCTAGGTATACCTCAAACCTCC。 β -actin引物扩增500-bp的PCR产物，其序列为，5'端，GAAATCGTGCGTGACATTAAG，3'端，CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGGGCC。

PCR体系含有PCR缓冲液，MgCl₂ 2 mM，各种脱氧核苷酸100 μ M，Tag聚合物1.9 U，各种引物0.5 μ M，总体积为50 μ L。PCR于Perin-Eler/Cetus扩增仪上进行。反应过程为94℃变性2 min，50℃退火2 min，72℃延伸2 min。最后，PCR于4℃终止反应。

将PCR产物加样于1.5%溴化乙锭染色的琼脂凝胶进行电泳，并将结果摄成照片。

RT-PCR产物的特异性通过索氏转移杂交得以证实。将RT-PCR产物电泳后于碱性条件下转移到

HybonN+尼龙膜(Amersham Arlington Height, IL)，然后与5'末端标记的特异性寡核苷酸探针进行杂交。探针的核苷酸序列为：IL-6，5'CTCCT-CATTGAATCCAGATTGGAAGCATCC3'； β -actin，5'GGCGCTCCATCCTGGCCTCG3'。感光自显影后的信号以激光密度仪定量。所扩增的IL-6水平以IL-6/ β -actin比值表示。

1.4 统计学方法

数据以均数±标准差表示。各组间资料比较采用配伍组间方差分析。

2 结果

2.1 IL-6和 β -actin特异性扩增

图1显示来自1例哮喘患者的mRNA扩增结果。与碱基对标准作对照可以判定扩增物的分子量大小：IL-6为386-bp而 β -actin为500-bp。我们未见到碱基对数更大的扩增带，说明无染色体DNA扩增。索氏转移杂交结果证实所扩增的cDNA确为IL-6和 β -actin。

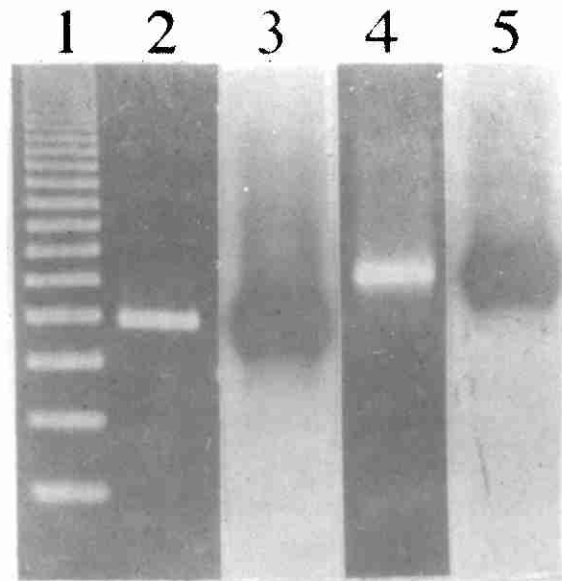


图1 11例哮喘患者IL-6及 β -actin扩增和索氏转移杂交结果

Fig.1 The amplification products of IL-6 and β -actin from an asthmatics' AM obtained by RT-PCR and Southern blots techniques

1为100-bp分子量标准 Lane 1 shows the 100-bp marker ladder; 2示扩增的IL-6电泳带(386-bp) Lane 2 shows a photograph ethidium bromide-stained pattern of IL-6(386-bp); 3为其自显影结果 Lane 3 is its autoradiographic signal.; 4示 β -actin的扩增带(500-bp) Lane 4 shows a photograph of ethidium bromide-stained pattern of β -actin(500-bp); 5为其杂交自显影结果 Lane 5 is its autoradiographic signal.

2.2 哮喘患者及正常人 IL-6 mRNA 表达的比较

IL-6 和 β -actin 的扩增分别进行 30 和 40 次循环。结果见图 2。未经激素治疗的哮喘 AM 的 IL-6/ β -actin 比值 (0.66 ± 0.32) 显著高于强的松治疗组 (0.41 ± 0.15 , $P < 0.05$) 及正常人 (0.34 ± 0.13 , $P < 0.01$), 而激素治疗组及正常人之间 IL-6/ β -actin 比值则无明显差异。

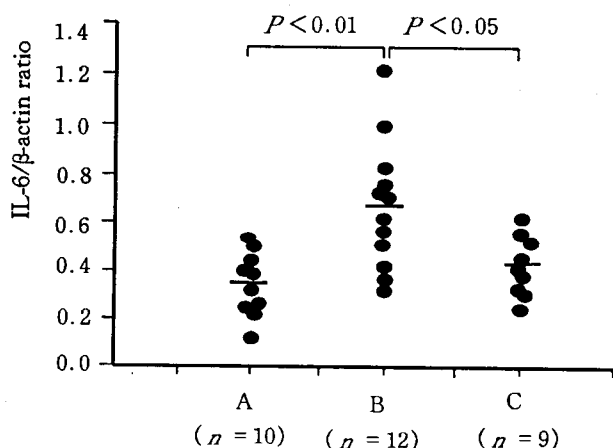


图2 哮喘患者和正常人 IL-6/ β -actin 比值的比较

Fig. 2 IL-6/ β -actin ratio in AM from asthmatics and normal subjects

A: 正常对照组 Normal subjects; B: 非激素治疗组 Asthmatics without corticosteroid treatment; C: 激素治疗组 Asthmatics treated with corticosteroid.

3 讨论

有报道示哮喘患者 BALF 中 IL-6 的水平明显升高^[3]。Gosset 等^[4]发现过敏性哮喘患者 AM 比正常人 AM 具有更强的分泌 IL-6 的能力。本实验中, 我们的资料显示未经激素治疗的哮喘患者, 其 AM 表达的 IL-6 mRNA 明显高于正常人的水平 ($P < 0.01$)。但我们未能观察到经激素治疗后患者 AM 所表达的 mRNA 与正常人之间的差别 ($P > 0.05$) 我们从 mRNA 的水平研究 AM 的 IL-6 表达情况, 以更精确分析 AM 在体内表达 IL-6 基因的情形。我们的资料提示 AM 及其所分泌的细胞因子可能在哮喘的发病机理中发挥重要的免疫调节作用。

IL-6 在哮喘发病机理中的作用至今尚未完全明了。由于 IL-6 能激活 T 淋巴细胞及自然杀伤细胞^[1]。而 T 淋巴细胞及自然杀伤细胞的激活则为哮喘的特征性变化^[5,6], 因此, 有理由认为 IL-6 至少有助于哮喘的特征性变化。IL-6 还能作用于 B 淋巴细胞并促使其合成和分泌 IgE^[7]。而且, 有报道指出^[8], IL-6 对成纤维细胞及气道上皮细胞的生长有明显的抑制作用。因而认为来自 AM 的 IL-6 具有加剧哮喘时气道

炎症反应的假说。

我们的资料还显示未经激素治疗的哮喘患者其 AM 中 IL-6/ β -actin 比值显著高于激素治疗组水平 ($P < 0.05$)。说明皮质激素具有抑制 AM 表达 IL-6 的作用。我们知道, 激素对于治疗哮喘具有重要的意义, 而雾化吸入激素治疗哮喘已被广泛接收。激素能有效地控制哮喘的一个机制, 是通过抑制脂类介质的产生从而抑制炎症反应^[10]。然而, 另一机制可能也与其抑制某些细胞因子包括 IL-6 的产生从而抑制炎症过程有关。最近的研究表明皮质激素的特异性受体的基因位于 IL-2 基因的上游强化因子区域^[11], 当我们获得全部细胞因子调节的认识之后, 我们很可能找到某种途径特异性地介入细胞炎症反应过程。

需要指出的是, 本实验中哮喘患者都服用 $\beta 2$ -受体兴奋剂。 $\beta 2$ -受体兴奋剂可能对 AM 表达 IL-6 产生某种影响。事实上, $\beta 2$ -受体兴奋剂可以使细胞内环磷酸腺苷浓度升高。我们尚无法排除其以同样的机理增强细胞对某些细胞因子表达的可能性。所以为了尽可能消除 (至少部分消除) $\beta 2$ -受体兴奋剂对观察结果的影响, 我们于实验前对病人和正常对照者都与以 200 μ g 喘乐宁雾化吸入。

总而言之, 本实验中我们的结果显示哮喘患者 AM 表达较高水平的 IL-6 mRNA, 而皮质激素能抑制 IL-6 在 AM 的表达, 这样就提示 IL-6 在哮喘的炎症反应中具有重要的作用。IL-6 在哮喘发病机理中的精确作用则有待于进一步研究。

致谢

日本国爱媛大学医学部横山彰仁博士在本实验过程中给予热情帮助和指导, 特此表示感谢。

参考文献

- 1 Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood 1989, 74: 1.
- 2 Lemeur M, Glanville N, Mandel J L et al. The ovalbumin gene family: hormonal control of α and γ gene transcription and mRNA accumulation. Cell, 1981, 23: 561.
- 3 Broide D H, Lotz M, Cuomo A et al. Cytokines in symptomatic asthma airway. J Allergy Clin Immunol, 1992, 89: 958.
- 4 Gosset P, Tscicopoulos A, Wallaert B et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. Am Rev Respir Dis, 1992, 146: 768.
- 5 Gerblin A A, Salik H, Schuyler M R et al. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after

- antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Res Respir Dis*, 1991, 143: 533.
- 6 Timonen T, Stenius-Aarniala B. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol*, 1985, 59: 85.
- 7 Vercelli D, Jabara H H, Araik K et al. Endogenous interleukin-6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur J Immunol*, 1989, 19: 1419.
- 8 Kohase M, Henriksen-DeStefano D, May L T et al. Induction of beta interferon by tumor necrosis factor; a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell*, 1986, 45: 659.
- 9 Takizawa H, Ito K. Interleukin-6 receptors on human bronchial epithelial cells. *Jpn J Thoracic Dis (in Japanese)*, 1992, 30 (suppl): 77.
- 10 Goulding N J, Godolphin J L, Gharland P R et al. Anti-inflammatory lipocortin-1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *Lacet*, 1990, 335: 1416.
- 11 Riegel J S, Corthesy B, Flannagan W M et al. Regulation of the interleukin-2 gene. *Interleukins: molecular biology and immunology. Chem Immunol*, 1992, 51: 266.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)

桂林新技术产业开发区

桂林是享誉中外的风景游览城市 and 历史文化名城, 千峰环立, 一水抱城, 山青水秀, 石美洞奇, 素有“桂林山水甲天下”之美誉。桂林市总面积 4196 km², 总人口 128 万, 其中市区面积 565 km², 人口 53 万, 年均接待国内外宾客 800 万人次, 桂林不仅具有世界闻名的旅游资源, 而且具备中外实业家投资经营的良好条件。

桂林是中国大西南的一个重要城市, 桂北地区政治、经济、文化中心。广西对外开放的窗口。桂林生态环境优美洁净, 城市基础设施完美, 交通发达, 通讯便捷, 拥有橡胶、医药、电子、机械、纺织、轻工食品和工艺美术等主要支柱产业。

桂林科技力量雄厚, 共有 13 所大专院校, 21 所中等专业学校, 12 所技工学校, 13 所中央部属和自治区属科研设计院所, 8 处国家级, 部级产品检测中心, 9 处国际贸易展览中心, 培训中心, 科技交流中心和数十家大中型骨干企业, 拥有配套的科研仪器, 生产设备和教学设施。近年来取得了近 3000 项科研成果, 在多项领域的研究、开发和应用方面处于国内先进水平。有的达到国际先进水平。这些科技机构大部分座落在开发区内。

桂林新技术产业开发区是经国务院批准的首批国家高新技术产业开发区, 也是全国少数民族地区的第一个国家级开发区。开发区享有国家和地方政府赋予的各项优惠政策。桂林市委、市政府在开发区实行统一领导、统一开发、统一管理的封闭式管理体制, 贯彻“封闭管理、全市共建、外引内联、政策灵活”的发展方针, 开发区的投资环境日臻完善。

地理位置: 开发区位于桂林市区东部, 秀丽的漓江绕区而流。开发区区域面积 21.67 km², 其中新建区 10.6 km²。

交通运输: 开发区距离桂林火车站仅 2 km, 拥有铁路专用线和桂林东站货站, 湘桂铁路南北纵贯; 漓江水运汇珠江经梧州致南海; 桂梧公路、桂柳高速公路联系东南和西南出海通道; 桂林飞机场距开发区 12 km, 拥有 29 条飞往国内各主要城市的国内航线和一条直飞香港的国际航线。将于 1996 年投入使用的桂林两江国际机场将进一步改善开发区的投资环境。

基础设施: 拥有日供水 6 万吨的东江自来水厂, 总容量为 18.3 万 kW 的 3 座变电站; 2 万门程控电话系统和无线寻呼、移动通信的七星邮电分局以及日排放能力 4 万吨的七里店污水净化厂。配套服务设施: 银行、海关、商检、宾馆、酒家、娱乐中心、学校、医院、高级公寓等机构设施一应俱全。

科教实力: 拥有各类专业技术人员 3.8 万人, 在校大中专学生 23 万人。拥有高等学校 7 所, 技工学校 12 所, 各类技工学校和职业技术学校每年培养出大批高素质员工。

(本刊编辑部)