维普资讯 http://www.cqvip.com

370-373

第21卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.4
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

IL-12对新生儿IFN-γ产生的影响

儿童医院免疫室 蒋利萍 李成荣 吴仕孝 杨锡强 王莉佳

提 要 白细胞介素12(IL-12)是一种重要的细胞因子，由单核/巨噬细胞、B细胞产生，通过诱导T细胞和NK细胞产生γ干扰素(IFN-γ)在细胞免疫反应中发挥多种作用。新生儿产生IL-12的能力鲜见报道。本文用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测8例新生儿脐血单个核细胞(CBMC)IL-12P_{40}mRNA和IFN-γmRNA表达；及ELISA法测新生儿CBMC培养上清IFN-γ浓度；并观察重组IL-12(rIL-12)对新生儿IFN-γ产生的影响。结果显示：新生儿CBMCIL-2p_{40}mRNA和IFN-γmRNA表达水平较成人PBMC低下、新生儿IFN-γ水平明显低于成人。rIL-12能增强抗CD_3和PMA刺激的新生儿CBMC产生IFN-γ，使其达成人水平。本文提示：新生儿IL-12表达水平低下可能在新生儿细胞免疫功能暂时性低下中起重要作用。

关键词 IL-12p_{40};mRNA;rIL-12;IFN-γ;婴儿;新生儿
中图分类号 R392.11

白细胞介素12(IL-12)是由单核/巨呼噬细胞、B细胞产生的多功能多效应细胞因子，主要作用是促进Th1细胞和自然杀伤细胞(NK//ce11)产生γ-干扰素(IFN-γ)，介导细胞免疫[1]。新生儿脐血单个核细胞(CBMC)产生IL-12的能力鲜见报道。仅文献报道重组IL-12(rIL-12)在体外能促进新生儿CD_4^+T细胞产生IFN-γ[2]。本文用逆转录——聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测8例新生儿CBMC体外表达IL-12p_{40}碳mRNA和IFN-γmRNA，用单克隆抗体酶联免疫吸附试验(ELISA)测定8例新生儿CBMC培养上清的IFN-γ，并进一步观察γIL-12对新生儿IFN-γ产生及其mRNA表达的影响。发现新生儿IL-12p_{40}mRNA和IFN-γ表达较成人为低，外源性γIL-12能使新生儿IFN-γ达成人水平。结果报道如下：

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 健康新生儿：8例足月顺产新生儿为研究对象，平均胎龄为38$\frac{3}{7}$周，平均产重3.4kg，其中男4例，女4例。其母无异常妊娠史、无血制品及免调节剂用药史。

1.1.2 健康成人：10例健康成人为对照，平均年龄32岁，包括男5例，女5例。采血前4周无明感染史，无血制品及免疫调节剂用药史。

采集肝素抗凝新生儿脐血及成人外周血25ml(无菌操作)备测。

1.2 实验方法

1.2.1 分离培养细胞：按常规操作无菌分离单个核细胞(PBMC或CBMC)，用RPMI-1640(含10%小牛血清)调细胞终浓度至1×10^6/ml。制备培养上清用2×10^6细胞，提总RNA用4×10^6细胞。设组如下：①测培养上清液中IFN-γ，设自身对照组提点

* 本文为卫生部科研基金资助课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 新生儿CBMC培养上清IFN－γ水平(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

标本	例数	刺激剂 O组	刺激剂 PMA+抗CD_3组	刺激剂 PMA+抗CD_3+rIL-12组	t	p
新生儿	8	2.74±0.04	2.94±0.17	3.50±0.54	t_1=3.98	<0.01
					t_2=2.81	<0.05
成人	10	2.73±0.03	3.34±0.46	3.52±0.66	t_1'=3.76	<0.01
					t_2'=0.69	>0.05
	t	0.66	2.35	0.07		
	P	>0.05	<0.05	>0.05		

注:t_1、t_1'分别为新生儿、成人O组与PMA+抗CD_3+rIL-12刺激组比较。
t_2、t_2'分别为新生儿、成人PMA+抗CD_3与PMA+抗CD_3+rIL-12刺激组比较。

RNA用4×10^6细胞。乙酰肉豆寇佛波酯(PMA)+抗CD_3单克隆抗体(抗CD_3)刺激组PMA+抗CD_3+γIL-12刺激组。②测IL-$12p_{40}$mRNA，设自身对照组，脂多糖(LPS)刺激组、PMA+抗CD_3刺激组，rIL-12刺激组。③测IFN-γmRNA。设自身对照组、PMA+抗CD_3刺激组、rIL-12刺激组。上述刺激剂终浓度分别为:PMA(Sigma)10ng/ml。抗CD_3(军事医学科学院)1 ug/ml。LPS(Sigma)、10ng/ml，rIL-12(R&D公司)250ng/ml。置37℃，5%CD2培养箱。制备培养上清液培养48小时。提细胞总RNA培养12小时。

1.2.2 单克隆抗体ELISA法测培养上清液中IFN-γ浓度:用"IFN-γ检测试剂盒"(第二军医大学)检测。标本不稀释。

1.2.3 提取培养细胞总RNA:用TRIzol™试剂盒(GIBCO)提取总RNA。操作过程按试剂盒说明书进行。

1.2.4. RT-PCR

1.2.4.1 核苷酸引物:IL-$12p_{40}$引物(STRATGENE公司合成)[3]:下游5-GTCTATTCCGTTCTCTC-3;PCR产物272bp。IFN-γ引物(中国科学院上海细胞生物研究所合成)[4]上游5'-ATGAAATATACAAGTTATCTTGGCTTT-3'，下游5'-GATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT-3';PCR产物494bp.

1.2.4.2 RT-PCR测IL-$12p_{40}$mRNA，IFN-γmRNA:采用Sandhya.LD等方法[5]，略加改良。逆转录反应体积为20μl。含总RNA1.2ug,5×逆转录酶缓冲液(GIBCO)4μl,0.1M/L DTT 0.5μl,0.1nM/μloligo$(dT)_{15}$(宝灵曼)1 μl,10mM/L dNTP(宝灵曼1μl，40^4/μl RNA酶抑制剂(RNAsin, promega)0.5 μl, 200^4/μl逆转酶(M-MLVRT, GIBCO/1μl于65℃变性5分钟，后置37℃1小时，95℃5分钟灭活逆转录酶。PCR反应体积为50μl，含KCL50mM/L,Mgcl- 1.5mM/L,Tris-Hcl10mM/L,PH8.3,明胶0.01%，1.25mM/LdNTP8μl,上、下游引物各25pmol.Taq DNA合酶2单位逆转录产物(模板cDNA)2 μl,反应在自动热循环仪(Bio-Rad)中进行。IL-$12p_{40}$温度条件为:94℃变性5分钟后，55℃退火4分钟，72℃延伸1.5分钟后，94℃变性1分钟，反应35个循环，最后一个循环将延伸时间延长至10分钟后冷却至4℃。IFN-γ温度条件为:94℃变性5分钟后，60℃退火，延伸2分钟，94℃变性45秒钟，反应28个循环，最后一个循环将延伸退火时间延长至10分钟后冷却至4℃。

1.2.4.3 结果观察:取15μlPCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭(EB)染色后用紫外检测仪观察并摄影，记录结果。每份标本均先扩增β-actin作为内部质控。以φX174RFDNAHaeⅢ作为分子量标记。

1.3 统计学处理

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示。两样本均数作分组t检验。

2 结果

2.1 培养上清液中IFN-γ 见表1。表1显

维普资讯 http://www.cqvip.com

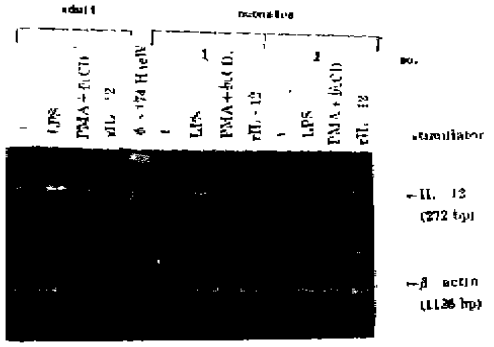


图1 IL－12P_{40}mRNA表达示意图(RT－PCR)

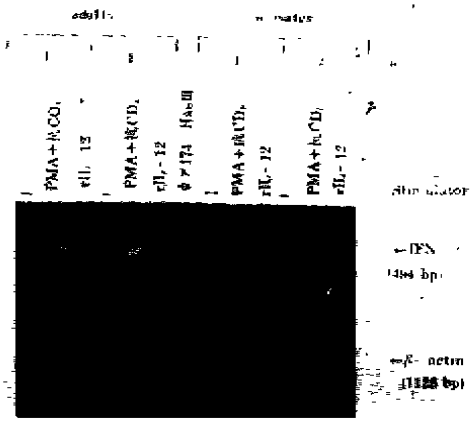


图2 IFN－γmRNA表达示意图(RT－PCR)

示新生儿CBMC产生IFN－γ水平较成人显著低下，rIL－12能协同抗CD_3、PMA使新生儿IFN－γ达成人水平。

2.2 IL－12p_{40}mRNA表达 见图1。图1显示新生儿单核细胞、B细胞IL－12_{40}mRNA表达水平较成人显著低下;rIL－12对其自身IL－$12p_{40}$ mRNA表达无明显影响。

2.3 IFN－γmRNA表达及rIL－12的影响 见图2。图2显示新生儿CBMC表达IFN－γmRNA较成人显著低下;rIL－12能促进新生儿IFN－γmRNA表达，但其作用较有PMA＋抗CD_3协同时稍弱，未能使新生儿IFN－γmRNA达成人水平。

3 讨论

IL－12是由p_{35}、p_{40}两种多肽组成的异二体(70KD)，其中p_{35}可由多种细胞产生，p_{40}则由产生IL－12的细胞表达，故测，IL－$12p_{40}$mRNA可反映IL－12基因表达状况[6]。

IL－12具有诱导NK细胞或LAN细胞产生细胞毒活性;增强活化的CD_4^+、CD_8^+ T细胞和NK细胞增殖;诱导NK细胞产生TNF－α;增强特异性细胞毒T细胞反应，在抗病毒、抗肿瘤、指各种胞内寄生菌、抗原感染的免疫反应中发挥重要作用[6]。因此，新生儿IL－12水平低下尚可在多细胞，多环节影响IL－12介导的细胞免胞免疫反应，因而易发生各种病毒感染，衣原体感染，及各种胞内、胞外寄生菌感染。然而，IL－12的主要作用是通过诱和促进Th1细胞和NK细胞产生IFN－γ介导细胞免疫，IFN－γ具有多种生物学活性，其主要作用是保护正常细胞免受病毒损害，抑制病毒复制，以及激活巨噬细胞促进多种免疫细胞成熟等，在机体抗毒，抗肿瘤和免疫调节中发挥重要作用[7]。新生儿脐血单个核细胞产生IFN－γ不足，使其细胞免疫功能低下已为人们共识。对新生儿产生IFN－γ水平低下的原因，以往多数学者认为与巨噬细胞功能不完善，调节功能紊乱，T细胞内与源性缺陷以及NK细胞缺陷有关[8]。随着分子免疫学研究的飞速发展和对IFN－γ基因表达调节因素的深入研究，新近发现IL－12是Th1细胞和NK细胞产生IFN－γ的强烈诱导剂[9]。而IFN－γ对其自身分泌有正性反馈作用[10]。本研究发现新生儿CBMC IL－$12p_{40}$mRNA表达较成人低下，rIL－12能明显纠正新生儿CBMC产生IFN－γmRNA及蛋白质之不足，因而作者认为新生儿IL－12产生低下可能是新生儿IFN－γ产生不足的重要原因之一；同时提示rIL－12、rIFN－γ对于新生儿严重和慢性细胞内病原体和病毒感染可能有潜在的治疗作用[11]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 Trinchieri G.Immunology Today,1993,14(7):335.

2 Wu CY,D,et al.J Immunol,1993,151:1938

3 Mattei S, et al. Int J Cancer,1994;56:853

4 Sandhya LD, et al. Lymphokine and Cytokine Res, 1993,12(2):59

5 Kubin M,Blood ,1994,83(7):1847.

6 Hsieh CS. et al .Science, 1993,260:547

7 向近敏.等.免疫学杂志.1993.9(2):71

8 李金兴.国外医学 儿科分册.1991.18(1):1

9 Hardy KJ, J Exp Med,1989,170:1021

10 D'Andrea A', J Exp Med, 1992,176:1387

11 Trinchieri G, Immunology Today,1994,15(10):460

(收稿日期 1996－04－15)

EFFECTS OF IL－12 ON PRODUCING IFN－γ IN NEONATES

Jiang Liping, et al

Dept. of Clnic Immunologic Laboratory,Children Hospital

Interleukin 12 is an important cytokine produced by monocytes/macrophages and B cells, which exerts pleiotrolic effects on cellular immune respons through inducing productin of IFN－γ byT cells and NK cells. it was knwn that there are few reports showing the ability of producing of IL－12 in neonates. In this report, IL－12p_{40}mRNA and IFN－γ mRNA expression were examined using RT－PCR in 8 cases of neonatal cord blood mononuclear cells (CBMC),and the levels of IFN－γ in the supernants of cultured CB MC were detected by ELISA.Furthermore,the effects of rIL－12 on production of IFN－γ by neonatal CBMC were observed.the results showed that thelevels of IL－12p_{40} γmRNA and IFN－γmRNA expression of CBMC were weaker than those of adultPBMC,and the concentrations of IFN－γ in neonates were significant lower than those of adults. rIL－12 could enhance IFN－γproduction stimulated by anti－CD_3 and PMA in neonatal CBMC up to levels of adults.The results suggest that insufficient IL－12 production may play an important role in temprary dysfunction of cellular immune response in neonates.

KEY WORDS IL－12p_{40}mRNA;RNA:rIL－12;IFN－γmRNA;IFN－γ;Infant;newborn