DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.022
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
902 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)10-0902-03

白细胞介素-5在慢性排斥反应中作用机制的探讨

黄亚冰,刘 斌,朱 珉,王树森,陈 实 (华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所,教育部器官移植重点实验室,武汉 430030)

提 要:目的 通过观察白细胞介素-5(IL-5)对人嗜酸性粒细胞(Eos)中转化生长因子TGF-β1基因表达的影响,以阐明其在Eos相关性慢性排斥反应中的作用。方法 采用改良的密度梯度离心法分离并体外培养人外周血Eos,以未加任何细胞因子的孔作为阴性对照,试验组加入不同浓度的IL-5(10^{-11}, 10^{-9}, 10^{-7} mol/L)共培养,台盼蓝拒染法观察细胞活力变化,培养16 h后收集细胞和细胞培养上清液,应用RT-PCR和ELISA方法通过检测转化生长因子TGF-β1 mRNA和蛋白表达的量观察IL-5的调控作用。结果 与对照组(228.9±2.87)相比,3种浓度的(10^{-11}, 10^{-9}, 10^{-7} mol/L)Th2型细胞因子IL-5均能显著增强体外培养的Eos中TGF-β1蛋白的表达(335.13±9.43, 403.7±0.09, 426.0±0.05),$P<0.05$,处理组mRNA的量分别为对照组的1.42, 1.70和1.76倍($P<0.05$)。结论 Th2型细胞因子IL-5可能通过上调TGF-β1的基因表达在Eos相关性慢性排斥反应中发挥作用。

关键词:白细胞介素-5;嗜酸性粒细胞;转化生长因子β1;慢性排斥
中图法分类号:R392.11;R617 文献标识码:A

IL-5 up-regulates the expression of TGF-β1 in human blood eosinophils *in vitro*

HUANG Ya-bing, LIU Bin, ZHU Min, WANG Shu-Sen, CHEN Shi (Key laboratory of Organ Transplantation, Ministry of Education, Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei province, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of IL-5 on the expression of TGF-β1 in eosinophils *in vitro*. Methods Eosinophils incubated *in vitro* in the presence of different concentrations of IL-5 were used as experimentol group and those without IL-5 were used as negative control. The regulatory effect of IL-5 was determined by measuring the expression lovel of TGF-β1 RNA in supernatants and cells at 16 h after cultivation using ELISA and RT-PCR. Results The expressions of TGF-β1 protein (335.13±0.68, 403.7±0.09, 426.0±0.05) in eosinophils were increased significantly by the three different concentrations of IL-5 (10^{-11}, 10^{-9}, 10^{-7} mol/L), while that for control was 228.9±0.92 ($P<0.05$). The expression of TGF-β1 mRNA in eosinophils was increased significantly by IL-5 in three samples ($P<0.05$) as 1.42, 1.70, and 1.76 times as that of the non-stimulated controls. Conclusion IL-5 can up-regulate the expression of TGF-β1 in eosinophils *in vitro*, which might have effect in eosinophil-associated chronic rejection.

Key words: IL-5; eosinophil; transforming growth factor-beta1; chronic rejection

伴随免疫抑制治疗方法的不断发展完善,早期同种移植急性排斥发生率已经明显下降,而实质性移植脏器丧失率仍以3%~5%的速度逐年递增,如何提高移植物长期存活正成为迫切需要解决的问题。移植物慢性失功是影响移植物长期存活的主要因素,慢性排斥反应则是导致移植物功能减退和慢性失功的主要原因[1]。嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)是移植排斥反应的效应细胞之一[2],其主要通过分泌嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cationic protein, ECP)、主要碱基蛋白(major base protein, MAP)和活性氧自由基等发挥对移植物的杀伤作用,但其参与慢性排斥间质病变和血管损害的作用机制还不清楚。本研究通过观察IL-5对体外人嗜酸性粒细胞中转化生长因子TGF-β1基因表达的影响,以阐明IL-5在Eos相关性慢性排斥反应中的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人重组细胞因子IL-5(Cytolab Ltd.),Percoll分离液(Sigma),N-甲酰甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, FMLP, Sigma),淋巴细胞分离液(上海生化二厂),人TGF-β1定量ELISA试剂盒(上海森雄科技有限公司),Trizol reagent, MMLV, TaqDNA聚合酶, dNTP, RNA酶抑制剂均购自

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200263)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200263)
作者简介:黄亚冰(1978-),女,湖北省丹江市人,硕士,主要从事移植免疫方面的研究。电话:(027)83646213
收稿日期:2004-02-02 修回日期:2004-04-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

TaKaRa 公司。

1.2　引物序列

根据 GenBank 资料, 采用 Primer 5.0 设计引物如下: TGF-β1 的上游引物: 5′-GGAAACCCACAACGA-3′, 下游引物 5′-CTCCTCAGCA-GACGC-3′, 扩增产物为 138 bp; β-actin 的上游引物: 5′-TCGTCCACCG-CAAAT-3′, 下游引物 5′-GCTATCACCTCCCCTGT-3′, 扩增产物为 389 bp, 上述引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.3　方法与步骤

1.3.1　外周血粒细胞的分离　　健康献血者抽取外周静脉血, 枸橼酸钠抗凝。100 ml/L FCS/Hanks 对倍稀释, 缓慢加在淋巴细胞分离液上面(比重 1.077, 滤过除菌), 室温离心 1 000× g, 20 min。取下层粒细胞和红细胞, 加入 3 倍体积 155 mmol/L NH_4Cl 溶液冰浴 15 min, 离心 400× g, 7 min。

1.3.2　嗜酸性粒细胞的分离及培养　　采用改良的 Percoll 密度梯度离心法分离 Eos[3]。所得沉淀细胞用 Hanks 液漂洗 1~2 次悬浮于 100 ml/L FCS/Hanks 液中, 37 ℃ 30 min, 然后加入 10 μmol/L 的 Fmlp 共孵育 37 ℃ 10 min。参照相关文献将 Percoll 贮存液配成密度分别为 1.082 和 1.100 的应用液, 将上述细胞悬液缓慢加于 Percoll 分离液上面(上层比重 1.082, 下层比重 1.100), 离心 1 000× g, 15 min。收集界面细胞, PBS 漂洗。取少许悬液计算细胞活力和纯度, 细胞活力(台盼蓝拒染法)> 95%, 分类计数(瑞氏染色)> 95% 纯化的 Eos 悬浮于含 10% 胎牛血清(foetus cattle blood serum, FCS)的 RPMI1640 培养基, 置于 96 孔平底培养板, 每孔细胞数 2.0×10^6, 总体积 200 μl。分别加入不同浓度的细胞因子 IL-5(10^{-11} mol/L、10^{-9} mol/L 和 10^{-7} mol/L), 在 50 ml/L CO_2、37 ℃条件下培养, 以不加入细胞因子的培养孔作为对照, 作用 16 h 后终止培养。收集并裂解细胞, 提取 RNA 进行 RT-PCR 检测, 取细胞培养上清液进行 ELISA 检测。

1.3.3　逆转录—聚合酶链式反应(RT-PCR)及 ELISA 法检测 TGF-β1 的表达

1.3.3.1　逆转录合成 cDNA(RT)　　采用 TRIZOL 法提取细胞总 RNA, 反应体系为 25 μl, 其中总 RNA1 μl(1 g/L), MMLV 1 μl(20 U/L), Oligo(dT)15 2 μl(0.1 g/L), 5× RTBuffer(缓冲液)5 μl, dNTP5 μl(10 mmol/L), RNasin0.5 μl(40 U/L), DEPC 水加至 25 μl。反应条件为 65 ℃ 10 min, 22 ℃10 min, 37 ℃ 90 min, 72 ℃ 10 min。

1.3.3.2　PCR　　PCR 扩增反应体系为 25 μl。取逆转录产物 cDNA 2 μl, *Taq* DNA 聚合酶(含 Mg^{2+}) 0.3 μl(5 U/L), 10× PCR-Buffer 2.5 μl, dNTP4 μl(10 mmol/L), TGF-β1 的上下游引物各 1 μl(25 pmol/L), 内参照 β-actin 的上下游引物各 0.5 μl(25 pmol/L), 双蒸水加至 25 μl。

反应参数为: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 1 min, 56 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环, 72 ℃后延伸 10 min。整个 RT-PCR 反应均在美国产 PERKINELMER 9600 型 PCR 仪上进行。

1.3.3.3　扩增产物半定量分析　　取扩增产物 10 μl 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 溴化乙锭(0.5 mg/L)染色后紫外灯下观察, 凝胶成像分析系统(GELWORKS 1D advanced v 4.01)分别对 TGF-β1 和 β-actin 的扩增条带进行扫描, 以恒量表达的 β-actin 为内参照进行校正。计算每份样本 PCR 扩增产物的 TGF-β1/β-actin 的光密度比值。

1.3.3.4　TGF-β1 蛋白的定量分析　　按试剂盒说明操作, 在已包被抗体的 96 孔板中加入 100 μl 培养上清液, 经一抗、二抗作用后, 加入底物显色, 用酶标仪(Elx808, Ouion, 美国)在 492 nm 波长处测定光吸收值后带入标准曲线方程计算 TGF-β1 的浓度。

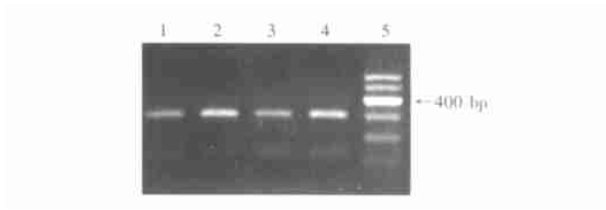
1.4　统计学处理

数据采用方差分析及多实验组与对照组的比较。

2　结果

2.1　RT-PCR 半定量检测结果

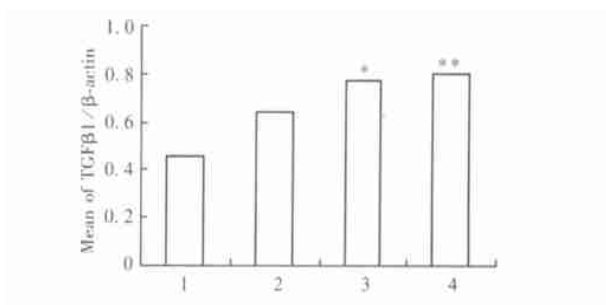
各样本的总 RNA OD_{260}/OD_{280}=(1.83±0.12), 1% 琼脂糖凝胶电泳显示清晰的 28S 和 18S rRNA 条带, 表明样品无明显降解, 总 RNA 纯度符合要求。每 1 份标本中 389 bp 处的 β-actin 条带清晰明亮且具有相似的表达, 表明最终合成的 cDNA 基本一致。因此, 本 RT-PCR 反应体系是可靠的, 可以用于分析 TGF-β1 的表达水平(图 1)。3 种浓度 IL-5(10^{-11}、10^{-9}、10^{-7} mol/L)刺激下的 TGF-β1 的光密度值经内参照 β-actin 校正后用均数±标准差表示分别为: (0.640±0.015)、(0.768±0.017)和(0.795±0.007)。与对照组(0.452±0.015)相比均有显著差异($P<0.05$), 其 TGF-β1mRNA 的量分别是对照组的 1.42, 1.70 和 1.76 倍(图 2)。



1: Control; 2: IL-5 (10^{-11}mol/L); 3: IL-5 (10^{-9}mol/L); 4: IL-5 (10^{-7}mol/L); 5: DNA marker (100—600 bp)

图 1　RT-PCR 产物电泳

Fig 1　Electrophoresis of RT-PCR product



1: Control; 2: IL-5 (10^{-11} mol/L); 3: IL-5 (10^{-9} mol/L); 4: IL-5 (10^{-7} mol/L); *: $P<0.05$ (10^{-9} mol/L *vs* control); **: $P<0.05$ (10^{-7} mol/L *vs* control)

图 2　各实验组与对照组 TGF-1/-actin 光密度均值的比较

Fig 2　Average density ratios of TGF-1/-actin by human Eos (n=6)

2.2　ELISA 定量检测结果

体外培养 16 h 后取细胞培养上清液 100 μl 进行检测, 采用多变量方差分析进行各实验组与对照组均数的比较。结果显示: Hotelling's Trace=494.41, $P<0.05$, 整体看来, 可认为 4 个

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

总体均数不等。其中各实验组的 TGF-β1 的蛋白浓度(pg/mL)用均数±标准差表示分别为 335.13±0.68、403.7±0.09 和 426.0±0.05,与未加细胞因子的对照组(228.9±0.92)相比均有显著性差异,且其 95%的可信区间均不包含零值,故可认为 3 种浓度的 IL-5 均能显著增强 TGF-β1 的表达。

3 讨论

TGF-β 是一大类调节细胞生长和分化的多肽,包括最具代表性的 TGF-β1 等至少 6 个结构相关的异构分子,由淋巴细胞 、巨噬细胞 、树突状细胞等多种细胞产生。哺乳动物主要有 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β 3 种形式,它们的生物学特性基本相同,其中以 TGF-β1 最为重要。过去的研究集中于其对免疫系统的负调节作用,如通过抑制 T、B 细胞增殖和 CTL、NK 细胞杀伤活性发挥非特异性免疫抑制,以及通过抑制 MHC Ⅱ类抗原表达和 DC 分化成熟以诱导耐受等,现在 TGF-β 在慢性纤维化疾病中作为一种促纤维化因子已得到较广泛认同。近年大量研究结果显示,虽然多种细胞因子和生长因子参与间质纤维化的发生发展,但作用最明显的是 TGF-β。作为一种强效的致纤维化因子,它在器官纤维化发生发展的多个环节起着重要作用[4,5]:①刺激成纤维细胞等增加 ECM 成分合成,如Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原和非胶原糖蛋白等;②通过抑制多种 ECM 降解酶(如 MMP,纤溶酶原激活物)的活性,刺激 TIMPS 和 PAI-1 的活性,从而抑制 ECM 降解;③增加 ECM 受体如整合素的表达,从而增加 ECM 与细胞的相互作用[6]。Isaka 等[7]把 TGF-β1 反义寡核苷酸转染到 UUO 大鼠肾间质成纤维细胞,发现梗阻侧肾脏 TGF-β1 水平和Ⅰ型胶原 mRNA 表达显著降低,肾间质纤维化程度也明显减轻,进一步证明了 TGF-β1 在肾间质纤维化中的意义。近年来多项研究表明,实质器官移植术后的慢性排斥过程也有转化生长因子β 的参与,在慢性排斥期间 TGF-β 和潜在 TGF-β 糖蛋白呈高水平上调。

Eos 可分泌 TGF-β1,促进成纤维细胞生长活化,刺激胶原合成,参与炎症的修复过程;而 Th2 型细胞因子 IL-5 是 Eos 炎症反应的主要介质,通过与 Eos 表面 IL-5R 结合介导嗜酸性粒细胞的增殖分化,延长其存活时间,促进 Eos 对血管内皮细胞的粘附能力、脱颗粒、组织浸润等,具有较强的趋化活性。

慢性排斥反应是一个包括细胞免疫和体液免疫在内的多因素作用的病理过程,T 细胞在同种移植排斥反应中发挥重要作用。传统观点认为:Th1 型细胞应答促进排斥发生,Th2 型细胞应答有助于建立对移植物抗原的无反应状态。但是近年来的实验和临床研究结果显示,临床上针对 Th1 型排斥效应机制采取的免疫抑制措施,虽能有效降低急排发生率,但不能完全避免排斥发生,尤其是慢性排斥的发生。若以 IL-5 基因敲除小鼠为移植受体,可减轻慢性排斥程度[8],提示 IL-5 在 Eos 相关性慢排发生过程中发挥重要作用。但是 IL-5 导致组织纤维化等慢性排斥病理改变的具体作用环节并不明确。本研究在体外培养的人嗜酸性粒细胞中加入白细胞介素-5 共孵育后发现转化生长因子 TGF-β1 的基因表达明显增强。转录水平的调控是真核生物基因表达调控最重要的环节,TGF-β1mRNA 的表达上调可能就是导致 TGF-β1 蛋白合成增加的原因。所以我们从基因转录水平推测 IL-5 参与 Eos 相关性慢性排斥反应的机制有可能为:Th2 型细胞产生 IL-5→TGF-βmRNA 的表达上调→TGF-β1 蛋白的表达上调→成纤维细胞生长活化,胶原合成增加,参与炎症的修复过程,通过干预 IL-5 的表达来调控嗜酸性粒细胞中 TGF-β1 的分泌可能具有治疗意义。当然仅仅依据体外实验证实 IL-5 可以上调嗜酸性粒细胞中转化生长因子 TGF-β1 的基因表达并不能完全阐明 IL-5 在慢性排斥反应中的作用机制,我们必须结合与之相对应的体内实验,包括建立完善的慢性排斥免疫病理模型,结合多种检测手段如病理切片、免疫组化、原位杂交等进一步阐明该机制和 Th2 型细胞因子 IL-5 在嗜酸性粒细胞相关性排斥反应的关键性作用,为完善防治慢性排斥反应的措施提供理论依据。

参考文献:

[1] Womer K L, Lee R S, Madsen J C, *et al*. Tolerance and chronic rejection[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1409): 727-738.

[2] Honjo K, Xu X Y, Bucy R P. Heterogeneity of T cell clones specific for a single indirect alloantigenic epitope (I-Ab/H-2Kd54-68) that mediate transplant rejection[J]. Transplantation, 2000, 70(10): 1516-1524.

[3] 赖克方, 郭晓明, 王长征, 等. 正常人外周血嗜酸性粒细胞的分离与培养方法的改进[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(10): 763-764.

[4] Klahr S, Morrissey J J. The role of growth factors, cytokines, and vasoactive compounds in obstructive nephropathy[J]. Semin Nephrol, 1998, 18(6): 622-632.

[5] Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-β1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation[J]. Kidney Int, 1993, 44(2): 313-321.

[6] O'Donnell M P. Renal tubulointerstitial fibrosis. New thoughts on its development and progression[J]. Postgrad Med, 2000, 108(1): 159-172.

[7] Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, *et al*. Transforming growth factor-β1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction[J]. Kidney Int, 2000, 58(5): 1885-1892.

[8] Le Moine A, Flamand V, Demoor F X, *et al*. Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection[J]. J Clin Invest, 1999, 103(12): 1659-1667.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net