DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.015
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
1034 2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)09-1034-03

IL-6和IL-10对小鼠肺泡巨噬细胞CD14清道夫受体mRNA表达的影响

秦文利,蒋建新 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨感染过程中内毒素促使肺泡巨噬细胞由免疫防御细胞转化为致炎效应细胞的分子机制。方法 通过体外培养肺泡巨噬细胞,施加IL-6和IL-10刺激,应用RT-PCR方法观察肺泡巨噬细胞CD14和清道夫受体(SR)mRNA的表达变化。结果 在基因转录水平,IL-6对CD14表达呈时间-剂量依赖性上调,对SR的表达呈进行性下调;IL-10对SR表达呈时间-剂量依赖性上调,下调CD14表达。结论 促炎因子IL-6对肺泡巨噬细胞SR表达下调及CD14表达上调可能是感染过程中内毒素促使肺泡巨噬细胞由免疫防御转化为致炎效应细胞的机制之一,抗炎因子IL-10可能对这一转化过程起到一定的抑制作用。

关键词:肺泡巨噬细胞;CD14;清道夫受体;IL-6;IL-10
中图法分类号:R322.35;R392.11;R392.2 文献标识码:A

Effect of IL-6 and IL-10 on expression of CD14 and scavenger receptor in mouse alveolar macrophages *in vitro*

QIN Wen-li, JIANG Jian-xin (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of the conversion of mouse alveolar macrophages (AMs) from immune defensive cells to inflammatory effective cells in LPS caused infection. Methods AMs were incubated *in vitro* and stimulated with IL-6 and IL-10. The expressions of scavenger receptor (SR) and CD14 mRNA in AMs were observed with RT-PCR. Results IL-6 up-regulated the expression of CD14 and down-regulated the expression of SR in a time- and dose-dependent fashion at the level of mRNA. IL-10 enhanced the expression of SR in a time-dose dependent manner, but inhibited the expression of CD14 at the level of mRNA. Conclusion The up-regulation of SR expression and down-regulation of CD14 expression by IL-6 indicate that IL-6 might be one of the important mechanisms in the conversion of AMs from immune defensive cells to inflammatory effective cells promoted by LPS and IL-10 might has an inhibitory effect on the conversion of AMs.

Key words: alveolar macrophages; CD14; scavenger receptor; IL-6; IL-10

肺泡巨噬细胞是肺局部最早接触外来病原体或细菌内毒素的免疫防御细胞之一,其表面存在着参与内毒素激活巨噬细胞的重要受体CD14和清除、灭活内毒素的受体清道夫受体(Scavenger receptor, SR)。以往研究显示,细菌内毒素对SR、CD14的调节可能是急性肺损伤过程中肺泡巨噬细胞由防御转化为效应细胞的内在机制,而内毒素刺激过程中同时伴有IL-6和IL-10的产生,那么IL-6、IL-10在内毒素反应过程中发挥了什么样的作用?本研究通过探讨IL-6和IL-10对CD14、SR表达的影响,从mRNA水平为阐明感染后肺泡巨噬细胞由正常的免疫防御细胞转变为致炎效应细胞的分子机制提供新的认识。

1 材料与方法

1.1 肺泡巨噬细胞的灌洗和培养[1]

取昆明种小鼠,雌雄不拘,做气管插管,用预冷的D-Hank's液灌洗肺脏,收集细胞,1 000r/min离心5 min。弃上清,加入含10%血清的RPMI1640培养基,形成细胞悬液,计数并调整细胞浓度至1×10⁶/ml,台盼蓝测定细胞活性大于95%。将细胞置于37 ℃、5%CO_2培养箱内培养,2 h后换液,去除未贴壁的细胞,贴壁者即为AM。继续培养48 h,用于下步实验。

1.2 施加IL-6、IL-10刺激

肺泡巨噬细胞培养稳定后,分别在终止培养前24、16、12、8、6、4、2 h换含有IL-6或IL-10的RPMI1640培养液(终浓度为100 ng/ml),继续培养致预定时间,观察其时效关系。同样在肺泡巨噬细胞培养稳定后,换含有IL-6或IL-10的RPMI1640培养液,至系列终浓度(1×10^{-3}、1×10^{-2}、1×10^{-1}、1×10^{0}、1×10^{1}、1×10^{2}、1×10^{3} ng/ml),继续培养12 h(此为预实验确定之最佳时相点),观察其量效关系。

1.3 细胞总RNA的提取

细胞总RNA的提取应用Promega RNA Agents试剂盒,操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.4 逆转录多聚酶链反应

1.4.1 逆转录 0.5 μg总RNA加入10 μl总体积RT溶液(博大泰克公司)中逆转录mRNA。

1.4.2 PCR扩增 根据已知CD14、SR和内参照GAPDH的cDNA序列设计引物如下:

CD14 5′-AAG CCA CCG GAC CCG ATC TC-3′和5′-CGT CTC CAT CCC CGC GTT AC-3′

SR 5′-CCA AGT CCT TGC AGA GTC TG-3′和5′-GTC TGA GGT CGT TGG TGA TG-3′

作者简介:秦文利(1972—),男,河北省滦县人,硕士研究生,医师,主要从事感染性休克方面的研究,现在解放军255医院传染科,唐山 063000。电话:(010)63771801

收稿日期:2002-01-25;修回日期:2002-06-25

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

GAPDH　5′-ACC TCA ACT ACA TGG TCT AC-3′ 和 5′-TTG TCA TTG AGA GCA ATG CC-3′

取 1 μl 逆转录的 cDNA 加入 22 μl PCR 溶液(博大泰克公司)中, 加上述 CD14、SR 和 GAPDH 引物, PCR 的温度条件是: 94 ℃变性 50 s, 58 ℃退火 58 s, 72 ℃延伸 1 min, 循环 22 个周期。

1.4.3　RT-PCR 产物的定量　　用 0.5× TBE 制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 加入终浓度为 0.5 μg/ml 的 EB, 取 10 μl PCR 产物, 5 μl DNA Marker 上样, 恒压 5 V/cm 电泳, 可见 237 bp 的 SR、296 bp 的 CD14 和 802 bp 的 GAPDH 扩增带。

1.5　图像分析

PCR 电泳结果经 BioRad2000 凝胶成像系统扫描, 应用 Bandscan 软件进行图像分析, 以 CD14 或 SR 扩增产物的积分灰度值与 GAPDH 积分灰度值之比表示 CD14/SR mRNA 表达的强度。

1.6　统计学分析

实验所得计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件单因素方差分析(One way ANOVA)。

2　结果

2.1　IL-6 对 CD14、SR mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, IL-6 刺激后, CD14 mRNA 水平随刺激时间延长和剂量增加逐渐增强, 分别于 12 h 和 100 ng/ml 达到峰值($P<0.01$), 随后有所回落; SR mRNA 表达随刺激时间延长逐渐减弱, 在 12 h 至低谷($P<0.01$), 在 1 ~ 100 ng/ml 浓度范围内随刺激剂量增加逐渐下降, 1×10^2 ng/ml 最低, 1×10^3 ng/ml 有所回升, 见表 1~2。

2.2　IL-10 对 CD14、SR mRNA 表达的影响

IL-10 刺激后, CD14mRNA 表达随刺激时间延长逐渐降低, 12 h 开始显著($P<0.05$), 16 h 表达最弱($P<0.01$), 24 h 有所回升, 随刺激剂量增加逐渐降低, 10 ng/ml 开始显著, 1×10^2ng/ml 时表达最低($P<0.01$), 1×10^3ng/ml 有所回升; SR mRNA 表达则随着 IL-10 刺激时间延长逐渐增强, 8 h 显著, 12 h 达峰值($P<0.01$), 此后回落, 在 $1\times(10^{-1}\sim10^{1})$ ng/ml 浓度范围内, 随着 IL-10 剂量增加 SR mRNA 表达逐渐增强, 此后有所回落, 见表 1~2。

表 1　IL-6/IL-10 刺激后 AM 中 CD14/SR mRNA 表达的动态变化($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Dynamic changes of expression of CD14/SR mRNA in AM after administration of IL-6 or IL-10($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Time(h)	IL-6		IL-10	
	CD14	SR	CD14	SR
Control	0.382±0.035	0.669±0.039	0.493±0.048	0.675±0.049
2	0.480±0.056	0.730±0.101	0.482±0.064	0.723±0.051
4	0.510±0.061 *	0.614±0.073	0.426±0.045	0.762±0.066
6	0.541±0.047 **	0.599±0.064	0.397±0.056	0.796±0.045
8	0.498±0.059 *	0.467±0.053 **	0.385±0.046	0.825±0.052 *
12	0.575±0.035 **	0.281±0.071 **	0.314±0.067 *	0.891±0.059 **
16	0.544±0.037 **	0.325±0.074 **	0.251±0.075 **	0.879±0.055 **
24	0.488±0.043	0.621±0.096	0.401±0.064	0.749±0.059

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

表 2　不同剂量 IL-6/IL-10 刺激后 AM CD14/SR mRNA 的表达($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of CD14/SR mRNA in AMS after administration of different dose of IL-6 or IL-10($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Dose(ng/ml)	IL-6		IL-10	
	CD14	SR	CD14	SR
Control	0.275±0.026	0.557±0.052	0.485±0.046	0.866±0.050
1×10^{-3}	0.348±0.053	0.551±0.064	0.483±0.045	0.863±0.056
1×10^{-2}	0.432±0.064 *	0.338±0.053 **	0.479±0.07	0.852±0.059
1×10^{-1}	0.453×0.063 *	0.340×0.061 **	0.432×0.057	1.009×0.037 *
1×10^{0}	0.437×0.063 *	0.306×0.066 **	0.381×0.074	1.129×0.065 **
1×10^{1}	0.441×0.049 *	0.240×0.063 **	0.324×0.06 *	1.223×0.062 **
1×10^{2}	0.501×0.057 **	0.152×0.074 **	0.253×0.045 **	0.962×0.070
1×10^{3}	0.210×0.036	0.244×0.046 **	0.261×0.063 **	0.984×0.033

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

3　讨论

肺泡巨噬细胞(Alveolar macrophage, AM)是肺局部最早接触外来病原体或细菌内毒素的免疫防御细胞之一[2], 与此同时作为肺内局部炎症反应的主要始动细胞, AM 可以产生过量的炎性介质, 并可引起其它免疫活性细胞的激活及炎性因子的释放, 进而造成肺局部过度炎症反应, 形成急性肺损伤。然而 AM 由正常的免疫防御细胞转化为致炎效应细胞的具体机制目前尚不清楚。清道夫受体(SR)是一种三聚体形式的膜糖蛋白, 近年研究发现, SR 参与机体对内毒素的清除和灭活, 是单核巨噬细胞表面重要的防御性受体[3~5], CD14 是分子量 55×10^3 糖基磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白, 是内毒素激活巨噬细胞的重要受体[6]。我们选取了 IL-6 和 IL-10 作为促炎因子和抗炎因子的代表, 从基因转录水平观察了它们对 SR 和 CD14 表达的影响, 为进一步阐明内毒素血症中肺泡巨噬细胞由防御性转化为效应性细胞的机制提供更为丰富的实验依据。

本研究结果显示, IL-6 可以从基因转录水平上调肺泡巨噬细胞 CD14 表达, 下调 SR 表达, 且呈时间-剂量依赖性。上述实验结果与我们以往研究中内毒素上调 CD14 表达, 下调 SR 表达相一致[1,7], 提示内毒素对 CD14 和 SR 表达的调节可能是其诱生介质的间接作用所致, IL-6 可能在其中扮演了重要角色。在正常情况下, AM 的功能主要是摄取和吞噬进入肺泡腔的颗粒或细菌毒素, 保持肺泡腔清洁和起到抗菌的作用, 当机体受到细菌感染后, 内毒素激活 AM 并诱导炎性因子如 IL-6 等的释放, IL-6 通过下调 AM 表面 SR 的表达, 降低了 AM 的防御功能, 导致内毒素与 SR 的结合、降解减少, 而与 CD14 的结合增多, 又通过 CD14 表达上调, 增强了 AM 的致炎效应, 使内毒素激活 AM 诱生炎性因子的作用增强, 导致炎性因子的过度释放, 造成肺局部的炎症反应失控, 加重肺损伤。因此, IL-6 对肺泡巨噬细胞表面 SR 表达下调, CD14 表达上调也可能是肺泡巨噬细胞由防御细胞转化为致炎效应细胞的内在

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

机制之一。

本研究结果还显示，IL-10 刺激后，CD14 mRNA 表达逐渐减弱，且呈时间-剂量依赖性，SR mRNA 水平则呈时间-剂量依赖性升高。说明 IL-10 可以从基因转录水平上调 SR 表达，下调 CD14 表达。这一结果与 IL-6 的作用刚好相反，提示 IL-10 可能通过上调 AM SR 的表达，增强 AM 的防御功能，加强了对内毒素的清除和灭活，又通过 CD14 表达下调，减轻了 AM 的致炎效应，从而减少内毒素激活 AM 释放过多的炎性因子，减轻进一步肺损伤。这可能是 IL-10 抑制 AM 炎性因子产生，对抗炎症反应的内源性机制之一。

参考文献：

[1] 陈永华，蒋建新，谢国旗，等. 内毒素血症时小鼠肺泡巨噬细胞 CD14 和清道夫受体的表达[J]. 第三军医大学学报，2000，22(7)：615－618.

[2] Sibille Y, Reynolds H Y. Macrophage and polymorphonuclear neutrophils in lung defence and injury[J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 141(2): 471－501.

[3] Hampton R Y, Golenbock D T, Penmqn M, *et al*. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors [J]. Nature, 1991, 352(6 333): 342－344.

[4] Hiroshi Suruki, Yukiko Kurihara, Motohiro Takeya, *et al*. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection[J]. Nature, 1997, 386(6 622): 292－296.

[5] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al*. CD14, a receptor for complex of lipopolysaccharide and LPS binding protein [J]. Science, 1990, 249(4 975): 1 431－1 433.

[6] 蒋建新. LBP/CD14 系统及其与内毒素作用的关系[J]. 生理科学进展，1997，28(3)：286－288.

[7] 蒋建新，谢国旗，陈永华，等. 库普弗细胞清道夫受体 CD14 表达变化及其与内毒素性肝损伤的关系[J]. 中华创伤杂志，2000，16(8)：478－481.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)09-1036-01

100 例老年人义齿再修复情况分析

Analysis of reprostheses in 100 seniles

杨 军，于 一心，容国俊，冉光亮 （第三军医大学附属西南医院口腔科，重庆 400038）

老年人缺失牙后的口腔功能，尤其是咀嚼功能会受到很大削弱，严重影响着老年人的身心健康和生命质量，而良好的义齿修复无疑是延长失去咀嚼功能老人健康生活不可缺少的重要支柱。然而怎样使修复的活动义齿能够较长时间地使用而不会过早地废弃是一个值得关注的问题。本研究通过对 60～80 岁我院门诊口腔 100 名老年患者，因活动义齿不能正常行使咀嚼功能而重新修复的主要原因进行分析，以便为老年人活动义齿的修复与口腔保健提供借鉴。

1 临床资料

100 名老年患者均为 1997 年 1 月至 2001 年 2 月来我院门诊口腔的老年患者，年龄 60～80 岁，平均 70 岁，其中男性 65 名，女性 35 名，活动义齿使用寿命平均为 2 年零 3 个月。所有患者均根据口腔缺失牙情况和基牙条件重新设计制作活动义齿，修复效果满意。

2 讨论

老年人的牙周组织常有生理性萎缩，承担咬合力能力减退，老年缺牙者采用活动义齿修复的较多[1]。通过本临床资料的研究分析，老年人活动义齿再修复的原因主要有以下几个方面。

一些研究表明[2]由于老年患者各种疾病，如糖尿病，心血管疾病的影响，使他们易忽视口腔卫生及对义齿的清洁护理，造成不洁义齿修复体。本组资料有 69 人(69%)是由于没有有效地清除牙齿与义齿基托邻接处，或与卡环支托连接处，以及义齿基托表面贴合处的菌斑原因，造成口腔余留牙龋病、牙周病及口腔炎，又没有及时治疗，使基牙脱落或拔除，牙槽嵴萎缩，原义齿固位性降低，无法配戴，需重新设计制作。

义齿过度磨耗，以及齿槽嵴的萎缩使病人咬合关系发生改变，从而引起咀嚼系统的功能紊乱，患者自觉义齿不适，要求重新修复。有 20 人属此原因(20%)。

由于口矫医师的专业知识判断，技术能力等原因，义齿设计不合理或义齿设计不当，义齿为不良修复体，使基牙及牙周组织受到不同程度的损害，有 10 人属此原因(10%)。

老年人，因记忆力减退，摘下义齿后随手放置，没有妥善保管随废物扔掉或倒入下水道。本组资料有 1 人属此原因。

综上所述加强老年人口腔卫生保健，科学设计制作义齿，是提高口腔疾病治疗率，避免义齿过早再修复的重要环节。保持严格的口腔卫生，对预防戴牙患者的基牙发生龋病和牙周病以及义齿性口腔炎至关重要。定期(或半年)进行口腔健康检查，及时诊治。

关键词：老人；义齿；修复
中图法分类号：R783.6；R787 文献标识码：B

参考文献：

[1] 蔡玉惠，胡家琨，张金芬，等. 南京市 411 名老年干部牙齿缺失后修复情况的调查[J]. 口腔医学，1991，11(4)：194－196.

[2] 姚培元，马 克，章文铮，等. 386 例老年人缺牙及修复情况分析[J]. 中华老年医学杂志，1999，18(2)：114－115.

（编辑 王 红）

作者简介：杨 军(1962－)，男，江苏省淮安市人，硕士，副主任医师，副教授，主要从事口腔颌面外科及老年口腔方面的研究，发表论文 12 篇。电话：(023)68754406

收稿日期：2001-07-30；修回日期：2002-01-10

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