DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.012

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0146-03

哮喘豚鼠嗜酸细胞IL-5、IL-3和GM-CSF受体mRNA表达及意义

李志奎,王长征,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 观察白介素-5受体α(IL-5 Rα)、IL-3Rα、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体α(GM-CSFRα)及共同β链(βcR)mRNA表达与嗜酸粒细胞(Eos)凋亡的关系,探讨各受体在哮喘发病中的作用。方法 健康豚鼠随机分为正常组、哮喘组(卵蛋白致敏激发),以TUNEL法检测支气管灌洗液(BALF)中低密度Eos(HEos)及正常密度Eos(NEos)细胞凋亡,原位杂交及RT-PCR法检测各受体mRNA表达。结果 哮喘组Eos显著高于正常组,以HEos为著($P<0.01$);Eos凋亡率明显低于正常组($P<0.01$),HEos表达IL-3Rα、GM-CSFRα明显高于NEos;哮喘组不同密度Eos表达各受体α mRNA明显下降,而βcR mRNA表达明显增加。RT-PCR检测IL-5Rα、IL-3Rα mRNA相对含量,哮喘组显著低于正常组($P<0.01$)。结论 哮喘Eos存在凋亡抑制,其IL-5、IL-3和GM-CSF受体的表达可能通过两种机制调节:各自α链表达减少,使其对Eos活化及凋亡抑制的负调节减弱;共同β链表达增加,使其对Eos活化和凋亡抑制的正性调节增强。表明IL-5等细胞因子受体可以通过调节Eos凋亡参与哮喘发病。

关键词:哮喘;嗜酸细胞;白介素;受体;凋亡
中图法分类号:R392.2;R562.25 文献标识码:A

Expressions of the common β subunit and specific α subunit of IL-5, IL-3, and GM-CSF receptor mRNA in eosinophils in BALF from guinea pigs with asthma

LI Zhi-kui, WANG Chang-zheng, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, china)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of the expressions of common β (βcR) and specific α chains of IL-5, IL-3 and GM-CSF receptors with the eosinophils(Eos) apoptosis for the roles of these receptors in asthma. **Methods** All of 12 guinea pigs were equally randomized into normal and ovalbumin sensitized asthmatic group. The apoptosis of hypodense and normodense Eos in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected by TUNEL method. The expression of common β and specific α chains of the 3 receptor mRNA were measured with RT-PCR and *in situ* hybridization. **Results** More Eos were observed in asthmatic group than in normal group, especially those in hypodense ($P<0.01$). The apoptotic rate of Eos in BALF were significantly lower in asthmatic group than in normal animals ($P<0.01$), but no difference was found between hypodense and normodense Eos. Compared with normal group, the expressions of the 3 receptor mRNA α chains were decreased in asthmatic group than in normal group ($P<0.01$), but βcR expression was increased significantly. More IL-3 Rα and GM-CSFRα mRNA were expressed in hypodense Eos than in normodense Eos. The contents of IL-5Rα and IL-3Rα mRNA were lower in asthmatic group than in normal group. **Conclusion** The apoptosis of Eos is inhibited in BALF from guinea pigs with asthma. The expressions of IL-5, IL-3 and GM-CSF receptors in Eos are regulated through 2 mechanisms: the reduced expressions of their specific α chains which attenuating the negative regulation on Eos activation and inhibited apoptosis and the increased expressions of their βcR which enhancing the positive regulation on the 2 aspects. These data suggest that IL-5, IL-3 and GM-CSF receptors might be involved in the pathogenesis of asthma through regulating the apoptosis of Eos.

Key words: asthma; eosinophils; interleukin; receptors; apoptosis

支气管哮喘嗜酸粒细胞(Eosinophils, Eos)增多的原因一是产生增多,二是凋亡减少。既往研究多集中在产生增加,近年注意到凋亡异常在Eos增加中的作用。已有证据表明哮喘时Eos凋亡减少,但其确切的机制仍不明了。细胞因子IL-5、IL-3及GM-CSF可使Eos存活时间明显延长[1]。IL-5、IL-3及GM-CSF是通过与细胞膜上各自的受体结合而起作用的。已发现Eos膜表面有这3种细胞因子的受体[2~4],它们由共同的βcR及不同的α链组成。以往对受体在Eos凋亡中的作用,研究甚少。由于细胞因子受体介导了细胞因子对Eos的生物学作用,所以可以推测受体也将在Eos凋亡中发挥重要作用。此外,确定Eos中各细胞受体的分布及调节对临床应用细胞因子拮抗剂治疗哮喘具有重要的理论及实践意义。本研究观测了正常及哮喘豚鼠肺组织中不同Eos表达IL-5Rα、IL-3Rα、GM-CSFRα、βcR mRNA表达与Eos凋亡的关系,以了解各受体在哮喘发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

健康豚鼠12只购自第三军医大学实验动物中心,体重200~250 g,雌雄不拘,随机分为正常对照组、哮喘组,每组6只。哮喘动物模型制备参照王长征[5]的方法略加修改。用卵蛋白

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670337)
作者简介:李志奎(1963-),男,山西省新绛县人,博士,副主任医师,主要从事哮喘的发病机制方面的研究,发表论文9篇,现在第四军医大学西京医院消化病研究所,西安 710032。电话:(029)3375695
收稿日期:2000-07-12;修回日期:2000-09-24

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

激发 48 h 后, 行支气管肺泡灌洗。

1.2　支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中低密度 Eos(Hypodense Eos, HEos)、正常密度 Eos(Normodense Eos, NEos)的分离

1.2.1　支气管肺泡灌洗　3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉, 颈动脉放血处死, Hanks 液经气管注入 5 ml× 3 次, 轻按动物胸部 20 ~30 s 后回收 BALF, 回收率大于 90%。

1.2.2　嗜酸细胞分离　按文献[6]方法配制不同密度 Percoll 液。离心管中依次加入 1.105、1.090、1.080 Percoll 液各 1 ml, 最后加入上述细胞悬液 1 ml。用 960× *g* 20 ℃离心 15 min。回收不同密度交界面的细胞层。计不同密度嗜酸细胞绝对数。

1.3　寡核苷酸探针合成与标记

1.3.1　寡核苷酸探针合成　参照文献[7], 由中国科学院上海细胞生物研究所合成寡核苷酸探针: IL-5Rα: 3' CTG GTC CAA CAA AGG TGG CCA AGGC 5'; IL-3Rα: 3' GTC TCC ACT ACG GAC ACT TCT GTC 5'; GM-CSFRα: 3' CTA GTC CCT GTT CCA CAG GCT GCTG 5'; Common β(AIC2B): 3' GTT GAG GAT TGT CTG GAT CC 5'。

1.3.2　寡核苷酸探针的标记　探针地高辛(Dig)标记使用 3' 末端转移法, 参照试剂盒说明进行。

1.4　原位凋亡细胞检测

TUNEL 法。细胞凋亡检测试剂盒(POD)购自德国宝灵曼公司, 方法参照说明书。

1.5　原位杂交

参照蔡文琴等[8]方法进行, 设两种阴性对照: ①无探针杂交液进行孵育, 其余步骤相同。②标记 IL-5Rα 正义链, 序列如下: 5' GCC CTT TGA TCA GCT GTT CAG TCC AC 3'。标记方法同上, 以此标记正义链进行杂交, 其余步骤相同。

1.6　引物设计与合成

扩增鼠 IL-5Rα、IL-3Rα 及 β-actin 的引物参照 McClanahan 等[7]设计, 由中科院上海细胞所合成: IL-5Rα: 扩增产物长度 450 bp, Sense 5' GCC CTT TGA TCA GCT GTT CAG TCC AC 3', Antisense 3' CTG GTC CAA CAA AGG TGG CCA AGG C 5'。IL-3Rα: 扩增产物长度 227 bp, Sense 5' GAA CAG ATT CCA CCA TGG CCT CCT TG 3', Antisense 3' GTC TCC ACT ACG GAC ACT TCT GTC 5'。β-actin: 扩增产物长度 587 bp, Sense: 5' CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C 3'; Antisense: 3' AGA CCG CCG TGG TGT ACA TGG GA 5'。

1.7　RT-PCR 检测

采用 SqRT-PCR, 通过设立β-actin 阳性对照作基因转录之 mRNA 半定量测定。

1.7.1　总 RNA 提取　细胞悬液内提取 RNA 8 ~15 μg(1× 10^6 cells)。采用 Tripure RNA 提取盒(Tripure isolation rengent, TIR)提取, 方法参照试剂盒说明书进行。

1.7.2　逆转录步骤　置 PCR 仪中 42 ℃反应 90 min, 95 ℃变性 5 min。

1.7.3　PCR 步骤　50 μl 反应体系, 按以下条件扩增 35 个循环。94 ℃变性 45 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃延伸 1 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, β-actin 为阳性对照, 以积分光密度 $IOD_{(目的带)}$/ $IOD_{(β\text{-}actin)}$之比进行半定量分析。

1.8　统计学分析

光镜下观察 IL-5Rα、IL-3Rα、GM-CSFRα 及βcR mRNA 阳性细胞百分率, 至少观察 5 个视野(× 400), 计数 200 个细胞以上, 由于mRNA 阳性表达信号强弱不等, 为统计方便, 仅计数各组表达强阳性细胞百分比。各组结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据以 SPSS(Statistics package for social science)统计分析。各组间比较采用非配对 *t* 检验。

2　结果

2.1　哮喘豚鼠 BALF 中的细胞总数及 Eos 的变化

正常豚鼠 BALF 中细胞总数为(103.83 ± 61.31)× 10^5/ml, 致敏豚鼠抗原激发后 48 h 后, 细胞总数显著高于正常组, 与正常组比较增加 3 倍以上($P < 0.01$)。正常组 Eos 以 NEos 为主, 哮喘组不同密度 Eos 均显著高于正常组, 以 HEos 为著, 其细胞增加数与 NEos 相比差别非常显著($P < 0.01$), 表明哮喘时肺部组织 Eos 浸润以 HEos 为主, 见表 1。

表 1　哮喘豚鼠 **BALF** 中 **Eos** 的变化(× 10^5/ ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of Eos in BALF of guinea pig with asthma(× 10^5/ ml, $\bar{x} \pm s$)

Group	*n*	HEos	NEos	Total cells
Control	6	4.83 ± 1.47	9.50 ± 2.59	103.83 ± 61.3
Asthmatic	6	75.17 ± 12.59 **	50.67 ± 11.20 **	479.33 ± 121.17 **

**: $P < 0.01$ *vs* control

2.2　哮喘豚鼠 BALF 中 Eos 细胞凋亡的变化

哮喘豚鼠肺 BALF 中 Eos 凋亡率明显较正常对照组低($P < 0.01$), HEos 与 NEos 凋亡率差别不显著, 见表 2。

表 2　**BALF** 中 **Eos** 细胞凋亡率变化(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of apoptic rate of Eos in BALF(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	*n*	HEos	NEos
Control	6	8 ± 2	7 ± 2
Asthmatic	6	4 ± 2 **	3 ± 2 **

**: $P < 0.01$ *vs* control

2.3　哮喘豚鼠 BALF 中 Eos IL-5Rα、IL-3Rα、GM-CSFRα 及βcR mRNA 表达的变化

原位杂交检测 IL-5Rα、IL-3Rα、GM-CSFRα 及βcR mRNA 表达显示, 正常组不同密度 Eos 均有一定量表达。HEos 表达IL-3Rα、GM-CSFRα 明显高于 NEos。哮喘组与正常组比较, 不同密度 Eos 表达各受体α mRNA 明显下降, 而βcR mRNA 表达明显增加。哮喘组 HEos 表达各受体与 NEos 差异不显著, 见表 3。

表 3　**BALF** 中 **Eos IL-5Rα、IL-3Rα、GM-CSFRα** 及 **βcR mRNA** 表达的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Expression of mRNA of IL-5Rα, IL-3Rα, GM-CSFRα and βcR in BALF Eos(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Control(*n*= 6)		Asthmatic(*n*= 6)	
	HEos	NEos	HEos	NEos
IL-5Rα	42 ± 5	48 ± 8	21 ± 5 **	18 ± 10 **
IL-3Rα	45 ± 9△	36 ± 6	25 ± 6 *	23 ± 9 *
GM-CSFRα	43 ± 8△△	34 ± 5	25 ± 6 **	23 ± 7 *
βcR	28 ± 5	26 ± 5	41 ± 6 **	39 ± 7 **

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* control;
△: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$ *vs* NEos

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

2.4 BALF 中 Eos IL-5Rα、IL-3Rα mRNA 表达相对含量的变化

RT-PCR 检测哮喘豚鼠 BALF 中 Eos IL-5Rα、IL-3Rα mRNA 相对含量($IOD_{(目的带)}/IOD_{(\beta\text{-actin})}$)，哮喘组显著低于正常组，见表4。

表4 BALF 中 Eos IL-5Rα、IL-3Rα mRNA 相对含量的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Contents of mRNA of IL-5Rα、IL-3Rα in BALF Eos($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-5Rα	IL-3Rα
Control	6	3.77±0.62	1.87±0.49
Asthmatic	6	2.11±0.40**	1.13±0.17**

**: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

本实验哮喘组 BALF 中细胞数及不同密度 Eos 明显增加，以 HEos 增加为显著，而 HEos 及 NEos 细胞凋亡明显下降，表明细胞凋亡受抑是哮喘肺部 Eos 增多的原因之一。Eos 凋亡异常与 IL-5、IL-3、GM-CSF 有关，这些细胞因子通过其细胞膜上的受体发挥生物学功能，而受体数量和结构的改变又是调节细胞功能的重要机制。有人用过敏原激发哮喘患者后，其骨髓 CD34/35 干细胞表达 IL-5R 上调，表明受体参与了 Eos 的分化[9]。这 3 种细胞因子功能相近，对 Eos 有交叉竞争现象，交叉竞争结合的强弱依次是 GM-CSF＞IL-3＞IL-5。已经证明它们共享一个共同的β亚基[10]。依靠各自独特的α亚基保持其特异性。α亚基是低亲合力受体，α亚基不能结合细胞因子，但可与α亚基结合形成高亲合力受体，并与信号传导有关[1]。

已发现 IL-5α 链转录调节产生膜结合型(Membrane-bound form，mIL-5Rα)或可溶型受体(Soluble form of IL-5Rα，sIL-5Rα)。膜型α受体定位于细胞膜，与β亚基结合后，其与 IL-5 结合的能力提高，特殊信号传导过程被激活。相反，可溶型α受体分泌至体液中，与 IL-5 结合，阻滞 IL-5 对靶细胞的活化[4]。sIL-5Rα mRNA 编码长度 1.4 kb。mIL-5Rα mRNA 编码 5.0 kb[11]。本实验所测 IL-5Rα mRNA 为编码 811～1 038 bp 之间[7]，不能区分可溶型与膜型，反映了两种α受体的表达水平。由于哮喘患者 Eos 中 90% IL-5R 是可溶型(可能非活动性)，10%为膜型(活动性的)[4]。说明本研究哮喘组 Eos 各受体 mRNA 主要反映可溶型受体表达水平。可溶型受体与细胞因子结合，但不产生 IL-5 的生物学作用，相反可中和 IL-5，起到负性调节剂的作用[11]。而过敏患者在花粉季节 IL-4 的可溶型受体表达增加，并与血 IgE 水平正相关，其可溶型受体起正性调节的作用，机制仍不清楚[12]。

本实验哮喘组豚鼠 BALF 中 Eos 表达 IL-5Rα、IL-3Rα、GM-CSFRα 明显下降，βc 受体 mRNA 表达显著增高，而同时哮喘组豚鼠 Eos 凋亡明显减少，提示 3 种细胞因子受体α链对 Eos 活化的负调节作用降低，凋亡减少，βcR 表达增加使 Eos 能与更多的细胞因子结合，使细胞因子作用信号加强，细胞活化，凋亡减少。表明哮喘 Eos 的 IL-5、IL-3 和 GM-CSF 受体的表达有可能通过以下两种机制调节细胞功能：①α链可溶型表达减少，使其对 Eos 活化及凋亡抑制的负调节减弱；②3 种受体的共同β链表达增加，使其对 Eos 活化和凋亡抑制的正性调节增强。

本实验中发现哮喘 Eos βc 受体 mRNA 表达增加，提示 Eos 能与更多的细胞因子结合，细胞信号传导增强，使细胞因子作用信号加强。表明 IL-5 等细胞因子的作用不但通过各α受体的可溶型来进行负调节，β受体也参与调节，IL-5、IL-3 及 GM-CSF 受体可能参与了哮喘的发病过程。针对β受体的阻滞剂也许可以最终抑制 IL-5 等细胞因子的抑凋亡作用。

参考文献：

[1] Ogata N, Kouro T, Yamada A, *et al*. JAK2 and JAK1 constitutively associate with an interleukin-5(IL-5) receptor α and βc subunit, respectively, and are activated upon IL-5 stimulation[J]. Blood, 1998, 91(7): 2 264—2 271.

[2] Wang P, Wu P, Cheewatrakoolpong B, *et al*. Selective inhibiton of IL-5 receptor α-chain gene transcription by IL-5, IL-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human blood eosinophils[J]. J Immunol, 1998, 160(9): 4 427—4 432.

[3] Zheng J, Kuvelkar R, Cheewatrakoolpong B, *et al*. Evidence for multiple promoters of the human IL-5 receptor α subunit gene: a novel 6-base pair element determines cell-specific promoter function[J]. J Immunol, 1997, 159(11): 5 412—5 421.

[4] Yasruel Z, Humbert M, Kotsimbos T C, *et al*. Membrane-bound and soluble αIL-5 receptor mRNA in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic asthmatics[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(4): 1 413—1 418.

[5] 王长征，王春霞，钱桂生，等. 银杏苦内酯对过敏性豚鼠气道内低密度嗜酸性粒细胞增多的调制作用[J]. 中国药理学通报，1996，12(3)：238—240.

[6] 王长征，蒲 萍，吴国明，等. 吸入血小板活化因子对豚鼠气道反应性影响及机制的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，1995，18(3)：155—157.

[7] McClanahan T, Dalrymple S, Barkertt M, *et al*. Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during *in vitro* development of hematopoietic cells[J]. Blood, 1993, 181(11): 2 903—2 915.

[8] 蔡文琴，王伯弋云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406—409.

[9] Denburg J A, Sehmi R, Upham J, *et al*. Rgulation of IL-5 and IL-5 receptor expression in the bone marrow of allergic asthmatics[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 118(2—4): 101—103.

[10] Yamada T, Sun Q, Zeibecoglou K, *et al*. IL-3, IL-5, granulocyte-macrophage clony-stimulating factor receptor α-subunit, and common β-subunit expression by peripheral leukocytes and blood dendritic cells[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101(5): 677—682.

[11] Tavernier J, Tuypens T, Plaetinck G, *et al*. Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin 5 receptor α subunit[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(15): 7 041—7 045.

[12] Benson M, Stramneg I L, Wennergren G, *et al*. Increase of the IL-4 receptor[IL-4sR] and positive correlation between IL-4sR and IgE in nasal fluids from school children with allergic rhinitis[J]. Allergy Asthma Proc, 2000, 21(2): 89—95.

(编辑 王 红)

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