DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.014
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0151-03

论著

雾化吸入γ-干扰素对免疫低下大鼠某些细胞因子的影响

马 壮,钱桂生,黄桂君,毛宝龄 (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 研究雾化吸入γ-干扰素(IFN-γ)对免疫低下大鼠细胞因子的影响。方法 醋酸考的松皮下注射并气管内注射白色念珠菌复制大鼠免疫低下肺感染模型,检测雾化吸入IFN-γ 1、3、7 d的免疫低下大鼠和对照组大鼠肺泡巨噬细胞(AM)培养上清中TNF-α活性和IL-1β、IL-6水平,支气管肺泡灌洗液(BALF)IFN-γ、TNF-α活性,肺组织IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6表达,以及血清IFN-γ活性和IL-1β、IL-6水平。结果 吸入IFN-γ组大鼠AM培养上清中TNF-α的活性和IL-1β、IL-6水平显著高于对照组大鼠。吸入IFN-γ组大鼠BALF中IFN-γ、TNF-α活性高于对照组大鼠(第7天TNF-α除外)。吸入IFN-γ组灌菌后第7天肺组织IFN-γ和IL-1β的表达高于对照组,TNF-α表达低于对照组,IL-6表达二组无显著差异。吸入IFN-γ组大鼠血清IFN-γ活性和IL-1β、IL-6水平,除第3天IL-1β外,与免疫低下大鼠组相比差异不显著。结论 雾化吸入IFN-γ可明显提高肺内IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6水平,但对相应血清细胞因子无明显影响。

关键词:γ-干扰素;免疫低下;大鼠;细胞因子
中图法分类号:R392.3;R519.3 文献标识码:A

Effect of IFN-γ inhalation on some cytokines of immunocompromised rats

MA Zhuang, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, MAO Bao-lin (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of IFN-γ inhalation via aerosol on cytokines of the immunocompromised rats. **Methods** Immunocomprised rat model was established with cortisol acetate injection for 14 d and then *Candida albicans* fluid was injected by tracheal for establishing am immuno comprised with pulmonary infection model. IFN-γ was inhaled with aerosol 1 d before the bacterium injection and then for 1, 3 and 7 d respectively. The activity of TNF-α, and the levels of IL-1β and IL-6 in the supernatant of the cultured alveolar macrophage(AM), the activity of IFN-γ and TNF—α in bronchial alveolar lavage fluid (BALF), the expressions of IFN-γ, TNF—α, IL-1β, and IL-6 of the lung tissues, the level of IFN-γ, IL-1β, and IL-6 in the serum were investigated. **Results** The activity of TNF—α, and the levels of IL-1β and IL-6 in the culture supernatant of the AM of the rats treated with IFN-γ were significantly higher than those of the control. The activity of IFN-γ and TNF-α in BALF was higher in the IFN-γ inhaled rats than in the control (except the activity of TNF-α on the 7th day). The expressions of IFN-γ and IL-1β in lung tissues was higher in the rats treated with IFN-γ than in the control. The expression of TNF-α in the rats treated with IFN-γ was less than that in the control rats. The expression of IL-6 had no difference between 2 groups. And no difference was found in the activity of IFN-γ, and the levels of IL-1β and IL-6 in the serum between 2 groups(except IL-1β on the 3rd day). **Conclusion** Administration of IFN-γ via aerosol can obviously increase the activity or levels of some cytokines in the lung of the immunocompromised rats, but has no effect on them in serum of the immunocompromised rats.

Key words: IFN-γ; immunocompromised; rats; cytokines; aerosol

随着免疫抑制药物的广泛临床应用,免疫低下患者日益增多。由此造成的难治性呼吸系统感染,作为这些患者的主要死亡原因,已经成为临床医学的研究重点。目前认为免疫低下宿主肺部细胞免疫功能低下主要是因为缺乏淋巴细胞源性细胞因子。本实验旨在探讨通过雾化吸入的方法补充肺局部IFN-γ水平,对免疫低下大鼠细胞因子的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

雄性Wistar大鼠30只(150~180 g)购于本校动物中心。白色念珠菌由本校微生物教研室馈赠。大鼠IFN-γ购于Pepro Tech Inc。雾化器为PLA933-Ⅰ型雾化治疗器(本研究所研制),雾化率0.25 ml/min,雾化颗粒直径(6.294±1.333)μm。放线菌素D购于Sigma公司。小牛血清和RPMI-1640购于Hyclone公司。L929细胞株购于上海细胞所,VSV病毒由第二军医大学免疫教研室曹雪涛教授馈赠。大鼠IL-1β、IL-6 ELISA试剂盒购于ENDOGEN公司。

1.2 动物模型的制备[1]和分组

给雄性Wistar大鼠隔日1次皮下注射醋酸考的松100 mg/kg,14 d后制成免疫低下大鼠模型。并于第14天气管内注射白色念珠菌菌液0.2 ml(左右侧各0.1 ml,1×10^6 cfu/ml),制成免疫低下并有白色念珠菌支气管-肺感染的大鼠模型。将大鼠随机地分为免疫低下+白色念珠菌+干扰素1、3、7 d组和对照组。实验组大鼠于气管内注射白色念珠菌的前1 d开始,雾化吸入IFN-γ 10 000 IU,每日1次,至实验结束。对照组同期雾化吸入等体积的等渗盐水。

作者简介:马 壮(1964—),男,辽宁省沈阳市人,博士,副主任医师,主要从事免疫低下宿主肺部感染方面的研究,发表论文14篇,现在沈阳军区总医院。电话:(024)23051165

收稿日期:2000-10-12;修回日期:2000-12-24

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

1.3 标本留取

大鼠经戊苯巴比妥麻醉后分离颈部气管，穿刺置入套管，用含1 mg/ml小牛血清白蛋白的Hanks液进行支气管肺泡灌洗，每次10 ml，共5次，留取支气管肺泡灌洗液(BALF)。将第1管BALF 4 ℃、1 500 r/min离心15 min。上清液用于IFN-γ、TNF-α活性和小牛血清白蛋白测定。Hanks液洗涤沉淀物1次，5% CO_2、37 ℃贴壁2 h。弃上清，回收贴壁的肺泡巨噬细胞(Alveolar macrophage，AM)，一般总数为$2\times10^6\sim4\times10^6$。用含10%小牛血清的RPMI-1640调整AM浓度为1×10^6/ml，台盼蓝染色蓝染的AM<5%可进行检测。心腔穿刺抽血，离心留取血清。

1.4 AM培养上清中TNF-α的活性和IL-1β、IL-6水平测定

取0.5 ml(1×10^6/ml)含10%小牛血清的RPMI-1640悬液加入24孔细胞培养板，5% CO_2、37 ℃贴壁2 h。用预温37 ℃Hanks液洗涤6次。加入含10%小牛血清的RPMI-1640 1 ml，5% CO_2、37 ℃培养36 h。采用L929细胞毒性试验测定上清中TNF-α的活性[2]。IL-1β、IL-6水平按ELISA试剂盒说明测定。

1.5 BALF中TNF-α、IFN-γ活性测定

TNF-α活性用L929细胞毒性试验测定[2]，IFN-γ活性用L929细胞病变抑制试验测定[3]。测定结果用小牛血清白蛋白的含量校正，以U/ml的形式表示。小牛血清白蛋白的测定采用毛细管电泳的方法进行，条件为未包被毛细管34 cm×50 μm，20 ℃，运行电压12 kV，运行缓冲液为0.02 mol/L四硼酸钠溶液，检测波长214 nm，积分曲线下面积推算小牛血清白蛋白含量。

1.6 肺组织IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6表达

取肺组织50 mg置于匀浆器中，用1 ml Tripure分离液(BOEHRINGER MANNHEM)提取RNA。取3 μg RNA进行逆转录，获得cDNA。取5 μl cDNA分别进行PCR(IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6和β-actin)。引物序列如下：TNF-α(315 bp)，上游5' CATGATCCGAGATGTGGAACTGGC 3'，下游5' CTGGCTCAGCCACTCCAGC 3'；IL-1β(377 bp)，上游5' TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG 3'，下游5' GCCGTCTTTCATACACAGG 3'；IFN-γ(490 bp)，上游5' ATC CAT GAG TGC TAC ACG C 3'；下游5' CTC TCT ACC CCA GAA TCA G 3'；IL-6(509 bp)，上游5' GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC 3'，下游5' TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT 3'；β-actin(587 bp)，上游5' CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC 3'，下游5' AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC 3'。反应条件：TNF-α 95 ℃ 45 s，60 ℃ 54 s，72 ℃ 90 s，35循环，72 ℃ 10 min；IL-1β 94 ℃ 20 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，35循环，72 ℃ 10 min；IFN-γ 94 ℃ 45 s，56 ℃ 50 s，72 ℃ 90 s，35循环，72 ℃ 10 min；IL-6 94 ℃ 20 s，65 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，35循环，72 ℃ 10 min；β-actin 95 ℃ 45 s，60 ℃ 55 s，72 ℃ 120 s，35循环，72 ℃ 10 min。取RT-PCR产物10 μl，2%琼脂糖凝胶电泳，凝胶分析仪测定灰度值，分别计算IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6与β-actin的比值。

1.7 血清IFN-γ活性和IL-1β、IL-6水平测定

血清γ-干扰素活性用L929细胞病变抑制试验[3]。IL-1β、IL-6水平按ELISA试剂盒说明测定。

1.8 统计学处理

所得数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用EXCEL软件，t检验处理各组数据。

2 结果

2.1 雾化吸入IFN-γ对肺泡巨噬细胞分泌功能的作用

对照组大鼠和吸入IFN-γ组大鼠气管内注射白色念珠菌后1、3、7 d，AM培养上清中TNF-α活性，IL-1β和IL-6水平见表1。经t检验分析，相应天数两组的AM培养上清中TNF-α活性，IL-1β和IL-6水平均差异显著。

表1 肺泡巨噬细胞培养上清中TNF-α活性和IL-1β、IL-6水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 TNF-α activity, and levels of IL-1β, and IL-6 in the culture supernatant of AM($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control(n=15)			Inhaling IFN-γ group(n=15)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
TNF-α(U/ml)	472.0±45.8	490.0±43.6	1 057.0±270.1	651.0±107.0 *	1 250.0±295.2 **	1 537.0±244.8 *
IL-1β(ρ_B/pg·ml^{-1})		127.40±5.41	144.30±6.66		149.50±5.90 **	158.00±5.17 **
IL-6(ρ_B/pg·ml^{-1})		372.10±6.68	764.40±14.34		705.10±10.19 **	944.80±18.98 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.2 雾化吸入IFN-γ对BALF中IFN-γ、TNF-α活性的影响

对照组大鼠和吸入IFN-γ组大鼠气管内注射白色念珠菌后1、3、7 d，BALF中IFN-γ、TNF-α活性见表2。经t检验分析，1、3 d两组BALF中IFN-γ、TNF-α活性和7 d两组BALF中IFN-γ活性差异均显著。

表2 支气管肺泡灌洗液中TNF-α和IFN-γ活性($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 TNF-α and IFN-γ activity in BALF($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control(n=15)			Inhaling IFN-γ group(n=15)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
IFN-γ(U/ml)	2 996.0±677.0	3 577.0±404.3	4 099.0±144.7	6 343.0±182.4 **	9 038.0±374.1 **	12 576.0±773.2 **
TNF-α(U/ml)	37.0±7.6	356.0±33.6	613.0±30.3	59.0±14.0 *	505.0±10.4 **	599.0±16.9

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

2.3 雾化吸入IFN-γ后肺组织IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6表达的变化

吸入IFN-γ组大鼠气管内注射白色念珠菌后第7天，IFN-γ、TNF-α、IL-1β和IL-6 RT-PCR条带灰度值与β-actin的比值分别为1.137±0.0157、0.627±0.0192、1.052±0.0453、1.238±0.0656；对照组大鼠为1.004±0.0707、0.681±0.0396、0.942±0.0781、1.190±0.1201。经t检验分析，吸入IFN-γ组灌菌后第7天肺组织IFN-γ和IL-1β的表达高于对照组，TNF-α表达低于对照组，而IL-6表达两组差异不显著。

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

2.4　雾化吸入 IFN-γ 对血清 IFN-γ 活性和 IL-1β、IL-6 水平的影响

对照组大鼠和吸入 IFN-γ 组大鼠气管内注射白色念珠菌后 1、3、7 d, 血清 IFN-γ 活性和 IL-1β、IL-6 水平见表 3。经 t 检验分析, 除第 3 天吸入 IFN-γ 组大鼠血清 IL-1β 水平显著高于对照组大鼠外, 相应天数两组间差异不显著。

表3　血清 IFN-γ 活性和 IL-1β、IL-6 水平($\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Serum activity of IFN-γ, and levels of IL-1β and IL-6($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Control(n=15)			Inhaling IFN-γ group(n=15)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
IFN-γ(U/ml)	3 863.0±667.8	4 680.0±953.1	9 451.0±362.8	4 203.0±865.2	5 590.0±1 191.1	11 076.0±2691.3
IL-1β(ρ_B/pg·ml^{-1})		173.80±4.11	281.20±9.95		187.40±8.66*	291.40±6.56
IL-6(ρ_B/pg·ml^{-1})		291.70±8.03	351.70±9.67		304.60±11.28	365.70±10.01

*: $P<0.05$ *vs* control

3　讨论

免疫低下病人易患难治性呼吸系统感染的主要原因是机体的免疫功能(尤其是细胞免疫功能)低下。细胞因子作为调节机体免疫状态的活性物质, 具有仅需小剂量、局部发挥作用等特点。有实验表明 IFN-γ 可增强肺泡内巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬及杀菌功能, 肺泡巨噬细胞的抗原提呈功能, 增加对某些(特别是机会致病)病原体的清除[4~8]。同时还可通过细胞因子网络系统使 TNF-α 和 GM-CSF 等细胞因子的肺内水平升高, 从而产生协同作用。目前认为 IFN-γ 是肺内抗感染细胞免疫的首发因子之一。因此, 提高免疫低下宿主肺内 IFN-γ 活性是增强肺局部抗感染能力的较好方法。

我们的实验表明吸入 IFN-γ 组大鼠 AM 培养上清中 TNF-α 活性(灌菌后 1、3、7 d), IL-1β 和 IL-6(灌菌后 3、7 d)显著高于对照组大鼠, 说明雾化吸入 IFN-γ 可明显增强肺泡巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的功能。吸入 IFN-γ 组大鼠灌菌后 1、3 d, BALF 中 IFN-γ 和 TNF-α 活性均高于对照组大鼠, 说明雾化吸入 IFN-γ 可通过细胞因子网络, 刺激肺组织分泌 IFN-γ 和 TNF-α, 使支气管肺泡衬液中 IFN-γ 和 TNF-α 的活性增强。灌菌后第 7 天肺组织 IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6 表达的检测结果显示吸入 IFN-γ 组大鼠肺组织 IFN-γ 和 IL-1β 的表达高于对照组, 相应 BALF 中 IFN-γ 活性吸入 IFN-γ 组也高于对照组; 而 TNF-α 的表达吸入 IFN-γ 组低于对照组, 相应两组 BALF 中 TNF-α 活性差异不显著; 肺组织 IL-6 的表达也差异不显著。综合灌菌后第 7 天肺内细胞因子的变化显示, 由于吸入 IFN-γ 增强了肺部抗感染能力, 至灌菌后第 7 天, 吸入 IFN-γ 组大鼠肺内 IFN-γ 和 IL-1β 表达高于对照组, 但 TNF-α 和 IL-6 的表达已经回落。说明吸入 IFN-γ 对肺内细胞因子的分泌并不是简单增强作用, 而是调节作用。同时, 我们的实验结果表明除雾化吸入 γ-干扰素的免疫低下大鼠血清 IL-1β 在第 3 天有一过性增高外, 雾化吸入 γ-干扰素的免疫低下大鼠血清 γ-干扰素活性、IL-1β 和 IL-6 水平与对照大鼠无明显差异。说明每日雾化吸入 10 000 IU 的 IFN-γ 对免疫低下大鼠血清细胞因子无明显影响。

参考文献:

[1] Skerrett S J, Martin T R. Intratracheal interferon-γ augments pulmonary defenses in experimental legionellosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149(1): 50—58.

[2] Skerrett S J, Martin T R. Roles for tumor necrosis factor alpha and nitric oxide in resistance of rat alveolar macrophages to legionella pneumophila [J]. Infect Immun, 1996, 64(8): 3 236—3 243.

[3] 曹雪涛, 章卫平, 顾　申, 等. 成纤维细胞介导的白介素 6 基因疗法增强机体免疫功能的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 1994, 10(1): 8—12.

[4] Szalay G, Ladel C H, Blum C, *et al*. IL-4 neutralization or TNF-α treatment ameliorate disease by an intracellular pathogen in IFN-γ receptor-deficient mice[J]. J Immunol, 1996, 157(11): 4 746—4 750.

[5] Heath L, Chrisp C, Huffnagle G, *et al*. Effector mechanisms responsible for gamma interferon-mediated host resistance to legionella pneumophila lung infection: the role of endogenous nitric oxide differs in susceptible and resistant marine hosts[J]. Infect Immun, 1996, 64(12): 5 151—5 160.

[6] Condos R, Rom W N, Schluger N W. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-γ via aerosol[J]. The Lancet, 1997, 349(9 064): 1 513—1 515.

[7] Yap G S, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma-and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii[J]. J Exp Med, 1999, 189(7): 1 083—1 092.

[8] 马　壮, 钱桂生, 黄桂君, 等. 雾化吸入 γ-干扰素增强免疫低下大鼠肺部抗白色念珠菌感染能力[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 292—293.

(编辑　谢义霞)

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