DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.004

雷公藤对哮喘豚鼠嗜酸性细胞凋亡及 IL-5和 GM-CSF mRNA表达的研究*

郭晓明** 王长征 赖克方 郭先健 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: 探讨雷公藤对哮喘豚鼠嗜酸性细胞 (Eosinophil, Eos)凋亡及与白介素-5(IL-5)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) mRNA表达的作用。方法: 实验豚鼠分为哮喘组、雷公藤治疗组 (处理组) 和正常对照组。采用原位细胞凋亡 (TUNEL)和原位杂交技术分别检测豚鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF)中的 Eos的凋亡率和肺组织 IL-5 GM-CSF mRNA的表达。结果: 哮喘组 Eos凋亡率显著低于处理组和对照组 ($P < 0.05$)。哮喘组肺组织 IL-5和 GM-CSF mRNA的表达强度均显著高于处理组和对照组 ($P < 0.01$)。哮喘组 BALF中 Eos凋亡率与肺组织 IL-5 GM-CSF mRNA表达强度呈显著负相关 ($r = -0.62$和 -0.56, $P < 0.05$)。结论: 哮喘豚鼠肺组织 IL-5 GM-CSF mRNA表达增强,可能是 Eos凋亡异常的重要原因。雷公藤甲素能抑制哮喘豚鼠 IL-5 GM-CSF表达,诱导 Eos凋亡,在抗哮喘气道炎症中具有潜在的应用价值。

关键词 哮喘;嗜酸性细胞;雷公藤;凋亡; IL-5; GM-CSF;豚鼠
中图法分类号 R282.71; R562.25

肺内嗜酸性细胞 (Eosinophil, Eos)浸润是哮喘的显著病理特征之一。哮喘肺内的 Eos增多,除了与体内 Eos生成增多外,还可能与 Eos在肺内生存时间延长,即正常的细胞凋亡受到抑制有关[1]。T淋巴细胞在哮喘气道炎症中起关键的调控作用,它通过分泌 IL-5 GM-CSF等细胞因子而促进 Eos在骨髓的生成增多,并延长 Eos的存活时间[2]。过去,我们曾发现雷公藤甲素能抑制哮喘豚鼠肺内的 IL-5等细胞因子表达[3]。本实验观察了雷公藤对哮喘豚鼠 BALF中 Eos的凋亡作用以及肺内 IL-5 GM-CSF mRNA表达的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

IL-5 GM-CSF探针均为合成的寡核苷酸探针。IL-5探针序列为 3′-CACTCGGTGTTCATTACAVCCA-AGAAACTCT-5′; GM-CSF探针序列为 3′-CTGACGACCCTCGCTGGTCAGG-TCC-5′。原位凋亡试剂盒购自宝灵曼公司。

1.2 哮喘豚鼠模型

30只雄性健康豚鼠 (体重 400~500 g,购于第三军医大学实验动物中心),随机分为哮喘组、处理组和对照组,每组各 10只。在第 1天和第 8天用 2% 卵蛋白 (OA) 0.5 ml腹腔注射,第 21天置于密闭容器中用 2% OA雾化,激发 1 h,或出现哮喘样发作为止。处理组在激发 24 h后用雷公藤甲素 (福建省医学科研所提供) 100 μg/kg腹腔注射。对照组按哮喘组的方法用生理盐水取代 OA处理。

1.3 支气管肺泡灌洗

用 3% 戊巴比妥 1 ml/kg,腹腔注射处死动物,经放血后气管插管, Hanks液对豚鼠右肺灌洗,每次 3 ml,共 6次。对照组应用生理盐水激发 24 h后按以上方法灌洗。

1.4 肺组织标本制备

留取左肺组织,液氮速冻后制成 5 μm厚冰冻切片,置 -70℃保存备用。

1.5 Eos分离固定

BALF离心 1 000 r/min, 5 min,收集试管底部的细胞制成细胞悬液,加在盛有比重分别为 1.100和 1.085, Percoll分离液的离心管中,离心 2 000 r/min, 15 min,然后取两种比重介面之间的 Eos涂片。玻片预先用多聚赖氨酸粘附剂 (北京中山公司)处理以防脱落。4% 多聚甲醛固定 30 min,用于原位细胞凋亡。

1.6 Eos凋亡 (TUNEL)方法检测

参照宝灵曼公司试剂盒说明书略加修正操作。0.1% Triton X-100 4℃通透 2 min, PBS漂洗。加入由末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (TdT)、脱氧三磷酸核苷 (dNTP)和荧光素标记的脱氧三磷酸尿苷 (dUTP)组成的混合物 30 μl/片, 37℃反应 30 min, PBS漂洗,碱性磷酸酶连接的抗荧光素抗体 30 μl/片, 37℃反应 30 min,终止反应, BCIP/NBT显色,光镜下观察。

在高倍视野下随机选择 10个视野,计总细胞数和凋亡细胞数,根据以下公式计算细胞凋亡率。

$$\text{凋亡细胞阳性率 (\%)} = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

1.7 原位杂交检测 IL-5 GM-CSF mRNA表达

取肺组织标本, 0.1 mol/L PBS漂洗 3次,每次 5 min, 0.3% Triton X-100, 25 min,蛋白酶 K (2 ng/ml) 37℃, 30 min, 4% 多聚甲醛 5 min, 0.1 mol/L PBS漂洗 5 min, (1.33% 三乙醇胺+ 0.25% 乙酸酐)/0.1 mol/L Tris HCl pH 8.0, 10 min, 2

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670337
** 郭晓明,男, 40岁,副主任医师,现在北京军区 251医院干部病房 张家口, 075000

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

× SSC漂洗 10 min,杂交液 (每片加含有 IL-5 GM-CSF探针标记液) 20 μl, 45 °C, 20 h, 4× SSC 37 °C下, 15 min, 2× SSC 37 °C下 30 min,依次转入 1× SSC, 0.5× SSC中各 37 °C下 10 min, 0.05 mol/L PBS漂洗 5 min,加 Anti-Dig-Ap抗体 (1∶1 000) 37 °C下 1 h转入 4 °C下 20 h, 0.05 mol/L PBS 5 min, TSM 1, TSM 2各 10 min, NBT/BCIP显色液 3~4 h, 0.05 mol/L PBS漂洗终止反应,中性树胶封片。杂交前所需液体及试剂均需 DEPC无 RNAase处理。

原位杂交阴性对照,即在杂交液中不加核酸探针,其它与杂交步骤相同。

在高倍视野 (hpf)下随机选择 10个视野,计数 IL-5 GM-CSF mRNA阳性细胞数,以其平均值 (每高倍视野下的细胞数)表示 IL-5和 GM-CSF mRNA表达强度。

1.8 统计分析

资料采用 $\bar{x}\pm s$表示,并用 t检验作组间差异显著性检验,采用直线相关分析做相关性检验。

2 结果

2.1 豚鼠肺组织 IL-5 mRNA, GM-CSF mRNA表达强度

哮喘组显著高于对照组和处理组 ($P<0.01$),对照组和处理组无显著差异 ($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 豚鼠肺组织 IL-5 GM-CSF mRNA表达强度 ($n=10$)

Tab 1 The densities of expression of IL-5, GM-CSF mRNA in guinea pigs' lung tissue ($n=10$)

Groups	IL-5 mRNA	GM-CSF mRNA
Asthma	30.5± 8.2*	26.7± 7.3*
Treated	8.3± 3.5	10.± 4.5
Control	6.2± 2.1	7.5± 2.9

*: $P<0.01$ *vs* control and treated groups

2.2 BALF中 Eos的凋亡率

哮喘组显著低于对照组及处理组 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 1。

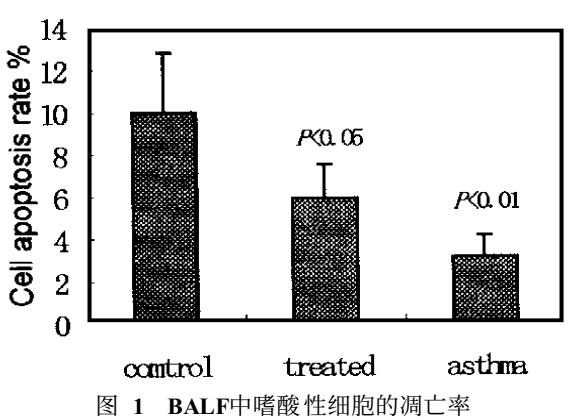


图 1 BALF中嗜酸性细胞的凋亡率

Fig 1 The apoptotic rate of eosinophils in BALF

$P<0.05$, $P<0.01$ *vs* control group

2.3 Eos凋亡率与 IL-5 GM-CSF mRNA表达强度的相关性

哮喘组 BALF中 Eos凋亡率与肺组织 IL-5 GM-CSF mRNA表达强度呈显著负相关 ($r=-0.62$和 -0.56, $P<0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡是生物体内存在的一种普遍现象,对维持组织细胞的平衡起着重要作用。Eos是一种终末分化细胞,当其存活时间终结时,将通过细胞凋亡清除。哮喘患者肺内 Eos正常凋亡受到抑制,必然会导致 Eos数量的增多。哮喘组 Eos凋亡率显著低于对照组及处理组,揭示哮喘肺内 Eos存在凋亡障碍。我们实验室的一项研究发现,给哮喘豚鼠一次性吸入抗原后可造成肺内的 Eos持续浸润达 1周以上并同时有 Eos凋亡率的显著降低[4],提示哮喘 Eos的凋亡障碍是 Eos在肺内持续浸润及气道炎症产生的重要机制。

Eos分化成熟后从骨髓进入外周血,在外周血存活大约 25 h,大部分以凋亡的方式被清除[5]。Eos体外培养仅能存活 3~4 d,但加入 IL-4 IL-5和 GM-CSF时,可以使 Eos存活时间增至 1周以上,当 3种细胞因子联合培养时,可使 Eos存活 2周以上[6]。Simon等[7]用 Eos明显增多的过敏性鼻炎患者鼻息肉组织在体外培养,发现培养的鼻息肉组织至第 7天仍未见 Eos凋亡,而相应的下鼻甲组织培养第 3天即可见 Eos凋亡,同时,鼻息肉组织表达较强的 IL-5 mRNA信号。使用 IL-5单抗中和 IL-5的作用,可诱导鼻息肉组织内 Eos凋亡。这些观察揭示了 IL-5 GM-CSF等在过敏性疾病 Eos增多及凋亡异常中具有十分重要的意义。本实验发现哮喘豚鼠肺组织 IL-5 GM-CSF mRNA表达增强且与 Eos凋亡率呈显著负相关,揭示 IL-5 GM-CSF在抑制哮喘 Eos凋亡中起重要作用。

雷公藤甲素是由雷公藤中提取的三环二萜类雷公藤内酯醇,作为一种免疫调节剂已广泛应用于临床,治疗类风湿、肾病以及哮喘等,但其作用机制仍不完全清楚。雷公藤甲素可显著抑制淋巴细胞增殖[8]。我们过去研究雷公藤甲素可抑制哮喘豚鼠肺组织中 IL-5 GM-CSF mRNA表达[3]。本实验发现雷公藤甲素可显著增加哮喘豚鼠 BALF中 Eos凋亡率,且抑制外周血淋巴细胞 IL-5 GM-CSF mRNA表达从而达到促进 Eos凋亡作用,发挥其抗哮喘气道炎症作用。雷公藤甲素能抑制哮喘豚鼠 IL-5 GM-CSF表达,诱导 Eos凋亡,在抗哮喘气道炎症中具有潜在的应用价值。

参考文献

1 Simon H U, Blaser K. Inhibition of pregrammed eosinophil death: A key pathogenic event for eosinophil? Immunol Today, 1995, 16(2): 53

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

2 Schleime R P, Bochner B S. The effects of glucocorticoids human eosinophils. J Allergy Clin Immunol, 1994, 94(1): 202
3 王长征,王春霞,金远林,等.哮喘豚鼠 IL-5 IL-3 GM-LSF mRNA表达及雷公藤内酯醇的影响.中华微生物和免疫学杂志, 1998, 18(2): 145
4 赖克方,王长征,郭先健,等.哮喘豚鼠嗜酸性细胞浸润和凋亡的动态变化.第三军医大学学报, 1998, 20(3): 198
5 Kroegel C, Virohow Jr J C, Iuttmann W, *et al*. Pulmonary immunol cells in heath and disease the eosinophil leukcyte. Eur Rispir J, 1994, 7(3): 519
6 Konderman L, Vasder Bruggen J, Schweizer R E, *et al*. Eosinophil primary by cytokines: from cellular signal to *in vivo* modulation. Eur Respir J, 1996, 9(Suppl 22): 119
7 Simon H U. Molecular mechanisms of defective eosinophil apoptosis in diseases associated with eosinophilia. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113(2): 206
8 吴国福,宋立平,崔莲山,等.雷公藤总甙对 IL-2和 IL-2R基因转录的影响.中华微生物和免疫学杂志, 1993; 13(3): 193

(收稿: 1998-12-23;修回: 1999-08-16)
(编辑 陈聪连)

Induction of eosinophil apoptosis and expression suppression of IL-5 and GM-CSF mRNA in allergic asthma with tripholide in guinea pigs*

Guo Xiaoming, Wang Changzheng, Lai Keifang, Guo Xianjian, Qian Guisheng (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Xinqiao, 400037)

Abstract Objective: To study the effects of tripholide on eosinophil apoptosis and suppression of expression of interleukin-5 (IL-5) and granulocyte/macrophage colong-stimulating factor (GM-CSF) in the airway of guinea pigs with allergic asthma. Methods: Guinea pigs were randomized into asthmatic, tripholide-treated and control groups. Eosinophil apoptosis in BALF was observed with TUNEL method and the expression of IL-5 GM-CSF mRNA with ISH. Results: The rate of eosinophil apoptosis was significantly lower in the asthmatic group than in the tripholide-treated and control groups ($P < 0.01$). The intenaity of expression of IL-5 and GM-CSF mRNA in the pulmonary tissues was far higher in the asthmatic group than in the tripholide-treated and control groups ($P < 0.01$). In the asthmatic group, the rate of eosinophil apoptosis was negatively correlated to the expression intensity of IL-5 and GM-CSF mRNA in the pulmonary tissues. Conclusion: Tripholide may play a role to suppress the allergic manifestations in the airways during asthma.

Key words asthma; eosinophil; tripholide; apoptosis; interleukin-5; granulocyte/macrophage colong-stimulating factor; guinea pig

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670337

十二指肠胰肾联合移植 1例营养治疗

Nutritional therapy for a case of duodenum, pancreas and renal united-transplantation

李明秀* 王 建 方 丽 (第三军医大学附属新桥医院营养科)重庆, 400037

1 临床资料

患者女,52岁,住院号 162742,患I 型糖尿病 19年,因慢性肾功能衰竭,糖尿病眼底改变,于 1998年 11月 13日入我院肾内科行十二指肠胰肾联合移植术前准备。入院时一般情况差,身高 140 cm,体重 40.5 kg,左上臂围 21 cm皮褶厚度 11 mm,血糖 16.1 mmol/L,尿糖卌,尿蛋白卄,血常规 WBC 10.6 × 10^9/L, RBC 2.42× 10^{10}/L, HB 74 g/L, PLT 175× 10^9/L,血肌酐 939.2 μmol/L,血尿素氮 26.3 mmol/L,肝功能 TP 66 g/L, Alb 33 g/L, Glb 33 g/L, A/G= 1,转氨酶正常。入院后给予高热能,高蛋白饮食治疗,体重增加至 45 kg,于 1998年 12月 15日行十二指肠胰肾联合移植术。术后营养支持分阶段进行,第一阶段为外周静脉营养,于术后第 2天至术后第 4天,因此期肾功能尚未恢复同时合并有创伤性胰腺炎,故要求低脂低蛋白。静脉营养组成包括脂肪乳、氨基酸, 5%葡萄糖,林格氏液,总热能 2.5~ 3.3 MJ/d,蛋白质 34 g/d,氮∶热= 1∶(110~ 150)。第二阶段静脉营养为主,肠内营养为辅,于术后第 4天开始,先用米汤试餐,试餐

* 李明秀,女,48岁,副主任医师,副教授

(下转 633页)

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