DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.007

糖皮质激素对哮喘豚鼠肺组织 IL-5 mRNA表达及嗜酸性粒细胞浸润的影响

毕玉田* 杨肇亨 王长征** (第三军医大学附属大坪医院呼吸内科) 重庆,400042

提 要 目的: 探讨哮喘时嗜酸性粒细胞(Eos)浸润与 IL-5 mRNA表达的关系以及糖皮质激素对其影响。方法: 采用孵蛋白(OA)吸入致敏制作豚鼠哮喘模型,在诱发哮喘 24 h后,检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中不同密度的 Eos的数量及其百分比,肺组织中原位 IL-5 mRNA的表达,以及地塞米松预防用药 6 d对其变化的影响。结果:① 哮喘组 BALF中 Eos总数增加,低密度 Eos(HEo)增加尤为显著;肺组织中 IL-5 mRNA原位表达水平显著增加($P<0.01$);② 与哮喘组比,地塞米松预防用药后 Eos计数及 HEo百分比显著减少($P<0.01$);③ 相关分析发现,IL-5 mRNA表达水平与 Eos总数($r=0.688$, $P<0.01$)及 HEo百分比显著正相关($r=0.582$,, $P<0.01$)。结论: 哮喘豚鼠肺组织 IL-5 mRNA表达的增加与 BALF中 Eos数量增多密切相关。抑制 IL-5 mRNA表达可能是糖皮质激素减少 Eos浸润及治疗支气管哮喘的重要机制之一。

关键词 哮喘;嗜酸性粒细胞;白细胞介素-5;原位杂交;地塞米松
中图法分类号 R562.25

支气管哮喘是一种以嗜酸性粒细胞(Eos)、肥大细胞反应为主的气道慢性炎症[1]。Eos通过释放颗粒蛋白导致上皮损伤,Eos也可产生白三烯、PAF,导致支气管痉挛、粘液分泌增多,从而导致哮喘的发生[2]。IL-5是主要由 Th2类淋巴细胞产生的特异作用于 Eos的细胞因子,被认为是抑制 Eos凋亡的细胞因子[3]。抗 IL-5抗体可阻止抗原诱发的哮喘 Eos浸润和气道高反应性[4]。糖皮质激素治疗哮喘的重要机制之一即为抑制 IL-5的产生[5]。本研究采用卵蛋白吸入诱发豚鼠哮喘模型,分析支气管肺泡灌洗液(BALF) Eos细胞数目改变。检测不同密度 Eos数目及比例改变,并采用原位杂交技术检测肺组织 IL-5 mRNA表达,以及地塞米松对其表达的影响,为临床治疗哮喘提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 哮喘动物模型的制作

36只豚鼠(第三军医大学动物所提供),雌雄不限,体重 300~400 g,随机分为正常对照组(C组)、哮喘组(A组)、地塞米松治疗组(D组)。A组: 参照 Hutson方法[6],复制哮喘模型,诱发后 24 h采集标本。C组: 用生理盐水替代 OA致敏,诱发同 A组。D组: 致敏和诱发同 A组,在第 16 d用 0.5 mg·kg^{-1}·d^{-1}地塞米松腹腔注射。连续 6 d,诱发前 12 h停药。

1.2 标本采集

实验豚鼠麻醉后,开胸暴露心脏,经左心室→主动脉弓灌注生理盐水约 200 ml(至从左心房流出的液体基本清亮为止),同时分离出气管,轻夹右下肺,剪开气管,气管插管,行支气管肺泡灌洗,收集 BALF用于分离细胞。松开右下肺,经心脏灌注 4%多聚甲醛-PBS缓冲液 300 ml,同时向气管内灌注 10 ml 灌注固定后 30 min取出支气管肺组织,投入相同的固定液置于 4℃冰箱继续固定,取部分右下肺修整,按文献[7]制作原位杂交组织切片。

嗜酸细胞的分离: 制成密度为 1.090 kg/L和 1.080 kg/L的 Percoll液,各 2 ml先后加入 15 ml锥形玻璃试管,然后轻轻沿管壁加 BALF于其上,2 000 r/min离心 20 min,离心完毕后,分别收集第一层、中间层及沉淀细胞,对这三层 Eos行绝对计数,中间层及沉淀细胞 Eos纯度达 95%以上,细胞活力(台盼蓝染色检查)> 95%。

1.3 探针的制备及标记

按常规行鼠 IL-5 cDNA质粒 pSP6K-mTRF23(Akira Tominaga教授惠赠)的转化、扩增、抽提和纯化,BamHI酶切、目的片段回收,片段约 1.5 kb,按宝灵曼公司试剂盒说明操作。用地高辛配基随机引物法标记 IL-5 cDNA探针。

1.4 原位杂交

参照文献[7]进行,略有改进。阴性对照: 肺组织切片预先经 RNA酶处理后再行原位杂交。图像分析: 每一玻片任选 5个视野,自动检测阳性细胞面密度,取其平均值,进行统计分析。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$表示。组间比较及相关分析全部用非配对计量资料检验和直线相关分析。

2 结果

2.1 支气管肺泡灌洗液中 Eos分类计数

将从三组实验动物获得的 BALF以 Percoll处理后,可见细胞按不同比重分为三层,第一层细胞比重≤ 1.080 第二层细

* 毕玉田,男,32岁,主治医师,讲师,硕士
** 附属新桥医院呼吸内科研究所 重庆,400037

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

胞比重在 1.080~ 1.090之间(1.080< d≤ 1.090),第三层细胞比重> 1.090。由表 1可见,A组在三种密度分层细胞中 Eos计数均显著高于 C组及 D组,特别是在第一层细胞中,C组 Eos分布极少,但 A组 Eos显著增加,达总数的 30%。D组较 C组各层的细胞数目显著增高,但与 A组相比明显减少。

计数第Ⅰ、Ⅱ层 Eos总和,定义为低密度 Eos(HEo, d≤ 1.090),而比重大于 1.090的 Eos定义为正常密度的 Eos(NEo)。结果表明,A组 BALF中 Eos总数显著增加,与 C组及 D组相比,A组 BALF中 HEo%增加特别明显($P < 0.01$)。而经地塞米松处理后 BALF中 Eos总数及 HEo%明显下降($P < 0.01$),但仍高于 C组($P < 0.01$)。

表 1 BALF中不同密度 Eos计数(1× 10^8/L)及百分比(%)

Tab 1 Count(1× 10^8/L) and percentage (%) of Eos with different density in BALF

Group	n	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ	
		Number	%	Number	%	Number	%
C	7	0.031± 0.010	6.5± 2.2	0.105± 0.042	21.4± 6.7	0.36± 0.123	72.1± 6.9
A	8	1.880± 0.331**	30.8± 4.8**	1.217± 0.299**	19.8± 3.9	3.015± 0.445**	49.5± 7.1**
D	8	0.083± 0.011▲	7.2± 1.2▲	0.352± 0.046▲	30.7± 5.0▲	0.72± 0.128**▲	62.1± 6.1**▲

Ⅰ: d≤ 1.080;Ⅱ: 1.080< d≤ 1.090;Ⅲ: d> 1.090;** : $P < 0.01$ *vs* C;▲: $P < 0.01$ *vs* A

2.2 实验动物肺组织 IL-5 mRNA的表达水平

实验动物肺组织 IL-5原位杂交结果镜下显示,哮喘时肺组织见较广泛阳性染色细胞,主要分布于气管粘膜下、肺泡间、甚至肺泡腔内。高倍镜下见阳性染色 IL-5 mRNA定位于胞浆,呈紫蓝色,见图 1。而 D组与 C组实验动物肺组织可见少许阳性染色细胞,见图 2,3。表 2示图像分析结果,A组肺组织 IL-5 mRNA水平明显高于 C组及 D组($P < 0.01$),而 D组 IL-5 mRNA水平与 C组相比差异不明显($P > 0.05$)。

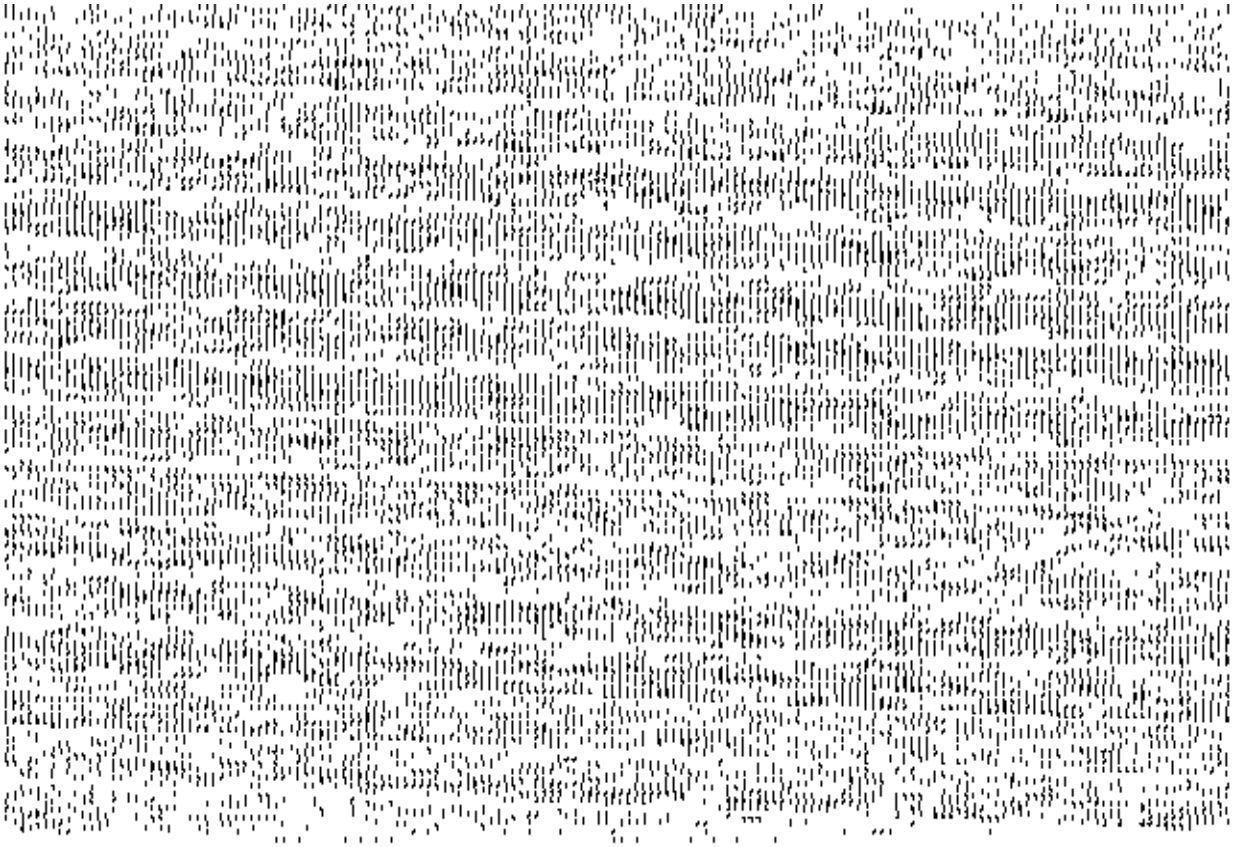


图 1 哮喘豚鼠肺组织 IL-5 mRNA表达 A: ISH× 100; B: ISH× 400

Fig 1 IL-5 mRNA expression in lung tissue of asthmatic guinea pigs A: ISH× 100; B: ISH× 400

图 2 正常豚鼠肺组织 IL-5 mRNA表达 (ISH× 100)

Fig 2 IL-5 mRNA expression in lung tissue of normal guinea pigs (ISH× 100)

图 3 地塞米松治疗组豚鼠肺组织 IL-5 mRNA表达 (ISH× 100)

Fig 3 IL-5 mRNA expression in lung tissue of dexamethasone-treated guinea pigs (ISH× 100)

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

表 2 肺组织 IL-5 mRNA的表达水平(面密度 10^{-3})

Tab 2 IL-5 mRNA expression in lung tissue(10^{-3})

Group	n	IL-5 mRNA
C	7	7.86± 2.48
A	8	27.18± 13.8**
D	8	8.73± 3.98▲

**: $P<0.01$ vs C; ▲: $P<0.01$ vs A

2.3 肺组织 IL-5 mRNA表达水平与 Eos有关参数的相关分析

相关分析表明,IL-5 mRNA水平与 Eos总数及 HEo%非常显著正相关(r分别为 0.688、0.582)。

3 讨论

3.1 IL-5 mRNA表达与哮喘嗜酸性粒细胞增多的关系

本实验以原位杂交技术证实哮喘豚鼠肺组织 IL-5 mRNA表达水平增高。已知 IL-5为 Eos分化、发育及功能调节的重要分子,IL-5过度表达与 Eos增多相关[8]。在体外 NEo与 IL-5共育后变为 HEo,并可自发地分泌其中的多种碱性蛋白。在本实验中,致敏豚鼠以 OA诱发哮喘 24 h后收集 BALF,可见 BALF中 Eos总数及 HEo均较正常组显著升高,表明哮喘时活化的 Eos增多。哮喘豚鼠 Eos特别是 HEo升高,与肺组织 IL-5 mRNA水平增加密切相关。IL-5可能通过直接、间接趋化、粘附作用募集 Eos到达肺组织局部。肺组织局部高浓度 IL-5进一步活化 Eos,促进炎性介质释放而造成损伤效应及气道高反应性[9]。

3.2 地塞米松对哮喘豚鼠肺组织 IL-5 mRNA及 Eos浸润的影响

由于本实验 D组是在 OA激发前 6 d对致敏动物持续给予地塞米松,地塞米松在体内的作用持续较久,对 IL-5 mRNA的表达抑制作用较强,因此当以 OA激发后实验动物肺组织 IL-5 mRNA水平显著受抑,并与哮喘症状减轻相一致。Eos为哮喘主要炎症浸润细胞及效应细胞,D组肺组织不同密度 Eos均较 A组下降,特别是地塞米松处理后 $d\leq 1.080$的 HEo%下降最为明显,几乎降至 C组水平。图像分析表明 D组肺组织 IL-5 mRNA水平较 A组显著降低,与 C组相比无统计学差别。表明地塞米松对 IL-5 mRNA表达的抑制作用极为明显。已知 Eos不同密度代表细胞处于不同功能活化状态,$d\leq 1.080$的 HEo更可能为一种过活化状态。在本研究中,我们定义比重小于 1.090的 Eos为 HEo。相关分析表明,IL-5 mRNA水平与 HEo%正相关,推测地塞米松通过下调 IL-5而抑制 Eos。其机制可能在于肺组织局部 IL-5水平下降,使外周血 Eos在组织局部的聚集减少[10],因此表现为 D组 BALF中 Eos总数下降;另一原因可能在于通过抑制 IL-5,减轻 IL-5对 Eos的活化作用,这主要表现在 D组较 A组 HEo%的明显降低。

参考文献

1 中华医学会呼吸系病学分会.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗、疗效判断标准及教育和管理方案).中华结核和呼吸杂志,1997,20(5):261

2 Wardlaw A. The eosinophil: new insights into its function in human health and disease. J Pathol, 1996, 179(4): 355

3 Yamaguchi Y, Suda T, Tominaga K, *et al*. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. Blood, 1991, 78(10): 2542

4 Akustu I, Kojima T, Kariyone A, *et al*. Antibody against interleukin-5 prevents antigen-induced eosinophil infiltration and bronchial hyperreactivity in the guinea pig airways. Immunol Lett, 1995, 45(1-2): 109

5 Bentley A M, Hamid Q, Robinson D S, *et al*. Prednisolone treatment in asthma: reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(2): 551

6 Hutson P A, Church M K, Clay T P, *et al*. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration. Am Rev Respir Dis, 1988, 137(3): 548

7 蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川省科学技术出版社,1994.406-434

8 Sur S, Gleich G J, Swanson M D, *et al*. Eosinophilic inflammation is associated with elevation of interleukin-5 in the airways of patients with spontaneous symptomatic asthma. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96(5pt1): 661

9 Foster P, Hogan S P, Young I G, *et al*. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J Exp Med, 1996, 183(1): 195

10 W G M, Hartnell A, Wardlaw A J, *et al*. IL-5 enhances the *in vitro* adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leukocyte integrin (CD11/CD18)-dependent manner. Immunology, 1990, 71(2): 258

(收稿: 1998-04-23;修回: 1998-10-16)

(编辑　汪勤俭)

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

Effects of glucocorticoid on interleukin 5 mRNA expression and eosinophil infiltration in the lung tissue of asthmatic guinea pigs

Bi Yutian, Yang Zhaoheng, Wang Changzheng (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To explore the relationship between interleukin 5 (IL-5) mRNA expression and eosinophil (Eos) infiltration in the lung tissue of asthmatic guinea pigs and the effects of glucocorticoid on it. Methods: Guinea pigs were randomized into the control group (CG), asthmatic group (AG) and dexamethasone-pretreated group (DPG). The animals in AG were sensitized by exposure to aerosolized ovalbumin to establish the model of asthma and those in DPG were treated likewise except for intraperitoneal injection of dexamethasone 6 h before the exposure. Twenty-four hours later, the counts of total Eos, hypodense eisinophil (HEo) and normal dense eosinophil (NEo) in the bronchoalveolar lavage (BALF) were measured. The changes in the percentage of HEo and NEo, IL-5 mRNA in situ expression and the effects of dexamethasone on them were determined. Results: ① The counts of total Eos and the percentage of HEo in BALF and IL-5 mRNA expression in the lung tissue in AG were significantly increased ($P < 0.01$) as compared with CG. ② The three parameters in DPG were significantly reduced in DPG as compared with AG ($P < 0.01$). ③ IL-5 mRNA expression was significantly correlated with the counts of total Eos ($r = 0.688$, $P < 0.01$) and percentage of HEo ($r = 0.582$, $P < 0.01$) in BALF. Conclusion: The enhancement of IL-5 mRNA in the lung tissue is closely associated with the increase in total counts of Eos. Inhibition of IL-5 mRNA expression in the lung tissue might be one of the important mechanisms of using glucocorticoid to reduce infiltration of Eos in the lung tissue to treat asthma.

Key words asthma; eosinophil; interleukin 5; *in situ* hybridization; dexamethasone; guinea pig

个案与短篇

青少年淋巴瘤 28例临床分析

A clinical analysis of 28 teenagers lymphoma patients

王 劲* 张书模 (第三军医大学附属大坪医院血液科) 重庆, 400042

我院自 1986~ 1996年收治了 28例青少年淋巴瘤患者,其临床特点及治疗效果观察报告如下。

1 临床资料

男 23例,女 5例,年龄 13~ 25岁,中位年龄 21岁,平均年龄 20.5岁。

临床特点: 28例患者中,26例以浅表淋巴结无痛性肿大为主要症状; 2例以胸腔积液、呼吸困难首诊,浅表淋巴结不大,X线片示"纵膈淋巴瘤",予联合化疗有效。全部患者中,14例有肝、脾肿大; 23例有低热、盗汗消瘦等全身症状; 16例伴不同程度胸腔和 或腹腔积液; 4例有颅内浸润: 脑背液压力增高,离心涂片染色发现淋巴肉瘤细胞; 3例有椎骨浸润: 表现为骨痛,其中 1例发展为截瘫; 4例有骨髓浸润,淋巴肉瘤细胞 3.0%~ 29.5%; 1例扁桃腺浸润; 1例骨髓纤维化。根据 Arbor分期法[1],I ~ II 期患者 5例,占 17.86%,III~ IV 期患者 23例,占 82.14%。

病程分型: 非何杰金淋巴瘤 (NHL) 20例,占 71.43%;何杰金病 (HD) 6例,占 21.43%; 2例无病理资料,根据病情分析行化疗有效,占 7.14%。在 NHL患者中,B细胞源型 15例,占 75.0% (其中小淋巴细胞型 11例,占 55.0%,滤泡中心细胞小裂细胞型 3例,占 15.0%,混合细胞型 1例,占 5.0%); T细胞源型 3例,占 15.0%;组织细胞型 1例,占 5.0%; Burkitt淋巴瘤 1例,占 5.0%。

治疗: I ~ II 期患者放疗为主,III~ IV 期患者化疗为主; HD患者予 COPP方案化疗, NHL患者于 COP-THP CHOP CEOP COP-ACR等方案联合化疗,颅内浸润者辅以鞘内注射氨甲喋呤 (MTX) 10 mg及地塞米松 (Dex) 5 mg,每周 1~ 2次。

疗效: 3例诊断后自动出院未治; 4例因病情重在第 1疗程治疗中即因感染、衰竭等原因死亡; 3例化疗中有效,但未达完

(下转 99页)

* 王 劲 男, 30岁,主治医师,讲师,硕士

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