DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.007

实验性哮喘豚鼠的细胞因子表达及雷公藤对其的影响*

金远林** 王长征 王春霞 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 探讨细胞因子 GM-CSF、IL-8、TNF-α在哮喘发病中的作用及雷公藤对细胞因子产生的影响。方法: 以卵蛋白雾化吸入诱导哮喘豚鼠实验模型,用雷公藤处理,斑点印迹杂交检测支气管肺组织 GM-CSF mRNA表达, ELISA测定血浆中 IL-8、TNF-α含量。结果: 哮喘组豚鼠肺组织 GM-CSF mRNA表达和血浆中 TNF-α水平明显增高,但血浆中 IL-8升高不明显。雷公藤处理后 GM-CSF mRNA表达及 TNF-α水平降低。结论: GM-CSF等细胞因子产生增加,可能是导致哮喘气道炎症的原因。雷公藤能抑制细胞因子的产生,可能在哮喘患者抗炎治疗中有潜在的应用价值。

关键词 哮喘;实验动物;细胞因子;雷公藤
中图法分类号 R562.5

哮喘是多种炎细胞参与的一种气道炎症性疾病,粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子能调节炎细胞的功能,包括增加嗜酸性粒细胞(Eos)在骨髓的生成,使其活化促使 Eos颗粒蛋白和炎性介质的释放,损伤气道上皮,引起气道高反应性,是导致哮喘发病的重要原因。雷公藤能抑制多种细胞因子的表达,能降低实验性哮喘豚鼠的气道高反应性;并抑制 Eos活化[1],但作用机制尚不完全清楚。本实验对哮喘豚鼠肺组织 GM-CSF mRNA表达和外周血 IL-8、TNF-α水平进行检测及雷公藤对细胞因子的作用做初步研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

含 mGM-CSF cDNA质粒 pEMBL8由澳大利亚 Metcalf教授惠赠,内切酶 BamHI为 Promage公司产品,地高辛标记试剂盒为德国 Boehringer Mannheims公司。雷藤内酯醇由福建省医学研究所提供。IL-8、TNF-α ELISA试剂盒由第四军医大学免疫学教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 动物处理 实验性哮喘豚鼠模型建立及雷公藤的处理参照文献[1]方法进行。选体重 200 g~300 g健康豚鼠 24只,随机分为:① 哮喘组:吸入卵蛋白致敏豚鼠;② 处理组:致敏的豚鼠在 16 d~20 d激发前雷藤内酯醇(100μg/kg)腹腔注射;③ 对照组:用生理盐水吸入。在第 21天采取颈动脉血。处理动物后留取支气管周围的肺组织。

1.2.2 mGM-CSF cDNA探针制备 将 pEMBL8质粒转化大肠杆菌 HB101,扩增后酶切,分离及纯化后的目的基因片段用地高辛随机引物法进行探针标记。

1.2.3 肺组织总 RNA提取 取 100 mg肺组织采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA。

1.2.4 斑点印迹杂交 按地高辛试剂盒说明进行。结果用薄层色谱扫描定量。

1.2.5 IL-8、TNF-α测定 按试剂盒说明进行。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 mGM-CSF酶切结果

酶切后的目的基因片段约 550 bp,见图 1。

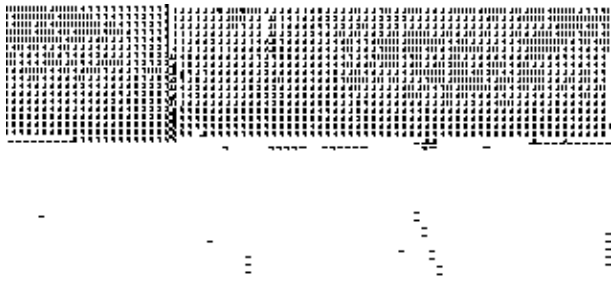


图 1 pEMBL8酶切电泳图

Fig 1 The electrophoresis of pEMBL8 plasmids digested by BamH I

A λDNA/HindⅢ marker
B pEMBL8+ BamH I
C pEMBL8

2.2 GM-CSF mRNA表达

斑点印迹杂交结果见图 2。支气管肺组织 GM-CSF mRNA相对含量见表 1。表明哮喘组肺组织 GM-CSF mRNA表达明显高于对照组和处理组($P < 0.05$),雷公藤处理组与对照组之间 mRNA表达差异不显著($P > 0.05$)。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39470326
** 金远林,男,40岁,副主任医师,学士,基金班学员,现在兰州军区兰州总医院胸内科 兰州, 730050
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 2　豚鼠肺组织 GM-CSF mRNA斑点印迹杂交

Fig 2　The dot blotting hybridization for GM-CSF mRNA in lung tissue from guinea pigs

表 1　GM-CSF mRNA表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The expression of GM-CSF mRNA ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	GM-CSF mRNA(pg/mg tissue)
Control	8	20.10± 5.65
Tripholide-treated	8	23.48± 3.54
Asthmatic	8	37.22± 13.70*

* : $P<0.05$ *vs* control

2.3　IL-8　TNFα 血浆含量

外周血 TNFα、IL-8含量见表 2,TNFα水平哮喘组明显高于对照组和处理组 ($P<0.01$)。哮喘组 IL-8水平与对照组和雷公藤处理组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2　IL-8　TNFα 含量 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The contents of IL-8 and TNFα ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-8[ρ_B/(ng·ml^{-1})]	TNFα[ρ_B/(pg·ml^{-1})]
Control	8	3.091± 0.099	201.1± 8.3
Tripholide-treated	8	3.077± 0.067	202.3± 10.3
Asthmatic	8	3.165± 0.177	221.7± 12.2**

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

3　讨论

在哮喘发作期的支气管组织内,有多种炎细胞聚集,包括活化的 T淋巴细胞 (CD_4^+ CD_{25}^+),活化的 Eos (EG^+),单核细胞及肥大细胞等,这些炎细胞和支气管上皮细胞均能产生 GM-CSF TNF等细胞因子。而正常人支气管粘膜则未检测到炎细胞浸润及 GM-CSF TNFα[2]。实验结果表明哮喘组豚鼠肺组织 GM-CSF mRNA表达明显增高,提示 GM-CSF可能参与哮喘气道炎症的形成。但本实验中 GM-CSF mRNA的细胞来源尚不能确定。Woolley等[3]发现:哮喘支气管上皮、支气管肺泡灌洗液 (BALF)细胞表达 GM-CSF明显增高,并与支气管粘膜 BALF中 Eos数量、活化及气道高反应性关系密切。吸入激素治疗哮喘后,支气管上皮细胞表达 GM-CSF减少,而且与 Eos数量和活化减少相一致[4]。可见 GM-CSF可能促进 Eos在哮喘支气管肺组织聚集,活化而参与哮喘气道炎症反应。哮喘豚鼠肺组织 GM-CSF mRNA表达增加可能是导致哮喘气道炎症的原因之一。

IL-8和 GM-CSF均能促进 Eos的趋化反应,跨内皮移行[5]。使 Eos在气道内聚集。GM-CSF还能调节 Eos对 IL-8的趋化反应。TNFα是多功能细胞因子,能调节炎性反应,并增强 Eos的细胞毒作用。在抗原对哮喘患者进行支气管局部激发后,BALF中 GM-CSF、IL-8、TNFα等细胞因子明显增加[6]。在哮喘发作期外周血中 IL-8明显高于缓解期和正常人[7]。我们测定结果 IL-8虽无统计学意义,但 IL-8水平有升高趋势。

雷公藤具有抗炎,免疫抑制等活性,能抑制淋巴细胞增殖及多种细胞因子的生成。哮喘实验豚鼠模型用雷公藤处理后,能降低卵蛋白激发导致的气道高反应性,并能抑制 BALF中嗜酸性粒细胞活力增强活性 (EVEA)[1]。雷公藤用于治疗哮喘,能明显改善中-重度小儿哮喘的症状和气道阻塞[8]。本实验结果提示雷公藤能抑制哮喘豚鼠肺组织 GM-CSF mRNA表达及血浆 TNFα水平,可能为雷公藤消除哮喘气道炎症,降低气道高反应性,缓解临床症状的作用机制之一。

参考文献

1　王长征,郭先健,王顺朝.雷公藤甲素对哮喘动物模型气道反应性的观察.中华医学杂志, 1996; 76(1): 68

2　Ackerman V, Marini M, Vittori E *et al*. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Chest, 1994; 105(3): 7687

3　Woolley K L, Adelroth E, Woolley K *et al*. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor eosinophils and eosinophil cationic protein in subjects with and without mild, stable, atopic asthma. Eur Respir J, 1994; 7(9): 1576

4　Trigg C J, Mamolitsas N D, Wang J *et al*. Placebo-controlled immunopathologic study four month of inhaled corticosteroid in asthma. Am J Respir Crit Care Med, 1994; 150(1): 17

5　Ebicawa M, Liu M C, Yamada T *et al*. Eosinophil transendothelial migration induce by cytokine. J Immunol, 1994; 152(9): 4590

6　Virchow J C, Walker C, Hafner D *et al*. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. Am J Respir Crit Care

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

Med, 1995; 151(1): 96
7 徐 青,彭东信,刘作志. IL-8在哮喘发病机制中的意义探讨.免疫学杂志,1997; 13(1): 65
8 来茶云,杨喜朝,黄 彤等.雷公藤多甙治疗重型、偏重型小儿支气管哮喘的临床疗效观察.实用儿科杂志,1987; 2(1): 28

(收稿: 1997-05-22;修回: 1998-03-30)
(编辑 汪勤俭)

Expression of cytokines and effects of tripholide on it in asthmatic guinea pigs*

Jin Yuanlin, Wang Changzheng, Wang Chunxia, Qian Guisheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To explore the role of cytokines GM-CSF, IL-8, TNF-α in the occurrence of airway inflammation and effects of tripholide on cytokine expression after asthma. Methods: Guinea pigs were randomized into three groups: ① Asthmatic group (AG); ② Asthmatic and tripholide-treated group (ATTG); ③ The control group (CG). The model of asthma was established with ovalbumin serosolization. The expression of GM-CSF mRNA in airway and pulmonary tissues was detected with dot blot hybridization and the contents of IL-8 and TNF-α in the plasma were determined with ELISA. Results: The expression of GM-CSG mRNA in airway and pulmonary tissues and content of TNF-α in the plasma were significantly higher in AG than in ATTG and CG. As for the content of IL-8 in the plasma, no remarkable difference was found among the three groups. Conclusion: The increase of the production of the cytokines might play an important role in the occurrence of airway inflammation after asthma and tripholide is of potential value for anti-inflammatory therapy in asthma.

Key words asthma; cytokine; tripholide; guinea pig

* This project was supported by the National Natrual Science Foundation of China, No. 39470326

干髓牙折裂后全冠修复疗效观察

Clinical observation of coronal restoration for fractured teeth after pulp mummified treatment

汪志德** 林景春 周正贵 (第三军医大学附属新桥医院口腔科)重庆,400037

干髓牙术后一旦发生完全折裂,以往常规拔除,但多数病人拒绝。因此,近3年来对此种情况,我们采用全冠修复,观察52例,获得良好效果,报道如下。

1 一般资料

52例共63只牙,男41例,女11例。年龄22岁~51岁。干髓术后至牙折时间6个月至3年。牙折后至治疗时间3 d~18 d。折裂部位及方向: 63只牙均为冠折,其中纵折48只,横折15只。折裂原因: 食硬物或咬砂粒、小石子致牙折32例(44只牙);义齿支托过高及创伤性咬 致牙折裂20例(22只牙)。X线片根尖骨质吸收20只牙具中伴牙龈瘘管9只牙。63只牙中,重做干髓术43只,根管治疗20只。牙位见附表。

附表 63只牙的牙位分布

牙位	4		4		4	4	5		5	5	5	6		6	6	6	7		7	7	7
牙数	1	1	1	1	2	3	3	4	5	6	7	9	6	4	5	5					

方法: 患牙拍X线片,发现根尖区骨质吸收,牙周膜改变或临床检查牙龈有瘘管者,则行根管治疗;根类正常者仍按干髓术处理。用500号裂钻围绕牙颈部制备宽1 mm、深0.5 mm环形沟槽,用3%双氧水清洗隐裂及牙周后,取32号结扎钢丝在沟槽

(下转210页)

** 汪志德,男,45岁,副主任技师

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