

哮喘小鼠骨髓 DC 细胞因子 mRNA 的分析

孙芸¹, 吴剑卿², 余多慰¹

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 南京医科大学第一附属医院 210029 江苏 南京)

[摘要] 通过体外诱导和扩增小鼠骨髓来源的树突状细胞(DC), 研究其中的细胞因子 mRNA 表达, 探讨 DC 在哮喘中可能的作用机制. 为此, 利用 rmGM-CSF 和 rmIL-4 体外诱导骨髓细胞分化为 DC, 采用多探针模板的核酸酶保护分析检测骨髓来源的 DC 中细胞因子 mRNA 的转录. 结果表明, 在两种细胞因子的作用下, 从骨髓中可以诱导出大量的 DC, 核酸酶保护分析显示骨髓来源的 DC 中有 IL-13、IL-9 和 IL-3 mRNA 的转录, 并且哮喘组表达 IL-13 mRNA 和 IL-9 mRNA 的相对水平与对照组相比有明显的差异性 $P < 0.05$, 而 IL-3 mRNA 的表达在两组鼠中的表达水平没有差异性 $P > 0.05$. 可以认为 DC 在哮喘的形成和发展中起重要作用, 提示了靶向于 DC 的治疗可能成为哮喘治疗的新目标.

[关键词] 哮喘, 树突状细胞, 细胞因子, IL-13, IL-9

[中图分类号] Q752, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)02-0096-05

Analysis of Cytokines mRNA in DCs derived from Asthmatic mice's Bone Marrow

Sun Yun¹, Wu Jianqing², Yu Duowei¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 210029, Nanjing, China)

Abstract :To induce and amplify dendritic cells (DCs) derived from murine bone marrow in vitro , study which cytokines mRNA are expressed in them , and investigate the functions DCs will perform in asthma. Cells isolated from murine bone marrow have cultured with rmGM-CSF and rmIL-4 , the expression of cytokines mRNA are determined by ribonuclease protection assay combined with multi-probe templates. The results are that large numbers of DCs have been obtained from bone marrow ;they express IL-13 , IL-9 and IL-3 mRNA ; Moreover , the level of IL-13 mRNA and IL-9 mRNA expressed by DCs in asthmatic mice is significantly higher than control mice , $P < 0.05$; but the level of IL-3 mRNA is no discrepancy in two groups , $P > 0.05$. So DCs are considered to be very important in the forming and developing of asthma , it clues to therapy targeted at DCs will be become a new goal.

Key words :asthma , dendritic cell , cytokine , interleukin-13 , interleukin-9

0 引言

哮喘是一种慢性的气道炎症,以气道高反应性和粘膜高分泌为特征,能导致周期性的气道破坏.大量的研究表明,在哮喘中发生偏向于 Th2 的免疫应答和 IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 等这些 Th2 类细胞因子的高分泌,引起气道嗜酸性粒细胞增多、粘膜高分泌和气道高反应性(AHR)、Ig E 的合成、肥大细胞的成熟和活化等一系列炎症症状.树突状细胞(dendritic cell , DC)是目前已知功能最强的抗原递呈细胞之一,它能识别、摄取、加工处理并呈递抗原给 T 细胞,激活初始型 T 细胞.越来越多的证据表明,在抗原递呈过程中通过 DC 所提供的刺

收稿日期:2004-09-22.

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助项目(225FA0309 2003104TSJB132).

作者简介:孙芸,女,1979—,硕士研究生,主要从事分子与细胞生物学的学习与研究. E-mail: yunde_on@126.com

通讯作者:余多慰,1954—,教授,主要从事分子与细胞生物学的教学与研究. E-mail: yuduowei@njnu.edu.cn

激和抑制信号对 T 细胞的分化及 Th1/Th2 偏移中起关键作用,是变应原诱发哮喘的始动环节。DC 起源于骨髓中的多能干细胞,随后在不同阶段,不同的微环境和细胞因子的作用下,逐渐迁移分化至外周组织,存在于皮肤、胃肠道、气道、肺等表面形成免疫的第一道防线。已有实验证明,在哮喘发作时,气道 DC 迅速增多,功能增强,并且伴随着 Th2 类细胞因子相关的嗜酸性粒细胞的增多,而这些 DC 来自于外周血^[1,2]。本实验从哮喘小鼠的骨髓细胞中诱导出 DC,并采用多探针模板的核酸酶保护分析研究这些细胞中有几种炎症细胞因子 mRNA 的转录,以此来探讨 DC 在哮喘中可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/C 小鼠(中科院上海实验动物中心,雌性,4~6 周),卵清蛋白(OVA,Grade II, Sigma 公司),RPMI1640 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),重组小鼠白细胞介素 4(recombinant mouse interleukin-4, rmIL-4)及重组小鼠粒细胞——巨噬细胞刺激因子(recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rmGM-CSF)(R&D system), Trizol Reagent(GIBCO 公司),核酸酶保护分析试剂盒 III(RPAIII)和 T7 体外转录试剂盒(Ambion 公司),多探针模板(PharMingen 公司)[α -³²P]UTP(北京福瑞公司)。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小鼠哮喘模型的建立^[3]

20 只小鼠正常饲养 2 d 后,随机分为 2 组,每组 10 只。哮喘组每只小鼠在第 18 d 腹腔注射 OVA 和 AL(OH)₃ 的混悬液 0.1 mL(含 OVA 10 mg, AL(OH)₃ 20 mg),14 d 后以 1% OVA 超声雾化(S-888E 型超声雾化器)吸入,持续 2 周,直至出现呼吸急促、腹肌抽搐、烦躁不安等症状,为哮喘的阳性反应。对照组以生理盐水代替卵清蛋白,其余同模型组。

1.2.2 骨髓来源 DC 的培养

参照文献方法^[4],略有改动。拉颈处死小鼠,无菌剥离股骨和胫骨,用 Hank's 冲出骨髓细胞, PBS 洗涤 1 次,用 0.83% Tris-NH₄CL 裂解红细胞, RPMI1640 培养液洗涤 2 次,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,并加入 rmGM-CSF(1000 U/mL)和 rmIL-4(500 U/mL),接种于 24 孔培养板,置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。第 3 天轻轻摇动培养板,吸走大部分悬浮细胞,加入等量的培养液,并补足细胞因子。隔日半量换液 1 次,第 7 天收集悬浮或稍微贴壁的细胞。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取

分别取 1×10^6 个培养至第 7 天的 DC,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 的产量和纯度, $A_{260}/A_{280} > 1.9$,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, 28S 带与 18S 带之比接近于 2:1(图 1)。

1.2.4 cRNA 探针的合成

多探针模板含有编码小鼠 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-9、IL-2、IL-3、IFN- γ 及人 IL-15 和管家基因 L32 和 GAPDH 的 DNA,以此 DNA 为模板,在 T7RNA 聚合酶的作用下体外转录成 ³²P 标记的 cRNA 探针,参照试剂盒说明书操作。

1.2.5 核酸酶保护分析

按照 RPA 试剂盒说明书进行。分别取 10 μ g、20 μ g 细胞总 RNA 加入 2 μ L 标记的 cRNA 探针,探针比活度为 5×10^5 cpm/ μ L,混合均匀并短暂离心。95℃ 变性 5 min, 56℃ 杂交过夜。以 Yeast RNA 和 Mouse Control RNA 作为对照。取适量的 RNA 酶 A/T1 加入到消化缓冲液中(1:1000 稀释),加入 100 μ L 稀释后的 RNA 酶 A/T1 到样品中,有一 Yeast RNA 对照不加 RNA 酶。30℃ 孵育 45 min,加入 150 μ L 灭活/沉淀溶液(试剂盒成分之一), -20℃ 静置 30 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 30 min,移走上清,空气干燥沉淀。加入 8 μ L 凝胶加样缓冲液,进行 5% 聚丙烯酰胺/8 mol/L 尿素/1 \times TBE 变性凝胶电泳,电泳后干胶, -20℃ 放射自显影 3 d。



图 1 1% 琼脂糖的电泳分析

1.3 统计学处理

将放射自显影的照片进行计算机扫描 ,用 Scion Image 图像分析软件对信号的灰度(密度)进行分析 ,用目的 mRNA 与管家基因 L32 和 GAPDH mRNA 的相对灰度比值来表示其相对丰度水平 (见表 1) ,结果用平均值 ± 标准差表示 . 采用 SPSS10. 0 分析软件进行分组的 *t* 检验 ,来分析模型组和对照组 mRNA 的转录水平有无显著差异性 ,*P* < 0. 05 表示有统计学意义 .

表 1 模型鼠和对照鼠骨髓 DC 细胞因子 mRNA 转录的相对水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	IL - 13		IL - 9		IL - 3	
	/L32	/GAPDH	/L32	/GAPDH	/L32	/GAPDH
模型组	0. 700 7 ± 0. 113 0 *	0. 695 1 ± 0. 110 2 *	0. 643 0 ± 0. 053 3 *	0. 631 6 ± 0. 054 3 *	0. 634 1 ± 0. 072 6	0. 624 5 ± 0. 070 3
对照组	0. 621 2 ± 0. 033 0	0. 616 2 ± 0. 053 0	0. 603 1 ± 0. 031 8	0. 589 1 ± 0. 034 8	0. 638 2 ± 0. 076 9	0. 626 3 ± 0. 085 0

注 *n* = 8 ,与对照组比较 ,* 表示 *P* < 0. 05 .

2 结果

(1) 在培养的第 2 天可以看到绝大多数细胞呈贴壁生长 ,出现点状的细胞集落 ,第 3 天轻轻摇动除去未贴壁的细胞并继续培养 2 d ,可见细胞集落明显增多、增大(图 2) . 再继续培养可见细胞体积明显增大且形态不规则 ,有 3 ~ 8 个不等的突起 ,呈现特征性的树突状 ,并且逐渐由贴壁变为悬浮 ,至第 7 天 ,细胞多悬浮但也有些稍微贴壁 ,但轻轻吹打即可脱壁 ,以此来收集细胞 . 在倒置显微镜下可以看到哮喘鼠骨髓来源的 DC 和对照鼠骨髓来源的 DC 均有大小不一的树突 ,但在镜下看不出二者树突数目有明显的差别 .

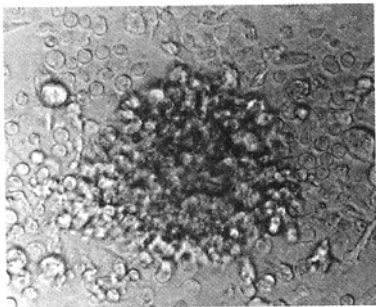


图 2 哮喘小鼠骨髓来源 DC 的细胞集落(×400)

(2) 多探针核酸酶保护分析的放射自显影结果显示 ,位置分别在 256 bp、204 bp、163 bp、处 ,相对应于探针 IL - 13、IL - 9、IL - 3 的偏下方出现信号 ,即结合后被“ 保护 ”的条带 ,说明在哮喘鼠和对照鼠的骨髓来源的 DC 中均有这三种细胞因子 mRNA 的转录(图 3) . Yeast RNA 因不能与小鼠的 cRNA 探针结合 ,故不加 RNA 酶消化的 Yeast RNA 对照用来显示实验中所使用的全部探针 ,而加 RNA 酶消化的 Yeast RNA 因单链 RNA 均被消化 ,故可作为阴性对照 ,并能检测 RNA 酶的活性 . Mouse Control RNA 有 IL - 4 ,IL - 10 ,IL - 2 ,L32 ,GAPDH 基因的转录 ,这与试剂盒中说明相一致 ,表明体外转录出的 cRNA 探针是有效的 ,而且管家基因的转录也证明了样品是完整的 . 被保护的条带比探针条带迁移的快些是由于探针两端的序列不能与样品的 mRNA 结合 ,被消化 ,而使结合后形成的双链比原来的探针短些 ,故样品中所出现的条带(电泳图左侧第三至七道)在相应的探针条带标准区带(电泳图左侧第一道)的下方 .

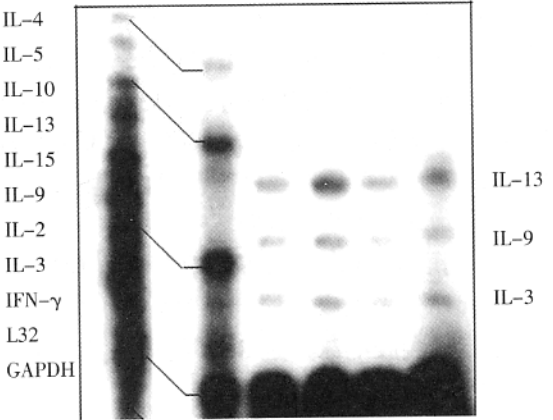


图 3 核酸酶保护分析显示模型鼠和对照鼠骨髓来源 DC 细胞因子 mRNA 的转录

(3) 在多探针模板的摩尔浓度相同的情况下 ,产物信号的强度取决于样品中与标记 ³²P 的 cRNA 探针结合的 mRNA 多少 ,信号越强表示结合越多 ,即样品中含与该 cRNA 探针相结合的 mRNA 的量越大 ,表明该基因的 mRNA 转录越多 ,因此 20 μg 总 RNA 的信号比 10 μg 总 RNA 的信号强 . 利用分析软件对放射自显影的信号灰度(密度)进行分析 ,可知两组鼠的 DC 中细胞因子 mRNA 的转录量有差异 ,见表 1 和图 4 所示 . 两者相比 ,模型鼠 DC 所产生细胞因子 IL - 13 mRNA 和 IL - 9 mRNA 的转录量较对照组的高 ,*P* < 0. 05 ,有差异性 ,但在两组鼠的 DC 中 IL - 3 mRNA 的转录没有显著的差异性 ,*P* > 0. 05 .

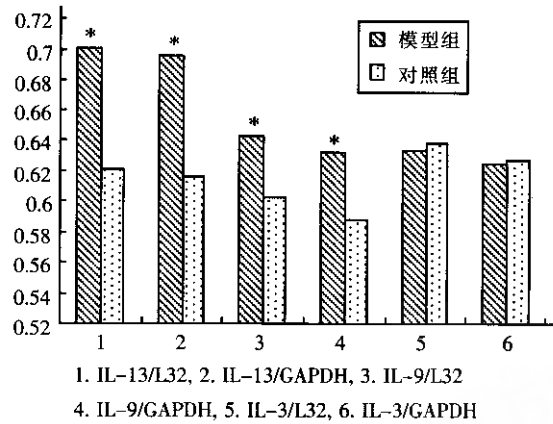


图4 两组鼠 DC 细胞因子 mRNA 转录水平的比较

3 讨论

支气管哮喘是一种多种炎症细胞及细胞因子相互作用的慢性气道炎症,其免疫异常表现为 Th1/Th2 细胞比例和功能的失衡、Th2 细胞数量的增多和功能的亢进。DC 是一种强有力的抗原递呈细胞,在气道和肺内构成一个防御网络,通过其表面表达的共刺激分子提供第二信号,可以高效地选择性地活化抗原特异性的初始 CD4⁺ Th 细胞,诱导初级免疫应答,分泌一些可溶性因子诱导 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,同时它们也表达趋化因子来吸引已经活化的 Th2 细胞,以确保活化的效应细胞驻留在气道,维持气道的炎症反应。本实验室的免疫组化分析已经证明了哮喘模型鼠的气道和肺中 DC 的数量明显高于正常对照组,而本实验从小鼠的骨髓细胞中诱导大量 DC,并且从 mRNA 水平研究了两组鼠骨髓来源 DC 中细胞因子基因的转录情况,结果显示炎症细胞因子 IL-13 和 IL-9 的基因转录在哮喘组中较高,则进一步表明 DC 在哮喘的发病机理中起重要的作用,提示了靶向与 DC 的治疗是未来哮喘治疗的一个方向。

IL-13 是一个能调节许多细胞免疫效应的 Th2 型细胞因子,可由多种细胞产生。在过敏性哮喘患者的肺泡灌洗液中、支气管粘膜上、外周血单个核细胞中均可以检测到 IL-13 mRNA 的转录,且转录量高于正常对照组。本研究也证明了 IL-13 mRNA 在骨髓来源的 DC 中有转录,且哮喘组的转录量高于对照组。IL-13 mRNA 转录的增加可能从以下两个方面加重哮喘的炎症症状 (1) 诱导上皮细胞表达趋化因子 MIP-3 α /CCL20,进而促进了不成熟 DC 招募到气道^[5],维持其它 Th2 类细胞因子在支气管粘膜上的表达 (2) 促进 B 细胞的增殖,诱导免疫球蛋白类型向 Ig E 的转换,从而导致哮喘中 Ig E 含量的增加。

IL-13 与 IL-4 有共同的受体,可与 IL-4 受体的 α 链结合,且二者共用信号转导系统,但本实验中未发现骨髓来源的 DC 中有 IL-4 mRNA 的转录,提示了 IL-13 可以不依赖于 IL-4 而发挥作用,对哮喘病理改变的发生起主导地位。有报道也指出 IL-13 可以不依赖 IL-4 而诱发气道的高反应性,是启动变应原诱导的 CD4⁺ T 细胞偏离的关键因子^[6]。用 IL-13 mAb 治疗霉菌致敏的哮喘小鼠,发现 IL-13 mAb 能明显地减轻 AHR,抑制气道上皮下的纤维化和肺组织胶原纤维沉积,抑制杯状细胞增生,这证明了 IL-13mAb 治疗哮喘的潜在作用^[7],也许这种作用可以通过改变 DC 中 IL-13 基因的转录来实现。

本研究发现在 DC 中有 IL-9 和 IL-13 mRNA 的同时转录,且转录量均高于对照组,这与 Cohn 等在过敏性哮喘的模型中发现 IL-9 通过 IL-13 介导的途径来刺激粘液的产生^[8]相一致。IL-9 也是过敏性疾病中重要的细胞因子,它可以参与嗜酸性粒细胞的浸润,气道的高反应及促进 Ig E 的产生,增加粘膜的分泌;对哮喘发生中的许多类型的细胞如 T 细胞, B 细胞,肥大细胞,上皮细胞等都起作用,能上调气道上皮细胞粘液基因表达,引起粘液细胞的转化,增加粘液的产生^[9]。在气道上皮损伤修复过程中,IL-9 导致了杯状细胞的增生,上皮细胞溶菌酶和粘液的增加^[10]。由此推测降低和阻断 IL-9 的产生可以通过抑制或阻断气道 DC 的功能来实现。

IL-3 是一种多克隆刺激因子,它作用于大多数未成熟的骨髓祖细胞,并促进细胞扩增和分化为成熟的细胞类型,对造血调控起着极其重要的作用。有两种不同的观点说明它在哮喘中的作用,一种是可以促进骨髓中

嗜酸性粒细胞的发育和活化,上调嗜酸性粒细胞和肥大细胞的数目但不能改变淋巴细胞、巨噬细胞的数目,也不能影响哮喘的早期或晚期症状^[11, 12];另一种是 IL-3 并不影响变应原刺激的嗜酸性粒细胞数目的增多和活性及气道的高反应^[13]。本实验的结果发现在哮喘鼠和对照鼠的 DC 中均有 IL-3 mRNA 的转录,但转录量没有明显的差异,可能是它们的存在可以促进骨髓祖细胞的生长和分化,在一定程度上也证实了后一种观点,但对于 DC 中表达 IL-3 mRNA 的报道较少,还值得做进一步的深究。

[参考文献]

- [1] Lambrecht B N , Benoit Salomon , David Klatzmann , *et al.* Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen sensitized mice[J]. *J Immunol* , 1998 , 160(8) : 4090—4097.
- [2] Jahnsen F L , Moloney E D , Hogan T , *et al.* Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge[J]. *Thorax* , 2001 , 56(11) : 823—826.
- [3] 陈欣 林涛 周童亮 , 等 雾化吸入白细胞介素-12 对小鼠哮喘模型气道炎症和辅助 T 细胞亚群的影响[J]. *中华内科杂志* , 2002 , 41(5) : 313—316.
- [4] 丁传林 姚堃 , 张天泰 , 等 IL-4 对 DC 产生 IL-12 影响的研究[J]. *上海免疫学杂志* , 2003 , 23(4) : 248—251.
- [5] Reibman J , Hsu Y , Chen L C , *et al.* Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* , 2003 , 28(6) : 648—654.
- [6] Wills - Karp M , Luyimbazi J , Xu Xueying , *et al.* Interleukin-13 : Central mediator of allergic asthma[J]. *Science* , 1998 , 282(12) : 2258—2261.
- [7] Blease K , Jakubzick C , Westwick J . Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma[J]. *J Immunol* , 2001 , 166(8) : 5219—5224.
- [8] Cohn L , Whittaker L , Niu N R J , *et al.* Cytokine regulation of mucus production in a model of allergic asthma[C]. In : Basbaum C . Mucus hypersecretion in respiratory disease . Chichester John Wiley & Sons Ltd 2002 , 201—213.
- [9] Reader J R , Hyde D M , Schelegle E S , *et al.* Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* , 2003 , 28(6) : 664—672.
- [10] Vermeer P D , Harson R , Einwalter L A , *et al.* Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* , 2003 , 28(3) : 286—295.
- [11] Du T , Martin J G , Xu L J , *et al.* IL-3 does not affect the allergic airway responses and leukotriene production after allergen challenge in rats[J]. *Eur Respir J* , 1999 , 13(5) : 970—975.
- [12] Gregory B , Kirchem A , Phipps S , *et al.* Differential regulation of human eosinophil IL-3 , IL-5 , and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines : IL-3 , IL-5 , and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness , but up-regulate IL-3 receptor alpha expression[J]. *J Immunol* , 2003 , 170(11) : 5359—5366.
- [13] Woolley K L , Adelroth E , Woolley M J , *et al.* Interleukin-3 in bronchial biopsies from nonasthmatics and patients with mild and allergen-induced asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med* , 1996 , 153(1) : 350—355.

[责任编辑 孙德泉]