

· 实验研究 ·

IL-12 对支气管哮喘小鼠 Th2 免疫应答的影响

安仁哲¹, Jong-Gyun KIM², Jae-Ho LEE²

(1. 延边大学医学院附属医院儿科, 吉林 延吉 133000; 2. 大韩民国忠南大学医科大学儿科, 韩国 大田市 301-040)

[摘要] 目的 哮喘是Th2细胞介导的气道慢性非特异性炎症。IL-12在抗原致敏阶段可有效抑制Th2免疫应答形成,而对已产生的Th2免疫应答是否同样具有抑制作用尚有争议。本研究探讨IL-12对哮喘时已产生的Th2免疫应答的影响,为临床应用提供可靠的理论依据。**方法** 实验一:取25只6~8周雌性BALB/c小鼠,腹腔注射鸡卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝致敏。于致敏前、致敏后第7,14,21,28天,各取处死5只检测脾脏单个核细胞培养上清液中的Th2类细胞因子IL-4和IL-5水平,观察Th2免疫反应形成情况。实验二:另取40只相同小鼠随机分为哮喘组($n=20$)和IL-12治疗组($n=20$),均腹腔注射鸡卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝致敏后雾化吸入OVA诱发哮喘。IL-12治疗组在致敏后25d开始连续5d腹腔内注射 $0.5\mu\text{g}$ (1 mL)重组IL-12,哮喘组仅注射PBS。两组均在最后1次诱发后(致敏后30d)处死,取支气管肺泡灌洗液(BALF)和脾脏单个核细胞培养上清液检测Th2类细胞因子IL-4、IL-5和Th1类细胞因子IFN- γ 水平(ELISA法)。**结果** 实验一:小鼠在致敏后14d脾脏单个核细胞分泌IL-4和IL-5明显增高,说明小鼠致敏后第14天已形成Th2免疫应答。实验二:与哮喘组比较,IL-12治疗组BALF中IL-4($192\pm 19\text{ pg/mL}$ vs $19\pm 5\text{ pg/mL}$)和IL-5浓度($328\pm 71\text{ pg/mL}$ vs $141\pm 15\text{ pg/mL}$)明显减少,差异有显著性($P<0.001$),但IFN- γ 浓度无明显变化,IL-4/IFN- γ 比值下降。IL-12治疗组脾脏单个核细胞培养上层液中IL-4和IL-5浓度($139\pm 54\text{ pg/mL}$ vs $341\pm 64\text{ pg/mL}$, $98\pm 18\text{ pg/mL}$ vs $411\pm 108\text{ pg/mL}$)与哮喘组比较明显减少,而IFN- γ 浓度($1403\pm 185\text{ pg/mL}$ vs $317\pm 54\text{ pg/mL}$)显著增高,差异均有显著性($P<0.001$)。**结论** IL-12治疗哮喘可抑制已建立的Th2型免疫反应,恢复Th1/Th2平衡。

[中国当代儿科杂志,2005,7(1):68-70]

[关键词] 支气管哮喘;Th2细胞类;免疫治疗;白细胞介素-12;细胞因子类;小鼠

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)01-0068-03

Effect of IL-12 on Th2-type immune responses in mice with asthma

Ren-Zhe AN, Jong-Gyun KIM, Jae-Ho LEE. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of the College of Medicine, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China (Email: aaraz_2000@yahoo.co.kr)

Abstract: Objective Asthma is a chronic non-specific inflammatory of the airways induced by Th2 type cells. IL-12 can inhibit Th2 immune response in the allergen sensitization stage. But whether it can inhibit the established Th2 immune responses is in question. In this study, the effect of IL-12 on the established Th2-type immune responses in asthma was examined in order to provide evidence for the clinical use of IL-12. **Methods** Experiment 1: Ovalbumin (OVA) and aluminium hydroxide were intraperitoneally injected into 25 female BALB/c mice of 6 - 8 weeks old to induce sensitization. Five mice were sacrificed before sensitization, and a further 5 more were sacrificed on 7, 14, 21 and 28 days after sensitization. The levels of Th2 cytokines IL-4 and IL-5 in the splenic mononuclear cells (MNCs) cultured supernatants were measured using ELISA to evaluate the time of Th2 immune response establishment. Experiment 2: Another 40 female BALB/c mice of 6 - 8 weeks old were sensitized by OVA and aluminium hydroxide intraperitoneal injection. Then asthma was induced by OVA inhalation. Twenty asthmatic mice were selected randomly to receive recombinant IL-12 treatment ($0.5\mu\text{g}$ was dissolved in 1 mL PBS once daily for 5 days) from 25 days post-sensitization. The rest of the asthmatic mice ($n=20$) just received a PBS injection. The 40 asthmatic mice were sacrificed at 30 days post-sensitization. The levels of Th2 cytokines IL-4, IL-5, and Th1 cytokines IFN- γ in the splenic MNCs cultured supernatants and in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by ELISA. **Results** Experiment 1 showed that the concentrations of IL-4 and IL-5 in the splenic MNCs cultured supernatants in mice increased on the 14th day post-injection, which suggested that a Th2 immune response had been established. Experiment 2 showed that the concentrations of IL-4 and IL-5 in BALF

[收稿日期]2004-07-30;[修回日期]2004-11-5

[作者简介]安仁哲(1959-),男,博士,副教授。主攻方向:小儿免疫系统疾病。

[通讯作者]安仁哲,吉林省延吉市局子街119号延边大学医学院附属医院儿科,邮编:133000。

significantly decreased in the IL-12-treated asthmatic mice when compared with the untreated asthmatic mice (19 ± 5 pg/mL vs 192 ± 19 pg/mL, 141 ± 15 pg/mL vs 328 ± 71 pg/mL, $P < 0.001$). The concentration of INF- γ remained unchanged, so the ratio of IL-4/INF- γ in BALF decreased in the IL-12-treated asthmatic mice. The concentrations of IL-4 and IL-5 in the splenic MNCs cultured supernatants were significantly decreased in the IL-12-treated mice (139 ± 54 pg/mL and 98 ± 18 pg/mL) compared with the untreated-asthmatic mice (341 ± 64 pg/mL and 411 ± 108 pg/mL, $P < 0.001$). In contrast, the INF- γ concentration increased (1403 ± 185 pg/mL vs 317 ± 55 pg/mL, $P < 0.001$).

Conclusions IL-12 can inhibit established Th2-type immune responses and can restore the Th1/Th2 balance.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(1):68-70]

Key words: Asthma; Th2 cells; Immunotherapy; Interleukin-12; Cytokines; Mouse

目前认为,哮喘主要是 Th2 细胞介导的气道慢性非特异性炎症^[1],Th1/Th2 细胞比例的降低与哮喘发病密切相关。Th1/Th2 失衡的原因可能与体内白细胞介素 12 (IL-12) 水平降低有关^[2]。IL-12 主要产生于巨噬细胞和树突状细胞,它通过激活转录因子 Stat 4,促使 Th0 细胞分化成 Th1 细胞,促进 INF- γ 的产生,而 INF- γ 又可增强 IL-12 的作用,形成正反馈调节,加强 Th1 应答反应。另一方面,IL-12 又可抑制 Th2 类因子如 IL-4、IL-5 的产生,从而抑制了 Th2 型应答反应。因此,IL-12 对调节 Th1/Th2 细胞免疫应答的平衡起着重要的作用。应用 IL-12 可改善 Th1/Th2 比例,治疗哮喘。

研究证实,IL-12 在抗原致敏阶段能有效抑制 Th2 免疫应答形成^[3],但是 IL-12 对已产生的 Th2 免疫应答是否同样具有抑制作用尚有争议。本研究利用支气管哮喘的动物模型,探讨 IL-12 对已产生 Th2 免疫应答的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组和模型建立

实验一:取 25 只 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠(韩国动物研究中心),于实验第 1 天腹腔内注射 10 μ g 鸡卵清蛋白(OVA, Sigma, 美国)和 1.5 mg 氢氧化铝(混合于 1 mL PBS)致敏,于致敏前、致敏后第 7, 14, 21, 28 天,各处死 5 只检测脾脏单个核细胞培养上清液中的 Th2 类细胞因子:IL-4 和 IL-5 水平,观察 Th2 免疫反应形成情况。

实验二:40 只 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠,随机分成哮喘组($n = 20$)和 IL-12 治疗组($n = 20$)。两组于实验第 1, 14, 21 天,腹腔内注射 10 μ g OVA 和 1.5 mg 氢氧化铝(混合于 1 mL PBS)致敏。第 28 天将小鼠置于密闭容器中,予以 1% OVA-PBS 20 mL 雾化吸入 20 min,连续 2 d,激发哮喘。IL-12 治疗组于实验第 25 天开始腹腔内注射 1 mL 重组 IL-12 (0.5 μ g/mL, Minneapolis, USA)进行治疗,每日 1

次,连续 5 d。哮喘组同时注射 1 mL PBS。末次激发后 24 h(致敏后 30 d)腹腔麻醉,取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和脾脏单个核细胞培养上清液检测 Th2 细胞因子 IL-4, IL-5 和 Th1 类细胞因子 INF- γ 水平。

1.2 BALF 的收集

小鼠气管插管, PBS 0.5 mL 灌洗,重复 3 次后回收灌洗液, 1 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, -70 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

1.3 脾脏单个核细胞培养上清液的收集

取脾脏置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,用不锈钢球压碎脾脏,收集上清液,用红细胞溶解液去除红细胞。用上述培养液调整细胞浓度为 2.5×10^5 /mL, 接种于 24 孔板,每孔 1 mL。细胞混悬液中加入 OVA,终浓度为 40 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵育箱内培养 48 h。收集上清液,在 -70 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

1.4 细胞因子的测定

采用双抗夹心酶联免疫吸附(ELISA)法,检测 BALF 和培养上清液中的 INF- γ 、IL-4 和 IL-5 水平。ELISA 试剂盒购至 BD Pharmingen 公司(USA),操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计软件分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两样本 t 检验。

2 结果

2.1 实验一:小鼠致敏后 Th2 免疫应答的形成

致敏前后不同时期脾脏单个核细胞分泌的细胞因子测定结果显示,致敏后第 14 天开始脾脏单个核细胞分泌 IL-4 和 IL-5 明显增高,与致敏前比较差异有显著性($t = 13.7, t = 30.2$, 均 $P < 0.001$)。见表 1。结果提示,小鼠致敏后第 14 天已形成 Th2 免疫应答反应。

表1 鸡卵清致敏前后小鼠脾脏单个核细胞分泌的细胞因子动态变化

Table 1 Changes of IL-4 and IL-5 levels of splenic mononuclear cells in mice before and after sensitization with OVA ($n = 5$, pg/mL)

细胞因子	致敏前	后 7 d	后 14 d	后 21 d	后 28 d
IL-4	31 ± 13	39 ± 16	80 ± 12 ^a	83 ± 16 ^a	81 ± 17 ^a
IL-5	36 ± 5	31 ± 5	217 ± 33 ^a	191 ± 16 ^a	200 ± 45 ^a

a 与致敏前比较 $P < 0.001$

2.2 实验二:IL-12 治疗哮喘对细胞因子的影响

2.2.1 两组 BALF 中细胞因子水平 IL-12 治疗组 BALF 中 IL-4 和 IL-5 浓度较哮喘组明显降低,差异有显著性。两组 BALF 中 INF- γ 浓度无显著性差异。见表 2。结果提示,IL-12 能够抑制 BALF 中 IL-4 和 IL-5 的分泌,使 IL-4/INF- γ 比值下降。

表2 鸡卵清激发后哮喘组和 IL-12 治疗组支气管肺泡灌洗液中细胞因子浓度

Table 2 Concentrations of cytokines in BALF in the Asthma and IL-12-treated groups after asthma induction with OVA ($n = 20$, pg/mL)

组别	IL-4	IL-5	INF- γ
哮喘组	192 ± 19	328 ± 71	229 ± 29
IL-12 治疗组	19 ± 5	141 ± 15	240 ± 16
t	44.5	12.9	1.7
P	<0.001	<0.001	>0.05

2.2.2 两组脾脏单个核细胞培养上清液中细胞因子水平 与哮喘组比较,IL-12 治疗组脾脏单个核细胞培养上层液中 IL-4 和 IL-5 浓度明显降低,而 INF- γ 浓度显著增高,差异均有显著性。见表 3。结果提示,IL-12 在 Th2 应答已建立的小鼠,具有抑制 Th2 类细胞因子分泌和增强 Th1 类细胞因子分泌,促进 Th1/Th2 恢复平衡的作用。

表3 鸡卵清激发后哮喘组和 IL-12 治疗组小鼠脾脏单个核细胞培养上清液中细胞因子浓度

Table 3 Concentrations of cytokines in the splenic mononuclear cells cultured supernatant in the Asthma and IL-12-treated groups after asthma induction with OVA ($n = 20$, pg/mL)

组别	IL-4	IL-5	INF- γ
哮喘组对照组	341 ± 64	411 ± 108	317 ± 54
IL-12 治疗组	139 ± 54	98 ± 18	1403 ± 185
t	12.1	13.2	28.3
P	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

本研究结果显示,小鼠致敏后第 14 天开始脾脏

单个核细胞分泌 IL-4 和 IL-5 明显增高,并保持稳定,说明小鼠被 OVA 致敏后两周,在体内已建立 Th2 类免疫反应。为了观察 IL-12 对已建立 Th2 型免疫反应的影响,在致敏小鼠被 OVA 激发时应用 IL-12 进行治疗。结果显示,IL-12 治疗不仅促进脾脏单个核细胞分泌 INF- γ ,而且抑制脾脏单个核细胞和 BALF 中的 IL-4 和 IL-5 的分泌,使 IL-4/INF- γ 比值下降。IL-12 治疗没有明显提高 BALF 中 INF- γ 浓度,可能与气道内 Th1 细胞数量较少有关。以上研究结果与 Lee 等^[4]报道一致,提示 IL-12 可有效地抑制已建立的 Th2 型免疫反应,能恢复 Th1/Th2 平衡。最近,Kuribayashi 等^[5]报道,IL-12 在抗原激发后治疗哮喘仍然有效,其机制可能与 IL-12 抑制 Th2 细胞的活化和增强内源性 IL-18 协同作用有关。

IL-12 不仅在抗原致敏阶段能有效的防止 Th2 型免疫反应形成,而且能抑制已建立的 Th2 型免疫反应和气道炎症改变,因此,增强 IL-12 的活性可能成为哮喘治疗的一个新的方向。国外临床研究报道,静脉注射 IL-12 治疗支气管哮喘有效,但因其全身副作用,其应用受到一定限制^[6]。最近,在哮喘动物的研究中发现,鼻腔内注入 IL-12 副作用小,同样可以降低气道高反应性和炎症反应^[7],有良好的临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] 董尉,盛军,浦燕艳,石学耕,史桂英. 哮喘患儿细胞内 IL-4 INF- γ 和血清 IgE 测定及临床意义. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(2): 119-120.
- [2] Naseer T, Minshall EM, Leung DY, Laberge S, Ernst P, Martin RJ, et al. Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(3): 845-851.
- [3] Lee YL, Fu CL, Ye YL, Chiang BL. Administration of interleukin-12 prevents mite Der p 1 allergen-IgE antibody production and airway eosinophil infiltration in an animal model of airway inflammation. [J]. Scand J Immunol, 1999, 49(3): 229-236.
- [4] Lee Y, Fu C, Chiang B. Administration of interleukin-12 exerts a therapeutic instead of a long-term preventive effect on mite Der p I allergen-induced animal model of airway inflammation [J]. Immunology, 1999, 97(2): 232-240.
- [5] Kuribayashi K, Kodama T, Okamura H, Sugita M, Matsuyama T. Effects of post-inhalation treatment with interleukin-12 on airway hyper-reactivity, eosinophilia and interleukin-18 receptor expression in a mouse model of asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32(4): 641-649.
- [6] Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(6): 511-522.
- [7] Matsuse H, Kong X, Hu J, Wolf SF, Lockey RF, Mohapatra SS. Intranasal IL-12 produces discreet pulmonary and systemic effects on allergic inflammation and airway reactivity [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(4): 457-468.

(本文编辑:钟乐)