

· 论 著 ·

BCG-DNA 对哮喘患者外周血单个核细胞 IFN- γ 和 IL-4 产生的作用

商 艳¹, 胡振林², 李 强¹, 施 柯², 刘忠令¹, 孙树汉^{2*}

(1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433; 2. 基础医学部医学遗传学教研室)

[摘要] 目的: 研究免疫活性物质卡介苗基因组DNA (BCG-DNA)对哮喘患者外周血单个核细胞(PBMC) IFN- γ 和 IL-4 产生的影响。方法: 分离哮喘患者 PBMC, 分别加入BCG-DNA、地塞米松刺激培养, ELISA 检测培养上清中 IFN- γ 及 IL-4 含量, RT-PCR 检测 PBMC IFN- γ mRNA 及 IL-4 mRNA 的表达量, 并与空白对照组相比较。结果: 地塞米松在体外对哮喘患者 PBMC 产生的 IFN- γ mRNA 和蛋白、IL-4 mRNA 和蛋白均有抑制作用; BCG-DNA 抑制哮喘患者 PBMC IL-4 mRNA 和蛋白的分泌, 而促进 IFN- γ mRNA 和蛋白的分泌, 与对照组比较差异显著($P < 0.01$), 且在体外对 PBMC 无毒性。结论: BCG-DNA 不仅具有和地塞米松相同的下调 IL-4 表达的作用, 而且还具有地塞米松所没有的诱导 IFN- γ 表达的作用, 利于纠正哮喘患者体内存在的 Th1/Th2 比例失衡状态, 起到治疗作用。

[关键词] 哮喘; 卡介苗基因组DNA; 干扰素 γ ; 白细胞介素 4; 外周血单个核细胞; 地塞米松

[中图分类号] R 562.250.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)07-0718-03

Effect of BCG-DNA on IFN- γ and IL-4 secreted by peripheral blood mononuclear cells in asthma patients

SHANG Yan¹, HU Zhen-Lin², LI Qiang¹, SHI Ke², LIU Zhong-Ling¹, SUN Shu-Han^{2*} (1. Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of BCG-DNA on IFN- γ and IL-4 secreted by the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in asthma patients. **Methods:** BCG-DNA and dexamethasone were added into PBMCs respectively. IFN- γ and IL-4 in the supernatant were detected by ELISA; mRNA level was evaluated by reverse transcript polymerase chain reaction. The results were compared among BCG-DNA, dexamethasone and control groups. **Results:** Dexamethasone *in vitro* inhibited the expression of Th1 cytokine IFN- γ and Th2 cytokine IL-4 in PBMC. BCG-DNA inhibited IL-4 expression in PBMC and promoted IFN- γ expression, and compared to control group there was significant difference ($P < 0.01$). BCG-DNA had no toxicity to PBMC. **Conclusion:** BCG-DNA can down-regulate IL-4 and induce IFN- γ secretion, which may help to reverse Th1/Th2 imbalance in asthma patients for therapeutic purpose.

[KEY WORDS] asthma; BCG-DNA; interferon- γ ; interleukin-4; peripheral blood mononuclear cells; dexamethasone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 718-720]

^[1] 免疫活性物质卡介苗基因组(BCG-DNA)对哮喘小鼠的过敏性气道炎症有明显的抑制作用^[1], 但 BCG-DNA 对哮喘患者是否具有同样的作用目前尚不清楚。本研究采用体外细胞培养的方法, 观察免疫调节剂 BCG-DNA 对哮喘患者外周血单个核细胞(PBMC)分泌 IFN- γ 和 IL-4 的影响, 并与地塞米松作用效果对比, 评价其作用的优缺点, 为 BCG-DNA 应用于临床提供实验依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象 选择长海医院门诊或住院哮喘发作期患者 24 例, 男 12 例, 女 12 例, 年龄 18~46 岁, 平均(38.5±4.4)岁, 全部符合中华医学会 1997 年支气管哮喘防治指南诊断标准。入选患者在本次就诊前 3 个月内未接受过免疫调节剂和糖皮质激素治

疗, 均填写知情同意书并报医院伦理委员会审批。
1.2 PBMC 的分离与培养 无菌操作抽取哮喘患者外周静脉血 20 ml, 肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液分离 PBMC。1% 锥虫蓝染色法检测细胞活力(在 95% 以上)并计数细胞。用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 调整细胞密度为 $2 \times 10^5/L$, 接种于 24 孔板, 每孔 2 ml。
1.3 实验分组 实验分为对照组、BCG-DNA 组、地塞米松组。对照组: 细胞悬液中加入终质量浓度为 100 $\mu g/ml$ 的刺激剂 PHA; BCG-DNA 组: 细胞悬液中加入终质量浓度为 100 $\mu g/ml$ 的 PHA 和 50 $\mu g/$

[基金项目] 国家高新技术发展规划(“863”计划)课题(2001AA213111)。

[作者简介] 商 艳(1975-), 女(汉族), 博士, 主治医师

* Corresponding author. E-mail: Shsun@snmu.edu.cn



ml 的 BCG-DNA (购自上海生物制品研究所); 地塞米松组: 细胞悬液中加入终质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PHA 和终浓度为 10^{-6} mol/ml 的地塞米松 (购自天津氨基酸公司人民制药厂)。细胞悬液内加入不同刺激物后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵箱内培养 72 h。收集培养上清液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待测。取细胞备用。

1.4 细胞毒性试验 动态观察培养的 PBMC 在加入 BCG-DNA 后细胞的生长情况, 并与不加 BCG-DNA 者比较, 同时于收集上清后对细胞进行常规锥虫蓝染色计数, 并以死亡细胞率反映 BCG-DNA 的毒性。

1.5 培养上清中 IFN- γ L-4 的测定 采用 ELISA 法 (试剂盒购自上海茂元科技有限公司) 分别检测上清液中 IFN- γ L-4 的含量。

1.6 IFN- γ mRNA、L-4 mRNA 半定量 RT-PCR 测定 用 RNA 纯化试剂盒分离细胞总 RNA, 并通过紫外分光光度仪及 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度、完整性、总量。按 AMV 逆转录试剂盒说明进行逆转录, 得到的 cDNA 直接进行下一步 PCR 扩增。反应总体积为 20 μl , 包括反转录产物 3 μl , 上下游引物各 0.5 μl , $10\times$ buffer (含 15 mmol/L Mg^{2+}) 2 μl , dNTPs 2 μl , Taq 酶 0.5 μl , 加无菌双蒸水至终体积 20 μl , 混匀后移至 PCR 仪行 PCR 反应。引物序列为: β actin (576 bp) 正向引物: 5'-CCA AGG CCA ACC GCG A GA AGA TGA C-3', 反向引物: 5'-A GG GTA CAT GGT GGT GCC GCC A GA C-3'。IFN- γ (494 bp) 正向引物: 5'-ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GTT T-3', 反向引物: 5'-GAT GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT-3'。L-4 (456 bp) 正向引物: 5'-ATG GGT CTC ACC TCC CAA CTG CT-3', 反向引物: 5'-CGA ACA CTT TGA ATA TTT CTC TCT CTC TCA T-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。取 10 μl PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳 30 min。用凝胶照相系统储存及打印电泳图像, 采用 Smart View 凝胶条带分析程序, 测定目的条带的密度, 然后以 β actin 作内对照, 目的条带的相对表达量 = 目的条带信号密度/ β actin 条带信号密度。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用非配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 BCG-DNA 对 PBMC 的生长毒性 经动态观察, 加或不加 BCG-DNA 对哮喘患者 PBMC 生长的影响均无明显差异, 锥虫蓝染色计数死亡细胞率亦

未见显著区别 (17% vs 15%), 表明 BCG-DNA 对体外 PBMC 生长无明显毒性。

2.2 BCG-DNA、地塞米松对哮喘患者 PBMC IFN- γ L-4 分泌的影响 BCG-DNA 和地塞米松均使 IFN- γ /L-4 比值升高, 但两者无统计学差异。地塞米松在体外对哮喘患者 PBMC 产生 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 Th2 型细胞因子 L-4 均有抑制作用; BCG-DNA 主要抑制哮喘患者 PBMC L-4 的分泌, 而促进 IFN- γ 分泌, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 BCG-DNA、地塞米松对哮喘患者 PBMC IFN- γ L-4 分泌的影响

Tab 1 Effect of BCG-DNA and dexamethasone on IFN- γ and L-4 secretion from PBMC in asthmatic patients

($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{pg}/\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Group	IFN- γ	L-4	IFN- γ /L-4
Control	551.86 \pm 121.53	610.43 \pm 198.72	0.90
BCG-DNA	680.74 \pm 130.65**	350.78 \pm 101.53**	1.94**
Dexamethasone	341.52 \pm 70.13**	172.45 \pm 86.31**	1.98**

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 哮喘患者各组 PBMC IFN- γ mRNA、L-4 mRNA 的表达 哮喘患者各组 PBMC 总 RNA 经紫外可见分光光度仪检测 $D_{260/280}$ 值为 2.0, 证明 RNA 提取纯度较好, RNA 电泳可见 18S 和 28S 条带, 提示 RNA 提取完整, 无降解。经 RT-PCR 半定量分析, 发现 BCG-DNA 组 PBMC IFN- γ mRNA 表达量较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而地塞米松组 PBMC IFN- γ mRNA 表达量较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。BCG-DNA 组和地塞米松组 PBMC L-4 mRNA 表达量均较对照组明显降低 ($P < 0.01$), 地塞米松组 L-4 mRNA 表达量降低尤其明显 (图 1)。

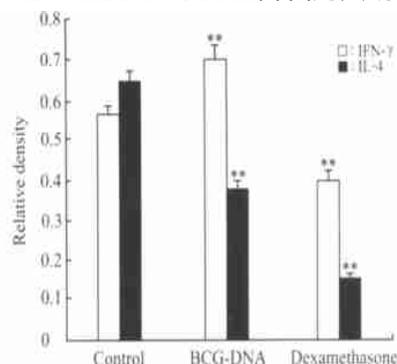


图 1 哮喘患者各组 PBMC IFN- γ mRNA、L-4 mRNA RT-PCR 的半定量分析

Fig 1 Semiquantitative analysis of IFN- γ mRNA and L-4 mRNA in PBMC of asthmatic patients

** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

支气管哮喘是由多种细胞如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[2]。其中T辅助细胞释放的Th2型细胞因子IL-4、Th1型细胞因子IFN- γ 在哮喘发病中分别起正反两方面的调节作用^[3]。IL-4是B细胞的生长和分化因子,能促进B细胞由产生IgM转变成产生IgE;另外它也是肥大细胞生长因子,与IL-3协同能促进肥大细胞增殖和分化;IL-4还可增加血管内皮细胞黏附分子1在内皮细胞的表达,诱导嗜酸粒细胞的气道聚集。更为重要的是IL-4是使CD4细胞转变为Th2细胞最重要的细胞因子,Th2细胞的形成反过来又分泌出更多的IL-4,因此IL-4是变态反应性疾病发病中的关键性细胞因子^[4]。IFN- γ 则是促使Th0细胞转变成Th1细胞的重要细胞因子,它能抑制Th2细胞的形成,减少IL-4诱导B细胞合成IgE,降低Fc ϵ R的表达。如能提高机体IFN- γ 水平,可在一定程度上达到抑制哮喘变态反应发生的目的^[5]。人们常用IFN- γ /IL-4比值代表Th1/Th2的平衡情况。目前糖皮质激素是治疗支气管哮喘最有效的药物,但全身使用糖皮质激素会不可避免地导致机体全身免疫功能的减弱,易造成多种病原体的反复感染,进一步加重哮喘病情。此外,长期大量使用激素还可引起向心性肥胖、水钠潴留、高血压、糖尿病等全身不良反应,这些都限制了糖皮质激素在临床上的应用^[6]。

1997年,Shirakawa等^[7]通过对日本867名6~12岁儿童的调查发现结核菌素的迟发相超敏反应强度与特异质呈负相关,PPD反应阳性者的哮喘发病率、血清IgE水平显著低于阴性者,IFN- γ 水平则显著升高。提示儿童时期感染结核杆菌可以诱导体内的Th1型细胞反应,降低哮喘的发病率,从而掀起了研究BCG用于哮喘防治的高潮。但使用BCG后容易出现发热、过敏性休克、淋巴结炎等不良反应,严重者可诱发全身结核感染,限制了其进一步广泛应用于临床。1984年,Tokunaga等^[8]发现从BCG中分离纯化的BCG-DNA有通过其自身结构特点直接触发机体免疫防御机制的能力,它能活化B细胞、NK细胞、巨噬细胞,使IFN- γ 分泌增加,显著增强Th1型细胞反应,对十几种类型的肿瘤细胞在体内及体外均有明显抑制作用,与BCG相比抗癌活性

更强而没有明显的细胞毒性^[9]。本实验结果表明,BCG-DNA作为一种免疫调节剂主要抑制哮喘患者PBM C IL-4 mRNA和蛋白的分泌,明显促进IFN- γ 产生,且在体外对PBM C无毒性。新近研究发现BCG-DNA中存在大量含有非甲基化CpG基元的六核苷酸序列,能够激活NK细胞,诱导IFN- γ 产生。这样BCG-DNA不仅具有和地塞米松相同的下调Th2细胞因子表达的作用,而且还具有地塞米松所没有的诱导Th1细胞因子表达的作用,从而达到抑制哮喘发病的目的。但机体免疫系统受复杂的体内、外环境的综合调节,BCG-DNA对支气管哮喘的非特异性免疫调节作用尚有待于临床进一步的观察和积累。

[参考文献]

- [1] Shang Y, Li Q, Sun SH, *et al* Effect of intratracheally administered BCG-DNA on murine model of asthma [J]. *J Med College PLA*, 2004, 19(1): 11-14
- [2] Apter AJ, Szefer SJ. Advances in adult and pediatric asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(3): 407-414
- [3] Liu L, Jarjour NN, Busse WW, *et al* Enhanced generation of helper T type 1 and 2 chemokines in allergen-induced asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(10): 1118-1124
- [4] O'Byrne PM, Imman MD, Adroth E. Reassessing the Th2 cytokine basis of asthma [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(5): 244-248
- [5] Gentile DA, Doyle WJ, Zeevi A, *et al* Association between TNF-alpha and TGF-beta genotypes in infants and parental history of allergic rhinitis and asthma [J]. *Hum Immunol*, 2004, 65(4): 347-351
- [6] Mclaughlin F, Mackintosh J, Hayes BP, *et al* Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers [J]. *Bone*, 2002, 30(6): 924-930
- [7] Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, *et al* The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder [J]. *Science*, 1997, 275(5296): 77-79
- [8] Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, *et al* Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1984, 72(4): 955-962
- [9] Shimada S, Yano O, Inoue H, *et al* Antitumor activity of DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG II. Effects on various syngeneic mouse tumors [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1985, 74(3): 681-687

[收稿日期] 2004-03-04

[修回日期] 2004-05-17

[本文编辑] 曹静