

重组人白细胞介素-11 对 2,4-二硝基氟苯致小鼠接触性皮炎和炎症细胞因子水平的影响

李应全, 王 进*, 谢 青, 王菊英, 张岫美
(山东大学医学院药理学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 观察重组人白细胞介素-11(rhIL-11)对接触性皮炎有无抗炎作用。方法 采用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)致小鼠耳部皮肤接触性皮炎试验模型, 观察 sc rhIL-11 $0.375 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 10 d 后皮肤炎症反应程度, 同时采用放射免疫分析法测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的水平, 采用生物化学检测法测定血清一氧化氮(NO)的水平, 采用免疫组化法测定皮肤中细胞间粘附分子(ICAM-1)的表达。结果 rhIL-11 可显著降低炎症细胞浸润, 减轻炎症反应程度, 并显著降低血清中 TNF- α , NO, IL-6 及皮肤中 ICAM-1 的水平。结论 rhIL-11 可抑制 DNFB 诱发的炎症反应, 并明显降低血清中促发因子 TNF- α , NO, IL-6 等的水平及皮肤中 ICAM-1 的表达。

关键词: 重组人白细胞介素-11; 皮炎, 接触性; 细胞因子; 细胞, 浸润

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)05-0383-04

接触性皮炎多为过敏反应性炎症性皮肤病, 随着近年来对其研究的不断深入, 调节机体失衡的免疫系统从而达到治疗效果逐渐被人们认可。由于基因重组工程技术的快速发展, 为该类疾病的生物疗法提供了物质基础。重组人白细胞介素-11(recombinant human interleukin-11, rhIL-11)系通过基因重组而制得的具有高活性的新生物制剂。本研究采用 2,4-二硝基氟苯(dinitrofluorobenzene, DNFB)致小鼠耳部皮肤慢性变态反应性接触性皮炎, 通过皮下注

射 rhIL-11, 观察本品对皮炎炎症程度的影响, 并采用放射免疫分析法、免疫组化法及生物化学检测法等, 测定其对血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、一氧化氮(NO)含量及皮肤中细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与药品

昆明种健康小鼠, 雌雄各半, 体重 $21 \sim 25 \text{ g}$, 山东大学实验动物中心提供。

rhIL-11, 齐鲁制药厂提供, 批号: 20030301; 地塞米松(dexamethasone), 山东鲁抗辰欣药业有限公司生产, 批号: 20030516; DNFB AR 级, 中国医药集团上海化学试剂公司产品, 批号: F2003029; TNF- α 放免测定试剂盒, 北方生物技术研究提供, 批号: 031001; IL-6 放免测定试剂盒, 北方生物技术研究提供, 批号: 031205; 兔抗小鼠 ICAM-1 单克隆抗体及试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司提供, 批号: 20030506; NO 试剂盒, 南京建成生物工程研究所提供, 批号: 20030519。

1.2 仪器

L8-80 型低温超速离心机, 美国 Beckman 生产; BH-2 型光学显微镜, 日本 Olympus 生产; 石蜡切片机, 美国 AO Spencer 产品; MPIAS-1000 图像分析系统, 北京华海公司产品; Model 550 型酶联免疫检测仪, 美国 Bio-Rad 公司生产; GD-911 型放射免疫计数仪, 中国科技大学创新股份有限公司中佳分公司生产; SPSS11.0 软件分析系统, 美国 SPSS 公司产品。

1.3 分组与给药方法

取昆明种小鼠 72 只, 随机分为 6 组, 即正常对照组, DNFB 染毒组(DNFB + NS), 阳性对照组(DNFB + 地塞米松 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), DNFB + rhIL-11 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, DNFB + rhIL-11 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,

收稿日期: 2004-12-29 接受日期: 2005-06-06

作者简介: 李应全(1949-), 男, 山东省济南市人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事免疫药理学研究。

* 联系作者 E-mail: wangj@sdu.edu.cn Tel: (0531) 88382036

DNFB + rhIL-11 0.375 mg·kg⁻¹组。除对照组外,每日皮下注射给药1次,连续10 d,实验时均用7% DNFB 丙酮液 30 μL 背部皮下注射致敏,9 d 后于小鼠右耳涂搽1% DNFB 甘油溶液 20 μL 进行攻击,12 h 后处死动物并取两侧耳廓组织。

1.4 rhIL-11 对 DNFB 性小鼠接触性皮炎的影响

用直径 9 mm 打孔器分别打取左右两耳圆片,称重后以两耳片重量之差作为耳肿胀程度(mg),然后用 10% 福尔马林固定,乙醇常规脱水,石蜡包埋,HE 染色。在光学显微镜下进行组织学检查,网型目镜测微尺计数单位面积真皮层最密集炎细胞浸润区的多形核细胞及单一核细胞数,判断炎症反应程度。

1.5 DNFB + rhIL-11 对小鼠耳部皮肤 ICAM-1 表达的影响

ICAM-1 染色方法严格按照试剂盒说明,采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin-enzyme complex)法进行操作。阳性反应部位主要以细胞膜及其周围区域的微血管为主,表现为棕黄色深染。将免疫组织化学染色结果输入 MPIAS-1000 图像分析系统,每个标本切片1张,在每张切片中随机选取5个非重叠视野,对表皮中 ICAM-1 的表达进行定量检测,以5个视野的平均吸光度值(A)表示每个标本中 ICAM-1 的相对含量,进行组间统计学比较。

1.6 DNFB + rhIL-11 对血清 TNF-α, IL-6, NO 含量的影响

每组小鼠于处死前以摘除眼球法取血约 1.5 mL,静置 15 min 后,4℃,450 × g 离心 20 min,分离收集血清。按试剂盒说明操作,采用液相平衡竞争放射免疫分析法检测血清 TNF-α 和 IL-6 的含量,采用比色法检测血清 NO 的含量。

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 分析软件进行单因素方差分析,组间比较采用 Tamhane T2 检验。

2 结果

2.1 rhIL-11 对 DNFB 性小鼠接触性皮炎模型耳肿胀程度的影响

结果表明,地塞米松 0.5 mg·kg⁻¹组及 rhIL-11 0.75 和 1.5 mg·kg⁻¹组可明显降低 DNFB 所致耳部肿胀程度,并且能够明显减轻接触性迟发性炎症反应,降低皮肤中炎性细胞浸润,统计学差别显著(表1和表2)。但 rhIL-11 各剂量组间比较无显著统计

学差异($P > 0.05$)。

Tab 1. Effects of interleukin-11 (rhIL-11) on ear swelling and expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) of auricle skins in mice with contact dermatitis induced by DNFB

Group		Δear weight	Expression of
/mg·kg ⁻¹		/mg	ICAM-1(A)
Control	—	0.5 ± 0.8	0.18 ± 0.11
DNFB	—	10.7 ± 4.2 ^{**}	0.44 ± 0.02 ^{**}
DNFB + DEX	0.5	3.6 ± 1.6 [#]	0.21 ± 0.05 [#]
DNFB + rhIL-11	0.375	6.5 ± 1.5	0.28 ± 0.03 [#]
	0.75	5.1 ± 2.1 [#]	0.24 ± 0.01 [#]
	1.5	4.5 ± 1.8 [#]	0.21 ± 0.07 [#]

Dinitrofluorobenzene(DNFB) was given subcutaneously for sensitization and challenged with DNFB on the right ears 9 d later. Round ear pieces of 9 mm diameter were cut from both right and left ears 12 h after challenge, and weighted separately. Degree of ear swelling was expressed as the weight difference of right and left ear piece. Expression of ICAM-1 was detected by immunohistochemical methods, the result was analyzed by computer imaging analysis system (MPIAS 1000), and recorded as mean absorbance of each slide, the data expressed in Tab 1 are the average of 12 slides, each from one mice. DEX: dexamethasone. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with DNFB group.

Tab 2. Effects of rhIL-11 on infiltration of inflammatory cells of auricle skins in mice with contact dermatitis induced by DNFB

Group		Infiltration of inflammatory cells/mm ²	
		Mononuclear cell(×10 ⁻³)	Polymorphonuclear cell
DNFB	—	1.32 ± 0.44	150 ± 68
DNFB + DEX	0.5	0.16 ± 0.11 ^{**}	26 ± 20 ^{**}
DNFB + rhIL-11	0.375	0.82 ± 0.18	92 ± 62
	0.75	0.62 ± 0.20 [*]	67 ± 40 [*]
	1.5	0.50 ± 0.23 ^{**}	50 ± 38 [*]

See Tab 1 for DNFB treatment. Inflammatory cell infiltration was observed under light microscope (×400) and cell counting was observed under micrometer eyepiece. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with DNFB group.

2.2 rhIL-11 对 DNFB 性小鼠接触性皮炎模型耳部皮肤组织 ICAM-1 表达的影响

用免疫组织化学方法检测发现,正常小鼠耳部

皮肤组织 ICAM-1 低度表达, DNFB 染毒组小鼠 ICAM-1 阳性染色高度表达, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 组和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 地塞米松组 ICAM-1 轻度表达, 0.75 和 $0.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 组 ICAM-1 中度表达, 具有显著统计学差异(表 1)。但 rhIL-11 各剂量组间比较无显著统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 rhIL-11 对 DNFB 性小鼠接触性皮炎模型炎症细胞因子水平的影响

表 3 结果表明, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 地塞米松与 0.375 , 0.75 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 均明显降低小鼠接触性皮炎模型血清中 NO 的含量, 与 DNFB 染毒组比较, 具有显著统计学差别。但 rhIL-11 各剂量组间比较无显著统计学差异($P > 0.05$)。

0.375 , 0.75 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 组和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 地塞米松组均可明显降低小鼠接触性迟发性皮炎模型血清中 TNF- α 的含量, 与 DNFB 染毒组比较有显著性差异。但 rhIL-11 各剂量组间比较无显著统计学差异($P > 0.05$)。

Tab 3. Effects of rhIL-11 on serum level of NO, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) in mice with contact dermatitis induced by DNFB

Group		NO	TNF- α	IL-6
$/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		$/\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	$/\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Control	—	46 ± 18	10.7 ± 1.4	7.6 ± 1.3
DNFB	—	$90 \pm 32^{**}$	$22.2 \pm 2.5^{**}$	$21.9 \pm 4.5^{**}$
DNFB + DEX	0.5	$59 \pm 11^{##}$	$12.4 \pm 2.7^{##}$	$12.4 \pm 2.6^{##}$
DNFB + rhIL-11	0.375	$67 \pm 16^{#}$	$17.5 \pm 2.1^{#}$	20.8 ± 2.8
	0.75	$66 \pm 22^{##}$	$15.2 \pm 2.3^{##}$	20.0 ± 3.2
	1.5	$63 \pm 17^{##}$	$14.5 \pm 1.8^{##}$	$17.5 \pm 1.9^{#}$

See Tab1 for DNFB treatment. Blood was collected from mice and centrifuged at $450 \times g$ for 20 min. The serum levels of TNF- α and IL-6 were measured by radioimmunoassay, the serum level of NO was detected by biochemical method. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. $^{**} P < 0.01$, compared with control group; $^{#} P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$, compared with DNFB group.

$0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 地塞米松可明显降低小鼠接触性迟发性皮炎模型血清中 IL-6 的含量($P < 0.01$), $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 可显著降低皮炎模型血清中 IL-6 的含量, 与 DNFB 染毒组比较, 具有显著统计学差别。而 0.375 和 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 组对血清中 IL-6 的水平无显著影响($P > 0.05$)。

3 讨论

DNFB 引发的变应性接触性皮炎, 是由 T 细胞

介导的迟发型超敏反应性疾病^[1]。DNFB 作为一种半抗原, 可与皮肤角质蛋白或朗格罕细胞结合而成为全抗原, 刺激 T 细胞分化增殖成致敏淋巴细胞, 由淋巴循环转入血流, 并分布于全身皮肤。当再次遇到同一抗原时, 引发淋巴细胞和单核细胞浸润并促进多种淋巴因子和单核因子如 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , ICAM-1 和 ELAM-1 等的释放, 而诱发或加剧病灶炎症及皮肤损害。

ICAM-1 能促进 T 细胞活化及白细胞从血管内向炎症部位浸润, 参与炎症和免疫反应。还可间接促进多种细胞因子分泌而使病情延续^[2,3]。本实验结果显示 rhIL-11 各剂量组除能抑制炎性细胞浸润并减轻耳肿胀程度外, 还能明显抑制皮肤中 ICAM-1 的表达水平, 从而减轻皮肤炎症反应。TNF- α 为单核因子, 能刺激血管 ELAM-1, 促进白细胞粘附趋化和表皮中中性白细胞的浸润, 还可刺激多种炎症相关因子 ICAM-1 等的分泌^[4]。本研究结果显示, rhIL-11 各剂量组均可明显降低血清中 TNF- α 的水平, 从而也可间接下调 IL-6, ICAM-1 及 NO 水平, 而抑制炎症反应。NO 和免疫性炎症性皮肤病变的免疫调节存在密切关系^[5], 可扩张血管增加通透性, 诱导炎细胞因子如 TNF- α , IL-1, IL-8 等生成和毒性自由基的产生。本研究结果表明, rhIL-11 各剂量组可显著降低血清中 NO 的含量而减轻炎症反应。IL-6 可刺激角质细胞增殖, 促进巨噬细胞的吞噬功能, 在皮肤炎症形成时对增加 T 细胞在表皮内的聚集具有一定的促进作用^[6]。本实验结果表明 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rhIL-11 可降低血清中 IL-6 的水平, 而在 0.75 和 $0.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时则能明显降低血清 NO 和 TNF- α 的水平, 这与 Nash 等^[7,8]报道的 rhIL-11 对放射线照射后整体动物或离体组织细胞培养液中多种细胞因子的影响相一致。

IL-11 为骨髓基质细胞产生的一种内源性的多肽类多功能造血细胞因子, 能够单独或协同其他细胞因子促进造血干细胞、单核细胞系、巨核细胞系、粒细胞系、红细胞系的集落形成和增殖、分化与成熟。经采用基因工程重组技术生产的 rhIL-11, 其比活性高于天然 IL-11。临床主要用于恶性肿瘤患者放、化疗所致的血小板减少症的治疗。本研究显示, rhIL-11 既能缓解变应性接触性皮炎动物模型的炎症反应程度和炎性细胞浸润, 又能减少 ICAM-1, TNF- α , NO 和 IL-6 等炎症细胞因子的表达, 而减轻炎症反应。提示本品为一种能够下调多种炎症介质

的多功能性抗炎因子。在 Th 细胞系列中, Th1 细胞主要介导细胞免疫和炎症反应, 而 Th2 细胞主要介导 B 细胞增殖和抗体产生, 两者可相互制约。rhIL-11 可能系抑制 Th1 细胞的功能, 减轻细胞免疫和炎症反应, 减少 TNF 等炎性细胞因子的生成, 同时又可减弱其对 Th2 细胞生成 IL-4 和 IL-10 的抑制作用, 从而产生较好的抗炎作用。至于本品对其他抗炎因子如 IL-4, IL-10 等水平的影响, 未进行观察。

4 参考文献:

- [1] Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity[J]. *Immunol Today*, 1998, **19**(1):37-44.
- [2] Boehncke WH, Kellner I, Konter U, Sterry W. Differential expression of adhesion molecules on infiltrating cells in inflammatory dermatoses[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1992, **26**(6):907-913.
- [3] Chen JL. Regulation of expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1)[J]. *Foreign Med Sci-Immunol* (国外医学免疫学分册), 2000, **23**(5):272-274.
- [4] Sheu MY, Fowler AJ, Kao J, Schmuth M, Schoonjans K, Auwerx J, et al. Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models[J]. *J Invest Dermatol*, 2002, **118**(1):94-101.
- [5] Morita H, Hori M, Kitano Y. Modulation of picryl chloride-induced contact hypersensitivity reaction in mice by nitric oxide[J]. *J Invest Dermatol*, 1996, **107**(4):549-552.
- [6] Westphal GA, Schnuch A, Moessner R, Konig IR, Kranke B, Hallier E, et al. Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis[J]. *Contact Dermatitis*, 2003, **48**(2):93-98.
- [7] Nash RA, Seidel K, Storb R, Slichter S, Schuening FG, Appelbaum FR, et al. Effects of rhIL-11 on normal dogs and after sublethal radiation[J]. *Exp Hematol*, 1995, **23**(5):389-396.
- [8] Redlich CA, Gao X, Rockwell S, Kelley M, Elias JA. IL-11 enhances survival and decreases TNF production after radiation-induced thoracic injury[J]. *J Immunol*, 1996, **157**(4):1705-1710.

Effects of recombinant human interleukin-11 on contact dermatitis of mice induced by dinitrofluorobenzene and on level of inflammatory cytokines

LI Ying-Quan, WANG Jin*, XIE Qing, WANG Ju-Ying, ZHANG Xiu-Mei

(Institute of Pharmacology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **AIM** To observe whether recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) can inhibit contact dermatitis. **METHODS** Dinitrofluorobenzene(DNFB) was used to induce the contact dermatitis in mouse ear, rhIL-11 0.375-1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ sc for 10 d, the degree of skin inflammatory reaction was observed. At the same time, the serum level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) was measured by radioimmunoassay; the serum level of nitrogen monoxidum (NO) was detected by biochemical method and the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was detected by im-

munohistochemical method. **RESULTS** rhIL-11 significantly decreased inflammatory cell infiltration and the degree of inflammatory reaction, decreased the level of TNF-α, NO, IL-6 in serum and the expression of ICAM-1 in skin. **CONCLUSION** rhIL-11 can significantly inhibit inflammatory reaction induced by DNFB.

Key words: recombinant human interleukin-11; dermatitis, contact; cytokine; cell, infiltration

* Corresponding author.