

白细胞介素协同作用抗小鼠新型隐球菌感染

张天托, 周凤丽, 毕筱刚, 吴本权, 唐英春
(中山大学附属第三医院内科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】观察白细胞介素 12(IL-12)和白细胞介素 18 (IL-18)对新型隐球菌感染小鼠细胞因子的影响和疗效。【方法】将(BALB/c × DBA/2)小鼠 88 只制成小鼠新型隐球菌感染模型后,随机分成 IL-12 组、IL-18 组、IL-12 + IL-18 组和对照组(用磷酸缓冲液处理),每组 22 只。根据处理方法治疗,检测肺泡灌洗液 IFN- γ 、IL-4、IL-10 含量(ELISA 法)和肺脑菌落计数,观察治疗后生存率。【结果】对照组、IL-12 组和 IL-18 组小鼠全部死亡,IL-12 + IL-18 组 4 只死亡。肺菌落计数对照组 $(3\,417 \pm 1\,177) \times 10^8$ CFU/L, IL-12 组 $(3\,914 \pm 2\,178) \times 10^8$ CFU/L, IL-18 组 $(3\,416 \pm 1\,574) \times 10^8$ CFU/L, IL-12 + IL-18 组 $(500 \pm 260) \times 10^8$ CFU/L。脑菌落计数对照组 $(21 \pm 6) \times 10^8$ CFU/L, IL-12 组 $(15 \pm 5) \times 10^8$ CFU/L, IL-18 组 $(16 \pm 8) \times 10^8$ CFU/L, IL-12 + IL-18 组 $(2 \pm 1) \times 10^8$ CFU/L。使用组 IFN- γ 水平显著升高,IL-4 和 IL-10 水平下降,与对照组比较差异有显著性。【结论】IL-12 和 IL-18 协同诱导 IFN- γ 产生,促进 Th1 细胞反应,抑制 Th2 细胞反应,改变了 Th1/Th2 平衡,对新型隐球菌感染小鼠产生保护效应。

关键词:隐球菌,新型/药物作用;白细胞介素类/治疗应用

中图分类号:R379.5

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)03-0243-03

Synergistic Effect of Interleukin in Protecting Mice Against Infection Caused by *Cryptococcus neoformans*

ZHANG Tian-tuo, ZHOU Feng-li, BI Xiao-gang, WU Ben-quan, TANG Ying-chun

(Department of Internal Medicine, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To study the effect of IL-12 and IL-18 on cytokines of murine infection with *Cryptococcus neoformans*. 【Methods】88 (BALB/c × DBA/2)mice infected with *Cryptococcus neoformans*. were randomized into IL-12, IL-18, IL-12 + IL-18 and normal control(PBS) ($n = 22$) groups, treated with PBS, IL-12 and/or IL-18 respectively. Level of IFN- γ , IL-4 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid were detected with ELISA method. The numbers of viable fungi in lung and brain were counted. Survival rate after treatment was investigated. 【Results】In control, IL-12 and IL-18 groups, all mice were dead. In IL-12 + IL-18 group, 4 were dead. The numbers of viable fungi in lung were $(3\,417 \pm 1\,177) \times 10^8$ CFU/L in control group, $(3\,914 \pm 2\,178) \times 10^8$ CFU/L in IL-12 group, $(3\,416 \pm 1\,574) \times 10^8$ CFU/L in IL-18 group and $(500 \pm 260) \times 10^8$ CFU/L in IL-12 + IL-18 group. The numbers of viable fungi in brain were $(21 \pm 6) \times 10^8$ CFU/L in control group, $(15 \pm 5) \times 10^8$ CFU/L in IL-12 group, $(16 \pm 8) \times 10^8$ CFU/L in IL-18 group, $(2 \pm 1) \times 10^8$ CFU/L in IL-12 + IL-18 group. The level of IFN- γ was increase, IL-4 and IL-10 was decrease in IL-12 + IL-18 group. There was significant difference between the combined group and the control group. 【Conclusions】Combined treatment with IL-12 and IL-18 synergistic induced IFN- γ production, promoted development of Th1 cell responses, suppressed Th2 cell responses, modulated Th1 and Th2 cytokine balance, suggesting that IL-12 + IL-18 enhance the host defense against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*/drug effects; interleukin/therapeutic use

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(3): 243 ~ 245, 252]

收稿日期:2002-02-01

作者简介:张天托(1962-),男,湖南长沙人,博士,副教授,硕士生导师。

近年深部真菌感染有明显上升的趋势。由于高效同时低毒的抗真菌药物较少,真菌产生耐药性强,因此深部真菌感染易于发展成难治性、致死性疾病。目前治疗的对策除了研究开发更有效安全的化疗药物外,试用提高机体免疫力,特别是在免疫损害宿主中探讨生物免疫治疗来加强控制病原体感染已引起高度重视。我们对使用白细胞介素12(IL-12)和白细胞介素18(IL-18)治疗新型隐球菌感染小鼠的效果,以及3种细胞因子水平的变化作了对比观察,报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 取7周龄雌性(BALB/c×DBA/2)F1小鼠88只,体质量22~25g。

1.1.2 新型隐球菌 取新型隐球菌临床株YC-11,血清型A型,经马铃薯右旋糖琼脂培养基培养增殖生长2d后,予生理盐水洗涤3次,配制成 1×10^8 CFU/L备用。

1.1.3 动物模型 小鼠经戊巴比妥钠70 mg/kg腹腔内注射麻醉,于气管内注入备用新型隐球菌菌液50 μ L,制成新型隐球菌感染动物模型。

1.1.4 细胞因子 重组小鼠白细胞介素12(mIL-12),含量 2.5×1^{-5} g/L,由Hoffman-La Roche Inc.赠送,重组小鼠白细胞介素18(mIL-18)含量0.01 g/L,由日本林原研究所赠送。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 小鼠随机分成IL-12组、IL-18组、IL-12+IL-18组和对照组,各22只。对照组用磷酸缓冲液(PBS,含10 mL/L小鼠血清蛋白)。IL-12 0.005 μ g/只,IL-18 2 μ g/只,200 μ L PBS/只于接种后即日起单独或混合连续腹腔内注射7d。

1.2.2 动物处置 于感染后的第1周、第3周每组分别处死小鼠7只。暴露气管,套管针穿刺,用1 mL冷PBS行肺泡灌洗术,留取肺泡灌洗液待检。取肺、脑全份脏器,经匀浆机制成匀浆,系列10倍稀释后接种于马铃薯右旋糖琼脂平板培养基上,36 $^{\circ}$ C培养2d后作菌落计数。

1.2.3 细胞因子测定 肺泡灌洗液标本分别作 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素10(IL-10)测定。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测,试剂盒购自美国Endogen公司,按说明书要求操作,酶标仪(Bio-Rad 2550型)450 nm测吸光度,

建立标准曲线,求其含量。

1.2.4 生存观察 余下各8只感染小鼠观察存活状态,以80 d为限计算生存率。

1.3 统计学处理

检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,4组间均数比较应用方差分析,采用LSD多重比较等方法统计,生存分析用Kaplan-Meier曲线,两组小鼠的生存曲线比较应用log-rank检验。所有数据处理均在计算机SPSS 8.0软件包进行。

2 结果

2.1 小鼠生存状况

4组小鼠在新型隐球菌感染后80 d内作生存率观察,生存曲线见图1。对照组,IL-12组和IL-18组从感染后第3周开始陆续死亡,至观察期结束无1只存活。IL-12组、IL-18组与对照组比较无显著差异。IL-12+IL-18组4只死亡,4只存活,与对照组比较生存率存在显著差异($P < 0.005$)见图1。

2.2 重要脏器菌落数

在真菌感染后第1周、第3周时各组取7只小

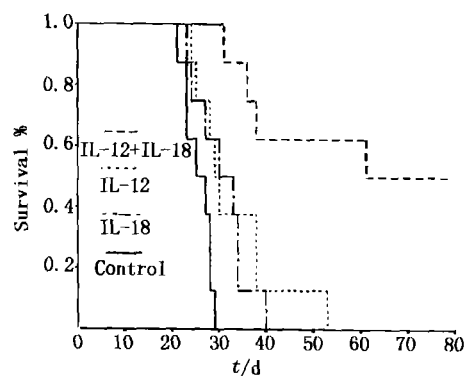


图1 4组小鼠生存曲线

Fig. 1 Survival curve of four mice groups ($n = 8$)

鼠的肺、脑全份脏器制成匀浆,系列稀释后作菌落计数,结果见表1。经统计学分析,第3周肺、脑的菌落计数显示,IL-12组、IL-18组与对照组比较无显著差异。IL-12+IL-18组与对照组比较有显著性差异($P < 0.001$)。见表1。

2.3 肺泡灌洗液IFN- γ 、IL-4、IL-10含量

第1周IL-12+IL-18组中IFN- γ 水平升高,IL-4、IL-10水平下降,与对照组比较有显著性差异(P 分别 < 0.05 、 < 0.01 、 < 0.05)。第3周IL-12+IL-18组中IFN- γ 水平明显升高,与对照组比较有显著性差异($P < 0.001$)。结果见表2。

表1 4组小鼠脏器菌落数

Table 1 The organs count of *C. neoformans* in four mice groups

| Groups | $\bar{x} \pm s, \times 10^8$ CFU/L | | | |
|---------------|------------------------------------|---------|---------------------|-------------------------|
| | First week | | Third week | |
| | Brain | Lung | Brain | Lung |
| Control | 0 | 45 ± 22 | 21 ± 6 | 3 417 ± 1 177 |
| IL-12 | 0 | 49 ± 25 | 15 ± 5 | 3 914 ± 2 178 |
| IL-18 | 0 | 44 ± 24 | 16 ± 8 | 3 416 ± 1 574 |
| IL-12 + IL-18 | 0 | 36 ± 23 | 2 ± 1 ¹⁾ | 500 ± 260 ¹⁾ |

Each group contain 7 mice. Compared with control group 1) $P < 0.001$

表2 4组小鼠血清细胞因子水平测定

Table 2 The level of cytokines in serum in four mice groups

| Groups | $\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$ | | | | | |
|---------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|------------|--------|-----------------------------|
| | First week | | | Third week | | |
| | IL-4 | IL-10 | IFN- γ | IL-4 | IL-10 | IFN- γ |
| Control | 65 ± 46 | 49 ± 11 | 36 ± 14 | 5 ± 4 | 21 ± 5 | 35 ± 10 |
| IL-12 | 75 ± 39 | 47 ± 10 | 34 ± 14 | 4 ± 3 | 20 ± 7 | 36 ± 10 |
| IL-18 | 69 ± 34 | 45 ± 12 | 52 ± 29 | 5 ± 3 | 19 ± 6 | 37 ± 13 |
| IL-12 + IL-18 | 9 ± 7 ²⁾ | 37 ± 5 ¹⁾ | 315 ± 298 ¹⁾ | 2 ± 3 | 16 ± 5 | 2 476 ± 1 349 ³⁾ |

Each group contain 7 mice. Compare with control group 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$

3 讨论

IL-12 与 IL-18 是多功能的细胞因子, 两者结构不同, 但具有生物学活性相似的特性。如刺激 T 细胞增殖、增强 NK 细胞的细胞毒性作用、提高 T 细胞产生 IFN- γ 和 GM-CSF、促进 Th1 细胞反应等, 因此它们在细胞免疫中起重要作用。它们作为生

物反应调变剂(BRM)用于抗感染免疫治疗, 对胞内病原体感染均有控制作用^[1,2]。IL-18 与 IL-12 对 IFN- γ 的诱导呈剂量依赖, 高剂量使用是产生毒副作用的主要原因。Tare 等^[3]报道给正常小鼠使用高剂量 IL-12(1 $\mu\text{g}/\text{d}$), 连用 7 d 后可引起严重血液及肝毒性反应等, 这制约了它在抗感染免疫应用中的效果。因此应探讨一种同时具有抗感染免疫效应和最少毒副作用的细胞因子治疗剂量。

两者作为 IFN- γ 的共刺激因子, 存在不同的受体和信号传递途径。IL-12 通过转录因子 STAT4 和 AP-1 两个位点共同调节 IFN- γ 启动子的活性。IL-18 信号则通过 IL-1 受体相关激酶 (IRAK) 通路传导, 引发 NF- κB 的激活, 以及通过酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 诱导 IFN- γ 产生, 这构成了两者调节 CD⁴ T 细胞 IFN- γ 基因的转录活性时既有差别又有协同作用的分子基础^[4,5]。IL-12 诱导 Th1 细胞反应, IL-18 则促进这种 IL-12 依赖的 Th1 细胞反应, 在功能上具有协同效应。我们在体外实验中联用 IL-12 和 IL-18 刺激小鼠 NK 细胞, 协同诱导产生 IFN- γ , 增强了腹腔渗出细胞杀死新型隐球菌的作用^[6]。迄今为止的报道表明, 两者联用时对 Th 细胞、人体 T 细胞、小鼠 B 细胞、骨髓巨噬细胞均有促进增殖、分化的效果^[7-9]。

本研究选用 BALB/c × DBA/2 小鼠给予外源

性的 IL-12 和 IL-18, 结果在甚少引起毒副作用剂量的 IL-12(0.005 μg) 或 IL-18(2 μg) 单独使用时, 肺泡灌洗液 IFN- γ 产生无明显变化, 当联合应用时, 促进 IFN- γ 产生量明显增多, 且肺组织中菌落数明显减少, 同时减少向中枢神经系统的播散, 动物生存时间明显延长。提示两种细胞因子的合用对感染小鼠起到显著的保护作用。实验小鼠类型表现以 Th2 型反应占优势, 对照组小鼠在感染抗原刺激下, 感染早期 1 周内 IL-4、IL-10 表达量增高, 随后产生水平渐下降, 到感染后期 3 周时回到基线水平, 构成了自身的动态特征。当 IFN- γ 表达量增多时, 混合因子治疗组小鼠的 IL-4、IL-10 水平在小鼠感染早期与对照组、单一因子治疗组相比出现降低, 差异有显著性。这提示 IFN- γ 促进 Th1 细胞反应增强的同时亦抑制了 IL-4、IL-10 调控的 Th2 细胞反应。因此我们认为, IL-12, IL-18 对 Th 细胞的调节, 诱导 Th0 向 Th1 细胞分化, 引发 Th1/Th2 比值上调是免疫应答控制病原体扩散的重要因素。

综上所述, 联合两种细胞因子有效地增强宿主抵御新型隐球菌感染, 与单一细胞因子相比, 剂量明显减少, 并减轻毒副作用。它们有望作为辅助性手段应用于免疫低下宿主合并病原体感染的状态。

(下转第 252 页 to page 252)

达量逐渐升高,提示用这种方法检测外周血 CK-19 mRNA 表达对准确判断鼻咽癌病变分期,发现早期转移病灶方面有一定应用前景。

本研究显示 CK-19 mRNA 表达拷贝数仅与局部侵犯范围有关,而与淋巴结转移状况无关,是否能够进一步说明鼻咽癌病人外周血中癌细胞的数目仅与局部侵犯范围有关,而与淋巴结转移无关,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Su S, Vivier R G, Dickson M C, *et al.* High-throughput RT-PCR analysis of multiple transcripts using a microplate RNA isolation procedure[J]. *Biotechniques*, 1997, 22(6): 1107.
- [2] Slade M J, Smith B M, Sinnott H D, *et al.* Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases on patients with breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(3): 870.
- [3] Yeh K H, Chen Y C, Yeh S H, *et al.* Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 (K19)—

possible clinical significance in advanced gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(2B): 1283.

- [4] Hioki T, Sugimura Y. Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 in patients with renal cell carcinoma[J]. *Hinyokika Kyo*, 1999, 45(8): 577.
- [5] 云径平,李锦添,刘克拉. 鼻咽癌中 P21^{ras} 的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(1): 59.
- [6] Kawamata H, Uchida D, Nakashiro K, *et al.* Haematogenous cytokeratin 20 mRNA as a predictive marker for recurrence in oral cancer patients[J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(3-4): 448.
- [7] Burchill S A, Bradbury M F, Pittman K, *et al.* Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. *Br J Cancer*, 1995, 71(2): 278.
- [8] Martell M, Gomez J, Esteban J I, *et al.* High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 37(2): 327.

(编辑 黄小廷)

(上接第 245 页 from page 245)

参考文献:

- [1] Kawakami K, Qureshi M H, Zhang T T, *et al.* IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production [J]. *J Immunol*, 1997, 159(11): 5528.
- [2] Kobayashi K, T Kasama, J Yamazaki, *et al.* Protection of mice from *Mycobacterium avium* infection by recombinant interleukin-12[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(6): 1369.
- [3] Tare N S, Bowen S, Warrier R R, *et al.* Administration of recombinant interleukin-12 to mice suppresses hematopoiesis in the bone marrow but enhances hematopoiesis in the spleen[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1995, 15(4): 377.
- [4] Kaplan M H, Sun Y L, Hoey T, *et al.* Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice[J]. *Nature*, 1996, 382(6587): 174.
- [5] Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, *et al.* Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)

-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(7): 1129.

- [6] Zhang T T, Kawakami K, Qureshi M H, *et al.* Interleukin(IL)-12 and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of interferon- γ by natural killer cells[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(9): 3596.
- [7] Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y, *et al.* Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- γ production from activated B cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3948.
- [8] Munder M, Mallo M, Eichmann K, *et al.* Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL) 12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation[J]. *J Exp Med*, 1998, 187(12): 2103.
- [9] Micallef M J, Ohtsuki T, Kohno K, *et al.* Interferon- γ -inducing factor enhanced T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production[J]. *Eur J Immunol*, 1996, 26(7): 1647.

(编辑 黄小廷)