

IV型变态反应中白细胞介素6的表达及白藜芦醇的抑制作用

李怡棠*, 钟 森, 邓永江¹, 朱秀媛, 程桂芳

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; ¹ 北京军区总医院病理科, 北京 100700)

摘要 目的: 研究白细胞介素6(IL-6)在2,4-二硝基氟苯(DNFB)诱导的IV型变态反应中的表达及不同剂量的白藜芦醇对DNFB诱导的IV型变态反应中IL-6生成的量效关系, 探讨IL-6在免疫性炎症中的作用及白藜芦醇抗炎作用机理。方法: 采用免疫组织化学的方法。结果: 白藜芦醇皮下给药50 mg·kg⁻¹可明显抑制由DNFB诱导的IV型变态反应中的小鼠耳肿胀, 抑制率为70%。白藜芦醇在皮下给药50, 100 mg·kg⁻¹剂量下, 可抑制DNFB诱导的IV型变态反应中IL-6的生成。结论: DNFB诱导的IV型变态反应确有IL-6的表达, 且白藜芦醇抗炎作用可能与抑制IL-6生成有关。

关键词 白藜芦醇; 抗炎作用; IV型变态反应; 白细胞介素6; 免疫组织化学

白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)是一种有广泛生物活性的细胞因子, 在机体内发挥重要的生理作用。近年的研究表明, IL-6分泌异常与多种疾病, 特别是免疫性炎症的病理生理过程密切相关。但是, 目前国内外尚未见到IV型变态反应中IL-6表达的报道。研究IL-6在IV型变态反应中的表达, 寻找有效的IL-6生成抑制剂是目前抗IV型超敏反应性疾病(如移植排斥、接触性皮炎等)研究领域中的一个新方向^[1~5], 而且对IL-6生成抑制剂作用机理的探索也可加深人们对IL-6在免疫性炎症中的作用的认知。

白藜芦醇为我所林茂教授从植物小叶买麻藤中分离得到的二苯乙烯类化合物^[6]。药理研究表明, 有抗血小板聚集、抗氧化、抑制花生四烯酸及其代谢物生成和肿瘤的化学预防等作用^[7~9]。本文研究白藜芦醇对IV型变态反应中IL-6生成的影响, 探讨其抗炎作用机理, 为寻找更有效的抗炎药提供实验依据。

材 料 与 方 法

动物 ♂ 615小鼠, 16~18 g; ♂ ICR小鼠, 18~22 g, 由中国医学科学院实验动物中心提供。

试剂及仪器 大鼠抗小鼠IL-6单克隆抗体(MP5-20F3)、生物素偶联羊抗大鼠多克隆抗体(经小鼠吸附): 购自美国Pharmin公司; 碱性磷酸

酶链酶亲和素: 购自美国Vector Laboratories, Inc; OCT(八聚体结合蛋白)包埋剂: 购自美国Triangle Biomedical Sciences公司; 二氨基联苯胺(DAB)(DAB 5 mg溶于0.05 mol·L⁻¹ pH 7.6的Tris-HCl缓冲液10 ml, 加0.3% H₂O₂ 0.02 ml); DNFB: 购自英国Aldrich Chemical Co. Ltd.; 其余为国产分析纯试剂, 白藜芦醇为本所植化室林茂教授惠赠。冰冻切片机(OTF型, 英国Bright公司生产)。

DNFB诱导小鼠IV型变态反应(DTH)模型^[10]

选用♂ ICR小鼠, 腹部去毛, 范围约为3 cm × 3 cm, 随机分为对照组、DNFB组和给药组, 每组6只。在DNFB组和给药组动物腹部均匀涂抹1% DNFB溶液(溶剂为丙酮: 麻油=1:1) 50 μl, 在对照组动物腹部均匀涂抹相应溶剂。次日用相同剂量加强1次。从致敏当日起sc给药, 对照组和DNFB组动物相同途径给予相应体积的溶剂, 5 d后用1% DNFB溶液10 μl攻击小鼠右耳, 24和48 h后处死动物, 剪下左右耳廓, 用直径为8 mm的不锈钢打孔器铇下耳片, 分别称重。左右耳片重量之差值表示肿胀程度。

免疫组织化学方法 选用♂ 615小鼠, 随机分为对照组、DNFB组和给药组, 每组3只。造模型方法同上。剪下右耳廓, 用包埋剂包埋, 冰冻切片, 厚5 μm, 冷丙酮固定, 蒸馏水洗后用3% H₂O₂封闭, 再以蒸馏水、0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.2~7.4)洗, 然后用非免疫血清封闭。倾去余液, 直接滴加IL-6抗体(1:250稀释), 4℃过夜。滴加生物素标记的羊抗大鼠抗体(1:200稀释) 37℃, 30 min, 滴加链霉亲

和素(1: 200 稀释) 37 °C, 30 min, DAB 显色。以上操作之间均以 PBS 洗 3 × 3 min。苏木素复染。透明、封片。以上实验设不加 IL-6 抗体的阴性对照。

实验结果

1 白藜芦醇对 DNFB 诱导的小鼠 IV 型变态反应的影响

按照上述方法建立 DNFB 诱导的小鼠 IV 型变态反应模型, 随机分为对照组、DNFB 组和给药组。从致敏当日起, 给药组 sc 50 mg 及 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 白藜芦醇, 连续 5 d。d 5 按上法攻击、处死。取耳片称重, 结果见表 1。由表 1 可见, 白藜芦醇 50 mg · kg⁻¹ 已能非常显著抑制 DNFB 诱导的小鼠 IV 型变态反应, 抑制率达 30% 以上; 100 mg · kg⁻¹ 和 50 mg · kg⁻¹ 给药组比较无显著差异。

2 DNFB 诱导的小鼠 IV 型变态反应中 IL-6 的表达

镜下观察可见, 有 IL-6 表达的细胞呈棕黄色,

且 IL-6 主要表达在软骨细胞细胞膜、组织细胞、皮肤附属腺体细胞及表皮角质细胞的细胞浆。软骨细胞中有自身 IL-6 的表达, 但刺激后较自身表达明显增加。没有加 IL-6 抗体的阴性对照组结果呈阴性, 未见棕黄色, 结果见图 1。由镜下观察还可见 48 h 较 24 h IL-6 表达增加(结果未列出)。提示 DNFB 诱导的 IV 型变态反应有 IL-6 的表达, 且 48 h 表达水平较 24 h 者高。

Tab 1 Inhibitive effect of resveratrol on delayed type hypersensitivity induced with 2, 4-dinitrofluorobenzene(1%, 50 μl) in mice

Group	Dose (sc) / mg · kg ⁻¹	Weight increase of ear/ mg	Inhibition / %
Control		17.27 ± 5.01	
DNFB		31.36 ± 7.27 ^Δ	
Resveratrol	50	21.36 ± 4.09 [*]	31.38
	100	21.35 ± 3.30 [*]	31.92

n = 5, $\bar{x} \pm s$. ^Δ P < 0.05 vs control, ^{*} P < 0.05 vs DNFB group.

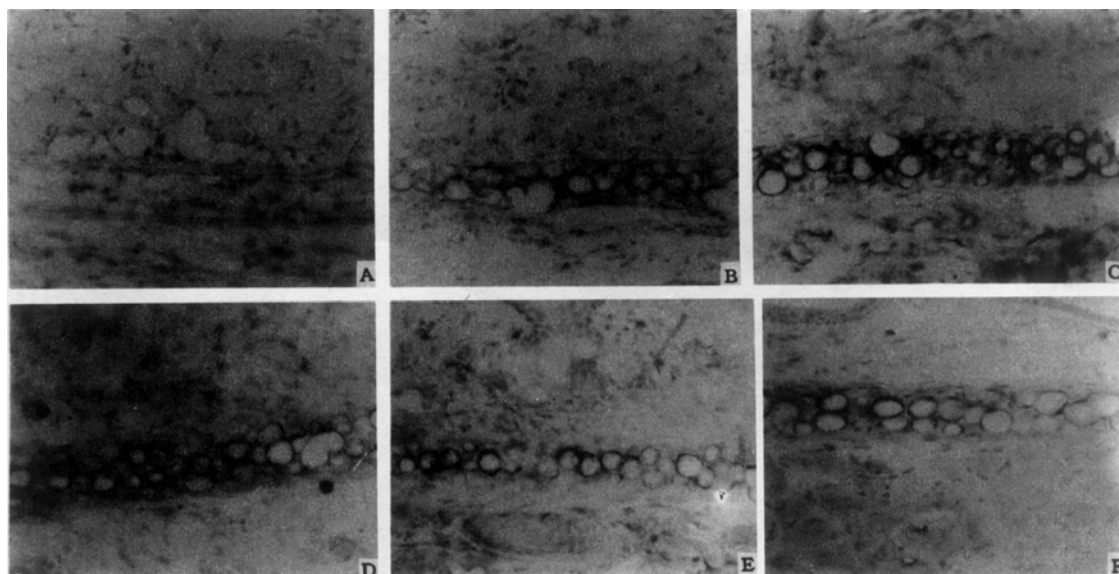


Fig 1 The expression of interleukin-6 in delayed type hypersensitivity induced by 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB)(1%, 50 μl) and inhibitory effects of resveratrol on interleukin-6 biosynthesis. A. Negative control(no anti mouse IL-6 monoclonal antibody) × 200; B. Experimental control(no DNFB) × 200; C. DNFB × 200; D. DNFB+ resveratrol(25 mg · kg⁻¹) × 200; E. DNFB+ resveratrol(50 mg · kg⁻¹) × 200; F. DNFB+ resveratrol(100 mg · kg⁻¹) × 200.

3 白藜芦醇对 DNFB 诱导的 IV 型变态反应中 IL-6 生成的影响

由图 1 可见, 白藜芦醇 sc 25, 50 及 100 mg · kg⁻¹ 实验组染色明显弱于刺激组, 皮下炎性细胞渗出减少, 染色变浅, 且随着剂量增大, 阳性反应

减弱。说明白藜芦醇在此剂量下能显著抑制 DNFB 诱导的 IV 型变态反应中 IL-6 的生成, 并有一定的剂量相关性。

讨 论

本实验观察到在小鼠耳廓的软骨细胞、组织细

胞、皮肤附属腺体细胞及表皮的部分细胞有 IL-6 的表达。IL-6 是具有广泛生物活性的细胞因子,在正常机体内它参与免疫应答、急性期反应、造血调节等重要生理过程。IL-6 的异常表达可导致多种免疫性疾病,如风湿性和类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病、系统性硬化、多发性硬化、早老性痴呆、非特异性结肠炎、糖尿病和免疫性肾炎等。目前国内尚未见有关 IL-6 与 IV 型超敏反应性疾病的报道。我们的实验表明 DNFB 诱导的 IV 型变态反应确有 IL-6 的表达,因此有效的 IL-6 生成抑制剂将可能缓解或消除 IV 型变态反应性炎症。

小叶买麻藤为我国南方民间草药,在民间有将其组方用于治疗急性风湿性关节炎有效的记载。白藜芦醇是从其中分离得到的单体化合物。本组的前期工作证实白藜芦醇对花生四烯酸代谢酶和白三烯受体有较强的抑制作用,并且对小鼠腹腔巨噬细胞 IL-6 分泌有抑制作用。本实验进一步观察了白藜芦醇对 DNFB 诱导的 IV 型变态反应及其中 IL-6 生成的影响,提示白藜芦醇有确切的抗炎作用。白藜芦醇抗炎活性与其 IL-6 生成抑制活性的关系,以及 IL-6 在这种炎症模型中可能的作用机制还需深入研究,为以白藜芦醇为先导化合物寻找新型非甾体抗炎药物提供理论依据。

致谢 本工作得到本所周兰芳教授的指导与协助。

参 考 文 献

- 1 Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 1990, **265**: 621
- 2 Luheshi G, Rothwell N. Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, **77**: 110
- 3 Paquet P, Pierard GE. Interleukin-6 and skin. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, **109**: 308
- 4 Glauser MP. The inflammatory cytokine. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs*, 1996, **52**(Suppl 2): 9
- 5 Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997, **85**: 16
- 6 中国医学科学院药物研究所编著. 中草药现代研究. 第三卷. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社, 1997. 156
- 7 Bertelli AA, Bertelli A, Fregoni M, et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *J Tissue React*, 1995, **17**: 1
- 8 Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, **275**: 218
- 9 冯永红,许实波. 白藜芦醇药理作用研究进展. 国外医药植物药分册, 1996, **11**: 155
- 10 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学. 第二版. 北京:人民卫生出版社, 1991. 719, 1215, 1235, 1226

EXPRESSION OF INTERLEUKIN-6 IN DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY AND INHIBITION EFFECTS OF RESVERATROL ON INTERLEUKIN-6 BIOSYNTHESIS

Li Yitang(Li YT), Zhong Miao(Zhong M), Deng Yongjiang(Deng YJ)¹,
Zhu Xiuyuan(Zhu XY) and Cheng Guifang(Cheng GF)

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050; ¹Department of Pathology, General Hospital of Beijing Command of PLA, Beijing 100700)

ABSTRACT AIM: To study the effects of resveratrol on Interleukin 6 (IL-6) biosynthesis, observe the action of IL-6 in the process of immunoinflammation and investigate the mechanism of the antiinflammation effects of resveratrol. **METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect the levels of IL-6 in delayed type hypersensitivity induced by DNFB(2,4-Dinitrofluorobenzene). **RESULTS:** In the mouse models of inflammation of delayed type hypersensitivity induced by DNFB, resveratrol was shown to significantly(30%) inhibit the inflammatory response at the dose of 50 mg·kg⁻¹(sc), and resveratrol, at the doses of 50 and 100 mg·kg⁻¹(sc) inhibited production of IL-6. **CONCLUSION:** Resveratrol is a potent antiinflammatory agent and there is IL-6 expression in the mouse model of delayed type hypersensitivity induced by DNFB. The mechanism of actions of resveratrol on antiinflammation may be related with the inhibition of IL-6 biosynthesis.

KEY WORDS resveratrol; antiinflammation; IL-6; delayed type hypersensitivity; immunohistochemistry