

芥子气促进真皮成纤维细胞分泌 IL-10的时效和量效研究

田 涇¹, 陆 坚¹, 杨积顺², 胡晋红² (1 第二军医大学研究生管理大队, 上海 200433; 2 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433)

摘要 目的: 探讨芥子气诱导真皮成纤维细胞分泌 IL-10的规律。方法: 采用 ELISA 方法, 检测不同浓度梯度的芥子气调节 IL-10分泌的量效和时效关系。结果: 成纤维细胞自身可分泌一定量的 IL-10, 芥子气作用成纤维细胞后, 显著上调 IL-10的分泌 ($P < 0.05$)。并呈时间依赖性和剂量依赖性。结论: 芥子气治疗银屑病的作用机制可能与促进细胞分泌抗炎因子 IL-10有关。

关键词 芥子气; 真皮成纤维细胞; IL-10; 银屑病

中图分类号: R986 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)03-0177-03

Study on secretion of IL-10 stimulated by sulfur mustard in Human fibroblasts

TIAN Jin¹, LU Jian¹, YANG Ji shun², HU Jin hong² (1. Graduates Management Brigade of SMMU, Shanghai 200433 China; 2. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective To explore the rule of secretion of IL-10 stimulated sulfur mustard in human fibroblasts. **Methods** The ELISA was used to detect the relationship between dose and efficacy, time course and efficacy of which sulfur mustard adjusted the secretion of IL-10. **Results** A portion of IL-10 could be secreted by the human fibroblasts. The secretion of IL-10 could be significantly stimulated after the function of sulfur mustard which depended on the time course and dosage. **Conclusion** The therapeutic mechanism of sulfur mustard to Psoriasis might related with the promotion of the secretion of IL-10.

KEY WORDS Sulfur mustard; oxidized low density lipoprotein; hypoxia inducible factor 1

银屑病是一种 T 细胞引发并维持的自身免疫性疾病^[1], 病人机体免疫系统紊乱, 健康细胞受到攻击, 导致临床上各种形态的皮肤红斑鳞屑性炎症病变。银屑病全层皮肤均存在异常, 真皮成纤维细胞在银屑病发展中扮演重要的调节作用。芥子气 (sulfur mustard, SM) 的化学名为“二氯二乙硫醚”, 对皮肤有较强的渗透性。芥子气霜 (1: 10 000), 作为一种疗效确切的治疗银屑病的常用经典药物, 在我校长海医院曾有多年的应用历史, 临床经验证明: 对银屑病症状及机体炎症状态的改善发挥了重要的作用。但其治疗机制尚不清楚。实验证实: 当芥子气浓度 $< 500 \mu\text{mol/L}$ 时, 对人体表皮细胞是没有毒性的^[2]。本文将研究芥子气对真皮成纤维细胞分泌 IL-10 的影响, 进而为研究芥子气治疗银屑病的机制做贡献。

1 实验材料

单道数字可调微量移液器 (日本 NICHIRYO 公司), 流式细胞计数仪 (FACSCAN) 胶原酶 (CLS-1,

Worthington Biochemical Corp); 分散酶 (AMRESCO); 胰蛋白酶 (tissue culture grade, AMRESCO); 小牛血清 (GIBCO); DMEM (high glucose, GIBCO/BRL); MTT (AMRESCO); 二甲基亚砜 (DMSO, 中国医药集团上海化学试剂公司); 青霉素 (80 万 U, 华北制药股份有限公司); 链霉素 (1 g, 华北制药股份有限公司); Human IL-10 ELISA Kit (Bender Medsystems GmbH) 芥子气 (SM): 第二军医大学防化教研室, 密度 1.27 g/mL , 纯度 96%, 液态。然后加入 10 mL DMEM 细胞培养基, 溶解, 得浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$ 的储备液, 使用时以 DMEM 稀释至规定浓度, 现配现用。

2 实验方法

2.1 细胞培养 取包皮环切术切下的健康人包皮, 用 PBS 洗净血迹, 置 0.05% 醋酸洗必泰灭菌溶液中清洗、消毒 5 min, PBS 冲洗后, 置于 0.2% 的分散酶溶液中, 4°C 消化过夜。次日取出皮块, 轻轻将消化液荡干, 用镊子将表皮与真皮层分开; 将分离出的真皮层剪碎, 放入 0.2% 胶原酶溶液中, 37°C 消化 4~5 h 去除上层胶原酶, 加入 15 mL 含 20% NBS 的 DMEM, 反复吹打成细胞悬液, 过 80 目消毒不锈钢纱网, 再过 200 目消毒尼龙筛网后, $1\ 000 \text{ rpm}$ 离心

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30873128)。

作者简介: 田涇 (1984), 女, 学士。E-mail: 5095688@qq.com。

通讯作者: 胡晋红, 主任药师, 博士生导师

10 min 弃除上清液,接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 后换液 1 次,待细胞生长近融合(70%~80%)后,0.25% 胰蛋白酶溶液消化进行传代,用于后续实验。

2.2 SM 刺激真皮成纤维细胞表达 IL-10 的时效关系 取生长良好的真皮成纤维细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液。分别用含 10% FBS 的 DMEM 培养基和含 10% NBS 的 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^8 个/L,接种于 24 孔细胞培养板,置 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h 待细胞平稳生长 70%~80% 融合后,换以无血清 DMEM 培养基,静息 24 h。用含 SM 终浓度分别为 400、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95、0.98 μmol/L 的无血清培养基培养不同时间(24、48、72 h),以 DMEM 培养基为空白对照,每组平行设 3 复孔。吸取上清液,1 000 rpm 离心 5 min, -20℃ 保存。采用 ELISA 方法检测 IL-10 的含量。

2.3 SP 刺激真皮成纤维细胞表达 IL-10 的量效关系 取生长良好的真皮成纤维细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液。分别用含 10% FBS 的 DMEM 培养基和含 10% NBS 的 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^8 个/L,接种于 24 孔细胞培养板,置 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h 待细胞平稳生长 70%~80% 融合后,换以无血清 DMEM 培养基,静息 24 h。以 DMEM 培养基为空白对照,每孔加入不同浓度的含 SM 的无血清培养基,使 SM 终浓度分别为 400、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95、0.98 μmol/L。每组平行设 3 复孔,继续培养 24 h。吸取上清液,1 000 rpm 离心 5 min, -20

℃ 保存。采用 ELISA 方法检测 IL-10 的含量。

2.4 酶联免疫吸附(ELISA)法检测细胞上清液中 IL-10 的含量 采用酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测细胞上清液中细胞因子的含量。

2.5 数据处理与统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 软件分析, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

3 实验结果

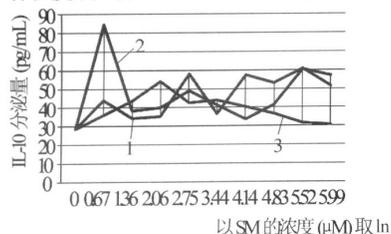
3.1 真皮成纤维细胞的培养与传代 在整个实验中,我们采用的是传代 10~20 代的真皮成纤维细胞。倒置相差显微镜下观察,真皮成纤维细胞呈梭形或长纤维状,胞体狭长,边界清楚,胞浆丰富,细胞核卵圆形,靠近胞质中央。细胞排列规则,成漩涡状或放射状,随细胞增殖而布满培养皿底部,培养 2~3 d 即可融合。

3.2 ELISA 法检测 SM 对真皮成纤维细胞表达 IL-10 的影响 真皮成纤维细胞用上述不同浓度梯度的 SM 刺激 24、48、72 h 后,用 ELISA 试剂盒测定细胞上清液中 IL-10 的浓度,结果显示,真皮成纤维细胞本身可分泌少量的 IL-10, SM 刺激可使 IL-10 的分泌量增多,但随着芥子气的浓度不同,分泌曲线有差异,当 SM 浓度为 400 μM 时,基础分泌量为 28.50 ± 2.67 pg/mL,在刺激 24 h 的时候,发现 IL-10 分泌量明显增多,随着时间的延长 IL-10 分泌量呈持续增强的趋势;但是在 48 h 以后 IL-10 分泌量又逐渐降低,达到 72 h 的时候 IL-10 分泌量基本恢复为稍高于空白对照组,为 30.86 ± 4.56 pg/mL。从 24 h 的曲线和 48 h 的曲线分别观察可见,IL-10 分泌量随着 SM 浓度上升也呈现出波动上升的趋势。结果见表 1 和图 1。

表 1 SM 在不同时间和浓度刺激真皮成纤维细胞表达 IL-10 的量

刺激时间	SM 浓度 C									
	0	1.95	3.91	7.81	15.63	31.25	62.50	125	250	400
24 h 分泌量	28.50	43.87	34.12	35.18	57.81	36.40	57.34	52.74	60.57	51.05
48 h 分泌量	28.50	84.57	38.11	39.90	48.91	41.27	33.51	41.27	60.42	56.88
72 h 分泌量	28.50	35.79	43.71	53.97	42.52	44.02	40.36	36.40	31.39	30.47

不同浓度芥子气作用 FB 细胞分泌 IL-10 的量-时的关系



以 SM 的浓度 (μM) 取 ln

图 1 SM 刺激真皮成纤维细胞表达 IL-10 的时效和量效关系
1-24 h 分泌量; 2-48 h 分泌量; 3-72 h 分泌量

4 实验讨论

芥子气霜,作为一种疗效确切的治疗银屑病的常用经典药物,临床经验证明:对银屑病症状及机体炎性状态的改善发挥了重要的作用。近年来研究发现, Th1 细胞和 Th2 细胞间的免疫反应失衡可能是银屑病发生发展的重要免疫学基础。其主要表现为 Th2 优势和由 Th2 细胞产生的 IL-4、IL-10 和 IL-13 等细胞因子的参与。IL-10 主要由 Th2 细胞分泌,对

(下转第 188 页)

表 2 山萘酚-3-O-芸香糖苷的水油分配系数

pH 值	正辛醇中的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	水中浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>P</i>
1.0	149.37	43.33	3.447
3.6	147.44	43.33	3.403
4.5	145.83	47.67	3.059
6.0	141.66	42.09	3.366
7.4	132.1	55.4	2.38

表 3 山萘酚-3-O-芸香糖苷磷脂复合物的水油分配系数

pH 值	正辛醇中的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	水中浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>P</i>
1.0	179.17	44.42	4.034
3.6	171.43	47.82	3.585
4.5	176.95	46.58	3.799
6.0	150.67	49.45	3.047
7.4	167.22	65.44	2.555

3 讨论

由于磷脂具有两性分子结构,含磷酸根及胆碱基的极性端具有亲水性,两个较长的碳氢链非极性端具有亲脂性,这种独特的理化特性和生理活性在制药工业中有十分重要的意义,精制的天然磷脂可用作制备各种药物制剂的乳化剂和辅料,还可制备脂质体、微乳和磷脂复合物等。

药物磷脂复合物的制备一般是将药物和磷脂溶于一种或几种非质子溶剂中,在适当的温度下反应数小时,再蒸除溶剂即可得到。药物磷脂复合物的理化性质会发生如下改变:脂溶性增强,熔点下降,吸收系数和光谱特征等也会有变化。本文制备山萘酚-3-O-芸香糖苷的磷脂复合物,测定其与山萘酚-3-O-芸香糖苷的溶解度,并对两者的水油分配系数进行了分析。

山萘酚-3-O-芸香糖苷磷脂复合物可显著提高药物的水溶性,这可能与复合物的无定形特征及在水中形成胶团的增溶作用有关^[5],也可能是由于与磷脂极性端结合的山萘酚-3-O-芸香糖苷高度分散

于磷脂分子中,使磷脂脂肪烃链间的有序性降低的缘故^[8];而在正辛醇中溶解性能的改善,一方面是由于其无定形的状态,另一方面则可能是复合物中磷脂的极性端团与山萘酚-3-O-芸香糖苷相互作用而受到一定的掩蔽,使得复合物表现出较强的脂溶性。

从水油分配系数的变化来看,山萘酚-3-O-芸香糖苷磷脂复合物可明显改善山萘酚-3-O-芸香糖苷在水及正辛醇中的溶解性能,且在不同的 pH 水-正辛醇系统中,山萘酚-3-O-芸香糖苷磷脂复合物的水油分配系数与山萘酚-3-O-芸香糖苷相比也有明显差异,此变化的主要原因可能是磷脂复合物改善了山萘酚-3-O-芸香糖苷的两亲性^[7-8]。

参考文献:

- [1] Li RP, Gou ML, Zhang G, *et al*. Neuroprotection of nicotine in permanent focal cerebral ischemia and in neuronal cultures [J]. *Biol Pharm Bull* 2006, 29(9): 1868.
- [2] Li RP, Guo ML, Zhang G, *et al*. Nicotine reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol* 2006, 107(1): 143.
- [3] 杨祥良. 灯盏花素磷脂复合物的制备及其药理作用研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2004.
- [4] Flaig TW, Gustafson DL, Su LJ *et al*. A phase I and pharmacokinetic study of silibinin-pyostemine in prostate cancer patients [J]. *Invest New Drugs*, 2007, 25(2): 139.
- [5] Flaig TW, Agawal R, Su LJ *et al*. A phase I study of silibinin in hormone refractory prostate cancer [J]. *ASCO Meeting Abstracts* 2005, 23(16): 4698.
- [6] 吴平, 曾繁荣, 马厚勋. 葛根素对大鼠脑及脏器组织一氧化氮体系的影响及其作用机制的探讨 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(3): 129.
- [7] 左巨波, 尚京川. 中药磷脂复合物的研究进展 [J]. *中国药房*, 2007, 18(27): 2149.
- [8] 李凤, 高尔. 天然活性成分-磷脂复合物的研究进展 [J]. *中国药房*, 2007, 18(7): 550.

收稿日期: 2009-02-19

(上接第 178 页)

Th1 细胞的细胞因子分泌功能起抑制作用。IL-10 可以作为银屑病转归阶段的重要标志生物因子。银屑病患者存在多种免疫学紊乱^[3], 银屑病的发病与 IL-10 低表达密切相关。本研究探讨了芥子气对真皮成纤维细胞分泌 IL-10 的影响, 结果表明, 真皮成纤维细胞自身可以分泌 IL-10, SM 刺激后可以显著上调 IL-10 的表达 ($P < 0.05$), 并呈一定的规律性。IL-10 的上调对银屑病的病情转归具有重要的作用, 这很可能也是芥子气霜治疗银屑病的又一重要的分

子生物学依据。

参考文献:

- [1] Ibrahim Gakdari MD, Mohamed Omar Sharif MD, *et al*. Psoriasis a fresh look [J]. *Clinics in Dermatology*, 2005, 23: 491.
- [2] Gentilhomme E, Reano A, Pradel D, *et al*. In vitro dermal irritation by bis(chloroethyl) sulfide. Effect on secondary epidermization [J]. *Cell Biol Toxicol* 1998, 14: 1.
- [3] 管海宏, 刘玉峰, 沈柱. 天然免疫紊乱与银屑病 [J]. *皮肤病学分册*, 2005, 31: 285.

收稿日期: 2009-03-18