

白三烯类化合物(Leukotrienes)对小鼠腹腔巨噬细胞生成 白细胞介素 6 的影响

钟 淼 程桂芳 王文杰 周龙恩 朱秀媛 张均田

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 探讨了白三烯 B₄(LTB₄)、白三烯 C₄(LTC₄)及白三烯 D₄(LTD₄)对小鼠腹腔巨噬细胞分泌白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)的影响。用 IL-6 依赖细胞株 B9 的 MTT 方法测定样品中 IL-6 的含量。结果显示,LTB₄ 能剂量依赖性地增加巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量。LTC₄ 及 LTD₄ 促进巨噬细胞培养上清液中 IL-6 含量的最适浓度分别为: 6.9×10^{-8} 和 $8.05 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果提示: LTB₄ 与 LTC₄ 及 LTD₄ 在某些生物学功能方面有一致性。与 LTC₄ 及 LTD₄ 相比,LTB₄ 促进巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量的最适浓度则要大 1~2 个数量级,提示在炎症反应中,白三烯与 IL-6 的相关性较强。

关键词 白三烯; 白细胞介素 6; B9 细胞株

近年的研究表明,IL-6 参与多种炎症性疾病的病理生理过程,在炎症反应中占有重要地位^[1~7]。LTB₄, LTC₄ 及 LTD₄ 为细胞膜脂质成分花生四烯酸(AA)经 5-脂氧酶途径所形成的一系列代谢产物,是一类有广泛生物活性的重要炎症介质^[8],研究它们之间的相互作用对了解炎症的病理机制有极为重要的意义。至目前为止,LTB₄ 与 LTC₄ 对效应细胞分泌 IL-6 的研究只有数篇文献报道^[8,9],而 LTD₄ 的研究未见文献报道。因此本文旨在探讨 LTB₄, LTC₄ 及 LTD₄ 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-6 的影响。

材 料 与 方 法

动物 C₅₇BL/6 小鼠,♀,6~8 周龄,由中国医学科学院实验动物养殖场提供。

药品及仪器 白三烯 B₄(LTB₄)、白三烯 C₄(LTC₄)、白三烯 D₄(LTD₄)及四氮唑蓝(MTT)为 Sigma 产品。新生牛血清(NBS)及

RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品。十二烷基磺酸钠(SDS)为 Serva 产品。Model 450 酶标仪为 Bio-Rad 产品。二甲基甲酰胺(DMF)和巯基乙醇酸钠为国产分析纯试剂。重组人白细胞介素 6(rhIL-6)为军事医学科学院产品。

小鼠腹腔巨噬细胞的制备及培养 按文献方法稍加修改^[10]: 小鼠 ip 3% 巯基乙醇酸钠每只 0.6~0.8 ml,3 d 后断头处死动物,无菌条件下,用磷酸缓冲液(PBS) ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 137.0, KCl 2.7, Na₂HPO₄·H₂O 9.8, KH₂PO₄ 1.5, pH 7.2)洗出腹腔巨噬细胞,用 PBS 洗涤细胞两次,细胞计数后,加入含 10% 新生牛血清(NBS)的 RPMI-1640 培养基,调整细胞浓度为 $1.2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,加入 24 孔培养板内,每孔 1 ml,在二氧化碳培养箱内 37℃ 培养 2 h 后,取出,吸弃上清液,用 PBS 洗板 2 次,加入含 10% NBS 及不同浓度 LTs 的 RPMI-1640 培养基,培养 24 h,收集上清液,用 PBS 透析 12 h,再用 RPMI-1640 培养基平衡 12 h。所有样品过滤除菌后于 -20℃ 保存备用。

B9 细胞培养及对不同浓度 IL-6 的增殖反应 B9 细胞用含 10% NBS 和 $100 \text{ u} \cdot \text{ml}^{-1}$

rhIL-6 的 RPMI-1640 培养基培养, 每 3 d 传代一次, 取生长良好的 B9 细胞, 按文献所述 MTT 方法^[11]操作: 在无菌条件下, 向 96 孔培养板内加入不同浓度样品, 每份样品 3 个复孔, 每孔 50 μl 。将细胞用 PBS 洗涤 2 次, 细胞计数后用含 20% NBS 的 RPMI-1640 培养基将细胞浓度调为 $2.5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, 加入 96 孔培养板, 每孔 50 μl , 48 h 后每孔加入浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 MTT 20 μl , 培养 4 h 后, 加入 100 μl 含 10% SDS, 50% DMF 的溶液 (pH 3~4.5), 培养箱内放置 12 h, 于 570 nm 处比色观察 B9 细胞对不同浓度 IL-6 的增殖反应。

实验结果

1 LTB₄ 对小鼠巨噬细胞生成 IL-6 的影响

本实验观察了所有样品在 1/30, 1/60, 1/120 和 1/240 4 个稀释度时对 B9 细胞增殖的

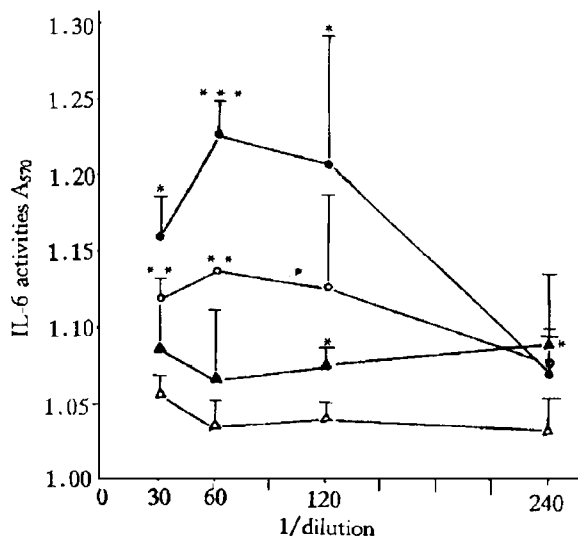


Fig 1 IL-6 activities in four dilutions of the supernatants of cultured mouse peritoneal macrophages stimulated by LTB₄. \triangle — \triangle control; \blacktriangle — \blacktriangle $1.45 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; \circ — \circ $1.45 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; \bullet — \bullet $1.45 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. IL-6 activity was determined with the proliferation of B9 cells. The response was quantified by reading the absorbance at 570 nm after the addition of MTT. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Similar results were obtained in three independent assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

影响。结果如图 1 所示, LTB₄ 在 1.49×10^{-8} , 1.49×10^{-7} 及 $1.49 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度下, 能剂量依赖性地增加巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量。在适当的稀释度, 显示出良好的量效关系。

2 LTC₄ 对小鼠巨噬细胞生成 IL-6 的影响

实验结果如图 2 所示, LTC₄ 能显著增高巨噬细胞培养上清液 IL-6 的水平, 在适当的稀释度, 呈现较好的量效关系。LTC₄ $6.9 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组随稀释度增加, 其 IL-6 活性增高, 从稀释度 1/120 始, 曲线趋向平缓。因此, 稀释度 1/120 与 1/240 为该剂量组 IL-6 活性测定的较适稀释度。在这两种稀释度的条件下, 与 LTC₄ $6.9 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, LTC₄ $6.9 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组的 IL-6 活性较低 (重复实验结果一致)。因此, LTC₄ 促进巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量的最适浓度为 $6.9 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

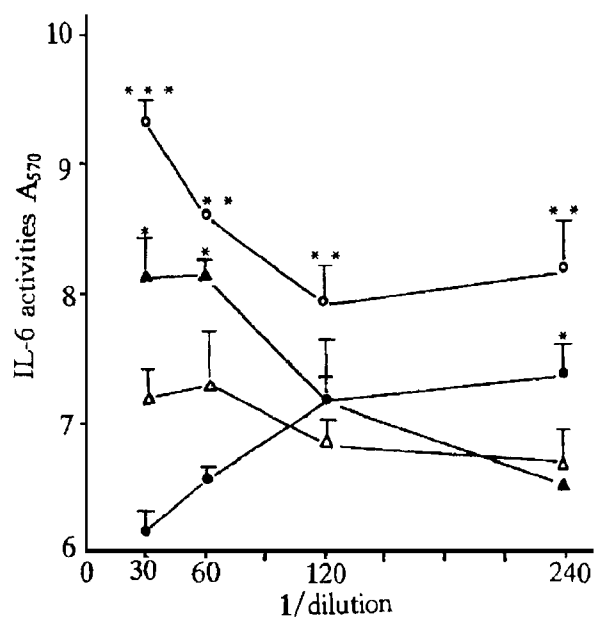


Fig 2 IL-6 activities in four dilutions of the supernatants of cultured mouse peritoneal macrophages stimulated by LTC₄. \triangle — \triangle control; \blacktriangle — \blacktriangle $6.9 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; \circ — \circ $6.9 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; \bullet — \bullet $6.9 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. IL-6 activity was determined with the proliferation of B9 cells. The response was quantified by reading the absorbance at 570 nm after the addition of MTT. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Similar results were obtained in three independent assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 LTD₄ 对小鼠巨噬细胞生成 IL-6 的影响

从图 3 可以发现, LTD₄ 刺激巨噬细胞生成 IL-6 的作用确切并具量效关系。LTD₄ 促进巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量的最适浓度为 $8.05 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

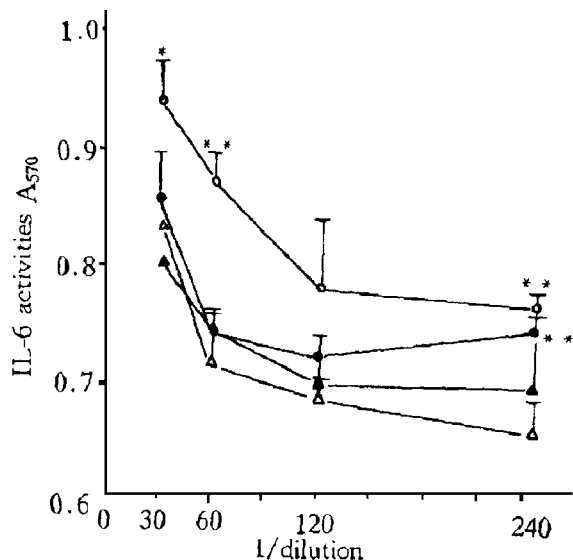


Fig 3 IL-6 activities in four dilutions of the supernatants of cultured mouse peritoneal macrophages stimulated by LTD₄. △-△ control; ▲-▲ $8.05 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ○-○ $8.05 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ●-● $8.05 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. IL-6 activity was determined with the proliferation of B9 cells. The response was quantified by reading the absorbance at 570 nm after the addition of MTT. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Similar results were obtained in three independent assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

讨 论

采用 B9 细胞株检测 IL-6 不仅具有较高的灵敏度而且有较好的专一性^[11], 因此, B9 细胞增殖法的测定结果能够反映样品中 IL-6 的含量。同时检测样品的 4 个稀释度时 IL-6 水平, 结果显示, LTB₄, LTC₄ 及 LTD₄ 在连续的几个稀释度中均有量效关系, 说明它们均能促进巨噬细胞 IL-6 的生成和释放。

LTC₄ 与 LTD₄ 属于肽白三烯, 在炎症反应中, 它们主要介导平滑肌收缩, 具有增加血管通透性, 增加粘膜分泌等作用, LTB₄ 则具有较强的中性粒细胞趋化、聚集和使之脱颗粒及溶酶

体酶释放等作用^[8], 因此, LTB₄ 与肽白三烯在炎症中的生物学作用是不一致的。本实验的结果显示, LTB₄ 与 LTC₄ 及 LTD₄ 均能促进小鼠腹腔巨噬细胞 IL-6 的生成和释放, 表明它们在某些生物学功能方面又具有一致性。LTC₄ 及 LTD₄ 促进巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量的最适浓度相当, 分别为 6.9×10^{-8} 和 $8.05 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。LTB₄ 促进巨噬细胞培养上清液中 IL-6 的含量的最适浓度则要大 1~2 个数量级, 提示在炎症反应中, 肽白三烯与 IL-6 存在较强的相关性。LTB₄ 与 LTC₄ 促进效应细胞 IL-6 的生成和释放仅见少量文献报道^[8,9], LTD₄ 在该方面的作用研究则未见文献报道。

致谢 上海第二军医大学长征医院孔宪涛教授和候健博士在 IL-6 检测方面所给予的大力帮助; 军事医学科学院三所的凌士淦教授和八所的陈添弥教授及边疆老师赠送 rhIL-6。

参 考 文 献

- 1 Hamzaoui K, Hamzaoui A, Kahan A, *et al.* Interleukin-6 in peripheral blood and inflammatory sites in Behcet's disease. *Mediators Inflammation*, 1992, **1**:281
- 2 Akira I, Yoshifumi I, Yasuyuki S, *et al.* Effects of interleukin-6 on the metabolism of connective tissue components in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 1992, **35**:1197
- 3 Kotloff RM, Jaxqueline L, Elias JA, *et al.* Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1990, **3**:497
- 4 Linardopoulos S, Corrigan V, Panayi GS, *et al.* Activation of HLA-DR and interleukin-6 gene transcription in resting T cells via the CD2 molecule: relevance to chronic immune-mediated inflammation. *Scand J Immunol*, 1992, **36**:469
- 5 Shacter E, Arzadon GK, Williams J, *et al.* Elevation of interleukin-6 in respond to a chronic inflammatory stimulus in mice: inhibition by indomethacin. *Blood*, 1992, **80**:194
- 6 Takahisa S, Osamn F, Mnkoto U, *et al.* Enhanced expression of interleukin-6 in rat and murine arthritis models. *Int J Immunopharmacol*, 1993, **15**:469

- 7 Pia TP, Hartmut P, Reiner MP, *et al.* Interleukin-6(IL-6) in adjuvant arthritis of rats and its pharmacological modulation. *Int J Immunopharmacol*, 1992, **14**:565
- 8 Henderson WR, Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*, 1994, **121**:684
- 9 Jana S, Marek RP. Interleukin-6 production by mononuclear phagocytes can be stimulated by leukotrienes. *Arch Immunol Ther Exp*, 1992, **40**: 17
- 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, 1991:1235
- 11 Pedersen MR, Jensen S, Christensen JD, *et al.* Lipopolysaccharide in concentration above 40 ng•ml⁻¹ stimulates proliferation of the IL-6-dependent B9 cell line. *J Immunol Methods*, 1995, **180**:159

EFFECTS OF LEUKOTRIENES ON PRODUCTION OF INTERLEUKIN 6 FROM MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES

Zhong Miao(Zhong M), Cheng Guifang(Cheng GF), Wang Wenjie(Wang WJ), Zhou Longen(Zhou LE), Zhu Xiuyuan(Zhu XY) and Zhang Juntian(Zhang JT)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT In the present study, effects of leukotrienes on IL-6 production by mouse resident peritoneal macrophages were explored with a bioassay method involving IL-6 dependent murine hybridoma B9 cell line. The results showed that LTB₄, LTC₄ and LTD₄ can enhance the production of IL-6 from cultured peritoneal macrophages of mice. The optimal concentrations for LTB₄, LTC₄ and LTD₄ were found to be 1.45×10^{-6} , 6.9×10^{-8} and 8.05×10^{-8} mol•L⁻¹, respectively. The results suggest that peptide leukotrienes might play important role on IL-6 production in the local milieu of inflammation.

KEY WORDS Leukotrienes; Interleukin 6; B9 cell line