

## 白细胞介素-10 对小鼠中性粒细胞吞噬和杀菌活性的影响

赵修春<sup>1</sup>, 徐凤珍<sup>2</sup>, 李柏青<sup>3</sup>

**[摘要]**目的: 探讨白细胞介素-10(IL-10)对中性粒细胞(PMN)吞噬和杀菌活性的影响,以了解IL-10对非特异性免疫的作用机制。方法: 小鼠麻醉后从眼球取血,与不同浓度IL-10在37℃水浴中作用2h,然后加FITC标记大肠埃希菌,置37℃水浴中15min,溶血剂去除红细胞,流式细胞仪检测各IL-10浓度组PMN的吞噬率。小鼠麻醉后局部消毒,摘眼球,无菌方法取血。与不同浓度IL-10在37℃下作用2h,然后加大肠埃希菌置37℃水浴1h,同时设PMN杀菌0min组、无IL-10的PMN杀菌对照组,各组样品作适当稀释后接种琼脂平板,最后观察各组菌落数,与对照组比较,计算IL-10对杀菌力影响。结果: PMN的吞噬功能在IL-10浓度为1ng/ml组减低(15.87±14.25)%,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。而PMN的杀菌功能在IL-10浓度为0.1ng/ml组降低(39.59±37.36)%,在IL-10浓度为1ng/ml组则降低(42.28±22.24)%,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: IL-10对PMN的吞噬功能有轻度的抑制作用,对PMN的杀菌功能有明显的抑制作用,对非特异性免疫亦有抑制作用。

**[关键词]** 白细胞介素-10; 中性粒细胞; 吞噬; 杀菌; 大鼠

**[中国图书资料分类法分类号]** R 392.12; R 392.3 **[文献标识码]** A

### Effects of interleukin-10 on phagocytosis and bactericidal activity of neutrophils in mouse model

ZHAO Xiu-chun<sup>1</sup>, XU Feng-zhen<sup>2</sup>, LI Bai-qing<sup>3</sup>

(1. Guangzhou Medical College School of Nursing, Guangzhou Guangdong 510180;

2. Department of Respiratory Disease, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

3. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of interleukin-10(IL-10) on the neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in mouse model. **Methods:** Whole blood of mice was pretreated with IL-10 at different concentrations, ranged from 1 pg to 100 ng/ml for 2 hours at 37℃, and then incubated with FITC labeled *E. coli* at 37℃ for 15 minutes. After lysing red blood cells the neutrophil phagocytosis was measured by flow cytometry. In the bactericidal assay, whole blood of mice pretreated with IL-10(0.1 and 1 ng/ml) for 2 hours at 37℃ was incubated with *E. coli* in water bath at 37℃ for 1 hour, and then cultured on agar plates. The number of colonies was counted and the inhibitory effect of IL-10 on killing activity was calculated. **Results:** The reduced rates of phagocytosis was (15.87±14.25)% only in the group that pretreated with IL-10 at 1 ng/ml, but with no significance( $P>0.05$ ). The relative rates of bactericidal activity of neutrophil in the groups of IL-10 at 0.1 ng/ml and 1 ng/ml were significantly reduced(39.59±37.36)% and (42.28±22.24)%( $P<0.05$ ), respectively. **Conclusions:** IL-10 slightly decreases the phagocytosis of the neutrophils, but potently suppresses the bactericidal activity of neutrophils. IL-10 is capable of down-regulating non-specific immunity.

**[Key words]** interleukin-10; neutrophils; phagocytosis; bactericidal activity; mice

细胞因子是细胞对刺激应答时分泌的小分子物质,它具有在细胞间发送信号、诱导细胞的生长、分化、趋化和活化作用,增强细胞毒活性和(或)调节免疫等功能。细胞因子的研究有助于人们从分子水平上阐明免疫应答及其调控机制,认识某些疾病发生、发展的病理机制。近年来,应用细胞因子及其拮抗剂在治疗肿瘤、感染、移植排斥、自身免疫性和过

敏性疾病方面取得良好疗效<sup>[1-2]</sup>,使得细胞因子的研究既有理论意义又有实际应用价值。在众多的细胞因子中,1989年发现的白细胞介素-10(IL-10)是具有独特生物学活性的细胞因子<sup>[1]</sup>。目前比较公认观点的是它对辅助性T细胞-1型(Th1)细胞介导的细胞免疫具有抑制作用<sup>[2]</sup>。中性粒细胞或称多形核细胞(PMN)是重要的非特异免疫细胞,是机体抵御外来微生物侵袭的第一道防线。研究<sup>[3-4]</sup>资料表明,PMN也影响着Th1/Th2的反应状态,其作用是促进Th1反应且与PMN内所含的IL-12有关。另一方面,Th1型相关细胞因子也能增强PMN的吞噬活性<sup>[5]</sup>,Th1型和Th2型细胞因子分别可以增强或降低人PMN对结核杆菌的吞噬功能<sup>[5-6]</sup>。本实

**[收稿日期]** 2011-04-25

**[作者单位]** 1. 广州医学院 护理学院, 广东 广州 510180; 2. 蚌埠医学院第一附属医院 呼吸内科, 安徽 蚌埠 233004; 3. 蚌埠医学院 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030

**[作者简介]** 赵修春(1971-),女,硕士,讲师。

验观察 IL-10 对 PMN 吞噬和杀伤大肠埃希菌活性的影响,进而探讨 IL-10 对非特异免疫的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 选用昆明种小鼠,雌雄不限,体重 18 ~ 22 g,置于 20 ~ 25 °C 的空调房间饲养,给予复合饲料,饮水不限。

1.2 试剂 重组小鼠 IL-10 购自 R&D 公司; FITC 购自 Merck 公司; 二甲基亚砜购自 Sigma 公司; 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  蚌埠医学院免疫学教研室中心传代保存。

1.3 FITC 标记大肠埃希菌的制备 取大肠埃希菌少许置入 LB 培养液中,37 °C 温箱中培养 12 ~ 14 h,分光光度计测细菌浓度。取部分细菌用 PBS 洗涤 2 次。用 pH 为 9.0 ~ 9.5 的碳酸盐缓冲液配成浓度为 0.5  $\times 10^9$  /ml,加入用二甲基亚砜配成的 FITC 溶液(10  $\mu$ g/ml),使 FITC 在菌液中的终浓度为 5  $\mu$ g/ml。将标记细菌悬液置于 37 °C 孵育 1 ~ 1.5 h,离心,弃上清, PBS 洗涤 2 次。用 1% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 2 次后配成浓度为 0.7  $\times 10^9$  /ml 备用。

1.4 小鼠外周血无菌采取方法 昆明小鼠用戊巴比妥钠 0.2 ml (3 g/100 ml) 腹腔注射,小鼠麻醉后提起尾巴,使之倒悬。无菌操作台下用 75% 乙醇棉球擦拭眼睛及颜面部作局部消毒,待乙醇干燥后用无菌镊子夹住眼球摘除,然后取血,用无菌试管收集。

1.5 流式细胞术检测小鼠 PMN 吞噬功能方法 从昆明小鼠取血,肝素抗凝(20 u/ml)。将采取的抗凝全血放入 EP 管,每管 90  $\mu$ l。加入相应浓度的 IL-10 溶液 10  $\mu$ l,使其在血液中的终浓度为 1、10、100 pg/ml 及 1、10、100 ng/ml,留 2 管未加 IL-10 稀释液的作对照。以上处理的各试管于 37 °C 水浴温箱中孵育 2 h。取出各试管后置入冰中 10 min。各管加入浓度为 0.7  $\times 10^9$  /ml 的 FITC 标记大肠埃希菌 20  $\mu$ l。留取未加 IL-10 而加细菌的一管作 0 °C 对照。将 0 °C 对照管置于冰上,其余各管再置于入 37 °C 水温箱孵育 15 min。取出各管,置入冰中 10 min,再把各管内的液体分别移到普通试管内,加入冰冷的 PBS 2 ml 洗涤 1 次,加入氯化铵溶血剂 2 ml,室温下放置 10 min,离心,弃上清,用冰冷 PBS 洗涤 1 次,加入 1% PFA 固定 30 min 后,在流式细胞仪 FACSCalibur(美国 BD 公司产品)上检测。IL-10 对 PMN 吞噬率的影响的计算方法:不同浓度 IL-10 对 PMN 吞噬的抑制率(%) = [(不同浓度 IL-10 PMN 吞噬率 - 37 °C 15 min 吞噬率) / 37 °C 15 min 吞噬率]  $\times 100\%$ 。

1.6 PMN 杀菌功能检测方法 昆明小鼠麻醉后,

无菌采取外周血后,放入无菌 EP 管,每管 90  $\mu$ l。各管加入 IL-10 溶液 10  $\mu$ l,使 IL-10 在血液中的浓度分别为 100 pg/ml、1 ng/ml。置于 37 °C 水浴箱中 2 h,加入 1  $\times 10^7$  /ml 的大肠埃希菌液 90  $\mu$ l,同时再次加入 10  $\mu$ l 相应浓度的 IL-10 稀释液或 IL-10 溶液 10  $\mu$ l,使各样本中 IL-10 的浓度不变。留取 1 份未加 IL-10 的标本,放入冰中,以防 PMN 对细菌吞噬及杀灭,其余放入 37 °C 水浴箱中 1 h,然后取出各管,无菌三蒸水稀释 10<sup>2</sup> 倍,然后取稀释后液体 10  $\mu$ l,加 90  $\mu$ l 无菌三蒸水,接种于琼脂培养皿上,L 型棒涂匀,37 °C 温箱培养 24 h,计算菌落数。水浴箱中取出的样本在没有稀释处理前需置入冰中,以防 PMN 继续作用。IL-10 对 PMN 的杀菌作用计算方法:PMN 1 h 正常杀菌数 = PMN 作用 0 min 的琼脂平板的细菌数 - PMN 作用 1 h 的琼脂平板的细菌数;不同 IL-10 浓度下 PMN 1 h 杀菌数 = PMN 作用 0 min 的琼脂平板的细菌数 - 不同 IL-10 浓度下 PMN 作用 1 h 的琼脂平板的细菌数;不同 IL-10 浓度对 PMN 杀菌作用的影响率(%) = [(不同 IL-10 浓度下 PMN 1 h 杀菌数 - PMN 1 h 正常杀菌数) / PMN 1 h 正常杀菌数]  $\times 100\%$ 。IL-10 对 PMN 功能的影响均为同一只小鼠血样互相对比,不同小鼠的血样的杀菌数不具有可比性。

1.7 统计学方法 采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 IL-10 对 PMN 吞噬功能的影响 不同浓度 IL-10 预处理的各组 PMN 吞噬率的变化率中,IL-10 浓度为 1 g/ml 时为(-15.87  $\pm$  14.25),降低最多,但差异无统计学意义(*P* > 0.05)(见表 1)。

2.2 IL-10 对 PMN 杀菌功能的影响 在 IL-10 浓度为 0.1 ng/ml 时杀菌活性减少(39.59  $\pm$  37.36)%,在 IL-10 浓度为 1 ng/ml 时杀菌活性减少(42.28  $\pm$  22.24)%,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)(见表 2)。

表 1 各浓度 IL-10 对 PMN 吞噬率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

IL-10 (ng/ml)	<i>n</i>	吞噬率 (%)	吞噬变化率 (%) ( $\bar{d} \pm s_d$ )	<i>t</i>	<i>P</i>
0	5	43.04 $\pm$ 24.54	—	—	—
0.001	4	39.83 $\pm$ 26.22	0.53 $\pm$ 10.53	0.10	>0.05
0.01	5	44.22 $\pm$ 21.33	8.55 $\pm$ 20.61	0.93	>0.05
0.1	5	42.68 $\pm$ 22.65	3.34 $\pm$ 13.37	0.57	>0.05
1	4	37.85 $\pm$ 28.57	-15.87 $\pm$ 14.25	2.23	>0.05
10	5	39.73 $\pm$ 21.00	-3.97 $\pm$ 16.18	0.55	>0.05
100	5	44.30 $\pm$ 23.19	6.89 $\pm$ 14.43	1.07	>0.05

表2 IL-10 对小鼠 PMN 杀菌活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

IL-10 (ng/ml)	n	菌落数	杀菌抑制率(%) ( $\bar{d} \pm s_d$ )	t	P
0	5	128.00 ± 41.40	—	—	—
0.1	5	84.00 ± 68.04	-39.59 ± 37.36	2.37	<0.05
1	4	86.00 ± 64.70	-42.28 ± 22.24	3.80	<0.05

### 3 讨论

实验结果证明,IL-10 对 PMN 的杀菌功能有抑制作用,而对其吞噬功能抑制作用较弱。我们可以这样认为,PMN 对细菌的吞噬是一个非常快的过程。我们以前的实验<sup>[7]</sup>结果表明,PMN 的吞噬率在 10 min 已经接近 80%,对于这样一个迅速的过程,IL-10 的抑制作用不很明显也许是合理的理解。相比而言,PMN 的杀菌过程则是一个相对缓慢的过程,本研究的实验方案中,PMN 吞噬对大肠埃希菌后置于 37 °C 共孵育时间为 1 h。IL-10 预处理小鼠 PMN(2 h) 对其杀菌活性的抑制作用很明显。从本研究结果来看,IL-10 不仅抑制细胞免疫,同时也对非特异性免疫也有抑制作用,其可能的机制之一就是抑制 PMN 的杀菌活性,而不是抑制其吞噬活性。

有报道<sup>[8]</sup>,在医院感染发生前有 IL-10 水平的升高且伴有 PMN 功能的损伤。医院感染患者的免疫力一般说来比较低下,医院感染的发生或许就是高水平 IL-10 导致的免疫力低下;也有报道<sup>[9]</sup>上腹部手术应激也导致患者术后早期就出现了血清 IL-10 水平的增高和 PMN 吞噬功能的受损。应激的激素主要是糖皮质激素,并且有研究<sup>[10]</sup>表明,糖皮质激素可以使患者体内 IL-10 水平升高,是糖皮质激素通过 IL-10 发挥作用,还是其独立发挥作用,有待进一步研究。但最近也有研究<sup>[11]</sup>发现,IL-10 对新生儿患者外周血中的 PMN 吞噬功能和杀菌功能都没有明显影响,但两者对脂多糖诱导的促炎因子释放的抑制作用基本相似。这和本研究有不太一致的地方,可能与 PMN 的功能状态在成人和新生儿不同有关<sup>[12-13]</sup>。

以往认为<sup>[3,14]</sup>对病毒及细胞内细菌感染的免疫,PMN 发挥的作用非常少。但是研究发现,细胞内细菌军团菌和弓形虫感染时,病灶部位的 PMN 含有预先储存的 IL-12。而 IL-12 促进  $\gamma$ -干扰素分泌,促进 Th1 细胞活化的作用已经得到了公认。因此,PMN 在炎症的早期释放的 IL-12 促进机体的细胞免疫。因此,机体的非特异性免疫状态对特异性免疫也有影响<sup>[15]</sup>。

IL-10 对机体 Th1 反应的抑制是直接抑制还是通过抑制 PMN 的作用从而间接抑制 Th1 反应,尚待研究。越是高等的动物,其 PMN 在白细胞中所占的比例越高。这说明 PMN 在动物进化过程中作用应该是越来越强,而不是越来越弱。PMN 对特异性免疫的影响尚需继续深入研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection[J]. *J Immunol* 2008, 180(9): 5771-5777.
- [2] Jankovic D, Kugler DG, Sher A. IL-10 production by CD4<sup>+</sup> effector T cells: a mechanism for self-regulation[J]. *Mucosal Immunol* 2010, 3(3): 239-246.
- [3] Tateda K, Moore TA, Deng JC, et al. Early recruitment of neutrophils determines subsequent Th1/Th2 host responses in a murine model of legionella pneumophila[J]. *J Immunol* 2001, 166(5): 3355-3361.
- [4] Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection[J]. *J Immunol* 2000, 165(8): 4515-4521.
- [5] 姜丽娜, 姚春艳, 金齐力, 等. Th1 型相关细胞因子对人中性粒细胞吞噬功能的影响[J]. *蚌埠医学院学报* 2008, 33(3): 256-259.
- [6] 姜丽娜, 李柏青, 姚春艳, 等. Th1 型和 Th2 型细胞因子对人中性粒细胞吞噬结核杆菌活性的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志* 2010, 30(6): 576-580.
- [7] 赵修春, 姚春艳, 李柏青, 等. 流式细胞术检测小鼠中性粒细胞吞噬功能的方法学探讨[J]. *蚌埠医学院学报* 2004, 29(5): 388-390.
- [8] Stephan F, Yang K, Tankovic J, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients[J]. *Crit Care Med* 2002, 30(2): 315-322.
- [9] Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, et al. Effects of epidural anaesthesia on surgical stress-induced immunosuppression during upper abdominal surgery[J]. *Br J Anaesth* 2007, 98(2): 196-203.
- [10] Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance[J]. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1024(1): 138-146.
- [11] Citarella BV, Miskolci V, Vancurova I, et al. Interleukin-10 versus dexamethasone: effects on polymorphonuclear leukocyte functions of the newborn[J]. *Pediatr Res* 2009, 65(4): 425-429.
- [12] Lawrence DW, King SB, Frazier WA, et al. Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for phagocytosis by monocyte-derived macrophages[J]. *Early Hum Dev* 2009, 85(10): 659-663.
- [13] Murciano C, Yáñez A, O'Connor JE, et al. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, 53(2): 214-221.
- [14] Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection[J]. *J Immunol* 2000, 165(8): 4515-4521.
- [15] Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes[J]. *Blood* 2008, 112(4): 1461-1471. (本文编辑 姚仁斌)