

## 罗红霉素对小鼠接触性皮炎及 T 细胞功能的影响

刘康, 徐强<sup>1</sup>

中国药科大学中药药理教研室, 南京 210038, 江苏;

<sup>1</sup>南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093, 江苏

**摘要** 目的: 研究罗红霉素对接触性皮炎及 T 细胞功能的影响。方法: 使用 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导小鼠接触性皮炎, 以双向混合淋巴细胞反应及刀豆蛋白诱导脾 T 细胞增殖, MTT 法检测活细胞数量。采用 RT-PCR 方法检测细胞因子 mRNA 表达。结果: 20 mg·kg<sup>-1</sup> 罗红霉素效应相灌胃给药明显抑制 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导的小鼠接触性皮炎 ( $P < 0.01$ )。25 μg·ml<sup>-1</sup> 罗红霉素显著降低双向混合淋巴细胞反应 ( $P < 0.05$ ), 5, 25 μg·ml<sup>-1</sup> 罗红霉素明显抑制刀豆蛋白诱导的脾细胞存活、增殖 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) 及 T-bet、IL-2 及 IFN-γ 的 mRNA 表达。结论: 罗红霉素能抑制 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导的接触性皮炎, 可能与其抑制 T 淋巴细胞存活、活化及增殖有关。

**关键词** 罗红霉素; 接触性皮炎; 混合淋巴细胞反应; T 淋巴细胞增殖; mRNA 表达

中图分类号: R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2005)04-0382-05

大环内酯类抗生素除抗菌作用外, 尚具有抗炎及免疫调节功能<sup>[1-4]</sup>。研究表明此类药物急性给药可减轻角叉菜胶等致炎剂引起的足肿胀<sup>[5]</sup>, 低剂量长期应用能改善弥漫性细支气管炎 (DPB)、哮喘症状<sup>[6]</sup>, 缓解粉刺、银屑病等皮肤炎症<sup>[7-8]</sup>。不少研究人员在抗生素的抗炎及免疫调节作用的综述中将其视为具有免疫抑制功能的类型<sup>[3, 9]</sup>, 有文献报道红霉素对多种物质所致皮炎效果良好, 而对免疫性皮

炎作用较差<sup>[10]</sup>, 罗红霉素是红霉素的衍生物, 具有更优越的药代动力学特点, 其抗炎作用也更强<sup>[2, 5]</sup>, 本研究主要观察罗红霉素对 T 细胞功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 雄性 ICR 小鼠, 体重 18~22 g, 由中国药科大学实验动物中心提供[动物合格证号: SCXK(苏) 2001-0011]; C57BL/6 小鼠[动物合格证号: SCXK(沪) 2003-0002], 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

**1.2 药品与试剂** 罗红霉素(roxithromycin, Rox), 购于 Sigma 公司, 体外实验中将其溶于二甲亚砜(DMSO), 用前以相应培养液稀释, 使 DMSO 终浓度低于 0.05%; 罗红霉素分散片(roxithromycin dispersible tablets, Rox), 江苏恒瑞医药股份有限公司产品, 用于灌胃给药; 地塞米松磷酸钠注射剂(dexamethasone sodium phosphate injection, Dex) 购自常州第二制药厂; 醋酸泼尼松片(prednisone acetate tablets, Pred) 购自浙江医药股份有限公司。刀豆蛋白(concanavalin A, Con A)、噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT), 为 Sigma 公司产品; 台盼蓝(trypan blue) 为中国医药集团(上海)化学试剂公司进口分装产品; 新生小牛血清(new calf serum, NCS) 为 PAA laboratory GmbH 产品; RPMI1640 培养基为 Gibco 产品; 2, 4, 6-三硝基氯苯(picryl chloride, PCI) 为 Tokyo Kasei Industry Co. Ltd 产品; TRIpure 试剂为 Roche 公司产品, RT-PCR 相关试剂购自博飞、生兴及三博远志公司。

**1.3 诱导小鼠接触性皮炎** ICR 小鼠腹部刮毛, 以 100 μl 1% PCI 无水乙醇溶液涂于腹部致敏, 5 d 后重复致敏 1 次, 10 d 后以 30 μl 1% PCI 橄榄油溶液涂于耳廓进行攻击。攻击前 1 h 及攻击后 12 h 分别灌胃给药 1 次, 罗红霉素剂量为 10、20 mg·kg<sup>-1</sup>, 醋酸泼尼松剂量为 10 mg·kg<sup>-1</sup>, 对照组用生理盐水灌

2005-02-23 收稿 2005-03-19 修回

徐强, 教授, 博士生导师, 研究方向: 免疫病理学及免疫药理学。

Tel: 025-83597620

刘康, 通讯作者, 女, 讲师, 博士生, 研究方向: 免疫药理学。

Tel: 025-85322594 E-mail: liukangcpu@yahoo.com.cn

胃。攻击后 24、48 h 用  $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠麻醉小鼠,螺旋测微器测定耳廓厚度,以左、右耳部厚度差为肿胀度。

**1.4 双向混合淋巴细胞反应** 放血处死 ICR 及 C57BL/6 小鼠,无菌取脾并制备脾细胞悬液,调整细胞浓度为  $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ,各加  $50 \mu\text{l}$  入反应孔,并分别加入终浓度为  $0.1$ 、 $0.5$ 、 $5$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的罗红霉素、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的阳性药地塞米松或同体积的培养液。另分别设 C57BL/6 小鼠的脾细胞 ( $2.5 \times 10^5$ /孔) 及 ICR 小鼠的脾细胞 ( $2.5 \times 10^5$ /孔) 的单独培养孔作为阴性对照孔。共育 6 d 后加入  $20 \mu\text{l}$   $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  MTT,继续培养 4 h,经  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $500 \text{ g}$  离心 5 min,吸弃上清,每孔加入二甲亚砜  $100 \mu\text{l}$ ,振摇 2 min,放置 10 min,用酶标仪测定 540 nm 波长处的吸收度 ( $OD_{540}$ ),以  $OD_{540}$  值反映活细胞数量,并计算刺激指数 (stimulating index, SI)。SI = 反应孔的  $OD_{540}$ /两小鼠脾细胞单独孔  $OD_{540}$  之和。

**1.5 Con A 诱导脾细胞增殖** 依照“1.4”方法制备 C57BL/6 小鼠脾细胞悬液,将细胞按  $5 \times 10^5$ /孔接种于 96 孔板。除对照组外,其余各孔均加入 Con A 使之终浓度分别为  $1.25$ 、 $2.5$  及  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,同时分别加入阳性药地塞米松或不同浓度的罗红霉素。地塞米松的终浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,罗红霉素的终浓度为  $0.1$ 、 $0.5$ 、 $5$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。培养 3 d 后按“1.4”中所述 MTT 法测定  $OD_{540}$ 。

**1.6 RT-PCR** 依照 1.4 方法制备 C57BL/6 小鼠脾细胞悬液,以  $1 \times 10^7$ /孔接种于 6 孔板,加入罗红霉素或地塞米松,同时加入终浓度  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  Con A,24 h 后收集细胞,用 TRIpure 提取总 RNA,以  $2 \mu\text{g}$  总 RNA 进行逆转录 (RT),反应体积  $25 \mu\text{l}$ 。以  $1 \mu\text{l}$  反应产物 cDNA 进行聚合酶链反应 (PCR),反应体积  $20 \mu\text{l}$ 。反应过程:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min, 26 ~ 30 个循环后,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 min,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

小鼠  $\beta$ -actin, T-bet, IL-2 及 IFN- $\gamma$  的引物序列及扩增产物大小如下: IL-2: 391 bp, sense:  $5' \text{-TGC TCC TTG TCA ACA GCG-3'}$ , antisense:  $3' \text{-CTC ACG GTT AAG CTA CTA CT-5'}$ 。INF- $\gamma$ : 406 bp, sense:  $5' \text{-CTT CTT CAG CAA CAG CAA GGC GAA AA-3'}$ , antisense:  $5' \text{-CCC CCA GAT ACA ACC CCG CAA TCA-3'}$ 。T-bet: 367 bp, sense:  $5' \text{-AGT GAG GTC GCC TGG TGA AAT G-3'}$ , antisense:  $5' \text{-TGC CCG AAC TAC AGT CAC GAA C-3'}$ 。 $\beta$ -actin: 161 bp, sense:  $5' \text{-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'}$ , antisense:  $3' \text{-GGA CCC ATG$

TAC CAC CAT GG-5'。

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶 ( $1.5\%$ ) 电泳,摄像,以捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统 (江苏捷达科技发展有限公司) 作半定量分析。

**1.7 统计学处理** 数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用双侧  $t$ -检验分析各组数据的差异,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 罗红霉素对 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导小鼠耳廓肿胀度的影响**  $10$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  罗红霉素于效应相给药对小鼠耳廓肿胀有明显抑制作用,其中  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量作用更强,在攻击后 24、48 h 时间点均表现出较强抑制效应 (表 1)。

表 1 罗红霉素对 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导小鼠耳廓肿胀度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分组	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿胀度 / $\mu\text{m}$		抑制率 / %	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	—	$159 \pm 35$	$120 \pm 28$	—	—
罗红霉素组	10	$123 \pm 39$	$80 \pm 25^c$	22.6	33.3
	20	$96 \pm 27^c$	$74 \pm 21^c$	39.6	38.3
地塞米松组	10	$87 \pm 25^c$	$72 \pm 13^c$	45.3	40.0

与对照组比较  $^c P < 0.01$

**2.2 罗红霉素对双向混合淋巴细胞反应 (two way-MLR) 的影响** 与阴性对照孔比较, C57BL/6 及 ICR 小鼠的脾细胞混合培养 6 d 后活细胞数明显增多,刺激指数为 2.72。阳性药地塞米松显著抑制 MLR; 而罗红霉素活性较低,仅在高浓度 ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 时表现出明显抑制 MLR 的作用 (表 2)。

表 2 罗红霉素对双向混合淋巴细胞反应的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

分组	浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	刺激指数	抑制率 / %
对照组	—	$2.72 \pm 0.42$	—
罗红霉素组	0.1	$2.78 \pm 0.37$	—0.7
罗红霉素组	0.5	$2.42 \pm 0.40$	11.0
罗红霉素组	5	$2.25 \pm 0.32$	17.3
罗红霉素组	25	$1.62 \pm 0.22^b$	40.4
地塞米松组	1	$0.92 \pm 0.10^c$	66.2

与对照组比较  $^b P < 0.05$ ,  $^c P < 0.01$

**2.3 罗红霉素对 Con A 诱导脾细胞增殖的影响** 对于 Con A 所致的脾细胞增殖,罗红霉素显示了浓度依赖性的抑制作用,而在不加 Con A 的情况下,仅

高浓度的罗红霉素 ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 显著地抑制脾细胞存活。地塞米松 ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 对脾细胞存活及 Con A

诱导的脾细胞增殖都显示出明显抑制效应(表 3)。

表 3 罗红霉素对不同浓度 Con A 刺激脾细胞增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

分组	浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Con A $/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$			
		0	1.25	2.5	5
对照组	—	0.35±0.02	0.61±0.00	0.60±0.05	0.46±0.07
罗红霉素组	0.1	0.28±0.04	0.52±0.07	0.57±0.04	0.42±0.07
罗红霉素组	0.5	0.32±0.06	0.46±0.07 <sup>b</sup>	0.58±0.01	0.33±0.05 <sup>b</sup>
罗红霉素组	5	0.26±0.07	0.40±0.05 <sup>c</sup>	0.51±0.05	0.34±0.02 <sup>b</sup>
罗红霉素组	25	0.13±0.00 <sup>c</sup>	0.22±0.05 <sup>c</sup>	0.29±0.05 <sup>c</sup>	0.15±0.02 <sup>c</sup>
地塞米松组	1	0.06±0.00 <sup>c</sup>	0.05±0.01 <sup>c</sup>	0.08±0.01 <sup>c</sup>	0.10±0.01 <sup>c</sup>

与对照组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.01$

2.4 罗红霉素对 Con A 刺激 24 h 后脾细胞因子 mRNA 表达的影响 Con A 刺激 24 h 后, 脾细胞的 T-bet、IL-2、IFN- $\gamma$  mRNA 表达明显增高, 罗红霉素在  $5.25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  水平显著抑制所检测因子的基因表达(图 1)。

### 3 讨论

与红霉素类的大环内酯类抗生素相似, 罗红霉素具有一定抗炎及免疫调节功能, 体内、外研究亦证实长期低剂量应用罗红霉素对呼吸道炎症有确切疗效, 其可能的作用机制包括抑制中性粒细胞趋化、抑制致炎因子释放、保护上皮细胞、抑制水及粘液分泌以及抑制 Th2 细胞功能等<sup>11-13</sup>, 但有关其对 Th1 细胞的影响报道很少, 结果也不一致。大环内酯类抗生素是否对 Th1 细胞因子介导的炎症有效, 是否能够对呼吸系统以外的炎症有确切疗效仍需更多证实。接触性皮炎是以 T 细胞及巨噬细胞为主要效应细胞的迟发型变态反应, 且在炎症反应中 Th1 细胞功能明显增强, 因此我们以此为模型探讨罗红霉素对 T 细胞功能的影响。

本实验中发现  $20 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的罗红霉素在效应相给药能够明显抑制 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导的小鼠接触性皮炎, 推测其可能影响 T 细胞等相关细胞功能。已有文献报道罗红霉素对巨噬细胞及中性粒细胞功能有明确抑制作用<sup>1, 2, 9, 13</sup>, 是可能的机制之一, 那么罗红霉素是否对 T 细胞有影响? 我们在体外实验中观察到罗红霉素对混合淋巴细胞反应抑制效应较差, 仅高浓度 ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 有效, 但能剂量依赖性抑制 Con A 诱导的脾 T 淋巴细胞增殖, 并降低 Th1 细胞因子 IL-2、IFN- $\gamma$  以及 Th1 细胞因子的转录因子 T-bet 的 mRNA 表达, 表明罗红霉素能抑制 Th1 细胞功能。这些结果与 Hinohata S 等人的结果较一致, 也可从 Seoung-Ju Park 小组的研究中获得一定支持。Hinohata S 等人研究发现罗红霉素能抑制 anti-CD3 诱导的人记忆 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- $\gamma$ <sup>14</sup>, 而 Seoung-Ju Park 小组在临床研究中观察到长期低剂

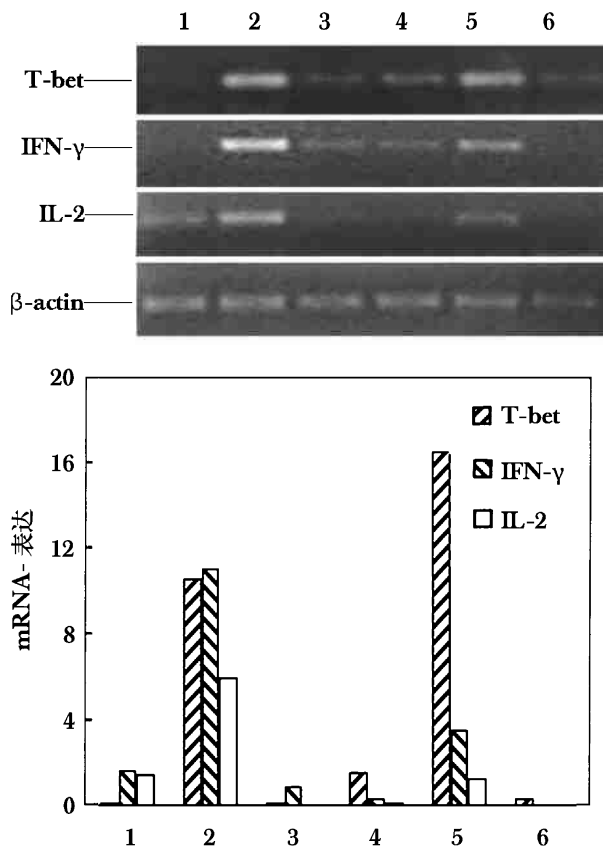


图 1 罗红霉素对 Con A 刺激小鼠脾细胞 T-bet、IFN- $\gamma$  和 IL-2 mRNA 表达的影响

1: 正常组; 2: 对照组; 3, 4, 5: 罗红霉素  $25, 5, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  组; 6: 地塞米松  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  组; 鼠脾细胞在  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Con A 刺激的同时与不同浓度罗红霉素或地塞米松共有 24 h, 以 TRIpure 试剂提取总 RNA 进行 RT-PCR 将反应产物进行电泳并作半定量分析(数据代表 3 次独立的实验结果)

量应用红霉素的弥漫性细支气管炎 (DPB) 病人支气管灌洗液中 Th1 细胞因子 IL-2 及 IFN- $\gamma$  水平低于未治疗者, Th2 细胞因子 IL-4、IL-5 及 IL-13 水平则有所升高<sup>[13]</sup>, 提示大环内酯类抗生素能从一定程度调节患者体内的 Th1/Th2 功能, 而不仅是单纯的抑制或增强效应, 这与前文提到的罗红霉素抑制 Th2 细胞因子有所不同<sup>[11, 12]</sup>。这些不同结果估计与受试对象、机体免疫功能状态、用药剂量和时程及所用细胞种类、纯度有关。我们在体外实验中应用脾细胞为受试细胞, 其中包括 T、B 细胞, 巨噬细胞和粒细胞等, 罗红霉素对 T 细胞的影响是直接或间接效应还未清楚, 药物作用的可能信号通路及其对蛋白水平的影响是否与对 mRNA 的影响一致等问题仍需很多实验研究。

同时实验中也发现, 罗红霉素对接触性皮炎抑制率约 30%~40%, 低于 F. Scaglione 等人报道的罗红霉素对角叉菜胶诱导急性非免疫性炎症的抑制程度(约 70%), 这与对红霉素的研究相似<sup>[10]</sup>, 表明此类药物的抗炎及免疫调节作用可能有一定相对选择性, 似乎对粒细胞作用更强, 这还需要更多的实验证明。

综上所述, 罗红霉素能抑制 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导的接触性皮炎, 可能与其抑制 T 淋巴细胞存活、活化及增殖有关, 更确切的机制尚有待进一步研究。

### 参考文献

- 1 Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombola L, Carnuccio R, *et al.* Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000; 292: 156-63
- 2 Agen C, Danesi R, Blandizzi C, Costa M, Stacchini B, Favini P, *et al.* Macrolide antibiotics as anti-inflammatory agents: roxithromycin in an unexpected role [J]. *Agents Actions*, 1993; 38: 85-90
- 3 Van Vlem B, Vanholder R, De Paepe P, Vogelaers D, Ringoir

- S. Immunomodulating effects of antibiotics: literature review [J]. *Infection*, 1996; 24: 275-91
- 4 Kadota JJ. Non-antibiotic effect of antibiotics [J]. *Clin Microbiol Infect*. 1996; 2: S20-2
- 5 Scaglione F, Rossoni G. Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1998; 41: 47-50
- 6 Keicho N, Kudoh S. Diffuse panbronchiolitis: role of macrolides in therapy [J]. *Am J Respir Med*, 2002; 1: 119-31
- 7 Ferahbas A, Utas S, Aykol D, Borlu M, Uksal U. Clinical evaluation of roxithromycin: a double-blind, placebo-controlled and crossover trial in patients with acne vulgaris [J]. *J Dermatol*, 2004; 31: 6-9
- 8 Ohshima A, Takigawa M, Tokura Y. CD8<sup>+</sup> cell changes in psoriasis associated with roxithromycin induced clinical improvement [J]. *Eur J Dermatol*, 2001; 11: 410-5
- 9 马恩龙, 王澈, 王敏伟. 大环内酯类抗生素免疫调节作用的研究进展 [J]. *国外医药抗生素分册*, 2003; 24: 1-4
- 10 Tarayre JP, Aliaga M, Barbara M, Villanova G, Ballester R, Tisne Versailles J, *et al.* Cutaneously applied erythromycin base reduces various types of inflammatory reactions in mouse ear [J]. *Int J Tissue React*, 1987; 9: 77-85
- 11 Noma T, Aoki K, Hayashi M, Yoshizawa I, Kawano Y. Effect of roxithromycin on T lymphocyte proliferation and cytokine production elicited by mite antigen [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001; 1: 201-10
- 12 Asano K, Kamakazu K, Hisamitsu T, Suzuki H. Modulation of Th2 type cytokine production from human peripheral blood leukocytes by a macrolide antibiotic, roxithromycin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001; 1913-21
- 13 Bruce K, Rubin, Mengr MD, FCCP, Markus O, Henke MD. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease [J]. *CHEST*, 2004; 125: 70-8
- 14 Hirohata S, Nakanishi K. Suppression of cytokine production of human memory T cells by roxithromycin [J]. *Aerugi*, 1995; 44: 1322-30
- 15 Seoung-Ju Park, Yong-Chul Lee, Yang-Keun Rhee, Heung-Bum Lee. The effect of long-term treatment with erythromycin on Th1 and Th2 cytokines in diffuse panbronchiolitis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 324: 114-7

## Effects of roxithromycin on contact sensitivity and functions of T Lymphocytes

LIU Kang, XU Qiang<sup>1</sup>

*Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, Jiangsu, China; <sup>1</sup>State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China*

**ABSTRACT AIM:** To observe effects of roxithromycin on contact sensitivity induced by picryl chloride (PCI) and on the functions of T cells. **METHODS:** Contact

sensitivity was induced with picryl chloride, two-way mixed lymphocyte reaction and Concanavalin A were used to induce T cell proliferation. The viability and cell pro-

liferation were examined by MTT method, mRNA expression was analyzed by RT-PCR and densitometry. **RESULTS:** Roxithromycin 20 mg ° kg<sup>-1</sup> significantly suppressed contact sensitivity induced by picryl chloride in mice. *In vitro* assay, roxithromycin dose-dependently inhibited splenic T lymphocyte proliferation induced by concanavalin A, 5 and 25  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  of roxithromycin suppressed mRNA expressions of T-bet, IL-2 and IFN- $\gamma$ . 25  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  of roxithromycin also decreased two-way mixed

lymphocyte reaction. **CONCLUSION:** Roxithromycin suppresses picryl chloride-induced contact sensitivity. The inhibitory effect may be related to the suppression on the viability, activation and proliferation of T lymphocytes.

**KEY WORDS** roxithromycin; contact sensitivity; two-way mixed lymphocyte reaction; T lymphocyte proliferation; mRNA expression