

Роль интерлейкина-5 в механизмах апоптотической гибели эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой

Иванчук И.И., Сазонов А.Э., Петровский Ф.И., Лещева И.С., Копьева А.П., Петрова И.В.

The role of IL-5 in eosinophils' apoptotic death mechanisms in patients with bronchial asthma

Ivanchuk I.I., Sazonov A.E., Petrovsky F.I., Lescheva I.S., Kopieva A.P., Petrova I.V.

Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Томск

© Иванчук И.И., Сазонов А.Э., Петровский Ф.И. и др.

Проведено исследование экспрессии мРНК внутриклеточных регуляторов апоптоза, антагонистов bcl-2 и bcl-xL и агонистов клеточной гибели bax, bcl-xS, а также экспрессии мРНК интерлейкина-5 (ИЛ-5). В результате исследования потенциальной роли ИЛ-5 в регуляции bcl-2-зависимой программируемой гибели нами установлено повышение жизнеспособности и стимуляция экспрессии мРНК bcl-2 эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой (БА). Показано, что свежеизолированные эозинофилы периферической крови во всех исследуемых группах экспрессируют мРНК bax и bcl-xL, меньшую активность имеет bcl-xS. В эозинофилах периферической крови здоровых доноров не выявлена экспрессия bcl-2, однако в группе больных бронхиальной астмой отмечалось повышение экспрессии мРНК ИЛ-5 и, возможно, связанное с этим появление активности bcl-2. Таким образом, снижение апоптотической активности в эозинофилах периферической крови больных бронхиальной астмой может приводить к увеличению доли эозинофилов, гибнущих по некротическому пути. Не исключено, что этот сдвиг вносит существенный вклад в патогенез бронхиальной астмы.

Ключевые слова: эозинофилы, апоптоз, астма, bcl-2.

Investigations of the mRNA expression of apoptosis intracellular regulators, bcl-2 and bcl-xL antagonists and bax, bcl-xL agonists of cellular destruction as well as mRNA expression of IL-5 were carried out. As a result of investigation of potential role of IL-5 in the regulation of programmable bcl-2-dependent destruction we found the increase of vitality and mRNA expression stimulation of bcl-2 peripheral blood eosinophils in patients with bronchial asthma (BA). It was found that fresh-isolated peripheral blood eosinophils in all investigated groups expressed bax and bcl-xL mRNA, bcl-xS had the less activity. In peripheral blood eosinophils of healthy donors the bcl-2 expression was not found, however, the increase of mRNA expression by IL-5 was shown in group of patients with bronchial asthma and, possibly connected with this, the appearance of bcl-2 activity. Thus, the decrease of apoptotic activity in peripheral blood eosinophils in patients with bronchial asthma may lead to the increase of eosinophil portion that is subjected to necrotic destruction and this may significantly contribute into bronchial asthma pathogenesis.

Key words: eosinophils, apoptosis, asthma, bcl-2.

УДК 616.248:616.155.35:577.7

Известно, что эозинофилы играют важную роль в патогенезе многих заболеваний. Установлена ассоциация как тканевых, так и периферических эозинофилов с гельминтозами и atopическими заболеваниями, включая бронхиальную астму (БА) [18]. Внутриклеточные медиаторы, высвобождае-

мые эозинофилами при БА, обладают гистотоксическим эффектом, вызывая повреждение тканей и воспаление дыхательных путей [4]. Для ограничения этого повреждающего действия в нормальных условиях эозинофилы элиминируются путем апоптоза. Однако при БА эозинофилы гибнут преимуще-

щественно по некротическому пути. В отличие от апоптоза некроз не обеспечивает сохранения мембранной целостности клетки и последующего фагоцитоза погибших эозинофилов. В результате при некротической гибели эозинофилов происходит массивное высвобождение медиаторов

Накопление эозинофилов в очагах воспаления зависит от ряда факторов, таких как селективная адгезия и миграция [17], повышение жизнеспособности в ответ на факторы роста (ИЛ-3, -5, -6) и колониестимулирующие факторы (GM-CSF) [13]. Ингибирование антиапоптотического действия ряда цитокинов, в том числе ИЛ-5, циклогексимидом и актиномицином D, предполагает зависимость этого эффекта от синтеза белка *de novo* [19].

В настоящее время известен ряд внеклеточных модуляторов апоптоза [5, 8], однако до сих пор остается открытым вопрос о внутриклеточных механизмах передачи сигналов и регуляции эффекторов апоптоза эозинофилов.

Одним из важнейших внутриклеточных регуляторов апоптоза является протоонкоген *bcl-2*, который был впервые описан при В-клеточной лимфоме [15], позднее была установлена его гомология с ингибитором апоптоза у *Caenorhabditis elegans* белком *ced-9* [6]. Семейство *bcl-2* включает в себя ряд генов с частичной гомологией и противоположной регуляторной активностью в апоптотической гибели клеток в виде антагонистов (*bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-w*) и агонистов (*bax*, *bcl-xS*, *bak*) [7]. Альтернативная транскрипция *bcl-x* гена приводит к образованию двух различных типов мРНК. Большой транскрипт — *bcl-xL* — кодирует супрессор апоптоза, короткий вариант — *bcl-xS* — обладает антагонистическим действием по отношению к *bcl-xL* [9]. Из членов *bcl-2*-семейства по области гомологии формируются динамически равновесные гомо-, гетеродимеры, которые, в свою очередь, взаимодействуют с несвязанными белками, рецепторами факторов роста и киназными каскадами внутриклеточной передачи сигналов [16].

Известно, что лимфоциты периферической крови экспрессируют *bcl-2*, *bcl-x* и *bax*, однако нейтрофилы экспрессируют только последний гомолог [11]. В настоящее время нет единого мнения об экспрессии и регуляции экспрессии *bcl-2*-

воспаления и, прежде всего, провоспалительных цитокинов. В связи с этим апоптотическая гибель эозинофилов рассматривается как важный механизм ограничения воспалительного процесса [2].

гомологов в эозинофилах в норме и при различных патологических состояниях.

Так, с использованием метода иммуноблотинга было показано отсутствие белковой экспрессии *bax*, *bcl-xL* и *bcl-2* в эозинофилах периферической крови здоровых доноров [10]. Напротив, в работе K. Yasui [21] методом проточной цитометрии показана стабильная экспрессия *bcl-2* и его гомологов в эозинофилах периферической крови.

Цель данной работы — исследование уровня экспрессии мРНК ИЛ-5, *bcl-2* и его гомологов (*bax*, *bcl-xS*, *bcl-xL*) в эозинофилах периферической крови больных БА.

Материал и методы

Объектом исследования служили эозинофилы, которые выделяли из периферической крови 20 здоровых доноров (группа контроля) и 20 больных бронхиальной астмой легкого и среднетяжелого течения. Больные БА в течение 4 нед перед исследованием не получали кортикостероидов (системных и ингаляционных), антилейкотриеновых препаратов, теофиллинов длительного действия. Контрольную группу составили доноры, у которых не выявлено БА и других аллергических заболеваний, гельминтных инвазий, с отрицательными результатами кожных алергопроб. Эозинофилы концентрировали в градиенте плотности. Эозинофильный концентрат переносили в раствор Хенкса (без ионов Ca_2 и Mg_2) с добавлением 2%-й инактивированной фетальной телячьей сыворотки (ФТС) и 0,02 М ЭДТА. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием трипановым синим (допустимой считали жизнеспособность более 95%). Изолированные эозинофилы отмывали и культивировали в концентрации 3×10^6 клеток/мл в питательной среде RPMI 1640 с L-глутамином (SIGMA, UK), содержащим 10% ФТС и антибиотики.

Жизнеспособность эозинофилов оценивали в тесте с трипановым синим (считали не менее 200

клеток). Апоптоз оценивали по стандартным морфологическим признакам (ядерная и цитоплазматическая конденсация) при окраске по Нохта—Максимову (считали не менее 200 клеток).

Тотальную РНК выделяли с помощью коммерческого набора TRIZOL™ (GibcoBRL, Life

bcl-2 (5'-GATGTCCAGCCAGCTGCACCTG; 3'-CACAAAGGCATCCCAGCCTCC),
bax (5'-GGACCCGGTGCCTCAGGA; 3'-CAAAGATGGTCACGGTCTGC),
bcl-xS/L (5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA; 3'-GTAGAGTGGATGG TCAGTG),
ИЛ-5 (5'-ATGCGCSTTTGCACTAATGGC; 3'-GCAAATTGCACGATCTGAC),
ГАФД (5'-GAAGCTCACTGGCATGGCCTTCC; 3'-CATGTGGGCCATGAGGTCCA).

Глицеральдегид 3-фосфат дегидрагеназа (ГАФД) использована как положительный контроль экспрессии мРНК. Экспрессия мРНК ГАФД в параллельных пробах принималась за 100% активности.

Праймеры к bcl-xS/L расположены в 5' и 3' нетранслируемых областях гена, что позволяет проводить одновременную амплификацию bcl-xS (0,6 kb) и bcl-xL (0,8 kb).

В 50 мкл ПЦР-смеси содержалось: 5 мкл кДНК, 10 mM Трис-НСI, 25 пМ каждого праймера, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP и 2,5 ед. BioTaq ДНК-полимеразы. Амплификацию осуществляли от 30 до 35 циклов, денатурацию проводили при 94 °C в течение 20 с, отжиг — при 60 °C (bcl-2, ГАФД) или 58 °C (bax, bcl-xS/L, ИЛ-5) в течение 30 с, синтез — при 72 °C в течение 60 с. Детекцию продуктов амплификации осуществляли в 1,2%-м агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Для оценки специфичности продуктов амплификации проводили nested-ПЦР.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, *U*-теста Манна—Уитни и корреляционного анализа Пирсона. Значения *P* < 0,05 принимались как достоверные различия.

Technologies). ПолиА-РНК получали на колонках с олиго-dT целлюлозой (ICN, США) и проводили обратную транскрипцию в течение 1 ч при 37 °C. Контрольную ДНК (кДНК) амплифицировали с праймерами, синтезированными на ДНК-синтезаторе «ASM 800» специфичными для:

Результаты исследования

В результате визуальной оценки апоптоза эозинофилов периферической крови (ЭПК) больных БА установлено значительное снижение количества клеток с морфологическими признаками апоптоза и увеличение жизнеспособности (тест с трипановым синим) по сравнению со средними значениями в группе здоровых доноров (рис. 1,а). Наблюдаемое количество эозинофилов с признаками апоптотической морфологии (через 24 ч культивирования) в группе больных БА составило 20 ± 4,3% по сравнению с 45 ± 5,2% в группе здоровых доноров (рис. 1,б).

Анализ экспрессии мРНК

В результате оценки матричной активности мРНК установлено, что свежеизолированные эозинофилы здоровых доноров не экспрессируют мРНК bcl-2 (рис. 2,а) по сравнению с экспрессией ГАФД, используемой в качестве контроля экспрессии в РТ-ПЦР. В этой же группе установлена экспрессия мРНК bax (495 bp) — 83,4 ± 7,6% и bcl-xL (0,8 kb) — 170,8 ± 11,5% (рис. 2,б,в).

Результаты исследований студентов и молодых ученых

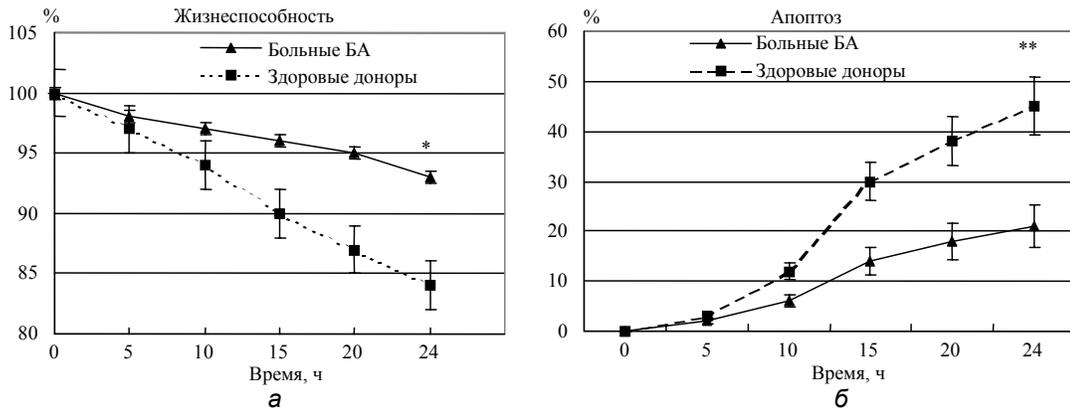


Рис. 1. Результаты визуальной оценки признаков апоптоза: а — жизнеспособность эозинофилов (в тесте с трипановым синим) в течение 24 ч культивирования; б — содержание эозинофилов с морфологическими признаками апоптоза в течение 24 ч культивирования. * — $P < 0,05$ по сравнению с показателями в группе здоровых доноров

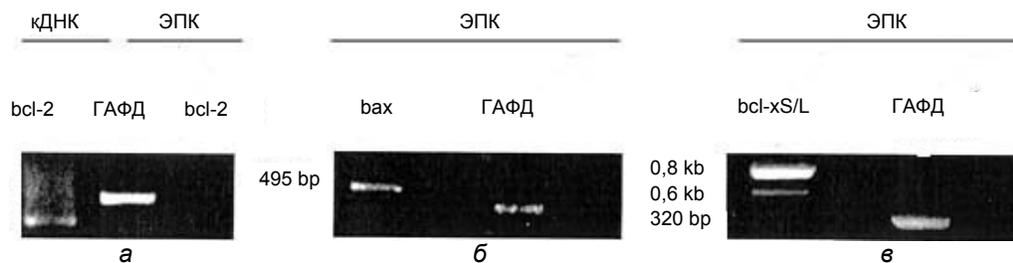


Рис. 2. Экспрессия мРНК bcl-2 (а), bax (б), bcl-xL и bcl-xS (в) свежеизолированных (0 ч) эозинофилов периферической крови (ЭПК) здоровых доноров. ГАФД — внутренний контроль амплификации и экспрессии мРНК. кДНК — контрольная ДНК

В результате коампликации bcl-xS (0,6 kb) зарегистрирована экспрессия мРНК, которая составила $16,2 \pm 3,3\%$, что существенно ниже активности его сплайс-варианта (рис. 2, в). Во всех исследуемых пробах в группе здоровых доноров установлена экспрессия мРНК ИЛ-5 на уровне $20,3 \pm 3,7\%$.

В результате исследования экспрессии мРНК изучаемых эффекторов апоптоза у больных БА установлено достоверное повышение экспрессии ИЛ-5 в 1,7 раза. Кроме этого, в эозинофилах периферической крови больных БА выявлена экспрессия мРНК bcl-2 (250 bp), интенсивность сигнала составила $10,8 \pm 2,3\%$. Установлена положительная корреляционная зависимость между уровнем экспрессии мРНК bcl-2 и мРНК ИЛ-5 ($r = 0,72$; $P < 0,01$). Изменение активности мРНК bax, bcl-xL и bcl-xS в эозинофилах периферической крови больных БА по сравнению с группой здоровых доноров не установлено.

Обсуждение

Известно, что ИЛ-5 увеличивает жизнеспособность эозинофилов, ингибируя апоптоз. При этом ИЛ-5-зависимое ингибирование апоптоза требует синтеза мРНК и белков de novo [17]. Регуляция экспрессии генов — членов bcl-2-семейства — является возможным механизмом реализации апоптоз-ингибирующего действия ИЛ-5 [1]. Однако в настоящее время существует ряд противоречивых мнений о механизмах реализации антиапоптотической активности ИЛ-5. Так, в работе К. Ochiai [10] отмечен стимулирующий эффект ИЛ-5 (in vitro) на экспрессию мРНК и белков bcl-2-семейства в эозинофилах периферической крови здоровых доноров. Напротив, в исследованиях А. Druilhe [3], выполненных на эозинофилах пуповинной крови, не установлено влияния различных концентраций ИЛ-5 на экспрессию мРНК bcl-2.

В результате оценки потенциальной роли ИЛ-5 в регуляции bcl-2-зависимой программируемой гибели нами установлено повышение жизнеспособности эозинофилов при культивировании в присутствии ИЛ-5.

собности и стимуляция экспрессии мРНК bcl-2 эозинофилов периферической крови больных БА. В то же время экспрессия мРНК как агонистов апоптоза (bax, bcl-xS), так и его антагониста (bcl-xL) в эозинофилах периферической крови больных БА не отличалась от значений в контрольной группе.

Известно, что чувствительность клеток к апоптотическим сигналам определяется соотношением агонистов и антагонистов клеточной гибели и их последующим взаимодействием через гомо- и гетеродимеризацию. Высокая экспрессия bax ведет к доминированию bax-гомомеров и стимуляции апоптоза [12], в то же время превалирование bcl-2 защищает клетки от гибели [14]. Установленный нами невысокий стимулирующий эффект ИЛ-5 на экспрессию мРНК bcl-2 наряду с относительно высоким уровнем мРНК bax в эозинофилах косвенно указывает на то, что антиапоптотический эффект ИЛ-5 реализуется не только через механизм активации bcl-2. Возможно, антиапоптотический эффект ИЛ-5 связан с активностью других членов bcl-2-семейства, таких как bad, bcl-w, bag-1 или mcl-1 [20].

Таким образом, ИЛ-5-зависимое увеличение экспрессии bcl-2 приводит к снижению активности апоптотической гибели эозинофилов периферической крови больных БА. Снижение апоптотической активности может приводить к увеличению доли эозинофилов, гибнущих по некротическому пути, и усилению воспалительного процесса в тканях легкого.

Литература

1. Clem R.J., Cheng E.H.-Y., Karp C.L., Kirsch D.S., Ueno K., Takahashi A., Kastan M.B., Griffin D.E., Earnshaw W.C., Veluona M.A., Hardwick M. Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. < 95. P. 554—559.
2. Dewson G., Wardlaw A.J., Walsh G.M. Human eosinophils: apoptosis versus survival in the mediation of inflammation // Apoptosis. 1996. < 1. P. 111—118.
3. Druilhe A., Arock M., Le Goff L., Pretolani M. Human eosinophils express bcl-2 family proteins: modulation of mcl-1 expression by IFN // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998. < 18. P. 315—322.
4. Gleich G.J. The eosinophil and bronchial asthma // J. Allergy Clin. Immunol. 1990. < 85. P. 422—436.
5. Hebestreit H., Yousefi S., Balatti I., Weber M., Cramer R., Simon D., Hartung K., Schapowal A., Blaser K., Simon H.-U. Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils // Eur. J. Immunol. 1996. < 26. P. 1775—1780.
6. Hengartner M.O., Horvitz H.R. Activation of C. elegans cell death protein Ced-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in bcl-2 // Nature. 1994. < 369. P. 318—320.
7. Kroemer G. The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis // Nature Med. 1997. < 3. P. 614—620.
8. Matsumoto K., Schleimer R.P., Saito H., Ikura Y., Bochner B.S. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas treatment in vitro // Blood. 1995. < 86. P. 1437—1443.
9. Minn A.J., Boise L.H., Thompson C.B. Bcl-xS antagonises the effects of bcl-xL // J. Biol. Chem. 1996. < 271. P. 6306—6312.
10. Ochiai K., Kagami M., Matsumura R., Tomioka H. IL-5 but not interferon-gamma (IFN-) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of bcl-2 expression // Clin. Exp. Immunol. 1997. < 107. P. 198—204.
11. Ohta K., Iwai K., Kasahara Y., Taniguchi N., Krajewski S., Reed J.C., Miyawaki T. Immunoblot analysis of cellular expression of bcl-2 family proteins, bcl-2, bcl-x, and mcl-1, in human peripheral blood and lymphoid tissues // Int. Immunol. 1995. < 7. P. 1817—1825.
12. Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerises in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death // Cell. 1993. < 74. P. 609—619.
13. Owen W.F., Rothenberg M.F., Silberstein D.S., Gasson J.C., Stevens R.L., Austen K.F., Soberman R.J. Regulation of human eosinophil viability, density and function by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts // J. Exp. Med. 1987. < 177. P. 567—572.
14. Rosse T., Olivier R., Monney L., Rager M., Conus S., Fellay I., Jansen B., Bonner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c // Nature. 1998. 391: 496—499.
15. Tsujimoto Y., Croce C.M. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. < 83. P. 5214—5218.
16. Wang H.-G., Rapp U.R., Reed J.C. Bcl-2 targets the protein kinases Raf-1 to mitochondria // Cell. 1996. < 87. P. 629—638.
17. Wardlaw A.J., Walsh G.M., Symon F.A. Mechanisms of eosinophil and basophil migration // Allergy. 1994. < 49. P. 797—807.
18. Wardlaw A.J., Moqbel R., Kay A.B. Eosinophils: biology and role in disease // Adv. Immunol. 1995. < 60. P. 151—266.
19. Yamaguchi Y., Suda T., Ohta S., Tominaga K., Miura Y., Kasahara T. Analysis of the survival of mature eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils // Blood. 1991. < 78. P. 2542—2547.
20. Yang E., Zha J., Jockett J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. Bad, a heteromeric partner for bcl-xL

Результаты исследований студентов и молодых ученых

and bcl-2, displaces bax and promotes cell death // Cell. 1995. < 80. P. 285—291.
21. Yasui K., Nakazawa T., Agematsu K., Komiyama A.

Theophylline accelerates human granulocyte apoptosis not via phosphodiesterase inhibition // J. Clin. Invest. 1997. < 100. P. 1677—1684.

Поступила в редакцию 17.04.2003 г.

Продолжая дискуссию

Уважаемые читатели!

Мы продолжаем начатую в < 1, 2003 г. публикацию докладов и выступлений, прозвучавших 2 декабря 2002 г. на юбилейной научно-практической конференции «Методология и методика клинического анализа», посвященной 50-летию дискуссии по книге И.Н. Осипова и П.В. Копнина «Основные вопросы теории диагноза» (Москва, 1951).

Приглашаем принять участие в дискуссии. Ваши материалы будут опубликованы в < 3, 2003 г.