

口蹄疫 146S 对乳鼠心肌膜微血管内皮细胞分泌 IL-6 的影响

田丽芳¹, 张涛², 张爽², 陈武¹, 索占伟¹, 胡格¹, 段惠琴¹, 穆祥¹

(¹北京市重点实验室(兽医学中医药)北京农学院动物科学技术系, 北京 102206;

²中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 研究口蹄疫 146S 病毒粒子抗原(FMDV 146S)对乳鼠心肌膜微血管内皮细胞(RMMVECs)分泌 IL-6 的影响,为解决现有口蹄疫疫苗的不足提供数据。体外培养乳鼠心肌膜微血管内皮细胞,用 ELISA 方法检测 FMDV 146S 处理后细胞上清液中 IL-6 浓度。乳鼠心肌膜微血管内皮细胞(RMMVECs)在正常状态下低水平分泌 IL-6;FMDV 146S 刺激后 IL-6 的分泌量显著增加,且呈剂量和时间依赖性,在刺激 24 h 后分泌量达到峰值。MVECs 在 FMDV 146S 诱导的免疫与炎症反应中起着重要作用。

关键词: 微血管内皮细胞;FMDV 146S;IL-6

中图分类号:S855.3 文献标识码:A

Effects of FMDV 146S on IL-6 Release of Suckling Rat Myocardial Microvascular Endothelial Cells in Vitro

Tian Lifang¹, Zhang Tao², Zhang Shuang², Chen Wu¹, Suo Zhanwei¹, Hu Ge¹,

Duan Huiqin¹, Mu Xiang¹

(*Beijing Key Laboratory of Veterinary Medicine (Traditional Chinese Medicine and Pharmacology),*

Department of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206;

²College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: To study the effects foot and mouth diseases virus 146S particle antigen (FMDV 146S) on IL-6 release of sucking rat myocardial microvascular endothelial cells (RMMVECs) in vitro, and to provide data for solving the problem of side effects in using foot-and-mouth-disease vaccines. The cultured RMMVECs in vitro were identified as endothelial cells by morphology and by positive immunocytochemistry for factor VIII-related antigen, a marker for endothelial cells. Using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the level of IL-6 produced by RMMVECs stimulated with FMDV 146S in cell supernatant liquid. On normal condition, RMMVECs can secrete IL-6 at low level. The level of IL-6 produced by RMMVECs stimulated with FMDV146S in cell supernatant liquid was increased dramatically in dose and time dependents, and got the maximum at 24 h. MVECs are very significant in immune and inflammatory reaction induced by FMDV 146S.

Key words: microvascular endothelial cells, FMDV146S, IL-6

IL-6 是一种具有广泛生物学活性的 26 kD 的单链糖蛋白细胞因子,内皮细胞等可产生该细胞因子。它在炎症^[1]和调节免疫反应方面具有重要的枢纽作用,可

能在宿主的防御机制中起关键作用^[2]。在现代研究中,微血管内皮细胞(MVECs)的作用越来越受到重视,它不但具有特殊的屏障作用,可以调节细胞环境的平衡,

基金项目:北京市自然科学基金重点项目(6061002)

第一作者简介:田丽芳,1982 年出生,女,河北保定人,硕士,研究方向为临床兽医学方向。通信地址:102206 北京市昌平区朱辛庄北农路 7 号。E-mail: tianlifangbb@126.com。

通讯作者:穆祥,1960 年出生,男,江苏人,教授,研究方向为中兽医学。通信地址:102206 北京市昌平区朱辛庄北农路 7 号。Tel: 010-80799515; E-mail: muxiangl109@sina.com。

收稿日期:2008-02-26;修回日期:2008-03-04

而且在机体的致炎与抗炎及免疫应答等方面都有十分重要的作用^[3]。

为了研究微血管内皮细胞在 FMDV 146S 诱导的免疫反应中的作用,在成功分离培养了乳鼠心肌膜微血管内皮细胞的基础上,本试验研究了口蹄疫 146S (FMDV 146S)对其培养上清液中 IL-6 浓度的影响,旨在了解 FMDV 146S 刺激心肌膜微血管内皮细胞后 IL-6 的分泌状况,为解决现有口蹄疫疫苗的不足提供数据。

1 材料与方 法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2007 年 4 月—12 月在北京农学院,北京市重点实验室(兽医学中医药)完成。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM 高糖培养基(GIBCO,批号:H2387)、优质胎牛血清(FBS,PAA Laboratories GmbH,批号:A04105-1121)、Hank's 平衡盐(SIGMA,批号:1136551)、IL-6 试剂盒(武汉博士德生物有限公司,批号:Ek0412)、胰蛋白酶(1:250,GIBCO,批号:2750018)、兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体(福州迈新生物技术开发有限公司,批号:61117070c)。

酶标仪(BIO-RAD 公司,型号:860)、CO₂ 恒温培养箱(SANYO,型号:MCO-17AC)、超净工作台(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),倒置显微镜(MOTIC,型号:DMB5),数码显微镜(MOTIC,型号:DMB5-223PL),酸度计(赛多利斯,型号:UB-7),眼科手术器械(苏州六六视觉科技股份有限公司)等。

1.3 乳鼠心肌膜微血管内皮细胞的分离培养及鉴定

取 10~15 日龄 SD 乳鼠(购自中科院遗传与发育生物学研究所)2 只,雌雄不限,颈椎脱臼致死,75%酒精浸泡 2 min。无菌剖开胸腔,暴露并剪下心脏,放入 Hank's 液中洗净血污,用眼科剪剪除大血管、左心房和右心房,用眼科镊小心撕除心外膜,剪开心室壁,剔除心内膜,再次用 Hank's 液清洗后用眼科剪将余下的心肌组织剪为 0.5×0.5×0.5 mm³ 大小的组织块。取 6 孔培养板一块,每孔中滴加胎牛血清 0.1 ml,润湿培养板底壁。将剪碎的心肌组织小心贴附于培养板底壁,每孔大约 10~20 块,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中静置培养。经过约 4 h,待组织小块贴壁后,每孔轻轻追加含 20%FBS 的 DMEM 完全培养基 2.0 ml,继续静止培养 65~70 h,至有一定量的多边形细胞长出后,轻轻吹打去除组织块。此后每 3 天更换一次完全培养基,待细胞生长至汇合状态,进行传代培养。

纯化后的细胞用免疫组化第 VIII 因子相关抗原染色

结合形态学进行鉴定。

1.4 口蹄疫 146S 的纯化处理

FMDV 146S 纯化自 FMD O 型 China99 毒株的 BHK-21 细胞培养物(兰州兽医研究所惠赠),100%病变的细胞组织液用二乙烯亚胺(BED)灭活,参照文献^[4]用 PEG-6000 进行纯化。纯化的 FMDV 146S 用 DMEM 培养基溶解,用考马斯亮兰法进行蛋白定量,醋酸铀复染后透射电子显微镜鉴定,-20℃保存。

1.5 试验细胞准备与处理

试验使用第 3 代细胞,将生长至汇合状态的细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化脱壁,调整细胞密度为 1.0×10⁵/ml,每孔 0.15 ml 接种于 96 孔培养板,置 5%CO₂ 恒温培养箱培养至 80%汇合状态时,更换为含 2%FBS 的维持培养基,过夜后再次更换为含 FMDV 146S 的维持培养基,FMDV 146S 设 0.8 μg/ml、4 μg/ml、20 μg/ml 3 个浓度,空白对照组加入不含 FMDV 146S 的维持培养基,分别于孵育 3,6,12,24,48,72 h 后收集上清液,每组 3 孔重复,冻存于 -80℃ 备测。

1.6 细胞上清液中 IL-6 浓度测定

采用 ELISA 方法,按照试剂盒说明进行操作,于 450 nm 处检测。

1.7 数据处理

数据以表示,结果进行“t-检验”统计分析。

2 结果

纯化的细胞培养物呈多边形或鹅卵石状(图 1),第 VIII 因子相关抗原免疫细胞化学染色呈阳性着色细胞纯度达 95%以上,能够满足试验要求。

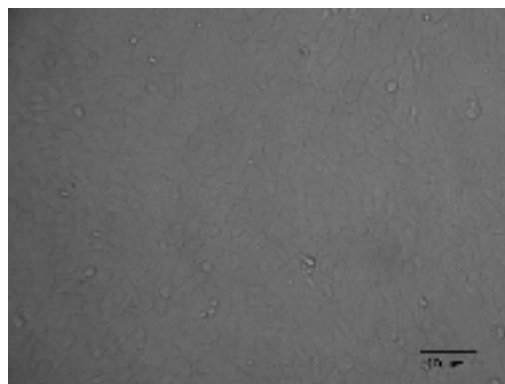


图 1 纯化的 RMMVECs

体外培养的 RMMVECs 低水平表达 IL-6,于 12 h 左右达到峰值;FMDV 146S 刺激后,IL-6 在 RMMVECs 上的分泌量显著升高,且随着 FMDV 146S 浓度的增大,IL-6 的分泌量亦随之显著增加,呈现对 FMDV 146S 的剂量依赖性特点,并于 24 h 达到分泌

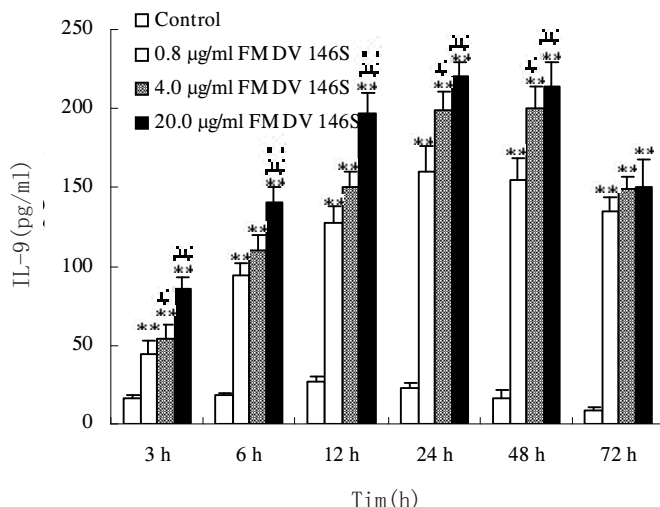


图 2 FMDV 146S 对 RMMVECs 产生 IL-6 的影响

* P < 0.05; ** P < 0.01 (与对照组相比较); # P < 0.05, ## P < 0.01 (与同时时间点 0.8 µg/ml FMDV 146S 组相比较); “ P < 0.05, ”” P < 0.01 (与同时时间点 4.0 µg/ml FMDV 146S 组相比较).

浓度峰值(图 2)。

3 讨论

微血管内皮细胞(MVECs)在动物体内居于重要的解剖学位置,是大多病原在体内经循环系统扩散造成全身感染的必经组织。当前已经研究证明,MVECs是多种细菌毒素和病毒(如疱疹病毒^[5]、艾滋病毒^[6]等)攻击的主要作用靶细胞。本试验应用体外分离培养的乳鼠心肌膜微血管内皮细胞(RMMVECs)为研究对象,观察到不同浓度的 FMDV 146S 对其分泌的 IL-6 都有很大的影响,说明 RMMVECs 是 FMDV 146S 作用的主要靶细胞之一。FMD 疫苗存在保护期短、保护率低及副作用大等问题,易产生免疫耐受,而 IL-6 能促进 B 细胞分化、Ig 的分泌和再次免疫应答并参与炎症,本试验结果为 FMD 疫苗存在的问题提供一定的数据依据。

有研究表明,在自然状态下,体外培养的内皮细胞可合成和分泌一定量的 IL-6^[7-10]。Lisa S.F.等^[10]的试验表明,在无刺激物的情况下肝脏内皮细胞能够产生 IL-6,在培养 6~8 h 后 IL-6 的量达到峰值。本试验中正常培养的心肌膜微血管内皮细胞在 72 h 内低水平表达 IL-6,在 12 h 左右达到峰值。本试验结果与 Lisa S.F.等的结果基本一致,因不同部位的内皮细胞存在异质性,其达到峰值的时间略有差别。

IL-6 是一种可由内皮细胞产生的多效能细胞因子,一直被认为是急性相反应的激活物和淋巴细胞刺激物^[11]。然而,近期研究证明 IL-6 能够对天然免疫的消失和获得性免疫反应的发生进行重要的调节作用,它主要通过对白细胞募集、激活和凋亡过程进行一定

的调控从而对免疫转型起调节作用^[12]。本试验以体外分离培养的乳鼠心肌膜微血管内皮细胞为研究对象,观察到不同浓度的 FMDV 146S 对其分泌的 IL-6 都有很大的影响,说明 MVECs 在 FMDV 146S 诱导的免疫反应中起着重要的作用。国外研究表明,紧急注射口蹄疫疫苗的动物,其 IL-6 的水平升高^[13,14],提示 IL-6 可能在 FMDV 紧急疫苗诱导的免疫防御中起关键的作用。本试验用的 FMDV 146S 是临床常用口蹄疫疫苗的最主要的成分,用它作用于乳鼠心肌膜微血管内皮细胞,检测到 IL-6 分泌呈时间和剂量依赖性,微血管内皮细胞分泌的 IL-6 可以促进 T、B 细胞分化增殖,对激活的 B 细胞最终分化成免疫球蛋白分泌细胞发挥必不可少的作用。更为重要的是 IL-6 能够对机体的天然免疫和获得性免疫进行调节,促进口蹄疫疫苗介导的获得性免疫反应,使其产生较好的保护能力,这也可能是动物体紧急接种口蹄疫疫苗后产生一定的保护力的机理所在。然而口蹄疫疫苗在临床应用中存在免疫耐受,可能是机体产生 IL-6 的量不足的缘故。

实际应用中,口蹄疫疫苗注射后也会对机体产生一定的副作用,如发生炎症反应,本试验中微血管内皮细胞产生的 IL-6 可能与疫苗注射后的副反应有关。Woods A.报道^[1]IL-6 在炎症中起着重要的枢纽作用。Castell J V^[15]报道,IL-6 是唯一一个能刺激所有急性期蛋白合成的因子,它通过促进肝脏合成急性期蛋白,介入炎症的发生。本试验中还观察到 4.0 µg/ml 和 20.0 µg/ml FMDV 146S 作用后 MVECs 形态发生改变,细胞皱缩,表明较高浓度的 FMDV 146S 对 MVECs 有一定程度的损伤作用。

通过研究 FMDV 146S 对体外培养的心肌膜微血管内皮细胞分泌 IL-6 的影响, 提示 MVECs 可能在 FMD 紧急疫苗诱导的免疫防御中起关键的作用, 其分泌的 IL-6 能够促进动物体获得性免疫的发生, IL-6 的分泌量不足可能是口蹄疫疫苗产生免疫耐受的原因之一, 同时它还可能参与炎症反应, 但其机理仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Woods A, Brull D J, Humphries S E, et al. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6 [J]. *European Heart Journal*, 2000, 21: 1574-1583.
- [2] Sehgal P B, Greininger G, Tosato G. Regulation of the acute phase and immune responses: Interleukin-6 [J]. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1989: 557-583.
- [3] Shireman P K, Pearce W H. Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease [J]. *American Journal of Roentgenology*, 1996, 166(2): 127-131.
- [4] 王春奕, 马军武, 伏小平. 口蹄疫病毒的纯化及鉴定 [J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(7): 66-69.
- [5] Shaw M A, Fu-Zhang Wang, Jeffrey Vieira, et al. Human Herpes virus & Interaction with Target Cells Involves Heparan Sulfate [J]. *Virology*, 2001, 282: 245-255.
- [6] Federico B, Stefania M, Guido S, et al. Interactions between endothelial cells and HIV-1 [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33: 371-390.
- [7] Shi Y, Inoue S, Shinozaki R. Release of cytokines from human umbilical vein endothelial cells treated with platinum compounds in vitro [J]. *Cancer Res.*, 1998, 89: 757.
- [8] 吴岩, 祝彼得. 体外人脐静脉内皮细胞分泌 IL-6 的研究 [J]. *四川解剖学杂志*, 2000, 8(3): 129-132.
- [9] Norioka K, Hara M, Harigai M, et al. Production of B cell stimulatory factor-2/interleukin-6 activity by human endothelial cells [C]. *Biochem. Biophys. Res.*, 1988, 153: 1045-1050.
- [10] Lisa S F, Jeanine A T, Debra L. L. Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993, 53: 126-132.
- [11] Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130 [J]. *Blood*, 1995, 86: 1243-1254.
- [12] Simon A, Jones D. Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6 [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 3463-3468.
- [13] Cox S J, Aggarwal N, Statham R J, et al. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD [J]. *Vaccine*, 2003, 21(13-14): 1336-1347.
- [14] Barnett P V, Cox S J, Aggarwal N, et al. Further studies on the early protective responses of pigs following immunization with high potency foot and mouth disease [J]. *Vaccine*, 2002, 20(25-26): 3197-3208.
- [15] Castell J V, Gomez-Lechon M J, David M. Interleukin- is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes [J]. *FEBS Letters*, 1989, 24: 237-239.