

IL-6RFP 在小鼠血吸虫感染中对肝细胞的保护作用

平春光¹ 程海燕¹ 高闻达² 计永胜¹ 刘 森¹ 任翠平¹ 邵延靖¹ 华梦晴¹ 沈际佳¹

摘要 目的 探讨鼠白介素6受体融合蛋白(mIL-6RFP)在BALB/c小鼠日本血吸虫感染模型中对肝细胞的保护作用。方法 通过亲和层析方法获得可阻断白介素-6(IL-6)的mIL-6RFP,经人类肝癌细胞(HepG2)IL-6刺激及阻断实验检测纤维蛋白原(fibrinogen, FGG)和结合珠蛋白(haptoglobin, HP)的mRNA表达变化,体外验证重组蛋白mIL-6RFP的生物活性。建立BALB/c小鼠日本血吸虫感染模型,于感染第24天起经尾静脉注射mIL-6RFP,隔天注射每次100 μg/只,感染第42天剖杀小鼠。HE染色法检测小鼠肝脏肉芽肿面积,荧光定量PCR法检测小鼠肝组织IL-1β、IL-13、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和趋化因子1(CXCL1)的mRNA表达,连续监测法检测小鼠肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)。结果 HepG2细胞实验显示mIL-6RFP可降低IL-6对该细胞的刺激作用,显著下调FGG和HP的表达($P < 0.05$)。在小鼠感染模型中阻断IL-6后,肝功能指标ALT和AST与溶剂对照组相比均显著下降($P < 0.05$),肉芽肿病变无显著性差异。结论 在BALB/c小鼠日本血吸虫感染模型中mIL-6RFP可明显改善肝细胞功能,但对肉芽肿形成未见明显作用。

关键词 IL-6; 日本血吸虫; BALB/c 小鼠

中图分类号 R 383.24; R 392.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1538-05

血吸虫病是一种严重危害人类健康的寄生虫病,目前我国仍是日本血吸虫病流行最严重的国家之一。血吸虫病主要致病机制是虫卵引起的肝脏肉芽肿和纤维化^[1]。白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)在BALB/c小鼠日本血吸虫感染模型肝脏肉芽肿和纤维化的形成中发挥重要作用,感染鼠IL-13水平明显升高,阻断IL-13后纤维化可显著改善^[2-3]。细胞因子IL-17在C57BL/6小鼠日本血吸虫感染模型肝脏肉芽肿的形成中也发挥重要作用,感染鼠IL-17显著升高,采用中和抗体阻断IL-17,小鼠肝脏肉芽肿病变和肝功能损伤都显著减轻^[4]。

有报道^[5]指出在大鼠败血症模型中IL-6显著升高,阻断IL-6可显著降低肝细胞损伤。此外,IL-6在免疫性疾病中可介导免疫损伤^[6]。前期研究^[4]显示IL-6在小鼠日本血吸虫感染模型中显著升高,但IL-6在血吸虫病发病机制中的作用尚不明确。该研究旨在探讨鼠白介素6受体融合蛋白(mouse interleukin-6 receptor fusion protein, mIL-6RFP)在BALB/c小鼠日本血吸虫感染模型中对肝细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 低糖DMEM培养基、胎牛血清和M-MLV逆转录酶购自美国Invitrogen公司;重组人白介素-6(recombinant human interleukin-6, rhIL-6)购自上海普欣生物技术有限公司;SYBR Premix Ex Taq II定量PCR试剂盒购自大连宝生物技术有限公司;BCA蛋白定量检测试剂盒、总蛋白提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒(连续监测法)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)检测试剂盒(连续监测法)购自上海荣盛生物药业有限公司;引物合成由上海生工生物工程有限公司完成;重组蛋白mIL-6RFP由安徽医科大学病原生物学教研室纯化获得;质粒pcDNA3.1携带鼠IL-6受体融合蛋白基因序列(mIL-6RFP-pcDNA3.1)由美国波士顿Antagen生物制药研究所高闻达教授惠赠;本研究所用其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 细胞株及实验动物 人类肝癌细胞(HepG2)购自中科院上海细胞库;SPF级BALB/c小鼠6~8周龄,雌性,购自安徽省实验动物中心;日本血吸虫感染阳性钉螺购自江苏省血吸虫病防治研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 mIL-6RFP活性验证 取对数生长期HepG2细胞,接种于6孔板中,细胞浓度为 2.5×10^5 /ml,2 ml/孔,完全低糖DMEM(含10% FBS、100 IU/ml双抗),37℃、5% CO₂、饱和湿度培养24 h。HepG2细胞饥饿处理,将完全低糖DMEM更换成不含血清的低糖DMEM,继续培养24 h^[7],再将培养基更换成

2015-05-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30972569、81471982)

作者单位:¹安徽医科大学病原生物学教研室,合肥 230032

²美国安泰吉生物技术与制药有限公司,波士顿 02118

作者简介:平春光,男,硕士研究生;

沈际佳,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shenjijia

@hotmail.com

完全低糖 DMEM。参照文献^[8] 设置如下实验,正常对照组不做任何特殊处理;IL-6 刺激组添加 rhIL-6,使其终浓度为 100 ng/ml;IL-6 阻断组,rhIL-6 和 mIL-6RFP 以分子数之比为 1:40 混合,37 °C 孵育 30 min 后将混合物添加到相应培养孔;溶剂对照组添加与 IL-6 阻断组等体积的蛋白溶剂。各组添加相应试剂后继续培养 4 h,收集各孔细胞。以上实验重复 3 次。

1.2.2 HepG2 细胞总 RNA 提取和 RT-PCR 6 孔板中各组细胞用预冷的 PBS 洗 2 次,每孔加 TRIzol 试剂 1 ml,反复吹打后转移到 1.5 ml EP 管,提取总 RNA。采用 Nano Drop 仪器检测 RNA 浓度后,根据 M-MLV 逆转录酶说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA。按照 SYBR Premix Ex Taq II 定量 PCR 试剂盒的操作步骤配制 RT-PCR 反应体系 20 μ l,设置反应条件,采用 GAPDH 作为本实验的内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 RT-PCR 数据进行分析,判断各组细胞纤维蛋白原(fibrinogen, FGG)和结合珠蛋白(haptoglobin, HP)的 mRNA 表达差异。本次及后续定量 PCR 实验所需引物见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
hFGG	F: TATTACCAAGGTGGCACTTACTC R: CATTATCATAACCATTAGGAGTAGATG
hHP	F: TCACGGATATCGCAGATGACG R: CACATAGCCATGTGCAATCTCG
hGAPDH	F: GGGAAGCTTGTTCATCAATGGA R: TCTCGCTCTGGAAGATGGT
mIL-1 β	F: CTGAACTCAACTGTGAAATGC R: TGATGTGCTGCTGCCGAGA
mIL-13	F: CCTGGCTCTTGCTTGCCTT R: GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
mIL-17	F: ACCGCAATGAAGACCCTGAT R: ACCGCAATGAAGACCCTGAT
mTNF- α	F: ACTGGCAGAAGAGGCACTC R: CTGGCACCCTAGTTGGTTG
mCXCL1	F: GGCTGGGATTCACCTCAA R: AACCAAGGGAGCTTCAGG
m β -actin	F: AGAGGGAAATCGTGCCTGAC R: CAATAGTGATGACCTGGCCGT

h: 人类; m: 小鼠

1.2.3 实验动物模型及 IL-6 阻断 18 只 BALB/c 小鼠随机分成正常对照组、溶剂对照组和 IL-6 阻断组。将感染了日本血吸虫的阳性钉螺置于 25 ~ 28 °C 温水中,用白炽灯照射至尾蚴逸出,IL-6 阻断组和溶剂对照组每鼠经腹部皮肤感染尾蚴(20 \pm 2) 条。

IL-6 阻断组小鼠感染第 24 天开始经尾静脉注射 mIL-6RFP,每隔 1 d 注射,每次 100 μ g/只,直至第 40 天注射最后 1 次,第 42 天剖杀。溶剂对照组注射等体积的蛋白溶剂,方法同 IL-6 阻断组。正常对照组不做任何特殊处理。

1.2.4 标本采集 小鼠于感染第 42 天剖杀,采集所需标本。小鼠全血采集后于 37 °C 温箱静置 1 h,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-80 °C 保存。采集肝脏标本,采集肝左叶用 10% 福尔马林固定;从相同部位采集 2 块肝脏,每块约 0.1 g,分别用于 RT-PCR 检测和虫卵计数。

1.2.5 小鼠肝脏虫卵计数 将肝脏置于青霉素瓶,每 0.1 g 肝脏加 1 ml 5% KOH 溶液,充分剪碎,37 °C 温箱消化 3 h,期间每 0.5 h 晃动 1 次以促进消化。消化结束后充分混匀,每次吸取 20 μ l 涂片,普通光学显微镜下(\times 40) 计虫卵数,每鼠计数 3 次,取平均数。

1.2.6 小鼠肝脏肉芽肿病变检测 取 10% 福尔马林固定的肝组织,石蜡包埋,切片厚度 4 μ m,每鼠切 3 个部位,每部位 1 张切片。经 HE 染色,普通光学显微镜下(\times 40) 拍照,采用 Image Tool 3.0 软件分别圈出每张切片的肉芽肿面积和总面积,分别计算 IL-6 阻断组和溶剂对照组中每只小鼠肉芽肿面积所占比例。

1.2.7 小鼠血清 ALT 和 AST 检测 采用连续监测法检测血清 ALT 和 AST 的活性。试剂 1 和试剂 2 按照 4:1 的比例混匀即为工作液,将 50 μ l 血清加入 1 ml 工作液中混匀,分别检测样本混匀后 1、2、3 min 时的吸光度值(absorbance, A) A1、A2 和 A3,波长 340 nm。计算平均变化吸光度($\Delta A/\text{min}$)。浓度换算按如下公式: ALT(IU/L) = $\Delta A/\text{min} \times 3\ 376$ 。AST 检测和换算方法与 ALT 相同。

1.2.8 小鼠肝脏组织总 RNA 提取和 RT-PCR 将肝脏组织从 RNAlater 溶液中取出,放入 TRIzol 溶液中,充分剪碎后电动匀浆器匀浆,提取总 RNA。采用 Nano Drop 仪器检测 RNA 浓度后,根据 M-MLV 逆转录酶说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA。按照 SYBR Premix Ex Taq II 定量 PCR 试剂盒的操作步骤配制 RT-PCR 反应体系 20 μ l,设置反应条件,采用 β -actin 作为本实验的内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 RT-PCR 数据进行分析,判断各组肝组织中 IL-1 β 、IL-13、TNF- α 和 CXCL1 的 mRNA 表达差异。

1.3 统计学处理 运用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用 *t* 检

验;多组均数的比较采用单因素方差分析,并采用LSD法进行两两比较。

2 结果

2.1 mIL-6RFP 的体外生物活性验证 FG和HP的mRNA表达水平在正常对照组、IL-6刺激组、IL-6阻断组和溶剂对照组中的差异均有统计学意义($F = 40.593, 111.687, P < 0.05$)。两两比较显示,FG和HP的mRNA表达水平在正常对照组和溶剂对照组中的差异均无统计学意义。IL-6阻断组中FG和HP的mRNA表达水平均低于IL-6刺激组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明mIL-6RFP具有阻断IL-6的生物活性。见图1。

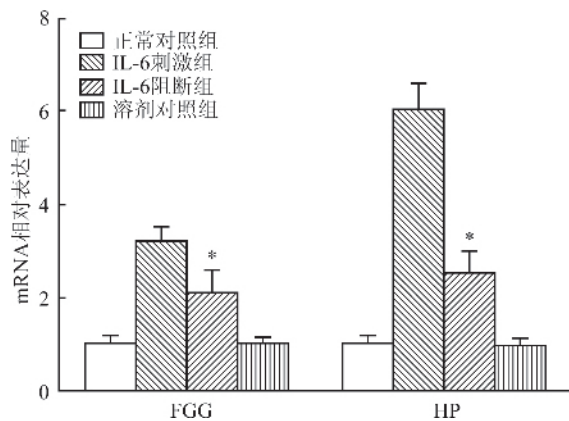


图1 mIL-6RFP的体外活性验证
与IL-6刺激组比较: * $P < 0.05$

2.2 肝脏虫卵计数 各组小鼠于血吸虫尾蚴感染第42天剖杀,小鼠肝脏虫卵计数结果显示溶剂对照组和IL-6阻断组虫卵密度比较差异无统计学意义,表明两组感染程度一致,后续实验具有可比性,见图2。

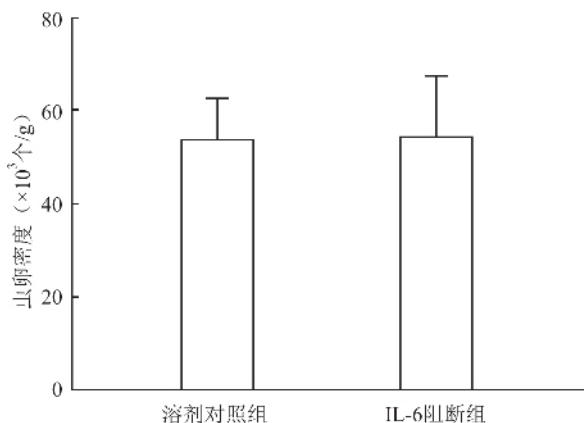


图2 肝脏虫卵计数

2.3 肝脏肉芽肿病变检测 小鼠肝脏切片经HE染色,溶剂对照组和IL-6阻断组均能观察到明显的肉芽肿病变,说明造模成功,见图3B、3C。小鼠肝脏切片经HE染色后采用Image Tool 3.0软件处理,分别计算溶剂对照组和IL-6阻断组中每只小鼠肉芽肿面积所占比例,溶剂对照组和IL-6阻断组肉芽肿面积比例无差异,见图3D。

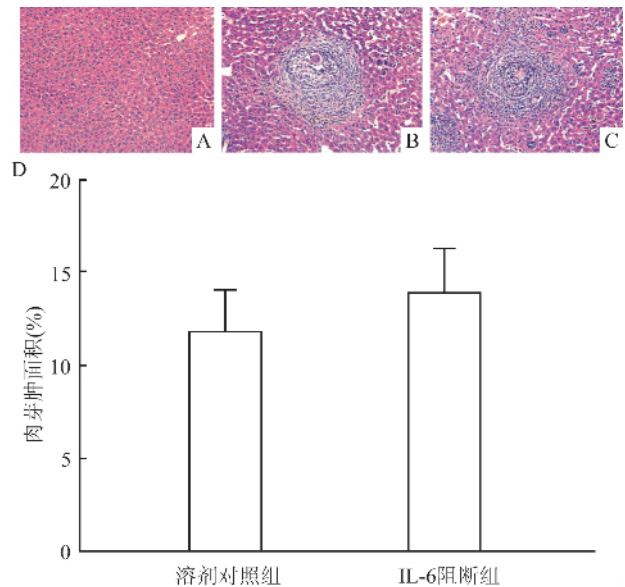


图3 肝脏肉芽肿病变检测

A、B、C: 正常对照组、溶剂对照组、IL-6阻断组小鼠肝脏HE染色示意图($\times 200$); D: 肉芽肿面积比例

2.4 肝功能指标ALT和AST检测 ALT和AST的活性在正常对照组、溶剂对照组和IL-6阻断组中的差异均有统计学意义($F = 48.600, 41.476, P < 0.05$)。正常对照组小鼠肝功能指标ALT均值为26 IU/L,AST均值为30 IU/L,两者都在正常范围(< 40 IU/L)。溶剂对照组小鼠肝功能指标ALT均值为306 IU/L,AST均值为348 IU/L;IL-6阻断组小鼠在阻断IL-6后肝功能指标ALT均值为135 IU/L,AST均值为175 IU/L。两两比较中,ALT和AST的活性在IL-6阻断组中均低于溶剂对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明IL-6阻断组中mIL-6RFP蛋白对血吸虫感染小鼠肝功能指标ALT和AST活性均起到明显的降低作用。见图4。

2.5 细胞因子和趋化因子mRNA水平检测 IL-1 β 、IL-13、TNF- α 和CXCL1的mRNA水平表达在正常对照组、溶剂对照组和IL-6阻断组中的差异均有统计学意义($F = 20.365, 9.020, 20.514, 31.654, P < 0.05$)。两两比较中,IL-1 β 、IL-13、TNF- α 和CXCL1的mRNA表达水平在溶剂对照组和IL-6阻断

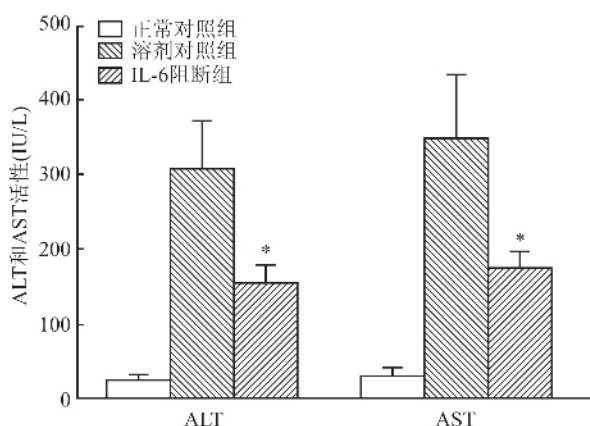


图4 肝功能 ALT 和 AST 活性检测结果
与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

组中均高于正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而溶剂对照组和 IL-6 阻断组的差异均无统计学意义。见图 5。

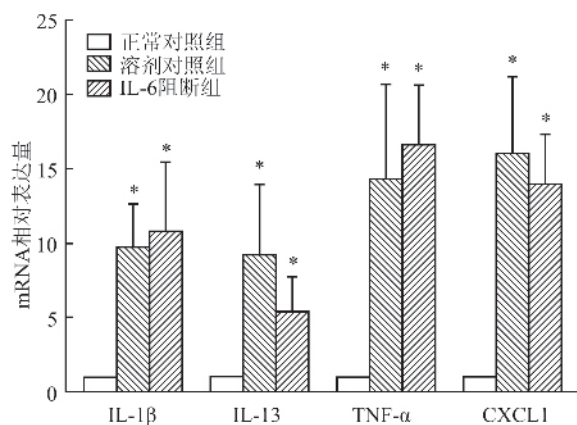


图5 细胞因子和趋化因子 mRNA 水平检测
与正常对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

IL-6 信号活化存在经典途径和间接途径两种方式。经典途径即 IL-6 先与膜结合型受体 IL-6R 结合,而后与 gp130 二聚体作用将信号转导到胞内;间接途径即 IL-6 先与可溶型受体 sIL-6R 结合,再与细胞膜上的 gp130 二聚体作用将信号转导到胞内^[9]。间接途径使 IL-6 的靶细胞不再局限于细胞膜上同时表达 IL-6R 和 gp130 二聚体的细胞,而是所有细胞膜上表达 gp130 二聚体的细胞都成为其潜在靶细胞^[10]。IL-6 具多种生物学功能,可诱导急性期反应蛋白表达、T 细胞激活和 B 细胞的分化,因此在炎症性疾病发生发展中起重要作用^[11]。此外,IL-6 参与多条促进肿瘤细胞增殖、转移和血管生成等的信号通路^[12]。因此阻断 IL-6 信号通路成为治疗相关疾

病的重要策略,IL-6R 的单克隆抗体塔西单抗已作为治疗类风湿性关节炎、卡斯特莱曼病和全身型关节炎的药物应用于临床,并有可能通过进一步研究用于治疗更多其它的自身免疫性疾病和慢性炎症性疾病^[13]。本研究所用的重组蛋白 mL-6RFP 基因序列长度为 2 088 bp、分子量为 94 ku,由 gp130 配体结合域、IL-6R 配体结合域和 HisTag 标签三部分组成^[14]。重组蛋白 mL-6RFP 是一种 IL-6 拮抗剂,在其 IL-6R 配体结合域能和 gp130 配体结合域共同作用下可阻断 IL-6 与受体的结合,从而抑制 IL-6 的生物效应^[8]。

本次细胞实验所用 HepG2 细胞表达 IL-6R,用 IL-6 刺激后 FGG 和 HP 的 mRNA 水平呈现高表达^[7]。实验中 mL-6RFP 通过与 IL-6R 竞争性结合 IL-6,抑制 IL-6 生物效应,表明获得的 mL-6RFP 是一种有生物学活性的蛋白,为进一步研究 IL-6 在相关疾病模型中的作用提供了有用的材料。虽然 IL-6 在 C57BL/6 小鼠日本血吸虫感染模型中表达显著升高,但 IL-6 在此模型中所起的作用尚不清楚^[4]。本研究的动物实验结果显示 mL-6RFP 不能使 IL-6 阻断组小鼠肝脏肉芽肿病变发生明显改变,由此推测其它因素在起作用。在 IL-6 阻断组小鼠肝脏中 IL-1 β 、IL-13、TNF- α 和 CXCL1 的 mRNA 水平均显著升高,这与这些炎症性细胞因子和趋化因子在肉芽肿形成和发展中起重要作用的报道^[3-4]相符。该结果部分解释了 IL-6 在 BALB/c 小鼠日本血吸虫感染模型肝脏肉芽肿形成中不起主要作用,IL-1 β 、IL-13、TNF- α 和 CXCL1 在本动物模型中是更强的致炎因素。而 IL-17 在 C57BL/6 小鼠日本血吸虫感染模型肉芽肿形成过程中发挥重要作用,采用 IL-17 中和抗体阻断 IL-17 后肝脏肉芽肿病变显著减轻^[4],并且 IL-6 在 Th17 细胞的分化过程中发挥一定的作用^[12]。但该研究中动物实验结果显示 BALB/c 小鼠的 IL-17 mRNA 水平在溶剂对照组和 IL-6 阻断组中表达量均未升高,与 C57BL/6 小鼠日本血吸虫感染模型结果不同,这可能与两种品系小鼠免疫系统反应差异有关。

研究^[5]报道在大鼠败血症模型中,肝细胞受到损伤后 ALT 和 AST 显著增高,同时发现 IL-6 的 mRNA 水平和蛋白水平也明显增高,采用抑制剂 (EX527) 可阻断 IL-6 的生物效应,即抑制了 IL-6 对肝功能指标 ALT 和 AST 活性的影响。本次动物实验肝功能指标检测结果显示 ALT 和 AST 在 IL-6 阻断组比溶剂对照组显著下降,因为 mL-6RFP 在小

鼠体内能结合 IL-6 并阻断其生物效应,从而抑制 IL-6 对肝细胞酶活性的影响,显示了其可改善肝功能指标的作用。

参考文献

- [1] Ross A G , Olvedab R M , Acosta L , et al. Road to the elimination of schistosomiasis from Asia: the journey is far from over[J]. *Microbes Infect* ,2013 ,15(13) : 858 - 65.
- [2] Chuah C , Jones M K , Burke M L , et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology[J]. *Trends Parasitol* ,2014 ,30(3) : 141 - 50.
- [3] Li X , Shen J , Zhong Z , et al. Paeoniflorin ameliorates schistosomiasis liver fibrosis through regulating IL-13 and its signalling molecules in mice[J]. *Parasitology* ,2010 ,137(8) : 1213 - 25.
- [4] Zhang Y , Chen L , Gao W , et al. IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *Schistosoma japonicum* infected mice [J]. *Eur J Immunol* ,2012 ,42(6) : 1523 - 35.
- [5] Ding Y , Lin Y , Zhu T , et al. Interleukin 6 increases dysfunction of organs in sepsis rats through sirtuin 1 [J]. *Int J Clin Exp Med* ,2014 ,7(9) : 2593 - 8.
- [6] Murakami M , Hirano T. The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation[J]. *Int J Biol Sci* ,2012 ,8(9) : 1267 - 80.
- [7] Brock M , Trenkmann M , Gay R E , et al. MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes [J]. *J Biol Chem* ,2011 ,286(46) : 40142 - 50.
- [8] Metz S , Wiesinger M , Vogt M , et al. Characterization of the interleukin (IL) -6 inhibitor IL-6-RFP: fused receptor domains act as high affinity cytokine-binding proteins [J]. *J Biol Chem* ,2007 ,282(2) : 1238 - 48.
- [9] Jones S A , Scheller J , Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling [J]. *J Clin Invest* ,2011 ,121(9) : 3375 - 83.
- [10] Garbers C , Hermanns H M , Schaper F , et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines [J]. *Cytokine Growth Factor Rev* ,2012 ,23(3) : 85 - 97.
- [11] Garbers C , Aparicio-Siegmund S , Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition [J]. *Curr Opin Immunol* ,2015 ,34C: 75 - 82.
- [12] Maddur M S , Miossec P , Kaveri S V , et al. Th17 cells: biology , pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases , and therapeutic strategies [J]. *Am J Pathol* ,2012 ,181(1) : 8 - 18.
- [13] Tanaka T , Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Int J Biol Sci* ,2012 ,8(9) : 1227 - 36.
- [14] 程海燕 高闻达 任翠平 等. 鼠 IL-6 受体融合蛋白的表达及初步鉴定 [J]. *安徽医科大学学报* 2014 49(8) : 1088 - 91.

IL-6RFP can protect liver function in the model of mice infected with *Schistosoma japonicum*

Ping Chunguang¹ , Cheng Haiyan¹ , Gao Wenda² , et al

(¹Dept of Microbiology and Parasitology , Anhui Medical University , Hefei 230032;

²Antagen Pharmaceuticals , Inc. , Boston 02118)

Abstract Objective To explore the role of mouse interleukin-6 receptor fusion protein (mIL-6RFP) for the protection of liver cells in the model of BALB/c mice infected with *Schistosoma japonicum*. **Methods** Nickel ion column was used to obtain purified recombinant mIL-6RFP protein. *In vitro* , HepG2 cells were used to verify the biological activity of mIL-6RFP. BALB/c mice were administrated by tail vein injection with 100 μg of mIL-6RFP or equal volume solvent , at 24 , 26 , 28 , 30 , 32 , 34 , 36 , 38 , and 40 days after infection. Mice were sacrificed 48 h after the last injection. The granuloma size was measured in the mouse liver by HE staining. Interleukin-1β (IL-1β) , interleukin-13 (IL-13) , tumor necrosis factor-α (TNF-α) and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) mRNA levels in mouse liver tissue were detected by RT-PCR. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were measured by the continuous monitoring method. **Results** HepG2 cells experiments showed that mIL-6RFP could reduce the effect of IL-6 on HepG2 cells , fibrinogen (FGG) and haptoglobin (HP) was significantly reduced (*P* < 0.05) . In the BALB/c mice infected with *Schistosoma japonicum* , when IL-6 was blocked the levels of ALT and AST were decreased significantly (*P* < 0.05) compared with that of the solvent group , while there was no significant difference on granuloma formation. **Conclusion** In the BALB/c mice infected with *Schistosoma japonicum* , mIL-6RFP can significantly improve the liver function but no obvious effect on granuloma formation.

Key words IL-6; *Schistosoma japonicum*; BALB/c mice