

肠道病毒 EV71 感染对 T 细胞免疫功能影响的研究

杜伯雨 白璐 沈岩 缪时英 王琳芳

摘要 目的 探讨肠道病毒 EV71 感染对 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞免疫功能的影响。**方法** 首先,用 RT-PCR 和免疫荧光的方法检测 EV71 能否感染 Jurkat 细胞,其次用 Annexin V-FITC 试剂检测 EV71 感染后的 Jurkat 细胞凋亡的情况,最后用 ELISA 的方法分析感染后的 Jurkat 细胞分泌细胞因子的情况。**结果** EV71 能够感染 Jurkat 细胞,并能够引起 Jurkat 细胞的凋亡,同时 EV71 感染还能导致 Jurkat 细胞分泌细胞因子 IL-2, IFN- γ , IL-6 和 IL-10 的能力下降。**结论** EV71 病毒感染对机体免疫功能的影响是多方面的,它不但能够诱导 T 细胞的凋亡,还能引起 T 细胞分泌细胞因子的能力降低,从而在数量和功能上影响参与免疫应答的 T 淋巴细胞。

关键词 EV71 T 细胞 免疫力

The Effects of Enterovirus 71 Infection on the Ability of T Cellular Immunity. Du Boyu, Bai Lu, Shen Yan, Miao Shiyang, Wang Linfang. The National Laboratory of Medical Molecular Biology, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the effects of Enterovirus 71 infection on the immune function of Jurkat cells. **Methods** First, the fact that Jurkat cells could be infected by EV71 had been detected by RT-PCR and immunofluorescence. Second, the apoptosis of Jurkat cells after EV71 infection was detected by Annexin V-FITC. Third, the cytokine secretion ability of Jurkat cells was analyzed by ELISA assay. **Results** EV71 could infect Jurkat cells. The infection could induce apoptosis. Meanwhile, the ability of Jurkat cells to secrete cytokine include IL-2, IFN- γ , IL-6 and IL-10 could also be weakened by the infection of EV71. **Conclusion** The immune function could be extensively affected after EV71 infection. Not only the apoptosis but also the cytokine secretion decreasing could be induced by EV71 infection. In summary, the quantities and function of those T lymphocytes, which was involved in the immune response, could be affected by EV71 infection.

Key words Enterovirus 71; T cells; Immunity

肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)是人肠道病毒的一种,其感染性强且致病率高,对中枢神经系统的侵害尤其严重^[1]。EV71 于 1969 年首次从加利福尼亚患有中枢神经系统疾病的婴儿粪便标本中获得分离。不同亚型感染所致临床症状不尽相同,常见临床症状包括引起患者手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)和无菌性脑膜炎、脑干脑炎以及脊髓灰质炎样的麻痹等多种与神经系统相关的疾病,致残率及病死率较高^[2]。手足口病是全球性传染病,近年来手足口病已成为越来越威胁国内外儿童健康的广泛流行性疾病之一。自 1974 年首次报道以来, EV71 已在世界范围内引起 10 多次暴发与流行。1998 年我国台湾地区 EV71 感染出现大暴发。近几

年来,在我国广东、福建、上海、重庆等地区均有局部流行的报道。因此, EV71 感染及流行是值得我们密切关注的问题。EV71 属小 RNA 病毒科,肠道病毒属成员。病毒基因组为 7408 个核苷酸的单股正链 RNA。EV71 病毒主要通过口腔进入消化道。病毒首先在咽和肠道淋巴组织进行繁殖扩增,然后通过形成病毒血症进行扩散,进一步在网状内皮细胞中扩增,最终侵犯脑膜、脊髓和皮肤等靶器官。EV71 感染者常见的显著特征为 T 淋巴细胞显著下降^[3]。此外,合并肺水肿的 EV71 感染者,某些细胞因子,如 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13 和 IFN- γ 的水平高于单独的脑膜炎患者^[4]。这些结果表明,异常的免疫活化可能与 EV71 的感染密切相关。

为进一步研究 EV71 的感染对机体免疫系统的影响,分析 EV71 感染免疫细胞后,对细胞免疫功能的影响。本课题中,我们用 EV71 病毒感染人 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞,以判断 EV71 能否感染 T 淋巴细

作者单位:100005 北京,国家医学分子生物学重点实验室、中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院基础学院(杜伯雨、沈岩、缪时英、王琳芳);100020 北京市疾病预防控制中心(白璐)

通讯作者:王琳芳,电子信箱:lfwangz@yahoo.com

胞,感染后的 Jurkat 细胞能否发生凋亡,以及 EV71 的感染对 Jurkat 细胞分泌细胞因子的影响,从而为阐明 EV71 的致病机制奠定基础。

材料与方法

1. 材料:Jurkat 细胞购自北京协和医学院细胞中心,以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养。小牛血清为 Gibco 公司产品,细胞培养用 RPMI1640 和 MEM 购自 Hyclone 公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,TaqDNA 聚合酶购自盈信阳光公司。MMLV 反转录酶、Oligo (dT) 15 引物、RNA 酶抑制剂均购自 Promega 公司。免疫荧光用鼠抗 EV71 单克隆抗体购自 Chemicon 公司。TRITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为中杉金桥公司产品。Annexin V - FITC 凋亡检测试剂盒购自宝赛公司。豆蔻酰佛波酸乙酯为 Sigma 公司产品。细胞因子检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。

2. 方法:(1)细胞培养:Jurkat 细胞,以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 悬浮培养。RD - A 细胞,以含 10% 小牛血清的 MEM 贴壁培养。(2)病毒培养与效价测定:EV71 病毒以感染复数 (MOI) = 1 的条件感染单层培养的 RD - A 细胞。37℃ 培养,36h 后收集细胞上清,1000g 离心 10min 去除细胞碎片,然后用 0.45μm 的滤膜过滤除菌,病毒液分装后储存于 - 70℃ 冰箱中备用。病毒效价采用 CCID50 的方法进行测定,即以 2% FBS 的 MEM 维持液 10 倍系列稀释为 10^{-8} ~ 10^{-1} 病毒液,各加入细胞板内,每孔 50μl,每稀释度 4 孔细胞;每孔加细胞悬液 50μl,同时设细胞对照,37℃ 培养 7 天,观察细胞病变。按 Behrens - Kärber 公式计算出分离病毒株的 CCID50;即 $\lg\text{CCID50} = L - d(S - 0.5)$,其中:L = 实验中使用的最低稀释度的 lg 值;d = 稀释梯度的 lg 值;S = 终判时阳性部分的总和。(3)免疫荧光检测 EV71 感染 Jurkat 细胞 EV71 病毒以 MOI = 5 的条件感染 1×10^6 Jurkat 细胞。同时设立阴性对照及阳性对照 (RD - A 细胞) 37℃ 培养,24h 后吸弃病毒液,磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻洗细胞 3 次,离心细胞固定于 24 孔板上,每孔加入 500μl 预冷的甲醛, - 20℃ 固定 20min。PBS 洗细胞后,加鼠抗 EV71 单克隆抗体 (1:200 稀释) 37℃ 孵育 1h。PBS 洗细胞 3 次,每孔加入 1:200 稀释的 TRITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:200 稀释),37℃ 孵育 1h,荧光显微镜下观察 EV71 感染细胞的情况。(4)RT - PCR 检测 EV71 感染 Jurkat 细胞:EV71 病毒以 MOI = 5 的条件感染 1×10^6 Jurkat 细胞。同时设立阴性对照及阳性对照 (RD - A 细胞) 37℃ 培养,24h 后收集细胞,提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA 第 1 链。以 EV71 特异性引物 (上游引物:5' - GCA GCC CAA AAG AAC TTC AC - 3',下游引物:5' - ATT TCA GCA GCT TGG AGT GC - 3') 扩增 cDNA 第 1 链,PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min,然后按如下参数进行 30 个循环:94℃ 变性 30s,45℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10min。1% DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,以检测 EV71 感染细胞的情况。(5)FACS 分析感染 EV71 后 Jurkat 细胞的凋亡情况:EV71 病毒以 MOI = 5 的条件感染 1×10^6 Jurkat 细胞。同时设立阴性

对照,37℃ 培养,24h 后收集细胞,调整待测细胞的浓度为 5×10^5 ~ 1×10^6 个/毫升,然后取 1ml 细胞,1000r/min,4℃ 离心 10min,弃上清,加入 1ml 预冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,1000r/min,4℃ 离心 10min,弃上清,洗细胞 3 次后,将细胞重悬于 200μl Binding Buffer (试剂盒中提供),然后加入 10μl Annexin V - FITC 和 5μl PI,轻轻混匀,避光 4℃ 反应 30min。加入 300μl Binding Buffer,在流式细胞仪上检测 Jurkat 细胞的凋亡情况。(6)ELISA 检测感染 EV71 后 Jurkat 细胞的分泌细胞因子的情况:EV71 病毒以 MOI = 5 的条件感染经豆蔻酰佛波酸乙酯 (phorbol myristate acetate, PMA) 刺激后的 1×10^6 Jurkat 细胞。同时设立阴性对照,37℃ 培养,48h 后收集细胞上清,ELISA 双抗体夹心法测定细胞因子含量,即 IL - 2,IL - 6,IL - 10 和 IFN - γ 在蛋白水平上的表达情况。(7)统计学分析:各组实验数据以 *t* 检验判断组间差异显著性, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异。

结 果

1. EV71 感染 Jurkat 细胞:为了判断 EV71 病毒是否能够感染 T 淋巴瘤细胞,我们首先用 EV71 病毒以 MOI = 5 的条件感染 Jurkat 细胞。37℃ 培养,24h 后收集细胞,提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA 第 1 链,以 EV71 特异性引物进行 RT - PCR 检测。结果如图 1 所示,第 1 泳道为 EV71 感染的 RD - A 细胞,可见 226bp 的目的条带,此为阳性对照;第 2 泳道为 EV71 感染的 Jurkat 细胞,可见 226bp 的目的条带;第 3 泳道为未染毒的 Jurkat 细胞对照,此为阴性对照。因此,RT - PCR 结果表明 EV71 能够感染 Jurkat 细胞。为了更直接地证明 Jurkat 细胞能被 EV71 感染,我们用免疫荧光的方法对其进行验证。感染 EV71 的 Jurkat 细胞,相继加入抗 EV71 单克隆抗体和荧光标记的二抗,荧光显微镜下观察 EV71 感染细胞的情况。结果如图 2 所示,荧光显微镜下可见 Jurkat 细胞能被 EV71 感染。

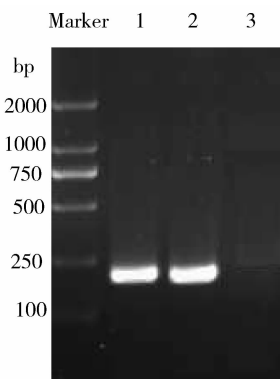


图 1 EV71 感染细胞后的 RT - PCR 结果

第 1 泳道为 EV71 感染的 RD - A 细胞 RT - PCR 结果;第 2 泳道为 EV71 感染的 Jurkat 细胞 RT - PCR 结果;第 3 泳道为未染毒的 Jurkat 细胞对照 RT - PCR 结果



图2 EV71 感染 Jurkat 细胞的免疫荧光结果

左图为 EV71 感染的 RD - A 细胞;中图为 EV71 感染的 Jurkat 细胞;右图为未染毒的 Jurkat 细胞对照

2. EV71 引起 Jurkat 细胞发生凋亡:EV71 病毒以 MOI = 5 的条件感染 Jurkat 细胞。24h 后收集细胞,按照 Annexin V - FITC 凋亡检测试剂盒的操作说明,对细胞进行 Annexin V - FITC 和 PI 染色,结果如图 3,染毒 24h 后,凋亡的 Jurkat 细胞比例为 57%

(22% + 35%)。其中早期凋亡的细胞,即 Annexin V - FITC 单阳的细胞占 35%,晚期凋亡的细胞,即 PI 和 Annexin V - FITC 双阳性细胞占 22%。结果提示, EV71 的感染能够引起 Jurkat 细胞发生凋亡。

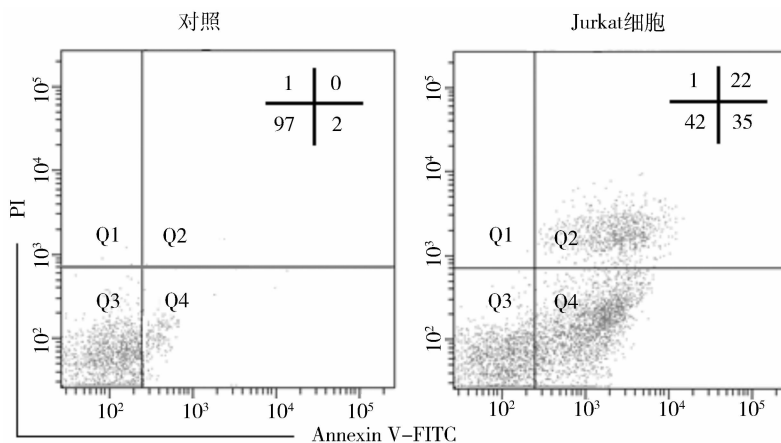


图3 EV71 感染引起 Jurkat 细胞发生凋亡

左图为未染毒的细胞对照流式细胞仪检测结果;右图为 EV71 感染的 Jurkat 细胞流式细胞仪检测结果

3. EV71 感染引起 Jurkat 细胞分泌细胞因子功能改变:既然 EV71 能够诱导 Jurkat 细胞发生凋亡,使其在免疫细胞数量上受到影响,我们于是推测感染 EV71 也可对淋巴细胞分泌细胞因子的功能产生影响。为证实这一推测,我们检测了感染 EV71 后 Jurkat 细胞分泌细胞因子的情况,结果如图 4 所示,染毒后的 Jurkat 细胞无论对 Th1 型细胞因子(IL - 2, IFN - γ),还是对 Th2 型细胞因子(IL - 6, IL - 10)的分泌能力均有所下降。其中,变化最显著的为 IL - 2 分泌能力的下降 ($P < 0.05$)。

讨 论

EV71 病毒的感染渠道很普遍,儿童和成人都可

能被感染,5 岁以下儿童多发。很多成人因为自身免疫功能比较完善,感染病毒后并不发病或发病无症状,成为隐性的病毒传染源。提示该病毒的感染与机体的免疫力密切相关。本研究中,我们首先证实 EV71 病毒能够感染人 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞。其次,我们的研究结果显示, EV71 病毒感染 Jurkat 细胞后,能够诱导细胞发生凋亡。以往的研究证明 EV71 的感染能够导致其他细胞系发生凋亡,如横纹肌肉瘤,胶质母细胞瘤和内皮细胞^[5-7]。因此, EV71 诱导的淋巴细胞凋亡可能是病毒在入侵机体、引起病变过程中的一种自我保护机制,以此来限制和阻止 T 细胞所引发的细胞特异性免疫应答对病毒的清除。实际

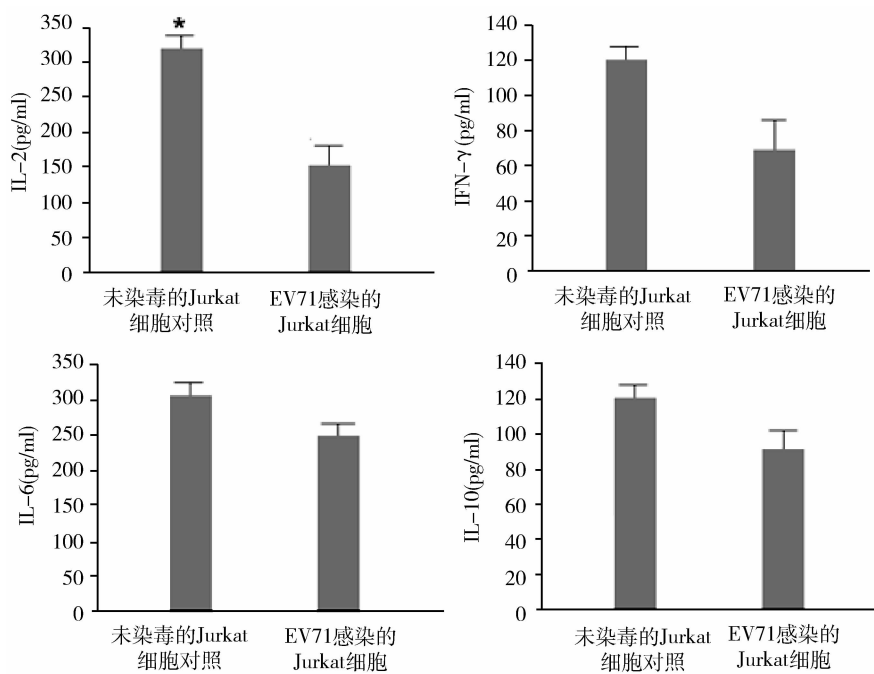


图 4 ELISA 检测 EV71 感染后 Jurkat 细胞分泌细胞因子水平的变化 ($P < 0.05$)

上,在许多 EV71 感染严重的患者中,T 细胞的耗竭比较常见^[8]。最后,我们初步探讨了 EV71 感染后 Jurkat 细胞分泌细胞因子的变化。我们选择了 Th1 型细胞因子,IL-2 和 IFN-γ 以及 Th2 型细胞因子 IL-6 和 IL-10。我们的研究结果提示 EV71 病毒感染 Jurkat 细胞后,无论 Th1 型细胞因子还是 Th2 型细胞因子的分泌能力均有所下降。

EV71 病毒感染对机体免疫功能的影响是多方面的,它不但能够诱导 T 细胞发生凋亡,从而在数量上使参与免疫应答的 T 细胞减少;同时它还能引起 T 细胞分泌细胞因子的能力降低,从而在功能上使参与免疫应答的 T 细胞失能。因此,对于当前流行的 EV71 感染性疾病,在没有特效治疗的情况下,完善自身免疫功能就显得尤为重要。

参考文献

- Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129(3): 304-309
- Lin TY, Chang LY, Huang YC, et al. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for

early recognition and therapy [J]. Acta Paediatr, 2002, 91(6): 632-635

- Lin TY, Hsia SH, Huang YC, et al. Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system [J]. Clin Infect Dis, 2002, 36(3): 269-274
- Wang SM, Lei HY, Huang KJ, et al. Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema [J]. J Infect Dis, 2003, 188(4): 564-570
- Shih SR, Tsai KN, Li YS, et al. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis* [J]. J Med Virol, 2003, 70(1): 119-125
- Li ML, Hsu TA, Chen TC, et al. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis [J]. Virology, 2002, 293(2): 386-395
- Liang CC, Sun MJ, Lei HY, et al. Human endothelial cell activation and apoptosis induced by enterovirus 71 infection [J]. J Med Virol, 2004, 74(4): 597-603
- Chen LC, Shyu HW, Chen SH, et al. Enterovirus 71 infection induces Fas ligand expression and apoptosis of Jurkat cells [J]. J Med Virol, 2006, 78(6): 780-786

(收稿:2010-03-26)

欢迎订阅

欢迎赐稿