

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49 (7):960-964; 4 July 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 水泡性口炎病毒对 IPEC-J2 细胞因子转录时相的影响

魏战勇<sup>1,2</sup>, 王学斌<sup>2</sup>, 王亚宾<sup>1</sup>, 张红英<sup>1</sup>, 陈红英<sup>2</sup>, 杨明凡<sup>1</sup>, 崔保安<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

(<sup>2</sup>河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002)

**摘要:** 【目的】为了更好的了解水泡性口炎病毒 (VSV) 感染后引起细胞炎性反应特别是炎性细胞因子的反应, 探讨宿主-病毒之间的作用关系。【方法】我们运用荧光定量 PCR 技术, 测定和分析 VSV 感染 IPEC-J2 细胞引起的病毒 RNA 量的变化和细胞因子 IL-2、6、8、10、12、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  和 TLR3 分泌水平。【结果】我们发现, VSV 感染后引起 IPEC-J2 细胞分泌 IL-6、8、12、TNF- $\alpha$  和 TLR3 显著增加, TGF- $\beta$  无显著差异; IPEC-J2 细胞不分泌 IL-2、IL-10、IFN- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 。【结论】水泡性口炎病毒感染可引起 IPEC-J2 细胞炎性分子分泌增加。

**关键词:** 水泡性口炎病毒; 细胞因子; IPEC-J2 细胞; 转录时相

**中图分类号:** S852.65    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0960-05

水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 属于弹状病毒科 (Rhabdoviridae) 水泡病毒属 (Vesiculovirus), 是一种含有线状、负义、单链 RNA 病毒<sup>[1]</sup>。VSV 呈子弹状或圆柱状, 长度约为直径的 3 倍, 大小为 150 ~ 180 nm × 50 ~ 70 nm。病毒粒子表面有囊膜, 囊膜上密布长约 10 nm 的纤突。病毒粒子的核衣壳呈螺旋状结构。病毒基因组全长 11 ~ 15 kb, 从 3' 到 5' 端依次排列 N、NS、M、G、L 5 个不重迭的基因。M 是基质蛋白, 可通过与核衣壳结合抑制转录。G 是糖蛋白, 是病毒的主要表面抗原, 决定着病毒的感染力, 也是病毒的主要保护性抗原<sup>[1]</sup>。

VSV 可以在大多数实验室的原代和传代细胞中增殖。Vero 和 BHK-21 细胞对水泡性口炎病毒相当敏感, 常被用于 VSV 的分离和培养。鸡胚和小鼠也可用于病毒的分离和增殖。在细胞培养过程中可以引起细胞明显的细胞病变, 同时产生较高滴度的子

代病毒<sup>[1]</sup>。该病毒经常作为模式病毒用做研究病毒感染、复制机制, 药物的抗病毒作用。目前对于该病毒感染后引起细胞的反应以及引起炎性变化仍不清楚, 特别是对于引起细胞因子分泌的影响尚不清楚。试验使用 IPEC-J2 细胞为细胞模型, 利用荧光定量 PCR 方法研究了 VSV 在细胞中增殖情况和诱导细胞因子分泌情况。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** 水泡性口炎病毒印第安纳株 (VSV-IND) 为本实验室保存, 病毒滴度为  $7 \times 10^9$  PFU。

**1.1.2 细胞:** IPEC-J2 细胞系 (Intestinal Pig Epithelial Cell Jejunum, IPEC-J2) 是分离于新生仔猪空肠, 经过驯化形成的一种传代细胞系, 细胞由柏林自由大学免疫与分子生物学实验室提供。细胞生长于含有 5% 新生牛犊的血清的 DMEM 培养基中, 5% CO<sub>2</sub>

基金项目: 河南省杰出人才创新基金项目 (0621002100)

\* 通信作者。Tel: +86-371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

作者简介: 魏战勇 (1975-), 男, 河南安阳人, 讲师, 博士, 主要从事动物分子免疫学研究。Tel: +86-371-63554361; E-mail: weizhanyong@hotmail.com

收稿日期: 2008-12-23; 修回日期: 2009-03-16

37℃ 培养。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** DMEM 培养基、Trypsin (Invitrogen 公司); 新生犊牛血清 (Hyclone 公司); Invisorb Spin Cell kit (Invitex 公司); 2 × Sensimix Plus SYBR + Fluoscein (peQLab 公司); Bio-Rad IQ5 荧光定量 PCR 仪 (BioRad 公司); 其它试剂均由本实验室提供。

## 1.2 病毒感染

将 IPEC-J2 细胞用胰酶分散后, 培养于 6 孔培养板 ( $1 \times 10^6$  个/孔), 培养细胞丰度达 80% 后, 用 PBS 洗 2 次, 将 VSV 接种于 IPEC-J2 (MOI = 0.1), 吸附 60 min, 期间每隔 15 min 翻转一次, 洗去未吸附的病毒, 添加含有 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液。

## 1.3 细胞的收集

将病毒感染后 1、2、3、12、24、48 h 的细胞分别用 PBS 洗 2 次, 添加 0.25% 胰酶消化细胞, 2000 × g 离

心收集 IPEC-J2 细胞, 直接进行 RNA 提取或者保存于 -80℃ 备用。

## 1.4 RNA 的提取和反转录

参照 Invisorb Spin Cell kit 说明书提取细胞总 RNA, 以提取的总 RNA 为模板进行反转录, 具体方法和步骤参照文献进行<sup>[1]</sup>, 反转录合成的 cDNA 作为荧光定量 PCR 模板。

## 1.5 引物和相对定量 PCR

引物的设计使用 Primer Premier 5.0 软件, 参照 GenBank 公布序列进行。基因名称、参考序列、退火温度及产物大小见表 1。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL, 其中 de Sensimix Plus SYBR + Fluoscein 10 μL, 上下游引物各 0.4 pM, cDNA 500 ng。反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 表 1 中所指的退火温度 40 s, 72℃ 40 s, 共进行 40 个循环, 于 4℃ 结束反应。

表 1 Real-time PCR 引物及其反应条件

Table 1 Primers and conditions used for Real-time PCR assays

Gene	Accession number in GenBank	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Annealing temperature/℃	Size of amplicon/bp
β-actin		CGGGACCTGACCGACTA	AAGGTCGGGAGGAAGGA	55	254
IL-2	EU139160	GCTGGATTACAGTTGCT	CTTGTTCAGATCCCTTT	55	213
IL-6	AB194100	AACGCCTGGAAGAAGA	AACCCAGATTGGAAGC	53	229
IL-8	X61151	GTTCTGCGCAAGAGTAAAG	CACGGAGAATGGGTTT	53	275
IL-10	EF433759	GCATCCACTTCCCAACCA	TCGGCATTACGTCCTCCAG	55	178
IL-12	NM-213993	AGGCCGTCAGCAACAC	GCAGCCAGGCAACTCT	58	314
IFN-α	NM214393	GCT CCT GGC ACA AAT G	GCTGCTGATCCAGTCC	53	243
IFN-γ	NM-213948	CTCCATCCTGGCTGTG	CATTTCCGAGATGAACC	53	183
TNF-α	NM 214022	ACGCTCTTCTGCCTACTGC	TGGGCGACGGGCTATC	58	134
TGF-β1	X12373	GAGAACCACCCATCAGA	GCCAGGCGTCAGCACTA	58	264
TLR3	AB111939	AAC CAG CAA CAC GAC T	TTG GAA AGC CCA TAA A	55	182
VSV	NC 001560	AGT TCA ATG ATT TCA ATG	TTA ACC AAC ATT CCC AT	56	203

## 1.7 数据分析

在实时定量 PCR 中, Ct 值是反映模板中目标基因含量的一个重要指标, 通过样品和标准曲线 Ct 值比较, 可以准确计算出 RNA 含量。另外, 将目标基因与持家基因 β-actin 比较, 消除由于收集细胞、反转录和加样中操作误差。将 0 h 未接种病毒的设为表达量为 1 ×, 使用 Bio-Rad IQ5 2.0 软件分析各基因相对于 0 h 的表达量变化水平。

## 2 结果

### 2.1 病毒 RNA 水平测定

IPEC-J2 单层细胞感染 VSV 后, 在 1、2、3、12、24、48 h 分别收集细胞, 提取 RNA, 反转录获得 cDNA, 做荧光定量 PCR, 与 β-actin 进行比较分析, 并以病毒感染 1 h 时病毒 RNA 含量定义为 1 ×, 得出不同时间病毒 RNA 在细胞的增殖倍数, 结果见图 1。

由图可知, 病毒感染后 1 h 就可以检测到病毒 RNA, 但病毒量相对较低; 随后开始逐步上升, 在感染后 3 h 病毒开始大量迅速增殖, 48 h 达到最高峰, 从感染后 1 h 的十几倍增殖到 2000 倍左右。

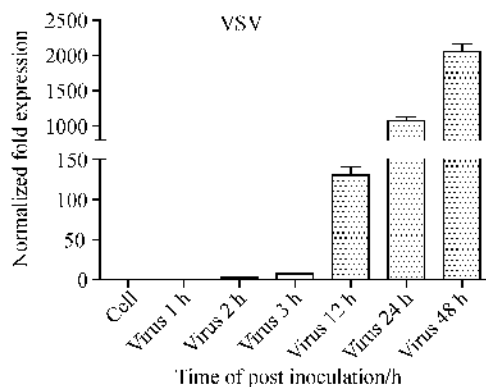


图 1 VSV 在 IPEC-J2 细胞中增殖规律

Fig. 1 The replication of VSV in IPEC-J2 cell.

## 2.2 细胞因子测定

IPEC-J2 单层细胞在感染 VSV 后 1、2、3、24 h 分别收集细胞,提取 RNA,反转录获得 cDNA,做荧光定量 PCR,并与  $\beta$ -actin 进行比较分析,并以病毒感染 0 h 时 mRNA 含量定义为 1 $\times$ ,得出不同时间细胞因子 RNA 在细胞的增殖倍数,结果见图 2。

由图 2 可知,IL-6、IL-8 和 TLR3 在感染后 1 h 表达量显著增加,在 2 h、3 h 和 24 h 无显著增加,甚至

略有降低;IL-12 表达在感染后 1 h 并未见增加,但在 2 h 时增加明显,达到未感染时的 20 倍左右,随后表达水平逐步降低,但与未感染细胞相比,仍有明显增加;TNF- $\alpha$  表达在感染后 1 h 开始增加,之后随着感染时间的延长表达量逐渐增加,24 h 达到高峰,可达 3 000 倍左右。TGF- $\beta$  感染前和感染后差异不显著。

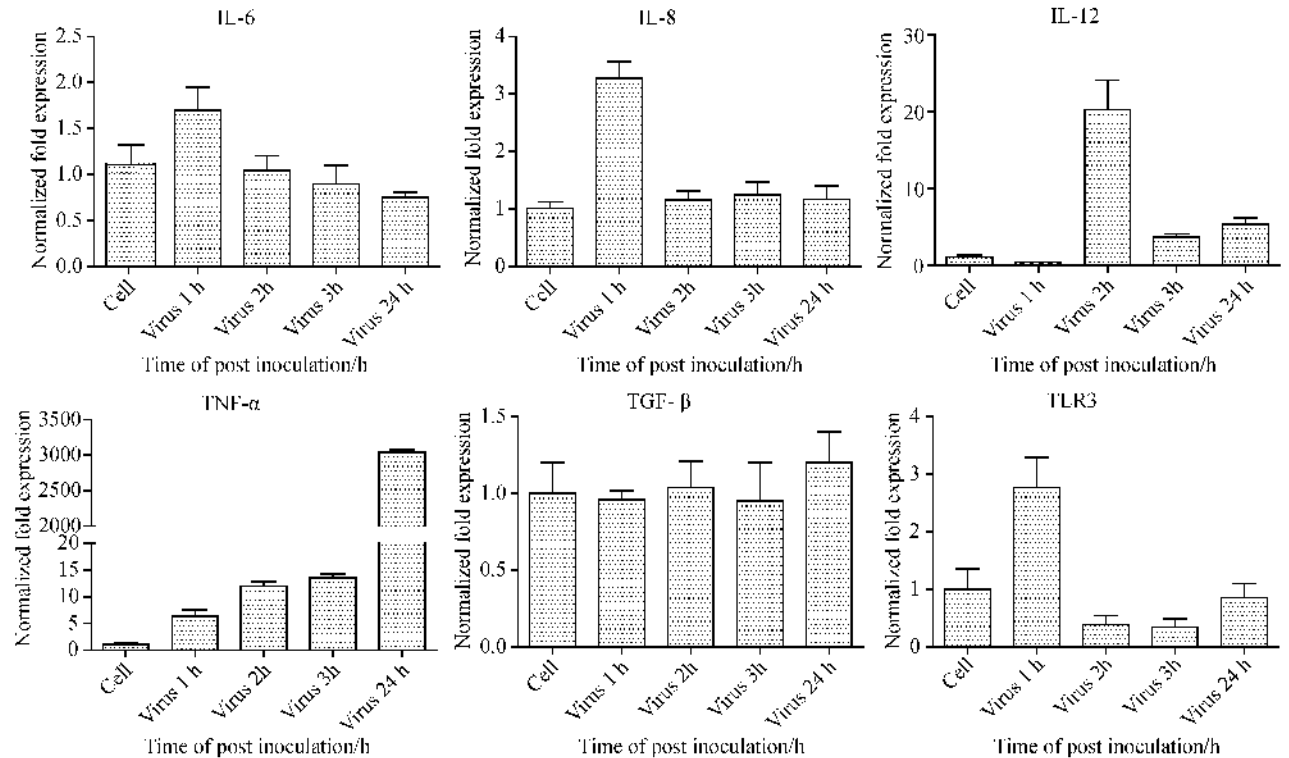


图 2 细胞因子的转录谱

Fig.2 The transcriptional profiles of cytokines.

## 3 讨论

VSV 可以在多数原代和传代细胞中增殖,且能引起较明显的细胞病变,常作为模式病毒研究病毒感染机制和药物的抗病毒作用。本研究证实 VSV 可以快速诱导 IPEC-J2 细胞产生 CPE。VSV 引起细胞体积缩小,胞浆浓缩,染色质凝集,核固缩、裂解,质膜内陷将细胞分裂为有膜包裹但内含物不能外泄的凋亡小体。病毒在感染后 1 h 能检测到病毒,3h 后开始大量增殖,在感染后 48 h 达最高峰,达到 2000 倍左右,这可能是由于病毒大量增殖,引起细胞死亡,导致病毒释放所致。

IL-6 和 IL-8 主要由单核-巨噬细胞分泌。IL-6 可介导 B 细胞增殖分化,产生 IgG,并可活化 T 细胞促进细胞毒性 T 细胞 (CTL) 的成熟。IL-8 可促进中

性粒细胞的趋化,在抗病毒感染中具有十分重要的作用。我们研究发现,IPEC-J2 细胞感染 VSV 后,在 1 h 时 IL-6 和 IL-8 表达量明显升高,但是随着时间的延长 IL-6 和 IL-8 明显降低,这与在呼吸合胞体病毒 (RSV) 研究相一致。Arnold 等研究发现人外周血多形颗粒细胞 (PMN) 感染 RSV 后可同时分泌 IL-6 和 IL-8,并且分泌量与接触病毒的数量有密切关系<sup>[4]</sup>。Becker 等也观察到 RSV 感染后患儿气管上皮细胞可分泌 IL-8,IL-8 可激活 PMN 释放蛋白酶原和氧自由基,活化的 PMN 在吞噬 RSV 颗粒或 RSV 免疫复合物后又可分泌 IL-6 和 IL-8<sup>[5]</sup>。我们推测 VSV 在感染 IPEC-J2 细胞后,可诱导细胞通过增加 IL-6 和 IL-8 分泌来增加炎症反应,从而一定程度上阻止 VSV 再次感染。

TNF- $\alpha$  在病毒感染过程中,能够促进 T、B 淋巴

细胞的增殖分化, 诱导多种有核细胞分泌干扰素, 直接参与抗病毒作用, 有利于机体对病毒感染的防护, 而且对病毒感染细胞具有选择性杀伤作用而不损伤正常细胞。VSV 感染 Hela 细胞后, TNF- $\alpha$  杀伤感染细胞, 而对未感染细胞不具有毒性作用<sup>[6]</sup>。我们研究发现 VSV 感染 IPEC-J2 细胞后, 可显著引起细胞分泌 TNF- $\alpha$  增高, 而且随着感染时间延长, TNF- $\alpha$  分泌浓度增加, 与细胞中病毒的含量呈正相关。TNF- $\alpha$  在病毒感染中引起宿主凋亡反应中具有重要意义的细胞因子。为此, 我们推测 VSV 可诱导 IPEC-J2 细胞凋亡, 而且随着感染时间的延长, 凋亡加剧。

TGF- $\beta$  是一个多效应细胞因子, 可以参与多种生物过程, 包括细胞生长, 分化、迁移和凋亡。早期研究证实, TGF- $\beta$  与病毒致病作用有着密切的关系<sup>[7-10]</sup>。多种病毒均可引起宿主细胞分泌高水平的 TGF- $\beta$ , 例如巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV)、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、犬瘟热病毒和鼻病毒等。然而 VSV 感染 IPEC-J2 细胞后, 尽管有少量 TGF- $\beta$  分泌, 但其分泌水平并没有随感染时间的延长而改变, 这可能由于病毒和宿主细胞不同所导致。另外, TGF- $\beta$  并不参与 VSV 感染 IPEC-J2 中引起的细胞炎性反应。

TLR3 (Toll-like receptor 3) 是第一个被鉴定为能够识别双链 RNA 病毒, 具有抗病毒作用的 TLR, 在宿主抗病毒反应中具有重要作用<sup>[11]</sup>。在流感病毒感染支气管上皮后, 细胞因子的分泌具有 TLR3 依赖性关系<sup>[12]</sup>。本试验也证实了 VSV 感染 IPEC-J2 细胞 1 h 后 TLR3 表达量显著升高, 达到 2.8 倍, 但随着感染时间的延长, TLR3 逐渐降低, 甚至低于未感染的细胞。可能是由于在刚刚感染时, 细胞能产生强烈的抗病毒反应, 随后病毒的逐渐增殖, 宿主细胞抗炎性反应逐渐降低所致。IPEC-J2 细胞在抗病毒感染过程中与 TLR3 有关。

试验同时对 IPEC-J2 细胞分泌的 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-10 进行了检测, 发现感染和未感染的细胞均不能检测出 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-10, 表明该细胞不分泌这些细胞因子, 这与 Schierack 等报道 IPEC-J2 细胞不产生这些细胞因子相一致<sup>[13]</sup>。

试验研究了 VSV 病毒感染 IPEC-J2 后, VSV 在 IPEC-J2 细胞中增殖情况, 同时研究了 VSV 引起细胞因子的分泌表达情况, VSV 感染后可导致 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TLR3 等炎性细胞因子增加, 为以后研究 VSV 分子致病机制, 评价疫苗的细胞免疫效果和药物抗病毒的药效机制提供了试验基础和依据。

## 参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997: 799 - 805.
- [2] Letchworth GJ, Rodriguez LL, Delcarrera J. Vesicular stomatitis. *Veterinary Journal*, 1999, 157 (3): 239 - 260.
- [3] Joseph S, David WR. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] Arnold R, Werner F, Humbert B, et al. Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF-alpha) release and respiratory burst in human granulocytes. *Immunology*, 1994, 82 (2): 184 - 191.
- [5] Becker S, Koren HS, Henke DC. Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1993 8 (1): 20 - 27.
- [6] 徐玮, 陈泮藻. 肿瘤坏死因子与感染性疾病的关系. 中华医院感染学杂志 (*Chinese Journal of Nosocomiology*), 1996, 6 (1): 59 - 61.
- [7] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, 390: 465 - 471.
- [8] Arnulf B, Villemain A, Nicot C, et al. Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses YGF-beta 1 signaling in human T cell via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-1 leukemogenesis. *Blood*, 2002, 100: 4129 - 4138.
- [9] Lotz M, Seth P. TGF-beta and HIV infection. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1993, 685: 501 - 511.
- [10] Lee DK, Kim BC, Kim IY, et al. The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 38557 - 38564.
- [11] Schroder M, Bowie AG. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends in immunology*, 2005, 26 (9): 462 - 468.
- [12] Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of Toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 5571 - 5580.
- [13] Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, et al. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, 125 (3): 293 - 305.

## Transcriptional profiles of intestinal pig epithelial cell jejunum 2 cultures infected by vesicular stomatitis virus

Zhanyong Wei<sup>1,2</sup>, Xuebin Wang<sup>2</sup>, Yabin Wang<sup>1</sup>, Hongying Zhang<sup>1</sup>, Hongying Chen<sup>2</sup>, Mingfan Yang<sup>1</sup>, Baoan Cui<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

<sup>2</sup>Henan Key Laboratory for Animal Food Safety, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract:** **[Objective]** To better understand the host inflammatory responses, in particular inflammatory cytokines responses of Vesicular Stomatitis virus (VSV) infection, and the host-VSV interaction. **[Methods]** We used VSV Indian strain to infect the Intestinal Pig Epithelial Cell Jejunum (IPEC-J2) cell. Then we measured and analyzed the viral RNA by using real-time PCR. The transcript level of cytokines (IL-2, 6, 8, 10, 12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and TLR3) were detected by real-time PCR. **[Results]** We found that the transcript levels of IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  and TLR3 were increased obviously whereas TGF- $\beta$  showed no significant difference. TPEC-J2 cell did not secrete IL-2, IL-10, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . **[Conclusion]** The level of inflammatory response was increased when VSV infected TPEC-J2 cell.

**Keywords:** Vesicular stomatitis virus; cytokines; IPEC-J2 cell; Transcriptional profiles

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Outstanding Person Innovation Fund of Henan Province of China (0621002100)

\* Corresponding author. Tel: +86-371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

Received: 23 December 2008/Revised: 16 March 2009

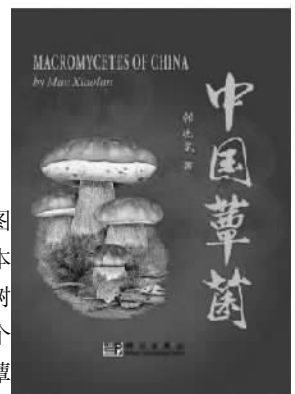
### 科学出版社新书推介 (2009-05)

#### 中国蕈菌 精装,全彩手绘图)

卯晓岚 著 978-7-03-024413-0 ¥688.00 2009年5月出版

**内容简介:**这是一部中国蕈菌彩绘图著。系统记载了各类蕈菌 881 种,隶属 65 科,214 属,581 个图版,共计彩图 1041 余贴。绝大多数彩图是从 20 世纪 60 年代开始,在全国各地野外考察采集标本时绘制的。其中记述食用菌 485 种,药用真菌 321 种,毒菌(毒蘑菇)201 种,木材腐朽菌 161 种,树木外生菌根菌 330 种。另外,已驯化培养的食、药用菌 65 种,部分物种的经济用途有待研究。每个种除有彩色绘图外,从形态特征、生态习性及分布地区等方面作了记述。在本图著前边对中国蕈菌物种资源、地理区系特点作了记述。还对各类蕈菌有关专业知识、科学术语等以图示或图解说明。书后附有物种中、英文名称和拉丁学名索引及参考文献。

本图著可供菌物学研究、教学,食用菌、药用真菌科技工作者、食品加工及商贸人员、卫生防疫及有关农林牧等科技工作者及菌物爱好者参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人 周文字 联系电话 010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目