DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.012

IL-1 IL-6和活化枯否细胞培养上清液对约氏疟原虫红外期发育的影响*

郝宏兴** 黄复生 况明书 段建华 (第三军医大学基础医学部寄生虫学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 研究 IL-1 IL-6和活化枯否细胞(Kc)产物对约氏疟原虫红外期(EEF)发育的影响。方法: 大鼠腹腔注射 IL-1、IL-6或合用, 3 h后接种子孢子(Sp), 42 h后观察 EEF发育情况;建立大鼠肝细胞-约氏疟原虫体外培养模型, Sp接种后 2 h加 IL-1、IL-6及激活后 Kc培养上清,观察对 EEF发育的影响。结果: IL-1组、合用组 Sp发育率明显降低, IL-6组无明显下降; IL-1、IL-6明显抑制培养的 EEF发育;激活 Kc培养上清也可抑制 EEF发育, EEF成熟度低、体积小。结论: IL-1 IL-6在体内外和接种 Sp前后均可抑制 EEF的发育。

关键词 白细胞介素-1;白细胞介素-6;枯否细胞;约氏疟原虫红外期

中图法分类号 R531.3

枯否细胞(Kc)可吞噬侵入机体的子孢子(Sp)[1], 并合成 TNF-α、IL-1和 IL-6等活性物质以抑制疟原虫红外期(EEF)的发育[2]。以往实验均为单纯计算 EEF数/cm^2,未考虑肝脏体积,误差较大。本研究选用较真实反映 EEF发育情况的 Sp发育率,探讨 IL-1和 IL-6及活化后 Kc产物对 EEF发育的影响。

1 材料和方法

约氏疟原虫 BY265株,斯氏按蚊 Hor株,本室常规饲养。Wistar大鼠。rhIL-1, rhIL-6(北京邦定公司)。

大鼠肝细胞分离 参照 Seglen[3]报道的方法。

Sp的分离: 无菌解剖感染后 17 d按蚊唾液腺,洗 3次后压碎,加培养基收集 Sp并计数(体外培养用);或将蚊胸部剪下,加 5%葡萄糖盐水研磨, 500 r/min,离心 3 min,共 2次,收集上清液并计数 Sp数量(体内实验用)。

激活 Kc培养上清液制备: 每 2万 Kc加 BCG 75μg和 LPS 10μg,收集 18 h培养上清(SKc), -20℃保存备用。

实验组大鼠腹腔注射 0.5 ml PBS,内含细胞因子。第一组: IL-1, 5×10^3U;第二组: IL-6, 1×10^4U;第三组: IL-1, IL-6各 1×10^4 U;第四组: 0.5 ml PBS作对照, 3 h后经尾静脉接种 Sp 30万/只, 42 h后活杀动物,常规制片,计数检出 EEF数量,计算 Sp发育率[4],测定原虫直径。

24孔板(内放 10×10 mm盖片)每孔接种肝细胞 2万,培养 12 h后接种 Sp 2万/孔, 2 h后换液并加入含细胞因子的培养基继续培养,每天换液一次, 48 h时取出盖片,常规处理, Giemsa染色,计数 EEF数目,与对照组比较,计算抑制率,并观察 EEF的形态、结构。

2 结果

2.1 IL-1 IL-6对大鼠体内约氏疟原虫 Sp入侵和 EEF发育的影响

实验组的 Sp发育率分别为 1.38%、2.46%和 0.01%,对照组是 3.34%。可见 5×10^3U IL-1能使 Sp发育率降低近 2/3($P<0.05$);而 1×10^4U的 IL-6无明显影响;合用组仅发现一个原虫, EEF的发育被显著抑制。EEF呈圆形和椭圆形,内含大量细小的裂殖子。IL-1、IL-6组 EEF的直径分别是 16.38μm和 17.41μm,均明显小于对照组(21.62μm, $P<0.05$)。合用组肝组织中可见大量白细胞浸润灶,提示细胞因子可能影响并损伤 EEF发育,诱致肝组织发生急性期反应。

2.2 IL-1、Kc上清和 IL-6对培养肝细胞内 EEF发育的影响

表 1 IL-1和 Kc上清对培养肝细胞内 EEF发育的影响

Tab 1 Effects of IL-1 and the SKc on the development of EEF *in vitro*

IL-1 (U/ml)	Ⅰ EEF/cm^2 ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition %	Ⅱ EEF/cm^2 ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition %
20	7.7± 0.6	32.3	7.0± 2.0	43.2
40	5.0± 1.0	55.9	5.3± 1.2	56.8
100	1.3± 0.6	88.3	1.0± 1.0	91.9
SKc 0.5 ml	6.0± 1.0	47.0	5.0± 1.7	59.5
Control	11.3± 2.3		12.3± 2.1	

3 wells/group, Ⅰ Ⅱ: Expt series

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39370630

** 郝宏兴,男, 30岁,讲师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 IL-6对培养肝细胞内 EEF发育的影响

Tab 2 Effects of IL-6 on the development of EEF *in vitro*

IL-6 (U/ml)	Ⅰ EEF/cm² ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition %	Ⅱ EEF/cm² ($\bar{x}\pm s$)	Inhibition %
20	3.7± 0.5	65.6	4.0± 1.0	55.6
40	1.3± 0.6	87.5	0.7± 0.6	93.7
100	0.0± 0.0	100.0	0.0± 0.0	100.0
Control	10.7± 3.1		9.0± 1.0	

3 wells/group, Ⅰ Ⅱ: Expt series

从表 1 2可见, IL-1的浓度越大, EEF发育的抑制率越高, 浓度为 100 U/ml时, 抑制率达 88.3%~ 91.9%。 Kc上清组平均检出 5~ 6个原虫,抑制率是 47.0%~ 59.5%。 对照组 EEF体积较大,核数量多,发育较成熟,见图 1 实验组 EEF体积小,核数量少,有的可见空泡化等退变表现,见图 2 IL-6抑制 EEF发育的作用也呈剂量依赖特点, EEF形态与 IL-1组类似。 100 U/ml组和 IL-1, 6合用组未见原虫。



图 1 对照组培养的 **EEF**,体积大,核多 (姬姆萨染色× 1 000)

Fig 1 Cultured EEF with larger size and more nuclei in control group (Giemsa stain× 1 000)

图 2 **IL-1**组培养的 **EEF**,体积小,核数量少,虫体空泡化 (姬姆萨染色× 1 000)

Fig 2 Cultured EEF size smaller with fewer nuclei and vacuoles formation in IL-1 group (Giemsa stain× 1000)

3 讨论

Vreden等[2]报道, Sp接种前 10^6 U IL-6或与 2.5 × 10^3 U IL-1合用,几乎完全抑制伯氏疟原虫 EEF的发育,接种 6 24 h后, IL-6的抑制率降低为 62%和 35%。 本结果显示,接种 Sp前 3 h,给大鼠腹腔注射 IL-6 IL-1各 10^4 U合用可显著抑制约氏疟原虫 EEF的发育;注入 5× 10^3 U IL-1, Sp发育率亦明显降低;而 10^4 U IL-6没有明显影响,但 EEF明显小于对照组,说明该剂量可推迟 EEF的成熟。 本实验与 Vreden的结果有一定差异,原因可能与下列因素有关:① 注入细胞因子的时间不同。 注入 IL-1或 IL-6后,血中 IL-6的水平大约 3 h达到高峰[2],故注入时间不同对 EEF的作用程度可能不同。 ②我们用的 IL-6的剂量比 Vreden的小得多。③ 观察 EEF发育数量的指标不同。 不同大鼠其体重和肝体积相差较多,单纯计算 EEF数/cm² 误差较大, Sp转化率能更准确反映实际结果[4]。 ④ 重组人 IL-6的来源不同,其活性大小可能有差异,即使剂量高达 10^6 U也不能完全抑制 EEF的发育。

在体外,低剂量的 IL-1, IL-6即可干扰 EEF的发育。 本结果表明,接种 Sp 2 h后,加入较大浓度的 IL-1 IL-6,且每天换液时补加细胞因子, 20U IL-1和 20U IL-6对 EEF发育的抑制率分别为 32%~ 43%和 55%~ 65%,且 EEF体积小,核数量少,提示 EEF的发育受到抑制。 激活的 Kc可释放多种活性物质,如 BCG刺激 Kc可使其释放 H_2O_2的量增加一倍[5]。 本结果显示,活化的 Kc培养上清对已侵入肝细胞的 Sp和 EEF的发育都有一定的影响。 接种 Sp可引起肝内迅速的细胞炎症反应[6], TNF 超氧阴离子和其它毒性氧自由基及损伤性溶酶体酶等急性反应介质均可对肝细胞损伤起到介导作用。 但是,细胞因子和活化 Kc产物是否直接杀伤疟原虫或通过损伤肝细胞从而造成疟原虫 EEF发育受阻,还有待进一步研究。

参考文献

1 黄复生,王兴相,曹晓东,等.约氏疟原虫子孢子入侵 Wistar

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大鼠肝内的扫描电镜观察.寄生虫与医学昆虫学报, 1996, 3(1): 1
2 Vreden S G S, Van Den Broek F M, Oettinger M C, *et al*. Cytokines inhibit the development of the malaria parasite *Plasmodium berghei in vivo*. Eur J Immunol, 1992, 22(9): 2271
3 Seglen P O. Treparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol, 1976, 13(1): 29
4 王兴相,黄复生.环磷酰胺对大鼠体内约氏疟原虫红外期发育的影响.中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1987, 5(3): 80
5 白咸勇,顾云娣,朱继红,等.生物免疫制剂对大鼠枯否细胞释放过氧化氢的影响.解剖学杂志, 1994, 17(4): 331
6 黄复生,王兴相,况明书,等.枯否细胞、肝细胞对疟原虫子孢子感染和发育的影响.中国寄生虫病防治杂志, 1996, 9(3): 173

(收稿: 1998-03-05;修回: 1998-09-17)
(编辑　仇玉福)

Effects of cytokines and supernatant of cultured activated Kuppfer cells on development of exo-erythrocytic forms of *Plasmodium yoelii* in rats*

Hao Hongxing, Huang Fusheng, Kuang Mingshu, Duan Jianhua (Department of Parasitology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the effects of IL-1 and IL-6 and supernatant of cultured activated Kuppfer cells on the development of exo-erythrocytic forms (EEFs) of *Plasmodium yoelii* (*P. yoelii*). Methods: Rats were injected intraperitoneally with IL-1, IL-6 or both and inoculated with sporozoites (SP) 3 h later. At the 42nd h after the inoculation, the SP viability and the diameter of EEFs were determined. After the model of *in vitro* culture of hepatic cell-*P. yoelii* was established in rats, the animals were inoculated with SP. At the 2nd h after the inoculation, IL-1, IL-6 and the supernatant of cultured activated Kuppfer cells were added to observe their effects on the development of EEFs of *P. yoelii*. Results: The SP viability of the IL-1 group was decreased to 41.32%. IL-1+ IL-6 group presented the complete inhibition of EEF development. In the IL-6 group, the size of EEFs was much smaller than that in the control ($P < 0.001$) though no significant changes of the SP viability were found. *In vitro*, the percentage of inhibition of the EEF development was 37.8% and 60.6% respectively in the 20 U/ml IL-1 group and 20 U/ml IL-6 group. The development of EEFs was also significantly inhibited in the hepatic cells cultured with the supernatant of the cultured activated Kuppfer cells. Conclusion: IL-1, IL-6 and the supernatant of cultured activated Kuppfer cells can inhibit the EEF development of *P. yoelii*.

Key words IL-1; IL-6; Kuppfer cell; *Plasmodium yoelii*; exo-erythrocytic form; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39370630

(上接 102页)

管扩张伴感染,行支气管造影才发现病灶位于 B_3 段支气管腔内。总之,肺梭形细胞癌的影像表现与普通肺癌的影像表现相似,因病例数有限,尚不能总结出它区别于普通肺癌的特征性影像表现。

文献[2]报道如表现为肺周边处钱币样病灶者,其预后较好。也有人认为其预后较相同部位的侵袭性鳞癌要好,发生于下呼吸道向腔内生长的单相梭形细胞癌预后亦较好;具有明显癌成分的"双相"肿瘤或侵及附近组织的,免疫组化对角蛋白反应较强(表明梭形细胞形成不良)的预后较差。此 2例对角蛋白,Vimentin均呈阳性反应,但例 1术后存活已达 56个月,目前仍生存,追其病理表现见以梭形细胞为主,且肿瘤内有大量淋巴细胞浸润,部分支持以上观点,是否与较强的细胞免疫因素有关,尚有待更多的病例证实。本组另一例手术后 4个月死亡。术后常规的放、化疗也是决定治疗效果的一个主要因素。

总之,梭形细胞癌发病率极低,术前多被诊断为肺癌。对此病的探讨,尤其是超微结构及免疫组化等方面的观察,会逐步揭示其临床生物学特征,为选择最有效的治疗方法提供依据。

关键词　梭形细胞癌;肺肿瘤　放射摄影术
中图法分类号　R734.2

参考文献

1 Humphrey P A, Scroggs M W, Roggli V L, *et al*. Pulmonary carcinomas with a sarcomatoid element: An immunocytochemical and ultrastractural analysis. Hum Pathol, 1988, 19(2): 155
2 Ro J Y, Chen J L, Lee J S, *et al*. Sarcomatoid carcinoma of the lung. Cancer, 1992, 69(5): 376
3 雷　鸣,张楚毅.肺癌肉瘤一例报告.第三军医大学学报, 1994, 16(1): 75

(收稿: 1998-04-15;修回: 1998-11-17)
(编辑　仇玉福)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net