

伯氏疏螺旋体 BmpA 诱导的莱姆关节炎中白细胞介素 -6 的变化

马维江¹⁾, 张福¹⁾, 王春媛¹⁾, 骆礼高¹⁾, 李冰雪^{2,3)}, 宝福凯^{2,3)}, 柳爱华^{2,3,4)}

(1) 昆明医科大学第二临床学院; 2) 热带医学研究所 / 病原生物学与免疫学系; 3) 云南省公共卫生与疾病防控协同创新中心; 4) 昆明医科大学生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500)

[摘要] 目的 探究 IL-6 在莱姆关节炎发病中的变化. 方法 选取 20 只雌性昆明种小鼠, 将其随机平均分为 2 组; 用 BmpA 蛋白液注射小鼠跗跖关节诱导莱姆关节炎; 用 ELISA 法检测小鼠关节液 IL-6 的含量. 结果 注射蛋白液第 10 天时测得小鼠关节液中 IL-6 平均含量为 72.26 pg/mL, 而正常组小鼠关节炎 IL-6 平均含量为 31.23 pg/mL. 2 组相关性检验时 $P < 0.01$, 差异有统计学意义. 结论 IL-6 是重要的炎性细胞因子, 与该病有着明显相关性, 在莱姆关节炎的发病中起着重要作用.

[关键词] 莱姆关节炎; BmpA; 白细胞介素 -6

[中图分类号] R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0012-03

Change of IL-6 in Lyme Arthritis Induced by BmpA of *Borrelia burgdorferi*

MA Wei-jiang¹⁾, ZHANG Fu¹⁾, WANG Chun-yuan¹⁾, LUO Li-gao¹⁾, LI Bing-xue^{2,3)}, BAO Fu-kai^{2,3)},
LIU Ai-hua^{2,3,4)}

(1) *Second College of Clinical Medicine*; 2) *Institute for Tropical Medicine*; 3) *Yunnan Province Integrative Innovation Center for Public Health, Diseases Prevention and Control*; 4) *Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China*)

[Abstract] **Objective** To investigate the change of IL-6 in Lyme arthritis. **Methods** Twenty female Kunming mice were selected and randomly divided into two groups. The recombinant BmpA of *Borrelia burgdorferi* was injected into the tibiotarsal joint of experimental group mice to induce the arthritis. ELISA experiment was used to detect the concentration of IL-6 in murine joints. **Results** The average concentration of IL-6 in the joint fluid of experimental mice and normal control group was 72.26 pg/mL and 31.32 pg/mL, respectively. The difference was statistically significant between two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** IL-6 is an important inflammatory cytokine, it has obvious correlation with Lyme arthritis.

[Key words] *Borrelia burgdorferi*; Lyme arthritis; IL-6; BmpA

莱姆病 (lyme disease, LD) 是一种以蜱作为传播媒介由伯氏疏螺旋体 (*borrelia burgdorferi*, Bb) 感染所致人畜共患的传染病, 其初发皮肤损害, 出现慢性游走性红斑, 继而可能出现心内脏损害、神经系统病变、心脏病变、关节病变等,

关节炎是莱姆病中晚期的主要表现. 关于莱姆关节炎的发病机理还不完全清楚, 普遍认为是莱姆螺旋体刺激某些炎性细胞因子而引起, 炎性因子是指能引起组织和细胞损伤而导致炎症的因子, 白细胞介素 -6 (IL-6) 是重要的细胞炎性因子, 与该病有

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81060134; 81371835); 云南省自然科学基金资助项目 (2010CD221, 2011FB244, 2012FB011, 2013FZ057); 昆明医科大学本科生创新基金资助项目 (CX201407)

[作者简介] 马维江 (1993~), 男, 云南昆明市人, 昆明医科大学临床医学专业在读本科生.

[通讯作者] 宝福凯. E-mail: baofukai@126.com; 柳爱华. E-mail: lunaliu123@yahoo.com.cn

着明显相关性^[1-3]。

本实验通过在动物模型中研究伯氏疏螺旋体膜蛋白 BmpA 对 IL-6 产生的刺激作用, 从而为阐明莱姆关节炎的发病机理和防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

-86℃超低温冰箱 (中科美菱低温科技有限公司); -30℃低温冰箱 (中国海尔集团有限公司); 单道手动可调移液器 (百得实验仪器有限公司); 大龙 TopPette 手动 8 道移液器 (上海万岛仪器科技有限公司); 台式高速离心机 (美国 Sigama 公司), 电子天平 DT1000 (长沙湘仪离心仪器有限公司), iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验动物

20 只雌性昆明种小鼠, 出生 3~4 周, 体重约 18 g 左右。

1.3 试剂

伯氏疏螺旋体膜蛋白液 (BmpA) (50 μg/mL, 本实验室提取); ELISA 试剂盒 (深圳达科为); 0.01M PBS 溶液 (实验室自配)。

1.4 方法

1.4.1 实验动物模型建立 将 20 只昆明小鼠随机的分为 2 组, 每组 10 只, 分别为正常组和 BmpA 组。将 BmpA 组小鼠以 4%水合氯醛 (注射剂量 0.3 mL/100 mg) 腹腔麻醉后, 注射部位酒精常规消毒, 用 50 μL 微量注射器抽取 50 μL 稀释蛋白液, 从小鼠足底部前部中段进针, 平行足底前进至跗关节, 向上倾斜 15° 刺向关节处, 可感受到轻微突破, 回抽无血后注射, 每隔 1 d 注射 1 次。正常组小鼠不作处理。保证 2 组小鼠饲养环境相同, 饲养过程中每天为小鼠测体重并记录数据。

1.4.2 小鼠的处理与样本的收集 在第 1 次注射蛋白液后的第 5 天和第 10 天的同一时间点分别分二批处理小鼠 (根据预实验的结果再决定是否要延长时间), 每批分别选取实验组、正常组小鼠各 5 只进行以下操作: (1) 测小鼠的跗关节直径, 进行关节炎评分, 评估造模是否成功; (2) 二氧化碳法处死小鼠, 取关节组织, 每个关节组织, 修剪至 30 mg, 加 600 μL 的 0.01M PBS 溶液, 再加 6 μL 蛋白酶抑制因子 (PMSF), 对其用组织匀浆器进行充分研磨再用离心机以 2 000 r/min 的速度离心 20 min, 吸取上清液标记后 -80℃保存备用。

1.4.3 ELISA 法检测小鼠关节组织中的 IL-6 含量 将 1.4.2 中收集的上清液做样本, 严格按照试剂盒

说明书的要求进行操作, 对其进行 ELISA 法检测 IL-6 的含量。具体操作如下: (1) 根据实验孔数量, 确定所需板条数目, 样品和空白都应做复孔; (2) 100 μL/孔加入稀释后的 Cytokine standard 至标准孔, 100 μL/孔加入样品至样品孔, 设置空白孔, 用 Dilution buffer 代替样本和标准品; (3) 50 μL/孔加入稀释后的 Biotiny lated antibody, 混匀后盖上封板膜, 37℃温育 90 min; (4) 扣去孔内液体, 300 μL/孔加入 washing buffer, 停留 1 min 后起去孔内液体, 重复 4 次, 每一次在滤纸上扣干; (5) 100 μL/孔加入稀释后的 Streptavidin-HRP, 盖上封板膜, 37℃温育 30 min; (6) 重复步骤 (4); (7) 100 μL/孔加入 TMB, 37℃避光温育 5~30 min 之间, 根据孔内颜色的深浅 (深蓝色) 来判定终止反应; (8) 100 μL/孔迅速加入 Stop solution, 终止反应; (9) 10 min 内于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值; 绘制标准曲线并计算相应的 IL-6 浓度。

2 结果

为评估莱姆关节炎模型建造是否成功, 以小鼠跗关节直径作为衡量标准, 第 10 天时 BmpA 组小鼠跗关节直径明显增加, 且关节外观有明显红肿, 即造模成功, 所记录数据见表 1。

表 1 第 5 天和第 10 天时 2 组小鼠跗关节直径记录 [mm, ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 1 The diameter of joint in 5th and 10th days [mm, ($\bar{x} \pm s$)]

组 别	第 5 天	第 10 天
正常组	3.07 ± 0.04	3.03 ± 0.02
BmpA 组	3.01 ± 0.01	4.92 ± 0.05

通过 ELISA 法测定小鼠关节组织中 IL-6 含量, 测得注射蛋白液第 10 天时小鼠关节液中 IL-6 平均含量为 72.26 pg/mL, 而正常组小鼠关节炎 IL-6 平均含量为 31.23 pg/mL, 并用 Prism 6 软件统计分析, 发现第 5 天时正常组和 BmpA 组 IL-6 含量相近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 10 天时正常组 IL-6 含量明显低于 BmpA 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

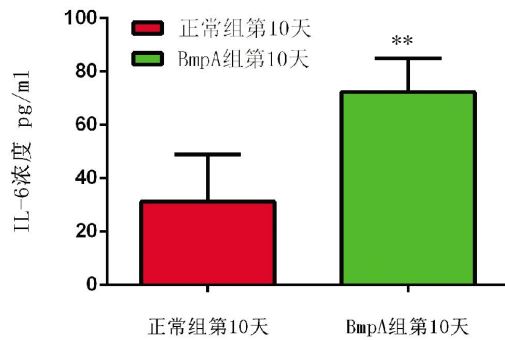


图 1 第 10 天 2 组小鼠关节组织中 IL-6 含量差异

Fig. 1 The content difference of IL-6 in joint tissue of experimental mice after 10 days

与正常组比, ** $P < 0.01$.

3 讨论

莱姆关节炎的详细致病机理尚不完全清楚, 但许多报道认为白细胞介素在莱姆关节炎的致病机理中发挥重要作用, 常见的有 IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-32、IL-37, 其中 IL-1、IL-6、TNF 和趋化因子家族是启动炎症反应的关键因子, 被称为促炎因子^[1,4]。莱姆螺旋体表面存在诸多脂蛋白, 许多研究表明这些脂蛋白与莱姆病致病有关, 目前发现的脂蛋白主要有 OspA、OspB、OspC、BmpA、BBK32、BBA64 等, 其中 BmpA 在莱姆病的致病中发挥着重要作用^[1,5]。

因此本实验选取重要的炎性细胞因子 IL-6 来探究其与莱姆关节炎的关系, 以 BmpA 蛋白液诱导莱姆关节炎来造模。第 5 天时 2 组 IL-6 含量差异无统计学意义, 是因注射第 5 天时间较短, 小鼠体内还未起免疫反应或反应程度较低, 而第 10 天时免疫程度较高, 差异已有统计学意义, 表明 IL-6 在莱姆关节炎的发病中发挥着重要作用, 与该病有着明显的相关性, 这一结论可为防治莱姆病提供新的思路, 但其详细的致炎性作用机理还有待进一步探究。

[参考文献]

- [1] 李静, 宝福凯, 柳爱华, 等. 莱姆病致病机理研究进展 [J]. 生命科学研究, 2014, 18(2): 173 - 178.
- [2] 宝福凯, 柳爱华, 马海滨, 等. 莱姆关节炎发病机理研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(5): 380 - 386.
- [3] 林丽艳, 张慧云, 何韶衡, 等. IL-6 及其受体与炎症性疾病关系的新进展 [J]. 中国热带医学, 2008, 8(4): 680 - 682.
- [4] RAMES G, SANTANA-GOULD L, INGLIS F M, et al. [J]. Neuroinflammation, 2013, 10(88): 1 724 - 2 094.
- [5] 宝福凯, 赖名耀, 张云波, 等. 伯氏疏螺旋体膜蛋白 BmpA 研究进展 [J]. 生命科学研究, 2012, 16(16): 462 - 465.

(2014 - 11 - 13 收稿)