

呼吸道融合病毒 A 亞群及 B 亞群在細胞培養中產生細胞激素之比較
Comparison of cytokines production in cell culture infected with respiratory syncytial
virus subgroup A and B

計畫編號： NSC 88-2314-B-002-261

執行期限： 87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：高全良 執行機構：國立台灣大學醫事技術學系

一、中文摘要

呼吸道融合病毒為引起嬰兒孩童呼吸道感染之重要致病因子之一。有關呼吸道融合病毒造成呼吸道感染之致病機制，至今尚未完全明瞭。一般認為細胞免疫作用，扮演相當重要之角色。而細胞激素在其中所扮演之角色雖然有研究，但不夠完整。同時臨床上 A 亞群引起之臨床症狀常較 B 亞群嚴重，此種差異是否與細胞之激素產生有關也是值得探討之課題。因此本計畫，以人類支氣管衍生之細胞培養 (BEAS-2B) 及肺泡組織衍生之細胞培養 (A549) 為對象，研究呼吸道融合病毒 A、B 兩亞群在感染此些細胞時，細胞激素產生之情形。我們分別以酵素免疫分析法定量細胞激素及反轉錄聚合酵素連鎖反應法測定細胞激素 messenger RNA 之表現。實驗結果顯示，A、B 兩亞群病毒感染 BEAS-2B 或 A549 細胞後，均可見 IL-6、IL-8 及 rantes 之 messenger RNA 之表現及激素之釋放。各激素 messenger RNA 及蛋白之釋放隨時間增加遞增。但比較兩種細胞時，發現病毒感染 A549 後，三種細胞激素之產量均遠高於感染 BEAS-2B。如以 A、B 兩亞群病毒感染細胞後之細胞激素產生情形做比較時，可發現 A 亞群病毒感染 A549 或 BEAS-2B 後，三種細胞激素之產生均高於 B 亞群病毒感染產生者。此些差異與呼吸道融合病毒 A、B 兩亞群在臨床上引起之症狀之嚴重情形之差異有其相關性存在。

關鍵詞：呼吸道融合病毒、細胞培養、細胞激素

Abstract

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of acute lower respiratory infection in infancy, causing annual epidemics together with repeated infections of individuals. RSV infection is also a very common and important disease in Taiwan. RSV subgroup A virus infections usually produce more severe disease than did subgroup B infections. The pathogenesis is still unclear. The cellular immunity may play a major role in RSV infections. In order to understand the role of cytokines in the pathogenesis of RSV infections, the cytokines production in the RSV infected cell cultures derived from respiratory tract such as A549 (human lung alveolar cells) and BEAS-2B (human bronchial cells) were determined. RT-PCR method and enzyme linked immuno-sorbent assay were used for assay of cytokines messenger RNA expression and cytokines release respectively. The results showed that both of RSV subgroup A and B produced more amount and more messenger RNA expression of IL-6, IL-8 and rantes in A549 cells than did in BEAS-2B cells. It is also found that RSV subgroup A produced more amounts of three kinds of cytokine in two

cell cultures, A549 and BEAS-2B than subgroup B did. The results indicated the association of the amount of cytokines production with the severity of RSV infections may exist. It is also suggested that the higher activity of cytokines release in subgroup A RSV infections may cause more severe diseases than subgroup B does.

Key words: Respiratory syncytial virus, RSV, Cytokines

二、緣由與目的

呼吸道融合病毒(Respiratory syncytial virus, RSV) 屬 *paramyxoviridae* 之 pneumovirus 屬, 為 single strand RNA 病毒。RSV 在臨床上常會引起嬰兒及孩童之急性下呼吸道感染⁽¹⁾, 主要症狀有咽喉、氣管、支氣管綜合病癥, 支氣管炎, 細小支氣管炎, 肺炎等, 嚴重者常會致死^(2,3)。近年來一些免疫機能下降之患者如腫瘤、骨髓移植病人身上也會造成嚴重之感染^(4,5)。近年亦有報告指出, RSV 之感染與中耳炎有密切之關係⁽⁶⁾。此外 RSV 在院內感染亦相當常見⁽⁷⁾。因此 RSV 在臨床上之重要性可見一斑。

RSV 在臨床上, 雖然可以引起許多呼吸系統之症狀, 但其致病機制並未十分瞭解。在因 RSV 引起之細支氣管炎病例之組織病理檢查, 可以發現支氣管有相當多之單核細胞侵入, 在細小 air way 之上皮細胞亦有嚴重壞死及呼吸管道阻塞、肺臟膨脹之現象⁽⁸⁾。RSV 引起之肺炎亦有間質性單核細胞侵入之情形⁽⁹⁾。這些病理上之觀察顯示, 藉由細胞免疫所引起之炎症反應可能在 RSV 所引起之呼吸道感染, 扮演重要之角色。有關此方面之探討, 近年來有些小進展。例如以 RSV 感染老鼠之實驗, 證明 T 細胞在 RSV 引起之症狀上所扮演之角色不容忽視⁽¹⁰⁾。在感染之老鼠肺臟中亦

有 TNF- α 及 IL-6 等細胞激素明顯增加之現象⁽¹¹⁾。人類呼吸道受 RSV 感染時, 亦被發現有 TNF- α 及 IL-6 等細胞激素明顯增加之現象⁽¹²⁾。這些現象說明了細胞激素在 RSV 感染致病機制上之重要性。

至於在呼吸道中各種細胞受 RSV 感染後, 細胞激素產生之情形如何? 是值得探討之問題。目前之資料顯示: nasal epithelium cell 受 RSV 感染後, IL-8 增加但無法測得 TNF- α 及 IL-6 之生成⁽¹³⁾; pulmonary epithelium cell 受 RSV 感染後, IL-6、IL-8⁽¹⁴⁾及 IL-11⁽¹⁵⁾明顯增加。這些細胞激素之分析雖可對 RSV 感染致病機制, 提供一些解釋, 但仍不夠完整。因此本計畫以 In vitro 培養之 RSV 較常感染部位之人類呼吸道相關之細胞: 呼吸道上端支器管細胞(BEAS-2B)及呼吸道較下端細胞(肺泡細胞, A549, human pulmonary epithelium cell)為對象, 探討這些細胞受 RSV 感染時, 細胞激素產生之情形。藉此對 RSV 之致病機制能有進一步之了解。

RSV 依其 G 蛋白之抗原性, 可分 A、B 兩 subgroup⁽¹⁶⁾。此兩 subgroup 之生物性質之差異尚不清確。但臨床上之表現則有所差異存在。一般之 RSV 之感染, subgroup A 之病毒佔大多數⁽¹⁷⁾。同時 subgroup A 感染之年齡群較低, 以 1 歲以下較多⁽¹⁸⁾。得到 subgroup A 之感染時, 其症狀較 subgroup B 嚴重, 其病症之持續時間較長。同時需進入加護病房治療之病例 subgroup A 也多於 subgroup B⁽¹⁹⁾。國內我們之研究亦有同樣之發現⁽²⁰⁾。這些結果顯示可能此兩 subgroup 之致病情形可能有所不同。以往有關 RSV 在細胞誘導細胞激素產生之研究, 一直以 subgroup A 為對象, subgroup B 之資料可供參考很少。所以本計畫之第二目的, 為比較兩種

亞群 RSV 病毒在細胞中產生細胞激素之情形，以了解其在致病機制上所扮演之角色。

三、結果與討論

本研究一共分析三種細胞激素：IL-6、IL-8 及 rantes。將 sucrose gradient 純化濃縮之 RSV 病毒，以 MOI=1 分別感染 A549 及 BEAS-2B 細胞後，於不同時間 (24、48、72、96 小時) 分別測定細胞培養液中細胞激素產生之情形。研究之結果顯示，A 亞群及 B 亞群病毒在感染 A549 細胞後，24 小時即均有 IL-8 之釋出。之後 A 亞群之 IL-8 之上升較快在 48 小時約為 B 亞群之 2 倍，但 72 及 96 小時 A、B 兩亞群間並無明顯之差別。在感染 BEAS-2B 時，24 小時兩亞群均可測得 IL-8 之產生。但隨後 A 亞群誘導之 IL-8 不論是在 48、72 或 96 小時均高於 B 亞群所誘導之 IL-8。兩種細胞平行比較，不論 A 或 B 亞群在呼吸道下端細胞 A549 所生成之 IL-8 均遠高於呼吸道上端 BEAS-2B 細胞中所產生者。至於 IL-6 之測試結果與 IL-8 測試之結果情形十分類似。但在 A549 細胞感染病毒後 72 小時，A 亞群病毒之 IL-6 釋出仍然較 B 亞群高出至少 6 倍以上，而於 96 小時兩亞群之產量方趨於一致。在 BEAS-2B 細胞中 IL-6 之表現模式則與 IL-8 相似。rantes 分析之結果則與與 IL-6、之產生情形類似。而各細胞激素之 messenger RNA 之表現也印證以上之觀察。

由以上結果可得到初步結論：RSV 病毒不論 A 或 B 亞群在支氣管上皮細胞 (BEAS-2B) 誘導釋放之 IL-6、IL-8 及 rantes 均比肺泡上皮細胞 (A549) 為低。而 A 亞群和 B 亞群間之比較，不論在肺泡上皮細胞或支氣管上皮細胞，A 亞群產生之三種細胞激素量均高於 B 亞群。

IL-6 及 IL-8 均為 proinflammatory 過程中重要之細胞激素。而 rantes 則為強且有效之 eosinophil 及 memory T cell 之 chemokine。RSV 感染肺泡細胞 (A549) 時，IL-6、IL-8 及 rantes 之產生均較氣管細胞 (BEAS-2B) 為多，此也許可解釋當 RSV 感染肺臟時可引起嚴重之肺炎。且較支氣管炎嚴重。而 A 亞群感染細胞後 IL-6、IL-8 及 rantes 三種細胞激素之產生均高於 B 亞群，此現象亦可解釋 A 亞群 RSV 感染時所引起之炎性反應及臨床表現常較 B 亞群嚴重之故。由於炎症反應機制極為複雜。RSV 感染細胞後，這些細胞激素與其他細胞激素間之相互作用如何以及其在 RSV 感染之致病機制上所扮演之確切角色如何？仍有待進一步探討。

四、計畫成果自評

本計畫已初步達成預定之目標。其研究成果也與原有之推論相吻合。即臨床上引起較嚴重感染之 A 亞群病毒可以誘導較多之病毒。經由以上之研究，可提供對 RSV 病毒之致病機制進一步之瞭解。對今後臨床診斷、治療、RSV 感染免疫學研究、疫苗研發及評估之研究可提供重要之參考。

但由於時間及經費之限，目前僅比較 A 亞群及 B 亞群 RSV 各兩株。未來可繼續比較不同 A 亞型 (A1-4 等) 及 B 亞型 (B1-3) 間產生之細胞激素產生之異同。探討之細胞激素種類也可增加其他類別。

五、參考文獻

1. La Via WV, Marks MI, Stutman HR. Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention. *J Pediatr* 121; 503-510, 1992.
2. Akerlind-Stopner, Mufson MA. Respiratory viruses. In: Spectore S,

- Lancz G. ed. *Clinical Virology Manual*, 2nd ed. 1992, p329-332.
3. CDC. Update: Respiratory syncytial virus activity-United States, 1995-96 season. *MMWR* 42; 900-901, 1995.
 4. Whimbey E, Bodey GP. Viral pneumonia in the immuno-compromised with neoplastic disease: the role of common community respiratory viruses. *Semin Respir Infect* 7; 122-131, 1992.
 5. Harrington RD, Hooton TM, Hackman RC, Storach GA, Osborne B, Cleaves CA, Benson A, Meyers JD. An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. *J Infect Dis* 165; 987- 993, 1992.
 6. Okamoto Y, Kudo K, Shirotori K et al. Detection of genomic sequences of respiratory syncytial virus in otitis media with effusion in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101; 7-10, 1992.
 7. Janet AE, Anderson LJ, Frank SR. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 29; 115-119, 1991.
 8. Aherne W, Bird T, Court S, et al. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 23; 7-18, 1970.
 9. Gardner PS, Turk DC, Aherne Wa et al. Deaths associated with respiratory tract infection in childhood. *Br Med J* 4; 316-320, 1967.
 10. Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol* 70; 2852-2860, 1996.
 11. Hayes PJ, Scott R, Wheeler J. In vivo production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in BALB/c mice inoculated intranasally with a high dose of respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 42; 323-329, 1994.
 12. Matsuda K, Tsutsumi H, Okamoto Y, Chiba C. Development of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha activity in nasopharyngeal secretions of infants and children during infection with respiratory syncytial virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2; 322-324, 1995.
 13. Becker S, Koren HS, Henke DC. Interleukin-8 expression in normal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8; 20-27, 1993.
 14. Arnold R, Humbert B, Werchau H, Gallati H, Konig W. Interleukin-8, interleukin-6 and soluble tumor necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelium cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunol* 82; 126-133, 1994.
 15. Elias JA, Zheng T, Einarsson O, Landry M, Trow T, Rebert N, Panuska J. Epithelial interleukin-11 regulation by cytokines, respiratory syncytial virus and retinoic acid. *J Biol Chem* 269; 22261-22268, 1994.
 16. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C,

- Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151; 626-633, 1985.
17. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. Occurrence of subgroups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 162; 1283-1290, 1990.
18. Tsutsumi H, Onima M, Nagai K, Yamazaki H, Chiba S. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup infections in Japan. *Scand J Infect Dis* 23; 671-674, 1991.
19. Mufson MA, Belse RB, Orvell C, Norby E. Respiratory syncytial virus epidemic: variable dominance of subgroup A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis* 157; 143-148, 1988.
20. Wei PF. Genotyping of respiratory syncytial virus G protein gene. (Master thesis, 1996)