

[文章编号] 1671-587X(2011)06-0998-03

RNA 病毒感染早期人肝脏细胞固有免疫反应

齐 月, 金清龙, 温晓玉, 牛俊奇
(吉林大学第一医院肝胆胰内科, 吉林 长春 130021)

[摘 要] 目的: 检测 RNA 病毒感染早期人肝脏细胞中免疫相关基因的诱导情况, 揭示肝细胞特有的固有免疫反应。方法: 以原代培养人肝细胞作为研究对象, 利用仙台病毒 (SV) 感染, 根据感染时间不同分为 0、3 及 6 h 组, 利用间接免疫荧光法检测干扰素调节因子 3 (IRF3) 和干扰素调节因子 7 (IRF7) 的细胞内分布情况; 将 SV 感染的原代肝细胞按照感染时间不同分为 0、1、2 及 3 h 组, 利用 Real-time PCR 检测感染早期细胞中 IFN α 1、IFN β 、IFN λ 3 及 维甲酸诱导 I 型基因 (RIG-I) 的表达。结果: 原代肝细胞中, SV 感染 0 h, IRF3 和 IRF7 均分布于细胞质中; 感染 3 h, 部分细胞的 IRF7 分布于细胞核中, IRF3 仍分布于细胞质中; SV 感染 6 h, 部分细胞的细胞核中发现 IRF7 和 IRF3 的信号。Real-time PCR 法检测, 与感染 0 h 组比较, SV 感染 2 h 组 RIG-I、IFN β 及 IFN λ 3 显著升高 ($P < 0.05$), IFN α 1 略有升高。结论: 肝细胞内存在固有表达的 IRF7, 在感染早期发生细胞核内转移, 与感染相关的干扰素基因被诱导表达, 说明肝细胞针对病毒感染存在独特而快速的免疫反应。

[关键词] 固有免疫反应; 肝细胞; 干扰素

[中图分类号] R322.47; R392.9 **[文献标志码]** A

Innate immune response of human hepatocytes in early phase of RNA virus infection

QI Yue, JIN Qing-long, WEN Xiao-yu, NIU Jun-qi
(Department of Liver Diseases, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To check the induction of the expression of the genes related to the immune response of human hepatocytes at the early stage of RNA virus infection and to reveal the hepatocyte specific immune response. **Methods** The Sendai virus (SV) infected primary human hepatocytes were divided into 0, 3 and 6 h groups, immunofluorescence (IF) assay was used to detect the location of IRF3 and IRF7. The SV infected primary human hepatocytes were divided into 0, 1, 2 and 3 h groups, the expressions of IFN α 1, IFN β and IFN λ 3 and RIG-I in the hepatocytes at the early phase of infection were detected by Real-time PCR. **Results** The IRF3 and IRF7 were detected in the cytoplasm before SV infection. The signal of IRF7 was detected in the nuclear of some cells after 3 h infection of SV, and the signals of both IRF3 and IRF7 were detected in the nuclear of some cells after 6 h infection. Compared with 0 h SV infection group, the expressions of RIG-I, IFN β and IFN λ 3 were significantly increased and IFN α 1 was slightly increased in 2 h SV infection group ($P < 0.05$). **Conclusion** The nuclear translocation of the constitutively expressed IRF7 in hepatocytes occurs at the early stage of infection and is related to the induction of expression of the IFNs corresponding to the infection. It indicates that the hepatocytes have specific and fast immune response to the virus infection.

Key words: immune response; hepatocytes; interferon

[收稿日期] 2011-07-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (8107234, 30972611)

[作者简介] 齐 月 (1977-), 女, 吉林省长春市人, 主治医师, 在读医学博士, 主要从事病毒性肝炎感染与免疫方面的研究。

[通信作者] 牛俊奇 (Tel: 0431-88782388, E-mail: junqiniu@yahoo.com.cn)

病毒感染激活一系列编码细胞因子及其他抗病毒蛋白的基因,启动固有免疫及获得性免疫。其中I型干扰素(IFN α 和IFN β)在此过程中广泛表达,成为抵御病毒感染的第一道防线^[1]。干扰素调节因子(IRF3和IRF7)在IFN α 和IFN β 的转录过程中具有重要独特的作用^[2]。在很多组织中检测到了IRF3的固有表达,但是具有固有IRF7表达的组织则很少^[3],肝脏是其中之一^[4]。对于IRF3固有表达的组织,先天免疫过程通常为病毒激活先天免疫,IRF3形成二聚体进入细胞核内,进而参与多种基因的转录,包括IFN β ,IFN β 通过干扰素受体激活IRF7的转录,IRF7大量表达,形成二聚体进入细胞核内,参与IFN α 和IFN λ 的转录表达^[5-6]。但在具有IRF7固有表达的肝细胞中,具体的免疫过程尚无相关报道。本研究拟利用RNA病毒仙台病毒(SV)感染原代培养肝细胞,通过检测感染早期IRF3和IRF7的激活以及固有免疫相关基因的诱导表达,揭示人肝细胞特异性的固有免疫反应。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 原代肝细胞冻存液(江阴齐氏)为商业制品。培养条件为DMEM(Invitrogen),内含5%小牛血清(Gibco),5% AB型人血清(Sigma),20 mmol·L⁻¹ HEPES(Gibco),44 mmol·L⁻¹ 碳酸氢钠、10 mmol·L⁻¹ 烟碱、0.1 mmol·L⁻¹ 长效抗坏血酸、5 μ g·L⁻¹ EGF 8 mg·L⁻¹ 脯氨酸、0.25 μ g·L⁻¹ 胰岛素(Sigma),50 nmol·L⁻¹ 地塞米松,100 IU·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·L⁻¹ 链霉素、1%DMSO、2 mg·L⁻¹ 两性霉素B。37℃二氧化碳孵箱培养。

1.2 抗体及免疫荧光染色 anti-IRF3(FL425, Santa Cruz Biotechnology)、anti-IRF7(H246, Santa Cruz Biotechnology)、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(A11008, invitrogen)和Alexa Fluor 546 goat anti rabbit IgG(A11035, invitrogen)均为商业制品。以纤维蛋白原I包被的玻璃培养板培养原代肝细胞,以SV感染,抗IRF3和抗IRF7抗体作为第一抗体进行标记。以荧光显微镜Biozero进行检测。

1.3 RNA的提取及逆转录多聚酶链反应(RT-PCR) 以氯仿乙醇法提取细胞Total RNA^[4],以100 ng Total RNA为模板,CYBR green为染料,进行Real-time PCR检测,引物见表1。

1.4 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理,各组细胞IFN α 1、IFN β 、IFN λ 3及RIG-I的表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

表1 RT-PCR相关引物序列

Tab.1 The sequences of primers related to RT-PCR

Gene	Primer sequence
GAPDH	5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'
IFN α 1	5'-TGGCAACCAGTTCAGAAGGCTCCA-3' 5'-TCTGCTCTGA CAACCTCAGGCAC-3'
IFN β	5'-TTCAGAGGACA GTCGCCACC-3' 5'-ATGCCCCAGACCTCCTTCTC-3'
IFN λ 3	5'-GCACACACGAGGCCATATGTC-3' 5'-CTTCCACCTGGCCAGGAATC-3'
RIG-I	5'-GCTCCTACAGGTTGTGGAAA-3' 5'-CAGTGGGCCTGAAGATCCTC-3'

2 结果

2.1 RNA病毒感染早期肝细胞中IRF3和IRF7的分布 以SV感染原代肝细胞后,通过免疫荧光法检测IRF7的定位,同时检测IRF3作为阳性对照(图1,见封二)。感染前IRF7及IRF3均位于细胞质中,在感染后3 h,细胞核内发现IRF7的信号,但是没有IRF3的信号;感染后6 h,细胞核内发现IRF3和IRF7的信号。提示在肝细胞中,IRF7的核内转移处于病毒感染的早期。

2.2 RNA病毒感染早期肝细胞中固有免疫相关基因的表达 通过Real time PCR检测SV感染3 h人原代肝细胞中IFN α 1、RIG-I、IFN β 、IRF7和IFN λ 3的相对mRNA水平(表2),与感染前比较,在感染后2 h,可以检测到RIG-I、IFN β 和IFN λ 3的明显增高($P < 0.05$),IFN α 1轻度增高,IRF7未见明显变化。结果提示:在肝细胞被SV感染的早期,没有大量IRF7诱导表达的前提下,I型和III型INF的诱导已经被激活。

表2 SV感染3h后肝细胞中IFN α 1、RIG-I、IFN β 和IFN λ 3的mRNA水平
Tab. 2 The mRNA levels of IFN α 1, RIG-I, IFN β and IFN λ 3 in hepatocytes after SV infection for 3 h

Group	IFN α 1	IFN β	IFN λ 3	RIG-I	IRF7
0 h	1	1	1	1	1
1 h	0.98 \pm 0.30	1.24 \pm 0.14	3.33 \pm 0.27*	1.35 \pm 0.35	0.90 \pm 0.23
2 h	1.40 \pm 0.04	2.64 \pm 0.30*	1 650.00 \pm 687.00*	6.85 \pm 4.00*	1.24 \pm 0.18
3 h	1.60 \pm 0.08*	3.57 \pm 0.90*	16 431.00 \pm 561.00*	33.60 \pm 12.37*	1.15 \pm 0.17

* P<0.05 vs 0 h group.

3 讨论

本研究结果表明:肝细胞病毒感染早期存在IRF7核内转移,在没有大量IRF7诱导生成的条件下,发现免疫相关的部分基因的诱导转录。IRF7被激活后形成二聚体并进入细胞核,才能进一步激活多种抗病毒因子的表达^[3,5]。结果提示:IRF7在感染早期就参与了固有免疫应答,这与目前已经被反复证实的关于IRF7在细胞感染晚期大量诱导生成并被激活,进一步刺激大量抗病毒因子,包括I型和III型INF的产生的研究结论^[7-9]不同。本研究结果显示:在感染早期观察到IFN的低水平诱导表达。在通过IFN预处理的细胞中,病毒感染后细胞的免疫反应增强^[10],因此肝细胞中干扰早期微量IFN诱导很可能在后续的免疫反应中起到重要作用。肝细胞是人体最大的实体免疫器官,接受胃肠道80%的血流,需要面对大量细菌、毒素及病毒的入侵^[11-12]。这种高致病因素的环境可能需要快速有效的对抗机制,因此肝细胞很可能具有自己独特的免疫反应,相关机制尚需要进一步研究。如果进一步证实了肝细胞存在特有的免疫反应,能更快速有效地对于病毒感染进行应答,那么目前用于研究肝炎病毒HBV及HCV的体外非肝细胞模型^[13]则很可能不能有效反映病毒与宿主之间的相互作用,开发研制新型肝细胞为基础的体外研究工具将有利于获得肝脏感染相关病毒方面研究的更可靠结果。

[参考文献]

- [1] Katze MG, He Y, Gale Jr M. Viruses and interferon: a fight for supremacy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (9): 675-687.
[2] Chen W, Royer WE Jr. Structural insights into interferon

regulatory factor activation [J]. *Cell Signal*, 2010, 22 (6): 883-887.

- [3] Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity [J]. *Rev Med Virol*, 2010, 20 (1): 4-22.
[4] Aly HH, Watashi K, Hijikata M, et al. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2007, 46 (1): 26-36.
[5] Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6 (9): 644-658.
[6] Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99 (3): 467-478.
[7] Gad HH, Hamming OJ, Hartmann R. The structure of human interferon lambda and what it has taught us [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30 (8): 565-571.
[8] Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30 (8): 555-64.
[9] Pagliaccetti NE, Robek MD. Interferon-lambda in the immune response to hepatitis B virus and hepatitis C virus [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30 (8): 585-590.
[10] Zhou H, Zhao J, Perlman S. Autocrine interferon priming in macrophages but not dendritic cells results in enhanced cytokine and chemokine production after coronavirus infection [J]. *MBio*, 2010, 1 (4): e00219-10.
[11] Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity [J]. *Hepatology*, 2008, 47 (2): 729-736.
[12] 李志勤, 余祖江, 武淑环, 等. 干扰素 α 对不同基因型乙型肝炎病毒抗病毒疗效比较 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2010, 45 (3): 526-528.
[13] Uprichard SL. Hepatitis C virus experimental model systems and antiviral drug research [J]. *Virol Sin*, 2010, 25 (4): 227-245.