

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.12.005

论著 · 临床研究

## 干扰素- $\lambda 1$ 在人类鼻病毒感染后儿童 呼吸道上皮细胞中的表达

林小娟<sup>1</sup> 钟礼立<sup>1</sup> 谢亚平<sup>1</sup> 邓中平<sup>2</sup>

(1. 湖南省人民医院儿科, 湖南长沙 410005; 2. 湖南圣湘生物有限公司, 湖南长沙 410000)

**[摘要]** **目的** 研究人类鼻病毒(HRV)感染后儿童呼吸道上皮细胞中干扰素(IFN)- $\lambda 1$ 的表达水平。**方法** 收集2017年2~10月因急性呼吸道感染住院的患儿痰液及鼻咽拭子标本,分别进行细菌培养及11种呼吸道病原体核酸检测,筛检出单纯HRV阳性患儿90例作为HRV感染组,单纯呼吸道合胞病毒(RSV)阳性患儿95例为RSV感染组。另选取同期门诊体检且病原检测结果均阴性的健康儿童50例为健康对照组。采集各组儿童鼻咽拭子标本,采用荧光定量PCR检测病毒载量和IFN- $\lambda 1$  mRNA表达水平。**结果** 在HRV感染组,IFN- $\lambda 1$  mRNA的表达水平在不同性别及不同年龄组间比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。HRV感染组IFN- $\lambda 1$  mRNA的表达水平与HRV的病毒载量无相关性( $P>0.05$ )。HRV感染组的IFN- $\lambda 1$  mRNA表达水平高于健康对照组,但低于RSV感染组( $P<0.05$ )。**结论** HRV可诱导呼吸道上皮细胞中IFN- $\lambda 1$ 的表达;推测IFN- $\lambda 1$ 在机体抗HRV感染中可能起到重要作用。**[中国当代儿科杂志, 2019, 21(12): 1177-1181]**

**[关键词]** 呼吸道感染;干扰素- $\lambda 1$ ;鼻病毒;呼吸道合胞病毒;儿童

### Expression of interferon- $\lambda 1$ in respiratory epithelial cells in children with human rhinovirus infection

LIN Xiao-Juan, ZHONG Li-Li, XIE Ya-Ping, DENG Zhong-Ping. Department of Pediatrics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China (Zhong L-L, Email: 570047414@qq.com)

**Abstract: Objective** To study the expression of interferon- $\lambda 1$  (IFN- $\lambda 1$ ) in respiratory epithelial cells in children with human rhinovirus (HRV) infection. **Methods** Sputum samples and nasopharyngeal swabs were collected from the children who were hospitalized due to acute respiratory infection from February to October, 2017. Bacterial culture was performed, and nucleic acid test was performed for 11 respiratory pathogens. A total of 90 children with positive HRV alone were enrolled as the HRV infection group, and 95 children with positive respiratory syncytial virus (RSV) alone were enrolled as the RSV infection group. A total of 50 healthy children who underwent outpatient physical examination during the same period of time and had negative results for all pathogen tests were enrolled as the healthy control group. Nasopharyngeal swabs were collected from all groups, and quantitative real-time PCR was used to measure viral load and the mRNA expression of IFN- $\lambda 1$ . **Results** In the HRV infection group, there was no significant difference in the mRNA expression of IFN- $\lambda 1$  between boys and girls and across all age groups ( $P>0.05$ ). In the HRV infection group, there was no correlation between the mRNA expression of IFN- $\lambda 1$  and HRV load ( $P>0.05$ ). The mRNA expression of IFN- $\lambda 1$  in the HRV infection group was significantly higher than that in the healthy control group ( $P<0.05$ ), but significantly lower than that in the RSV infection group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** HRV can induce the expression of IFN- $\lambda 1$  in respiratory epithelial cells, suggesting that IFN- $\lambda 1$  may play an important role in anti-HRV infection in children. **[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(12): 1177-1181]**

**Key words:** Respiratory infection; Interferon- $\lambda 1$ ; Rhinovirus; Respiratory syncytial virus; Child

[收稿日期] 2019-06-19; [接受日期] 2019-10-31

[基金项目] 湖南省自然科学基金立项计划(2017JJ2150); 湖南省卫健委科研计划课题项目(B2019049)。

[作者简介] 林小娟,女,硕士,副主任医师。

[通信作者] 钟礼立,女,主任医师。Email: 570047414@qq.com。

呼吸道感染是严重影响全球儿童的健康问题,每年有超过100万5岁以下儿童死于呼吸道感染,病毒是呼吸道感染中最重要病原。人类鼻病毒(human rhinovirus, HRV)是儿童呼吸道感染中常见的病毒,是诱导婴幼儿喘息性疾病的常见病原体且与哮喘的发生及发展紧密相关。宿主和病毒两者的相互作用深刻影响到病毒相关的气道炎症反应。干扰素(interferon, IFN)作为机体抗病毒先天免疫反应的主要角色之一,在呼吸道感染的发病中备受关注,Ⅰ型与Ⅱ型IFN,被认为是早期宿主对抗病毒感染防御机制中具有代表性的细胞因子。2003年,一种新型的抗病毒细胞因子被发现,并被鉴定为Ⅲ型IFN,即IFN-λ。Ⅲ型IFN与Ⅰ型IFN具有类似的抗病毒性质,但似乎仅表达于上皮细胞,从而主要在上皮表面发挥保护作用。IFN-λ由IL-29(IFN-λ1)、IL-28A(IFN-λ2)、IL-28B(IFN-λ3)三个亚型组成<sup>[1]</sup>,病毒活性的强弱顺序为IFN-λ3>IFN-λ1>IFN-λ2<sup>[2-3]</sup>,其中IFN-λ1在呼吸道上皮细胞中高表达<sup>[4]</sup>。在呼吸道病毒感染性疾病发病中,不同的呼吸道病毒感染临床表现是不一样的,那么不同病毒感染后呼吸道上皮细胞IFN-λ1的表达水平是否有差异,国内鲜有研究报道。在前期研究中, Selvaggi等<sup>[5]</sup>指出,呼吸道合胞病毒(RSV)和HRV感染后均可诱导IFN-λ的表达,但RSV感染对IFN-λ的诱导作用高于HRV感染。本课题组的前期研究中,陶美婷等<sup>[6]</sup>发现RSV可诱导IFN-λ1的表达,并且IFN-λ1表达水平与RSV病毒载量呈正相关。本研究中我们观察了HRV感染患儿气道上皮细胞中IFN-λ1的表达水平,同时与RSV感染患儿做对比,并研究IFN-λ1的表达与HRV病毒拷贝数的关系,探讨IFN-λ1在不同呼吸道病毒感染中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

采集2017年2~10月于湖南省人民医院儿童医学中心因急性呼吸道感染住院患儿入院48h内的痰液及鼻咽拭子标本,鼻咽拭子标本行核酸提取并对11种呼吸道病原体进行检测(包括HRV、RSV、呼吸道腺病毒、支原体、衣原体、百日咳杆菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副

流感1~3型病毒),痰液标本行细菌培养。选取单纯HRV阳性患儿90例为HRV感染组,其中男55例,女35例,平均年龄12.0(5.8~36.0)个月;选取单纯RSV阳性患儿95例为RSV感染组,其中男56例,女39例,平均年龄8.0(3.0~24.0)个月。排除:(1)年龄>14岁;(2)痰培养有阳性结果者;(3)合并肿瘤、血液系统疾病、心肝肾功疾病、免疫功能缺陷等基础疾病者;(4)病程超过10d。另采集同期于我院门诊行健康体检儿童(入院前1周内无就医情况,无发热、咳嗽等呼吸道症状)入院当天的鼻咽拭子标本,检测11种呼吸道病原体,以检测结果阴性的健康儿童50例为健康对照组,其中男27例,女23例,平均年龄5.0(2.0~11.0)个月。本研究已获得所有家长签署的知情同意书。

### 1.2 标本采集及检测

标本采样由湖南省人民医院儿童呼吸科专业护士执行。将咽拭子伸入研究对象的鼻咽部,长度为耳垂部到鼻尖,将拭子轻轻捻动转圈取样,采集鼻咽拭子,加入2mL病毒保存液,保存至-80℃冰箱。鼻咽拭子标本送圣湘生物有限公司实验室,提取核酸并对11种呼吸道病原体进行检测;同时吸痰管抽吸口咽部痰液送检验科行细菌培养。

### 1.3 实时荧光定量PCR法检测IFN-λ1 mRNA表达及病毒载量

将入组儿童的鼻咽拭子标本室温解冻并混匀,取200μL样本,用RNAsimple总RNA提取试剂盒(湖南圣湘生物有限公司)提取总RNA。针对HRV病毒基因组设计特异性引物HRV-1A、HRV-2A、HRV-1B和Taqman荧光探针HRV-P;针对IFN-λ1基因组设计特异性引物IFN-λ1-F、IFN-λ1-R和Taqman荧光探针IFN-λ1-P;根据管家基因GAPDH基因组设计特异性引物GAPDH-F、GAPDH-R和Taqman荧光探针GAPDH-P;针对RSV病毒基因组设计特异性引物RSV-F、RSV-R和Taqman荧光探针RSV-P,所有引物序列由上海百力格公司设计并合成,见表1。

将样本提取的总RNA进行PCR反应。反应体系:将HRV-1A/2A/1B/P(50pmol/μL)各0.2μL、GAPDH-F/R/P(50pmol/μL)各0.2μL、IFN-λ1-F/R/P(40pmol/μL)各0.25μL、RSV-F/R/P

(50 pmol/μL) 各 0.2 μL 分别加入含 Buffer 40 μL、H-Taq 酶 (5 U/μL) 1 μL, Tth DNA 聚合酶 (5 U/μL) 1 μL、Mn<sup>2+</sup> (5 mmol/L) 1.5 μL、dNTPs (40 pmol/μL) 1.5 μL、总 RNA 5 μL 的混合液中。反应条件均为: 95℃ 1 min, 60℃ 30 min, 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 45 个循环; 60℃ 30 s。

将 CT 值 <40 者判定为阳性结果, CT 值 >40

者判定为阴性结果; 根据同 1 次扩增中已知浓度质粒的 CT 值推算出待测 mRNA 的拷贝数。HRV 感染组及 RSV 感染组 IFN-λ1 mRNA 的相对含量 = IFN-λ1 mRNA 绝对定量 /GAPDH mRNA 的绝对定量, 将获取的数据进行 log10 对数转换后进行统计学分析。HRV 病毒载量为 HRV mRNA 绝对定量, 将数据经 log10 对数转换后进行对比分析。

表 1 HRV、IFN-λ1、GAPDH 及 RSV 的引物及探针核苷酸序列

名称	引物及探针名称	引物及探针序列 (5' → 3')	5' 荧光基团	3' 淬灭基团
HRV	HRV-1A	AGCCTGCCTGGCTGCCTG		
	HRV-2A	CCTGCCTGGCGGCCARC		
	HRV-1B	CCCAAAGTAGTYGGTCCCRCTCC	FAM	MGB
	HRV-P	TCCTCCGGCYCTGAATG		
GAPDH	GAPDH-F	CCACTCCTCCACCTTTGA		
	GADPH-R	TGTCATACCAGGAAATGAGC	HEX	MGB
	GADPH-P	CTGGCATTGCCCTCAACGACC		
IFN-λ1	IFN-λ1-F	GGACGCCTTGAAGAGTCACT		
	IFN-λ1-R	AGAAGCCTCAGGTCCCAATTC	FAM	TAMRA
	IFN-λ1-P	GTTGCAGCTCTCCTGTCTTCCCGC		
RSV	RSV-F	TTCACGARGGCTCCACATA		
	RSV-R	TCAATTGGTTGATTGATTGGTT	FAM	BHQ1
	RSV-P	TTCACGTATGTTCCATATTGCCCCA		

注: [FAM] 6- 羧基荧光素; [HEX] 六氯 -6- 甲基荧光素; [MGB] Minor Groove Binder, 小沟结合物, 可与 DNA 的小沟结合的化学基团; [TAMRA] 羧基 -4- 甲基罗丹明; [BHQ1] Black Hole Quencher, 为常用的黑洞淬灭基团。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用两样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。采用 Pearson 相关分析对连续变量进行相关性分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同性别 HRV 阳性患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量变化

90 例 HRV 感染组患儿中, 男性患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量 (2.7 ± 0.3) 与女性患儿 (2.7 ± 0.5) 相比, 差异无统计学意义 (*t* = 0.318, *P* > 0.05)。

### 2.2 不同年龄 HRV 阳性患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量变化

90 例 HRV 感染组患儿中, <1 岁患儿 54 例, 1~3 岁患儿 18 例, >3 岁患儿 18 例。IFN-λ1 mRNA 相对表达量在 <1 岁组 (2.6 ± 0.4)、1~3 岁组

(2.7 ± 0.4) 和 >3 岁组 (2.8 ± 0.3) 间比较差异无统计学意义 (*F* = 0.529, *P* > 0.05)。

### 2.3 健康对照组、HRV 感染组和 RSV 感染组 IFN-λ1 mRNA 相对表达量变化

HRV 感染组患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量为 2.68 ± 0.40, RSV 感染组为 3.70 ± 0.76, 健康对照组为 2.28 ± 0.24, 三组儿童 IFN-λ1 mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义 (*F* = 104.08, *P* < 0.05)。其中 HRV 感染组、RSV 感染组 IFN-λ1 mRNA 相对表达量高于健康对照组 (*P* < 0.05), HRV 感染组 IFN-λ1 mRNA 相对表达量低于 RSV 感染组 (*P* < 0.05)。

### 2.4 HRV 感染组 IFN-λ1 mRNA 相对表达量与 HRV 的病毒载量相关性分析

HRV 阳性患儿病毒载量为 5.95 ± 2.40。相关分析结果显示: HRV 阳性患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量与 HRV 的病毒载量无相关性 (*r* = 0.35, *P* > 0.05)。



### 3 讨论

急性呼吸道感染在全世界范围内都是儿童最为常见的疾病,呼吸道病原学分析研究表明,儿童急性呼吸道感染中病毒感染占据主要地位,病毒感染较易形成爆发流行,感染后机体获得免疫抗体维持时间较短,且大部分病毒血清型众多,交叉抗原少,可反复感染。HRV是引起儿童呼吸道感染性疾病的常见病毒,可使气道上皮免疫激活及产生炎症反应,Ⅲ型干扰素,具有同Ⅰ型干扰素相似的抗病毒作用,但因其具有受体特异性表达于上皮组织细胞的特点,使其主要在上皮细胞发挥作用<sup>[7]</sup>,从而引起了人们对其研究的热潮。既往的研究提示,Ⅲ型干扰素与气道病毒感染后的疾病相关,特别是在HRV引起的哮喘的恶化和RSV相关的喘息性疾病当中起到重要作用<sup>[5,8-10]</sup>。HRV可以通过IRF1依赖的通路而拮抗IFN-λ的生成<sup>[11]</sup>。但Miller等<sup>[12]</sup>却发现哮喘儿童群体里,HRV感染与急性气喘发作相关,HRV通过IFN-λ1反应介导引起哮喘恶化。调节IFN-λ1可能作为治疗HRV引起的急性哮喘发作方案之一。Scagnolari等<sup>[13]</sup>在病毒相关急性毛细支气管炎患儿鼻咽冲洗液中检测到IFN诱导基因的表达,病情严重程度与IFN诱导基因的表达水平成反比。这表明IFN反应在早期病毒相关呼吸疾病中起着重要作用,这些研究均提示IFN-λ介导的反应在呼吸道病毒感染时发挥正面或负面的效应,本次实验研究了呼吸道上皮细胞中IFN-λ1表达与HRV感染的关系。

本研究可见HRV感染后可诱导呼吸道上皮细胞中IFN-λ1 mRNA的表达增高,但HRV感染组IFN-λ1 mRNA表达水平明显低于RSV感染组,推测相对于HRV,机体对RSV有更多分子模式识别受体,此结论与Selvaggi等<sup>[5]</sup>的研究结论一致,他们在RSV感染患者的鼻咽拭子中检测发现多种细胞因子的浓度高于HRV感染者,考虑RSV较HRV可刺激机体产生更强烈的固有免疫应答,诱导产生更高水平的IFN-λ1。进一步我们观察到IFN-λ1 mRNA的表达水平与HRV的病毒载量无相关性。陶美婷等<sup>[6]</sup>既往研究中发现RSV阳性患儿鼻咽拭子中IFN-λ1 mRNA水平明显增高,且IFN-λ1 mRNA水平与RSV病毒载量呈明显正相关。Jewell等<sup>[14]</sup>观察到在甲型流感病毒感染小鼠

肺部实验中,IFN-λ的反应水平与病毒的剂量相关。之后Miller等<sup>[12]</sup>研究发现,在由HRV感染诱发的哮喘发作患儿的鼻腔盥洗液中,HRV滴度与机体IFN-λ反应没有相关性,这与本实验结果一致。我们分析可能是由于与流感病毒及RSV等不同,HRV感染机体时,疾病严重程度的差异可能更多地与宿主对HRV的易感性有关,而不是与病毒载量有关<sup>[15-16]</sup>,因此HRV对IFN-λ1产生的诱导作用最终不由病毒拷贝数决定,两者并不呈正相关。

Pierangeli等<sup>[17]</sup>研究分析了HRV和RSV感染的小婴儿气道IFN-λ受体(IFNLR1/IL10RB)的表达的情况,他们发现HRV感染比RSV感染小婴儿气道中IFNLR1 mRNA的表达更多,而IL10RB mRNA的水平在两组病人间没有区别。在比较严重的毛细支气管炎和嗜酸性粒细胞大于3%的HRV感染婴儿及感染HRV-C型的婴儿中,IFNLR1 mRNA更高。提示不同的IFN-λ受体的分布可能决定了不同呼吸道病毒亚型感染时的抗病毒防御机制和临床转归。IFN-λ受体的转录水平的高度变异可能与病毒的种类不同及宿主的基因相关。IFN-λ已被证明通过直接作用于Th1/2极化和细胞因子的产生,在调节适应性免疫反应中发挥着关键作用<sup>[18-19]</sup>。特别是,IFN-λ1已被证明可以增加IL-6、IL-8和IL-10的产量,而IL-1或TNF没有随之增加,这表明它可能不是直接导致局部组织破坏,而是有助于细支气管炎的炎症过程。探究病毒感染时炎症性细胞因子和IFN-λ亚型之间的交叉作用在确定临床转归方面的影响需要更多的研究。

综上所述,IFN-λ1与HRV之间的关系密切,HRV急性感染时可诱导IFN-λ1的表达增高。IFN-λ1作为机体抗病毒感染的第一道免疫防线,在呼吸道病毒的治疗中发挥着重要作用,其具体作用机制与机体免疫应答的关系等还有待更深入的研究,IFN-λ在呼吸道病毒感染中的生物学功能研究是具有重要意义的。

#### [参 考 文 献]

- [1] Minor DM, Proud D. Role of human rhinovirus in triggering human airway epithelial-mesenchymal transition[J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 110.
- [2] Lasfar A, Zloza A, de la Torre A, et al. IFN-λ: a new inducer of local immunity against cancer and infections[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 598.

- [3] Lauber C, Vieyres G, Terczyńska-Dyla E, et al. Transcriptome analysis reveals a classical interferon signature induced by IFN $\lambda$ 4 in human primary cells[J]. *Genes Immun*, 2015, 16(6): 414-421.
- [4] Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 1): 1-47.
- [5] Selvaggi C, Pierangeli A, Fabiani M, et al. Interferon lambda 1-3 expression in infants hospitalized for RSV or HRV associated bronchiolitis[J]. *J Infect*, 2014, 68(5): 467-477.
- [6] 陶美婷, 谢亚平, 刘淑萍, 等. RSV 感染患儿呼吸道上皮细胞中干扰素  $\lambda$ 1 的表达水平及其与 RSV 载量的关系 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(6): 677-681.
- [7] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 63-68.
- [8] Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, et al. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations[J]. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1023-1026.
- [9] Baraldo S, Contoli M, Bazzan E, et al. Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(6): 1307-1314.
- [10] Spann KM, Baturcam E, Schagen J, et al. Viral and host factors determine innate immune responses in airway epithelial cells from children with wheeze and atopy[J]. *Thorax*, 2014, 69(10): 918-925.
- [11] Garibaldi BT, Illei P, Danoff SK. Bronchiolitis[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2012, 32(4): 601-619.
- [12] Miller EK, Hernandez JZ, Wimmenauer V, et al. A mechanistic role for type III IFN- $\lambda$ 1 in asthma exacerbations mediated by human rhinoviruses[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(5): 508-516.
- [13] Scagnolari C, Midulla F, Trombetti S, et al. Upregulation of interferon-induced genes in infants with virus-associated acute bronchiolitis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, 232(10): 1355-1359.
- [14] Jewell NA, Cline T, Mertz SE, et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo[J]. *J Virol*, 2010, 84(21): 11515-11522.
- [15] Ahn JG, Kim DS, Kim KH. Clinical characteristics and cytokine profiles of children acute lower respiratory tract infections caused by human rhinovirus[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0198624.
- [16] van Elden LJ, Sachs AP, van Loon AM, et al. Enhanced severity of virus associated lower respiratory tract disease in asthma patients may not be associated with delayed viral clearance and increased viral load in the upper respiratory tract[J]. *J Clin Virol*, 2008, 41(2): 116-121.
- [17] Pierangeli A, Stazu M, Nenna R, et al. Interferon lambda receptor 1 (IFNL1R) transcript is highly expressed in rhinovirus bronchiolitis and correlates with disease severity[J]. *J Clin Virol*, 2018, 102: 101-109.
- [18] Jordan WJ, Eskdale J, Boniotto M, et al. Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29)[J]. *Genes Immun*, 2007, 8(1): 13-20.
- [19] Pekarek V, Srinivas S, Eskdale J. Interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) induces ELR(-) CXC chemokine mRNA in human peripheral blood mononuclear cells, in an IFN-gamma-independent manner[J]. *Genes Immun*, 2007, 8(2): 177-180.

( 本文编辑: 万静 )