论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0934-04

TLR7激活对HepG2.2.15细胞株炎症因子TNF-α和IL-6表达的上调作用

张胜权,胡道军,朱娟娟,罗 欣,黄海量,柴 瑜,陶千山 (230032 合肥,安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 比较乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因组稳定转染细胞株HepG2.2.15和肝癌细胞株HepG2中TLR7表达,分析HepG2.2.15细胞中TLR7激活后诱导炎症因子表达。**方法** 通过实时荧光定量(Real-time) PCR分析HepG2和HepG2.2.15中TLR7受体、IL-6和TNF-α mRNA水平表达。TLR7配体Gardiquimod刺激20 min后,Western blot分析激活的信号通路;刺激6 h,Real-time PCR分析TLR7激活后IL-6和TNF-α mRNA水平表达变化;刺激48 h,ELISA法分析IL-6和TNF-α蛋白质水平表达变化。**结果** HepG2.2.15细胞株中TLR7 mRNA水平表达比HepG2中的表达高约30倍($P<0.01$)。在没有任何刺激的条件下,HepG2.2.15细胞株中IL-6和TNF-α mRNA水平表达比HepG2中的表达分别高约7.5和9.3倍;Gardiquimod刺激6 h后,HepG2.2.15细胞株中IL-6和TNF-α mRNA表达水平明显升高,并具有剂量依赖关系($P<0.01$),而HepG2细胞在相同的刺激下IL-6和TNF-α mRNA表达水平升高并不明显($P<0.05$);刺激48 h后,IL-6和TNF-α蛋白质表达水平变化与其mRNA水平变化一致($P<0.01$)。HepG2.2.15细胞株经Gardiquimod刺激后NF-κB p65亚单位进入细胞核中量显著增加。**结论** TLR7激活后能够上调HepG2.2.15细胞中IL-6和TNF-α的表达,提示TLR7可能在乙型病毒性肝炎的病理生理过程中发挥作用。

[关键词] 乙型肝炎病毒;TLR7; Gardiquimod;HepG2.2.15细胞株;促炎症因子

[中图法分类号] R392.11; R392.2; R512.62 **[文献标志码]** A

Role of TLR7 activation in IL-6 and TNF-α expressions in HepG2.2.15 cell line

Zhang Shengquan, Hu Daojun, Zhu Juanjuan, Luo Xin, Huang Hailiang, Chai Yu, Tao Qianshan (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230032, China)

[Abstract] Objective To explore the different expression of Toll-like receptor 7 (TLR7) between HepG2.2.15 cells, which were stably transfected HBV gene, and HepG2 cells, and then analyze the expressions of the TLR7-induced inflammation factors in HepG2.2.15 cell line. Methods Real-time PCR was used to analyze the different expressions of TLR7, IL-6 and TNF-α between in HepG2 and HepG2.2.15 cells. After the cells were treated with Gardiquimod, a TLR ligand, at 0, 1, 3 and 10 μg/ml for 6 h, the messenger ribonucleic acid (mRNA) expressions of IL-6 and TNF-α were measured by real-time PCR, and the protein secretion of the 2 cytokines was determined by ELISA after 48 hours' treatment. Western blot analysis was used to analyze the activation of NF-κB in HepG2.2.15 cells after Gardiquimod stimulation for 20 min. Results The expression of TLR7 in HepG2.2.15 cells was about 30-fold higher than that in the HepG2 cells. The mRNA levels of IL-6 and TNF-α were higher in HepG2.2.15 cells than in HepG2 cells (about 7.5 and 9.3 folds respectively), even without Gardiquimod stimulation. After the cells were stimulated by Gardiquimod for 6 h, although the mRNA of IL-6 and TNF-α in HepG2 cells were slightly increased (compared with the control, $P<0.05$), the increase of IL-6 and TNF-α mRNA levels was more significant in HepG2.2.15 cells than in HepG2 cells (compared with the control, $P<0.01$, and with HepG2 cells, $P<0.01$). The cells were treated with Gardiquimod for 48 h, the induced expressions of the 2 cytokines protein levels had a consistent changes with the mRNAs level at a dose-dependent manner (compared with control $P<0.01$). While HepG2.2.15 cells were stimulated by Gardiquimod for 20 min, the nuclear immigration of NF-κB p65 subunit was significantly increased. Conclusion The activation of TLR7 upregulates the expressions of the IL-6 and TNF-α, suggesting that the TLR7 might be involved in the pathogenesis of the viral hepatitis.

[Key words] hepatitis B virus; Toll-like receptor 7; Gardiquimod; HepG2.2.15 cells; inflammation factors

Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (050430604), and the Special Fund for Anhui Key Laboratory of Outstanding Young Leaders (2007). Corresponding author: Zhang Shengquan, Tel:86-551-5161194, E-mail: sqz36@yahoo.com

[基金项目] 安徽省自然科学基金(050430604);安徽省重点实验室优秀中青年科研带头人专项基金(2007)

[通信作者] 张胜权,电话:(0551)5161194, E-mail: sqz36@yahoo.com

Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是机体识别病毒及其他病原生物等病原相关分子模式(PAMP)的模式识别受体(PRR)[1]。到目前为止,已鉴定出 10 种人 TLRs。不同的 TLRs 识别不同的 PAMP,在抗感染中发挥不同作用[1-3]。TLR7 定位在细胞的内体上,识别单链 RNA(ssRNA)和小分子化合物。TLR7 与其配体结合后,主要通过依赖 MyD88 信号途径,激活信号蛋白 IRF7、NF-κB 和 MAPK,诱导干扰素(IFNα、β、λ、ω)、促炎症因子(IL-6、TNF-α)以及 DC 细胞中的 CD80 和 CD86 合成,从而调控免疫反应[4,5]。研究发现干扰素刺激细胞可以诱导靶细胞中 TLR7 受体的表达,从而建立一个对病毒的高敏感状态,TLR7 在病毒感染性疾病的病理生理中发挥重要作用[6]。已经发现 TLR2/9 等与乙型肝炎发病有关[7],但是 TLR7 在乙型肝炎的发病中如何发挥作用仍不清楚[8]。本研究旨在探讨稳定转染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的细胞株 HepG2.2.15 与肝癌细胞株 HepG2 中 TLR7、IL-6 和 TNF-α 是否存在差异,同时分析 TLR7 配体 Gardiquimod 激活 TLR7 后在 HepG2.2.15 细胞中激活的信号途径及其可能诱导的炎症因子表达。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HepG2 及 HepG2.2.15 细胞由本室保存,Gardiquimod 购自 Invitrogen 公司,DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,RT 试剂盒(A3800)购自 Promega 公司,Real-time 试剂盒购自 TaKaRa 公司,引物由 TaKaRa 公司合成,Anti-TLR7 及抗核纤层蛋白(Lamin)抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 及 HepG2.2.15 接种于 25 ml 细胞培养瓶中,于 37 ℃,以含 100 ml/L 胎牛血清 DMEM 培养液、5% CO_2 培养。

1.2.2 Real-time PCR 检测 TLR7、IL-6 和 TNF-α mRNA 水平表达 提取刺激或不刺激的培养细胞总 RNA 并合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,加入 200 nmol/L 特异性引物(表 1)和 2×SYB Green Premix,总体积 20 μl。在 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪上按 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 40 s,40 个循环运行,以 GAPDH 为内参。运行结束后相对定量法分析各基因表达,通过 $-\Delta\Delta Ct$ 计算实验组(TLR7 配体 Gardiquimod 刺激)与对照组(无 TLR7 配体 Gardiquimod 刺激)的倍数关系(实验组/对照组 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍)。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
TLR7	上游引物 5′-TAGGATCACTCCATGCCATCAA-3′	148
	下游引物 5′-CAGTGTCCACATTGGAAACACC-3′	
IL-6	上游引物 5′-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3′	81
	下游引物 5′-GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3′	
TNF-α	上游引物 5′-TCTCCTTCCTGATCGTGGCA-3′	144
	下游引物 5′-GGGTTCGAGAAGATGATCTGACT-3′	
GAPDH	上游引物 5′-CCACATCGCTCAGACACCAT-3′	115
	下游引物 5′-GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT-3′	

1.2.3 ELISA 检测 IL-6 和 TNF-α 蛋白质水平表达 取培养细胞上清液,ELISA 分析 IL-6 和 TNF-α 在蛋白质水平表达的变化。每孔加入培养细胞上清液 100 μl,37 ℃ 2 h;洗涤液洗 5 次;加入第一抗体 100 μl,37 ℃ 1 h;洗涤液洗 5 次;加入酶标抗体 100 μl,37 ℃ 1 h;洗涤液洗 5 次;加入显色液 100 μl,37 ℃ 15 min;加入终止液 100 μl,酶联仪比色。每个样本设 3 个复孔。

1.2.4 Western blot 检测 TLR7 及 NF-κB p65 亚单位 提取处理后细胞总蛋白及细胞核蛋白[9],加入 5×上样缓冲液 50 μl,100 ℃ 5 min。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(胶浓度为 12%)分离蛋白质,120 mA 电流将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶封闭 2 h,一抗(NF-κB p65 亚单位 1∶300, Lamin 1∶500)4 ℃ 过夜,洗膜 3 次,二抗(1∶20 000)室温 1 h,加发光剂 ECL,曝光压片。拍照、BIO-ID 图像分析软件分析。

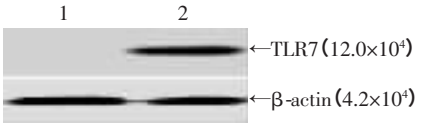
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,同一组内不同浓度点的比较采用方差分析,2 组之间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 HepG2.2.15 与 HepG2 细胞株中 TLR7 mRNA 及蛋白质表达水平

培养至相同生长状态的 HepG2.2.15 及 HepG2 细胞,调整细胞数至 2×10^5/ml 后,接种于 12 孔板,继续培养至约 70% 融合。细胞裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白,经 Western blot 分析显示 HepG2.2.15 中 TLR7 水平远高于 HepG2 细胞(图 1)。Trizol 提取细胞总 RNA,Real-time PCR 分析 TLR7 mRNA 水平,每组设 3 个复孔,重复 3 次。结果通过 $-\Delta\Delta Ct$($-\Delta\Delta Ct = 4.89$)计算得出稳定转染 HBV 细胞株 HepG2.2.15 中 TLR7 表达大约是 HepG2 细胞中的 30 倍($P<0.01$)。



1:HepG2 细胞株;2:HepG2.2.15 细胞株

图 1 Western blot 检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞株中 TLR7 蛋白的表达

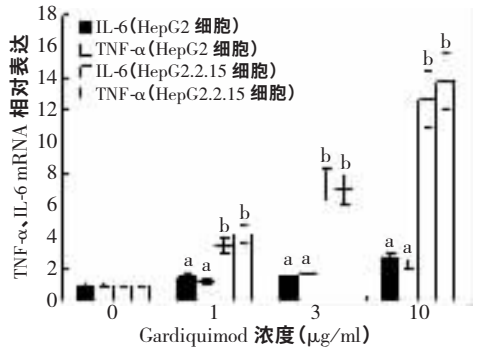
2.2 Real-time PCR 检测 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞中 IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达

Real-time PCR 检测 HepG2.2.15 细胞中 IL-6 和 TNF-α mRNA 表达水平较 HepG2 细胞中分别高(7.5±0.6)和(9.3±0.8)倍。以不同浓度(0、1、3、10 μg/ml)的 Gardiquimod 作用 HepG2.2.15 和 HepG2 细胞 6 h 后,每组设 3 个复孔,提取 RNA、逆转录 cDNA。Real-time PCR 检测 Gardiquimod 刺激 6 h 后,HepG2.2.15 细胞中 IL-6 和 TNF-α mRNA 水平较对照组显著升高($P<0.01$),且具有剂量依赖关系,HepG2 细胞的 IL-6 和 TNF-α mRNA 水平虽有所升高($P<0.05$),但远没有 HepG2.2.15 中升高显著(图 2)。

2.3 ELISA 检测 HepG2.2.15 细胞中 IL-6 和 TNF-α 蛋白质水平表达

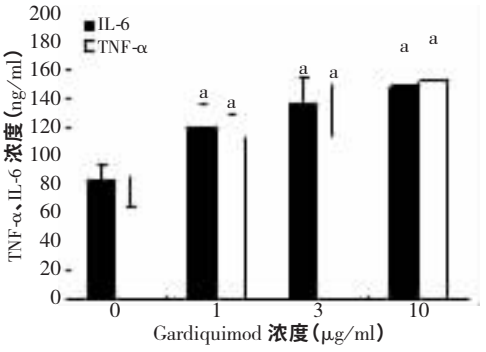
不同浓度(0、1、3、10 μg/ml)的 Gardiquimod 作用 HepG2.2.15 细胞 48 h 后收集上清液经 ELISA 分析,培养上清液中 IL-6 和 TNF-α 的蛋白水平随着 Gardiquimod 浓度的升高而升高($P<$

0.01,图3),提示 Gardiquimod 诱导其蛋白质水平表达也具有剂量依赖关系。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组(0 μg/ml Gardiquimod)比较

图2 Real-time PCR 检测不同浓度 Gardiquimod 作用 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞后 IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达

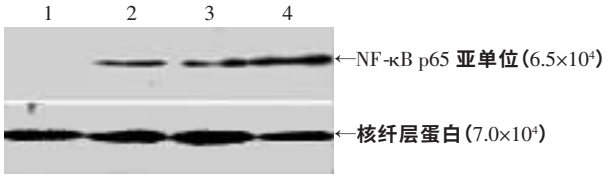


a: $P<0.01$,与对照组(0 μg/ml Gardiquimod)比较

图3 ELISA 检测不同浓度 Gardiquimod 作用 HepG2.2.15 细胞后 IL-6 和 TNF-α 蛋白的表达

2.4 Western blot 检测 NF-κB p65 亚单位

HepG2.2.15 细胞经 Gardiquimod 刺激 20 min,提取核蛋白,Western blot 分析显示 NF-κB 被活化,其 p65 亚单位入核量与对照组比较显著增加(图4),提示 Gardiquimod 能激活 HepG2.2.15 细胞中的 TLR7 信号途径。



1~4:Gardiquimod 浓度分别为0、1、3、10 μg/ml

图4 Western blot 检测不同浓度 Gardiquimod 作用 HepG2.2.15 细胞后 NF-κB p65 亚单位入核量

3 讨论

TLR 家族是进化中的保守家族,具有高度同源性,识别病原相关的分子模式(PAMP)。每种 TLR 受体与其配体结合后能够激活特定的信号途径从而诱导特异的生物学效应,如启动天然免疫、树突状细胞的成熟、细胞因子产生和获得性免疫的建立等[10]。研究表明 TLR7 通过诱导干扰素、促炎症因子以及 DC 细胞的成熟,从而调控免疫反应,在防御病毒感染及自身免疫性疾病的发生发展中发挥重要作用[4,5]。

我们研究发现肝癌细胞 HepG2 中 TLR7 表达非常低,而 HBV 感染的肝癌细胞 HepG2.2.15 中 TLR7 表达明显升高,因为 TLR7 能够识别单链 RNA(ssRNA),HBV 在感染肝细胞的生长繁殖过程中能够产生 ssRNA,提示 TLR7 可能在防御 HBV 感染中发挥重要作用。进一步分析发现 HepG2.2.15 细胞中的 IL-6 和 TNF-α mRNA 水平表达显著高于 HepG2 细胞,虽然 HepG2.2.15 中 HBV 的影响可能是多途径的,但这一效应可能与 TLR7 高表达和激活有关。经 TLR7 配体刺激后的 HepG2.2.15 细胞,能够激活 NF-κB 途径,并诱导促炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的表达,而经 TLR7 配体刺激后的 HepG2 细胞中这两个细胞因子的表达虽有升高,但远没有 HepG2.2.15 升高明显,这些提示 TLR7 在病毒感染的肝细胞中可能具有重要作用。NF-κB 途径在机体防御病毒感染中起重要作用,通过该途径诱导的 IL-6 和 TNF-α 是抗病毒感染及病毒感染诱导炎症反应的重要细胞因子[11]。IL-6 能够促进机体从天然免疫向获得性免疫的转换,同时促进单核巨噬细胞等浸润,从而发挥抗病毒作用[12],而 TNF-α 能够干扰病毒进入细胞和杀伤宿主细胞而抑制病毒的生长繁殖[13]。IL-6 和 TNF-α 还能够诱导其他细胞因子和趋化因子的表达从而诱导局部和全身的炎症反应[12,13]。因此,TLR7 在启动机体天然免疫和获得性免疫反应发挥其抗病毒作用的同时,也可能通过诱导的炎症因子表达参与肝损伤反应。

我们初步阐明了 HBV 稳定转染细胞株 HepG2.2.15 中 TLR7 表达显著升高,TLR7 激活后能够启动 HepG2.2.15 细胞的天然免疫反应,因此 TLR7 可能在乙型肝炎的发病中发挥重要作用。本研究使用 HBV 稳定转染细胞株,对 HBV 感染中 TLR7 可能存在的作用进行了初步分析,并没有完全阐明 TLR7 在病毒性肝炎中的病理生理作用。HBV 感染后如何诱导肝细胞中 TLR7 表达,TLR7 在 HBV 感染中以及病毒感染诱导的肝损伤中的作用机制还有待深入研究。

参考文献:

[1] Bowie A G, Haga I R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses[J]. Mol Immunol, 2005, 42(8): 859-867.

[2] 徐华超,卢根生,张庆华. 人尿路上皮细胞 TLR2 和 TLR4 分布情况研究[J]. 第三军医大学学报,2007, 29(10): 948-950.

[3] Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H. *et al*. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA[J]. Science, 2004, 303(5663): 1529-1531.

[4] 丁国富, 吴翀, 蒋为薇,等. 人TLR9真核表达载体在HEK293T细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1246-1248.
[5] Schon M P, Schon M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy [J]. Oncogene, 2008, 27(2): 190-199.
[6] Tissari J, Siren J, Meri S, *et al*. IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression[J]. J Immunol, 2005, 174(7): 4289-4294.
[7] 刘光泽, 熊一力, 刘慧萍,等. HBV转基因小鼠脾脏DC的TLR2、TLR9和T细胞Elispot检测分析[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(5): 367-368.
[8] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(5): 886-892.
[9] Ahmed S, Pakozdi A, Koch A E. Regulation of interleukin-1beta-induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3-gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(8): 2393-2401.
[10] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and Type Ⅰ interferons[J]. J Biol Chem, 2007, 282(21): 15319-15323.
[11] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 693-733.
[12] Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(11): 619-626.
[13] Herbein G, O'Brien W A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 2000, 223(3): 241-257.

(**收稿**:2009-10-29;**修回**:2009-12-04)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2010)09-0937-01

个案与短篇

3D-CT血管造影与2D-数字血管造影对颅内动脉瘤诊断的对比分析

郑 超[1],吴海涛[2],周荣福[1],黄效东[1],马书明[1],陈明锐[1],孙晓川[3] (400020 重庆,重庆市江北区第一人民医院神经外科[1];365000,福建 三明,福建医科大学附属三明第一医院神经外科[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[3])

[关键词] 3D-CT血管造影;2D-数字血管造影;颅内动脉瘤;对比分析
[中图法分类号] R816.1 **[文献标志码]** B

颅内动脉瘤破裂出血严重危及患者的生命和预后生存质量,及时、正确诊断是提高救治率的关键环节。数字血管造影(digital subtraction angiography, DSA)以及CT血管造影(computed tomography angiography, CTA)为颅内动脉瘤的诊断带来了极大的便利,而两者各有优缺点[1]。我们对115例自发性蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)患者进行了3D-CTA和2D-DSA的对比研究,旨在探究2种检查方法对于颅内动脉瘤诊断的敏感性、准确性、特异性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2007年9月至2008年8月重庆医科大学附属第一医院神经外科收治的自发性SAH患者共115例,其中男性52例,女性63例,年龄17~76岁,平均46.8岁。所有患者(直系亲属)均知情,并同意参与本研究。

1.2 临床一般资料

患者的首发症状主要表现为头痛、眼睑下垂、意识障碍,也有少数出现四肢抽搐或无明显临床症状。Hunt-Hess分级情况以Ⅱ级(34例)和Ⅲ级(61例)居多。头颅CT平扫情况:侧裂池出血57例,脑室内出血21例,还有患者表现为脑内血肿、前纵裂池出血及脑积水。115例患者中,既往有高血压病史者83例,有糖尿病病史者21例。

[通信作者] 孙晓川,电话:(023)89011151,E-mail: sunxch1445@gmail.com

1.3 3D-CTA检查

所有患者在入院时均接受3D-CTA检查。设备为GE公司64层螺旋CT机(LightSpeed VCT)及AW4.2工作站,双管高压注射器(Nemoto)。扫描参数:电压120 kV,电流250~335 mA,旋转速度0.4 s/r,螺距0.531:1, FOV 18~24 cm,矩阵512×512,层厚5 mm。脑血管成像采用优维显(370 mg/ml)作为对比剂,后期图像处理由专门从事神经影像学的高年资医师进行,最终的诊断由1名神经影像医师及2名神经外科医师确定。

颅内动脉瘤的CTA诊断标准[2]:①瘤颈、瘤体显示明确,瘤颈>3 mm。②对于瘤颈<3 mm、瘤体显示不清、怀疑动脉瘤者,结合临床表现并参考入院所做的CT或MR图片确定诊断。

1.4 2D-DSA检查

所有患者在完善DSA术前相关检查后于1周内行2D-DSA检查。设备及参数包括西门子1 200 mA数字减影X光机,采用标准Seldinger技术经股动脉穿刺插管行全脑血管造影,一般作双侧颈内动脉和椎动脉,每个系列行正位、侧位和斜位等多角度投影至病灶显示满意为止。

颅内动脉瘤的DSA诊断标准[3]:颅内动脉局限性扩张,呈囊状、梭状或任一形状,边缘光整。除外:①动脉硬化血管节段性狭窄或血管节段性痉挛、正常段的梭形改变。②动脉壁上局灶结节状钙化。

1.5 统计学分析

统计软件采用SPSS 13.0,对3D-CTA与2D-DSA的检出率间差异进行χ^2检验。

2 结果

81例患者行开颅动脉瘤夹闭术或血管内栓塞术,手术证实

(下转942页)