doi:10.11659/jjssx.11E018049

·基础研究·

呼吸道合胞病毒感染单核细胞诱导 IDO 表达的机制研究

王 豪,廖 伟,金 玲 (陆军军医大学第一附属医院儿科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨呼吸道合胞病毒(RSV)感染单核细胞诱导 IDO 表达的分子机制。**方法** RSV 感染人外周血单核细胞,或预先利用信号通路抑制剂孵育 1 h 后再进行感染,定量 PCR 检测 IDO 的 mRNA 水平,ELISA 检测 IDO 的蛋白水平。**结果** 与未感染组相比,RSV 感染的单核细胞显著上调 IDO 的 mRNA 水平和蛋白水平($P<0.05$),并具有时间依赖性;加入 TLR3 抑制剂或 NF-κB 抑制剂后可显著抑制 RSV 感染诱导的 IDO 水平($P<0.01$);而 TLR7/8/9 抑制剂、RIG-I 抑制剂、PI3K 抑制剂、JNK 抑制剂和 MEK1/2 抑制剂对 RSV 感染诱导的 IDO 水平则无明显影响。**结论** RSV 可通过 TLR3-NF-κB 信号途径诱导单核细胞表达 IDO,从而参与其感染相关疾病的发生发展。

[关键词] 呼吸道合胞病毒;IDO;NF-κB 信号;呼吸道感染;免疫应答;单核细胞

[中图分类号] R446.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-11-20

Mechanism of respiratory syncytial virus induced the expression of IDO in monocytes

WANG Hao, LIAO Wei, JIN Ling (Department of Paediatrics, First Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of respiratory syncytial virus(RSV) induced the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in monocytes. **Methods** Monocytes were infected with RSV in vitro, or signal pathway inhibitor were pre-incubated with monocytes for 1 hour and then RSV were added, the level of IDO was detected by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** After RSV infection, the mRNA and protein levels of IDO by monocytes were significantly increased($P<0.05$), which was in a time dependent manner. In addition, RSV-induced the expression of IDO by monocytes was significantly decreased after pre-incubated by the TLR3 or NF-κB inhibitor ($P<0.01$), but such effect was not observed when monocytes were pre-incubated with the TLR7/8/9 inhibitor, RIG-I inhibitor, PI3K inhibitor, JNK inhibitor and MEK1/2 inhibitor. **Conclusion** RSV can induce the expression of IDO in monocytes via TLR3-NF-κB signal pathway, which may be involved in the development of RSV-related diseases.

Keywords: respiratory syncytial virus; IDO; NF-κB signal; respiratory tract infection; immune response; monocyte

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是公认的引起婴幼儿下呼吸道感染最重要的病原之一,RSV 感染不仅会导致严重的肺炎和支气管炎,而且与长期迁延不愈的慢性哮喘密切相关[1-2]。目前,RSV 感染的致病机理尚不明确,全球也未找到抵抗 RSV 感染的预防性疫苗或特异性治疗药物,因此,亟需深入阐明其致病机制,为临床防治 RSV 感染提供理论依据[3-5]。研究表明,免疫应答在调控 RSV 感染相关疾病的发生发展中具有重要的作用,主要表现为 Th1/Th2 细胞的免疫反应失衡[6-7]。文献报道 RSV 感染树突状细胞后可抑制 Th1 细胞应答,而对 Th2 细胞无明显影响;若利用抑制剂阻断 IDO 的活性,则可解除 Th1 细胞的抑制性免疫应答[8]。由此提示 IDO 很可能是 RSV 感染导致 Th1/Th2 细胞免疫应答失衡的重要因素。此外,除了树突状细胞,RSV 感染的上皮细胞和间充质干细胞也可显著上调 IDO 的表达,进一步证实 IDO 是调控 RSV 感染相关免疫病理性应答的关键[9-10]。然而,RSV 感染诱导 IDO 表达的相关分子机制并不清楚。基于树突状细胞由外周单核细胞迁移分化而来且肺组织局部中存有大量的单核细胞浸润,因此,本研究拟通过收集健康人外周血,分离纯化单核细胞后与 RSV 在体外共培养,探讨 RSV 诱导单核细胞表达 IDO 的 mRNA 与蛋白水平变化,并进一步阐明其相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 12 例我院体检中心健康人外周血,其中男 6 例,女 6 例,年龄 20~30 岁。

1.2 材料

淋巴细胞分离液购自美国 GE 公司,CD14 阳性细胞分选试剂盒购自加拿大 stem cell 公司,NF-κB 抑制剂(BAY 11-7082)、PI3K 抑制剂(Wortmannin)、MEK1/2 抑制剂(U0126)、RIG-I 抑制剂(BX795)和 JNK 抑制剂(SP600125)购自上海碧云天生物技术有限公司,TLR3

[基金项目] 军事医学科技创新计划(SWH2016LCYB-22)

[通信作者] 金 玲,E-mail:swjinling@163.com

抑制剂(TLR3/dsRNA complex inhibitor)以及 TLR7/8/9 抑制剂(ODN2088)购自美国 InvivoGen 公司,IDO ELISA 检测试剂盒购自美国 RD 公司,PBS 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,RPIM 1640 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,RSV 国际标准株 RSV-long 购自美国 ATCC,人喉癌上皮细胞系 Hep-2 购自中国科学院。mRNA 提取试剂盒购自美国 invitrogen 公司,逆转录试剂盒和 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自日本 Toyobo 公司。

1.3 方法

1.3.1 RSV 培养与保存 RSV-long 标准株在 Hep-2细胞中进行繁殖培养,收集的病毒颗粒在 30% 甘油、0.1 mol/L 硫酸镁和 50 mm HEPES 溶液中经超速离心后进行纯化,随后利用预冷的缓冲液(0.1 mol/L 硫酸镁,150 mm NaCl 和 50 mm HEPES)重悬,进而分装冻存于 -80 ℃备用。

1.3.2 单核细胞的分选 先利用淋巴细胞分离液分离收集外周血中的单核细胞,然后按照 CD14 阳性免疫磁珠分选试剂盒说明对其中的 CD14 阳性单核细胞进行富集纯化。

1.3.3 RSV 感染及分组 按照 1×10^6 个细胞/孔将单核细胞铺于24 孔板中,然后加入滴度为 1×10^6 pfu/mL 的 RSV(感染复数 MOI 值为 1)进行感染,或预先加入终浓度为 10 μmol/L 的信号通路抑制剂作用 1 h,然后换取新的培养基后再加入 RSV 感染,在不同的时间点收集单核细胞,用于 IDO 的 mRNA 和蛋白水平检测。按照实验要求分组。不同时间点培养的单核细胞分组为未感染组与 RSV 感染组。不同信号通路抑制剂处理的单核细胞分组为未感染组和在均有 RSV 感染下的未加抑制剂对照组、TLR3 抑制剂组、TLR7/8/9 抑制剂组和 RIG-I 抑制剂组;以及在均有 RSV 感染下的未加抑制剂对照组、DMSO 组、NF-κB 抑制剂组、PI3K 抑制剂组、MEK1/2 抑制剂和 JNK 抑制剂组。

1.3.4 RT-PCR 单核细胞的 mRNA 经 RNA 提取试剂盒进行抽提并逆转录成 cDNA,然后分别利用 IDO 的引物对(上游引物:5′-ACGTCCATGTTCTCATAAGTCAG-3′,下游引物:5′-GTTCCTTACTGCCAACTCTCC-3′)和 GAPDH 的引物对(上游引物:5′-CCACATCGCTCAGACACCAT-3′,下游引物:5′-AAAAGCAGCCCTGGTGACC-3′)进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 ℃预变性 30 s,然后以 95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 5 s,72 ℃延伸 30 s 的模式反应 35 个循环,以 GAPDH 作为参考基因分析 IDO 的表达差异。

1.3.5 ELISA RSV 感染后的单核细胞经预冷的 PBS 清洗 3 次,加入蛋白裂解液裂解细胞,并利用细胞刮收集,随后转移至液氮中放置 5 min,在冰上冻融 5 min,反复操作 3 次,最终经离心后获取上清液,BCA 法测定上清液中的总蛋白浓度,并根据 IDO 的 ELISA 检测试剂盒操作指南,检测上清液中 IDO 的蛋白水平。

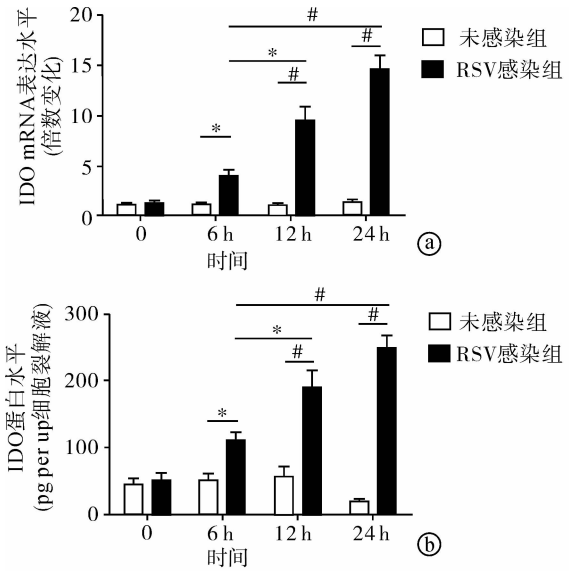
1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理和统计学分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,RSV 感染组与未感染组的比较采用独立样本 t 检验,多组之间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 RSV 感染单核细胞诱导 IDO 表达的检测

体外培养的单核细胞经 RSV 感染后,检测 IDO 的 mRNA 及蛋白水平,结果显示:未感染组的单核细胞自身低表达 IDO,但 RSV 感染组单核细胞表达的 IDO 水平显著增加,并且随着 RSV 感染时间的延长,IDO 的 mRNA 及蛋白水平也逐渐增加,由此提示 RSV 感染可诱导单核细胞上调表达 IDO,并具有时间依赖性(图 1)。



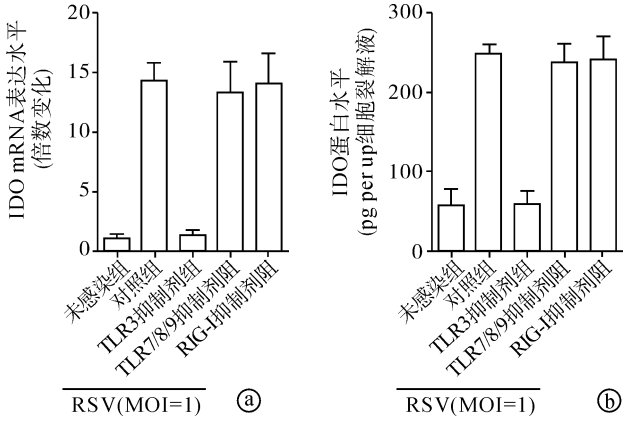
a:RSV(MOI = 1)在不同时间点感染诱导单核细胞表达 IDO 的 mRNA 水平;b:RSV(MOI = 1)在不同时间点感染诱导单核细胞表达 IDO 的蛋白水平 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 1 RSV 感染单核细胞诱导 IDO 表达的 mRNA 和蛋白水平比较

2.2 RSV 经 TLR3-NF-κB 信号参与诱导 IDO 的表达

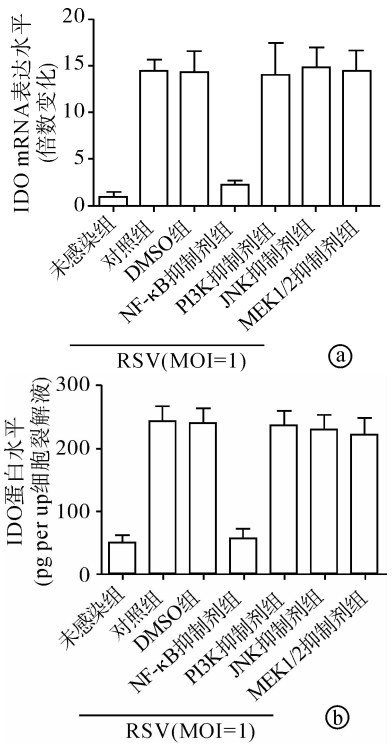
基于 RSV 感染单核细胞后可增加 IDO 的表达,我们进一步探讨其可能的机制。在 RSV 均感染 24 h 的情况下,TLR3 抑制剂组单核细胞 IDO 的表达水平显著下降,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 2;然而,TLR7/8/9 抑制剂组或 RIG-I 抑制剂组则未观察到 IDO 水平出现明显改变。此外,利用NF-κB抑

制剂 BAY 11-7082、PI3K 抑制剂 Wortmannin、MEK1/2 抑制剂 U0126、JNK 抑制剂 SP600125 进行预处理,结果发现,RSV 均感染 24 h,NF-κB 抑制剂组中 IDO 的水平显著低于未加抑制剂对照组或 DMSO 组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 3。而加入其他抑制剂组与未加抑制剂对照组或 DMSO 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。由此提示 RSV 与 TLR3 结合后,通过激活下游 NF-κB 信号途径诱导单核细胞 IDO 的表达。



a:TLR3、TLR7/8/9 或 RIG-I 抑制剂阻断后对 RSV 感染(MOI=1)诱导单核细胞 IDO mRNA 水平的影响;b:TLR3、TLR7/8/9 或 RIG-I 抑制剂阻断后对 RSV 感染(MOI=1)诱导单核细胞 IDO 蛋白水平的影响

图 2 TLR3、TLR7/8/9 或 RIG-I 抑制剂对 RSV 感染诱导单核细胞 IDO 表达的影响



a:NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082、PI3K 抑制剂 Wortmannin、JNK 抑制剂 SP600125 和 MEK1/2 抑制剂 U0126 预处理对 RSV 感染诱导单核细胞 IDO mRNA 水平的影响;b:NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082、PI3K 抑制剂 Wortmannin、JNK 抑制剂 SP600125 和 MEK1/2 抑制剂 U0126 预处理对 RSV 感染诱导单核细胞 IDO 蛋白水平的影响

图 3 不同信号通路抑制剂对 RSV 感染诱导单核细胞 IDO 表达的比较

3 讨论

自 RSV 被鉴定发现后,其在人群(特别是婴幼儿)中的高感染、强致病特性得到广泛的探讨与研究,然而,RSV 的致病机理仍未完全阐明[11-13]。现有的研究认为:RSV 进入宿主肺部后,可黏附感染其中的上皮细胞、间质细胞以及免疫细胞,促使这些细胞产生大量的促炎症因子及免疫调节性因子,进而诱导宿主肺组织的病理性损伤,最终导致严重的肺炎等相关疾病[14-15]。

在免疫调控过程中,RSV 感染最先激活机体的固有免疫应答[16-17]。而单核细胞作为固有免疫系统的重要组成部分,在机体抵御病毒入侵以及疾病的免疫调控上起着重要的作用[18]。本研究以单核细胞作为研究对象,在体外利用 RSV 感染后检测免疫调节性因子 IDO 的表达水平。结果显示,RSV 不仅能够诱导单核细胞上调表达 IDO,而且随着感染时间的延长,其诱导 IDO 表达的能力也逐渐增强,由此表明 RSV 可通过直接作用于单核细胞诱导 IDO 的表达。作为 RNA 病毒,RSV 必须与其相应的分子模式受体结合才能诱导 IDO 的产生;而胞内 TLR 以及 RIG-I 则均是特异性识别病毒 RNA 的受体[19-20]。因此,本研究进一步利用 TLR3、TLR7/8/9 或 RIG-I 抑制剂阻断 RSV 与受体的结合,发现仅有 TLR3 抑制剂能够显著抑制 RSV 诱导的 IDO 表达,由此证实 RSV 感染诱导的 IDO 水平改变依赖于 RSV 与胞内 TLR3 的结合,而 TLR7/8/9 或 RIG-I 则很可能不参与 IDO 的诱导表达。

RSV 与胞内 TLR3 结合后,需要进一步激活下游的级联信号,才能够诱导 IDO 转录并翻译成蛋白质后发挥作用。尽管文献报道包括 PI3K、MEK1/2、NF-κB 和 JNK 在内的多个信号均可介导 IDO 的表达,但是研究证实 NF-κB 才是 TLR3 下游的关键转录信号转导与激活子[21]。因此,本研究加入多个信号通路抑制剂预先处理单核细胞,抑制其胞内相应的转录信号,结果发现在均有 RSV 感染的情况下,仅 NF-κB 抑制剂 BAY 11-7082 处理后可观察到单核细胞 IDO 的表达水平显著下降,而 PI3K、MEK1/2 和 JNK 抑制剂预处理均未见 IDO 的表达水平出现统计学改变,由此提示 RSV 感染单核细胞后,可经 TLR3 活化 NF-κB 信号通路参与诱导 IDO 的表达。

IDO 作为免疫调节因子,在维持机体的免疫自稳

方面发挥重要作用[22]。然而,在机体处于感染或炎症时,IDO 的表达可显著增加,从而导致免疫细胞特别是 Th1/Th2 细胞的应答失衡。一方面,IDO 通过分解 T 细胞生长繁殖必须的色氨酸,诱导 Th1 细胞凋亡;另一方面,IDO 分解色氨酸生成的代谢产物可抑制 Th1 细胞分化,促进 Th2 细胞应答,从而导致抗病毒的干扰素减少,有利于 RSV 的定植与致病[23]。由于本研究是在体外展开,那么在 RSV 感染的患者中,RSV 是否通过 TLR3-NF-κB 信号诱导单核细胞 IDO 的表达,进而调控免疫细胞应答失衡还有待进一步探讨。

综上所述,RSV 感染单核细胞后可进入胞内与 TLR3 结合,激活下游 NF-κB 信号通路诱导 IDO 表达上调,进而导致机体 Th1/Th2 细胞免疫应答失衡。若能进一步全面阐明 RSV 感染的免疫致病机制,将为临床研发抗 RSV 感染的预防性疫苗或治疗性药物提供实验依据。

[参考文献]

[1] Priante E, Cavicchiolo ME, Baraldi E. The RSV infection and respiratory sequelae[J]. Minerva Pediatr, 2018, 70(6): 623 - 633. doi: 10.23736/S0026 - 4946.18.05327 - 6.

[2] Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1): 277 - 319. doi: 10.1128/CMR.00010 - 16.

[3] Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study[J]. Lancet, 2017, 390(10098): 946 - 958. doi: 10.1016/S0140 - 6736(17)30938 - 8.

[4] Mejias A, Garcia-Maurino C, Rodriguez-Fernandez R, et al. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection[J]. Vaccine, 2017, 35(3): 496 - 502. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.09.026.

[5] Griffin MP, Khan AA, Esser MT, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of MEDI8897, the respiratory syncytial virus prefusion f-targeting monoclonal antibody with an extended half-life, in healthy adults[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(3): 1714 - 1716. doi: 10.1128/AAC.01714 - 16.

[6] Openshaw PJM, Chiu C, Culley FJ, et al. Protective and harmful immunity to RSV infection[J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35: 501 - 532. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116 - 052206.

[7] Canedo-Marroquín G, Acevedo-Acevedo O, Rey-Jurado E, et al. Modulation of host immunity by human respiratory syncytial virus virulence factors: a synergic inhibition of both innate and adaptive immunity[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 367. doi: 10.3389/fcimb.2017.00367.

[8] Ajamian F, Wu Y, Ebeling C, et al. Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2,3-dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease[J]. Clin Exp Allergy, 2015, 45(3): 644 - 659. doi: 10.1111/cea.12498.

[9] Rajan D, Chinnadurai R, O'Keefe EL, et al. Protective role of indoleamine 2,3 dioxygenase in respiratory syncytial virus associated immune response in airway epithelial cells[J]. Virology, 2017, 512: 144 - 150. doi: 10.1016/j.virol.2017.09.007.

[10] Cheung MB, Sampayo-Escobar V, Green R, et al. Respiratory syncytial virus-infected mesenchymal stem cells regulate immunity via interferon beta and indoleamine-2,3-dioxygenase[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0163709. doi: 10.1371/journal.pone.0163709.

[11] Taleb SA, Al Thani AA, Al Ansari K, et al. Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018. doi: 10.1007/s10096 - 018 - 3289 - 4.

[12] Fonseca W, Lukacs NW, Ptaschinski C. Factors affecting the immunity to respiratory syncytial virus: from epigenetics to microbiome[J]. Front Immunol, 2018, 9: 226. doi: 10.3389/fimmu.2018.00226.

[13] Scheltema NM, Nibbelke EE, Pouw J, et al. Respiratory syncytial virus prevention and asthma in healthy preterm infants: a randomised controlled trial[J]. Lancet Respir Med, 2018, 6(4): 257 - 264. doi: 10.1016/S2213 - 2600(18)30055 - 9.

[14] Rey-Jurado E, Kalergis AM. Immunological features of respiratory syncytial virus-caused pneumonia: implications for vaccine design[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 556. doi: 10.4161/2162402X.2014.984547.

[15] Restori KH, Srinivasa BT, Ward BJ, et al. Neonatal immunity, respiratory virus infections, and the development of asthma[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1249. doi: 10.3389/fimmu.2018.01249.

[16] Ruckwardt TJ, Morabito KM, Graham BS. Determinants of early life immune responses to RSV infection[J]. Curr Opin Virol, 2016, 16: 151 - 157. doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.003.

[17] Lambert L, Culley FJ. Innate immunity to respiratory infection in early life[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1570. doi: 10.3389/fimmu.2017.01570.

[18] Bohmwald K, Espinoza JA, Pulgar RA, et al. Functional impairment of mononuclear phagocyte system by the human respiratory syncytial virus[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1643. doi: 10.3389/fimmu.2017.01643.

[19] Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJ, et al. Immunity to RSV in early-life[J]. Front Immunol, 2014, 5: 466. doi: 10.3389/fimmu.2014.00466.

[20] Chow KT, Gale M Jr, Loo YM. RIG-I and other RNA sensors in antiviral immunity[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 667 - 694. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617 - 053309.

[21] Ramnath D, Powell EE, Scholz GM, et al. The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 61: 22 - 30. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.014.

[22] Aldajani WA, Salazar F, Sewell HF, et al. Expression and regulation of immune-modulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by human airway epithelial cells and its effect on T cell activation[J]. Oncotarget, 2016, 7(36): 57606 - 57617. doi: 10.18632/oncotarget.11586.

[23] Wu H, Gong J, Liu Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase regulation of immune response (Review)[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 4867 - 4873. doi: 10.3892/mmr.2018.8537.

(编辑:魏 源)