

LPS 对丙型肝炎病毒复制以及 I 型干扰素信号通路的影响

朱紫衣¹, 王文博², 刘媛¹, 江忠勇¹, 常凯¹, 叶雨笙¹, 熊杰¹

摘要 目的 探讨 LPS 对丙型肝炎病毒(HCV)复制以及 I 型干扰素(IFN-I)信号通路的影响。方法 CCK8 法检测 LPS 对肝癌细胞株 Huh7 细胞增殖的影响, 100 mg/L LPS 处理 Huh7 并加入 0.5 感染复数(MOI) HCVcc 感染细胞, 荧光定量 PCR 以及免疫荧光法检测细胞内病毒水平; 流式细胞仪检测 LPS 处理 Huh7 细胞后细胞凋亡与周期的改变; Western blot 检测 LPS 对 IFN- α 、IFN- β 蛋白水平表达的影响。结果 各浓度 LPS 对 Huh7 细胞的增殖无明显影响; 100 mg/L LPS 可以抑制 HCV 的感染及复制水平($P < 0.05$); LPS 处理能够减轻 Huh7 细胞凋亡, 并使 S 期细胞明显增多。LPS 刺激细胞后, IFN- α 、IFN- β 表达显著上调, HCV 感染可以促进 IFN- α 、IFN- β 的表达, LPS 抑制 HCV 感染引起的 IFN- β 表达上调, 但对 IFN- α 表达无明显影响。结论 LPS 可以在细胞水平抑制 HCV 的复制及感染, 可能与其促进 IFN- α 、IFN- β 的表达有关, 而与细胞毒性作用和细胞凋亡无关。

关键词 LPS; HCV; 复制; 干扰素

中图分类号 R 373.2+1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)04-0544-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.009

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是引起慢性肝病的重要病原体之一, 并且 HCV 感染通常不会产生适当的固有免疫反应, 导致 80% 的感染者转为慢性感染, 其中一部分随之诱发为 HCV 感染相关性肝硬化及肝癌, 严重威胁人类健康^[1]。Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)作为一种病原体识别受体, 在固有免疫和适应免疫中发挥重要作用, 其中最早被鉴定为 TLRs 的 TLR4 作为革兰阴性细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)受体, 具有抗菌和抗病毒感染的作用^[2]。既往研究^[3-4]表明, LPS 可以抑制巨噬细胞内登革热病毒以及 HIV 的复制, 体内体外实验^[5-7]也表明 LPS 可以抑制 HBV 的复制,

然而关于 LPS 体外对于 HCV 复制的影响尚未见报道。该研究拟通过相关实验来研究 LPS 对 HCV 复制以及对 Huh7 I 型干扰素(interferon-I, IFN-I)信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Huh7 细胞及感染性 HCV 病毒颗粒(cell-culture-derived infectious HCV, HCVcc)由本实验室保存, Huh7 培养于 DMEM 培养基, 内含 10% 胎牛血清、100 mg/L 链霉素和 100 U/ml 青霉素, 置于 37 °C、5% CO₂、相对饱和湿度的细胞培养箱中进行培养, 待细胞生长至融合, 按 1:2 或 1:3 进行传代, 取对数生长期细胞进行实验。

DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司; 脂多糖购自美国 Sigma 公司; TRIzol 试剂盒、CCK8 细胞增殖和毒性检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 细胞周期及凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 实时定量 PCR 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; HCV 感染者血清收集自本科室检测标本。

1.2 实验方法

1.2.1 LPS 对 Huh7 生长增殖的影响 采用 CCK8 法。将 Huh7 按 1×10^4 个/孔接种 96 孔板, 贴壁后分别加入浓度为 100、10、1、0.1 mg/L 的 LPS, 继续培养 24、48 h 后, 每孔加入培养基总体积 10% 的 CCK8 溶液, 在培养箱中继续培养 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值(OD)。

1.2.2 LPS 对 HCV 复制的影响 将 Huh7 按 1×10^4 个/孔接种 96 孔板, 培养 24 h 后, 以 0.5 感染复数(multiplicity of infection, MOI) HCVcc 感染 Huh7, 并加入 100 mg/L LPS, 以未加 LPS 作为对照, 培养 24 h 以及 48 h 后, 用 TRIzol 试剂抽提细胞总 RNA, 进行 PCR 扩增。

1.2.3 免疫荧光(IFA)检测 LPS 对 HCVcc 感染 Huh7 的影响 Huh7 按 1×10^4 个/孔接种 96 孔板, 24 h 后加入 0.5 MOI HCVcc, 并加入 LPS, 48 h 后弃上清液, PBS 洗 2 遍, 加入甲醇 100 μ l/孔, 置于 -20 °C 冰箱固定 20 min, PBS 洗 1 遍, 加入 3% BSA, 室温封

2018-12-28 接收

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究计划项目(编号: 2013JY0173)

作者单位: ¹西部战区总医院检验科, 成都 610083

²西部战区总医院疾病预防控制中心, 成都 610021

作者简介: 朱紫衣, 女, 硕士研究生;

熊杰, 女, 教授, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: byx410@163.com

闭 2 h; 而后加入用 100 μ l HCV 感染者血清(1:100), 室温孵育 2 h 后, PBS 洗涤 3 次, 加入 Alex-488 羊抗人 IgG(1:100), 避光孵育 40 min 后, 用 PBS 洗涤 2 遍, 荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 LPS 对 Huh7 细胞凋亡及细胞周期的影响

将对数生长期的 Huh7 按 1×10^5 个/ml 接种 6 孔板, 贴壁后加入 100 mg/L LPS 48 h 后消化、离心收集细胞, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 后, 再加入 5 μ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 混匀, 室温、避光反应 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

Huh7 按 1×10^5 个/ml 接种 6 孔板, 贴壁后更换不含血清的培养基, 使其同步 8 h 后加入 100 mg/L 的 LPS 孵育 48 h 后消化、离心收集细胞, 70% 冰乙醇固定 24 h 后, PBS 洗涤、离心, 加入 PI 染色工作液, 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 Real-time PCR 按照 TRIzol 试剂盒说明书操作, 提取待测细胞总 RNA, 并以之为模板采用 SYBRGreen 法进行 qPCR 扩增反应, 以 GAPDH 作为内参基因, 反应条件为: 45 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 94 $^{\circ}$ C 5 s, 59 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 循环进行 40 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各处理组 HCV RNA 水平。所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体引物序列如下: HCV 上游引物: 5'-CTTCACG-CAGAAAGCGTCTA-3', 下游引物: 5'-CAAGCAC-CCTATCAGGCAGT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-TGGGCTACACTGAGCACCAG-3', 下游引物: 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAAT-3'。

1.2.6 Western blot 检测 IFN- α 、IFN- β 蛋白水平

将 Huh7 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml 接种到 24 孔板中, 置于培养箱中培养。贴壁长至 70% 时, 分别加入 100 mg/L LPS 以及 0.5 MOI HCVcc, 分别孵育 2、4 h 后预冷 PBS 洗涤 2 次, 裂解、提取蛋白进行蛋白定量检测。SDS-PAGE 电泳后转膜、封闭, 再分别孵育鼠抗 IFN- α 抗体(1:500)、兔抗 IFN- β 抗体(1:500)、鼠抗 GAPDH 抗体(1:1000) 4 $^{\circ}$ C 过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加二抗(1:1000) 室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次, 使用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒进行显色。Image J 软件对结果进行灰度分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。多样本组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 对 Huh7 的细胞增殖的影响 Huh7 接种 96 孔板, 加入不同浓度的 LPS, 24 h 及 48 h 后行 CCK8 试验, 检测细胞增殖活性。本研究实验均独立重复进行 3 次, 结果见图 1、表 1。与对照组比较, 10 mg/L LPS 对 Huh7 有促进细胞增殖的作用($P < 0.05$), 其余各浓度 LPS 对 Huh7 生长增殖无明显影响($P > 0.05$), 因此余后续实验采用 100 mg/L 处理。

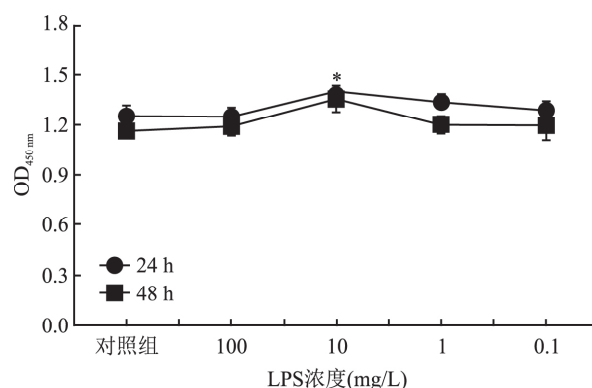


图 1 不同浓度的 LPS 对 Huh7 细胞增殖的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 LPS 在细胞水平上抑制对 HCV 的感染及复制 结果显示用 100 mg/L LPS 处理细胞后, HCV mRNA 显著降低, 24 h 对照组和实验组(LPS 100 mg/L) HCV 相对 mRNA 水平分别为 (0.902 ± 0.169)、(0.269 ± 0.138), 差异有统计学意义($t = 5.016$, $P = 0.007$); 48 h 对照组和实验组 HCV 相对 mRNA 水平分别为 (0.930 ± 0.121)、(0.647 ± 0.065), 差异有统计学意义($t = 3.567$, $P = 0.023$), 见图 2。

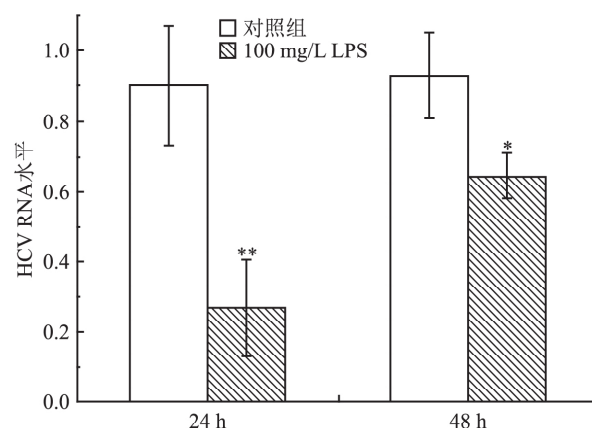


图 2 LPS 对 HCV 复制的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表1 各浓度 LPS 处理组的 OD_{450 nm} 值 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

LPS 浓度	24 h	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	48 h	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	1.242 ± 0.076			1.158 ± 0.002		
100 mg/L	1.254 ± 0.048	-0.225	0.834	1.162 ± 0.035	-0.216	0.839
10 mg/L	1.394 ± 0.041	-3.036	0.039	1.356 ± 0.074	-4.323	0.049
1 mg/L	1.342 ± 0.038	-2.022	0.113	1.203 ± 0.043	-1.797	0.147
0.1 mg/L	1.306 ± 0.036	-1.306	0.259	1.196 ± 0.087	-0.766	0.489

为进一步明确 LPS 对 HCV 感染的抑制作用,以 HCV 感染者血清为一抗,通过免疫荧光法检测 LPS 处理 Huh7 后细胞内抗核心蛋白抗体的表达。结果如图 3 所示,100 mg/L 的 LPS 处理组 HCV 结构蛋白水平明显减低。

2.3 LPS 对 Huh7 细胞周期和凋亡的影响 通过流式细胞仪检测细胞周期及凋亡,结果如图 4 所示:以 100 mg/L LPS 作用于 Huh7 48 h 后,与对照组比较,实验组细胞凋亡率减低,分别为 $(2.130 \pm 0.001)\%$ 、 $(1.070 \pm 0.002)\%$,差异有统计学意义 ($t = 11.314$, $P = 0.001$)。LPS 作用 Huh7 48 h 后,细胞周期发生明显改变,实验组进入分裂期(G2 + M 期)的细胞比例明显低于对照组,而 S 期细胞明显增多(图 5、表 2)。

表2 LPS 对 Huh7 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	G0G1	G2M	S
对照	46.557 ± 2.910	14.223 ± 3.230	39.220 ± 4.607
LPS 100 mg/L	33.767 ± 3.782*	7.857 ± 0.852*	58.373 ± 2.980**

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 LPS 对 Huh7 细胞 IFN- α 、IFN- β 表达的影响

结果如图 6 所示, LPS 刺激细胞后, IFN- α 、IFN- β 均表达上调 ($P < 0.05$)。HCV 感染引起 IFN- α 、IFN- β 表达增加,尤其是 IFN- β ; 此外, LPS 抑制了 HCV 引起的 IFN- β 的表达上调,但对 IFN- α 表达无

明显影响。

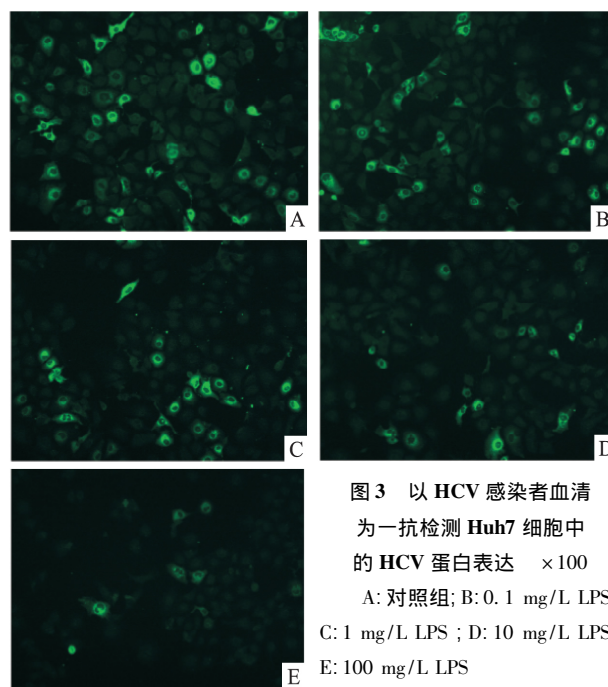


图3 以 HCV 感染者血清为一抗检测 Huh7 细胞中的 HCV 蛋白表达 $\times 100$
A: 对照组; B: 0.1 mg/L LPS; C: 1 mg/L LPS; D: 10 mg/L LPS; E: 100 mg/L LPS

3 讨论

据世界卫生组织统计,全球约有 1.85 亿人感染 HCV, HCV 感染已成为全球关注的重要公共卫生问题^[8-9]。近年来,直接抗病毒药物(DAA)药物的上市为 HCV 的患者带来了福音^[10],但 DAA 药物价格

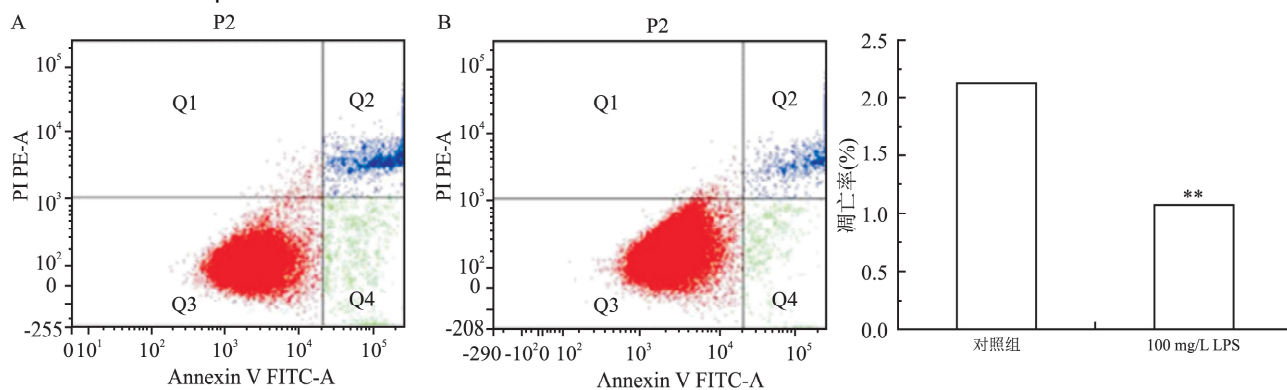


图4 LPS 对 Huh7 细胞凋亡的影响

A: 对照组; B: LPS 100 mg/L; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

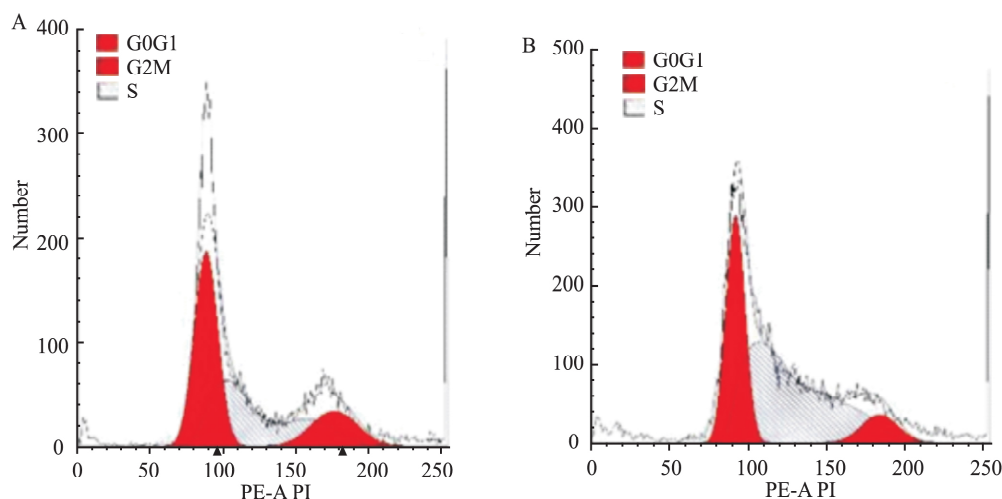


图5 LPS对Huh7细胞周期的影响

A: 对照组; B: LPS 100 mg/L

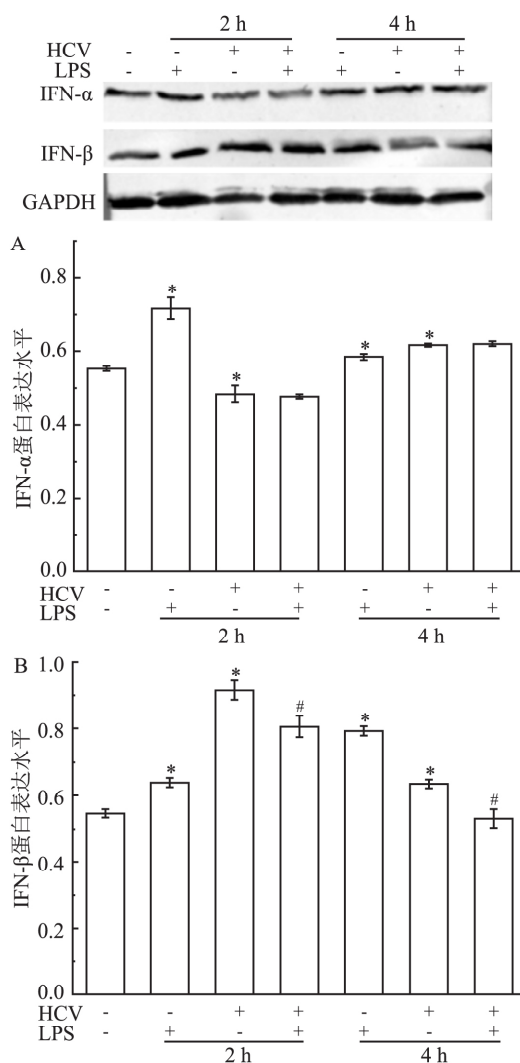


图6 Western blot法检测IFN-α、IFN-β蛋白的表达情况

A: IFN-α; B: IFN-β; 与未处理组比较: * $P < 0.05$; 与HCV组比较: # $P < 0.05$

昂贵,且安全性和有效性有待于长期追踪。TLR在防御病原体感染发挥重要作用,病毒感染能够刺激TLR信号,使机体发挥免疫清除的作用。然而,HCV感染激活TLR信号的同时,也通过不同机制损害TLR信号,从而逃避免疫清除,所以理论上来说通过使用TLR激动剂恢复TLR信号是一种潜在的治疗方法^[11]。本研究显示TLR4的配体LPS可以在细胞水平抑制HCV的复制及感染。细胞凋亡与周期实验结果显示LPS处理后能够使Huh7细胞凋亡减低,S期细胞明显增多,这与既往研究^[12]结果相符。细胞毒性实验也说明100 mg/L LPS对Huh7细胞生长增殖无明显作用,说明LPS抑制HCV的复制与感染并非通过细胞毒性作用来实现的。

IFN-I能够抵抗多种病原体的感染,且HCV刺激机体免疫系统所产生抗病毒和免疫调节物质主要是IFN-I^[13]。本研究检测LPS对Huh7细胞IFN-I信号通路影响,以期LPS抑制HCV的复制提供些理论依据。实验结果显示LPS刺激细胞后,IFN-α、IFN-β均表达上调,而IFN-α、IFN-β参与抑制HCV的复制是非常明确的^[14]。Barjesteh et al^[15]认为TLR配体处理鸡巨噬细胞后可抑制禽流感病毒的复制,可能与其配体诱导IFN-α、IFN-β等抑制病毒复制的基因表达增加有关,但未对TLR配体对流感病毒感染引起的相关抗病毒基因的表达影响进行研究。本研究显示HCV感染可以迅速激活IFN-I信号通路,使IFN-α、IFN-β表达上调,同时LPS抑制了HCV感染引起的IFN-β表达上调,而对IFN-α表

达无明显影响。这说明 LPS 可能通过干扰 HCV 感染细胞引起天然免疫应答, 从而影响 HCV 的感染与复制, 但 LPS 具体通过何种机制影响病毒感染引起干扰素信号通路表达变化, 尚未见明确报道, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会. 丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 29(5): 1-19.
- [2] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence[J]. *Nat Rev Immunol* 2007, 7(3): 179-90.
- [3] Chen Y C, Wang S Y, King C C. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry *via* a CD14-dependent mechanism[J]. *J Virol* 1999, 73(4): 2650-7.
- [4] Liu F L, Zhu J W, Mu D, et al. Lipopolysaccharide suppresses human immunodeficiency virus 1 reverse transcription in macrophages[J]. *Arch Virol* 2016, 161(11): 1-9.
- [5] Isogawa M, Robek M D, Furuichi Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo* [J]. *J Virol* 2005, 79(11): 7269-72.
- [6] Wu J, Lu M, Meng Z, et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice [J]. *Hepatology* 2007, 46(6): 1769-78.
- [7] 资捷, 王前, 郑磊等. 脂多糖经 MyD88/NF- κ B 信号途径抑制 Bewo 细胞中乙型肝炎病毒复制[J]. 中国医师杂志, 2011, 13(11): 1464-7.
- [8] Cox A L. MEDICINE. Global control of hepatitis C virus [J]. *Science* 2015, 349(6250): 790-1.
- [9] Thomas D L. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity [J]. *Nat Med* 2013, 19(7): 850-8.
- [10] Webster D P, Klennerman P, Dusheiko G M. Hepatitis C [J]. *Lancet* 2015, 385(9973): 1124-35.
- [11] Howell J, Angus P, Gow P, et al. Toll-like receptors in hepatitis C infection: implications for pathogenesis and treatment [J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2013, 28(5): 766-76.
- [12] 王李杰. 炎症促进肝细胞癌进展和转移作用机制的体内和体外研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2011.
- [13] Iwasaki A. A virological view of innate immune recognition [J]. *Annu Rev Microbiol* 2012, 66(66): 177-96.
- [14] Kato T, Liang T J, Heller T, et al. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell culture [J]. *J Virol* 2007, 36(9): S53.
- [15] Barjesteh N, Behboudi S, Brisbin J T, et al. TLR ligands induce antiviral responses in chicken macrophages [J]. *PLoS One* 2014, 9(8): e105713.

Effects of LPS on hepatitis C virus replication and interferon-I signaling pathway

Zhu Ziyi¹, Wang Wenbo², Liu Yuan³, et al

(¹Clinical Laboratory, The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083;

²Center for Disease Control and Prevention of Western Theater Command, Chengdu 610021)

Abstract Objective To investigate the effect of LPS on HCV replication and interferon-I signaling pathways. **Methods** The effect of LPS on the proliferation of Huh7 cells was observed *via* CCK8 methods. Huh7 cells pre-treated with 100 mg/L LPS were followed with HCV infection. The intracellular HCV RNA and protein levels were determined by quantitative PCR and immunofluorescence assay. In addition, the effect of LPS on the expression of IFN- α and IFN- β protein were detected by Western blot. **Results** LPS had no significant effect on the proliferation of Huh7 cells. 100 mg/L LPS could inhibit the infection and replication of HCV in Huh7 cells ($P < 0.05$). Compared with the control group, LPS attenuated the apoptosis of Huh7 cells and increased the number of S phase cells. The expression of IFN- α and IFN- β were significantly up-regulated by LPS and HCV. LPS inhibited the expression of IFN- β induced by HCV infection, while had no significant effect on the expression of IFN- α . **Conclusion** LPS can inhibit the replication and infection of HCV at the cellular level, which may be related to the promotion of IFN- α and IFN- β expression, but not to cytotoxicity and apoptosis.

Key words LPS; HCV; replication; interferon