

NS2 激活 TLR7 抑制 RSV 感染肺泡上皮细胞中 IFN 的表达

汪旻旻 孙 涛 袁晓玲 黄升海

摘要 目的 探讨非结构蛋白 NS2 在呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染人 II 型肺泡上皮细胞 (A549) 活化 TLR7 信号转导过程中的可能作用。方法 以 RSV 感染体外培养的 A549 细胞, 设立正常对照组、RSV 感染组、RSV NS2 小干扰 RNA 沉默组 (NS2 siRNA + RSV 组) 及 TLR7 激动剂组 (R848 + RSV 组)。各组分于病毒感染后的 4、12、24、48 h 收集细胞和培养上清液。Western blot 法检测各组不同时间点 TRIF、TRAF6 及 p-I κ B- α 蛋白表达; ELISA 法检测各组细胞培养上清液中 I 型干扰素 α (IFN- α)、IFN- β 含量的变化。结果 正常对照组中 TRIF、TRAF6、p-I κ B- α 蛋白的表达量较低, 经 RSV 感染之后, 随感染时间增加, 表达量升高; 在 NS2 siRNA + RSV 组三者表达量较正常对照组上调, 但相对于 RSV 感染组, 表达下降, 表明 RSV NS2 可以活化 TRIF、TRAF6 及 p-I κ B- α 蛋白的表达。RSV 感染组及 NS2 siRNA + RSV 组 IFN- α 、IFN- β 含量随感染时间增加逐渐升高, 4 h 开始升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); R848 + RSV 组 IFN- α 和 IFN- β 呈时间依赖性增加, 感染 4 h 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 NS2 在病毒感染 A549 细胞过程中激活 TLR7, 抑制了 IFN- α 和 IFN- β 的表达。

关键词 A549 细胞; NS2; 呼吸道合胞病毒; Toll 样受体; siRNA

中图分类号 R 373.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1632-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.011

2017-06-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371797); 安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2012A152)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 汪旻旻, 女, 硕士研究生;

黄升海, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huang-shh68@aliyun.com

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是非节段性单股负链 RNA 病毒, 属于副黏病毒科肺炎病毒属^[1]。RSV 会引发婴幼儿和儿童急性下呼吸道感染, 导致毛细支气管炎, 对老年人也是一个重要威胁, 可导致严重肺部感染, 死亡率极高^[2]。Toll 样受体 7 (Toll-like receptor 7, TLR7) 主要识别单链 RNA 病毒 (ssRNA), 参与胞内病毒感染^[3]。在介导病毒免疫反应中发挥着必不可少的作用。RSV 感染后, 机体可经 TLR7 介导的 TLR7/MyD88/NF- κ B/TNF- α 或 TLR7/MyD88/IRF7/I 型干扰素 α (type I interferon α , IFN- α) 信号转导通路诱导炎症反应, 从而发挥抗病毒作用^[4-6]。RSV 非结构蛋白 NS 包括含有 139 个氨基酸的 NS1 和含有 124 个氨基酸的 NS2。有研究^[7-8]显示 NS 蛋白对干扰素有拮抗作用, 但并未揭示出其具体机制。瑞喹莫德 (Resiquimod, R848) 是一种 TLR7 激动剂, 具有很强的细胞因子诱导效应^[9], 可以激活 TLR7 从而产生免疫刺激效应^[10]。该研究通过 RSV 感染体外培养的气道上皮细胞, 加之 TLR7 激动剂和 NS2 siRNA 预处理, 探究 NS2 在 RSV 感染 A549 细胞活化 TLR7 信号转导通路中对 IFN 的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒 A549 细胞为人 II 型肺泡上皮细胞, RSV 为国际标准株 Long 株, 以上均由安徽医科大学微生物学教研室保存。

1.2 主要试剂 新生胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 超敏化学发

for 24 hours, the number of pericyte were increased obviously in ischemia group ($P < 0.05$); The pathology change was more significantly in hyperglycosemia & ischemia group than that in the ischemia group after reperfusion for 24 hours. Cerebral edema was aggravated remarkably, at the same time, the number of pericyte were increased massively ($P < 0.05$). qRT-PCR and Western blot showed that the expression of α -SMA was higher in hyperglycosemia & ischemia group than that in ischemia group ($P < 0.05$). **Conclusion** Diabetes hyperglycosemia cerebral ischemia reperfusion can aggravate cerebral damage, reinforce the expression of α -SMA and increase the number of pericyte.

Key words cerebral ischemia reperfusion; hyperglycosemia; pericyte; α -smooth muscle actin

光试剂盒(瑞士 Thermo 公司); TRAF6 蛋白抗体(英国 Abcam 公司); IFN- β TLR 相关区域连结蛋白(TIR domain-containing adapter inducing interferon IFN- β , TRIF) 蛋白抗体、ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司); p-I κ B- α 蛋白、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司); Western blot 二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 细胞培养 取冻存细胞 37 °C 水浴迅速溶解, 加入含 10% 的 FBS 与 90% 的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 8 h 后更换培养基, 细胞生长 2 d 后, 视细胞生长情况按一定比例传代培养。

1.4 实验分组与细胞标本收集 通过预实验筛选出最有效的 Lipofectamine 2000 与 siRNA 的浓度, 瞬时转染特异性 siRNA 沉默抑制 RSV 感染后 NS2 蛋白表达。实验分组为: ① 正常对照组: 未处理的 A549 细胞; ② RSV 感染组: RSV 感染的 A549 细胞; ③ TLR7 激动剂组(R848 + RSV 组): 先加入 0.1 μ g/ml R848(预实验已确定最适浓度), 再行 RSV 感染; ④ RSV NS2 siRNA 沉默组(NS2 siRNA + RSV 组): 先加入 siRNA-Lipofectamine 2000 脂质体复合物, 再行 RSV 感染。RSV 感染各组时间点分别为 4、12、24 和 48 h, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。提取总蛋白, 细胞培养上清液用于后续检测。

1.5 细胞转染 A549 细胞复苏后接种于细胞培养瓶中, 24 h 后更换新鲜完全培养基; 待细胞长至 80% 时, 胰酶消化, 离心, 吹散成单细胞悬液, 按 5.0×10^5 /ml 铺于 12 孔细胞培养板中, 24 h 长至 60% ~ 70% 可用于细胞转染。RSV NS2 siRNA 上游引物: 5'-CCGAAAGGGAAGGGAGAUATT-3', 下游引物: 5'-UAUCUCCCUUCCCUUUCGGTT-3'。弃去含血清的细胞培养液, PBS 轻洗 3 次, 每孔加入 1 ml 无双完全培养液。在 EP 管中将 3 μ l Lipofectamine 2000 与 97 μ l opti-MEM 进行稀释, 将 4 μ l siRNAs 储存液用 96 μ l opti-MEM 进行稀释, 分别轻轻混匀, 室温孵育 5 min, 然后将 Lipofectamine 2000 稀释液与 siRNAs 稀释液轻轻混合(总体积 200 μ l), 室温孵育 20 min, 使之形成 siRNA-Lipofectamine 2000 脂质体复合物。将脂质体复合物逐滴加入 12 孔细胞培养板中, 轻轻混匀, 并在对应孔做上标记。37 °C、5% CO₂ 培养 6 h 后弃去培养基, 更换含有 10% FBS 的完全培养基, 加入 RSV 感染, 于感染后的各时间点分别提取 RNA 进行检测。

1.6 Western blot 法检测 A549 细胞中 TRIF、

TRAF6、p-I κ B- α 表达 按 1.4 处理各组细胞, 在各感染时间点进行总蛋白提取, 步骤如下: 弃掉瓶中原液, PBS 洗涤后置于冰上, 每瓶中加入裂解液 120 μ l, 充分裂解后收集细胞, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, BCA 测定蛋白浓度, 按比例加入蛋白上样缓冲液, 99 °C 加热变性 5 min。配制 SDS-PAGE, 按照每孔 50 μ g 上样, 在浓缩胶中电压为 80 V(约 20 min), 进入分离胶后电压改为 120 V, 持续恒压电泳直至溴酚兰达分离胶底端, 250 mA 水浴电转, 恒流 2 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。TBST 洗膜后 4 °C 旋转孵育过夜(TRIF 一抗 1 : 500 稀释, TRAF6 一抗 1 : 500 稀释, p-I κ B- α 一抗 1 : 500 稀释, β -actin 一抗 1 : 500 稀释); TBST 洗膜, 二抗(按 1 : 2 000 比例稀释) 室温下孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次, 调节软件拍摄时间进行连续曝光, 调整至合适对比度后选择最佳曝光效果进行保存, 采用 Image J 图像分析软件对图片进行灰度值分析。

1.7 ELISA 检测培养上清液中 IFN- α 和 IFN- β 按时间点收集各实验组细胞培养上清液, 离心弃去沉淀, 取上清分装后于 -80 °C 冻存。使用试剂盒进行操作, 采用双抗夹心 ELISA 法。将抗人 IFN- α 、IFN- β 抗体包被于酶标板上, 依次加入生物素化的抗人 IFN- α 、IFN- β 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲本素, 接着加入显色底物, 显色底物在辣根过氧化物酶的催化下会呈现出蓝色, 加入终止液终止, 颜色变为黄色, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光值, IFN- α 、IFN- β 浓度与吸光值呈正相关性, 通过绘制标准曲线求出各组上清液中 IFN- α 、IFN- β 的含量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 法检测各组 A549 细胞中 TRIF、TRAF6、p-I κ B- α 蛋白表达量的变化

2.1.1 各组 TRIF 的表达 正常 A549 细胞中 TRIF 蛋白的表达量较低, 经 RSV 感染之后, 随感染时间增加, TRIF 表达量增加 ($F = 16.23$, $P < 0.01$), 表明 RSV 感染可以活化 TRIF 蛋白的表达。在 R848 + RSV 组, RSV 感染 48 h TRIF 表达量较 RSV 感染组显著增加 ($t = 48.04$, $P < 0.01$), 表明 TLR7 激动剂对 TRIF 蛋白的表达起到促进作用。在 NS2 siRNA + RSV 组, 4、12、24、48 h TRIF 相对于 RSV 感染组,

表达下降 ($t = 8.40, 6.78, 3.47, 3.35, P < 0.05$) 随感染时间增加, TRIF 表达量缓慢上升, 说明 NS2 可促进 TRIF 蛋白的表达。见图 1。

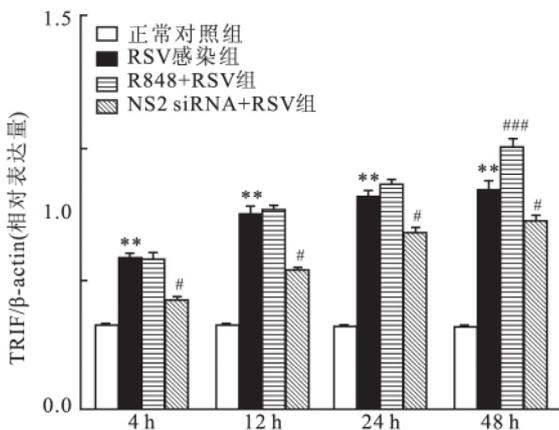
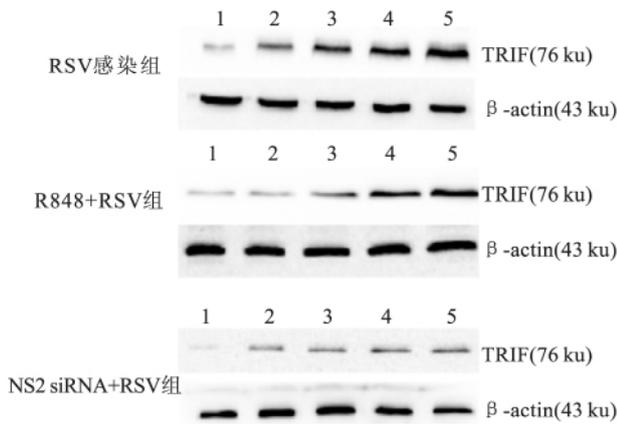


图1 RSV 感染 A549 不同时间点 TRIF 蛋白水平表达量变化

1: 正常对照组; 2~5 分别为 RSV 感染 A549 细胞 4、12、24、48 h; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 RSV 感染组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

2.1.2 各组 TRAF6 的表达 正常 A549 细胞中 TRAF6 蛋白的表达量较低, 经 RSV 感染之后, 随感染时间增加, TRAF6 表达量增加 ($F = 5.37, P < 0.05$) 表明病毒感染能够促进 TRAF6 的表达。在 R848 + RSV 组 4、12、24、48 h TRAF6 表达量增加 ($t = 17.08, 6.70, 8.91, 5.41, P < 0.01$) 表明 TLR7 激动剂对于 TRAF6 的表达有促进作用。在 NS2 siRNA + RSV 组, TRAF6 表达量较正常对照组上调, 随感染时间增加, TRAF6 表达量有所上升 ($F = 7.42, P < 0.05$) 说明 NS2 能够促进 TRAF6 的表达。见图 2。

2.1.3 各组 p-IκB-α 的表达 正常 A549 细胞中 p-IκB-α 蛋白的表达量较低, 经 RSV 感染之后, 随感染时间增加, p-IκB-α 的表达量不断增加 ($F = 286.90,$

$P < 0.01$) 说明 RSV 可以活化 p-IκB-α 的表达。在 R848 + RSV 组, p-IκB-α 表达量较 RSV 感染组显著增加, 且具有时间依赖性, 差异有统计学意义 ($F = 125.00, P < 0.01$) 表明 TLR7 激动剂促进了 p-IκB-α 的表达。在 NS2 siRNA + RSV 组, p-IκB-α 表达量较正常对照组显著上升, 但相对于 RSV 感染组, 在感染的 24、48 h 表达下降 ($t = 7.02, 11.59, P < 0.01$) 随感染时间增加, p-IκB-α 表达量上升, 说明在病毒感染的后期, NS2 对 p-IκB-α 的表达起促进作用。见图 3。

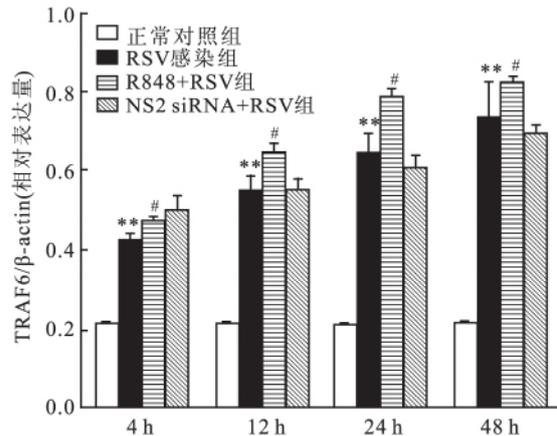
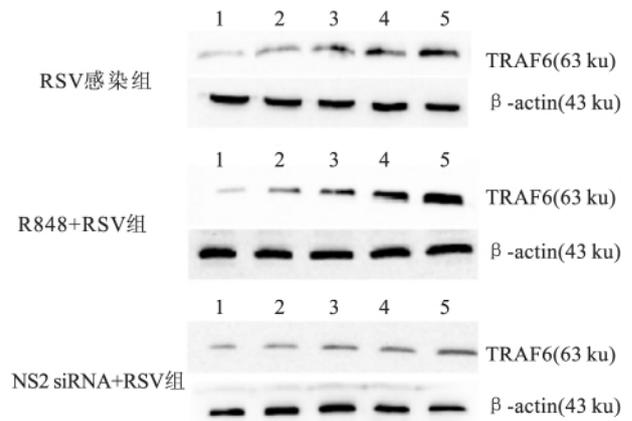


图2 RSV 感染 A549 不同时间点 TRAF6 蛋白表达变化

1: 正常对照组; 2~5 分别为 RSV 感染 A549 细胞 4、12、24、48 h; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 RSV 感染组比较: # $P < 0.05$

2.2 ELISA 法检测培养上清液中 IFN-α、IFN-β 水平 与正常对照组细胞培养上清液相比, RSV 感染组 IFN-α、IFN-β 含量升高, 从 4 h 开始升高 ($F = 84.76, 1317.00, P < 0.01$) 随着感染时间的延长而增加, 说明 RSV 感染能上调 IFN-α、IFN-β 表达; 在 R848 + RSV 组, IFN-α、IFN-β 含量亦随感染时间的延长逐渐增加, 感染 4 h 升高 ($F = 11050.00, 2219.00, P < 0.01$) 表明 TLR7 激动剂能进一步促进 IFN-α、IFN-β 分泌; 在 NS2 siRNA + RSV 组, 随感染时间增

加 IFN- α 、IFN- β 含量逐渐增加,与 RSV 感染组相比,从感染 4 h 开始升高 ($F = 54.48, 541.90, P < 0.01$),说明在病毒感染过程中,NS2 抑制了 IFN- α 、IFN- β 的表达。见图 4、5。

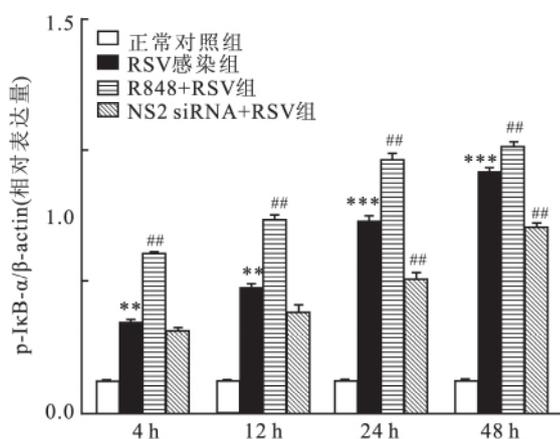
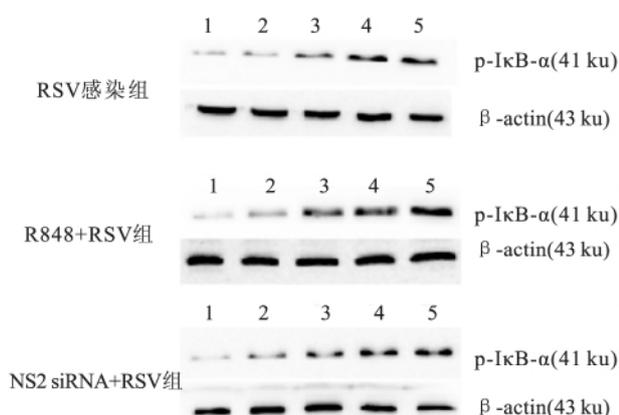


图3 RSV 感染 A549 不同时间点 p-IκB- α 蛋白表达变化

1: 正常对照组; 2~5 分别为 RSV 感染 A549 细胞 4、12、24、48 h; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 RSV 感染组比较: ## $P < 0.01$

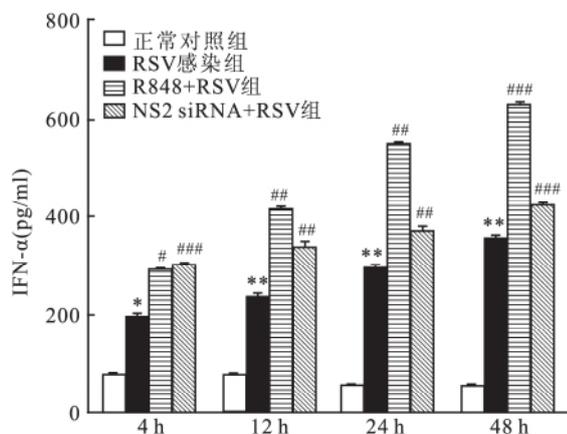


图4 各组不同时间点 RSV 感染后 A549 细胞培养上清中 IFN- α 的表达

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 RSV 感染组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

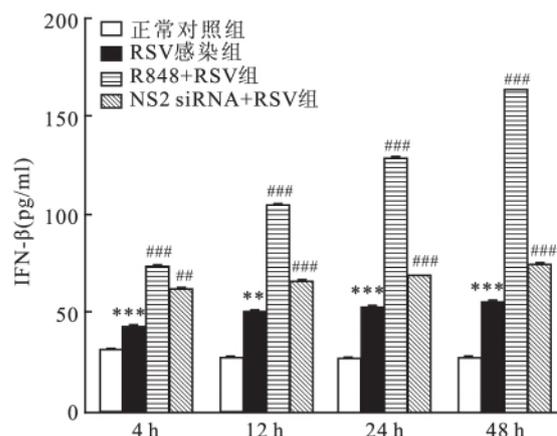


图5 各组不同时间点 RSV 感染后 A549 细胞培养上清中 IFN- β 的表达

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 RSV 感染组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3 讨论

研究^[11]表明,NS1 和 NS2 在病毒感染早期大量表达,且两者具有协同促进病毒复制的功能。本研究显示,在 NS2 siRNA + RSV 组随着感染时间的延长,IFN- β 的表达量是上升的,且较 RSV 感染组相比,IFN- β 表达升高,说明 RSV NS2 抑制了 IFN- β 的产生。有研究^[7]表明 NS2 能够抑制 TLR3 介导的干扰素的表达,本研究结果与之一致。其是通过诱导 TRIF 继而激活 IRF3 激酶 IKK ϵ 、TBK-1,从而诱导 IFN- β 的表达。同时通过干扰实验显示 TLR3 是在晚期诱导 IFN- β 。以上提示 NS2 并没有与 TRIF 特异性结合,但是却能够抑制由 TRIF 介导的 IFN- β ,说明 NS2 可能是与下游某个分子相互作用,最终抑制 IFN- β 表达。RSV 感染 A549 细胞之后,NS1 通过输入蛋白 a5 转移到细胞核内,竞争性的结合蛋白 a5 阻断了蛋白 a5 与转录激活因子 1(STAT1)的相互作用,结果使 STAT1 介导的基因表达量降低,降低了 I 型干扰素的产生^[12]。RSV 为了逃避宿主 I 型干扰素应答也会通过特异性下调 STAT2 的表达从而降低(抑制)信号转导^[8]。有研究^[13]显示 NS1 会竞争性的与 MAVS 结合,从而导致 MAVS 与 RIG-I 相互作用被阻断,IFN- β 表达减少。RSV NS2 与 RIG-I 的相互作用会抑制 IFN- β 转录过程: NS2 与 RIG-I 的 CARD 结构域结合,从而导致 RIG-I 与下游的 MAVS 结合被阻断,导致 IFN- β 启动子的活化被抑制^[14]。

TLR7 可以募集 MyD88 的 TIR 结构域, 两者的 TIR 会相互靠近并发生寡聚化。E2、泛素结合酶异二聚体泛素结合酶复合物可以将 TRAF6 激活^[15], 被激活的 TRAF6 能够募集转化生长因子 β 激活酶 1, 在转化生长因子 β 激活酶 1 发生泛素化的同时与 TRAF6 进行相互作用, 从而激活、调控下游分子信号通路。与此相一致, 本研究显示在加入了 TLR7 激动剂 R848 后, TRAF6 蛋白表达量较感染组上升, 在 NS2 沉默之后, TRAF6 蛋白表达量随之下降, 说明在病毒感染之后, NS2 可以促进 TLR7 下游的 TRAF6 活化, 激活下游分子信号通路; p-I κ B- α 蛋白的表达量随病毒感染时间的延长而上升, 但同一感染时间点, 在 NS2 siRNA + RSV 组表达有明显下降, 提示 NS2 在 RSV 感染 A549 细胞活化 p-I κ B- α 中发挥一定作用。

NS1、NS2 作为 RSV 感染过程中最先转录的两个基因, 在病毒感染细胞的初期有大量表达, 有利于病毒复制。本实验瞬时转染特异性 siRNA 沉默, 有效抑制 RSV 感染后 NS2 的表达。得出结论: NS2 对 RSV 十分重要, 在病毒感染 A549 细胞过程中激活 TLR7, 抑制 RSV 感染肺泡上皮细胞中 IFN 的表达。不足之处在于仅对 NS2 mRNA 干扰进行了初步的研究, 由于市场上尚无商品化的 RSV NS2 抗体, 实验中并未对 NS2 进行蛋白水平的分析。目前 NS1、NS2 的作用机制尚不清楚, 接下来拟制备抗体, 完善实验中 NS2 蛋白水平的分析, 同时开展 RSV NS2 缺陷病毒的构建。随着对 RSV 的研究越来越深入, 对 RSV 非结构蛋白 NS 的分子作用机制的研究已成为当前的研究热点之一, 对 RSV NS1 及 NS2 的作用机制、功能等方面的深入研究为如何防治 RSV 感染提供了新的思路。

参考文献

- [1] Robinson K A, Odelola O A, Saldanha I J. Palivizumab for prophylaxis against respiratory syncytial virus infection in children with cystic fibrosis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 20(7): CD007743.
- [2] Carbonell-Estrany X, Simões E A, Dagan R, et al. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial[J]. *Pediatrics*, 2010, 125(1): e35 - 51.
- [3] Qi F, Wang D, Liu J, et al. Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 408 - 15.
- [4] Yamaguchi M, Kitagawa Y, Zhou M, et al. An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(1): 28 - 34.
- [5] Deng Y, Yan Y, Tan K S, et al. MicroRNA-446a induction during influenza H3N2 virus infection targets and regulates TRAF6 levels in human nasal epithelial cells (hNECs) [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(2): 184 - 92.
- [6] Kang K, Won M, Yuk J M, et al. IiQ attenuates systemic inflammatory responses via selectively impairing the Myddosome complex formation upon TLR4 ligation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 121: 52 - 66.
- [7] Ling Z, Tran K C, Teng M N. Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I [J]. *J Virol*, 2009, 83(8): 3734 - 42.
- [8] Ramaswamy M, Shi L, Varga S M, et al. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction [J]. *Virology*, 2006, 344(2): 328 - 39.
- [9] Tomai M A, Gibson S J, Imbertson L M, et al. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463 [J]. *Antiviral Res*, 1995, 28(3): 253 - 64.
- [10] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(2): 196 - 200.
- [11] Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, et al. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF- κ B-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth [J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1786 - 95.
- [12] Elliott J, Lynch O T, Suessmuth Y, et al. Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase [J]. *J Virol*, 2007, 81(7): 3428 - 36.
- [13] Liu P, Jamaluddin M, Li K, et al. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells [J]. *J Virol*, 2007, 81(3): 1401 - 11.
- [14] Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling [J]. *J Immunol*, 2003, 171(8): 4304 - 10.
- [15] Walsh M C, Kim G K, Maurizio P L, et al. TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NF κ B and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL [J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4064.

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.012.html>

IL-17 调控 IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 信号通路 影响喉癌细胞的侵袭和转移

季加标 宋 杨 杨 明 杨见明

摘要 目的 研究白介素(IL)-17通过IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3信号通路调控人源性高分化喉癌细胞(Hep-2)侵袭、转移。方法 以Hep-2细胞为研究对象,设IL-17刺激剂0、1、50、100 ng/ml浓度组,Western blot法检测不同分组在IL-17的刺激下,Hep-2细胞中IL-6、IL-6R、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3的表达变化。迁移、侵袭实验观察IL-17的刺激对Hep-2细胞侵袭、迁移的影响。结果 Western blot实验中,在IL-17刺激下,1、50、100 ng/ml浓度组较0 ng/ml

浓度组Hep-2细胞的IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3的表达明显增加($P < 0.01$),50、100 ng/ml浓度组较1 ng/ml浓度组Hep-2细胞的IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3的表达明显增加($P < 0.01$),100 ng/ml浓度组较50 ng/ml浓度组Hep-2细胞的IL-6R、p-JAK1、p-STAT3的表达明显增加($P < 0.01$);各组间JAK1、STAT3的表达无明显变化。侵袭与迁移实验显示IL-17可以促进Hep-2细胞的侵袭和迁移。结论 IL-17可能通过IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3信号通路促进Hep-2细胞的侵袭和转移。

关键词 IL-17; IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3信号通路; 喉癌

中图分类号 R 739.65

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1637-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.012

2017-05-31 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2015A140)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院耳鼻喉-头颈外科,合肥 230601

作者简介: 季加标,男,硕士研究生;

杨见明,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: jmy-ang88@163.com

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,96%~98%为鳞状细胞癌,男性患病优势,约占男性肿瘤的

NS2 activates TLR7 during infection of A549 and inhibits the expression of IFN

Wang Minmin, Sun Tao, Yuan Xiaoling, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of nonstructural protein NS2 in respiratory syncytial virus (RSV) infected human type II alveolar epithelial cells (A549) activated TLR7 during the signal transduction. **Methods** This study divided into normal control group, RSV infection group, RSV NS2 small interfering RNA silencing (NS2 siRNA) group and TLR7 agonists (resiquimod, R848) group. A549 cells in each group were infected with different time points and culture supernatant were collected. The expression of TRIF, TRAF6 and p-I κ B- α protein in each group was detected by Western blot at different time points. Type I interferon (IFN)- α , IFN- β in cell culture supernatant of each group detected by enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). **Results** In the normal control group, the expression of TRIF, TRAF6 and p-I κ B- α was low, with the infection time increased, the expression of them increased. In NS2 siRNA group, the expression of the three proteins increased compared with the normal control group, but decreased compared with RSV infection group. In RSV infection group and NS2 siRNA group, the IFN- α , IFN- β level increased compared with normal control group and was time-dependent, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); In TLR7 agonists group, the IFN- α , IFN- β level increased gradually with the infection time increased compared with RSV infection group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NS2 activates TLR7 in the process of A549 infection, and inhibits the expression of IFN- α and IFN- β .

Key words A549 cell; NS2; respiratory syncytial virus; Toll-like receptor 7; siRNA