

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00929

丙型肝炎病毒单链 RNA 免疫活性的研究

程娜, 章意亮, 魏伟, 王凯慧*, 孙树汉*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 筛选丙型肝炎病毒(HCV)单链 RNA(single strand RNA, ssRNA)序列中有效的免疫激活序列,并进一步确定与免疫激活序列特异结合的蛋白。**方法** 筛选并合成4条 HCV ssRNA 序列中的寡聚核苷酸序列(HCV-ORNs),通过 ELISA 法检测其诱导的细胞因子表达情况,确定有效免疫激活序列。然后通过改良型凝胶阻滞实验及质谱分析技术筛选与该序列特异结合的蛋白。**结果** 在4个 HCV-ORNs 中,ORN_{HCVtail}可有效诱导细胞因子 TNF- α 、IFN- α 升高($P < 0.01$)。与 ORN_{HCVtail} 特异结合的蛋白条带经质谱鉴定共鉴定出83种蛋白,其中可能与 HCV ssRNA 激活免疫反应相关的蛋白包括:TLR3(Toll-like receptor 3),NLRC3(NLR family, CARD domain-containing 3),NLRC4(NLR family, CARD domain-containing 4, 又称 IPAF)。**结论** 成功筛选出 HCV ssRNA 序列中有效的免疫激活序列,并筛选出与其特异结合的蛋白,为 HCV 激活天然免疫反应的机制研究奠定了基础。

[关键词] 丙型肝炎病毒;单链 RNA;免疫激活序列;RNA 结合蛋白

[中图分类号] R 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-0929-04

Study on immunological activity of single strand RNA of hepatitis C virus

CHENG Na, ZHANG Yi-liang, WEI Wei, WANG Kai-hui*, SUN Shu-han*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To screen for the effective immunostimulatory sequences from hepatitis C virus(HCV) single strand RNA (ssRNA), and to identify the proteins that can bind to the sequences specifically. **Methods** Four oligonucleotide sequences (HCV-ORNs) derived from HCV ssRNA were synthesized, and the cytokines induced by them were detected using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), so as to identify the effective immunostimulatory sequences. Then proteins binding to the sequence(s) specifically were identified using improved electrophoresis mobility shift assay (EMSA) combined with electrospray ionization mass spectrum (ESI-MS). **Results** One of the HCV-ORNs, ORN_{HCVtail}, induced higher levels of TNF- α and IFN- α ($P < 0.01$). Totally 83 groups of proteins were identified that can bind to ORN_{HCVtail}; the proteins included TLR3(Toll-like receptor 3), NLRC3(NLR family, CARD domain-containing 3), and NLRC4(NLR family, CARD domain-containing 4). **Conclusion** We have successfully screened out effective immunostimulatory sequence of HCV ssRNA and the proteins that can bind to the sequence specifically. Our findings in the present study lay a foundation for mechanism research of immunity stimulated by HCV infection.

[Key words] hepatitis C virus; single strand RNA; immunostimulatory sequence; RNA binding protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):929-932]

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单链 RNA(single strand RNA, ssRNA)病毒,可引起人类丙型病毒性肝炎。据世界卫生组织统计,全球 HCV 的感染率约为 3%^[1]。被 HCV 感染后,55%~85%的成人发展成为慢性炎症^[2]。因此,研究 HCV 感染引起炎症反应的机制显得尤为重要。

天然免疫是细胞和机体天然存在的非特异性或广谱的抗病原微生物的功能,是机体抵抗病毒的第一道防线,在病毒入侵时可激活一系列的免疫反应,从而有效控制病毒的复制和蔓延^[3-4]。最近研究发现,HCV ssRNA 除了携带遗传信息外,还是有效的免疫激活物质^[5],能够被表达于细胞内的模式识别受体

[收稿日期] 2010-05-04 **[接受日期]** 2010-06-04

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863”计划,2006AA02A238),全军“十一五”科技攻关项目(06G067)。Supported by the National High-tech R&D Program of China(“863” Program, 2006AA02A238) and the Key Science and Technology Program of the “11th Five-year Plan” for Medical Science Development of PLA(06G067).

[作者简介] 程娜, 硕士。E-mail: acn666@126.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871054, E-mail: khwang0118@sina.com; Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

(pattern recognition receptor, PRR)所识别,激活天然免疫反应,诱导效应细胞产生大量 I 型干扰素 (IFN- α/β),后者是介导抗病毒反应最重要的方式之一;并且机体可进一步通过分泌的细胞因子来控制适应性免疫应答的起始^[3]。因此,HCV ssRNA 的识别过程对机体的抗病毒免疫反应起着至关重要的作用。机体免疫系统在识别病毒入侵之后,如何启动有效的免疫应答反应以抵御病毒感染,以及还有哪些重要的免疫分子参与此免疫识别过程并不清楚。

本研究筛选了 HCV ssRNA 序列中有效的免疫激活序列,并进一步筛选其特异性的结合蛋白,试图鉴定 HCV ssRNA 的特异性受体,为进一步探讨 HCV ssRNA 的分子作用机制奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞 人单核细胞株 THP-1、鼠巨噬细胞 RAW264.7(中国科学院细胞库),人外周血单个核细胞(PBMC)分离自健康人静脉血。THP-1 细胞、

PBMC 在含 10% FBS(Gibco 公司)的 RPMI 1640 培养液(Invitrogen 公司)中生长,RAW264.7 细胞在含 10% FBS (Gibco 公司)的 DMEM 培养液(Invitrogen 公司)中生长,培养条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度。

1.2 寡聚核苷酸序列的筛选与合成 对于具有免疫刺激性 RNA 的序列特点目前尚没有明确的说法。不过,有研究表明,富含 G/U 碱基的序列具有较强的免疫刺激活性,并且 U 的数量越多,免疫刺激活性越强^[6-7]。所以从 HCV ssRNA 中随机筛选(筛选标准:G/U 碱基含量>50%)并合成 4 条特征性的寡聚核苷酸序列(HCV-ORNs),序列见表 1。凝胶阻滞实验探针:标记探针为 20 nt poly(U),即序列同 ORN_{HCVtail},在 5'端进行 FITC 标记;竞争探针(未标记探针)序列同标记探针,无 FITC 标记;阴性对照(N.C)探针序列为:5'-UUG UAC UAC ACA AAA GUA CUG-3',无 FITC 标记。以上单链寡聚核苷酸均由上海吉玛制药技术有限公司合成。

表 1 HCV-ORN 序列
Tab 1 HCV-ORN sequences

Region in HCV and ORN name	Sequence(5'-3')	Mutation (ORNmut, G/U to A,5'-3')
ORN ₃₁₁	GCC CCG GGA GGU CUC GUA GA	ACC CCA AAA AAA CAC AAA AA
ORN ₃₁₃₁	UGC GCU CCG UGA UAG GGG GG	AAC ACA CCA AAA AAA AAA AA
ORN ₈₉₆₁	CUU UGA AAU GUA CGG GGC CA	CAA AAA AAA AAA AAA AAC CA
ORN _{HCVtail}	UUU UUU UUU UUU UUU UUU UU	AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

1.3 细胞因子检测 PBMC、RAW264.7 细胞 100 μ l(细胞密度均为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml)铺于 96 孔板,分别经 10 μ mol/L ORN₃₁₁、ORN₃₁₃₁、ORN₈₉₆₁、ORN_{HCVtail}、相应的 10 μ mol/L ORNmut[ORN 与 DOTAP(Sigma 公司)在无血清培养液中混合]及 DOTAP 对照作用 24 h 后,收集 PBMC 培养液上清,使用人 IFN- α 、人 IL-4 ELISA 检测试剂盒(R&D 公司)检测 IFN- α 、IL-4 表达量;收集 RAW264.7 细胞培养液上清,使用鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒(R&D 公司)检测 TNF- α 表达量。

1.4 细胞总蛋白抽提 水平冷冻离心机 1 000 \times g 离心 5 min 收集 THP-1 细胞,用冰冷的 PBS 洗涤 2 次,1 000 \times g 离心 5 min/次,弃尽上清。计数细胞,每 1.0×10^5 个待测细胞加入 100 μ l 非变性细胞裂解液置于装满碎冰的保温盒上 20 min,1 000 \times g 离心 5 min,吸取上清液,即为细胞总蛋白。使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒(Biorad 公司)测定蛋白浓度。

1.5 RNA-凝胶阻滞实验(RNA-EMSA) 所有溶液均为 RNase-free 水配制,凝胶电泳所用玻璃板为

RNA 专用。8%非变性分离胶的配制(10 ml):双蒸水 6.02 ml;30%丙烯酰胺 2.66 ml、10 \times TBE 缓冲液 1 ml;甘油 0.25 ml、10% 过硫酸铵 70 μ l;N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED) 3.5 μ l。

RNA-蛋白结合反应:实验共分 4 组,即(1)标记探针;(2)总蛋白+标记探针;(3)总蛋白+竞争探针+标记探针;(4)总蛋白+N.C 探针+标记探针。具体反应体系如下:(1)结合反应体系,10 \times 结合缓冲液 2 μ l, Poly (I : C) 2 μ l, 标记探针(10 pmol/ μ l) 0.5 μ l, THP-1 细胞总蛋白 4~10 μ g, 补足 RNase-free 水至总体积 20 μ l, 温和混匀,室温静置结合 30 min。(2)竞争结合反应体系,10 \times 结合缓冲液 2 μ l, Poly(I : C) 2 μ l, 竞争探针或 N.C 探针(100 pmol/ μ l) 2.5 μ l, THP-1 细胞总蛋白 4~10 μ g, 补足 RNase-free 水至总体积 19.5 μ l, 温和混匀,室温静置结合 20 min。然后加入标记探针(10 pmol/ μ l) 0.5 μ l, 温和混匀,室温静置结合 30 min。非变性 PAGE:各结合样品分别加入 5 \times 非变性 PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所)后上样到加

样孔。电泳缓冲液为 $1 \times$ TBE (pH 8.3), 电压 100 V, 电泳 100 min。凝胶扫描: 使用 Typhoon 9400 激光扫描成像系统 (GE healthcare 公司), 激发光/发射光波长为 488/520 nm。

1.6 电喷雾质谱 (ESI-MS) 分析 取 RNA-蛋白特异结合条带, 进行 ESI-MS 分析。

1.7 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 软件, 利用 Student's *t* 检验分析两组的差异。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 HCV 免疫激活序列筛选 为筛选 HCV-ORNs 中有效的免疫激活序列, 通过 ELISA 法检测 HCV-ORNs 刺激 RAW264.7 细胞后, 促炎细胞因子 TNF- α 的表达量, 以及刺激 PBMC 后, Th1 型细胞因子 IFN- α 和 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达量。结果发现, ORN_{HCVtail} 诱导 TNF- α 表达量 (图 1A, $P < 0.01$) 及 IFN- α 的表达量 (图 1B, $P < 0.01$) 均显著上调, 诱导 IL-4 的表达量与相应的 ORNmut 诱导量相比无明显差别 (数据未显示, $P > 0.05$)。证明 ORN_{HCVtail} 是有效的免疫激活序列。

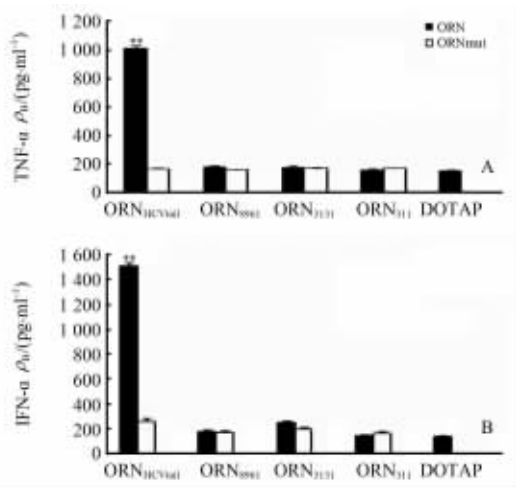


图 1 HCV-ORNs 刺激 RAW264.7 细胞后诱导 TNF- α (A) 及刺激 PBMC 后诱导 IFN- α (B) 表达分析
Fig 1 Analysis of TNF- α expression in RAW264.7 cells (A) and IFN- α expression in PBMCs (B) after stimulation with HCV-ORNs

** $P < 0.01$ vs ORNmut stimulation. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 免疫激活序列与蛋白结合分析 将筛选出来的免疫激活序列 ORN_{HCVtail} 与 THP-1 细胞总蛋白进行 RNA-EMSA, 结果如图 2 所示, 标记探针与细胞总蛋白出现 RNA-蛋白结合条带, 经未标记的竞争探针竞争结合后, RNA-蛋白结合条带几乎消失, 而经未标记

的 N.C 探针竞争结合后, 非特异性结合杂带消失, 而主要的特异结合条带没有变化, 证明该条带中 RNA 与蛋白结合为特异性结合且为可饱和性结合。

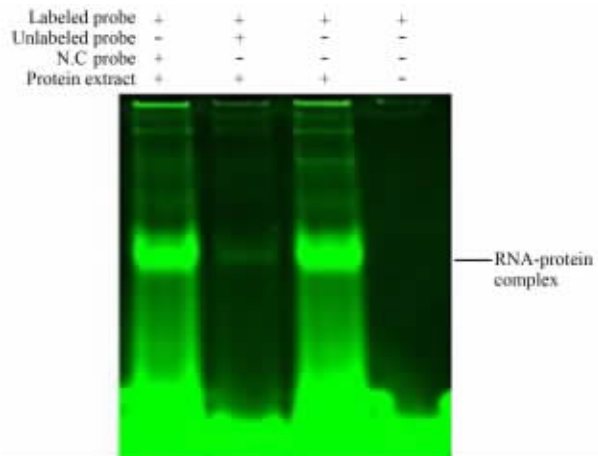


图 2 测定 ORN_{HCVtail} 特异性蛋白结合条带的 RNA 凝胶阻滞实验
Fig 2 Specific ORN_{HCVtail}-protein bands examined by RNA-EMSA

2.3 质谱结果分析 将上述特异 RNA-蛋白结合条带进行 ESI-MS 分析, 共鉴定出 83 种蛋白, 部分结果如表 2 所示。其中, 根据目前研究发现可能与 HCV ssRNA 刺激天然免疫反应相关的蛋白包括: TLR3 (Toll-like receptor 3)、NLRC3 (NLR family, CARD domain-containing 3)、NLRC4 (又称 IPAF)。

3 讨论

研究发现, HCV ssRNA 是有效的免疫激活物质。化学合成的 ORNs 可以模拟病毒 RNA 的作用, 激活效应细胞, 诱导分泌细胞因子^[6]。本研究从 HCV ssRNA 中筛选并合成了 4 个 RNA 寡聚核苷酸序列: ORN₃₁₁、ORN₃₁₃₁、ORN₈₉₆₁ 和 ORN_{HCVtail} [Poly(U)], 发现 ORN_{HCVtail} 具有很强的免疫刺激性, 能够强烈激活天然免疫反应, 诱导效应细胞产生大量 TNF- α 及 IFN- α 。说明该寡聚核苷酸 [Poly(U)] 序列能有效激活免疫细胞, 使其分泌细胞因子。关于 HCV ssRNA 激活天然免疫反应方面的研究, 目前尚未见其他实验室从免疫激活序列筛选角度的报道, 本报道所研究的序列是本实验室从 HCV 特异性免疫激活序列筛选的角度新发现的序列。

本研究进一步通过 RNA-EMSA 结合 ESI-MS 分析技术, 筛选与该 Poly(U) 序列相互作用的蛋白。采用了改良型 EMSA 技术, 与普通 ³²P 标记或生物素标记 EMSA 相比, 该改良型 EMSA 的探针为荧光标记, 灵敏度高, 且实验操作简便。对特异性

RNA-蛋白结合条带进行质谱鉴定,共鉴定出 83 种蛋白,其中可能与 HCV ssRNA 刺激天然免疫反应

相关的蛋白包括 3 个重要的天然免疫模式识别受体 TLR3、NLRC3 和 NLRC4。

表 2 ESI-MS 鉴定的部分 ssRNA 结合蛋白

Tab 2 List of single strand RNA binding proteins identified by ESI-MS

Gene_symbol	SWISS-PROT	M _r	pI	PepCount sequence
Toll-like receptor 3 precursor(TLR3)	O15455	103 828. 61	6. 73	K. SEELDIFANSSLKK. L
Isoform 4 of protein NLR family, CARD domain-containing 3 (NLRC3)	Q7RTR2	111 634. 42	8. 58	R. AM * QAEDGRLDVFLR. F
Isoform 1 of protein NLRC4	Q9NPP4-1	116 159. 12	6. 32	R. FKNM * VIVTTTTECLR. H R. FKNM * VIVTTTTECLR. H
Protein disulfide-isomerase precursor(P4HB)	P07237	57 116. 53	4. 76	K. HNQLPLVIEFTEQTAPK. I K. NFEDVAFDEK. K K. NFEDVAFDEK. K K. VDATEESDLAQQYGV. G R. EADDIVNWLK. K R. EADDIVNWLK. K R. LITLEEEMTK. Y R. LITLEEEMTK. Y
Isoform 1 of Bel-2-associated transcription factor 1(BCLAF1)	Q9NYF8	106 122. 61	9. 99	K. YQGDGIVEDEEETMENNEEK. K

通常认为 TLR3 是病毒双链 RNA(dsRNA) 识别受体,位于细胞膜,可以特异性地识别 dsRNA 和 Poly(I : C)。由于 dsRNA 是病毒复制过程中普遍存在的中间产物,因此 TLR3 在宿主抗病毒天然免疫反应中发挥重要作用。但最近 Marshall-Clarke 等^[8]报道 TLR3 也能识别单股链 Poly (I), 因此 TLR3 可能对 dsRNA 与 ssRNA 均有识别能力。本实验有力地支持了这一结论,提示 TLR3 可能作为一种新的 HCV ssRNA 识别受体,在 HCV 引起的天然免疫反应中发挥作用。

NLRC3、NLRC4 属于 NLR(NOD-like receptor) 家族,位于胞质。NLRC4 可被胞内菌的鞭毛蛋白激活,如沙门菌的识别需要 NLRC4 激活一种 ASC 依赖性的 NALP 炎症小体,从而诱导 IL-1 β 的生成或细胞凋亡^[9]。之前认为 NLR 家族是以识别细菌为主,但最近的研究表明,它们与病毒感染也有密切关系^[10]。本研究提示, NLRC3、NLRC4 可能在 HCV ssRNA 的识别过程中也发挥作用,从而为 HCV 诱导的免疫反应的机制研究提供了新的方向和思路。

对于以上可能识别 HCV ssRNA 的蛋白的进一步鉴定,首先可通过 EMSA 对纯化的蛋白与 HCV-ORN 的结合进行;其次可通过酵母三元杂交技术在体内检测 RNA-蛋白间相互作用,激光共聚焦实验进行核酸与蛋白共定位,如果定位一致,则可进一步确定其结合;还可通过功能分析确认 TLR3、NLRC3 或 NLRC4 是否可以识别 HCV ssRNA,如通过基因过表达及 RNAi 实验进行免疫学分析等。

本研究成功筛选出 HCV ssRNA 序列中有效的

免疫激活序列,并筛选出与其特异结合的蛋白,为 HCV 激活免疫反应的机制研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium[J]. J Viral Hepat, 1999, 6: 35-47.

[2] Hoofnagle J H. Course and outcome of hepatitis C[J]. Hepatology, 2002, 36(5 Suppl 1): S21-S29.

[3] Beignon A S, Mckenna K, Skobene M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh D G, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells *via* Toll-like receptor-viral RNA interactions [J]. J Clin Invest, 2005, 115: 3265-3275.

[4] Sun Q, Sun L, Liu H H, Chen X, Seth R B, Forman J, et al. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune response[J]. Immunity, 2006, 24: 633-642.

[5] Decalf J, Fernandes S, Longman R, Ahloulay M, Audat F, Lefrere F, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients[J]. J Exp Med, 2007, 204: 2423-2437.

[6] Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA[J]. Science, 2004, 303: 1529-1531.

[7] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA *via* toll-like receptor 7 and 8[J]. Science, 2004, 303: 1526-1529.

[8] Marshall-Clarke S, Downes J E, Haga I R, Bowie A G, Borrow P, Pennock J L, et al. Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3[J]. J Biol Chem, 2007, 282: 24759-24766.

[9] Mariathasan S, Newton K, Monack D M, Vucic D, French D M, Lee W P, et al. Differential activation of the inflammasome by casepase-adaptors ASC and Ipaf [J]. Nature, 2004, 430: 213-218.

[10] Allen I C, Scull M A, Moore C B, Holl E K, McElvania-TeKippe E, Taxman D J, et al. The NLRP3 inflammasome mediates *in vivo* innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA[J]. Immunity, 2009, 30: 556-565.