

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.08.001

· 论 著 ·

流感病毒感染小鼠肺巨噬细胞 Dll1 和 MHC- I 表达研究

邹婷婷¹, 张智洁^{1,2}, 杨松¹, 原野¹, 薛琨¹, 刘思楠¹, 胡晓同¹, 金红¹

(1 中国医科大学基础医学院病原生物学教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 探讨小鼠肺巨噬细胞 Dll1 及 MHC-I 与细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)为主的细胞免疫应答的关系, 为制备有效的新型抗流感病毒疫苗提供理论依据。方法 将小鼠随机分为 3 组, 异型免疫组(用 rL-H5 株重组二联活疫苗免疫)、同型免疫组(用 A/H1N1 流感病毒免疫)和未免疫感染组(用 PBS 代替疫苗), 不同疫苗免疫小鼠后均感染 A/H1N1 型流感病毒, 比较 3 组小鼠肺巨噬细胞 Notch-Dll1 及 MHC-I 表达情况, 并研究干扰素(IFN)- γ 、T 细胞水平变化。结果 异型免疫组感染 4 d 和 7 d 后, 肺巨噬细胞 Notch-Dll1 [分别为(0.01460 \pm 0.00125)和(0.01750 \pm 0.00196)] 及 MHC- I mRNA 表达水平 [分别为(0.03050 \pm 0.0029)和(0.0495 \pm 0.0024)] 显著高于感染前 [分别为(0.00045 \pm 0.00004)和(0.0120 \pm 0.0018)], 未免疫感染组感染 4 d 和 7 d 后 Notch-Dll1 [分别为(0.01010 \pm 0.00107)和(0.01320 \pm 0.00143)] 和 MHC- I mRNA 表达水平 [分别为(0.0219 \pm 0.0024)和(0.0248 \pm 0.0022)] 均高于感染前 [分别为(0.00032 \pm 0.00007)和(0.0090 \pm 0.0013)]; 异型免疫组感染 4 d 和 7 d 后, Notch-Dll1 和 MHC- I mRNA 表达水平均高于同型免疫组 [感染 4 d 和 7 d 后, Notch-Dll1 分别为(0.00089 \pm 0.00018)和(0.00143 \pm 0.00096), MHC- I mRNA 分别为(0.0038 \pm 0.0008)和(0.0008 \pm 0.0002)及未免疫感染组, 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。感染后第 7 天, 异型免疫组 IFN- γ 、CD8 + T 细胞的百分比含量为(3.31 \pm 0.34)%, 高于同型免疫组和未免疫感染组 [分别为(0.38 \pm 0.06)%和(1.58 \pm 0.27)%]; 感染后第 5 天, 异型免疫组流感病毒量为[(6.26 $\times 10^5$) \pm (3.7 $\times 10^5$)]copies/ μ L, 低于未免疫感染组 [(6.85 $\times 10^7$) \pm (2 $\times 10^7$)]copies/ μ L, 而高于同型免疫组(400 \pm 250)copies/ μ L (均 $P < 0.05$)。结论 小鼠肺巨噬细胞 Dll1 及 MHC- I 的表达可能在以 CTL 为主流感病毒异型交叉保护免疫应答反应中起重要作用。

[关键词] 流感病毒; 巨噬细胞; 异型; Notch-Dll1; MHC- I; 细胞毒性 T 淋巴细胞

[中图分类号] R511.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)08-0449-05

Notch-Dll1 and MHC- I expression in pulmonary alveolar macrophages of mice infected with influenza virus

ZOU Ting-ting¹, ZHANG Zhi-jie^{1,2}, YANG Song¹, YUAN Ye¹, XUE Kun¹, LIU Si-nan¹, HU Xiao-tong¹, JIN Hong¹ (1 College of Basic Medical Science, China Medical University, Liaoning 110001, China; 2 Shengjing Hospital of China Medical University, Liaoning 110001, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between Notch ligand Delta-like 1 (Dll1), MHC class I molecule (MHC-I) in mice pulmonary alveolar macrophages (PAM) and cellular immunity response based on cytotoxic T-lymphocytes(CTLs), and provide theoretical basis for the preparation of vaccine against influenza virus. **Methods** Mice were randomly divided into 3 groups: heterosubtypic immune group (immunized with recombinant virus vaccine rL-H5), homosubtypic immune group (immunized with A/H1N1 influenza virus vaccine), and viral infection group (immunized with PBS). Mice immunized with different vaccines were all infected with A/H1N1 influenza virus. mRNA expression of Notch-Dll1 and MHC-I among 3 groups were compared, levels of IFN- γ and T cells in 3 groups were studied. **Results** At day 4, 7 of post-infection, in heterosubtypic immune group, mRNA expression of Notch-Dll1 ([0.01460 \pm 0.00125]),

[收稿日期] 2014-04-18

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20102104110018)

[作者简介] 邹婷婷(1989-), 女(汉族), 河南省信阳市人, 硕士研究生, 主要从事病毒学研究。

[通信作者] 金红 E-mail: jinhong@sina.com

[0.01750 ± 0.00196]) and MHC- I ([0.03050 ± 0.0029],[0.0495 ± 0.0024]) were both higher than those before infection ([0.00045 ± 0.00004],[0.0120 ± 0.0018]), in viral infection group, mRNA expression of Notch-Dll1 ([0.01010 ± 0.00107],[0.01320 ± 0.00143]) and MHC- I ([0.0219 ± 0.0024],[0.0248 ± 0.0022]) were both higher than those before infection([0.00032 ± 0.00007],[0.0090 ± 0.0013]);At day 4,7 of post-infection, mRNA expression of Notch-Dll1 and MHC- I in heterosubtypic immune group were both higher than those in homosubtypic immune group (Notch-Dll1 [0.00089 ± 0.00018],[0.00143 ± 0.00096]; MHC- I [0.0038 ± 0.0008],[0.0008 ± 0.0002]) and viral infection group,the difference was statistically significant(all $P < 0.05$). At day 7 of post-infection, the percentage of IFN- γ and CD8 + T cells in heterosubtypic immune group was(3.31 ± 0.34)%, which was significantly higher than homosubtypic immune group ([0.38 ± 0.06]%)and viral infection group ([1.58 ± 0.27]%) ; At day 5 of post-infection, viral load of heterosubtypic immune group ([6.26 × 10⁵ ± 3.7 × 10⁵]copies/ μ L) was lower than that of viral infection group ([6.85 × 10⁷ ± 2 × 10⁷] copies/ μ L),but higher than that of homosubtypic immune group([400 ± 250]copies/ μ L) (all $P < 0.05$). **Conclusion** Notch-Dll1 and MHC- I in mice PAM may play active roles by promoting CTL differentiation during heterosubtypic immune against influenza virus.

[**Key words**] influenza virus;macrophage; heterosubtypic; Notch-Dll1; MHC- I ; cytotoxic T lymphocyte

[Chin Infect Control,2014,13(8):449-453]

流感病毒是导致全球周期性流感流行的病原体,其潜伏期短,发病率高,传染性强,对人类威胁较大^[1]。2013年发生在中国的甲型 H7N9 流感病毒再次引起全球关注^[2]。目前,预防流感有效的措施就是接种流感病毒疫苗。国内外生产的流感病毒疫苗是几种常见流行株组合产品,主要诱导机体产生 HA(血凝素,hemagglutinin)特异性中和抗体,只对控制所含型别流行有效,对新出现的变异株无效。目前,尚无有效的抗变异流感病毒感染疫苗。Tamura 等^[3]认为机体对流感病毒不同型别间的交叉保护作用常由流感病毒共有核蛋白(NP)主导,其中细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应起重要作用。自然产生的异型间交叉保护作用弱,难以完全抵御异型流感病毒感染。那么是否能够通过增强细胞免疫应答作用,达到清除异型流感病毒的目的,有待进一步研究。

相关前期研究工作^[4-5]发现,小鼠感染免疫型别不同的异型免疫组病毒后,干扰素(IFN)- γ 水平显著升高,与同型免疫组和未免疫组比较,差异具有统计学意义。IFN- γ 是活化的淋巴细胞分泌的细胞因子,具有上调单核细胞表面 MHC- I 类分子表达、活化巨噬细胞、促使 CD8 + T 细胞成熟为效应 CTL 细胞等重要作用^[6]。最新资料^[7]表明,抗原递呈细胞(APC)巨噬细胞表面 Notch ligand Delta-like 1(Dll1)基因表达及分泌的 IFN- γ 水平与感染流感病毒动物的病死率、病毒清除率密切相关。关于流感病毒感染与 Notch 配体关系的研究仅对初次流感病毒感染时 Notch-Dll1 表达水平的初步研究,对再次流感病毒感染,特别是感染与免疫型别不同流感

病毒,其表达量的变化及其机制皆无深入研究。

本研究用不同流感病毒疫苗免疫小鼠,然后感染 H1N1 流感病毒,检测小鼠肺巨噬细胞 Notch-Dll1 及 MHC- I 表达情况,并研究 IFN- γ 阳性 T 细胞水平变化。探讨肺巨噬细胞 Dll1 及 MHC- I 与 CTL 为主的细胞免疫应答的关系,为制备有效的新型抗流感病毒疫苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,雌性,由中国医科大学动物部提供。

1.1.2 病毒 A/FM/47(H1N1)流感病毒小鼠适应株,由中国医科大学病原生物学实验室提供,用前进行病毒滴定鸡胚半数感染量(50% egg infection dose, EID₅₀)。

1.1.3 主要试剂 重组活疫苗(rL-H5 株),购自哈尔滨维科生物技术开发公司;RNAiso Plus(Total RNA 提取试剂)、RT Master Mix(Perfect Real Time)和 SYBR Premix Ex Taq™II(Perfect Real Time),均购自大连宝生物工程公司;相关抗体购自凯基生物有限公司;引物由北京华大基因公司合成。

1.2 方法

1.2.1 分组 将小鼠随机分为 3 组,每组 15 只。异型免疫组(H5N1-H1N1):用 rL-H5 株重组二联活疫苗免疫,A/H1N1 型流感病毒感染;同型免疫组(H1N1-H1N1):用 A/H1N1 流感病毒免疫,A/H1N1 型流感病毒感染;未免疫感染组(PBS-

H1N1):用 PBS 代替疫苗,A/H1N1 型流感病毒感染。各组标记后分别称重,正常饮水及食物喂养,每日观察记录小鼠的活动状态、临床表现及称量体重。

1.2.2 免疫动物 将各组小鼠用水合氯醛轻度麻醉,异型免疫组疫苗接种按说明书进行,每只小鼠鼻腔接种 EID₅₀ 为 10^{6.0} 的 rL-H5 疫苗 50 μL。同型免疫组疫苗接种参照文献[6],每只小鼠经鼻腔接种 EID₅₀ 为 10^{2.8} 的 A/H1N1 流感病毒 50 μL。未免疫感染组,每只小鼠鼻腔滴入 50 μL PBS。首次免疫 3 周后加强免疫 1 次,方法与剂量同上。

1.2.3 感染动物 加强免疫 2 周后,各组小鼠用水合氯醛轻度麻醉,按上述分组每只小鼠经鼻腔感染 EID₅₀ 为 10^{4.8} 的 A/H1N1 流感病毒 100 μL,正常饮食饮水饲养,感染病毒后每天准确称量小鼠体重,并观察其饮食饮水及精神状态。

1.2.4 分离肺巨噬细胞 分别于感染前,感染 4 d 和 7 d 后无菌解剖小鼠,取小鼠全肺(每组 3 只)。按常规方法制作肺组织匀浆,4℃离心机以 3 000 r/min 离心 10 min,细胞悬浮于 5 mL 红细胞溶解液(ACK buffer),室温培育 5 min,经 PBS 洗涤后悬浮于 RPMI1640 中,并用贴壁法进一步纯化及收集巨噬细胞。

1.2.5 肺巨噬细胞 Notch-Dll1 mRNA 表达水平 Trizol 法提取肺巨噬细胞 RNA,以 β-actin 为内参,采用实时定量 RT-PCR 法检测 Notch-Dll1 表达量。Notch-Dll1 引物,forward: 5'-GCAGATGGCCCTT-GCTTCA-3'; reverse: 5'-CACAGGTAAGAGTTGC-CGAGGTC-3'。β-actin 引物,forward : 5'-CATCCG-TAAAGACCTCTATGCCAAC -3'; reverse: 5'-ATG-GAGCCACCGATCCACA -3'。反应体系如下:10 μL 的 SYBR Premix Ex Taq™II(2×)、0.4 μL 的 ROX Reference Dye II(50×)、6 μL 去离子水、2 μL 的 cDNA、各 0.8 μL 的 10 μmol/L 上、下游引物。反应条件: Stage 1(预变性):95℃30 s;Stage 2 (35 个循环):95℃5 s,60℃30 s;Stage 3(溶解):95℃15 s,60℃60 s,

95℃15 s。

1.2.6 肺巨噬细胞 MHC-I 表达水平 MHC-I 表达水平检测的方法、步骤及反应体系同 Notch-Dll1 mRNA 检测法。引物为 forward:5'-CCAGCACCTCAGGGT-GACTTTA-3';reverse:5'-TGGCTCCGCAGATAC-CTGAA-3'。反应条件:Stage 1(预变性):95℃30 s;Stage 2 (35 个循环):95℃5 s,57℃30 s;Stage 3(溶解):95℃15 s,60℃60 s,95℃15 s。

1.2.7 IFN-γ 阳性 CD8+ T 细胞水平测定 分别于感染前,感染 4 d 和 7 d 后无菌解剖取小鼠脾(每组 3 只)。常规方法分离脾淋巴细胞,调整细胞浓度至 1×10⁶ 个/mL,破膜后使用抗 CD3、CD8 及 IFN-γ 抗体,用流式细胞仪检测 IFN-γ 阳性 CD8+ T 细胞的百分含量。

1.2.8 感染小鼠肺流感病毒量测定 感染病毒第 5 d,使用 Trizol 试剂提取小鼠左肺 RNA(每组 3 只),用实时定量 RT-PCR 法检测流感病毒特异性 NP 基因量,反应条件和反应体系参照文献[5]。引物为 forward: 5'-CTGAGAAGCAGGTACTGGGC-3'; reverse:5'-CTGCATTGTCTCCGAAGAAAT -3'。

1.3 统计分析 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,各组数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析以及两因素重复测量数据的方差分析;采用 Graphpad prism 软件制作图。P≤0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺巨噬细胞 Notch-Dll1 mRNA 表达水平 感染 4 d 和 7 d 后异型免疫组和未免疫感染组 Notch-Dll1 mRNA 表达水平高于感染前,差异具有统计学意义(P<0.05)。异型免疫组 Notch-Dll1 mRNA 表达水平高于同型免疫组及未免疫感染组,差异具有统计学意义(P<0.05)。见图 1。

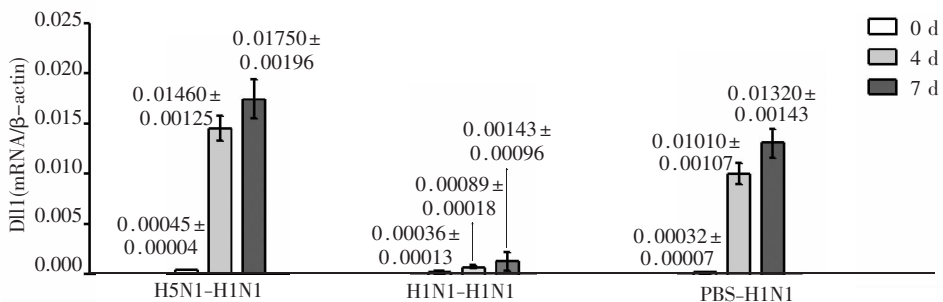


图 1 小鼠肺巨噬细胞 Notch-Dll1 mRNA 表达量

Figure 1 mRNA expression of Notch-Dll1 in mice pulmonary alveolar macrophages

2.2 肺巨噬细胞 MHC-I 表达水平 感染 4 d 和 7 d 后异型免疫组和未免疫感染组 MHC-I mRNA 表达水平高于感染前, 差异具有统计学意义 (P

<0.05)。异型免疫组 MHC-I mRNA 表达水平高于同型组及未免疫感染组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

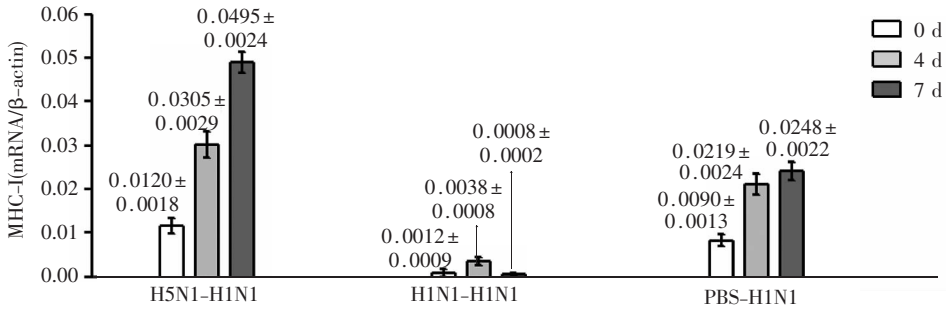


图 2 小鼠肺巨噬细胞 MHC-I mRNA 表达量

Figure 2 mRNA expression of MHC-I in mice pulmonary alveolar macrophages

2.3 IFN- γ 阳性 CD8 + T 细胞水平 感染后第 7 天, 异型免疫组 IFN- γ 阳性 CD8 + T 细胞的百分比含量明显高于同型免疫组和未免疫感染组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

鼠肺病毒量, 发现未免疫感染组小鼠肺病毒量最高, 而同型免疫组肺病毒量最低; 异型免疫组肺病毒量低于未免疫感染组而高于同型免疫组 (均 $P < 0.05$)。见图 4。

2.4 小鼠肺流感病毒量测定 感染 5 d 后检测小

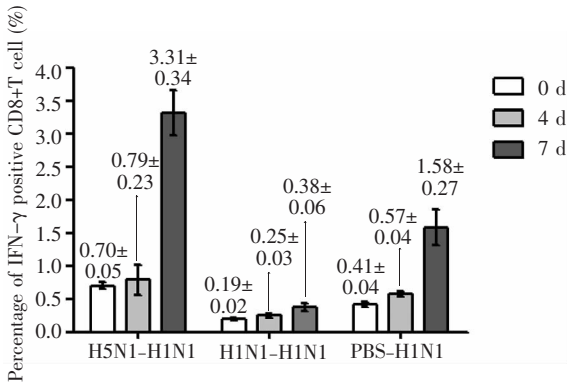


图 3 小鼠 IFN- γ 阳性 CD8 + T 细胞百分比含量测定

Figure 3 Percentage of IFN- γ -secreting CD8 + cells in mice

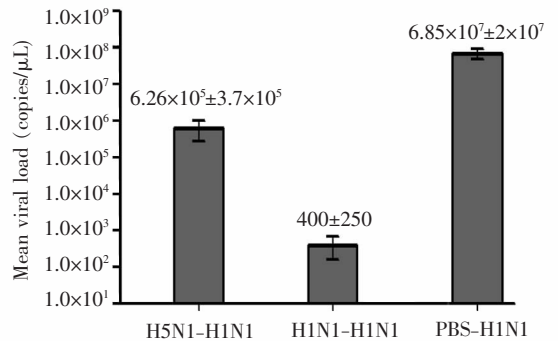


图 4 实时定量 PCR 法测定小鼠肺病毒基因

Figure 4 Virus load in mice lung detected by real-time PCR

3 讨论

研究适应性细胞免疫应答反应在抗异型流感病毒感染的主要机制, 是开发以细胞免疫为基础的抵御异型流感病毒感染疫苗的前提, 此类疫苗可以为机体提供交叉免疫保护。Notch 基因为细胞的重要信号系统, 脊椎动物常见 Notch 配体分为 Delta-like 与 Jagged 两类, 前者包括 delta-like1、delta-like3 和 delta-like4 (又称 Dll1、Dll3 和 Dll4)^[8]。目前, 对 Notch 信号在肿瘤的形成和发展中的作用研究较

多, 但有限的与抗病毒感染免疫关系的研究, 尚不能说明 Notch 信号与抗病毒感染免疫之间的关系。本研究在前期研究的基础上^[4-5], 测定再次感染时起重要抗原递呈作用及连接适应性免疫应答反应的重要免疫相关细胞—肺巨噬细胞表面 Notch-Dll1 mRNA 表达水平, 发现异型免疫组和未免疫感染组感染后 4 d 和 7 d 其表达水平升高, 异型免疫组表达水平高于同型组及未免疫感染组。APC 中的巨噬细胞表面 Notch ligand Delta-like 1 基因表达影响机体抗流感病毒免疫应答反应, 并与 IFN- γ 水平密切相关^[7]。异型免疫组其水平显著升高, 说明肺巨噬

细胞表面 Notch 信号系统可能介导机体再次感染异型流感病毒时的交叉保护免疫应答反应。

IFN- γ 阳性 CD8 + T 细胞主要由 CTL 组成^[9], 流感病毒感染 5~7 d 后 CTL 趋化至肺部感染处, 识别表达 MHC-I 病毒抗原肽的感染细胞, 通过颗粒酶、穿孔素等杀伤感染细胞。病毒感染后, 表达于肺巨噬细胞的 MHC-I 递呈病毒抗原给 CD8 + T 细胞, 并产生细胞毒效应, 发挥 CTL 的功能, 对清除体内病毒感染起重要作用^[10]。本研究显示, 异型免疫组 MHC-I mRNA 表达水平高于同型组及未免疫感染组, 表明肺巨噬细胞 MHC-I 基因表达与流感病毒不同型别间交叉免疫应答反应相关。我们可以推测, 异型流感病毒感染后, 通过肺巨噬细胞表面 Notch 信号系统及 MHC-I 基因启动 CTL 为主的抗流感病毒免疫应答反应。我们用流式细胞术检测 IFN- γ 阳性 CD8 + T 细胞水平结果, 进一步证实了 IFN- γ 阳性 CD8 + T 细胞(CTL)参与了异型流感病毒间的交叉免疫应答反应。对小鼠流感病毒感染后肺病毒量进行检测, 结果显示感染与免疫型别不同流感病毒时的病毒残留量小于未免疫感染组, 表明这种异型流感病毒间产生了交叉免疫保护作用。

综上所述, 今后的努力目标是如何提高机体异型流感病毒间的交叉保护作用, 深入研究其机制, 为制备能够抵御变异流感病毒感染的疫苗提供新思路。

[参 考 文 献]

[1] Williams J R, Chen P Y, Cho C T, et al. Influenza: prospect for prevention and control[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2002, 18(9):

421 - 434.

- [2] Li J, Yu X, Pu X, et al. Environmental connections of novel avian-origin H7N9 influenza virus infection and virus adaptation to the human[J]. Sci China Life Sci, 2013, 56(6): 485 - 492.
- [3] Tamura S I, Tanimoto T, Kurata T. Mechanisms of broad cross protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines[J]. Jpn J Infect Dis, 2005, 58(4): 195 - 207.
- [4] 郭志华, 牛术孟, 金红. 异型流感病毒感染小鼠肺细胞因子水平变化[J]. 微生物学杂志. 2011, 31(4): 74 - 79.
- [5] Yang S, Niu S, Guo Z, et al. Cross-protective immunity against influenza A/H1N1 virus challenge in mice immunized with recombinant vaccine expressing HA gene of influenza A/H5N1 virus[J]. Virol J, 10: 291.
- [6] Tu W, Mao H, Zheng J, et al. Cytotoxic T lymphocytes established by seasonal human influenza cross-react against 2009 pandemic H1N1 influenza virus[J]. J Virol, 2010, 84(13): 6527 - 6535.
- [7] Ito T, Allen R M, Carson W F 4th, et al. The critical role of Notch ligand Delta-like 1 in the pathogenesis of influenza A virus (H1N1) infection[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11): 1 - 14.
- [8] Shawber C J, Kitajewski J. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish mouse and man[J]. Bioessays, 2004, 26(3): 225 - 234.
- [9] Hutnick N A, Carnathan D, Demers K, et al. Adenovirus-specific human T cells are prevasive, polyfunctional, and cross-reactive[J]. Vaccine, 2010, 28(8): 1932 - 1941.
- [10] Zhang W, Lin Y, Bai Y, et al. Identification of CD8 + cytotoxic T lymphocyte epitopes from porcine reproductive and respiratory syndrome virus matrix protein in BALB/c mice[J]. Virol J, 2011, 8: 263.

(本文编辑:左双燕)