

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.16.007

文章编号: 1005-8982(2016)16-0035-04

论著

乙型肝炎病毒蛋白诱导白细胞介素 32 表达情况的研究

张晶晶, 谢永富, 胡建峰, 刘会晶, 孙宏勋

(河北医科大学第三医院 检验科, 河北 石家庄 050051)

摘要: **目的** 探讨乙型肝炎病毒蛋白诱导白细胞介素 32(IL-32)的表达以及临床意义。**方法** 用 Lipofectamine 2000™ 介导转染 HepG2 细胞。转染 48 h 后,采用聚合酶链反应(RT-PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 HepG2 细胞中 IL-32 的 mRNA 及蛋白的表达量。**结果** RT-PCR 结果显示转染 HBV 的 HepG2 细胞中 IL-32 mRNA 的表达量比转染空载体(未转染)的细胞中 IL-32 mRNA 高 2.3 倍;Western blot 结果显示与空载体转染的 HepG2 细胞比较,转染 pIRES2-HBV-EGFP 的 HepG2 细胞中 IL-32 蛋白质表达增高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HBV 促进 IL-32 蛋白的表达,从而证实乙型肝炎的严重程度与 IL-32 的表达有关。

关键词: 乙型肝炎病毒蛋白;IL-32;表达;研究

中图分类号: R575.1

文献标识码: A

Expression of IL-32 induced by hepatitis B virus protein

Jing-jing Zhang, Yong-fu Xie, Jian-feng Hu, Hui-jing Liu, Hong-xun Sun
(Department of clinical laboratory, the Third Hospital of Hebei Medical University,
Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether protein of hepatitis B virus induced the expression of IL-32. **Methods** HepG2 was mediated transfected by Lipofectamine 2000™. After 48 hours, the expressions of IL-32 mRNA and protein in HepG2 cells were detected by RT-PCR and western blot respectively. **Results** RT-PCR result showed expressions of IL-32 mRNA in HepG2 cells transfected with HBV were 2.3 times higher than the cells transfected with empty vector (non-transfected). Western blot result showed that, compared with the IL-32 protein in untransfected HepG2 cells, expression of IL-32 protein in transfected pIRES2-HBV-EGFP HepG2 cells was increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of IL-32 mRNA, IL-32 protein in HepG2 cells is promoted by HBV.

Keywords: hepatitis B virus protein; IL-32; expression; study

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是目前严重威胁人类健康的病毒之一。HBV 感染肝细胞后不仅极易引起急性肝炎、慢性肝炎和肝硬化等疾病,而且还会提高肝癌的发生率^[1]。HBV 感染宿主后,正常的免疫应答可以清除乙肝病毒,表现为急性一过性的感染。若是细胞免疫功能低下或紊乱者,则

无法清除乙肝病毒,最终将成为慢性感染者^[2]。白细胞介素 32(Interleukin, IL-32)是一种重要的炎症因子,主要经免疫细胞表达,IL-32 为促炎因子。IL-32 在丙型肝炎病毒、人乳头状瘤病毒引起的炎症性疾病中发挥重要作用^[3-4]。IL-32 是否参与乙型病毒性肝炎的发病,国内外研究甚少,本研究在分子生化水

收稿日期:2016-04-08

[通信作者] 谢永富, E-mail: xieteng811@sohu.com; Tel: 13503339862

平对 HBV 是否诱导 IL-32 的表达进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞株:人肝癌细胞株 HepG2 细胞(购自北京协和和技术所细胞库),主要试剂:主要试剂及来源见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞培养在含 10%胎牛血清、10%青链双抗的 DMEM 培养基中,于 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 条件下培养,待贴壁细胞处于生长期时进行传代。

1.2.2 质粒转染细胞 用脂质体 Lipofectamine 2000™ 介导转染,在转染前 1 d 换用不含双抗的培养液,调整 HepG2 细胞浓度为 1 × 10⁵ 个 /rat,将其接种于 24 孔板中,每孔 1 ml。用 OPTI-MEM 稀释质粒和脂质体,当细胞贴壁密度达到 90%融合时,把质粒、脂质体混合物加至细胞中。转染 6 h 后更换培养液为含双抗的培养液,第 2 天荧光下观察转染率达 50%。

1.2.3 RT-PCR 检测 HBV 转染 IL-32 mRNA 的表达量 将上述细胞培养 48 h 后,除去培养液,用 PBS(phosphate-buffered saline, PBS)洗 2 次,然后加入 Trizol。按试剂盒说明提取总 RNA。采用分光光度法(A260/280 nm 值)检测每一个 RNA 样本的质量。利用反转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录。采用 SYBR Green I 染料法对 IL-32 基因的表达量进行检测,反应体系为 25 μl:2 × Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Bio-system)10 μl,10 μmol/L 的正反向引物各加 1 μl,模板为总 RNA 逆转录所得的 cDNA,用灭菌双蒸水补足至 25 μl。各处理组分别做 3~4 个平行样品,每个样品再分别平行做 3 个重复。各个样品的反应条件为:95℃、3 min,40 个循环:95℃、15 s,60℃、45 s;60℃延伸步骤进行荧光信号的采集。反应结束后,收集本反应体系的融解曲线,以此分析 PCR 产物的特异性。目的基因相对表达量分析方法采用 2^{-ΔΔCT} 法计算。IL-32 引物参照 KOBAYASHI 等^[8]:正向引物 5'-CGACTTCAAAGAGG GCTACC-3',反向引物 5'-GAGTGAGCTCTGGGTGC TG-3';β-actin 引物:正向引物 5'-TCGTCCACCGCA AATGCTTCTAG-3',反向引物 5'-ACTGCTGTACCT FCACCGTTCC-3',采用双 Δt 法计算结果。

1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HBV 转染 IL-32 蛋白的表达量影响 收集未转染以及转染 48 h 的细胞,冲洗 2 次,置放射免疫沉淀分析缓冲液中萃取蛋白,置冰上 30 min。采用超声匀浆器处理标本,用未转染细胞做对照,采用 Lowry 法测定蛋白浓度。采用 10% SDS-PAGE(150 V,2 h)分离蛋白,并转到硝酸纤维膜上,用 5%的牛血清白蛋白封闭 1 h,加 1:2 000 的 Mouse anti-IL-32 单抗孵育过夜,第 2 天,冲洗掉一抗,在用 1:5 000 的辣根过氧化酶结合的 Goat anti-mouse IgG 孵育 1 h。采用增强化学发光法检测蛋白质。Mouse-anti-β-actin 单克隆抗体作为内对照。

表 1 试剂列表

主要试剂	来源
HBV 表达质粒与核因子 K B5 (nuclearfactor KB,NF-KB)蛋白	济南协和肝病医院惠赠
胎牛血清	Hyclone 公司
DMEM	Hyclone 公司
Trizol	Invitrogen 公司
反转录试剂盒	Thermo 公司
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	QIAGEN 公司
Mouse anti-IL-32 单抗	
Goat anti-mouse IgG	BioLegend 公司
Mouse-anti-β-actin 单抗	
人 IL-32 α ELISA,MAX,Deluxe	

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 对 IL-32 mRNA 的表达量的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,转染 HBV 48 h 后的 HepG2 细胞,比转染空载体(未转染)的细胞中的 IL-32 mRNA 表达量高 2.3 倍(见图 1,2 和表 2),并且溶解曲线显示 IL-32,以及 β-actin 的引物特异性良好,进一步显示数据具有可靠性。

结果可见,通过对未转染细胞和转染细胞中 β-actin 统计分析可以看出,β-actin 表达在两组比较差异无统计学意义,而对未转染细胞和转染细胞中 RNA IL-32 mRNA 的含量可以看出未转染细胞 RNA IL-32 mRNA 表达明显高于转染细胞,差异有统计学意义,见表 2。

2.2 HBV 对 IL-32 蛋白的表达量的影响

Western blot 结果显示,转染 48 h 的 HepG2 细胞,

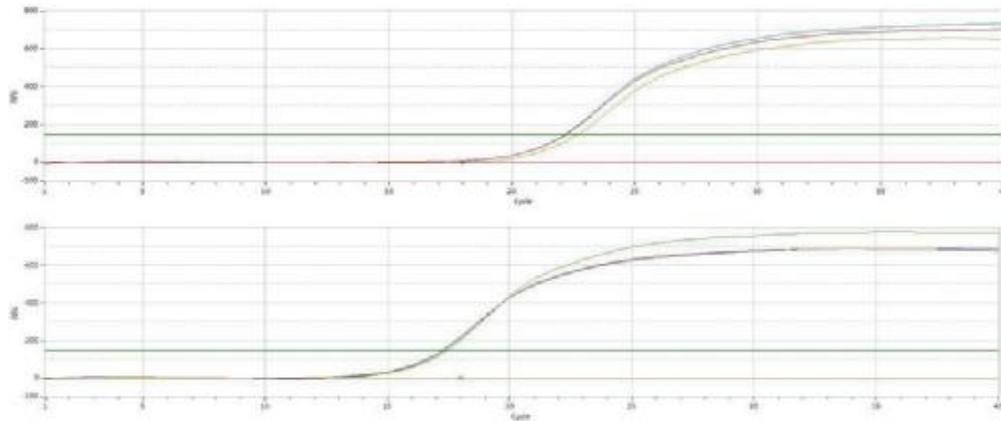


图 1 未转染细胞中 IL-32 及 β -actin 的扩增曲线

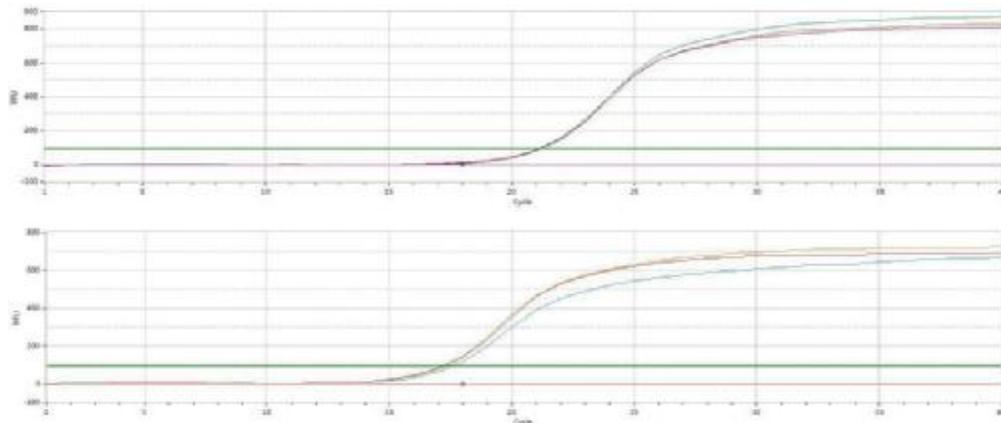


图 2 转染细胞中 IL-32 及 β -actin 的扩增曲线

与空载体转染的 HepG2 细胞比较,转染 HBV 的 HepG2 细胞中 IL-32 蛋白质表达显著增高 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 3。

表 2 HBV 对 IL-32 mRNA 的表达量影响 (dRn, $\bar{x} \pm s$)

组别	β -actin	IL-32 RNA
未转染细胞	15.304 \pm 0.218	32.462 \pm 0.633
转染细胞	15.263 \pm 0.324	30.844 \pm 0.691
t 值	1.986	3.364
P 值	0.057	0.043

表 3 HBV 对 IL-32 蛋白的表达量的影响

组别	例数	灰度值
未转染细胞	20	24.7 \pm 6.9
转染细胞	20	58.7 \pm 3.1 [†]
t 值		6.298
P 值		0.030

注:† 与未转染组比较, $P < 0.05$



图 3 Western blot 结果图

3 讨论

近年的研究^[6-7]证实,细胞因子在 HBV 感染所引起的肝损伤中发挥重要作用。许春梅等^[8]检测 HBV 患者血清中 IL-32 水平,发现 IL-32 水平与 HBV 感染者的炎症严重程度相关,并且随炎症程度的加重 IL-32 呈上升趋势。PAN 等^[9]证明 HBV 的 X 蛋白 (HBx)通过 IL-32 的启动子(从 -746 到 +25)以剂量依赖的方式增强 IL-32 的表达。IL-32 是 2005 年 KIMETAL^[10]在用基因芯片方法研究 IL-18 可诱导基因时发现的一种新型白细胞介素。越来越多的研究

表明,IL-32 在机体的免疫调节方面发挥着重要作用,它与慢性炎症性疾病、细菌感染性疾病、肿瘤和病毒感染性疾病等密切相关^[1]。疾病中所起的作用不同,IL-32 可以诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 及 MIP-2 等细胞因子的表达,与 HCV^[3]、HPV 等^[2]多种病毒感染引起的疾病的发病密切相关。IL-32 基因位于人染色体 16p13.3 上,有 8 个外显子,有 6 种以上剪接变体,目前比较明确的是 IL-32 α 、IL-32 β 、IL-32 γ 、IL-32 δ 、IL-32 ϵ 和 IL-32 ζ 6 种^[3]。

IL-32 可由多种细胞刺激产生,如 T 淋巴细胞可在丝裂原等的刺激下、在 IL-12 和 IL-18 的共同作用下或在 TNF- α 的作用下产生,NK 细胞可在 IL-12 和 IL-18 的共同作用下产生,单核细胞和 B 细胞均可在活化 T 细胞的辅助下产生,上皮细胞在 IFN- γ 的作用下亦可产生等^[4]。本研究中显示转染 HBV 的 HepG2 细胞比未转染的 HepG2 细胞中的 IL-32 mRNA 的表达量高 2.3 倍,说明 HBV 促使 IL-32 mRNA 的表达,是由于 HBV 感染引起肝损伤与增加炎症因子的表达有关。同时,本研究结果显示,转染 HBV 的 HepG2 细胞中 IL-32 蛋白比未转染 HBV 的细胞中 IL-32 蛋白表达量高,说明 HBV 促进 HepG2 细胞中的 IL-32 蛋白的表达。本研究发现,转染 HBV 表达载体的 HepG2 细胞内及培养上清液中均表达 IL-32,分泌表达的 IL-32 可通过诱导其他炎症细胞因子的表达而引起炎症疾病的发生,进一步从蛋白水平说明 HBV 感染引起肝损伤与增加炎症因子的表达有关。

综上所述,本文通过检测转染及未转染 HBV 的 HepG2 细胞中的 IL-32 mRNA 及蛋白的表达量,探究 HBV 对 IL-32 的表达,研究结果证明 HBV 对 IL-32 的 mRNA 及蛋白的表达均有促进作用。

参 考 文 献:

- [1] CROWTHER C, MOWA M B, ELY A, ARBUTHNOT P B. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo using helper-dependent adenovirus vectors to deliver antiviral RNAi expression cassettes[J]. *Antivir Ther*, 2013, 25(1): 72-86.
- [2] BILITY M T I, CHENG L I, ZHANG Z, et al. Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 20(3): 29-60.
- [3] MOSCHEN A R, FRITZ T, CLOUSTON A D, et al. Interleukin-32: a new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(6): 1819-1829.
- [4] LEE S, KIM J H, KIM H, et al. Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response To human papilloma virus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papilloma virus oncogene[J]. *Immunology*, 2011, 132(3): 410-420.
- [5] KOBAYASHI H, LIN P C. Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cell[J]. *Cytokine*, 2011, 46(3): 351-358.
- [6] ZHOU Y, WANG S, MA J W, et al. Hepatitis B virus protein X-induced expression of the CXC chemokine IP-10 is mediated through activation of NF-kappa B and increases migration of leukocytes[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12159-12168.
- [7] ZHANG K, XU Q H, CHEN L B, et al. The measurement and significance of serum chcmekine RANTES in patients with chronic hepatitis B[J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2012, 22(12): 293-295.
- [8] 许春梅,左维泽,沈兰超.白介素-32 在 HBV 感染者的变化及其临床意义[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(2): 298-301.
- [9] PAN X, CAO H, LU J, et al. Interleukin -32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF- κ B[J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(12/13):1573-1577.
- [10] KIM S H, HAN S Y, AZAM T, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF-alpha[J]. *Immunity*, 2005, 22(1): 131-142.
- [11] 田兆菊,王英,陈强,等.白细胞介素-32 与疾病的关系研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(11): 994-997.
- [12] LEE S, KIM J H, KIM H, et al. Activation of the interleukin-32 proinflammatory pathway in response to human papilloma virus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papilloma virus oncogene[J]. *Immunology*, 2011, 132: 410-420.
- [13] CHOI J D, BAE S Y, HONG J W, et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform[J]. *Immunology*, 2009, 126(4): 535-542.
- [14] NETEA M G, AZAM T, FERWERDA G, et al. IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1 beta and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism[J]. *USA Proc Natl Acad Sci*, 2010, 102(45): 16309-16314.

(张蕾 编辑)