

## Toll 样受体 4 介导抑制 Bewo 细胞中乙型肝炎病毒的复制

资捷<sup>1</sup>, 王前<sup>2\*</sup>, 郑磊<sup>2</sup>, 王芳<sup>1</sup>

**摘要:** **目的** 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)介导的天然免疫对 Bewo 细胞中乙型肝炎病毒(HBV)复制的影响。 **方法** 首先用 TLR4 配体 LPS 处理 Bewo 细胞,观察细胞 TLR4 mRNA 表达的动力学。然后将 2 $\mu$ g 1.3 倍 HBV 全基因重组质粒 pcDNA3.1(+)-HBV1.3 转染 Bewo 细胞,12h 后,以 LPS 处理 3d。最后,用抗 TLR4 处理 Bewo 细胞 1h 后,加入 10 $\mu$ g/ml LPS 刺激。采用荧光定量 RT-PCR、微粒子酶免疫分析法(MEIA)和荧光定量 PCR 法分别检测细胞 TLR4 mRNA 表达、HBsAg、HBeAg 及 HBV DNA 水平。 **结果** LPS 可显著诱导 Bewo 细胞 TLR4 mRNA 表达( $P<0.05$ ),呈时间和剂量依赖性;与对照组比较,LPS 可显著抑制 HBV 复制( $P<0.001$ ),LPS 对 HBV DNA、HBsAg 及 HBeAg 的抑制率(%)分别为 29.70 $\pm$ 6.03、32.12 $\pm$ 5.98 和 33.89 $\pm$ 1.28。抗 TLR4 可显著逆转 LPS 对 HBV 复制的抑制作用( $P<0.01$ )。 **结论** TLR4 介导的天然免疫可一定程度地抑制 Bewo 细胞中 HBV 复制,为防治 HBV 宫内感染提供了新的途径。

**关键词:** Toll 样受体 4; Bewo 细胞; 乙型肝炎病毒; 复制

**中图分类号:** R373.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2011)12-1445-03

**TLR4-mediated inhibition of hepatitis B virus replication in Bewo cells.** ZI Ji, WANG Qian, ZHENG Lei (1. Futian Women and Children Health Care Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong, P. R. China)

**Abstract Objective** To explore the effect of TLR4-mediated natural immunity on hepatitis B virus(HBV)replication in Bewo cells. **Methods** Firstly, Bewo cells were exposed to TLR4 ligand LPS and the kinetics of TLR4 mRNA expression in Bewo cells was observed. Secondly, 2 $\mu$ g 1.3-fold HBV recombinant vector pcDNA3.1 (+)-HBV1.3 were transfected into Bewo cells, 12h later the cells were treated with LPS for 3 days. finally, 10 $\mu$ g/ml LPS an hour after Bewo cells were stimulated with anti-TLR4 antibody. The TLR4 mRNA expression in Bewo cells was determined by real-time fluorescence quantitative RT-PCR (qRT-PCR). HBsAg, HBeAg and HBV DNA level was detected by Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) and fluorescence quantitative PCR, respectively. **Results** LPS could significantly induce TLR4 mRNA expression in Bewo cells ( $P<0.05$ ) in time- and dose-dependent manners. Compared with control, LPS could markedly inhibit HBV replication ( $P<0.01$ ), the inhibitory rate of LPS on HBV DNA, HBsAg and HBeAg were (29.70 $\pm$ 6.03)% (32.12 $\pm$ 5.98)% and (33.89 $\pm$ 1.28)% respectively. The suppressive effect of LPS on HBV replication was reversed by neutralizing antibodies against human TLR4 ( $P<0.01$ ). **Conclusions** TLR4-mediated natural immunity could inhibit HBV replication in Bewo cells to some degree and this will provide a new way for prevention and treatment of intrauterine HBV infection.

**Key words:** Toll-like receptor 4; Bewo cell; Hepatitis B virus; Replication

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)严重威胁人类的健康,孕妇感染 HBV 后,可能经胎盘垂直传播给胎儿,是发展为慢性乙肝患者的重要原因。胎盘是胎儿抵御病原微生物感染的天然屏障,滋养层细胞是胎盘最外层的细胞,直接与母亲血液接触,因此,滋养层细胞在防御 HBV 宫内感染中可能发挥着重要的作用。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是一种模式识别受体,可介导天然免疫反应,主要分布在人胎盘滋养层细胞<sup>[1]</sup>。近期研究发现,TLR4 介导的天然免疫都可抑制肝细胞、枯否氏细胞中 HBV 复制<sup>[2-3]</sup>。但 TLR4 对胎盘滋养层细胞中 HBV 复制的作用尚不清楚。本研究旨在初步探讨 TLR4 介导的天然免疫对 Bewo 细胞中 HBV 复制的作用,为防治 HBV 宫内感染提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 1.3 倍 HBV 全基因重组质粒 pcDNA3.1(+)-HBV1.3 由我室构建保存<sup>[4]</sup>, Bewo 细胞株和 Opti-MEM 培养基(ATCC), DMEM/F12 培养基、胎牛血清和青-链霉素溶液(Gibco), TLR4 配体脂多糖(LPS)、PCR buffer、Taq 酶和 dNTPs (Sigma), 抗 TLR4 抗体(eBioscience), 转染试剂 lipofectamine 2000 和 Trizo 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen), 逆转录 PCR 试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), 引物及 TaqMan 水解探针的合成(上海英骏生物技术公司)。

1.1.2 仪器 PCR 扩增仪(BIO RAD), PE 7000 全自动荧光定量 PCR 仪(Perkin Elmer), AXSYM 自动免疫分析仪(Abbott), 台式冷冻高速离心机(Heraeus), 紫外分光光度仪(Beckman)。

### 1.2 方法

作者单位: 1. 深圳市福田区妇幼保健院, 广东 深圳 518026; 2. 南方医科大学南方医院临床检验中心, 广东 广州 510515

作者简介: 资捷(1970-), 男, 湖南人, 博士, 主任技师, 主要从事生化与分子生物学检验。

\* 通讯作者 E-mail: mflad@163.com

1.2.1 Bewo 细胞的培养 采用 DMEM/F12 培养液, 含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素, 在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 Bewo 细胞, 每 3d 换液传代。

1.2.2 定量 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 的表达 参考文献<sup>[5]</sup>, 简述如下, 按照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书, 提取 Bewo 细胞总 RNA, 电泳鉴定 RNA 纯度, 并逆转录合成 cDNA。然后通过 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 的表达, 具体操作按逆转录 PCR 试剂盒说明书进行。RT-PCR 反应体系 5× 定量 PCR buffer (10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L KCl, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 10μl, 上游引物 (10μmol/L) 1μl, 下游引物 (10μmol/L) 1μl, 探针 (10μmol/L) 1μl, dNTPs (10mmol/L) 1μl, Taq 酶 (5U/μl) 1μl, cDNA 5μl, ddH<sub>2</sub>O 30μl, 总体积 50μl, 反应条件为 93℃ 3s, 1 个循环, 93℃ 45s, 55℃ 1min, 40 个循环。Bewo 细胞 TLR4 mRNA 的定量以 β-肌动蛋白 (β-actin) 作为内参照。TLR4 扩增片段长度为 72bp, 上游引物: 5'-TTTTCGGGCC AGCTTTCAG-3', 下游引物: 5'-TTTCACACGTGCAATCAAA GG-3', 探针 5'-FAM-AACCTGACTGAGTTAGATATGCGCTT-TAMRA-3'。β-actin 扩增片段长度为 102bp, 上游引物: 5'-GCATGGGTGACAAGGATTCT-3', 下游引物 5'-TCGT CCCAGTTGGTGACGAT-3', 探针 5'-FAM-CCTCACCTGAA GTACCCATCGAGC-TAMRA-3'。根据标准曲线, 由电脑自动分析并计算样本中 TLR4 和 β-actin 的 mRNA 含量, 以 TLR4 和内参 β-actin mRNA 含量的比值作为评价 TLR4 表达水平的指标。

1.2.3 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 的检测 按照 Abbott 试剂盒说明书, 以微粒子酶免疫分析法 (MEIA) 定量检测细胞上清 HBsAg 和 HBeAg 水平, HBsAg S/N 值 >2.0 为阳性, HBeAg S/CO 值 >1.0 为阳性。HBV DNA 的检测按照中山大山达安基因股份有限公司 HBV PCR 荧光定量检测试剂盒说明书进行检测, HBV DNA 拷贝数 ≥ 1×10<sup>3</sup> 为阳性。

1.2.4 重组质粒转染 Bewo 细胞 转染前更换细胞培养基为无血清无抗的 DMEM/F12 培养液, 并将脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 与重组质粒 pcDNA3.1(+)-HBV1.3 按 2μl: 1μg 比例共转染。本实验转染重组质粒均为 2μg。

1.2.5 实验分组 Bewo 细胞 1×10<sup>6</sup>/孔接种于 6 孔板, 24h 后细胞生长至 80% 融合, 然后按下列分组进行实验。每组实验重复 3 次。

1.2.6 LPS 对细胞 TLR4 mRNA 表达的动力学 Bewo 细胞 1×10<sup>6</sup>/孔接种于 6 孔板, 24h 后细胞生长至 80% 融合, 分别以 LPS (10μg/ml) 刺激 Bewo 细胞, 在 0h、6h、12h、24h、48h 收集细胞, 或者分别以不同浓度的 LPS (0、0.01、0.1、1.0、10.0μg/ml) 处理, 12h 后收集细胞, 每组实验重复 3 次。

1.2.7 LPS 对细胞 HBV 复制的作用 Bewo 细胞 1×10<sup>6</sup>/孔接种于 6 孔板, 24h 后细胞生长至 80% 融合, 实验分 3 组: ①空载体转染组 (pcDNA3.1); ②重组质粒转染组 (pcDNA3.1-HBV); ③LPS 刺激重组质粒转染组 (pcDNA3.1-HBV+LPS)。在细胞转染 12h 后, 加入终浓度 10μg/ml 的 LPS 予以刺激, 3d 后收集细胞上清液。HBV 抑制率 (%) = (转染组值 - 转染刺激组值) / 转染

组值 × 100%。每组实验重复 3 次。

1.2.8 抗 TLR4 对 LPS 抑制 HBV 复制的作用 Bewo 细胞 1×10<sup>6</sup>/孔接种于 6 孔板, 24h 后细胞生长至 80% 融合, 实验共分 3 组: ①重组质粒转染组 (pcDNA3.1-HBV); ②LPS 刺激重组质粒转染组 (pcDNA3.1-HBV+LPS); 处理同步骤 1.2.5 中 ③组; ③抗 TLR4 拮抗 LPS 刺激重组质粒转染组 (pcDNA3.1-HBV+抗 TLR4+LPS)。转染 12h 后, 先以抗 TLR4 预处理 1h, 然后加入 LPS (10μg/ml) 刺激, 3d 后收集细胞上清液。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 各组数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。

## 2 结果

2.1 LPS 对细胞 TLR4 mRNA 表达的动力学 结果显示, 与 0h 相比, LPS 在 6h 时便可显著诱导 Bewo 细胞表达 TLR4 mRNA, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 且 24h 和 48h 细胞 TLR4 mRNA 的表达水平与 0h 相比有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 其中 48h 时 TLR4 mRNA 表达水平最高, 呈时间依赖性 (图 1)。在剂量依赖性实验中, 与对照组相比, 当 LPS 浓度 ≥ 0.1μg/ml 时, 可显著诱导细胞表达 TLR4 mRNA ( $P < 0.05$ ), 当其浓度为 10μg/ml 时, 其 TLR4 mRNA 表达水平最高, 呈剂量依赖性 (图 2)。

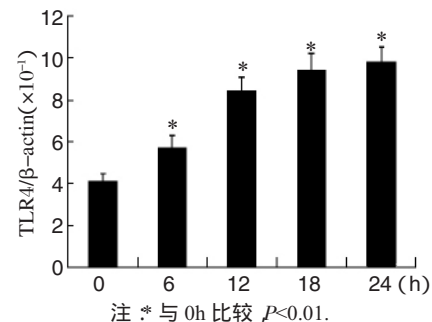


图 1 LPS 诱导 TLR4 表达的时间依赖性作用

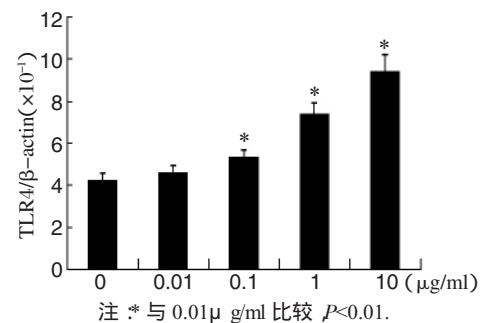


图 2 LPS 诱导 TLR4 表达的剂量依赖性作用

2.2 LPS 对细胞 HBV 复制的作用 与 pcDNA3.1 组比较, pcDNA3.1-HBV 组和 pcDNA3.1-HBV+LPS 组 HBV DNA、HBsAg 与 HBeAg 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 但与 pcDNA3.1-HBV 组比较, pcDNA3.1-HBV+LPS 组其细胞上清各指标水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )。其中, LPS 对 HBV DNA、HBsAg 及 HBeAg 表达的抑制率 (%) 分别为  $29.70 \pm 6.03$ 、 $32.12 \pm 5.98$  和  $33.89 \pm 1.28$ 。此表明 TLR4 配体 LPS 能一定程度地抑制 Bewo 细胞中 HBV 复制。见表 1。

2.3 抗 TLR4 对 LPS 抑制 HBV 复制的作用 与 pcDNA3.

1-HBV+LPS 组比较 ,pcDNA3.1-HBV+ 抗 TLR4+LPS 组细胞上清 HBV DNA、HBsAg 及 HBeAg 水平显著升高( $P<0.01$ ) ,但与 pcDNA3.1-HBV 组比较 , 该组各指标水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。说明 LPS 抑制 Bewo 细胞 HBV 复制是通过 TLR4 所介导的。见表 2。

表 1 LPS 对 Bewo 细胞 HBV 复制的作用( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	HBV DNA (log 拷贝/ml)	HBsAg (S/N)	HBeAg (S/CO)
pcDNA3.1	3	1.18±0.23	1.21±0.14	0.31±0.07
pcDNA3.1-HBV	3	6.23±0.58*	25.26±1.77*	12.07±1.02*
pcDNA3.1-HBV+LPS	3	4.36±0.38**	17.10±1.37**	7.98±0.78**

注：与 pcDNA3.1 组比较 , \*  $P<0.001$  ; 与 pcDNA3.1-HBV 组比较 , \*\* :  $P<0.01$ 。

表 2 抗 TLR4 对 LPS 抑制 HBV 复制的作用( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	HBV DNA (log 拷贝/ml)	HBsAg (S/N)	HBeAg (S/CO)
pcDNA3.1-HBV	3	6.23±0.58	25.26±1.77	12.07±1.02
pcDNA3.1-HBV+LPS	3	4.36±0.38	17.10±1.37	7.98±0.78
pcDNA3.1-HBV+ 抗 TLR4+LPS	3	5.89±0.59*	23.63±1.81*	11.36±1.06*

注：与 pcDNA3.1-HBV+LPS 组比较 , \*  $P<0.01$ 。

3 讨论

HBV 是一种肝向性 DNA 病毒 ,严重威胁人类的健康 ,孕妇感染 HBV 后 ,可能经胎盘垂直传播给胎儿 ,引起宫内感染<sup>[5]</sup> ,是我国人群 HBV 传播的重要途径。胎盘是母体与胎儿之间的桥梁 ,作为妊娠期间一种特殊的先天性免疫器官 ,在抵御外来病原菌入侵中起着重要的作用。由于胎盘屏障的第一层细胞是滋养层细胞 ,该层细胞直接与母亲血液接触 ,可识别病原微生物并对其作出相应的免疫应答 ,因此 ,滋养层细胞在防御 HBV 宫内感染中可能发挥着重要的作用 ,但是 ,其作用机制尚不清楚。

Toll 样受体(Toll-like receptors ,TLRs)是天然免疫系统中新发现的模式识别受体(PRR)。至今 ,已发现 10 种人属 TLRs<sup>[6]</sup> ,其中 TLR4 广泛表达于各种组织和细胞 ,在我们最近的研究中 ,通过免疫组化发现 TLR4 主要表达于胎盘合体滋养层细胞和绒毛细胞滋养层细胞膜<sup>[7]</sup>。此提示 ,在妊娠期间胎盘 TLR4 表达可能具有重要的作用。Bewo 细胞是人胎盘绒毛癌细胞系 ,现已被广泛用于滋养层细胞功能的研究。既往研究报道 ,TLR4 的配体 LPS 可诱导滋养层细胞表达 TLR4 mRNA<sup>[8]</sup>。与此一致的是 ,我们在 LPS 诱导 Bewo 细胞表达 TLR4 的动力学实验中发现 ,LPS 可诱导 Bewo 细胞表达 TLR4 mRNA ,呈时间和剂量依赖性 ,其中 24h 时其 TLR4 mRNA 表达水平最高 ,48h 时依然保持高水平 ,且 LPS 浓度为 10μ g/ml 时 ,其 TLR4 mRNA 表达水平最高。此表明 ,LPS 可即时和快速触发 Bewo 细胞表达高水平的 TLR4 mRNA ,在防御各种病原微生物入侵中可能起重要作用。

据报道 ,TLR4 及其介导的天然免疫都可抑制肝细胞、枯否

氏细胞中 HBV 复制<sup>[2,3]</sup>。但滋养层细胞 TLR4 介导的天然免疫对抑制 HBV 复制的作用尚不清楚。本研究发现 ,Bewo 细胞在转染 2μ g 重组质粒 pcDNA3.1(+)-HBV1.3 后 ,以 10μ g/ml LPS 处理 ,其细胞上清 HBV DNA、HBsAg 及 HBeAg 水平较 pcDNA3.1(+)-HBV1.3 转染组显著下降 ,LPS 对 HBV DNA、HBsAg 及 HBeAg 的抑制率(%) 分别为 29.70±6.03、32.12±5.98 和 33.89±1.28。此提示 ,LPS 可一定程度抑制胞内 HBV 复制。

既然 LPS 可抑制胞内 HBV 复制 ,本研究以抗 TLR4 处理转染 HBV 重组质粒的 Bewo 细胞后 ,LPS 并不能抑制胞内 HBV 复制 ,此表明 ,LPS 抑制胞内 HBV 复制分别是通过 TLR4 所介导的。其原因可能是在 TLR4 配体 LPS 的刺激下 ,滋养层细胞可表达前炎症细胞因子(如 TNF-α)和趋化因子(如 IL-8)<sup>[9]</sup> ,产生抗病毒反应。

综上所述 ,TLR4 介导的天然免疫能一定程度地抑制 Bewo 细胞中 HBV 复制 ,此提示 ,母胎界面的滋养层细胞在抵御病毒感染中起着重要的作用。深入了解这些机理将有助于发展新的抗病毒策略 ,为预防 HBV 宫内感染提供新的理论依据。

参考文献：

[1] Schulz O ,Diebold SS ,Chen M ,et al . Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells [J] . Nature ,2005 ,433(7028) : 887-892.

[2] Guo H ,Jiang D ,Ma D ,et al . Activation of pattern recognition receptor-mediated innate immunity inhibits the replication of hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells[J] . J Virol ,2009 ,83(2) :847-858.

[3] 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) :1769-1778.

[4] 资捷 ,王前 ,郑磊 ,等 . 1.3 倍乙型肝炎病毒全基因真核表达载体的构建及其在 Bewo 细胞中的表达[J] . 热带医学杂志 ,2010 ,10(2) : 126-129.

[5] Bhat P ,Anderson DA . Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier[J] . J Virol ,2007 ,81(13) :7200-7207.

[6] Takeda K ,Akira S . Toll-like receptors in innate immunity [J] . Int Immunol ,2005 ,17(1) :1-14.

[7] 资捷 ,王前 ,郑磊 ,等 . HBeAg 对慢性乙型肝炎孕妇胎盘组织 TLR4 表达的作用研究[J] . 中国优生与遗传杂志 ,2010 ,21(4) :41-43.

[8] Ma Y ,Krikun G ,Abrahams VM ,et al . Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta : implications in fetal infection [J] . Placenta ,2007 ,28 (10) :1024-1031.

[9] Koga K ,Aldo PB ,Mor G . Toll-like receptors and pregnancy : trophoblast as modulators of the immune response [J] . J Obstet Gynaecol Res ,2009 ,35(2) :191-202.

收稿日期 2011-09-09 编辑 符式刚