

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.05.019 [http://www.crter.org]

陈晓红, 舒赛男, 刘兴楼, 王慧, 张菊, 杜小弋, 李革, 方峰. 脂氧素受体激动剂对巨细胞病毒感染巨噬细胞的免疫负调节[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(5):886-893.

## 脂氧素受体激动剂对巨细胞病毒感染巨噬细胞的免疫负调节☆

陈晓红<sup>1,2</sup>, 舒赛男<sup>1</sup>, 刘兴楼<sup>1</sup>, 王慧<sup>1</sup>, 张菊<sup>1</sup>, 杜小弋<sup>1,2</sup>, 李革<sup>1</sup>, 方峰<sup>1</sup>

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科系, 湖北省武汉市 430030

2 武汉市儿童医院, 湖北省武汉市 430016

### 文章亮点:

1 采用脂氧素受体激动剂 BML-111, 激活脂氧素, 干预巨细胞病毒感染巨噬细胞模型, 显示人巨细胞病毒感染可诱导巨噬细胞同时分泌促炎因子及抑炎因子, 给予脂氧素受体激动剂 BML-111 处理感染细胞后, 在蛋白水平, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达明显受到抑制, 并且先行下降; 白细胞介素  $1\beta$  表达亦明显受到抑制; 对白细胞介素 10 表达无明显差异; 而转化生长因子  $\beta$  在各时间点表达均明显升高。

2 实验证明 NF- $\kappa$ B 可以促进细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因转录, 在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中起重要作用, 肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$  等促炎因子是经 NF- $\kappa$ B 途径激活而表达, 由此推测, BML-111 抑制 NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基核转位是 BML-111 抑制促炎因子表达而发挥免疫负调节作用的主要机制之一。

### 关键词:

器官移植; 移植与免疫; 巨细胞病毒; 巨噬细胞; 脂氧素; 脂氧素受体激动剂; 免疫调节; 肿瘤细胞坏死因子; 其他基金

### 摘要

**背景:** 脂氧素可以抑制炎症细胞、内皮细胞、小鼠脾脏树突状细胞等合成细胞因子, 还可以抑制炎症性细胞因子对细胞的生物效应。

**目的:** 分析脂氧素受体激动剂 BML-111 对人巨细胞病毒感染 THP-1 源巨噬细胞的免疫调节作用。

**方法:** 用人巨细胞病毒 AD169 毒株感染 THP-1 源巨噬细胞(MOI=0.5), 细胞培养后设立对照组、人巨细胞病毒感染组及人巨细胞病毒+BML-111 组。在感染后 0, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72 h 收集各组细胞培养上清液, 以 ELISA 检测各组细胞因子的表达水平; RT-PCR 检测各指标 mRNA 的表达强度; Western blot 检测感染 4 h 的细胞核内 p65 亚基蛋白表达。

**结果与结论:** 与对照组相比, 其他两组各细胞因子蛋白及 mRNA 表达明显升高( $P < 0.05$ )。与人巨细胞病毒感染组相比, 人巨细胞病毒+BML-111 组白细胞介素  $1\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  显著降低, 转化生长因子  $\beta$  显著升高( $P < 0.05$ ), 白细胞介素 10 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 人巨细胞病毒+BML-111 组各细胞因子 mRNA 均明显降低( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 其他两组细胞核内 NF- $\kappa$ B p65 亚基蛋白浓度明显升高( $P < 0.05$ ); 人巨细胞病毒+BML-111 组显著低于人巨细胞病毒感染组( $P < 0.05$ )。说明 BML-111 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基核转位, 减少白细胞介素  $1\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  的表达, 促进转化生长因子  $\beta$  的表达, 从而对人巨细胞病毒感染的 THP-1 源巨噬细胞发挥其免疫负调节作用。

## Negative immunomodulatory effect of lipoxin receptor stimulating agent on macrophages infected by human cytomegalovirus

Chen Xiao-hong<sup>1,2</sup>, Shu Sai-nan<sup>1</sup>, Liu Xing-lou<sup>1</sup>, Wang Hui<sup>1</sup>, Zhang Ju<sup>1</sup>, Du Xiao-yi<sup>1,2</sup>, Li Ge<sup>1</sup>, Fang Feng<sup>1</sup>

1 Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

2 Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, Hubei Province, China

陈晓红☆, 女, 1971 年生, 湖北省黄梅县人, 汉族, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科在读博士, 副主任医师, 主要从事儿科感染方面的研究。  
chenxiaohong2007d@hotmail.com

通讯作者: 方峰, 博士, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科系, 湖北省武汉市 430030  
ffang@tjh.tjmu.edu.cn

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)05-00886-08

收稿日期: 2012-05-27

修回日期: 2012-06-20

(20120227009/D·C)

Chen Xia-hong ☆, studying for doctorate, Associate chief physician, Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China; Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, Hubei Province, China  
chenxiaohong2007d@hotmail.com

Corresponding author: Fang Feng, Doctor, Professor, Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
ffang@tjh.tjmu.edu.cn

Supported by: Special Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No.20090142110076\*

Received: 2012-05-27  
Accepted: 2012-06-20

## Abstract

**BACKGROUND:** Lipoxin can inhibit the synthesis of inflammatory cells, endothelial cells and mouse spleen dendritic cells into the cytokines, and it can also inhibit the biological effects of inflammatory cytokines on cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the negative immunomodulatory effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on THP-1 macrophages infected by human cytomegalovirus.

**METHODS:** THP-1 derived macrophages were infected with human cytomegalovirus AD169 (multiplicity of infection=0.5), and the cultured cells were randomly divided into control group, human cytomegalovirus group and human cytomegalovirus+BML-111 group. Then the cell culture supernatant was collected at 0, 1, 2, 4, 12, 24, 48 and 72 hours after infection, and the expression levels of cytokines in each group were detected with enzyme-linked immunosorbent assay; mRNA levels of the factors were tested with real-time PCR; Western blot was used to detect the expression of p65 subunit protein in the nucleus after infection for 4 hours.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, the cytokine protein and mRNA expression both in human cytomegalovirus group and human cytomegalovirus+BML-111 group were increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with human cytomegalovirus group, the levels of interleukin- $1\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in human cytomegalovirus+BML-111 group were decreased significantly, and thus the level of transforming growth factor- $\beta$  was increased greatly ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference of the level of interleukin-10 between the two groups ( $P > 0.05$ ) mRNA expression. mRNA expression of all the cytokines in human cytomegalovirus+BML-111 group was lower than that in human cytomegalovirus group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the level of p65 subunit protein in the nucleus of human cytomegalovirus group and human cytomegalovirus+BML-111 group was increased significantly ( $P < 0.05$ ). The level of p65 subunit protein in the nucleus of human cytomegalovirus+BML-111 group was lower than that of human cytomegalovirus group ( $P < 0.05$ ). BML-111 may decrease the expression of interleukin- $1\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ , and promote the expression of transforming growth factor- $\beta$  by inhibiting the nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$ B p65. Thus it plays negative immunoregulation effect on THP-1 macrophages infected by human cytomegalovirus.

**Key Words:** organ transplantation; transplantation and immunology; cytomegalovirus; macrophages; lipoxin; lipoxin receptor stimulating agent; immunomodulatory; tumor necrosis factor; other grants-supported paper

Chen XH, Shu SN, Liu XL, Wang H, Zhang J, Du XY, Li G, Fang F. Negative immunomodulatory effect of lipoxin receptor stimulating agent on macrophages infected by human cytomegalovirus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(5): 886-893.

## 0 引言

人巨细胞病毒是世界范围内引发先天性感染最常见的一种病毒, 由于病变涉及全身多个系统, 儿童巨细胞病毒感染在临床表现主要为肝功能损害、黄疸、肺炎, 少数表现为血液系统疾患、中枢神经系统疾病、心肌损害、肾脏损害及胃肠道损害<sup>[1-3]</sup>。在机体对抗人巨细胞病毒感染的免疫应答过程中, 炎性细胞因子在疾病的病理生理过程中发挥着重要的作用<sup>[4-5]</sup>。一方面, 细胞因子可以是宿主介导的控制病毒复制的重要因素; 另一方面, 细胞因子也可以是病毒破坏宿主免疫系统的重要递质。脂氧素具有抗炎、促炎症消退的双重作用, 被认为是内源性的炎症刹车信号<sup>[6]</sup>。在各种炎症性疾病中, 脂氧素通过抑制中性粒细胞向炎症部位的趋化, 减少相关炎性因子的产生, 促进巨噬细胞发挥非炎性吞噬作用, 清除局部坏死、凋亡细胞, 促进炎症的消退<sup>[7]</sup>。作者推测, 脂氧素作为参与机体防御反应的重要组成分子, 可以减轻人巨细胞病毒感染后体内的炎症反应。实验拟采用脂氧素受体激动剂BML-111, 激活脂氧素, 干预巨细胞病毒感染巨噬细胞模型, 阐述其对巨细胞病毒感染巨噬细胞的免疫调节作用。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞免疫学实验。

**时间及地点:** 于2009年9月至2010年5月在华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科病毒实验室完成。

**材料:**

**样本:** 人单核细胞白血病THP-1细胞购自中国典型培养物保存中心(武汉)。人巨细胞病毒 AD169 病毒株由中国预防医学科学院病毒研究所提供, 在本实验室传代适应。

脂氧素受体激动剂BML-111对巨细胞病毒感染巨噬细胞的免疫负调节实验的试剂及仪器:

Main reagents and instruments used in the experiment of negative immunomodulatory effect of lipoxin receptor stimulating agent on macrophages infected by human cytomegalovirus:

试剂及仪器	来源
脂氧素受体激动剂 BML-111 (终浓度为 100 nmol/L)	Enzolifescience 公司
佛波酯(PMA)	晶美生物有限公司
白细胞介素 1 $\beta$ , 10; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 转化生长因子 $\beta$ ELISA 和 NF- $\kappa$ B(p65)检测试剂盒	raybiotech 公司
PCR 引物	上海吉玛制药技术有限公司合成
Trizol	Invitrogen 公司
SYBRgreen Real-time PCR 试剂盒	TaKaRa 公司
核蛋白提取试剂盒	Active Motif 公司
浓缩型 DAB 试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG	北京中山生物技术有限公司

**实验方法:**

**病毒感染性滴度测定:** 病毒感染性滴度测定采用标准蚀斑法。感染复数(MOI)设定: MOI=病毒蚀斑形成单位(PFU)/细胞计数, 本实验采用MOI=0.5。

**细胞培养:** THP-1细胞用含体积分数10%胎牛血清的RPMI1640培养液, 在37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下培养, 按 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 转入细胞培养板, 加入终浓度为100 nmol/L的PMA诱导使其分化为巨噬细胞。培养24 h后, 细胞用无血清的1640培养液洗3次。

**实验分组:** 将培养细胞随机分成3组(每组各10孔):

①对照组: 用与病毒液等体积的1640培养液处理THP-1源巨噬细胞1 h, 更换维持液。②人巨细胞病毒感染组: 用MOI=0.5的人巨细胞病毒感染THP-1源巨噬细胞1 h, 更换维持液(含体积分数4%胎牛血清的RPMI 1640 培养液)。③人巨细胞病毒+BML-111组: MOI=0.5的人巨细胞病毒感染THP-1源巨噬细胞1 h, 更换含100 nmol/L BML-111维持液。

**病毒感染:** 接种适量人巨细胞病毒AD169病毒悬液, 使MOI=0.5。以病毒吸附(37 °C, 1 h)后更换维持液的完成时间为计时起点(0 h), 设实验检测时间点为

0, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72 h, 收集各时间点细胞样本及上清液, -70 °C保存备用。

**ELISA法检测炎症因子蛋白表达:** 以ELISA 测定上清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ , 白细胞介素1 $\beta$ , 白细胞介素10和转化生长因子 $\beta$ 浓度, 严格按照试剂盒说明书操作。450 nm测吸光度, 根据标准曲线求出样品浓度。

**Real-time RT-PCR法检测炎症因子基因表达:** 采用SYBR green real - time RT-PCR法检测肿瘤坏死因子 $\alpha$ , 白细胞介素1 $\beta$ , 白细胞介素10和转化生长因子 $\beta$ mRNA 的表达。Trizol提取细胞总RNA, 检测RNA纯度1.72-1.85; 取2  $\mu$ g RNA 合成cDNA第1链, 每份样本同时定量检测目的基因和内参GAPDH基因, 各设3复管。各引物序列和扩增片段长度如下: 白细胞介素1 $\beta$ (107 bp): 上游引物5'-TCC CTG CCC ACA GAC CTT-3', 下游引物5'-GCA CAT AAG CCT CGT TAT CCC-3'; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (71 bp): 上游引物 5'-CCG AGT CTG GGC AGG TCT A-3', 下游引物 5'-GCG TTT GGG AAG GTT GGA T-3'; 白细胞介素10(187 bp): 上游引物 5'-CAA CCT GCC TAA CAT GCT TCG-3', 下游引物5'-TTG GGG CAT CAC CTC CTC-3'; tgf- $\beta$  (207 bp): 上游引物5'-GAA ACC CAC AAC GAA ATC TAT GA-3', 下游引物 5'-GCT GAG GTA TCG CCA GGA A-3'; GAPDH(96 bp) 上游引物5'-GCA CAG TCA AGG CCG AGA A-3', 下游引物5'-CCT CAC CCC ATT TGA TGT TAG TG -3'。反应体系: SYBR p remix Ex Taq 12.5  $\mu$ L、forward p rimer (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L、reverse p rimer (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L、rox reference dye II 0.5  $\mu$ L和样本cDNA 1  $\mu$ L, 总体积25  $\mu$ L。反应条件: 95 °C预变性10 s, 1个循环; 95 °C 5 s, 58 °C 20 s, 共45个循环。

**Western blot法检测NF- $\kappa$ B的p65亚基在胞核内的表达:** 在感染4 h时, 提取胞核蛋白, 加入5 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 上样50  $\mu$ g/孔进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白电转移至硝酸纤维素膜, 转膜时间60 min, 用含1%脱脂奶粉的TTBS室温封闭1 h; 加入 1 : 100的兔抗人NF- $\kappa$ B p65多克隆一抗和1 : 400的兔抗人肌动蛋白( $\beta$ -actin)多克隆一抗与硝酸纤维素膜4 °C共孵育20 h; 加入工作浓度1 : 1 000的标记有辣根过氧化物酶的山羊抗兔的二抗, 在室温下孵育2 h; 洗膜后与化学发光试剂ECL反应5 min, 将X射线片放在硝酸纤维素膜上曝光5 min, 冲洗胶片。用扫描仪扫描X光胶片, 采用 QuantityOne4.62软件测定各条带的积分吸光度值。被检测蛋白相对分子质量: NF- $\kappa$ B p65亚基为

65 000,  $\beta$ -actin为42 000。以 $\beta$ -actin条带为内参照进行蛋白上样量的校正(校正值 $K$ =目的条带的积分吸光度/ $\beta$ -actin条带的积分吸光度), 以校正值 $K$ 对目的蛋白NF- $\kappa$ B p65亚基表达水平进行半定量分析。

**主要观察指标:** 观察在BML-111干预下巨噬细胞在巨细胞病毒感染前后, 促炎因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白细胞介素 $1\beta$ , 及抑炎因子白细胞介素 $10$ 和转化生长因子 $\beta$ 表达的变化, 以及NF- $\kappa$ B p65亚基在细胞核内表达的变化。

**统计学处理:** 采用SPSS软件13.0进行数据分析, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 先进行方差分析, 同一时间点两组资料进行 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 BML-111对人巨细胞病毒诱导THP-1源巨噬细胞分泌炎症因子的影响** 与对照组相比, 其他两组各细胞因子在病毒感染后水平明显升高( $P=0.032, 0.013, 0.023, 0.012$ )。

**肿瘤坏死因子 $\alpha$ :** 对照组与人巨细胞病毒感染组比较,  $F=3.880, t=98.386$ ; 对照组与人巨细胞病毒+BML-111组比较,  $F=9.038, t=17.979$ ; 人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111组比较,  $F=3.948, t=9.181$ 。见表1。

表1 脂氧素受体激动剂BML-111对巨细胞病毒诱导巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的影响

Table 1 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  of macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10, \text{ng/L}$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111组
0 h	21.02	572.10 <sup>a</sup>	477.12 <sup>a</sup>
1 h	23.23	532.00 <sup>a</sup>	592.02
2 h	18.19	2 777.24 <sup>a</sup>	1 427.18 <sup>a</sup>
4 h	20.05	4 322.13 <sup>a</sup>	2 057.41 <sup>a</sup>
12 h	21.11	23 602.09 <sup>a</sup>	11 272.39 <sup>ab</sup>
24 h	23.06	27 252.32 <sup>a</sup>	10 132.17 <sup>ab</sup>
48 h	21.97	31 997.03 <sup>a</sup>	7 597.24 <sup>ab</sup>
72 h	20.76	20 192.12 <sup>a</sup>	6 231.85 <sup>a</sup>

注: 人巨细胞病毒感染组肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在12 h显著升高, 48 h达高峰, 随之逐渐降低; 人巨细胞病毒+BML-111组肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在12 h显著升高即达高峰, 之后也曾下降趋势。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与人巨细胞病毒感染组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

**白细胞介素 $1\beta$ :** 人巨细胞病毒感染两组白细胞介素 $1\beta$ 表达在12 h显著升高, 趋势基本持平, 之后呈持续下降趋势( $P=0.013$ )。24 h后, 人巨细胞病毒+BML-111组显著降低( $P=0.002$ )。见表2。

表2 脂氧素受体激动剂BML-111对巨细胞病毒诱导巨噬细胞分泌白细胞介素 $1\beta$ 的影响

Table 2 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the secretion of interleukin- $1\beta$  from macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10, \text{ng/L}$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111组
0 h	2.041	5.781	26.406
1 h	3.023	26.094 <sup>b</sup>	36.875 <sup>b</sup>
2 h	2.004	44.141 <sup>b</sup>	38.438 <sup>b</sup>
4 h	2.022	54.063 <sup>b</sup>	45.625 <sup>b</sup>
12 h	2.011	108.906 <sup>ab</sup>	105.000 <sup>ab</sup>
24 h	3.004	200.938 <sup>ab</sup>	149.531 <sup>ab</sup>
48 h	2.015	400.313 <sup>ab</sup>	270.078 <sup>ab</sup>
72 h	3.026	538.359 <sup>ab</sup>	426.953 <sup>ab</sup>

注: 人巨细胞病毒感染组与对照组比较,  $F=6.316, t=11.928$ ; 人巨细胞病毒+BML-111组与对照组比较,  $F=11.795, t=14.936$ ; 人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111组比较,  $F=9.602, t=381.800$ 。同组间比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

**白细胞介素 $10$ :** 人巨细胞病毒感染两组白细胞介素 $10$ 均在0时即显著升高, 之后呈缓慢上升趋势, 两组间比较, 差异无显著性意义( $P=0.613$ )。见表3。

表3 脂氧素受体激动剂BML-111对巨细胞病毒诱导巨噬细胞分泌白细胞介素 $10$ 水平的影响

Table 3 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the secretion of interleukin- $10$  from macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10, \text{ng/L}$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111组
0 h	4.002	15.651 <sup>a</sup>	25.240 <sup>a</sup>
1 h	5.234	26.267 <sup>a</sup>	28.322 <sup>a</sup>
2 h	4.582	29.007 <sup>a</sup>	30.890 <sup>a</sup>
4 h	5.374	33.630 <sup>a</sup>	35.514 <sup>a</sup>
12 h	4.716	48.527 <sup>a</sup>	43.562 <sup>a</sup>
24 h	5.254	49.726 <sup>a</sup>	43.733 <sup>a</sup>
48 h	5.769	47.671 <sup>a</sup>	46.815 <sup>a</sup>
72 h	5.154	62.086 <sup>a</sup>	61.027 <sup>a</sup>

注: 人巨细胞病毒感染组与对照组比较,  $F=30.054, t=232.055$ ; 人巨细胞病毒+BML-111组与对照组比较,  $F=25.045, t=230.050$ 。人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111组比较, 差异无显著性意义。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

转化生长因子 $\beta$ : 人巨细胞病毒感染两组转化生长因子 $\beta$ 显著升高, 且人巨细胞病毒+BML-111组高于人巨细胞病毒感染组( $P=0.007$ )。见表4。

表4 脂氧素受体激动剂 BML-111 对巨细胞病毒诱导巨噬细胞分泌转化生长因子  $\beta$  的影响

Table 4 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the secretion of transforming growth factor  $\beta$  from macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10$ , ng/L)

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111 组
0 h	50.378	193.220 <sup>a</sup>	1 244.068 <sup>ab</sup>
1 h	56.389	176.271 <sup>a</sup>	1 023.729 <sup>ab</sup>
2 h	48.763	464.407 <sup>a</sup>	922.034 <sup>ab</sup>
4 h	58.396	365.763 <sup>a</sup>	1 057.627 <sup>ab</sup>
12 h	49.263	549.153 <sup>a</sup>	1 006.780 <sup>ab</sup>
24 h	58.358	752.542 <sup>a</sup>	1 142.373 <sup>ab</sup>
48 h	48.189	786.441 <sup>a</sup>	1 566.102 <sup>ab</sup>
72 h	52.538	871.186 <sup>a</sup>	1 074.576 <sup>ab</sup>

注: 人巨细胞病毒感染组与对照组比较:  $F=5.732$ ,  $t=187.053$ ; 人巨细胞病毒+BML-111 组与对照组比较:  $F=5.062$ ,  $t=128.045$ 。人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111 组比较:  $F=34.575$ ,  $t=116.023$ 。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与人巨细胞病毒感染组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.2 BML-111对炎症因子mRNA表达的影响 与对照组比较, 人巨细胞病毒感染组各细胞因子mRNA在病毒感染后水平明显升高( $P=0.001$ ,  $0.023$ ,  $0.012$ ,  $0.024$ )。与人巨细胞病毒感染组比较, 人巨细胞病毒+BML-111组各细胞因子mRNA均在0时即升高, 2 h达高峰, 之后缓慢下降; 且其表达均较人巨细胞病毒感染组降低 ( $P=0.002$ ,  $0.016$ ,  $0.030$ ,  $0.017$ )。

肿瘤坏死因子 $\alpha$ mRNA水平: 人巨细胞病毒感染组和人巨细胞病毒+BML-111组肿瘤坏死因子 $\alpha$ mRNA在 1 h显著升高并于2 h达高峰, 之后迅速下降。见表5。

白细胞介素 $1\beta$  mRNA水平: 人巨细胞病毒感染组和人巨细胞病毒+BML-111组白细胞介素 $1\beta$  mRNA 在0时即开始升高, 均于2 h达高峰, 且同时于4 h 后迅速下降, 于72 h降至最低。见表6。

白细胞介素 $10$  mRNA水平: 人巨细胞病毒感染组白细胞介素 $10$  mRNA在1 h迅速升高至峰值, 而后缓慢下降; 人巨细胞病毒+BML-111组白细胞介素 $10$  mRNA在0时开始升高, 之后保持相对高水平, 12 h缓慢开始下降。

见表7。

表5 脂氧素受体激动剂 BML-111 对巨细胞病毒诱导巨噬细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 水平的影响

Table 5 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the mRNA expression level of tumor necrosis factor  $\alpha$  of macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111 组
0 h	0.03	1.00 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>
1 h	0.05	2.98 <sup>a</sup>	1.59 <sup>a</sup>
2 h	0.03	5.70 <sup>a</sup>	4.96 <sup>a</sup>
4 h	0.04	0.41 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>
12 h	0.05	0.30 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>
24 h	0.03	0.40 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>
48 h	0.03	0.20 <sup>a</sup>	0.69 <sup>a</sup>
72 h	0.04	0.26 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>

注: 人巨细胞病毒感染组与对照组比较:  $F=8.223$ ,  $t=111.067$ ; 人巨细胞病毒+BML-111 组与对照组比较:  $F=9.238$ ,  $t=132.033$ 。人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111 组比较:  $F=75.732$ ,  $t=14.534$ 。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

表6 脂氧素受体激动剂 BML-111 对巨细胞病毒诱导巨噬细胞白细胞介素  $1\beta$  mRNA 水平的影响

Table 6 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the mRNA expression level of interleukin- $1\beta$  of macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111 组
0 h	0.01	1.00 <sup>a</sup>	0.24
1 h	0.02	1.62 <sup>a</sup>	0.68 <sup>a</sup>
2 h	0.01	2.44 <sup>a</sup>	1.68 <sup>a</sup>
4 h	0.03	1.79 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>
12 h	0.01	0.39 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
24 h	0.02	0.68 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>
48 h	0.02	0.27 <sup>a</sup>	0.10
72 h	0.01	0.04 <sup>a</sup>	0.02

注: 人巨细胞病毒感染组与对照组比较:  $F=4.371$ ,  $t=158.102$ ; 人巨细胞病毒+BML-111 组与对照组比较:  $F=5.370$ ,  $t=40.482$ 。人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111 组比较:  $F=23.727$ ,  $t=86.552$ 。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

转化生长因子 $\beta$  mRNA水平: 人巨细胞病毒感染组和人巨细胞病毒+BML-111组转化生长因子 $\beta$ mRNA均在0时即升高, 2 h达高峰, 之后缓慢下降。见表8。

表7 脂氧素受体激动剂 BML-111 对巨细胞病毒诱导巨噬细胞白细胞介素 10 mRNA 水平的影响

Table 7 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the mRNA expression level of interleukin-10 of macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111 组
0 h	1.20	1.00	2.20 <sup>a</sup>
1 h	1.10	5.83 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>
2 h	1.18	3.43 <sup>a</sup>	2.60 <sup>a</sup>
4 h	1.19	3.93 <sup>a</sup>	2.20 <sup>a</sup>
12 h	1.16	2.87 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>
24 h	1.18	1.93 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>
48 h	1.17	1.40 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>
72 h	1.19	2.04 <sup>a</sup>	0.90

注: 对照组与人巨细胞病毒感染组比较:  $F=5.732$ ,  $t=33.633$ ; 与人巨细胞病毒+BML-111 组比较:  $F=9.038$ ,  $t=32.949$ 。人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111 组比较:  $F=3.903$ ,  $t=137.288$ 。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

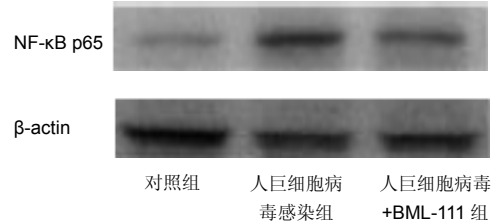
表8 脂氧素受体激动剂 BML-111 对巨细胞病毒诱导巨噬细胞转化生长因子  $\beta$  mRNA 水平的影响

Table 8 Effect of lipoxin receptor stimulating agent BML-111 on the mRNA expression level of transforming growth factor  $\beta$  macrophages infected by human cytomegalovirus ( $n=10$ )

时间	对照组	人巨细胞病毒感染组	人巨细胞病毒+BML-111 组
0 h	0.25	1.00 <sup>a</sup>	0.68 <sup>a</sup>
1 h	0.26	1.40 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>
2 h	0.25	1.45 <sup>a</sup>	1.23 <sup>a</sup>
4 h	0.27	0.91 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>
12 h	0.25	0.62 <sup>a</sup>	0.63 <sup>a</sup>
24 h	0.26	0.72 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
48 h	0.25	0.34 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
72 h	0.24	0.27 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>

注: 人巨细胞病毒感染组与对照组比较:  $F=5.046$ ,  $t=32.476$ ; 人巨细胞病毒+BML-111 组与对照组比较:  $F=5.038$ ,  $t=30.356$ 。人巨细胞病毒感染组与人巨细胞病毒+BML-111 组比较:  $F=1.537$ ,  $t=127.25$ 。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

**2.3 BML-111对转录因子NF- $\kappa$ B的p65亚基核转位的影响** Western blot结果显示人巨细胞病毒感染巨噬细胞4 h后, NF- $\kappa$ B的p65在核内表达明显升高( $P < 0.05$ ), 而予BML-111处理感染细胞4 h后, NF- $\kappa$ B的p65在核内表达明显降低( $P < 0.05$ ), 见图1。



注: 人巨细胞病毒感染巨噬细胞4 h后, NF- $\kappa$ B的p65在核内表达明显升高( $P < 0.05$ ), 而予BML-111处理感染细胞4 h后, NF- $\kappa$ B的p65在核内表达明显降低( $P < 0.05$ )

图1 BML-111对人巨细胞病毒感染巨噬细胞转录因子NF- $\kappa$ B p65亚基在核内表达的影响

Figure 1 Effect of BML-111 on the expression of nuclear factor- $\kappa$ B p65 in the nucleus of macrophages infected with human cytomegalovirus

### 3 讨论

巨噬细胞能介导炎症反应, 通过分泌各种细胞因子, 生长因子等参与组织修复和机体的免疫反应, 并以吞噬和抗原递呈等方式联系天然免疫和获得性免疫应答<sup>[8-9]</sup>。脂氧素可以促进巨噬细胞对凋亡中性粒细胞的吞噬, 从而发挥积极的抗炎促消退作用<sup>[10]</sup>。脂氧素对于炎性细胞因子的作用, 一方面可以抑制炎症细胞、内皮细胞、小鼠脾脏树突状细胞等合成细胞因子; 另一方面, 脂氧素还可以抑制炎性细胞因子的对细胞的生物效应<sup>[11-12]</sup>。

炎性细胞因子是一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质或小分子多肽, 主要有促炎因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ 和白细胞介素 $10$ 、转化生长因子 $\beta$ 等<sup>[13]</sup>。肿瘤坏死因子 $\alpha$ 是机体应激反应产生最早的炎症递质, 可诱导白细胞介素、干扰素、巨噬细胞集落刺激因子等多肽递质<sup>[14]</sup>, 在细胞的生长死亡、肿瘤的形成、免疫反应和应激反应方面都具有重要的作用<sup>[15]</sup>。白细胞介素 $1\beta$ 可诱导产生白细胞介素 $2$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等细胞因子及其它炎症递质, 同时还能与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 产生协同作用引起血管扩张和白细胞介导的组织坏死, 从而导致器官衰竭<sup>[16]</sup>。白细胞介素 $10$ 是由激活的巨噬细胞和T淋巴细胞产生, 可抑制细胞介导的抗原免疫反应, 白细胞介素 $10$ 还可以通过降低单核巨噬细胞的共刺激分子而减少抗原的提呈, 具有强有力的抗炎和免疫抑制作用<sup>[17]</sup>。Radnai等<sup>[18]</sup>研究发现减少血清中早期炎症因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白细胞

介素1 $\beta$ , 增加白细胞介素10, 对机体起保护作用。转化生长因子 $\beta$ 是一类重要的生长调节细胞因子, 对大多数细胞的增殖具有抑制作用, 在调节细胞表型、抑制肿瘤等方面发挥着重要作用<sup>[19-20]</sup>。

实验结果显示, 人巨细胞病毒感染可诱导巨噬细胞同时分泌促炎因子及抑炎因子。同时还显示, 给予脂氧素受体激动剂BML-111处理感染细胞后, 在蛋白水平, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 表达明显受到抑制, 并且先行下降; 白细胞介素1 $\beta$ 表达亦明显受到抑制; 对白细胞介素10表达无明显差异; 而转化生长因子 $\beta$ 在各时间点表达均明显升高。在mRNA水平, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素10、转化生长因子 $\beta$ 表达均受抑制, 这与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1 $\beta$ 蛋白表达改变一致, 但与白细胞介素10、转化生长因子 $\beta$ 蛋白表达存在矛盾, 由于基因表达的转录和翻译发生的时间和位点存在时空间隔; 转录后还有转录后加工, 转录产物的降解, 翻译, 翻译后加工及修饰好几个层面。所以从转录水平和翻译水平可能并不完全一致; 再次因为检测的时间点不同, 可能在蛋白达到峰值的时候mRNA已经降解了或者在mRNA达到峰值的时候蛋白量还在增加中, 导致了表达的不一。提示BML-111可抑制促炎因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1 $\beta$ 基因及蛋白表达, 促进抑炎因子转化生长因子 $\beta$ 蛋白表达, 对抑炎因子白细胞介素10蛋白表达无影响<sup>[21-22]</sup>。因此作者推测, BML-111对人巨细胞病毒感染诱导的巨噬细胞活化产生负调节作用。

另外, 对人巨细胞病毒诱导的NF- $\kappa$ B的主要亚基之一p65核转位的检测显示, 人巨细胞病毒感染巨噬细胞4 h后, p65在核内表达明显升高, 而予BML-111处理感染细胞4 h后, NF- $\kappa$ B的p65在核内表达明显降低。数据表明, 人巨细胞病毒感染能诱导转录因子NF- $\kappa$ B的p65亚基核转位, 而BML-111能抑制人巨细胞病毒感染诱导的转录因子NF- $\kappa$ B p65亚基核转位。BML-111可以抑制促炎因子TNF $\alpha$ 和白细胞介素1 $\beta$ 表达; 同时BML-111又可抑制NF- $\kappa$ B p65亚基核转位, 从而抑制NF- $\kappa$ B激活。NF- $\kappa$ B可以促进细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因转录, 在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中起重要作用<sup>[23]</sup>, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1 $\beta$ 等促炎因子是经NF- $\kappa$ B途径激活而表达<sup>[24]</sup>, 由此推测, BML-111抑制NF- $\kappa$ B的p65亚基核转位是BML-111抑制促炎因子表达而发挥免疫负调节作用的主要机制

之一。

综上, 巨细胞病毒感染所诱导的免疫致病机制十分复杂, BML-111可能通过抑制NF- $\kappa$ B的p65亚基核转位, 减少白细胞介素1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的表达, 促进转化生长因子 $\beta$ 的表达, 从而对人巨细胞病毒感染的THP-1源巨噬细胞起免疫负调节作用<sup>[25-26]</sup>。此结论为寻找治疗巨细胞病毒感染性疾病提供了新的思路, 并为临床应用奠定了一定的理论基础。

**基金资助:** 高等学校博士学科点专项科研基金(20090142110076)。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计, 第二至第七作者进行实施, 第八作者进行实验评估, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 第八作者审校, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 不涉及任何伦理道德规范。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Fang F, Shiyong Erke Linchuang Zazhi. 2010;25(10):701-703. 方峰. 儿童巨细胞病毒性疾病的诊断与防治[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(10):701-703.
- [2] Chen XF, Zhang WZ. Zhengjiang Yixue. 2011;33(12):1819-1820. 陈筱凡, 张伟珍. 巨细胞病毒感染检测在骨髓和外周血干细胞移植中的意义[J]. 浙江医学, 2011, 33(12):1819-1820.
- [3] Xiao YM, Hu ZH. Zhongguo dangdai Erke Zazhi. 2010;12(1):21-23. 肖咏梅, 胡志红. 不同年龄阶段儿童巨细胞病毒感染的临床表现差异[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(1):21-23.
- [4] Fiorentini S, Luganini A, Dell'Oste V, et al. Human cytomegalovirus productively infects lymphatic endothelial cells and induces a secretome that promotes angiogenesis and lymphangiogenesis through interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Gen Virol. 2011;92(Pt 3):650-660.
- [5] Streblov DN, Dumortier J, Moses AV, et al. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 325:397-415.
- [6] Penner MJ. Empirical tests demonstrating two coexisting sources of tinnitus: a case study. J Speech Hear Res. 1989; 32(2):458-454.

- [7] Yacoubian S, Serhan CN. New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implications for rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007;3(10):570-579.
- [8] Schäfer H, Struck B, Feldmann EM, et al. TGF- $\beta$ 1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells. *Oncogene*. 2012 Feb 20.
- [9] Kim MR, Park DW, Lee JH, et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2005; 11(11):801-808.
- [10] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, et al. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des*. 2008;14(33):3574-3589.
- [11] Baker N, O'Meara SJ, Scannell M, et al. Lipoxin A4: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells. *J Immunol*. 2009;182(6):3819-3826.
- [12] Su JB, Wang XQ, Ma XH, et al. *Jiangsu Yiyao*. 2012;38(6): 631-634.  
苏建彬,王雪琴,马向华,等. 脂联素干预TNF- $\alpha$ 作用后的巨噬细胞脂联素受体mRNA表达水平及其吞噬脂质变化[J]. *江苏医药*, 2012,38(6):631-634.
- [13] Ng YH, Zhu H, Pallen CJ, et al. Differential effects of interleukin-1beta and transforming growth factor-beta1 on the expression of the inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro. *Hum Reprod*. 2006;21(8):1990-1999.
- [14] Vural P, Değirmencioğlu S, Saral NY, et al. Tumor necrosis factor alpha (-308), interleukin-6 (-174) and interleukin-10 (-1082) gene polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;150(1): 61-65.
- [15] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(5):361-371.
- [16] Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*. 2004;117(5):561-574.
- [17] Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. 2008;28(4):468-476.
- [18] Radnai B, Tucsek Z, Bogнар Z, et al. Ferulaldehyde, a water-soluble degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice. *J Nutr*. 2009;139(2):291-297.
- [19] Caron PL, Fréchette-Frigon G, Shooner C, et al. Transforming growth factor beta isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:80.
- [20] Arici A, MacDonald PC, Casey ML. Modulation of the levels of transforming growth factor beta messenger ribonucleic acids in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod*. 1996;54(2): 463-469.
- [21] Chen BC, Bai YH, Pan XD, et al. *Zhonghua Yiyuan Ganran Zazhi*. 2012;22(4):753-755.  
陈必成,白永恒,潘晓东,等. 移植患者免疫抑制剂治疗后感染多瘤病毒及巨细胞病毒的现状[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012,22(4): 753-755.
- [22] Xiang HL, Xue WJ, Tian PX, et al. *Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi*. 2011;32(10):592-595.  
项和立,薛武军,田普训,等. 肾移植术后并发巨细胞病毒肺炎患者的细胞免疫状态[J]. *中华器官移植杂志*, 2011,32(10): 592-595.
- [23] Jing K, Sun M. *Zhongguo Dangdai Erke Zazhi*. 2010;13(8): 661-664.  
荆科,孙梅. 谷氨酰胺对肠组织NF- $\kappa$ B及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的调节与肠损伤保护作用的关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010,13(8): 661-664.
- [24] Liu YS, Chen JQ, Zhu BX. *Xuzhou Yixueyuan Xuebao*. 2009; 29(8):553-556.  
刘元山,陈剑群,朱炳喜. 细胞因子表达与NF- $\kappa$ B活化在溃疡性结肠炎发病中的意义[J]. *徐州医学院学报*, 2009,29(8):553-556.
- [25] Zhang Y, Wang LN. *Guoji Jianyan Yixue Zazhi*. 2012;33(4): 436-438.  
张园,王露楠. 巨细胞病毒与自身免疫病关联的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2012,33(4):436-438.
- [26] Ren WY, Zhu L, Hua F, et al. *Zhonghua Jiehe he Huxi Zazhi*. 2010,33(5):367-371.  
任卫英,朱蕾,华峰,等. 脂多糖对大鼠肺泡巨噬细胞Toll样受体4和髓样分化蛋白-2基因表达及炎性因子分泌的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010,33(5):367-371.