

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.06.013

论著·临床研究

RSV 感染患儿呼吸道上皮细胞中干扰素- λ 1 的表达水平及其与 RSV 载量的关系

陶美婷 谢亚平 刘淑萍 陈浩峰 黄寒 陈敏 钟礼立

(湖南省人民医院儿童医学中心, 湖南长沙 410005)

[摘要] **目的** 了解呼吸道合胞病毒(RSV)感染患儿呼吸道上皮细胞中干扰素(IFN)- λ 1的表达水平及其与RSV载量的关系。**方法** 收集2015年6月至2016年6月期间因呼吸道感染住院患儿的鼻咽拭子标本,采用直接免疫荧光法行7种常见呼吸道病毒(含RSV)抗原检测,筛选出单纯RSV阳性患儿作为RSV感染组($n=120$);另收集同期门诊体检健康儿童鼻咽拭子标本,行7种常见呼吸道病毒检查均为阴性的儿童作为健康对照组($n=50$)。对两组儿童鼻咽拭子标本行荧光定量PCR检测RSV载量和IFN- λ 1 mRNA水平。**结果** RSV感染组鼻咽拭子中IFN- λ 1 mRNA水平显著高于健康对照组($P<0.05$),且IFN- λ 1 mRNA水平与RSV载量呈正相关($r=0.56, P<0.05$)。**结论** RSV可诱导呼吸道上皮细胞中IFN- λ 1的表达,推测IFN- λ 1在机体抗RSV感染中可能起重要作用。
[中国当代儿科杂志, 2017, 19(6): 677-681]

[关键词] 干扰素- λ 1; 呼吸道合胞病毒; 荧光定量PCR; 儿童

Expression of interferon- λ 1 in respiratory epithelial cells of children with RSV infection and its relationship with RSV load

TAO Mei-Ting, XIE Ya-Ping, LIU Shu-Ping, CHEN Hao-Feng, HUANG Han, CHEN Min, ZHONG Li-Li. Children's Medical Center, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China (Zhong L-L, Email: 570047414@qq.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of IFN- λ 1 in respiratory epithelial cells of children with respiratory syncytial virus (RSV) infection and its relationship with RSV load. **Methods** The nasopharyngeal swabs were collected from the children who were hospitalized with respiratory tract infection from June 2015 to June 2016. A direct immunofluorescence assay was used to detect the antigens of seven common respiratory viruses (including RSV) in the nasopharyngeal swabs. A total of 120 children who were only RSV positive were selected as the RSV infection group. A total of 50 children who had negative results in the detection of all viral antigens were selected as the healthy control group. Fluorescence quantitative real-time PCR was used to determine the RSV load and the expression of IFN- λ 1 mRNA in the nasopharyngeal swabs of children in the two groups. **Results** The expression of IFN- λ 1 in the RSV infection group was significantly higher than that in the healthy control group ($P<0.05$). The expression of IFN- λ 1 was positively correlated with RSV load ($r=0.56, P<0.05$). **Conclusions** RSV can induce the expression of IFN- λ 1 in respiratory epithelial cells, suggesting that IFN- λ 1 may play an important role in anti-RSV infection.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(6): 677-681]

Key words: Interferon- λ 1; Respiratory syncytial virus; Fluorescence quantitative real-time PCR; Child

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿急性呼吸道感染最常见的病原,常引起2岁内儿童发生毛细支气管炎及肺炎,目前

缺乏特异性治疗。虽然大部分患儿预后良好,但少数RSV感染患儿可出现反复喘息,严重时可扩展为重症肺炎甚至导致死亡。根据世界卫生组织

[收稿日期] 2017-02-17; [接受日期] 2017-04-19

[基金项目] 湖南省自然科学基金(2017JJ2150);《中华儿科杂志》百利儿科科研基金(B2016-B-1)。

[作者简介] 陶美婷,女,硕士研究生。

[通信作者] 钟礼立,女,主任医师。

估计,全世界每年感染RSV的人数约有6400万,其中约16万人死亡^[1]。RSV感染后不同的预后与RSV载量及机体病毒感染后的防御能力有关^[2]。

干扰素(interferon, IFN)是机体产生的抗病毒及免疫调节的重要物质^[3]。根据IFN氨基酸序列及特异性受体的不同,IFN分为I型、II型和III型。近年来I型IFN在呼吸系统抗病毒治疗中初见成效,但是具有全身性副作用。III型IFN也叫λ干扰素(lambda interferon, IFN-λ),包括IFN-λ1、IFN-λ2、IFN-λ3和IFN-λ4。其中IFN-λ1~3和I型IFN类似,具有抗病毒、免疫调节及抗肿瘤活性,但是由于IFN-λ的受体具有组织特异性,局限表达于上皮组织细胞,使其抗病毒作用更具有靶向性^[4],且全身副作用少于I型、II型干扰素^[5],理论上极有可能成为治疗呼吸道病毒感染的新秀。但是国内外研究呼吸道病毒与IFN-λ之间关系的资料不多^[6-8]。IFN-λ1作为IFN-λ中重要的一员,已有研究表明其在呼吸道病毒感染患者中的表达水平显著提高^[4]。本研究观察RSV感染后患儿呼吸道上皮细胞中IFN-λ1表达水平的变化,以及IFN-λ1的表达水平与RSV载量的关系,为IFN-λ与病毒之间关系的后续相关研究提供有益参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2015年6月至2016年6月于湖南省人民医院儿童医学中心因呼吸道感染住院的患儿,采集患儿起病5d内双侧鼻咽拭子各1份,其中1份鼻咽拭子进行直接免疫荧光抗原检测呼吸道常见7种病毒(包括RSV);选取其中有且仅有RSV检测阳性的患儿为RSV感染组,排除:(1)病程超过5d;(2)痰培养、血培养结果阳性;(3)合并其他慢性疾病,如先天性心脏病、哮喘、免疫功能缺陷、遗传代谢性疾病等的患儿;共120例,其中男67例,女53例,年龄范围为0~5岁。采集同期来我院行健康体检儿童(1周内无就医情况,无发热、咳嗽等呼吸道症状)入院当天双侧鼻咽拭子各1份,同样取其中1份检测呼吸道常见7种病毒,以鼻咽拭子直接免疫荧光病毒抗原检测阴性的健康儿童为健康对照组,共50例,其中男27例,女23例,年龄范围为0~8岁。

1.2 标本采集

所有入组研究对象取双侧鼻咽拭子各1份。由经过培训的护士将咽拭子由鼻伸入鼻咽部,伸入长度与从耳垂部到鼻尖的长度一致,拭子伸入后轻轻捻动转圈取样后洗脱至生理盐水中,1份行直接免疫荧光病毒抗原检测,另1份存至-80℃冰箱。

1.3 7项呼吸道病毒检测

7项呼吸道病毒检测试剂盒购自上海贝西生物科技有限公司,呼吸道病毒抗原7项检测由湖南省人民医院检验科完成。

1.4 实时荧光定量PCR法检测IFN-λ1 mRNA和RSV mRNA表达

将咽拭子样本室温解冻并混匀,取200 μL样本,用RNAsimple总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取总RNA,所有操作完全按试剂盒说明书进行。针对RSV病毒基因组设计特异性引物RSV-F和RSV-R, Taqman荧光探针RSV-P;针对IFN-λ1基因组设计特异性引物IFN-λ1-F和IFN-λ1-R, Taqman荧光探针IFN-λ1-P;根据管家基因GAPDH基因组设计特异性引物GAPDH-F和GAPDH-R, Taqman荧光探针GAPDH-P(表1)。所有引物序列由上海百力格设计公司设计并合成。

表1 GAPDH、IFN-λ1、RSV mRNA的引物和探针核苷酸序列

引物探针名称	引物探针序列(5'→3')	5'荧光基团	3'淬灭基团
GAPDH			
F	CCACTCCTCCACCTTTGA	HEX	MGB
R	TGTCATACCAGGAAATGAGC		
P	CTGGCATTGCCCTCAACGACC		
IFN-λ1			
F	GGACGCCTTGAAGAGTCACT	FAM	TAMRA
R	AGAAGCCTCAGTCCCAATTC		
P	GTTGCAGCTCTCCTGTCTTCCCG		
RSV			
F	TTCACGARGGCTCCACATA	FAM	BHQ1
R	TCAATTGGTTGATTGATTGGTT		
P	TTCACGTATGTTCCATATTTGCCCA		

注:[HEX]六氯-6-甲基荧光素;[FAM]6-羧基荧光素;[TAMRA]羧基-4-甲基罗丹明;[MGB]即Minor Groove Binder,小沟结合物,可与DNA的小沟结合的化学基团;[BHQ1]即Black Hole Quencher,为常用的黑洞淬灭基团。

将样本提取的总 RNA 进行 PCR 反应。反应体系（湖南圣湘生物有限公司）：将 RSV-F/R/P（50 pmol/μL）各 0.2 μL、GAPDH-F/R/P（50 pmol/μL）各 0.2 μL、IFN-λ1-F/R/P（40 pmol/μL）各 0.25 μL 分别加入含 Buffer 40 μL、H-Taq 酶（5 U/μL）1 μL、Tth 酶（5 U/μL）1 μL、Mn²⁺（50 mmol/L）1.5 μL、dNTPs（T）（40 pmol/μL）1.5 μL、总 RNA 5 μL 的混合液中。反应条件均为：95 °C 1 min，60 °C 30 min，95 °C 1 min，1 个循环；95 °C 15 s，60 °C 30 s，45 个循环；60 °C 30 s。

结果处理：（1）将 CT 值 ≤ 35 的样本视为阳性，CT 值在 35~40 的样本重复检测，两次检测 CT 值均 <40 则视为阳性结果，若第 2 次检测 CT 值 >40，则视为阴性结果。（2）IFN-λ1 mRNA 的相对含量 = IFN-λ1 mRNA 绝对定量 / GAPDH mRNA 绝对定量，然后将数据扩大 10000 倍经 log 转换后进

行对比分析。RSV 载量为 RSV mRNA 绝对定量，将数据经 log 转换后进行对比分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件包对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间比较采用 *t* 检验；多组间比较采用方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。连续变量相关性分析采用 Pearson 相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扩增曲线

各待测 mRNA 扩增良好，阴性对照中未见扩增曲线，提示反应体系合适且无污染。见图 1。

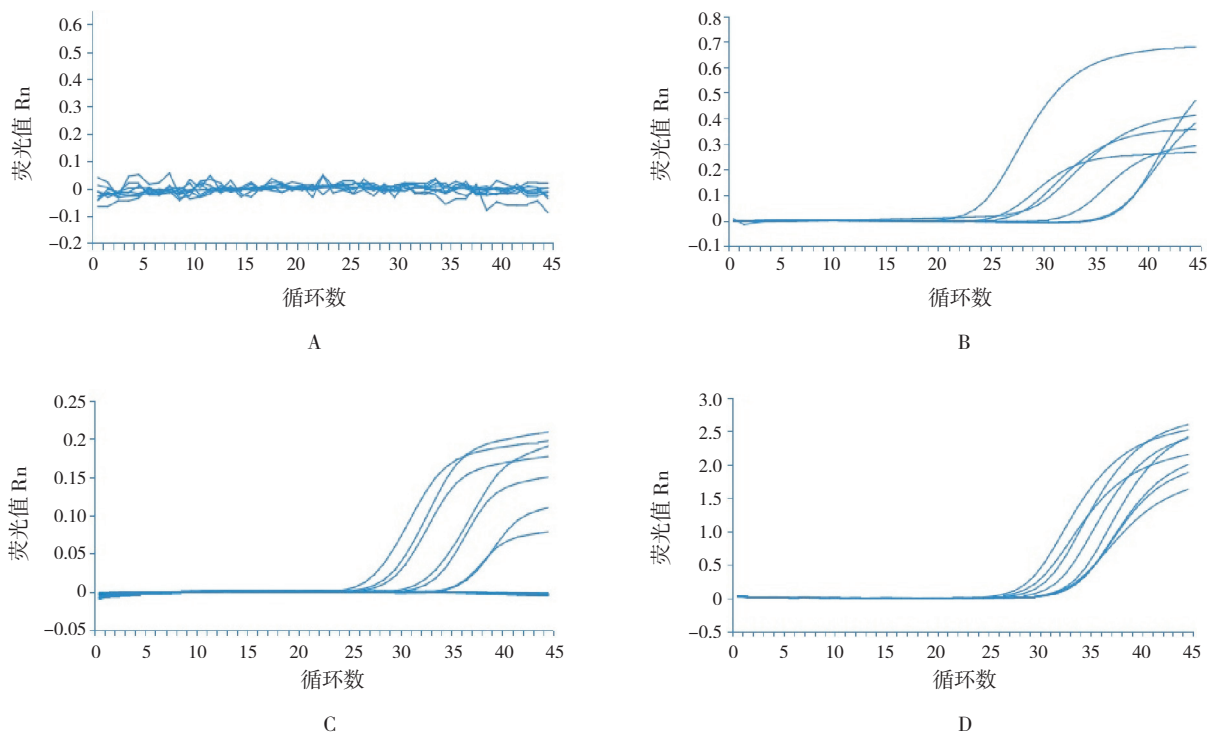


图 1 扩增曲线 A: 阴性对照; B: RSV mRNA 扩增曲线, C: IFN-λ1 mRNA 扩增曲线, D: GAPDH mRNA 扩增曲线。其中 B 和 C 均为 FAM 荧光通道, D 为 ROX 荧光通道。阴性对照中所有通道均无 S 曲线, 提示反应体系无污染。

2.2 不同年龄及性别 RSV 感染患儿 IFN-λ1 mRNA 的表达情况

将 RSV 感染组根据年龄分布分为 <6 个月组 (*n*=48), 6 个月~组 (*n*=42), 1~5 岁组 (*n*=30), 各年龄组患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量分别为

3.7 ± 0.5、3.7 ± 0.6、3.7 ± 0.3, 3 组比较差异无统计学意义 (*F*=0.79, *P*=0.51); 根据性别分为男孩组 (*n*=67) 和女孩组 (*n*=53), 不同性别患儿 IFN-λ1 mRNA 相对表达量分别为 3.8 ± 0.7、3.6 ± 0.8, 两组比较差异无统计学意义 (*t*=0.91, *P*=0.36)。

2.3 RSV 感染组和健康对照组 IFN-λ1 mRNA 的表达情况

对 RSV 感染组及健康对照组的 IFN-λ1 mRNA 表达量进行比较, 健康对照组 IFN-λ1 mRNA 相对表达量 (2.8 ± 0.7) 低于 RSV 感染组 (3.7 ± 0.8) ($t=6.64, P<0.05$)。

2.4 RSV 载量与 IFN-λ1 mRNA 的相关性分析

为了解不同的 RSV 载量对 IFN-λ1 mRNA 的表达量是否有影响, 采用 Pearson 相关分析对 RSV 感染组患儿 IFN-λ1 mRNA 的表达量和 RSV 载量作相关性分析, 结果两者呈正相关 ($r=0.56, P<0.05$), 见图 2。

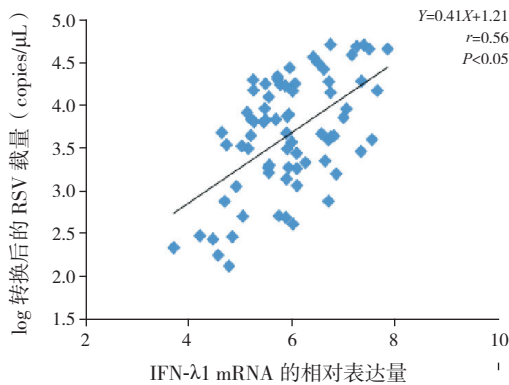


图 2 IFN-λ1 mRNA 表达量与 RSV 载量的相关性分析

3 讨论

呼吸道感染是危害儿童健康的重要疾病, 儿童呼吸道感染最常见的病原是 RSV^[9]。目前临床上可用于儿童的抗病毒药物少见, 除流感病毒外, 其他呼吸道常见病毒感染均缺乏特异治疗。IFN-λ 作为新发现的干扰素, 可诱导机体抗病毒免疫, 各种病毒和 Toll 样受体的刺激都能诱导 IFN-λ 表达^[10], 而且其受体具有组织特异性, 有望成为全身副作用小的靶向抗病毒药物^[11]。目前已有体外研究表明 IFN-λ 与呼吸道感染之间关系密切^[7,12]。也有学者研究发现, IFN-λ 在体内和体外的抗病毒活性有差别^[13]。但目前 IFN-λ 在呼吸道上皮细胞中的表达水平与呼吸道感染的具体关系尚不明确, 仅少有的研究也多为离体实验, 结论也不完全一致。因此, IFN-λ 与病毒感染的确切关系有待深入研究。

在 III 型 IFN 所有成员中, IFN-λ3 的抗病毒活

性最高, 其次是 IFN-λ1^[14], 但只有 IFN-λ1 可以在原核表达系统里高效表达, 为更好地服务于后续实验, 故此次研究的是 IFN-λ1 与 RSV 的关系。

本次实验利用临床鼻咽拭子研究了 IFN-λ1 在呼吸道上皮细胞中的表达及其与 RSV 的关系, 实验标本均来自于临床病人, 相比于体外实验, 本研究得出的结果更能反映体内的情况。而且本研究选取直接免疫荧光病毒抗原检测有且仅有 RSV 感染, 细菌培养 (-) 的患儿作为 RSV 感染组, 尽可能去除混合感染的干扰, 同时选取直接免疫荧光病毒抗原检测阴性的健康儿童作为对照组, 排除隐性感染的干扰, 使结论更趋可靠。

本次研究结果显示, RSV 感染患儿的 IFN-λ1 mRNA 表达量高于健康儿童, 与年龄及性别无关, 这与 Selvaggi 等^[4]的研究结果一致, 佐证了 RSV 可诱导 IFN-λ1 表达水平上调的结论。

Contoli 等^[15]曾证明 IFN-λ 表达水平与病毒载量的关系为负相关。而本次研究发现, RSV 感染组 IFN-λ1 mRNA 表达量与 RSV 载量呈正相关, 提示体内 RSV 载量越高, IFN-λ1 的表达水平越高。与本此次研究不同的是, Contoli 等^[15]的实验对象为哮喘患者, 而本研究对象均无基础疾病, 这提示 IFN-λ1 的表达水平可能与机体的基础状态有关。此外, Contoli 等^[15]研究的是鼻病毒与 IFN-λ1 的关系, 而本研究是探讨 RSV 与 IFN-λ1 的关系, 这提示可能不同的呼吸道病毒感染对 IFN-λ1 的诱导作用不相同。

综上所述, IFN-λ1 在 RSV 感染进程中高表达, 且 IFN-λ1 的表达水平与病毒载量呈正相关。作为一个重要的抗病毒和免疫调节因子, 考虑 IFN-λ1 在病毒高复制期机体抗病毒过程中应发挥了重要作用; 深入研究 IFN-λ 在呼吸道感染中的生物学功能, 对阐明呼吸道感染后机体的免疫应答有一定作用, 对抗病毒新药物的研究也具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Maggon K, Barik S. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus[J]. Rev Med Virol, 2004, 14(3):149-168.
- [2] Hasegawa K, Jartti T, Mansbach JM, et al. Respiratory syncytial virus genomic load and disease severity among children hospitalized with bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland[J]. J Infect Dis, 2015, 211(10): 1550-

- 1559.
- [3] Zickert A, Oke V, Parodis I, et al. Interferon (IFN)- λ is a potential mediator in lupus nephritis[J]. *Lupus Sci Med*, 2016, 3(1): e000170.
- [4] Selvaggi C, Pierangeli A, Fabiani M, et al. Interferon lambda 1-3 expression in infants hospitalized for RSV or HRV associated bronchiolitis[J]. *J Infect*, 2014, 68(5): 467-477.
- [5] Eslam M, George J. Targeting IFN- λ : therapeutic implications[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(12): 1425-1432.
- [6] Bullens DM, Decraene A, Dilissen E, et al. Type III IFN- λ mRNA expression in sputum of adult and school-aged asthmatics[J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(9): 1459-1467.
- [7] Lin M, Yu HP. Dexamethasone decreases IL-29 expression in house dust mite-stimulated human bronchial epithelial cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(6): 823-827.
- [8] 王怡, 刘沙, 魏溪, 等. IL-29 和 TGF- β 1 在肺癌中的表达及临床意义 [J]. *江苏大学学报 (医学版)*, 2016, 26(5): 458-460.
- [9] 刘军, 刘春艳, 谢正德, 等. 儿童急性下呼吸道合胞病毒单一感染与混合感染对照研究 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2015, 30(11): 848-851.
- [10] Iversen MB, Paludan SR. Mechanisms of type III interferon expression[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30(8): 573-578.
- [11] Pagliaccetti NE, Robek MD. Interferon- λ in the immune response to hepatitis B virus and hepatitis C virus[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30(8): 585-590.
- [12] Ilyushina NA, Donnelly RP. In vitro anti-influenza A activity of interferon (IFN)- λ 1 combined with IFN- β or oseltamivir carboxylate[J]. *Antiviral Res*, 2014, 111: 112-120.
- [13] Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. Interferon induction and function at the mucosal surface[J]. *Immunol Rev*, 2013, 255(1): 25-39.
- [14] Dellgren C, Gad HH, Hamming OJ, et al. Human interferon- λ 3 is a potent member of the type III interferon family[J]. *Genes Immun*, 2009, 10(2): 125-131.
- [15] Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, et al. Role of deficient type III interferon- λ production in asthma exacerbations[J]. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1023-1026.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

举办“新生儿生命支持技术高峰论坛”通知

为促进我国新生儿危重病医学的发展以及新生儿生命支持技术的应用与推广, 不断提高危重新生儿的抢救水平, 《中国当代儿科杂志》编辑部、广州市医学会新生儿科分会、广州市妇女儿童医疗中心(广州市儿童医院)拟于2017年7月27~30日(27日报到, 30日上午撤离)在广州市联合举办“新生儿生命支持技术高峰论坛”。

本次会议系国家级继续医学教育项目(项目编号: 2017-06-03-042; I类学分8分), 内容突出生命支持技术的“规范化应用与研究进展”特点, 涵盖新生儿临床应用的各种生命支持技术, 如常频机械通气、高频振荡通气、无创正压通气、ECMO、CRRT、NO吸入治疗、亚低温治疗、换血疗法、肺表面活性物质的应用、益生菌疗法、早产儿氧疗、加温湿化高流量氧疗、危重新生儿胃肠外营养、胃肠内营养、脑损伤的干细胞移植治疗、脑血氧监测、振幅整合脑电图的应用、无创心输出量监测、NICU床旁检测技术等。届时将邀请国内知名新生儿医学领域专家、教授演讲与研讨。

报名办法及注意事项: 会务费(含资料费)900元, 食宿统一安排, 费用自理。有意参会者请来信、电话或电子邮件联系。主办方联系地址: 广州市人民中路318号广州市儿童医院新生儿科, 邮编510120; 联系人: 唐娟, 15302491815, Email: moyudaoyuan@163.com; 周伟, 13928737378, Email: zhouwei_pu002@126.com)。

《中国当代儿科杂志》编辑部 / 广州市医学会新生儿科分会 / 广州市妇女儿童医疗中心