

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.22.001

## 甲氨蝶呤对固有免疫关键分子干扰素的影响研究

元建国<sup>1</sup>, 叶海艳<sup>2</sup>, 李世林<sup>2△</sup>, 陈利民<sup>2▲</sup>

(1. 成都大学门诊部, 成都 610000; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院输血研究所, 成都 610063)

**[摘要]** **目的** 为了探究具有免疫抑制和抗肿瘤作用的甲氨蝶呤(MTX)对干扰素(IFN)的影响,以及 IFN 在风湿免疫性疾病中的作用。**方法** 以 5、20、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度梯度的 MTX 作用于 Huh7.5.1 细胞 48 h,采用实时荧光定量 PCR 法定量检测 MTX 干预后 Huh7.5.1 细胞内 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、干扰素刺激基因 15(ISG15)、抗黏病毒蛋白(MxA)的 mRNA 表达量。**结果** Huh7.5.1 细胞在 MTX(5、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )干预下内源性 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  的 mRNA 表达量与对照组相比均明显上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),并且随着 MTX 干预浓度的上升而上升;MTX 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与对照组相比虽有上升但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而 IFN- $\gamma$  的 mRNA 表达量仅在 MTX 浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在 5、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时虽有上升但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在 MTX 干预后,MxA 和 ISG15 的 mRNA 表达量均有不同程度的上升( $P < 0.05$ )。**结论** 小剂量 MTX 治疗风湿免疫性疾病取得良好的疗效与 IFN 相关。

**[关键词]** 甲氨蝶呤;固有免疫;干扰素**[中图分类号]** R392.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3025-03

## The effects of methotrexate on innate immune molecule interferon

Yuan Jianguo<sup>1</sup>, Ye Haiyan<sup>2</sup>, Li Shilin<sup>2△</sup>, Chen Limin<sup>2▲</sup>

(1. Department of Outpatient, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610000, China; 2. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Chengdu, Sichuan 610063, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of methotrexate(MTX), which has immunosuppressive and antitumor properties on interferon production and the role of interferon(IFN) in rheumatic autoimmune disease. **Methods** Cultured Huh7.5.1 cells were treated with different concentration of MTX(5, 20, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 48 hours. After MTX intervention, the mRNA expression levels of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , ISG15, MxA in Huh7.5.1 cells were quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** Compared with the control group, the endogenous IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  mRNA expressions of Huh7.5.1 cells under the intervention of methotrexate(5, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were significantly increased, the differences were statistically significant( $P < 0.05$ ), which was increasing with the rise of the concentration of MTX intervention. MTX concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , compared with the control group, although there was an increase, but without statistical significance( $P > 0.05$ ). While the mRNA expression of IFN- $\alpha$  was only significantly different when the MTX concentration was 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $P < 0.05$ ). Although there was an increase in 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , there was no statistical significance( $P > 0.05$ ). In MTX, the expression levels of MxA and ISG15 were increased in different degrees( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The good efficacy of low-dose MTX in the treatment of rheumatic autoimmune diseases may be related to IFN.

**[Key words]** methotrexate; innate immune; interferon

固有免疫是机体与生俱来的抵御病原微生物入侵的第一道防线,具有抵抗体外病原体侵袭、清除体内抗原性异物的能力,是生物体在漫长的进化和自然选择过程中形成的防御机制<sup>[1]</sup>。固有免疫具有抗感染、抗肿瘤、维持自身耐受,以及启动和参与特异性免疫等作用<sup>[2]</sup>。干扰素(IFN)是固有免疫系统重要的固有免疫分子,是最早发现的细胞因子,因其具有干扰病毒的感染和复制功能而得名。根据其来源和理化性质,可分为 I 型(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ )、II 型(IFN- $\gamma$ )及 III 型。

IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  由许多不同的细胞(所有有核细胞,特别是成纤维细胞、巨噬细胞、树突状细胞)在应答病毒或胞内细菌感染时产生。IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  的受体相同,几乎表达于所有有核细胞表面,功能广泛,包括抗病毒、免疫调节,以及促进组织相容性复合体(MHC) I 类分子和 II 类分子的表达。IFN- $\gamma$  主要由活化的 T 细胞、自然杀伤细胞诱导产生,具有抗病毒,活化巨

噬细胞,促进 MHC 分子表达的抗原提呈,诱导 Th1 分化,抑制 Th2 分化的作用<sup>[3-4]</sup>。

甲氨蝶呤(MTX)用于风湿免疫性疾病已数十年,被全世界的风湿免疫学者普遍接受,在治疗类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、血管炎、干燥综合征等疾病中都取得了良好的效果<sup>[5]</sup>。MTX 是二氢叶酸还原酶抑制剂,是一种叶酸拮抗剂,与二氢叶酸还原酶底物叶酸结构相似,能有效地占据酶催化中心,它与该酶的结合力比叶酸大 106 倍,对二氢叶酸还原酶呈强大而持久的竞争性抑制作用,使二氢叶酸不能变成四氢叶酸,导致 DNA 合成障碍,阻止嘌呤核苷酸的合成,而干扰蛋白质的合成<sup>[6-8]</sup>。

IFN 是固有免疫分子中的一种细胞因子,是固有免疫系统重要的组成成分,在整个免疫系统中具有重要意义,但在风湿免疫性疾病中,IFN 在疾病的发生、发展及转归、预后中的作用

和地位尚不十分清楚,同时,临床常用的免疫抑制剂对 IFN 的影响亦不明了。因此,为了探究 MTX 对 IFN 的影响,以及 IFN 在风湿免疫性疾病中的作用,本研究以不同浓度的 MTX 作用于 Huh7.5.1 细胞,采用实时荧光定量 PCR 法定量检测 MTX 干预后 Huh7.5.1 细胞内 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、干扰素刺激基因 15(ISG15)、抗黏病毒蛋白(MxA)的 mRNA 表达量,探讨并试图从基因水平证明 MTX 对 IFN 的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验细胞** Huh7.5.1 细胞:人肝癌细胞系,本实验室长期保存。

**1.1.2 主要试剂及仪器** MTX 片;胎牛血清(foetal bovine serum, FBS)购自 Hycone 公司;达氏修正依氏培养基(DMEM,高糖)购自 Hyclone 公司;非必需氨基酸(Non-essential amino acids, NEAA)购自 Gibico 公司;双抗(青霉素-链霉素)购自 Hyclone 公司;0.25%的胰酶购自 Gibico 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自 Gibico 公司;IFN- $\alpha$  购自 Merck&Co 公司;Trizol 购自 Ambion 公司;逆转录试剂盒购自 Bio-rad 公司;SYBR 荧光染料试剂盒购自 Roche 公司。

倒置荧光显微镜(CKX31 型)购自 Olympus 公司;Fast Real-Time PCR system(7500HT)购自 Applied Biosystem 公司;PCR 仪(Veriti 96 Well)购自 Applied Biosystem 公司;二氧化碳培养箱购自 Thermo electric 公司;生物洁净工作台购自 Airtech 公司;96 孔板离心机(3K15)购自 Sigma 公司;高速台式冷冻离心机购自 Thermo 公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 MTX 片溶解液的配置** 配置 0.71%的无水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )溶液和 0.69%磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )溶液,取 500 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液和 600 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液混合摇匀,用 2 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液调节 pH 值为 6.9。

**1.2.2 细胞培养、分组及 RNA 的提取** (1)细胞培养:①用 0.25%的胰酶将培养瓶中的细胞消化下来后转移至 50 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用完全培养基重悬细胞;②取 10  $\mu\text{L}$  细胞悬液至 10  $\mu\text{L}$  0.4%台盼蓝中充分混匀后加入计数板中计数;③根据细胞密度加入完全培养基,调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  /mL;④在 24 孔细胞培养板中每孔加入 500  $\mu\text{L}$  Huh7.5.1 细胞悬液;⑤37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜培养。(2)分组:细胞贴壁后进行药物处理,将 MTX 加入细胞培养板中,使终浓度分别为 5、20、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每个浓度设 3 个重复孔,放入 37  $^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 48 h;对照组细胞正常培养,未做任何处理。(3)RNA 提取:将 Trizol 加入 24 孔细胞培养板中,每孔加入 200  $\mu\text{L}$ ,反复吹打细胞后转移至 1.5 mL 离心管中,室温放置 5 min。加入 40  $\mu\text{L}$  氯仿,剧烈振

荡 10 s 后室温放置 5 min。4  $^\circ\text{C}$  12 000 r/min 离心 15 min。吸取 100  $\mu\text{L}$  水相转移入新的 1.5 mL 离心管中,加入 100  $\mu\text{L}$  异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10 min。4  $^\circ\text{C}$  12 000 r/min 离心 10 min,移去上清。加入 200  $\mu\text{L}$  75%乙醇,4  $^\circ\text{C}$  7 500 r/min 离心 5 min,弃上清以洗涤沉淀。室温放置使乙醇挥发后,加入 30  $\mu\text{L}$  无 RNA 酶(RNase)的焦碳酸二乙酯(DEPC)水,用枪头吸打几次使其充分溶解,-80  $^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.2.3 引物的序列和合成**<sup>[9-11]</sup> IFN- $\alpha$ :上游引物 5'-TCG CCC TTT GCT TTA CTG AT-3',下游引物 5'-GGG TCT CAG GGA GAT CAC AG-3';IFN- $\beta$ :上游引物 5'-AAA CTC ATA GCA GTC TGC A-3',下游引物 5'-AGG AGA TCT TCA GTT TCG GAG G-3';IFN- $\gamma$ :上游引物 5'-CCA ACG CAA AGC AAT ACA TGA-3',下游引物 5'-TTT TCG CTT CCC TGT TTT AGC-3';MxA:上游引物 5'-GTG CAT TGC AGA AGG TCA GA-3',下游引物 5'-CTG GTG ATA GGC CAT CAG GT-3';ISG15:上游引物 5'-CGC AGA TCA CCC AGA AGA TT-3',下游引物 5'-GCC CTT GTT ATT CCT CAC CA-3';3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH):上游引物 5'-GCC TCC TGC ACC ACC AAC TG-3',下游引物 5'-ACG CCT GCT TCA CCA CCT TC-3'。

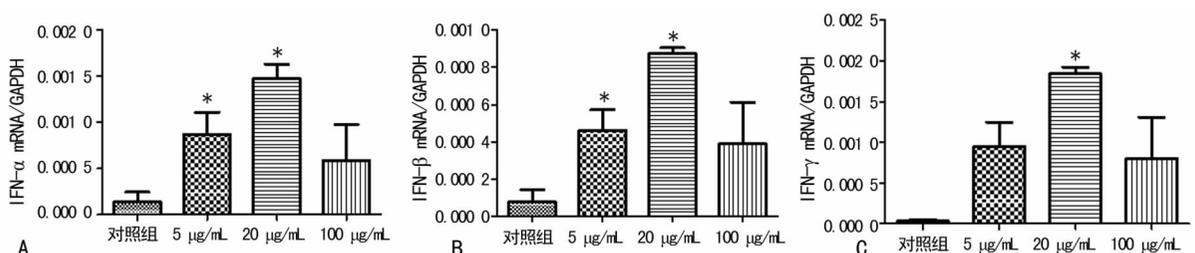
**1.2.4 逆转录反应** 使用逆转录试剂盒,反应体系如下:5  $\times$  Mix 1  $\mu\text{L}$ ,RNA 模板 3  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ ,总体积 10  $\mu\text{L}$ 。反应条件:30  $^\circ\text{C}$  10 min,42  $^\circ\text{C}$  20 min,99  $^\circ\text{C}$  5 min,4  $^\circ\text{C}$  5 min。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR** 采用 Roche 公司的 SYBR 荧光染料试剂盒,反应体积为 20  $\mu\text{L}$ ,反应体系:2  $\times$  SYBR mix 10  $\mu\text{L}$ ,Primer-R 1  $\mu\text{L}$ ,Primer-F 1  $\mu\text{L}$ ,Template 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^\circ\text{C}$  30 s,60  $^\circ\text{C}$  30 s,72  $^\circ\text{C}$  30 s,共 35 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法,以看家基因 GAPDH 作内参,得出待测目的基因 mRNA 相对表达量。

**1.3 统计学处理** 实验均设 3 次独立的重复实验,数据采用 ANOVA 软件进行统计分析,数据用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组细胞内 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  及 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达比较** Huh7.5.1 细胞在 MTX(5、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )干预下内源性 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  的 mRNA 表达量与对照组相比均上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),并且随着 MTX 干预浓度的上升而上升;MTX 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与对照组相比虽有上升但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而 IFN- $\gamma$  的 mRNA 表达量仅在 MTX 浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在 5、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时虽有上升但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 1。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

图 1 不同浓度的 MTX 对 Huh7.5.1 细胞 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  mRNA 表达量的影响

2.2 各组 ISG15、MxA mRNA 的表达比较 在 MTX 干预后, MxA 和 ISG15 的 mRNA 表达量均有不同程度的上升, 与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

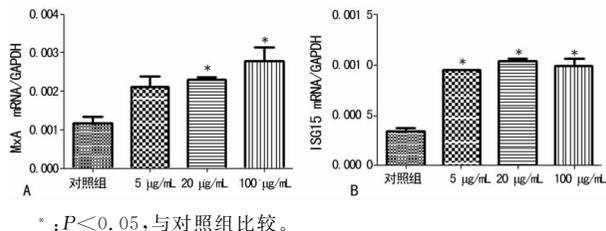


图 2 MTX 对 ISG15、MxA mRNA 表达量的影响

### 3 讨论

在临床实践中, 大剂量 MTX 被用于抗肿瘤治疗, 主要是抑制细胞增殖和复制, 即抗增殖作用, 是通过抑制二氢叶酸还原酶而阻止二氢叶酸还原为四氢叶酸, 可阻止 DNA 合成, 也可干扰 RNA 蛋白质的生物合成, 从而达到阻止肿瘤细胞生成的作用<sup>[12]</sup>。而治疗风湿免疫性疾病是小剂量应用, 其作用机制不能完全用抗增殖进行解释, 每周 1 次小剂量治疗风湿病的机制可能是几种作用的结合, 包括抗叶酸、免疫调节、免疫抑制及抗炎作用<sup>[13]</sup>。

IFN 属于细胞因子中的一类, 主要有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等作用。本研究只涉及了 I 型和 II 型。IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  可由体内多种细胞产生, IFN- $\gamma$  由自然杀伤细胞诱导产生, 具有抗病毒和免疫调节的功能<sup>[14]</sup>。在正常生理情况下, 多数细胞可以自发分泌少量内源性 I 型 IFN。IFN 与干扰素受体 (IFNR) 结合激活 Janus 酪氨酸蛋白激酶/信号转导子与转录激活子 (Janus kinase signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT) 信号通路, 该通路在调节细胞增殖、分化、凋亡, 以及在免疫调节、炎症和肿瘤等多种病理生理过程中能发挥重要的作用<sup>[15]</sup>。

本实验表明, MTX 能明显促进内源性 IFN 的分泌, 并且能与 IFNR 结合激活 IFN 信号通路从而促进 ISGs 的表达, 提示小剂量 MTX 治疗风湿免疫性疾病取得的良好疗效与 IFN 相关。本实验结果可以为进一步研究 MTX 治疗疾病的机制, 以及对 MTX 的开发利用提供理论依据。

### 参考文献

[1] 曹雪涛, 何维. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.  
 [2] 柳爱华, 宝福凯. 近年来固有免疫研究中的一些重要进展[J]. 自然杂志, 2009, 31(4): 218-222.

[3] 冯盼盼, 卢雪梅, 金小宝, 等. 干扰素的药理研究进展[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 780-783.  
 [4] Samuel CE. Antiviral actions of interferons[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809.  
 [5] 何泽民, 王姿媛, 蔡晓虹. 甲氨蝶呤的临床应用[J]. 海峡药学, 2005, 17(3): 119-121.  
 [6] Blits M, Jansen G, Assaraf YG, et al. Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(11): 2791-2802.  
 [7] Spurlock CF, Gass HM, Bryant CJ, et al. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes[J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(1): 178-187.  
 [8] 周惠琼, 吴东海. 甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎作用机制的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(7): 497-499.  
 [9] Nagao M, Nakajima Y, Kanehiro H, et al. The impact of interferon gamma receptor expression on the mechanism of escape from host immune surveillance in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2000, 32(3): 491-500.  
 [10] Chen L, Borozan I, Feld J, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection[J]. Gastroenterology, 2005, 128(5): 1437-1444.  
 [11] Liu B, Chen S, Guan Y, et al. Type III interferon induces distinct SOCS1 expression pattern that contributes to delayed but prolonged activation of Jak/STAT signaling pathway: implications for treatment Non-Response in HCV patients[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133800.  
 [12] Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance[J]. Drug Resist Updat, 2012, 15(4): 183-210.  
 [13] 向阳, 苏林冲. 小剂量甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的作用机理[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 1999, 16(2): 47-50.  
 [14] Iwasaki A. A virological view of innate immune recognition[J]. Annu Rev Microbiol, 2012, 66(1): 177-196.  
 [15] Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty [J]. Immunity, 2012, 36(4): 503-514.

(收稿日期: 2016-02-12 修回日期: 2016-03-25)

## 《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象), 作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准, 并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。