

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.004

NLRC5 对 HepG2.2.15 细胞中 MHC-I 类分子的调节作用*

秦 娇,王文龙,盛云建,强 丽,吴 刚[△]
(西南医科大学附属医院,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨 NLRC5 在 Hep G2.2.15 细胞中的表达情况及其对主要组织相容性复合体 I 类分子(MHC-I 类分子)表达的调节作用。**方法** 将实验分为 Hep G2 组、Hep G2+IFN- γ 组、Hep G2.2.15 组、Hep G2.2.15+IFN- γ 组、Hep G2.2.15+pcDNA3.1-NLRC5-GFP 组、Hep G2.2.15+pcDNA3.1 组,检测 NLRC5 转录水平及蛋白表达情况,以及过表达 NLRC5 后 MHC-I 类分子表达情况。**结果** 与 Hep G2 细胞相比,Hep G2.2.15 细胞中的 NLRC5 转录水平、蛋白表达水平、MHC-I 类分子的表达水平降低($P<0.05$)。Hep G2 细胞加入 IFN- γ 后,NLRC5 的转录水平及蛋白表达水平均增加($P<0.05$),Hep G2.2.15 细胞蛋白水平无明显变化。与未转染组相比,过表达 NLRC5 蛋白后的 Hep G2.2.15 细胞表面的 MHC-I 类分子表达上调($P<0.05$)。**结论** HBV 感染导致 MHC-I 类分子表达下调,而 NLRC5 可上调 MHC-I 类分子的表达。

[关键词] 肝炎,乙型,慢性;Hep G2.2.15 细胞;组织相容性抗原 I 类;NLRC5**[中图分类号]** R512.6+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0913-04

Regulative effect of NLRC5 on MHC-I class molecules in HepG2.2.15 cells*

QIN Jiao,WANG Wenlong,SHENG Yunjian,QIANG Li,WU Gang[△]

(Affiliated Hospital of Southwest Medical University,Luzhou,Sichuan 646000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor family CARD domain containing 5(NLRC5) in Hep G2.2.15 cells and its regulatory effect on MHC-I class molecule expression. **Methods** The experiment was divided into the Hep G2 group, Hep G2+IFN- γ group, Hep G2.2.15 group, Hep G2.2.15+IFN- γ group, Hep G2.2.15+pcDNA3.1-NLRC5-GFP group and Hep G2.2.15+pcDNA3.1 group. The transcription level of NLRC5 and protein expression were detected in each group. After the overexpression of NLRC5, the expression of MHC-I class molecules was detected. **Results** Compared with the Hep G2 cells group, the transcription level, protein expression level and MHC-I class molecule expression level in Hep G2.2.15 cells were decreased($P<0.05$). After adding IFN- γ in Hep G2 cells, the transcription level of NLRC5 and protein expression level were increased($P<0.05$), Hep G2.2.15 cells had no obvious change. Compared with the non-transfection group, the MHC-I class molecule expression in Hep G2.2.15 cellular surface after overexpressing NLRC5 protein was up-regulated($P<0.05$). **Conclusion** Hepatitis B virus (HBV) infection causes the down-regulation of MHC-I class molecules, while NLRC5 can up-regulate the expression of MHC-I class molecules.

[Key words] hepatitis B, chronic; Hep G2.2.15 cells; histocompatibility antigens class I; NLRC5

乙型肝炎病毒(HBV)感染后引起的免疫应答是肝细胞损伤及炎症发生的主要机制,而炎症反复存在是慢性乙型肝炎进展为肝硬化甚至肝癌的重要因素。在 HBV 感染期间,HBV 特异性 T 细胞的数量和功能与 HBV 控制情况有关^[1]。因此,HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)不能有效清除感染 HBV 的细胞是造成乙型肝炎慢性化甚至肝癌的重要因素。经典的主要组织相容性复合体 I 类分子(MHC-I 类分子)通过提呈抗原肽而激活 T 淋巴细胞,CD8⁺ CTL 识别 MHC-I 类分子提呈的内源性抗原肽,参与

适应性免疫应答。在肝母细胞癌实验中发现 HBV 感染可下调 MHC-I 类分子 HLA-ABC、HLA-E 和 MIC-A 的表达^[2]。

肽聚糖的核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族(NLRs 家族)是细胞内模式识别受体(PRR)中一个很大的蛋白家族。NLRC5 蛋白作为 NLRs 家族成员之一,近年多项研究表明,在天然免疫及适应性免疫起重要作用。NLRC5 蛋白可参与 MHC-I 基因及其相关基因的调节,如 β 2-微球蛋白、Tap1 和 Lmp2 基因的表达^[3-4]。而 NLRC5 对 HBV 感染后所致的 MHC-

I 下调是否起作用,目前尚未见相关报道。Hep G2.2.15 细胞是 Hep G2 细胞的衍生系,可持续、稳定地释放 HBV。笔者将 NLRC5 能否诱导 MHC-I 类分子表达增加的调控机制应用于 Hep G2.2.15 细胞,观察 NLRC5 在 Hep G2.2.15 细胞中对 MHC-I 类分子表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及材料

Hep G2 细胞株由本实验室保存, Hep G2.2.15 细胞由重庆医科大学肝研所赠予,复苏、培养至细胞呈对数期生长用于实验。DMEM 培养基及胎牛血清(美国 Hyclone 公司);lipofectamineTM 2000(美国 Introvigen 公司)、Opti-MEM(美国 Gibco 公司)。pc DNA3.1 质粒购自中国质粒菌株基因库;总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(天根公司);PCR 引物由上海 Invitrogrn 生物公司合成。Anti-NLRC5(一抗)、山羊抗兔二抗(HRP,英国 Abcam 公司)。FITC 标记鼠抗人 HLA-ABC 抗体(美国 eBioscience 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

A 组: Hep G2 组, B 组: Hep G2+IFN- γ (5 ng/mL)组, C 组: Hep G2.2.15 组, D 组: Hep G2.2.15+IFN- γ (5 ng/mL)组, E 组: Hep G2.2.15+pcDNA3.1-NLRC5-GFP; F 组: Hep G2.2.15+pcDNA3.1 组。

1.2.2 质粒转染

待细胞数量达 80% 时准备转染,将 250 μ L Opti-MEM 与 30 μ L 的 lipofectamineTM 2000 混合后静置 20 min,分别将 pcDNA3.1-NLRC5-GFP、pcDNA3.1 加入混有转染剂的培养基中静置 10 min。加入 3 每毫升 $\times 10^6$ 细胞悬液,混匀后置于培养箱中,6 h 后换液。

1.2.3 RT-PCR

从细胞中提取细胞总 RNA。取 0.5 μ g RNA 按逆转录试剂盒制备 cDNA,逆转录原液稀释 10 倍,将试剂及样本 cDNA 混匀,放入定量 PCR 仪,并按下列条件进行 cDNA 扩增反应:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 25 s,共 40 个循环。所有样本均设置 3 个平行管。

1.2.4 Western blot

收集细胞进行蛋白提取,配置浓度为 0.5 mg/mL 标准液,根据 BCA 法测定各样品的蛋白浓度,然后进行 SDS-PAGE 电泳,分别以 60 V 电泳浓缩胶、120 V 电泳分离胶。选用 PVDF 膜进行转膜,室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入(1:3 500),室温下孵育 2 h;用 ECL 化学发光法显影。

1.2.5 流式细胞学检测

取对数生长的细胞,经胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,调定浓度为每毫升 1×10^6 个,将细胞用 2 μ L/mL 的 CFSE 在 37 $^{\circ}$ C 染色 30 min,洗涤 2 次,以 FITC 标记的鼠抗人 HLA-ABC 抗体室温孵育 10 min,使用流式细胞仪进行检测,每个

抗体重复 3 次,记录激发波长 488 nm 处绿色荧光。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 对 NLRC5 转录水平及蛋白的表达影响

与 Hep G2 组相比, Hep G2.2.15 组细胞中的 NLRC5 转录水平及蛋白表达水平均下降($P < 0.05$),见图 1。

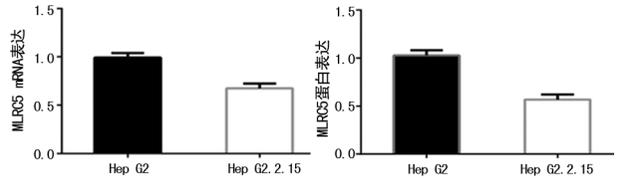


图 1 HBV 对 NLRC5 转录水平及蛋白的表达影响

2.2 IFN- γ 对 NLRC5 转录水平及蛋白的表达影响

Hep G2 细胞加入 IFN- γ 后, NLRC5 的转录水平及蛋白表达水平均增加($P < 0.05$), Hep G2.2.15 细胞在 IFN- γ 刺激后不能提高 NLRC5 的蛋白表达水平,见图 2。

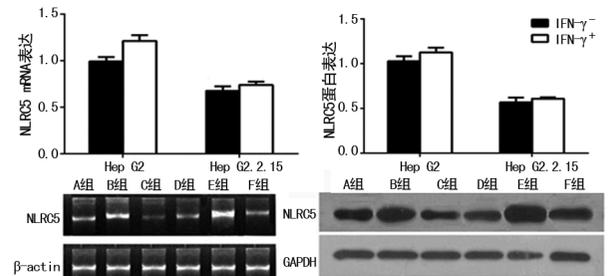


图 2 IFN- γ 对 NLRC5 转录水平及蛋白的表达影响

2.3 HBV 对 MHC-I 类分子表达的影响

与 Hep G2 细胞相比, Hep G2.2.15 细胞中的 MHC-I 类分子的表达水平降低($P < 0.05$),见图 3。

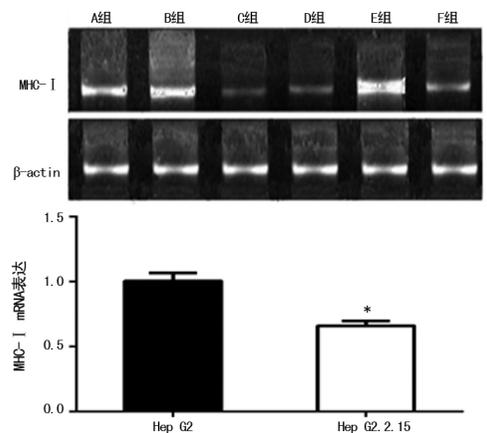


图 3 HBV 对 MHC-I 类分子表达的影响

2.4 转染 NLRC5 蛋白后 Hep G2.2.15 细胞的表达情况

转染 NLRC5 后的转录及蛋白表达水平均增加($P < 0.05$),见图 4。

2.5 MHC-I 类分子在稳定表达 NLRC5 的 Hep

G2.2.15 细胞表面的表达情况 C 组、E 组、F 组的 MHC-I 类分子 MFI 分别为 16.17、17.86、16.59。与未转染组相比,过表达 NLRC5 蛋白后的 Hep G2.2.15 细胞表面的 MHC-I 类分子表达上调 ($P < 0.05$),见图 5。

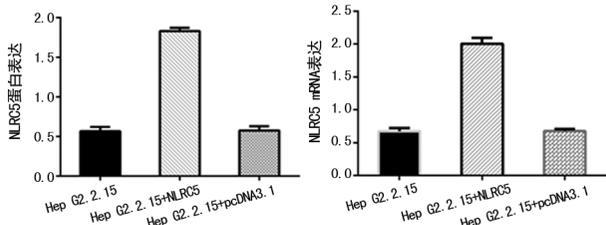


图 4 转染 NLRC5 蛋白后 Hep G2.2.15 细胞的表达情况

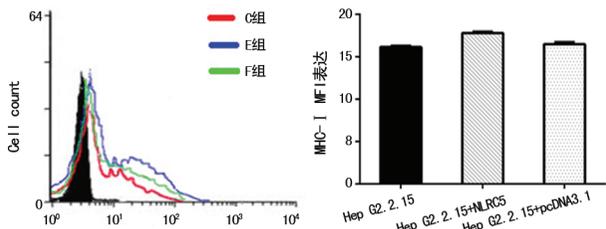


图 5 MHC-I 类分子在稳定表达 NLRC5 的 Hep G2.2.15 细胞表面的表达情况

3 讨 论

病原相关分子模式(PAMP)作为先天免疫反应的第一道防御入侵微生物的防线,其识别依赖于几类 PRR。NLRC5 蛋白作为 NLRs 家族成员之一,近年来广泛在天然免疫及适应性免疫应答、抗感染、肿瘤等领域被研究。NLRC5 具有非典型 NLRs 结构,即位于中心的腺苷酸三磷酸酶结构域、位于 N 端的效应器控制域(CARD 属于死亡折叠域),与 NLRs 其他家族成员的 CARD 或 PYD 没有同源性,为非典型的 CARD 结构域及位于 C 端最长的亮氨酸重复序列区域(LRR 结构)^[5-8]。研究发现,NLRC5 广泛表达于人体多个组织,而免疫相关组织,如骨髓造血组织、淋巴结、脾和外周血淋巴细胞中 NLRC5 的表达最高^[9],表明 NLRC5 参与免疫应答过程。NLRC5 表达被 TLR3 配体 [poly(I : C)]、病毒感染或 IFN- γ 触发^[7,10-11]。HBV 是一种双链 DNA 病毒,在本实验中发现,在 HBV 感染后的肝细胞中可发现 NLRC5 表达,表明 NLRC5 在 HBV 感染机体后引起的免疫应答过程中起着一定的作用,可能参与了 HBV 的清除作用。IFN- γ 是一种主要由 Th1 细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞等免疫细胞分泌的细胞因子,IFN- γ 可通过刺激 JAK-STAT 信号、途径激活 NLRC5 基因表达^[12]。研究发现,免疫系统的 IFN- γ -NLRC5-MHC-I 轴对于 CD8⁺ T 细胞应答和细胞内病原体的有效杀伤至关重要^[13]。本实验用等量的 IFN- γ 分别刺激 Hep G2 细胞和 Hep G2.2.15 细胞后得到 NLRC5 在转录水平及蛋白水平均呈上升

趋势。

笔者发现经典 MHC-I 类分子表达在 Hep G2.2.15 细胞中低于 Hep G2 细胞,Hep G2.2.15 细胞不仅具有 Hep G2 细胞生物学活性,同时又能够持续、稳定地分泌 HBV,表明 HBV 感染机体情况下可下调 MHC-I 类分子表达,这与文献一致^[2]。MHC-I 类分子分布于有核细胞表面,通过提呈抗原肽而激活 CD8⁺ T 淋巴细胞,参与适应性免疫应答。HBV 感染宿主细胞后,其表面 MHC-I 类分子表达下调或丢失,因此在宿主细胞表面不易形成足够的抗原肽-MHC 分子复合物,导致机体出现免疫耐受。目前认为,HBV 感染机体后诱导机体出现免疫耐受是导致乙型肝炎慢性化的重要因素^[14]。HBV 特异性免疫应答在 HBV 清除过程中起重要作用,MHC-I 类分子限制性的 CD8⁺ CTL 可诱导肝细胞凋亡,也可分泌 IFN- γ ,以非细胞裂解机制抑制其他肝细胞内 HBV 基因复制和表达。慢性 HBV 感染患者的 CTL 免疫应答能力减弱是 HBV 感染趋于慢性化的主要原因^[15]。

尽管 NLRC5 在天然免疫应答中的作用仍有争议,但最近发现的 MHC-I 类反式激活因子(CITA)也属于 NLR 蛋白家族,并构成 MHC-I 类基因转录激活的关键调节因子^[16]。NLRC5 作为 MHC-I 类分子的反式激活因子,诱导经典 MHC-I 的表达(即 HLA-A、HLA-B、HLA-C),非经典的 I 类(即 HLA-E、HLA-F、HLA-G), β 亚基(B2M),免疫蛋白酶体组分(PSMB9,即 LMP2)和肽转运蛋白(TAP1)^[17]。有研究团队发现,流感病毒感染 NLRC5 缺陷型小鼠,在体内降低了 MHC-I 类分子表达,CD8⁺ T 细胞功能受损及病毒滴度增加^[18]。NLR 家族成员 NLRC5 在各种类型的感染过程中调节 MHC-I 的表达,但其在对 HBV 免疫中的作用尚未得到充分研究。为探求 HBV 感染机体时 NLRC5 能否刺激 MHC-I 类分子表达,笔者将外源性 NLRC5 转染到 Hep G2.2.15 细胞,经 RT-PCR 及流式细胞术分别得到上调的 MHC-I 类分子表达。表明在 Hep G2.2.15 细胞中,NLRC5 可上调 MHC-I 类分子表达,提出 NLRC5 对 HBV 感染的免疫应答中起重要作用。

上述研究发现,HBV 感染后 NLRC5 蛋白和 MHC-I 类分子表达均下调。HBV 感染人体后可降低其抗原呈递能力,从而逃逸免疫监督,导致特异性 CTL 不能有效清除 HBV,机体呈持续 HBsAg、HBeAg 阳性表现。HBV 特异性 CTL 免疫杀伤效应的降低可能与 HBV 感染后导致的 NLRC5 表达下调有关。在 HepG2.2.15 细胞中过表达 NLRC5,证实了 NLRC5 可以上调 HepG2.2.15 细胞 MHC-I 类分子表达,而 MHC-I 类分子表达增加促进 HBV 特异性 CTL 更好地发挥免疫杀伤效应,这对揭示乙型肝炎免疫耐受机制具有重要意义。因此,NLRC5 是否

通过 MHC-I 类分子增强 HBV 特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞的免疫杀伤作用可进一步证实,从而为打破乙型肝炎免疫耐受提供理论依据。

参考文献

- [1] ZEHN D, UTZSCHNEIDER D T, THIMME R. Immune-surveillance through exhausted effector T-cells[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 16: 49-54.
- [2] CHEN Y, CHENG M, TIAN Z. Hepatitis B virus down-regulates expressions of MHC class I molecules on hepatoplastoma cell line[J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(5): 373-378.
- [3] BISWAS A, MEISSNER T B, KAWAI T, et al. Cutting edge: impaired MHC class I expression in mice deficient for Nlr5/class I transactivator[J]. *J Immunol*, 2012, 189(2): 516-520.
- [4] ROBBINS G R, TRUAX A D, DAVIS B K, et al. Regulation of class I major histocompatibility complex (MHC) by nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(29): 24294-24303.
- [5] CHELBI S T, GUARDA G. NLRC5, a promising new entry in tumor immunology[J]. *J Immun Cancer*, 2016, 4: 39.
- [6] NEERINCX A, JAKOBESHAGEN K, UTERMOHLEN O, et al. The N-terminal domain of NLRC5 confers transcriptional activity for MHC class I and II gene expression[J]. *J Immunol*, 2014, 193(6): 3090-3100.
- [7] NEERINCX A, LAUTZ K, MENNING M, et al. A role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(34): 26223-26232.
- [8] YAO Y, QIAN Y. Expression regulation and function of NLRC5[J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 168-175.
- [9] STAEHLI F, LUDIGS K, HEINZ L X, et al. NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I-dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells[J]. *J Immunol*, 2012, 188(8): 3820-3828.
- [10] BENKO S, KOVACS E G, HEZEL F, et al. NLRC5 Functions beyond MHC-I regulation-what do we know so far? [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 150.
- [11] BENKO S, MAGALHAES J G, PHILPOTT D J, et al. NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways[J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1681-1691.
- [12] MEISSNER T B, LI A, KOBAYASHI K S. NLRC5: a newly discovered MHC class I transactivator (CITA) [J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(6): 477-484.
- [13] YEUNG K S, CHUNG B H, CHOUFANI S, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of chinese patients with systemic lupus erythematosus identified hypomethylation in genes related to the type I interferon pathway[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169553.
- [14] BERTOLETTI A, FERRARI C. Adaptive immunity in HBV infection[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1 Suppl): S71-83.
- [15] LAN P, ZHANG C, HAN Q, et al. Therapeutic recovery of hepatitis B virus (HBV)-induced hepatocyte-intrinsic immune defect reverses systemic adaptive immune tolerance[J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 73-85.
- [16] DOWNS I, VIJAYAN S, SIDIQ T, et al. CITA/NLRC5: a critical transcriptional regulator of MHC class I gene expression[J]. *Bio Factors*, 2016, 42(4): 349-357.
- [17] LUDIGS K, SEGUIN-ESTEVEZ Q, LEMEILLE S, et al. NLRC5 exclusively transactivates MHC class I and related genes through a distinctive SXY module[J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(3): e1005088.
- [18] LUPFER C R, STOKES K L, KURIAKOSE T, et al. Deficiency of the NOD-Like receptor NLRC5 results in decreased CD8⁺ T cell function and impaired viral clearance [J]. *J Virol*, 2017, 91(17): pii: e00377.

(收稿日期: 2018-10-18 修回日期: 2018-12-18)

(上接第 912 页)

- of interleukin-1 receptor antagonist on lubricin metabolism and cartilage degeneration in an anterior cruciate ligament transection model [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(1): 114-121.
- [11] LIEBERTHAL J, SAMBAMURTHY N, SCANZELLO C R. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(11): 1825-1834.
 - [12] HUEBNER K D, SHRIVE N G, FRANK C B. New surgical model of post-traumatic osteoarthritis: isolated intra-articular bone injury in the rabbit [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(6): 914-920.
 - [13] YANG C Y, CHANALARIS A, TROEBERG L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects' [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(7): 1000-1009.
 - [14] 白笙君, 陈传好, 王伟. MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-3 及 Col-II 因子在兔软骨细胞损伤后的表达变化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(2): 419-425.
 - [15] 安梅, 孙和炎, 卢锦森, 等. 基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂在白藜芦醇治疗佐剂性关节炎中的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(6): 701-705.

(收稿日期: 2018-10-18 修回日期: 2018-12-21)