

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.10.009

病毒感染对角质形成细胞 CCL20 表达的影响及其机制*

庄同田 易秀莉 亢盼 陈佳希 李舒丽[△]

(第四军医大学西京皮肤医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:既往研究发现,趋化因子 CCL20 在银屑病、白癜风等在内的多种自身免疫性皮肤病的病理过程中扮演了重要的角色,同时病毒感染也被认为是自身免疫性疾病的重要参与者。皮肤组织是机体抵御外界病原体的第一道屏障,其中角质形成细胞被认为在启动免疫中发挥了关键的作用。视黄酸诱导基因蛋白 I(RIG-I)是固有免疫模式识别受体家族的重要成员,其能够被病毒复制的中间产物激活。然而,病毒感染是否会通过 RIG-I 信号通路影响角质形成细胞中 CCL20 的表达,进而参与自身免疫性皮肤病的病理过程仍不清楚。本文使用聚肌胞苷酸(Poly(I:C))来体外模拟病毒感染,探究病毒感染对皮肤角质形成细胞 CCL20 表达的影响,并且通过小干扰 RNA 沉默关键分子来探究相应的分子机制。**方法:**首先,体外细胞实验使用 Poly(I:C)刺激角质形成细胞系 HaCaT,通过 Western-blot 实验和 qRT-PCR 实验探究 Poly(I:C)对 HaCaT 中 RIG-I 表达的影响;接下来,通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)以及酶联免疫吸附测定实验(ELISA)检测 Poly(I:C)对角质形成细胞 CCL20 分泌的影响;线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)在 RIG-I 的下游发挥着重要作用,我们通过小干扰 RNA(si-RNA)阻断 RIG-I-MAVS-NF- κ B 信号通路关键分子,探究 Poly(I:C)诱导角质形成细胞 CCL20 表达升高的分子机制。**结果:**Poly(I:C)能够明显促进角质形成细胞中 RIG-I 的表达及 CCL20 的表达和分泌;Poly(I:C)诱导角质形成细胞 CCL20 分泌是由 RIG-I-MAVS-NF- κ B 信号通路介导的。**结论:**Poly(I:C)模拟病毒感染能够通过 RIG-I-MAVS-NF- κ B 信号通路介导 CCL20 表达增加,进而参与自身免疫性皮肤病的病理过程。

关键词:病毒;Poly(I:C);角质形成细胞;CCL20

中图分类号:R-33;R751;R752 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)10-1840-06

Impacts and Mechanism of Virus Infection on Expression of CCL20 in Keratinocytes*

ZHUANG Tong-tian, YI Xiu-li, KANG Pan, CHEN Jia-xi, LI Shu-li[△]

(Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Previous studies have validated that CCL20 played a key role in the pathogenesis of many autoimmune skin diseases including psoriasis and vitiligo. Meanwhile, virus infection also is considered as an important participant factor of autoimmune diseases. Skin tissue, as the outermost layer in organism, contributes critically to the pathogens defense and elimination. Particularly, keratinocyte, accounting for the absolutely percentage in epidermis, is regarded as the important executor in the process of initiating immunology. RIG-I (Retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) is an innate pathogen recognition receptor (PRR) and could be activated by the virus replication intermediate products. However, whether virus infection could influence the secretion of CCL20 in keratinocytes via RIG-I signaling pathway and forwardly to aggravate pathogenesis of autoimmune skin diseases is still elusive. In the present study, using Poly(I:C) to imitate virus infection in vitro, we explored the impact of virus infection on the expression of CCL20 in keratinocytes. In addition, using the corresponding small interference RNA (si-RNA) to block the key molecule, we explored the underlying mechanism. **Methods:** Firstly, using Poly(I:C) to stimulate keratinocyte cell line HaCaT, we explored the effect of Poly(I:C) on the expression of RIG-I by Western-blot assay and qRT-PCR assay. Sequentially, using qRT-PCR and ELISA to validate the impacts of Poly(I:C) on the expression of CCL20 in HaCaT cells in vitro. In addition, MAVS (Mitochondria anti-virus signaling protein, MAVS) functions in the downstream of RIG-I, using small interference RNA (si-RNA) to impede key signaling components in RIG-I-MAVS-NF- κ B signaling pathway to determine the specific mechanism of how Poly(I:C) induces the expression of CCL20. **Results:** Poly(I:C) could induce the expression of RIG-I and the secretion of CCL20 in keratinocytes. The RIG-I-MAVS-NF- κ B signaling pathway contributes significantly to the secretion of CCL20 in response to Poly(I:C). **Conclusion:** Virus invasion to skin could induce the secretion of CCL20 via RIG-I-MAVS-NF- κ B signaling pathway in keratinocytes and forwardly to participate in the pathogenesis of autoimmune skin diseases.

Key words: Virus; Poly(I:C); Keratinocyte; CCL20

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R751; R752 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)10-1840-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81803122)

作者简介:庄同田(1993-),男,硕士研究生,主要研究方向:皮肤病与性病学,E-mail: 13474652655@163.com

[△] 通讯作者:李舒丽(1986-),女,博士,主治医师,主要研究方向:白癜风的发病机制,E-mail: lishli@fmmu.edu.cn,电话:029-84775406

(收稿日期:2019-10-28 接受日期:2019-11-24)

前言

很多自身免疫性皮肤病的发生被认为是环境因素和遗传因素共同作用的结果^[1,2]。皮肤作为人体最大的器官,在抵御外界微生物侵袭中发挥着重要的屏障功能^[3],在组成这道屏障的细胞成分中,角质形成细胞占据了绝对优势。病毒作为与人类长期共同进化的微生物,已被证实参与包括1型糖尿病^[4], Graves病^[5]等在内的多种自身免疫性疾病的发生发展,但病毒是否参与自身免疫性皮肤病的病理过程以及相应的机制仍不清楚。最近的研究表明,CCL20在包括银屑病^[6]和白癜风^[7]在内的多种自身免疫性皮肤病中明显升高并可能在其病理过程中发挥着关键的作用。我们提出假说,病毒感染能够介导角质形成细胞CCL20的分泌,从而参与自身免疫性皮肤病的病理过程。首先我们使用poly(I:C)模拟病毒感染^[8,9]来刺激角质形成细胞,发现其能够明显的诱导角质形成细胞CCL20的表达和分泌。接下来,我们证实了Poly(I:C)诱导CCL20表达主要是通过RIG-I-MAVS-NF- κ B信号通路。这一研究支持了病毒感染参与自身免疫性皮肤病发病的观点,并进一步为治疗病毒感染参与的自身免疫性皮肤病提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;视黄酸诱导基因蛋白I(Retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)、线粒体抗病毒信号蛋白(Mitochondria anti-virus signaling protein, MAVS)蛋白免疫印迹抗体购自美国abcam公司;NF- κ B、干扰素调节因子3(Interferon regulatory Factor3, IRF3)蛋白免疫印迹抗体购自美国CST公司;RIG-I、CCL20引物购自上海生工;CCL20 ELISA检测试剂盒购自美国RD公司;RIG-I、MAVS小干扰RNA(Small interference RNA, si-RNA)购自上海生工;NF- κ B、IRF3分子si-RNA购自美国Santa Cruz公司;免疫共聚焦显微镜购自日本Olympus公司;Real time PCR仪、Chemi Doc XRS化学发光仪、电泳槽、转膜槽、玻璃胶板购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 配置含10%胎牛血清(FBS)的1640培养基作为细胞培养液。在液氮罐中取出HaCat冻存管,迅速放入37℃水浴箱中复温解冻,将细胞悬液加入含10 mL培养液的离心管中,800 r/min离心5分钟,弃上清,将细胞重悬后移入培养瓶中,37℃ 5% CO₂培养箱中常规培养。

1.2.2 细胞分组与处理 使用0.1,0.15,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 μ g/mL的Poly(I:C),分别刺激角质形成细胞HaCat,每一个浓度设置三个独立重复实验,每次实验每个浓度设置三个复孔,收集并裂解细胞后通过Western-blot检测RIG-I表达变化。在0-60小时时间范围内,每一个时间长度的刺激分为对照组和实验组,实验组加入0.6 μ g/mL Poly(I:C),对照组加入等体积无菌去离子水,每次实验对照组和实验组各设置3个复孔,每一个时间点设置3次独立重复实验。在干涉RIG-I(RIG-I-si-RNA)探究RIG-I对CCL20表达影响的实验中,分组为NC-si-RNA, RIG-I-si-RNA,NC-si-RNA+ Poly(I:C),RIG-I-si-RNA+ Poly(I:

C),每一个分组设置三个复孔,该干涉实验设置3次独立重复。干涉MAVS,NF- κ B,IRF3的实验分组情况同干涉RIG-I。

1.2.3 Western-blot 处理后的细胞分别使用细胞裂解液冰上裂解15分钟。使用BCA蛋白试验试剂盒进行总蛋白定量。相同数量的总蛋白通过SDS-PAGE分离并且将其转移到PVDF膜上。接下来,PVDF膜在5%牛奶中封闭2小时,经由TBST短暂的漂洗后,将PVDF膜一抗4℃孵育过夜。恢复至室温后,经PBS漂洗5 min \times 3遍后,二抗室温孵育1小时。最后在化学发光仪上检测相应的蛋白条带。

1.2.4 qRT-PCR 经过不同处理的细胞使用TRIzol裂解并通过PrimeScript RT reagent kit反转录为cDNA,使用SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)在Real time PCR仪上进行qRT-PCR实验。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算mRNA的变化,相应的mRNA表达通过 β -actin进行标准化。引物序列如下:

RIG-I-F: TATTCTGATTGCCACCTCAGTT
RIG-I-R: TTTGATGACATTGCCACATAC;
CCL20-F: ACTTTGACTGCTGTCTTGGATA
CCL20-R: GACCCAAGTCTGTTTTGGATTT。

1.2.5 ELISA 首先将细胞处理后的上清加入各上样孔中,室温孵育90分钟,倒去孔内液体,加入100 μ L生物素化抗体工作液,室温孵育1小时;洗涤3次后加入100 μ L酶结合物工作液,室温孵育30分钟;洗涤5次后,加入底物溶液90 μ L,室温避光孵育15分钟;每孔加入终止液50 μ L,立即使用酶标仪在450 nm波长处测量各孔的光密度(OD)值。最后对照标准曲线,计算样本中CCL20的实际浓度。

1.2.6 小干扰RNA(si-RNA)处理 细胞按照 3×10^5 /孔的密度铺在6孔板中,24小时后进行转染。将6 μ L的si-RNA(RIG-I-si-RNA,5'-AUUUAAAACCAGAAUUAUUCTT-3';MAVS-si-RNA,5'-CACAGGGUCAGUUGUAUCUTT-3';NC-si-RNA,5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3';NF- κ B-si-RNA(h)sc29410 Santa Cruz; IRF3-si-RNA(h)sc35710 Santa Cruz)和6 μ L的Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, USA)加入到250 μ L不含胎牛血清的1640培养基中并且充分混匀,10分钟后,将试剂加入到含有2 mL培养基(含有胎牛血清)的细胞培养板中。

1.3 统计学分析

每一组数据的分析都是通过GraphPad Prism 5软件进行,采取双尾非配对t检验或者one-way ANOVA。数据均是平均值 \pm 标准差展示,实验均进行了三次独立重复。

2 结果

2.1 Poly(I:C)能够促进角质形成细胞RIG-I的表达

Poly(I:C)是病毒复制中间产物双链RNA(double strand RNA, dsRNA)的类似物。RIG-I作为一种细胞质中的模式识别受体^[10],能够识别病毒复制中间产物,并且以正反馈的方式使得自身表达升高。所以我们首先使用0.1,0.15,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 μ g/mL的Poly(I:C)分别作用于角质形成细胞,24小时后通过蛋白免疫印迹实验检测RIG-I的表达变化,发现Poly(I:C)以浓度依赖的方式促进RIG-I的表达,并且在0.6 μ g/mL时效果最显著(图1. A)。接下来,通过qRT-PCR实验证实在36小

时内,0.6 μg/mL Poly(I:C)能够显著的促进 RIG-I mRNA 水平的升高(图 1. B)。这些数据表明,Poly(I:C)能够促进角质形成细胞 RIG-I 的表达。

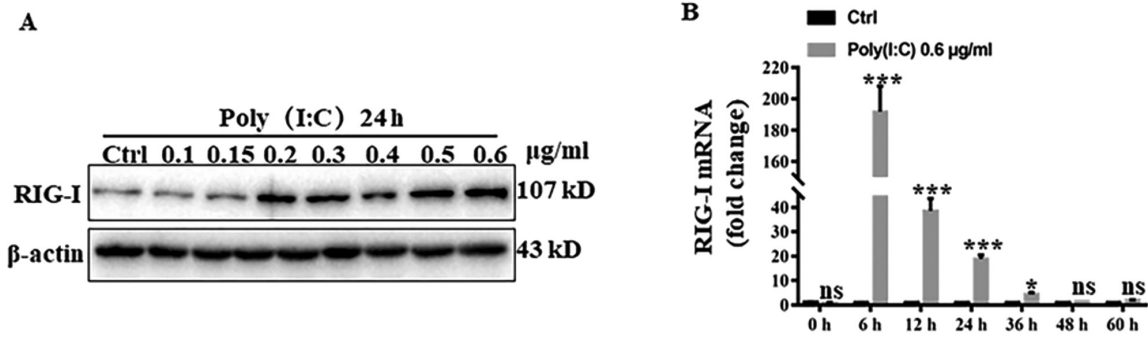


图 1 Poly(I:C)能够促进角质形成细胞 RIG-I 表达升高

A. 不同浓度的 Poly(I:C)作用 24 小时,HaCaT 细胞系中 RIG-I 蛋白表达变化。B. 0.6 μg/mL Poly(I:C)作用不同时间,RIG-I mRNA 水平变化。数据以平均值± 标准差展示,n=3,*P<0.05,***P<0.001,ns: 无统计学意义,和对照组相比。

Fig.1 Poly(I:C) could promote the expression of RIG-I in keratinocytes

Note: A. The protein of RIG-I treated with Poly(I:C) in the indicated concentration for 24 hours. The result is the representative of three independently performed assays. B. The mRNA levels of RIG-I stimulated by 0.6 μg/ml Poly(I:C) in the indicated time. Data are expressed as mean± SD, n=3.

*P<0.05, ***P<0.001, ns: no significance, compared with the corresponding Control group.

2.2 Poly(I:C)能够促进角质形成细胞 CCL20 的表达和分泌

我们使用 0.6 μg/mL 的 Poly (I:C) 刺激角质形成细胞 6、12、24、36、48、60 小时后收集细胞及细胞上清液。收集的细胞通过 qRT-PCR 实验检测 CCL20 mRNA 的表达变化,收集的细胞上清液通过 ELISA 实验检测 CCL20 的分泌变化。结果证实,在角质形成细胞中,0.6 μg/mL Poly (I:C) 刺激 HaCaT 36 小时

内,能够明显促进 CCL20 mRNA 水平的升高(图 2.A),这种促进作用在 48 小时后消失,可能是由于 Poly(I:C)被细胞代谢或者由于细胞数量的增多,Poly(I:C)在每一个细胞中的浓度降低所致。一致的是,ELISA 实验结果表明,Poly (I:C) 能够促进 CCL20 的分泌(图 2.B)。这些数据表明,Poly(I:C)能够明显促进角质形成细胞 CCL20 的表达。

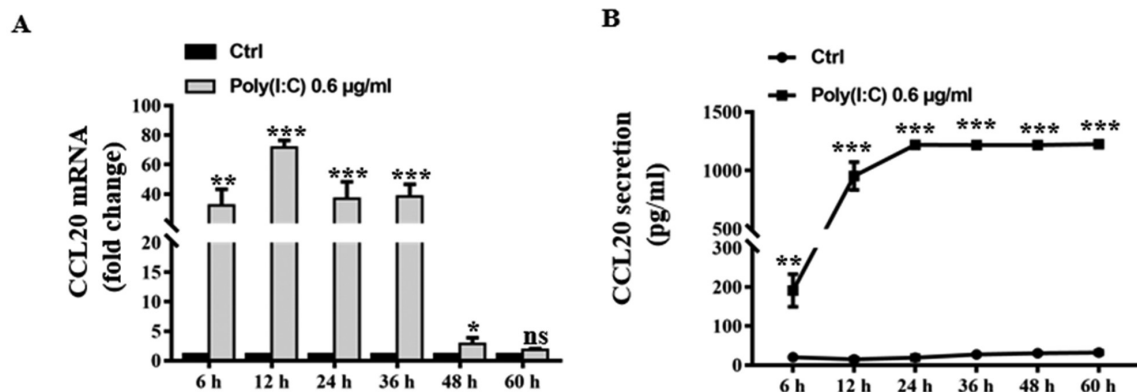


图 2 Poly(I:C)能够促进 CCL20 的表达升高

A. 0.6 μg/mL Poly(I:C)作用不同时间 CCL20 mRNA 变化。B. 0.6 μg/mL Poly(I:C)作用不同时间,CCL20 蛋白表达变化变化。数据以平均值± 标准差展示,n=3,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,ns: 无统计学意义,和对照组相比。

Fig.2 Poly(I:C) could promote the expression and secretion of CCL20

Note: A. The mRNA alteration of CCL20 stimulated by Poly(I:C) in the indicated time. The result is the representative of three independently performed assays. B. The protein level of CCL20 treated by Poly(I:C) in the indicated time. Data are expressed as mean± SD, n=3.

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, compared with the corresponding Control group.

2.3 Poly(I:C)通过 RIG-I-MAVS 信号通路介导 CCL20 的表达

接下来,我们探究了 Poly(I:C)促进 CCL20 表达的分子机制。首先使用 RIG-I 小干扰 RNA(RIG-I-si-RNA)和 MAVS 小干扰 RNA(MAVS-si-RNA)预处理细胞 24 小时,Western-blot 实验证实小干扰 RNA 的干涉效率可以用于后续干涉实验(图 3.A)。接下来,使用 RIG-I-si-RNA 和 MAVS-si-RNA 以及对照小干扰 RNA(NC-si-RNA)对细胞进行预处理 24 小时,然后使用 Poly(I:C)刺激 24 小时,最后使用 ELISA 检测试剂盒检测各组分分泌的 CCL20。结果显示,Poly(I:C)能够明显升高 CCL20 的

表达,阻断 RIG-I 和 MAVS 后,CCL20 的表达明显减少(图 3. B)。这些数据表明,Poly(I:C)促进角质形成细胞 CCL20 的表达是通过 RIG-I-MAVS 信号通路。

2.4 NF-κB 在 MAVS 下游发挥重要作用

既往文献报道,经过一系列激酶的信号传递,MAVS 能够激活其下游的 NF-κB 和 IRF3 转录因子,NF-κB 和 IRF3 的入核能够启动一系列细胞因子的产生^[1],那么,这一信号对 CCL20 的表达是否有影响仍不清楚。我们首先通过免疫印迹实验证实了所使用的 NF-κB-si-RNA 和 IRF3-si-RNA 的干涉效率

(图 4.A)。然后使用小干扰 RNA 预处理 24 小时,再使用 Poly (I:C)刺激 24 小时,然后通过 ELISA 测定 CCL20 的表达变化。结果显示,和 NC-si-RNA+ Poly(I:C)相比,NF-κB-si-RNA+ Poly (I:C)组的 CCL20 表达明显减少(图 4.B),表明 NF-κB 在 Poly

(I:C)促进 CCL20 表达中的重要作用。另外,和 NC-si-RNA+ Poly(I:C)相比,IRF3-si-RNA+ Poly(I:C)组的 CCL20 表达明显减少(图 4.B),表明 IRF3 在 Poly(I:C)促进 CCL20 表达中的重要作用。

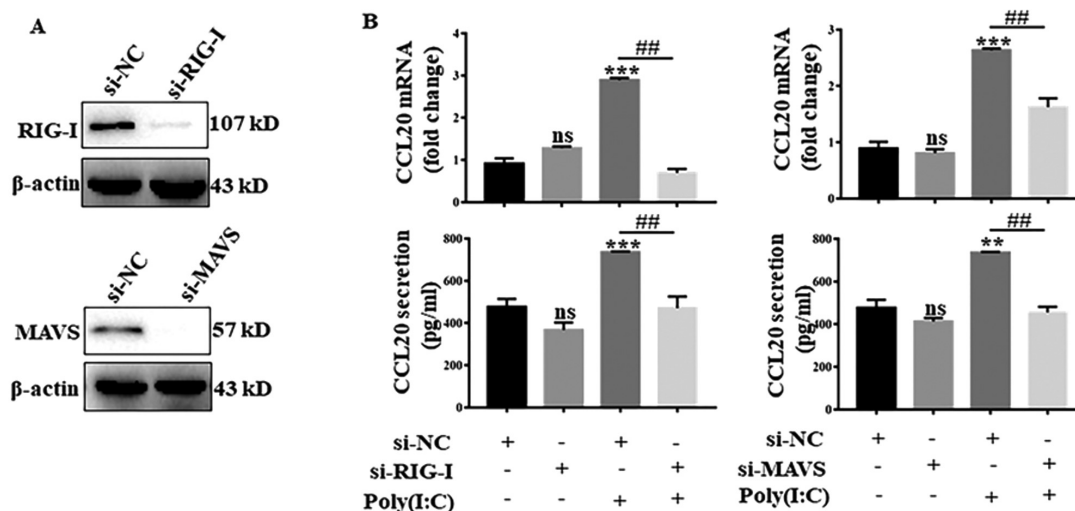


图 3 Poly(I:C)通过 RIG-I-MAVS 信号通路介导 CCL20 的表达

A. 使用小干扰 RNA 处理细胞 24 小时后,蛋白印迹实验验证 si-RIG-I (RIG-I 小干扰 RNA)和 si-MAVS(MAVS 小干扰 RNA)的干扰效率。si-NC: (阴性对照(negative control)小干扰 RNA)。si-RIG-I: RIG-I 小干扰 RNA。si-MAVS: MAVS 小干扰 RNA。B. 干涉 RIG-I 和 MAVS 条件下, CCL20mRNA 和 CCL20 蛋白水平变化。+:加入该处理;-:未加该处理。si-NC:(阴性对照(negative control)小干扰 RNA)。si-RIG-I: RIG-I 小干扰 RNA。si-MAVS: MAVS 小干扰 RNA。横坐标代表不同的处理分组。数据以平均值± 标准差展示,n=3, ***P*<0.01, ##*P*<0.01, ****P*<0.001, ns: 无统计学意义。ns, *和 si-NC 处理组比较。

Fig.3 Poly(I:C)mediated the expression of CCL20 via RIG-I-MAVS signaling pathway

A. The interference efficiency of si-RIG-I and si-MAVS treated with corresponding si-RNA for 24 hours. B. the mRNA and protein levels of CCL20 when silencing RIG-I or MAVS. Note: Data are expressed as mean± SD, n=3. ns=no significance, ***P*<0.01, ****P*<0.001, compared with si-NC group; ##*P*<0.01, compared between the groups of si-NC+ Poly(I:C) and si-RIG-I/MAVS+ Poly(I:C).

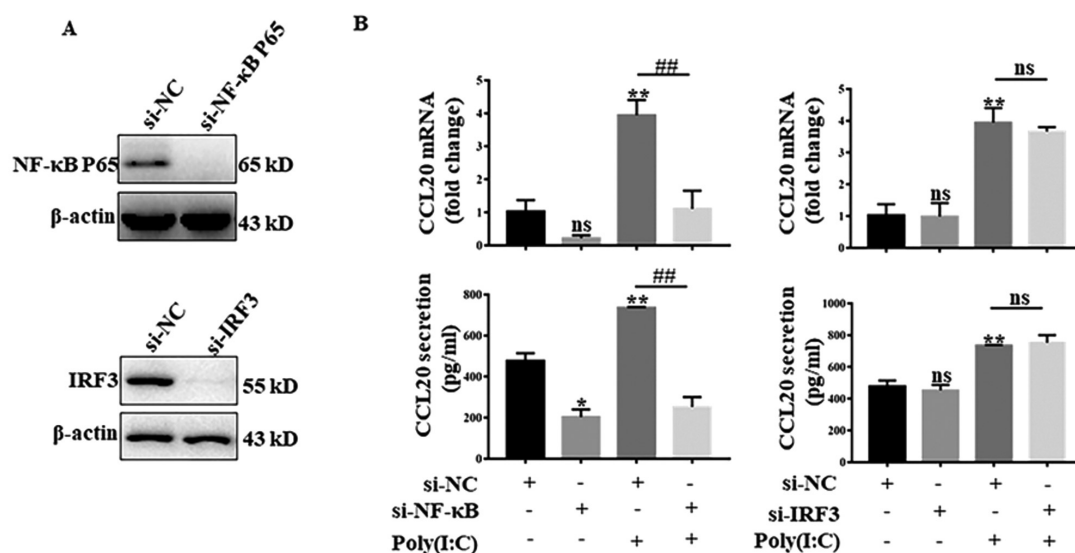


图 4 NF-κB 在 MAVS 下游发挥重要作用

A. 蛋白印迹实验验证 si-NF-κB P65 (NF-κB P65 小干扰 RNA)和 si-IRF3(IRF3 小干扰 RNA)的干扰效率。si-NC:(阴性对照(negative control)小干扰 RNA)。si-NF-κB: NF-κB 小干扰 RNA。si-IRF3: IRF3 小干扰 RNA。B. 分别干涉 NF-κB P65 和 IRF3 条件下,CCL20mRNA 和 CCL20 蛋白水平变化。+:加入该处理;-:未加该处理。横坐标代表不同的处理分组。数据以平均值± 标准差展示,n=3, ***P*<0.01, ##*P*<0.01, ns: 无统计学意义。ns, *和 si-NC 处理组比较。

Fig.4 NF-κB plays important role in the downstream of MAVS

A. The interference efficiency of si- si-NF-κB P65 and si-IRF3 treated with corresponding si-RNA for 24 hours. B. the mRNA and protein levels of CCL20 when silencing NF-κB P65 or IRF3.

Note: Data are expressed as mean± SD, n=3. ns=no significance, ***P*<0.01, compared with si-NC group; ##*P*<0.01, compared between the groups between si-NC+ Poly(I:C) and si-NF-κB P65/IRF3 + Poly(I:C).

3 讨论

本研究发​​现病毒感染能够促进角质形成细胞 CCL20 分泌显著增加。CCL20 是 8 kDa 左右的趋化因子,其主要表达在皮肤、肝脏、结肠、前列腺以及子宫,并且其受体只有 CCR6,这一特性使得 CCL20/CCR6 成为十分有价值的药物靶点^[12]。研究发现类风湿关节炎的关节滑液中 CCL20 含量明显增加^[13],并且和 CCR6 阳性的树突状细胞、巨噬细胞和 CD4 阳性的 T 淋巴细胞浸润相关^[14],尤其是 CD4⁺T 细胞的募集被认为是类风湿性关节炎发展的重要步骤。在炎症性肠病 (IBD)^[15]中的研究提示,疾病严重程度越高,肠上皮细胞分泌的 CCL20 越多,能够趋化更多的 TH1/17 细胞和 Tc1/17 细胞到炎症局部,参与疾病的发展。另外,在肿瘤的研究中^[16]也发现 CCL20 能够招募表达 CCR6 的树突状细胞到上皮组织中,这往往和肿瘤的预后差有关;进一步研究发现,这些浸润的树突状细胞能够发生重编程导致 Toll 样受体 7 (Toll-like receptor 7, TLR7) 功能受抑制,从而导致了肿瘤组织中细胞因子谱的变化以及肿瘤的免疫逃逸。以上研究均证实了 CCL20 在调节局部免疫中的巨大作用。在皮肤微环境中,CCL20 同样发挥着重要的作用,一项最新的研究^[17]发现,扁桃体感染产生的表达 CCR6 的 T 细胞参与了掌趾脓疱病的病理过程。另外,特应性皮炎^[18]中 IL-26 的表达升高,并且能够促进角质形成细胞 CCL20 的表达,进一步激活 TH17 和 TH2 免疫反应,从而导致 AD 的进展。同样的,在银屑病^[9]病理过程中,角质形成细胞在 IL-17 等细胞因子的作用下能够产生大量的 CCL20,参与银屑病的发病过程。除此之外,研究发现进展期的白癜风^[7]皮损处和外周血中的 CCL20 表达显著升高,并且外周循环中表达其受体的 TH1/17 细胞和 Tc1/17 细胞数量也明显增加。所以,角质形成细胞能够表达 CCL20 并且参与多种皮肤疾病的发病过程。

皮肤作为人体与外界环境交互的第一道屏障,在抵御微生物侵袭中发挥着举足轻重的作用,尤其是表皮免疫的重要性不容忽视^[19]。病毒作为环境中无处不在、和人类长期共存的微生物,在一些疾病的发生发展中扮演着重要的角色。研究发现病毒等微生物能够通过促进 IL-23 的表达参与银屑病的病理过程^[19],提示病毒可能在一些看似和病毒无关的皮肤疾病发生发展过程中扮演了“催化剂”的作用。所以,我们的研究关注于病毒对皮肤中角质形成细胞 CCL20 表达的影响,旨在揭示病毒和皮肤相互作用参与疾病发生发展的机制。

我们发现病毒感染角质形成细胞促进 CCL20 表达的效应是由 RIG-I 介导的。RIG-I 作为一种细胞质中的固有免疫模式识别受体,和 MDA5, LGP2 同属于 RIG-I 样受体家族,在机体识别病毒等微生物感染并且有效清除病原体方面发挥着重要的作用^[21]。同时,这一信号通路的过度活化也和很多自身免疫性疾病相关,如 1 型糖尿病、银屑病等。另外,有研究指出,线粒体中双链 RNA (dsRNA) 的释放以及受损细胞中 dsRNA 的释放也能够被 RIG-I 识别^[22],从而引起下游信号级联反应的活化,导致和病毒感染同样的效应产生,这可以部分解释进展期银屑病等的“同形反应”。Poly(I:C)作为一种病毒复制时产生的中间产物(dsRNA)的类似物,被用来在体外实验中模拟病毒感染过程。Poly(I:C)激活 RIG-I 后能够促进多种细胞因子如 IL-6、

IL-8、TNF- α 等的分泌,从而间接的参与自身免疫性疾病的发生^[9]。同时,RIG-I 的活化也能明显的促进细胞的凋亡,这同样可以参与自身免疫性疾病的发生。我们发现在 Poly(I:C)模拟病毒 dsRNA 条件下,RIG-I 可以介导角质形成细胞 CCL20 的表达增加进一步丰富了 RIG-I 介导自身免疫性疾病的机制。

另外,我们发现病毒感染条件下,RIG-I-MAVS-NF- κ B 信号通路在 CCL20 的产生中发挥了重要的作用。既往的研究报道,在病毒感染过程中,RIG-I-MAVS-NF- κ B/IRF3 通路能够明显促进 IFN- β 的产生,IFN- β 在限制病毒感染方面发挥着重要的作用^[23]。一方面 IFN- β 可以通过 JAK-STAT 通路促进一些干扰素刺激基因的表达来限制病毒的复制、扩散等^[24],另一方面 IFN- β 还具有促进适应性免疫增强的作用^[25],如增强效应性 T 细胞对病毒感染细胞的杀伤。但是,由这一通路介导的其他效应仍有很多未知。我们阐释了病毒感染皮肤后,角质形成细胞能够通过 RIG-I-MAVS-NF- κ B 信号通路促进 CCL20 表达上调,为进一步通过抗病毒方式来治疗病毒感染参与的银屑病、特应性皮炎、掌趾脓疱病、白癜风等皮肤疾病提供了重要参考。病毒感染和机体免疫功能调节、免疫平衡紊乱以及自身免疫性疾病发病的关系十分复杂,但是从很多的观察性研究和基础性研究都提示病毒在自身免疫性疾病发生发展中扮演了重要角色。当然,病毒感染角质形成细胞后引起的其他细胞因子和趋化因子的释放以及 CCL20 如何参与疾病的发展还需要进一步的探索。

我们的研究证实 Poly(I:C)模拟病毒感染皮肤角质形成细胞,能够通过 RIG-I-MAVS-NF- κ B 信号通路介导角质形成细胞 CCL20 的分泌,参与皮肤疾病的病理过程并且可以作为皮肤疾病活动程度的标志物。这一研究支持了病毒参与皮肤疾病病理过程的理论,并且为病毒感染参与自身免疫性皮肤病的抗病毒治疗提供了理论支持。但是本研究缺乏小鼠模型和大规模的临床样本的证据,还需要进一步深入探究。

参考文献 (References)

- [1] Panarina M, Kisand K, Alnek K, et al. Interferon and Interferon-Inducible Gene Activation in Patients with Type 1 Diabetes [J]. Scand J Immunol, 2014, 80(4): 283-292
- [2] Spritz R A, Andersen G H L. Genetics of Vitiligo [J]. Dermatol Clin, 2017, 35(2): 245-255
- [3] Handfield C, Kwok J, MacLeod A S. Innate Antiviral Immunity in the Skin[J]. Trends Immunol, 2018, 39(4): 328-340
- [4] Op De Beeck A, Eizirik D L. Viral infections in type 1 diabetes mellitus - why the β cells?[J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(5): 263-273
- [5] Page C, Hoffmann T W, Benzerdjeb N, et al. Detection of erythrovirus B19 in thyroidectomy specimens from Graves' disease patients: a case-control study[J]. J Med Virol, 2013, 85(8): 1414-1419
- [6] Hawkes J E, Chan T C, Krueger J G. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 140(3): 645-653
- [7] Zhang L, Kang Y, Chen S, et al. Circulating CCL20: A potential biomarker for active vitiligo together with the number of Th1/17 cells [J]. J Dermatol Sci, 2019, 93(2): 92-100
- [8] Yu N, Zhang S, Sun T, et al. Double-stranded RNA induces melanocyte death via activation of Toll-like receptor 3 [J]. Exp Der-

- matol, 2011, 20(2): 134-139
- [9] Wang S, Liu D, Jin R, et al. Differential Responses of Normal Human Melanocytes to Intra- and Extracellular dsRNA [J]. *Dna Cell Biol*, 2015, 34(6): 391-399
- [10] Reikine S, Nguyen J B, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5 [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 423-430
- [11] Chow K T, Gale M J, Loo Y M. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36:667-694
- [12] Osuala K O, Sloane B F. Many Roles of CCL20: Emphasis on Breast Cancer[J]. *Postdoc J*, 2014, 2(3): 7-16
- [13] Matsui T, Akahoshi T, Namai R, et al. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 125(1): 155-161
- [14] Chabaud M, Page G, Miossec P. Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines[J]. *J Immunol*, 2001, 167(10): 6015-6020
- [15] Trivedi P J, Adams D H. Chemokines and Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease; Pitfalls and Promise [J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2018, 12 (suppl_2): S641-S652
- [16] Le Borgne M, Etchart N, Goubier A, et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺T cell cross priming in vivo[J]. *Immunity*, 2006, 24(2): 191-201
- [17] Harabuchi Y, Takahara M. Pathogenic role of palatine tonsils in pal-moplar pustulosis: A review[J]. *The Journal of Dermatology*, 2019, 46(11): 931-939
- [18] Kamijo H, Miyagaki T, Hayashi Y, et al. Increased interleukin-26 expression promotes Th17 and Th2-associated cytokine production by keratinocytes in atopic dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 87(2): 372-387
- [19] Mack M R, Kim B S. Superficial Immunity: Antimicrobial Responses Are More Than Skin Deep[J]. *Immunity*, 2016, 45(1): 6-8
- [20] Zhu H, Lou F, Yin Q, et al. RIG-I antiviral signaling drives interleukin-23 production and psoriasis-like skin disease [J]. *Embo Mol Med*, 2017, 9(5): 589-604
- [21] Kasumba D M, Grandvaux N. Therapeutic Targeting of RIG-I and MDA5 Might Not Lead to the Same Rome[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(2): 116-127
- [22] Dhir A, Dhir S, Borowski L S, et al. Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans [J]. *Nature*, 2018, 560 (7717): 238-242
- [23] Molony R D, Nguyen J T, Kong Y, et al. Aging impairs both primary and secondary RIG-I signaling for interferon induction in human monocytes[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(509): n2392
- [24] Xu L, Wang W, Li Y, et al. RIG-I is a key antiviral interferon-stimulated gene against hepatitis E virus regardless of interferon production [J]. *Hepatology*, 2017, 65(6): 1823-1839
- [25] Yang X, Zhang X, Fu M L, et al. Targeting the tumor microenvironment with interferon-beta bridges innate and adaptive immune responses[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 37-48

(上接第 1810 页)

- [20] Li Y F, Xu B Y, An R. Protective effect of anisodamine in rats with glycerol-induced acute kidney injury [J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1): 223
- [21] 董昊晨, 蔺雪峰, 韩轩茂, 等. 腺苷在心肌缺血及远程预适应中的作用[J]. *医学综述*, 2019, 25(15): 3003-3007+3013
- [22] 余婷, 韩亚非. 苦参素对大鼠全脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. *中西医结合脑血管病杂志*, 2019, 17(12): 1807-1810
- [23] 黄娟, 王育庆, 卜眺, 等. SOD2 在姜黄素减轻氧糖剥夺所致神经元损伤中的作用[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(9): 1638-1643
- [24] 龚毅, 赵若连, 杨保春. 旅途精神病患者血清超氧化物歧化酶活性及丙二醛水平[J]. *上海精神医学*, 2012, 24(3): 155-161
- [25] 杨莹莹, 王猛, 刘霞, 等. TLR4 对缺血再灌注损伤作用机理的研究进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2019, 25(4): 643-647
- [26] Shirali A C, Goldstein D R. Tracking the toll of kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19: 1444-1450
- [27] Mersmann J, Koch A, Tran N, et al. Toll-like receptor 2 signaling triggers fatal arrhythmias upon myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38: 1927-32
- [28] Lu C, Liu L, Chen Y, et al. TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling[J]. *J Immunol*, 2011, 187(3): 1458-1466
- [29] Wolfs T G, Buurman W A, van Schadewijk A, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation [J]. *J Immunol*, 2002, 168(3): 1286-1293
- [30] 宋菲, 杨发奋. TLR2、TLR4 在糖尿病肾病炎症状态中的作用及药物干预研究进展[J]. *右江医学*, 2015, 43(5): 614-617
- [31] Urbschat A, Baer P, Zacharowski K, et al. Systemic TLR2 antibody application in renal ischaemia and reperfusion injury decreases AKT phosphorylation and increases apoptosis in the mouse kidney [J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2017, 122(2): 223-232