

MOI 对 PK-15 细胞感染 PPV 后细胞因子 mRNA 转录时相的影响

李厚伟^{1Δ} 徐进^{1Δ} 吴红云¹ 李建正^{1,2*}

(1. 郑州后羿制药有限公司 河南 郑州 451161)

(2. 河南省天然兽药工程技术研究中心 河南 郑州 451161)

摘 要: 【目的】更好地了解感染复数(MOI)对猪细小病毒(PPV)感染 PK-15 细胞后引起细胞因子的反应, 探讨宿主-病毒之间的作用关系。【方法】运用荧光定量 PCR 技术, 测定和分析 3 种感染复数对 PPV 感染 PK-15 细胞引起的病毒 DNA 量的变化和细胞因子 IFN- β 、IRF-3、TNF- α 和 IL-18 分泌水平。【结果】PPV 感染 PK-15 细胞 12 h 病毒开始大量迅速增殖, 感染 48 h 且 MOI 为 1.0 时达到最高峰; PPV 感染后可引起 PK-15 细胞中 IFN- β 、IRF-3、TNF- α 和 IL-18 的表达量显著增加, 其中 IRF-3 基因在感染后 1 h 且 MOI 为 10.0 时表达量达到 967 倍。【结论】细胞因子的分泌水平显著依赖感染复数和感染时间的交互作用。

关键词: 猪细小病毒, 细胞因子, PK-15 细胞, 感染复数, 转录时相

Effect of MOI on transcriptional profiles of cytokines mRNA after PK-15 cell cultures infected with porcine parvovirus

LI Hou-Wei^{1Δ} XU Jin^{1Δ} WU Hong-Yun¹ LI Jian-Zheng^{1,2*}

(1. Zhengzhou Hou Yi Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 451161, China)

(2. Henan Engineering Research Center of Natural Veterinary Drugs, Zhengzhou, Henan 451161, China)

Abstract: [Objective] Porcine Kidney-15 cells (PK-15) were infected by Porcine Parvovirus

*通讯作者: ✉: hyljz999@163.com

Δ 共同第一作者

收稿日期: 2012-02-05; 接受日期: 2012-03-28

(PPV) to survey the host inflammatory responses, particularly multiplicity of infection (MOI) for the cytokines responses of PPV infection, and the host-PPV interaction. [Methods] Then the viral DNA was measured and analyzed using real-time PCR. The transcript level of cytokines (IFN- β , IRF-3, TNF- α and IL-18) were detected by real-time PCR too. [Results] We found that PPV proliferated rapidly in PK-15 cell 12 hours after infection, and reached peak after 48 hours infection and MOI=1.0; the transcription levels of IFN- β , IRF-3, TNF- α and IL-18 increased obviously, and the transcription level of IRF-3 gene increased to 967 times in 1 hour and MOI=10.0 after infection. [Conclusion] The results revealed that the level of cytokines significantly dependent on the interaction of MOI and infection time.

Keywords: Porcine parvovirus, Cytokines, PK-15 cell, Multiplicity of infection, Transcriptional profiles

目前猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)感染 PK-15 细胞后引起细胞的反应特别是对细胞因子分泌的影响尚不清楚。本研究将探讨 3 种感染复数对猪细小病毒感染宿主细胞后引起相关细胞因子 mRNA 水平的转录时相的变化,以期揭示 PPV 感染机制,为猪细小病毒的防治和抗病毒药物、疫苗研究提供重要的试验依据和理论基础。PPV 是引起妊娠母猪繁殖障碍的主要病原体之一。初产妊娠母猪感染后,经胎盘侵袭胚胎或胎儿,引起母猪流产、胚胎死亡、胎儿畸形及木乃伊化,致使母猪不孕或反复发情,同时还可引起仔猪的皮炎和腹泻^[1]。猪细小病毒在猪群中检出率甚高,在猪群中的血清抗体阳性率达 50%–80%,给养猪业带来巨大的经济损失^[2]。细胞因子主要是由活化的免疫细胞和某些造血细胞产生的高活性多功能的小分子蛋白质,在机体的免疫应答、造血、组织修复、炎症反应、免疫调节、胚胎发生和生长发育等方面发挥重要作用^[3]。随着分子生物学的快速发展,已经对多种关键的细胞因子进行了克隆和研究,但关于细胞因子和细胞因子网络在机体的免疫应答过程中的作用机制尚不清楚,细胞因子在预防疾病和治疗疾病过程中的作用机理还处于探索阶段。病毒与细胞因子相互作用的生物学效应是病毒感染与致病

的基础,其中,干扰素 β (IFN- β)在病毒复制阶段通过其诱导产生的抗病毒基因的表达使细胞产生一种抗病毒状态^[4],而 IFN- β 的转录激活则需要干扰素调控因子 3 (IRF-3)的调控,IRF-3 的转录活力与生物学功能直接影响细胞的抗病毒能力^[5]。白细胞介素-8 (IL-8)不仅对中性粒细胞有最强的趋化和激活作用,而且参与病毒感染后的炎症过程^[6]。研究表明肿瘤坏死因子 α (TNF- α)能选择性地破坏病毒感染细胞,具有抗病毒作用。近几年研究发现 TNF- α 能增加某些病毒复制,加速机体损害,与病毒感染疾病的严重程度有关^[7]。本试验利用 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法,分 3 个感染复数(Multiplicity of infection, MOI)和 7 个时间点定量检测 PPV 感染 PK-15 后 4 种细胞因子 mRNA 的表达。为更深入地研究细胞因子的抗病毒机制提供理论参考和试验依据,并为预防控制 PPV 提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 病毒: 猪细小病毒 7909 标准毒株 (PPV-7909)购自中国兽药监察所,病毒滴度为 $10^{6.1}$ TCID₅₀/mL。

1.1.2 细胞: 猪肾细胞 PK-15 (Porcine Kidney-15

cells)由中国兽药监察所提供,细胞生长于含 7% 新生犊牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 5% CO₂ 37 °C 培养。

1.1.3 主要试剂: Protein K, Promega 公司; RPMI-1640 培养基, GIBCOBR 公司; Trypsin, Invitrogen; 胎牛血清, Hyclone 公司; E.Z.N.A Total RNA Kit I, OMEGA; SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa 公司; RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas; 其它常规试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器: CFX96 Real-Time PCR 仪, Bio-Rad 公司; 台式高速低温离心机, 德国 Sigma 公司; PTC-200 型 PCR 仪, MJ Research 公司; 紫外凝胶成像系统, 美国 SIM 公司; 小型台式离心机, 德国 Sigma 公司。

1.2 病毒感染

将 PK-15 细胞用胰酶分散后, 培养于 6 孔培养板(2×10⁵ 个/孔), 培养细胞丰度达 80%后, 用 PBS 洗 2 次, 分别按 MOI 为 0.1、1.0、10.0 时将 PPV 接种于 PK-15 细胞, 吸附 60 min, 期间每隔 15 min 翻转一次, PBS 洗涤液洗去未吸附的病毒, 添加含有 2%胎牛血清的 1640 维持液。

1.3 细胞的收集

将病毒感染后 1、2、3、6、12、24、48、60 和 72 h 的细胞分别用 PBS 洗 2 次, 添加 0.25%胰酶消化细胞, 2 000×g 离心收集 PK-15 细胞, 保存于-80 °C 备用。

1.4 DNA 及 RNA 的提取和反转录

按蛋白酶 K 法提取病毒 DNA, 参照 E.Z.N.A Total RNA Kit I 说明书提取细胞总 RNA, 具体方法和步骤参照文献[8]进行, 紫外分光光度计检测 A 值, 计算其浓度。以提取的总 RNA (1 μg)为模板进行反转录, 按照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)说明书进行, 反应体系为 1 μg RNA、1 μL Oligo (dT)₁₈ Primer, 补 DEPC 水至 12 μL; 70 °C 热变性 15 min, 迅速冰浴

3 min; 再依次加入 4 μL 5×Reaction Buffer、1 μL RNase Inhibitor、2 μL dNTP Mix、1 μL 逆转录酶, 至终体积为 20 μL; 离心后置于 PCR 仪中, 42 °C 60 min, 72 °C 10 min 终止反应。反转录合成的 cDNA 及提取的 DNA 作为荧光定量 PCR 模板。

1.5 引物和相对定量 PCR

引物的设计使用 Primer Premier 5.0 软件, 参照 GenBank 公布序列进行。优化反应条件, 如引物浓度、退火温度和延伸时间等, 使目的基因和持家基因的扩增效率基本保持一致。基因名称、参考序列、退火温度及产物大小见表 1。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL, 其中 SYBR Premix ExTaq 10 μL, 上下游引物 (浓度 10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA 400 ng。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s; 表 1 中所指的退火温度 15 s, 72 °C 30 s; 共进行 40 个循环, 循环结束后升温至 95 °C 30 s, 再降至 55 °C, 开始以 0.5 °C/s 递增至 95 °C, 采集荧光信号得出扩增产物的溶解曲线, 于 10 °C 结束反应。

1.6 数据分析

在实时定量 PCR 中, C_t 值是反映模板中目标基因含量的一个重要指标, 通过样品和标准曲线 C_t 值比较, 可以准确计算出 RNA 含量。另外, 将目标基因与持家基因 β-Actin 比较, 消除由于收集细胞、反转录和加样中操作误差。将 0 h 未接种病毒的细胞因子的表达量设为 1×, 运用 2^{-ΔΔCT} 法分析结果, 公式如下: 目标基因 mRNA 相对表达倍数=2^{-[(待测组目标基因平均 C_t 值-待测组持家基因平均 C_t 值)-(对照组目标基因平均 C_t 值-对照组持家基因平均 C_t 值)]}。

2 结果

2.1 病毒 DNA 水平测定

PK-15 单层细胞感染 PPV 后, 分别按 MOI 为 0.1、1.0、10.0 且 1、2、3、6、12、24、48、60 和 72 h 收集细胞, 提取 DNA, 做荧光定量

表 1 Real-time PCR 引物及其反应条件
Table 1 Primers and conditions used for Real-time PCR assays

基因名称 Genes	基因库登录号 Accession number in GenBank	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物片段 Size of amplicon (bp)
猪细小病毒 PPV	NC001560	AGTTCAATGATTTCATG	TTAACCAACATTCCCAT	56	203
β -Actin	AF508792	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	GCACCGTGTGGCGTAGAGG	55	254
干扰素 β IFN- β	AY687281	CCAACAAAGGAGCAGCAAT	CATCCATCTGCCCATCAAG	59	266
干扰素调节 因子 3 IRF-3	AB116563	GTGGTGCCTACACTCCTGG	TGTGGTCCTCTGCTAAACG	58	103
肿瘤坏死因 子- α TNF- α	X57321	TCACCACGCTCTTCTGC	CCCTCGGCTTTGACATT	55	166
白细胞介素 -18 IL-18	SSU68701	GTTTCATTAACCAGGGAC	CTCTAGTGAGGCTATCTTT	57	117

PCR, 与 β -Actin 进行比较分析, 并将病毒感染 1 h 时病毒 DNA 含量定义为 1 \times , 得出 3 种感染复数在不同时间点病毒 DNA 在细胞中的增殖倍数, 结果见图 1。

由图 1 可知, 病毒感染后 1 h 就可以检测到病毒 DNA, 但病毒量相对较低; 随后开始逐步上升, 在感染后 12 h 病毒开始大量迅速增殖, 在感染后 48 h 且 MOI 为 1.0 时达到最高峰, 从感染

后 12 h 的 68 倍增殖到 1 800 倍左右, 之后病毒 DNA 含量显著下降, 至 72 h 时几乎恢复至原来水平。

2.2 细胞因子测定

PK-15 单层细胞在感染 PPV 后, 分别按 MOI 为 0.1、1.0、10.0 且 1、2、6、12、24、48 和 60 h 收集细胞, 提取 RNA, 反转录获得 cDNA, 做荧光定量 PCR, 并与 β -Actin 进行比较分析, 并以病毒感染 0 h 时 mRNA 含量定义为 1 \times , 得出 3 种感染复数在不同时间点细胞因子 mRNA 的转录倍数, 结果见图 2。

由图 2 可知, IFN- β 在感染后 1 h 表达量开始增加, 当 2 h 且 MOI 为 10.0 时表达量增加显著, 达到 2.4 倍, 此后开始下降; IRF-3 在感染后 1 h 表达量即显著增加, 在 1 h 且 MOI=10.0 时表达量达到 967 倍; TNF- α 在 1 h 时表达量开始增加, 在 2 h 且 MOI 为 1.0 时表达量的差异倍数达到 97, 48 h 后开始下降; IL-18 从 1 h 到 48 h 持续表达, 在 2 h 且 MOI 为 1.0 时表达差异倍数达到 64 倍。

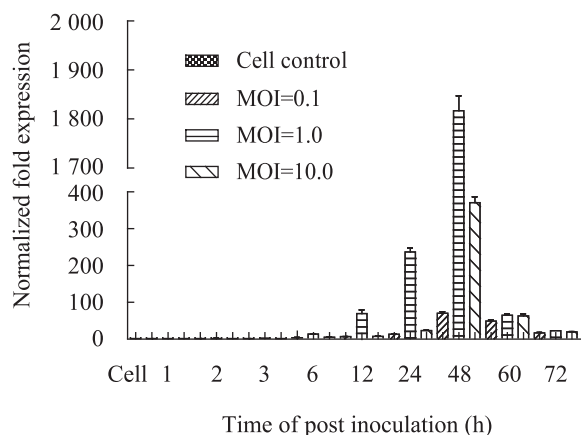


图 1 PPV 在 PK-15 细胞中增殖规律

Fig. 1 The replication of PPV in PK-15 cell

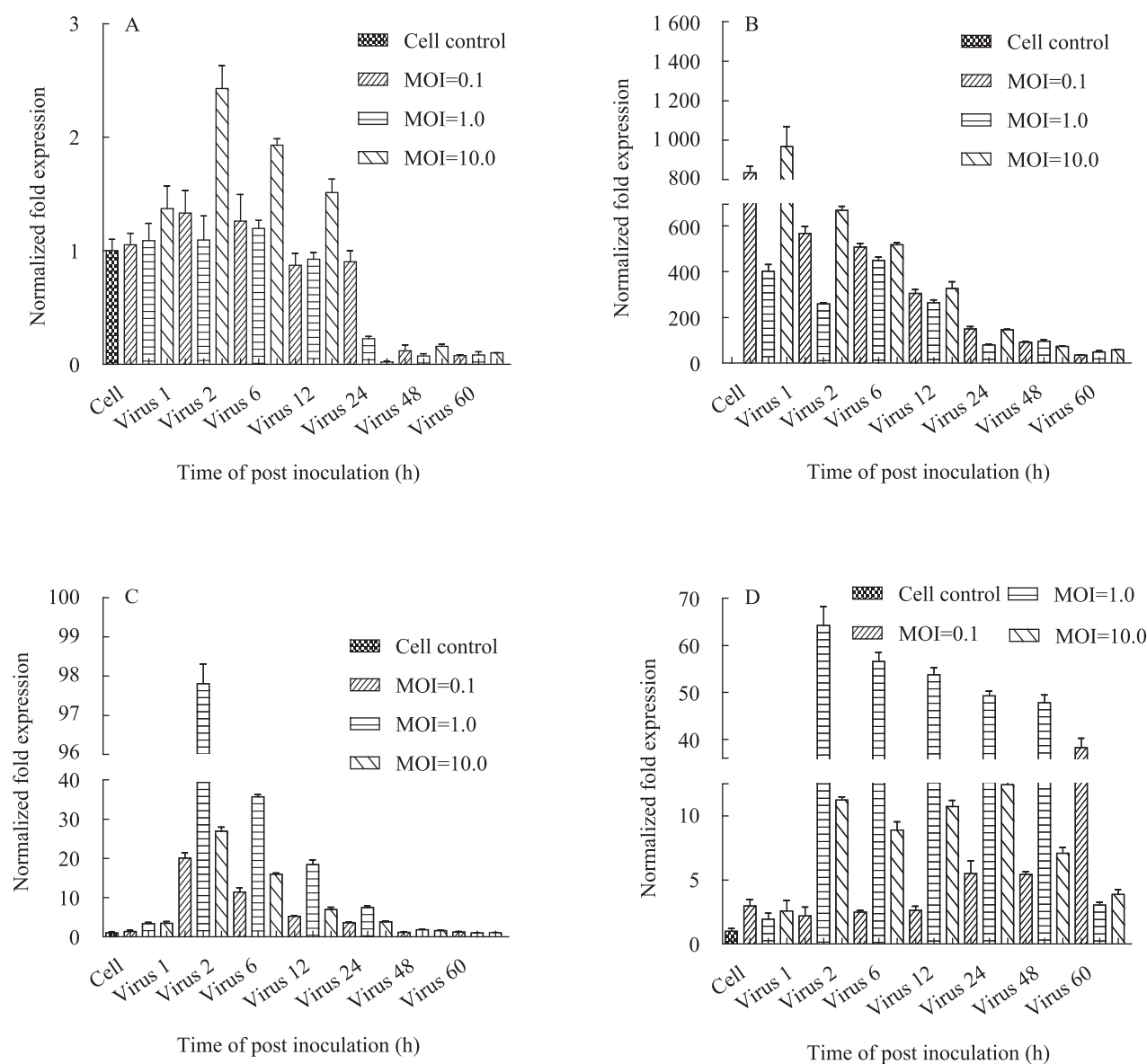


图2 细胞因子的转录谱

Fig. 2 The transcriptional profiles of cytokines

Note: A: IFN- β ; B: IRF-3; C: TNF- α ; D: IL-18.

3 讨论

PPV 可以在多数原代和传代细胞中增殖, 且能引起较明显的细胞病变, 常作为模式病毒研究病毒感染机制和药物的抗病毒作用。本研究证实 PPV 可以快速诱导 PK-15 细胞产生 CPE。PPV 引

起细胞体积缩小, 胞浆浓缩, 染色质凝集, 核固缩、裂解, 质膜内陷将细胞分裂为有膜包裹但内含物不能外泄的凋亡小体^[9]。病毒在感染后 1 h 能检测到病毒, 12 h 后开始大量增殖, 在感染后 48 h 且 MOI 为 1.0 时达最高峰, 达到 1 800 倍左右, 这可能是由于病毒大量增殖, 引起细胞死亡,

导致病毒释放所致。通过 3 种感染复数的比较发现, 病毒以 MOI 为 1.0 时感染细胞所获得的 DNA 含量最高, 而感染高于此剂量或低于此剂量的病毒并不会促进病毒的大量增殖, 这可能是由于适当的病毒感染量可以有效激发病毒的二次感染, 如果细胞感染的病毒颗粒过多, 则导致宿主细胞迅速死亡, 使病毒失去赖以生存的环境, 从而不能达到较高的病毒滴度, 而细胞感染的病毒颗粒过少则不能诱导足够刺激, 造成病毒无法大量复制。另外, 细胞感染病毒的不同时间也会造成细胞中病毒增殖速度的差异, 这种差异可能是由于细胞自身的免疫机制、细胞的营养消耗及病毒数量积聚程度的不同导致的。更重要的是, 本研究结果证明, 猪细小病毒的增殖能力受感染时间和感染复数二者的交互作用影响, 这为解决猪细小病毒疫苗在制备过程中的成本和产量问题提供了有力依据, 也为探索其他病毒的增殖条件提供了有益参考。

干扰素(IFN)分为 I 型和 II 型, IFN- α 和 IFN- β 属 I 型 IFN, IFN- γ 属 II 型 IFN。IFN- β 主要由成纤维细胞产生, 几乎所有脊椎动物均可产生, IFN- β 通过干扰病毒 DNA 或 RNA 复制而抑制病毒增殖, 可促进 NK 细胞的杀伤活性, 促进 MHC I 类分子表达而加强 CTL 对感染病毒细胞的识别和杀伤作用^[10-11]。我们研究发现 PPV 感染 PK-15 细胞 1 h 时 IFN- β 表达量开始增加, 在 2 h 时 IFN- β 表达量显著增加, 且当 MOI 为 10.0 时表达差异倍数达到 2.4 倍, 但是随着时间的延长表达量明显降低, 24 h 后 IFN- β 的表达量变化不显著, 甚至低于对照组细胞的表达量。这一结果说明细胞因子通常处于沉默状态, 只有受到适当的诱导或刺激后才被激活进行转录, 但是转录也受多种因素的调节和控制, 需要一定的时间来完成^[12], 在 2 h 时 IFN- β 表达量开始显著增加。

Chelbi-Alix MK 等研究发现在干扰素发挥作用的过程中, 细胞内与病毒本身相关的某些蛋白如 SOCS-1、PIAS-1、PIAS-3、SHP-1、SHP-2 磷酸酶等均能够负性调节 JAK-STAT 介导的信号, 进而抑制干扰素的抗病毒作用^[13]。Goodbourn 研究也发现在 IFN 经转录和翻译后, 从感染细胞中分泌出去, 造成细胞内的 IFN 表达量有一定的下降^[14]。我们推测, 适当剂量的 PPV 感染后首先导致干扰素的产生, 同时大量病毒感染细胞导致被感染细胞的死亡、崩解, 干扰素随即释放并扩散到细胞间隙中, 进而激活细胞内更深层次的抗病毒机制。为此我们可以确定 PPV 感染 PK-15 细胞可以诱导 IFN- β 的表达, 且最适感染浓度为 MOI 是 10.0 时, 最佳感染时间为 2 h, 为进一步研究 PK-15 细胞中 PPV 的感染机制, 以及开发治疗 PPV 的新型动物医药奠定了基础。

干扰素调节因子 3 (Interferon regulatory factor 3, IRF3) 在大多数细胞中呈高水平组成性表达, 主要以单体形式存在于细胞浆中^[15-16], DNA 或 RNA 病毒感染可以高效诱导 IRF3 的表达, 且 IRF3 在病毒感染早期对 IFN- α/β 基因表达起重要的调节作用^[17-18]。本实验研究发现, PPV 感染 PK-15 细胞 1 h 后 IRF-3 基因的表达量即显著增加, 且 MOI=0.1、MOI=1.0、MOI=10.0 表达量差异均显著, 在 PPV 感染 PK-15 细胞 1 h 时且 MOI=10.0 时 IRF-3 基因的表达量变化倍数最大, 达到近 967 倍, 48 h 后 IRF-3 呈低水平表达, 但仍高于对照组细胞中 IRF-3 mRNA 的表达量。据此我们推测受适量病毒感染的刺激, IRF3 随即被诱导高效表达, 而宿主的免疫系统正是通过 IRF3 高效表达及其与其它细胞因子的相互调节作用, 实现对抗病原微生物的入侵及机体的自我保护机制, 而在病毒感染细胞 1 h 且 MOI=10.0 时即可获得 IRF-3 基因较高的表达量, 可为 IRF-3 相关

药物的研制提供试验参考。

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)由体内的多种细胞产生,但主要是由活化的单核-巨噬细胞系产生的具有广泛生物学活性的细胞因子^[19],TNF- α 能特异性的杀伤肿瘤细胞,诱导细胞凋亡^[20],与机体的免疫反应和急性期炎症反应密切相关,在机体自身防御反应中发挥重要作用^[21-22]。我们的研究发现,PPV感染PK-15细胞1 h且MOI为1.0时TNF- α 基因的表达量即开始增加,在感染2 h后3种感染复数的TNF- α 表达量的均显著增加,尤其当MOI为1.0时基因表达量的差异倍数达到97倍,48 h后TNF- α 基因表达量逐渐下降。当PPV感染PK-15细胞2 h时且MOI为1.0时TNF- α 大量表达,说明TNF- α 参与了细胞早期的抗病毒反应。Maiai研究表明TNF- α 在许多疾病的病理生理过程中起重要的介质作用,且干扰素能增加某些肿瘤细胞表面的TNF受体数量,从而实现干扰素与肿瘤坏死因子的协同抗肿瘤效应^[23]。我们研究发现干扰素在PK-15感染PPV后2 h表达量显著增加,进而可以推测某些干扰素可能上调了TNF- α 的表达量,在感染初期发挥抗病毒的生物学效应。本实验结果表明当MOI为1.0时,TNF- α 的表达量增加尤其显著,但是随着感染时间的延长,TNF- α 的表达量也在急剧下降。这一结果说明在适量病毒刺激下,细胞内TNF- α 分泌参与细胞的免疫反应,有利于机体对PPV的清除,但过量的分泌可能会打破细胞内免疫平衡,造成细胞的死亡、崩解,引起或加重感染程度,对机体产生不利的影响。因此应由适当药物降低TNF- α 的分泌水平,减轻免疫反应,可能有利于疾病的恢复。本实验结果显示PPV感染PK-15细胞2 h且MOI为1.0时TNF- α 基因的表达量差异最显著,可为临床治疗PPV提供实验依据和理论参考。

白细胞介素 18 (IL-18)是在多种细胞中都广

泛表达的多向性效应天然免疫调节因子^[24],可诱导并增强造血细胞及非造血细胞的早期炎症反应,主要在炎症反应早期起关键作用^[25]。IL-18可以激活对病毒清理起关键作用的CD8+T细胞,有效防御病毒的入侵。已经证实IL-18对痘苗病毒、小鼠腺病毒、单纯疱疹病毒以及A型流感病毒的复制和表达发挥抑制作用^[26]。我们研究发现,PPV感染PK-15细胞1 h时,不同的感染复数IL-18基因的表达量均有所增加,2 h时当MOI为1.0时IL-18的表达量增加显著,表达差异倍数达到64倍之多,48 h后IL-18表达量有所下降,但仍高于对照组细胞中IL-18的表达量。为此我们推测IL-18作为细胞因子网络中关键的促炎症因子参与了机体抵抗PPV感染的发生、发展过程,其机制可能包括调节Th1/Th2细胞比例、增强NK细胞活性、诱导IFN- γ 表达和炎性细胞因子的产生,从而发挥其抗病毒感染效应。本实验结果也可以说明不同的感染复数及不同的感染时间均可以获得IL-18基因的表达,但是在2 h且MOI为1.0时可以获得高效的表达量,为进一步研究有关IL-18的抗病毒药物提供了必要的实验依据和理论支持。

本实验利用荧光定量PCR测定和分析感染复数分别为0.1、1.0、10.0对PK-15细胞感染PPV后IFN- β 、IRF3、TNF- α 和IL-18 mRNA表达量的变化,在不同时间不同的感染复数细胞因子的表达量均有显著变化,其中,在2 h且MOI为10.0时IFN- β 的表达量变化显著,在1 h且MOI为10.0时IRF3的表达量显著增加,在2 h且MOI为1.0时IRF3表达量差异倍数最大,在2 h且MOI为1.0时IL-18基因的表达变化量最大,为以后PPV分子致病机制,评价疫苗的细胞免疫效果和药物抗病毒的药效机制提供了实验基础和依据。

参 考 文 献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997: 1148–1182.
- [2] Letchworth GJ, Rodriguez LL, Del Cbarrera J. Vesicular stomatitis[J]. The Veterinary Journal, 1999, 157(3): 239–260.
- [3] Darwich L, Pié S, Rovira A, et al. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. Journal of General Virology, 2003, 84(8): 2117–2125.
- [4] 陈刚, 郑大海, 杨仇生, 等. I 型干扰素及其在抗病毒和抗细菌感染中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(2): 83–87.
- [5] 刘星, 石贺欣, 王琛, 等. 干扰素调控因子3: 细胞抗病毒反应的核心转录因子[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(8): 817–825.
- [6] Zuccari DAPC, Castro R, Gelaleti GB, et al. Interleukin-8 expression associated with canine mammary tumors[J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10(3): 1522–1532.
- [7] Keadle TL, Usui N, Laycock KA, et al. IL-1 and TNF- α are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2000, 41(1): 96–102.
- [8] 萨姆布鲁克, 拉塞尔 DW. 黄陪堂, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 463–471.
- [9] Vvasudevacharya J, Basak S, Srinivas RV, et al. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of porcine parvovirus, strain NADL-2[J]. Virology, 2001, 178(2): 611–616.
- [10] Salmom P, Le Cotonnec JY, Galazka A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human interferon- β in healthy male volunteers[J]. Journal of Interferon and Cytokine Research, 1996, 16(10): 759–764.
- [11] Chang SR, Wang KJ, Lu YF, et al. Characterization of early gamma interferon (IFN- γ) expression during murine listeriosis: identification of N K1. 1⁺ CD11c⁺ cells as the primary IFN- γ -expressing cells[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(3): 1167–1176.
- [12] Lim BJ, Lee D, Hong SW, et al. Toll-like receptor 4 signaling is involved in IgA-stimulated mesangial cell activation[J]. Yonsei Medical Journal, 2011, 52(4): 610–615.
- [13] Chelbi-Alix MK, Wiezerbin J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research[J]. Biochimie, 2007, 89(6/7): 713–718.
- [14] Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures[J]. Journal of General Virology, 2008, 89(1): 1–47.
- [15] Hiscott J. Convergence of the NF-kappa B and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response[J]. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2007, 18(5/6): 483–490.
- [16] Fitzgerald KA, Mcwhirter SM, Fala KL, et al. IKK ϵ , epsilon and TBK1 are essential componets of the IRF3 signaling pathway[J]. Nature Immunology, 2003, 4(5): 491–496.
- [17] Zhong B, Yang Y, Li S, et al. The adaptor protein MITA links Virus-sensing receptors to IRF-3 transcription factor activation[J]. Immunity, 2008, 29(4): 538–550.
- [18] Juang YT, Lowther W, Kelluw M, et al. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(17): 9837–9842.
- [19] Kleine TO, Zwerenz P, Zöfel P, et al. New and old diagnostic markers of meningitis in cerebrospinal fluid (CSF)[J]. Brain Research Bulletin, 2003, 61(3): 287–297.
- [20] Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration[J]. Journal of Clinical Investigation, 1995, 96(2): 1042–1052.
- [21] Singh J, Suruchi A. AntiTNF- α strategy: present status of this therapeutic paradigm[J]. Indian Journal of Pharmacology, 2004, 36(1): 10–14.

- [22] Tracey KJ, Lane F, Hilkens CM, et al. Introduction of tolerance by TNF-treated dendritic cells[J]. *Lancet*, 1990, 336(8648): 1721-1728.
- [23] Maia SR. Infliximab treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 2004, 30(2): 329-347.
- [24] Hung J, McQuillan BM, Chapman CM, et al. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, 25(6): 1268-1273.
- [25] Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 73(2): 213-224.
- [26] Kanda T, Tanaka T, Sekiguchi K, et al. Effect of interleukin-18 on viral myocarditis: enhancement of interferon- γ and natural killer cell activity[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2000, 32(12): 2163-2171.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *ns*p14 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,2000: 4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华璐等. 核农学进展[M]. 北京:中国农业出版社,1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2012-00-00; 接受日期: 2012-00-00

(下转 p.1470)