

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.03.007

奥司他韦对寒冷刺激致鼻黏膜免疫屏障功能低下模型小鼠的保护作用*

晏雪梅, 杨居崩, 聂发龙, 廖 陈, 李秀芳[△]

(云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要:目的 探讨奥司他韦对寒冷刺激致鼻黏膜免疫屏障功能低下(MNMBD)模型小鼠的保护作用。方法 将38只SPF级昆明种小鼠随机分为正常组(12只,等体积蒸馏水)、模型组(12只,等体积蒸馏水)和奥司他韦组(14只,奥司他韦40 mg/kg)。灌胃给药,每日1次,连续3次。末次给药30 min后,模型组和奥司他韦组小鼠置-20℃2 h,再转移至25℃30 min,循环刺激2次以建立寒冷刺激致鼻黏膜免疫屏障功能低下模型小鼠;正常组小鼠不予任何刺激。采用免疫印迹(Western Blot)法检测小鼠鼻黏膜组织免疫球蛋白A(IgA)、干扰素 λ (IFN- λ)、干扰素 λ 受体1(IFNLR1)、白细胞介素10R β (IL-10R β)、干扰素调节因子9(IRF9)和黏病毒抗性蛋白1(Mx-1)表达水平。结果 与正常组比较,模型组小鼠IgA,IFN- λ ,IFNLR1,IL-10R β ,IRF9,Mx-1蛋白表达水平均显著下降($P<0.05$);与模型组比较,奥司他韦组小鼠IgA,IFN- λ ,IL-10R β ,IRF9,Mx-1蛋白表达水平均显著上升($P<0.05$)。结论 奥司他韦可提高小鼠鼻黏膜免疫屏障功能,其作用与促进小鼠鼻黏膜组织中IgA蛋白表达和激活IFN- λ 信号通路相关。

关键词:奥司他韦;寒冷刺激;免疫球蛋白A;干扰素 λ ;小鼠

中图分类号:R965;R978.7

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)03-0021-04

Effect of Oseltamivir on Mouse Nasal Mucosal Immune Barrier Dysfunction Induced by Cold Stimulation

YAN Xuemei, YANG Jubeng, NIE Falong, LIAO Chen, LI Xiufang

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Oseltamivir on the mouse nasal mucosal immune barrier dysfunction (MNMBD) induced by cold stimulation. **Methods** Totally 38 SPF Kunming mice were randomly divided into normal group (12 mice, equal volume of distilled water), model group (12 mice, equal volume of distilled water) and Oseltamivir group (14 mice, 40 mg/kg of Oseltamivir). The mice were given intragastric administration once a day for three times. 30 min after the last administration, the mice in the model group and Oseltamivir group were placed at -20℃ for 2 h, then they were transferred to 25℃ for 30 min, and were circularly stimulated twice to establish the MNMBD model induced by cold stimulation, the mice in the normal group were not stimulated. The expression levels of immunoglobulin A (IgA), interferon- λ (IFN- λ), interferon- λ receptor 1 (IFNLR1), interleukin-10R β (IL-10R β), interferon regulatory factor 9 (IRF9) and myxovirus resistance protein-1 (Mx-1) in the nasal mucosa tissues of mice were detected by

*基金项目:国家自然科学基金[81860724];云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项项目[2019FF002(-054)]。

第一作者:晏雪梅,女,硕士研究生,研究方向为中医治法与中药药效的关系,(电子信箱)982241467@qq.com。

[△]通信作者:李秀芳,女,博士研究生,教授,研究方向为中药药理学,(电子信箱)sofinelxf@163.com。

- [3] 林雪玲,郑 蓉,何天友,等. 台湾牛樟总 DNA 提取方法研究及其 PCR 验证[J]. 安徽农学通报,2019,25(Z1):7-9.
- [4] 杨海宽,章 挺,汪信东,等. 牛樟叶精油化学成分分析及类型划分研究[J]. 江西农业大学学报,2016,38(4):668-673.
- [5] COSTA JPD, VITORINO R, SILVA GM, et al. A synopsis on aging - Theories, mechanisms and future prospects[J]. Ageing Res Rev, 2016,29:90-112.
- [6] BARCELOS IP, HAAS RH. CoQ10 and Aging[J]. Biology, 2019, 8(2):28.
- [7] 张丝雨,邓剑冷,赵程程,等. 抗疲劳、抗衰老中药的性味及其主要成分的研究[J]. 中医药导报,2017,23(7):74-76.
- [8] CHEN P, CHEN FC, ZHOU BH. Leonurine ameliorates D-galactose-induced aging in mice through activation of the Nrf2 signalling pathway[J]. Aging, 2019, 11(18):7339-7356.
- [9] 赵凡凡,周玉枝,高 丽,等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展[J]. 药科学报,2017,52(3):347-354.
- [10] ISLAM MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction - linked neurodegenerative disorders[J]. Neurological Research, 2016,39(1):73-82.
- [11] WANG Y, BRANICKY R, NOË A, et al. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling[J]. J Cell Biol, 2018,217(6):1915-1928.
- [12] NANDI A, YAN LJ, JANA CK, et al. Role of catalase in oxidative stress - and age - associated degenerative diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019,2019:9613090.
- [13] SAHNI S, HICKOK JR, THOMAS DD. Nitric Oxide Reduces Oxidative Stress in Cancer Cells by Forming Dinitrosyliron Complexes[J]. Nitric Oxide, 2018,76(1):37-44.
- [14] MORALES RC, BAHNSON ESM, HAVELKA GE, et al. Sex - based differential regulation of oxidative stress in the vasculature by nitric oxide[J]. Redox Biology, 2015,4:226-233.

(收稿日期:2020-05-25;修回日期:2020-08-15)

western blot. **Results** The protein expression of IgA, IFN- λ , IFNLR1, IL-10R β , IRF9 and Mx-1 in the model group were significantly lower than that in the normal group ($P < 0.05$). The protein expressions of IgA, IFN- λ , IL-10R β , IRF9 and Mx-1 in Oseltamivir group were significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Oseltamivir can improve the immune barrier function of nasal mucosal tissues of mice, which is related to promoting the protein expression of IgA in nasal mucosa tissues and activating IFN- λ signal pathway.

Key words: Oseltamivir; cold stimulation; immunoglobulin A; interferon- λ ; mice

上呼吸道感染(URTI)为常见呼吸系统疾病,包括流行性感(简称流感)、普通感冒、病毒性咽炎等,URTI向下呼吸道迁延而出现的多种并发症是导致 URTI 患者致残或致死的重要原因。2018 年, KWONG 等^[1]指出,急性心肌梗死与急性 URTI 尤其是流感之间关系密切,患者在确认感染流感后的前 7 d,急性心肌梗死发作的概率可增加 6 倍。一项针对感染甲型流感(H7N9)幸存病例出院后 2 年的随访调查显示,50% 的幸存者在感染治愈后的 1 年内仍存在严重的通气功能障碍^[2]。由于 80% 以上的 URTI 由病毒感染引起,故接种疫苗和使用抗病毒药物是临床对因治疗最有效的手段。目前,临床常用的 URTI 抗病毒药物包括神经氨酸酶抑制剂、脱氧核糖核酸(RNA)聚合酶抑制剂和 M₂ 蛋白离子通道抑制剂。神经氨酸酶抑制剂由于耐药率相对较低,作用特异性较强,可阻碍病毒颗粒的释放,高效抗病毒。奥司他韦是神经氨酸酶抑制剂,可竞争性结合流感病毒表面的神经氨酸酶活性,干扰病毒从宿主细胞释放,阻碍病毒扩散,对甲型和乙型流感病毒具有较好的抑制作用。UYEKI^[3]研究发现,奥司他韦可降低疾病的严重程度和死亡率。H1N1 流感病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒等均可由呼吸道进入机体,引发疾病,覆盖于呼吸道的黏膜系统成为机体防御病毒、细菌等病原微生物经口鼻入侵的第一道防线。研究证实,呼吸道黏膜屏障结构破坏或功能低下与 URTI 密切相关^[4],提高呼吸道黏膜屏障的防御能力是防治 URTI 的重要途径。本研究中探讨了奥司他韦对寒冷刺激所致小鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下(MNMBD)的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器与动物

试剂:磷酸奥司他韦颗粒(宜昌东阳光长江药业股份有限公司,批号为 0581903053); Mouse IgA Antibody (美国 Novus Biologicals 公司,批号为 A30); β -Actin Polyclonal antibody(批号为 00078629), GAPDH Rabbit Polyclonal antibody(批号为 00044915),均购自美国 Proteintech 公司;干扰素 λ 受体 1(IFNLR1) Antibody(英国 biorbyt 公司,批号为 CBI7514);白细胞介素 10R β (IL-10R β) Antibody(美国 Santa Cruz 公司,批号为 D1015);干扰素调节因子 9(IRF9) Antibody(美国 Cell Signaling 公司,批号为 288455); Anti-IL-28A Antibody(批号为 GR24656-5), Anti-黏病毒抗性蛋白 1(Mx-1) Antibody

(批号为 GR3190794-16),均购自美国 Abcam 公司。

仪器: Infinite M200 PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); XS125A 型分析天平(瑞士普利赛斯公司,精度为十万分之一); HITACHI CF16RX II 型台式低速离心机(日本 Hitachi Koki 公司); PowerPac U 型电泳仪、Mini-Proto 型湿转仪,均购自美国伯乐公司; Bio Spectrum 型 UVP 凝胶成像分析系统(美国 Spectrum 公司)。

动物: SPF 级昆明种小鼠 38 只,雄性,体质量 18 ~ 20 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,许可证号为 SCXK(川)2015-030,合格证号为 51203500009727。饲养条件为光照 12 h、黑暗 12 h,温度 18 ~ 22 °C,相对湿度 40% ~ 60%。

1.2 方法

复制寒冷刺激致小鼠 MNMBD 模型^[5-6]。

将小鼠随机分为正常组(12 只)、模型组(12 只)、奥司他韦组(14 只)。正常组和模型组灌胃蒸馏水,奥司他韦组小鼠提前灌胃奥司他韦,临用时按临床成人等效量的 2 倍量(40 mg/kg)进行配制,每 10 g 体质量 0.2 mL 灌胃给药,1 次/日,连续给药 3 次。正常组不予任何刺激;模型组和奥司他韦组小鼠均于末次给药 30 min 后置 -20 °C 环境中 1 h,再置 25 °C 环境中 30 min,循环刺激 2 次,造模后正常给予水和食物。于造模结束后 24 h,过量麻醉,处死小鼠,摘取鼻黏膜,使用免疫印迹(Western Blot)法检测鼻黏膜组织中免疫球蛋白 A(IgA)、干扰素 λ (IFN- λ)、IFNLR1、IL-10R β 、IRF9 和 Mx-1 蛋白表达水平。

模型组小鼠鼻黏膜组织中,IgA 和 IFN- λ 蛋白表达水平与正常组相比,明显下降,若差异有统计学意义则判断为造模成功。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 法检验,方差不齐者采用 Tamhane's 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 IgA 蛋白表达的影响

结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 IgA 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,奥司他韦组小鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达水平显著升高

($P < 0.01$)。详见图 1 A。

2.2 对 IFN- λ 蛋白表达的影响^[7]

结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 IFN- λ 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,奥司他韦组小鼠鼻黏膜组织中 IFN- λ 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。详见图 1 B。

2.3 对 IFNLR1 和 IL-10R β 蛋白表达的影响

结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 IFNLR1 和 IL-10R β 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,奥司他韦组小鼠鼻黏膜组织中 IFNLR1 蛋白表达水平呈升高趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),IL-10R β 蛋白表达水平明显高于模型组($P < 0.01$)。详见图 1 C 和图 1 D。

2.4 对 IRF9 蛋白表达的影响

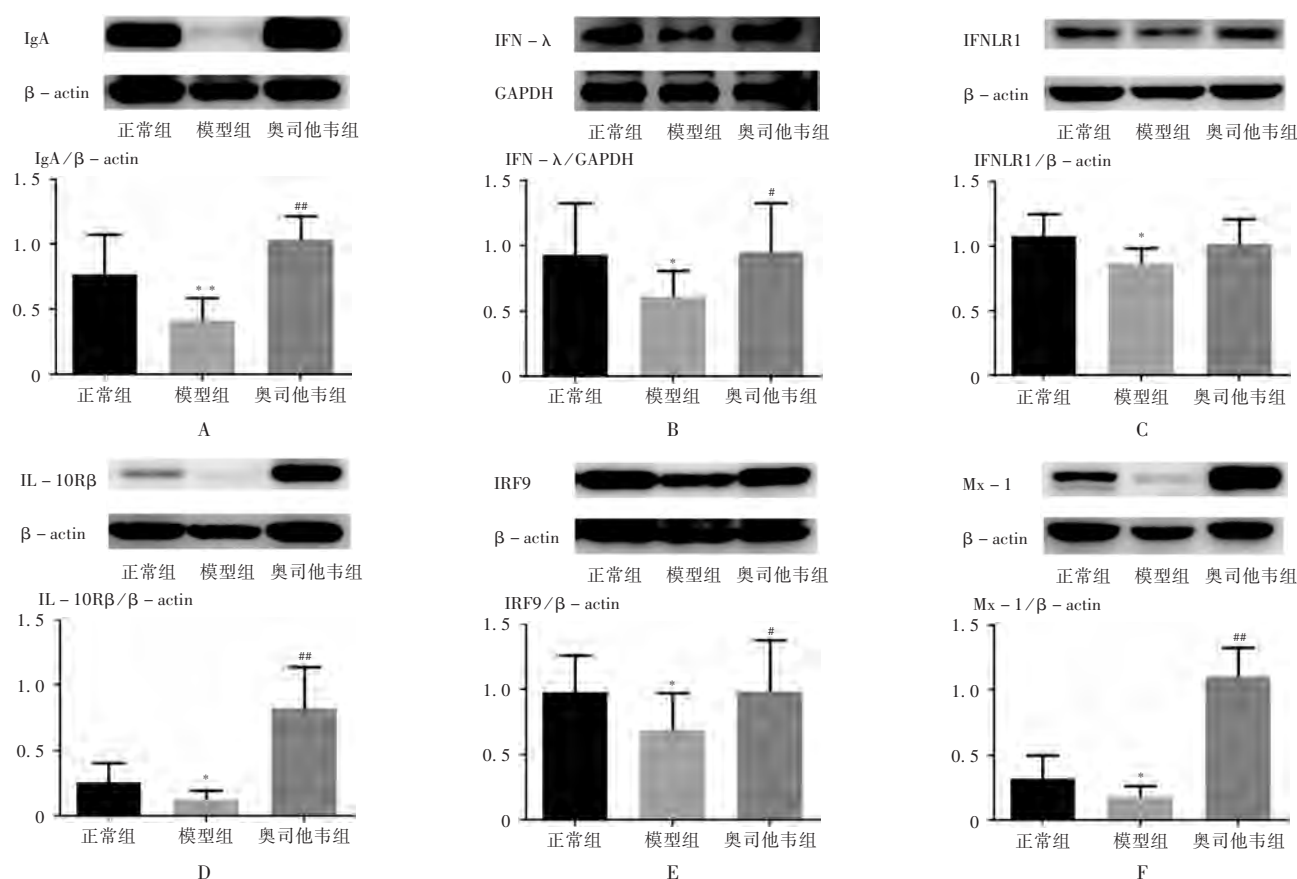
结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 IRF9 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,奥司他韦组小鼠鼻黏膜组织中 IRF9 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。详见图 1 E。

2.5 对 Mx-1 蛋白表达的影响

结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 Mx-1 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,奥司他韦组小鼠鼻黏膜组织中 Mx-1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。详见图 1 F。

3 讨论

上呼吸道与外界直接相通,覆盖于除鼻前庭外鼻腔结构的鼻黏膜,始终暴露于病原菌、共生菌和环境化学物质等各种物质中,由鼻黏膜激发的免疫效应对于防御病原体经鼻进入机体至关重要。研究表明,鼻黏膜屏障结构遭到破坏或功能低下可为病原微生物的入侵和定植创造条件,是上呼吸道感染发生的重要原因之一^[8-9]。分泌型免疫球蛋白 A(sIgA)是黏膜免疫系统的主要效应分子,在机体第一线屏障中起重要作用,可防止病原体进入黏膜上皮,保护黏膜表面免受病原体和致病菌的侵害^[10-11]。本研究结果显示,MNMBD 模型小鼠鼻黏膜组织中 IgA 蛋白表达明显下降,给予奥司他韦后可显著促进小鼠鼻黏膜组织中的 IgA 蛋白表达,提示其可提高小



注:与正常组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.01$,# $P < 0.05$ 。

A. IgA B. IFN- λ C. IFNLR1 D. IL-10R β E. IRF9 F. Mx-1

图 1 奥司他韦对 MNMBD 模型小鼠鼻黏膜组织中免疫屏障功能的影响

Note: Compared with those in the normal group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; compared with those in the model group, ** $P < 0.01$, # $P < 0.05$.

A. IgA B. IFN- λ C. IFNLR1 D. IL-10R β E. IRF9 F. Mx-1

Fig. 1 Effect of Oseltamivir on the immune barrier function in the nasal mucosa tissues of MNMBD model mice

鼠鼻黏膜免疫屏障功能。

IFN- λ 是近 15 年才发现的特异性产生于黏膜组织的免疫效应分子,在抗病毒和免疫调节方面发挥重要作用,具有参与维持上呼吸道黏膜免疫屏障功能的重要作用,可通过诱导抗病毒蛋白的表达防止病毒侵袭,维持黏膜屏障功能的完整性。有研究显示,寒冷刺激可使 IFN- β 诱导的抗病毒反应下降^[12]。本研究结果显示,反复的寒冷刺激可降低小鼠鼻黏膜 IFN- λ 蛋白表达。IFN- λ 的受体为 IFNLR1 和 IL-10R β 的异源二聚体,IFN- λ 与其受体结合,启动 Janus 激酶-信号转导及转录激活因子(JAK-STAT)信号级联反应,JAK-STAT 信号转导通路是将细胞因子刺激信号经细胞膜进入细胞核内部的重要途径,IFN 刺激基因的激活在细胞内建立抗病毒状态,促使抗病毒蛋白因子如 2',5'-寡聚腺苷酸合成酶(OAS)、核糖核酸依赖性蛋白酶(PKR)和 Mx-1 的释放,抑制病毒复制,发挥抗病毒作用^[13]。可见,IFN- λ 并非直接抑制或杀死病毒,而是通过启动相关抗病毒基因的表达,促使多种抗病毒蛋白的产生,从而发挥抗病毒作用^[14-15]。Mx-1 是关键的抗病毒效应因子^[16-19],Mx-1 蛋白是 IFN- λ 关键的抗病毒效应蛋白^[20-21],是控制多种病毒的天然免疫系统的高度有效的抗病毒限制因子,可阻止病毒在细胞内的传播及复制。本研究结果显示,寒冷刺激后,小鼠组织中 IgA, IFN- λ , IFNLR1, IL-10R β , IRF9, Mx-1 蛋白表达水平均下降。可见,寒冷刺激造成了小鼠鼻黏膜免疫屏障下降,这或许是受凉后易发生 URTI 的原因之一。给予奥司他韦干预后,可明显提高小鼠鼻黏膜 IgA, IFN- λ , IFNLR1, IL-10R β , IRF9, Mx-1 蛋白表达水平。可见,奥司他韦可提高寒冷刺激所致小鼠鼻黏膜免疫屏障的功能,作用机制与激活了小鼠鼻黏膜组织中 IFN- λ 相关信号通路有关。

参考文献

- [1] KWONG JC, SCHWARTZ KL, CAMPITELLI MA, et al. Acute myocardial infarction after laboratory - confirmed influenza[J]. N Engl J Med, 2018, 378(4): 345 - 353.
- [2] CHEN JJ, WU J, HAO SR, et al. Long term outcomes in survivors of epidemic Influenza A (H7N9) virus infection[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17275 - 17282.
- [3] UYEKI T. Antiviral treatment for patients hospitalized with 2009 pandemic influenza A (H1N1) [J]. N Engl J Med, 2009, 361(23): e110.
- [4] IWASAKI A, PILLAI PS. Innate immunity to influenza virus infection[J]. Nat Rev Immunol. 2014, 14(5): 315 - 328.
- [5] XIAO MM, PAN CS, LIU YY, et al. Post - Treatment with Ma - Huang - Tang Ameliorates Cold - Warm - Cycles Induced Rat Lung Injury[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 312.
- [6] 李 娟, 雷 娜, 段小花, 等. 寒冷刺激致小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(8): 1662 - 1664.
- [7] LASFAR A, LEWIS - ANTES A, SMIMOV SV, et al. Characterization of the mouse IFN - lambda ligand - receptor system: IFN - lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4468 - 4477.
- [8] THOMAS RJ. Particle Size and Pathogenicity in the Respiratory Tract[J]. Virulence, 2013, 4(8): 847 - 858.
- [9] ZUERCHER AW, CEBRA JJ. Structural and functional differences between putative mucosal inductive sites of the rat[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(11): 3191 - 3196.
- [10] MACPHERSON AJ, HUNZIKER L, MCCOY K, et al. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non - pathogenic microorganisms[J]. Microbes and Infection, 2001, 3(12): 1021 - 1035.
- [11] MANTIS NJ, FORBES SJ. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders[J]. Immunological Investigations, 2010, 39(4 - 5): 383 - 406.
- [12] BOONARKART C, SUPTAWIWAT O, SAKORN K, et al. Exposure to cold impairs interferon - induced antiviral defense[J]. Arch Virol, 2017, 162(8): 2231 - 2237.
- [13] SCHNEIDER WM, CHEVILLOTTE MD, RICE CM. Interferon - stimulated genes: a complex web of host defenses[J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32(1): 513 - 545.
- [14] 孙业平, 高 福. 天然免疫抗病毒效应分子 Mx 蛋白的结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(7): 699 - 706.
- [15] MACMICKING JD. IFN - inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens[J]. Trends Immunol, 2004, 25(11): 601 - 609.
- [16] SCHOGGINS JW, WILSON SJ, PANIS M, et al. Corrigendum: A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. Nature, 2011, 472(7344): 481 - 485.
- [17] SADLER AJ, WILLIAMS BRG. Interferon - inducible antiviral effectors[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(7): 559 - 568.
- [18] STAEHELI P, HALLER O. Interferon - induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus[J]. Interferon, 1987, 8: 1 - 23.
- [19] GRIMM D, STAEHELI P, HUFBAUER M, et al. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(16): 6806 - 6811.
- [20] HALLER O, STAEHELI P, SCHWEMMLE M, et al. Mx GTPases: dynamin - like antiviral machines of innate immunity[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(3): 154 - 163.
- [21] HALLER O, KOCHS G. Interferon - induced mx proteins: dynamin - like GTPases with antiviral activity[J]. Traffic, 2002, 3(10): 710 - 717.

(收稿日期: 2020 - 06 - 23; 修回日期: 2020 - 09 - 30)