

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.12.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210601.1239.002.html\(2021-06-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210601.1239.002.html(2021-06-01))

红树林淡紫拟青霉 EPS 对 HSV-1 颅内感染小鼠脑组织 NF- κ B 表达的影响*

王永霞,王娇娇,黄燕妮,林英姿[△]

(海南医学院教育部热带病重点实验室,海口 571109)

[摘要] **目的** 探讨红树林淡紫拟青霉胞外多糖(EPS)对单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)颅内感染小鼠脑组织核因子 κ B(NF- κ B)表达的影响。**方法** 除阴性对照组外,其他各组小鼠均颅内注射病毒建立 HSV-1 颅内感染模型,次日起实验组分别经腹腔给予低剂量、中剂量和高剂量 EPS 干预,药物对照组用阿昔洛韦干预,病毒对照组和阴性对照组均用生理盐水干预,连续注射 7 d。观察各组小鼠病变、死亡情况,免疫组织化学检测脑组织 NF- κ B 表达情况,RT-qPCR 检测脑组织 NF- κ B mRNA 表达。**结果** 除病毒对照组小鼠死亡率明显高于阴性对照组($P < 0.05$)外,其他各组间无明显差异($P > 0.05$)。免疫组织化学和 RT-qPCR 检测均发现,与病毒对照组相比,实验组小鼠脑组织 NF- κ B 表达均有一定程度下调,其中高剂量 EPS 组下调最明显($P < 0.05$),低剂量、中剂量 EPS 组下调不明显($P > 0.05$)。低剂量、中剂量 EPS 组 NF- κ B 表达与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),高剂量 EPS 组与阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 红树林淡紫拟青霉 EPS 具有一定抑制 HSV-1 颅内感染小鼠脑组织 NF- κ B 表达的作用,且该抑制作用呈一定剂量依赖性。

[关键词] 红树林淡紫拟青霉;胞外多糖;单纯疱疹病毒 1 型;核因子 κ B**[中图法分类号]** R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)12-1988-05

Effects of extracellular polysaccharides from mangrove forest *Paecilomyces Lilacinus* on expression of NF- κ B in HSV-1 intracranial infection mice*

WANG Yongxia, WANG Jiaojiao, HUANG Yanni, LIN Yingzi[△]

(Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Disease of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the extracellular polysaccharides (EPS) isolated from mangrove forest *Paecilomyces lilacinus* on the expression of NF- κ B in HSV-1 intracranial infection mice brain tissue. **Methods** Except for the negative control group, the other groups were intracranially injected with virus for constructing the HSV-1 intracranial infection model. The experiment group was given the low dose, middle dose and high dose EPS intervention, the medication control group used the acyclovir intervention, the viral control group and negative control group used the normal saline intervention. The injection consecutively lasted for 7 d. Then the mice lesions and death were observed in each group. The expression level of brain tissue NF- κ B was detected by the immunohistochemical technique and the expression level of NF- κ B mRNA was detected by RT-qPCR. **Results** Except the death rate in the viral control group was significantly higher than that in the negative control group, there was no significant difference among the other groups ($P > 0.05$). The immunohistochemistry and RT-qPCR found that compared with the viral control group, the expression of brain tissue NF- κ B in the experiment group had some degrees of down-regulation, in which the down regulation in the high dose EPS group was most significant ($P < 0.05$), and the down regulation in the low dose and middle dose EPS groups was unobvious ($P > 0.05$). The NF- κ B expression level had significant

* **基金项目:**国家自然科学基金项目(81560006);海南省重点研发项目(SZD180007);海南医学院省级及校级大学生创新创业项目(201811810046)。 **作者简介:**王永霞(1971—),副教授,硕士,主要从事抗感染免疫研究。 [△] **通信作者,**E-mail:13198997808@126.com。

differences in the low dose and middle dose EPS groups compared with the negative control group ($P < 0.05$), while no significant the difference was found between the high dose EPS group and negative control group ($P > 0.05$). **Conclusion** EPS from mangrove forest *Paecilomyces lilacinus* may be a potential candidate for inhibiting NF- κ B expression in mice brain tissue with HSV-1 infection with a dose-dependent manner.

[Key words] paecilomyces lilacinus; extracellular polysaccharides; herpes simplex virus type 1; NF- κ B

单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)属于 α 疱疹病毒科的双链 DNA 病毒,人群感染普遍,是引起疱疹性口炎、咽峡炎、皮肤复发性单纯疱疹及疱疹性角膜炎的常见病原体,若累及中枢神经系统,可引起单纯疱疹病毒性脑炎(herpes simplex viral encephalitis, HSE),其是该病毒引起的最严重病变,占病毒性脑炎的 2%~19%。尽管 HSV-1 和 HSV-2 均可引起 HSE,但 94%~96% 的患者由 HSV-1 感染引起^[1-2],未经治疗的 HSE 患者病死率高达 80%,存活者亦可能遗留不同程度的智力障碍和肢体活动困难等后遗症^[3-4]。研究发现,HSV-1 颅内感染者脑组织中核因子 κ B(NF- κ B)信号通路激活介导的炎性反应参与了脑组织病理损伤,可能是病毒包膜糖蛋白与宿主细胞 Toll 样受体(TLR)的结合触发了近膜端 NF- κ B 活化的级联反应,进而激活固有免疫和适应性免疫应答,促进细胞因子、趋化因子及黏附分子的表达,加重了病毒感染后的炎性反应^[5-6],因此,抑制其表达可能具有一定的抗病毒作用。

课题组前期从海南红树林中分离到一株淡紫拟青霉,其产生的胞外多糖(EPS)经体外实验证实可通过 TLR 调节 HSV-1 感染细胞的免疫功能^[7],改善病毒所致的细胞病变效应,但该作用是否通过对 NF- κ B 信号通路的调节完成有待证实。本研究拟通过颅内注射 HSV-1 建立小鼠感染模型,采用不同剂量的红树林淡紫拟青霉 EPS 经腹腔给药干预,观察其对小鼠脑组织 NF- κ B 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 周龄健康昆明种小鼠 90 只,体重 18~22 g, SPF 级,雄性,购自长沙市天勤生物技术有限公司[许可证号 SCXK(湘)2014-0011]。

1.1.2 主要试剂与仪器

红树林淡紫拟青霉 EPS 由本室制备和鉴定; HSV-1 病毒液由本室保存。非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)购自中科院干细胞库(SCSP-520、CCL-81TM),小鼠 NF- κ B p65 免疫组织化学试剂盒购自上海雅吉

生物科技有限公司;动物组织总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技(北京)有限公司;RNA 保护液、逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

生物安全柜(SG403A-HE)购自美国 Baker 公司; CO₂ 培养箱(MCO-18AC)购自松下电器有限公司; AE2000 倒置生物显微镜购自上海光学仪器厂;超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-950E)和高通量组织研磨器均购自宁波新芝生物科技有限公司;高速冷冻离心机购自美国 Beckman 公司;荧光定量 PCR 仪购自德国 Biometra GmbH 公司;全自动凝胶成像分析仪(JY04S-3E)购自北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒滴定

HSV-1 于 Vero 细胞中传代 2 次增加病毒毒力。将收获的病毒接种于已长成单层的 Vero 细胞中,逐日观察细胞病变情况(cytopathic effect, CPE),当 CPE 达“+++~++++”时收获病毒,采用 Reed-Muench 法滴定其半数组织感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)为 10⁴。本实验拟用 100TCID₅₀ 病毒接种小鼠。

1.2.2 模型建立

将小鼠分为实验组、药物对照组、病毒对照组和阴性对照组,实验组又分为低剂量 EPS 组、中剂量 EPS 组、高剂量 EPS 组,每组 15 只。戊巴比妥钠按 20 mg/kg 腹腔注射,麻醉小鼠,将其固定于实验台上,微量注射器于右眼角与外耳道口连线中点处垂直进针,有突破感时停止,进针深度 2~3 mm。除阴性对照组外其余组小鼠颅内分别注射 100TCID₅₀ HSV-1 30 μ L,阴性对照组注射 DMEM 30 μ L。次日低、中、高剂量实验组分别经腹腔注射红树林淡紫拟青霉 EPS 6 g/kg、8 g/kg 和 10 g/kg,每日 2 次;药物对照组注射阿昔洛韦 15 mg/kg,每日 2 次;病毒对照组和阴性对照组注射生理盐水 0.2 mL,每日 2 次;连续注射 7 d。每日观察记录小鼠进食、精神及活动状况等,对于死亡的小鼠立即开颅取其脑组织,备做免疫组织化学和 RT-qPCR。

1.2.3 免疫组织化学染色

EPS 干预 7 d 后处死小鼠, 无菌条件下切取左脑组织固定于 4% 多聚甲醛中, 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明; 石蜡包埋, 制备切片。SABC 法进行免疫组织化学染色, 操作严格按试剂盒说明书进行。石蜡切片常规脱蜡至水, 微波修复法修复抗原, 3% H_2O_2 避光孵育 15 min, 正常山羊血清工作液封闭 20 min, NF- κ B 一抗用兔抗鼠 NF- κ B p65 亚单位的多克隆抗体, 稀释度 1:200, 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜, 生物素标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 20 min, 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素孵育 20 min, DAB 显色液显色 1 min, 苏木素复染。镜下观察细胞染色情况, 阳性表达定位于细胞核, 每张切片 400 倍下选取 15 个不重复的视野, Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析 NF- κ B 表达情况。

1.2.4 RT-qPCR 检测小鼠脑组织 NF- κ B mRNA 表达

取各组小鼠右侧枕叶脑组织 20 mg, 预冷 PBS 冲洗, 立即置于 RNA 保护液中, 脑组织匀浆制备及 RNA 提取严格按照试剂盒说明书进行。提取完成后分别检测 A260 和 A280, 计算 RNA 浓度和纯度; 取各组 RNA 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 完整性。各组 RNA 按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA。NF- κ B^[8]: 上游引物 5'-GCA TCC AAC CTG AAA ATC GTG-3', 下游引物 5'-CCC CAA ATC CTT CCC AAA CTC-3', 由通用生物系统(安徽)有限公司合成; 内参 GAPDH^[9]: 上游引物 5'-TCT TGG GCT ACA CTG AGG AC-3', 下游引物 5'-TGT TGC TGT AGC CGT ATT CA -3'。反应体系: cDNA 2 μ L, SYBR 10 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, DEPC 水 6.4 μ L, 总共 20 μ L。反应条件: 93 $^{\circ}C$ 4 min; 93 $^{\circ}C$ 30 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 30 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次, Δ Ct 实验组 = Ct 实验组目的基因 - Ct 实验组 GAPDH, Δ Ct 空白组 = Ct 空白组目的基因 - Ct 空白组 GAPDH, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct 实验组 - Δ Ct 空白组, 目的基因 mRNA 相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计软件进行分析。计数资料以率表示, 采用 Fisher 确切概率法; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠发病及死亡情况

除阴性对照组外, 接种 HSV-1 的小鼠次日均出现了精神萎靡、食欲减退、蜷缩、竖毛等症状, 3~5 d

达高峰, 病毒对照组、低剂量和中剂量 EPS 组症状最为明显。病毒对照组小鼠死亡 5 只(33.3%), 低剂量 EPS 组死亡 3 只(20.0%), 中剂量、高剂量 EPS 组和药物对照组各死亡 2 只(13.3%), 阴性对照组小鼠无死亡。病毒对照组与阴性对照组小鼠死亡率比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 其他组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠脑组织免疫组织化学染色情况

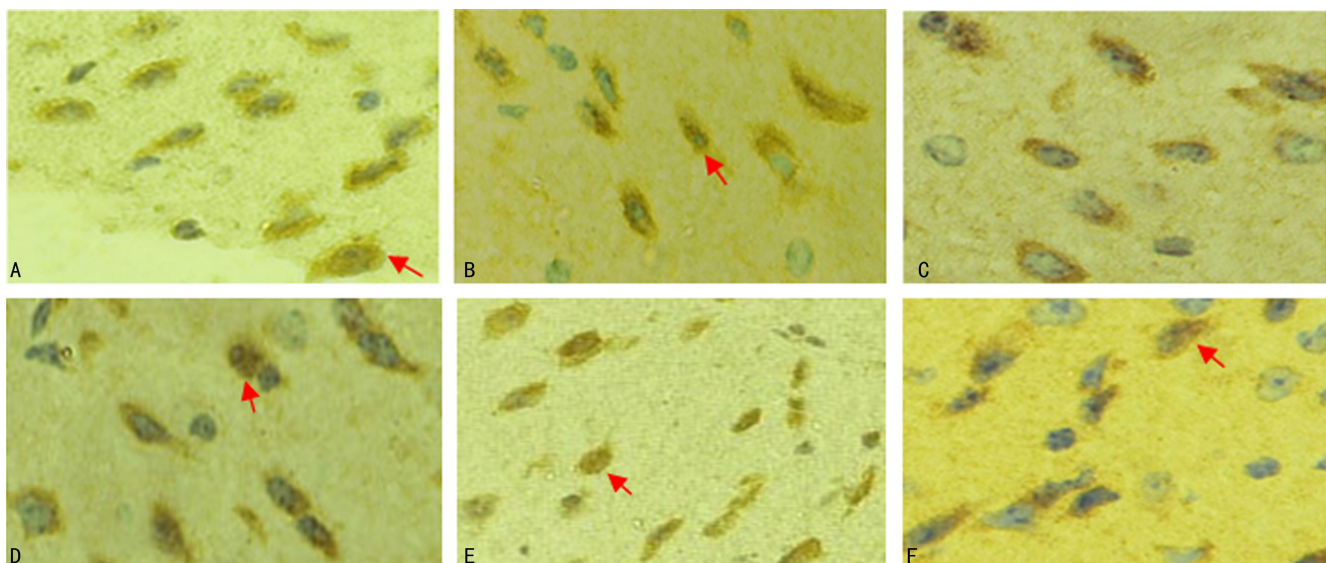
低剂量 EPS 组、中剂量 EPS 组、高剂量 EPS 组、药物对照组、病毒对照组、阴性对照组的 NF- κ B 表达水平分别为 20.033 ± 3.286 、 19.594 ± 3.207 、 15.282 ± 2.395 、 15.091 ± 2.423 、 21.962 ± 4.431 、 14.868 ± 2.490 。低剂量 EPS 组、中剂量 EPS 组、病毒对照组 NF- κ B 表达与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 高剂量 EPS 组、药物对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。低剂量、中剂量 EPS 组与病毒对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 高剂量 EPS 组、药物对照组与病毒对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。低剂量、中剂量 EPS 组与高剂量 EPS 组、药物对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。低剂量与中剂量 EPS 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 1。

2.3 RNA 纯度及完整性检测

随机取 3 份提取的小鼠脑组织 RNA, 测定其 A260 及 A280, 发现其 A260/A280 在 1.8~2.0, 说明 RNA 纯度较高。1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28 s、18 s、5 s 3 条清晰条带, 证明小鼠脑组织 RNA 完整性好, 见图 2。

2.4 各组小鼠脑组织 NF- κ B mRNA 表达

低剂量 EPS 组、中剂量 EPS 组、高剂量 EPS 组、药物对照组、病毒对照组、阴性对照组小鼠脑组织 NF- κ B mRNA 表达水平分别为 1.198 ± 0.213 、 1.135 ± 0.206 、 0.907 ± 0.165 、 0.900 ± 0.152 、 1.250 ± 0.164 、 0.898 ± 0.188 。低剂量、中剂量 EPS 组、病毒对照组与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 高剂量 EPS 组、药物对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。低剂量、中剂量 EPS 组与病毒对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 高剂量 EPS 组、药物对照组与病毒对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。低剂量、中剂量 EPS 组与高剂量 EPS 组、药物对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 低剂量组与中剂量组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:低剂量 EPS 组;B:中剂量 EPS 组;C:高剂量 EPS 组;D:药物对照组;E:病毒对照组;F:阴性对照组;红色箭头:阳性细胞染色定位于细胞核,根据染色深浅表现为棕黄至棕褐色。

图 1 各组小鼠脑组织免疫组织化学染色结果(×400)

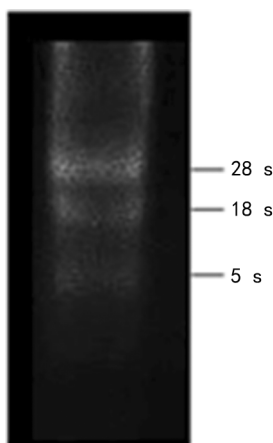


图 2 小鼠脑组织 RNA 完整性检测

3 讨 论

目前认为,小胶质细胞激活介导的继发性免疫损伤在 HSV-1 颅内感染发病中起着重要作用^[10-11]。其中,NF-κB 激活介导的炎症反应更为关键。HSV-1 感染诱导了 NF-κB 激酶的活化,使 NF-κB 磷酸化和泛素化,活化的 NF-κB 游离并转位至细胞核,刺激炎症细胞因子 IL-1β、TNF-α 及 IL-6 等的分泌^[12-14]。细胞因子的过度分泌介导的剧烈炎症反应参与并加重了中枢神经系统的免疫病理损伤,抑制 NF-κB 激活可能具有一定缓解 HSV-1 所致炎症损伤的作用。

本研究发现,颅内接种病毒的小鼠次日即出现倦怠、蜷缩、抽搐、毛发紊乱等症状,接种后 7 d 内病毒对照组小鼠死亡最多,初步表明 EPS 具有一定的改善病毒感染小鼠生存的作用。

免疫组织化学和 RT-qPCR 检测发现,各剂量 EPS 对 NF-κB 表达均有一定抑制作用,其中高剂量

EPS 组和药物对照组抑制作用最明显,而低剂量和中剂量 EPS 对其表达无明显抑制作用。以上结果表明 HSV-1 引起的小鼠颅内感染可导致 NF-κB 大量激活,红树林来源的淡紫拟青霉 EPS 对其激活具有一定抑制作用,且该作用呈现一定的剂量依赖性,其中高剂量 EPS 抑制作用明显,而低剂量和中剂量无明显抑制作用。

综上所述,红树林淡紫拟青霉 EPS 对小鼠 HSV-1 颅内感染导致的脑组织 NF-κB 激活表现出一定抑制作用,这可能是该 EPS 抗 HSV-1 感染的机制之一,但其作用是否通过结合 TLR 完成还需进一步证实。

参考文献

[1] TAN T, XIA L. TRIM21 aggravates herpes simplex virus epithelial keratitis by attenuating STING-IRF3-Mediated type I interferon signaling [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 703.

[2] PACHOTA M, KLYSIK K, SYNOWIEC A, et al. Inhibition of herpes simplex viruses by cationic dextran derivatives [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(20): 8620-8630.

[3] SHI L, YIN F, XIN X, et al. Astragalus polysaccharide protects astrocytes from being infected by HSV-1 through TLR3/NF-κB signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 285356.

[4] SABAH M, MULCAHY J, ZENAN A. Herpes

- simplex encephalitis [J]. *Praxis (Bern 1994)*, 2012,101(22):1437-1440.
- [5] LI L J, ZHANG S J, LIU P, et al. Corilagin interferes with toll-like receptor 3-mediated immune response in herpes simplex encephalitis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12:83.
- [6] LIU H, CHEN K, FENG W, et al. TLR4-MyD88/Mal-NF- κ B axis is involved in infection of HSV-2 in human cervical epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e80327.
- [7] 王永霞, 胡海岩, 杨文, 等. 红树林淡紫拟青霉 EPS 提取物体外抗 HSV-1 机制研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(1):5-9.
- [8] 梅自洁. a7-nAChR 激动剂 GTS-21 对小鼠放射性肺损伤的保护作用及机制研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2015.
- [9] KUMAR D, SINGLA S K, PURI V, et al. The restrained expression of NF- κ B in renal tissue ameliorates folic acid induced acute kidney injury in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):1-23.
- [10] LOKENSGARD J R, HU S, SHENG W, et al. Robust expression of TNF- α , IL-1, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus [J]. *Neurovirol*, 2001, 7(3):208-219.
- [11] MENASRIA R, CANIVET C, PIRET J, et al. Protective role of CX3CR1 signalling in resident cells of the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis [J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(3):447-460.
- [12] PIRET J, BOIVIN G. Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25(5):300-319.
- [13] LIU W, FAN Z, HAN Y, et al. Activation of NF- κ B signaling pathway in HSV-1-induced mouse facial palsy: possible relation to therapeutic effect of glucocorticoids [J]. *Neuroscience*, 2015, 289:251-261.
- [14] ZHENG S Q, LI Y X, ZHANG Y, et al. MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B [J]. *Antiviral Res*, 2011, 89:219-226.
- (收稿日期:2020-08-28 修回日期:2021-02-16)
-
- (上接第 1987 页)
- macrophage-mediated inflammation in diabetic wound healing [J]. *Front Immunol*, 2017, 8:635.
- [18] ZHENG S, ZHANG P, CHEN Y, et al. Inhibition of Notch signaling attenuates schistosomiasis hepatic fibrosis via blocking macrophage M2 polarization [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11):e0166808.
- [19] ROCCA C, FEMMINO S, AQUILA G, et al. Notch1 mediates preconditioning protection induced by GPER in normotensive and hypertensive female rat hearts [J]. *Front Physiol*, 2018, 9:521.
- [20] KASPER I R, APOSTOLIDIS S A, SHARABI A, et al. Empowering regulatory T cells in autoimmunity [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(9):784-797.
- [21] TIEN Y C, LIN J Y, LAI C H, et al. *Carthamus tinctorius* L. prevents LPS-induced TNF α signaling activation and cell apoptosis through JNK1/2-NF κ B pathway inhibition in H9c2 cardiomyoblast cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(3):505-513.
- [22] WANG P, SHU B, XU Y, et al. Basic fibroblast growth factor reduces scar by inhibiting the differentiation of epidermal stem cells to myofibroblasts via the Notch1/Jagged1 pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):114.
- [23] SUN W, ZHANG H, WANG H, et al. Targeting Notch-Activated M1 macrophages attenuates joint tissue damage in a mouse model of inflammatory arthritis [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(7):1469-1480.
- [24] ZEKE A, MISHEVA M, REMENYI A, et al. JNK signaling: regulation and functions based on complex protein-protein partnerships [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3):793-835.
- [25] SOLINAS G, BECATTINI B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response [J]. *Mol Metab*, 2017, 6(2):174-184.
- [26] WU Q, WU W, FU B, et al. JNK signaling in cancer cell survival [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(6):2082-2104.
- (收稿日期:2020-09-18 修回日期:2021-03-02)