

DOI:10.13350/j.cjpb.220104

• 论著 •

肝素酶在人 β -防御素-3抗甲型流感病毒的作用研究*杨小余¹, 马贵凤¹, 唐源¹, 罗红³, 江滢^{1,2**}(1. 贵州医科大学医学检验学院临床微生物与免疫学教研室, 贵州贵阳 550025;
2. 贵州医科大学附属医院临床检验中心微生物免疫科; 3. 贵州医科大学实验动物中心)

【摘要】 **目的** 探讨肝素酶在人 β -防御素-3(Human β -defensin 3, HBD3)抗甲型流感病毒(Influenza A virus, IAV)中的作用。**方法** 采用CCK8法检测肝素酶对人支气管上皮细胞(BEAS-2B)的毒性情况;经肝素酶处理BEAS-2B细胞,并在4℃下与HBD3和IAV病毒液孵育2h,分为未处理组(HBD3+IAV),肝素酶+HBD3+IAV组,提取细胞总RNA和总蛋白,采用qRT-PCR检测感染细胞中的NP mRNA表达水平,Western blot和免疫共沉淀检测HBD3和IAV HA蛋白表达水平以及HBD3和HA蛋白的相互作用。试验设未经肝素酶处理BEAS-2B细胞对照组。**结果** 肝素酶作用48h,其浓度在30 U/mL以下浓度时对细胞无毒性作用;HBD3干预IAV感染细胞后细胞中的NP mRNA表达水平显著降低($t=12.81, 26.13, 28.68, P<0.01$),经肝素酶处理IAV感染的细胞其NP mRNA表达水平升高($t=-4.55, P<0.05$),结果显示HBD3可抑制病毒复制,而经肝素酶处理IAV感染的细胞其病毒未减少,表明只使用肝素酶不能降低病毒感染;与未经肝素酶处理的细胞相比,经肝素酶处理的细胞中HBD3和HA蛋白表达水平降低,以及HBD3和HA蛋白的相互作用显著降低($P<0.01$),表明HBD3和肝素酶共同作用可降低HA的表达来阻止IAV进入细胞。**结论** 肝素酶和HBD3共同作用可以抑制病毒进入细胞,具有抗甲型流感病作用。

【关键词】 甲型流感病毒;人 β -防御素3;肝素酶;糖胺聚糖蛋白**【中图分类号】** R373.1**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)01-0014-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan;17(1):14-17, 21.]

Effect of heparinase on human β -defensin-3 against influenza A virusYANG Xiao-yu¹, MA Gui-feng¹, TANG Yuan¹, LUO Hong³, JIANG Yan^{1,2} (1. Department of Microbiology and Immunology, School of Clinical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Clinical Laboratory Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University; 3. The Laboratory Animal Center of Guizhou Medical University)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of heparinase on human β -defensin-3 (HBD3) against influenza A virus (IAV). **Methods** The toxicity of heparinase to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) was detected using CCK8 test. BEAS-2B cells were treated with heparinase, and incubated with HBD3 and IAV virus for two hours at 4℃. The experimental groups were divided into untreated group (HBD3+IAV) and heparinase+HBD3+IAV group. Total RNA and total protein were extracted. The expression of NP mRNA in infected cells was detected by qRT-PCR. The expression of HBD3 and IAV HA protein were detected by Western Blot test, and the interaction between HBD3 and HA protein was detected using immunoprecipitation. **Results** Heparinase at the concentration below 30 U/ml had no toxic effect on BEAS-2B cells for 48 hours. The expression level of NP mRNA in IAV infected cells with HBD3 treatment was significantly lower than that of IAV infected cells ($t=12.81, 26.13, 28.68, P<0.01$). The expression level of NP mRNA in IAV infected cells treated with heparinase was higher than that of the HBD3+IAV group ($t=-4.55, P<0.05$). The results showed that HBD3 could inhibit virus replication. It indicated that heparinase could not inhibit virus infection, that heparinase did not reduce the amount of IAV. Compared with untreated cells, the expression of HBD3 and HA proteins and the interaction between HBD3 and HA proteins decreased significantly in heparinase treated cells. The results showed that the combined action of HBD3 and heparinase could reduce the expression of HA to prevent IAV entering cells. **Conclusion** The combined action of heparinase and HBD3 could inhibit the entry of IAV into BEAS-2B cells and play an anti-IAV role.

【Key words】 Influenza A virus; Human β -defensin 3; heparinase; Glycosaminoglycan protein* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No:81260249);“贵州省实验动物管理服务平台”中央引导地方科技发展专项基金项目(黔科中引地[2016]4007号)资助。** **【通讯作者】** 江滢, E-mail:624057523@qq.com**【作者简介】** 杨小余(1995-),女,贵州遵义人,在读硕士,初级检验师,主要研究方向:医学病毒学。E-mail:1249901975@qq.com

甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)是一种常见的呼吸道病原体,人体感染后损坏呼吸道上皮组织和肺组织,降低呼吸能力,引发疾病,重症者可导致死亡,全球每年多达50万以上的感染者死亡,这对人类健康和经济造成严重威胁^[1-2]。目前,临床上有多种抑制剂作为抗流感药物,如神经氨酸酶(NA)抑制剂, M2离子通道抑制等。由于IAV的表面结构蛋白HA和NA抗原性容易变异而出现的变异毒株^[3],对抗IAV药物产生耐药性,而抗菌肽(Antimicrobial peptide, AMP)被认为是针对IAV感染的新型治疗方法的潜在候选药物,亟待进一步研究。

人β-防御素(human β-defensins, HBD)是一类上皮细胞衍生的AMP,具有抗菌、抗病毒、调节免疫等多种生物学活性^[4]。目前研究已明确HBD有6种(HBD-1~6),其中HBD3具有较强的抗菌活性和抗病毒能力^[5-6]。β-防御素3在体内具有抗流感病毒作用,保护细胞和小鼠免受IAV感染^[7-8]。Leikina等^[9]表明HBD3通过凝集素活性交联宿主糖蛋白,从而阻断由病毒HA介导的膜融合来抑制流感病毒感染。β-防御素3作为预防和治疗流感的药物,其抗流感病毒机制尚不清楚。

肝素酶(heparinase)是一种生物催化剂,能够特异性裂解细胞外基质和基底膜中的硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)^[10]。HSPG是由一个或多个硫酸乙酰肝素(HS)共价连接至糖胺聚糖(GAG)链的核心蛋白组成的线性多糖,广泛存在于细胞表面和细胞外基质中,介导许多生物学活性^[11]。病毒在感染的吸附和进入过程中可利用细胞表面的GAG作为一种低亲和受体增大对细胞感染的机会,Leistner等发现^[12]肝素酶对细胞表面蛋白进行预处理可以减少HBV病毒感染。本研究用肝素酶协同HBD3作用IAV感染的人支气管上皮细胞,检测感染细胞NP mRNA的表达水平以及HBD3和IAV蛋白HA的表达情况以及经肝素酶处理后HBD3和HA的相互作用,探讨肝素酶在HBD3抗流感病毒中的机制作用。

材料与方法

1 材料

1.1 病毒株和细胞 甲型流感病毒A/PR/8/34(H1N1)毒株为本课题组保存;人正常支气管上皮细胞(BEAS-2B)购自于中国科学院昆明细胞库。

1.2 主要试剂和仪器 HBD3购自美国Novus公司;肝素酶购自北京阿斯雷尔生物技术有限公司;CCK8细胞增殖检测试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司;RNAsimple总RNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购

自北京索莱宝科技有限公司;PVDF、ECL显色试剂盒购自美国Millipore公司;兔抗HBD3抗体购自英国Abcam公司;兔抗HA抗体购自北京义翘神州科技有限公司;兔抗GAPDH抗体均购自杭州贤至生物科技有限公司;Immunoprecipitation(IP) Kit购自美国Biovision公司。

2 方法

2.1 细胞培养与感染 生长80%~90%成片的BEAS-2B细胞经0.25%胰酶消化后,进行细胞传代至6孔板,细胞浓度约 5×10^5 个/mL·孔,置37℃、5%CO₂恒温箱培养。肝素酶在37℃预处理细胞1h,然后用IAV(50×TCID₅₀)病毒液和HBD3在4℃作用2h,继续培养48h。

2.2 CCK8法检测肝素酶对IAV感染细胞的增殖情况 将BEAS-2B细胞传代铺板,加入不同浓度肝素酶(20 U/mL、10 U/mL、5 U/mL、2.5 U/mL、1.25 U/mL)作用1h,每个浓度复孔3孔,然后加入100 μL IAV(50×TCID₅₀)吸附1.5h,设置对照孔,加入新鲜培养液,继续培养48h;每孔加入10 μL 7Sea-Cell Counting Kit溶液,设置不加细胞的空白对照孔(细胞培养液+肝素酶+7Sea-Cell Counting Kit溶液),放置培养箱中培养2h;用酶标仪测定在450 nm处的吸光度值,根据每孔吸光度值,计算出细胞存活率。细胞存活率=[(实验孔A₄₅₀-空白孔A)/(对照孔A₄₅₀-空白孔A₄₅₀)]×100%。

2.3 qRT-PCR检测IAV感染细胞的NP mRNA表达水平 用不同浓度的HBD3(5 μg/mL、2.5 μg/mL、1.25 μg/mL)或不同浓度的肝素酶(30 U/mL、15 U/mL、7.5 U/mL)处理IAV感染细胞,培养48h;用1×PBS漂洗细胞3次后,每孔加入0.5 mL RZ裂解液,移至1.5 mL无酶的灭菌EP管中,根据总RNA提取试剂盒步骤提取细胞总RNA,根据逆转录试剂盒操作说明书合成cDNA,将逆转录后的cDNA模板、UltraSYBR Mixture及引物序列(表1)等相应试剂加入PCR八联管中,置实时荧光定量PCR基因扩增仪上进行扩增,反应结束后记录各组的CT值,所有标本均在相同反应体系及条件下设置3孔,分别以GAPDH为内参,计算各组细胞中NP mRNA表达量,并对表达量的比值($2^{-\Delta\Delta C_t}$)进行分析。

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for quantitative real time PCR

基因名称 Gene	引物(5'-3') Primer	引物序列 Sequence	产物长度 Size(bp)
NP	Foward primer	GACGATGCAACGGCTGGTCTG	147
	Reverse primer	AGCATTGTTCCAACCTCTTT	
GAPDH	Foward primer	AGGGCAATGCCAGCCCCAGCG	118
	Reverse primer	AGGCGTCGGAGGCCCCCTC	

2.4 Western blot 检测感染细胞的 HBD3、HA 的表达水平 用 1×PBS 漂洗 3 次,加入含 1×PMSF 的 RIPA 裂解液,收集裂解产物,12 000 r/min 离心 2min,取上清,根据 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度;按 10% 和 15% 制备分离胶和浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,并湿转至 PVDF 膜上,将 PVDF 膜面朝上放入封闭液内,摇床上室温封闭 2 h;加入一抗(兔抗 HA、HBD3、GAPDH)4℃ 孵育过夜,用 1×TBST 在摇床中 5 min/3 次洗 PVDF 膜,加入二抗(HRP-羊抗兔 IgG),摇床共孵育 60 min,用曝光系统的凝胶成像仪扫描记录结果,采用 Image J 软件对目的条带进行灰度值分析,相对表达量=目的条带灰度值/内参蛋白灰度值。

2.5 免疫共沉淀试验检测肝素酶对 HBD3 与 IAV 蛋白 HA 的相互作用 用 1×PBS 漂洗 3 次,加适量细胞裂解缓冲液,将裂解液在 4℃ 下搅拌 30 min,10 000 g 离心 10 min 取上清,加兔抗 HBD3 抗体,4℃ 缓慢摇晃孵育过夜;取 10 μL protein A 琼脂糖珠,用裂解缓冲液洗 3 次,每次 2 000 g 离心 2 min,将预处理过的 10 μL protein A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中 4℃ 缓慢摇晃孵育 2~4 h,使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连;在 4℃ 以 2 000 g 离心 2 min,将琼脂糖珠离心至管底,去上清,用裂解缓冲液洗 3 次;最后加入 15 μL 2×SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 min,用 SDS-PAGE 分析。

2.6 数据分析 使用 SPSS22.0 软件行进行统计学分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异性比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用独立样本的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 的差异具有统计学意义。

结果

1 肝素酶对 BEAS-2B 细胞的毒性情况

用肝素酶作用细胞 48 h 后,CCK8 法检测的结果显示肝素酶在 30 U/mL 以下浓度时,对细胞无毒性作用($P > 0.05$)(图 1)。

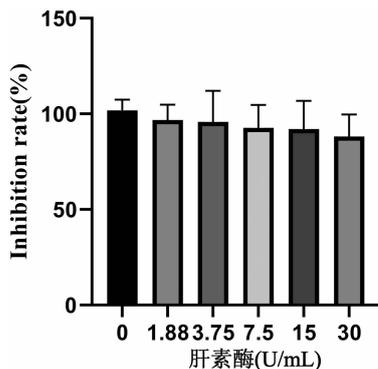


图 1 肝素酶对 BEAS-2B 细胞的毒性作用
Fig. 1 Toxicity of heparinase on BEAS-2B cells

2 HBD3 和 肝素酶的抗甲型流感病毒作用

qRT-PCR 法检测 BEAS-2B 细胞中 IAV NP mRNA 的表达,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 IAV NP mRNA 的相对表达量。HBD3 作用 IAV 感染细胞 48 h 后,与 IAV 组相比,HBD3 (5 μg/mL、2.5 μg/mL、1.25 μg/mL)组中 NPmRNA 表达水平显著降低($t = 12.81、26.13、28.68, P < 0.01$),且与 HBD3 呈剂量依赖性关系(图 2A)。肝素酶处理 IAV 感染细胞后 48 h 发现,与 IAV 组相比,肝素酶浓度为 30 U/mL 时,IAV NP mRNA 的表达明显升高($t = -4.55, P < 0.05$)(图 2B)。

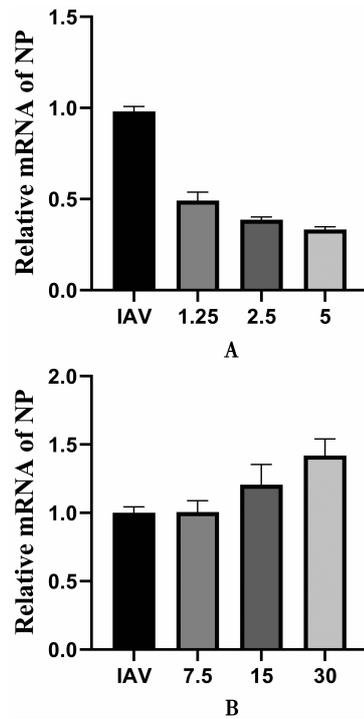


图 2 IAV 感染细胞的 NP mRNA 表达水平
Fig. 2 NP mRNA expression level of IAV infected cells

3 肝素酶在 HBD3 抗流感病毒中的作用

3.1 肝素酶对 HBD3 和 HA 蛋白表达水平的影响 肝素酶处理或未用肝素酶处理 IAV 感染的 BEAS-2B 细胞,并在 4℃ 下与 HBD3 孵育 2 h,采用 Western blot 方法检测 HBD3 和 HA 的蛋白表达水平,结果经 Image J 软件对目的条带进行灰度值分析发现,与肝素酶未处理组相比,肝素酶处理组中 HBD3 在 BEAS-2B 细胞中的蛋白表达水平降低($P < 0.01$)(图 3);与肝素酶未处理相比,肝素酶处理组中 HA 在 BEAS-2B 细胞上的蛋白表达水平降低($P < 0.01$)(图 3)。

3.2 肝素酶对 HBD3 和 HA 蛋白相互作用的影响 采用免疫共沉淀方法检测,结果发现 HBD3 与 IAV HA 蛋白相互作用,且肝素酶处理组中降低了 BEAS-2B 细胞上的 HBD3 蛋白表达水平($P < 0.01$),IAV 的 HA 蛋白表达水平差异不显著($P > 0.05$)(图 4)。

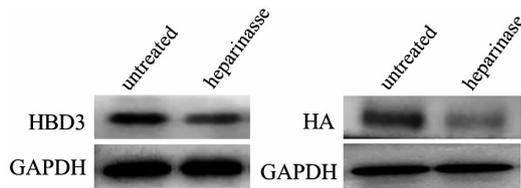


图3 肝素酶降低 BEAS-2B 细胞中 HBD3 和 HA 的表达
Fig. 3 Heparinase decreased HBD3 and HA expression in BEAS-2B cells

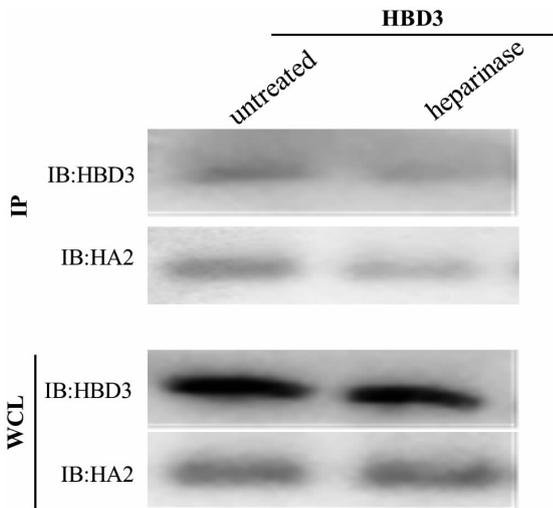


图4 HBD3 和 HA 蛋白的相互作用
Fig. 4 Interaction between HBD3 and HA protein

讨论

防御素是富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽,有 α 、 β 、 θ 3 类,可以直接作用于病毒的包膜、糖蛋白和衣壳,抑制病毒融合,阻断宿主细胞受体并与病毒糖蛋白结合以及阻止细胞内信号的转导等来抑制病毒的复制^[13-14]。除了具有直接的抗病毒特性外,防御素还起细胞因子或趋化因子的作用,以增强抗微生物的免疫反应,从而间接影响病毒的发病机制^[14]。其中 β -防御素的抗病毒潜力不同于其他的抗菌肽,因其在半胱氨酸残基之间具有分子内二硫键以稳定其结构,并且 β -防御素是由上皮细胞响应微生物刺激而诱导产生的,以诱导型表达发挥作用,能够及时准确地识别和中和感染病原体,可以为许多病毒感染的第一道防线^[15-16]。我们前期的研究证明了重组小鼠 β -防御素 3 (rMBD3) 在体外和体内对流感病毒均有抗病毒活性,是通过阻止病毒结合和进入来保护细胞免受病毒感染^[17]。

流感病毒侵入主要是通过结构蛋白 HA 与含唾液酸的细胞表面分子结合来介导病毒与靶细胞的附着,核内体 pH 降低会触发 HA 的结构重排,最终导致病毒膜与内体膜间融合,使核衣壳进入细胞质^[18]。HA 高度可变,球状头部中糖基化模式的改变被认为是其免疫逃逸机制之一,考虑到凝集素样糖蛋白的结

合活性,防御素可阻断糖基化球状头部区域以增强 HA 亚基的保守茎区对特定 B 细胞的诱导^[19]。细胞中的 HSPG 可以与病毒表面糖蛋白或非包膜病毒的衣壳蛋白的残基发生静电相互作用,这种弱的相互作用被病毒用来增加它们在细胞表面的浓度,并增加它们特异性结合进入受体的机会^[20]。本研究使用肝素酶预处理抑制 BEAS-2B 细胞膜和细胞外基质中糖蛋白,当用肝素酶处理后,IAV 感染的细胞中 NP mRNA 升高,表明流感病毒复制与细胞中的 GAG 蛋白作用,降低细胞表面 GAG 蛋白不一定能抑制流感病毒的感染。人 β -防御素能够与 GAG 结合,如肝素/HSPG,形成复合物,在呈递防御素中起重要作用^[21-22]。本研究用肝素酶预处理 HBD3 干预的 IAV 感染细胞,Western blot 结果显示,IAV HA 蛋白表达降低,以及通过免疫共沉淀方法检测发现 HBD3 和 HA 相互作用,因此进一步证明了 HBD3 降低 IAV 感染是通过抑制 HA 介导的病毒融合和膜蛋白迁移来完成的。

人 β -防御素抗病毒机制较复杂,病毒减少的原因与防御素对病毒复制及与宿主的间接影响作用尚不清楚。本研究使用肝素酶探讨其在 HBD3 抗流感病毒中的作用,用肝素酶处理细胞,表明存在 HSPG 时,能够促进 HBD3 和 HA 作用并结合与细胞表面,抑制流感病毒进入细胞,减少病毒感染,具有抗甲型流感病作用。

【参考文献】

- [1] Meineke R, Rimmelzwaan GF, Elbahesh H. Influenza Virus Infections and Cellular Kinases[J]. Viruses, 2019, 11(2): 171.
- [2] Betakova T, Kostrabova A, Lachova V, et al. Cytokines induced during influenza virus infection[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(18): 2616-2622.
- [3] Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10): e1003657.
- [4] Wilson SS, Wiens ME, Holly MK, et al. Defensins at the mucosal surface: latest insights into defensin-virus interactions[J]. J Virol, 2016, 90(11): 5216-5218.
- [5] Fruitwala S, El-Naccache DW, Chang TL. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms[J]. Semin Cell Dev Biol, 2019(88): 163-172.
- [6] Feng Z, Dubyak G R, Lederman M M, et al. Cutting edge: human beta defensin 3—a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4[J]. J Immunol, 2006, 177(2): 782-786.
- [7] Jiang Y, Wang Y, Kuang Y, et al. Expression of mouse beta-defensin-3 in MDCK cells and its anti-influenza-virus activity[J]. Arch Virol, 2009, 154(4): 639-647.
- [8] 牟秋菊, 朱颜鑫, 智妍, 等. 重组小鼠 β 防御素 3 体内抗甲型流感病毒 H1N1 作用[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(5): 521-524.

